

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Antonia Jakovčević

Nazočnost 4-hidroksi-2-nonenal-a (HNE-a) u pločastom
karcinomu orofarinksa

Doktorska disertacija

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

NAZOČNOST 4-HIDROKSI-2-NONENALA –a (HNE-a) U PLOČASTOM KARCINOMU OROFARINKSA

Antonia Jakovčević

Disertacija je izrađena u: Klinički zavod za patologiju i citologiju, KBC Zagreb

Mentor/i: prof. dr. sc. Kamelija Žarković

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Povećana incidencija pločastog karcinoma orofarinksa je udružena s pušenjem, alkoholom i infekcijom s humanim papiloma virusom (HPV). Osim ovih faktora karcinogeneza je također povezana s oksidacijskim stresom i lipidnom peroksidacijom. Cilj ovog retrospektivnog istraživanja je bio utvrditi imunohistokemijsku nazočnosti HNE i p53 u pločastom karcinomu orofarinksa. Nazočnost HNE-a zamijećena je u gotovo svim uzorcima pločastog karcinoma i u okolnom netumorskom tkivu te je njegova ekspresija najizraženija u dobro i umjereno diferenciranim tumorima dok se u slabo diferenciranim tumorima smanjuje. Sukladno tomu, u uznapredovalim stadijima bolesti također pada ekspresija HNE-a kako u u tumoru tako i u okolnom tkivu. Nađena je korelacija distribucije HNE-a i p53 u uznapredovalim stadijima bolesti, dok se nazočnost p53 u tumoru i okolnom zdravom epitelu povećava s porastom gradusa tumora. Ovo istraživanje je potvrdilo važnost oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije te HNE histidinskog konjugata kao njihovog važnog bioaktivnog markera u karcinogenezi pločastog karcinoma orofarinksa i okolnog netumorskog tkiva.

Broj stranica: 128

Broj slika: 43

Broj tablica: 13

Broj literaturnih navoda: 127

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: oksidacijski stres, lipidna peroksidacija, HNE, pločasti karcinom, orofarinks

Datum obrane: 19. 05. 2016.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Jerko Barbić, redoviti profesor
2. prof. dr. sc. Kamelija Žarković, redovita profesorica (mentor)
3. prof. dr. sc. Neven Žarković, izvanredni profesor, znanstveni savjetnik, trajno zvanje
4. prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica (zamjena)

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science
Scientific Fields: Biology and Basic medical sciences

THE APPEARANCE OF 4-HYDROXY-2-NONENAL (HNE) IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE OROPHARYNX

Antonia Jakovčević

Thesis performed at: Department of Pathology and Cytology, UHC Zagreb

Supervisor/s: prof. dr. sc. Kamelija Žarković

Short abstract:

The increasing incidence of squamous cell carcinoma of the oropharynx is associated with smoking, alcohol and infection of human papilloma virus (HPV). Beside these factors, carcinogenesis is connected also with oxidative stress and lipid peroxidation. Therefore, the aim of this retrospective study was to determine the immunohistochemical expression of HNE-histidine conjugates and p53 in squamous cell carcinoma of the oropharynx. The HNE immunopositivity was found positive in almost all tumour samples and in the surrounding non-tumorous tissue. The level of HNE immunopositivity was higher in well and moderately differentiated squamous cell carcinoma, while it was gradually decreasing in poorly differentiated carcinomas and in advanced stages of disease. The appearance of HNE and p53 distribution were found to be mutually related in advanced stages of disease, since the expression of p53 in tumour cells and in non-malignant squamous epithelium increased with the histological grade of the tumour. This study confirmed the importance of oxidative stress and lipid peroxidation and HNE-histidine adducts as their valuable bioactive marker of carcinogenesis in squamous cell carcinoma of the oropharynx and in the surrounding non-tumorous tissue.

Number of pages: 128

Number of figures: 43

Number of tables: 13

Number of references: 127

Original in: Croatian

Key words: oxidative stress, lipid peroxidation, HNE, squamous cell carcinoma, oropharynx

Date of the thesis defense: 19. 05. 2016.

Reviewers:

1. Prof Jerko Barbić, PhD, MD, Full professor
2. Prof Kamelija Žarković, PhD, MD, Full professor (supervisor)
3. Prof Neven Žarković, PhD, MD, Senior scientist, Associate professor
4. Prof Vera Cesar, PhD, Full professor (substitute)

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

Doktorska disertacija izrađena je na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditeljica rada je prof. dr. sc. Kamelija Žarković.

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Kameliji Žarković na izvrsnoj suradnji, strpljenju i nesebičnoj podršci u mom znanstvenom i profesionalnom radu.

Hvala prof. dr. sc. Nevenu Žarkoviću na stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada te brojnim sugestijama i podršci.

Zahvalnost upućujem i prim. dr. Zoranu Rakušiću na susretljivosti u sakupljanju podataka o bolesnicima koji su uključeni u ovo istraživanje.

Veliko hvala tehničarki Nevenki Borić na pomoći obrade preparata za imunohistokemijsku analizu.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Georg Waegu na donaciji monoklonskog protutijela na HNE-histidinske konjugate.

Posebno zahvaljujem svojim roditeljima i sestri te svim prijateljima i kolegama na strpljenju i podršci. Veliko hvala svima što ste uz mene!!!

SADRŽAJ

I. POPIS KRATICA.....	I
1. UVOD	1
1.1. Anatomija orofarinksa	3
1.2. Tumori orofarinksa	7
1.3. Epidemiologija tumora orofarinksa.....	9
1.4. Etiologija karcinoma orofarinksa	10
1.5. Dijagnostika tumora orofarinksa	12
1.6. Klasifikacija karcinoma orofarinksa	13
1.6.1. Eitelne prekursorske lezije.....	13
1.6.2. Patohistološka klasifikacija pločastog karcinoma	15
1.6.3. Prognostički čimbenici	20
1.6.4. TNM klasifikacija i stadij bolesti karcinoma orofarinksa.....	21
1.7. P53 kao biljeg karcinogeneze pločastog karcinoma orofarinksa.....	24
1.8. Oksidacijski stres	26
1.8.1. Slobodni radikali	26
1.8.2. Reaktivni kisikovi spojevi	27
1.8.3. Slobodni radikali dušika	29
1.8.4. Lipidna peroksidacija	29
1.8.5. 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)	31
1.8.6. Oksidacijski stres i karcinogeneza	33
1.8.7. ROS i HNE u karcinogenezi	36
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA	39
3. MATERIJAL I METODE	40
3.1. Ispitanici.....	40
3.2. Obrada uzoraka i priprema tkiva za svjetlosnu mikroskopsku analizu	41
3.3. Imunohistokemijsko bojenje preparata protutijelom HNE	45
3.4. Imunohistokemijsko bojenje preparata protutijelom p53	45
3.5. Analiza imunohistokemijskih preparata	46
3.6. Statistička obrada podataka	47

4. REZULTATI	48
4.1. Analiza obilježja tumora odabranih za imunohistokemijsku obradu	48
4.2. Kontrolna skupina	56
4.3. Imunohistokemijska nazočnost 4-hidroksinonenala u pločastom karcinomu.....	58
4.4. Usporedba nazočnosti HNE-a s ostalim prognostičkim čimbenicima.....	70
4.4.1. Usporedba nazočnosti HNE-a u pločastom karcinomu po kliničkim stadijima bolesti...	70
4.4.2. Usporedba nazočnosti HNE-a u epitelu sluznice uz tumor prema kliničkim stadijima bolesti i kontrolnom uzorku	72
4.4.3. Usporedba nazočnosti HNE-a s ostalim parametrima	74
4.4.4. Usporedba nazočnosti HNE-a u pločastom karcinomu prema gradusu	77
4.4.5. Usporedba nazočnosti HNE-a u epitelu sluznice uz tumor prema gradusu tumora i kontrolnom uzorku	82
4.4.6. Usporedba nazočnosti HNE-a u tumoru prema kontrolnoj skupini	83
4.4.7. Usporedba nazočnosti HNE-a u upalnim stanicama u tumorskoj stromi prema histološkom gradusu tumora	86
4.5. Imunohistokemijska nazočnost p53 u pločastom karcinomu	87
4.5.1. Usporedba nazočnosti p53 u tumoru i okolnom epitelu uz tumor po kliničkim stadijima bolesti	88
4.5.2. Usporedba nazočnosti p53 u tumoru i okolnom epitelu uz tumor po histološkom gradusu tumora	91
4.6. Istovremena nazočnost HNE i p53 u pločastom karcinomu	97
4.7. Istovremena nazočnost HNE i p53 u okolini uz tumor	100
5. RASPRAVA	101
6. ZAKLJUČCI	107
7. LITERATURA	109
8. SAŽETAK	121
9. SUMMARY	122
10. ŽIVOTOPIS	123

I. POPIS KRATICA

AJCC - Američko društvo za rak (eng. American Joint Committee on Cancer)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. Deoxyribonucleic acid)

DAB - diaminobenzidin

GSH – glutation

GST – glutation-transferaza

HNE – 4-hidroksinonenal

HPV- humani papilloma virus

IH – imunohistokemija

LOH – gubitak heterozigotnosti

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. Mitogen activated protein kinase)

MDA – malondialdehid

MR- magnetska rezonanca

MMP1- matriksna metaloproteaza 1

MMP2- matriksna metaloproteaza 2

NHL- Non- Hodgkin limfom

OS – oksidacijski stres

8-oksodG- 8-okso^{2'}-deoksigvanozin (engl. 8-oxo^{2'}-deoxyguanosine)

8-OHdG- 8-hidroksi^{2'}-deoksigvanozin (engl. 8-hydroxy^{2'}- deoxyguanosine)

PUFA – višestruko nezasićene masne kiseline (engl. Polyunsaturated fatty acids)

RNA- ribonukleinska kiselina (engl. Ribonucleic acid)

RNS – reaktivne dušikove vrste (engl. Reactive nitrogen species)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. Reactive oxygen species)

SOD – superoksid dismutaza

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

SŽS – središnji živčani sustav

TNF- α – faktor nekroze tumora α (engl. Tumor necrosis factor α)

1. UVOD

Maligni tumori glave i vrata su heterogena skupina novotvorina koja nastaje iz epitela sluznice gornjeg respiratornog i probavnog sustava. Oni obuhvaćaju tumore nosa i paranazalnih sinusa, usne šupljine, ždrijela, grla i žlijezda slinovnica. Tumori koji nastaju na sluznici građenoj od mnogoslojnog pločastog epitela imaju histološku sliku pločastog karcinoma koji je najzastupljeniji patohistološki tip tumora glave i vrata (1). Glavna anatomsko i funkcionalna karakteristika gornjeg respiratornog i probavnog trakta je križanje puta disanja i gutanja te funkcija govora. Pojava tumora na tim lokalizacijama vezana je za poremećaj tih struktura i njihova simptomatologija izaziva kod bolesnika traumu. U pristupu liječenju potrebno je odabrati pravi modalitet gledajući najučinkovitiju terapiju i održavanje estetskog i funkcionalnog integriteta bolesnika (2).

Pločasti karcinom glave i vrata čini 6% svih karcinoma i šesti je po učestalosti među karcinomima. Ukupno 5-godišnje preživljenje u bolesnika s ovim tipom karcinoma je nisko, u usporedbi s drugim tipovima karcinoma (3). Češće se javlja kod muškaraca u dobi iznad 60-te godine života, a od etioloških čimbenika rizika najznačajniji su duhan i alkohol te humani papiloma virus (HPV) (4).

Za razliku od većine drugih tumora glave i vrata, zadnjih godina raste incidencija pločastog karcinoma orofarinksa. Prema podacima Registra za rak RH iz 2012. god. (Bilten broj 37) incidencija tumora orofarinksa u Hrvatskoj na 100 000 stanovnika iznosila je 3,8 (5). Orofarinks obuhvaća bazu jezika, tonzile, meko nepce i stražnju faringealnu stijenu. Tumori u ranim stadijima često su izlječivi kirurški ili zračenjem i imaju dobru prognozu, međutim kod njih je veći rizik za razvoj drugog primarnog tumora s niskim stopama preživljenja (6). Tumori u uznapredovalom stadiju bolesti imaju lošiju prognozu i u njihovom liječenju potreban je multimodalni pristup koji uz kirurgiju i zračenje uključuje i kemoterapiju (3,7). Zadnjih desetljeća znatno se poboljšalo liječenje tumora glave i vrata. Tome je doprinijela bolja dijagnostika, nove tehnike zračenja, upotreba novih citostatika i razvoj biološke terapije. Napredak u razumijevanju genetske i molekularne osnove karcinoma potaklo je na istraživanje i otkrivanje specifičnih promjena u pločastom karcinomu glave i vrata koje pomažu u prevenciji, pravodobnoj dijagnozi i adekvatnom liječenju (3, 8).

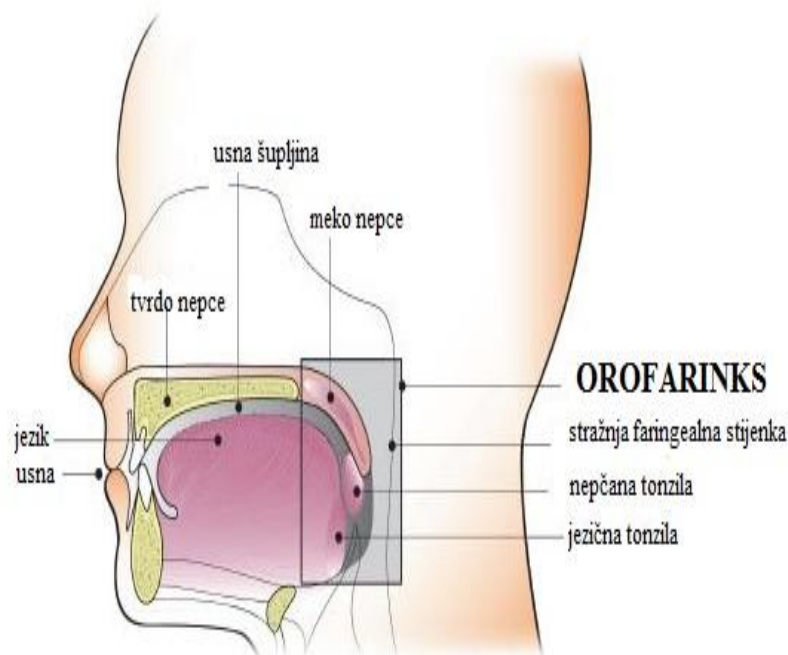
Oksidacijski stres ima značajnu ulogu u karcinogenezi. U stanjima trajnog oksidacijskog oštećenja dolazi do porasta reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u organizmu te do oštećenja

DNA, proteina i lipida stanične membrane. Ključan proces u oksidacijskom stresu je lipidna peroksidacija. To je složena lančana reakcija oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) potaknuta ROS-om čiji završni produkti su reaktivni aldehidi (9). U visokim koncentracijama HNE je citotoksičan i mutagen. U tom se slučaju HNE kao produkt lipidne peroksidacije može koristiti kao indikator u prognozi raka.

Svrha ove retrospektivne studije je analiza ekspresije HNE-a i p53 u pločastom karcinomu orofarinksa, a cilj je istražiti povezanost produkta lipidne peroksidacije (HNE) s nastankom pločastog karcinoma. Do danas nije objavljeno istraživanje imunohistokemijske nazočnosti HNE-a u ovom području onkološke patologije i zbog toga je ovaj rad izvorno istraživanje, a rezultati rada će biti još jedan korak naprijed u razumijevanju ove bolesti.

1.1. ANATOMIJA OROFARINKSA

Orofarinks je srednji dio ždrijela anatomski smješten između epifarinksa s gornje i hipofarinksa s donje strane. Gornja granica je spoj tvrdog i mekog nepca, donja valekula i jezična kost, prema naprijed proteže se do papile cirkumvalate, a straga ga omeđuje muskulatura stijenke ždrijela. U svrhu lakše orijentacije lokalizacije tumora, orofarinks dijelimo na četiri podsijela (10): 1. baza jezika (uključujući faringoepiglotski i glosopiglotski nabor); 2. tonzilarna regija (tonzilarna udubina i prednji i stražnji tonzilarni nabor); 3. meko nepce i uvula; 4. stražnji faringealni zid (slika 1).



Slika 1. Anatomija orofarinksa.

(izvor: http://www.cdc.gov/cancer/hpv/basic_info/cancers.htm).

Stražnja trećina oralne strane jezika čini bazu jezika i definirana je s papilom circumvalate s prednje strane, faringoepiglotskim i glosopiglotskim naborima straga i jezičnom tonzilom lateralno. Osjet i okus u ovoj regiji osigurani su preko glosofaringealnog živca, dok unutarnja laringealna grana vagusnog živca osigurava inervaciju valemule. Glavna arterija koja opskrbljuje krvlju bazu jezika je lingvalna arterija.

Nepčana tonzila je građena od mukoza pridruženog oblinog limfatičnog tkiva te je omeđena s mišićima: palatoglosusom s prednje i palatofaringealnim sa stražnje strane. Lateralno je omeđena s gornjim konstriktorom, stiloglosusom i prednjim vlaknima palatofaringeusa. Glavna opskrba gornjeg i donjeg pola tonzile arterijskom krvlju dolazi od vanjske karotidne arterije. Uzlazna faringealna arterija i silazna palatinalna arterija opskrbljuju krvlju gornji dio, dok ogranci facijalne arterije, jezična arterija i uzlazna palatinalna arterija opskrbljuju krvlju donji dio. Živčani tonzilarni plexus čine ogranci maksilarnog dijela trigeminalnog živca i glosofaringealni živac. Timpanični ogranak glosofaringealnog živca, poznat kao Jacobsonov živac, odgovoran je za bol u uhu (otalgija) koja nastaje zbog nekog patološkog procesa u tonzilama.

Meko nepce čini pet mišića: tenzor veli palatini, levator veli palatini, palatoglosus i palatofaringeus čineći predni dio mekog nepca. Uvularni mišić se veže za stražnji dio nosnog grebena i karakteristična je struktura u središnjoj liniji udružena sa stražnjim dijelom mekog nepca. Jedinstvena karakteristika mekog nepca je prisutnost dva različita tipa epitela. Cilindrični epitel s trepetljikama koji oblaže površinu nosa dok je višeslojni pločasti epitel prisutan na oralnoj strani. Na oralnoj strani mekog nepca mogu se naći i okusni pupoljci. Glavnina opskrbe arterijskom krvlju dolazi od uzlaznog ogranka facijalne arterije i uzlazne faringealne arterije. U prednjem dijelu mekog nepca osjet osigurava palatinalni živac koji je dio maksilarnog ogranka trigeminalnog živca, a osjećaj okusa veliki petrosalni živac preko pterigopalatinalnog ganglion. U stražnjem dijelu mekog nepca osjet dolazi preko ogranaka glosofaringealnog živca.

Stražnji se faringealni zid gledajući od medijalne prema lateralnog strani sastoji od mukoze, submukoze, faringobazilarne fascije konstriktornih mišića i bukofaringealne fascije. Krvne žile koje opskrbljuju tu regiju su uzlazna faringealna i fascijalna arterija dok je inervacija od glosofaringealnog i vagusnog živca.

Cijeli orofarinks je izrazito bogat limfnim žilama te je u kontaktu s dva klinički potencijalno važna prostora. Straga je retrofaringealna, a lateralno parafaringealna regija. Ovisno o zahvaćenom podsijelu, 15% do 75% pacijenata se prezentira sa zahvaćenim limfnim

čvorovima na vratu (11). Širenjem tumora retrofaringealno povećava se vjerojatnost kontralateralnih metastaza u regionalne limfne čvorove vrata dok je širenje tumora u parafaringealni prostor povezano uz veći rizik lokalnog recidiva bolesti (12). Većina tumora orofarinksa se otkriva najčešće u kasnim stadijima bolesti s metastazama u limfne čvorove vrata. Pojedinci se žale na bol ili grlobolju. Tumori smješteni u bazi jezika su često asimptomatski zbog nedostatka vlakana za bol u toj regiji. U uznapredovalim stadijima bolesti javljaju se smetnje gutanja i govora.

Tumori orofarinksa metastaziraju često u regionalne limfne čvorove vrata. Širenje tumora u regionalne limfne čvorove često je predvidljivo i postupno, od najbližih limfnih čvorova prema udaljenijim (13). Limfne čvorove vrata tvore površinska i duboka skupina čvorova koji čine horizontalni lanac uzduž cervikocefaličnog spoja i vertikalni lanac koji je smješten ispod sternokleidomastoidnog mišića. Zbog potrebe planiranja liječenja nastala je klasifikacija limfnih čvorova na vratu prema sistemu regija. Klasifikacija je tijekom godina doživjela niz modifikacija.

Limfni čvorovi lateralnog dijela vrata podijeljeni su u 5 skupina (slika 2).

Skupina I: Submentalni i submandibularni limfni čvorovi.

Podskupina I A: submentalni limfni čvorovi nalaze se između prednjih trbuha digastričnih mišića i hioidne kosti.

Podskupina I B: submandibularni limfni čvorovi se nalaze u trokutu omeđenom prednjim i stražnjim trbuhom digastričnog mišića i donjim rubom mandibule.

Skupina II: Gornji jugularni čvorovi (podskupine A i B).

Gornji jugularni čvorovi nalaze se oko unutarnje jugularne vene od baze lubanje do visine hioidne kosti, ispred lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a iza lateralnog ruba stražnjeg trbuha digastričnog mišića.

Skupina III: Srednji jugularni čvorovi.

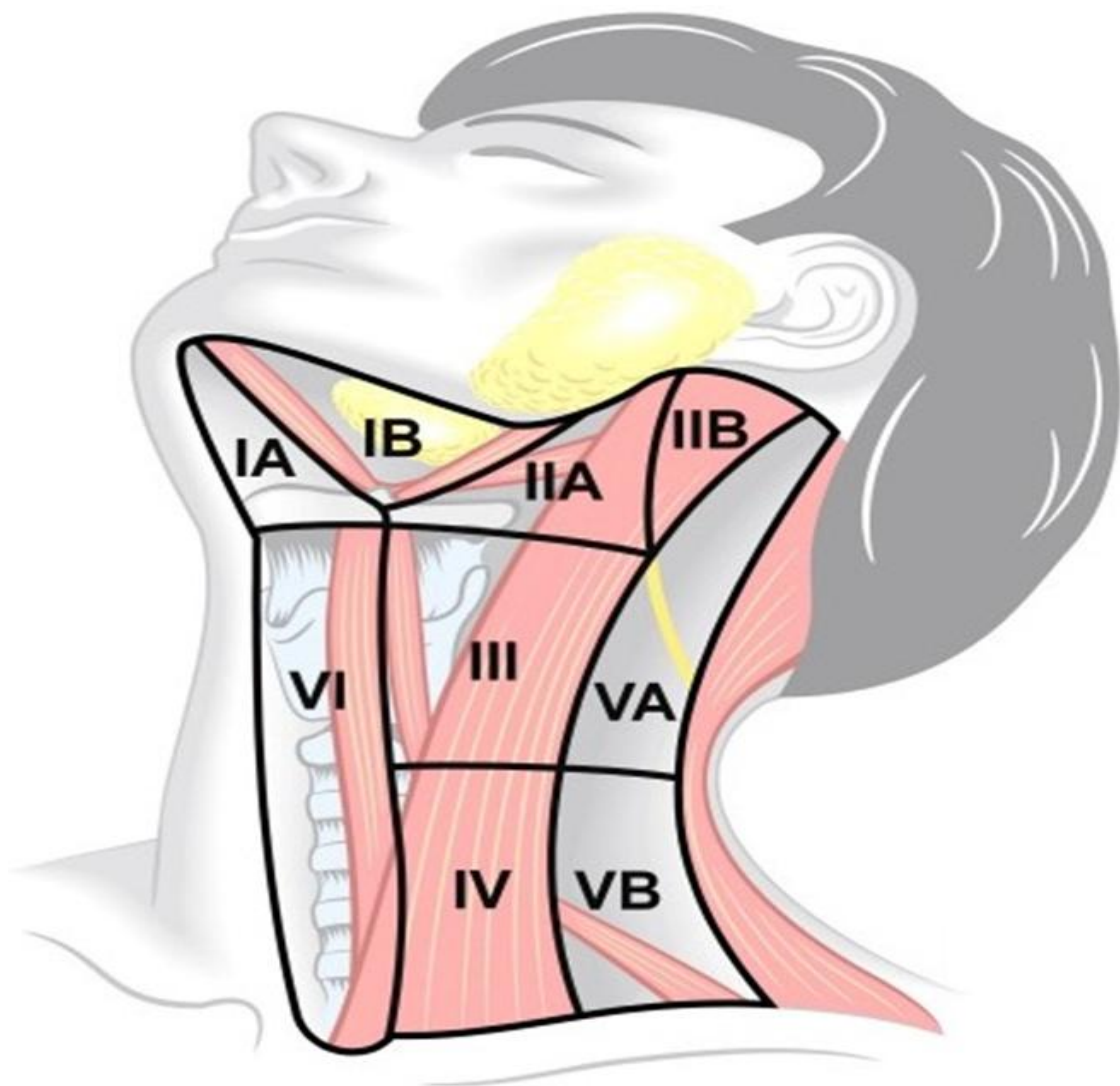
Srednji jugularni čvorovi nalaze se oko unutarnje jugularne vene od visine hioidne kosti do omohioidnog mišića ili do visine donjeg ruba krikoidne hrskavice, straga do lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a naprijed do lateralnog ruba sternohioidnog mišića.

Skupina IV: Donji jugularni čvorovi.

Donji jugularni čvorovi nalaze se oko unutarnje jugularne vene od visine omohioidnog mišića ili od visine donje krikoidne hrskavice do klavikule, straga do lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a naprijed do lateralnog ruba sternohioidnog mišića.

Skupina V: Stražnji trokut vrata (podskupine A i B).

Skupina čvorova u stražnjem trokutu vrata nalazi se između stražnjeg ruba sternokleidomastoidnog mišića, prednjeg ruba trapezoidnog mišića i klavikule.



Slika 2. Regije limfnih čvorova vrata

(izvor: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3544246_CTO-11-04-g-001&req=4).

Vjerojatnost metastaza u limfne čvorove ovisi o veličini i lokalizaciji primarnog tumora u orofarinksu. Metastaze se prvo pojavljuju u skupini II, te potom u skupinama III i IV.

Za tumore smještene blizu medijalne linije, kao što je stražnja faringealna stijenka i baza jezika, karakteristične su obostrane metastaze. Moguće su i metastaze u retrofaringealnim limfnim čvorovima (14). Postojanje skip metastaza kod tumora orofarinksa je rijetko.

1.2. TUMORI OROFARINKSA

Tumori orofarinksa mogu biti epitelnog, mezenhimalnog ili hematolimfoidnog porijekla (15). Histološki orofarinks je građen od pločastog epitela, mezenhimalnog tkiva, limfatičnog tkiva i malih žlijezda slinovnica. Tumori mogu nastati iz bilo kojih od ovih tkiva te mogu biti benigni i maligni. Epitelni tumori mogu nastati iz pločastog epitela ili epitela malih žlijezda slinovnica. Većina epitelnih tumora je pločasti karcinom.

Od benignih tumora porijekla pločastog epitela u tom području najčešći su papilomi s prevalencijom od 0,1%-0,5% (15). Papilomi su egzofitične i polipoidne lezije histološki građene od hiperplastičnog pločastog epitela. Mogu biti solitarne ili multiple lezije, najčešće uzrokovane infekcijom s HPV-om. U orofarinksu najčešće lokalizacije su meko nepce i uvula. Klinička diferencijalna dijagnoza uključuje običnu bradavicu, fibroepitelni polip, žarišnu epitelnu hiperplaziju i šiljasti kondilom. Terapija je kirurška ekscizija, recidivi su rijetki. Drugi benigni tumor porijekla epitela malih žlijezda slinovnica je pleomorfni adenom. Benigni tumori mezenhimalnog porijekla koji se mogu javiti u tom području su hemangiom, leiomiom, švanom i neurofibrom.

Tumori porijekla žlijezda slinovnica su rijetki u orofarinksu i čine 1,1-3,3% svih tumora malih žlijezda slinovnica. U većini studija odnos žena prema muškarcima je 1,2:1-1,5:1 (15). Gotovo polovina svih tumora je zloćudna i najčešća lokalizacija je meko nepce, zatim slijede tonzila i baza jezika. Među najčešćim karcinomima su mukoepidermoidni karcinom, adenoidni cistični karcinom i polimorfni adenokarcinom niskog gradusa. Prezentiraju se kao spororastuće, ulcerirane ili crvenkaste submukozne tvorbe i među glavnim simptomima je disfagija, dok se bol javlja u uznapredovalim stanjima.

Od tumora hematolimfoidnog porijekla najčešći je Non-Hodgkin limfom (NHL). NHL orofarinksa čini oko 13% svih primarnih ektranodalnih NHL, oko 70% njih smješteno je u

tonzili (15, 16). Mogu se javiti u svim životnim dobima, ali većina ih se javlja u 60. i 70. godini života. NHL karakterističan za dječju dob i mlađe odrasle je Burkitov limfom. NHL povezan s imunodeficijencijom se također javlja u mlađih osoba. Najčešći histološki tip koji čini više od 50% NHL je difuzni B velikostanični, potom slijede limfom plaštene zone, folikularni limfom i ektranodalni B- stanični marginalni limfom. Klinički se prezentiraju kao solitarne ili multiple lezije u obliku egzofičnih tumora sa ili bez ulceracije. Limfomi u području tonzile manifestiraju se kao asimetrično povećanje tonzile, dok u 9% slučajeva mogu biti bilateralni. Regionalni limfni čvorovi mogu biti povećani kao rezultat sistemske bolesti ili reaktivnih promjena. Sistemske simptome bolesti kao što su povećana temperatura i noćna znojenja nisu česti. Od drugih limfoma koji se mogu javiti u orofarinsu su Hodgkinov limfom, T-stanični limfom, NK/T stanični limfom i ekstramedularni plazmocitom. Pacijenti koji boluju od NHL orofarinksa liječe se radioterapijom, kemoterapijom ili kombinacijom to dvoje.

1.3. EPIDEMIOLOGIJA TUMORA OROFARINKSA

Prema podacima Registra za rak Republike Hrvatske iz 2012. Godine (Bilten br. 37) incidencija tumora orofarinksa u Hrvatskoj na 100 000 stanovnika iznosila je je 3,8, a ukupan broj novih slučajeva bio je 162. Prema podsijelu orofarinksa, incidencija tumora tonzile bila je najviša i iznosila je 1,5, slijedi baza jezika 1,0 i stražnja faringealna stijenka 1,3 na 100 000 stanovnika. Prema navedenim podacima znatno su češći u muškaraca s omjerom 7:1 u odnosu na žene te u dobi između 55 i 65 godina starosti (5).

Smatra se da su zbog navike pušenja i konzumacije većih količina žestokih alkoholnih pića muškarci češće zahvaćeni od žena. Međutim, udio žena oboljelih od pločastog karcinoma različit je u pojedinim dijelovima svijeta, a raste zbog porasta broja pušača među ženama (15, 16).

Podaci govore o porastu incidencije karcinoma orofarinksa širom svijeta, a pripisuje se infekciji HPV-om. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) godišnje se dijagnosticira oko 5000 novih slučajeva tumora orofarinksa, od toga 85-90% su histološki pločasti karcinomi. Postotak HPV pozitivnih pločastih karcinoma orofarinksa u SAD iznosi 40-80%. Premda se većina tumora javlja u osoba starijih od 45 godina, u zadnjim studijama provedenim u zapadnoj Europi i Americi nalazi se povećanje incidencije ove bolesti u osoba mlađih od 45 godina (17). To se objašnjava sa sve češćom infekcijom s HPV-om. Pojava orofaringealnih karcinoma u svijetu je procijenjena na oko 10% od svih karcinoma glave i vrata ili 52 000 slučajeva godišnje (18).

1.4. ETIOLOGIJA TUMORA OROFARINKSA

Etiologija pločastog karcinoma glave i vrata je složena. Pločasti karcinom nastaje kao posljedica brojnih molekularnih promjena induciranih čimbenicima okoline uz genetsku predispoziciju (4). Najčešći čimbenici okoline, kako za sve pločaste karcinome glave i vrata tako i za karcinome orofarinksa, su pušenje i konzumacija alkoholnih pića. Zajedničko djelovanje alkohola i cigareta višestruko povećava rizik nastanka karcinoma (16). Rizik nastanka karcinoma povećan je i za teške pušače koji ne konzumiraju alkohol, kao i za alkoholičare koji ne puše (15). U velikom broju studija dokazala se povezanost pušenja i alkohola s pojavom pločastog karcinoma orofarinksa. Nakon prestanka pušenja pada relativni rizik nastanka pločastog karcinoma glave i vrata, ali i dalje ostaje viši od rizika za ljude koji nisu nikad pušili (6).

Direktni utjecaj nikotina i policikličkih aromatičnih ugljikovodika u duhanu se smatra karcinogenim (19). Metabolit alkohola, acetaldehid, prepoznat je kao promotor u procesu karcinogeneze putem stvaranja slobodnih radikala i oštećenja DNA. U sluznici gornjeg dišnog puta prisutni su enzimi alkoholdehidrogenaza (ADH) i citokrom P-4501 koji posreduju u metaboliziranju etanola u acetaldehid. Sinergistički učinak alkohola na nastanak karcinoma kod pušača može se objasniti činjenicom da je acetaldehid više topljiv i tako prisutan u većoj koncentraciji u slini pušača nego u nepušača (20). Mutacije tumor supresor gena p53 su također povezane s pušenjem i alkoholom (21).

Prehrana je također važan etiološki čimbenik u nastanku tumora orofarinksa. Protektivnu ulogu ima prehrana bogata voćem i povrćem, naročito hrana bogata karotenima koji su važni antioksidansi (22).

Stoga proizlazi da je prevencija u više od 90% slučajeva pločastog karcinoma orofarinksa izbjegavanje pušenja i konzumacije alkohola te prehrana bogata karotenima iz voća i povrća (15).

Humani papiloma virus (HPV) tip 16 povezuje se s nastankom pločastog karcinoma glave i vrata te se prema dostupnim podacima iz literature nalazi u 31-74% karcinoma usne šupljine, u do 50% orofaringealnih karcinoma i do 85% laringealnih karcinoma. HPV pripada Papillomaviride obitelji virusa. To su mali kružni dvolančani DNA virusi s genomom od oko 8000 parova baza. Svi subtipovi HPV-a imaju tropizam prema pločastom epitelu.

U zaraženim stanicama HPV izaziva brojne poremećaje kao što su inhibicija tumor supresor gena, aktivacija ciklina i produljenje života stanice. U karcinomima dolazi do integracije virusne DNK u genom stanice domaćina. Sama infekcija HPV-om nije dovoljna za nastanak tumora već infekcija stanice virusom HPV-a djeluje kao inicijator, a za nastanak zloćudne preobrazbe potreban je dodatni utjecaj karcinogena kao što su dim cigarete, hormonski čimbenici itd. HPV pridruženi karcinomi orofarinksa nastaju najčešće u lingvalnoj i palatinalnoj tonzili. HPV ima najveći afinitet za visokospecijalizirani retikularni epitel koji oblaže tonzile. Pretpostavlja se da sluznica orofarinksa omogućuje olakšan pristup virusu u bazalnom sloju epitela u kriptama tonzile što je slično procesu koji se zbiva u transformacijskoj zoni cerviksa uterusa (23).

Važnu ulogu u nastanku pločastog karcinoma glave i vrata ima i genetska predispozicija (6,8). Genetska predispozicija očituje se kroz nemogućnost metaboliziranja karcinogena ili prokarcinogena, te neučinkovitost sustava popravka oštećenja DNA (4,8). Enzim glutathion-S-transferaza sudjeluje u metaboliziranju karcinogena iz cigareta i neki od oblika tog enzima povezani su s povećanim rizikom nastanka pločastog karcinoma. U prilog neadekvatnom sustavu popravka DNA govori prisutna nestabilnost genoma, citogenetske aberacije, gubitak heterozigotnosti (LOH) i nestabilnost mikrosatelita (4). Učinkovitost sustava popravka DNA ovisi o primjerenom kontroli staničnog ciklusa i mogućnosti popravka DNA. Važni čimbenici kontrole staničnog ciklusa su inaktivacija p53 ili p16 tumor supresor gena ili amplifikacija protoonkogena ciklin D1 (4).

1.5. DIJAGNOSTIKA TUMORA OROFARINKSA

Sumnja na tumor sluznice orofarinksa postavlja se kliničkim otorinolaringološkim (ORL) pregledom. Pregledom se određuje vjerojatno podsijelo tumora te granica širenja tumora prema okolnim strukturama. Klinička sumnja na tumor prije početka liječenja mora se potvrditi patohistološkom analizom (24). U procjeni veličine i proširenosti primarnog tumora te širenju tumora u okolne strukture koristi se kompjuterizirana tomografija (CT) i endoskopija gornjeg respiratornog i probavnog sustava. One ujedno služe i za otkrivanje eventualno prisutnog drugog primarnog tumora. Pločasti karcinom orofarinksa najčešće metastazira u regionalne limfne čvorove vrata. Metoda izbora za utvrđivanje broja i veličine suspektnih limfnih čvorova je ultrazvuk (UZV). Suspektne limfne čvorove potrebno je punktirati pod kontrolom UZV-a i razmaze pregledati citološki. Za utvrđivanje stadija bolesti i isključivanje udaljenih metastaza potrebno je napraviti CT abdomena i pluća. Na osnovi svih prethodno navedenih nalaza utvrđuje se veličina i proširenost tumora te se odabere način liječenja.

1.6. KLASIFIKACIJA KARCINOMA OROFARINKSA

1.6.1. Epitelne prekursorske lezije

Prekursorske lezije se definiraju kao promjene u epitelu s povećanom vjerojatnošću progresije u pločasti karcinom. Promijenjeni epitel pokazuje različite arhitekturne i citološke promjene nazvane displazija (24). Arhitekturne promjene uključuju nepravilnu stratifikaciju epitela, gubitak polarosti bazalnih stanica, povećan broj mitozna naročito u superficialnom sloju, diskeratozu i pojavu rožnatih perli unutar rete pegs. Citološke promjene u displaziji su: anizonukleoza, anizocitoza, pleomorfizam jezgri i citoplazmi, povećan omjer jezgre i citoplazme, atipične mitoze, povećan broj i veličina jezgri i hiperkromazija jezgri. Makroskopski one izgledaju poput bjelkastih naslaga (leukoplakija), crvenih naslaga (eritroplakija) ili miješanog izgleda.

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2005 god. prekursorske lezije se kategoriziraju:

1. Hiperplazija pločastih stanica je karakterizirana povećanim brojem stanica, ali bez poremećaja arhitekture i bez atipije stanica. Često se na površini nalazi keratoza. Povećan broj stanica može biti smješten kroz cijelu debljinu epitela ili djelovati ograničeno. Hiperplazija pločastih stanica je najčešći uzrok leukoplakije. Iako se smatra epitelnom prekursorском lezijom, razvoj za nastanak pločastog karcinoma je nizak.
2. Blaga displazija je karakterizirana poremećajem arhitekture u vidu gubitka sazrijevanja stanica i blagom citološkom atipijom stanica u donjoj trećini debljine epitela. Mnoge lezije opisane kao displazija pokazuju hiperplaziju bazalnih stanica s citološkom atipijom ograničenom na donju trećinu debljine epitela.
3. Umjereni displazija je karakterizirana poremećajem arhitekture u donje dvije trećine debljine epitela s umjerenom, ali ne jakom, citološkom atipijom. Ako je citološka atipija jaka, može se proglasiti teškom displazijom.
4. Teška displazija je karakterizirana poremećajem arhitekture u više od 2/3 debljine epitela s teškom citološkom atipijom ili teška citološka atipija s bilo kojim stupnjem poremećaja arhitekture.

5. Karcinom in situ se definira kao maligna transformacija, ali bez znakova invazije bazalne membrane. Karakteriziran je poremećajem arhitekture u cijeloj debljini epitela i teškom citološkom atipijom s atipičnim mitozama u superficijalnom sloju.

U opisanim promjenama nalaze se molekularne nepravilnosti koje koreliraju s histološkim atipijama i rizikom za razvoj pločastog karcinoma. LOH na 3p i 9p su rani događaji u razvoju pločastog karcinoma. Isto tako, mutacije u p53 genu su česte u prekursorskim lezijama i udružene su s razvojem invazivnog karcinoma (25, 26).

Sluznica u blizini pločastog karcinoma često pokazuje premaligne promjene vjerojatno uzrokovane istim karcinogenima (27).

1.6.2. Patohistološka klasifikacija pločastog karcinoma

Pločasti karcinom nastaje iz mnogoslojnog pločastog epitela ili iz cilindričnog epitela nakon pločaste metaplazije. Karakteristika su mu pločasta diferencijacija tumorskih stanica i invazivni rast. Pločasta diferencijacija očituje se stvaranjem roževine uz različitu učestalost formiranja „perli“. Rožnate perle su kuglasto oblikovani dezmosomski dodaci i intracitoplazmatski snopovi tonofilamenata. Invazivni rast očituje se probijanjem bazalne membrane i infiltracijom podležeg tkiva, te infiltracijom krvnih žila i živaca (24). Tumor infiltrativno raste stvarajući nepravilna, međusobno anastomozirajuća gnijezda, tračke ili pojedinačne pločaste stanice koje pokazuju različiti stupanj stvaranja intracelularnog i ekstracelularnog keratina. Pojačana diferencijacija je često prisutna prema središtu gnijezda, dok periferno smještene stanice imaju bazaloidni izgled s oskudnom bazofilnom citoplazmom. Kako stanice napreduju prema središnjim dijelovima gnijezda, njihova citoplazma postaje obilnija i eozinofilnija. Ekstracelularni keratin, često izmiješan s nekrotičnim detritusom, često se nađe u središtu gnijezda. Stroma oko tumora pokazuje dezmozoplaziju i prožeta je različitim stupnjem kroničnih upalnih stanica. Pločasti karcinomi mogu biti i nekeratinizirajući, ali i tada proizvode oskudnu količinu unutarstaničnog ili izvanstaničnog keratina (16).

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) na osnovi količine stvaranja roževine i morfološkog izgleda stanica pločasti karcinomi dijele se u tri gradusa: gradus I: dobro diferencirani, gradus II: umjereno dobro diferencirani, gradus III: slabo diferencirani.

Gradus I

Dobro diferencirani pločasti karcinom sličan je normalnom pločastom epitelu. Karakterizira ga obilno stvaranje roževine, rijetke mitoze i blaga atipija stanica. Sazrijevanje stanica se nalazi u središnjim dijelovima gnijezda. Infiltrativna gnijezda tumorskih stanica su veća nego kod slabije diferenciranih pločastih karcinoma i mogu biti centralno cistična. Infiltrativna mala gnijezda i pojedinačne tumorske stanice ne smiju biti prisutni. Kako je sazrijevanje prisutno relativno je isti odnos omjera jezgre i citoplazme. Atipija jezgri je minimalna i većina jezgri ima vezikularni kromatin. Mitoze su rijetke, manje od pet na deset velikih vidnih polja povećanja mikroskopa, i smještene su na periferiji infiltrativnih otoka tumorskih stanica.

Gradus II

Umjereno diferencirani pločasti karcinom ima manje izraženo stvaranje roževine dok su mitoze jasno vidljive i veći je stupanj atipije stanica i jezgri. Infiltrativna gnijezda tumorskih stanica su manja, pokazuju varijacije u veličini i žarišno imaju izgled tračaka. Dok je većina jezgri zrela, ipak ih je značajan broj hiperkromatskih i imaju granularni kromatin. Nalaze se varijacije u veličini i izgledu jezgara, neke izgledaju presavijeno i nepravilno te imaju veći volumen od okolnih tumorskih stanica. Mitoze su češće i mogu se naći kroz tumorske otoke. Većina pojedinačnih tumorskih stanica podliježe nekrozi i nekrotični detritus se često vidi unutar centralnih dijelova tumorskih gnijezda.

Gradus III

Slabo diferencirani pločasti karcinom sastoji se od polimorfnih stanica s brojnim tipičnim i atipičnim mitozama te minimalnim stvaranjem roževine. Gnijezda tumorskih stanica su manja i prisutna je infiltracija pojedinačnim tumorskim stanicama. Nekad tumor može rasti difuzno u obliku solidnih nakupina. Prisutno je minimalno sazrijevanje stanica, i središnje smještene jezgre izgledaju monomorfno i isto kao i periferno smještene jezgre u tumorskim otocima. Nalaze se brojne apoptoze kao i difuzna područja nekroze.

Mikroskopski, konvencionalni tip pločastog karcinoma ima stanice u različitom stupnju diferencijacije i različitog stupnja citološke atipije. Manje bazaloidne stanice imaju nediferencirani fenotip i izgledaju okruglo s oskudnom citoplazmom. Veće stanice imaju obilnu eozinofilnu do svijetlu citoplazmu i poligonalni oblik. Ove stanice često izgledaju artificijelno odvojene jedna od druge i tipično se nalaze intercelularni mostići. Unutar citoplazmi većih stanica koje su dobro diferencirane ponekad se može vidjeti stvaranje keratina. Jezgre tumorskih stanica pokazuju umjerenu do značajnu razliku u veličini i obliku s nepravilnim konturama i vezikularnim do granularnim kromatinom. Često se nalaze prominentni nukleoli i mitotičke figure, uključujući i atipične mitoze. U pločastom karcinomu često se nalaze pojedinačne nekrotične stanice i veća područja nekroze.

Najčešći histološki tip pločastog karcinoma je konvencionalni tip, dok se prema SZO-i razlikuju patohistološki podtipovi (15):

Verukozni karcinom

Verukozni karcinom je prvi put opisan i priznat kao poseban entitet sa strane Lauren Ackerman-a 1948. godine. Verukozni karcinom može nastati na različitim mjestima duž cijelog gornjeg respiratornog trakta i tijela. Kad zahvaća gornji respiratorni trakt, najčešće je smješten na bukalnog sluznici ili gingivi te grkljanu. Ovaj podtip pločastog karcinoma češće se javlja u starijoj životnoj dobi i povezan je sa žvakanjem duhana. Drugi etiološki uzroci su pušenje duhana, alkohol i loša higijena usne šupljine. Makroskopski ti tumori imaju gljivasti i bradavičasti izgled s ulceracijama. Histološki izgledaju poput bradavice s obilnom keratozom i parakeratozom na zadebljanom pločastom epitelu te imaju izgled poput „vrha na crkvi“. Tumorske pločaste stanice sazrijevaju prema površini i samo minimalna atipija stanica može biti prisutna. Mitoze se mogu naći samo u bazalnim epitelnim stanicama. Jezgre imaju vezikularni kromatin s malim jezgicama. Na bazi tumora nalaze se široki jezičci zrelog, dobro diferenciranog pločastog epitela koji invadiraju podležeću stromu gurajući se prema dolje. Infiltrativna gnijezda tumorskih stanica, koja su tipična za konvencionalni tip pločastog karcinoma, ne smiju biti prisutna. Na bazi tumora u stromi često se može naći gusti limfoplazmocitoidni upalni infiltrat.

Kunikulatni karcinom

Kunikulatni karcinom je rijetka varijanta pločastog karcinoma koja je dobila ime po sličnosti s tumorom na stopalu koji duboko infiltrira kost. Ovi tumori smješteni u orofarinksu pokazuju proliferaciju višeslojnog pločastog epitela u obliku kripte ispunjenih roževinom koji se utiskuju u kost. Višeslojni pločast epitel ne pokazuje očite histološke značajke zloćudnosti. Sama dijagnoza se teško može postaviti histološki te je potrebna korelacija s kliničkim i radiološkim značajkama.

Papilarni pločasti karcinom

Papilarni pločasti karcinom je neuobičajena varijanta pločastog karcinoma. Češće se javlja u starijih muškaraca. Makroskopski ima egzofitični i resičasti izgled. Histološki se na malom povećanju mikroskopa vide kompleksne, resičaste i nitaste strukture obložene atipičnim pločastim epitelom. Atipični pločasti epitel pokazuje gubitak sazrijevanja stanica, povećan omjer jezgre i citoplazme, polimorfizam jezgri i brojne mitoze kroz cijelu debljinu epitela. Kod ovog podtipa pločastog karcinoma nekad je teško vidjeti infiltraciju podležeće strome. Resičaste strukture u središnjim dijelovima imaju fibrovaskularnu stromu prožetu kroničnim upalnim stanicama.

Akantolitički pločasti karcinom

Akantolitički pločasti karcinom je rijetka varijanta pločastog karcinoma karakterizirana s akantolizom tumorskih stanica stvarajući pseudolumene i lažni dojam da se radi o žljezdanoj diferencijaciji. Pseudolumeni uglavnom sadrže stanični detritus. U tumoru se ne nalazi prave žljezdane diferencijacije ili stvaranja sluzi. Pločasta komponenta unutar tumora dominira. Okolna stroma je dezmozoplastična prožeta s limfoplazmocitnim infiltratom. Prognoza je slična konvencionalnom tipu pločastog karcinoma premda se u nekim studijama navodi agresivniji biološki tijek bolesti.

Adenoskvamozni karcinom

Adenoskvamozni karcinom je rijedak podtip pločastog karcinoma koji se češće javlja kod starijih osoba i povezan je s konzumacijom alkohola i pušenjem. Ovi tumori imaju biološki agresivniji tijek i često rano metastaziraju u limfne čvorove i recidiviraju. Histološki često prevladava pločasta komponenta. Površina je ulcerirana te pločasti epitel pokazuje promjene koje odgovaraju teškoj displaziji. Pločasta komponenta odgovara umjereno do slabo diferenciranom karcinomu s područjima keratinizacije. Žljezdana komponenta obično se vidi u dubljim dijelovima tumora te ima duktularnu i kribriformnu građu.

Bazaloidni pločasti karcinom

Bazaloidni pločasti karcinom svrstava se u histološki gradus III te je karakteriziran nedostatkom staničnog sazrijevanja i stvaranjem ekstracelularnog keratina. Stanice imaju nezreli izgled i nalikuju bazalnim stanicama pločastog epitela. Klinički se pojavljuju u starijih muškaraca i etiološki su povezani s pušenjem, alkoholom i infekcijom s HPV-om. Česta lokalizacija je baza jezika te se prezentiraju u kasnim stadijima bolesti s metastazama u regionalne limfne čvorove vrata. Histološki bazaloidni podtip pločastog karcinoma građen je od različito velikih gnijezda i tračaka bazaloidnih stanica. Velika gnijezda imaju centralni, komedo tip nekroze. Na periferiji otoka tumorskih stanica često se vide palisadno raspoređene jezgre. Tumor može imati žarišno žljezdanu i kribriformnu građu te se nalaze područja konvencionalnog tipa pločastog karcinoma i keratinizacija. Okolna stroma može biti miksoidno ili hijalino promijenjena. Jezgre su sitne i hiperkromatske s brojnim mitozama i apoptozom.

Karcinom vretenastih stanica

Karcinom vretenastih stanica je slabo diferencirana varijanta pločastog karcinoma histološkog gradusa III. Dobio je ime po tome što većina tumorskih stanica ima mezenhimalni (vretenasti) izgled. Uglavnom se javlja u starijih muškaraca i povezan je s pušenjem i alkoholom. Rijetko može nastati iz konvencionalnog tipa pločastog karcinoma nakon zračenja. Makroskopski se pojavljuju kao ulcerirane, polipozne tvorbe, a histološki izgled im varira i ima različiti mezenhimalni izgled. Površinska epitelna komponenta je prisutna i često odgovara teškoj displaziji. Nalaze se i područja konvencionalnog pločastog karcinoma. Tumorsko tkivo je srednje do gusto celularno, vretenastog izgleda s brojnim mitozama, pleomorfnim i bizarnim jezgrama te područjima koštane i hrskavične metaplazije. Diferencijalna dijagnoza uključuje različite varijante benignih i malignih mezenhimalnih tumora te melanom. Zbog toga se definitivna dijagnoza ne može postaviti samo na osnovu histološkog izgleda, već je potrebna dodatna imunohistokemijska analiza.

1.6.3. Prognostički čimbenici

Prognostički čimbenici su veličina i lokalizacija primarnog tumora, prisutnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima te prisutnost udaljenih metastaza. Uz njih, važni prediktori ukupnog preživljenja su opće stanje bolesnika i komorbiditet.

Od patohistoloških parametara prognostički čimbenici su (15):

1. Histološki gradus tumora
2. Dubina invazije
3. Status resekcijских rubova
4. Limfovaskularna invazija
5. Peri i/ili intraneuralna invazija
6. Ekstrakapsularno širenje tumora u metastatskom limfnom čvoru

Kad se gleda histološki gradus tumora, dobro diferencirani tumori imaju bolju prognozu nego slabo diferencirani tumori koji, ujedno, češće metastaziraju u regionalne limfne čvorove. Dubina invazije često ovisi o gradu, tako da slabije diferencirani tumori imaju veću dubinu invazije. Bitan je status resekcijских rubova, ako su pozitivni resekcijски rubovi, postoji veći rizik za lokalni recidiv bolesti. Ako je prisutna limfovaskularna invazija, češće su metastaze u limfne čvorove, dok je kod prisutne peri i/ili intraneuralne invazije veći rizik za recidiv i metastaziranje. Na lošiju prognozu upućuje i ekstrakapsularno širenje tumora u zahvaćenom limfnom čvoru. Ekstrakapsularno širenje tumora i pozitivni resekcijски rubovi neovisni su prognostički čimbenici mortaliteta kod karcinoma usne šupljine i orofarinksa (28), dok limfovaskularna i perineuralna invazija nisu neovisni čimbenici. Oni ukazuju na moguću veću agresivnost tumora.

Stadij bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze pločastog karcinoma je najvažniji prognostički čimbenik. Stadij bolesti temelji se na TNM klasifikaciji u kojoj su objedinjeni veličina tumora, status limfnih čvorova i udaljene metastaze. Bolesnici koji u trenutku postavljanja dijagnoze nemaju zahvaćene limfne čvorove imaju izvrsnu prognozu. Bolesnici sa zahvaćenim limfnim čvorovima imaju 50% manju vjerojatnost 5-godišnjeg preživljenja bez obzira na primijenjeno liječenje (29). Zahvaćenost limfnih čvorova je najvažniji prognostički čimbenik. Za karcinome orofarinksa odnos veličine tumora i postojanja metastaza na vratu je varijabilna (13).

1.6.4. TNM klasifikacija i stadij bolesti karcinoma orofarinksa

Nakon učinjene obrade, a prije početka liječenja bolest se klasificira prema TNM klasifikaciji Međunarodne unije za borbu protiv raka (franc. Union Internationale Contre leCancer, UICC). TNM klasifikacija obuhvaća uvid u veličinu primarnog tumora (T), status zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova (N) i prisutnost udaljenih metastaza (M) (Tablica 1).

U TNM- klasifikaciji gledaju se svi bitni kliničko-patološki podaci koji uključuju klinički pregled, radiološke pretrage (RTG, UZV, CT, MR i PET-CT) i patohistološki nalaz. Klinički stadij bolesti od I do IV određuje se na osnovi TNM-a, a prema klasifikaciji Američkog društva za rak (eng. American Joint Committe on Cancer, AJCC) (11).

U Tx stadiju primarno sjelo tumora se ne može odrediti. U T0 stadiju nema dokaza za postojanje primarnog tumora. U Tis stadiju nalazi se pločasti karcinom in situ. U T1 stadiju veličina primarnog tumora je manja ili jednaka 2 cm u dužem promjeru. U T2 stadiju veličina primarnog tumora je od 2 do 4 centimetra u dužem promjeru. U T3 stadiju primarni tumor je veći od 4 cm u dužem promjeru. T4 stadij se dijeli na dva podstadija : T4a kad se primarni tumor širi u grkljan, duboku muskulaturu jezika, medijalni pterigoid, tvrdo nepce ili mandibulu, dok T4b stadij obuhvaća širenje tumora u lateralni pterigoidni mišić, lateralni nazofarinks, bazu lubanje ili karotidne arterije.

U Nx stadiju regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti. U N0 stadiju ne postoje metastaze u regionalnim limfnim čvorovima. U N1 stadiju nalaze se metastaze u istostranom pojedinačnom limfnom čvoru koji je manji ili jednak 3 cm u promjeru. N2 stadij se dijeli u tri podstadija: N2a koji obuhvaća metastazu u jedan istostrani limfni čvor koji je promjera većeg od 3 do 6 centimetara, N2b koji obuhvaća metastaze u više istostranih limfnih čvorova promjera manjeg ili jednako 6 centimetara, N2c obuhvaća obostrano zahvaćanje više limfnih čvorova promjera manjeg ili jednako 6 centimetara. U N3 stadiju nalaze se metastaze u limfne čvorove veće od 6 centimetara u promjeru.

U Mx stadiju postojanje udaljenih metastaza se ne može odrediti. U M0 stadiju udaljene metastaze ne postoje. U M1 stadiju udaljene metastaze su prisutne.

Tablica 1. TNM-klasifikacija prema AJCC

T-stadij	
TX	primarni tumor ne može se procijeniti
T0	nema dokaza za postojanje primarnog tumora
Tis	carcinoma <i>in situ</i>
T1	≤2 cm
T2	>2 cm do 4cm
T3	>4 cm
T4a	širenje tumora u larinks, duboku muskulaturu jezika, medijalni pterigoid, tvrdo nepce, mandibulu
T4b	širenje tumora u lateralni pterigoidni mišić, lateralni nazofarinks, bazu lubanje, karotidne arterije
N-stadij	
NX	regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti
N0	ne postoje metastaze u regionalnim limfnim čvorovima
N1	istostrani pojedinačni limfni čvor ≤3 cm
N2a	istostrani pojedinačni limfni čvor >3 do 6 cm
N2b	istostrani multipli limfni čvorovi ≤6 cm
N2c	obostrani, kontralateralni limfni čvorovi ≤6 cm
N3	limfni čvor >6 cm
M-stadij	
NX	udaljene metastaze ne mogu se procijeniti
M0	ne postoje udaljene metastaze
M1	postojanje udaljenih metastaza

Na osnovi pojedinačne T, N i M klasifikacije određuje se klinički stadij bolesti.

Klinički stadij 0 obuhvaća tumore koji su Tis, N0 i M0. Klinički stadij I obuhvaća tumore koji su T1, N0 i M0. Klinički stadij II obuhvaća tumore koji su T1, N0 i M0. Klinički stadij III obuhvaća tumore koji su T3, N0 i M0; T1, N1 i M0; T2, N1 i M0; T3, N0 i M0. Klinički stadij IV se dijeli na tri podstadija: IVA obuhvaća tumore koji su T4a, N0 i M0; T1, N2 i M0; T2, N2 i M0; T3, N2 i M0; T4a, N1 i M0 te T4a, N2 i M0. Stadij IVB obuhvaća tumore koji su T4b, bilo koji N i M0 te bilo koji T, N3 i M0. Stadij IVC obuhvaća tumore koji su bilo koji T, bilo koji N i M1.

Tablica 2. Klinički stadij prema TNM-klasifikaciji

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

1.7. P53 KAO BILJEG KARCINOGENEZE PLOČASTOG KARCINOMA OROFARINKSA

Razumijevanje procesa karcinogeneze i razvoj molekularne biologije doveo je do otkrivanja novih molekularnih biomarkera koji nam pomažu u ranom otkivanju tumora te njihovom liječenju. Na molekularnoj razini u pločastom karcinomu glave i vrata, a tako i orofarinksa, dolazi do aktivacije onkogeni i inaktivacije tumor supresor gena kao što su p16 i p53 (3).

Tumor supresor gen p53 najčešće je promijenjen u tumorima. P53 je prvi put opisan 1979. godine i prvi je otkriveni tumor supresor gen. Njegova osnovna funkcija je kontrola staničnog ciklusa, pri čemu eliminira i inhibira proliferaciju promijenjenih stanica te tako sprečava nastanak tumora. Signalni put p53 aktivira se kao odgovor na stanični stres poput hipoksije i nukleotidne deplecije. Regulatori aktivnosti p53 su promjene genetskog i epigenetskog karaktera. Te iste promjene utječu i na transkripcijske ciljeve p53 koji ispoljavaju divlji-tip (nemutirani) p53. Nekoliko nezavisnih puteva aktivacije p53 ovisni su o različitim regulacijskim kinazama (30). P53 djeluje kao inhibitor staničnog ciklusa i to preko inhibitora ciklin-ovisne kinaze p21^{Waf1}, koji se veže na ciklin B1-CDK1 kompleks u citoplazmi te ga inhibira i zadržava stanicu u G2 fazi staničnog ciklusa. P53 djeluje i kao regulator apoptoze. Proapoptotički proteini direktno ovisni o p53 su između ostalih i Bax, Apaf1, PUMA, p53AIP1, PIDD i NOXA. Divlji tip p53 direktno aktivira ekspresiju brojnih gena koji sudjeluju u popravku oštećenja DNA. P53 inhibira angiogenezu i nastanak metastaza preko inhibicije mamarne serin proteaze (maspin), koji inhibira angiogenezu, invaziju i metastaze. Drugi protein inhibitor metastaza reguliran proteinom p53 je KAI1. Mutacije proteina p53 gotovo su uvijek u dijelu koji se specifično veže za DNA te posljedično mijenja aktivaciju gena reguliranih divljim tipom proteina (30). Broj mutacija u p53 veći je nego kod ostalih tumor supresor gena. Protein p53 zaustavlja stanični ciklus, inhibira angiogenezu i omogućava popravak DNA, a u slučaju nemogućnosti popravka aktivira mehanizam apoptoze. Stanice s mutacijom p53 gena obilježene su genskom nestabilnošću čineći tako važan uvjet za nastanak karcinoma. Visoka učestalost p53 mutacija u tumorskim stanicama daje selektivnu prednost mutiranim stanicama da izbjegnju staničnom mehanizmu tumorske supresije.

Preko 50% karcinoma glave i vrata ima mutirani p53 i u većini studija pojačana imunohistokemijska ekspresija p53 korelira sa slabijim odgovorom na radioterapiju i kemoterapiju te stoga lošom prognozom bolesti (31, 32). DNA mutacije ne moraju nužno poremetiti funkciju p53, divlji tip p53 može biti poremećene funkcije zbog virusne infekcije HPV-om. HPV E6 protein može inaktivirati protein p53, zato je i manje mutacija p53 u HPV-pozitivnim tumorima (33). U nedavno objavljenom studij p16 pozitivni i p53 pozitivni pločasti karcinomi orofarinksa imaju lošiju prognozu nego p16 pozitivni i p53 negativni tumori (34). Metastatski potencijal tumorskih stanica može nastati zbog gubitka p53. Gubitak p53 potpomaže inicijaciju i progresiju tumora i tako dozvoljava tumoru da brzo dosegne svoj metastatski potencijal. P53 direktno potpomaže transkripciju gena odgovornih za metastaziranje vežući promotore gena uključene u regulaciju stanične pokretljivosti i adhezije, koji su važni u procesu metastaziranja (35). U nekim studijama je nađeno da ekspresija p53 nije u korelaciji s regionalnim metastaziranjem u limfne čvorove i razvojem udaljenih metastaza (36). Visoka ekspresija p53 je povezana s većom učestalošću recidiva bolesti, naročito kod tumora koji su nastali procesom karcinogeneze negoli tumori nastali indukcijom virusne infekcije. Visoka ekspresija p53 često se zbog toga nalazi u p16 negativnih tumora. Visoka ekspresija p53 je povezana sa smanjenim preživljenjem vjerojatno zbog razvoja recidiva bolesti (36).

1.8. OKSIDACIJSKI STRES

Helmut Sies je 1985. godine definirao oksidacijski stres kao poremećaj u ravnoteži između antioksidansa i oksidansa u korist oksidansa (37). U normalnoj aerobnoj stanici postoji ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i antioksidacijske zaštite. Do poremećaja može doći zbog povećanog stvaranja oksidansa, smanjenog stvaranja antioksidansa i neuspješnog popravka nastalih oštećenja. U stanjima oksidacijskog stresa pretjerano stvaranje slobodnih radikala može dovesti do oštećenja DNA, proteina i lipida stanične membrane. Oštećenje DNA uzrokuje mutacije, proteini oksidacijom gube svoju funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji. Oksidacijski stres ima značajnu ulogu u etiopatogenezi kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, karcinoma, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, fibroze i procesa starenja (38).

1.8.1. Slobodni radikali

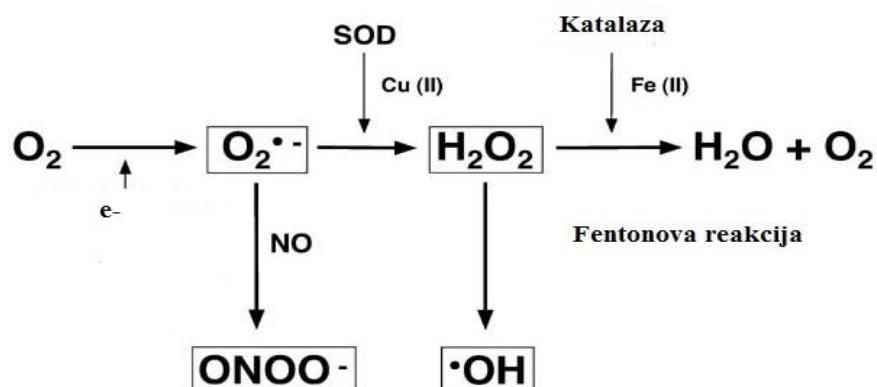
Rak je multifaktorijalna bolest čija etiologija je još uvijek većim dijelom nepoznata. Zadnjih desetljeća istraživanja su pokazala da slobodni radikali imaju važnu ulogu u karcinogenezi (39, 40). Slobodni radikali su reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi. Reaktivni kisikovi spojevi (eng. reactive oxygen species-ROS) je zajednički naziv za radikale kisika (npr. superoksid, hidroksil radikal) i spojeve koji nisu radikali (npr. vodikov peroksid, reaktivni kisik). ROS su produkti normalnog staničnog metabolizma. To su visoko reaktivne molekule koje sadrže nespareni elektron u vanjskoj orbiti što ih čini izrazito nestabilnima i visoko reaktivnima, pri čemu reagiraju s organskim ili neorganskim spojevima (41). Procijenjeno je da dnevno 10 000 – 20 000 slobodnih radikala napada svaku stanicu tijela. Kod vrhunskih sportaša ta je brojka uvećana za 50%. Slobodni radikali nastaju uslijed apsorpcije energije zračenja, u redukcijsko-oksidacijskim reakcijama, tijekom patoloških i normalnih fizioloških procesa kao što su oksidacijska fosforilacija u mitohondrijima, prijenosom elektrona u sistemu citokroma P-450 u endoplazmatskom retikulumu, oksidacijom masnih kiselina u peroksisomima, metabolizmom arahidonske kiseline u staničnim membranama i tijekom fagocitoze (38). Slobodni radikali mogu nastati i tijekom enzimatske oksidacije i autooksidacije različitih kemijskih spojeva pri čemu dolazi do redukcije

molekularnog kisika i nastajanja superoksida, najčešće uz prisutnost prijelaznih metala. U fiziološkom stanju glavni izvor slobodnih radikala je „curenje“ elektrona iz elektronskog transportnog lanca u mitohondrijima na molekularni kisik što stvara superoksid ($\cdot\text{O}_2$) (42). Mala stanična organela koja je odgovorna za proizvodnju energije i staničnu respiraciju naziva se mitohondrij. Elektroni prelaze na različite molekule preko sustava „elektronski transportni lanac“ i svakim prelaskom se stvara kemijska energija. Čak i u idealnim uvjetima neki elektroni cure s elektronskog transportnog lanca i reagiraju s kisikom pri čemu nastaje superoksid koji onda primarno reagira s mitohondrijskom DNK. Većina štete nastale u jezgri DNK se popravi, dok je kapacitet popravka mitohondrijske DNK deficijentan te dolazi do nakupljanja oksidacijski oštećene mitohondrijske DNK. S vremenom mitohondriji gube svoju funkciju te dolazi do smrti stanice. Osim endogenih izvora, ROS može u organizmu nastati i uslijed izlaganja egzogenim izvorima kao što su ionizirajuće zračenje, ultraljubičasto zračenje, ozon, dim cigareta, industrijski onečišćivači i lijekovi (43).

1.8.2. Reaktivni kisikovi spojevi

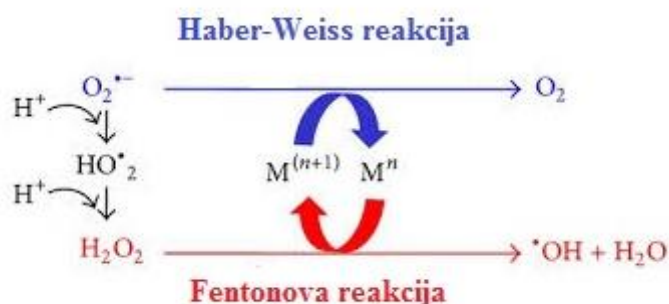
ROS su skupina vrlo reaktivnih spojeva koji obuhvaćaju kisikove radikale poput superoksidnog aniona (O_2^-) i hidroksilnog radikala ($\text{HO}\cdot$) te druge reaktivne spojeve kisika kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), reaktivni (singlet) kisik ($^1\text{O}_2$), hipoklornu kiselinu (HOCl) te ozon (O_3) koji uzrokuju oksidacijsko oštećenje staničnih struktura (38).

Superoksid ($\cdot\text{O}_2$) nastaje redukcijom jednog elektrona molekule kisika (41). Njegovo djelovanje je ograničeno na mjesto stvaranja te ne može prodrijeti duboko u stanicu zbog ograničene topljivosti u mastima. U kiseloj sredini veže proton pri čemu nastaje još reaktivniji perhidroksilni radikal ($\text{HO}_2\cdot$). Superoksid se spontano, ali i uz pomoć superoksid dismutaze (SOD) te vodikovih iona, raspada u vodikov peroksid (H_2O_2) (slika 3).



Slika 3. Prikaz lančane reakcije (kaskade) slobodnih radikala

Vodikov peroksid se zatim pretvara u vodu i molekularni kisik djelovanjem enzima katalaze, glutation peroksidaze i peroksiredoksina. Iako vodikov peroksid nije radikal jer nema nesparenih elektrona, on je oksidans koji uz prisustvo prijelaznih metala, dvovalentnog iona željeza (Fe^{2+}) i jednovalentnog iona bakra (Cu^+), može prihvatiti jedan elektron stvarajući vrlo toksičan hidroksilni radikal (•OH). Vodikov peroksid je topiv u mastima pa može djelovati na udaljenim mjestima od njegovog stvaranja. Hidroksilni radikal nastaje Fentonovom i Haber-Weissovom reakcijom (slika 4).



Slika 4. Prikaz Fentonove i Haber-Weissove reakcije

U Fentonovoj reakciji Fe^{2+} reagira s vodikovim peroksidom pri čemu nastaje hidroksilni radikal i hidroksilni ion uz nastanak Fe^{3+} . U Haber-Weissovoj reakciji superoksid reagira s vodikovim peroksidom pri čemu također nastaje hidroksilni radikal i hidroksilni ion.

Hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) je najreaktivnija poznata ROS vrsta i reagira sa svim vrstama biomolekula. Njegovo poluvrijeme života je kratko (manje od 1 ns) i zato mu je djelovanje ograničeno na najbliže stanične komponente (41,44).

1.8.3. Slobodni radikali dušika

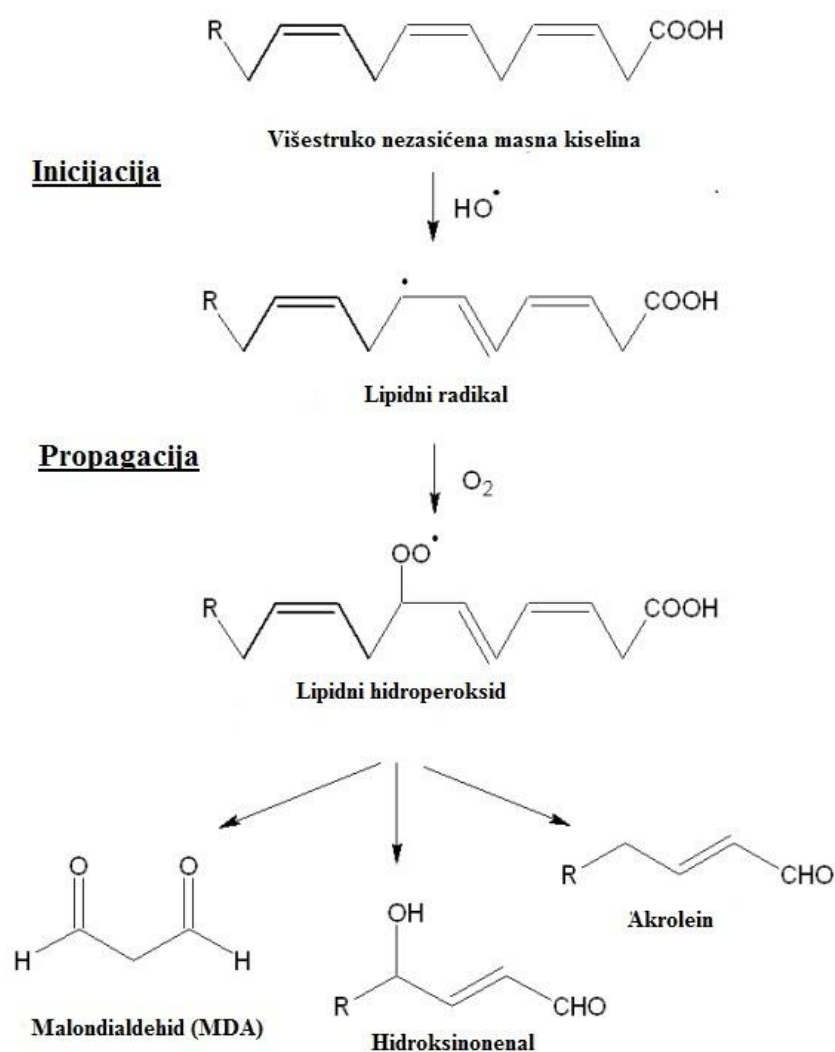
Naziv „reaktivni dušikovi spojevi“ (eng. reactive nitrogen species-RNS) označava skupinu visoko reaktivnih dušikovih spojeva koja uz slobodne dušikove radikale, dušikov oksid ($\text{NO}\cdot$) i dušikov dioksid ($\text{NO}_2\cdot$), uključuje i druge reaktivne spojeve dušika kao što su dušična kiselina (HNO_2), peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$), peroksinitritna kiselina (ONOOH) i alkil peroksinitrat (ROONO) (44). Dušikov oksid nastaje u endotelnim, živčanim i upalnim stanicama iz L-arginina djelovanjem dušik oksid sintetaze (45). On sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka, u upalnim reakcijama, inhibiciji agregacije trombocita i proliferaciji glatkih mišićnih stanica. Dušikov oksid je toksičan i ima važnu ulogu u oštećenju tkiva tijekom kronične upale, infarkta mozga i septičkog šoka (46, 47). Reakcijom $\text{NO}\cdot$ sa superoksidom nastaje vrlo toksičan peroksinitrit koji može potaknuti lipidnu peroksidaciju (48). Peroksinitrit s lipofilnim peroksilnim radikalima ($\text{ROO}\cdot$) stvara relativno stabilni ROONO koji može zaustaviti proces lipidne peroksidacije. Stoga, veća količina $\text{NO}\cdot$ štiti lipide staničnih membrana od oštećenja (49, 50).

1.8.4. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je složena lančana reakcija (slika 5) oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina (eng. Polyunsaturated fatty acid; PUFA) potaknuta ROS-om i RNS-om (51, 52). Višestruko nezasićene masne kiseline nalaze se u sastavu lipida svih bioloških membrana i jako su osjetljive na oštećenja uzrokovana ROS-om. Lipidna peroksidacija rezultira stvaranjem oksisterola, hidroksiperoksida i endoperoksida koji se dalje

metaboliziraju do reaktivnih α , β aldehida (HNE, akrolein), dialdehida (malondialdehid, glioksal) i ketoaldehida (4-oksotransnonenal i isoketali) (53). U kontroliranim uvjetima se u stanicama proizvode oksidirani produkti PUFA pod utjecajem enzima koji djeluju kao medijatori upale (54).

Pojava lipidne peroksidacije u biološkim membranama može dovesti do poremećaja funkcije i smanjene fluidnosti što je sve povezano s brojnim bolesnim stanjima (55).



Slika 5. Lančana reakcija lipidne peroksidacije. Prva faza reakcije, inicijacija, događa se uslijed reakcije PUFA-e s jednim od izrazito reaktivnih radikala (hidroksilni, karbonatni ili dušikov dioksid radikal). Nastali lipidni hidroperoksidi imaju sposobnost daljnje propagacije reakcije čiji konačni produkti su reaktivni aldehidi.

U fazi inicijacije visoko reaktivni oksidans (X) oduzima atom vodika višestruko nezasićenoj masnoj kiselini pri čemu nastaje alkilni, odnosno lipidni radikal. Proces se odvija na vodikom smještenom na α -metilen ugljiku. Ovaj proces može izazvati bilo koji spoj koji ima sposobnost oduzeti vodikov atom masnoj kiselini. Jedini od reaktivnih kisikovih radikala koji ima dovoljno energije da izazove lipidnu peroksidaciju je hidroksilni radikal (56, 57). Ukoliko inicijacija nije kontrolirana obrambenim mehanizmima, ona može započeti lančanu reakciju koja može dovesti do uništenja okolnih molekula. Ako nema prisutnih antioksidansa dolazi do faze propagacije i lančane reakcije lipidne peroksidacije, u procesu lipidne peroksidacije sudjeluju i ioni željeza koji potiču daljni proces peroksidacije. Lipidni hidroperoksidi lako reagiraju s Fe^{2+} i Fe^{3+} pri čemu nastaju alkoksi radikali i lipidni peroksilni radikali pri čemu dolazi do grananja lančane reakcije procesa lipidne peroksidacije (58, 59).

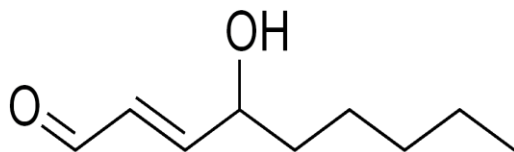
Završni produkti lipidne peroksidacije su reaktivni aldehidi. To su 4-hidroksialkenali i drugi srodni α,β -nezasićeni aldehidi koji se smatraju „drugim toksičnim glasnicima“ primarnih slobodnih radikala (51, 60). Oni mogu u određenim uvjetima nastaviti lančanu reakciju oksidacijskog oštećenja premda se zovu „završni produkti lipidne peroksidacije“. Njihova je reaktivnost niža od reaktivnosti ROS-a, ali dovoljno velika da mogu reagirati s molekulama u okolini i tako oštetiti stanice i uzrokovati staničnu smrt. Reaktivni aldehidi su, za razliku od ROS-a, relativno stabilniji te mogu difundirati od mjesta nastanka i širiti oksidativno oštećenje na molekule daleko od početnog oštećenja uzrokovanog slobodnim radikalima, bilo intracelularno ili ekstracelularno (61).

Glavni produkti nađeni u biološkim uzorcima su heksanal, malondialdehid (MDA) i 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) te su stoga i najviše istraživani (38).

1.8.5. 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)

4-hidroksi-2-nonenal ($\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_2$) je bezbojna tekućina molekulske mase 156,22. Topiva je u većini organskih otapala poput alkohola, heksana i kloroforma, dok je slabo topiva u vodi s maksimalnom topljivošću koja iznosi 6,6 g/L odnosno 42 mM (56). Kao i svi 4-hidroksialkenali, HNE ima 3 funkcionalne skupine: aldehidnu skupinu ($\text{C}=\text{O}$), ugljik-ugljik dvostruku vezu ($\text{C}=\text{C}$) i hidroksilnu skupinu (OH) koje u reakciji mogu sudjelovati same ili u

sekvenci kemijskih reakcija (Slika 6). Koja će od tih skupina reagirati ovisi o tipu reaktanta i uvjetima reakcije (57).



Slika 6. Prikaz strukturne građe 4-hidroksi-2-nonenala.

4-hidroksi-2-nonenal može reagirati sa svim aminokiselinama uz uvjet da postoji blago lužnati medij (pH 8,8) i visoka koncentracija reaktanata (10mM). HNE je jedini reaktivni aldehid koji se nalazi i u fiziološkim stanjima u mjerljivim količinama (62, 63). U tkivima i u serumu fiziološka koncentracija HNE-a je manja od 0,1 μ M. U tako niskim koncentracijama HNE pojačava kemotaktičnu aktivnost neutrofila, utječe na aktivnost enzima adenilat-ciklaze, gvanilat-ciklaze i fosfolipaze C te tako djeluje na rast, prijenos signala i druge važne funkcije stanica (51,64, 65). Povišene koncentracije HNE-a od 1-20 μ M *in vitro* inhibiraju stvaranje DNK, bjelančevina, stvaranje produkta *c-myc* gena, a potiču fosfolipazu A2 i stvaranje produkata *c-fos* gena (66, 67). U koncentracijama od 100 μ M i većim, HNE uzrokuje akutnu citotoksičnost koja dovodi u većini slučajeva do stanične smrti. U velikim koncentracijama dolazi do djelomičnog ili potpunog prekida staničnih funkcija kao što su mitohondrijska respiracija, sinteza bjelančevina, RNA i DNA (51). Njegova uloga u organizmu može varirati od fiziološke do patološke zbog uključenosti HNE-a u brojne signalne putove kojima se reguliraju diferencijacija, proliferacija, upala i apoptoza (68). Iako nastaje neenzimskim putem kao produkt lipidne peroksidacije, njegovo stvaranje je potaknuto u prisutnosti NADPH ovisnih enzima i dodatno ubrzano u prisutnosti iona željeza. Jednom formiran, HNE se Michaelovom adicijom može vrlo brzo vezati na cisteinske, lizinske i histidinske ostatke proteina (51). Do sada je prepoznato nekoliko skupina proteina modificiranih HNE-om, uključujući transportere iona i nutrijenata na plazma membrani, receptore za čimbenike rasta i neurotransmitere, proteine uključene u sustav prijenosa elektrona u respiratornom lancu mitohondrija, šaperone, proteasomalne i citoskeletne proteine (69). Stanice posjeduju različite mehanizme obrane od HNE-a i HNE-om modificiranih proteina kako bi zaustavile njihove

štetne učinke. Glavni i najučinkovitiji sustav obrane od HNE-a je putem glutaciona (70). HNE se detoksicira konjugacijom s glutationom (GSH) neenzimatski ili je reakcija detoksifikacije katalizirana glutation-transferazom (GST) koji su ubikvitarni enzimi kojih ima najviše u jetri. Detoksikacija u hepatocitima je moguća i oksidacijom ili redukcijom do njegove odgovarajuće kiseline ili alkohola aldo-keto reduktazama. Tako aldehid-dehidrogenaza oksidira HNE do 4-hidroksinonenoične kiseline (HNA), dok aldehid reduktaza reducira HNE do 1,4-dihidroksinonena (DHN) (71). Oksidacija aldehid dehidrogenazama aktivira se u stanju blagog stresa, a redukcija aldehid reduktazom aktivira se u akutnom stresu (70).

1.8.6. Oksidacijski stres i karcinogeneza

Karcinogeneza je proces pretvorbe normalne stanice u malignu. To je složen proces, potaknut karcinogenima (72). Tri su stadija karcinogeneze: inicijacija, promocija i progresija. Inicijacija je ireverzibilan proces koji započinje mutacijom u genomu stanice. U toj fazi dolazi do promjena molekulske strukture stanične DNK, a tvari ili fizikalne pojave koje mogu dovesti do takvih promjena (mutacija) se zovu mutagenima. Ukoliko mutacije dovode do nastanka tumora te tvari nazivamo karcinogenima, u karcinogene spadaju: kemijski karcinogeni, ionizacijsko i neionizacijsko zračenje te virusi (73). U toku inicijacije dolazi do aktivacije brojnih protoonkogenih i inaktivacije tumor supresorskih gena. U stadiju promocije dolazi do mijenjanja ekspresije gena i prijenosa signala iz okoline do genoma te do selektivne klonalne ekspanzije stanica koje izbjegavaju kontrolne mehanizme rasta i diferencijacije.

U novije vrijeme smatra se da slobodni radikali imaju važnu ulogu u sva tri stadija karcinogeneze (74). U stanicama karcinoma dokazana je veća razina 8-hidroksi-2' deoksiadenozina (8-oksodG) što je potvrdilo da tumorske stanice podliježu perzistentnom i visokom oksidacijskom stresu (75). To se objašnjava samim metabolizmom tumorskih stanica (potaknuta glikoliza), povećanom infiltracijom fagocita koja prati tumor te povećanom produkcijom ROS-a u defektnom vaskularnom sustavu tumora za vrijeme reperfuzijske faze koja prati hipoksiju. Fagociti i B limfociti sadrže enzim NADPH oksidazu i kada fagociti prepoznaju stranu molekulu dolazi do niza reakcija (tzv. „oksidacijskog praska“)

kojim se elektroni prenose s NADPH na O₂ pri čemu nastaje superoksid koji služi za ubijanje stanica i patogena (76). Karcinomi potiču svoj rast stimulacijom angiogeneze. Sam tok krvi unutar novostvorenih krvnih žila je kaotičan uzrokujući razdoblja hipoksije praćene reperfuzijom. Poznato je da reperfuzija koja se javlja nakon infarkta miokarda i ishemije mozga uzrokuje stvaranje ROS-a. Tako je u nekim studijama kod karcinoma dokazano da tumori pridruženi makrofazi pridonose daljnjem oksidacijskom stresu u tumorskim stanicama tako što luče slobodne kisikove radikale (77). Tumori pridruženi makrofazi luče i faktor nekroze tumora- α (TNF- α) koji djeluje necitotoksično na DNA i tako potiče daljnji oksidacijski stres u stanicama karcinoma (78). Slobodni radikali su bitan faktor u inicijacijskom stadiju karcinogeneze (79). Za vrijeme inicijacije oksidacijsko oštećenje DNK može dovesti do mutacije gena te strukturnih promjena DNK. Hidroksil radikal može aktivirati određene onkogene kao što su K-ras i C-raf-1 (80). Za vrijeme promocije oksidacijski stres može doprinijeti abnormalnoj ekspresiji gena, inhibiciji međustanične komunikacije i modifikaciji sistema drugih glasnika, što rezultira u povećanju stanične proliferacije ili smanjenju apoptoze u iniciranoj populaciji stanica što sve rezultira klonalnom ekspanzijom iniciranih stanica u preneoplastične žarišne lezije. Perzistentan oksidacijski stres rezultira patofiziološkim promjenama koje omogućavaju selektivan rast preneoplastičnih iniciranih stanica. U fazi promocije moguće je da sami antioksidansi omogućavaju klonalno širenje i promociju tumora štiteći inicirane stanice od pretjerane toksičnosti oksidansa i posljedične apoptoze. Progresija tumora rezultira u razvoju malignog rasta iz benignih lezija. Oksidacijski stres može sudjelovati u fazi progresije stvaranjem daljnjih promjena u strukturi DNA u populaciji iniciranih stanica. Mogu nastati promjene enzimatske aktivnosti i tako učiniti lezije otpornima na normalnu kontrolu rasta. U ovom stadiju oksidacijski stres može imati glavnu ulogu u razvoju karakteristika tumora kao što su nekontrolirani rast, genomska nestabilnost, rezistencija na kemoterapiju te invazija i metastaze. ROS može oštetiti određene inhibitore proteaza što vodi pojačanoj aktivaciji nekih proteaza (plazmin, elastaza i aktivator plazminogena) čime se potpomaže invazija tumora i metastaze (81). Oksidacijski stres u karcinomu aktivira neke transkripcijske faktore kao što su nuklearni faktor-kappa B (NF- κ B), AP-1, povećava ekspresiju protoonkogeni (c-fos, c-jun, c-myc), inaktivira tumor supresor gen (p53), te inducira oštećenje DNA koje vodi daljnjoj genetskoj nestabilnosti (82). Transkripcijski faktori su proteini niske molekulske težine koji se vežu za promotorsku regiju gena te reguliraju transkripciju gena uključenih u rast, razvoj i starenje stanice (83).

AP-1 kontrolira gene važne za stanični rast, a ROS može aktivirati AP-1 i potaknuti njegovu sintezu (84). ROS aktivira i antioksidacijski sistem (tiodoksini, peroksiredoksini) koji može štiti karcinom od apoptoze i činiti ga otpornim na kemoterapiju.

Perzistentni oksidacijski stres u tumoru je dovoljan da uzrokuje dodatnu gensku nestabilnost, ali ne i nekrozu tumorskih stanica. U tumoru perzistentni i visoki oksidacijski stres djeluje selektivno i potiče ubrzani rast, invaziju i metastaze (39,75).

Oksidacijski stres može potpomognuti invaziju i metastaziranje aktivacijom tkivnih matriks metaloproteinaza (MMP-a) i inhibicijom tkivnih inhibitora matriks metaloproteaza (TIMP-a). ROS može aktivirati matriksnu metaloproteinazu-2 (MMP-2) vjerojatno kroz reakciju ROS s tiolnom grupom u proteaza katalitičkoj domeni (85). MMP-2 je gelatinaza koja ima važnu ulogu u invaziji kod karcinoma i nastanku metastaza. Također, ROS mogu regulirati ekspresiju više MMP-a (MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-10, MMP-13) (86). Matriks metaloproteaza -1 (MMP-1) je kolagenaza koja potpomaže rast krvno-žilne opskrbe u tumoru. Uz to, angiogeneza podiže intersticijski tlak u tumoru i tako može potaknuti širenje tumora limfnim žilama. Slobodni radikali mogu povećati migraciju tumorskih stanica aktivacijom p38 MAPK i time rizik za invaziju i metastaze (87). Slobodni radikali nekad ne potpomažu ekspresiju TIMP-a dok je aktivnost MMP-a povećana, ali svejedno povećana ekspresija MMP-a dovodi do povećanog metastatskog potencijala tumora (88).

Zadnjih godina, postalo je očito da većina tipova stanica raka ima povećanu razinu ROS-a. Tako su studije u solidnim tumorima pokazale povećanu razinu produkta oksidacijskog oštećenja DNA. Najčešća lezija baze koja je ujedno i najviše mjerena kao indeks oksidacijskog oštećenja DNA je 8-hidroksigvanin koji se često mjeri i kao nukleozid (89). Interakcijom ·OH radikala s DNA dolazi do hidroksilacije 2'-deoksigvanosina na poziciji C-8 pri čemu nastaje 8-hidroksi-2'-deoksigvanozin (8-OHdG) koji je najrašireniji marker oksidacijskog stresa. 8-oksodG može inducirati GC→TA transverziju za vrijeme DNA replikacije i ako se ove lezije ne poprave postaju mutagene (90). Studije su pokazale da je razina 8-oksodG znatno veća u stanicama i tkivu karcinoma dojke u usporedbi s nemaligim lezijama dojke (91). Povišene razine 8-oksodG također su nađene u urinu ili u DNA tumorskog tkiva u usporedbi sa zdravim tkivom kod akutne limfoblastične leukemije, kolorektalnog karcinoma, cervikalne displazije visokog stupnja, karcinoma bubrega i drugih (92-94). Novija istraživanja su pokazala slab imunohistokemijski pozitivitet 8-oksodG kod

invazivnog karcinoma dojke u usporedbi s neinvazivnim lezijama te da je negativan imunohistokemijski nalaz 8-oksodG nezavisni prognostički faktor loše prognoze (95, 96).

Nasuprot tome, povećana 8-oksodG razina u tumorskom tkivu je prognostički faktor za loše preživljenje kod hepatocelularnog karcinoma i karcinoma pluća, što ukazuje na različitu funkciju 8-oksodG u različitim tumorima (97, 98).

1.8.7. ROS i HNE u karcinogenezi

Biologija tumorskog rasta povezana je s pojavom oksidacijskog stresa u kojem stanice luče reaktivne kisikove spojeve (ROS), prvenstveno slobodne radikale koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju. Slobodni radikali imaju lokalne efekte zbog kratkog vremena života dok se produkti lipidne peroksidacije nazivaju „drugim glasnicima oksidacijskog stresa“ zbog dužeg vremena života i sposobnosti difuzije dalje od mjesta nastanka. Reakcija ROS-a s višestruko nezasićenim masnim kiselinama membranskih lipida rezultira proizvodnjom različitih reaktivnih aldehida. Malonaldehid, 4-hidroksinonenal i akrolein su najreaktivniji završni produkti lipidne peroksidacije (99) koji reagiraju s različitim bioaktivnim makromolekulama, uključujući proteine i nukleinske kiseline, i tako mijenjaju njihovu strukturu i funkciju.

Akrolein je aldehid koji je poznat kao zagađivač iz okoliša koji nastaje izgaranjem plastike, iz dima cigarete i u ulju prženom na visokim temperaturama. Akrolein također nastaje biotransformacijom iz alilnih sastojaka i iz ciklofosfamida (100). Između svih α,β -nezasićenih aldehida uključujući HNE i malodialdehid, akrolein je najjači elektrofil i stoga pokazuje najjaču reaktivnost prema proteinima i DNA (101). U nekim studijama nađeno je da akrolein djeluje na karcinogene iz dima cigarete i inhibira aktivnost gen supresor tumora p53 i tako igra glavnu ulogu u procesu karcinogeneze raka pluća (102, 103). U studiji rađenoj na karcinomima kolona nađeno je da imunohistokemijska ekspresija akroleina manje izražena u uznapredovalim stadijima karcinoma negoli u ranim stadijima bolesti i primijećena je njegova nazočnost u okolnom zdravom tkivu uz karcinom (104).

Premda je akrolein 100 puta reaktivniji od HNE-a, zasad je HNE ipak najbolje opisan aldehid koji je zbog biomedicinskih učinaka poznat i kao „drugi glasnik slobodnih radikala“. Genotoksičan i mutageni efekt HNE-a je dokazan u prokariotskim i eukariotskim stanicama. Ovaj jaki alkilirajući aldehid može direktno oštetiti DNA. Njegova genotoksičnost je prikazana u hepatocitima i endotelnim stanicama moždanih krvnih žila, gdje je nađeno

povećanje jezgrica, kromosomske aberacije i izmjena sestrinskih kromatida (105). Potencijalni mehanizam mutagenosti HNE-a je stvaranje DNA-adukta s metabolitima HNE-a, tzv. etheno-DNA adukt čija povećana razina je nađena u kroničnim upalnim procesima koji vode u zloćudne procese kao što su kronični pankreatitis, ulcerativni kolitis, virusni hepatitis B i Chronova bolest (106).

Oštećenje DNA s HNE-om dovodi do hot-spot mutacije G:C nasuprot T:A na kodonu 249 u tumor supresor genu p53 kod hepatocelularnog karcinoma, stoga HNE može biti involviran u etiopatogenezu ljudskih malignih tumora (107). Postoji povezanost između HNE-a i p53. P53 se aktivira kod oštećenja DNA i oksidacijskog stresa da štiti i popravi stanicu, ali ako stres dosegne prag, p53 potiče staničnu smrt (70).

Premda uloga lipidne peroksidacije u karcinogenezi još nije razjašnjena, ona ima važnu ulogu u nastanku nekoliko ljudskih zloćudnih tumora uključujući tumore bubrega, jetre i kože (108), a njeni produkti mogu se koristiti kao indikatori u prognozi raka (109). Pojavnost HNE-a kao završnog produkta lipidne peroksidacije i pokazatelja OS u tumorima opisana je do sada u glijalnim tumorima SŽS-a. Imunohistokemijski pozitivitet HNE-a nazočan je u astrocitnim, oligodendroglijalnim i endodimalnim tumorima, njegova ekspresija postupno raste u stanicama tumora s višim gradusom i neovaskularizacijom (110, 111) što se može objasniti visokom koncentracijom PUFA u lipidima stanične membrane. Također se ista korelacija našla i u karcinomima dojke (112). U pacijenata oboljelih od karcinoma dojke u plazmi je nađena povećana koncentracija malondialdehida (MDA) u usporedbi s osobama bez karcinoma dojke. Dok u uznapredovalim stadijima karcinoma dojke razine MDA u plazmi mogu biti smanjene (108). U karcinomima bubrega imunopozitivitet HNE-a je primijećen u citoplazmama tumorskih stanica za razliku od normalnog kontrolnog tkiva, ali bez korelacije s kliničkim stadijem (92). U istraživanjima kod kolorektalnog karcinoma nalazi su kontradiktorni. U nekim studijama nađena je korelacija ekspresije HNE i progresije bolesti (113) dok u drugim studijama autori objavili značajni pad ekspresije HNE-a u tkivu karcinoma u usporedbi s zdravim tkivom (114, 115). U hepatocelularnom karcinomu nalazi su suprotni, kod njih produkti lipidne peroksidacije uključujući i HNE su niski ili negativni (116). Taj nalaz se objašnjava povećanom aktivnošću enzima koji metaboliziraju aldehide i neenzimatskim antioksidativnim sustavom nastanka HNE-GSH (glutation) konjugata koji brzo i učinkovito odstranjuju HNE iz stanice štiteći tako stanice raka od citotoksičnog oštećenja aldehida (117). U istraživanju provedenom na benignim i malignim tumorima štitnjače ispitivao se utjecaj oksidativnog oštećenja (8-oksodG) i lipidne peroksidacije (HNE).

Imunohistokemijski su za oba markera nađene statistički značajno povećane razine u benignim i malignim tumorima u usporedbi s normalnim tkivom, što sugerira njihovu ulogu u ranim događajima koji potiču gensku nestabilnost i posljedični nastanak bolesti (118).

Ovi različiti rezultati o imunohistokemijskoj ekspresiji HNE-a u tumorima različitog porijekla i diskrepancija između razine oksidacijskog stresa i razine produkata lipidne peroksidacije može biti zbog: oblika HNE metabolizirajućih enzima u tumorskim stanicama, sastava lipida stanične membrane i prisutnosti upalnih stanica u okolnom tkivu uz tumor koje mogu povećati razinu HNE-a (119).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

2.1. Ciljevi istraživanja

Osnovni su ciljevi ovog istraživanja:

1. Utvrditi imunohistokemijski pojavnost HNE i p53 u pločastom karcinomu orofarinksa.
2. Utvrditi imunohistokemijski pojavnost HNE i p53 u okolnom displastičnom i/ili zdravom epitelu .
3. Utvrditi imunohistokemijski pojavnost HNE u stromi, krvnim žilama i upalnim stanicama oko tumora.
4. Utvrditi povezanost izraženosti HNE-a i p53 s proširenošću tumora (TNM) u trenutku postavljanja dijagnoze
5. Utvrditi povezanost izraženosti HNE i p53 prema stupnju diferencijacije pločastog karcinoma.
6. Usporediti razinu izraženosti HNE i p53 između tumorskog tkiva i kontrolne zdrave skupine.

2.2. Hipoteza

Nazočnost 4-hidroksinonenala (HNE) kao konačnog produkta lipidne peroksidacije će biti izražena različito u tumorskom tkivu i okolnom normalnom tkivu, pri čemu će intenzitet imunohistokemijske reakcije na HNE biti u skladu s ekspresijom p53.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

3.1. ISPITANICI

Istraživanje je retrospektivno i provelo se na arhivskom bioptičkom materijalu Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Koristili su se parafinski blokovi iz 2002. do 2007. godine. U istraživanje je ukupno uključeno 102 bolesnika dijagnosticirana i operirana u Klinici za bolesti uha, nosa, grla i kirurgiju glave i vrata, Kliničkog bolničkog centra Zagreb u tom razdoblju.

Za istraživanje su se koristili samo materijali bolesnika s pločastim karcinomom orofarinksa za koje su dostupni klinički i patohistološki podaci.

Od kliničkih podataka gledao se spol (ženski i muški), dob u trenutku postavljanja dijagnoze, podsijelo tumora orofarinksa (tonzila, baza jezika, meko nepce i stražnja faringealna stijenka), a od patohistoloških gledao se tip tumora (pločasti karcinom), gradus tumora: (dobro diferencirani, umjereno diferencirani, slabo diferencirani), veličina tumora (T), zahvaćenost limfnih čvorova vrata (N) i prisutnost udaljenih metastaza (M). Klinički stadij bolesti izražen je prema TNM-klasifikaciji koja se rabila u trenutku postavljanja dijagnoze.

Svi obrađeni bolesnici imali su primarno sijelo tumora u orofarinksu (tonzila, baza jezika, meko nepce i stražnja faringealna stijenka). Kod svih tumora utvrđena je patohistološka dijagnoza pločastog karcinoma, gradus tumora, T-status, N-status i klinički stadij bolesti. Za sve bolesnike prikupljeni su podaci o spolu, dobi u trenutku postavljanja dijagnoze, primarnom podsijelu tumora u orofarinksu, T-stadiju, N-stadiju, kliničkom stadiju bolesti. Podaci su prikupljeni iz arhiviranih patohistoloških nalaza s Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju i iz povijesti bolesti s Klinike za bolesti uha, grla i nosa i kirurgije glave i vrata, KBC Zagreb.

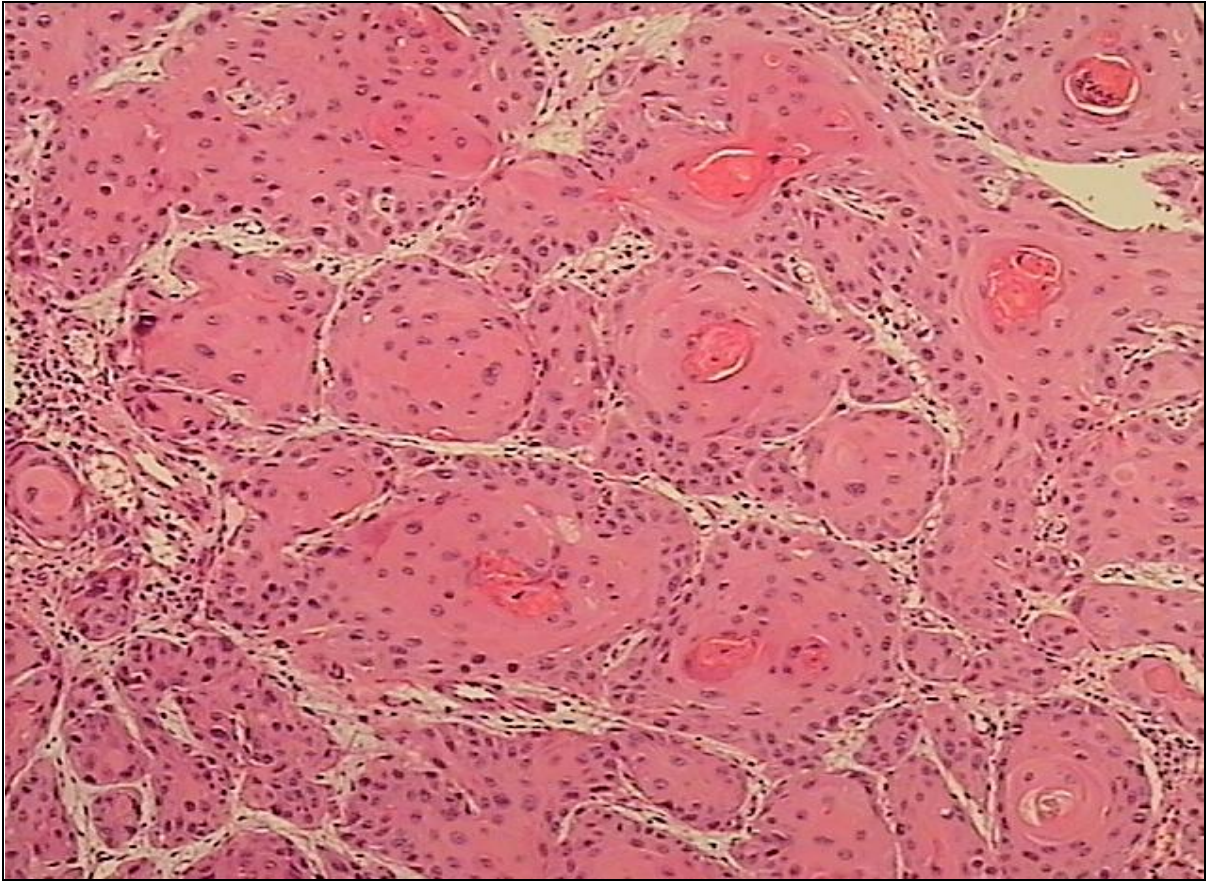
Kontrolnu skupinu činili su uzorci sluznice orofarinksa dobiveni nakon tonzilektomije zbog kroničnog tonzilitisa ili uzorci sluznice orofarinksa dobiveni prema protokolu za

dijagnostiku tumora nepoznatog primarnog sjela u kojima nije bilo tumora niti upalnog procesa. U kontrolnim uzorcima na površini sluznice nalazi se pravilni mnogoslojni pločasti epitel, a u podležućoj vezivnoj stromi krvne žile i mjestimično seromukozne žlijezde. Ne nalazi se upalnih stanica. U uzorcima iz tonzila gledao se epitel ispod kojeg se nalazila vezivna stroma i seromukozne žlijezde, za analizu se izbjegavao dio građen od limfatičnog tkiva.

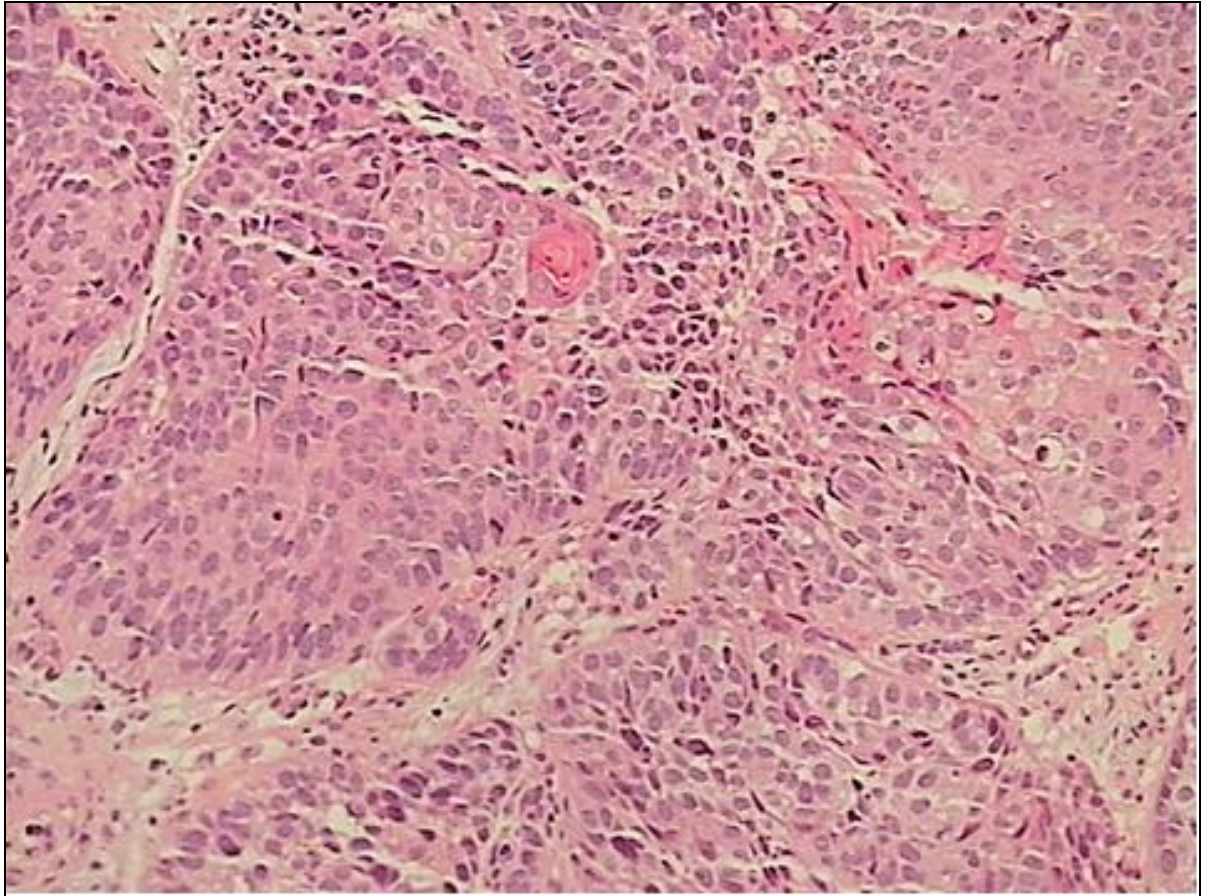
Broj uzoraka ispitivane skupine je 102 uzorka pacijenata operiranih zbog pločastog karcinoma orofarinksa, a kontrolnu skupinu čine 32 uzorka od pacijenata sa zdravom sluznicom orofarinksa.

3.2. OBRADA UZORAKA I PRIPREMA TKIVA ZA SVJETLOSNU MIKROSKOPSKU ANALIZU

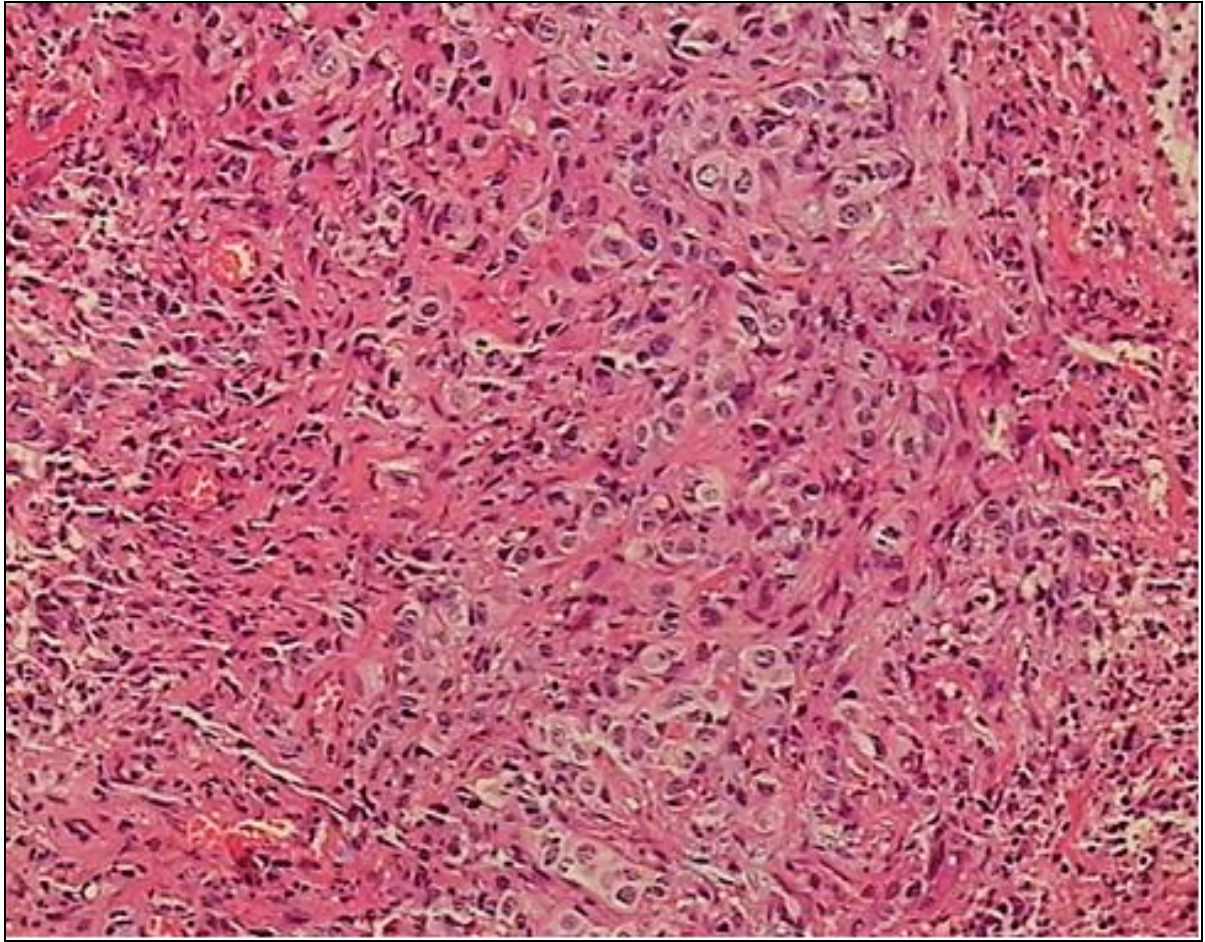
Operacijom dobiveni uzorci pločastog karcinoma obrađeni su standardnom histološkom metodom koja uključuje 24 satnu fiksaciju u 10%-tnom puferiranom formalinu te dehidraciju u etanolu rastućih koncentracija (70%, 80%, 96% i 100%). Tkivo je potom bilo provedeno kroz ksilol te prožeto u tekućem parafinu na temperaturi od +60 , nakon čega je uklopljeno u parafinske blokove. Tako uklopljeno tkivo bilo je ohlađeno na +4 , te je bilo rezano na kliznom mikrotomu na rezove debljine 4-5 μm . Ovi rezovi nakon deparafiniranja u ksilolu i dehidracije u opadajućem nizu koncentracije etanola (100%, 96%, 80% i 70%) bili su obojani histokemijskom tehnikom na hemalaun-eozin (HE). Na hemalaun-eozinskim (HE) preparatima ponovno je procijenjena morfološka građa tumorskog tkiva te se potvrdio pločasti karcinom. Prema smjernicama SZO odredio se histološki gradus tumora (11). Postoje tri histološka gradusa tumora koja se određuju prema nuklelarnom pleomorfizmu i količini roževine koju stvaraju tumorske stanice (slika 7, 8 i 9). Gledao se izgled epitela sluznice oko tumorskog tkiva i procijenilo pokazuje li displastične promjene ili je zdrav. Potom se odabrao reprezentativni parafinski blok za rezanje za daljnja imunohistokemijska bojanja.



Slika 7. Prikaz pločastog karcinoma orofarinksa histološkog gradusa I (bojanje HE, objektiv x 10).



Slika 8. Prikaz pločastog karcinoma orofarinksa histološkog gradusa II (HE, objektiv x 20).



Slika 9. Prikaz pločastog karcinoma orofarinksa histološkog gradusa III (bojanje HE, objektiv x 20).

3.3. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE PREPARATA MONOKLONSKIM PROTUTIJELOM HNE

Parafinski rezovi tumorskog tkiva debljine 4-5 μm bili su podvrgnuti procesu deparafiniranja ksilenom i rehidracije u opadajućem nizu koncentracija etanola, a potom su isti preparati biti uronjeni 2 minute u metanol. Nakon ispiranja u fiziološkoj otopini puferiranoj s fosfatnim puferom, pH 7,2 (engl. phosphate buffered saline, PBS) endogena peroksidazna aktivnost bila je blokirana s 3%-tnim vodikovim peroksidom. Za imunohistokemijsko (IH) bojanje primarnim monoklonskim protutijelom anti-HNE razrijeđeno u omjeru 1:10 u BSA (engl. bovine serum albumin) koncentracije 1 mg/mL korišten je EnVision kit (K8000, DAKO). Primarno monoklonalno HNE protutijelo je podrijetlom iz kulture klona 'HNE 1g4' dobivenog spajanjem Sp2-Ag8 mijelomskih stanica s B-stanicama BALBc miševa imuniziranih s HNE modificiranim hemocijaninom. Protutijelo je specifično za HNE-histidinski epitop na HNE proteinskim konjugatima (donacija od G. Waega, Graz, Austrija). HNE proteinski konjugati prisutni u stanicama prikazani su diaminobenzidinom (DAB, DAKO) kao smeđe obojenje i kontrastirani s hematoksilinom (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Uz svako bojanje izrađuje se pozitivna i negativna kontrola. Pozitivna kontrola su bile stanice tretirane 1 μM , 5 μM i 50 μM HNE-om, a negativna kontrola su bile stanice netretirane HNE-om te tkiva tumora na koje nije aplicirano primarno protutijelo HNE. Pozitivna kontrola je bilo tkivo pluća.

3.4. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE PREPARATA MONOKLONSKIM PROTUTIJELOM p53

Parafinski rezovi tumorskog tkiva debljine 4-5 μm deparafinizirani su ksilolom, a potom dehidrirani u gradiiranom alkoholu (100%, 96%, 70%) te obojani standardnom imunohistokemijskom metodom imunoperoksidaza avidin-biotin u stroju za automatsko bojanje (Autostainer, DAKO, Danska). Slijedi tretiranje u mikrovalnoj pećici 3 puta po 5

minuta u puferu, pH 9 (Dako Retrieval Solution), a potom hlađenje na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Nakon toga rezovi su inkubirani primarnim monoklonalnim mišjim anti-humanim p53 protutijelom (Monoclonal mouse anti-human, clone DO-7, DAKO, Danska) u razrjeđenju od 1:50 uz dodatak peroksida te ispiranja puferom. Nakon toga je dodano sekundarno protutijelo EnVision (K8000, DAKO, Danska) i inkubirano na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon ispiranja sekundarnog protutijela u puferu, dodao se diaminobenzidin (DAB, DAKO) koji je kod reakcije antigen-antitijelo prikazalo kao smeđe obojenje. Suvišak DAB-a ispirao se destiliranom vodom. Tkivo je kontrastirano hematoksilinom. Uz svako bojanje izrađuje se pozitivna kontrola koja je bila serozni karcinom jajnika. Pozitivnom reakcijom se smatralo obojenje jezgara tumorskih stanica smeđom bojom.

3.5. ANALIZA IMUNOHISTOKEMIJSKIH PREPARATA

Procjena HNE i p53 imunopozitiviteta je utvrđena svjetlosnim mikroskopom tehnikom semikvantitativne analize. Procjena HNE i p53 imunopozitiviteta u citoplazmama i/ili jezgrama stanica temeljila se po postotku pozitivnih stanica (0: 0%, +1: 1-25%, +2: 26-50%, +3: 51-100%). Jačina intenziteta bojenja preparata podijeljena je na 0: bez imunoreakcije, +1: blaga imunoreakcija, +2: umjerena imunoreakcija, +3: snažna imunoreakcija. Tehnika semikvantitativne analize primijenjena je i pri procjeni imunopozitiviteta endotelnih stanica i stijenke krvnih žila, mezenhimske strome te upalnog infiltrata u stromi uz tumor te je negativna reakcija na HNE ocijenjena kao „0“, a pozitivna reakcija na HNE kao „+1“.

Svi preparati su bili pregledani od dva iskusna patologa.

3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

U statističkoj obradi dobivenih rezultata koristile su se metode deskriptivne statistike. Za usporedbu ovisnih i neovisnih uzoraka koristio se neparametrijski Mann-Whitney test. Za testiranje razlike u učestalosti nezavisnih stanja - pojava primijenjen je χ^2 test. Analiza razlika u ekspresiji HNE i p53 između tumora i okoline načinjena je Pearsonovom korelacijom te se za izračun koristila web stranca <http://www.socscistatistics.com/test/pearson/Default2.aspx>. Statistički značajnom smatrana je vrijednost empirijske razine značajnosti p od 0.05 ($p < 0.05$). Dobiveni rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

4. REZULTATI

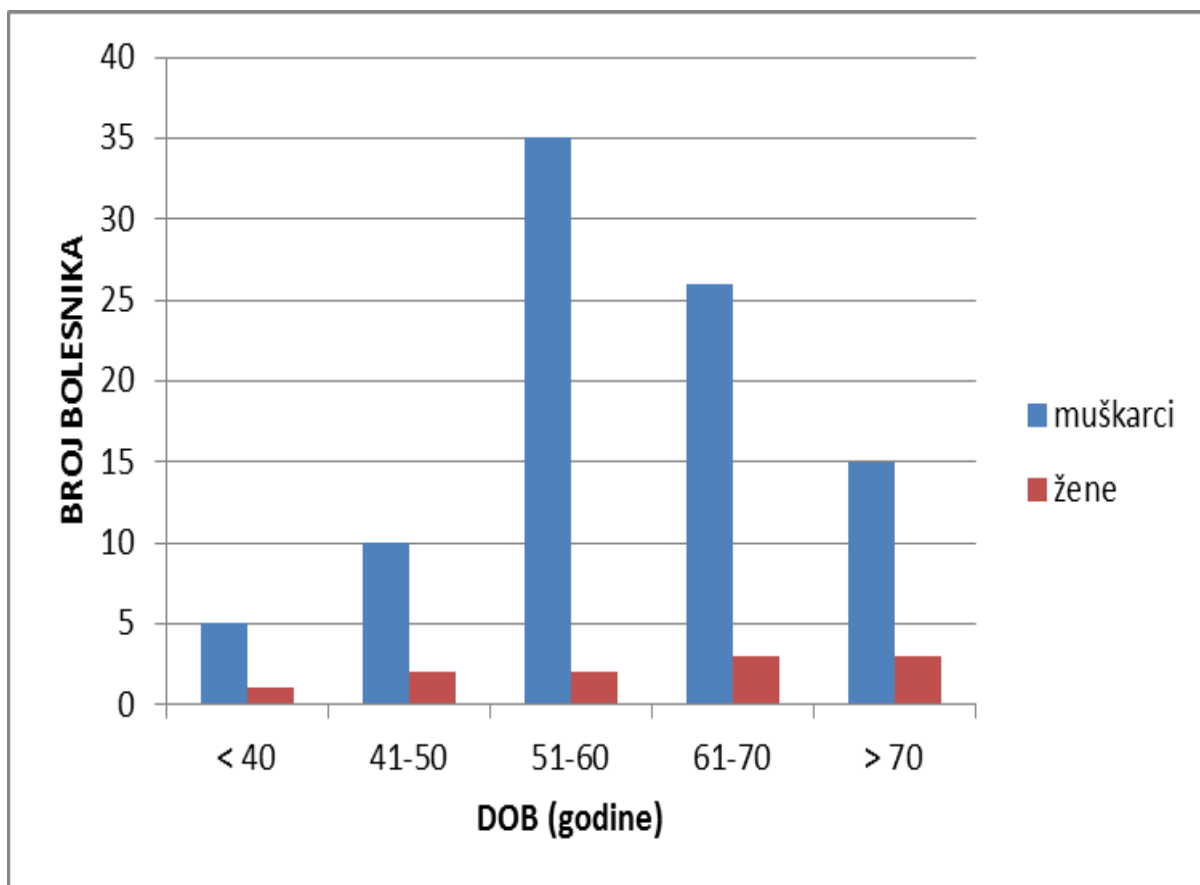
4.1. Analiza obilježja tumora odabranih za imunohistokemijsku obradu

U istraživanje je uključeno 102 bolesnika oboljela od pločastog karcinoma orofarinksa. Učinjena je analiza dobne i spolne raspodjele, raspodjele po podsijelima tumora orofarinksa, po TNM klasifikaciji i stadiju bolesti, te po gradusu tumora.

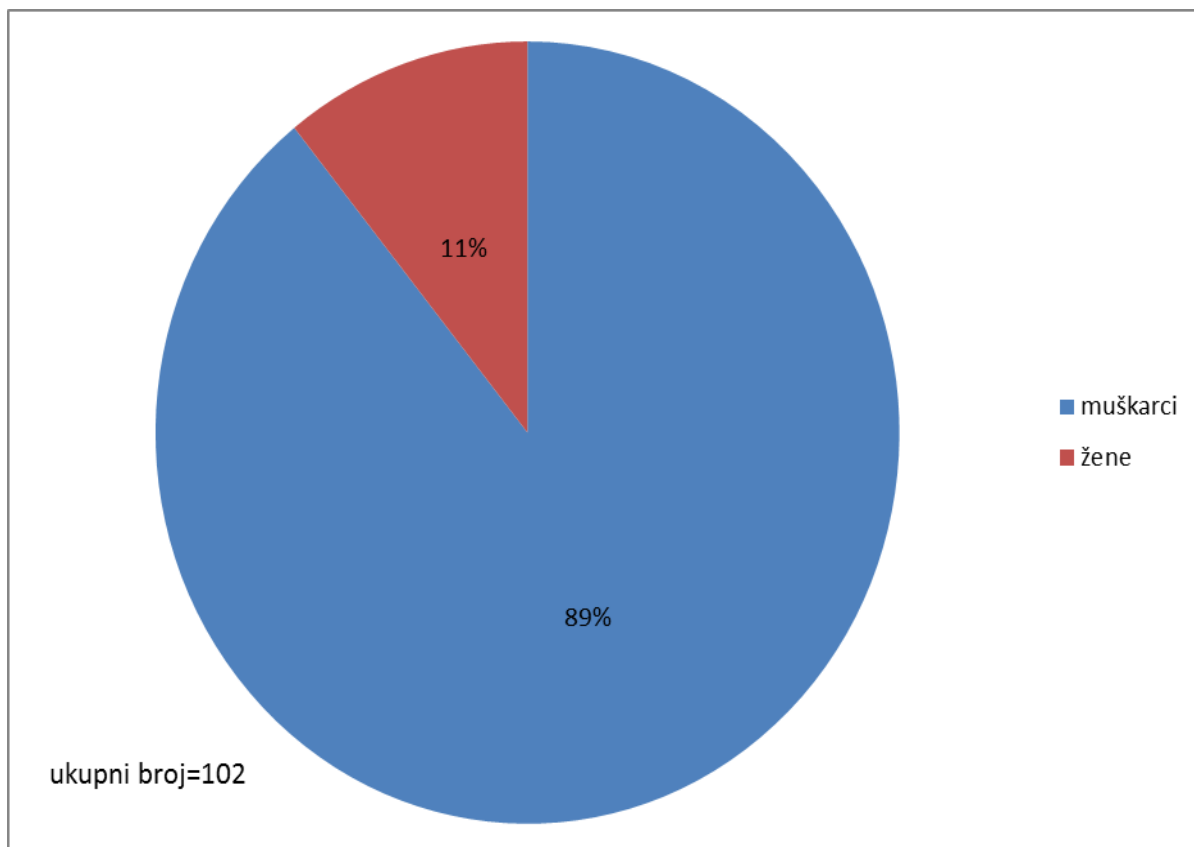
Gledala se dob kad je bolesnik obolio od karcinoma. Istraživanje obhvaća pet dobnih skupina: manje od 40 godine života, 41-50 godina, 51-60 godina, 61-70 godina i stariji od 70 godina života. Broj bolesnika s pločastim karcinomom orofarinksa ispod 40. godine života je mali i zatim raste uz maksimum u 6. i 7. desetljeću života, nakon čega se ponovno smanjuje (tablica 3, slika 9). U ukupnom broju ispitanika bilo je 11 (11%) žena i 91 (89%) muškaraca (slika 10). Tumori kod žena javili su se u dobi od 38 do 82 godina, a u muškaraca u dobi od 21 do 88 godina. Prosječna dob bolesnika je bila 59, 02 godine.

Tablica 3. Dobna i spolna raspodjela bolesnika

DOB	BROJ MUŠKARACA	BROJ ŽENA	UKUPNO
<40	5	1	6
41-50	10	2	12
51-60	35	2	37
61-70	26	3	29
>70	15	3	18
UKUPNO	91	11	102

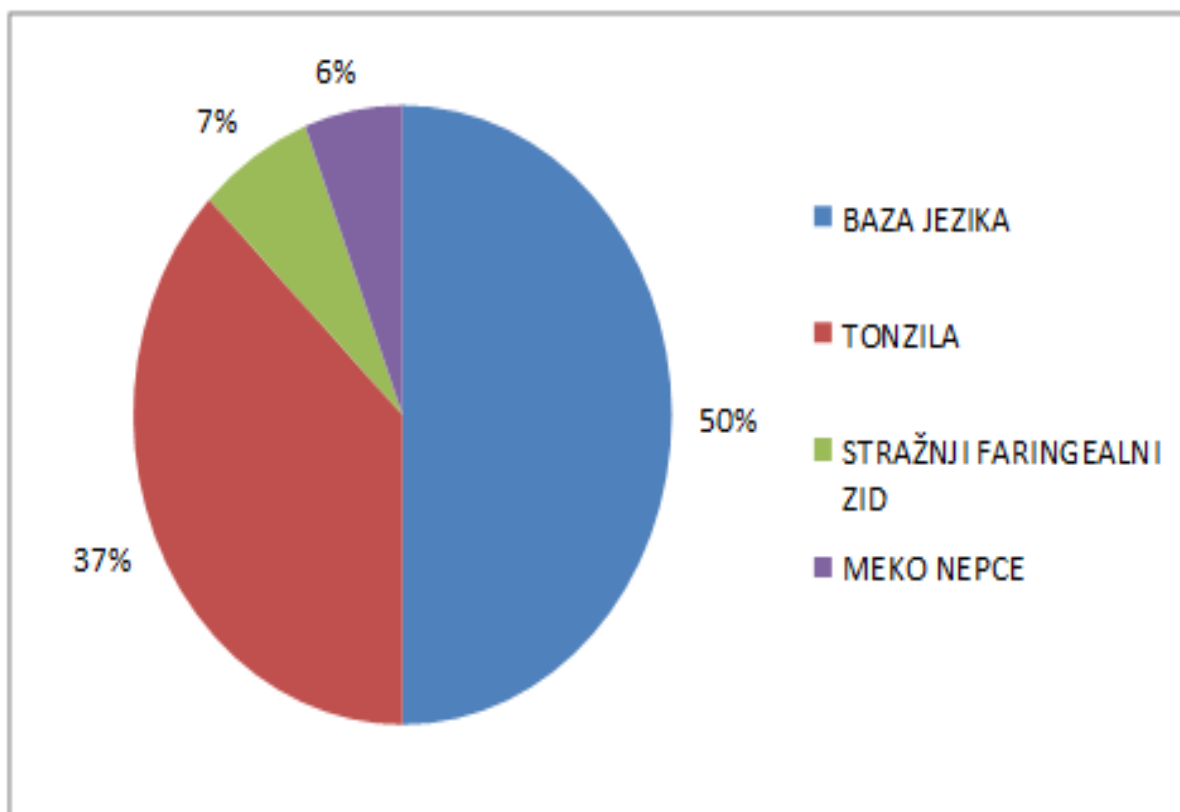


Slika 9. Grafički prikaz dobne i spolne raspodjele.



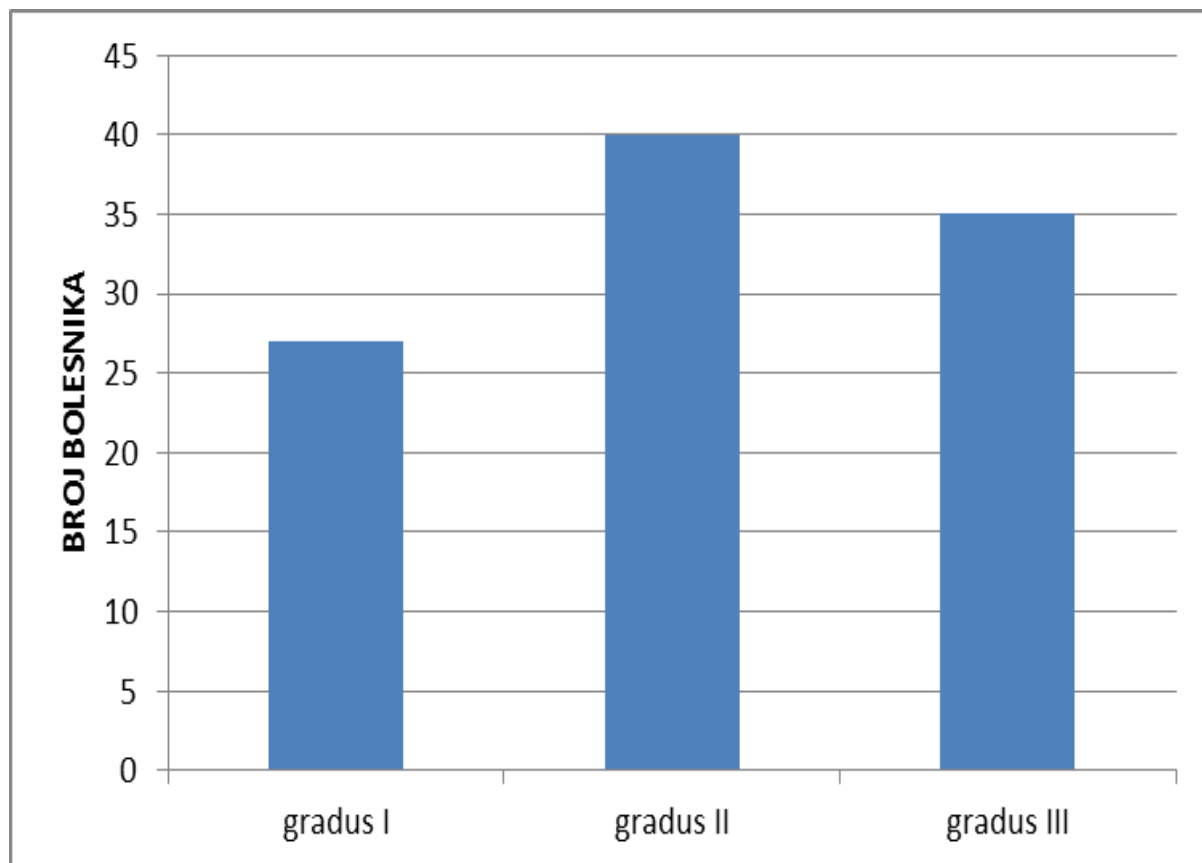
Slika 10. Raspodjela bolesnika prema spolu.

Gledajući podsijelo tumora u orofarinksu, kod 51 (50,0%) bolesnika je to bila baza jezika, u 38 (37,2%) tonzila, u 7 (6,8%) stražnji faringealni zid i u 6 (5,8%) bolesnika meko nepce (slika 11).



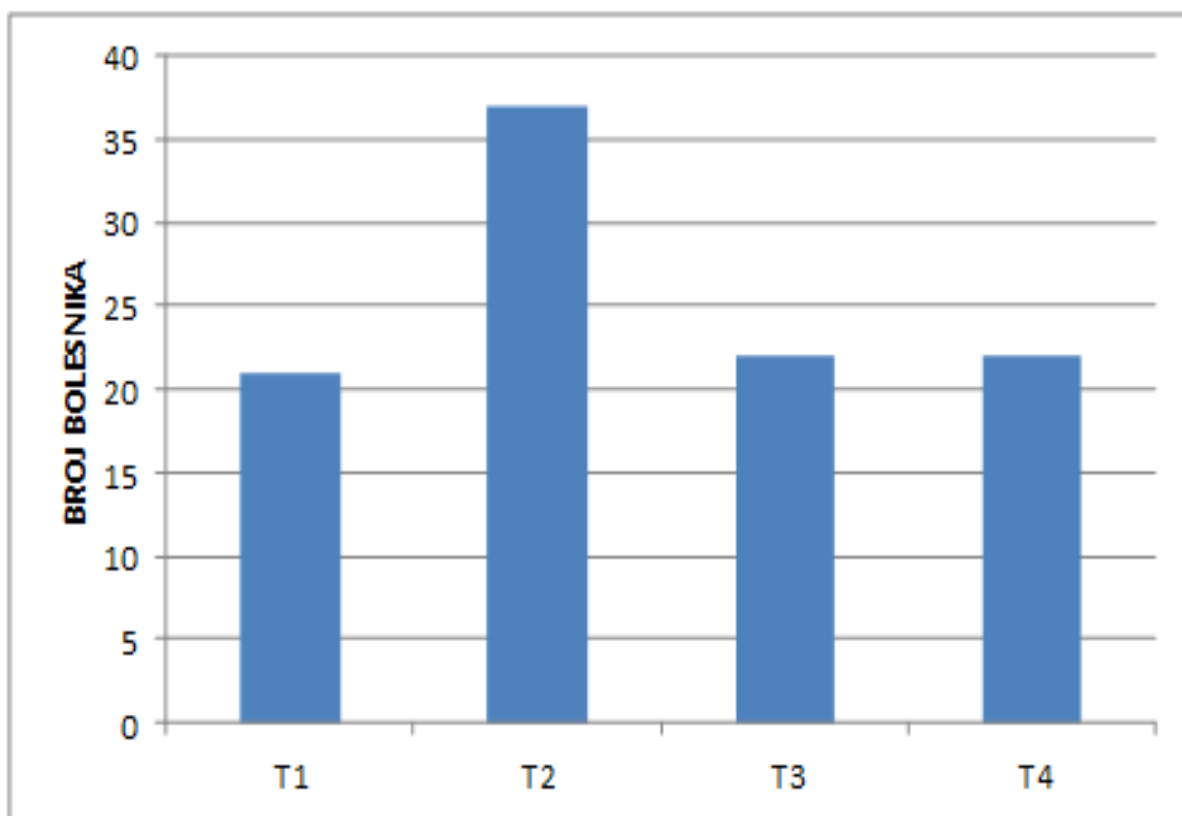
Slika 11. Raspodjela prema podsijelu tumora orofarinksa.

Na standardnom patohistološkom preparatu rutinski se određuje stupanj diferencijacije tumora i klasificira kao gradus I-III. U analizu je uključeno 27 (26,4%) bolesnika s pločastim karcinomom gradusa I, 40 (39,2%) gradusa II, te 35 (34,3 %) gradusa III (slika 12).



Slika 12. Raspodjela tumora prema histološkom stupnju diferenciranost.

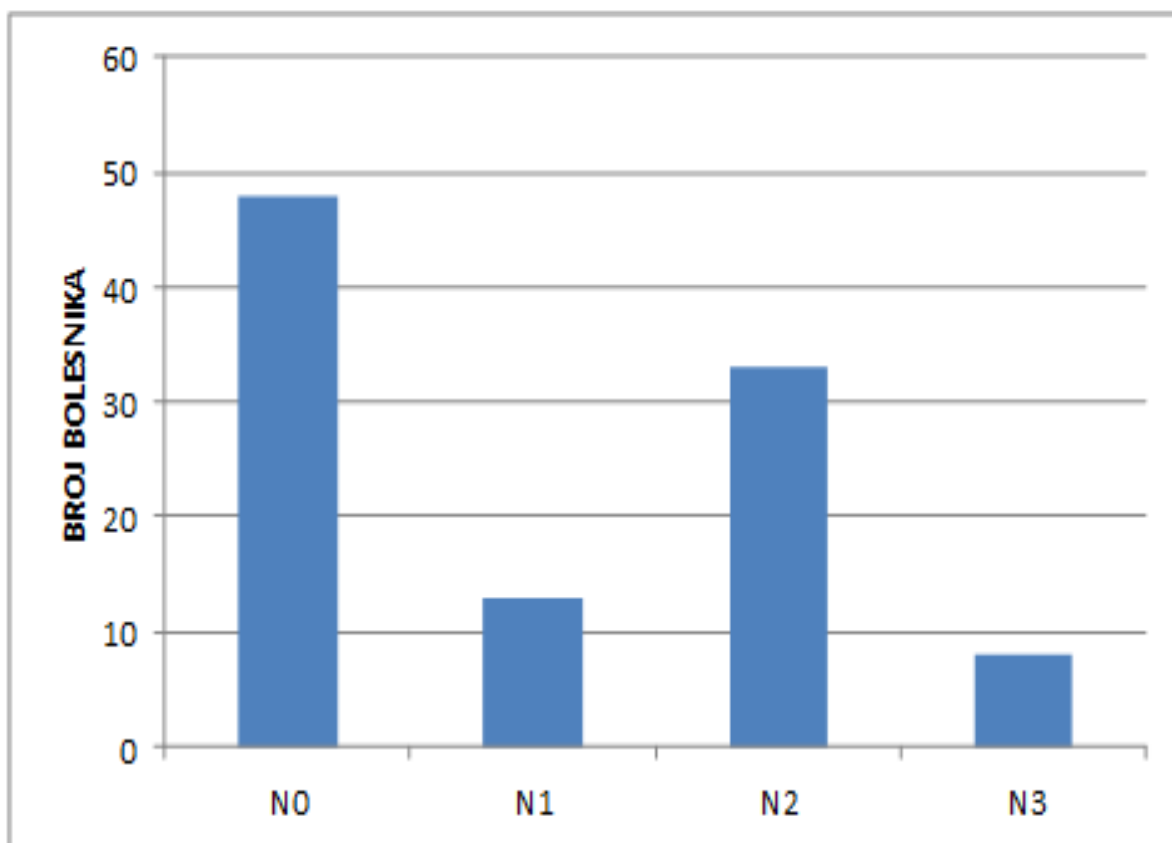
U TNM klasifikaciji tumori se prema veličini primarnog tumora klasificiraju u 4 stadija (T1-T4). Prema veličini tumora bilo je 21 (20,5%) T1 tumora, 37 (36,2%) T2 tumora, 22 (21,5%) T3 tumora, te 22 (21,5%) T4 tumora (slika 13). Tumore se može prema veličini podijeliti i u početne (T1-T2) i lokalno uznapredovale (T3-T4), nakon takve podjele na analiziranom uzorku bilo je 58 (56,8%) početnih tumora i 44 (43,1%) lokalno uznapredovalih tumora.



Slika 13. Raspodjela T stadija primarnog tumora.

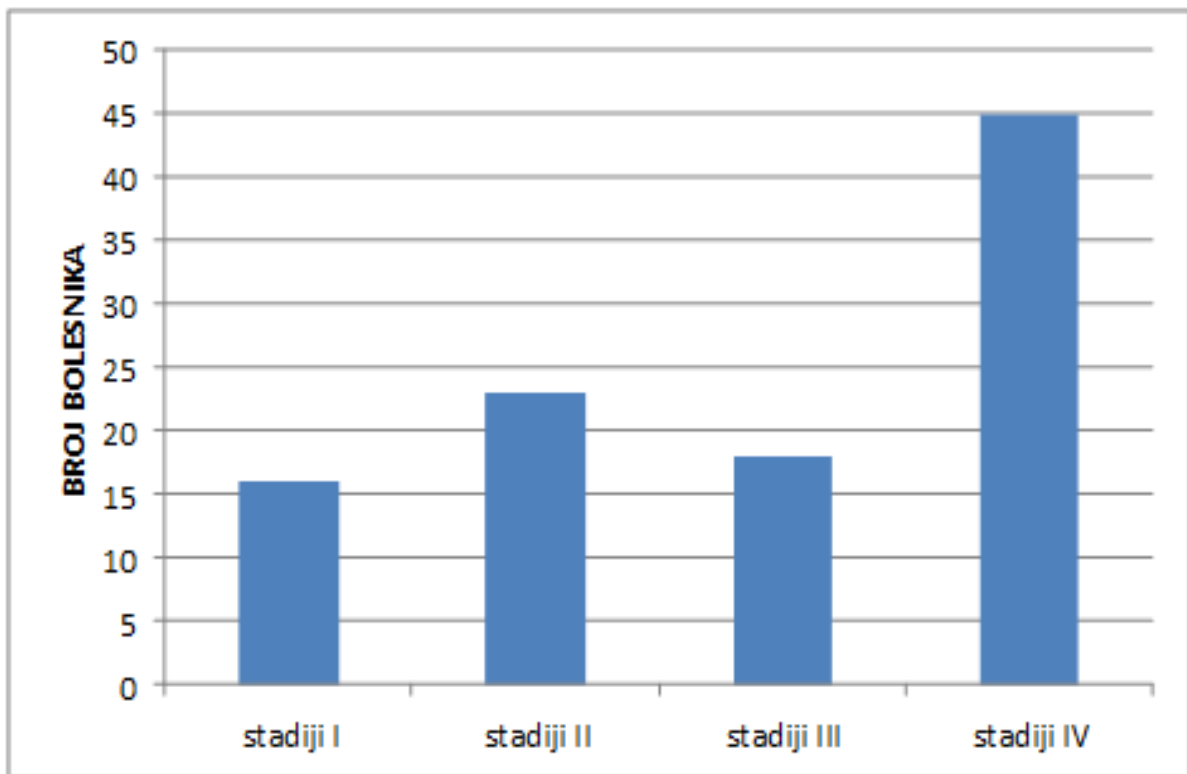
Bolesnike smo prema N stadiju bolesti također podijelili u 4 grupe: N0 što znači bez metastaza na vratu, te N1-3 ovisno o broju i veličini regionalnih metastaza (tablica 1). Stadij N0 bolesti utvrđen je kod 48 (47,0%), N1 u 13 (12,7%), N2 u 33 (32,3%) i N3 u 8 (7,8%) bolesnika (slika 14).

Prisutnost udaljenih metastaza, M1 stadij, nađen je samo u 1 bolesnika.



Slika 14. Raspodjela N stadija primarnog tumora.

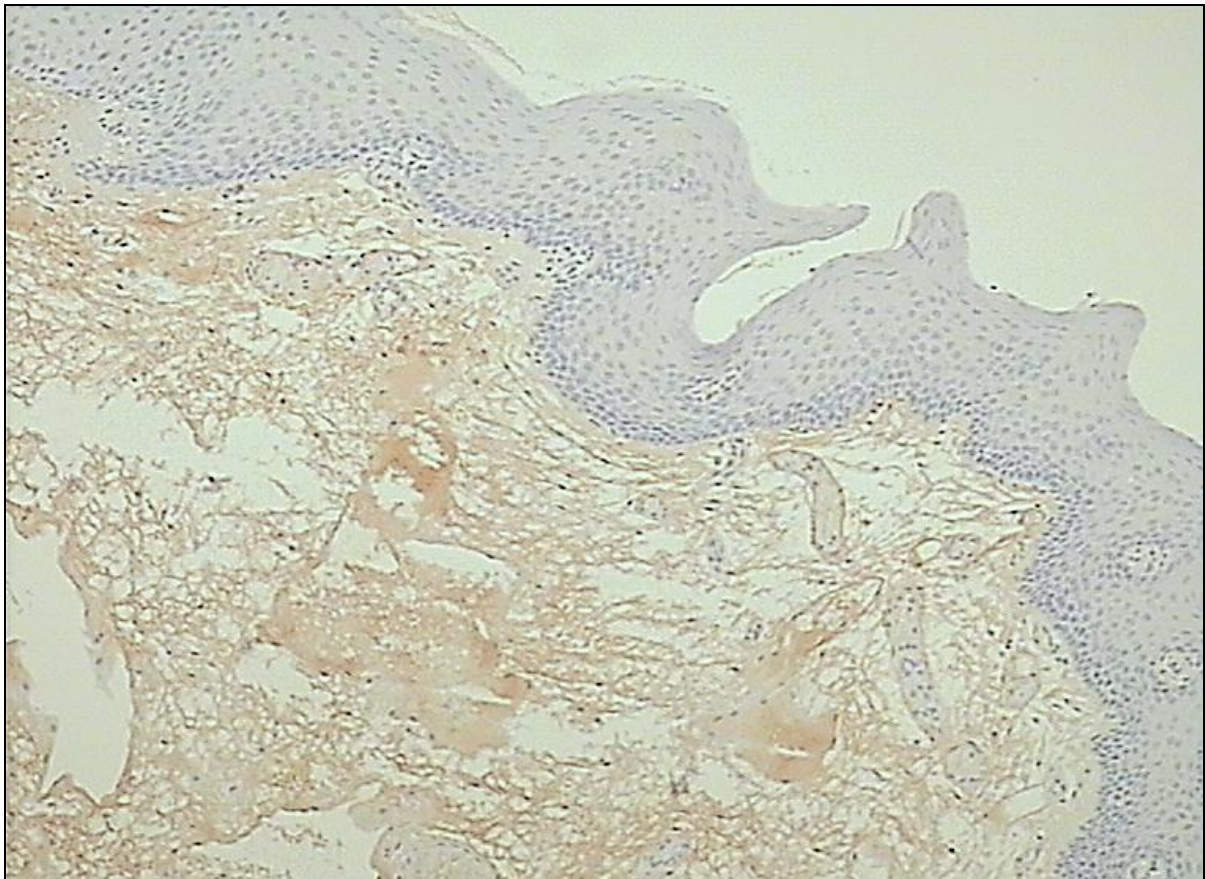
Prema AJCC stadijima (I-IV) bolesti bilo je 16 (15,6%) bolesnika u stadiju I, 23 (22,5%) bolesnika u stadiju II, 18 (17,6%) bolesnika u stadiju III, te 45 (44,1%) bolesnika u stadiju IV (slika 15). Kao i kod T veličine primarnog tumora i ovdje se bolesnike može podijeliti na skupinu bolesnika s rano dijagnosticiranom bolesti (stadiji I i II), te skupinu s uznapređovalom bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze (stadiji III i IV). U ukupnom broju analiziranih bolesnika bilo je 39 (38,2%) bolesnika s rano postavljenom dijagnozom, te 63 (61,7%) bolesnika u uznapređovalim stadijima bolesti (slika 15).



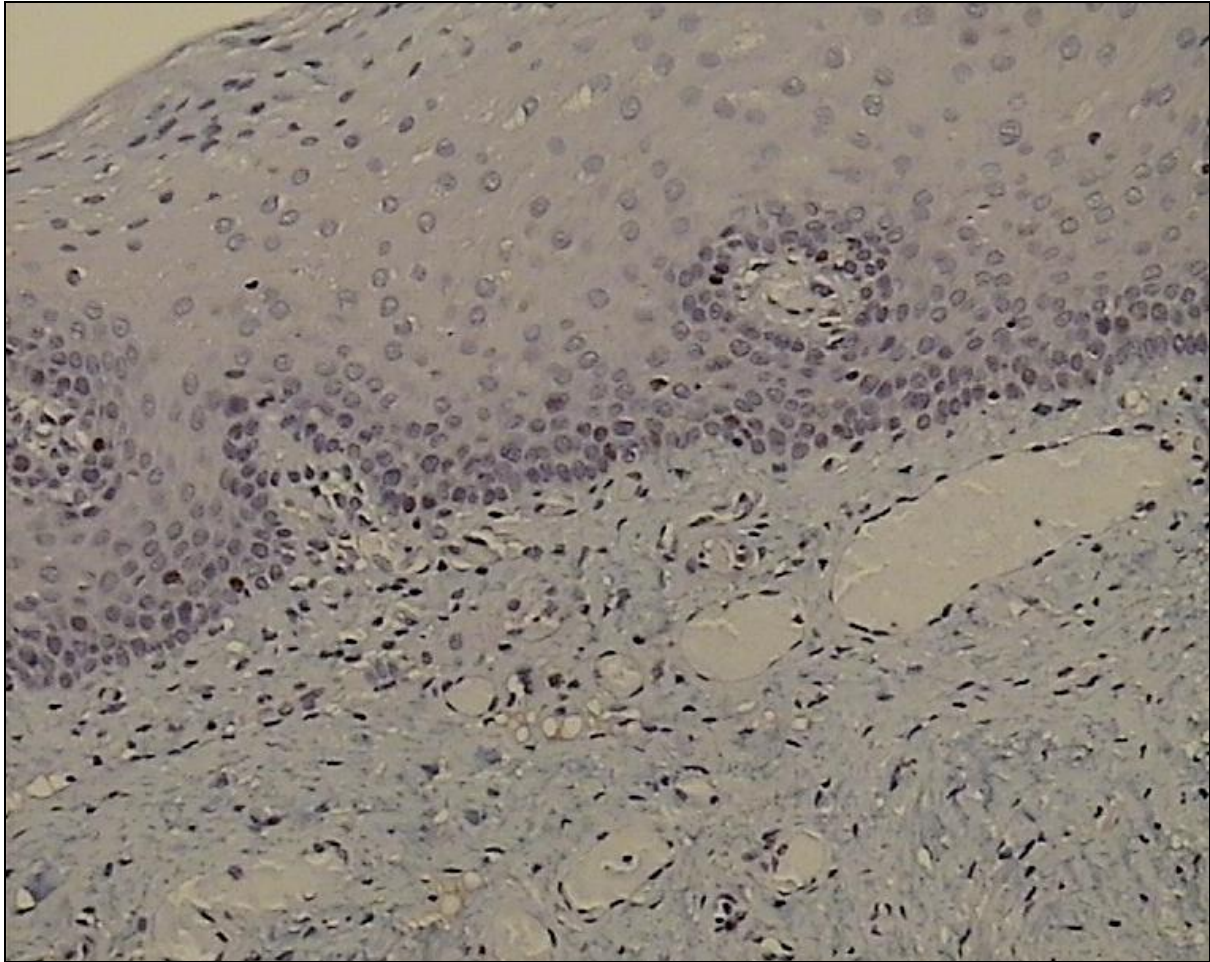
Slika 15. Raspodjela prema AJCC stadijima u trenutku postavljanja dijagnoze.

4.2. Kontrolna skupina

Kontrolnu skupinu činilo je 32 uzorka sluznice orofarinksa u kojem nema patoloških promjena, ne nalazi se tumorskog tkiva niti upalnih i drugih reaktivnih promjena. Materijal je dobiven biopsijom ili operacijom te uklopljen u parafinske kocke. Svi uzorci bojani su na HNE i p53. Imunohistokemijskom analizom uzoraka bojanih na HNE- proteinski konjugati u manje od polovine uzoraka nađene su imunopozitivne citoplazme pločastih epitelnih stanica bojane blagim intenzitetom te mjestimice podležeća stroma i stijenke krvnih žila (slika 16). IH analizom uzoraka bojanih na p53 nađene su sporadično pozitivne jezgre pločastih epitelnih stanica dok je stroma bila u svim uzorcima negativna (slika 17).



Slika 16. Prikaz imunohistokemijskog bojanja kontrolne sluznice na HNE- proteinski konjugati. Slika pokazuje negativno bojanje pločastog epitela sluznice, dok su podležeća stroma i stijenke krvnih žila pozitivne (objektiv x 10).



Slika 17. Prikaz imunohistokemijskog bojanja kontrolne sluznice na p53. Slika prikazuje sporadično pozitivne jezgre u bazalnom epitelu sluznice. Podležeća stroma je negativna (objektiv x 20).

4.3. Imunohistokemijska nazočnost 4-hidroksinonenala u pločastom karcinomu

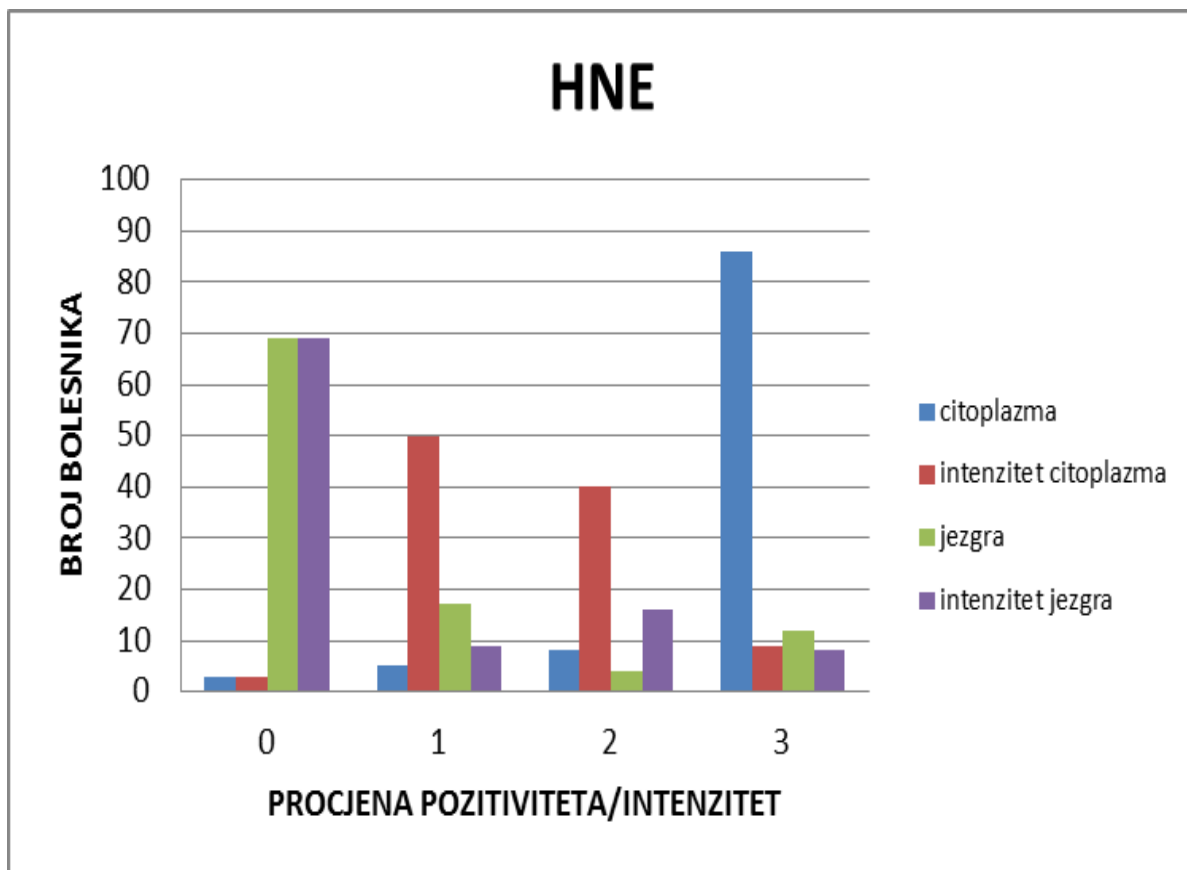
Nazočnost (ekspresija) HNE-a je imunohistokemijski prikazana u tumorskim stanicama i u okolnom netumorskom tkivu. U tumorskim stanicama HNE je nazočan u citoplazmama i jezgrama, dok je u tumorskoj stromi nazočan u upalnim stanicama. U okolnom netumorskom tkivu HNE je nazočan u citoplazmama i jezgrama pločastih epitelnih stanica te u vezivnoj stromi, stijenci i endotelnim stanicama krvnih žila. HNE je prisutan i u sadržaju krvnih žila te u upalnim stanicama u stromi.

Rezultati imunohistokemijske nazočnosti HNE-a u pločastom karcinomu (slika 18, 19, 20) prikazani su u tablici 4. HNE imunopozitivitet nađen je u 99 (97, 0%) uzoraka u citoplazmama tumorskih stanica i to pretežito u blagom intenzitetu 50 (49,0%). Negativan (0) nalaz HNE imunopozitiviteta u citoplazmama tumorskih stanica je nađen u 3 (2,9%) uzorka tumora. Imunopozitivitet koji je iznosio +1 zabilježen je u 5 (4,9%), a sa +2 u 8 (7,8%) i +3 u 86 (84,3%) uzoraka. Intenzitet imunopozitiviteta je bio negativan u 3 (2,9%) uzorka, blagi u 50 (49,0%), umjeren u 40 (39,2%) i jak u 9 (8,8%) uzoraka. Negativna reakcija na HNE nađena je u 69 (67,6%) jezgri tumorskih stanica, dok je imunopozitivitet koji je iznosio +1 zabilježen u 17 (16,6%), +2 u 4 (3,9%) i +3 u 12 (11,7%) uzoraka. Intenzitet imunopozitiviteta HNE u jezgrama tumorskih stanica bio je negativan (0) u 69 (67,6%) uzoraka, blagi u 9 (8,8%), umjeren u 16 (15,6%) i jak u 8 (7,8%) uzoraka.

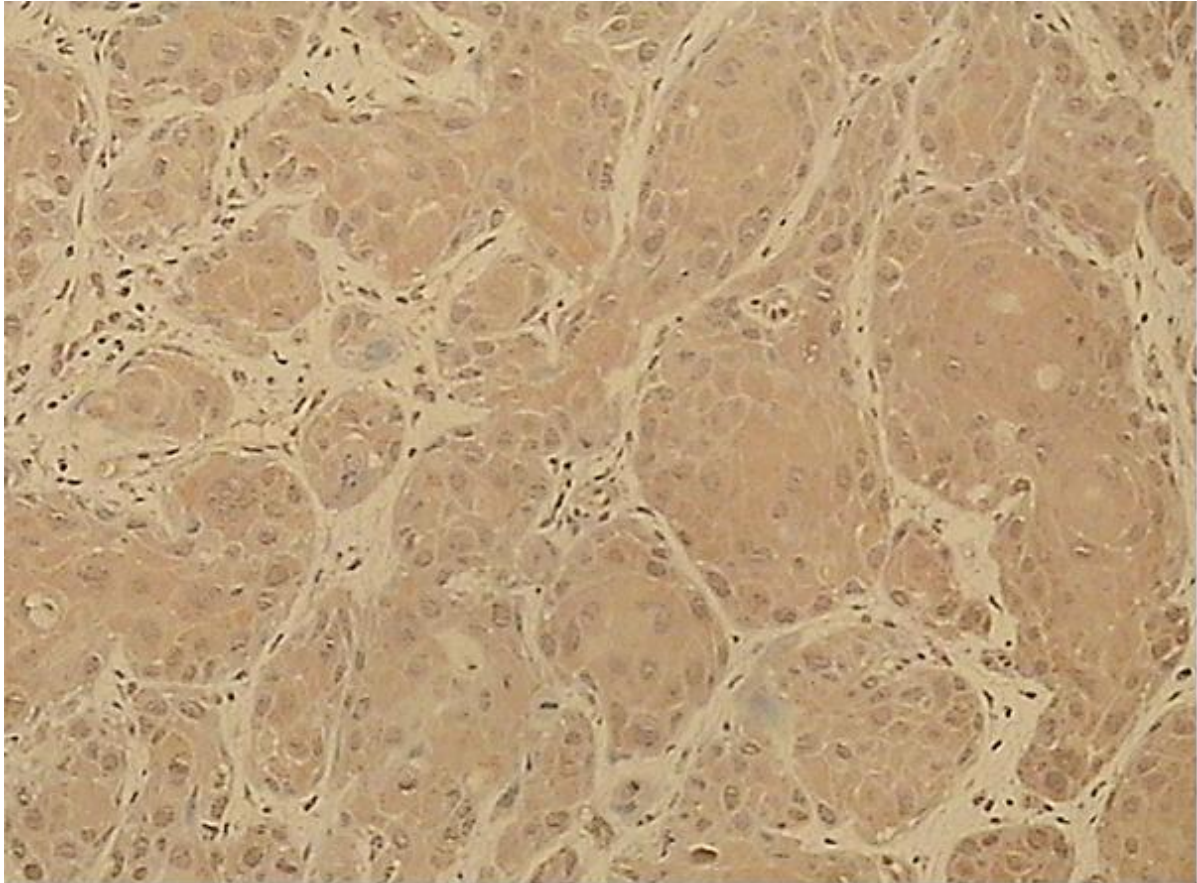
Tablica 4. Prikaz broja bolesnika s pozitivnom imunohistokemijskom reakcijom na HNE u odnosu na izraženost pozitiviteta u citoplazmama i jezgrama pločastih tumorskih stanica.

	CITOPLAZMA TUMORSKIH STANICA		JEZGRA TUMORSKIH STANICA	
	POZITIVITET	INTENZITET	POZITIVITET	INTENZITET
0	3	3	69	69
1	5	50	17	9
2	8	40	4	16
3	86	9	12	8
Ukupan broj bolesnika	102	102	102	102

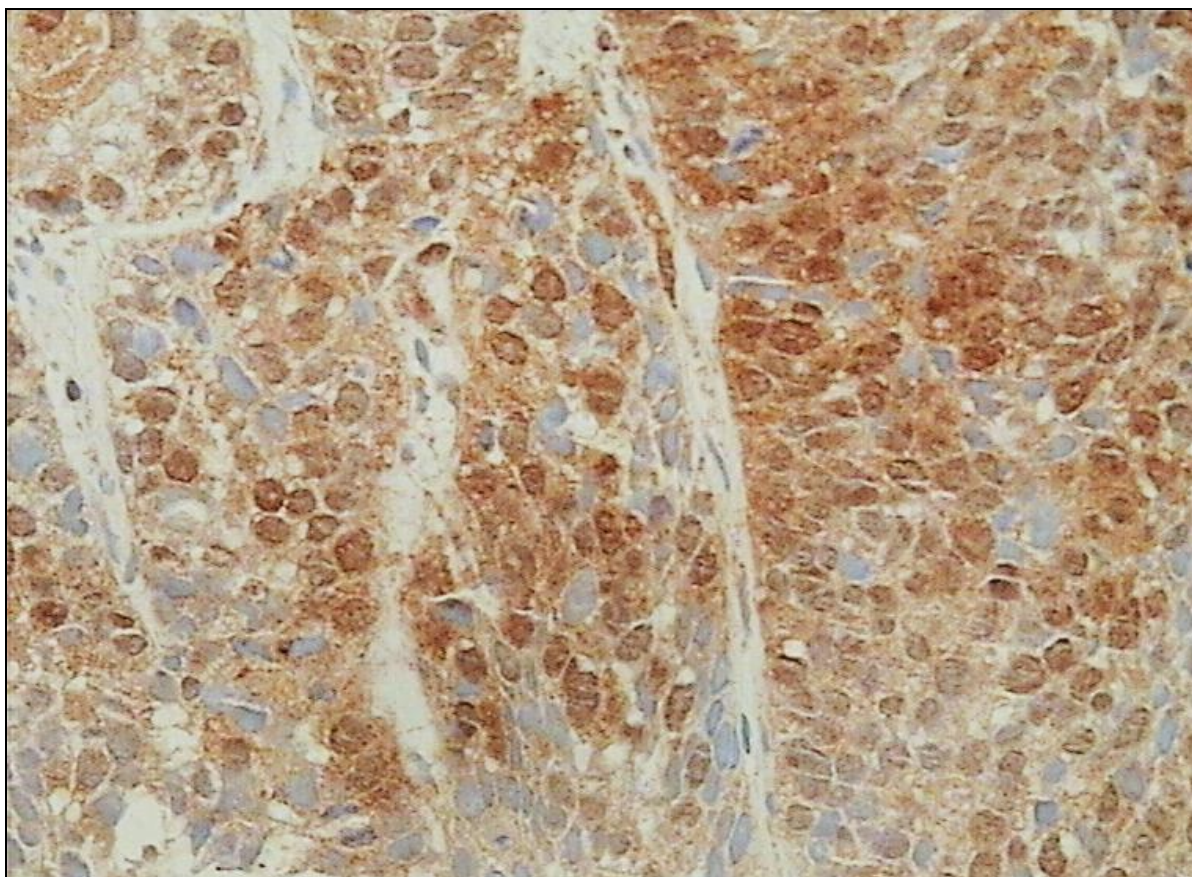
Legenda: '0' negativan 0% i nema imunoreakcije, '1' imunopozitivitet u 1- 25% tumorskih stanica i blaga reakcija, '2' imunopozitivitet u 26-50% tumorskih stanica i umjerena reakcija, '3' imunopozitivitet u 51-100% tumorskih stanica i snažna reakcija.



Slika 18. Grafički prikaz procjene pozitiviteta i intenziteta HNE imunopozitiviteta u citoplazmama i jezgrama tumorskih stanica.



Slika 19. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na HNE uzorka pločastog karcinoma gradusa I orofarinksa. Slika pokazuje blag intenzitet bojanja u citoplazmama tumorskih pločastih stanica, dok su jezgre tumorskih stanica negativne (objektiv x 20).



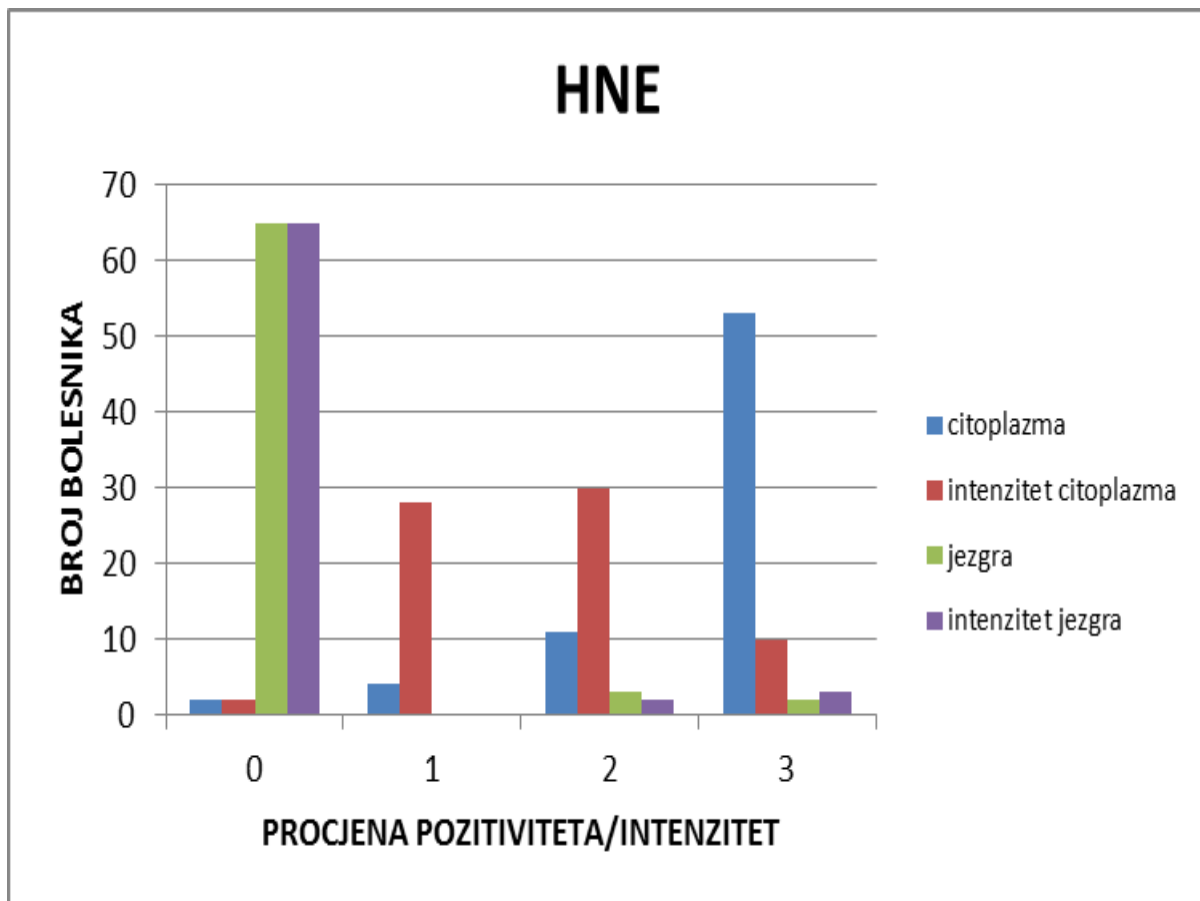
Slika 20. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na HNE pločastog karcinoma gradusa III orofarinksa. Slika prikazuje jak intenzitet bojanja u jezgrama tumorskih stanica pločastog karcinoma gradusa III (objektiv x 40).

Rezultati patohistološke nazočnosti (ekspresije) HNE-a u epitelu sluznice oko tumora (slika 21, 22) prikazani su u tablici 5. U 32 uzorka uz tumorsko tkivo pločastog karcinoma ne nalazi se zdravog okolnog epitela, dok je u preostalim 70 uzoraka HNE imunopozitivitet bio prisutan uglavnom u citoplazmama pločastih epitelnih stanica. U 53 (75,7%) uzorka HNE imunopozitivitet u citoplazmama je zabilježen u 51-100% stanica (+3), u 11 (15,7%) uzoraka u 21-50% stanica (+2), u 4 (5,7%) uzorka u 1-20% stanica (+1), a u 2 uzorka citoplazme stanica su bile negativne (0). Intenzitet IH bojanja na HNE u citoplazmama epitela uz tumor bio je umjernog intenziteta u 30 (42,8%), dok je u 28 (40%) bio blagog, a u 10 (7%) jakog intenziteta. Jezgre epitelnih stanica uz tumor u 65 (92,8%) uzoraka su bile negativne na IH bojanje na HNE, dok je u 3 (4,2%) uzorka procjena IH pozitiviteta HNE-a bila +2, a u 2 (2,8%) uzorka +3. Intenzitet reakcije u 2 (2,8%) uzorka bio umjeren, a u 3 uzorka (4,2%) jak.

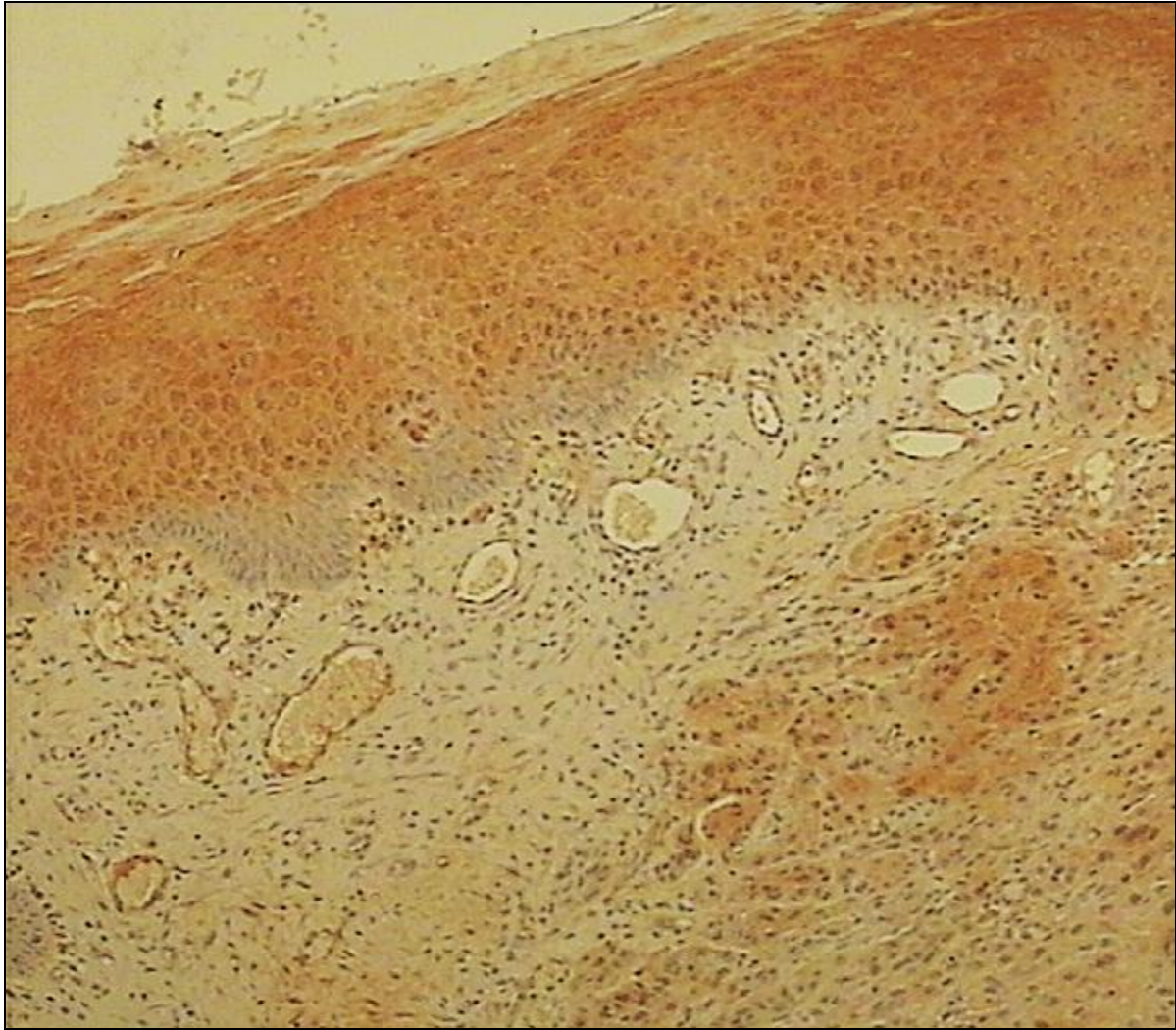
Tablica 5. Prikaz broja bolesnika s pozitivnom imunohistokemijskom reakcijom na HNE u odnosu na izraženost pozitiviteta u citoplazmama i jezgrama pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor.

	CITOPLAZMA EPITELNIH STANICA		JEZGRA EPITELNIH STANICA	
	POZITIVITET	INTENZITET	POZITIVITET	INTENZITET
0	2	2	65	65
1	4	28	0	0
2	11	30	3	2
3	53	10	2	3
Ukupan broj bolesnika	70	70	70	70

Legenda: '0' negativan 0% i nema imunoreakcije, '1' imunopozitivitet u 1- 25% tumorskih stanica i blaga reakcija, '2' imunopozitivitet u 26 - 50% tumorskih stanica i umjerena reakcija, '3' imunopozitivitet u 51 - 100% tumorskih stanica i snažna reakcija.



Slika 21. Grafički prikaz procjene i intenziteta HNE imunopozitiviteta u citoplazmama i jezgrama pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor.



Slika 22. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na HNE uzorka pločastog, nemalignog epitela sluznice orofarinksa uz pločasti karcinom. Slika pokazuje umjereni citoplazmatski HNE pozitivitet u nemalignom, pločastom epitelu uz tumor. U podležećoj stromi koja je HNE negativna nalaze se pozitivne kronične upalne stanice, stijenke krvnih žila te manje solidne nakupine atipičnih, pločastih epitelnih stanica (objektiv x 20).

Rezultati patohistološke nazočnosti HNE-a u displaziji epitela uz tumor (slika 23) prikazani su u tablici 6. U 23 (22,5%) uzorka uz tumorsko tkivo pločastog karcinoma ne nalazi se okolnog epitela, a u 35 (44,3%) uzorka okolni epitel nije pokazivao displastične promjene. U 44 (43,1%) uzorka okolni epitel je pokazivao displastične promjene i tu je HNE imunopozitivitet bio nazočan u jezgrama, podjednako u blagom 13 (29,5%), umjerenom 17 (38,6%) i jakom 14 (31,8%) intenzitetu bojanja. Rezultati HNE imunopozitiviteta u specifičnom tkivu u tumoru i oko tumora (slika 24) prikazani su u tablici 7. Stroma oko tumora bila je imunopozitivna u 41 (40,1%) uzorku, a negativna u 56 (54,9%) uzoraka, dok stroma nije nađena u 5 (4,9%) uzoraka. Stijenka krvne žile bila je imunopozitivna u više od polovine uzoraka 58 (56,8%), negativna u 39 (38,2%), a nije nađena u svega 5 (4,9%) uzorka. Endotel krvnih žila bio je negativan u 87 (85,2%) uzoraka, u 10 (9,8%) uzoraka je bio pozitivan dok krvne žile nisu nađene u 5 (4,9%) uzoraka. Upalne stanice u stromi tumora, i to pretežito limfociti i plazma stanice, HNE su imunopozitivne u 66 (64,7%) uzoraka, negativne u 13 (12,7%) uzoraka dok tumorska stroma nije nađena u 23 (22,5%) uzorka.

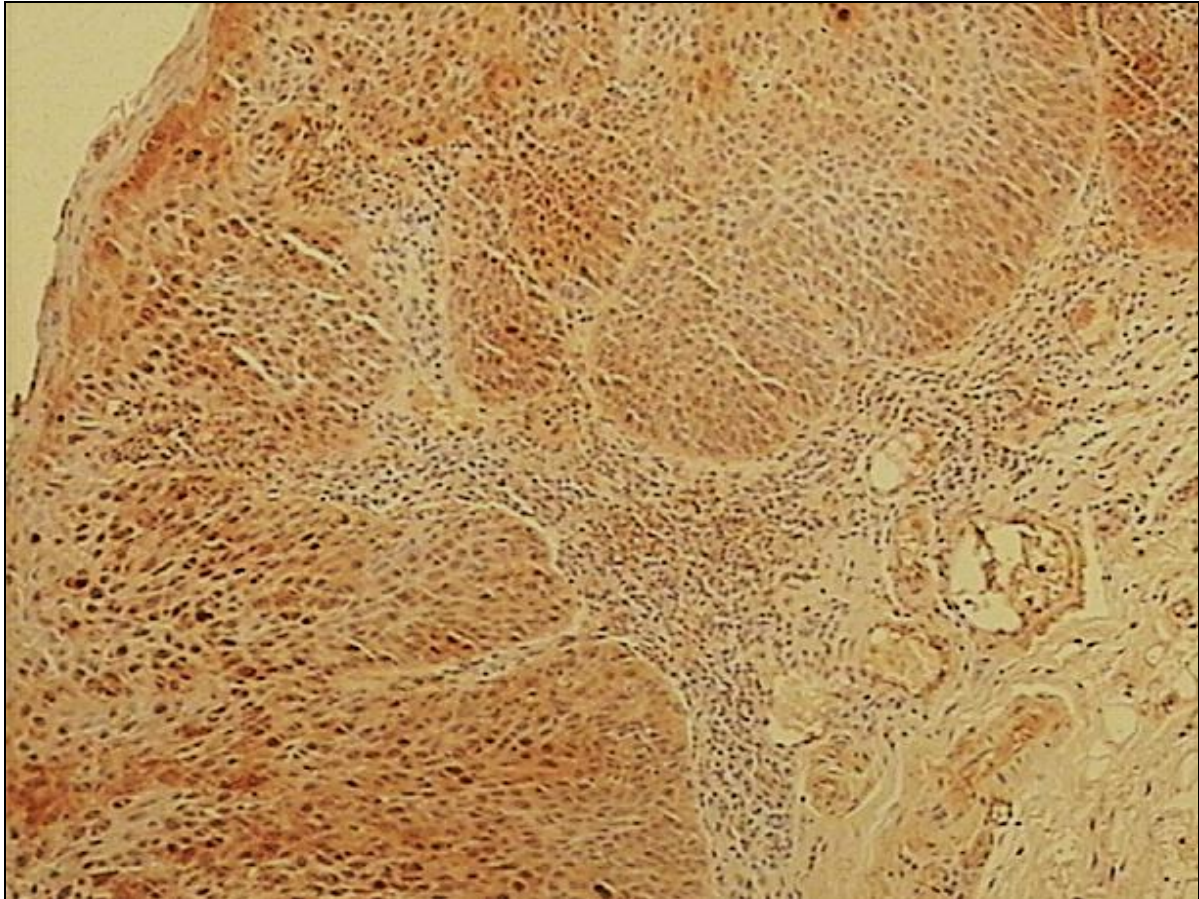
Tablica 6. Prikaz broja bolesnika s prisutnom displazijom uz pločasti karcinom te pozitivnom imunohistokemijskom reakcijom na HNE.

DISPLAZIJA	INTENZITET	BROJ BOLESNIKA	UKUPNI BROJ BOLESNIKA	%
prisutna/pozitivna	blag	13	44	43,1
	umjeren	17		
	jak	14		
nije prisutna	-	35	35	34,3
nema epitela	-	23	23	22,5

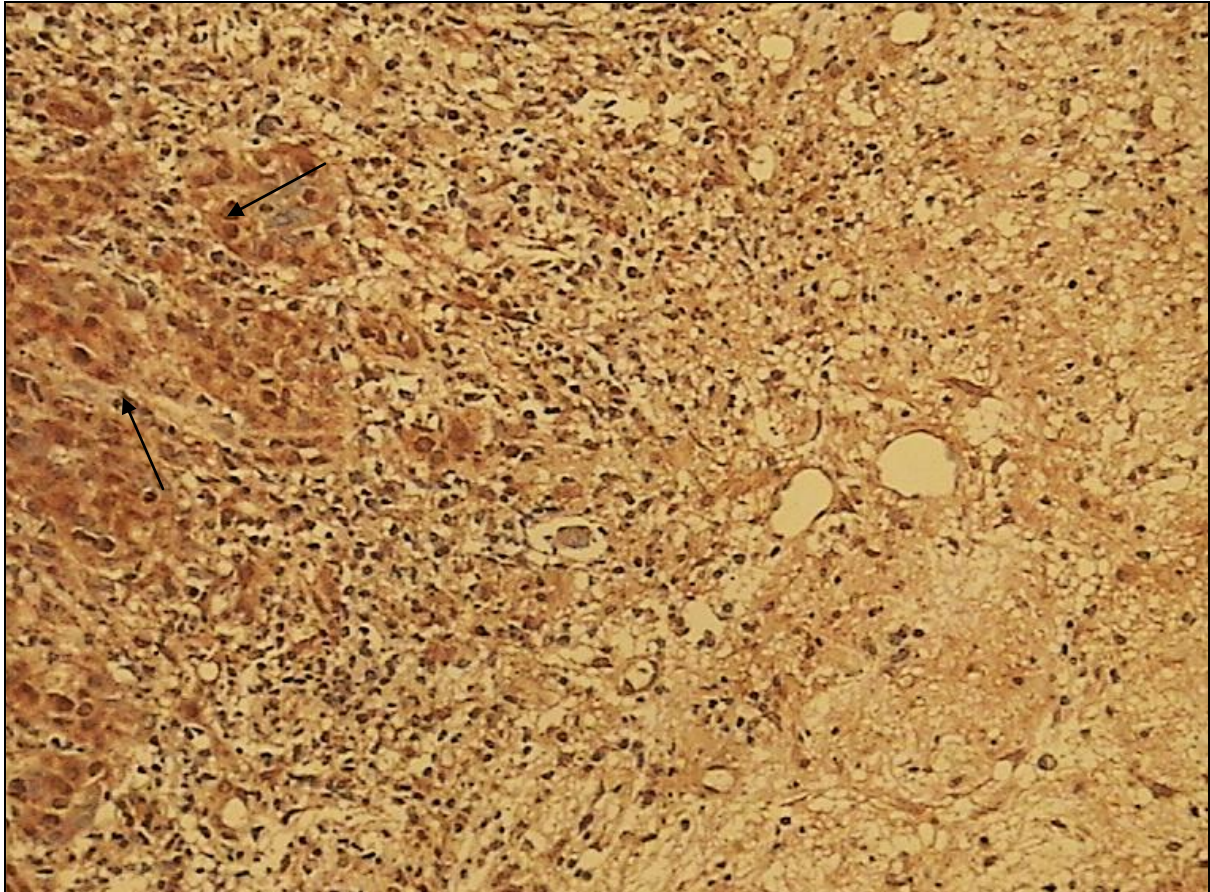
Tablica 7. Nazočnost HNE-a u specifičnom tkivu oko pločastog karcinoma orofarinksa.

PARAMETAR	N	%
Stroma oko tumora		
pozitivna *	41	40,1
negativna **	56	54,9
nije prisutna ***	5	4,9
Stijenka krvne žile		
pozitivna	58	56,8
negativna	39	38,2
nije prisutna	5	4,9
Endotel krvne žile		
pozitivan	10	9,8
negativan	87	85,2
nije prisutan	5	4,9
Upala u tumorskoj stromi		
pozitivna	66	64,7
negativna	13	12,7
nije prisutna	23	22,5

Legenda: N- broj uzoraka, %-postotak , * pozitivan, izražen HNE imunopozitivitet, ** negativan, HNE imunopozitivitet nije nađen, ***nije prisutan - određena stanica ili nije nađena struktura



Slika 23. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na HNE uzorka teške displazije sluznice orofarinksa. Slika prikazuje jak intenzitet HNE imunopozitiviteta u jezgrama i blag intenzitet u citoplazmama displastičnih stanica. U stromi su pozitivne kronične upalne stanice i stijenke krvnih žila (objektiv x 20).



Slika 24. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na HNE vezivne strome oko tumora u uzorku pločastog karcinoma orofarinksa . Slika prikazuje manje solidne nakupine pločastog karcinoma gradusa III (strelica) oko kojeg se nalazi HNE pozitivna stroma i upalne stanice (objektiv x 40).

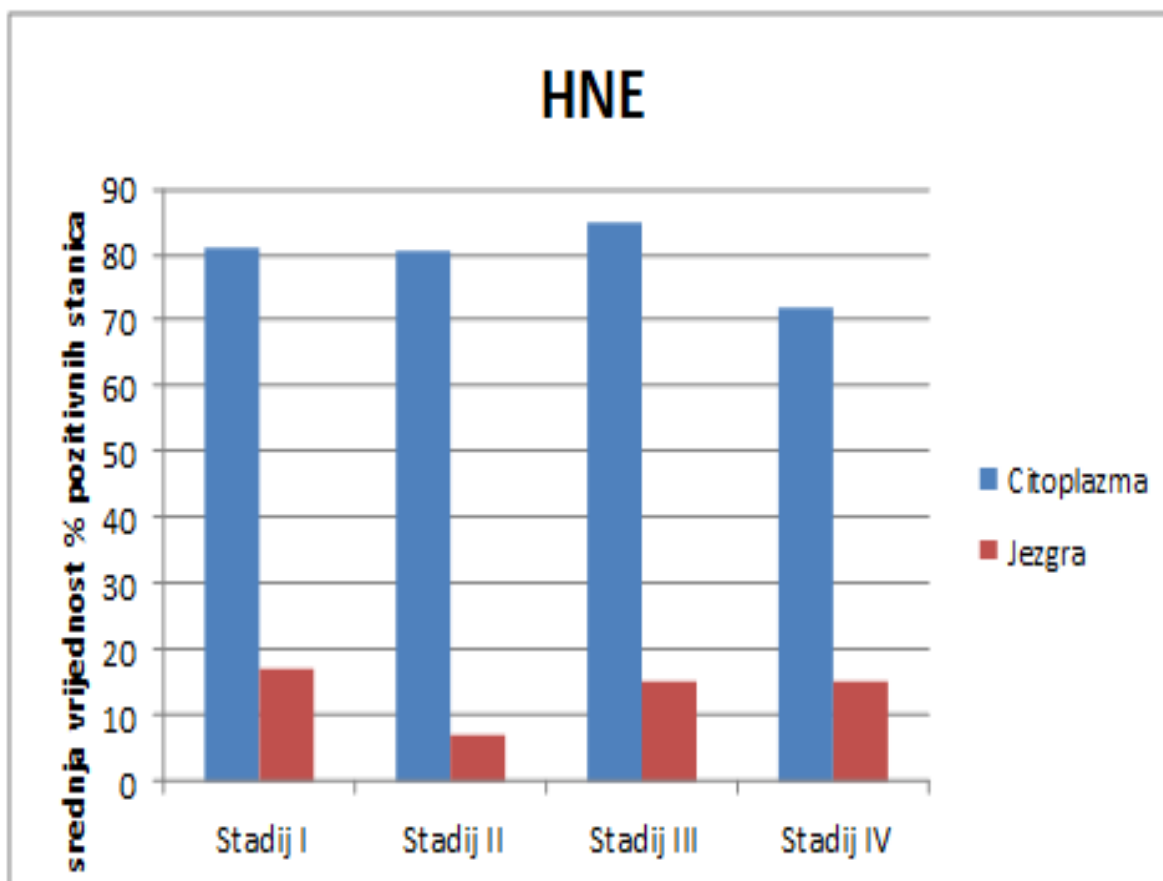
4.4. Usporedba nazočnosti HNE-a s ostalim prognostičkim čimbenicima

4.4.1. Usporedba nazočnosti HNE-a u pločastom karcinomu po kliničkim stadijima bolesti

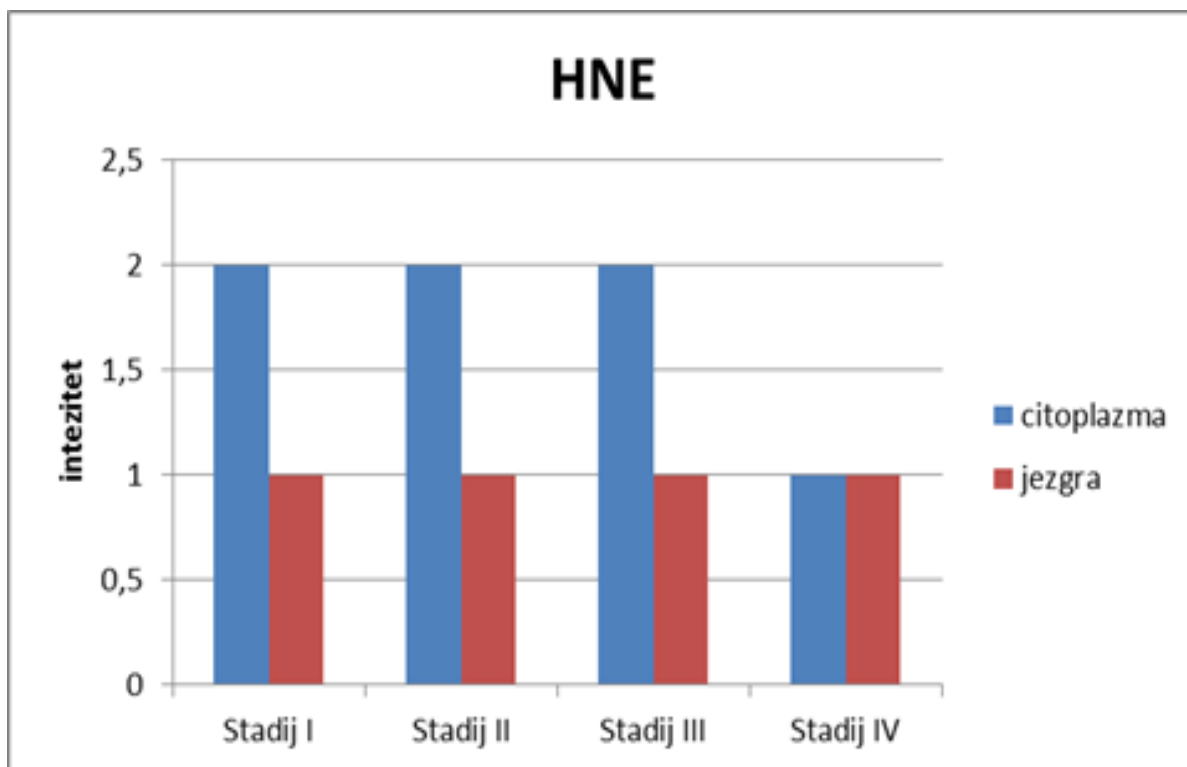
Radi usporedbe HNE imunopozitiviteta u jezgri i citoplazmi pločastih stanica tumora u ovisnosti o kliničkom stadiju bolesti prikazali smo dobivene vrijednosti kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) zbog lakše usporedbe i statističke obrade rezultata.

HNE imunopozitivitet u citoplazmama i jezgrama tumorskih stanica nađen je u svim kliničkim stadijima bolesti (slika 25, 26), dok je primijećen neznatni pad HNE imunopozitiviteta u IV stadiju bolesti. Rezultati statističke analize gledajući srednju vrijednost i standardnu devijaciju (SD) postotka pozitivnih citoplazmi tumorskih stanica su iznosili: u kliničkom stadiju I srednja vrijednost 81,0, SD 18; u kliničkom stadiju II srednja vrijednost je 80,5, SD 15; u kliničkom stadiju III srednja vrijednost je 84,7, SD 10; a u kliničkom stadiju IV srednja vrijednost je 72,0, SD 25. Prosječni intenzitet imunoreakcije na HNE u citoplazmama tumorskih stanica je bio umjeren (2) u kliničkim stadijima I, II i III, dok je u kliničkom stadiju IV bio blag (1). Statistički značajna razlika dvosmjernim Mann Whitney U-testom nađena je jedino uspoređujući postotak pozitivnih citoplazmi na HNE u tumorskim stanicama između stadija III i IV ($p=0,038$). Statistički značajna razlika intenziteta imunoreakcije na HNE u citoplazmama tumorskih stanica po kliničkim stadijima nađena je jedino između stadija I i IV ($p=0,001$).

Rezultati statističke analize srednje vrijednosti i SD postotka pozitivnih jezgri tumorskih stanica po kliničkim stadijima su iznosili: u stadiju I srednja vrijednost 17, SD 31; u stadiju II srednja vrijednost 7, SD 18; u stadiju stadij III srednja vrijednost 15, SD 28 i u stadiju IV srednja vrijednost 15, SD 27. Intenzitet imunoreakcije na HNE u jezgrama tumorskih stanica je bio uglavnom blag (1) te je bio jednak u svim kliničkim stadijima. Uspoređujući međusobno kliničke stadije dvosmjernim Mann Whitney U- testom nije nađena statistički značajna razlika ($p>0,05$) u postotku pozitivnih jezgri i intenziteta imunoreakcije tumorskih stanica.



Slika 25. Grafički prikaz srednje vrijednosti postotka pozitivnih stanica na HNE u jezgrama i citoplazmama tumorskih stanica prema kliničkim stadijima bolesti.



Slika 26. Grafički prikaz srednje vrijednosti intenziteta HNE imunoreakcije prema kliničkim stadijima u citoplazmama i jezgrama pločastih tumorskih stanica. Intenzitet „1“ blaga reakcija, intenzitet „2“ umjerena reakcija.

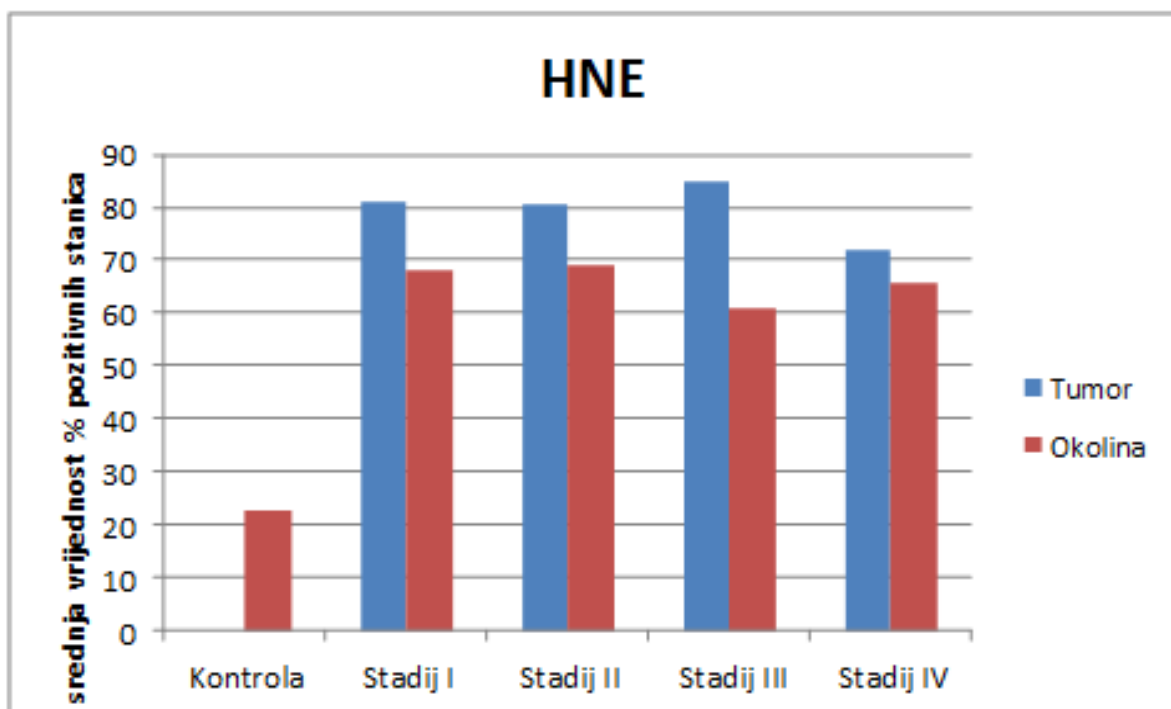
4.4.2. Usporedba nazočnosti HNE-a u epitelu sluznice uz tumor prema kliničkim stadijima bolesti i kontrolnom uzorku

Radi usporedbe HNE imunopozitiviteta u citoplazmama pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor i kontrolne skupine u ovisnosti o kliničkom stadiju bolesti (slika 27) prikazali smo dobivene vrijednosti kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) zbog lakše usporedbe i statističke obrade rezultata.

U svim kliničkim stadijima nađena je gotovo podjednaka srednja vrijednost postotka pozitivnih citoplazmi epitela uz tumor. U kliničkom stadiju I srednja vrijednosti je iznosila 68, SD 27; u kliničkom stadiju II srednja vrijednost je iznosila 69,06, SD 14; u kliničkom stadiju III srednja vrijednost iznosila je 61, SD 30 i u stadiju IV 65,86, SD 25, dok u kontrolnoj skupini srednja vrijednost je iznosila 22,81, SD 30,4. Nije dobivena statistički značajna razlika dvosmjernim Mann Whitney U-testom među pojedinim kliničkim stadijima

bolesti ($p > 0,05$). Nazočnost imunopozitiviteta HNE u citoplazmi u okolnom epitelu uz tumor povišena je u odnosu na kontrolnu skupinu, a ta razlika je posebno izražena između II i IV stadija bolesti ($p < 0,01$). U kliničkom stadiju II zabilježena je najveća srednja vrijednost intenziteta reakcije u citoplazmama epitelnih stanica uz tumor i iznosila je 2,067, SD 1, dok je u drugim stadijima ona niža i iznosila je za stadij I 1,8, SD 1; stadij III 1,46, SD 1 i stadij IV 1,51, SD 1. Statistički značajna razlika nađena je uspoređujući srednje vrijednosti između stadija bolesti II i III ($p = 0,042$) i stadija bolesti II i IV ($p = 0,012$). Statistički značajna reakcija dobivena je uspoređujući srednje vrijednosti svih kliničkih stadija bolesti s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$).

Nije dobivena statistički značajna razlika dvosmjernim Mann Whitney U-testom kod nazočnosti HNE imunopozitiviteta u jezgrama i intenzitetu imunoreakcije u epitelu oko tumora uspoređujući kliničke stadije bolesti ($p > 0,05$).



Slika 27. Grafički prikaz HNE imunopozitiviteta u citoplazmi pločastih stanica tumora i pločastih, nemalighnih epitelnih stanica uz tumor u ovisnosti o kliničkom stadiju bolesti i kontrolne skupine. Statistički značajna reakcija dobivena je uspoređujući srednje vrijednosti svih kliničkih stadija bolesti s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$).

4.4.3. Usporedba nazočnosti HNE-a s ostalim parametrima

Rezultati patohistološke analize nazočnosti HNE-a u stromi uz tumor prema kliničkim stadijima prikazani su u tablici 8. U kliničkom stadiju I u više od polovine uzoraka (10/16) nalaz je bio negativan, a pozitivan je bio u 5/16 uzoraka dok u 1/16 uzoraka stroma nije bila prisutna. U kliničkom stadiju II stroma je bila pozitivna u 12/23 uzorka, negativna u 10/23 uzorka, a u 1/23 nije bila prisutna. U kliničkom stadiju III stroma je podjednako bila pozitivna 9/18 i negativna 9/18 uzoraka. U kliničkom stadiju IV pozitivna je stroma u 27/45, negativna u 15/45, a nije prisutna u 3/45 uzoraka. Nije dobivena statistički značajna razlika dvosmjernim Mann Whitney U-testom među pojedinim kliničkim stadijima bolesti ($p > 0,05$).

Rezultati patohistološke nazočnosti HNE-a u stijenci krvnih žila prema kliničkim stadijima prikazani su u tablici 8. U kliničkom stadiju I stijenke krvnih žila bile su pozitivne u 9/16, negativne u 6/16, dok nisu bile prisutne u 1/16 uzoraka. U kliničkom stadiju II stijenke krvnih žila bile su pozitivne u 13/23, negativne u 9/23, a nisu bile prisutne u 1/23 uzorka. U kliničkom stadiju III stijenke krvnih žila bile su pozitivne u 11/18, a negativne u 7/18 uzoraka. U kliničkom stadiju IV stijenke krvnih žila bile su pozitivne u 25/45, negativne u 17/45, a nisu bile prisutne u 3/45 uzoraka. U kontrolnoj skupini stijenke krvnih žila bile su pozitivne u 18/32, a negativne u 14/32 uzorka. Nije dobivena statistički značajna razlika dvosmjernim Mann Whitney U-testom među pojedinim kliničkim stadijima bolesti te prema kontrolnom uzorku.

Rezultati patohistološke nazočnosti HNE-a u endotelnim stanicama stijenke krvne žile prema kliničkim stadijima prikazani su u tablici 8. U kliničkom stadiju I endotel krvnih žila bio je negativan u 15/16, a nije bio prisutan u 1/16 uzoraka. U kliničkom stadiju II endotel krvnih žila je bio pozitivan u 3/23, negativan u 19/23, a nije bio prisutan u 1/23 uzorka. U kliničkom stadiju III endotel krvnih žila je bio negativan u 16/18, a pozitivan u 2/18 uzoraka. U kliničkom stadiju IV endotel krvnih žila je bio negativan u 37/45, pozitivan u 5/45, a nije bio prisutan u 3/45 uzoraka. U gotovo svim kontrolnim uzorcima 31/32 endotel krvnih žila je bio negativan, a pozitivan je bio u 1/32 uzorka. Nije dobivena statistički značajna razlika dvosmjernim Mann Whitney U-testom među pojedinim kliničkim stadijima bolesti te prema kontrolnom uzorku.

Rezultati patohistološke nazočnosti HNE imunopozitiviteta u upalnim stanicama tipa limfocita i plazma stanica prikazani su u tablici 8. U kliničkom stadiju bolesti I u 10/16 uzorka upalne stanice bile su HNE imunopozitivne, u 5/16 uzoraka upalne stanice bile su

negativne, a u 1/16 uzoraka stroma s upalnim stanicama nije bila prisutna. U kliničkom stadiju II u 15/23 uzorka upalne stanice bile su HNE imunopozitivne, u 7/23 uzorka upalne stanice su bile negativne, a u 1/23 uzorka stroma s upalnim stanicama nije bila prisutna. U kliničkom stadiju III u 13/18 uzoraka upalne stanice bile su HNE imunopozitivne, u 5/18 uzorka upalne stanice bile su negativne. U kliničkom stadiju IV u 24/45 uzoraka upalne stanice bile su HNE imunopozitivne, u 17/45 uzorka upalne stanice bile su negativne, a u 3/45 uzoraka nije bila prisutna stroma s upalnim stanicama. Provedenom statističkom analizom dvosmjernim Mann Whitney U-testom među kliničkim stadijima bolesti nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$), dok je statističkom analizom pomoću χ^2 - testa nađena statistički značajna razlika za stadij II bolesti ($p = 0,033$). U kontrolnoj skupini u stromi nisu nađene upalne stanice.

Tablica 8. Nazočnost HNE imunopozitiviteta u mezenhimu oko tumora po kliničkim stadijima bolesti i kontrolnoj skupini. Za sve parametre nije dobivena statistički značajna razlika $p>0,05$.

		HNE imunopozitivitet					
		Stadij I	Stadij II	Stadij III	Stadij IV	Kontrola	UKUPNO
STROMA	pozitivan	5	12	9	27	14	67
	negativan	10	10	9	15	18	62
	nije prisutan	1	1	0	3	0	5
	UKUPNO	16	23	18	45	32	134
STIJENKA KRVNE ŽILE	pozitivan	9	13	11	25	18	76
	negativan	6	9	7	17	14	53
	nije prisutan	1	1	0	3	0	5
	UKUPNO	16	23	18	45	32	134
ENDOTEL KRVNE ŽILE	pozitivan	0	3	2	5	1	11
	negativan	15	19	16	37	31	118
	nije prisutan	1	1	0	3	0	5
	UKUPNO	16	23	18	45	32	134
UPALA OKO TUMORA	pozitivan	10	15	13	24	-	62
	negativan	5	7	5	17	-	34
	nije prisutan	1	1	0	3	-	5
	UKUPNO	16	23	18	44	-	101

Patohistološka nazočnost imunopozitiviteta na HNE u stromi oko tumora za sve kliničke stadije bolesti u ispitivanoj skupini i nazočnost imunopozitiviteta na HNE u stromi u kontrolnoj skupini analizirana je pomoću χ^2 testa kojim nije nađena statistički značajna razlika ($p>0,05$).

Patohistološka nazočnost imunopozitiviteta HNE u epitelu oko tumora za sve kliničke stadije bolesti u ispitivanoj skupini i nazočnost HNE imunopozitiviteta u epitelu u kontrolnoj skupini analizirana je pomoću χ^2 testa. Za sve kliničke stadije bolesti nađena je statistički značajna razlika: stadij I $p=0,01$, stadij II $p<0,01$, stadij III $p<0,01$, stadij IV $p<0,01$. Za kontrolnu skupinu nije nađena statistički značajna razlika $p=0,2$.

4.4.4. Usporedba nazočnosti HNE-a u pločastom karcinomu prema gradusu

Radi usporedbe HNE imunopozitiviteta u citoplazmi i u jezgri pločastih stanica tumora u ovisnosti o histološkom gradusu tumora (slika 28, 29, 30 i 31) prikazali smo dobivene vrijednosti kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) zbog lakše usporedbe i statističke obrade rezultata. HNE imunopozitivitet u citoplazmi i u jezgri pločastih stanica tumora primijećen je u svim gradusima.

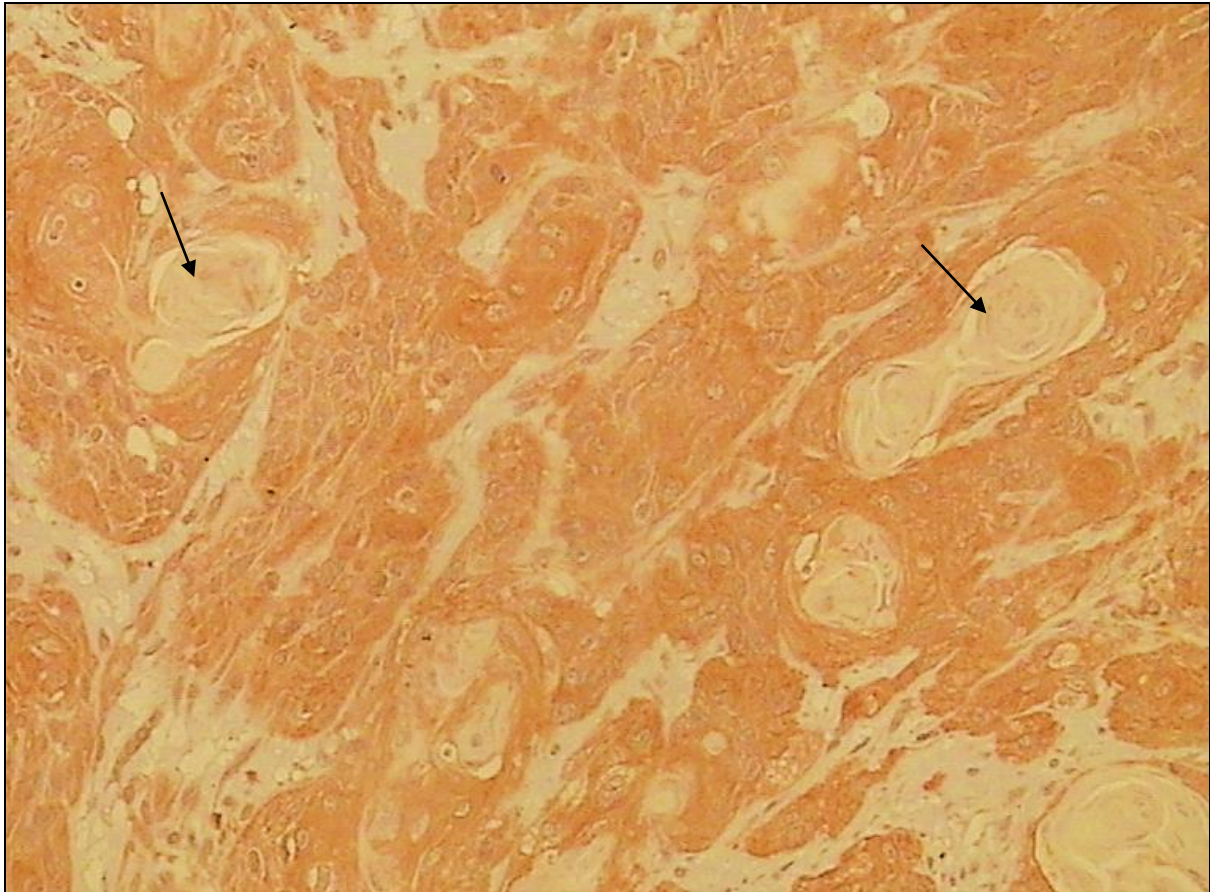
Imunopozitivitet HNE-a u citoplazmama tumorskih stanica u gradusu 1 je bio nazočan u 25/27 uzoraka, srednja vrijednost postotka pozitivnih citoplazmi iznosila je 81, SD 20,05. Imunopozitivitet HNE-a u citoplazmama tumorskih stanica u gradusu 2 je bio nazočan u 39/40 uzoraka, srednja vrijednost postotka pozitivnih citoplazmi iznosila je 79, SD 14. Imunopozitivitet HNE-a u citoplazmama tumorskih stanica u gradusu 3 je bio nazočan u 35/35 uzoraka, srednja vrijednost postotka pozitivnih citoplazmi iznosila je 74, SD 25. Intenzitet imunoreakcije HNE-a u gradusu 1 srednja vrijednost 2, SD 0,65; u gradusu 2 srednja vrijednost 2, SD 1; u gradusu 3 srednja vrijednost 1, SD 1.

Kod intenziteta HNE u citoplazmama tumorskih stanica došlo je do statistički značajne reakcije s obzirom na gradus, naročito uspoređujući gradus 1 s gradusom 3 ($p < 0,01$) i uspoređujući gradus 2 s gradusom 3 ($p = 0,013$).

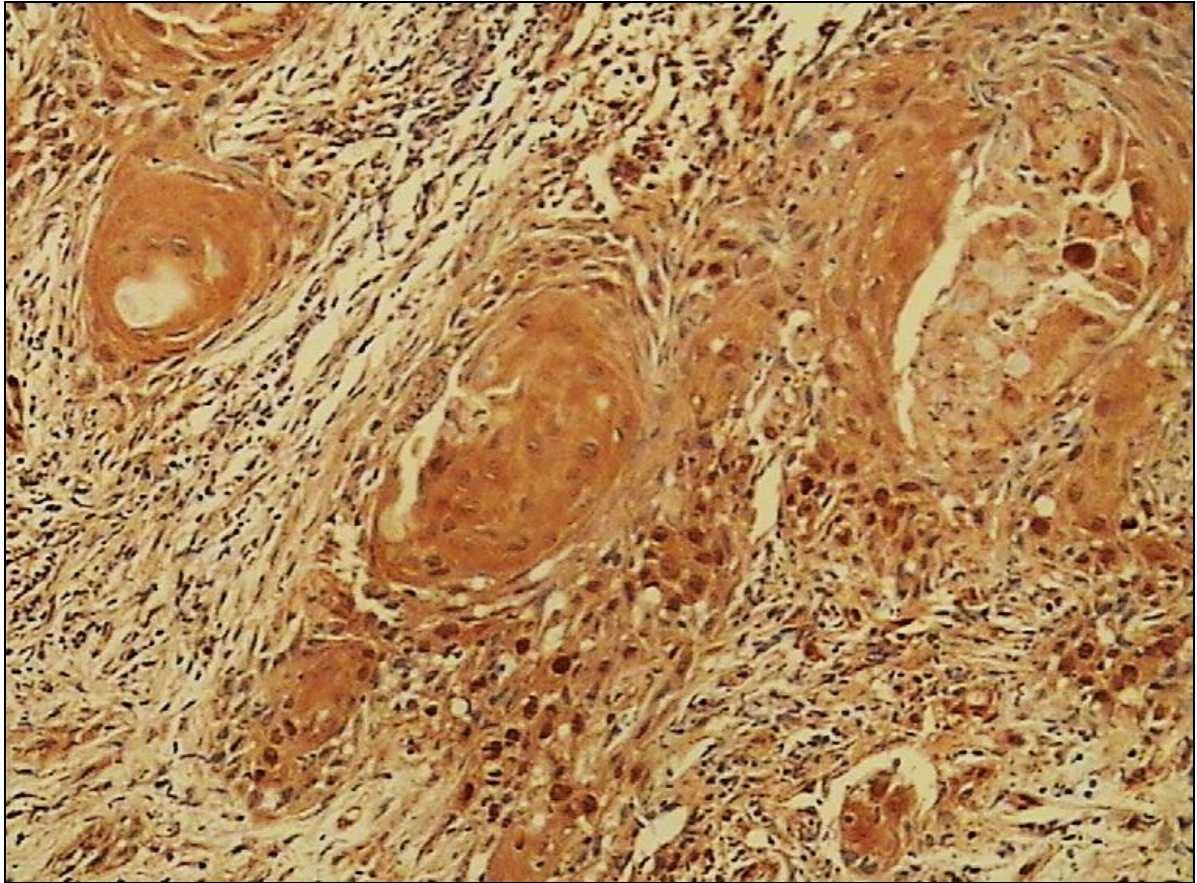
Rezultati patohistološke analize imunohistokemijske nazočnosti HNE-a u citoplazmi tumorskih stanica i intenzitet reakcije u negativnoj su korelaciji s histološkim gradusom tumora te povećanjem gradusa smanjuje se postotak pozitivnih stanica (slika 32) i intenzitet imunoreakcije.

Imunopozitivitet HNE-a u jezgrama tumorskih stanica u gradusu 1 nazočan je u 12/27 uzoraka, srednja vrijednost postotka pozitivnih jezgri iznosi 18, SD 30,07. Imunopozitivitet HNE-a u jezgrama tumorskih stanica u gradusu 2 bio je nazočan u 15/40 uzoraka, srednja vrijednost postotka pozitivnih jezgri iznosila je 12, SD 23. Imunopozitivitet HNE-a u jezgrama tumorskih stanica u gradusu 3 bio je nazočan u 10/35 uzoraka, srednja vrijednost postotka pozitivnih jezgri iznosila je 12, SD 26. Intenzitet imunoreakcije jezgri HNE-a u gradusu 1 srednja vrijednost je bila 1,14, SD 0,65; u gradusu 2 srednja vrijednost je bila 1, SD 1; u gradusu 3 srednja vrijednost je bila 1, SD 1. Analizom rezultata patohistološke nazočnosti HNE-a u jezgrama tumorskih stanica zamjećuje se porast pozitiviteta u gradusu 1 i 2 te zatim njegov pad u gradusu 3 (slika 32). Intenzitet imunoreakcije HNE u jezgri tumorskih stanica je u svim gradusima u prosjeku slab. Provedenom statističkom analizom dvosmjernim

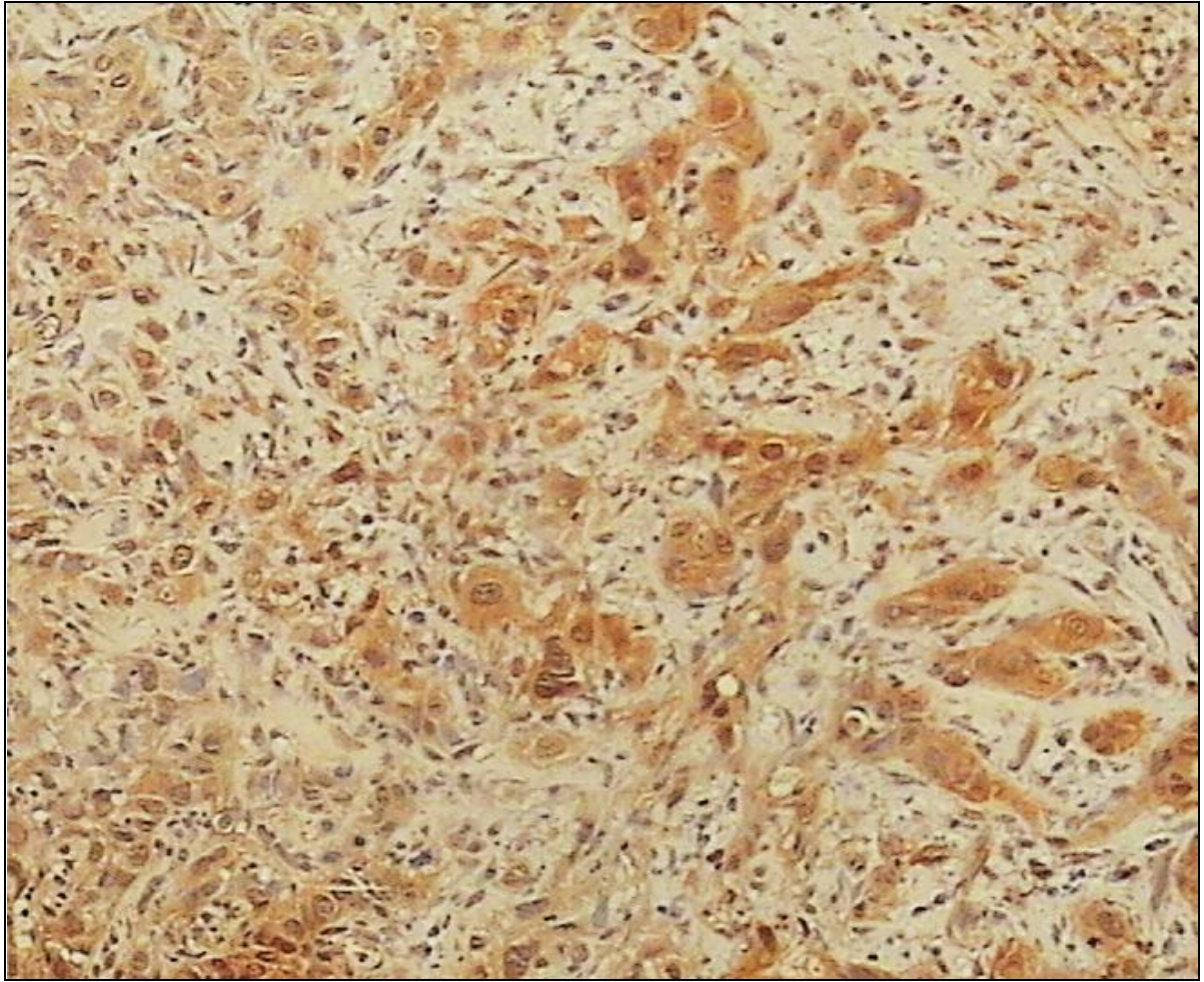
Mann Whitney U-testom za postotak pozitivnih jezgri i intenzitet imunoreakcije po gradusima nije utvrđena statistička značajna razlika ($p > 0,05$).



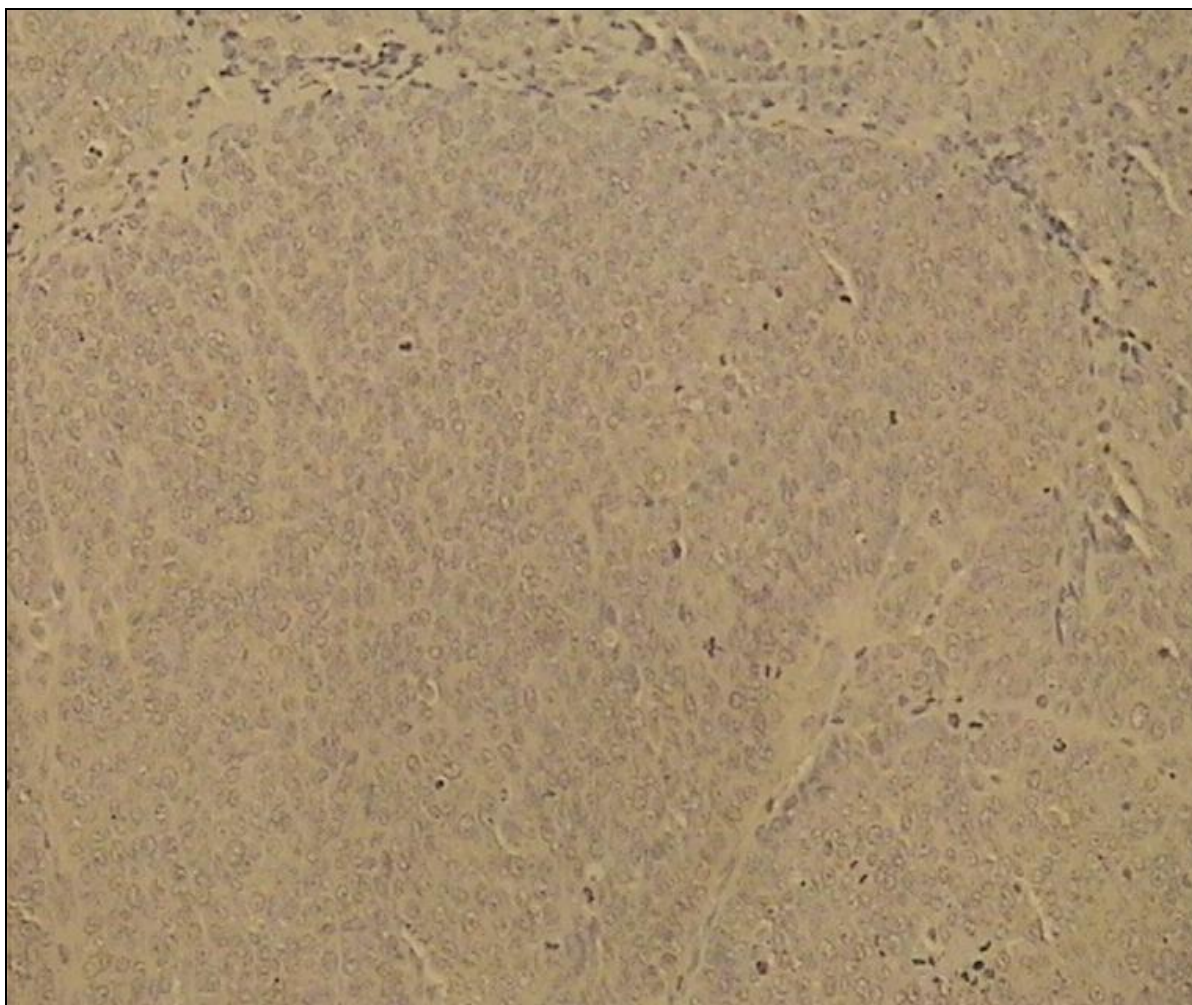
Slika 28. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na HNE pločastog karcinoma gradusa I orofarinksa. Slika prikazuje jak intenzitet bojanja citoplazi tumorskih stanica na HNE. Rožnate perle su negativne (strelica) (objektiv x 20).



Slika 29. Prikaz imunohistokemijskih bojanja na HNE pločastog karcinoma gradusa II orofarinksa. Slika pokazuje umjereni i jak intenzitet bojanja citoplazmi i jezgri tumorskih stanica na HNE. Okolna tumorska stroma i upalne stanice su također pozitivne na HNE (objektiv x 20).



Slika 30. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na HNE pločastog karcinoma gradusa III orofarinksa. Slika pokazuje slab i umjeren HNE pozitivitet u citoplazmama i dijelom u jezgrama tumorskih stanica. Stroma je negativna, dok su upalne stanice u tumoru pozitivne (objektiv x 20).



Slika 31. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na HNE pločastog karcinoma gradusa III orofarinksa. Slika prikazuje negativan HNE imunopozitivitet u tumorskim stanicama (objektiv x 40).

4.4.5. Usporedba nazočnosti HNE-a u epitelu sluznice uz tumor prema gradusu tumora i kontrolnom uzorku

Radi usporedbe nazočnosti HNE imunopozitiviteta u citoplazmi i u jezgri pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor u ovisnosti o histološkom gradusu tumora (slika 33, 34) i kontrolne skupine prikazali smo dobivene vrijednosti kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) zbog lakše usporedbe i statističke obrade rezultata.

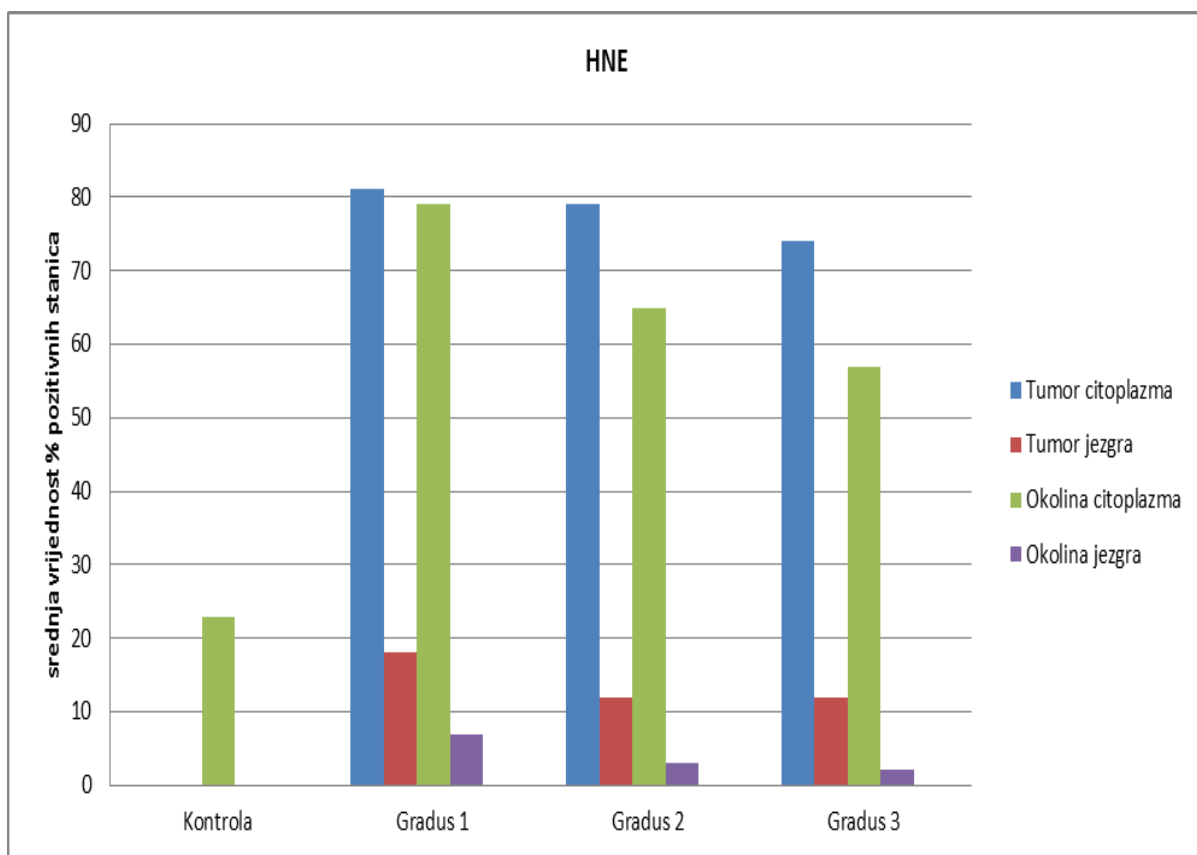
Imunopozitivitet HNE-a u citoplazmama pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor gradusa 1 bio je nazočan u 18/27 uzoraka, dok u 9/27 uzoraka okolni epitel uz tumor nije bio prisutan. Srednja vrijednost postotka pozitivnih stanica iznosila je 79, SD 14,19. Imunopozitivitet HNE-a u citoplazmama pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor gradusa 2 bio je nazočan u 26/40 uzoraka, u 1/27 pozitivitet je bio negativan (0), a u 13/27 uzoraka okolni epitel nije bio prisutan. Srednja vrijednost postotka pozitivnih stanica iznosila je 65, SD 24. Imunopozitivitet HNE-a u citoplazmama pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor gradusa 3 bio je nazočan u 24/35 uzoraka, u 1/35 uzoraka pozitivitet je bio negativan (0), a u 10/35 uzoraka okolni epitel nije bio prisutan. Srednja vrijednost postotka pozitivnih stanica iznosila je 57, SD 27. Uspoređujući histološke graduse statistička značajna razlika nađena je između gradusa 1 i gradusa 2 ($p=0,0343$) te gradusa 1 i gradusa 3 ($p=0,032$). Analizom rezultata patohistološke nazočnosti HNE-a u citoplazmama epitelnih stanica uz tumor po pojedinim kategorijama gradusa zamjećuje se negativna korelacija, tj. statistički značajan pad pozitivnih stanica s porastom gradusa.

Intenzitet imunopozitiviteta HNE-a u citoplazmama pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor podjednak je za sve kategorije gradusa te je umjeren (+2) ($p > 0,05$).

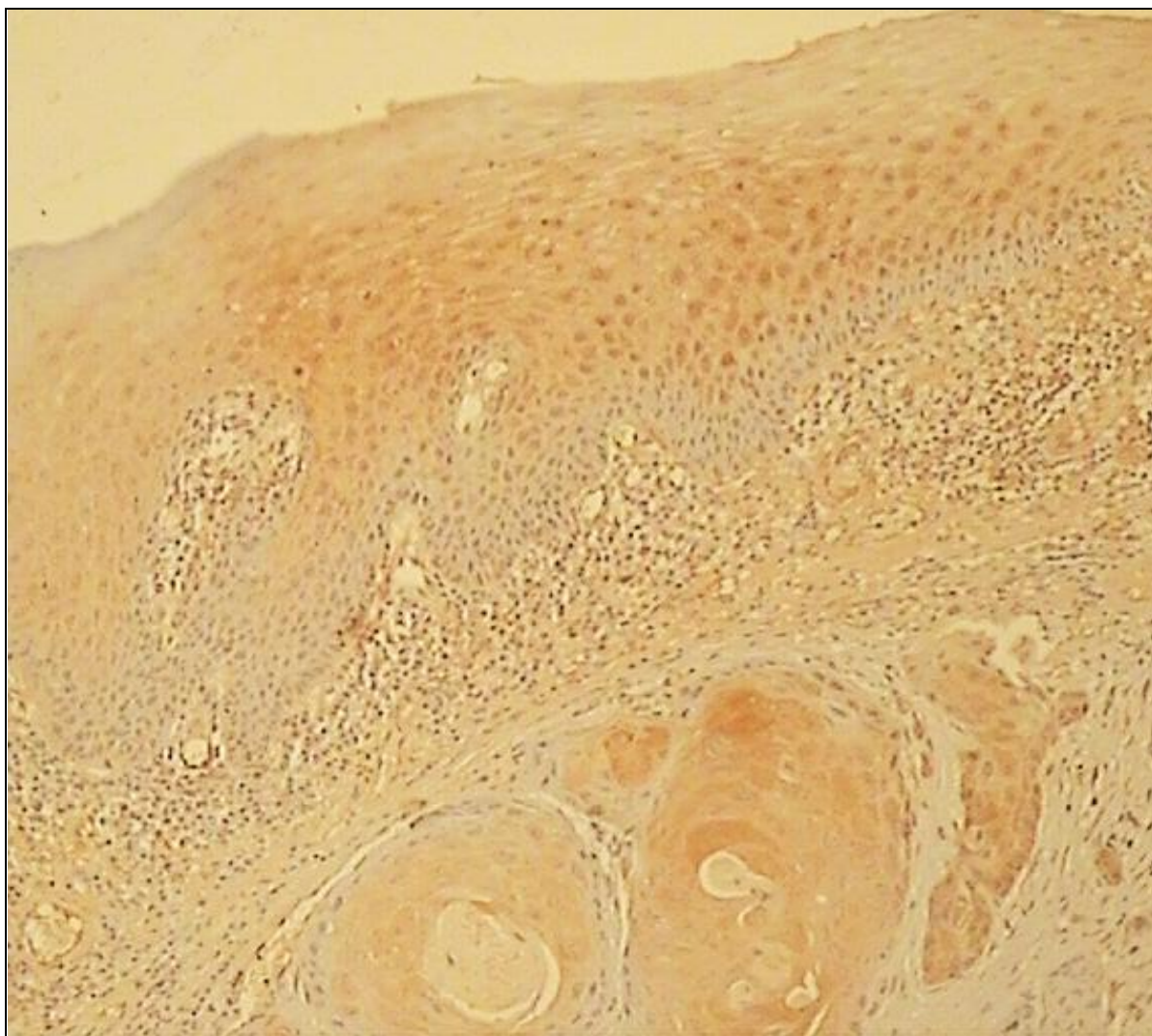
Imunopozitivitet HNE-a u jezgrama pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor bio je nazočan u izrazito manjem postotku stanica nego u citoplazmama te je zamijećen njegov pad s porastom gradusa. Tako je u gradusu 1 bilo pozitivno 2/27 uzoraka, negativno (0) 17/27 uzoraka, a u 9/27 uzoraka epitel nije bio prisutan. Srednja vrijednost iznosila je 7, SD 19,7. Intenzitet imunoreakcije u pozitivnim uzorcima je bio umjeren i jak. U gradusu 2 je bio pozitivan 1/40 uzoraka, 26/40 uzoraka je bilo negativno, a u 13/40 uzoraka okolni epitel nije bio prisutan. Srednja vrijednost iznosila je 3, SD 13, a intenzitet imunoreakcije u pozitivnom uzorku je bio slab (+1). U gradusu 3 pozitivan je bio 1/35 uzoraka, 24/35 je bilo negativno, dok u 10/35 uzoraka okolni epitel nije bio prisutan. Srednja vrijednost iznosila je 2, SD 10, a intenzitet imunoreakcije u pozitivnom uzorku je bio jak (+3).

4.4.6. Usporedba nazočnosti HNE-a u tumoru prema kontrolnoj skupini

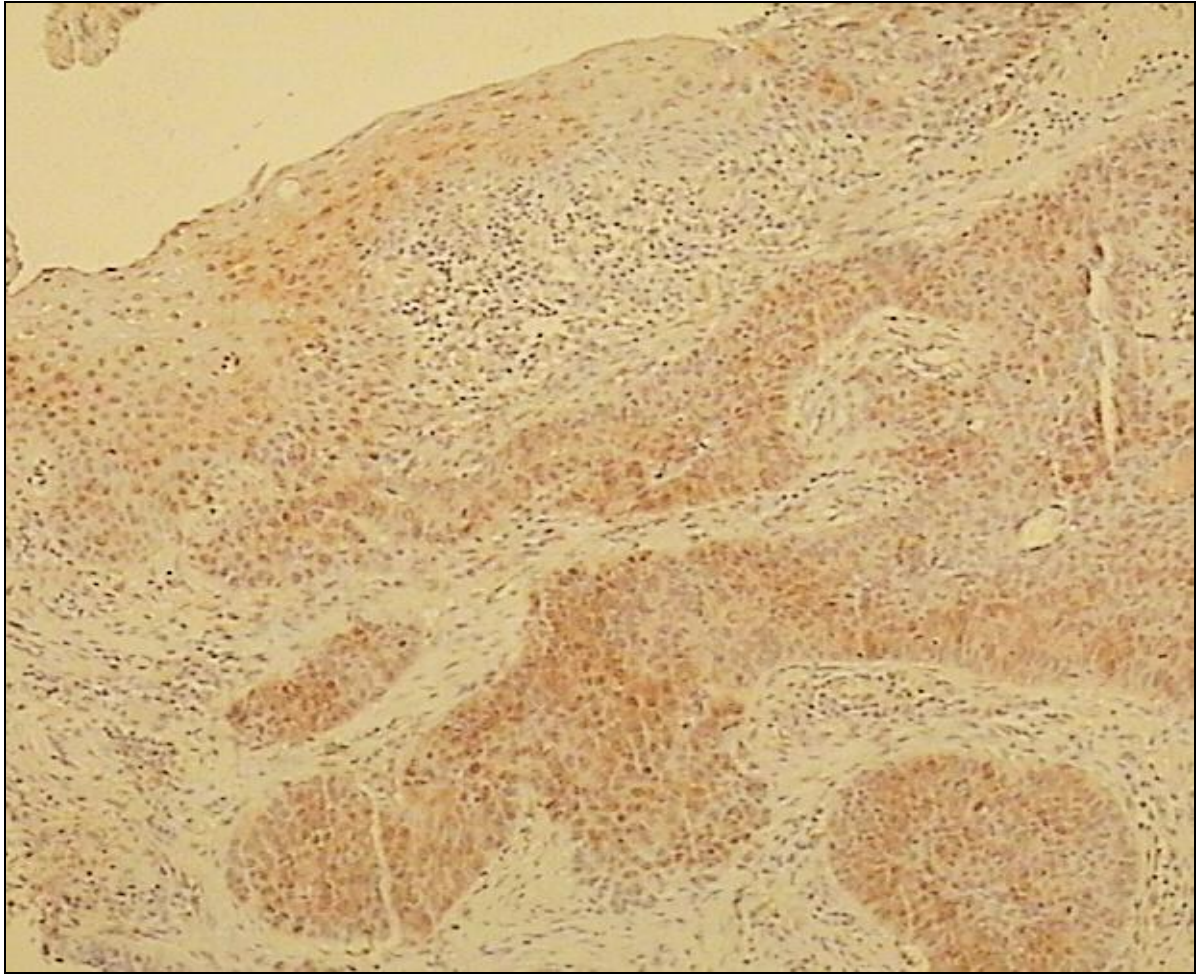
Provedenom statističkom analizom dvosmjernim Mann Whitney U-testom o nazočnosti HNE-a u citoplazmama i jezgrama tumorskih stanica te intenzitetu imunoreakcije u ispitivanoj skupini bolesnika prema kontrolnom uzorku za sve varijable u odnosu na svaku kategoriju gradusa došlo je do statistički značajne razlike po pojedinom gradusu ($p < 0,05$) (slika 32).



Slika 32. Grafički prikaz nazočnosti HNE-a u tumoru i epitelu oko tumora po pojedinim kategorijama gradusa te u kontrolnoj skupini. Dobivena je značajna statistička razlika dvosmjernim Mann Whitney U-testom kod ispitivane i kontrolne skupine za ispitivane varijable po pojedinim kategorijama gradusa ($p < 0,05$).



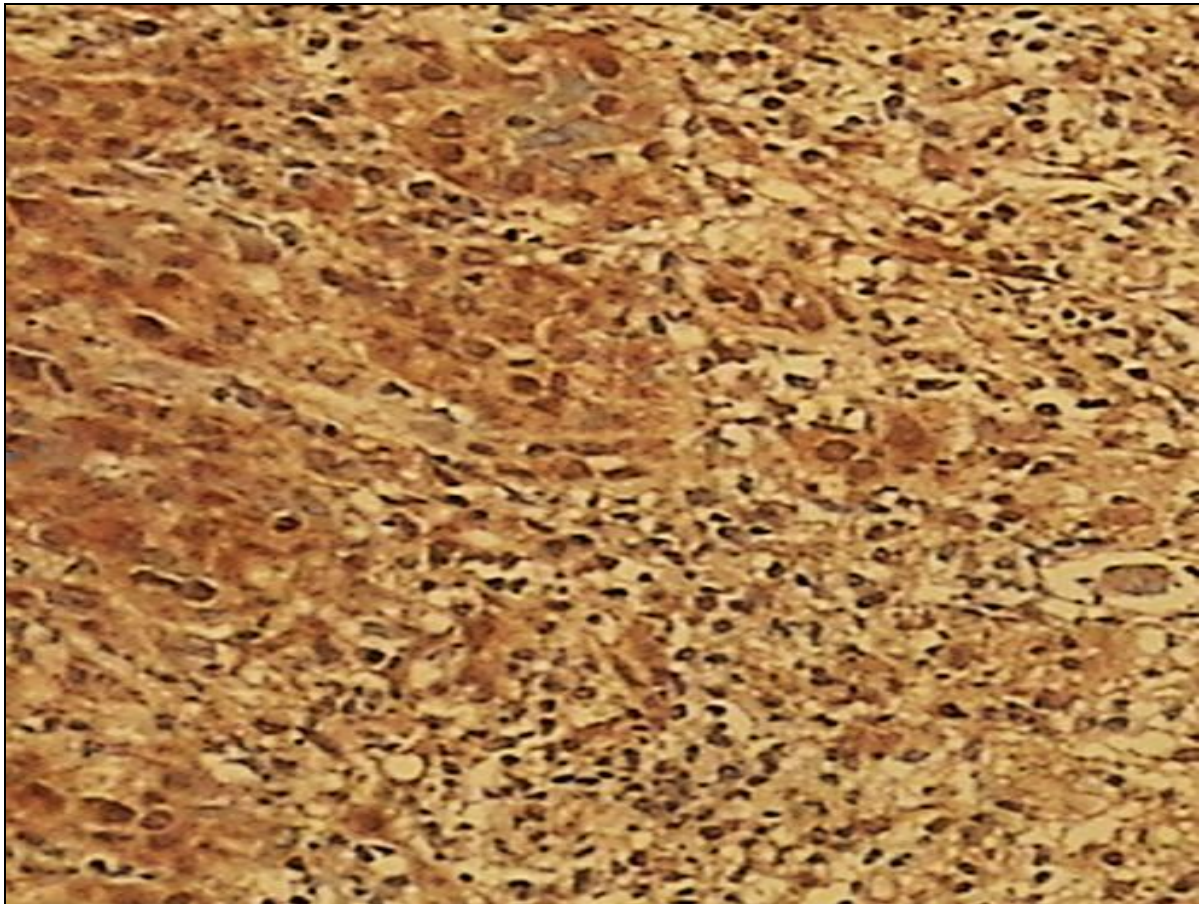
Slika 33. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na HNE pločastog, nemalignog epitela uz pločasti karcinom gradusa I orofarinksa. Slika prikazuje umjereni citoplazmatski HNE pozitivitet u pločastom epitelu iznad tumora (objektiv x 20).



Slika 34. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na HNE pločastog, nemalignog epitela uz pločasti karcinom gradusa III orofarinksa. Slika prikazuje slab intenzitet HNE bojanja u citoplazmama pločastih epitelnih stanica te slab intenzitet pozitivnih citoplazmi tumorskih stanica (objektiv x 20).

4.4.7. Usporedba nazočnosti HNE-a u upalnim stanicama u tumorskoj stromi po histološkom gradusu tumora

Imunopozitivitet HNE-a u upalnim stanicama u tumorskoj stromi prikazan je na slici 35. U gradusu 1 je bio pozitivan u 18/27, negativan u 2/27 dok u 7/27 uzoraka upalne stanice nisu bile prisutne. U gradusu 2 je bio pozitivan u 29/27, negativan u 3/40, dok u 8/40 uzoraka upalne stanice nisu bile prisutne. U gradusu 3 je bio pozitivan u 19/35, negativan u 8/35, dok u 8/35 uzoraka upalne stanice nisu bile prisutne. Statističkom analizom podataka došlo je do statističke značajne razlike u pozitivitetu HNE u upalnim stanicama u tumorskoj stromi kad uspoređujemo 2 i 3 gradus tumora ($p=0,0475$).



Slika 35. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na HNE tumorske strome u pločastom karcinomu gradusa III orofarinksa. Slika pokazuje pozitivitet strome i kroničnih upalnih stanica na HNE te manje solidne nakupine tumorskog tkiva gdje je HNE pozitivan u umjerenom intenzitetu u citoplazmama i jezgrama (objektiv x 40).

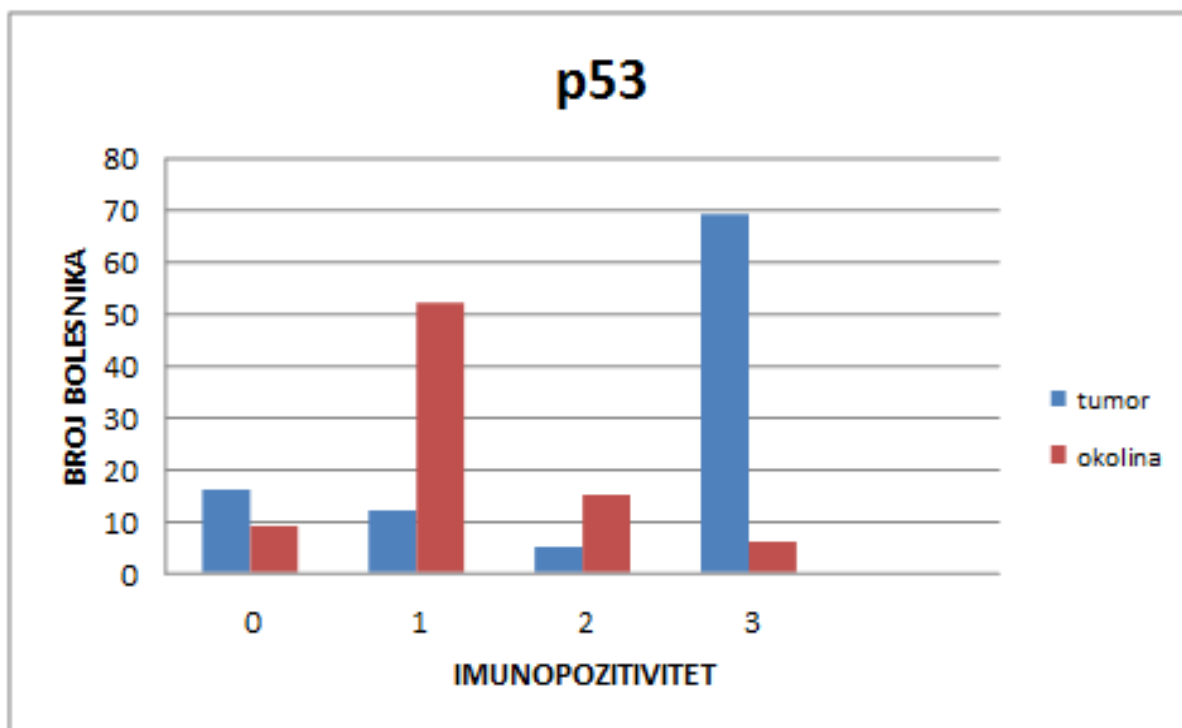
4.5. Imunohistokemijska nazočnost p53 u pločastom karcinomu

Nazočnost (ekspresija) p53 je imunohistokemijski prikazana u tumorskim stanicama i u okolnom netumorskom tkivu. U tumorskim stanicama p53 je nazočan u jezgrama. U okolnom netumorskom tkivu p53 je nazočan u jezgrama pločastih epitelnih stanica. U mezenhimalnim stanicama p53 nije nazočan.

Rezultati imunohistokemijske nazočnosti p53 u pločastom karcinomu prikazani su u tablici 9 i slici 36. P53 imunopozitivitet nađen je u većini 86 (84,3%) jezgri tumorskih stanica, dok ih je 16 (15,6%) bilo negativno. U više od polovine pozitivnih tumora 69 (67,6%) procjena imunopozitiviteta bila je +3, u 12 (11,7%), procjena bila je +1, a u 5 (4,9%) bila je +2. P53 imunopozitivitet nađen je u 73 (71,5%) uzorka epitela oko tumora, dok ih je 9 (8,8%) bilo negativno. U 20 uzoraka okolni epitel uz tumor nije bio prisutan. U 52 (50,9%) uzorka procjena imunopozitiviteta je iznosila +1, u 15 (14,7%) je bila +2, a u 3 (2,9%) uzorka je bila +3.

Tablica 9. Nazočnost p53 u jezgrama stanica pločastog karcinoma i u jezgrama pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor.

	TUMOR	EPITEL UZ TUMOR
pozitivan	89	73
negativan	13	9
nije prisutan	0	20
UKUPNO	102	102



Slika 36. Grafički prikaz procjene imunopozitiviteta p53 u jezgrama tumorskih stanica i pločastih epitelnih stanica oko tumora.

4.5.1. Usporedba nazočnosti p53 u tumoru i okolnom epitelu uz tumor po kliničkim stadijima bolesti

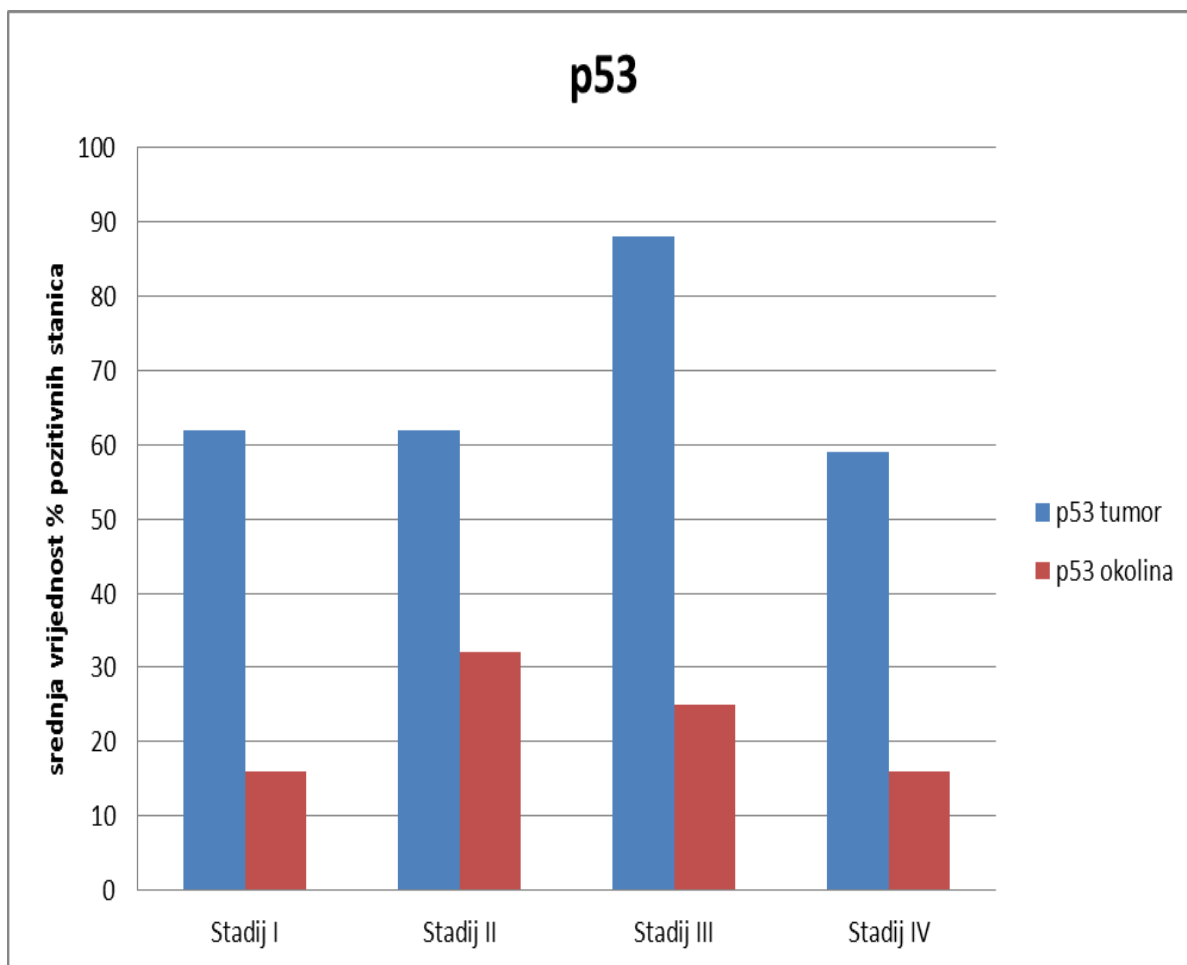
Radi usporedbe p53 imunopozitiviteta u jezgri pločastih stanica tumora u ovisnosti o kliničkom stadiju bolesti prikazali smo dobivene vrijednosti kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) zbog lakše usporedbe i statističke obrade rezultata.

Imunopozitivitet na p53 u jezgrama tumorskih stanica u kliničkom stadiju I bolesti bio je nazočan u 12/16 uzoraka, dok je bio negativan u 4/16 uzoraka. Srednja vrijednost iznosila je 62, SD 40. Imunopozitivitet na p53 u jezgrama tumorskih stanica u kliničkom stadiju II bolesti bio je nazočan u 20/23 uzoraka, dok je bio negativan u 3/23 uzoraka. Srednja vrijednost iznosila je 62, SD 37. Imunopozitivitet na p53 u jezgrama tumorskih stanica u kliničkom stadiju III bolesti bio je nazočan u 17/18 uzoraka dok je bio negativan u 1/18 uzoraka, srednja vrijednost iznosila je 88, SD 24. Imunopozitivitet na p53 u jezgrama tumorskih stanica u kliničkom stadiju IV bolesti bio je nazočan u 38/45 uzoraka dok je bio

negativan u 7/45, srednja vrijednost postotka pozitivnih stanica iznosila je 59, SD 42.

Analizom rezultata primjećuje se rast postotka pozitivnih stanica u prva tri klinička stadija bolesti s vrhuncem u III kliničkom stadiju bolesti te potom njegov pad u IV kliničkom stadiju bolesti. Statističkom obradom rezultata dvosmjernim Mann Whitney U-testom došlo je do statistički značajne razlike kad uspoređujemo I i III klinički stadij ($p=0,027$) te III i IV klinički stadij ($p=0,07$) bolesti.

Imunopozitivitet na p53 u jezgrama pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor u kliničkom stadiju I bolesti bio je nazočan u 11/16 uzoraka, negativan u 1/16 uzoraka dok u 4/16 uzoraka okolni epitel nije bio prisutan, a srednja vrijednost postotka pozitivnih stanica iznosila je 16, SD 10. U kliničkom stadiju II bio je pozitivan u 19/23 uzorka, negativan u 1/23, dok u 3/23 uzorka okolni epitel nije bio prisutan. Srednja vrijednost postotka pozitivnih stanica iznosila je 32, SD 23. U kliničkom stadiju III p53 je bio pozitivan u 16/18 uzoraka dok okolni epitel nije bio prisutan u 2/18 uzoraka, a srednja vrijednost postotka pozitivnih stanica iznosila je 25, SD 23. U kliničkom stadiju bolesti IV p53 bio je pozitivan u 27/45 uzorka, negativan u 7/45 dok u 11/45 uzorka okolni epitel nije bio prisutan. Srednja vrijednost iznosila je 16, SD 14. Analizom rezultata primjećuje se rast postotka pozitivnih stanica u prva dva klinička stadija bolesti s vrhuncem u II kliničkom stadiju bolesti te potom njegov pad u III i IV kliničkom stadiju bolesti (slika 37). Statističkom obradom rezultata dvosmjernim Mann Whitney U-testom došlo je do statistički značajne razlike kad uspoređujemo II i IV klinički stadij bolesti ($p=0,003$).



Slika 37. Grafički prikaz srednje vrijednosti postotka pozitivnih stanica na p53 u tumoru i epitelu oko tumora. Mann Whitney U-testom došlo je do statistički značajne razlike u nazočnosti p53 u tumoru kad uspoređujemo I i III klinički stadij ($p=0,027$) te III i IV klinički stadij ($p=0,07$) bolesti, dok je u nazočnosti p53 u okolini kad uspoređujemo II i IV klinički stadij ($p=0,003$) bolesti.

4.5.2. Usporedba nazočnosti p53 u tumoru i okolnom epitelu uz tumor po histološkom gradusu tumora

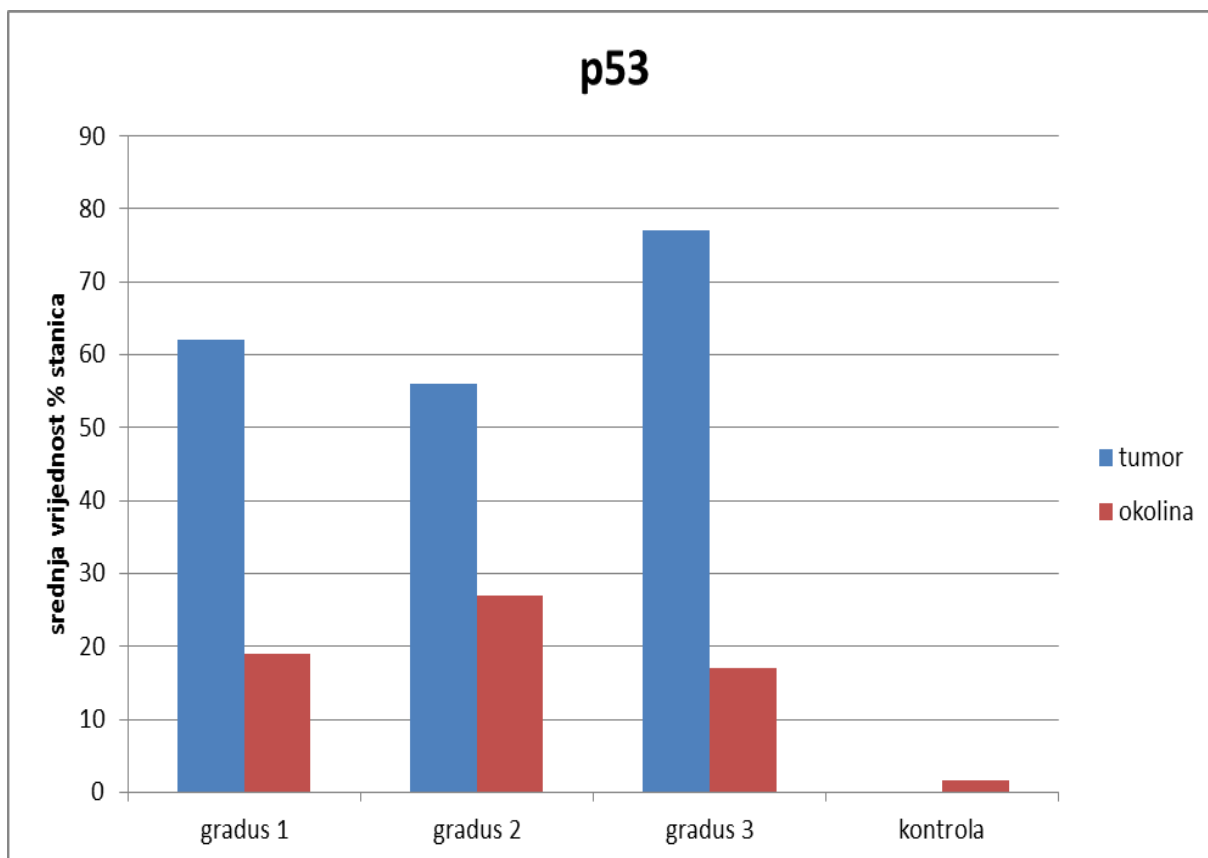
Radi usporedbe p53 imunopozitiviteta u jezgri pločastih stanica tumora (slika 39, 40, 41) i u jezgri pločastih, nemalignih epitelnih stanica uz tumor (slika 42, 43) u ovisnosti o histološkom gradusu tumora prikazali smo dobivene vrijednosti kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) zbog lakše usporedbe i statističke obrade rezultata (slika 38).

Imunopozitivitet na p53 u jezgrama tumorskih stanica u gradusu I bio je pozitivan u 22/27 uzoraka, negativan u 5/27 uzoraka, a srednja vrijednost postotka pozitivnih stanica je iznosila 62, SD 35,6. U gradusu II bilo je 32/40 pozitivnih uzoraka, negativnih 9/40, a srednja vrijednost je iznosila 56, SD 42. U gradusu III bilo je 33/35 pozitivnih uzoraka, negativnih 2/35, a srednja vrijednost je iznosila 77, SD 34. Statističkom obradom rezultata dvosmjernim Mann Whitney U-testom statistički značajna razlika dobivena je uspoređujući II i III gradus ($p=0,022$).

Imunopozitivitet na p53 u jezgrama pločastih epitelnih stanica u okolini tumora gradusa I bio je pozitivan u 17/27 uzoraka, negativan u 1/27 dok u 9/27 uzoraka okolni epitel nije bio prisutan. Srednja vrijednost postotka pozitivnih stanica je iznosila 19, SD 15,16. U okolini tumora gradusa II epitel je bio pozitivan u 33/40 uzoraka, negativan u 2/40 uzoraka dok nije bio prisutan u 5/40 uzoraka, a srednja vrijednost je iznosila 27, SD 22. U okolini tumora gradusa III epitel je bio pozitivan u 23/35 uzoraka, negativan u 6/35 uzoraka dok nije bio prisutan u 6/23 uzoraka, a srednja vrijednost je iznosila 17, SD 16. Statističkom obradom rezultata dvosmjernim Mann Whitney U-testom statistička značajna razlika dobivena je uspoređujući II i III gradus ($p=0,0321$).

U kontrolnoj skupini p53 je bio pozitivan u 7/32 uzorka, a negativan u 25/32 uzorka, srednja vrijednost pozitivnih stanica je iznosila 1,56, SD 3,2.

Statističkom obradom rezultata dvosmjernim Mann Whitney U-testom, nazočnost p53 u jezgrama tumorskih stanica je statistički značajno povišena u svim gradusima tumora u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,0001$).

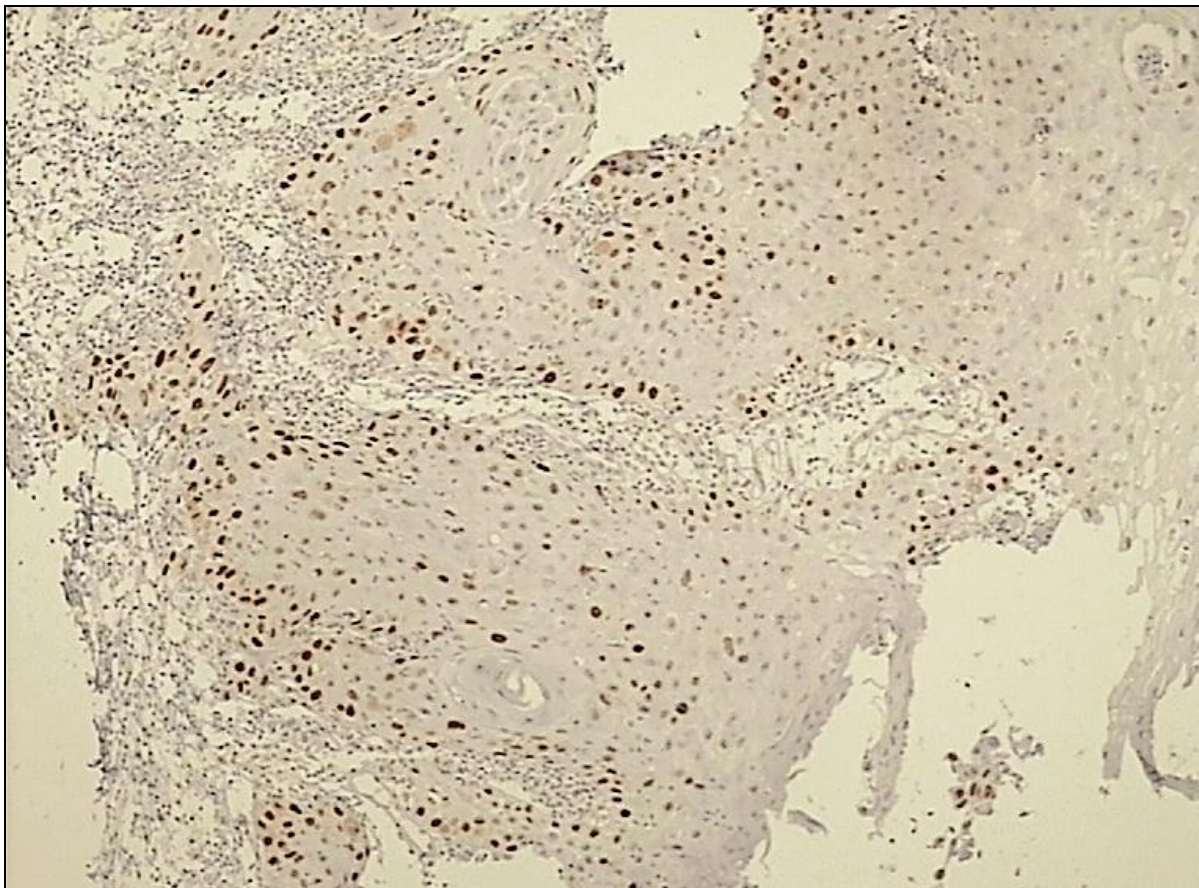


Slika 38. Grafički prikaz srednje vrijednost postotka pozitivnih stanica na p53 u tumoru i okolini uz tumor te kontrolnoj skupini bolesnika. Mann Whitney U-testom došlo je do statistički značajne razlike u nazočnosti p53 uspoređujući II i III gradus kod tumora ($p=0,022$) i kod okoline uz tumor ($p=0,0321$). P53 je u tumoru i okolini uz tumor povišen u svim gradusima u odnosu na kontrolu ($p<0,0001$).

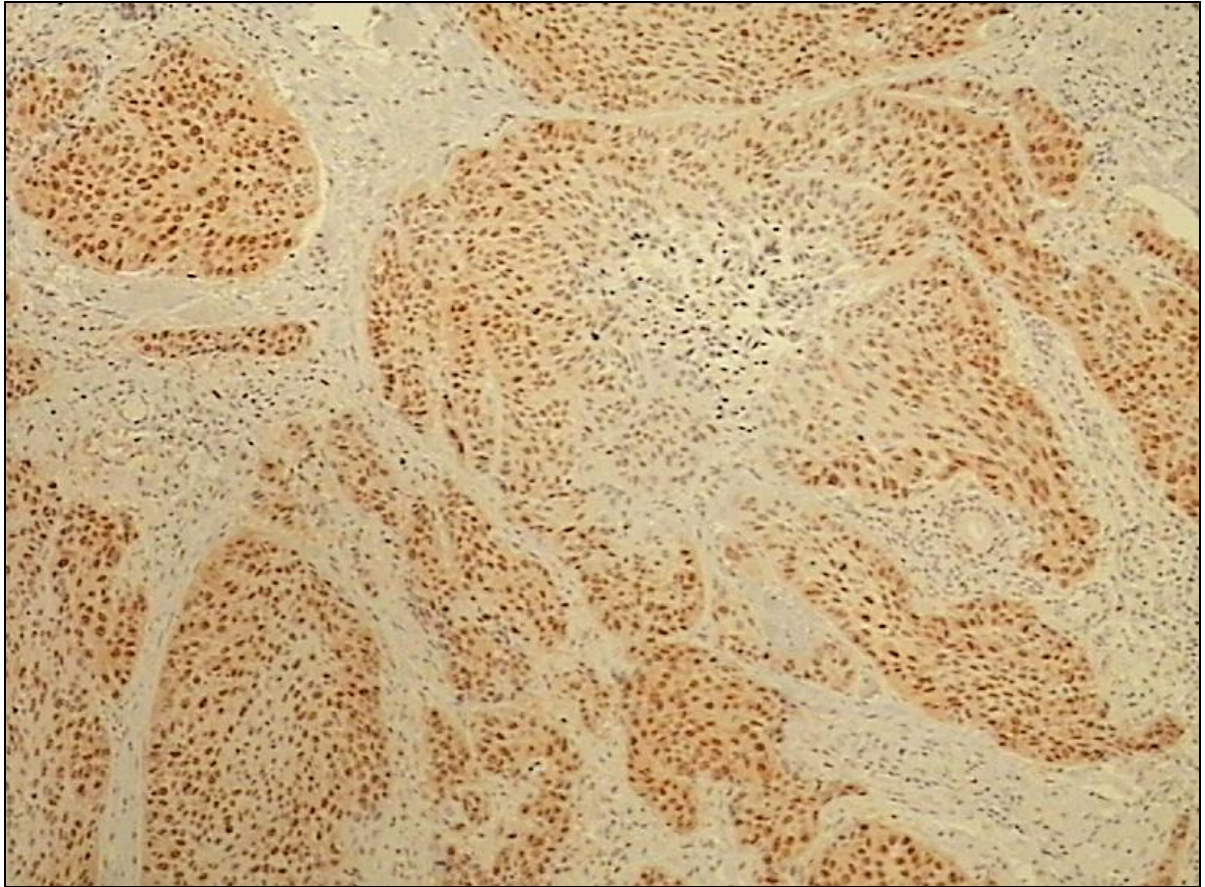
Dobiveni rezultati nakon statističke analize Pearsonovim χ^2 testom u korelaciji IH nazočnosti p53 u postotku tumorskih stanica i epitelnih stanica prikazani su u tablici 10. Provedenom statističkom analizom pronađena je statistički značajna razlika u nazočnosti p53 u tumoru i okolini u gradusu 1 ($p=0,024$). Potonji nalaz ukazuje na proporcionalni porast nazočnosti p53 u tumoru i okolini u gradusu 1.

Tablica 10. Pearsonova korelacija imunohistokemijske nazočnosti p53 u stanicama pločastog karcinoma i u pločastim, nemalignim epitelnim stanicama uz tumor.

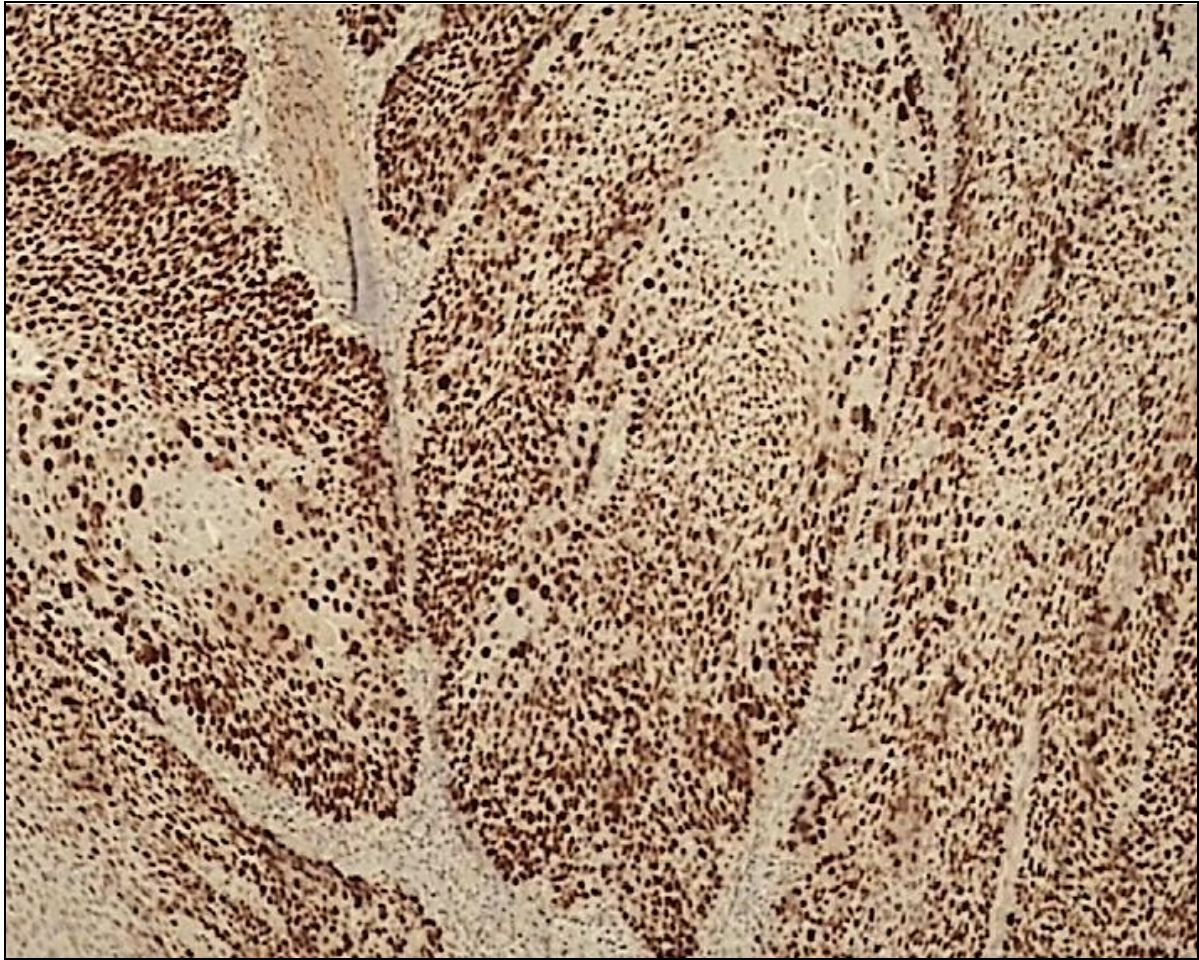
	p53 tumor vs. p53 okolina	
SVI	0,0361778	
gradus 1	0,5600713	p=0,024
gradus 2	-0,044726	
gradus 3	0,2375915	



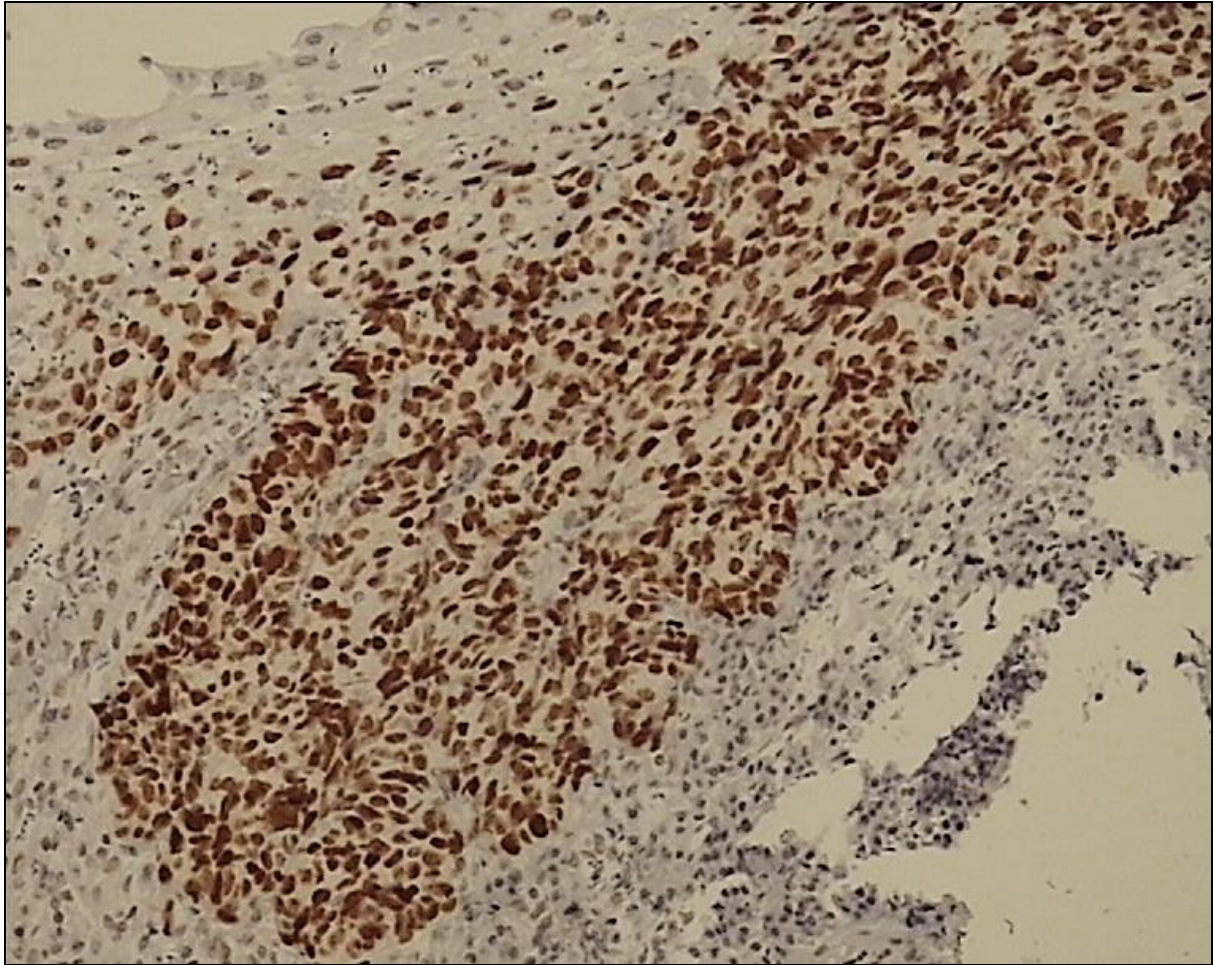
Slika 39. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na p53 pločastog karcinoma gradusa I orofarinksa. Slika prikazuje <21 % pozitivnih jezgri tumorskih stanica na p53 (objektiv x 20).



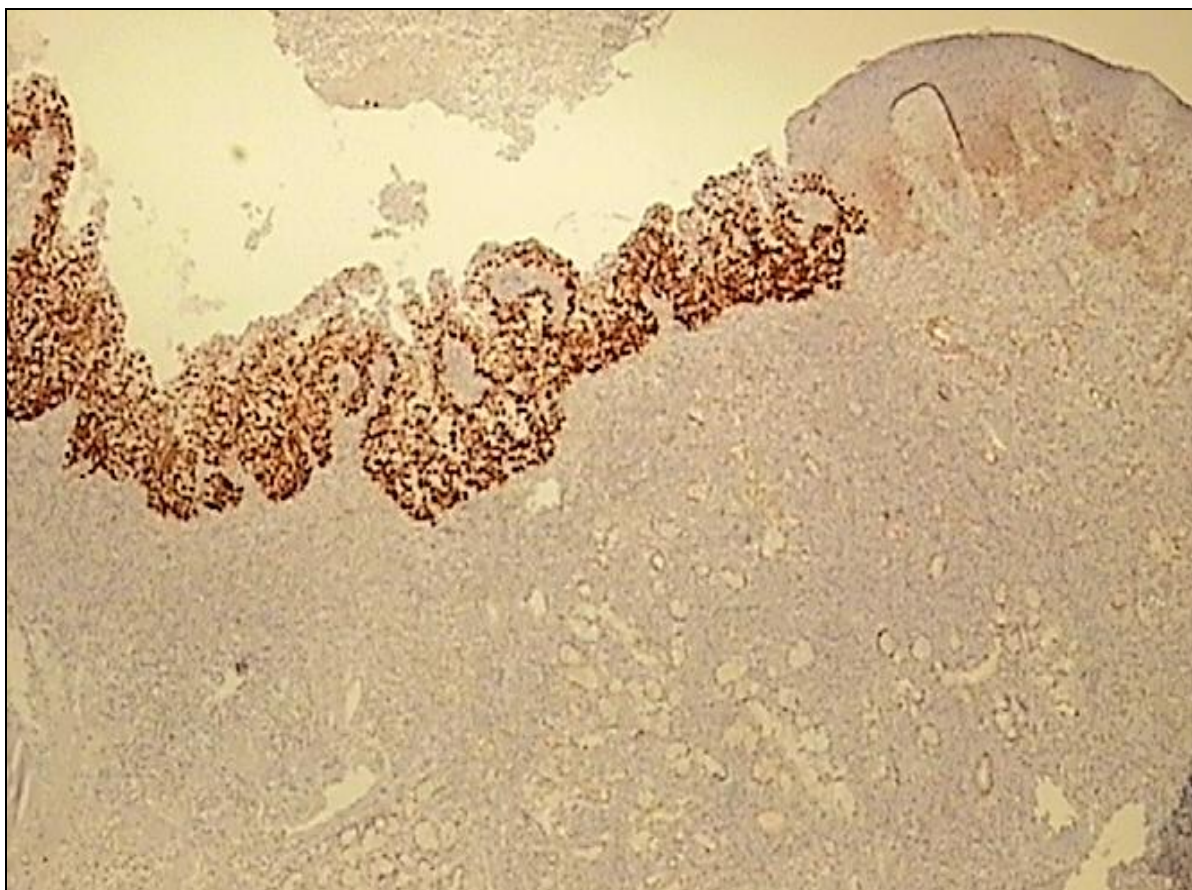
Slika 40. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na p53 pločastog karcinoma gradusa II orofarinksa. Slika prikazuje pozitivne jezgre tumorskih stanica na p53. Okolna stroma i upalne stanice su p53 negativne (objektiv x 10).



Slika 41. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na p53 pločastog karcinoma gradusa III orofarinksa. Slika prikazuje pozitivne jezgre tumorskih stanica na p53. Okolna stroma i upalne stanice su p53 negativne (objektiv x 10).



Slika 42. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na p53 pločastog karcinoma gradusa II i okolnih pločastih, nemalignih epitelnih stanica u orofarinksu. Slika prikazuje p53 pozitivne jezgre pločastih stanica tumora dok u okolini jezgre su pozitivne na p53 u donjoj polovini epitela. Okolna stroma i upalne stanice su p53 negativne (objektiv x 40).



Slika 43. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na p53 pločastog karcinoma in situ/teške displazije i okolnog pločastog, nemalignog epitela u orofarinksu. Slika prikazuje p53 pozitivne jezgre tumorskih/displastičnih stanica dok u okolini jezgre su sporadično pozitivne na p53 u bazalnom sloju. Okolna stroma i upalne stanice su p53 negativne (objektiv x 10).

4.6. Istovremena nazočnost HNE i p53 u pločastom karcinomu

Dobiveni rezultati statističke analize Pearsonovim χ^2 testom u korelaciji IH nazočnosti p53 tumorskih stanica i HNE u citoplazmi tumorskih stanica prikazani su u tablici 11. Vidljivo je da je HNE u >51% tumorskih stanica prisutan u 82,3 % uzoraka, dok je p53 prisutan u 58,8% uzoraka. Negativan nalaz HNE je bio u 3,9% uzoraka dok je p53 bio negativan u 14,7% uzoraka. Provedenom statističkom analizom nije pronađena statistički značajna razlika u koekspresiji HNE citoplazma i p53 u postotku pozitivnih tumorskih stanica ($p > 0,05$). Potonji nalaz ukazuje na obrnuto proporcionalnu ekspresiju HNE citoplazma i p53 u

tumorskim stanicama, HNE postepeno pada s porastom gradusa dok p53 raste s porastom gradusa.

Tablica 11. Prikaz korelacije imunohistokemijske nazočnosti HNE u citoplazmama tumorskih stanica i p53 u tumoru prema histološkom gradusu tumora.

	HNE tumor citoplazma				p53 tumor				X ²	p
	bez pozitivnih stanica	<25% poz. stanica	25-50% poz. stanica	51-100 % poz. stanica	bez pozitivnih stanica	<25% poz. stanica	26-50% poz. stanica	51-100% poz. stanica		
Gradus 1 broj (%)	3 (2,9%)	0 (0%)	4 (3,9%)	20 (19,65%)	5 (4,9%)	3 (2,9%)	1 (0,9%)	18 (17,6%)	-0,195	>0,05
Gradus 2 broj (%)	1 (0,9%)	0 (0%)	3 (2,9%)	36 (35,3%)	8 (7,8%)	6 (5,8%)	3 (2,9%)	13 (12,7%)	-0,195	>0,05
Gradus 3 broj (%)	0 (0%)	2 (1,9%)	3 (2,9%)	28 (27,5%)	2 (1,9%)	3 (2,9%)	1 (0,9%)	29 (28,4%)	0,3713	>0,05
Ukupno (%)	4 (3,9%)	2 (1,95)	10 (9,8%)	84 (82,3%)	15 (14,7%)	12 (11,7%)	4 (3,9%)	60 (58,8%)	0,0367	>0,05
UKUPAN BROJ	102				102					

Dobiveni rezultati statističke analize Pearsonovim χ^2 testom korelacije IH nazočnosti p53 tumora i HNE jezgre tumorskih stanica prikazani su u tablici 12. Vidljivo je da je HNE u >51% tumorskih jezgri prisutan u 11,7 % uzoraka, dok je p53 prisutan u 58,8 % uzoraka. Negativan nalaz HNE je bio u 67,6% uzoraka dok je p53 bio negativan u 14,7% uzoraka. Provedenom statističkom analizom pronađena je statistički značajna razlika u koekspresiji HNE jezgri i p53 u postotku pozitivnih tumorskih stanica u gradusu 1 ($p=0,0782$). Potonji nalaz ukazuje na obrnuto proporcionalnu koekspresiju HNE jezgri i p53 u tumorskim stanicama.

Tablica 12. Prikaz korelacije imunohistokemijske nazočnosti HNE i p53 u jezgrama tumorskih stanica prema histološkom gradusu tumora.

	HNE tumor jezgra				p53 tumor				X ²	p
	bez pozitivnih stanica	<25% poz. stanica	25-50% poz. stanica	51-100 % poz. stanica	bez pozitivnih stanica	<25% poz. stanica	26-50% poz. stanica	51-100% poz. stanica		
Gradus 1 broj (%)	18 (17,6%)	3 (2,9%)	2 (1,9%)	4 (3,9%)	5 (4,9%)	3 (2,9%)	1 (0,9%)	18 (17,6%)	-0,5481	0,00782
Gradus 2 broj (%)	26 (25,4%)	10 (9,8%)	0 (0%)	4 (3,9%)	8 (7,8%)	6 (5,8%)	3 (2,9%)	13 (12,7%)	0,1962	>0,05
Gradus 3 broj (%)	25 (24,5%)	4 (3,9%)	2 (1,9%)	4 (3,9%)	2 (1,9%)	3 (2,9%)	1 (0,9%)	29 (28,4%)	0,0067	>0,05
Ukupno (%)	69 (67,6%)	17 (16,6%)	4 (3,9%)	12 (11,7%)	15 (14,7%)	12 (11,7%)	4 (3,9%)	60 (58,8%)	-0,062	>0,05
UKUPAN BROJ	102				102					

4.7. Istovremena nazočnost HNE i p53 u okolini uz tumor

Dobiveni rezultati statističke analize Pearsonovim χ^2 testom korelacije IH nazočnosti p53 okoline i HNE u citoplazmi epitela oko tumora stanica prikazani su u tablici 13. Vidljivo je da je HNE u > 51% epitelnih stanica u okolini prisutan u 75,7% uzoraka dok je p53 prisutan u 7,3% uzorka. HNE je u <25% stanica prisutan u 5,7% uzoraka, dok je p53 prisutan u 64,6% uzoraka. Provedenom statističkom analizom nije pronađena statistički značajna razlika u koekspresiji HNE i p53 u postotku pozitivnih epitelnih stanica u okolini tumora ($p > 0,05$). Potonji nalaz ukazuje na obrnuto proporcionalnu ekspresiju HNE i p53 u okolini tumora.

Tablica 13. Prikaz korelacije imunohistokemijske nazočnosti HNE i p53 u pločastim, nemaligim epitelnim stanicama u okolini tumora prema histološkom gradusu tumora.

	HNE okolina				p53 okolina				X ²	p
	bez pozitivnih stanica	<25% poz. stanica	25-50% poz. stanica	51-100 % poz. stanica	bez pozitivnih stanica	<25% poz. stanica	26-50% poz. stanica	51-100% poz. stanica		
Gradus 1 broj (%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2,8%)	16 (22,8%)	1 (1,2%)	14 (17%)	2 (2,4%)	1 (1,2%)	0,2052	>0,05
Gradus 2 broj (%)	1 (1,4%)	1 (1,4%)	3 (4,2%)	22 (31,4%)	2 (2,4%)	20 (24,3%)	9 (10,9%)	4 (4,8%)	-0,220	>0,05
Gradus 3 broj (%)	1 (1,4%)	3 (4,2%)	6 (8,5%)	15 (21,4%)	6 (7,3%)	19 (23,1%)	3 (3,6%)	1 (1,2%)	0,149	>0,05
Ukupno (%)	2 (2,8%)	4 (5,7%)	11 (15,7%)	53 (75,7%)	9 (10,9%)	53 (64,6%)	14 (17%)	6 (7,3%)	-0,04	>0,05
UKUPAN BROJ	70*				82*					

Legenda * razlika u ukupnom broju uzoraka HNE okolina i p53 okolina posljedica je gubitka materijala prilikom dubljeg rezanja tkiva za imunohistokemijsku analizu.

5. RASPRAVA

Pločasti karcinom orofarinksa smatra se heterogenim zloćudnim tumorom prema svojoj etiologiji, biološkom ponašanju i prognozi. Nastaje iz epitela koji oblaže sluznicu orofarinksa te je ovo anatomsko mjesto direktno izloženo visokim razinama karcinogena iz duhana i alkohola. Zadnjih godina u svijetu, a tako i kod nas, raste incidencija pločastog karcinoma orofarinksa. Porast incidencije pločastog karcinoma orofarinksa u Hrvatskoj posljedica je raširene navike pušenja i konzumacije većih količina alkoholnih pića, te zadnjih godina virusom HPV-a potaknute karcinogeneze. Uz navedene etiološke čimbenike bitna je i genetska predispozicija (4). Klasične kliničko-patološke karakteristike koje određuju prognozu i preporuke za adjuvantnu terapiju su veličina tumora, histološki gradus i status regionalnih limfnih čvorova. TNM sustav integrira ove karakteristike tumora u stadije koji imaju glavnu prognostičku vrijednost. Lokalizacija primarnog tumora utječe na sam tijek bolesti. Tumori orofarinksa se obično otkriju u većim T stadijima jer se radi o tzv. tihoj regiji gdje i veći tumori izazivaju minimalne smetnje, a u trenutku postavljanja dijagnoze više od polovine bolesnika ima prisutne metastaze na vratu. Vjerojatnost metastaziranja ne može se isključivo povezati sa stupnjem diferenciranosti tumora. Unatoč poznatim prognostičkim čimbenicima, karcinom orofarinksa je često nepredvidivog tijeka, stoga se istražuju brojni biomarkeri s ciljem pomoći kod određivanja optimalne terapije, predviđanja odgovora na terapiju kao i ocjene prognoze. Biologija tumorskog rasta povezana je s pojavom oksidacijskog stresa u kojem stanice luče reaktivne kisikove spojeve (ROS), prvenstveno slobodne radikale koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju. Najvažniji produkt lipidne peroksidacije je 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) koji je zbog biomedicinskih učinaka poznat i kao „drugi glasnik slobodnih radikala“. U visokim koncentracijama HNE je citotoksičan i mutagen, suprimira sintezu p53 i stoga je potencijalni biljeg za karcinogenezu u mnogim tumorima. Točna uloga oksidacijskog stresa u etiologiji pločastog karcinoma orofarinksa još nije razjašnjena. Prema dostupnoj literaturi ovo je prvo istraživanje koje istražuje povezanost oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije, tj. produkta lipidne peroksidacije HNE-a u pločastom karcinomu orofarinksa.

Provedeno je istraživanje imunohistokemijske nazočnosti protutijela specifičnog za HNE-histidinski epitop na HNE proteinskim konjugatima i protutijela na p53 na pločastom karcinomu orofarinksa.

U ovom istraživanom uzorku dobna i spolna raspodjela odgovara podacima iz literature (15) te se uglavnom radilo o starijim muškarcima u dobi od 51 do 70 godina. Prema podacima o incidenciji u Hrvatskoj i u svijetu prema podsijelu karcinoma orofarinksa očekivana raspodjela bi bila da ih je najviše u području tonzile, zatim u bazi jezika te stražnjoj faringealnoj stijenci i mekom nepcu. Međutim u ovom istraživanju polovina ih je bila u području baze jezika (50%), zatim u tonzili (37,2%) te u stražnjoj faringealnoj stijenci (6,8%) i mekom nepcu (5,8%). U drugim istraživanjima, pa i u ovom, karcinomi tonzile i baze jezika čine oko 90% svih pločastih karcinoma orofarinksa (120, 121).

Stadij bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze među najvažnijim je prihvaćenim prognostičkim čimbenicima. Kod bolesnika uključenih u istraživanje velik je udio bolesnika (61,7%) u uznapredovalim stadijima bolesti (stadij III i IV), za razliku od studije provedene u Memorial Sloan-Kettering Cancer Center gdje je značajno niži udio bolesnika u stadijima I i II (28). Otkrivanje bolesti u uznapredovalim stadijima najvećim dijelom je posljedica niskog stupnja educiranosti populacije te nižim socioekonomskim uvjetima života gdje se pušenje i konzumacija alkohola smatraju prihvatljivim navikama. Bolesnici najčešće dolaze na prvi pregled nakon što simptomi postoje nekoliko mjeseci što sve vodi kasnom postavljanju dijagnoze i visokom udjelu bolesnika u uznapredovalim stadijima bolesti.

Drugi prognostički čimbenik je histološki stupanj diferencijacije tumora koji se ne može povezati s vjerojatnošću metastaziranja i ne pokazuje jednoliku raspodjelu prema stadijima bolesti. U ovoj istraživanoj skupini 2/3 su bili umjereno do slabo diferencirani tumori koji češće metastaziraju i otkriju se u uznapredovalim stadijima bolesti.

U ovom istraživanju aktivnost lipidne peroksidacije na temelju nađene prisutnosti HNE-a potvrđena je u tumorskim stanicama gotovo svih analiziranih pločastih karcinoma, u stijenci krvnih žila, stromi i upalnim stanicama većine analiziranih uzoraka. Time se potvrđuje da je OS u pločastom karcinomu orofarinksa povezan s lipidnom peroksidacijom i posljedičnim stvaranjem HNE-a, a zamijećeno je i da je razina HNE imunopozitiviteta veća u tumorskim stanicama nego u okolnom netumorskom epitelu i u kontrolnom uzorku.

Gledajući stupanj diferenciranosti tumora zamijećeno je da razina HNE-a u tumorskim stanicama pada s porastom gradusa. Intenzitet bojanja HNE-a također pada s porastom gradusa tumora pri čemu se statistički značajna razlika uočava uspoređujući graduse 1 i 2 s gradusom 3. Prisutnost HNE-a u epitelu oko tumora se povećava u odnosu na kontrolnu skupinu, pri čemu gradus 3 ima značajno manje izraženu nazočnost HNE-a u citoplazmi nego

gradus 1 i gradus 2. Prisutnost HNE-a nađena je u visokom postotku u citoplazmama tumorskih stanica u svim gradusima tumora kao i u okolnom epitelu uz tumor, dok je prisutnost HNE-a u jezgrama stanica nađena u manjem postotku. U kontrolnoj skupini nađen je pozitivitet HNE-a samo u citoplazmama stanica, dok su jezgre u svim uzorcima bile negativne. Uspoređujući kliničke stadije bolesti pozitivitet HNE je više izražen u citoplazmama nego u jezgrama tumorskih stanica i pada u IV stadiju u odnosu na prva tri stadija, statistički značajno samo za III stadij bolesti. Intenzitet imunoreakcije HNE je u prva tri stadija uglavnom umjeren, u IV stadiju je blag značajnije samo u odnosu na I stadij. U svim stadijima bolesti HNE u epitelu oko tumora je naročito pozitivan u citoplazmama stanica u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka, a ta razlika je posebno izražena između II i IV stadija.

Prisutnost HNE imunopozitiviteta nađena je u upalnim stanicama, posebice makrofazima, u stromi oko tumora, a i u samom tumoru. Primijećeno je da razina HNE-a u stromi pada s gradusom tumora, no sama je stroma u tumoru jače pozitivna nego u kontrolnom, zdravom tkivu. To se može objasniti činjenicom da upalne stanice stvaraju veliku količinu ROS-a i tako potiču lipidnu peroksidaciju. U prilog tome ide nazočnost pozitiviteta na HNE u tumorskoj stromi i upalnim stanicama koja korelira s prisutnošću HNE-a u tumorskim stanicama ovisno o gradusu. Tijekom fagocitoze dolazi do „oksidativne eksplozije“ pri čemu nastaju ROS-evi koji uzrokuju daljnje pojačanje OS i lipidne peroksidacije (122). Povećanje ROS-a je udruženo s poremećenim rastom tumorskih stanica i predstavlja poremećaj homeostaze koja nastaje ili zbog povećanog stvaranja ROS ili zbog smanjena enzima koji odstranjuju ROS-e (75). Potvrđeno je da razine enzima koji odstranjuju ROS kao što su SOD, glutation peroksidaza i peroksiredoksin značajno poremećene u malignim stanicama i tkivu što sve dovodi do poremećene homeostaze i adaptacije na stres u tumorskim stanicama (119). To može dovesti do začaranog kruga gdje reaktivni aldehidi mogu samo djelomično biti odstranjeni iz tkiva i tako uzrokovati smrtna ili karcinogena oštećenja tumorskih stanica što predstavlja mehanizam ubijanja tumorskih stanica. Eventualno, karcinomske stanice mogu sadržavati malu količinu lipida i PUFA-a što će rezultirati smanjenju HNE-a u tkivu. To sve može objasniti smanjenu količinu reaktivnih aldehida u uznapredovalim stadijima u usporedbi s ranijim stadijima bolesti. Ovo istraživanje korelira s istraživanjem provedenim na adenokarcinomima kolona gdje se gledala nazočnost produkta lipidne peroksidacije akroleina u tumorskom i okolnom netumorskom tkivu (104). U tom istraživanju utvrđena je različita prisutnost akroleina u benignim tumorima adenomima i u malignim adenokarcinomima

ovisno o kliničkom stadiju bolesti i histološkom gradusu tumora te je nađena manja nazočnost akroleina u uznapredovalim nego u ranijim stadijima bolesti.

U ovom istraživanju nazočnost HNE-a u epitelu oko tumora je povećana u odnosu na kontrolnu skupinu s obzirom na klinički stadij bolesti i stupanj diferencijacije tumora. Nazočnost HNE-a u citoplazmama stanica oko tumora pada s porastom gradusa tumora te je statistički značajno manje izražena u gradusu III, te u kliničkim stadijima II i IV. Zamijećen je pad intenziteta bojanja citoplazmi stanica oko tumora u gradusu III i kliničkom stadiju IV u odnosu na manje graduse odnosno stadije bolesti. HNE je među reaktivnim aldehidima poznat po svoj toksičnoj ulozi prema proteinima i DNA (51). HNE osim na proteine i utjecaja na signalne putove stanice vezanjem na proteine, može mijenjati putove prijenosa signala u stanici i vezanjem na lipide, te utjecati na promjene lipidnog sastava stanične membrane (123). Stoga nije čudno da je nađena njegova nazočnost u okolnoj sluznici uz tumor. U istraživanju provedenom na adenokarcinomu kolona nađeni su slični rezultati. Imunohistokemijskom analizom HNE je bio nazočan u citoplazmama tumorskih stanica, dok je slabije bio pozitivan u okolnom netumorskom tkivu (115). Poznato je da je karcinom kolona povezan sa stilom života i prehranom. HNE se nalazi u hrani ili njegova proizvodnja u crijevima može biti potaknuta sa prisutnošću nezasićenih masnih kiselina PUFA-a. Stoga prehrana bogata mastima i s niskim sadržajem antioksidansa može biti važan izvor ovog aldehida u netumorskom tkivu debelog crijeva i biti povezana s karcinogenezom kolona (115). Ovim se spoznajama može povezati i utjecaj duhana kao egzogenog izvora ROS-a u karcinogenezi karcinoma glave i vrata (19). U studiji provedenoj 2009 god. Gupta A. i suradnici istražili su povezanost lipidne peroksidacije i antioksidansa u pločastom karcinomu glave i vrata (124). Oni su mjerili razinu MDA i antioksidansa (SOD, tiola i askorbinske kiseline) u plazmi bolesnika s pločastim karcinomom glave i vrata u usporedbi s kontrolnom, zdravom skupinom. U toj studiji nađeno je značajno povećanje razine MDA i smanjene SOD, tiola i askorbinske kiseline u bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike.

U prethodnim istraživanjima nađeno je da sluznica u neposrednoj blizini pločastog karcinoma pokazuje premaligne promjene, vjerojatno uzrokovane istim kancerogenima (27). U ovom istraživanju u nešto manje od polovine uzoraka sluznica uz tumor je bila displastično promijenjena i u svim uzorcima je HNE imunopozitivitet bio nazočan u različitom intenzitetu. Ta spoznaja sugerira važnost OS i lipidne peroksidacije u karcinogenezi pločastog karcinoma i malignoj alteraciji iz prekancerozne lezije u invazivni karcinom.

Brojne studije su potvrdile činjenicu da HNE u različitim vrstama stanica ima utjecaj na poticaj stanične apoptoze, a važan gen koji kontrolira unutrašnje puteve apoptoze je p53. U prognozi tumora glave i vrata, posebice karcinoma orofarinksa, značajno mjesto zauzima i ekspresija p53. Pojačana ekspresija proteina p53 izražena je u više od 50% tumora glave i vrata (31) te ona podrazumijeva nazočnost mutiranog p53 proteina. Mutacija p53 se smatra ranim događajem u karcinogenezi orofarinksa (125). Unatoč spoznajama o lošijem preživljenju bolesnika s pojačanom ekspresijom p53, ne postoji konsenzus o ekspresiji p53 kao prediktivnom biljevu prognoze, ni kao mogućem pokazatelju terapijskog pristupa bolesnicima s tumorima glave i vrata. U ovom istraživanju u gotovo svim uzorcima pločastog karcinoma nazočan je pozitivitet na p53 koji se povećava s gradusom tumora i povećan je u uznapredovalim stadijima bolesti. Okolni epitel uz tumor također pokazuje nazočnost p53 u jezgrama, ali u manjem postotku stanica nego u tumoru. Uglavnom je ekspresija p53 veoma niska u zdravim stanicama i u normalnim okolnostima u njima sprječava propagaciju genetski oštećene stanice (126). U skladu s prethodnim istraživanjima (127) naši rezultati su potvrdili povećanu ekspresiju p53 i njegovu važnost kao biomarkera karcinogena iz okoliša u etiologiji pločastog karcinoma orofarinksa. U ovom istraživanju nazočnost p53 raste s porastom kliničkog stadija i svoj vrhunac postiže u III stadiju bolesti dok u IV stadiju postepeno pada. Uspoređujući kliničke stadije bolesti značajno kvantitativno jače u III stadiju nego u I i IV stadiju, a u okolini značajno kvantitativno jače u II stadiju nego u I i IV stadiju. Nazočnost p53 u okolnom epitelu uz tumor svoj vrhunac postiže u II stadiju te postepeno pada u uznapredovalim stadijima bolesti. Tu se nalazi korelacija s nazočnošću HNE-a koji je manje izražen u uznapredovalim nego u ranijim stadijima bolesti i povećan je u okolnom epitelu uz tumor. Ta činjenica je potvrdila prethodno navedenu tvrdnju da se histološki stupanj diferencijacije ne može povezati s TNM klasifikacijom i vjerojatnošću metastaziranja u regionalne limfne čvorove vrata i ne pokazuje jednoliku raspodjelu prema kliničkim stadijima bolesti. Iz toga proizlazi da su nazočnost HNE-a i p53 manje izraženi u uznapredovalim stadijima bolesti. Sluznica u okolini tumora također pokazuje slične promjene koje su izraženije u manjem histološkom gradusu, odnosno stadiju bolesti. Nalaz korelacije HNE i p53 u uznapredovalim stadijima bolesti mogao bi značiti da HNE promovira apoptozu stanica pločastog karcinoma orofarinksa preko p53 signalnog puta. Sukladno tome možemo zaključiti da mogući karcinogeni efekti HNE-a u pločastom karcinomu orofarinksa su udruženi s nazočnošću p53.

Ovo istraživanje je potvrdilo važnost oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije u razvoju ljudskih, zloćudnih epitelnih tumora i imunohistokemijsku nazočnost HNE-a u pločastom karcinomu orofarinksa i okolnom netumorskom tkivu. U istraživanju se također potvrdila važnost HNE-a kao bioaktivnog markera lipidne peroksidacije i tako omogućio novi uvid u molekularne mehanizme karcinogeneze ovih tumora.

6.ZAKLJUČCI

1. HNE imunopozitivitet je zabilježen gotovo u svim tumorskim stanicama analiziranih pločastih karcinoma te u krvnim žilama, stromi i upalnom infiltratu u tumoru.
2. HNE imunopozitivitet ima veću nazočnost u citoplazmi nego u jezgri tumorskih stanica i pločastih epitelnih stanica uz tumor.
3. HNE imunopozitivitet je zabilježen u višeslojnom pločastom epitelu u okolini tumora. HNE imunopozitivitet se u epitelu oko tumora povećava u odnosu na kontrolnu skupinu, pri čemu gradus III ima značajno manje izraženu nazočnost HNE-a u citoplazmi nego gradus I i gradus II.
4. Povećanjem gradusa planocelularnog karcinoma smanjuje se intenzitet nazočnosti HNE u citoplazmi tumorskih stanica, statistički značajno između gradusa 1 i gradusa 2 te između gradusa 2 i gradusa 3.
5. Porastom gradusa planocelularnog karcinoma smanjuje se nazočnost HNE u stromi i/ili upali u tumorskom tkivu, no sama stroma je u tumoru jače pozitivna nego vezivo u normalnom, kontrolnom tkivu.
6. P53 imunopozitivitet je povišen u tumoru i u višeslojnom pločastom epitelu oko tumora, dok je u kontrolnoj skupini gotovo neznatan.
7. Nazočnost p53 u tumoru i u višeslojnom pločastom epitelu oko tumora raste s porastom gradusa tumora, statistički značajno između gradusa 2 i 3.
8. Imunopozitivitet na HNE u tumorskim stanicama pada u IV stadiju tumorske bolesti u odnosu na prva tri stadija, ali statistički značajno samo u odnosu na stadij III bolesti.

9. Imunopozitivitet na HNE u višeslojnom pločastom epitelu uz tumor je povišen u odnosu na kontrolnu skupinu, a razlika imunopozitiviteta je posebno izražena između II i IV stadija tumorske bolesti.

10. Imunopozitivitet p53 je prisutan u tumorskim stanicama u svim stadijima tumorske bolesti, a vrhunac postiže u III stadiju. Imunopozitivitet p53 je također prisutan u okolnom epitelu uz tumor u svim stadijima bolesti dok vrhunac postiže u II stadiju bolesti.

11. Imunohistokemijska koekspresija HNE i p53 povećava se u planocelularnom karcinomu gradusu 1 i 2, dok u gradusu 3 HNE pada, a p53 nastavlja rasti. Nadalje, koekspresija HNE i p53 povećava se u prva tri stadija tumorske bolesti, dok se u IV stadiju smanjuje. Ovaj nalaz ukazuje na njihovu međuovisnost u uznapredovalim stadijima bolesti i mogućnost da oba biljega budu dobri pomoćni dijagnostički i prognostički čimbenici za zloćudni pločasti karcinom.

7. LITERATURA

1. Stambuk HE, Karimi S, Lee N, Patel SG. Oral cavity and oropharynx tumors. *Radiol Clin North Am* 2007; 45(1): 1-20.
2. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(4): 489-501.
3. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260:502-8.
4. Fan CY. Genetic alterations in head and neck cancer: interactions among environmental carcinogens, cell cycle control, and host DNA repair. *Curr Oncol Rep* 2001; 3(1): 66-71.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak. Incidencija raka u Hrvatskoj 2012. Bilten br. 37 Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2012.
6. Papadimitrakopoulou VA. Carcinogenesis of head and neck cancer and the role of chemoprevention in its reversal. *Curr Opin Oncol* 2000;12:240-5.
7. Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2001;23:147-59.
8. Jefferiers S, Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2001;37:115-26.
9. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11: 81-128.
10. Osborne RF, Brown JJ. Carcinoma of the oral pharynx: an analysis of subsite treatment heterogeneity. *Surg Oncol Clin N Am* 2004;13:71-80.
11. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site

12. Lin DT, Cohen SM, Coppit GL, Burkey BB. Squamous cell carcinoma of the oropharynx and hypopharynx. *Otolaryngol Clin North Am* 2005;38(1): 59-74.
13. Rhys Evans PH, Montgomery PQ, Gullane PJ, ur. *Principles and Practice of Head and Neck Oncology*. London: Martin Dunitz; 2003, str.163-334.
14. Dirix P, Nuyts S, Busseis B, Hermans R, Van den Bogaert W. Prognostic influence of retropharyngeal lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65(3):739-44.
15. Barnes L, Eveson J.W, Reichart P, Sidransky D, ur. *World Health Organization Classification of tumors. Pathology and genetics of Head and Neck Tumors*. Lyon: IARC Press; 2005, str.107-208.
16. Fletcher CDM, ur. *Diagnostic Histopathology of tumors*. London: Churchill Livingstone; 2000, str.150-238.
17. Cohan DM, Popat S, Kaplan SE, Rigual N, Loree T, Hicks WL. Oropharyngeal cancer: current understanding and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;17: 88-94.
18. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH i sur. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709-20.
19. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 2007; 12(1):20-37.
20. Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. Risk of head and neck cancer and the alcohol dehydrogenase 3 genotype. *Carcinogenesis* 2001; 22(1):57-61.
21. Obata A, Eura M, Sasaki J, Saya H, Chikamatsu K, Tada M, Iggo RD, Yumoto E. Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Cancer* 2000; 89(2):187-93.

22. Garavello W, Giordano L, Bosetti C, Talamini R, Negri E, Tavani A, Maisonneuve P, Franceschi S, La Vecchia C. Diet diversity and the risk of oral and pharyngeal cancer. *Eur J Nutr* 2008;47(5):280-4.
23. Klussmann JP, Weissenborn S, Fuchs PG. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001;345(5):376; author reply 377.
24. Wenig BM. Atlas of Head and Neck pathology: Oropharyngeal squamous cell carcinoma. Elsevier. 2008; str. 330-332.
25. Girod SC, Kramer C, Knufermann R, Krueger GR. p53 expression in the carcinogenesis in the oral mucosa. *J Cell Biochem* 1994; 56(4):444-8.
26. Farrar M, Sandison A, Peston D, Gailani M. Immunocytochemical analysis of AE1/AE3, CK 14, Ki-67 and p53 expression in benign, premalignant and malignant oral tissue to establish putative markers for progression of oral carcinoma. *Br J Biomed Sci* 2004;61(3): 117-24.
27. Califano J, van der Riet P, Westra W i sur. Genetic progression model for head and neck cancer: implication for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488-92.
28. Rogers SN, Brown JS, Woolgar JA, Lowe D, Magennis P, Shaw RJ, Sutton D, Errington D, Vaughan D. Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral Oncol* 2009;45(3): 201-11.
29. Shah JP, Patel SG, urednici. Head and Neck Surgery and Oncology. Edinburgh: Mosby; 2003, str.173-394.
30. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000; 60(24):6788-93.
31. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N i sur. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2007;357(25):2552-61.

32. Perrone F, Suardi S, Pastore E, Casieri P, Orsenigo M i sur. Molecular and cytogenetic subgroups of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(22):6643-51.
33. Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L i sur. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(36):5630-6.
34. Shinohara S, Kikuchi M, Tona R, Kanazawa Y, Kishimoto I i sur. Prognostic impact of p16 and p53 expression in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 2014;44(3):232-40.
35. Powell E, Piwnica-Worms D, Piwnica-Worms H. Contribution of p53 to metastasis. *Cancer Discov* 2014;4(4):405-14.
36. Barber BR, Biron VL, Klimowicz AC, Puttagunta L i sur. Molecular predictors of locoregional and distant metastases in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;42:53.
37. Sies H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: Sies H, editor. *Oxidative Stress*. London: Academic Press INC. LTD; 1985. p. 1–8.
38. Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*. 4. Izd. New York: Oxford University Press; 2007, str. 5-9.
39. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003;17(10):1195-214.
40. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J i sur. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 1:289-95.
41. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266(1-2):37-56.
42. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1986; 247(1):1-11.

43. Pramod J, Singh S, Singh J. Role of Free Radicals and Antioxidants in Human Health and Disease. *Int J Curr Res Rev* 2013;05:14–22.
44. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):361-70.
45. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411(2-3): 217-30.
46. Cannon RO 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998;44(8 Pt 2):1809-19.
47. Giles TD. Aspects of nitric oxide in health and disease: a focus on hypertension and cardiovascular disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2006;8 (12 Suppl 4):2-16.
48. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1):315-424.
49. Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogenes. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 1999;443:37-52.
50. Halliwell B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Annals Rheumatic Dis* 1995;54:505-510.
51. Halliwell B, Chirco S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993;57:715-25.
52. Svingen BA, O'Neal FO, Aust SD. The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation. *Photochem Photobiol* 1978;28(4-5):803-9.
53. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L i sur. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 2010;44:1098–124.
54. Smith WL, Marnet LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochem Biophys Acta* 1991;1083:1-17.
55. Yamamoto S. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:117-131.

56. Blake D, Winyard PG. Immunopharmacology of free radical species. Academic Press, London 1995:23-37.
57. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984;105:273-82.
58. Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol* 1994;366:43-58.
59. Aikens J, Dix TA. Perohydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 1991;266(23):15091-8.
60. Sies H. Oxidative stress: an introduction in oxidative stress oxidants and antioxidants. Academic Press, London 1991:319-336.
61. Pamplona R. Advanced lipoxidation end-products. *Chem Biol Interact* 2011;192(1-2): 14-20.
62. Schauenstein E, Esterbauer H, Zollner H. Aldehydes in biological systems; their natural occurrence and biological activities. Pion Ltd, London 1977.
63. Schaur RJ, Zollner H, Esterbauer H. Biological effects of aldehydes with particular attention to 4-hydroxynonenal and malonaldehyde. Membrane lipid oxidation. CRC Press Inc, Vol III, Boca Raton, Florida 1991:141-163.
64. Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal and cell signaling. *Free Rad Res* 1997;28:553-559.
65. Žarković N, Ilić Z, Jurin M i sur. Stimulation of HeLa cell growth by physiological concentrations of 4-hydroxynonenal. *Cell Biochem Funct* 1993;11:279-86.
66. Kreuzer T, Zarkovic N, Grube R, Schaur RJ. Inhibition of HeLa cell proliferation by 4-hydroxynonenal is associated with enhanced expression of the c-fos oncogene. *Cancer Biother Radiopharm* 1997;12(2):131-6.
67. Kreuzer T, Grube R, Wutte A, Zarkovic N, Schaur RJ. 4-Hydroxynonenal modifies the effects of serum growth factors on the expression of the c-fos proto-oncogene and the proliferation of HeLa carcinoma cells. *Free Radic Biol Med* 1998;25(1):42-9.

68. Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* 2004;37(7): 937-45.
69. Sultana R, Perluigi M, Allan Butterfield D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biol Med* 2013;62:157–69.
70. Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ* 2013;20:1615–30.
71. Pappa A, Estey T, Manzer R, Brown D, Vasiliou V. Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *Biochem J* 2003;376:615–23.
72. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008;358(5):502-11.
73. Vogelstein B, Kinzler KW. *The genetic basis of human cancer*. 2. izd. New York: McGraw-Hill Professional; 2002.
74. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:239-67.
75. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 1995; 358(1):1-3.
76. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(9):1428-59.
77. Fulton AM, Chong YC. The role of macrophage-derived TNF α in the induction of sublethal tumor cell DNA damage. *Carcinogenesis* 1992;13(1):77-81.
78. Balkwill F. TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(3): 409-16.
79. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004;567(1):1-61.
80. Jackson JH. Potential molecular mechanisms of oxidant-induced carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1994; 102(10):155-7.

81. Brown NS, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001;3(5):323-7.
82. Storz G, Polla BS. Transcriptional regulators of oxidative stress-inducible genes in prokaryotes and eukaryotes. *EXS* 1996; 77:239-54.
83. Vellanoweth RL, Suprakar PC, Roy AK. Transcription factors in development, growth, and aging. *Lab Invest* 1994;70(6):784-99.
84. Kerr LD, Inoue J, Verma IM. Signal transduction: the nuclear target. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4(3):496-501.
85. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996; 98:2572–2579.
86. Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, Quilliam LA. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J Biol Chem* 1997;272:4323–4326.
87. Wang X, Martindale JL, Liu Y, Hollbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 1998;333:291-300.
88. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, Stefanescu M, Matache C. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med* 2007;10:499–510.
89. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000;21:361-70.
90. Peoples MC, Karnes HT. Recent developments in analytical methodology for 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and related compounds. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;827:5-15.

91. Matsui A, Ikeda T, Enomoto K i sur. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett* 2000; 151: 87-95.
92. Okamoto K, Toyokuni S, Uchida K i sur. Formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1994;58:825-9.
93. Oliva MR, Ripoll F, Muniz P i sur. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Mol Carcinog* 1997;18:232-43.
94. Senturker S, Karahalil B, Inal M i sur. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Lett* 1997;416:286-90.
95. Sova H, Jukkola-Vuorinen A, Puistola U, Kauppila S, Karihtala P. 8-Hydroxydeoxyguanosine: a new potential independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 2010;102:1018-23.
96. Jakovčević D. Prognostička vrijednost 8-oksodG u invazivnom karcinomu dojke (NOS). Doktorska disertacija, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, 2013.
97. Matsumoto K, Satoh Y, Sugo H i sur. Immunohistochemical study of the relationship between 8-hydroxy-2-deoxyguanosine levels in noncancerous region and postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma in remnant liver. *Hepatol Res* 2003;25:435-41.
98. Shen J, Deininger P, Hunt JD, Zhao H. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 2007;109:574-80.
99. Barrera G, Pizzimenti S, Dianzani MU. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. *Molecular Aspects of Medicine* 2008; 29:1-8.
100. Manzano RG, Wright KA, Twentyman PR. Modulation by acrolein and chloroacetaldehyde of multidrug resistance mediated by multidrug resistance-associated protein (MRP). *Clin Cancer Res* 1996;2:1321-1326.

101. Uchida K, Kanematsu M, Sakai K, Matsuda T, Hattori N, Mizuno Y, Suzuki D, Miyata T, Noguchi N, Niki E, Osawa T. Protein-bound acrolein: Potential markers for oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4882-4887.
102. Biswal S, Maxwell T, Rangasmy T, Kehrer JP. Modulation of nenzo(a)oreine-induced p53 DNA activity by acrolein. *Carcinogenesis* 2003;24:1401-1406.
103. Tirumali R, Rajesh Kumar T, Mai KH, Biswal S. Acrolein causes transcriptional induction of phase II genes by activation of Nrf2 in human type II epithelial (A549) cells. *Toxicol Lett* 2002;132:27-36.
104. Zarkovic K, Uchida K, Kolenc D, Hlupic Lj, Zarkovic N. Tissue distribution of lipid peroxidation product acrolein in human colon carcinogenesis. *Free Radical Research* 2006;40:543-552.
105. Eckl PM. Genotoxicity of HNE. *Mol Aspects Med* 2003; 24:161–165.
106. Bartsch H, Nair J. Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies. *Mutat Res* 2005; 591:34–44.
107. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991; 350: 427–428.
108. Gago-Dominguez M, Jiang X, Castelao JE. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. *Breast Cancer Res* 2007;9:201.
109. Milkovic L, Siems W, Siems R, Zarkovic N. Oxidative stress and antioxidants in carcinogenesis and integrative therapy of cancer. *Current Pharmaceutical Design* 2014;20:6529-42.
110. Jurić-Sekhar G, Žarković K, Waeg G i sur. Distribution of 4hydroxynonenal-protein conjugates as a marker of lipid peroxidation and parameter of malignancy in astrocytic and ependymal tumors of the brain. *Tumori* 2009;95:762-8.
111. Kolenc D. Imunohistokemijska koekspresija 4-hidroksinonenala i prominina-1 u glijalnim tumorima mozga. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2010.

112. Karihtala P, Koauppila S, Puistola U, Jukkola-Vuorinen A. Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxy-guanosine (8-OhdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. *Histopathology* 2011; 58: 854-62.
113. Kondo S, Toyokuni S, Iwasa Y i sur. Persistent oxidative stress in human colorectal carcinoma, but not in adenoma. *Free Radic Biol Med* 1999;27: 401-10.
114. Biasi F, Tessitore L, Zanetti D i sur. Associated changes of lipid peroxidation and transforming growth factor beta 1 levels in human colon carcinoma during tumor progression. *Gut* 2002;50: 361-7.
115. Pizzimenti S, Toaldo C, Pettazzoni P, Ciamporceto E, Dianziani MU, Barrera G. Lipid Peroxidation in Colorectal Carcinogenesis: Bad and Good News. In: Ettarh R Ed. *Colorectal Cancer Biology- From Genes to Tumor*. In Tech 2012
116. Dianzani MU. Lipid peroxidation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993; 15: 125-47.
117. Tjalkens RB, Cook LW, Petersen DR. Formation and export of the glutathione conjugate of 4-hydroxy-2, 3-E-nonenal (4-HNE) in hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys* 1999; 361(1): 113-9.
118. Young O, Crotty T, O'Connell R i sur. Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head Neck* 2010;32:750-6.
119. Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* 2012;2012:137289.
120. Licitra L, Bernier J, Grandi C, Merlano M, Bruzzi P, Lefebvre JL. Cancer of the oropharynx. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;41:107-22.
121. Dahlstrand HM, Dalianis T. Presence and influence of human papillomaviruses (HPV) in tonsillar cancer. *Adv Cancer Res* 2005;93:59-89.
122. Niviere V, Fontecave M. Biological sources of reduced oxygen species. U:Favier i sur. *Analysis of free radicals in biological systems*. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland 1995:11-19.

123. Guichardant M, Chantegrel B, Deshayes C, Lagarde M. Aldehydes from n-6 fatty acid peroxidation. Effects on aminophospholipids 2002;67:147-9.
124. Gupta A, Bhatt ML, Misra MK. Lipid peroxidation and antioxidant status in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009;2:68-72.
125. Braakhuis Bj, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff. A genetic explanation of Slaughter 's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003; 63:1727-30.
126. Edström S, Cvetkovska E, Westin T, Young C. Overexpression of p53-related proteins predicts rapid growth rate of head and neck cancer. *Laryngoscope.* 2001; 111(1):124-30.
127. Peltonen JK, Helpp HM, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T, Vahakangas KH. p53 in head and neck cancer: functional consequences and environmental implications of TP53 mutations. *Head Neck Oncol* 2010; 2:36.

8. SAŽETAK

Povećana incidencija pločastog karcinoma orofarinksa je udružena s pušenjem, alkoholom i infekcijom s humanim papiloma virusom (HPV). Osim ovih faktora karcinogeneza je također povezana s oksidacijskim stresom i lipidnom peroksidacijom. Najviše istraživani produkt lipidne peroksidacije je 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) koji je zbog biomedicinskih učinaka poznat i kao „drugi glasnik slobodnih radikala“. U visokim koncentracijama, HNE je citotoksičan i mutagen, suprimira sintezu p53 i u nekim studijama može djelovati kao karcinogeni faktor za gliomske tumore, karcinome dojke, debelog crijeva i bubrega. Do sada nije istraživana moguća uloga HNE-a u ljudskom pločastom karcinomu orofarinksa.

Cilj ovog retrospektivnog istraživanja je bio utvrditi imunohistokemijsku nazočnosti HNE-histidinskih konjugata, kao glavnog bioaktivnog produkta lipidne peroksidacije, i tumor supresorskog gena p53 u pločastom karcinomu orofarinksa.

Nazočnost HNE-a i p53 je analizirana koristeći monoklonsko protutijelo na HNE-histidinske konjugate i monoklonsko protutijelo na p53 iz parafinskih blokova od 102 bolesnika s pločastim karcinomom orofarinksa. Imunohistokemijski nalaz HNE i p53 je koreliran s dijagnostičkim/prognostičkim faktorima tumora kao što su gradus, TNM i klinički stadij bolesti.

Nazočnost HNE-a zamijećena je u gotovo svim uzorcima pločastog karcinoma i u okolnom netumorskom tkivu te je njegova ekspresija najizraženija u dobro i umjereno diferenciranim tumorima dok u slabo diferenciranim tumorima smanjuje. Sukladno tome u uznapredovalim stadijima bolesti također pada ekspresija HNE-a kako u tumoru tako i u okolnom tkivu. Nađena je korelacija distribucije HNE-a i p53 u uznapredovalim stadijima bolesti, dok se nazočnost p53 u tumoru i okolnom zdravom epitelu povećava s porastom gradusa tumora.

Ovo istraživanje je potvrdilo važnost oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije te HNE histidinskog konjugata kao njihovog važnog bioaktivnog markera u karcinogenezi pločastog karcinoma orofarinksa i okolnog netumorskog tkiva.

9. SUMMARY

The Appearance of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in squamous cell carcinoma of the oropharynx

The increasing incidence of squamous cell carcinoma of the oropharynx is associated with smoking, alcohol and infection of human papilloma virus (HPV). Beside these factors, carcinogenesis is connected also with oxidative stress and lipid peroxidation. The most intensively studied product of lipid peroxidation is 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), which is considered to be „the second messenger of free radicals“. In high concentrations, HNE is cytotoxic and mutagenic, suppresses the synthesis of p53 and acts as potent carcinogenic factor for gliomas and carcinoma of the breast, colon and kidney. However, possible involvement of HNE in cancer development was not studied so far for human squamous cell carcinoma of the oropharynx.

Therefore, the aim of this retrospective study was to determine the immunohistochemical expression of HNE-histidine conjugates, as major bioactive marker of lipid peroxidation, in respect to the expression of the tumour suppressor p53 in squamous cell carcinoma of the oropharynx.

The expression of HNE and p53 was analysed using monoclonal antibody for the HNE-histidine conjugates and monoclonal antibody for p53 in tissue samples of 102 patients with squamous cell carcinoma. Expression was evaluated in relation to the diagnostic/prognostic factors including the grade of the tumour, TNM and clinical stage of the disease.

The HNE immunopositivity was found positive in almost all tumour samples and in the surrounding non-tumorous tissue. The level of HNE immunopositivity was higher in well and moderately differentiated squamous cell carcinoma, while it was gradually decreasing in poorly differentiated carcinomas and in advanced stages of disease.

The appearance of HNE and p53 distribution were found to be mutually related in advanced stages of disease, since the expression of p53 in tumour cells and in non-malignant squamous epithelium increased with the histological grade of the tumour.

This study confirmed the importance of oxidative stress and lipid peroxidation and HNE-histidine adducts as their valuable bioactive marker of carcinogenesis in squamous cell carcinoma of the oropharynx and in the surrounding non-tumorous tissue.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: **Antonia Jakovčević**

Titula: doktor medicine, specijalist patolog

Adresa: IV Maksimirsko naselje 31

10 000 Zagreb

Telefon: 098/588 551

E- mail: antonia.jakovcevic@gmail.com

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 16.02. 1977. Split

RADNO ISKUSTVO

2008 – danas specijalist patolog, KBC Zagreb, Klinički zavod za patologiju i citologiju,
područje rada: patologija glave i vrata, neuropatologija, oko i mišići

2004 – 2008 specijalizant, KBC Zagreb, Klinički zavod za patologiju i citologiju,
područje rada:specijalizacija iz patološke anatomije

2003 liječnik, Ustanova za hitnu medicinsku pomoć Split,
područje rada: hitna medicina

2002 – 2003 pripravnik-volonter, Dom zdravlja Kaštela, područje rada: opća medicina

OBRAZOVANJE

2014 – danas Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti

01.02 - 31.03. 2013 studijski boravak, dobivena stipendija od EURO-CNS društva na Institutu za Neuropatologiju, Uniklinikum RTWH Aachen, Njemačka

26.02. 2008 položen specijalistički ispit iz patološke anatomije, KBC Zagreb

2004 – 2008 specijalizacija iz patološke anatomije, Klinički bolnički centar Zagreb

23.03. 2003 položen stručni ispit pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravstva RH i stekla stručnu osposobljenost za samostalan rad na poslovima doktora medicine

1995 - 2001 Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

MATERINSKI JEZIK

Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

Engleski jezik

ČLANSTVO

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko društvo za patologiju i sudsku medicinu

RAČUNALNE VJEŠTINE

MS Office

POPIS PUBLIKACIJA

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u WoS časopisima

1. Krušlin B, Muller D, Nola I, Vučić M, Novosel I, **Jakovčević A**, Brozić J, de Syo D, Čupić H, Belicza M: Metastatic Melanoma in biopsy material in the 1995-2000 period. *Acta clin Croat* 2001; 40: 2003-7.
2. Brčić L, **Jakovčević A**, Vuletić Batelja L, Orlić D, Seiwerth S : Pleomorphic liposarcoma of the foot: a case report. *Diagnostic Pathology* 2008; 3:15
3. Bišof V, **Jakovčević A**, Seiwerth S, Rakušić Z, Gašparov S. Prognostic value of ERCC1 in head and neck carcinoma treated with definitive or adjuvant radiotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Feb;139(2):187-94.
4. Jakovcevic D, Dedic-Plavetic N, Vrbanc D, **Jakovcevic A**, Jakic-Razumovic J. Breast cancer molecular subtypes and oxidative DNA damage. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015 Jan 21
5. Rakusic Z, Krpan AM, Polancec DS, **Jakovcevic A**, Bisof V. Sudden bilateral hearing loss in gastric cancer as the only symptom of disease. *Onco Targets Ther*. 2015 Jun 2;8:1285-9.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Kolenc D, **Jakovčević A**, Macan M, Žarković K. The co-expression of 4-hydroxynonenal and prominin-1 in glioblastomas. *Transl. Neurosci*. 2011;2:163–7.
2. Coce N, Pavlisa G, Nankovic S, **Jakovcevic A**, Seronja-Kuhar M. Large hemorrhagic colloid cyst in a 55-year-old male. *Turk Neurosurg*. 2012; 22(6):783-4.
3. Baretić M, Tomić Brzac H, Dobrenić M, **Jakovčević A**. Parathyroid carcinoma in pregnancy. *World J Clin Cases*. 2014 May 16;2(5):151-6.

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

1. **Jakovčević A**, Ćorić M, Novak M, Žarković K. Monozygotic twins and metastasis of neuroblastoma twin-to.twin through foetoplacental circulation. Virchows Archiv. Springer Berlin / Heidelberg 253-253. (poster, sažetak, znanstveni)

Kongresno priopćenje (sažeci) u zbornicima radova

1. Radotić V, Jakovčević D, Ugraković N, **Jakovčević A**, Belicza M: Possible influence of the war aggression on Croatia (1991-1995) on the distribution of skin cancer. 11th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, Zagreb, 2000.(poster, sažetak, znanstveni)
2. **Jakovčević A**, Brčić L, Vuletić-Batelja L, Orlić D, Seiwerth S: Pleomorphic liposarcoma of the foot: a case report. 3. hrvatski kongres patologije I sudske medicine s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija 2005 .(poster, sažetak, znanstveni)
3. **Jakovčević A**, Macan M, Čačić M, Pasini J : Sclerosin Sertoli cell tumor of the testis : a case report. 4. hrvatski kongres patologije I sudske medicine s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek 2008.(poster, sažetak, znanstveni)
4. **Jakovčević A**, Dotlić S, Žarković K, Paladino J : Primary intracranial leiomyosarcoma with rhabdoid features: a case report. 20th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, Zagreb 2008. (poster, sažetak, znanstveni)
5. **Jakovčević A**, Žarković K, Radoš M. Morfološki aspekti fokalne kortikalne displazije i progresivne mioklone epilepsije. II. Hrvatski kongres “Dileme u neurologiji”, Novigrad u Istri, Hrvatska, 03-07. listopada 2010. (predavanje, sažetak, znanstveni)
6. **Jakovčević A**, Žarković K. Morfološki aspekti fokalne kortikalne displazije. IX. Hrvatski simpozij o epilepsiji, Split, Hrvatska, 07-10. studenog 2010. (predavanje, sažetak, znanstveni)
7. **Jakovcevic A**, Hutinec Z, Markov-Glavas D. Alveolar rhabdomyosacroma of the parotid gland: A case report. International Congress on Head and Neck Tumors, Zagreb, Croatia October 20-22, 2011. (poster, sažetak, znanstveni)

8. Markov-Glavas D, Makovac I, **Jakovcevic A**. Acnic cell carcinoma of the parotid gland in a child. International Congress on Head and Neck Tumors, Zagreb, Croatia October 20-22, 2011. (poster, sažetak, znanstveni)
9. **Jakovcevic A**, Kolenc D, Ilic I, Zarkovic K, Djuric S, Vukic M. Follicular lymphoma of the falx cerebri: a case report. 10th European Congress of Neuropathology, Edinburgh, Scotland, 6th-9th June 2012. (poster, sažetak, znanstveni)
10. Zarkovic K, **Jakovcevic A**, Kolenc D, Nemir J, Djuric S, Miklic M. Chordoma of the third ventricle: a case report. 10th European Congress of Neuropathology, Edinburgh, Scotland, 6th-9th June 2012. (poster, sažetak, znanstveni)
11. **Jakovcevic A**, Kolenc D, Žarković K. Važnost patohistološke dijagnostike u bolesnika s epilepsijom. NEUROL.CROAT. Vol.61, Supl.5:15 (sažetak, znanstveni)
12. **Jakovčević A**. The importance of patohistological analysis in patience with epilepsy. 3. Hrvatski kongres“ Dileme u neurologiji“ Šibenik, Hrvatska 17-21. Listopad 2012. (predavanje, sažetak, znanstveni)
13. **Jakovčević A**, Ilić I, Hutinec Z, Ledić-Drvar D, Štulhofer-Buzin D, Biloš J, Bumber B. Obilježja primarnih kožnih melanoma glave iv rata od 1998.godine do 2014. godine. 2. kongres Hrvatskog društva za tumore glave i vrata s međunarodnim sudjelovanjem 23. - 25. listopada 2014. Zadar, Hrvatska (predavanje, sažetak, znanstveni)
14. **Jakovčević**, Vlatko Šulentić , David Ozretić, Andrej Desnica , Kolenc Danijela Primary diffuse leptomeningeal gliomastosi- a case report. 3rd Pannonia congress of Pathology. Bled, Slovenia, 15 to 17 May, 2014. (poster, sažetak, znanstveni)
15. **Jakovcevic A**, Kolenc D, Zarković K, Mrak G, Duric KS Intracranial immature teratoma in an adolescent: a case report. 7th Congress of the Croatian Neurosurgical, November 20-22, 2014, Zagreb, Croatia. (poster, sažetak, znanstveni)
16. **Jakovčević A**, Hutinec Z, Bradamante M, Bubmer B Secondary syphilis- related oral lesion: a case report. 46th Professor Janez Plečnik Memorial Meeting with International Symposium Advances in oral diseases December 3-4, 2015 Ljubljana Slovenia (poster, znanstveni)

Sudjelovanje na tečajevima trajne izobrazbe- pozvani predavač

1. **Jakovčević A**, Jakić Razumović J. Patohistološke osobine Barrettovog jednjaka. Tečaj stalnog usavršavanja Hrvatsko gastroenterološko društvo, Zagreb, Listopad 2011. (predavanje, sažetak, znanstveni)
2. **Jakovčević A**, Žarković K. Uloga patologa u dijagnostici LGMD. Poslijediplomski tečaj I. Kategorije „Novosti u kliničkoj genetici: Molekularna dijagnostika, terapija i prevencija pojasnih mišićnih distrofija (LGMD), Zagreb, 30.11-1.12. 2012 (predavanje, sažetak u zborniku radova)
3. **Jakovčević A**. Uloga patologa u dijagnostici distrofinopatija. Poslijediplomski tečaj I. Kategorije „Novosti u kliničkoj genetici: značenje novih tehnologija u dijagnostici genetskih bolesti“ Zagreb, 13-14.09. 2013 (predavanje, sažetak u zborniku radova)
4. **Jakovčević A**, Žarković K. „ Važnost patohistološke dijagnostike u bolesnika s progresivnom mioklonom epilepsijom“ poslijediplomski tečaj I kategorije Progresivne mioklone epilepsije, Zagreb, 13. 03. 2015. (predavanje, sažetak u zborniku radova)
5. **Jakovčević A**. „ Patohistology of the sinus and skull base tumors“ 17th Croatian International Advanced School, 18-19. 06. 2015. Zagreb, Tečaj I. Kategorije (predavanje)