

**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**



**СТЕВАН П. СТОЈАНОВИЋ**

**ЗНАЧАЈ КВАНТИФИКАЦИЈЕ МАРКЕРА ОНКОГЕНЕЗЕ У ТКИВНИМ  
ИСЕЧЦИМА ОБОЛЕЛИХ ОД ПЛАНОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА  
ЛАРИНКСА И ХРОНИЧНОГ ЛАРИНГИТИСА**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРАЦИЈА**

**КРАГУЈЕВАЦ**

**2013.**

*Пуну захвалност дугујем свом ментору, **Проф. др Браниславу Белићу**, ванредном професору на предмету Оториноларингологија, Медицинског факултета у Приштини, са привременим боравком у Косовској Митровици на несебичној подршци и вредним саветима које ми је пружио у изради докторске тезе.*

*Посебну захвалност у изради ове тезе дугујем:  
**Доц. др Слободанки Митровић, Доц. др Ивану Јовановићу и доц. др Гордани Радосављевић** на великој помоћи у изради практичног дела ове тезе*

***Посвећено Тањи, Луки и Нини** који су највише саосећали са мном протеклих година*

# САДРЖАЈ

УВОД.....	1
1.1. КАРЦИНОГЕНЕЗА.....	1
1.2. КЛИНИЧКЕ И ХИСТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ДИСПЛАЗИЈА И КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА.....	4
1.2.1. Клиничке и хистолошке карактеристике дисплазија ларинкса и њихове поделе..	4
1.2.2. Клиничке и хистолошке карактеристике карцинома ларинкса.....	6
1.2.2.1. Епидемиологија карцинома ларинкса.....	6
1.2.2.2. Етиопатогенеза карцинома ларинкса.....	7
1.2.2.3. Хистопатологија карцинома ларинкса.....	7
1.2.2.4. Клиничка TNM класификација карцинома ларинкса.....	8
1.3. МЕХАНИЗАМ РЕГУЛАЦИЈЕ ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА.....	12
1.3.1. Ћелијски циклус.....	12
1.3.2. Регулација ћелијског циклуса и тумор супресорски гени.....	15
1.3.2.1. Регулација ћелијског циклуса.....	15
1.3.2.2. Тумор супресорски гени и њихова улога у контроли ћелијског циклуса.....	17
1.4. ПОВЕЗАНОСТ АЛТЕРАЦИЈА cyclin D1, FGF3, p16 и p21 СА ДИСПЛАЗИЈАМА И КАРЦИНОМИМА ЛАРИНКСА.....	18
1.4.1. Функције протеина cyclin D1, FGF3, p16 и p21.....	19
1.4.1.1. Функција cyclin D1.....	19
1.4.1.2. Функција FGF3.....	19
1.4.1.3. Функција p16.....	20
1.4.1.4. Функција p21.....	20
1.4.2. Повезаност алтерација cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са дисплазијама и карциномима ларинкса.....	20
1.4.2.1. Алтерација cyclin D1.....	21
1.4.2.2. Алтерација FGF3.....	22
1.4.2.3. Алтерација p16.....	22
1.4.2.4. Алтерација p21.....	24

1.4.3. Значај измењене експресије испитиваних протеина за дисплазије и карциноме ларинкса.....	24
ЦИЉ РАДА.....	25
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	26
3.1. ИСПИТИВАНА ПОПУЛАЦИЈА.....	26
3.2. МЕТОД УЗИМАЊА ТКИВНИХ ИСЕЧАКА ЛАРИНКСА.....	27
3.3. МЕТОДЕ БОЈЕЊА ЛАРИНГЕАЛНИХ УЗОРАКА.....	28
3.4. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКО ИСПИТИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, P16 И P21.....	29
3.5. МИКРОСКОПИЈА.....	31
3.6. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА.....	31
РЕЗУЛТАТИ.....	32
4.1. ИСПИТИВАЊЕ ЗАВИСНОСТИ ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 и p21 КОД НОРМАЛНЕ, ДИСПЛАСТИЧНЕ СЛУЗНИЦЕ И КОД КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА.....	34
4.1.1. Експресија cyclin D1 код нормалне и диспластичне слузнице и код карцинома ларинкса.....	34
4.1.2. Експресија FGF3 код нормалне и диспластичне слузнице и код карцинома ларинкса.....	36
4.1.3. Експресија p16 код нормалне и диспластичне слузнице и код карцинома ларинкса.....	38
4.1.4. Експресија p21 код нормалне и диспластичне слузнице и код карцинома ларинкса.....	40
4.2. ИСТРАЖИВАЊЕ ВЕЗЕ ИНТЕНЗИТЕТА ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 И p21 КОД НОРМАЛНЕ, ДИСПЛАСТИЧНЕ СЛУЗНИЦЕ И КОД КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА.....	42
4.2.1. Интензитети експресије cyclin D1 код нормалне и измењене слузнице ларинкса.....	42
4.2.2. Интензитети експресије FGF3 код нормалне и алтерисане слузнице ларинкса. .	44
4.2.3. Интензитети експресије p16 код нормалне и алтерисане слузнице ларинкса.....	45
4.2.4. Интензитети експресије p21 код нормалне и алтерисане слузнице ларинкса.....	46

4.3. ОДРЕЂИВАЊЕ МОГУЋЕ ПОВЕЗАНОСТИ ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 И p21 У ЦИЉУ ДИФЕРЕНИЈАЦИЈЕ НОРМАЛНЕ СЛУЗНИЦЕ ЛАРИНКСА ОД ЛАРИНГЕАЛНИХ ЛЕЗИЈА.....	47
4.3.1. Експресија маркера cyclin D1 код нормалне слузнице ларинкса са његовом експресијом код заједно диспластичне слузнице ларинкса и карцинома ларинкса.....	47
4.3.2. Експресија FGF3 код нормалне слузнице ларинкса према експресији FGF3 код заједно диспластичне слузнице и карцинома ларинкса.....	48
4.3.3. Експресија p16 код нормалне слузнице ларинкса у односу на његову експресију код заједно диспластичне слузнице и карцинома ларинкса.....	48
4.3.4. Експресија p21 код нормалне слузнице ларинкса у односу на његову експресију код заједно диспластичне слузнице и карцинома ларинкса.....	49
4.4. АНАЛИЗА ПОВЕЗАНОСТИ ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 И p21 СА КЛИНИЧКИМ И ХИСТОЛОШКИМ ПАРАМЕТРИМА ЛАРИНГЕАЛНИХ ЛЕЗИЈА....	50
4.4.1. Зависност експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 од клиничких карактеристика лезија ларинкса.....	50
4.4.2. Зависност експресије cyclin D1, FGF3, p16, p21 од хистолошких карактеристика лезија ларинкса.....	53
4.5. ИСТРАЖИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ИНТЕНЗИТЕТА ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 И p21 СА КЛИНИЧКИМ И ХИСТОЛОШКИМ ПАРАМЕТРИМА ЛАРИНГЕАЛНОГ КАРЦИНОМА.....	56
4.5.1. Зависност интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 од клиничких карактеристика карцинома ларинкса.....	56
4.5.2. Одређивање повезаности интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са хистолошким карактеристикама карцинома ларинкса.....	64
4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 И p21 СА СТЕПЕНОМ ДИСПЛАЗИЈЕ ХРОНИЧНОГ ЛАРИНГИТИСА.....	73
4.7. ОДРЕЂИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ИНТЕНЗИТЕТА ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 И p21 СА СТЕПЕНОМ ДИСПЛАЗИЈЕ ХРОНИЧНОГ ЛАРИНГИТИСА.....	74
4.8. ИСПИТИВАЊЕ СЕНЗИТИВНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ПОЈЕДИНИХ МАРКЕРА И ЊИХОВИХ КОМБИНАЦИЈА У ЦИЉУ РАЗЛИКОВАЊА КАРЦИНОМА ОД ЗАЈЕДНО ДИСПЛАЗИЈЕ И НОРМАЛНЕ СЛУЗНИЦЕ ЛАРИНКСА.....	76

4.8.1. Анализа интензитета експресија cyclin D1, FGF3, p16 и p21 код заједно дисплазија и нормалне слузнице у односу на карцинома ларинкса.....	76
4.8.2. Испитивање бинарне логистичке регресије интензитета експресије за cyclin D1, FGF3, p16 и p21 и ризика од карцинома ларинкса.....	79
4.8.3. Анализа специфичности и сензитивности експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 код карцинома ларинкса у односу на збирну групу дисплазија и нормалне слузница ларинкса.....	79
4.8.4. Анализа сензитивности и специфичности комбинације cyclin D1+FGF3+p16+p21>0 за карцинома ларинкса.....	80
ДИСКУСИЈА.....	82
5.1. Значај квантификације експресије и интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 .....	82
5.2. Повезаност експресије и интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са различитим типовима лезије слузнице ларинкса.....	83
5.3. Повезаност експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 у циљу диференцијације нормалне слузнице ларинкса од ларингеалних лезија.....	89
5.4. Анализа повезаности експресије и интензитета експресије испитиваних онкогена и антионкогена са старошћу, полом, позитивном породичном и личном анамнезом, конзумирањем дувана и алкохола.....	89
5.5. Повезаност експресије и интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са клиничким и хистолошким параметарима истраживања.....	91
5.6. Експресије cyclin D1 и p16 1+, 2+ и 3+ добро диферентују карцинома од нормалне+диспластичне слузнице ларинкса.....	94
5.7. Са повећањем интензитета експресије cyclin D1 и FGF3 расте и „шанса“ за присуство карциномских ћелија у исечцима.....	94
5.8. Висока сензитивност и специфичност интензитета експресије cyclin D1 за ћелије карцинома за разлику од нормалне и диспластичне слузнице.....	95
5.9. Висока сензитивност и специфичност cyclin D1+FGF3+p16+p21>0 за карцинома ларинкса.....	95
5.10. Комбинација cyclin D1>0 и FGF3+p16+p21>5 повећава шансу за присуством дисплазије у исечцима слузнице ларинкса.....	96

ЗАКЉУЧЦИ.....	97
ЛИТЕРАТУРА.....	98
3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА.....	130
8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА.....	131
8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS.....	133
8.6 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	135

# УВОД

Предмет овог рада су истраживања функције и значаја квантификације *suclin D1*, *FGF3*, *p16* и *p21* код нормалне и диспластичне слузнице и код карцинома ларинкса. У уводу, а пре описивања добијених резултата и њихове дискусије, изнети су општи аспекти онкогенезе, ћелијског циклуса, испитиваних онкогена и тумора супресорских гена, ларинкса и патологије карцинома и дисплазија ларинкса.

## 1.1. КАРЦИНОГЕНЕЗА

Једна од првих теорија у настанку карцинома је теорија „канцеризације поља“, према *Slaughteri car.* (1). Ова теорија подразумева развој поља са генетски измењеним ћелијама. У почетној фази стем ћелија доживљава генетску промену и формира „закрпу“, односно, клоналну јединицу измењених ћерки ћелија. Ове закрпе се препознају на основу мутација гена *p53* и описане су код карцинома главе и врата. Следећи критичан и логичан корак у епителној карциногензи је измена закрпе у растуће поље. За овај корак потребне су додатне генске алтерације и пролиферишуће поље постепено потискује нормалну мукозу. У мукози главе и врата, као код езофагуса, таква поља су нађена са дијаметром већим од 7 cm. Описана поља обично нису установљена рутинском дијагностиком. Неизоставно клонална различитост доводи до развоја једног или више тумора унутар целовитог поља пренеопластичних ћелија. Значајан клинички утицај у том пољу остаје након хирургије примарног тумора. Он може водити развоју нових канцера, које данашњи клиничари називају „секундарни примарни тумор“ или „локална рекуренција“, у зависности од тачног места и временског интервала (2).

Према данашњем схватању процес канцерогенезе захтева неколико наследних или стечених генских промена у једном ћелијском клону. Ћелијском клону ове промене обезбеђују предност у расту и развоју (3). Протоонкогени као нормални учесници сигналних путева регулишу пролиферацију, а у свом мутираном облику постају



доминантни онкогени доводећи до неопластичног раста (4). Ген чији губитак или инактивација омогућава ћелији да покаже другачији фенотип је тумор супресорски ген. Такав другачији фенотип се одликује губитком регулације неопластичног раста (5). Иницијалне мутације специфичних онкогена и инактивације тумор супресорских гена обезбеђују ћелијама већу пролиферативну способност. Свака следећа генска промена може да доведе до настанка генотипа са „напреднијим” фенотипом. Овакве ћелије постају прекурсори клоналне популације, која доминира туморском масом. Свака генска промена „пролази” клонску селекцију. У оквиру туморске масе доминираће клонска популација са наведеним фенотипским предностима у односу на друге клонове (6). Протоонкогени имају кључну улогу у пролиферацији и диференцијацији ћелија. Високо су конзервирани код различитих организама и њихова експресија је прецизно регулисана. Продукти протоонкогена су сви типови молекула који су укључени у процесе сигналне трансдукције. Њиховом активацијом долази до: 1) повећања количине и активности фактора раста, 2) повећања броја рецептора за факторе раста, 3) повећања броја адаптивних протеина сигналних путева и 4) повећаног стварање транскрипционих фактора (7). Мутације гена доводе до губитка протеинске функције, што може водити убрзању ћелијског циклуса и могућем развоју рака.

Један од узрока пролиферације ћелија је хиперактивност протоонкогена. Поремећаје у њиховој експресији узрокују неки од следећих механизма: амплификација ДНК, тачкасте мутације, реципрочне транслокације (прекид два хромозома и реципрочна размена генетског материјала), делеције, дупликације, инверзије и инсерција вирусне ДНК или РНК у геном ћелије. Неадекватна експресија ових протеина може довести до развоја малигнитета. Разликују се од нормалних протеина у неадекватној експресији током ћелијског циклуса или у експресији у неадекватном ткиву (8,9).

Друга врста гена, тумор супресорски гени, доприноси канцерогенези губитком своје функције. Тумор супресорски гени, ретинобластом ген (Rb) и ген p53, заустављају ћелијску пролиферацију и функционишу преко другачијег пута. Они регулишу пролиферацију ћелија својим инхибиторним деловањем на деобу.

Функције тумор супресор гена су: а) репресија гена који су неопходни за наставак ћелијског циклуса, а ако нису експримирани долази до застоја у ћелијском циклусу, б) откривање и исправљање ДНК оштећења (док год у ћелији постоје оштећења ДНК, она се

нормално неће делити, а тек када се оштећења отклоне, долази до наставка ћелијског циклуса), в) Иницирање апоптозе тј. програмиране ћелијске смрти, уколико не дође до отклањања оштећења DNK и г) Одржање ћелијске адхезије, блокирање губитка контактне инхибиције, тј. инхибиција настанка метастаза (10).

Тумор супресорски гени губе функцију након мутације. За дисфункцију гена неопходна је мутација или промена у активности оба алела и ова појава је позната под називом „губитак хетерозиготности“. Трансформација нормалног ткива у ткиво инвазивног карцинома је вишестепени процес који траје од 5 до 20 година и на који утичу бројни наследни фактори и соматске генске промене (које се акумулирају).

Један од модела у онкогенези је постојање мутације, тј. инактивација тумор супресор гена. То доводи до убрзаног раста и дељења ћелија. Кратак деобни циклус не дозвољава адекватну репарацију евентуалних оштећења DNK, те настају мутације гена одговорних за исправљање оштећења, као и мутације протоонкогена. Серија деоба ћелија, у којима се мутације и друге хромозомске аберације сустижу у ћеркама ћелијама, доводе до формирања генотипа који индукује испољавање малигног фенотипа. Основне карактеристике малигног фенотипа су: 1) убрзан раст, 2) брза деоба ћелија, 3) аутономија раста, 4) неосетљивост на инхибиторне сигнале, 5) „избегавање“ апоптозе, 6) неограничен репликативни потенцијал, 7) стална ангиогенеза, 8) способност инвазивности и 9) способност метастазирања (11).

Описане молекуларне промене се клинички испољавају у виду дисплазије ларинкса и карцинома ларинкса.

## 1.2. КЛИНИЧКЕ И ХИСТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ДИСПЛАЗИЈА И КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА

### 1.2.1. Клиничке и хистолошке карактеристике дисплазија ларинкса и њихове поделе

Дисплазије се карактеришу:

- 1) Променама у грађи и
- 2) Променама у ћелији.

1) Промене у грађису: а) нерегуларна епителна стратификација, б) губитак поларности базалних ћелија, в) „капљице“ у ћелијској мрежи, г) повећан број митоза, д) митозе у површном ћелијском слоју, њ) дискератоza и е) кератинске перле унутар ћелијске мреже.

2) Промене у ћелији су: а) анизонуклеоза, б) нуклеарни плеоморфизам, в) анизоцитоза, г) ћелијски плеоморфизам, д) повећан однос једра и цитоплазме, њ) атипичне митотске фигуре, е) повећан број и величина нуклеолуса и ж) хиперхроматизам (12).

Најчешћа је подела дисплазије на лаку, средње тешку и тешку (13). Лака дисплазија је поремећај у грађи ограничен на доњу трећину епитела (слој ћелија уз базалну мембрану) са минималном ћелијском атипичношћу. Средње тешка дисплазија је поремећај у грађи који или захвата доњу и средњу трећину епитела до површног слоја ћелија и/или са средње тешком атипичношћу која се шири до средње трећине епитела. Тешка дисплазија захвата више од две трећине епитела и/или показује поремећаје у грађи који су повезани са цитолошком атипичношћу (14).

Blackwell KE и сар. су показали да ларингомикроскопски узети исечци од пацијената са променама у ларинксу показују следећу дистрибуцију патохистолошких налаза: лака дисплазија у 12%, средње тешка дисплазија у 33%, тешка у 44%, док је у 11% био присутан интраепилнителни карцином (15).

Малигна прогресија интраепителних ларингалних лезија дијагностикованих према WHO (Светска Здравствена Организација) условила је следећу класификацију: лака дисплазија прелази у карцином у 0-30% случајева (15–17), средње тешка у 0-44% случајева (16–20), а тешка дисплазија прелази у карцином у 20–57% случајева (16–21).

Фактори који повећавају ризик од малигне прогресије и који се разликују између лаке, средње тешке и тешке дисплазије су: а) ниво матурације, б) полиморфизам ћелија, в) једарна атипичност и хиперхромазија, г) митотска активност, д) стромална инфламација и е) абнормалне митотичке фигуре (19). Дисплазије ларингеалног епитела могу прогредирати у карцином под дејством хроничних иритација, као што су пушење дувана и конзумирање алкохола. Ове хроничне иритације на почетку свог деловања доводе до епителне хиперплазије. Епителна хиперплазија се дефинише као патолошко задебљање површине ларингалног епитела и присутна је код патолошких стања ларинкса, као што су: хронични ларингитис, полипи и нодулуси, Reinke-ови едеми, папиломатозе итд. (17,22). Епителне хиперплазије ларинкса се ларингомикроскопски виде као сивкастобеличаста задебљања слузнице или као едематозна црвенкаста задебљања слузнице. Могу бити присутне код хроничног ларингитиса и класификоване су према Љубљанској класификацији.

Љубљанска класификација дели епителне хиперпластичне лезије ларинкса на: 1) просту хиперплазију, 2) абнормалну хиперплазију, 3) атипичну хиперплазију („ризици“ епител) и 4) карцином *in situ* (23). Gale N. и сар. су известили да је атипична хиперплазија највећим делом присутна код хроничног ларингитиса и папиломатозе, а њена малигна трансформација је нађена у 11,6% случајева (24). Према Helliwell TR. проста и абнормална хиперплазија, имају ниску вероватноћу да прогредирају у карцином и то у 1%, док атипична хиперплазија има вероватноћу да се развије у карцином у 10% случајева (25).

Једна група аутора подржава поделу дисплазија на: дисплазију ниског и дисплазију високог градуса, а друга група узима у обзир присуство орожавања или кератозе епитела (26). У односу на присуство кератозе, дисплазија се дели на: кератозе без дисплазије, које прогредирају у карцином у 1–5% случајева и на кератозе са дисплазијом, које прогредирају у карцином у 11–18% случајева (27). Gallo и сар. све кератозе деле на четири групе: 1) кератозе без дисплазије, 2) кератозе са дисплазијом лаког степена (или ларингална интраепителна лезија тип један –LIN1), 3) кератозе са дисплазијом средњег

степен (или ларингална интраепителна лезија тип два –LIN2) и 4) кератозе са дисплазијом тешког степена (или ларингална интраепителна лезија тип три –LIN3) (28).

Кератозе које укључују и слику дисплазије представљају појам преканцерозних стања. Преканцерозна стања су генерализована клиничка стања са значајно повишеним ризиком за сквамозелуларни карцином. У разликовању преканцерозних стања од друге патологије неопходно је присуство епителне атрофије, повећане митотске активности и оштећених механизма репарације епитела (29). Licitra L. и сар. су класификовали преканцерозна стања на основу присутне хиперплазије и присуства или одсуства кератозе и дисплазије на: 1. хиперплазија сквамозних ћелија са кератозом или без кератозе - без дисплазије и 2. хиперплазија сквамозних ћелија са кератозом или без кератозе - са дисплазијом (30).

## **1.2.2. Клиничке и хистолошке карактеристике карцинома ларинкса**

### **1.2.2.1. Епидемиологија карцинома ларинкса**

Сквамоцелуларни карциноми чине 95% свих малигнух тумора ларинкса. Обухватају 2% свих малигнома људског организма и по учесталости су одмах иза малигнух тумора плућа (31). Сваке године, открије се приближно 11000 нових случајева ларингеалног карцинома у Сједињеним Америчким Државама (1% од новодијагностикованих канцера) а око 1/3 дијагностикованих пацијената умире од ове болести (32). У Европи је инциденца око 52000 нових случајева годишње, од чега су 90% мушкарци. Годишња стопа инциденце за мушкарце у јужној Европи је 18 на 100000, а за оне у северној Европи је 6 на 100000. За жене стопа инциденце није већа од 1,5 на 100000 годишње (33). Постоје географске разлике и у топографској дистрибуцији, тако да су у Француској, Шпанији, Италији, Финској и Холандији учесталији супраглотисни, за разлику од Сједињених Америчких Држава, Канаде, Енглеске и Шведске, где је учесталији глотисни карцином, док је у Јапану учесталост ове две локализације подједнака (34).

### **1.2.2.2. Етиопатогенеза карцинома ларинкса**

Настанак карцинома ларинкса може бити изазван дејством различитих ендогених и егзогених етиолошких фактора, од којих се егзогени могу поделити на физичке и хемијске. До настанка тумора не долази деловањем једног етиолошког фактора, већ је потребно и деловање других механизма. Физички етиолошки фактори обично доводе до инцијације карактерисане променама у генетском материјалу током туморигенезе. Познато је да јонизујуће и ултраљубичасто зрачење могу довести до настанка тумора. Хемијски етиолошки фактори туморигенезе, најчешће испољавају генотоксичан ефекат и то различитим механизмима, у чијој је основи везивање хемијске материје за пуринске или пиримидинске базе DNK на строго специфичним местима, што као крајњи ефекат има соматску мутацију гена. Неки од ових мутираних гена су регулатори ћелијског циклуса. Друга група хемијских канцерогена испољава свој ефекат тек после дутотрајног деловања и у високим концентрацијама. Најчешћи познати хемијски канцерогени су конзумирање дувана и алкохола, а комбиновано конзумирање мултиплицира појединачне ефекте. Постоји разлика у дејству канцерогена с обзиром на анатомске регионе ларинкса. Супраглотис са локализацијом између респираторног и дигестивног тракта изложен је дејству и алкохола и дуванског дима, док је ендоларинкс, као део респираторних путева, изложен дејству само дуванског дима (22).

### **1.2.2.3. Хистопатологија карцинома ларинкса**

Макроскопски, сквамозелуларни карциноми ларинкса се деле на:

1) Пролиферативни–вегетантни (егзофитични) облик, који се одликује папиларним брадавичастим или квргастим творевинама, величине од неколико mm, до величине која испуњава цео ларинкс, сивобеличасте боје.

2) Инфилтративни–интерстицијални облик, који се обично шири ка месту где је слузокожа дебела, па слузница изнад тумора може бити дуго времена без промена и улцерација и

3) Улцерозни облик који настаје улцерисањем једног од претходних облика, па може бити улцеро– пролиферативни или улцеро – инфилтративни.

У односу на анатомски регион у супраглотису су заступљена сва три облика, али је учесталији инфилтративни од вегетантног облика. Глотис је захваћен најчешће вегетантним обликом, док је субглотис углавном захваћен инфилтративним обликом.

Микроскопске форме карцинома ларинкса су: 1) Верукозни карцином, 2) Базалоидни сквамoцелуларни карцином, 3) Папиларни сквамoцелуларни карцином, 4) Карцином вретенастих ћелија, 5) Акантолитични сквамoцелуларни карцином и 6) Аденосквамозни карцином (34).

Градирање тумора заснива се на степену диференцијације туморских ћелија и броја митоза унутар тумора, тако да се карциноми хистолошки класификују на градусе: I, II и III. Величина примарне лезије, степен инвазије и раширеност у регионалне лимфне чворове и постојање или одсуство хематогених метастаза, одређују стадијум карцинома. Пораст градуса и стадијума карцинома означавају узрапредовалу малигну болест и лошију прогнозу, а често и већи обим хируршке ресекције.

#### **1.2.2.4. Клиничка TNM класификација карцинома ларинкса**

За одређивање стадијума малигне болести се користи TNM систем класификације. TNM класификација (Т–примарни тумор, N–регионалне метастазе, нодус, M–удаљене метастазе) за ларинкс изгледа овако (35):

Т представља примарни тумор, без обзира на захваћеност једног или више региона (супраглотис, глотис и субглотис) у ларинксу:

- Тх: примарни тумор не може бити процењен.
- Т0: нема доказа о примарном тумору.
- Тis: интраепителни карцином.

За *примарни тумор супраглотиса* са захватањем једног или више његових субрегиона: ларингеалне површине епиглотиса, ариепиглотисних набора, аритеноидних набора, вентрикуларних набора и Морганијевих рецесуса, Т класификација је следећа:

- T1: Тумор ограничен на један субрегион супраглотиса, са нормалном покретљивошћу гласница.
- T2: Тумор захвата мукозу два или више припадајућа субрегиона супраглотиса или глотиса или региона ван супраглотиса (мукозу базе језика, валекуле, медијалног зида пириформног синуса) без фиксације ларинкса.
- T3: Тумор ограничен на ларинкс са фиксацијом гласница и/или захвата нешто од следећих структура: посткрикоидни предео, преепиглотисно ткиво.
- T4: Тумор се шири кроз тиреоидну хрскавицу и/или захвата мека ткива врата, тиреоидну жлезду и/или једњак.

За *примарни тумор глотиса* са захватањем једног или више његових субрегиона: гласница/ -е, предње и задње комисуре, T класификација је следећа :

- T1: Тумор ограничен на гласницу/ -е (може захватати предњу или задњу комисуру) са нормалном мобилношћу.
- T1a: Тумор ограничен на једну гласницу.
- T1б: Тумор захвата обе гласнице.
- T2: Тумор се шири на супраглотис, и/или субглотис, и/или са ослабљеном покретљивошћу гласнице.
- T3: Тумор ограничен на ларинкс са фиксацијом гласнице.
- T4: Тумор се шири кроз тиреоидну хрскавицу и/или друга ткива испод ларинкса (трахеју, мека ткива врата, укључујући тиреоидну жлезду и фаринкс).

За *примарни тумор субглотиса* (тумор који захвата слузницу која облаже предео унутрашње стране крикоидне хрскавице), T класификација је следећа:

- T1: Тумор ограничен на субглотис.
- T2: Тумор се шири до гласнице/ -а са нормалном или ослабљеном покретљивошћу.
- T3: Тумор ограничен на ларинкс са фиксацијом гласнице.



- T4: Тумор се шири кроз крикоидну или тиреоидну хрскавицу и/или захвата друга ткива испод ларинкса (трахеју, мека ткива врата, укључујући тиреоидну жлезду и једњак).

N представља захваћеност лимфних чворова са једне или са обе стране врата и представља регионално ширење карцинома ларинкса:

- NX: Регионални лимфни чворови се не могу проценити.
- N0: Нема метастаза у регионалним лимфним чворовима.
- N1: Метастаза у једном истостраном лимфном чвору, 3cm или мање у највећем промеру.
- N2: Метастаза у једном истостраном лимфном чвору, више од 3cm, али мање од 6cm у највећем промеру или у више истостраних лимфних чворова, ниједан већи од 6cm у највећем промеру или у билатералним или контралатералним лимфним чворовима, ниједан већи од 6cm у највећем промеру.
- N2a: Метастаза у једном истостраном лимфном чвору већем од 3cm, али мањем од 6 cm у највећем промеру.
- N2b: Метастаза у више истостраних лимфних чворова, ниједан већи од 6cm у највећем дијаметру.
- N2c: Метастазе у билатералним или контралатералним лимфним чворовима, ниједан већи од 6cm у највећем дијаметру.
- N3: Метастаза у лимфном чвору већем од 6cm у највећем дијаметру.

Иако се доста ретко јављају, удаљене метастазе представљају ширење карцинома ларинкса у удаљене органе и то најчешће на: плућа, јетру, мозак, простату и бубреге (M):

- MX: Удаљене метастазе не могу бити процењене.
- M0: Нема удаљених метастаза.
- M1: Удаљена метастаза.

У клиничкој процени се користи и клинички стадијум малигне болести, који је настао комбинацијом појединих T, N и M, познат под називом AJCC (American Joint Cancer Commity):

- Стадијум 0: Tis, N0, M0
- Стадијум I: T1, N0, M0

- Стадијум II: T2, N0, M0
- Стадијум III: T3, N0, M0 или  
T1, N1, M0 или  
T2, N1, M0 или  
T3, N1, M0
- Стадијум IVA: T4, N0, M0 или  
T4, N1, M0 или  
сваки T, N2, M0
- Стадијум IVB: сваки T, N3, M0
- Стадијум IVC: сваки T, сваки N, M1.

Ипак, ова класификација има недостатак, пошто пацијенти са истим TNM стадијумом немају исти клинички исход лечења, односно, постоје озбиљне прогностичке варијације између сваког TNM стадијума (36). Виши клинички стадијум регионалне проширености карцинома ларинкса повећава ризик од удаљених метастаза истог (37). Истраживање молекуларних промена у развоју рака главе и врата предузето је на свим нивоима молекуларне онкологије (38,39,44). Специфичне туморске карактеристике могу помоћи у избору оптималног лечења за појединачни тумор (40).

Прогноза и лечење карцинома ларинкса се данас заснивају на морфолошкој анализи туморског ширења, на разликовању градуса и типа микроскопске инвазије (41). Неопходно је да се у нови клиничко молекуларни приступ ларингеалном канцеру интегришу: имунохистохемијско одређивање експресије онкопротеина и тумор супресорских протеина, изучавање фактора ризика, одређивање TNM стадијума и хистопатолошко градирање (42,43).

## 1.3. МЕХАНИЗАМ РЕГУЛАЦИЈЕ ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

### 1.3.1. Ћелијски циклус

Тачно утврђени редослед догађаја током којих долази до дуплирања ћелијског садржаја, након којих се ћелија подели на две ћерке ћелије, назива се ћелијски циклус и временски обухвата период између две ћелијске деобе (45). Током ћелијског циклуса, ћерке ћелије добијају подједнаку количину DNK и приближно подједнаку количину цитоплазме са својим органелама. Howard и Pelc су поделили ћелијски циклус на 4 стадијума: M, G1, S и G2.

M стадијум обухвата два главна процеса: једарну деобу или *митозу*, када се дуплирани хромозоми раздвајају на пар ћерки једара и цитоплазматску деобу или *цитокинезу*, када се цитоплазма са органелама дели на две ћерке ћелије. Овај стадијум је подељен на четири фазе: профазу, метафазу, анафазу и телофазу. M стадијум је знатно краћи од S стадијума и обично траје 1 до 2 часа (46).

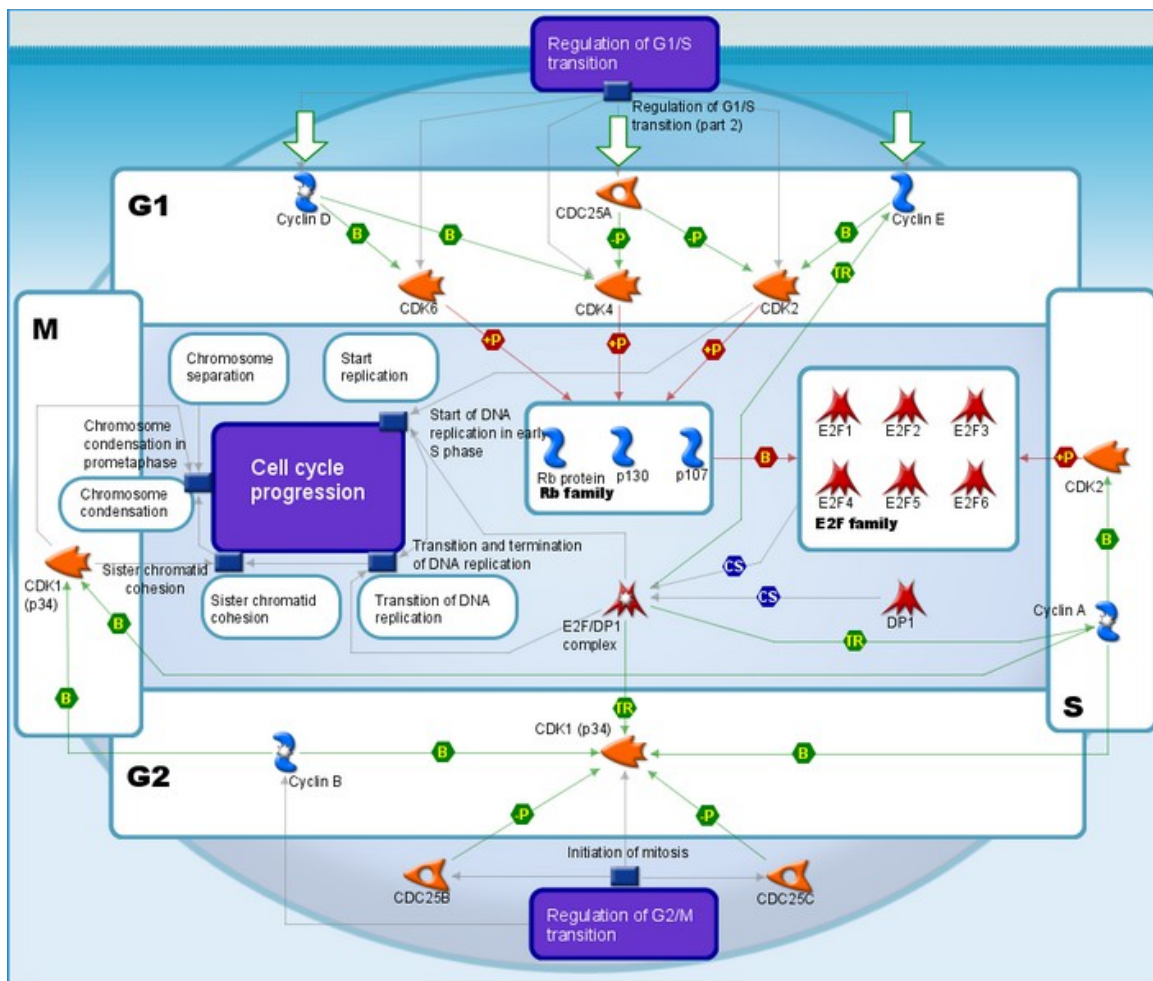
Контрола митозе се одиграва преко два контролна механизма: 1) Механизмом анеуплоидије и 2) Помоћу комплекса APC (anaphase promoting complex), који има улогу да покреће синтезу циклина G1 за следећи ћелијски циклус и да разграђује протеин геминин, који не дозвољава поновну репликацију већ репликоване DNK, све док се не заврши митоза (47).

Период између два M стадијума је интерфаза, током које се увећава ћелијска маса и ћелија се припрема за деобу. Састоји се од три преостала стадијума: G1, G2 и S. Стадијум G1 (G: енгл. gap– пукотина) се састоји од припреме ћелије за репликацију и одвија се од краја M фазе до почетка нове репликације DNK. Током M стадијума ћелија је у стању мировања, када одржава своје виталне функције на нижем нивоу.

Веома битну улогу у регулацији ћелијског циклуса имају циклини (cyclins). Подељени су на неколико класа: A, B, D и E. Циклини се везују у комплексе са cdk (cyclin dependent kinases–циклин зависне киназе), који представљају каталитичку субјединицу

циклина (48, 49). Комплекси: cyclinD/cdk4,6 и cyclinE/cdk2 имају регулаторну улогу у G1/S фази, а комплекси: cyclinA/cdk2, cyclinA/cdk1, cyclinB/cdk1 у регулацији G1/M фазе ћелијског циклуса (50, 51). Важан биохемијски процес, који се дешава у R тачки (restriction point – тачка рестрикције) G1 фазе, јесте хиперфосфорилација гена Rb (Retinoblastoma – ретинобластома). Транскрипциони фактор E2F-1 (E2 Transcription Factor 1–E2 фактор транскрипције 1) један је од двадесет ћелијских протеина који интерагују са геном Rb. Када се E2F веже за Rb, блокира његову транскрипциону улогу у кодирању за DNK синтезу (нпр. ензима дихидрофолат–редуктаза). Хиперфосфорилација Rb коју врши комплекс cyclinD/cdk4,6 узрокује раскидање везе E2F1– Rb, ослобађа се фактор транскрипције и ћелија улази у G1 и S фазу.

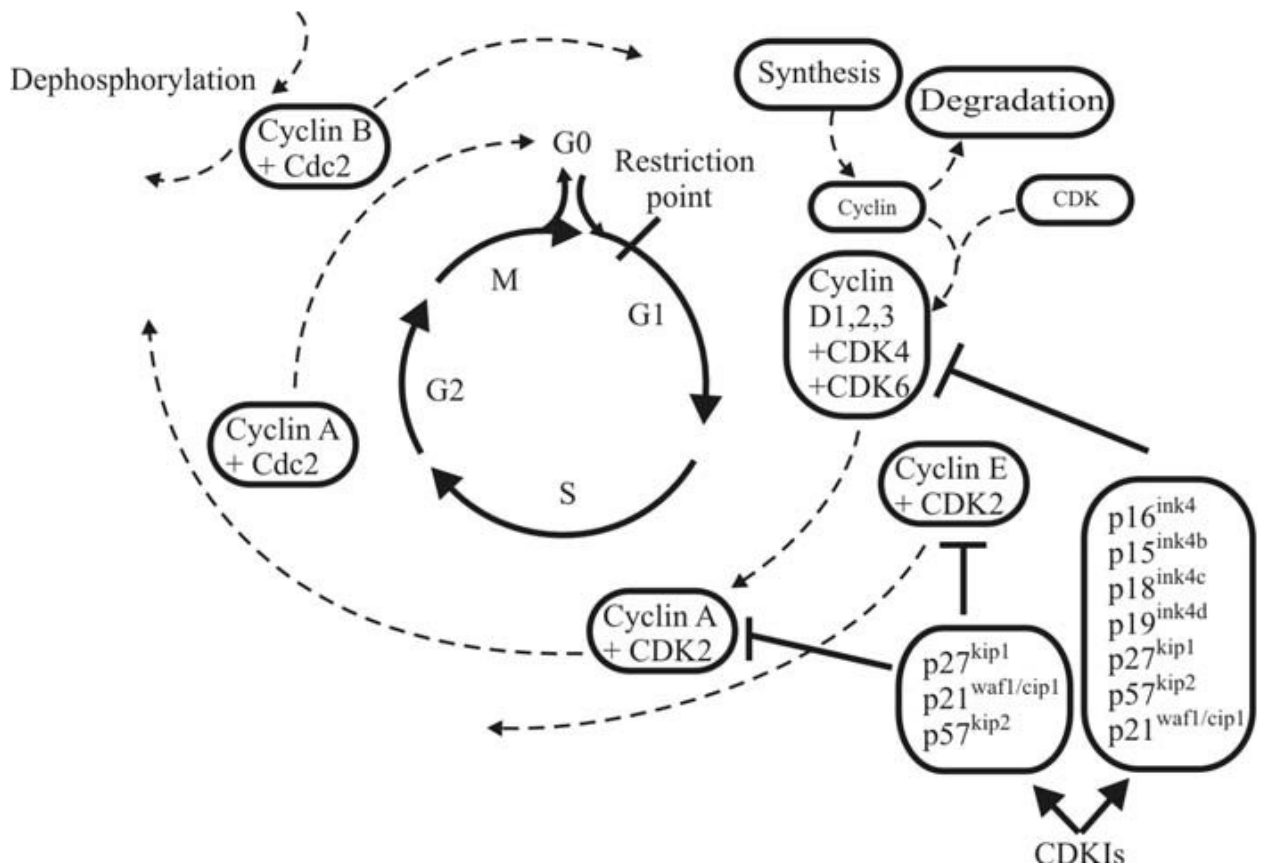
У сложенем систему регулације ћелијског циклуса поменута хиперфосфорилација је само једна од улога cyclin/cdk. Активност комплекса cyclin/cdk може бити инхибирана са cdk<sub>i</sub> (cyclin dependent kinasa inhibitors –инхибитори циклин зависних киназа) (52–56). Ови инхибитори су подељени на две групе: WAF1 (wild type activating fragment 1–дивљи тип фрагмента активације 1) и INK4 (inhibitor of cyclin-dependent kinase 4 – инхибитор циклин зависне киназе 4). Онкогени као што је нпр. Мус (myelocytomatosis viral oncogene homolog – хомолог мијелоцитоматозног вирусног онкогена) блокирају cdk<sub>i</sub>, што доводи до неконтролисаног раста и пролиферације канцерских ћелија (Слика 1) (57–62).



Слика 1. Регулација ћелијског циклуса.

У току S стадијума настаје репликација ДНК, што временски представља најдужу фазу ћелијског циклуса у трајању од 10 до 12 сати од 24-часовног трајања ћелијског циклуса (63). RNK има функцију као „окидач“ индукције неопходних гена за индукцију ДНК синтезе. RNK прајмер је део RNK, који се синтетише под дејством ензима RNK–примазе (64,65).

ДНК не може бити поново репликована све док М стадијум није потпуно завршен. G2 стадијум се одвија између краја S и почетка М фазе (Слика 2). Током овог стадијума ћелија врши припрему за митозу која је инхибирана, све док не буду завршене све неопходне припреме за њено несметано одвијање. Међутим, вредности концентрација cyclin D1, p16 и p21 су зависне и од регулације ћелијског циклуса.



Слика 2. Ћелијски циклус и његове фазе.

## 1.3.2. Регулација ћелијског циклуса и тумор супресорски гени

### 1.3.2.1. Регулација ћелијског циклуса

У ћелијама сисара контрола ћелијског циклуса активира прогресију ћелијског циклуса преко три главна регулаторна прелаза или контролне тачке. Прва контролна тачка је Start (или рестрикциона тачка) у касној G1 фази, када ћелија даје упутства за улазак у ћелијски циклус и за дупликацију хромозома (66). Друга је G2/M контролна тачка, на којој контролни систем активира рани митотски догађај који доводи до поравнавања хромозома на деобном вретену у метафази (67). Трећи је прелазак из метафазе у анафазу, у којој контролни систем стимулише одвајање сестринских хроматида доводећи до завршетка

митозе и цитокинезе. Контролни систем онемогућава прогресију кроз сваку од ових контролних тачака, ако детектује проблеме унутар или ван ћелије.

Најбоље је проучен ефекат комплекса G1-cdk на транскрипционим факторима E2F породице (E2 promoter binding factor). У склопу регулације ћелијског циклуса E2F активирају експресију cyclin A, cyclin E и cdk2. Ови протеини су делови комплекса S-cdk, неопходних за пролазак кроз S фазу. Активност E2F је посебно регулисана преко интеракције са pRb. Када се pRb веже за E2F он не може даље функционисати као транскрипциони фактор и зато се разлаже у цитосолу. Интеракција pRb и E2F је повезана са стањем фосфорилације pRb и сличност између ова два протеина је највећа када је хипофосфорилисан pRb. Фосфорилација pRb је највећа на почетку S фазе, а најнижа после митозе и на уласку у G1 фазу (68). Подстицање ћелија у стању мировања митогенима индукује фосфорилацију pRb, док диференцијација, супротно, индукује хипофосфорилацију pRb. Протеин pRb је један од најзначајних супстрата за фосфорилацију cyclin-cdk комплекса током G1 фазе. Када у G1 фази комплекси cyclin-cdk фосфорилишу pRb, они ослобађају E2F омогућавајући му да транскрипционо активира своје циљне гене. Када E2F активира експресију комплекса протеина S-cdk, ови комплекси такође фосфорилишу pRb, што одржава ћелију у стању мировања.

Протеин p53 је активан као фактор хомотетрамерне транскрипције. Једна од главних функција протеина p53 је да служи као компонента тачке провере, која контролише да ли ће или не, ћелије ући и напредовати кроз S фазу. Као одговор на оштећење DNK, индукује се дејство p53. Под нормалним околностима, нивои p53 остају врло ниски. У реакцији на DNK оштећење, ћелије активирају неколико ензима киназа, чији је један од супстрата и p53 (69–71). Један од супстрата p53 је ген инхибитор циклина p21Cip1. Активација p21Cip1 доводи до повећања инхибиције комплекса cyclin D1-cdk4 и cyclin E-cdk2 због чега се зауставља напредовање кроз ћелијски циклус или пре уласка у S фазу или током S фазе. Као последица p21 експресије, индукује се синтеза p53 и постоји сабирање функција p53 и pRb у регулацији комплекса cyclin-cdk. Контрола ћелијског циклуса се остварује на нивоу три велике групе гена: протоонкогени, тумор супресор гени и систем гена DNK репарације. Промена у структури и/или функцији ових гена, може довести до малигног процеса, тако да се малигнитет може дефинисати и као болест гена.

### 1.3.2.2. Тумор супресорски гени и њихова улога у контроли ћелијског циклуса

Тумор супресори онемогућавају способност развитка рака, зато је једна важна функција тумор супресора контрола прогресије ћелије током ћелијског циклуса. Ако би ћелије биле способне да синтетишу оштећену DNK, пре него што је она поправљена или да се поделе када је DNK оштећена, онда би новонастале ћерке ћелије имале оштећења. Резултат би могао бити катастрофалан доводећи до туморогенезе, због тога су две најважније контролне тачке код ћелијског циклуса прелазак из G1 у S фазу и улазак у митозу. Након изолације два супресорска гена pRb и p53, који су кодирани ретинобластома геном, установљена је и њихова контролна функција за способност ћелија да напредују кроз ове две контролне тачке.

Функција pRb је да спречава ћелије да изађу из G1 фазе, а p53 спречава да ћелије пређу из S фазе у M фазу. Другу групу супресорских гена представљају инхибитори циклин зависних киназа cdk<sub>i</sub>, који су негативни регулатори ћелијског циклуса, за разлику од циклина и циклин зависних киназа, који су позитивни регулатори ћелијског циклуса (72-75). Cdk<sub>i</sub> се састоје од две структурно различите фамилије и то: INK4 (инхибитори cdk4) и Cip/Kip (cdk интерагујући протеин/протеин инхибитор киназе) протеина (76). INK4 фамилија протеина садржи p14, p15 (INK4B), p16 (INK4A), p18 (INK4C), и p19 (INK4D), који специфично инхибирају комплексе cyclin D/CDK4 и cyclin D/CDK6 и учествују у контроли G1 фазе ћелијског циклуса. Cip/Kip фамилија садржи протеине p21 (Cip1/WAF1/SDI1), p27 (Kip1) и p57 (Kip2). То су региони који су одговорни за везивање циклина и инхибиторну функцију киназе (74-77). Фамилија Cip/Kip показује ширу специфичност него INK4 фамилија, зато што њени чланови инхибирајући киназну активност, реагују са cyclin E/Cdk2, cyclin D/Cdk4, cyclin D/Cdk6, cyclin A/Cdk2, и cyclin B/CDC2 комплексима и такође делују током целог ћелијског циклуса (74). Чланови cdk<sub>i</sub> фамилије инхибирају активност cdk различитим механизмима.

Чланови фамилије Cip/Kip везивањем за комплекс cyclin/cdk доводе до инхибиције активности овог комплекса. Другачије од претходног, чланови фамилије INK4 блокирају циклин индиректним везивањем за комплекс cyclin/cdk, доводећи до алостеричних промена у cdk, што узрокује мењање места везивања циклина за cdk (78). Други начин



деловања фамилије INK4 је измена АТР везујућег места, што доводи до смањења афинитета за АТР (79).

Што се p21 тиче, овај инхибитор циклин зависне киназе постоји и у облику активних и у облику инактивних комплекса са cyclin/cdk. Претпоставља се да конформација везивања p21 за cyclin/cdk комплексом контролише активацију или инхибицију комплекса. Показано је да p21 постоји истовремено у каталитички активном и каталитички неактивном комплексу cyclin/cdk и да, додавање ниских концентрација p21 комплексима cyclin A/cdk2, доводи до прогресивног повећања активности cdk2. Даље је показано да ниске концентрације p21 могу деловати као фактор ограничења за cyclin/cdk, док је потребно везивање више од једног молекула p21 за инхибицију активности cdk2 (80).

Тумор супресорски протеин p53, такође, игра важну улогу у прекидању ћелијског циклуса у G1 и G2 тачкама провере, што последично индукује програмирану ћелијску смрт (81-83). Као одговор на оштећење ДНК p53 може покренути транскрипцију p21, који инхибира активацију различитих cyclin/cdk комплекса у G1 фази (77,82). Антипролиферативни сигнали, као што су: контактна инхибиција, старење, екстрацелуларни антимиогени фактори, контролне тачке ћелијског циклуса и фосфорилација p53 индукују појединачно експресију p27, p16, p15, и p21 (84-86). Функција молекула ћелијског циклуса у регулацији пролиферације је осветљена чињеницом да су код карцинома многи од тих молекула нађени мутирани или дерегулисани. Највећи број хуманих тумора настаје због мутације или делеције једног или више регулаторних гена ћелијског циклуса, посебно оних који контролишу напредовање из G1 у S фазу. На пример, p16 је мутиран у одприлике 1/3 карцинома, а најчешће мутирани ген нађен код карцинома је p53 (8,78,87,88).

#### **1.4. ПОВЕЗАНОСТ АЛТЕРАЦИЈА cyclin D1, FGF3, p16 и p21 СА ДИСПЛАЗИЈАМА И КАРЦИНОМИМА ЛАРИНКСА**

Гени на ампликонима 11q13, 9p21 и 6p21.2 (CCND1, INT2, CDKN2A/MTS1 и CDKN1A) учествују у развоју сквамозелуларног карцинома главе и врата (89). Ови гени

кодирају специфичне протеинске продукте и то: CCND1 ген кодира синтезу cyclin D1, INT2 ген синтезу FGF3, CDKN2A/MTS1 ген синтезу p16 и CDKN1A ген синтезу p21.

### **1.4.1. Функције протеина cyclin D1, FGF3, p16 и p21**

#### **1.4.1.1. Функција cyclin D1**

Функција cyclin D1 је у позитивној регулацији преласка из G1 у S фазу ћелијског циклуса преко активације cdk4/6. Ово последично доводи до инактивације Rb протеина његовом фосфорилацијом. Инактивација Rb протеина подстиче ослобађање везаног E2F омогућавајући напредовање ћелијског циклуса. Протеин cyclin D1 се експримира у једрима ћелија (90–92).

#### **1.4.1.2. Функција FGF3**

FGF3 припада фамилији фибробластних фактора раста (FGFs), коју чине протеини атомске масе од 16 до 18 кДа. Повезани су са функцијом контроле нормалног раста и диференцијације мезенхималног, епителијарног и неуроектодермалног ткива. Чланови фамилије деле 30% до 55% секвенцијалног идентитета и сличне су генетске структуре. Они су способни за индукцију трансформације преко аутокриног механизма, када су презентовани одговарајућем FGF рецептору при ћелијској експресији. Познате су две велике групе FGF. Једна група FGF је експримирана у мозданом ткиву и идентификована је појачавањем активности пролиферације мишићних фибробласта. За време његове основне рН фактор је назван FGF–2 (базни FGF, bFGF). Други тип, такође иницијално изолован из мозданог ткива је FGF–1 (кисели FGF, aFGF). FGF-1 делује на фибробласте, тако што повећава њихову пролиферацију. Неколико фактора удружених са FGF су описани као фактори слични фибробластном фактору раста и названи су FGF' s (fibroblast growth factor homologous factors). Ови фактори обухватају FGF-3 и FGF–23, а од када су FGF фактори показали висок афинитет за хепарин, названи су такође хепарин

везујућим факторима раста или HBFGFs (heparin binding FGF's). Протеин FGF3 се експримира у једру и у цитоплазми ћелија (93).

#### **1.4.1.3. Функција p16**

Протеин p16 је главни фактор у контроли напредовања преласка из G1 у S фазу ћелијског циклуса. Овај протеин се везује за cdk4, што доводи до инхибирања интеракције cdk4 са cyclin D1. Cyclin D1, повезан са cdk4, фосфорилише Rb протеин ослобађајући ћелију од Rb-посредованог прекида ћелијског циклуса. Протеин p16 се експримира у једру и у цитоплазми (94–96).

#### **1.4.1.4. Функција p21**

Протеин p21 (WAF1) припада породици регулатора ћелијског циклуса, који су названи циклин зависни инхибитори киназе (cdk's). Ови циклин зависни инхибитори киназе се везују за комплекс cyclin-cdk и узрокују прекид ћелијског циклуса у G1 фази. Протеин p21 (WAF1) је нисходни регулатор тумор супресорског гена p53, инхибира cdk2 и 4 и инактивира cyclin E-cdk2 и комплексе cyclin D1, D2, D3– cdk4, а експримира се у нуклеусу ћелија (97,86).

### **1.4.2. Повезаност алтерација cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са дисплазијама и карциномима ларинкса**

Дисплазије епитела су утврђене различитим методама и на различитим локализацијама главе и врата. Код дисплазија епитела оралне шупљине методом компаративне генске хибридизације је у 22,45% узорака ткива установљена амплификација хромозомског региона 11q13, а на коме се налази ген који кодира cyclin D1 (98). Примећен је и различит степен губитка хетерозиготности код преканцерозних, диспластичних лезија (9p у 28%, 9q у 10% и 11q у 17%) и карцинома сквамозног епитела и

показано је да постоји разлика у степену експресије у корист сквамозних карцинома (9p у 72%,9q у 35% и 11q у 33%), (99). Преканцерозне лезије ларинкса се детектују аутофлуоресцентном ендоскопијом ларинкса у 94,6%, а метода је прецизнија од клиничког обсервирања са сензитивношћу од 97,3% и специфичношћу од 83,8%(100). Савремене методе у детекцији ових лезија су и компактна ендоскопија и топичка примена 5-аминолевулонске киселине (101). Степен дисплазије ларингеалног епитела значајно је повезан са ризиком за појаву карцинома, али експресија p21 није повезана са прогресијом канцера (102).

Генске промене доводе до инактивације многих тумор супресорских гена и активације протоонкогена, укључујући: p16INK4a, p53, cyclinD1, p14, FHIT, RSBF1, EGFR, Rb и FGF3 (103–106). Статистичке анализе засноване на старосно специфичној инциденци рака главе и врата показале су да се већина ових канцера развија након акумулације 6 до 10 независних генских догађаја (107). Обично се региструје губитак хетерозиготности за 3p, 5q, 8p, 9p, 18q и 21q.

#### **1.4.2.1. Алтерација cyclin D1**

Највише је испитиван cyclin D1, при чему су установљене: транслокације, делеције, инверзије и дупликације (108–118). Повећана генска експресија cyclin D1 је нађена различитим генским методама у 44–50% узорака сквамозног карцинома главе и врата (СКГВ) (119–126). Делеција дугог крака хромозома 11 установљена је у 41–47% испитиваних узорака карцинома главе и врата, а кратког крака истог хромозома у 45–53% узорака и повезана је са метастазама тумора (127–138). Код ових тумора је приказан повећан број генских копија за cyclin D1 и то у 16–83% и FGF3 у 48–52% узорака (139–152). Утврђено је да су пролиферативна активност СКГВ и амплификација у значајној повезаности, али постоји разлика према локализацији, тако да хипофарингеални сквамозног карциноми показују већу учесталост амплификација за FGF3 и cyclin D1 за разлику од ларингеалног карцинома, што потврђује теорију да тумори који потичу из различитих региона главе и врата могу имати различиту биологију (148,152,153). Слично претходном, амплификација је обсервирана код 22–82% пацијената са СКГВ, али

карциноми хипофаринкса, ларинкса и орофаринкса имају већи степен амплификације, него карциноми усне шупљине и епифаринкса (154–163). Leonard JH. и сар. доказали су коамплификацију *cyclin D1/FGF3* код сквамoцелуларног карцинома главе и врата (164). Амплификација *cyclin D1* је значајно повезана са високим цитолошким градусом, дифузним инфилтративним начином раста и хипофаринкском локализацијом, рекуренцијом, метакроним туморима и повећаном ћелијском пролиферацијом (162,166 и 167). Амплификација *cyclin D1* и делеција *p16* коегзистирају у 62% карцинома главе и врата (168). У канцерогенези епитела ларинкса постоји кооперативни ефекат амплификације/повећања ћелијске експресије *cyclin D1* и мутације *p16* (169,170). Компаративном геномском хибридизацијом *cyclin D1* експримиран је у 47% узорака карцинома главе и врата, а *p16* у 44% узорака карцинома ларинкса и у вези је са ниским хистолошким градусом и лошом прогнозом (171,172). *Cyclin D1* је незаобилазан учесник онкогенезе, што је показано на фибробластним ћелијама пацова, али и хуманим ћелијама паратиреоидног аденома и Б ћелијског лимфома, када дерегулација доводи до малигне трансформације (173–176). Повећана ћелијска имунохистохемијска експресија *cyclin D1* установљена је и код хуманог оралног сквамoцелуларног карцинома у 41% испитиваних узорака и карцинома плућа у 60% испитиваних узорака (177,153). Губитак хетерозиготности за ларингеални сквамoцелуларни карцином потврђен је у 31% узорака примарног тумора (178).

#### **1.4.2.2. Алтерација FGF3**

Амплификација *FGF3* гена претходи развоју СКГВ (171). Установљен је губитак хетерозиготности на 9p и 11q и хромозомски додаци на 9q и 11q, док је група аутора установила губитак алела на 11q13 региону у 25–52% (160–173).

#### **1.4.2.3. Алтерација p16**

Мутација *p16* учествује у настанку широког спектра малигнух тумора и то је прво било откривено на ћелијским линијама (144,8,180,181,119,182–196). Ген *p16* (*CDKN2A*) је

означен као један од циљних гена, код кога настају хромозомске аберације у прогресији сквамозелуларног карцинома главе и врата (194,117). Најчешћи тип мутације p16 код ткивних узорак СКГВ је хомозиготна делеција у 20–81%, тачкаста мутација и метилација промоторског региона у 9–63%, која код ћелијских линија и примарних СКГВ тумора износи 33% (198–202,157,203–220,196). У канцеризацији епитела главе и врата губитак хетерозиготности 9p је уобичајен, рани догађај и описан је у 56–82%. Он се јавља у иницијалној фази развоја карцинома и са истом учесталошћу од 72% као и код диспластичних преинвазивних лезија (139,128,215–228). Мао L. и сар. су приметили да је губитак хетерозиготности код карцинома главе и врата за p16 присутан у 81% (229). Губитак хетерозиготности за p16 код карцинома ларинкса је потврђену 45–78%, а у ћелијама са знацима ларингеалне интраепителне лезије тип 3 у 60%, код типа 2 у 50%, код типа 1 и код кератозе без дисплазије у 25%, тако да дисплазија корелира са губитком хетерозиготности на 9p21 у раној ларингеаланој канцерогенези (230–235). Иста генска алтерација p16 оралног сквамозелуларног карцинома примећена је у 53%, за разлику од оралних преканцерозних лезија, где се јавља у 38% (236–238). Развој метастаза је повезан са губитком хетерозиготности, а делеција хромозома 9p13–24 различита је код нодалних метастаза и одговарајућег примарног тумора (239,240,186). T3 и T4 карциноми главе и врата су чешћи код губитка хетерозиготности за 9p (241). Код карцинома главе и врата у 36–55% карцинома је установљена повећана експресија p16, а у T1 и T2 планоцелуларним карциномима ларингофаринкса у 42–62,5% (120,242–246). Вестерн блот методом је установљен недостатак експресије p16 у 65% узорак СКГВ и она је у обрнутој вези са присуством cyclin D1 и Rb протеина (247,248). Постоји и саопштење да имунохистохемија p16 није од помоћи у разликовању диспластичних од нормалних узорак оралне мукозе (249). У 95% узорак СКГВ позитивних на p16 постоји повезаност са присутним хуманим папилома вирусом (250–253). Инактивација индукована хиперметилацијом представља рани догађај у еволуцији прекурсорских лезија у инвазивни карцином, док је рани удружени биомаркер за ларингеалну интраепителну неоплазију cyclin D1 и p16 (100,254,255). GalloO и сар. су подвукли значај имунохистохемијског одређивања p16 код премалигних ларингеалних лезија, у којима је овај тумор супресор ген позитиван у 60% (256).

#### **1.4.2.4. Алтерација p21**

Ген p21 је потврђен за тумор супресорски ген, најпре на ћелијским линијама, као што су имортализовани фибробласти (173,79,97,193,257–261). Генотипизирањем се дошло до закључка да је полиморфизам на p21 гену повезан са ризиком за планоцелуларни карцином главе и врата (262). Код оралне канцерогенезе p21 је имунохистохемијски експримиран у 40–82,4% узорака канцерског ткива и са вишом експресијом у супрабазалном и вишим слојевима мукозе (263,264). Према другим ауторима, премалигне оралне дисплазије (у 53–100%) и орални карциноми (у 63–92%) показују сличну експресију p21 (265,148). Постоји значајна повезаност између појаве карцинома ларинкса и активно пролиферишућих тумора са старијим узрастом и женским полом (264). Експресија p21 код оралног карцинома са метастазама је нађена у 38,5% и већа је него код истог без метастаза, када је p21 експримиран у 21,2% (266). Сквамoцелуларни карцином језика показује јако имунохистохемијско бојење на p21 и то у 56% случајева, а показано је и да удружена негативна експресија p16 и позитивна експресија cyclin D1, предсказује краће преживљавање (267,268). За ларингеални сквамoцелуларни карцином је такође показано да је у тесној вези са измењеним нивоом p21 експресије (269).

#### **1.4.3. Значај измењене експресије испитиваних протеина за дисплазије и карциноме ларинкса**

У досадашњим истраживањима није било свеобухватних испитивања cyclin D1, FGF3, p16 и p21 у односу на: старост оболелих, њихов пол, тип епитела (нормалан, дисплазија, карцином), начин раста карцинома, TNM градус, стадијум малигне болести, хистолошки градус, нуклеарни градус, анатомски регион ларинкса, инвазивност, интраепителни карцином, лимфну, васкуларну и перинеуралну инвазију, некрозу, митотски индекс, стромалну моноклеарну инвазију и дезмоплазију. Актуелна је и повезаност експресије ових маркера са степеном ларингеалне дисплазије, која је један од хистопатолошких синонима за клинички манифестан хронични ларингитис.

## ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је испитивање могуће повезаности клиничких и хистолошких параметара ларингеалних лезија са експресијом и интензитетом експресије тумор маркера:

- 1) cyclinD1,
- 2) FGF3,
- 3) p16 и
- 4) p21.

У складу са основним циљем рада постављени су следећи задаци:

1. Испитивање зависности експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 код нормалне, диспластичне слузнице и код карцинома ларинкса.
2. Истраживање интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 код нормалне, диспластичне слузнице и код карцинома ларинкса.
3. Одређивање могуће повезаности експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 у циљу диференцијације нормалне слузнице ларинкса од ларингеалних лезија.
4. Анализа повезаности експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са клиничким и хистолошким параметрима ларингеалних лезија.
5. Истраживање повезаности интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са клиничким и хистолошким параметрима ларингеалних лезија.
6. Анализа повезаности експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са степеном дисплазије у исечцима ларингеалне слузнице.
7. Анализа повезаности интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са степеном дисплазије у исечцима ларингеалне слузнице.
8. Испитивање сензитивности и специфичности појединачних маркера, као и комбинација маркера у разликовању карцинома ларинкса од дисплазија ларинкса и нормалне слузнице ларинкса.



# МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

## 3.1. ИСПИТИВАНА ПОПУЛАЦИЈА

У овој ретроспективној, клиничко–експерименталној студији коришћени су узорци ларингеалне слузнице узети од 108 пацијената лечених на Клиници за ОРЛ Клиничког центра у Крагујевцу од 2000. до 2005. године. Код свих пацијената су урађени ларингомикроскопски статус и биопсија, а на добијеним исечцима је вршена патохистолошка и имунохистохемијска анализа биоптичког материјала.

На основу микроскопске дијагнозе узорци су подељени на следеће три групе:

1. Контролну групу су чинили узорци нормалне ларингеалне слузнице ( $n=29$ ),
2. Прву експерименталну групу сачињавали су узорци ларингеалне дисплазије ( $n=31$ )
3. Друга експериментална група се састојала од узорака карцинома ларинкса ( $n=48$ ).

Испитивани су односи клиничко –хистолошких параметара и имунохистохемијске експресије маркера. Студија је одобрена од стране Етичког комитета Клиничког центра у Крагујевцу. Сви пацијенти су на пријему од симптома имали промуклост. Дијагноза је заснована на клиничким и патохистолошким критеријумима.

Од клиничких података испитивани су: старост (до 50 година и преко 50 година), пол, малигнитет у породичној и личној анамнези (присутан или није присутан), конзумирање алкохола и дувана (присутно или није присутно), анатомски субрегион ларинкса (супраглотис, глотис и субглотис), начин раста (инфилтративан или вегетантан), клинички TNM стадијум (T1-T4, N0-N3, M0-M1) и клинички стадијум малигне болести (I-IV).

Испитивани патохистолошки подаци су: хистолошки и нуклеарни градус (1–3), интраепителни карцином (присутан или не), инвазивност, васкуларна, лимфна и перинеурална инвазија (присутни или не), некроза (0–3), митотски индекс (1–3), моноклеарна стромална реакција (0–3), дезмоплазија (0–2) и степен дисплазије (лака, средња и тешка). Узорци диспластичне слузнице су даље подељени на: лаку ( $n=9$ ), средње

тешку ( $n=12$ ) и тешку ( $n=10$ ) дисплазију према критеријуму Светске Здравствене Организације (281).

### **3.2. МЕТОД УЗИМАЊА ТКИВНИХ ИСЕЧАКА ЛАРИНКСА**

Индиректна ларингоскопија је метод индиректног прегледа структура хипофаринкса и ларинкса ларингеалним огледалом и осветљењем по Clar-у (282). Ова метода има за циљ инспекцију патолошких промена и грубу оријентацију о врсти патолошких промена. Њена предност над ларингомикроскопским прегледом је што се може утврдити покретљивост половина ларинкса као и покретљивост гласница, а недостаци су: немогућност приказивања субмукозног ширења тумора, Морганијевих рецесуса, предње комисуре гласница и петиолуса епиглотиса (283).

Ларингомикроскопски преглед је индикован код постојања патолошких промена у хипофаринксу и ларинксу. Нарочито је погодан за процену локализације, проширености и изгледа патолошких промена слузницом прекривених структура ларинкса под микроскопом и са увећањем 300 пута. При прегледу се користи ларингоскопска шпатула, хваталице различитог облика и ригидни аспиратор. Предуслови су: лежећи положај пацијента са дорзалном флексијом врата и општа или локална анестезија. Увођење ларингоскопске шпатуле се састоји из три акта. У првом акту, а након увођења шпатуле у усну шупљину по медијалној линији задњег зида ждрела, приказују се: 1) база језика и 2) обе епиглотичне јамице, ограничене латерално, латералним глосоепиглотисним наборима, а медијално, медијалним глосоепиглотисним набором. У другом акту, а након подизања базе језика нагоре и увођења ларингоскопа наниже, могу се видети: 1) језична површина епиглотиса, 2) пириформни синуси, 3) задњи зид хипофаринкса и ниже 4) ретрокрикоидни предео. У трећем акту, врх ларингоскопа се повлачи уназад, испод епиглотиса, а потом навише и нагоре и на тај начин се подизањем епиглотиса приказују: 1) ларингеална површина епиглотиса, 2) оба ариепиглотисна набора, 3) оба аритеноидна набора, 4) оба вентрикуларна набора са њиховом предњом комисуром, 5) оба Моранијева вентрикулуса, 6) обе гласнице са њиховом предњом и задњом комисуром, 7) субглотисни предео и 8) почетни део трахеје. По довођењу ларингоскопа у описани положај, на његов

горњи крај се монтира држач за фиксирање који омогућава лекару слободне руке за узимање исечака. Из добро визуелизованих структура се под микроскопом узимају исечци одговарајућим хваталицама и то код хроничног ларингитиса из самих диспластичних промена, а код постојања тумора из самог тумора и са његових граничних регија, како би се са сигурношћу одредиле његове границе или T стадијум и како би се могло планирати даље лечење.

### **3.3. МЕТОДЕ БОЈЕЊА ЛАРИНГЕАЛНИХ УЗОРАКА**

За постављање дијагнозе и одређивање патохистолошких критеријума коришћена је стандардна, хематоксилин–еозин метода бојења, а у експерименталном делу, експресија испитиваних маркера је одређивана имунохистохемијским методом, применом моноклоналних антитела (284,285).

Добијени ларингеални биоптички узорци ткива су фиксирани у 4% неутралном пуферисаном раствору формалина у току 24 часа на собној температури. По завршеној фиксацији, узорци су дехидратисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације (70%, 96% и 100%), просветљавани у ксилолу и калупљени у парапласт. Попречни серијски пресеци, дебљине 4 $\mu$ m, сечени су на микротомумодела Leica RM 2135, Аустрија. После депарафинисања у ксилолу и хидратације у опадајућем реду алкохола, исечци су бојени хематоксилином по Мауег-у, просветљавани у 2% раствору еозина, затим дехидратисани, просветљивани и монтирани на плочице са Канада балзамом (285). Ова класична Хематоксилин–Еозин метода омогућила је микроскопским прегледом постављање коначне дијагнозе, као и патохистолошку анализу ткивних узорака, која је укључивала одређивање стандардних и нестандартних параметара, тј. особина тумора (286,284).

Степен дисплазије и проширеност тумора су класификовани TNM системом према AJCC (287). Градус туморске диференцијације одређен је према критеријумима Светске Здравствене Организације.

### 3.4. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКО ИСПИТИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, P16 И P21

Имунохистохемијски метод се базира на реакцији антиген–антитело. Применом одговарајућих моноклонских антитела, специфичних за одређене врсте протеина у једру, цитоплазми или на мембрани, нормалне или малигне ћелије, могућа је визуелизација комплекса антиген–антитело, а самим тим и интензитет те експресије. Ова метода омогућава приказ ћелија са експримираним протеинома одређивање нивоа његове експресије (288). Испитивани су узорци нормалне и диспластичне слузнице ларинкса, као и узорци карцинома ларинкса. Употребљена су следећа примарна мишја антихумана моноклонска антитела: 1) Mouse anticyclin D1 Monoclonal Antibody (Кат. бр. МСА1756, разблажење 1:1000; Клон CD1.1; AbDSerotec, Оксфорд, Велика Британија), Monoclonal Anti-human FGF-3 Antibody (Кат. бр. МАВ1206, разблажење 1:500; Клон 254625; R&DSYSTEMS, Inc., Минеаполис, Сједињене Америчке Државе), Mouse anti p16 Monoclonal Antibody (Кат.бр. 554362, разблажење 1:100; Клон D25; BDBiosciences, Erembodegem, Белгија) и Monoclonal Anti-human p21 Antibody (Кат. бр. МАВ1047, разблажење 1:200; Клон 195720; R&DSYSTEMS, Inc, Сједињене Америчке Државе). Секундарна антитела су добијена у сетовима са примарним.

Извршена је депарафинизација и рехидратација ткивних исечака у више фаза. Прва фаза подразумева депарафинизацију и то тако што су предметна стакла потопљена 2x5 минута у ксилолу. У другој фази је урађена рехидратација са растућим концентрацијама алкохола и то прво 5 минута у апсолутном алкохолу. Овај поступак је још једном поновљен. Затим су исечци држани 5 минута у 96% алкохолу, а потом су исечци пребачени у кивете са 70% алкохолом. По истеку 5 минута пребачени су у кивете са 50% алкохолом, где су држани наредних 5 минута. У последњој фази рехидратације исечци су потопани 5 минута у дестилованој води. Предметна стакла су обрисана, тако да су само исечци остали влажни. Демаскирање антигена је урађено тако што је у кивете са ткивним исечцима сипан цитратни пуфер (pH=6,0), који је претходно загрејан на собној температури. Кивете су стављене у посуду и у њој је додатно наливен цитратни пуфер, тако да ниво течности буде мало изнад врха кивета. Пластична посуда је заједно са

препаратима загревана у микроталасној пећници на 800W у трајању од 21 минута. Након овог поступка кивете са препаратима су одмах извађене из пластичне посуде и хлађене на собној температури 10–20 минута. Следило је испирање ткивних исечака екстензивно, најпре два пута у дестилованој води, а затим 3 пута по 10 минута у PBS-у (PBS – Phosphate–buffered saline) чији је рН износио 7,2. Након процеса демаскирања урађено је блокирање ендogene пероксидазе, тако што су препарати потопљени 8 минута у 3%-раствору хидрогена у PBS-у. Препарати су опрани 3 пута по 5 минута у PBS-у. Предметна стакла су обрисана, тако да су само исечци остали влажни. На исечке је нането примарно антитело и инкубирани су 1 сат у влажној комори. Одливен је вишак антитела, а исечци опрани 3 пута по 5 минута у PBS-у. Предметна стакла су обрисана, тако да су само исечци остали влажни. На исечке је нането секундарно биотинисано антитело и инкубирано 30 минута у влажној комори. Одливен је вишак антитела и препаратису поново опрани 3 пута по 5 минута у PBS-у. Предметна стакла су обрисана, тако да су само исечци остали влажни. На исечке је нанесен Streptavidin-Horseradish Peroxidase (претходно припремљен у одговарајућој концентрацији у PBS-у). Пластице су инкубиране у влажној комори 30 минута на собној температури. Следи прање препарата 3 пута по 5 минута у PBS-у. Околина исечка је обрисана папирном ватом. Припремљен DAB (diaminobenzidine tetrachloride/chromogen substrate) раствор је нанесен на исечке. Пластице су инкубиране 5 минута у влажној комори на собној температури или колико је потребно да се добије жељени интензитет боје. У овој фази, ако је реакција успешна, боја се запажа већ после десетак секунди. Препарати су опрани 3 пута по 5 минута у дестилованој води. На исечке је нанесен раствор хематоксилина (контрасно или помоћно бојење). Препарати су испрани водом са чесме, да се одстрани вишак хематоксилина, а затим су исечци дехидрирани у киветама са растућим концентрацијама алкохола и то 5 минута у 75%-алкохолу и 10 минута у 95%-алкохолу. Предметна стакла су обрисана, тако да су само исечци остали влажни. Препарати су опрани у ксилолу и околина исечка је брзо обрисана папирном ватом, јер исечак не сме да се осуши, а на исечке је нанета кап канада-балзама (Canadabalsam, Centrohem, Србија) и прекривена покровном лџуспицом. Препарати су се, пре одлагања у холдере за препарате, сушили положени хоризонтално 24 сата на собној температури.

### 3.5. МИКРОСКОПИЈА

Експресија имунохистохемијског бојења и интензитети експресије су оцењивани при увеличању 200 пута, на микроскопу Carl Zeiss, типа Axioscop 40, од стране три независна истраживача, који нису имали увид у клиничке податке пацијената, а препарати са репрезентативном експресијом су снимани коришћењем три микроскопска увеличања (x10, x20 и x40) помоћу камере Canon PC 1089.

Примењено је семиквантитативно читавање процента позитивних ћелија код сва три типа ларингеалне слузнице и то тако што је посматран само проценат нуклеарне позитивности, док цитоплазматска позитивност није читавана (289):

Интензитет 0: 0% обојених једара;

Интензитет 1: 1–10% обојених једара;

Интензитет 2: 10–50% обојених једара;

Интензитет 3: више од 50% обојених једара.

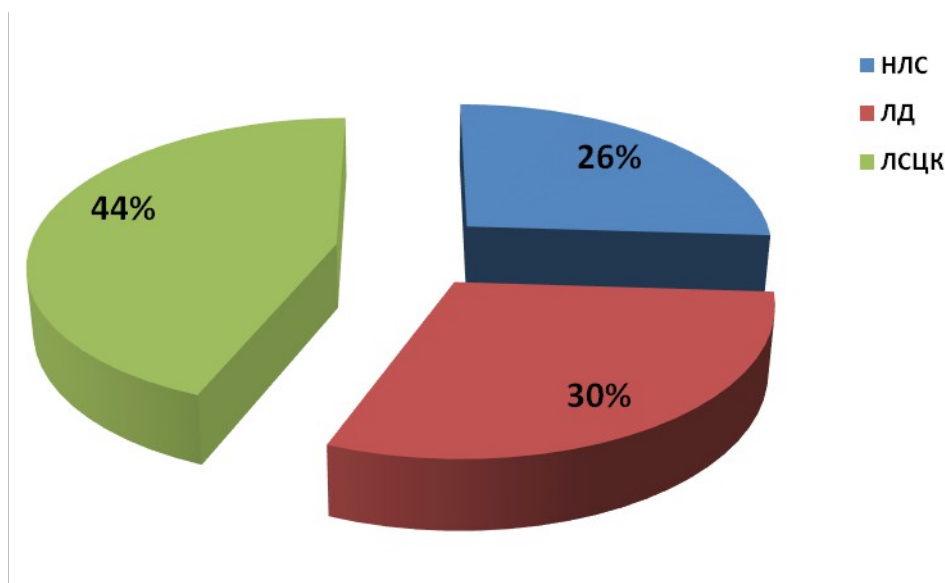
### 3.6. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

За статистичку анализу је коришћен SPSS за Windows (верзија 20.0, SPSS Inc. Чикаго, Сједињене Америчке Државе). Статистичка анализа је примењена на читаву популацију узорака, као и на различите субпопулације. Повезаност категоријалних варијабли тестирана је Пирсоновим Хи квадрат тестом и Фишеровим тестом тачне вероватноће. За утицај појединачних или групе маркера на појаву дисплазије и карцинома, коришћена је бинарна логистичка регресија. Испитивана је и сензитивност и специфичност појединачних и групе маркера. Сензитивност је дефинисана као удео ткивних исечака оболелих пацијената код којих је имунохистохемијско бојење позитивно. Сензитивност је мера колико добро имунохистохемија открива болест када стварно постоји. Специфичност је удео необолелих код којих је бојење негативно. Добијене вредности статистичких тестова су сматране за значајне када је  $p$  вредност била мања од 0,05, а за високо значајне када је  $p$  вредност била мања од 0,001. Резултати су приказани табеларно и графички.

## РЕЗУЛТАТИ

Истраживањем је обухваћено 108 пацијената (18 жена и 90 мушкараца). Критеријум за укључивање у истраживање је била промуклост (са трајањем од 30 дана и више). Просечна старост испитаника је износила 58,05 година, при чему је најмлађи испитаник имао 10, а најстарији 87 година. Свим пацијентима је узет исечак слузнице ларинкса и упућен на патохистолошку анализу.

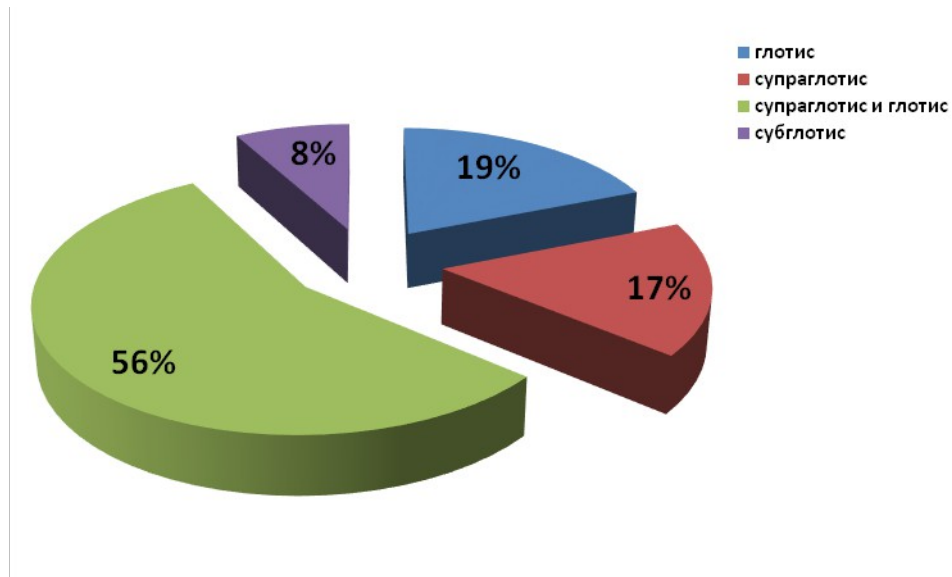
На основу прегледа патолога, исечци су подељени на три групе и то на: нормалну слузницу ларинкса, ларингеалну дисплазију и сквамозелуларни карцином ларинкса. Прву експерименталну групу су чинили пацијенти са дисплазијом слузнице ларинкса ( $n=31$ ; 30%), другу пацијенти са сквамозелуларним карциномом ларинкса ( $n=48$ ; 44%), док су контролну групу сачињавали пацијенти са нормалном слузницом ларинкса ( $n=29$ ; 26%), (Графикон 1).



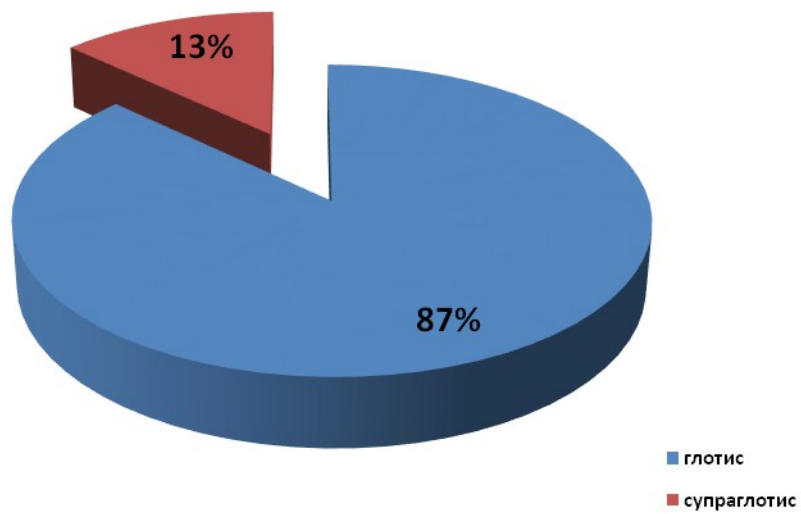
Графикон 1. Заступљеност узорака слузнице ларинкса на нормалну слузницу ларинкса (НЛС), ларингеалну дисплазију (ЛД) и ларингеални сквамозелуларни карцином (ЛСЦК).

На основу раширености карцинома на поједине регионе ларинкса, пацијенти су разврстани према локализацији на следеће четири групе: супраглотисна локализација (17%), глотисна (19%), истовремено супраглотисна и глотисна (56%) и субглотисна (8%),

(Графикон 2). Пацијенти са дисплазијама слузнице су на основу локализације разврстани у следеће експерименталне групе: глотисна (87%) и супраглотисна (13%) (Графикон 3).



Графикон 2. Заступљеност карцинома према субрегиону ларинкса (у %).



Графикон 3. Заступљеност дисплазија према субрегиону ларинкса (у %).

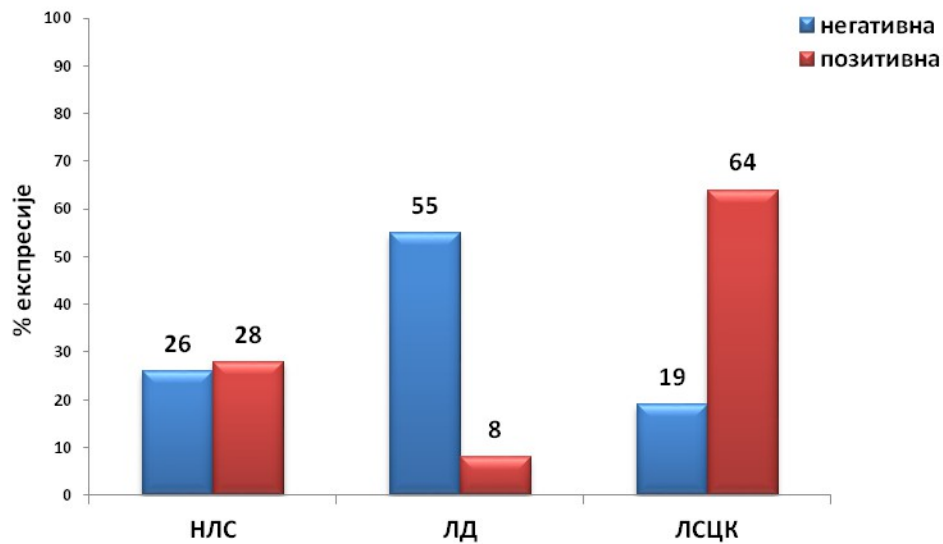


## **4.1. ИСПИТИВАЊЕ ЗАВИСНОСТИ ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 и p21 КОД НОРМАЛНЕ, ДИСПЛАСТИЧНЕ СЛУЗНИЦЕ И КОД КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА**

Пацијенти су подељени на групе на основу степена експресије онкогена и антионкогена у ткивним исечцима. Интензитети експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 су одређени семиквантитивно на основу процента обојених ћелија у односу на укупан број посматраних ћелија. Експресија је означавана као негативна (-) уколико није било обојених једара - **интензитет 0**, означава 0% обојених једара, а као позитивна (+), ако је проценат обојених једара био од 1–100%. **Интензитет 1** означава 1–10% обојених једара, **интензитет 2** означава 11–50% обојених једара и **интензитет 3** означава 51–100% обојених једара. Затим смо код испитиваних протеина упоредили негативан са позитивним интензитетом експресије код нормалне слузнице ларинкса, ларингелне дисплазије и сквамоцелуларног карцинома ларинкса.

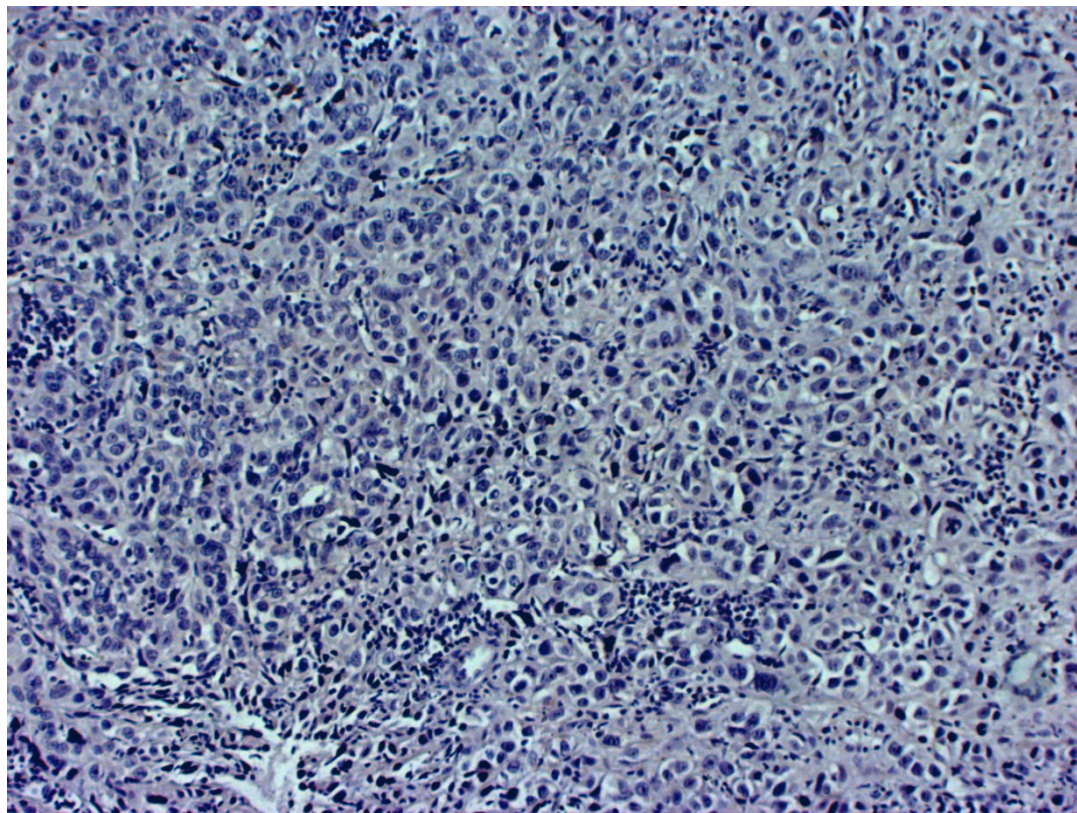
### **4.1.1. Експресија cyclin D1 код нормалне и диспластичне слузнице и код карцинома ларинкса**

Експресија cyclin D1 је присутна код 17 од 29 пацијената са нормалном слузницом (28%), код 5 од 31 пацијента са диспластичном слузницом (8%) и код 39 од 48 пацијената (64%) са карциномом ларинкса, што је јасно приказано на Графикону 4. Експресија cyclin D1 је учесталија у карциномима ларинкса, него у дисплазијама и нормалној слузници ларинкса ( $\chi^2=32,570$ ;  $df=2$ ;  $p<0,001$ ). Микрофотографије негативне и позитивне експресије cyclin D1 у ткиву карцинома ларинкса су приказане на Слици 3.

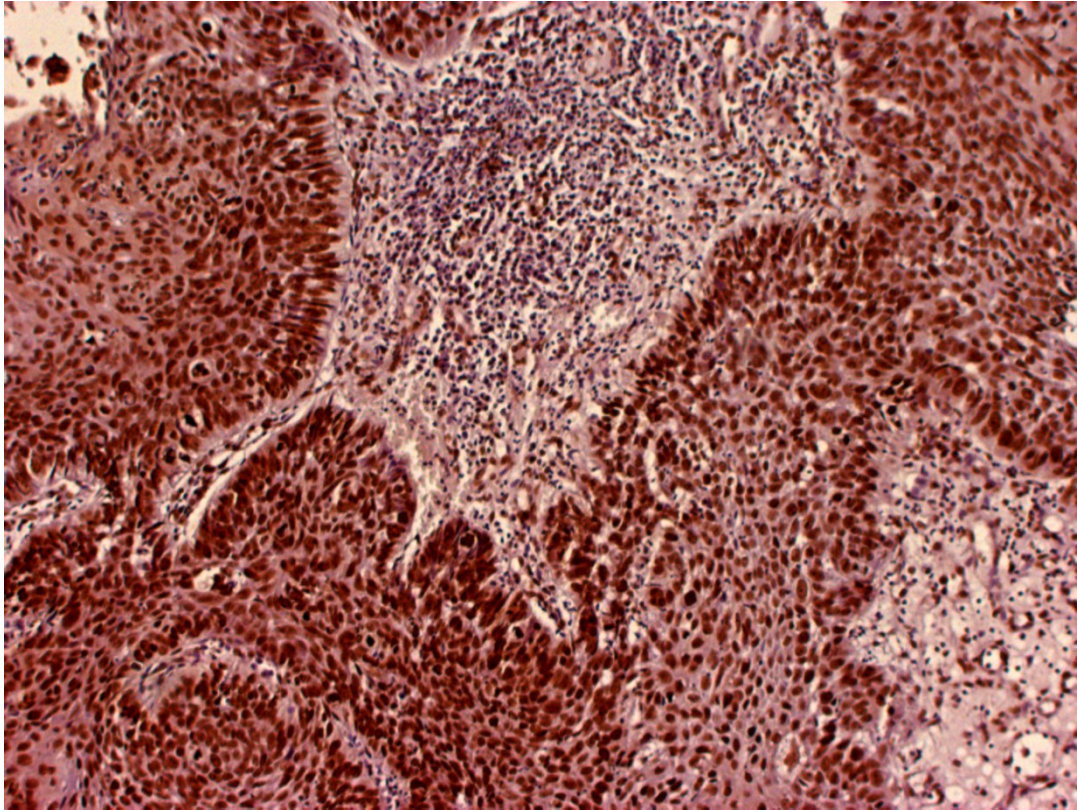


**Графикон 4. Експресија cyclin D1 код НЛС, ЛД и ЛСЦК.** НЛС-нормална ларингеална слузница, ЛД-ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамoцелуларни карцином.

**А**



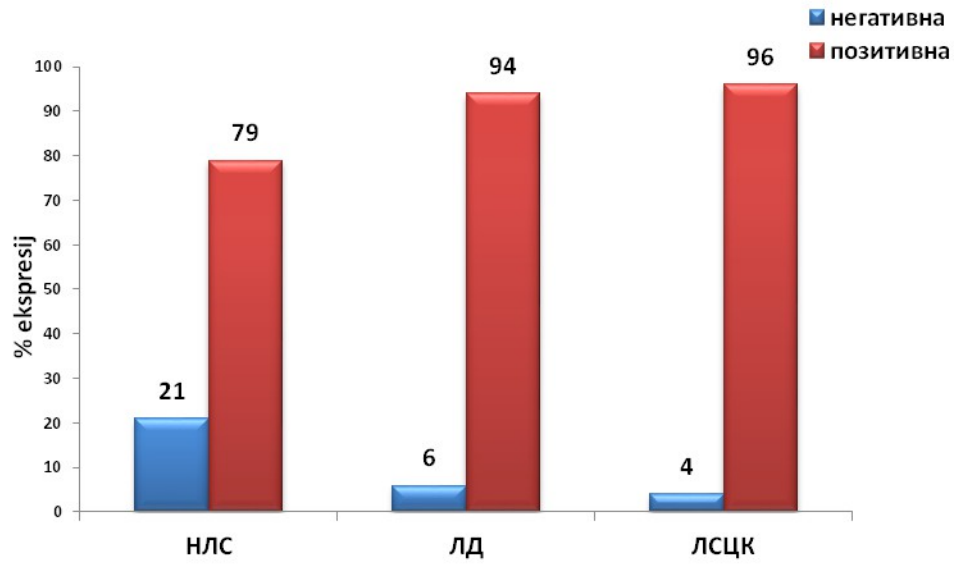
**Б**



**Слика 3 (А,Б). Негативна експресија (микрофотографија А) и позитивна експресија cyclin D1 (микрофотографија Б) карцинома ларинкса са увељичањем x40.**

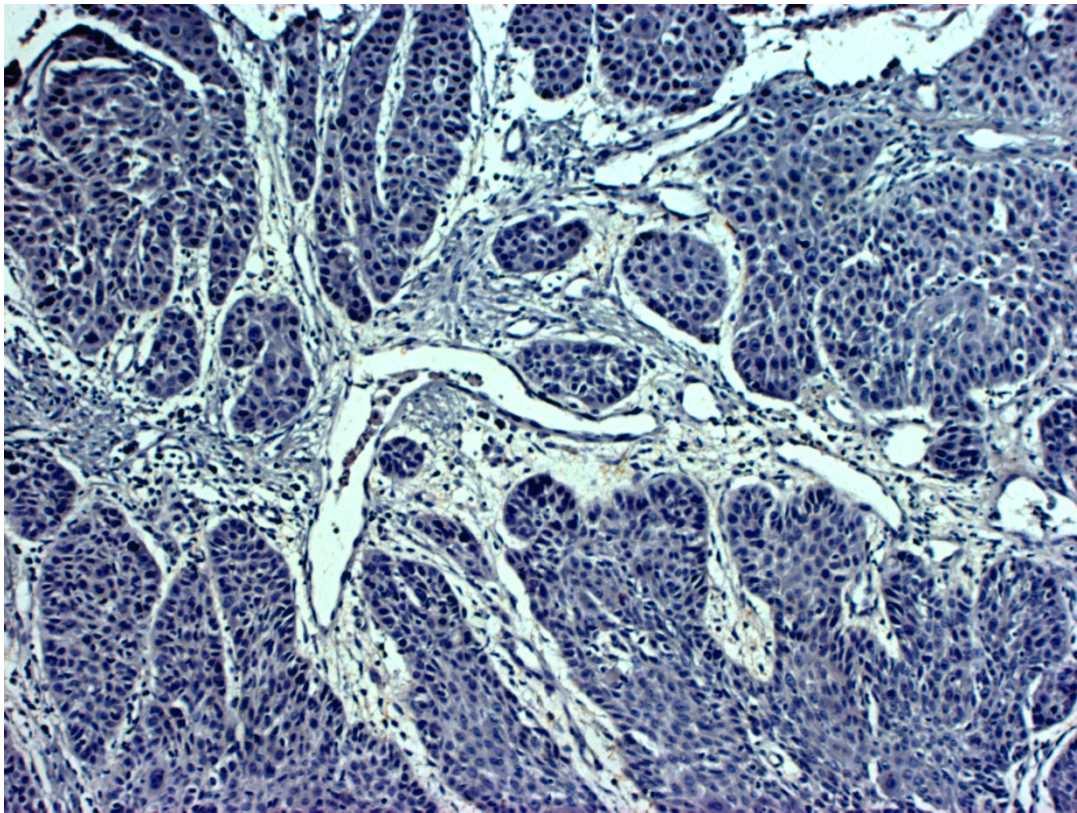
#### **4.1.2. Експресија FGF3 код нормалне и диспластичне слузнице и код карцинома ларинкса**

Експресија FGF3 је код нормалне слузнице присутна код 23 од 29 (79,3%) пацијената, код ларингеалне дисплазије у 29 од 31 (93,5%), а код карцинома у 46 од 48 (95,8%) пацијената. Експресија FGF3 није статистички значајно већа код нормалне, диспластичне слузнице и код сквамозелуларног карцинома (Fisher-ов тест=5,380,  $p=0,0552$ ). Негативна и позитивна експресија FGF3 је приказана на Графикону 5.

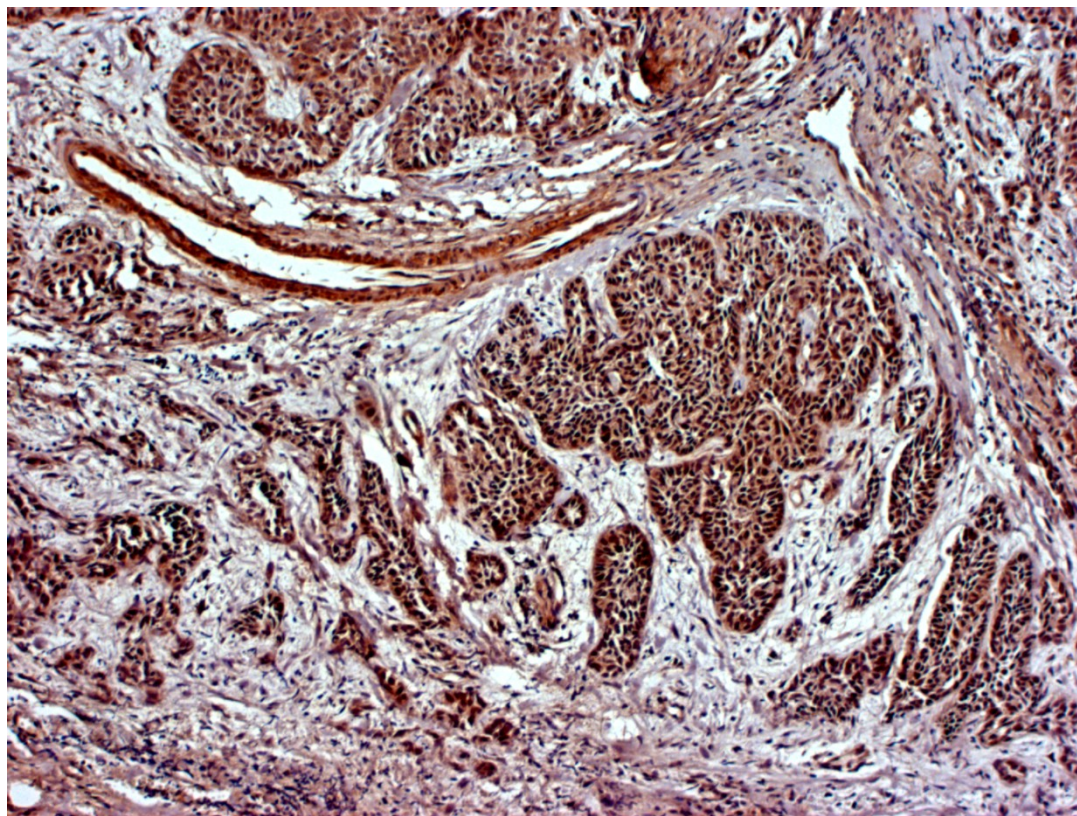


**Графикон 5.** Експресија FGF3 код НЛС, ЛД и ЛСЦК. НЛС-нормална ларингеална слузница, ЛД-ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамозелуларни карцином.

**A**



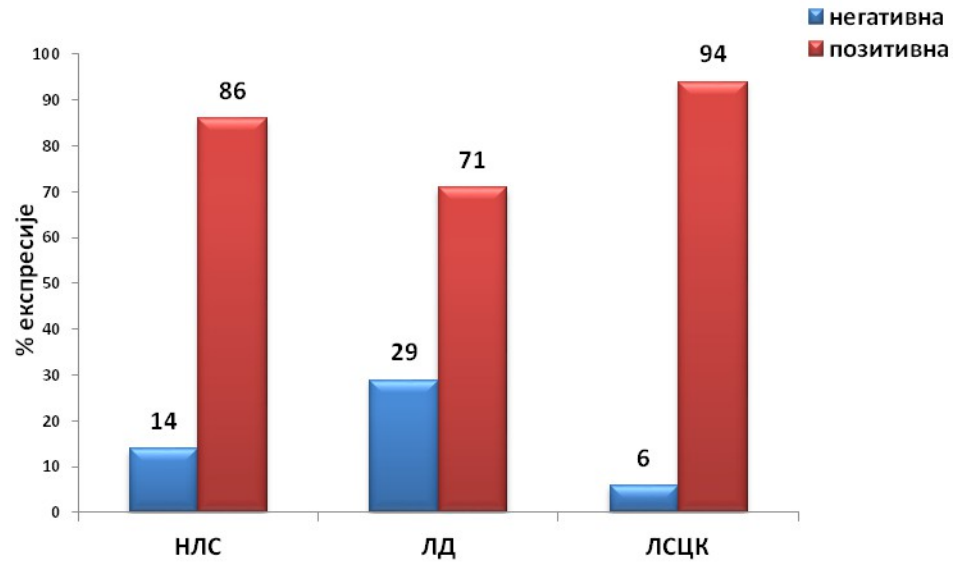
**Б**



**Слика 4 (А,Б). Негативна (микрофотографија А) и позитивна (микрофотографија Б) експресија FGF3 карцинома ларинкса са увеличањем x 40.**

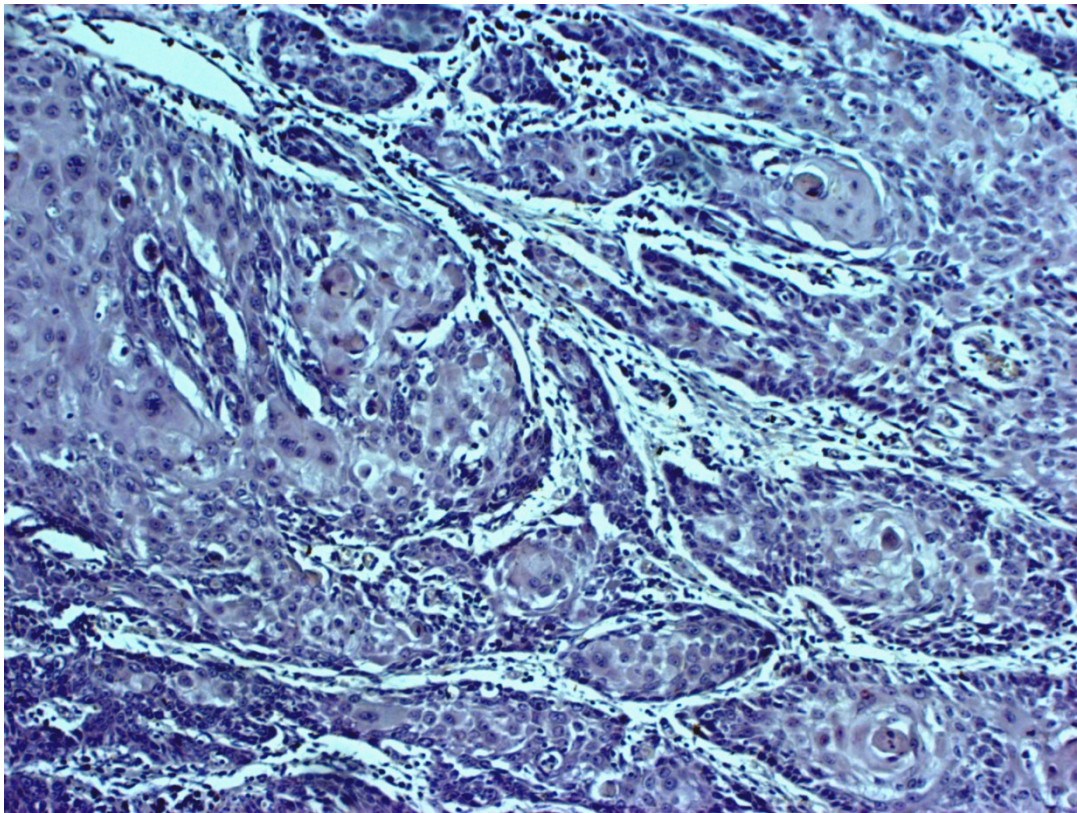
#### **4.1.3. Експресија p16 код нормалне и диспластичне слузнице и код карцинома ларинкса**

Експресија p16 је код нормалне слузнице присутна код 25 од 29 (86,2%) пацијената, код ларингеалне дисплазије код 22 од 31 (70,9%), а код карцинома код 45 од 48 (93,75%) пацијената. Експресија p16 је статистички значајно већа код сквамозелуларног карцинома у односу на нормалну слузницу и ларингеалну дисплазију (Fisher-ов тест=7,316,  $p=0,0232$ ), што се може видети на Графикону 6. На Слици 5 су приказане микрофотографије негативне и позитивне експресије p16.

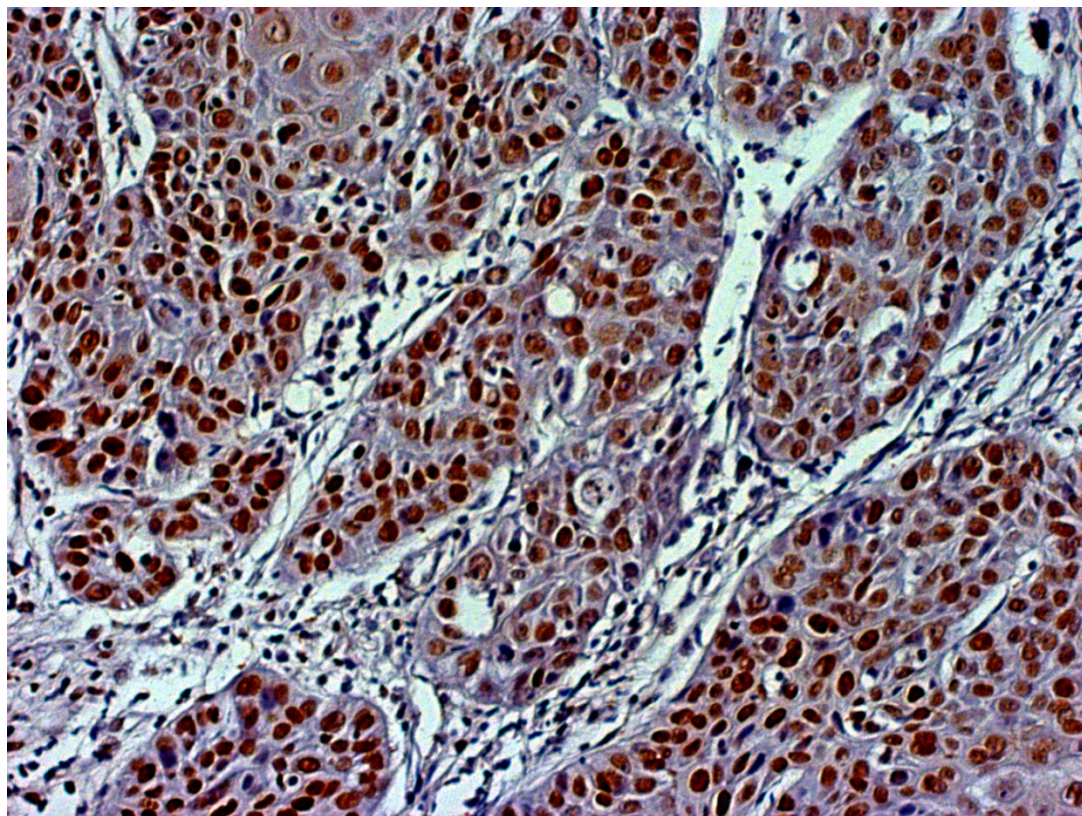


**Графикон 6.** Експресија р16 код НЛС, ЛД и ЛСЦК. НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД- ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамозелуларни карцином.

**А**



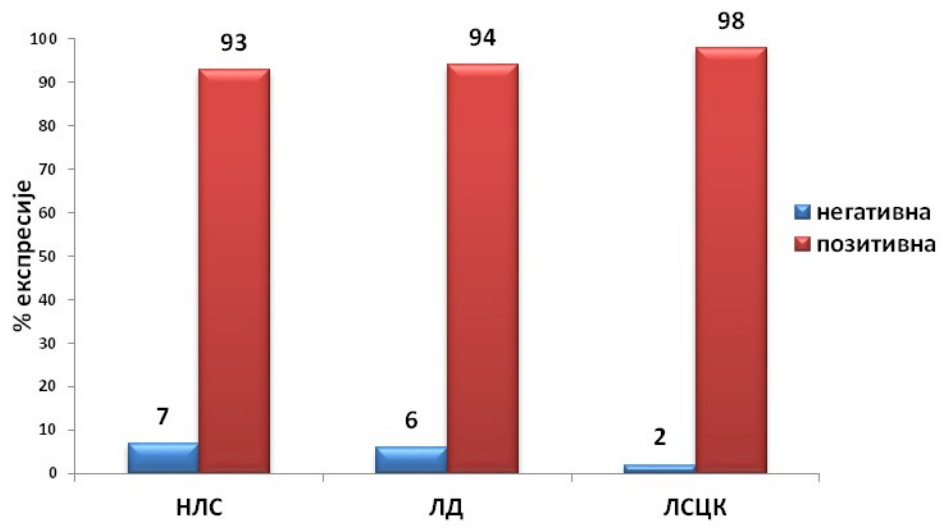
**Б**



Слика 5 (А,Б). Негативна (микрофотографија А) и позитивна (микрофотографија Б) експресија p16 карцинома ларинкса са увеличањем x 40.

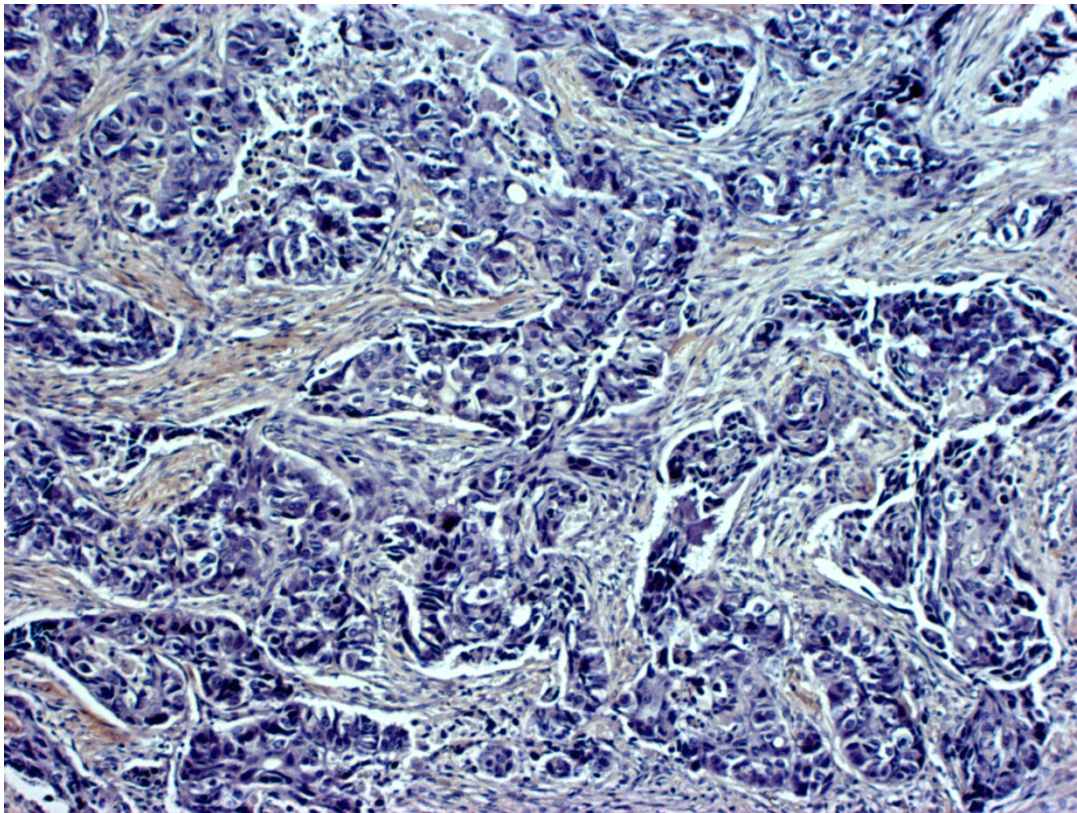
#### **4.1.4. Експресија p21 код нормалне и диспластичне слузнице и код карцинома ларинкса**

Експресија p21 је код нормалне слузнице присутна код 27 од 29 (93,1%) пацијената, код ларингеалне дисплазије код 29 од 31 (93,5%), а код карцинома код 47 од 48 (98%) пацијената. На Графикону 7 се може видети да експресија p21 није статистички зависна од типа ларингеалне слузнице (Fisher-ов тест=1,593,  $p=0,597$ ). Микрофотографије негативне и позитивне експресије p21 су приказане на Слици 6.



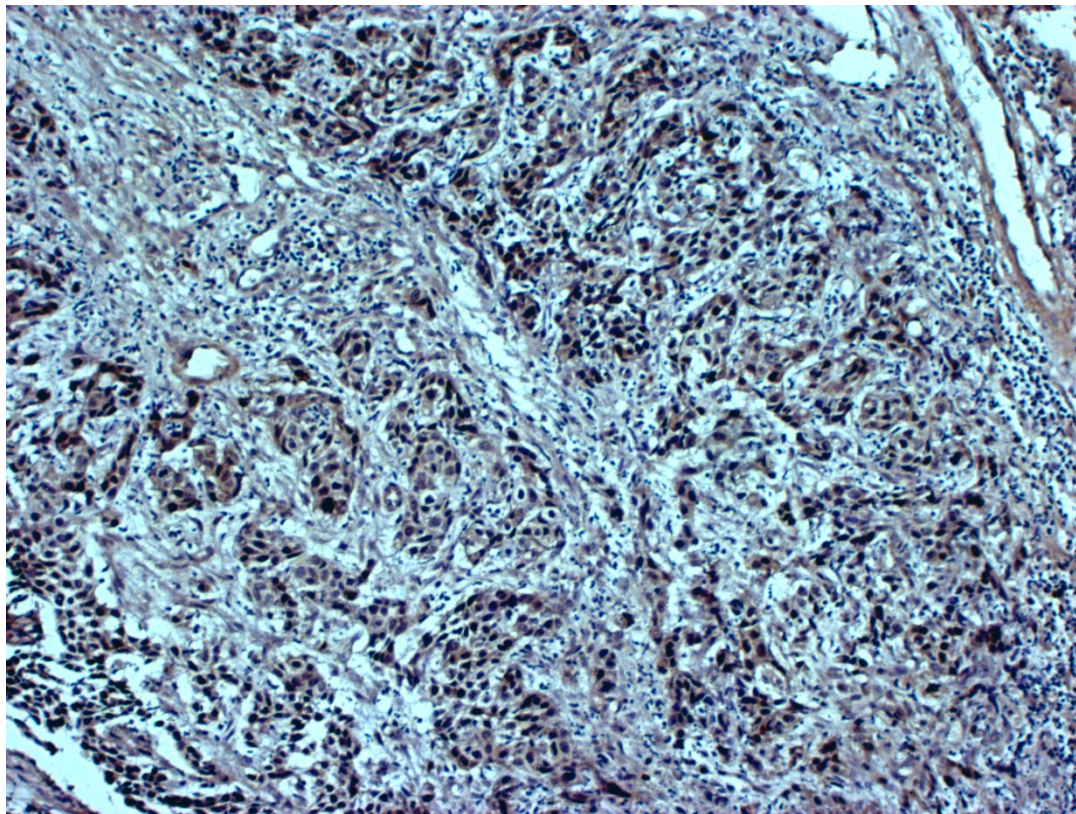
**Графикон 7.** Експресија р21 код НЛС, ЛД и ЛСЦК. НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД- ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамозелуларни карцином

**А**





**Б**



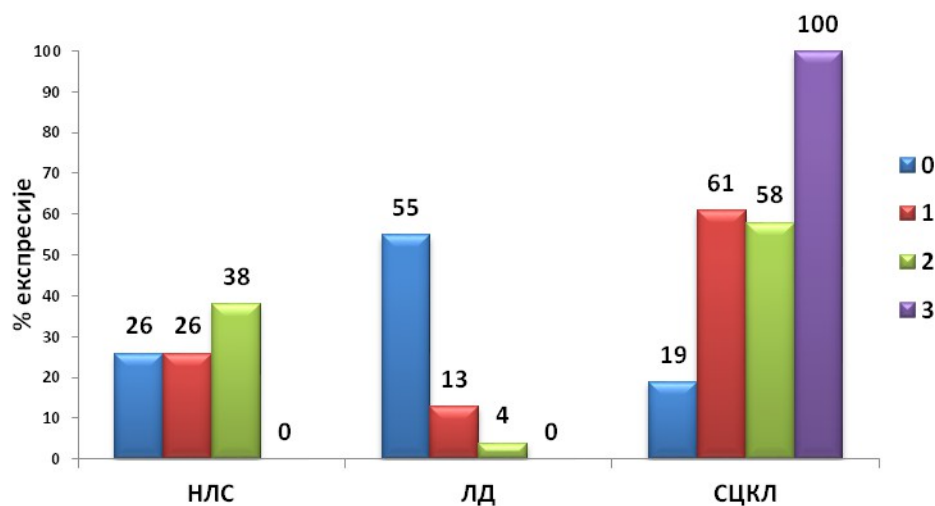
Слика 6 (А,Б). Негативна (микрофотографија А) и позитивна експресија p21 (микрофотографија Б) карцинома ларинкса са увеличањем x 40.

## **4.2. ИСТРАЖИВАЊЕ ВЕЗЕ ИНТЕНЗИТЕТА ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 И p21 КОД НОРМАЛНЕ, ДИСПЛАСТИЧНЕ СЛУЗНИЦЕ И КОД КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА**

### **4.2.1. Интензитети експресије cyclin D1 код нормалне и измењене слузнице ларинкса**

Експресија cyclina D1 са интензитетом 0 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 41,4% (12/29), код диспластичне слузнице у 83,9% (26/31), док је код

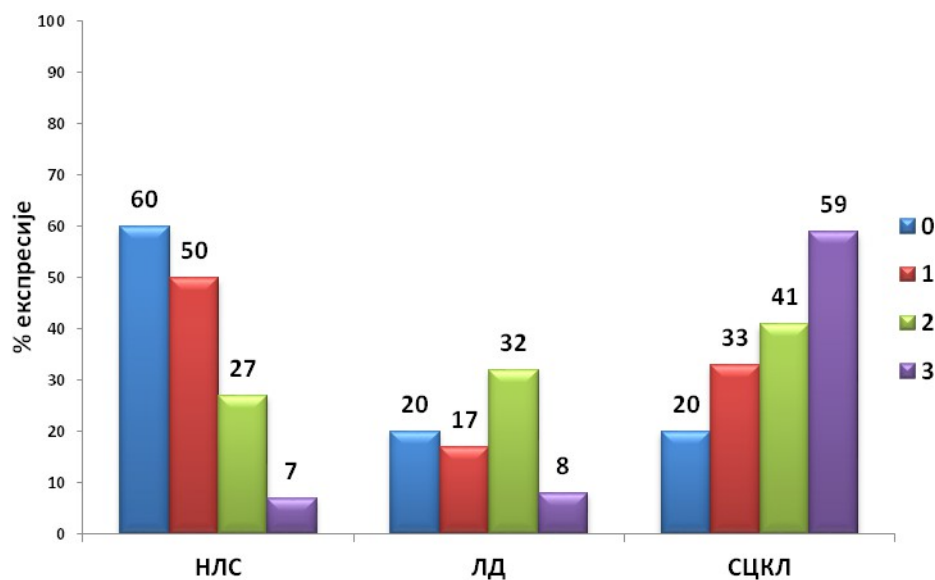
карцинома ларинкса присутна код 18,8% (9/48) пацијената. Експресија *cyclin D1* са интензитетом 1 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 27,6% (8/29), код диспластичне слузнице у 12,9% (4/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 39,6% (19/48) пацијената. Експресија *cyclin D1* са интензитетом 2 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 31% (9/29), код диспластичне слузнице у 3,2% (1/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 29,2% (14/48) пацијената. Експресија *cyclin D1* са интензитетом 3 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 0% (0/29), код диспластичне слузнице, такође, у 0% (0/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 12,5% (6/48) пацијената, што се јасно види на Графикону 8. Наши резултати указују да су интензитети експресије *cyclin D1* зависни од типа ларингеалне слузнице (Fisher-ов тест=36,740,  $p=0,001$ ).



**Графикон 8.** Интензитети експресије *cyclin D1* код НЛС, ЛД и ЛСЦК. НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД-ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамозелуларни карцином

## 4.2.2. Интензитети експресије FGF3 код нормалне и алтерисане слузнице ларинкса

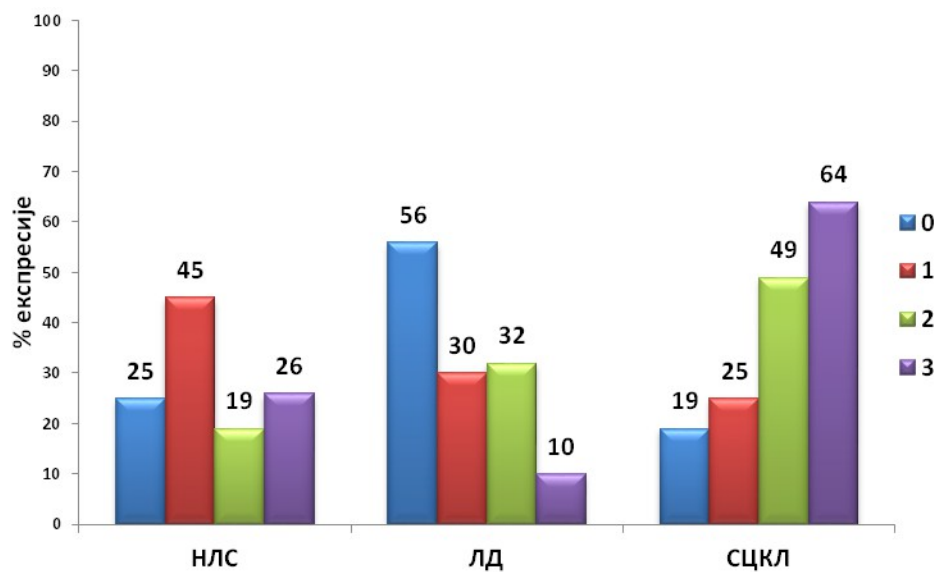
Експресија FGF3 са интензитетом 0 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 20,7% (6/29), код диспластичне слузнице у 6,5% (2/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 4,2% (2/48) пацијената. Експресија FGF3 са интензитетом 1 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 31% (9/29), код диспластичне слузнице у 9,7% (3/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 12,5% (6/48) пацијената. Експресија FGF3 са интензитетом 2 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 37,9% (11/29), код диспластичне слузнице у 41,9% (13/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 35,4% (17/48) пацијената. Експресија FGF3 са интензитетом 3 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 10,3% (3/29), код диспластичне слузнице у 41,9% (13/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 47,9% (23/48) пацијената (Графикон 9). Наши резултати указују да са повећањем интензитета експресије FGF3 опада његова процентуална заступљеност код нормалне слузнице ларинкса, а повећава се код дисплазија и карцинома (Fisher-ов тест=18,099,  $p=0,004$ ).



Графикон 9. Интензитети експресије FGF3 код НЛС, ЛД и ЛСЦК. НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД-ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамoцелуларни карцином

### 4.2.3. Интензитети експресије p16 код нормалне и алтерисане слузнице ларинкса

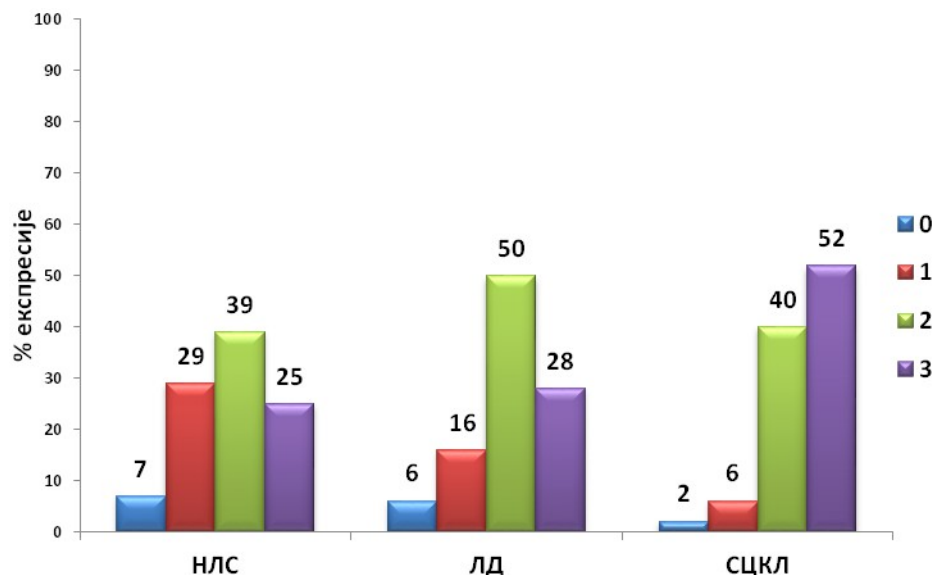
Експресија p16 са интензитетом 0 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 13,8% (4/29), код диспластичне слузнице у 29% (9/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 27,6% (8/48) пацијената. Експресија p16 са интензитетом 1 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 31% (9/29), код диспластичне слузнице у 19,4% (6/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 10,4% (5/48) пацијената. Експресија p16 са интензитетом 2 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 27,6% (8/29), код диспластичне слузнице у 41,9% (13/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 41,7% (20/48) пацијената. Експресија p16 са интензитетом 3 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 27,6% (8/29), код диспластичне слузнице у 9,7% (3/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 41,7% (20/48) пацијената (Графикон 10). Са повећањем интензитета експресије p16 повећава се његова процентуална заступљеност код дисплазија и карцинома, док опада код нормалне слузници (Fisher-ов тест=18,504,  $p=0,004$ ).



Графикон 10. Интензитети експресије p16 код НЛС, ЛД и ЛСЦК. НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД-ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамозелуларни карцином

#### 4.2.4. Интензитети експресије p21 код нормалне и алтерисане слузнице ларинкса

Експресија p21 са интензитетом 0 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 6,9% (2/29), код диспластичне слузнице у 6,5% (2/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 2,1% (1/48) пацијената. Експресија p21 са интензитетом 1 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 27,6% (8/29), код диспластичне слузнице у 16,1% (5/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 6,2% (3/48) пацијената. Експресија p21 са интензитетом 2 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 41,4% (12/29), код диспластичне слузнице у 48,4% (15/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 39,6% (19/48) пацијената. Експресија p21 са интензитетом 3 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 24,1% (7/29), код диспластичне слузнице у 29% (9/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 52,1% (25/48) пацијената (Графикон 11). Са повећањем интензитета експресије p21 повећава се његова процентуална заступљеност код дисплазија и карцинома, док опада код нормалне слузници (Fisher-ов тест=11,788, p=0,049).

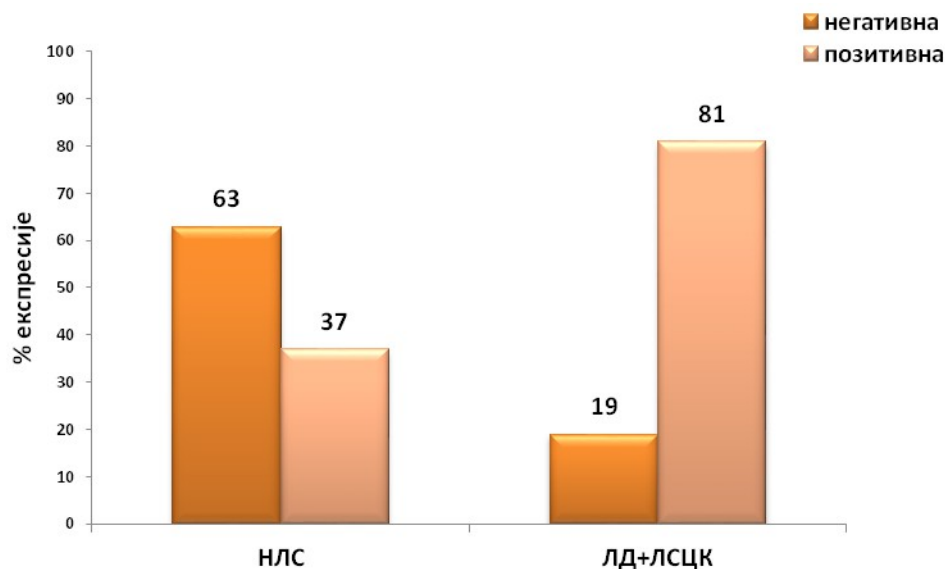


Графикон 11. Интензитети експресије p21 код НЛС, ЛД и ЛСЦК. ЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД-ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамозелуларни карцином

### 4.3. ОДРЕЂИВАЊЕ МОГУЋЕ ПОВЕЗАНОСТИ ЕКСПРЕСИЈЕСУСCLIND1, FGF3, p16 И p21 У ЦИЉУ ДИФЕРЕНИЈАЦИЈЕ НОРМАЛНЕ СЛУЗНИЦЕ ЛАРИНКСА ОД ЛАРИНГЕАЛНИХ ЛЕЗИЈА

#### 4.3.1. Експресија маркера суscln D1 код нормалне слузнице ларинкса са његовом експресијом код заједно диспластичне слузнице ларинкса и карцинома ларинкса

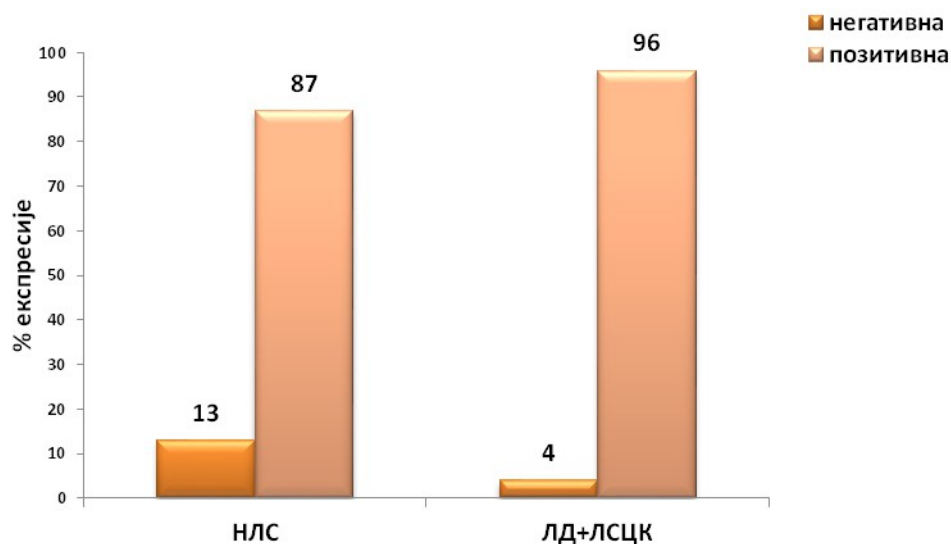
Експресија суscln D1 код нормалне слузнице ларинкса је била интензитета 0 код 38 (63,3%) пацијената, а интензитета 1+2+3 код 22 (36,7%) пацијента. Код заједно диспластичне слузнице ларинкса и карцинома ларинкса њихова експресија је била интензитета 0 код 9 (18,8%) пацијената, а интензитета 1+2+3 код 39 (81,3%) пацијената. Ова разлика је статистички значајна ( $\chi^2=21,562$ ;  $df=1$ ;  $p=0,0001$ ), што се јасно уочава на графикону 12.



Графикон 12. Експресија суscln D1 код НЛС и ЛД+ЛСЦК. НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД- ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамозелуларни карцином

#### 4.3.2. Експресија FGF3 код нормалне слузнице ларинкса према експресији FGF3 код заједно диспластичне слузнице и карцинома ларинкса

Експресија FGF3 код нормалне слузнице ларинкса је била интензитета 0 код 8 (13,3%) пацијената, а интензитета 1+2+3 код 52 (86,7%) пацијента. Код заједно диспластичне слузнице ларинкса и карцинома ларинкса експресија FGF3 је била интензитета 0 код 2 (4,2%) пацијента, а интензитета 1+2+3 код 46 (95,8%) пацијената. Ова разлика није статистички значајна ( $p=0,179$ ; Fisher-ов тест), што се може видети на Графикону 13.

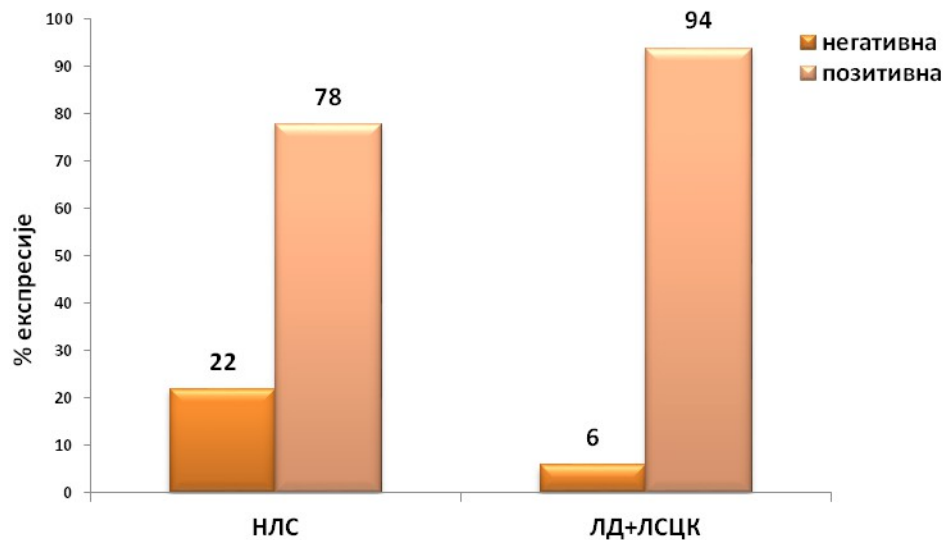


Графикон13. Експресија FGF3 код НЛС и ЛД+ЛСЦК. НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД- ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамозелуларни карцином

#### 4.3.3. Експресија p16 код нормалне слузнице ларинкса у односу на његову експресију код заједно диспластичне слузнице и карцинома ларинкса

Експресија p16 код нормалне слузнице ларинкса је била интензитета 0 код 13 (21,7%) пацијената, а интензитета 1+2+3 код 47 (78,3%) пацијената. Код заједно

диспластичне слузнице ларинкса и карцинома ларинкса њихова експресија је била интензитета 0 код 3 (6,3%) пацијента, а интензитета 1+2+3 код 45 (93,8%) пацијената. Разлика је статистички значајна ( $p=0,030$ ; Fisher-ов тест), што се јасно уочава из Графикана 14.

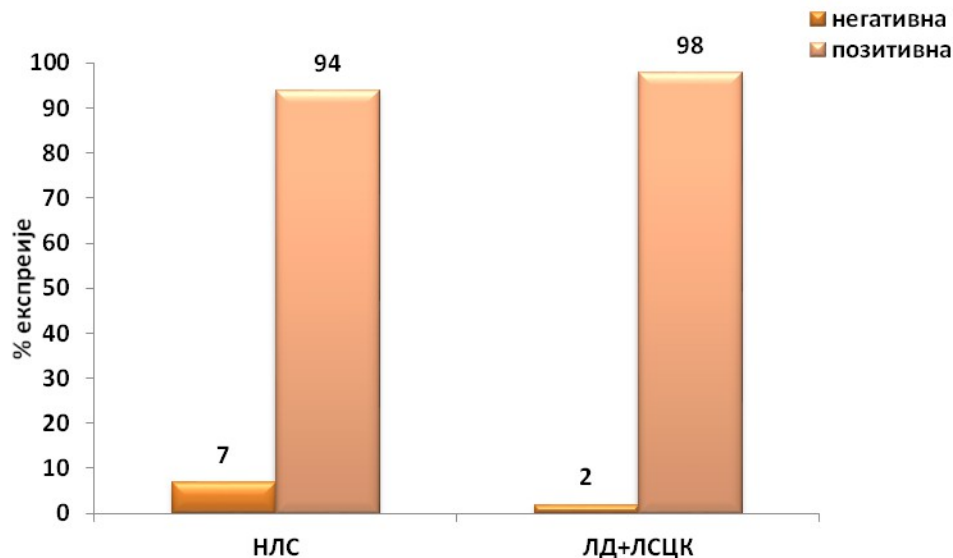


Графикон 14. Експресија p16 код НЛС и ЛД+ЛСЦК. НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД- ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамозелуларни карцином

#### 4.3.4. Експресија p21 код нормалне слузнице ларинкса у односу на његову експресију код заједно диспластичне слузнице и карцинома ларинкса

Експресија p21 код нормалне слузнице ларинкса је била интензитета 0 код 4 (6,7%) пацијента, а интензитета 1+2+3 код 56 (93,3%) пацијената. Код заједно диспластичне слузнице ларинкса и карцинома ларинкса њихова експресија је била интензитета 0 код 1 (2,1%) пацијента, а интензитета 1+2+3 код 47 (97,9%) пацијената. Разлика није статистички значајна ( $p=0,379$ ; Fisher-ов тест), што је приказано на Графикону 15.





**Графикон 15. Експресија p21 код код НЛС и ЛД+ЛСЦК.** НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД- ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамoцелуларни карцином

#### **4.4. АНАЛИЗА ПОВЕЗАНОСТИ ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 И p21 СА КЛИНИЧКИМ И ХИСТОЛОШКИМ ПАРАМЕТРИМА ЛАРИНГЕАЛНИХ ЛЕЗИЈА**

##### **4.4.1. Зависност експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 од клиничких карактеристика лезија ларинкса**

Испитана је веза експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са старошћу на малигнитет позитивном породичном и личном анамнезом, са конзумирањем дувана и алкохола, ледираним анатомским субрегионом ларинкса, начином раста карцинома, клиничким TNM стадијумом карцинома и клиничким стадијумом малигне болести. Експресија ових маркера није могла да се повеже са старошћу, породичном и личном анамнезом, као ни са конзумирањем дувана и алкохола. Код мушкараца је регистрована значајно израженија

експресија p16 него код жена ( $\chi^2=5,870$ ;  $df=1$ ;  $p=0,015$ ), што се јасно уочава на Табели 1. Мушки и женски пол подједнако експримирају cyclin D1, FGF3 и p21 (Табеле 1 и 2).

**Табела 1. Повезаност експресије cyclin-a D1, FGF3, p16 и p21 са старошћу, полом, позитивном породичном и личном анамнезом, конзумирањем дувана и алкохола**

	Cyclin D1+	FGF3+	p16+	p21+
<b>Старост (године)</b>				
<50	33,3%(1/3)	66,7%(2/3)	100%(3/3)	100%(3/3)
>50	57,1%(60/105)	91,4%(96/105)	84,8%(89/105)	95,2%(100/105)
<b>p вредност</b>	p=0,579	p=0,255	p=1.000	p=1.000
<b>Пол</b>				
мушки	58,9%(53/90)	92,2%(83/90)	88,9%(80/90)	96,7%(87/90)
женски	44,4%(8/18)	83,3%(15/18)	66,7%(12/18)	88,9%(16/18)
<b>p вредност</b>	p=0,259	p=0,365	<b>*p=0,015</b>	p=0,193
<b>Претходна малигна болест у породици</b>				
Позитивна	59,3%(51/86)	89,5%(77/86)	86%(74/86)	94,2%(81/86)
Негативна	45,5%(10/22)	95,5%(21/22)	81,8%(18/22)	100%(22/22)
<b>p вредност</b>	p=0,242	p=0,683	p=0,737	p=0,581
<b>Претходна малигна болест</b>				
Позитивна	55,1%(54/98)	89,8%(88/98)	85,7%(84/98)	94,9%(93/98)
Негативна	70%(7/10)	100%(10/10)	80%(8/10)	100(10/10)
<b>p вредност</b>	p=0,509	p=0,594	p=0,641	p=1,000
<b>Конзумирање дувана и алкохола</b>				
Присутно	66,7%(2/3)	66,7%(2/3)	100%(3/3)	100%(3/3)
Није присутно	56,2%(59/105)	91,4%(96/105)	84,8%(89/105)	95,2%(100/105)
<b>p вредност</b>	p=1,000	p=0,255	p=1.000	p=1.000

p вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-овим тестом тачне вероватноће, а p вредности су статистички значајне када је  $p<0,05$ .

Оболели су на основу анатомског региона ларинкса, начин раста карцинома, TNM стадијума и клиничког стадијума подељени у групе и испитана је повезаност ових карактеристика са експресијом cyclin D1, FGF3, p16 и p21 (Табела 2). Није уочено да постоји статистички значајна разлика наведених клиничких карактеристика са експресијом испитиваних тумор маркера.

**Табела 2. Зависност експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са анатомским регионом ларинкса, начином раста карцинома, TNM стадијумом и клиничким стадијумима карцинома ларинкса**

	Cyclin D1+	FGF3+	p16+	p21+
<b>Анатомски регион</b>				
Глотис	88,9%(8/9)	88,9%(8/9)	100%(9/9)	100%(9/9)
Супраглотис	87,5%(7/8)	100%(8/8)	75%(6/8)	100%(8/8)
Глотис+Супраглотис	77,4%(24/31)	96,8%(30/31)	96,8%(30/31)	96,8%(30/31)
р вредност	p=0,874	p=0,588	p=0,525	p=1,000
<b>Начин раста карцинома</b>				
Веgetантан	62,5%(5/8)	87,5%(7/8)	100%(8/8)	87,5%(7/8)
Инфилтративан	85%(34/40)	97,5%(39/40)	92,5%(37/40)	100%(40/40)
р вредност	p=0,159	p=0,309	p=1,000	p=0,167
<b>Т стадијум</b>				
T1	88,9%(8/9)	100%(9/9)	100%(9/9)	100%(9/9)
T2	80%(8/10)	90%(9/10)	80%(8/10)	100%(10/10)
T3	77,3%(17/22)	95,5%(21/22)	95,5%(21/22)	95,5%(21/22)
T4	85,7%(6/7)	100(7/7)	100(7/7)	100(7/7)
р вредност	p=0,951	p=0,795	p=0,280	p=1,000
<b>N стадијум</b>				
N0	80%(32/40)	95%(38/40)	92,5%(37/40)	97,5%(39/40)
N1	100%(1/1)	100%(1/1)	100%(1/1)	100%(1/1)
N2	100%(6/6)	100%(6/6)	100%(6/6)	100%(6/6)
N3	0%(0/1)	100%(1/1)	100%(1/1)	100%(1/1)
р вредност	p=0,262	p=1,000	p=1,000	p=1,000
<b>M стадијум</b>				
M0	80,4%(37/46)	95,7%(44/46)	93,5%(43/46)	97,8%(45/46)
M1	100%(2/2)	100%(2/2)	100%(2/2)	100%(2/2)
р вредност	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=1,000
<b>Клинички стадијум</b>				
КС1	91,7%(11/12)	100%(12/12)	100%(12/12)	100%(12/12)
КС2	80%(8/10)	90%(9/10)	80%(8/10)	100%(10/10)
КС3	70,6%(12/17)	94,1%(16/17)	94,1%(16/17)	94,1%(16/17)
КС4	88,9%(8/9)	100%(9/9)	100%(9/9)	100%(9/9)
р вредност	p=0,520	p=0,819	p=0,316	p=1,000

T- примарни тумор, N- регионална проширеност у лимфне чворове на врату, M- удаљене метастазе;

#### **4.4.2. Зависност експресије cyclin D1, FGF3, p16, p21 од хистолошких карактеристика лезија ларинкса**

Испитали смо зависност експресије протеина cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са хистолошким градусом, нуклеарним градусом, присуством интраепителног карцинома (односно карцинома који није пробио базалну мембрану или carcinoma in situ), присуством или одсуством инвазивности, присуством васкуларне инвазије, инвазијом карцинома у лимфне судове околног ткива и перинеуралном инвазијом тумора у околна ткива. Ове особине одређују степен агресивности карцинома ларинкса. Експресија тумор маркера није статистички значајно повезана са наведеним особинама карцинома ларинкса (Табела 3).

**Табела 3. Хистолошке карактеристике карцинома ларинкса у зависности од експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21.**

	Cyclin D1+	FGF3+	p16+	p21+
<b>Хистолошки градус</b>				
ХГ1	82,6%(19/23)	91,3%(21/23)	91,3%(21/23)	95,7%(22/23)
ХГ2	81%(17/21)	100%(21/21)	95,2%(20/21)	100%(21/21)
ХГ3	75%(3/4)	100%(4/4)	100%(4/4)	100%(4/4)
р вредност	p=1,000	p=0,572	p=1,000	p=1,000
<b>Нуклеарни градус</b>				
НГ1	100%(8/8)	100%(8/8)	100%(8/8)	100%(8/8)
НГ2	77,1%(27/35)	94,3%(33/35)	91,4%(32/35)	97,1%(34/35)
НГ3	80%(4/5)	100%(5/5)	100%(5/5)	100%(5/5)
р вредност	p =0,402	p =1,000	p=1,000	p=1,000
<b>Интраепителни карцином</b>				
Присутан	81%(17/21)	95,2%(20/21)	95,2%(20/21)	100%(21/21)
Није присутан	81,5%(22/27)	96,3%(26/27)	92,6%(25/27)	96,3%(26/27)
р вредност	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=0,373
<b>Инвазивност</b>				
Присутна	80,4%(37/46)	95,7%(44/46)	93,5%(43/46)	97,8%(45/46)
Није присутна	100%(2/2)	100%(2/2)	100%(2/2)	100%(2/2)
р вредност	p =1,000	p =1,000	p=1,000	p=1,000
<b>Васкуларна инвазија</b>				
Присутна	66,7%(2/3)	100%(3/3)	100%(3/3)	100%(3/3)
Није присутна	82,2%(37/45)	95,6%(43/45)	93,3%(42/45)	97,8%(44/45)
р вредност	p =0,472	p =1,000	p=1,000	p=1,000
<b>Инвазија карцинома у лимфне судове околног ткива</b>				
Присутна	50%(3/6)	100%(6/6)	100%(6/6)	100%(6/6)
Није присутна	85,7%(36/42)	95,2%(40/42)	92,9%(39/42)	97,6%(41/42)
р вредност	p =0,071	p =1,000	p=1,000	p=1,000
<b>Перинеурална инвазија</b>				
Присутна	75%(3/4)	100%(4/4)	100%(4/4)	100%(4/4)
Није присутна	81,8%(36/44)	95,5%(42/44)	93,2%(41/44)	97,7%(43/44)
р вредност	p =1,000	p =1,000	p=1,000	p=1,000

ХГ-хистолошки градус, НГ-нуклеарни градус,  
р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-овим

Испитали смо и зависност експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 од степена некрозе карцинома, вредности митотског индекса, стромалне мононуклеарне реакције и дезмоплазија. Ово су показатељи агресивности карцинома ларинкса, али и антитуморског имунског одговора организма (Табела 4). Наша истраживања нису показала битну повезаност експресије протеина cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са поменутиим особинама карцинома ларинкса.

**Табела4. Повезаност експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са некрозом, митотским индексом, стромалном мононуклеарном реакцијом и дезмоплазијом карцинома ларинкса.**

	Cyclin D1+	FGF3+	p16+	p21+
<b>Некроза</b>				
0	80%(8/10)	90%(9/10)	100%(10/10)	100%(10/10)
1	66,7%(14/21)	95,2%(20/21)	90,5%(19/21)	95,2%(20/21)
2	100%(11/11)	100%(11/11)	90,9%(10/11)	100%(11/11)
3	100%(6/6)	100%(6/6)	100%(6/6)	100%(6/6)
р вредност	p=0,076	p=0,795	p=1,000	p=1,000
<b>Митотски индекс</b>				
1	88,2%(15/17)	94,1%(16/17)	94,1%(16/17)	94,1%(16/17)
2	81,5%(22/27)	96,3%(26/27)	92,6%(25/27)	100%(27/27)
3	50%(2/4)	100%(4/4)	100%(4/4)	100%(4/4)
р вредност	p=0,216	p=1,000	p=1,000	p=0,437
<b>Стромална мононуклеарна реакција</b>				
0	100%(2/2)	100%(2/2)	50%(1/2)	100%(2/2)
1	80%(12/15)	100%(15/15)	93,3%(14/15)	100%(15/15)
2	72,2%(13/18)	94,4%(17/18)	94,4%(17/18)	100%(18/18)
3	92,3%(12/13)	92,3%(12/13)	100%(13/13)	92,3%(12/13)
р вредност	p=0,584	p=0,761	p=0,165	p=0,312
<b>Дезмоплазија</b>				
0	100%(3/3)	100%(3/3)	100%(3/3)	100%(3/3)
1	76,5%(26/34)	94,1%(32/34)	94,1%(32/34)	97,1%(33/34)
2	90,9%(10/11)	100%(11/11)	90,9%(10/11)	100%(11/11)
р вредност	p=0,559	p=1,000	p=1,000	p=1,000

р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-

## **4.5. ИСТРАЖИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ИНТЕНЗИТЕТА ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 И p21 СА КЛИНИЧКИМ И ХИСТОЛОШКИМ ПАРАМЕТРИМА ЛАРИНГЕАЛНОГ КАРЦИНОМА**

Интензитети експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 су подељени на основу процента обојених ћелија у односу на укупан број посматраних ћелија на: интензитет 1 који означава 1–10% обојених једара, интензитет 2- означава 11–50% обојених једара и интензитет 3 који означава 50–100% обојених једара. Испитали смо повезаност појединачних интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16, p21 са клиничким хистолошким карактеристикама лезија ларинкса.

### **4.5.1. Зависност интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 од клиничких карактеристика карцинома ларинкса**

Испитали смо повезаност интензитета експресије cyclin-a D1, FGF3, p16 и p21 са: 1. старошћу, 2. полом, 3. на малигнитет позитивном породичном и 4. личном анамнезом, 5. конзумирањем дувана и алкохола, 6. ледираним анатомским субрегионом ларинкса, 7. начином раста карцинома, 8. клиничким TNM стадијумом карцинома и 9. клиничким стадијумом малигне болести код карцинома ларинкса. Експресија ових маркера није могла да се повеже са старошћу, породичном и личном анамнезом, конзумирањем дувана и алкохола, ледираним анатомским субрегионом ларинкса, клиничким TNM стадијумом карцинома и клиничким стадијумом малигне болести.

Код мушкараца је регистрована значајно израженија експресија виших интензитета FGF3 него код жена (Fisher exact test=9,630; p=0,009), што је јасно приказано у Табели 6. Инфилтративни начин раста је доминантан у односу на вегетантан, у погледу експримирања виших интензитета експресије p21 (2 и 3), што је приказано у Табели 12

(Fisher-ов тест =8,553; p=0,026). Код осталих испитаних клиничких карактеристика подједнако су експримирани сви интензитети cyclin D1, FGF3 и p21 (Табела 5 –12).

**Табела 5. Повезаност интензитета експресије cyclin D1 са старошћу, полом, претходном малигном болести у фамилији, позитивном личном анамнезом на малигнитет и конзумирањем дувана и алкохола.**

Cyclin D1	0	1	2	3
<b>Старост (године)</b>				
<50	20%(1/5)	40%(2/5)	40%(3/5)	0%(0/5)
>50	18,61%(8/43)	39,5%(17/43)	27,9%(12/43)	14%(6/43)
р вредност	p=1,000			
<b>Пол</b>				
мушки	18,6%(8/43)	39,5%(17/43)	30,2%(13/43)	11,6%(5/43)
женски	20%(1/5)	40%(2/5)	20%(1/5)	20%(1/5)
р вредност	p=0,918			
<b>Претходна малигна болест у породици</b>				
Позитивна	16,2%(6/37)	40,5%(15/37)	29,7%(11/37)	13,5%(5/37)
Негативна	27,3%(3/11)	36,4%(4/11)	27,3%(3/11)	9,1%(1/11)
р вредност	p=0,889			
<b>Претходна малигна болест</b>				
Позитивна	21,4%(9/42)	40,5%(17/42)	23,8%(10/42)	14,3%(6/42)
Негативна	0%(0/10)	33,3%(2/10)	66,7%(4/10)	0(0/10)
р вредност	p=0,224			
<b>Конзумирање дувана и алкохола</b>				
Присутно	19,1%(9/47)	40,4%(19/47)	27,7%(13/47)	12,8%(6/47)
Није присутно	0%(0/1)	0%(0/1)	100%(1/1)	0%(0/1)
р вредност	p=0,604			

р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-овим

**Табела 6. Повезаност интензитета експресије FGF3 са старошћу, полом, претходном малигном болести у фамилији, позитивном личном анамнезом на малигнитет и конзумирањем дувана и алкохола.**



FGF3	0	1	2	3
<b>Старост (године)</b>				
<50	0%(0/5)	0%(0/5)	20%(1/5)	80%(4/5)
>50	4,7%(2/43)	14%(6/43)	37,2%(16/43)	44,2%(19/43)
р вредност	p=0,533			
<b>Пол</b>				
мушки	0%(0/43)	14%(6/43)	34,9%(15/43)	51,2%(22/43)
женски	40%(2/5)	0%(0/5)	40%(2/5)	20%(1/5)
р вредност	<b>Fisher exact test=9,630; *p=0,009</b>			
<b>Претходна малигна болест у породици</b>				
Позитивна	0%(0/11)	18,2%(2/11)	27,3%(3/11)	54,5%(6/37)
Негативна	5,4%(2/37)	10,8%(4/37)	37,8%(14/37)	45,9%(17/37)
р вредност	p=0,828			
<b>Претходна малигна болест</b>				
Позитивна	0%(0/6)	16,7%(1/6)	66,7%(4/6)	16,7%(1/6)
Негативна	4,8%(2/42)	11,9%(5/42)	31%(13/42)	52,4(22/42)
р вредност	p=0,223			
<b>Конзумирање дувана и алкохола</b>				
Присутно	4,3%(2/47)	12,8%(6/47)	36,2%(17/47)	46,8%(22/47)
Није присутно	0%(0/1)	0%(0/1)	0%(0/1)	100%(1/1)
р вредност	p=1,000			

р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-овим

Табела 7. Повезаност интензитета експресије p16 са старошћу, полом, претходном малигном болести у фамилији, позитивном личном анамнезом на малигнитет и конзумирањем дувана и алкохола.

p16	0	1	2	3
<b>Старост (године)</b>				
<50	0%(0/5)	0%(0/5)	40%(2/5)	60%(3/5)
>50	7%(3/43)	11,6%(5/43)	41,9%(18/43)	39,5%(17/43)
p вредност	p=1,000			
<b>Пол</b>				
мушки	7%(3/43)	11,6%(5/43)	37,2%(16/43)	44,2%(19/43)
женски	0%(0/5)	0%(0/5)	80%(4/5)	20%(1/5)
p вредност	p=0,445			
<b>Претходна малигна болест у породици</b>				
Позитивна	9,1%(1/11)	9,1%(1/11)	36,4%(4/11)	45,5%(5/37)
Негативна	5,4%(2/37)	10,8%(4/37)	43,2%(16/37)	40,5%(15/37)
p вредност	p=0,947			
<b>Претходна малигна болест</b>				
Позитивна	16,7%(1/6)	0%(0/6)	66,7%(4/6)	16,7%(1/6)
Негативна	4,8%(2/42)	11,9%(5/42)	38,1%(16/42)	45,2(19/42)
p вредност	p=0,203			
<b>Конзумирање дувана и алкохола</b>				
Присутно	6,4%(3/47)	10,6%(5/47)	40,4%(19/47)	42,6%(20/47)
Није присутно	0%(0/1)	0%(0/1)	100%(1/1)	0%(0/1)
p вредност	p=1,000			

p вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-овим

**Табела 8. Повезаност интензитета експресије p21 са старошћу, полом, претходном малигном болести у фамилији, позитивном личном анамнезом на малигнитет и конзумирањем дувана и алкохола.**

p21	0	1	2	3
-----	---	---	---	---

Старост (године)				
<50	0%(0/5)	0%(0/5)	20%(1/5)	80%(4/5)
>50	2,3%(1/43)	7%(3/43)	41,9%(18/43)	48,8%(21/43)
р вредност	p=0,601			
Пол				
мушки	0%(0/43)	7%(3/43)	37,2%(16/43)	55,8%(24/43)
женски	20%(1/5)	0%(0/5)	60%(3/5)	20%(1/5)
р вредност	p=0,086			
Претходна малигна болест у породици				
Позитивна	0%(0/11)	18,2%(2/11)	27,3%(3/11)	54,5%(6/11)
Негативна	2,7%(1/37)	2,7%(1/37)	43,2%(16/37)	51,4%(19/37)
р вредност	p=0,270			
Претходна малигна болест				
Позитивна	0%(0/6)	16,7%(1/6)	16,7%(1/6)	66,7%(4/6)
Негативна	2,4%(1/42)	4,8%(2/42)	42,9%(18/42)	50%(21/42)
р вредност	p=0,270			
Конзумирање дувана и алкохола				
Присутно	2,1%(1/47)	6,4%(3/47)	40,4%(19/47)	51,1%(24/47)
Није присутно	0%(0/1)	0%(0/1)	0%(0/1)	100%(1/1)
р вредност	p=1,000			

р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-овим

Табела 9. Зависност интензитета експресије cyclin D1 од захваћеног анатомског региона ларинкса, начина раста карцинома, TNM стадијума и клиничког стадијума малигне болести.

Cyclin D1	0	1	2	3
Анатомски регион				

Глотис	11,1%(1/9)	55,6%(5/9)	22,2%(2/9)	11,1%(1/9)
Супраглотис	12,5%(1/8)	37,5%(3/8)	37,5%(3/8)	12,5%(1/8)
Глотис+Супраглотис	22,6%(7/31)	35,5%(11/31)	29,2%(9/31)	12,5%(4/31)
р вредност	p=0,971			
<b>Начин раста карцинома</b>				
Веgetантан	37,5%(3/8)	25%(2/8)	37,5%(3/8)	0%(0/8)
Инфилтративан	15%(6/40)	42,5%(17/40)	27,5%(11/40)	15%(6/40)
р вредност	p=0,297			
<b>Т стадијум</b>				
T1	11,1%(1/9)	55,6%(5/9)	22,2%(2/9)	11,1%(1/9)
T2	20%(2/10)	30%(3/10)	40%(4/10)	10%(1/10)
T3	22,7%(5/22)	40,9%(9/22)	27,3%(6/22)	9,1%(2/22)
T4	14,3%(1/7)	28,6%(2/7)	28,6%(2/7)	28,6% (2/7)
р вредност	p=0,950			
<b>N стадијум</b>				
N0	20%(8/40)	40%(16/40)	27,5%(11/40)	12,5%(5/40)
N1	0%(0/1)	0%(0/1)	100%(1/1)	0%(0/1)
N2	0%(0/6)	50%(3/6)	33,3%(2/6)	16,7%(1/6)
N3	100%(1/1)	0%(0/1)	0%(0/1)	0%(0/1)
р вредност	p=0,604			
<b>M стадијум</b>				
M0	19,6%(9/46)	41,3%(19/46)	28,3%(13/46)	10,9%(5/46)
M1	0%(0/2)	0%(0/2)	50%(1/2)	50%(1/2)
р вредност	p=0,168			
<b>Клинички стадијум</b>				
КС1	8,3%(1/12)	58,3%(7/12)	25%(3/12)	8,3%(1/12)
КС2	20%(2/10)	30%(3/10)	40%(4/10)	10%(1/10)
КС3	29,4%(5/17)	35,3%(6/17)	23,5%(4/17)	11,8%(2/17)
КС4	11,1%(1/9)	33,3%(3/9)	33,3%(3/9)	22,2%(2/9)
р вредност	p=0,877			
Т- примарни тумор, N- регионална проширеност у лимфне чворове на врату, М- удаљене метастазе.				

**Табела 10. Зависност интензитета експресије FGF3 од захваћеног анатомског региона ларинка, начина раста карцинома, TNM стадијума и клиничког стадијума малигне болести.**

FGF3	0	1	2	3
<b>Анатомски регион</b>				
Глотис	11,1%(1/9)	0%(0/9)	33,3%(3/9)	55,6%(5/9)
Супраглотис	0%(0/8)	0%(0/8)	37,5%(3/8)	62,5%(5/8)

Глотис+Супраглотис	3,2%(1/31)	19,4%(6/31)	35,5%(11/31)	41,9%(13/31)
р вредност	p=0,569			
<b>Начин раста карцинома</b>				
Веgetантан	12,5%(1/8)	12,5%(1/8)	62,5%(5/8)	12,5%(1/8)
Инфилтративан	2,5%(1/40)	12,5%(5/40)	30%(12/40)	55%(22/40)
р вредност	p=0,078			
<b>Т стадијум</b>				
T1	0%(0/9)	0%(0/9)	44,4%(4/9)	55,6%(5/9)
T2	10%(1/10)	10%(1/10)	40%(4/10)	40%(4/10)
T3	4,5%(1/22)	18,2%(4/22)	36,4%(8/22)	40,9%(9/22)
T4	0%(0/7)	14,3%(1/7)	14,3%(1/7)	71,4% (5/7)
р вредност	p=0,818			
<b>N стадијум</b>				
N0	5%(2/40)	10%(4/40)	37,5%(15/40)	47,5%(19/40)
N1	0%(0/1)	0%(0/1)	0%(0/1)	100%(1/1)
N2	0%(0/6)	16,7%(1/6)	33,3%(2/6)	50%(3/6)
N3	0%(0/1)	100%(1/1)	0%(0/1)	0%(0/1)
р вредност	p=0,573			
<b>M стадијум</b>				
M0	4,3%(2/46)	13%(6/46)	37%(17/46)	45,7%(21/46)
M1	0%(0/2)	0%(0/2)	0%(0/2)	100%(2/2)
р вредност	p=0,653			
<b>Клинички стадијум</b>				
КС1	0%(0/12)	0%(0/12)	41,7%(5/12)	58,3%(7/12)
КС2	10%(1/10)	10%(1/10)	40%(4/10)	40%(4/10)
КС3	5,9%(1/17)	17,6%(3/17)	35,3%(6/17)	41,2%(7/17)
КС4	0%(0/9)	22,2%(2/9)	22,2%(2/9)	55,6%(5/9)
р вредност	p=0,801			

T- примарни тумор, N- регионална проширеност у лимфне чворове на врату, M- удаљене метастазе;

**Табела 11. зависност интензитета експресије p16 од захваћеног анатомског региона ларинкса, начина раста карцинома, TNM стадијума и клиничког стадијума малигне болести.**

p16	0	1	2	3
<b>Анатомски регион</b>				
Глотис	0%(0/9)	0%(0/9)	55,6%(5/9)	44,4%(4/9)
Супраглотис	25%(2/8)	12,5%(1/8)	12,5%(1/8)	50%(4/8)
Глотис+Супраглотис	3,2%(1/31)	12,9%(4/31)	45,2%(14/31)	38,7%(12/31)
р вредност	p=0,218			

Начин раста карцинома				
Вегетантан	0%(0/8)	0%(0/8)	75%(6/8)	25%(2/8)
Инфилтративан	7,5%(3/40)	12,5%(5/40)	35%(14/40)	45%(18/40)
р вредност	p=0,078			
Т стадијум				
T1	0%(0/9)	11,1%(1/9)	44,4%(4/9)	44,4%(4/9)
T2	20%(2/10)	0%(0/10)	30%(3/10)	50%(5/10)
T3	4,5%(1/22)	18,2%(4/22)	40,9%(9/22)	36,4%(8/22)
T4	0%(0/7)	0%(0/7)	57,1%(4/7)	42,9%(3/7)
р вредност	p=0,731			
N стадијум				
N0	7,5%(3/40)	10%(4/40)	40%(16/40)	42,5%(17/40)
N1	0%(0/1)	0%(0/1)	100%(1/1)	0%(0/1)
N2	0%(0/6)	16,7%(1/6)	33,3%(2/6)	50%(3/6)
N3	0%(0/1)	0%(0/1)	100%(1/1)	0%(0/1)
р вредност	p=0,931			
M стадијум				
M0	6,5%(3/46)	10,9%(5/46)	41,3%(19/46)	41,3%(19/46)
M1	0%(0/2)	0%(0/2)	50%(1/2)	50%(1/2)
р вредност	p=1,000			
Клинички стадијум				
КС1	0%(0/12)	8,3%(1/12)	41,7%(5/12)	50%(6/12)
КС2	20%(2/10)	0%(0/10)	30%(3/10)	50%(5/10)
КС3	5,9%(1/17)	17,6%(3/17)	47,1%(8/17)	29,4%(5/17)
КС4	0%(0/9)	11,1%(1/9)	44,4%(4/9)	44,4%(4/9)
р вредност	p=0,741			

T- примарни тумор, N- регионална проширеност у лимфне чворове на врату, M- удаљене метастазе,

Табела 12: Зависност интензитета експресије p21 од захваћеног анатомског региона ларинкса, начина раста карцинома, TNM стадијума и клиничког стадијума малигне болести.

p21	0	1	2	3
Анатомски регион				
Глотис	0%(0/9)	0%(0/9)	44,4%(4/9)	55,6%(5/9)
Супраглотис	0%(0/8)	0%(0/8)	37,5%(3/8)	62,5%(5/8)
Глотис+Супраглотис	3,2%(1/31)	9,7%(3/31)	38,7%(12/31)	48,4%(15/31)
р вредност	p=1,000			
Начин раста карцинома				
Вегетантан	12,5%(1/8)	25%(2/8)	25%(2/8)	37,5%(3/8)

Инфилтративан	0%(0/40)	2,5%(1/40)	42,5%(17/40)	55%(22/40)
р вредност	Fisher exact test=8,553; *p=0,026			
<b>Т стадијум</b>				
T1	0%(0/9)	0%(0/9)	44,4%(4/9)	55,6%(5/9)
T2	0%(0/10)	0%(0/10)	50%(5/10)	50%(5/10)
T3	4,5%(1/22)	9,1%(2/22)	40,9%(9/22)	45,5%(10/22)
T4	0%(0/7)	14,3%(1/7)	14,3%(1/7)	71,4%(5/7)
р вредност	p=0,822			
<b>Н стадијум</b>				
N0	2,5%(1/40)	2,5%(1/40)	42,5%(17/40)	52,5%(21/40)
N1	0%(0/1)	0%(0/1)	0%(0/1)	100%(1/1)
N2	0%(0/6)	16,7%(1/6)	33,3%(2/6)	50%(3/6)
N3	0%(0/1)	100%(1/1)	0%(0/1)	0%(0/1)
р вредност	p=0,143			
<b>М стадијум</b>				
M0	2,2%(1/46)	6,5%(3/46)	39,1%(18/46)	52,2%(24/46)
M1	0%(0/2)	0%(0/2)	50%(1/2)	50%(1/2)
р вредност	p=1,000			
<b>Клинички стадијум</b>				
КС1	0%(0/12)	0%(0/12)	33,3%(4/12)	66,7%(8/12)
КС2	0%(0/10)	0%(0/10)	50%(5/10)	50%(5/10)
КС3	5,9%(1/17)	5,9%(1/17)	47,1%(8/17)	41,2%(7/17)
КС4	0%(0/9)	22,2%(2/9)	22,2%(2/9)	55,6%(5/9)
р вредност	p=0,533			

T- примарни тумор, N- регионална проширеност у лимфне чворове на врату, M- удаљене метастазе;

#### 4.5.2. Одређивање повезаности интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са хистолошким карактеристикама карцинома ларинкса

Анализирали смо везу интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са следећим хистолошким карактеристикама карцинома ларинкса: 1. хистолошким градусом, 2. нуклеарним градусом, 3. присуством интраепителног карцинома, 4. присуством или одсуством инвазивности, 5. присуством васкуларне инвазије, 6. инвазијом карцинома у лимфне судове околног ткива, 7. перинеуралном инвазијом тумора у околна ткива, 8. некрозом, 9. митотским индексом, 10. стромалном моноклеарном реакцијом и 11. дезмоплазијом код карцинома ларинкса (Табеле 13–20).

**Табела 13. Хистолошки и нуклеарни градус, интраепителни карцином, инвазивност, васкуларна инвазија, инвазија карцинома у лимфне судове околног ткива и перинеурална инвазија карцинома ларикса у зависности од интензитета експресије cyclin D1.**

Cyclin D1	0	1	2	3
<b>Хистолошки градус</b>				
ХГ1	17,4%(4/23)	43,5%(10/23)	21,7%(5/23)	17,4%(4/23)
ХГ2	19%(4/21)	38,1%(8/21)	38,1%(8/21)	4,8%(1/21)
ХГ3	25%(1/4)	25%(1/4)	25%(1/4)	25%(1/4)
р вредност	p=0,674			
<b>Нуклеарни градус</b>				
НГ1	0%(0/8)	62,5%(5/8)	12,5%(1/8)	25%(2/8)



НГ2	22,9%(8/35)	37,1%(13/35)	28,6%(10/35)	11,4%(4/35)
НГ3	20%(1/5)	20%(1/5)	60%(3/5)	0%(0/5)
р вредност	p=0,311			
<b>Интраепителни карцином</b>				
Присутан	18,5%(5/21)	40,7%(11/21)	25,9%(7/21)	14,8%(4/21)
Није присутан	18,8%(4/27)	39,6%(8/27)	29,2%(7/27)	12,5%(2/27)
р вредност	p=0,951			
<b>Инвазивност</b>				
Присутна	19,6%(9/46)	39,1%(18/46)	30,4%(14/46)	10,9%(5/46)
Није присутна	0%(0/2)	50%(1/2)	0%(0/2)	50%(1/2)
р вредност	p=0,349			
<b>Васкуларна инвазија</b>				
Присутна	33,3%(1/3)	33,3%(1/3)	0%(0/3)	33,3%(1/3)
Није присутна	17,8%(8/45)	40%(18/45)	31,1%(14/45)	11,1%(5/45)
р вредност	p=0,442			
<b>Инвазија карцинома у лимфне судове околног ткива</b>				
Присутна	50%(3/6)	16,7%(1/6)	0%(0/6)	33,3%(2/6)
Није присутна	14,3%(6/42)	42,9%(18/42)	33,3%(14/42)	9,5%(4/42)
р вредност	<b>Fisher exact test=7,903; p=0,019</b>			
<b>Перинеурална инвазија</b>				
Присутна	25%(1/4)	50%(2/4)	25%(1/4)	0%(0/4)
Није присутна	18,2%(8/44)	38,6%(17/44)	29,5%(13/44)	13,6%(6/44)
р вредност	p=1,000			

ХГ- хистолошки градус, НГ- нуклеарни градус,  
р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-овим

Табела 14. Хистолошки и нуклеарни градус, интраепителни карцином, инвазивност, васкуларна инвазија, инвазија карцинома у лимфне судове околног ткива и перинеурална инвазија карцинома ларинкса у зависности од интензитета експресије FGF3.

FGF3	0	1	2	3
<b>Хистолошки градус</b>				
ХГ1	8,7%(2/23)	13%(3/23)	34,8%(8/23)	43,5%(10/23)
ХГ2	0%(0/21)	9,5%(2/21)	42,9%(9/21)	47,6%(10/21)
ХГ3	0%(0/4)	25%(1/4)	0%(0/4)	75%(3/4)
р вредност	p=0,503			
<b>Нуклеарни градус</b>				
НГ1	0%(0/8)	25%(2/8)	12,5%(1/8)	62,5%(5/8)
НГ2	5,7%(2/35)	8,6%(3/35)	42,9%(15/35)	42,9%(15/35)

<b>НГ3</b>	0%(0/5)	20%(1/5)	20%(1/5)	60%(3/5)
<b>р вредност</b>	p=0,420			
<b>Интраепителни карцином</b>				
<b>Присутан</b>	4,8%(1/21)	9,5%(2/21)	42,9%(9/21)	42,9%(9/21)
<b>Није присутан</b>	3,7%(1/27)	14,8%(4/27)	29,6%(8/27)	51,9%(14/27)
<b>р вредност</b>	p=0,822			
<b>Инвазивност</b>				
<b>Присутна</b>	4,3%(2/46)	13%(6/46)	37%(17/46)	45,7%(21/46)
<b>Није присутна</b>	0%(0/2)	0%(0/2)	0%(0/2)	100%(2/2)
<b>р вредност</b>	p=0,653			
<b>Васкуларна инвазија</b>				
<b>Присутна</b>	0%(0/3)	33,3%(1/3)	33,3%(1/3)	33,3%(1/3)
<b>Није присутна</b>	4,4%(2/45)	11,1%(5/45)	35,6%(16/45)	48,9%(22/45)
<b>р вредност</b>	p=0,570			
<b>Инвазија карцинома у лимфне судове околног ткива</b>				
<b>Присутна</b>	0%(0/6)	16,7%(1/6)	50%(3/6)	33,3%(2/6)
<b>Није присутна</b>	4,8%(2/42)	11,9%(5/42)	33,3%(14/42)	50%(21/42)
<b>р вредност</b>	p=0,686			
<b>Перинеурална инвазија</b>				
<b>Присутна</b>	0%(0/4)	50%(2/4)	25%(1/4)	25%(1/4)
<b>Није присутна</b>	4,5%(2/44)	9,1%(4/44)	36,4%(16/44)	50%(22/44)
<b>р вредност</b>	p=0,183			

ХГ- хистолошки градус, НГ-нуклеарни градус,  
р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-овим

**Табела 15. Хистолошки и нуклеарни градус, интраепителни карцином, инвазивност, васкуларна инвазија, инвазија карцинома у лимфне судове околног ткива и перинеурална инвазија карцинома ларинкса у зависности од интензитета експресије р16.**

<b>р16</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Хистолошки градус</b>				
<b>ХГ1</b>	8,7%(2/23)	8,7%(2/23)	43,5%(10/23)	39,1%(9/23)
<b>ХГ2</b>	4,8%(1/21)	14,3%(3/21)	42,9%(9/21)	38,1%(8/21)
<b>ХГ3</b>	0%(0/4)	0%(0/4)	25%(1/4)	75%(3/4)
<b>р вредност</b>	p=0,945			
<b>Нуклеарни градус</b>				
<b>НГ1</b>	0%(0/8)	12,5%(1/8)	50%(4/8)	37,5%(3/8)
<b>НГ2</b>	8,6%(3/35)	11,4%(4/35)	40%(14/35)	40%(14/35)
<b>НГ3</b>	80%(0/5)	100%(0/5)	40%(2/5)	60%(3/5)

<b>р вредност</b>	p=1,000			
<b>Интраепителни карцином</b>				
<b>Присутан</b>	4,8%(1/21)	9,5%(2/21)	42,9%(9/21)	42,9%(9/21)
<b>Није присутан</b>	7,4%(2/27)	11,1%(3/27)	40,7%(11/27)	40,7%(11/27)
<b>р вредност</b>	p=1,000			
<b>Инвазивност</b>				
<b>Присутна</b>	6,5%(3/46)	10,9%(5/46)	41,3%(19/46)	41,3%(19/46)
<b>Није присутна</b>	0%(0/2)	0%(0/2)	50%(1/2)	50%(1/2)
<b>р вредност</b>	p=1,000			
<b>Васкуларна инвазија</b>				
<b>Присутна</b>	0%(0/3)	0%(0/3)	33,3%(1/3)	66,7%(2/3)
<b>Није присутна</b>	82,2%(3/45)	95,6%(5/45)	93,3%(19/45)	97,8%(18/45)
<b>р вредност</b>	p=1,000			
<b>Инвазија карцинома у лимфне судове околног ткива</b>				
<b>Присутна</b>	0%(0/6)	16,7%(1/6)	16,7%(1/6)	66,7%(4/6)
<b>Није присутна</b>	7,1%(3/42)	9,5%(4/42)	45,2%(19/42)	38,1%(16/42)
<b>р вредност</b>	p=0,418			
<b>Перинеурална инвазија</b>				
<b>Присутна</b>	0%(0/4)	25%(1/4)	50%(2/4)	25%(1/4)
<b>Није присутна</b>	6,8%(3/44)	9,1%(4/44)	40,9%(18/44)	43,2%(19/44)
<b>р вредност</b>	p=0,580			

ХГ- хистолошки градус, НГ-нуклеарни градус,  
 р вредности св добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-овим

Табела 16. Хистолошки и нуклеарни градус, интраепителни карцином, инвазивност, васкуларна инвазија, инвазија карцинома у лимфне судове околног ткива и перинеурална инвазија карцинома ларикса у зависности од интензитета експресије p21.

p21	0	1	2	3
<b>Хистолошки градус</b>				
<b>ХГ1</b>	4,3%(1/23)	4,3%(1/23)	47,8%(11/23)	43,5%(10/23)
<b>ХГ2</b>	0%(0/21)	4,8%(1/21)	38,1%(8/21)	57,1%(12/21)
<b>ХГ3</b>	0%(0/4)	25%(1/4)	0%(0/4)	75%(3/4)
<b>р вредност</b>	p=0,289			
<b>Нуклеарни градус</b>				
<b>НГ1</b>	0%(0/8)	0%(0/8)	37,5%(3/8)	62,5%(5/8)
<b>НГ2</b>	2,9%(1/35)	5,7%(2/35)	42,9%(15/35)	48,6%(17/35)
<b>НГ3</b>	0%(0/5)	20%(1/5)	20%(1/5)	60%(3/5)
<b>р вредност</b>	p=0,669			

<b>Интраепителни карцином</b>				
Присутан	0%(0/21)	0%(0/21)	47,6%(10/21)	52,4%(11/21)
Није присутан	3,7%(1/27)	11,1%(3/27)	33,3%(9/27)	51,9%(14/27)
р вредност	p=0,335			
<b>Инвазивност</b>				
Присутна	2,2%(1/46)	6,5%(3/46)	41,3%(19/46)	50%(23/46)
Није присутна	0%(0/2)	0%(0/2)	0%(0/2)	100%(2/2)
р вредност	p=0,579			
<b>Васкуларна инвазија</b>				
Присутна	0%(0/3)	33,3%(1/3)	0%(0/3)	66,7%(2/3)
Није присутна	2,2%(1/45)	4,4%(2/45)	42,2%(19/45)	51,1%(23/45)
р вредност	p=0,152			
<b>Инвазија карцинома у лимфне судове околног ткива</b>				
Присутна	0%(0/6)	16,7%(1/6)	33,3%(2/6)	50%(3/6)
Није присутна	2,4%(1/42)	4,8%(2/42)	40,5%(17/42)	52,4%(22/42)
р вредност	p=0,642			
<b>Перинеурална инвазија</b>				
Присутна	0%(0/4)	75%(3/4)	25%(1/4)	0%(0/4)
Није присутна	2,3%(1/44)	0%(0/44)	40,9%(18/44)	56,8%(25/44)
р вредност	<b>Fisher exact test=17,280; p=0,001</b>			

ХГ- хистолошки градус, НГ-нуклеарни градус,  
р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-овим

**Табела 17. Некроза, митотски индекс, стромална мононуклеарна реакција и дезмоплазија и њихова веза са интензитетима cyclin D1 код карцинома ларинкса.**

Cyclin D1	0	1	2	3
Некроза				
0	20%(2/10)	30%(3/10)	10%(1/10)	40%(4/10)
1	33,3%(7/21)	38,1%(8/21)	28,6%(6/21)	0%(0/21)
2	0%(0/11)	45,5%(5/11)	36,4%(4/11)	18,2%(2/11)
3	0%(0/6)	50%(3/6)	50%(3/6)	0%(0/6)
р вредност	<b>Fisher exact test=15,819; *p=0,033</b>			
Митотски индекс				
1	11,8%(2/17)	58,8%(10/17)	11,8%(2/17)	17,6%(3/17)
2	18,5%(5/27)	29,6%(8/27)	40,7%(11/27)	11,1%(3/27)
3	50%(2/4)	25%(1/4)	25%(1/4)	0%(0/4)
р вредност	p=0,162			
Стромална мононуклеарна реакција				

0	0%(0/2)	0%(0/2)	100%(2/2)	0%(0/2)
1	20%(3/15)	53,3%(8/15)	26,7%(4/15)	0%(0/15)
2	27,8%(5/18)	33,3%(6/18)	16,7%(3/18)	22,2%(4/18)
3	7,7%(1/13)	38,5%(5/13)	38,5%(5/13)	15,4%(2/13)
р вредност	p=0,256			
<b>Дезмоплазија</b>				
0	0%(0/3)	33,3%(1/3)	33,3%(1/3)	33,3%(1/3)
1	23,5%(8/34)	38,2%(13/34)	26,5%(9/34)	11,8%(4/34)
2	9,1%(1/11)	45,5%(5/11)	36,4%(4/11)	9,1%(1/11)
р вредност	p=0,827			

р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-

**Табела 18. Некроза, митотски индекс, стромална мононуклеарна реакција и дезмоплазија и њихова веза са интензитетима FGF3 код карцинома ларинкса.**

FGF3	0	1	2	3
<b>Некроза</b>				
0	10%(1/10)	10%(1/10)	30%(3/10)	50%(5/10)
1	4,8%(1/21)	23,8%(5/21)	38,1%(8/21)	33,3%(7/21)
2	0%(0/11)	0%(0/11)	27,3%(3/11)	72,7%(8/11)
3	0%(0/6)	0%(0/6)	50%(3/6)	50%(3/6)
р вредност	p=0,509			
<b>Митотски индекс</b>				
1	5,9%(1/17)	23,5%(4/17)	17,6%(3/17)	52,9%(9/17)
2	3,7%(1/27)	3,7%(1/27)	44,4%(12/27)	48,1%(13/27)
3	0%(0/4)	25%(1/4)	50%(2/4)	25%(1/4)
р вредност	p=0,166			
<b>Стромална мононуклеарна реакција</b>				
0	0%(0/2)	0%(0/2)	100%(2/2)	0%(0/2)

1	0%(0/15)	20%(3/15)	40%(6/15)	40%(6/15)
2	5,6%(1/18)	5,6%(1/18)	33,3%(6/18)	55,6%(10/18)
3	7,7%(1/13)	15,4%(2/13)	23,1%(3/13)	53,8%(7/13)
р вредност	p=0,601			
<b>Дезмоплазија</b>				
0	0%(0/3)	0%(0/3)	33,3%(1/3)	66,7%(2/3)
1	5,9%(2/34)	8,8%(3/34)	35,3%(12/34)	50%(17/34)
2	0%(0/11)	27,3%(3/11)	36,4%(4/11)	36,4%(4/11)
р вредност	p=0,717			

р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-

**Табела 19. Некроза, митотски индекс, стромална мононуклеарна реакција и дезмоплазија и њихова веза са интензитетима p16 код карцинома ларинкса.**

p16	0	1	2	3
<b>Некроза</b>				
0	0%(0/10)	20%(2/10)	60%(6/10)	20%(2/10)
1	9,5%(2/21)	9,5%(2/21)	42,9%(9/21)	38,1%(8/21)
2	9,1%(1/11)	0%(0/11)	9,1%(1/11)	81,8%(9/11)
3	0%(0/6)	16,7%(1/6)	66,7%(4/6)	16,7%(1/6)
р вредност	<b>Fisher exact test=14,009; *p=0,050</b>			
<b>Митотски индекс</b>				
1	5,9%(1/17)	11,8%(2/17)	41,2%(7/17)	41,2%(7/17)
2	7,4%(2/27)	11,1%(3/27)	37,0%(10/27)	44,4%(12/27)
3	0%(0/4)	0%(0/4)	75%(3/4)	25%(1/4)
р вредност	p=0,967			
<b>Стромална мононуклеарна реакција</b>				
0	50%(1/2)	0%(0/2)	50%(1/2)	0%(0/2)
1	6,7%(1/15)	20%(3/15)	33,3%(5/15)	40%(6/15)

2	5,6%(1/18)	0%(0/18)	38,9%(7/18)	55,6%(10/18)
3	0%(0/13)	15,4%(2/13)	53,8%(7/13)	30,8%(4/13)
р вредност	p=0,201			
<b>Дезмоплазија</b>				
0	0%(0/3)	0%(0/3)	33,3%(1/3)	66,7%(2/3)
1	5,9%(2/34)	8,8%(3/34)	35,3%(12/34)	50%(17/34)
2	0%(0/11)	27,3%(3/11)	36,4%(4/11)	36,4%(4/11)
р вредност	p=0,717			

р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-

**Табела 20. Некроза, митотски индекс, стромална мононуклеарна реакција и дезмоплазија и њихова веза са интензитетима р21 код карцинома ларинкса.**

р21	0	1	2	3
<b>Некроза</b>				
0	0%(0/10)	0%(0/10)	70%(7/10)	30%(3/10)
1	4,8%(1/21)	14,3%(3/21)	38,1%(8/21)	42,9%(9/21)
2	0%(0/11)	0%(0/11)	9,1%(1/11)	90,9%(10/11)
3	0%(0/6)	0%(0/6)	50%(3/6)	50%(3/6)
р вредност	p=0,061			
<b>Митотски индекс</b>				
1	5,9%(1/17)	5,9%(1/17)	29,4%(5/17)	58,8%(10/17)
2	0%(0/27)	3,7%(1/27)	44,4%(12/27)	51,9%(14/27)
3	0%(0/4)	25%(1/4)	50%(2/4)	25%(1/4)
р вредност	p=0,350			
<b>Стромална мононуклеарна реакција</b>				
0	0%(0/2)	0%(0/2)	50%(1/2)	50%(1/2)
1	0%(0/15)	6,7%(1/15)	33,3%(5/15)	60%(9/15)
2	0%(0/18)	5,6%(1/18)	33,3%(6/18)	61,1%(11/18)
3	7,7%(1/13)	7,7%(1/13)	53,8%(7/13)	30,8%(4/13)

р вредност	р=0,700			
Дезмоплазија				
0	0%(0/3)	0%(0/3)	66,6%(2/3)	33,3%(1/3)
1	2,9%(1/34)	0%(0/34)	38,2%(13/34)	58,8%(20/34)
2	2,1%(0/11)	27,3%(3/11)	36,4%(4/11)	36,4%(4/11)
р вредност	р=0,061			
р вредности су добијене $\chi^2$ тестом и Fisher-				

Интензитети експресије су за cyclin D1 статистички значајно повезани са одсуством инвазије карцинома ларинкса у лимфне судове околног ткива, што је приказано у Табели 13 (Fisher-ов тест=7,903,  $p=0,019$ ). Интензитети експресије овог тумор маркера се значајно разликују код појединих степена некрозе, што се јасно види у Табели 17 (Fisher-ов тест=15,819;  $p=0,033$ ). Интензитети експресије p21 су у статистички значајној вези са одсуством перинеуралне инвазије карцинома ларинкса, Табела 16 (Fisher-ов тест=17,280;  $p=0,001$ ). Слично претходном маркеру и интензитети експресије p16 су у значајној статистичкој вези са различитим степенима некрозе карцинома ларинкса (Fisher-ов тест=14,009;  $p=0,050$ )–Табела 19.

#### 4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 И p21 СА СТЕПЕНОМ ДИСПЛАЗИЈЕ ХРОНИЧНОГ ЛАРИНГИТИСА

Испитали смо зависност експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 од степена дисплазије код хроничног ларингитиса и установили да нема статистички значајне повезаности (Табела 21).

Табела 21. Повезаност експресије cyclin D1, FGF3, p16, p21 са степеном дисплазије ларингеалне слузнице.

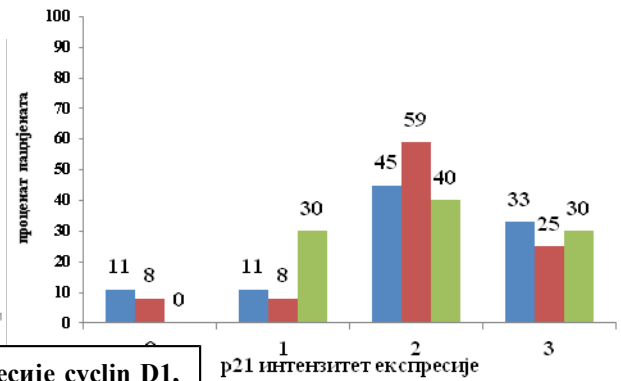
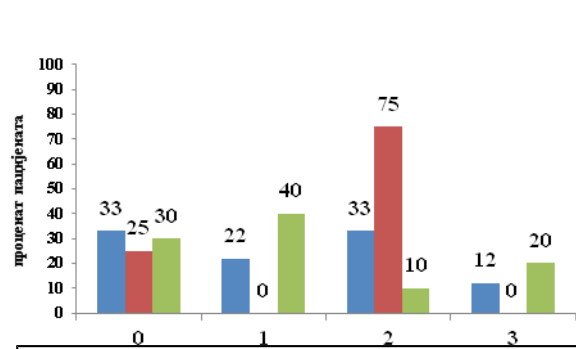
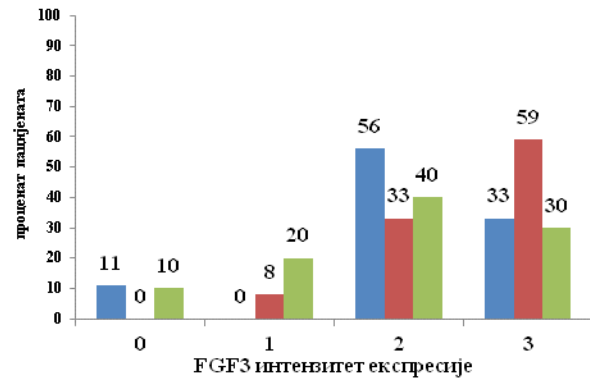
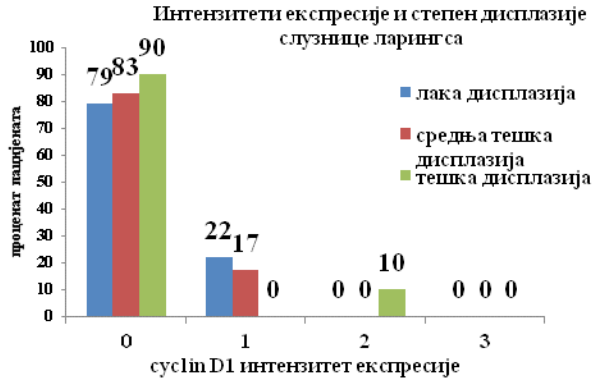


	Cyclin D1+	FGF3+	p16+	p21+
<b>Степен дисплазије</b>				
лака	22,2%(2/9)	88,9%(8/9)	66,7%(6/9)	88,9%(8/9)
умерена	16,7%(2/12)	100%(12/12)	75%(9/12)	91,7%(11/12)
тешка	10%(1/10)	90%(9/10)	70%(7/10)	100%(10/10)
<b>р вредност</b>	p=0,843	p=0,510	p=1,000	p=0,742

р вредности су добијене  $\chi^2$  тестом и Fisher-овим

#### 4.7. ОДРЕЂИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ИНТЕНЗИТЕТА ЕКСПРЕСИЈЕ CYCLIN D1, FGF3, p16 И p21 СА СТЕПЕНОМ ДИСПЛАЗИЈЕ ХРОНИЧНОГ ЛАРИНГИТИСА

Анализирали смо зависност интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 од степена дисплазије. Наши резултати показују да постоји повезаност интензитета експресије p16 са степеном дисплазије, а при томе је p16 интензитет експресије 2 присутан са највишим процентом код дисплазије средњег степена ( $p < 0,05$ ). Нисмо установили значајну повезаност интензитета експресије cyclin D1, FGF3, и p21 са степеном дисплазије ( $p > 0,05$ ), што се јасно уочава на Графикону 16.



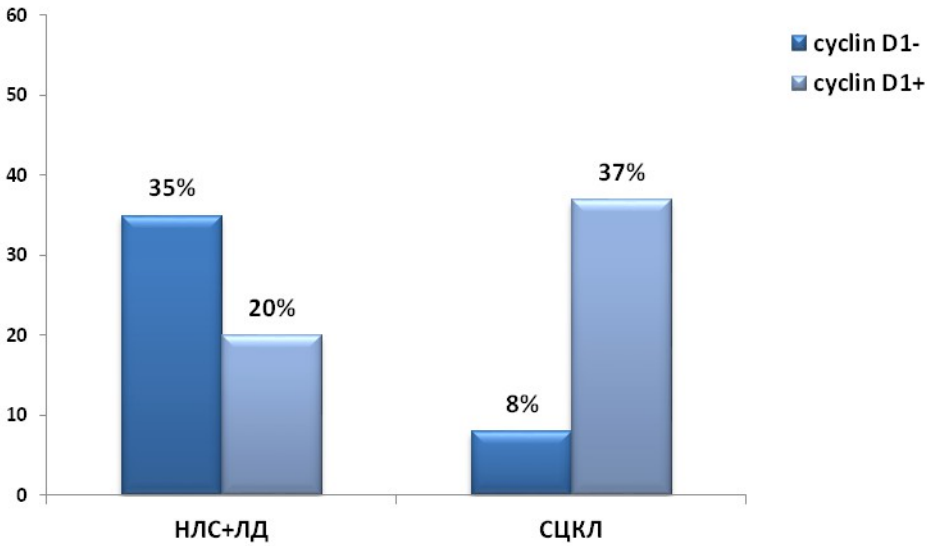
**Графикон 16. Зависност интензитета експресије sucln D1, FGF3, p16 и p21 од степена дисплазије слузнице ларинкса.**

0-одсуство експресије, 1-интензитет експресије 1, 2-интензитет експресије 2, 3-интензитет експресије 3. Не постоји статистички значајна разлика између интензитета експресије sucln D1 и степена дисплазије слузнице ларинкса (Fisher-ов тест=4,016;  $p=0,453$ ). Не постоји статистички значајна разлика између интензитета експресије FGF3 и

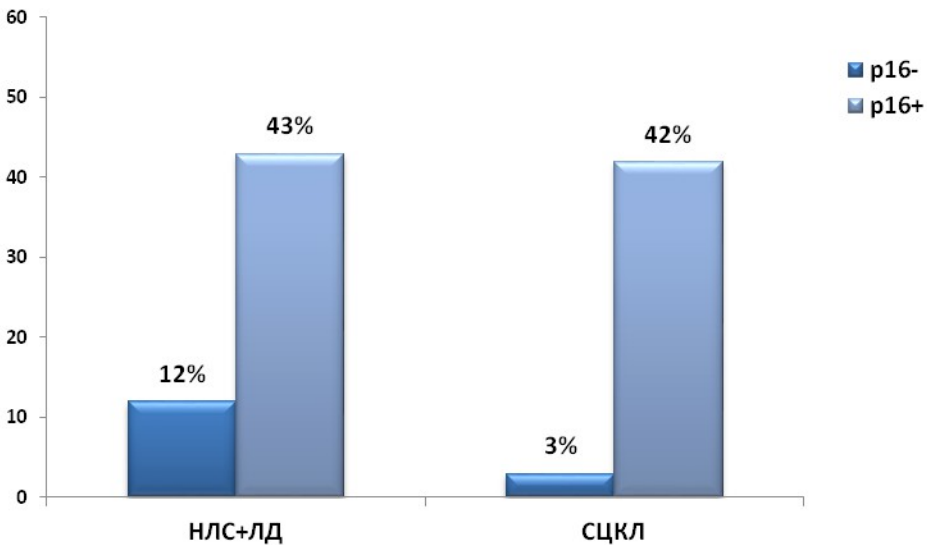
## **4.8. ИСПИТИВАЊЕ СЕНЗИТИВНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ПОЈЕДИНИХ МАРКЕРА И ЊИХОВИХ КОМБИНАЦИЈА У ЦИЉУ РАЗЛИКОВАЊА КАРЦИНОМА ОД ЗАЈЕДНО ДИСПЛАЗИЈЕ И НОРМАЛНЕ СЛУЗНИЦЕ ЛАРИНКСА**

### **4.8.1. Анализа интензитета експресија cyclin D1, FGF3, p16 и p21 код заједно дисплазија и нормалне слузнице у односу на карциноме ларинкса**

Анализирали смо повезаности присуства експресија (1+2+3) за cyclin D1, FGF3, p16 и p21 код заједно нормалне и диспластичне слузнице у односу на карцином ларинкса. Наши резултати показују да, као што се види на Графикону 17. и 18, постоји повезаност присутне експресије за cyclin D1 и p16 код карцинома ларинкса у односу на експресије код заједно нормалне и диспластичне слузнице ( $\chi^2=21,564$ ,  $df=1$ ,  $p=0,0001$  за cyclin D1; Fisher-ов тест,  $p=0,0301$ , за p16).

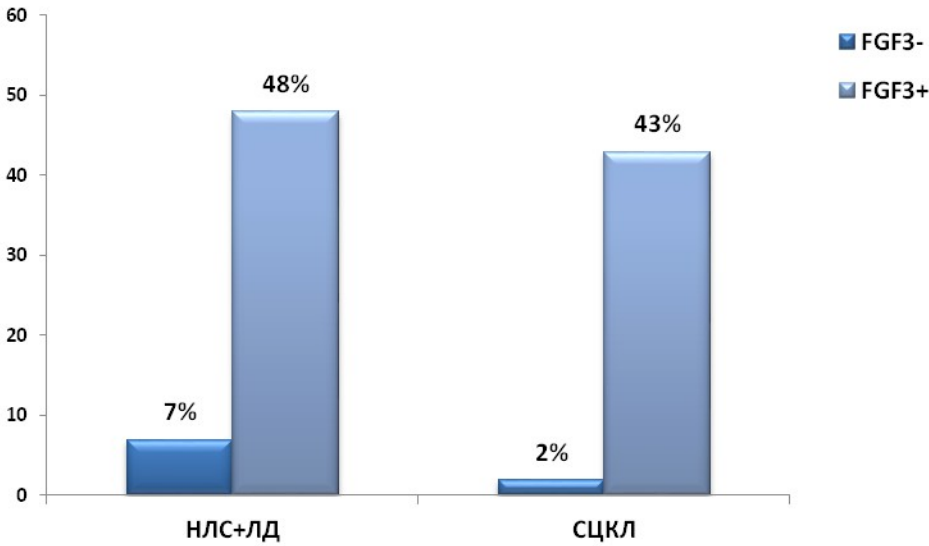


**Графикон 17.** Експресија cyclin D1 код заједно нормалне и диспластичне слузнице у односу на експресије овог маркера код карцинома ларинкса. НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД- ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамoцелуларни карцином.

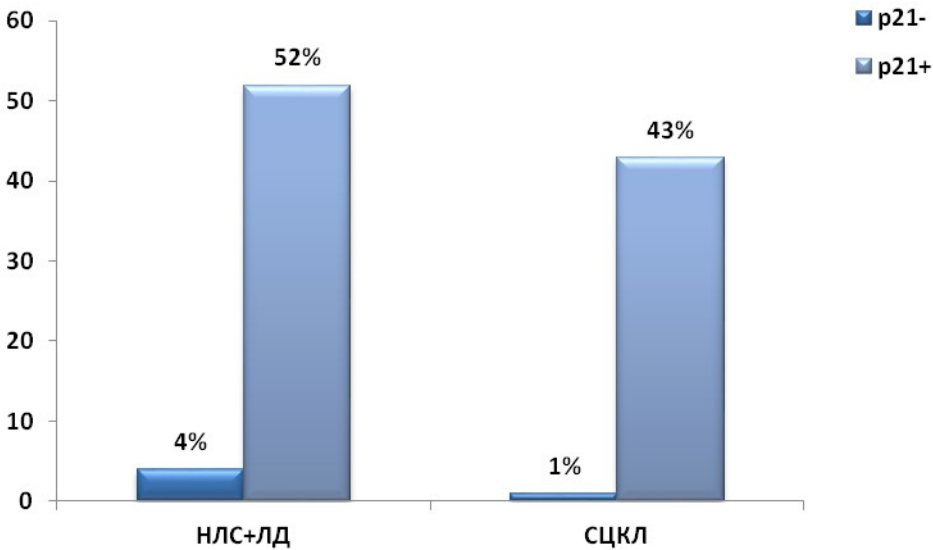


**Графикон 18.** Експресија p16 код заједно нормалне и диспластичне слузнице у односу на експресије овог маркера код карцинома ларинкса. НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД-ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамoцелуларни карцином.

Описану повезаност нисмо установили за FGF3 и p21 ( $p=0,1799$ , Fisher-ов тест, за FGF3;  $p=0,3791$ , Fisher-ов тест, за p21), што је приказано на Графикону 19 и 20.



**Графикон 19.** Експресија FGF3 код заједно нормалне и диспластичне слузнице у односу на експресије овог маркера код карцинома ларинкса. НЛС-нормална ларингеална слузница, ЛД-ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамoцелуларни карцином.



**Графикон 20.** Експресија p21 код заједно нормалне и диспластичне слузнице у односу на експресије овог маркера код карцинома ларинкса. НЛС- нормална ларингеална слузница, ЛД-ларингеална дисплазија, ЛСЦК-ларингеални сквамoцелуларни карцином.

#### **4.8.2. Испитивање бинарне логистичке регресије интензитета експресије за cyclin D1, FGF3, p16 и p21 и ризика од карцинома ларинкса**

Анализирали смо интензитете експресије за cyclin D1, FGF3, p16 и p21. Наши резултати показују да, када интензитет експресије порасте за један, „шанса“ за карцином се повећава код cyclin D1 7,704 пута, а код FGF3 5,682 пута (за cyclin D1,  $p=0,001$ ,  $oddsratio=7,704$ ,  $CI=2,953-20,102$ ; за FGF3,  $p=0,046$ ,  $oddsratio=5,682$ ,  $CI=1,035-31,197$ , Бинарна логистичка регресија). Сличне резултате нисмо нашли код p16 и p21 (за p16,  $p=0,446$ ,  $oddsratio=1,774$ ,  $CI=0,406-7,762$ ; за p21,  $p=0,853$ ,  $oddsratio=1,280$ ,  $CI=0,085-19,235$ ).

#### **4.8.3. Анализа специфичности и сензитивности експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 код карцинома ларинкса у односу на збирну групу дисплазија и нормалне слузница ларинкса**

Сензитивност је дефинисана као удео ткивних исечака оболелих пацијената код којих је имунохистохемијско бојење позитивно, односно осетљивост је мера колико добро имунохистохемија открива болест када стварно постоји. Сензитивно бојење има неколико лажно негативних резултата. Специфичност је удео необолелих, код којих је бојење негативно. Она мери колико добро имунохистохемија искључује болест кад је стварно одсутна, а специфичан тест има неколико лажно позитивних резултата. Корелирали смо сензитивност и специфичност експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 код карцинома ларинкса и заједно нормалне и диспластичне слузнице. Cyclin D1 има високу сензитивност и специфичност за карциноме, у поређењу са нормалном и диспластичном слузницом ларинкса, док остала три тумор маркера имају само високу сензитивност, али не и специфичност (Табела 22).

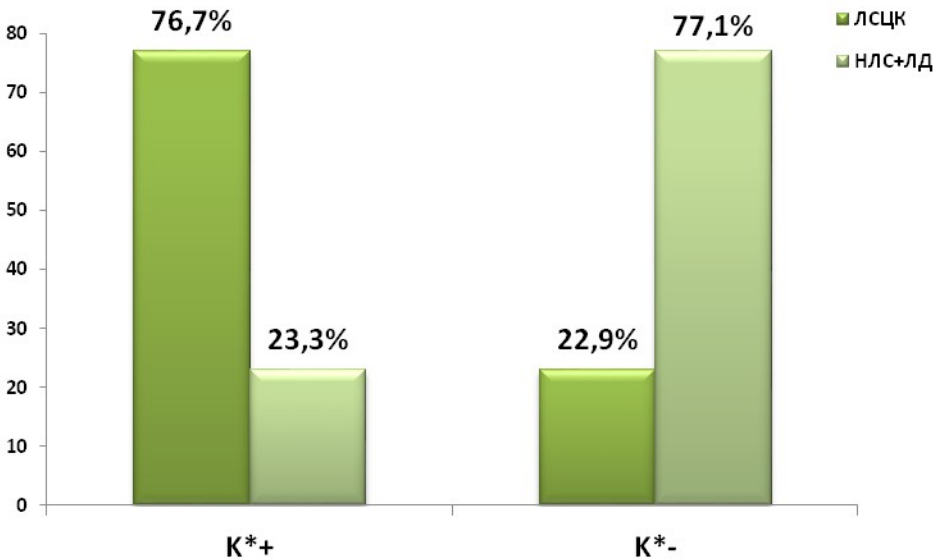
Табела 22. Сензитивност и специфичност експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 код карцинома у односу на заједно нормалну и диспластичну слузницу ларинкса.

	cyclin D1	cyclin D1	FGF3	FGF3	p16	p16	p21	p21
%	специфичност	сензитивност	специфичност	сензитивност	специфичност	сензитивност	специфичност	сензитивност
НЛС+ЛД	37	19	87	4	78	6	93	2
СЦКЛ	63	81	13	96	22	94	7	98

НЛС-нормална ларингеална слузница, ЛД-ларингеална дисплазија, СЦКЛ-сквамозелуларни карцином ларинкса. **А.** Сензитивност експресије cyclin D1 за карциноме ларинкса износи 81%, а за заједно нормалну и диспластичну слузницу 19%, а његова специфичност експресије у ткиву карцинома је 63%, док је код нормалне и диспластичне слузнице 37%. Само за cyclin D1 су вредности исензитивности и специфичности високе. **Б.** Сензитивност експресије FGF3 код карцинома је 96%, а код нормалне и диспластичне слузнице је 4%. Вредности за специфичност су ниске за карциноме и то 13%, а за нормалну и диспластичну слузницу високе и то 87%. **В.** Сензитивност експресије p16 код карцинома је 94%, а код нормалне и диспластичне

#### 4.8.4. Анализа сензитивности и специфичности комбинације cyclin D1+FGF3+p16+p21>0 за карциноме ларинкса

При постојању позитивне експресија бар једног, од испитивана четири тумор маркера, вероватноћа за карцином је велика, а разликовање карцинома од заједно дисплазија и нормалне слузнице је са сензитивношћу од 77,1% и специфичношћу од 76,7% (Графикон 21).



Графикон 21. Специфичност и сензитивност комбинације тумор маркера cyclin D1+FGF3+p16+p21>0. K\*- комбинација негативна, K\* + комбинација позитивна

#### 4.8.5. Анализа сензитивности и специфичности комбинације cyclin D1>0, FGF3+p16+p21>5 за дисплазију у односу на нормалну слузницу ларинкса

У циљу диференцирања дисплазије од здраве слузнице ларинкса, испитали смо сензитивност и специфичност комбинације експресије cyclin D1 и збира интензитета експресија FGF3+p16+p21, када је он већи од 5. Наш резултат показује да ова комбинација разликује узорке дисплазије од узорака нормалне слузнице ларинкса са сензитивношћу од 79,5% и специфичношћу од 75,4% (Табела 23).

Табела 23. Специфичност и сензитивност комбинације cyclin D1>0, FGF3+P16+P21>5 (у %).

cyclin D1>0, FGF3+P16+P21>5	НЛС	ЛД
специфичност	75,4	24,6
сензитивност	20,5	79,5



## ДИСКУСИЈА

### 5.1. Значај квантификације експресије и интензитета експресије *cyclin D1*, *FGF3*, *p16* и *p21*

На почетку истраживања смо показали да су експресије *cyclin D1* и експресија *p16* учесталије код карцинома ларинкса, него код дисплазија и нормалне слузнице ларинкса (Графикони 4 и 6), али ову зависност нисмо установили за *FGF3* и *p21* (Графикони 5 и 7). Затим смо, такође, показали, да су интензитети експресије *cyclin D1*, *FGF3*, *p16* и *p21* (Графикони 8 –11) зависни од типа ларингеалне слузнице.

У даљем раду приказали смо да се збир позитивних интензитета експресије (1+2+3+) код заједно диспластичне слузнице ларинкса и карцинома ларинкса, у односу на нормалну слузницу, значајно разликује код *cyclin D1* и *p16* (Графикони 12 и 14), али не и код *FGF3* и *p21* (Графикони 13 и 15).

Установили смо и да су експресија *p16*, као и интензитети експресије *FGF3* учесталији код мушкараца (Табела 1 и Табела 6). Ову зависност нисмо потврдили за експресију *cyclin D1*, *FGF3* и *p21* (Табела 1) и интензитете експресије *cyclin D1*, *p16* и *p21* (Табеле 5, 7 и 8).

Инвазију карцинома ларинксау лимфне судове околног ткива не прати експресија *cyclin D1*, али зато ову инвазију прате интензитети његове експресије (Табела 3 и Табела 13). Виши степен некрозе заступљенији је код вишег интензитета експресије *cyclin D1* и *p16*, што није случај са њиховом експресијом (Табеле 17 и 19; Табела 4). Интензитети експресије *p21* су карактеристични за инфилтративни начин раста карцинома, што не важи и за његову експресију (Табела 12 и Табела 2). Експресија *cyclin D1*, *FGF3*, *p16* и *p21* није повезана са степеном дисплазије (Табела 21). Експресија *p16* интензитета 2 је у уској вези са дисплазијом средњег степена слузнице ларинкса (Графикон 16). Перинеурална

инвазија је значајно већа код вишег интензитета експресије p21, али није зависна од саме експресије овог антионкогена (Табела 16 и Табела 3).

Показали смо значајно више експресије за *cyclin D1* и p16, али не и за FGF3 и p21, код карцинома, за разлику од збира експресија дисплазије и здраве слузнице (Графикони 17–20). Доказали смо и да онкоген *cyclin D1* има сензитивност од 81% и специфичност од 63% за карциноме ларинкса, у односу на заједно дисплазије и нормалну слузницу, док остали онкогени и антионкогени немају значајну сензитивност и специфичност (Табела 22). Показали смо да *cyclin D1* и FGF3 имају повећану шансу за присуство карцинома у ларингеалном исечку, у односу на остала два типа ткива, и то: код *cyclin D1* за 7,704 пута, а код FGF3 за 5,682 пута у случају повећања њиховог интензитета експресије за 1. Показали смо да, ако и један од четири маркера има најмање експресију 1, тада је присутна сензитивност од 77,1% и специфичност од 76,7% за разликовање карцинома од остала два типа слузнице (Графикон 20). По први пут смо установили, уз сензитивност 80% и специфичност 75%, важност комбинације  $cyclin D1 > 0$ ,  $FGF3 + p16 + p21 > 5$  за разликовање диспластичне и нормалне слузнице (Табела 23).

## **5.2. Повезаност експресије и интензитета експресије *cyclin D1*, FGF3, p16 и p21 са различитим типовима лезије слузнице ларинкса**

*Експресија и интензитети експресије *cyclin D1* су већи код карцинома ларинкса, него код нормалне и код диспластичне слузнице.* Установљена је висока зависност експресија *cyclin D1* у исечцима са карциномом ларинкса, у односу на експресију *cyclin D1* у исечцима пацијената са нормалном и са диспластичном слузницом. Онкоген *cyclin D1* је експримиран у исечцима код 39/48 пацијената (64%) са карциномом ларинкса, код 17/29 пацијената (28%) са нормалном слузницом и код 5/31 пацијената са диспластичном слузницом (8%) ( $\chi^2=32,570$ ;  $df=2$ ;  $p<0,001$ ). Са повећањем интензитета експресије повећава се и процентуална заступљеност исечака карцинома, а опада заступљеност исечака дисплазија. Одсуство експресије *cyclina D1*, односно, његова

експресија са интензитетом 0 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 26% (12/29), код диспластичне слузнице у 55% (26/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 19% (9/48) пацијената. Експресија cyclin D1 са интензитетом 1 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 26% (8/29), код диспластичне слузнице у 13% (4/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 61% (19/48) пацијената. Експресија cyclin D1 са интензитетом 2 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 38% (9/29), код диспластичне слузнице у 4% (1/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 58% (14/48) пацијената. Експресија cyclin D1 са интензитетом 3 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 0% (0/29), код диспластичне слузнице у 0% (0/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 100% (6/48) пацијената. Наши резултати указују да су интензитети експресије cyclin D1 зависни од типа ларингеалне слузнице (Fisher-ов тест=36,740,  $p=0,001$ ). Cyclin D1 је регулаторна подјединица холоензима, који фосфорилише и заједно са претходно фосфорилисаним комплексом cyclin E/cdk2, инактивише ретинобластома протеин (pRb), који има инхибирајућу функцију на ћелијски циклус.

Ретинобластома протеин служи као чувар капије G1 фазе ћелијског циклуса и пролазак кроз рестрикциону тачку узрокује синтезу DNK. Изражена експресија cyclin D1 корелира са раном појавом карцинома и ризиком за туморску прогресију и метастазирање (277,278,279,116). Повећана експресија cyclin D1 и/или амплификација је нађена у 35–64% карцинома главе и врата (280–283). Позитивна експресија cyclin D1 је код карцинома ларинкса присутна у 19–89% и приближна је експресији за све карциноме (261,284–287). Cyclin D1 показује ниску или одсутну експресија у 97,7% узорака диспластичних лезија (281). Можемо потврдити да чешћа експресија cyclin D1 као и виши интензитети експресије корелирају са исечцима карцинома, зато што у овим ћелијама долази до повећане експресије овог онкогена.

***Интензитети експресије FGF3 су већи код карцинома ларинкса него код нормалне и код диспластичне слузнице.*** Није нађена зависност експресије FGF3 у исечцима пацијената са карциномом ларинкса у односу на експресију FGF3 у исечцима пацијената са нормалном и са диспластичном слузницом (Fisher-ов тест=5,380,  $p=0,0552$ ). Експресија FGF3 је код нормалне слузнице присутна код 23 од 29 (79,3%) пацијената, код ларингеалне дисплазије код 29 од 31 (93,5%), а код карцинома код 46 од 48 (95,8%)

пацијената. Са повећањем интензитета експресије FGF3 опада његова процентуална заступљеност код нормалне слузнице ларинкса, а повећава се код дисплазија и карцинома (Fisher-ов тест=18,099,  $p=0,004$ ). Експресија FGF3 са интензитетом 1 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 31% (9/29), код диспластичне слузнице у 9,7% (3/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 12,5% (6/48) пацијената. Експресија FGF3 са интензитетом 2 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 37,9% (11/29), код диспластичне слузнице у 41,9% (13/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 35,4% (17/48) пацијената. Експресија FGF3 са интензитетом 3 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 10,3% (3/29), код диспластичне слузнице код 41,9% (13/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 47,9% (23/48) пацијената.

FGF су фамилија повезаних протеина који регулишу ћелијску пролиферацију, диференцијацију и бројне ћелијске процесе, укључујући нормални развој, карциногенезу и метастазирање (288–291). Функција FGF фамилије и њених рецептора укључује њихову способност да утичу на митозу и инхибирају апоптозу (288). Проказано је од 17 до 19 различитих FGF (289,290). Сви FGF показују степен структурне сличности и везују ниским интензитетом хепарин сулфат и то обично у форми хепарин сулфат протеогликана (291,292). FGF испољавају своја дејства кроз високо специфичне трансмембранске рецепторе (FGFRs), који имају активност цитосолне тирозин киназе на свом карбокси-терминалном домену и на три екстрацелуларна имуноглобулину слична региона, на њиховом аминокиселинском терминалном домену. FGF-1 везује све изотипе FGFR2 и FGFR3, док FGF2 показује превасходно везивање за FGFR2b и FGFR2c (293). Мало је тога познато о улози FGF фамилије у патолошком ткиву, мада су идентификовани код различитих неоплазми укључујући феохромоцитом, карцином бубрега, астроцитом, карцином бешике, хепатоцелуларни карцином и карцином плућа (288). Амплификација гена INT2, који кодира FGF3 протеин, доказана је код карцинома главе и врата (294). Оралне дисплазије и карциноми у односу на нормалну слузницу показују интензивнију експресију FGF3, а постоји и повећање интензитета експресије код узорака диспластичне слузнице и оралних карцинома (295). Како је експресија чешћа, а интензитети експресије већи од нормалне, преко диспластичне слузнице, а највиши код исечака карцинома, можемо рећи да FGF3

функционише у крајњој диференцијацији сквамозног епитела и да та функција није измењена код планоцелуларног карцинома.

*Експресија и интензитети експресије p16 су чешћи и виши код карцинома ларинкса него код нормалне и код диспластичне слузнице.* Постоји корелација експресије p16 у исечцима пацијената са карциномом ларинкса у односу на експресију p16 у исечцима пацијената са нормалном и са диспластичном слузницом (Fisher-ов тест=7,316,  $p=0,0232$ ). Експресија p16 је код нормалне слузнице присутна у 25 од 29 (86,2%) пацијената, код ларингеалне дисплазије у 22 од 31 (70,9%), а код карцинома у 45 од 48 (93,75%) пацијената. Са повећањем интензитета експресије p16 повећава се његова процентуална заступљеност код дисплазија и карцинома, док опада код нормалне слузнице (Fisher-ов тест=18,504,  $p=0,004$ ). Експресије p16 са интензитетом 0 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 13,8% (4/29), код диспластичне слузнице у 29% (9/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 16,67% (8/48) пацијената. Експресија p16 са интензитетом 1 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 31% (9/29), код диспластичне слузнице у 19,4% (6/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 10,4% (5/48) пацијената. Експресија p16 са интензитетом 2 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 27,6% (8/29), код диспластичне слузнице у 41,9% (13/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 41,7% (20/48) пацијената. Експресија p16 са интензитетом 3 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 27,6% (8/29), код диспластичне слузнице у 9,7% (3/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 41,7% (20/48) пацијената. Ген p16INK4A припада 9p21 хромозомском региону који садржи три ексона и кодира нуклеарни фосфопротеин са молекуларном тежином од 16 kDa. Према својој молекуларној тежини је овај протеин и добио назив p16. Функција p16 протеина је изражена у негативној регулацији ћелијског циклуса преко инхибиције циклин зависних киназа 4 и 6 и интеракција са cyclin D1 (296). У одсуству p16, cdk-s се везују за cyclin D1, а ретинобластома протеин (pRb) се фосфорилише. Фосфорилација pRb доводи до губитка регулације преласка ћелије из G1 у S фазу и започиње ћелијска пролиферација. У мноштву малигних тумора и ћелијских линија, ген p16INK4A је инактивиран различитим генетским механизмима, укључујући тачкасте мутације, хомозиготне делеције и хиперметилацију промотерског региона p16INK4A. Дакле, cdk инхибиторни протеини, укључујући p16,

имају кључне улоге у преласку ћелијског циклуса из G1 у S фазу, инхибицијом фосфорилације pRb која је посредована комплексима cyclin D-cdk4/6(87,95). Оштећење било ког дела овог сигналног пута, као што су делеција/мутација гена p16, амплификација/прекомерна експресија cdk или cyclin D и мутације cdk које утичу на везивање p16. Ове промене доводе до фосфорилације pRb и последичне прогресије ћелијског циклуса из G1 у S фазу (83,248,296–300).

Према Yuen PW и сар. експресија p16 је смањена и креће се у опсегу 10–52% за карциноме главе и врата, а према Lingbao A. и сар. експресија овог протеина је нађена у 55% код карцинома ларинкса (301,302). Laco J, и сар. су анализирали 46 узорка нормалне слузнице, 18 узорка диспластичне слузнице и 24 узорка карцинома ларинкса и регистровали су експресију p16 у 9%, 50% и 58%, појединачно, тако да експресија расте са канцеризацијом слузнице ларинкса (303). Генетска инактивација p16 настаје у раној фази развоја карцинома (176,218,304). Мишљења смо да се високе вредности експресије, као и виши интензитети експресије p16 у нашим узорцима нормалне и диспластичне мукозе, а посебно у узорцима карцинома, могу објаснити одсуством било ког типа генетских аберација p16INK4A.

***Експресија p21 није повезана са лезијама слузнице ларинкса, за разлику од његових интензитета експресије.*** Прецизније, није нађена повезаност експресије p21 са различитим лезијама слузнице ларинкса у ткивним исечцима испитиваних пацијената (Fisher-ов тест=1,593, p=0,597). Експресија p21 је изостала код нормалне слузнице ларинкса у 6,9% (2/29), код диспластичне слузнице у 6,5% (2/31), док је код карцинома ларинкса била одсутна код 2,1% (1/48) пацијената. Експресија p21 са интензитетом 1 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 27,6% (8/29), код диспластичне слузнице у 16,1% (5/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 6,2% (3/48) пацијената. Експресија p21 са интензитетом 2 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 41,4% (12/29), код диспластичне слузнице у 48,4% (15/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 39,6% (19/48) пацијената. Експресија p21 са интензитетом 3 је процентуално заступљена код нормалне слузнице ларинкса у 24,1% (7/29), код диспластичне слузнице у 29% (9/31), док је код карцинома ларинкса присутна код 52,1% (25/48) пацијената. p21 заједно са p27 и p53 припада фамилији Cip/Kip. Може служити као моћан и универзалан инхибитор активности циклин зависних киназа.

Инхибира циклин зависне киназе 2, 4 и 6 и способан је да при повећаној експресији индукује прекид ћелијског циклуса у G1 фази (147,258,305,306). У ћелији са нормалним ћелијским циклусом у комплексу је са cyclin/cdk. p21/cyclin/cdk комплекси задржавају киназну активност неактивiranу додавањем још протеина p21 (80,147). Измена активних у неактивне комплексе постиже се мењањем односа p21 комплекса са cyclin/cdk, тако да активни комплекси садрже молекулу p21, док неактивни комплекси садрже различите неактивне подјединице. У нормалним фибробластима је cyclin D1 удружен са кватернарним комплексима који садрже cyclin/cdk/p21 и пролиферативни нуклеарни антиген (PCNA), подјединицу DNK полимеразе која функционише и у DNK репликацији и DNK поправци (173). p21 има два карактеристична региона: N-терминалну половину протеина, одговорну за инхибиторну активност циклин зависних киназа, док се C-терминални домен везује за PCNA. Експресија p21 код карцинома главе и врата износи 54–67%, а код карцинома ларинкса 31–86% (280,301,307,311). Maiorano E, и сар. су код 44 узорка ларингеалне слузнице утврдили експресију p21 за НЛС, ЛД и ЛСЦК у 50%, 82,6% и 72,72%, појединачно, а пораст експресије од НЛС до ЛСЦК је објашњен могућом улогом стероидних хормона у канцерогенези ларинкса (312). У истом раду у 84% ткивних узорака, са позитивном експресијом p21, нађено је присуство стероидних рецептора (312). Wang J, и сар. су показали да тренд експресије p21 опада од нормалне слузнице, преко дисплазије до карцинома ларинкса (95%, 75% и 63,3%) што је у супротности са нашим резултатима (313). Ипак, већина аутора се слаже да експресија показује негативан тренд од нормалне слузнице, преко дисплазије до карцинома (25,39,99,195). Приказано је да постоји неколико мутација p21 код појаве карцинома, од којих је за неке утврђено да поништавају активност p21 као cdk инхибитора (76,315–319). Заједнички закључак различитих студија, које су истраживале мутације p21, јесте да су његове мутације изузетно ретке (320). Слажемо се са тврдњом да високи интензитети експресије p21 настају због прекомерне експресије p21 која може имати улогу у биологији ћелија ларингеалног карцинома, која се карактерише много већом агресивношћу.

### **5.3. Повезаност експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 у циљу диференцијације нормалне слузнице ларинкса од ларингеалних лезија**

Утврдили смо да се збир позитивних интензитета експресије (1+2+3+) код заједно диспластичне слузнице ларинкса и карцинома ларинкса, у односу на нормалну слузницу, значајно разликује код cyclin D1 и p16 ( $\chi^2=21,562$ ;  $df=1$ ;  $p=0,0001$ ;  $p=0,030$ , Fisher-ов тест), али не и код FGF3 и p21 ( $p=0,179$ , Fisher-ов тест;  $p=0,379$ ; Fisher-ов тест). У до сада познатој литератури нисмо нашли слична запажања.

### **5.4. Анализа повезаности експресије и интензитета експресије испитиваних онкогена и антионкогена са старошћу, полом, позитивном породичном и личном анамнезом, конзумирањем дувана и алкохола**

*Експресија p16 је већа код мушкараца.* Показали смо да при експресији p16 код мушког (88,9%) у односу на женски пол (66,7%) постоји значајна разлика ( $\chi^2=5,870$ ;  $df=1$ ;  $p=0,015$ ). p16 тумор супресорски ген је локализован на хромозому 9p21 и кодира инхибитор циклин зависне киназе тежине 16 kDa. Садржи анкирински сегмент који везује Cdk4 и Cdk6 (290,87). Ово везивање блокира прелазак ћелије из G1 у S фазу инхибицијом cyclin D зависне фосфорилације Rb протеина и омогућава његово везивање за транскрипциони фактор E2F (321). Peng J, и сар. су код 47 узорака карцинома ларинкса и 6 узорака нормалног ткива утврдили да експресија p16 није значајно виша код мушкараца или код жена (322). El-Naggar AK, и сар. су показали да узорци карцинома код 92,3% жена и 54,5% мушкараца имају алтерисану експресију протеина p16 ( $p=0,02$ ), а узрок овог налаза је нејасан, мада може имати улогу повезаност са усходним регулатором на X хромозому (323). Експресија p16 инхибира прелазак ћелије из G1 у S фазу ћелијског



циклуса. Foster JS, и сар. су доказали да је ова инхибиција индукована MCF-7 ћелијама посредством 17- $\beta$ -естрадиола и удружена са заједничком инхибицијом од стране cdk4 и cdk2 киназне активности (329). Дејство естрадиола, дакле, смањује експресију p16 код жена (329). У нашем раду се већа експресија код мушког (n=90) у односу на женски пол (n=18) објашњава већим бројем припадника мушког пола, који је био укључен у испитивање.

***Експресија cyclin D1, FGF3, p16 и p21 није повезана са старошћу, полом, претходном малигном болести у породичној и личној анамнези, ни са факторима ризика.*** Експресија cyclin D1 није виша ни код млађих/старијих од 50 година, ни код испитиваних мушкараца/жена, ни код присуства/одсуства претходног тумора код испитаника или у његовој породици, нити је повезана са пушењем и конзумирањем алкохола (p=0,579, p=0,259, p=0,242, p=0,509, p=1,000, појединачно). Исти резултати су добијени за FGF3 (p=0,255, p=0,365, p=0,683, p=0,594, p=0,255, појединачно), за повезаност експресије p16 и старости, код претходног тумора испитаника или у његовој породици, за факторе ризика (p=1,000, p=0,581, p=1,000, p=1,000, појединачно), као и код p21 и испитаних анамнестичких параметара (p=1,000, p=0,193, p=0,581, p=1,000, p=1,000, појединачно). Segas JV, и сар. су повезаност експресије cyclin D1 са старошћу и полом оболелих објаснили хетерогеношћу испитиване групе ларингеалних карцинома, који су различите величине, локалне и удаљене проширености, различитог нуклеарног и хистолошког градуса, као и клиничког стадијума малигне болести (287). Ова хетерогеност може настати због нових мутација у генетски нестабилним ћелијама карцинома или због променљиве експресије круцијалних гена различитих поткласа туморских ћелија (325). Резултати других аутора показује да је експресија cyclin D1 значајно учесталија код пушача и конзумента алкохола (p=0,001), (286). Наиме, позитивна је корелација амплификације гена за cyclin D1 и високе експресије mRNA са пушењем дувана и конзумирањем алкохола код оболелих од карцинома главе и врата (150,326). Испитивање хуманог папилома вируса и преживљавања пацијената са карциномом главе и врата је показало да конзумирање алкохола и пушења не мења експресију p16 и p21 (328,329). Повезаност експресија cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са присутном/одсутном претходном малигном болешћу испитаника или код њихових породица није забележена у до сада познатој литератури.

*Интензитети експресије FGF3 су виши код мушкараца.* Уочили смо већу процентуалну заступљеност експресије FGF3 код мушког пола (Fisher exact test=9,630; p=0,009). Можемо претпоставити да су интензитети експресије нисходно регулисани од стране X хромозома, а да на FGF3 додатни утицај врши и естрадиол. Ову зависност нисмо установили за интензитете експресије cyclin D1, p16 и p21 (p>0,05).

## **5.5. Повезаност експресије и интензитета експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са клиничким и хистолошким параметарима истраживања**

*Експресија cyclin D1, FGF3, p16 и p21 је независна од локализације.* Прецизније, нисмо установили значајну повезаност експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 са локализацијом патолошког процеса у ларинксу (p=0,874, p=0,588, p=0,525, p=1,000, појединачно). Однос глотисних према супраглотисним туморима је 65%:35% за експресију cyclin D1 (285). Различити анатомски региони се карактеришу различитим типовима генетских аберација и због тога могу представљати различите подтипове истог типа тумора. Показано је у недавним истраживањима да различите генетске аберације зависе од анатомског региона карцинома главе и врата (328,330). Различита експресија испитиваних протеина проузрокована је различитим правцима ембриолошке диференцијације ларинкса (331). Тако су захваћени региони који имају сличне антигене детерминанте, али различит развојни пут (332).

*Интензитети експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 нису повезани са локализацијом патолошких лезија у ларинксу.* За интензитете експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 нисмо детектовали повезаност са локализацијом патолошких промена.

*Интензитети експресије cyclin D1 код карцинома су повезани са одсуством њихове инвазије у лимфне судове околног ткива, али сама експресија овог онкогена није.* Са порастом интензитета експресије cyclin D1 смањује се учесталост лимфне инвазије (Fisher exact test=7,903; p=0,019). Експресија онкопротеина cyclin D1 не зависи од инвазије карцинома у лимфне судове околног ткива (p=0,071). Има доста опречних

мишљења о повезаности лимфне инвазије и експресије *cyclin D1* у до сада познатој литератури. *Cyclin D1* генска амплификација и висока експресија његове mRNA, а који су нађени код карцинома ларинкса, значајно су повезани са узрапредовалом лимфном инвазијом (333–335). Ипак, сматрамо да лимфна инвазија зависи од биолошке агресивности карцинома.

***Интензитети експресије p21 су учесталија код инфилтративног у односу на вегетантни начин раста карцинома, што није случај код саме експресије овог антионкогена.*** Експресија протеина p21 је независна од начина раста карцинома ( $p=0,167$ ). Интензитети експресије p21 су виши код инфилтративног начина раста, сем код интензитета 1, који је учесталији код вегетантног начина раста, (Fisher exact test=8,553;  $p=0,026$ ). У нашем истраживању инфилтративни начин раста и интензитети експресије p21 се могу приписати супраглотисним карциномима који иначе имају много чешћи инфилтративни начин раста. Експресија *cyclin D1*, FGF3 и p16, као и њихови интензитети експресије, нису повезани са одређеним обликом раста карцинома ларинкса (336).

***Експресија и интензитети експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 не условљавају измене већине хистолошких параметара испитивања.*** Није утврђена повезаност експресије и интензитета експресије *cyclin D1*, FGF3, p16 и p21 са TNM, стадијумом малигне болести, хистолошким и нуклеарним градусом, присуством интраепителног карцинома, инвазивношћу, са васкуларном и перинеуралном инвазијом, некрозом, митотским индексом, стромалном моноклеарном реакцијом и дезмоплакијом у испитиваним исечцима. Овде можемо издвојити зависност интензитета експресије p21 и перинеуралне инвазије (Fisher exact test=17,280;  $p=0,001$ ) и зависност интензитета експресије *cyclin D1* и p16 од степена некрозе (Fisher exact test=15,819,  $p=0,033$ ; Fisher exact test=14,009,  $p=0,050$ , појединачно). Опречни су резултати добијени за патолошке параметре истраживања у до сада познатој литератури (268,285–287,337–342). Већи број истраживања је показао да немаповезаности експресије *cyclin D1*, p53 и Ki67 са TNM и хистолошким градусом карцинома ларинкса (266–331). У нашем истраживању нису значајно повезани M стадијум карцинома ларинкса са експресијом испитиваних протеина, а ова повезаност није испитивана у до сада доступној литератури. Разлике у добијеним зависностима се могу објаснити присуством велике интратуморске хетерогености карцинома ларинкса.

Клинички стадијум карцинома ларинкса и експресија испитиваних онкогена и антионкогена испитивна је од стране више аутора, али су и овде добијени различити резултати (285,286,342–344).

***Интензитети експресије cyclin D1, FGF3, p16 и p21 су зависни од степена дисплазије ларингеалних лезија.*** Експресија cyclin D1, FGF3, p16 и p21 није повезана са степеном дисплазије лезија ларингеалне слузнице ( $p=0,843$ ;  $p=0,510$ ;  $p=1,000$ ;  $p=0,742$ ). Различити степени дисплазије слузнице ларинкса подједнако експримирају појединачне интензитете експресије cyclin D1, FGF3 и p21 (Fisher-ов тест=4,016,  $p=0,453$ ; Fisher-ов тест=5,059,  $p=0,553$ ;  $\chi^2=3,507$ ;  $df=6$ ;  $p=0,814$ , појединачно). То није случај код p16 код кога је интензитет експресије 2 највиши код средње тешке дисплазије (Fisher-ов тест=12,501;  $p=0,022$ ). Дисплазије лаког и тешког степена су у корелацији са интензитетима 1 и 3 експресије p16, док су дисплазије умереног степена у корелацији са интензитетом 2 експресије p16. Bradley КТ, и сар. су показали код 119 исечака са патолошком сликом оралне дисплазије смањење тренда интензитета експресије p16 са порастом степена дисплазије ( $p=0,006$ ), (249). Било је покушаја да се повежу специфичне генске промене са хистопатолошком прогресијом, али је то остао изазов од када је откривено да су у оралну канцерогенезу укључени бројни гени (343). Од свих генских абнормалности најчешћи је губитак хетерозиготности за 9p код оралне дисплазије и карцинома (343,345,346). За дисплазије сквамозног епитела горњих аеродигестивних путева показано је значајно смањење броја p16 позитивних случајева са повећањем степена дисплазије (347). Инактивација p16 је рани догађај у канцерогенези, а механизми њеног настанка су соматска мутација кодирајућег гена CDKN2A, његова хомозиготна делеција или пак његова метилација (348–350). Претпостављена су два модела експресије p16 код дисплазија: смањење експресије због инактивирајуће мутације и компензаторно повећање експресије због инактивације pRb. Наше запажање, да се са повећањем степена дисплазије постепено снижава проценат исечака са p16 експресијом, може се објаснити накупљањем инактивирајућих мутација CDKN2A гена.

***Са порастом интензитета експресије p21 смањује се перинеурална инвазија.*** Прецизније, интензитет експресије p21 је високо статистички значајно повезан са перинеуралном инвазијом (Fisher exact test=17,280;  $p=0,001$ ). Процент перинеуралне инвазије се смањује са порастом интензитета експресије. Оваква повезаност није

установљена за *cyclin D1* ( $p=1,000$ ), *FGF3* ( $p=0,183$ ) и *p16* ( $p=0,580$ ). Перинеурална инвазија или неуротропизам је фактор агресивности карцинома главе и врата. Учесталији је код мушкараца и удружен је са лошом прогнозом, (351,352). У студији од 348 дукталних панкреатичних карцинома перинеурална инвазија је била присутна у 80% узорака карцинома (353). Показали смо да се са порастом интензитета експресије *p21* смањује проценат перинеуралне, а расте проценат лимфне инвазије карцинома ларинкса, што може повећати сумњу на метастазирање карцинома ларинкса у околно лимфно ткиво.

## **5.6. Експресије *cyclin D1* и *p16* 1+, 2+ и 3+ добро диферентују карциноме од нормалне+диспластичне слузнице ларинкса**

Постоји висока зависност експресије са интензитетима 1+2+3 за *cyclin D1* ( $\chi^2=21.564$ ,  $df=1$ ,  $p=0,0001$ ) и нешто нижа зависност експресије *p16* (Fisher-ов тест,  $p=0,0301$ ) у ткиву карцинома, у односу на дисплазије+здраву слузницу. Поменута зависност није нађена за *FGF3* ( $p=0,1799$ , Fisher-ов тест) и *p21* ( $p=0,3791$ , Fisher-ов тест). Слично је показано и код карцинома једњака и ларингеалних карцинома (354,256). Експресија *p16* није валидна у диференцирању ларингеалних карцинома од ларингеалне дисплазије (249). Cdk инхибиторни протеини, у које се убраја и *p16*, имају кључне улоге у преласку ћелијског циклуса из G1 у S фазу инхибицијом фосфорилације *pRb*, која је посредована комплексима *cyclin D-cdk4/6* (87,355). Сматрамо да ова корелација произилази из заједничког сигналног пута *cyclin D1* и *p16*.

## **5.7. Са повећањем интензитета експресије *cyclin D1* и *FGF3* расте и „шанса“ за присуство карциномских ћелија у исечцима**

Установљена је значајна веза пораста интензитета експресије за 1 код *cyclin D1* и *FGF3* са присуством карцинома ларинкса, док код *p16* и *p21* то није случај. На овај начин се „шанса“ за карцином повећава, код *cyclin D1* 7,704 пута, а код *FGF3* 5,682 пута (за

cyclin D1,  $p=0,001$ , odds ratio=7,704, CI=2,953-20,102; за FGF3,  $p=0,046$ , odds ratio=5,682, CI=1,035-31,197). Сматрамо да је за овакву корелацију одговоран генетски синергизам, с обзиром да се гени који кодирају ова два онкопротеина налазе на хромозомском региону 11q13.

## **5.8. Висока сензитивност и специфичност интензитета експресије cyclin D1 за ћелије карцинома за разлику од нормалне и диспластичне слузнице**

Cyclin D1 је високо сензитиван (81,3%) и специфичан (63,3%) у исечцима ткива карцинома ларинкса у поређењу са исечцима нормалне и диспластичне слузнице, док FGF3, p16 и p21 немају статистички значајну сензитивност и специфичност. Vani–Hani K, и сар. су показали значајну сензитивност (67%) и специфичност (71%) експресије cyclin D1 за молекуларну дијагнозу аденокарцинома једњака (356). Високу сензитивност интензитета експресије cyclin D1 смо довели у везу са високом генском амплификацијом гена CCND1, која повећава експресију овог протеина (357).

## **5.9. Висока сензитивност и специфичност cyclin D1+FGF3+p16+p21>0 за карциноме ларинкса**

Постоји значајна зависност позитивне експресије бар једног од испитиваних протеина (cyclin D1+FGF3+p16+p21>0) са вероватноћом да је у испитиваном исечку присутан карцином ларинкса. Ова комбинација тумор маркера, у разликовању карцинома ларинкса од диспластичне+нормалне слузнице, има сензитивност од 77,1% и специфичност од 76,7%. Сматрамо да су због значајне експресије сва четири тумор маркера у ткиву карцинома ларинкса добијени и овако високи резултати сензитивности и специфичности. Слична зависност није доказана у до сада познатој литератури.

## **5.10. Комбинација cyclin D1>0 и FGF3+p16+p21>5 повећава шансу за присуством дисплазије у исечцима слузнице ларинкса**

Постоји повезаност комбинације cyclin D1>0, FGF3+p16+p21>5 са присуством дисплазије у исечцима за разлику од нормалне слузнице. Ова комбинација онкогена и тумор супресорских гена диференцира дисплазије од здраве слузнице са сензитивношћу од 80% и специфичношћу од 75%. Наведена комбинација маркера није до сада наведена у познатој литератури и свакако да би могла заузети значајно место као дискриминатор дисплазија од нормалне слузнице ларинкса.

## ЗАКЉУЧЦИ

Резултати добијени у овом раду указују да *cyclin D1*, *FGF3*, *p16* и *p21* играју значајне улоге у развоју сквамоцелуларног карцинома и дисплазија ларинкса. Експресија туморских маркера *cyclin D1*, *FGF3*, *p16* и *p21*, поред индиректне ларингоскопије, ларингомикроскопије и патохистолошког испитивања, има значајну улогу у дијагностиковању и диференцирању карцинома и дисплазија од нормалне слузнице ларинкса.

Овај општи закључак је изведен на основу следећих експерименталних доказа:

1. Знатно већи проценат пацијената са сквамоцелуларним карциномом ларинкса има позитивну експресију маркера *cyclin D1* и *p16* у односу на пацијенте са дисплазијом и са нормалном слузницом ларинкса;
2. Пацијенти са сквамоцелуларним карциномом ларинкса имају већи интензитет експресије биомаркера *cyclin D1*, *FGF3*, *p16* и *p21* у односу на пацијенте са дисплазијом и са нормалном слузницом ларинкса;
3. Позитивна експресија *cyclin D1* је високо сензитиван и специфичан маркер у диференцирању сквамоцелуларног карцинома од дисплазија ларинкса;
4. Експресија *cyclin D1* повећава 7,7 пута шансе за развој сквамоцелуларног карцинома ларинкса;
5. Интензитет експресије *cyclin D1* и *p16* су у позитивној корелацији са степеном некрозе сквамоцелуларног карцинома ларинкса;
6. Интензитети експресије *cyclin D1* могу служити као маркер метастазирања сквамоцелуларног карцинома ларинкса у регионалне лимфне чворове.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, and Brakenhoff RH. A genetic explanation of slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Research* 2003;63:1727-30.
2. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194(4260):23-8.
3. Bishop JM. Cancer: the rise of the genetic paradigm. *Genes Dev* 1995;9:1309-15.
4. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991;254(5035):1138-46.
5. Calabrese P, Tavaré S, and Shibata D. Pretumor progression clonal evolution of human stem cell populations. *Am J Pathol* 2004;164:1337-46.
6. Novakofski J. Role of proto-oncogenes in normal growth and development. *J Anim Sci* 1991;69(Suppl. 3):56-73.
7. Chin L, & Gray JW. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature* 2008;452:553-63.
8. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264(5157):436-40.
9. Levine AJ, Momand, Jamil M, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351(6326):4536.
10. Hollingsworth JRE, Lee WH. Tumor suppressor genes: new prospects for cancer research. *Natl Cancer Inst* 1991;83(2):91-6.
11. World Health Organization Classification of Tumours (2005) Pathology and genetics of tumours of the head and neck. IARC, Lyon.
12. Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra W, Califano J: Tumours of the hypopharynx, larynx and trachea (Epithelial precursor lesions). In World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & genetics. Head and neck tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC) Edited by: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Lyon: IARC Press; 2005:140-143.
13. Fleskens S and Slootweg P Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. *Head & Neck Oncology* 2009;1(11):1-8.
14. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 2008;37(3):127-33.
15. Blackwell KE, Calcaterra TC, Fu YS. Laryngeal dysplasia: epidemiology and treatment outcome. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:596-602.
16. Plch J, Par I, Navratilova I, Blahova M, and Zavadil M. Long term follow-up study of laryngeal precancer. *Auris Nasus Larynx*, 1998;25:407-12.
17. Uno Y, Saito R, Hamaya K, Nose S. Epithelial hyperplasia of the larynx a clinical follow-up study. *Auris Nasus Larynx* 1997;24:309-14.
18. Hellquist H, Cardesa A, Gale N, Kambic V, Michaels L. Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members

- of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. *Histopathology* 1999;34:226-33.
19. Blackwell KE, Fu YS, and Calcaterra TC. Laryngeal dysplasia. A clinico-pathologic study. *Cancer* 1995;75:457-63.
  20. Velasco RJR, Nieto SC, de Bustos PC, Marcos AC. Premalignant lesions of the larynx: pathological prognostic factors. *J Otolaryngol.* 1987;16(6):367-70.
  21. Hellquist H, Lundgren J, Olofsson J. Hyperplasia, keratosis, dysplasia and carcinoma in situ of the vocal cords—a follow-up study. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* 1982;7(1):11-27.
  22. Cattaruzza MS, Maisonneuve P and Boyle P. Epidemiology of Laryngeal Cancer. *Oral Oncol, EurJ Cancer* 1996;32B(5):293-305.
  23. Gale N. Epithelial hyperplastic laryngeal lesions: An overview of research work in Slovenia and further prospects. *Zdrav Vestn* 2002;71:(Suppl. 3):17–23.
  24. Gale N, Zidar N, Fischinger J, Kambič V. Clinical applicability of the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. *Clin Otolaryngol* 2000;25:227-32.
  25. Helliwell TR. ‘Risky’ epithelium in the larynx—a practical diagnosis? *Histopathology* 1999;34:262–5.
  26. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* 2006;42:987-93.
  27. Wenig BM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: precursors and problematic variants. *Mod Pathol* 2002;15(3):229-54.
  28. Gallo A, de Vincentiis M, Della Rocca C, Moi R, Simonelli M, Minni A, Shaha AR. Evolution of precancerous laryngeal lesions: A clinicopathological study with long-term follow-up on 259 patients. *Head Neck* 2001;23:42-7.
  29. Dreyar T, Popella C, Hinrichs B et al. Grading of precancerous laryngeal lesions by multiparameter image-analysis at separate epithelial layers. *J Pathol* 1995;177;385-93.
  30. Licitra L, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M, Gatta G, et al. Cancer of the larynx. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2003;47:65-80.
  31. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao Y-T, Ferlay J, Powell J. Cancer incidence in five continents. Vol. VI. Lyon: IARC, 1992. (IARC Scientific Publications No. 120).
  32. Anil K. Lalwani. *Current Diagnosis & Treatment in Otolaryngology—Head & Neck Surgery*. Publisher: McGraw-Hill Incorporated. Copyright 2008. ISBN: 0071460276. <http://webmedbooks.com/umn/content/productdetail.aspx/upc=981955a8-c83d-431f-804a-f8f7af03cf24/>.
  33. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. IARC Cancer Base No. 5. Lyon: IARC Press, 2001.
  34. Fletcher CDM, Unni K, Mertens F (2002). WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. IARC Press: Lyon.
  35. Sobin LH, Wittekind C (2002). TNM: Classification of Malignant Tumours. 6th ed. John Wiley & Sons: New York.
  36. Salesiotis AN, Cullen KJ. Molecular markers predictive of response and prognosis in the patient with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: evolution of a model beyond TNM staging. *Current Opinion in Oncology* 2000;12:229–39.

37. Matsuo JMS, Patel SG, Singh B, et al. Clinical Nodal Stage Is an Independently Significant Predictor of Distant Failure in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Larynx. *Ann Surg* 2003;238:412–22.
38. Field JK. The role of oncogenes and tumour suppressor genes in the aetiology of oral, head and neck squamous cell carcinoma. *J R Soc Med* 1995;88:35–9.
39. Nadal A, Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2003;442:1–7.
40. Rafferty MA, Fenton JE and Jones AS. An overview of the role and inter-relationship of epidermal growth factor receptor, cyclin D and retinoblastoma protein on the carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the larynx. *Clin Otolaryngol* 2001;26:317–20.
41. Myers EN. Cell proliferation activity and kinetic profile in the prognosis and therapeutic management of carcinoma of the pharynx and larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;121:476-81.
42. Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Paludetti G, Maurizi M. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: Towards an integrated clinicobiological approach. *European Journal of Cancer* 2005;41:683–93.
43. Grandis JR, Pietenpol JA, Greenberger JS, Pelroy RA,4 and Mohla S. Head and neck cancer: meeting summary and research opportunities. *Cancer Research* 2004;64:8126–9.
44. Rodrigo JP, Suárez C, González MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, et al. Variability of genetic alterations in different sites of head and neck cancer. *Laryngoscope* 2001;111 (7):1297-301.
45. Howard A, Pelc SR. Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. *Nature* 1951;167(4250):599-600.
46. Rao PN, Johnson RT. Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 1970; 225:159.
47. King RW, Peters JM, Tugendreich S, Rolfe M, Hieter P, and Kirschner MW. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 1995;81:279-88.
48. Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* 1995;20:187-90.
49. Hunter T, and Pines J. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994;79:573-82.
50. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:261-91.
51. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374:131-4.
52. Harbour JW. and Dean DC. Corepressors and retinoblastoma protein function. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001;254:137-44.
53. Harbour JW, Luo RX, Dei SA, Postigo AA, and Dean DC. Cdkphosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 1999;98:859-69.
54. Harbour JW. and Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2000;2:65-7.
55. Harbour JW. and Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 2000;14 2393-409.
56. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell. *Cancer Res* 2000;60:3689-95.

57. Sherr CJ. and Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-2.
58. Enders GH. The INK4a/ARF locus and human cancer. *Methods Mol Biol* 2003;222:197-209.
59. Ortega S, Malumbres M, and Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002;1602:73-87.
60. Shapiro GI. and Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J. Clin Invest* 1999;104:1645-53.
61. Lowe SW. and Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr. Opin. Genet Dev* 2003;13:77-83.
62. Sherr CJ. and McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002;2:103-12.
63. Tuteja N, Tuteja R, Ochem A, Taneja P, Huang NW, et al. Human DNA helicase II: A novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J* 1994;13:4991-5001.
64. Tubo RA, Berezney R. Nuclear matrix-bound DNA primase: Elucidation of an RNA priming system in nuclear matrix isolated from regenerating rat liver. *J Biol Chem* 1987;262:6637-42.
65. Burhans WC, Vassilev LT, Caddle MS, Heintz NH, DePamphilis ML. Identification of an origin of bidirectional DNA replication in mammalian chromosomes. *Cell* 1990;62:955-65.
66. Herrera RE, Sah VP, Williams BO, Makela TP, Weinberg RA and Jacks T. Altered cell cycle kinetics, gene expression, and G1 restriction point regulation in Rb-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1996;16(5):2402-7.
67. Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 1995;10(1):109-15.
68. Lees JA, Weinberg RA. Tossing monkey wrenches into the clock: new ways of treating cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4221-3.
69. Lohrum MA, Ashcroft M, Kubbutat MH, Vousden KH. Contribution of two independent MDM2-binding domains in p14(ARF) to p53 stabilization. *Curr Biol* 2000a;10:539-42.
70. Lohrum MA, Ashcroft M, Kubbutat MH, Vousden KH: Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat Cell Biol* 2000b;2:179-81.
71. Tao W, Levine AJ (): P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6937-41.
72. Bicknell KA, Surry EL, and Brooks G. Targeting the cell cycle machinery for the treatment of cardiovascular disease. *J Pharm Pharmacol* 2003;55:571-91.
73. Reed SI, Bailly E, Dulic V, Hengst L, Resnitzky D, and Slingerland J. G1 control in mammalian cells. *J Cell Sci* 1994;(Suppl 18):69-73.
74. Pines J. Cyclin-dependent kinase inhibitors: the age of crystals. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332:39-42.
75. Brooks G, Poolman RA, and Li JM. Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovasc Res* 1998;39:301-11.
76. Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 1999;287:821-8.
77. Gartel AL, Serfas MS, and Tyner AL. p21-negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;213:138-49.

78. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-7.
79. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997;237:7-13.
80. Zhang H, Hannon GJ, and Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 1994;8:1750-8.
81. Prives C. Doing the right thing: feedback control and p53. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:214-18.
82. Ewen ME. p53-dependent repression of cdk4 synthesis in transforming growth factor-b-induced G1 cell cycle arrest. *J Lab Clin Med* 1996;128:355-60.
83. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81:323-30.
84. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, and Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13742-7.
85. Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, and Massague J. 1995 Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-b. *Genes Dev* 9:1831-5.
86. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-25.
87. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, and Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994;368:753-6.
88. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.
89. Field JK, Kiaris H, Risk JM, Tsiriyotis C, Adamson R, Zoumpourlis V, et al. Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. *Br J Cancer* 1995;72(5):1180-8.
90. Rossi S, Laurino L, Furlanetto A, Chinellato S, Orvieto E, Canal F, et al. Rabbit monoclonal antibodies: a comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol* 2005;124:1-8.
91. Torlakovic E, Nielsen S, Vyberg M. Antibody selection in immunohistochemical detection of Cyclin D1 in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2005;124:782-9.
92. Cheuk W, Wong K, Wong C, Chan J. Consistent immunostaining for Cyclin D1 can be achieved on a routine basis using a newly available rabbit monoclonal antibody. *Am J Surg Pathol* 2004;28:801-7.
93. Zammit C, Barnard R, Gomm J, Coope R, Shousha S, Coombes C, Johnston C. Altered intracellular localization of fibroblast growth factor receptor 3 in human breast cancer. *J Pathol* 2001;194(1):27-34.
94. Marx J. Link to hereditary melanoma brightens mood for p16 gene. *Science* 1994; 265(5177):1364-5.
95. Serrano M, Hannon GJ, Beach. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993; 366(6456):704-7.
96. Yeager T, Stadler W, Belair C, Puthenveetil J, Olopade O, Reznikoff C. Increased p16 levels correlate with pRb alterations in human urothelial cells. *Cancer Res* 1995;55(3):493-7.
97. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993;366:701-4.

98. Brieger J, Jacob R, Riazimand HS, Essig E, Heinrich UR, Bittinger F, et al. Chromosomal aberrations in premalignant and malignant squamous epithelium. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003; 144(2):148-55.
99. El-Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, Luna MA, Goepfert H, Huff V. Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:2656-9.
100. Malzahn K, Dreyer T, Glanz H, Arens C. Autofluorescence endoscopy in the diagnosis of early laryngeal cancer and its precursor lesions. *Laryngoscope* 2002;112:488-93.
101. Johnson FL. Management of advanced premalignant laryngeal lesions. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;11:462-6.
102. Jeannon JP, Soames JV, Aston V, Stafford FW, Wilson JA. Molecular markers in dysplasia of the larynx: expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p21, p27 and p53 tumour suppressor gene in predicting cancer risk. *Clin Otolaryngol* 2004;29:698-704.
103. Perez-Ordoñez B, Beauchemin M and Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006;59:445-53.
104. Chin D, Boyle GM, Theile DR et al. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg* 2004;57:595-602.
105. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2001;345:1890-900.
106. Hosokawa Y and Arnold A. Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;22:66-71.
107. Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993;7:139.
108. Motokura T, Arnold A. Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3(1):5-10.
109. Patmore HS, Cawkwell L, Stafford ND, and Greenman J. Unraveling the chromosomal aberrations of head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Ann Surg Oncol* 2005;12(10):831-42.
110. Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustg AK, Opitz OG, Suliman Y, Wong DT. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(1):51-61.
111. Deshpande A, Peter Sicinski P and Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 2005;24:2909-15.
112. Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A, Weinberg RA. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:709-13.
113. Lim YC, Lee SH, Song MH, Yamaguchi K, Yoon JH, Choi EC et al. Growth inhibition and apoptosis by (-)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1 suppression in head and neck squamous carcinoma cells. *Eur J Cancer* 2006;42:3260-6.
114. Withers DA, Harvey RC, Faust JB, et al. Characterization of a Candidate bcl-1 Gene. *Mol Cell Biology* 1991;11(10):4846-53.
115. Motokura T and Arnold A. PRAD1/cyclin D1 proto-oncogene: genomic organization, 5' DNA sequence and sequence of a tumor-specific rearrangement breakpoint. *Genes Chromosomes Cancer* 1993;7:89-95.
116. Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther* 2002;1:226-31.

117. Scully C, Field JK and Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000;36:256–63.
118. Zaslav AL, Stamberg J, Steinberg BM et al. Cytogenetic analysis of head and neck carcinomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1991;56(2):181-7.
119. Monden N, Nishizaki K, Fukushima K, et al. Quantitative analysis of cyclin D1 messenger RNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Japanese Journal of Cancer Research* 1997;88:660-8.
120. Schneeberger C, Eder S, Swoboda H, Ullrich R, Zeillinger R. A differential PCR system for the determination of CCND1 (cyclin D1) gene amplification in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1998;34:257-60.
121. Matthias C, Jahnke V, Jones PW, Hoban PR, Alldersea JE, Worrall SF, et al. Cyclin D1, glutathione S-transferase, and cytochrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1999;8:815–23.
122. Rodrigo JP, Garcia LA, Ramos S, Lazo PS and Suarez C. EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clinical cancer research* 2000;6:3177–82.
123. Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, Wang LE, Eicher SA, Strom SS, et al. Cyclin D1 polymorphism and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Carcinogenesis* 2001;22:1195–9.
124. Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Li XQ, Ibarguen H, Lee JS, Ro Jy et al. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene* 1998;17:2313-22.
125. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA and Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 2006;25:1620–8.
126. Rydzanicz M, Golusinski P, Mielcarek-Kuchta D, Golusinski W, Szyfter K. Cyclin D1 gene (CCND1) polymorphism and the risk of squamous cell carcinoma of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006;263:43–8.
127. Nawroz H, van der Riet P, Hruban RH, Koch W, Ruppert JM, Sidransky D. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 1994;54:1152-5.
128. Ah-See KW, Cooke TG, Pickford IR, Soutar D, and Balmain A. An Allelotype of Squamous Carcinoma of the Head and Neck Using Microsatellite Markers. *Cancer Research* 1994;56:1617-21.
129. Lydiatt WM, Davidson BJ, Shah J, Schantz SP, Chaganti RSK. The relationship of loss of heterozygosity to tobacco exposure and early recurrence in head and neck squamous-cell carcinoma. *Am J Surg* 1994;168:437-40.
130. Patmore HS, Ashman JN, Cawkwell L, et al. Can a genetic signature for metastatic head and neck squamous cell carcinoma be characterised by comparative genomic hybridisation? *Br J Cancer* 2004;90:1976–82.
131. Stafford ND, Ashman JN, MacDonald AW, et al. Genetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma and surrounding mucosa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:1341–8.
132. Qin LX. Chromosomal aberrations related to metastasis of human solid tumors. *World J Gastroenterol* 2002;8(5):769-76.

133. Bockmuühl U, Schluüns K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I. Chromosomal Alterations During Metastasis Formation of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Genes, Chrom & Cancer* 2002;33:29–35.
134. Jin Y, Mertens F, Mandahl N, et al. Chromosome abnormalities in eighty-three head and neck squamous cell carcinomas: influence of culture conditions on karyotypic pattern. *Cancer Research* 1993;53:2140-6.
135. Stafford ND, Ashman JNE, MacDonald AW, Ell SR, Monson JRT, Greenman J. Genetic Analysis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Surrounding Mucosa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;125:1341-48.
136. Nagal MA. Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999;32:897-904.
137. Akervall J, Borg A, Dictor M et al. Chromosomal translocations involving 11q13 contribute to cyclin D1 overexpression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Oncol* 2002;20(1):45-52.
138. Helliwell TR. Molecular markers of metastasis in squamous carcinomas. *J Pathol* 200;1194: 289-93.
139. Berenson JR, Yang J, Mickel RA. Frequent amplification of the Bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 1989;4:1111-6.
140. Somers KD, Schechter G L. Genetic alterations in head and neck cancer. *Otolaryngologic Clinics of North America* 1992;25:1065-72.
141. Tsuda T, Tahara E, Kajiyama G, Sakamoto H, Terada M, Sugimura T. High incidence of coamplification of Hst-1 and Int-2 genes in human esophageal carcinomas. *Cancer Research* 1989;49:5505-8.
142. Zhou DJ, Casey G, Cline MJ. Amplification of int-2 in breast cancers and squamous carcinomas. *Oncogene* 1988;2:279-82.
143. Merritt WD, Weissler MC, Turk BF, Gilmer TM. Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Archives of Otolaryngology, Head and Neck Surgery* 1990;116: 1394-8.
144. Somers KD, Cartwright S L, Schechter GL. Amplification of the Int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 1990; 5: 915-20.
145. Gaffey MJ, Iezzoni JC, Meredith SD et al. Cyclin D1 (PRAD1, CCND1) and glutathione-S-transferase pi gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum. Pathol.* 1995;26(11):1221–26.
146. Mineta H, Borg A, Dictor M, Wahlberg P and Wennerberg J. Correlation between p53 mutation and cyclin D1 amplification in had and neck squamous cell carcinoma. *Oral. Oncol.* 1997;33(1):42–6.
147. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 CDK-interacting protein cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75:805–16.
148. Kuo MY, Chang HH, Hahn LJ et al. Elevated ras p21 expression in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1995;24:255-60.
149. Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA and Batsakis JG. PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994;74(1):152–8.



150. Davidson BJ, Lydiatt WM, Abate MP, Schantz SP, Chaganti RS. Cyclin D1 abnormalities and tobacco exposure in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 1996;18:512-21.
151. Casey G, Smith R, Mc Gillivray D, Peters G, and Dickson C. Characterization and chromosome assignment of the human homolog of int-2, a potential proto-oncogene. *Mol Cell Biol* 1986;6:502-510.
152. Almadori G, Galli J, Cadoni G, Bussu F, and Maurizi M. Human papillomavirus infection and cyclin D1 gene amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: biologic function and clinical significance. *Head Neck* 2002;24(6):597–604.
153. Rodrigo JP, Suárez C, González MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, et al. Variability of genetic alterations in different sites of head and neck cancer. *Laryngoscope* 2001;111(7):1297-301.
154. Kyomoto R, Kumazawa H, Toda Y et al. Cyclin D1 gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein over expression in human head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1997;74:576-81.
155. Nimeus E, et al. Amplification of the cyclin D1 gene is associated with tumour subsite, DNA non-diploidy and high S-phase fraction in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology* 2004;40:624–9.
156. Jin Y, Höglund M, Jin C, Martins C, Wennerberg J, Akervall J et al. FISH Characterization of head and neck carcinomas reveals that amplification of band 11q13 is associated with deletion of distal 11q. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;22:312–20.
157. Namazie A, Alavi S, Olopade OI, et al. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope* 2002;112:472–81.
158. Nimeus E, Baldetorp B, Bendahl PO, Rennstam K, Wennerberg J, Akervall J, et al. Amplification of the cyclin D1 gene is associated with tumour subsite, DNA non-diploidy and high S-phase fraction in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2004;40:624–9.
159. Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, Devens F, Benner A, Bosch FX et al. Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:1179-82.
160. El-Naggar AK, Steck K, Batsakis JG. Heterogeneity of the proliferative fraction and cyclin D1/CCND1 gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Cytometry* 1995;21:47-51.
161. Xu L, Davidson BJ, Murty VV, et al. TP53 gene mutations and CCND1 gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1994;59:383 -7.
162. Williams ME. Gaffey M, Weiss LM, Wilczynski SP, Schuuring E, Levine PA. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993;119:1238-43.
163. Nogueira CP, Dolan RW, Gooley J, Byahatti S, Vaughn CW, Fuleihan NS et al. Inactivation of p53 and amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1998;108:345-50.
164. Gleich LL, Salamone FN Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control* 2002;9:369-78.

165. Leonard JH, Kearsley JH, Chenevix-Trench GE, Hayward NK. Analysis of gene amplification in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 1991;48: 511-15.
166. Nogueira CP, Dolan RW, Gooley J, Byahatti S, Vaughn CW, Fuleihan NS et al. Inactivation of p53 and amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1998;108:345-50.
167. Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, Pallente M, Ensley JF, Koontongkaew S et al. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser.
168. Olshan AF, Weissler MC, Pei H, et al. Alterations of the p16 gene in head and neck cancer: frequency and association with p53, PRAD-1 and HPV. *Oncogene* 1997;14:811–8.
169. Jares P, Fernandez PL, Nadal A, Cazorla M, Hernandez L, Pinyol M, et al. p16MTS1/CDK4I mutations and concomitant loss of hetero-zygosity at 9p21-23 are frequent events in squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene* 1997;15:1445-53.
170. Akervall J, Bockmuhl U, Petersen I, Yang K, Carey TE, and Kurnit DM. The gene ratios c-MYC: Cyclin-dependent kinase (CDK)N2A and CCND1:CDKN2A correlate with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research* 2003;9:1750–5.
171. Peschos D, Tsanou E, Stefanou D, Damala C, Vougiouklakis T, Mitselou A, Agnantis NJ. Expression of cyclin-dependent kinases inhibitors p21(WAF1) and p27(KIP1) in benign, premalignant and malignant laryngeal lesions. correlation with cell cycle regulatory proteins. *In Vivo* 2004;18(6):719-24.
172. Jeannon JP, and Wilson JA. Cyclins, cyclin-dependent-kinases & cyclin-dependent-kinase inhibitors in head & neck cancer. *Clin Otolaryngol* 1998;23: 420–4.
173. Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992;71: 505–14.
174. Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol:Mol Pathol* 1998;51:1–7.
175. Lovec H, Sewing A, Lucibello FC, Muller R, Moroy T. Oncogenic activity of cyclin D1 revealed through cooperation with Ha-ras: link between cell cycle control and malignant transformation. *Oncogene* 1994;9:323-6.
176. Rosenberg CL, Wong E, Petty EM, Bale AE, Tsujimoto Y, Harris NL, and Arnold A. PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 9638-42.
177. Xu J, Gimenez-Conti IB, Cunningham JE, Collet AM, Luna MA, Lanfranchi HE et al. Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. *Cancer* 1998;83:204-12.
178. Rogowski M, Walenczak I, Pepiński W, Skawrońska M, Sieśkiewicz A, Klatka J. Loss of heterozygosity in laryngeal cancer. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku* 2004;49:262-4.
179. Roh HJ, Shin DM, Lee JS, Ro JY, Tainsky MA, Hong WK, et al. Visualization of int-2 amplification in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Proc AACR* 1994;35:117.

180. Aagaard L, Lukas J, Bartkova J, Kjerulff AA, Strauss M. and Bartek J. Aberrations of p16Ink4 and retinoblastoma tumor-suppressor genes occur in distinct subsets of human cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 1995;61:115–20.
181. Brotherton DH, et al. Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d. *Nature* 1998; 395:244–50.
182. Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *TIG* 1995;11:136-40.
183. Mineta H, Miura K, Takebayashia S, Misawaa K, Uedaa Y, Suzukia I, Itoa M, Wennerbergc J. Low expression of fragile histidine triad gene correlates with high proliferation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2002;39:56–63.
184. Brenner AJ, Stampfer MR and Aldaz CM. Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* 1998;17:199-205.
185. Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA and Lincoln CE. Immunohistochemical Detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INK4A in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. *Cancer Res* 1995;55:6006-11.
186. Liggett W, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin. Oncol* 1998;16:1197-206.
187. Serrano M, Lee HW, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D and Depinho RA. *Cell* 1996;85:27-37.
188. Sharpless NE and DePinho RA. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:22–30.
189. Spillare EA, Okamoto A, Hagiwara K, Demetrick DJ, Serrano M, Beach D and Curtis C. Harris' Suppression of Growth In Vitro and Tumorigenicity In Vivo of Human Carcinoma Cell Lines by Transfected p16 INK4. *Molecular Carcinogenesis* 1996;16:53-60.
190. Crowe DL, Hacia JG, Hsiek CL, Sinha UK, Rice H. Molecular pathology of head and neck cancer. *Histol. Histopathol* 2002;17:909-14.
191. Plzak J, Chovanec M, Cada Z, Betka J, Smetana KJ. Current promising molecular markers in head and neck squamous cell cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264(Suppl 1):76.
192. Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Gene Dev* 2003;13:77–83.
193. Chen YQ, Cipriano SC, Arenkiel JM, Miller FR. Tumor suppression by p21WAF1. *Cancer Res* 1995;55:4536–9.
194. Zhang SY, Klein-Szanto AJ, Sauter ER, Shafarenko M, Mitsunaga S, Nobori T, et al. Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck. *Cancer Res* 1994;54:5050-3.
195. Natarajan E, Saeb M, Crum CP, Woo SB, McKee PH, and Rheinwald JG. Co-Expression of p16INK4A and laminin 5  $\gamma$ 2 by microinvasive and superficial squamous cell carcinomas in vivo and by migrating wound and senescent keratinocytes in culture. *American Journal of Pathology* 2003;163:477-91.
196. Microarrays in molecular profiling in cancer, Focus on head and neck squamous cell carcinoma. Järvinen AK. Helsinki Biomedical Graduate School, University of Helsinki, Helsinki, 2008, 19-21.

197. Kong CS, Narasimhan B, Cao H, Kwok S, Erickson JP, Koong A et al. The relationship between human papillomavirus status and other molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiation Biol Phys* 2009;74(2):553-61.
198. Riese U, Dahse R, Fiedler W, Theuer C, Koscielny S, Ernst, et al. Tumour suppressor gene p16(CDKN2A) mutation status and promoter inactivation in head and neck cancer. *Int J Mol Med* 1999;4:61-5.
199. Rawnsley J, Srivatsan ES, Chakrabarti R, Billings K, Wang M. Deletion analysis of the p16/CDKN2 gene in head and neck squamous cell carcinoma tumors by quantitative PCR. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:863–919.
200. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet* 1995;11:210-2.
201. Gonzales MV, Pello MF, Lopez-Larea C, Suarez C, Menendez MJ, Coto E. Deletion and methylation of the tumour suppressor gene p 1 6/CDKN2 in primary head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 1997;50:509-512.
202. Worsham MJ, Chen KM, Tiwari N, Pals G, Schouten JP, Sethi S, Benninger MS. Fine-Mapping Loss of Gene Architecture at the CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p14ARF, p16INK4a), and MTAP Genes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:409-15.
203. Worsham MJ, Chen KM, Tiwari N, Pals G, Schouten JP, Seema Sethi. Fine-mapping loss of gene architecture at the CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p14ARF, p16INK4a), and MTAP genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:409-15.
204. Rocco JW, Sidransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001;264:42–55.
205. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000;60:892–5.
206. Stone S et al. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res* 1995;55:2988–94.
207. Maruya S, Issa JPI, Weber RS, Rosenthal DI, Haviland JC, Lotan R, and El-Naggar AK. Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: incidence and potential implications. *Clinical cancer research* 2004;10:3825–30.
208. Miracca EC, Kowalski LP, Nagai MA . High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumours. *Br J Cancer* 1999;81:677–83.
209. Geisler S, Olshan A, Weissler M, et al. p16 and p53 expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3445–53.
210. Rosas SLB, Wayne Koch, Carvalho MGC, Wu L, Califano J, Westra W, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Research* 2001;61:939–42.
211. Agnese V, Corsale S, Calo V, Augello C, Bruno L, Calcara D, et al. Significance of P16INK4A hypermethylation gene in primary head/neck and colorectal tumors: it is a

- specific tissue event? Results of a 3-year GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Annals of Oncology* 2006;17(Suppl 7):137–41.
212. Ai L, Stephenson KK, Ling W, Zuo C, Mukunyadzi P, Suen JY, et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: A promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol* 2003;16(9):944–50.
  213. Calmona MF, Colomboa J, Carvalhob F, Souzaa FP, Filhoc JFG, Fukuyamac EE, et al. Methylation profile of genes CDKN2A ( p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007;173:31-7.
  214. Koscielny S, Dahse R, Ernst G, Eggeling Fv. The Prognostic Relevance of p16 inactivation in head and neck cancer. *ORL* 2007;69:30-36.
  215. Nunn J, Scholes AGM, Liloglou T, Nagini S, Jones AS, Vaughan ED et al. Fractional allele loss indicates distinct genetic polupations in the development of squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Carcinogenesis* 1999;20(12):2219-28.
  216. Van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corto R, Tokino K, Koch W and Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer Progression. *Cancer Res* 1994;54:1156-8.
  217. Waber P, Dlugosz S, Cheng QC, Truelson J and D Nise P. Genetic alterations of chromosome band 9p21-22 in head and neck cancer are not restricted to p16INK4a. *Oncogene* 1997;15:1699-704.
  218. Kujawski M, Sarlomo-Rikala M, Gabriel A, et al. Recurrent DNA copy number losses associated with metastasis of larynx carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;26:253–7.
  219. Tremmel SC, Gotte K, Popp S, et al. Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;144:165–74.
  220. Beder L, Gunduz M, Fukunishi K, Hiura Y, Nishizaki K, Shimizu K, et al. Genome-wide heterozygosity analysis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Hard Tissue Biology* 2002;14(2):229-31.
  221. Patel V, Jakus J, Harris CM, Ensley JF, Robbins KC, Yeudall WA. Altered expression and activity of G1/S cyclins and cyclin-dependent kinases characterize squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 1997;73: 551-5.
  222. Kiaris H, Spanakis N, Ergazaki M, Sourvinos G, Spandidos DA. Loss of heterozygosity at 9p and 17q in human laryngeal tumors. *Cancer Letters* 1995;97:129-34.
  223. Lydiatt WM, Murty VV, Davidson BJ, Xu L, Dyomina K, Sacks PG, et al. Homozygous deletions and loss of expression of the CDKN2 gene occur frequently in head and neck squamous cell carcinoma cell lines but infrequently in primary tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;13(2):94-8.
  224. Soder AI, Hopman AHN, Ramaekers FCS, Conradt C, Bosch FX. Distinct nonrandom patterns of chromosomal aberrations in the progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1995;55:5030–7.
  225. Kim MM, Califano JA. Molecular pathology of head-and-neck cancer. *Int J Cancer* 2004;112:545–53.
  226. Gonzalez MV, Pello MF, Lopez-Larrea C, Suarez C, Menendez MJ, and Coto E. Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research* 1995;1:1043-9.

227. Guervos MA, Marcos CA, Llorente JL, Nuno AS, Suarez C, Hermesen M. Genetic differences between primary larynx and pharynx carcinomas and their lymph node metastases by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Oral Oncology* xxx (2008) xxx-xxx ( in press).
228. Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck*, 23: 238-53, 2001.
229. Mao L, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Shin DS, Shin HC, Youhong Fan Y, et al. Phenotype and genotype of advanced premalignant head and neck lesions after chemopreventive therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 1998;90(20):1545-51.
230. Rizos E, Sourvinos G, Spandido DA. Loss of heterozygosity at 8p, 9p and 17q in laryngeal cytological specimens. *Oral Oncology* 1998;34:519-23.
231. Sasiadek MM, Stembalska-Kozłowska A and Smigiel R, et al., Impairment of MLH1 and CDKN2A in oncogenesis of laryngeal cancer. *Br J Cancer* 2004;90: 1594–9.
232. Yoo WJ, Cho SH, Lee YS, Park GS, Kim MS, Kim BK, et al. Loss of heterozygosity on chromosomes 3p, 8p, 9p and 17p in the progression of squamous cell carcinoma of the larynx. *J Korean Med Sci* 2004;19:345-51.
233. Szyfter K, Szmęja Z, Szyfter W, Hemminki K, Banaszewski J, Jaskula-Sztul R, et al. Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer. *Mutat Res* 1999;445:259–74.
234. Bazan V, Zanna I, Migliavacca M, Sanz-Casla MT, Maestro ML, Simona Corsale S, et al. Prognostic significance of p16INK4a alterations and 9p21 loss of heterozygosity in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Journal of Cellular Physiology* 2002;192(3):286 – 93.
235. Jares P, Nadal A, Fernandez PL, Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, et al. Disregulation of p16MTS1/CDK4I protein and mRNA expression is associated with gene alterations in squamous-cell carcinoma of the larynx. *Int J Cancer* 1999;81:705-11.
236. Nakanishi H, Wang XL, Imai FL, Kato J, Shiiba M, Miya T et al. Localisation of a novel tumour suppressor gene loci on chromosome 9p21-22 in oral cancer. *Anticancer Res* 1999;19:29-34.
237. Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, Tanaka N, Noguchi M, Sonoda T, et al. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2002;(8):3164–71.
238. Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, Lee JS, Fan JH, Clayman G, et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene* 1997;14:1799-803.
239. Wreesmann VB, Wang D, Goberdhan A, Prasad M, Ngai I, Schnaser EA et al. Genetic abnormalities associated with nodal metastasis in head and neck cancer. *Head and Neck* 2004;26(1):10-5.
240. Bockmühl U, Petersen S, Schmidt S, et al. Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:5213–6.
241. Redon R, Muller D, Caulee K, Wanherdrick K, Abecassis J, and Manoir S. A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: PIK3CA but not p63 gene as a likely target of 3q26-qter gains. *Cancer Research* 2001;61:4122–9.

242. Lang JC, Borchers J, Danahey D, Smith S, Stover DG, Agrawal A et al. Mutational status of overexpressed p16 in head and neck cancer: evidence for germline mutation of p16/p14ARF. *Int J Oncol* 2002;21:401–8.
243. Sanz-Ortega J, Valor C, Saez MC et al. 3p21, 5q21, 9p21 and 17p13 allelic deletions accumulate in the dysplastic spectrum of laryngeal carcinogenesis and precede malignant transformation. *Histol Histopathol* 2003;18:1053–7.
244. Lang JC, Tobin EJ, Knobloch TJ, Schuller DE, Bartynski KJ, Mountain RE, et al. Frequent Mutation of p16 in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Laryngoscope* 1998;108(6):923-8.
245. Temam S, Benard J, Dugas C, Trassard M, Gormally E, Soria JC, et al. Molecular detection of early-stage laryngopharyngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2547-51.
246. Huang H, Cui Y, Tang D, Tao Y, Liu Q. Correlation of p16 mutation and biological behavior in Chinese laryngeal cancer. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 200;15(6):253-4.
247. Lai S, El-Naggar AK . Differential expression of key cell cycle genes (p16/cyclin D1/pRb) in head and neck squamous carcinomas. *Lab Invest* 1999;79:255–60.
248. Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett P, et al. Mutations and altered expresion of p16CDK2 in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1994;91:11045-49.
249. Bradley KT, Budnick SD and Logani S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Modern Pathology* 2006;19:1310–6.
250. Slebos RJC, Yi Y, Kim Ely, Carter J, Evjen A, Zhang X et al. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin cancer res* 2006;12(3):701-9.
251. Gasco M, Bell AK, Heath V, Sullivan A, Smith P, Hiller L et al. Epigenetic inactivation of 14-3-3  $\sigma$  in oral carcinoma: association with p16INK4a silencing and human papillomavirus negativity. *Cancer Research* 2002;62:2072–6.
252. Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA, Shah K, and Westra WH. Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clinical Cancer Research* 2003; 9:6469–75.
253. Smeets SJ, Braakhuis BJM, Abbas S, Snijders PJF, Ylstra B, van de Wiel MA, et al. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene* 2006;25:2558–64.
254. Bradford CR. Genetic markers of head and neck cancer identifying new molecular targets. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:366-7.
255. O’Shaughnessy JA, Kelloff GJ, Gordon GB, Dannenberg AJ, Hong WK, Fabian, CJ et al. Treatment and Prevention of Intraepithelial Neoplasia: An important target for accelerated new agent development recommendations of the american association for cancer research task force on the treatment and prevention of intraepithelial neoplasia. *Clinical Cancer Research* 2002;8:314–46.
256. Gallo O, Santucci M, Franchi A. Cumulative prognostic value of p16/CDKN2 and p53 oncoprotein expression in premalignant laryngeal lesions. *Journal of the National Cancer Institute* 1997;89:1161-3.

257. Cardinali M, Jakus J, Shah S, Ensley JF, Robbins KC, Yeudall WA. p21 (WAF1/Cip1) retards the growth of human squamous cell carcinomas in vivo. *Oral Oncol* 1990;34:211–8.
258. El-Deiry WS, Tokino T, Waldman T. et al. Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995;55: 2910–19.
259. Harada K, Ogden GP. An overview of the cell cycle arrest protein, p21WAF1. *Oral Oncology* 2000;36:3-7.
260. Nakanishi M, Robetorye RS, Adami GR, Pereira-Smith OM, Smith JR. Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1. *EMBO J* 1995;14:555–63.
261. Vogt M, Haggblom C, Yeargin J, Christiansen-Weber T and Haas M. Independent induction of senescence by p16Ink4a and p21CIP1 in Spontaneously Immortalized Human Fibroblasts. *Cell Growth and Differentiation* 1998;9:139-46.
262. Li G, Liu Z, Sturgis EM, Shi Q, Chamberlain RM, Spitz MR, et al. Genetic polymorphisms of p21 are associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 2005;26(9):1596-602.
263. Yook JL, Ki J. Expression of p21WAF1/CIP1 is unrelated to p53 tumour suppressor gene status in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology* 1998;34: 198-203.
264. Ng IO, Lam KY, Ng M, et al. Expression of p21/waf1 in oral squamous cell carcinomas: correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. *Oral Oncol.* 1999;35:63-9.
265. Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, et al. Alterations of p53, pRb, cyclin D1 and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2000;36:334-9.
266. Tatemoto Y, Osaki T, Yoneda K et al. Expression of p53 and p21 proteins in oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and response to chemoradiotherapy. *Pathol Res Pract.* 1998;194:821-30.
267. Yuen PW, Chow V, Choy J, et al. The clinicopathologic significance of p53 and p21 expression in the surgical management of lingual squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2001;116:240-5.
268. Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, et al. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin cancer res* 1999;5:2810-9.
269. Duane A, Sewell DA, Yuan CX, Robertson E. Proteomic signatures in laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL* 2007;69(2):77-84.
270. Shanmugaratnam K, Sobin LH. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. a commentary on the second edition. *Cancer* 1993;71:2689-97.
271. Tulunay OE. Laryngitis—diagnosis and management. *Otolaryngol Clin North Am* 2008;41(2):437-51.
272. Sulfaro S, Barzan L, Querin F, Lutman M, Caruso G, Comoretto R, et al. T staging of the laryngohypopharyngeal carcinoma. A 7-year multidisciplinary experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;115(5):613-20.
273. Heidenhain M. Noch einmal über die darstellung der centralkörper durch eisenhamotoxylin. Nebst einigen allgemeinen bemerkungen über die hamatoxylinfarben. *2. Wiss. Mikrosk.,* 1896; 13:186.



274. Bancroft JD and Gamble M. Theory and practice of histological techniques. 5th edition. Churchill Livingstone, Edeinburgh, London, New York, Oxford, 2002.
275. NHSBSP. Pathology reporting of breast disease. NHSBSP publication no 58. Sheffield: 2005:86–7.
276. Volavšek M, Bračko M and Gale N. Distribution and prognostic signi.cance of cell cycle proteins in squamous carcinoma of the larynx, hypopharynx and adjacent epithelial hyperplastic lesions. *J Laryngol Otol* 2003;117:286–93.
277. Motokura T and Arnold A. PRAD1/cyclin D1 proto-oncogene: genomic organization, 5' DNA sequence and sequence of a tumor-specific rearrangement breakpoint. *Genes Chromosom Cancer* 1993;7:89–95.
278. Zhang YJ, Jiang W, Chen CJ, Lee CS, Kahn SM, Santella RM, et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellularcarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196:1010-6.
279. Bartkova J, Lukas J, Muller H, Luthzhoft D, Strauss M, Bartek J. CyclinD1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer*1994;57:353-61.
280. Bartkova J, Lukas J, Muller H, Strauss M, Gusterson B, Bartek J. Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer. *Cancer Res* 1995;55: 949-56.
281. Ioachim E, Peschos D, Goussia A, Mittari E, Charalabopoulos K, Michael M et al. Expression patterns of cyclins D1, E in laryngeal epithelial lesions: Correlation with other cell cycle regulators (p53, pRb, Ki-67 and PCNA) and clinicopathological featur. *J Exp Clin Cancer Res* 2004;23(2):277-83.
282. Kumar RV, Shenoy AM, Daniel R, Shah KV. Cyclin D1, p53, MIB1, intratumoral microvessel density, and human papillomavirus in advanced laryngeal carcinoma: Association with nodal metastasis. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2004;131(4):509-13.
283. Michalides R, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A. Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1995;55:975-8.
284. Morshed K, Skomra D, Korobowicz E, Szymanski M, Polz-Dacewicz M and Golabek W. An immunohistochemical study of cyclin D1 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Oto-Laryngologica* 2007;127:760-9.
285. Dong Y, Sui L, Sugimoto K, et al. Cyclin D1-CDK4 complex, a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;95:209–15.
286. Pignataro L, Pruneri G, Carboni N, et al. Clinical relevance of cyclin D1 protein overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1998;16:3069-77.
287. Segas JV, Lazaris AC, Nikolopoulos TP, Nikolaos G. Kavantzias NG, Lendari IE et al. Cyclin D1 protein tissue detection in laryngeal cancer. *ORL* 2005;67:319-25.
288. Goldfarb M. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:311-25.
289. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 2000;22:108-12.

290. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 2000;20:2260-8.
291. Galzie Z, Kinsella AR, Smith JA. Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem Cell Biol* 1997;75:669-85.
292. Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 1992;59:115-60.
293. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwan DG, MacArthur CA, Coulier F, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996;271:15292-7.
294. Field JK. Oncogenes and tumour-suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncolog Ear J Cancer* 1992;1:67-76.
295. Wakulich C, Boeters LJ, Daley TD, Wysocki GP. Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and receptors fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:573-9.
296. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994;8:15-21.
297. Caldas C, Hahn SA, da Costa L T, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994;8:27-32.
298. Lapointe J, Lachance Y, Labrie Y, and Labrie C. A p18 mutant defective in CDK6 binding in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1996;56:4586-9.
299. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996;12:97-9.
300. Paggi MG, Baldi A, Bonetto F, and Giordano A. Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer: a review. *J Cell Biochem* 1996;62:418-30.
301. Yuen PW, Lam KY, Choy JT, Ho WT, Wei WI. Clinicopathological significance of p53 and p21 expression in the surgical treatment of laryngeal carcinoma. *Anticancer Res* 2000;20:4863-6.
302. Lingbao Ai, Stephenson KK, Ling W, Zuo C, Mukunyadzi P, Suen JY, et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) Tumor-Suppressor Gene in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Promoter Methylation and Protein Expression Study in 100 Cases. *Mod Pathol* 2003;16(9):944-50.
303. Laco J, Slaninka I, Jirasek M, Celakovsky P, Vosmikova H, Ryska A. High-risk human papillomavirus infection and p16INK4a protein expression in laryngeal lesions. *Pathology Research and Practice* 2008;204:545-52.
304. Bruce JL, et al. Requirements for cell cycle arrest by p16INK4a. *Mol. Cell* 2000;6:737-42.

305. Gu Y, Turek CW, Morgan DO. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 1993;366:707-10.
306. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Expl Cell Res* 1994;211:90-8.
307. Nadal A, Jares P, Cazorla M, Fernandez PL, Sanjuan X, Hernandez L, et al. p21WAF1/Cip1 expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinomas of the larynx. *Journal of Pathology* 1997;183:156-63.
308. Osman I, Sherman E, Singh B, Venkatraman E, Zelefsky M, Bosl G, et al. Alteration of p53 Pathway in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Impact on Treatment Outcome in Patients Treated With Larynx Preservation Intent. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20(13):2980-7.
309. Erber R, Klein W, Andl T, et al: Aberrant p21 (CIP1/WAF1) protein accumulation in head-and-neck cancer. *Int J Cancer* 1997;74:383-9.
310. Li X, Izumaru S, Sakamoto K, Miyajima Y, Nakashima T. The immunohistochemical expression of p21WAF1/Cip1 and proliferating cell nuclear antigen in laryngeal squamous cell carcinomas. *The Journal of Laryngology & Otology* 2006;120:1042-8.
311. Jin YT, Kayser S, Kemp BL, Ordonez NG, Tucker SL, Clayman GL, et al. The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1998;82:2159-65.
312. Maiorano E, Botticella MA, Marzullo A, et al: Expression of ER-D5 and EGFR in laryngeal carcinoma and pre-malignant epithelium. *Acta Otolaryngol Suppl* 1997;527:95-9.
313. Wang J, Lou W, Dong M. Study on the relation between the cell cycle regulators and laryngeal carcinogenesis *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2001;15(3):112-4.
314. Hirvikoski P, Virtaniemi J, Kumpulainen E, Johansson R, Kosmad M. Supraglottic and glottic carcinomas: clinically and biologically distinct entities? *European Journal of Cancer* 2002;38:1717-23.
315. Russo AA, Tong L, Lee JO, Jeffrey PD, Pavletich NP. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumor suppressor p16INK4a. *Nature* 1998;395:237-43.
316. Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* 1999;50:401-23.
317. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27kip1 protein: prognostic implication in primary breast cancer. *Nature Med* 1997;3:227-30.
318. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, et al. Increases proteasomedependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997;3:231-4.
319. Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. The murine gene p27kip1 is haploinsufficient for tumour suppression. *Nature* 1998;396:177-180.
320. Garrett MD, Fattaey A. CDK inhibition and cancer therapy. *Curr Opin Gen Dev* 1999;9:104-11.

321. Serrano M, Gomez-Lahoz E, DePinho RA, Beach D, Bar-Sagi D: Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science* 1995;267:2492-52.
322. Peng J, Zeng Y, Xu Y. Significance of p16 and C-myc expression in the laryngeal squamous cell carcinoma. *Lin Chuang Erh Pi Yen Hou Ko Tsa Chih Journal of Clinical Otorhinolaryngology*. 1997;11(8):352-5.
323. El-Naggar AK, Lai S, Clayman G, Lee JK, Luna MA, Goepfert H, et al. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. *Am J Pathol* 1997;151(6):1767-74.
324. Matthias C, Jahnke V, Jones PW, Hoban PR, Alldersea JE, Worrall SF, et al. Cyclin D1, glutathione S-transferase and cytochrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(9):815-23.
325. Lam KY, Ng IO, Yuen AP, Kwong DL, Wei W. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinomas: clinicopathological relevance and correlation with p53 expression. *J Oral Pathol Med* 2000;29(4):167-72.
326. Volling P, Jungehulsing M, Jucker M: Coamplification of the hst and bell oncogenes in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer* 1993;29:383-9.
327. Smith EM, Wang D, Kim Y, Rubenstein LM, Lee JH, Haugen TH, et al. p16INK4a expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2008;44(2):133-42.
328. Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Buffa R, Di Finizio D, Cesana BM, et al. Clinical relevance of expression of the CIP/KIP cell-cycle inhibitors p21 and p27 in laryngeal cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(10):3150-9.
329. Foster JS, Henley DC, Bukovsky A, Seth P, Wimalasena J. Multifaceted regulation of cell cycle progression by estrogen: regulation of Cdk inhibitors and Cdc25A independent of cyclin D1-Cdk4 function. *Mol Cell Biol* 2001;21(3):794-810.
330. Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, et al. Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:1179-82.
331. Ferlito A, Olofsson J, Rinaldo A. Barrier between the supraglottis and the glottis: myth or reality? *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106(8):716-9.
332. Tamás L, Szentkúti G, Eros M, Dános K, Brauswetter D, Szende B, et al. Differential biomarker expression in head and neck cancer correlates with anatomical localization. *Pathol Oncol Res* 2011;17(3):721-7.
333. Jares P, Fernández PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. *Cancer Res* 1994;54(17):4813-7.
334. Williams ME, Gaffey MJ, Weiss LM, et al. Chromosome11q13 amplification in head and squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:1238-43.
335. Callender T, El-Naggar AK, Lee MS, et al. PRAD-1 (CCND)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994;74:152-8.
336. Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoike K, et al. Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2003;32(8):468-74.

337. Krecicki T, Smigiel R, Fraczek M, Kowalczyk M and Sasiadek M. Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue. *The Journal of Laryngology & Otology* 2004;118:676-80.
338. Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck* 2006 ;28(3):256-69.
339. Yuen PW, Lam KY, Choy JT, Ho WT, Wei WI. Clinicopathological significance of p53 and p21 expression in the surgical treatment of laryngeal carcinoma. *Anticancer Res* 2000;20:4863-6.
340. JeannonJP, SoamesJ, LunecJ, AwwadS, AshtonV, WilsonJA. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1) and p53 tumour suppressor gene in laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol* 2000;25:23-7.
341. Jin YT, Kayser S, Kemp BL, Ordonez NG, Tucker SL, Clayman GL, et al. The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1998;82:2159-65.
342. Capaccio P, Pruneri G, Carboni N, Pagliari AV, Buffa R, Neri A, et al. Cyclin D1 protein expression is related to clinical progression in laryngeal squamous cell carcinomas. *J Laryngol Otology* 1997;111:622-6.
343. Califano J, van der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488-92.
344. Fracchiolla NS, Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Capaccio P, Boletini A, et al. Molecular and immunohistochemical analysis of the bcl-1/cyclin D1 gene in laryngeal squamous cell carcinomas: correlation of protein expression with lymph node metastases and advanced clinical stage. *Cancer* 1997;79:1114-21.
345. El-Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, et al. Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:2656-9.
346. Nawroz H, van der Riet P, Hruban RH, et al. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:1152-5.
347. Wayne S, Robinson RA. Upper aerodigestive tract squamous dysplasia: Correlation with p16, p53, pRb, and Ki-67 expression. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1309-14.
348. Nagpal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol* 2003;39:213-21.
349. Li W, Thompson CH, Cossart YE, et al. The expression of key cell cycle markers and presence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tonsil. *Head Neck* 2004;26:1-9.

350. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:57-68.
351. Carter RL, Foster CS, Dinsdale EA and Pittam MR. Perineural spread by squamous carcinomas of the head and neck: a morphological study using anti-axonal and anti-myelin monoclonal antibodies. *J Clin Pathol* 1983;36:269-75.
352. Goepfert H, Dichtel WJ, Medina JE, Lindberg RD and Luna MD Perineural invasion in squamous cell skin carcinoma of the head and neck. *Am J Surg* 1984;148:542-7.
353. Biankin AV, Morey AL, Lee CS, Kench JG, Biankin SA, Hook CH, et al. DPC4/Smad4 expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 2002;20(23):4531-42.
354. Ohbu M, Kobayashi N, Okayasu I. Expression of cell cycle regulatory proteins in the multistep process of oesophageal carcinogenesis: stepwise over-expression of cyclin E and p53, reduction of p21(WAF1/CIP1) and dysregulation of cyclin D1 and p27(KIP1). *Histopathology* 2001;39(6):589-96.
355. Serrano M, Hannon GJ, and Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. 1993;366:704-7.
356. Bani-Hani K, Martin IG, Hardie LJ, Mapstone N, Briggs JA, Forman D, Wild CP. Prospective study of Cyclin D1 overexpression in Barrett's esophagus: association with increased risk of adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(16):1316-21.
357. Åkervall JA, Michalides RJAM, Mineta H, Balm A, Borg Å, Dictor MR, et al. Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer* 1997;79:380-9.

# ПРИЛОГ

## 8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:  
РБ

Идентификациони број:  
ИБР

Тип документације:  
ТД

Монографска публикација

Тип записа:  
ТЗ

Текстуални штампани матерјал

Врста рада:  
ВР

Докторска дисертација

Аутор:

Стеван П. Стојановић

**AУ**

**Ментор/коментор:  
МН**

**Проф. др Бранислав Белић**



<b>Title:</b> ТП	<b>Значај квантификације маркера онкогензе у ткивним исечцима оболелих од планоцелуларног карцинома ларинкса и хроничног ларингитиса</b>
<b>Језик публикације:</b> ЈП	<b>Српски (ћирилица)</b>
<b>Језик извода:</b> ЈИ	<b>Српски/Енглески</b>
<b>Земља публикавања:</b> ЗП	<b>Србија</b>
<b>Уже географско подручје:</b> УГП	<b>Србија</b>
<b>Година:</b> ГО	<b>2013.</b>
<b>Издавач:</b> ИЗ	<b>Ауторски репринт</b>
<b>Место и адреса:</b> МС	<b>34000, Крагујевац, Србија Светозара Марковића 69</b>
<b>Физичи опис рада:</b> ФО	<b>Дисертација има 117 страна садржи 7 поглавља, 6 слика, 20 графикана, 23 табеле и 357 референци</b>
<b>Научна област:</b> НО	<b>Медицина</b>
<b>Научна дисциплина:</b> ДИ	<b>Оториноларингологија</b>

**Предметна одредница/ кључне речи**

ларинкс, карцином, хронични ларингитис, *cyclin D1*, *FGF3*, *p16*, *p21*

**ПО**

**УДК**

**Чува се:**

**ЧУ**

У Библиотеци Факултета  
медицинских наука у  
Крагујевцу, 34000 Крагујевац,  
Србија, Светозара Марковића  
69

**Важна напомена:**

**МН**

**Извод:**

**ИД**

Прогресија хроничног ларингитиса и настанак карцинома ларинкса везан је за активацију различитих онкогена и инактивацију тумор супресорских гена. Протеински производи ових гена се имунохистохемијски детектују у ткивним исечцима оболелих пацијената. Утврђено је да карциноми ларинкса са истим клиничким и хистолошким особеностима имају различито биолошко понашање, а самим тим и прогнозу. Хронични ларингитиси се карактеришу дисплазијом која се може степеновати у три стадијума и код које постоји такође измењена експресија онкогена и антионкогена. Клинички и хистолошки налаз допуњени имунохистохемијским бојењем ткивних препарата пружају додатну инфомацију неопходну у третирању хроничног ларингитиса и карцинома ларинкса. Најчешће је измењена експресија онкогена *cyclin D1* и *FGF3* код хроничног ларингитиса и карцинома ларинкса. Од тумор супресорских гена веома често су алтерисани *p16* и *p21*.

Анализирали смо експресију *cyclin D1*, *FGF3*, *p16* и *p21* и показали да знатно већи проценат пацијената са карциномом ларинкса има позитивну експресију маркера *cyclin D1* и *p16* у односу на пацијенте са дисплазијом и са нормалном слузницом ларинкса, што није случај код експресије *FGF3* и *p21*. Пацијенти са карциномом ларинкса имају већи интензитет експресије биомаркера *cyclin D1*, *FGF3*, *p16* и *p21* у односу на пацијенте са дисплазијом и са нормалном слузницом ларинкса. Збир позитивних интензитета експресије *cyclin D1* и *p16* је одлика диспалстичне слузнице ларинкса и карцинома ларинкса. Такође смо показали да су експресија *p16*

и интензитети експресије FGF3 везани за мушки пол. Показали смо и да је инвазија карцинома ларинкса у лимфне судове околног ткива повезана са интензитетима експресије *cyclin D1*. Степени некрозе карцинома ларинкса су везани за више интензитета експресије *cyclin D1* и *p16*, а интензитети експресије *p21* су карактеристични за инфилтративни начин раста карцинома. Експресија *p16* интензитета 2 је у уској вези са дисплазијом средњег степена слузнице ларинкса. Установили смо да је перинеурална инвазија значајно већа код вишег интензитета експресије *p21*. Показали смо и значајно више експресије за *cyclin D1* и *p16* код карцинома, за разлику од збира експресија дисплазије и здраве слузнице. Показали смо и да онкоген *cyclin D1* има сензитивност од 81% и специфичност од 63% за карциноме ларинкса, у односу на заједно дисплазије и нормалну слузницу. Установили смо да *cyclin D1* и FGF3 имају повећану шансу за присуство карцинома у ларингеалном исечку, у односу на остала два типа ткива, и то: код *cyclin D1* за 7,704 пута, а код FGF3 за 5,682 пута у случају повећања њиховог интензитета експресије за 1. Показали смо да, ако и један од четири маркера има најмање експресију 1, тада је присутна сензитивност од 77,1% и специфичност од 76,7% за разликовање карцинома од остала два типа слузнице. По први пут смо установили, уз сензитивност 80% и специфичност 75%, важност комбинације *cyclin D1*>0, FGF3+p16+p21>5 за разликовање диспластичне и нормалне слузнице.

Тумор маркери *cyclin D1*, FGF3, *p16* и *p21* дају значајан допринос у дијагностиковању и диференцијацији ларингеалних лезија, поред индиректне ларингоскопије, ларингомикроскопије са биопсијом и патохистолошких испитивања добијених узорака. Детекцијом експресије и интензитета експресије наведених тумор маркера, много прецизније и детаљније се одређују значајне клиничке и хистолошке карактеристике код хроничног ларингитиса и код карцинома ларинкса, што додатно поједностављује процену биолошког понашања оболелог ткива ларинкса.

Датум прихватања теме од стране ННВ:

29.03.2006.

ДП

Датум одбране:

2013.

ДО

Чланови комисије:

КО

**Председник: Проф. др Љубица Живић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Оториноларингологија, председник

**Члан: Проф. др Љиљана Ердевички**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Оториноларингологија, члан

**Члан: Проф. др Антон Микић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Оториноларингологија, члан

**Члан: Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан

**Члан: Доц. др Слободанка Митровић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

## **8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION**

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC**

**Accession number:**

**ANO**

**Identification number:**

**INO**

**Documentation type:**

**DT**

**Monographic publication**

<b>Type of record:</b> TR	<b>Textual printed material</b>
<b>Contents code:</b> CC	<b>PhD thesis</b>
<b>Author:</b> AU	<b>Стеван П. Стојановић</b>
<b>Menthor/co-mentor</b> MN	<b>Проф. др Бранислав Белић</b>
<b>Title:</b> TI	<b>The importance of quantifying markers of oncogenesis in tissue slices of patients with squamous cell carcinoma of the larynx and chronic laryngitis</b>
<b>Language of text:</b> LT	<b>Serbian (Cyrillic)</b>
<b>Language of abstract:</b> <b>Country of publication:</b> CP	<b>Serbian (Cyrillic)/English Serbian</b>
<b>Locality of publication:</b> LP	<b>Serbia</b>
<b>Publication year:</b> PY	<b>2013.</b>
<b>Publisher:</b> PU	<b>Author reprint</b>
<b>Publication place:</b> PP	<b>34000 Kragujevac, Serbia Svetozara Markovica 69</b>
<b>Physical description</b> PD	<b>Thesis contains 117 pages, 7 chapters, 6 figures, 20 graphs, 23 tables and 357 citations</b>

**Scientific field:** Medicine  
**SF**

**Scientific discipline:** Otorhinolaryngology  
**SD**

**Subject/key words:** Larynx, carcinoma, chronic laryngitis,  
**SKW** cyclin D1, FGF3, p16 and p21

**UDC**

**Holding data:**

Library of Faculty of Medical  
sciences, 34000 Kragujevac, SERBIA  
Svetozara Markovica 69

**Note:**  
**N**

**Abstract:**  
**AB**

Progression of chronic laryngitis and laryngeal cancer development are related to the activation of various oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes. Protein products of these genes are detected by immunohistochemistry in tissue slices in ill patients. It has been determined that laryngeal cancers with the same clinical and histological characteristics have different biological behaviour, and therefore, different prognosis. Chronic laryngitis is characterized by dysplasia, which can be graded into three stages, with altered oncogenes and anti-oncogenes expression. Clinical and histological findings, complemented by immunohistochemical staining of tissue preparations, provide additional information necessary in the treatment of chronic laryngitis and laryngeal cancer. The expression of oncogene cyclin D1 and FGF3 are most often changed in chronic laryngitis and laryngeal cancer. Tumor suppressor genes that are often altered are p16 and p21 .

We have analyzed the expression of cyclin D1, FGF3, p16 and p21 and we have showed that a significantly higher percentage of patients with laryngeal cancer had a positive expression of markers cyclin D1 and p16 compared to patients with dysplasia and normal mucosa of the larynx, which is not the case for the expression of FGF3 and p21. Patients with laryngeal cancer have a higher intensity of expression of biomarkers cyclin D1, FGF3, p16 and p21 compared to patients with dysplasia and normal mucosa of the larynx. The sum of the

positive expression intensity of cyclin D1 and p16 is the characteristic dysplastic lining of the larynx and laryngeal cancer. We have also showed that the expression of p16 and intensity of expression of FGF3 are attached to the male sex. We have demonstrated that the invasion of laryngeal cancer in the lymph vessels of the surrounding tissues is associated with the intensity of expression of cyclin D1. The necrosis degrees of laryngeal cancer are linked to higher intensities of expression of cyclin D1 and p16, and intensities of expression of p21 are characteristics of infiltrative growth pattern of cancer. Expression of p16 intensity 2 is closely related to the medium stage dysplasia of the larynx. We have found that perineural invasion is significantly greater in the higher intensity of expression of p21. We have demonstrated significantly higher expression of cyclin D1 and p16 in cancer, as opposed to the sum of the expression of dysplasia and healthy mucosa. We have shown that oncogene cyclin D1 has a sensitivity of 81% and a specificity of 63% for laryngeal cancer compared to dysplasia and normal mucosa together. We have determined that cyclin D1 and FGF3 have an increased chance of cancer in the presence of laryngeal smears, compared to the other two types of tissue, such as: in cyclin D1 to 7,704 times, and in FGF3 to 5,682 times in the case of increasing the intensity of their expression for 1. We have shown that if one of the four markers has an expression of at least 1, then the sensitivity of 77.1% and a specificity of 76.7% are present for distinguishing cancer from the other two types of lining. With sensitivity of 80% and specificity of 75%, we have determined for the first time, the importance of a combination of cyclin D1 > 0, FGF3 + p16 + p21 > 5 to differentiate dysplastic from normal mucosa.

Tumor markers cyclin D1, FGF3, p16 and p21 are very important in the diagnosis and differentiation of laryngeal lesions, in addition to indirect laryngoscopy, laryngomicroscopy with biopsy and histopathological examination of obtained samples. Detection of expression and intensity of expression of the above tumor markers helps to determine more precisely the clinical and histological features in chronic laryngitis and laryngeal cancer, which further simplifies the evaluation of the biological behaviour of the diseased tissue of the larynx.

Accepted by the Scientific Board on:  
ASB

29.03.2006.

Defended on:  
DE

2013.

Thesis defended board  
(Degree/name/surname/title/faculty)  
DB

President: Prof. dr Ljubica Živić, Associate Professor of Otorhinolaryngology, Faculty of



medical sciences, University of Kragujevac

**Member: Prof. dr Ljiljana Erdevički**, Associate Professor of Otorhinolaryngology, Faculty of medical sciences, University of Kragujevac

**Member: Prof. dr Anton Mikić**, Associate Professor of Otorhinolaryngology, Faculty of medical sciences, University of Belgrade

**Member: Doc. dr Ivan Jovanović**, Asistant Professor of Microbiology and Immunology, Faculty of medical sciences, University of Kragujevac

**Member: Doc. dr Slobodanka Mitrović**, Asistant Professor of Pathological Anatomy, Faculty of medical sciences, University of Kragujevac

### **3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА**

**Др Стеван Стојановић**, асистент на предмету Оториноларингологија, рођен је 14.03.1967. године у Крагујевцу. Основну школу и Медицинску школу „Сестре Нинковић“, општи смер, завршио је са одличним успехом. Уписао је 1987. године Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу, који је завршио 1994. године са пресечном оценом 8,74.

Након дипломирања, завршио је приправнички лекарски стаж и положио стручни испит за доктора медицине пред испитном комисијом Министарства здравља Републике Србије.

Током 1994. и 1995. ради као лекар у научноистраживачком раду у КЦ „Крагујевац“.

Јуна 1996. године је уз сагласност Министарства здравља Републике Србије започео специјализацију из Оториноларингологије, а специјалистички испит је положио 2000. године на Медицинском факултету Универзитета у Београду и стекао звање специјалисте оториноларингологије.

На Медицинском факултету у Крагујевцу је завршио магистарске студије 1998., када је и одбранио магистарску тезу под називом „Трахеотомија и интубација у лечењу акутне респирацијске инсуфицијенције“.

Од 2005. ради као асистент на предмету Оториноларингологија, а реизабран је 2009. године.

Научно-наставно Веће Медицинског факултета у Крагујевцу одобрило му је тему докторске дисертације „Значај квантификације маркера онкогенезе у ткивним исечцима оболелих од планоцелуларног карцинома ларинкса и хроничног ларингитиса“ 2006. године.

Успешно је завршио усавршавање из области хирургије ларинкса 2003. године у Институту за оториноларингологију и максилофацијалну хирургију КЦ “Србије“. 2008. године је успешно завршио курс под називом „Функционална ендоскопска хирургија носа и параназалних шупљина“ на Универзитету у Грацу, Аустрија. 2010. је успешно завршио курс под називом „Говорна рехабилитација постларингектомисаних пацијената“ у Националном Институту за канцер „Антони Фон Левенхук“ у Амстердаму. Учествовао је на многим међународним и домаћим конгресима из области Оториноларингологије .

Добро влада енглеским језиком, а поседује и знање из различитих области рада на рачунарима (MS Word, Excel, Power Point, Internet).

## **8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА**

### **Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја**

1. Stojanović PS, Živić Lj, Stojanović J, Belić B. Total Fixation of Cricoaarytenoid Joint of a Patient with Rheumatoid Arthritis and Hashimoto Thyroiditis. Srp Arh Celok Lek 2010;138(3-4):230-2. **IF=0,194**

2. Živić Lj, Obradović S, Stojanović S, Zbiljić I, Jakovljević LjV, Živić D, Stojanović J, Laban O. Neonatal screening of hearing function by otoacoustic emission – a single centre experience. *Vojnosanit Pregl* 2012; 69(4):340–4. **IF= 0,228**

3. Zivic Lj, Zivic Dj, i Stojanovic S. Nagli gubitak sluha-nasa iskustva u lecenju vazoaktivnim sredstvima. *Srp Arh Celok Lekar* 2008;136(3-4):91-4. **IF= 0,190**

### **Научни радови објављени у целини у часописима националног значаја**

1. Belić B, Erdevički Lj, Stojanović J, Stojanović S, Arsenijević S. A Modeultrasonography and roentgenography in diagnosing chronic nonpolypoid maxillary rhinosinusitis. *Acta chirurgica Iugoslavica* 2009;56(3):139-44.

2. Белић Б, Андрић В, Тадић Љ, Васковић Ж, Стојановић С, Крсмановић Ј. Цитологија у дијагностици обољења носа и параназалних синуса. *Srp Arh Celok Lekar* 2002;130(1):29-32.

3. Тадић Љ, Васковић Ж, Стојановић С, Крсмановић Ј. Однос између величине назофаринкса и појаве хроничног запаљења ува. *Srp Arh Celok Lekar* 2002;130(1):12-5.

4. Белић Б, Стојановић Ј, Арсенијевић Ц, Милојевић И, Тадић, Стојановић С. Инсерција септалног оптуратора у третману перфорације носне преграде, приказ случаја. *Ser J Exp Clin Res* 2008;9(1): 35-8.

5. Stojanović S, Belić B. The case of the urgent tracheostomy in patient with rare condition- Preeclampsia. *Medicus* 2007;8(1):32-3.

6. Stojanović S, Živić Lj. The value of palpation and ultrasound in diagnostics of neck lymph nodes at histologically verified primary larynx and pharynx malignancies. *Medicus* 2005; 6(1):31-4.

7. Erdevički Lj, Stojanović J, Stojanović S, Arsenijević S, Milojević I, Belić B. Sekretorni otitis media – problem prepoznavanja. Medicinski Časopis 2008;1:64-7.

### **Научни радови саопштени на научним скуповима међународног значаја**

1. Belić B, Stojanović S, Tadić Lj i Stojanović J. Dijagnostički i terapijski pristup sinonazalnoj polipozi. XVII Kongres otorinolaringologa Srbije sa internacionalnim učešćem i XLVI ORL nedelja, Novi Sad, Srbija, 2006.

2. Stojanović S, Belić B, Erdevički Lj, Živić Lj, Stojanović J, Kilibarda R, Milojević I. Prikaz slučaja urgentne traheotomije kod retke indikacije – preeklampsije. XII simpozijum otorinolaringologa Republike Srpske sa međunarodnim učešćem, Banja Luka, Republika Srpska, 2008.

## **8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS**

### **The published papers in extensor in international journals**

1. Stevan P. Stojanović, Ljubica Živić, Jasmina Stojanović, Branislav Belić. Total Fixation of Cricoarytenoid Joint of a Patient with Rheumatoid Arthritis and Hashimoto Thyroiditis. Srp Arh Celok Lek 2010;138(3-4):230-2. **IF= 0,194**

2. Živić Lj, Obradović S, Stojanović S, Zbiljić I, Jakovljević LjV, Živić D, Stojanović J, Laban O. Neonatal screening of hearing function by otoacoustic emission – a single centre experience. Vojnosanit Pregl 2012; 69(4): 340–4. **IF= 0,228**

3. Zivic Lj, Zivic Dj, i Stojanovic S. Nagli gubitak sluha-nasa iskustva u lecenju vazoaktivnim sredstvima. Srp Arh Celok Lekar 2008;136(3-4):91-4. **IF= 0,190**

### **The published papers in extenso in national journals**

1. Belić B, Erdevički Lj, Stojanović J, Stojanović S, Arsenijević S. A Modeultrasonography and roentgenography in diagnosing chronic nonpolypoid maxillary rhinosinusitis. Acta chirurgica Iugoslavica 2009;56(3):139-44.

2. Белић Б, Андрић В, Тадић Љ, Васковић Ж, Стојановић С, Крсмановић Ј. Цитологија у дијагностици обољења носа и параназалних синуса Српски архив за целокупно лекарство 2002;130(1):29-32.

3. Тадић Љ, Васковић Ж, Стојановић С, Крсмановић Ј. Однос између величине назофаринкса и појаве хроничног запаљења ува. Српски архив за целокупно лекарство. 2002;130(1):12-5.

4. Белић Б, Стојановић Ј, Арсенијевић Ц, Милојевић И, Тадић, Стојановић С. Инсерција септалног оптуратора у третману перфорације носне преграде, приказ случаја. Ser J Exp Clin Res 2008;9(1): 35-8.

5. Stojanović S, Belić B. The case of the urgent tracheostomy in patient with rare condition- Preeclampsia. Medicus 2007;8(1):32-3.

6. Stojanović S, Živić Lj. The value of palpation and ultrasound in diagnostics of neck lymph nodes at histologically verified primary larynx and pharynx malignancies. Medicus 2005; 6(1):31-4.

7. Erdevički Lj, Stojanović J, Stojanović S, Arsenijević S, Milojević I, Belić B. Sekretorni otitis media – problem prepoznavanja. Medicinski Časopis 2008;1:64-7.

## The international congress presentations published as abstracts

1. Belić B, Stojanović S, Tadić Lj i Stojanović J. Dijagnostički i terapijski pristup sinonazalnoj polipozi. XVII Kongres otorinolaringologa Srbije sa internacionalnim učešćem i XLVI ORL nedelja, Novi Sad, Srbija, 2006.

2. Stojanović S, Belić B, Erdevički Lj, Živić Lj, Stojanović J, Kilibarda R, Milojević I. Prikaz slučaja urgentne traheotomije kod retke indikacije – preeklampsije. XII simpozijum otorinolaringologa Republike Srpske sa međunarodnim učešćem, Banja Luka, Republika Srpska, 2008.

## 8.6 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I. Аутор</i></b>
Име и презиме: Стеван Стојановић
Датум и место рођења: 14.03.1967. Крагујевац
Садашње запослење: Асистент мр сци др, Катедра за оториноларингологију, Факултет Медицинских наука у Крагујевцу, специјалиста оториноларингологије, КЦ “Крагујевац“
<b><i>II. Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Значај квантификације маркера онкогенезе у ткивним исечцима оболелих од планоцелуларног карцинома ларинкса и хроничног ларингитиса
Број страница: 112
Број слика: 6
Број библиографских података: 357
Установа и место где је рад израђен: КЦ „Крагујевац“ у Крагујевцу
Научна област (УДК): Оториноларингологија
Ментор: Проф. др Бранислав Белић
<b><i>III. Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 23.03.2006.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 541/3; 04.05.2006.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
1. Проф.др Ђорђе Живић, редовни професор за ужу научну област

- Оториноларингологија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу,
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологијом и Основи онкологије, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу,
  3. Проф. др Милан Кнежевић, редовни професор за ужу научну област Патолошка анатомија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу,
  4. Проф. др Снежана Јанчић, редовни професор за ужу научну област Патолошка анатомија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу,
  5. Проф. др Антон Микић, ванредни професор за ужу научну област Оториноларингологија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Београду.

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

1. Проф. др Ђорђе Живић, редовни професор за ужу научну област Оториноларингологија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу,
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологијом и Основи онкологије, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу,
3. Проф. др Милан Кнежевић, редовни професор за ужу научну област Патолошка анатомија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу,
4. Проф. др Снежана Јанчић, редовни професор за ужу научну област Патолошка анатомија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу,
5. Проф. др Антон Микић, ванредни професор за ужу научну област Оториноларингологија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Београду.

Комисија за оцену докторске дисертације:

1. Проф. др Љубица Живић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Оториноларингологија, председник
2. Проф. др Љиљана Ердевички, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Оториноларингологија, члан
3. Проф. др Антон Микић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Оториноларингологија, члан
4. Доц. др Иван Јовановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан
5. Доц. др Слободанка Митровић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Проф. др Љубица Живић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Оториноларингологија, председник
2. Проф. др Љиљана Ердевички, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Оториноларингологија, члан
3. Проф. др Антон Микић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Оториноларингологија, члан
4. Доц. др Иван Јовановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан
5. Доц. др Слободанка Митровић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

Датум одбране дисертације: 2013.



**ОБРАЗАЦ 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-х СТЕВАН СТОЈАНОВИЋ  
број уписа \_\_\_\_\_

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом  
ЗНАЧАЈ КВАНТИФИКАЦИЈЕ МАРКЕРА ОНКОГЕНЕЗЕ У ТКИВНИМ  
ЦЕТИЦИМА ОБИТЕЉИХ ОД ПЛАНЦЕ ПУЛАРНОГ КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА  
И ХРОНИЧНОГ ЛАРИНГИТИСА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Крагујевцу, 28.10.2013.

**Потпис аутора**

Stevan Jankovic

**ОБРАЗАЦ 2.**

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Стеван Стојановић  
Број уписа \_\_\_\_\_  
Студијски програм \_\_\_\_\_  
Наслов рада Значај квантификације маркера синдромне утјивних исечуца оболелих од  
Ментор планоцелуларног карцинома фаринкса и хроничног ларингитиса  
проф. др Бранислав Белић  
Потписани ББВБ

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Крагујевцу.

У Крагујевцу, 28. 10. 2013.

**Потпис аутора**

Стеван Стојановић

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ЗНАЧАЈ КВАНТИФИКАЦИЈЕ МАРКЕРА ДИКОГЕНЕЗЕ У ТКИВИМ ИСЕЋЦИМА  
ОБЛАСТИ ПУЛМОНОГ КАРЦИНОМА ГЛАВНОГ ЛАРИНКСА И ХРОНИЧНОГ  
која је моје ауторско дело. ЛАРИНГИТИСА

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

У Крагујевцу, 28.10.2013.

*Стево Јанковић*

