

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Branko S. Dožić

**Imunohistohemijska analiza i prognostički značaj
markera unutrašnjeg puta apoptoze u
adenoidnom cističnom karcinomu pljuvačnih
žlezda**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Branko S. Dožić

**Immunohistochemical Analysis and Prognostic
Value of Markers of the Intrinsic Pathway of
Apoptosis in Adenoid Cystic Carcinoma of the
Salivary Glands**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTOR: Prof. dr Ivan Boričić, redovni profesor Medicinski fakultet
Univerziteta u Beogradu,

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Gordana Basta-Jovanović, redovni profesor Medicinski fakultet
Univerziteta u Beogradu

2. Prof. dr Svetislav Tatić, redovni profesor Medicinski fakultet Univerziteta u
Beogradu

3. Prof. dr Miroslav Vukadinović, redovni profesor Stomatološki fakultet
Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: ____ / ____ / _____

Imunohistohemijska analiza i prognostički značaj markera unutrašnjeg puta apoptoze u adenoidnom cističnom karcinomu pljuvačnih žlezda

Uvod Adenoidni cistični karcinom (ACC), je jedan od najčešćih malignih tumora pljuvačnih žlezda. Učestvuje sa oko 10-15% kod salivarnih neoplazmi. Karakteriše ga spor rast, visoka incidenca ka invaziji nerva, retko regionalno metastaziranje, česti lokalni recidivi i spor razvoj progresivnih i relativno indolentnih udaljenih metastaza. Najznačajniji faktori za prognozu ovog tumora su klinički stadijum i histološki izgled tumora, prisustvo ili odsustvo tumorskog tkiva na linijama resekcije, invazija nerva.

Apoptoza je regulatorni mehanizam tkivne homeostaze. Poremećaj regulacije apoptoze je relativno česta karakteristika maligne ćelije. U zavisnosti od stimulansa, putevi aktivacije apoptoze mogu biti: receptorski (spoljašnji) i mitohondrijski (unutrašnji) put. U unutrašnjem putu apoptoze značajnu ulogu igraju Apaf-1, inicijatorne i efektorne kaspaze. Apaf-1 je multidomenski protein, za koji se vezuje citohrom c i prokaspaza 9 što dovodi do formiranja apoptozoma. Ovaj kompleks proteolitički aktivira inicijatornu kaspazu-9. U završnoj fazi apoptoze, aktivirana kaspaza 9 dovodi do aktivacije efektorne kaspaze 3, čijim ulaskom u jedro započinje degradaciona faza apoptoze.

Cilj U ovoj studiji cilj je bio ispitati imunohistohemijsku ekspresiju Apaf-1, kaspaze 9 i 3 u ACC pljuvačnih žlezda, i rezultate korelirati sa kliničko-patološkim parametrima kako bi se utvrdilo koji je od njih nezavistan prognostički parametar.

Materijal i metode Istraživanje je koncipirano kao studija preseka, koja obuhvata 50 pacijenata sa ACC pljuvačnih žlezda, muškog i ženskog pola, prosečne starosti 58 godina. U ovoj studiji koristili smo tehniku tkivnog mikroniza (TMA kalupi). Preseci sa TMA kalupa, debljine 5 μ m, bojeni su streptavidin-biotin imunohistohemijskom tehnikom pomoću primarnih antitela specifičnih za: Apaf-1, kaspazu 9 i kaspazu 3. Obojeni tkivni preseci su analizirani svetlosnim mikroskopom (Olympus tip BH-2). Na osnovu prikupljenih podataka formirana je baza podataka u –SPSS 18.0 koja je korišćena za dalju statističku obradu. Statistička analiza podataka obuhvatala je metode deskriptivne i analitičke (inferencijalne) statistike.

Rezultati U pedeset ispitivanih konsekutivnih slučajeva ACC, Apaf-1 se eksprimovao u citoplazmi tumorskih ćelija. Kod 42% ispitanika bio je jak intenzitet ekspresije, dok je umerena i slaba ekspresija bila zastupljena kod 30% odnosno 28% ispitanika. Kaspaza 9 je pokazivala pozitivnost i u jedru i u citoplazmi tumorskih ćelija, pri čemu su različiti nivoi imunoreaktivnosti bili statistički značajni ($p=0,000$). Intenzitet ekspresije kaspaze 9 bio je umeren kod 54% pacijenta, jak intenzitet kod 40% ispitanika, dok je najređe ocenjena ekspresija bila slaba ili je nedostajala (6%). Kaspaza 3 je pokazivala samo citoplazmatsku pozitivnost u tumorskim ćelijama, gde je kao i kod Apaf-1 najčešće bio prisutan jak intenzitet ekspresije (42%). Nešto ređa pozitivnost ovog proteina ocenjena je kao umerena (36%) i slaba ili je nedostajala (22%). Pomoću χ^2 -testa, korelirana ekspresija Apaf-1, kaspaze 9 i kaspaze 3 je imala statističku značajnost u nivou ekspresije između Apaf-1 i kaspaze 3. Ispitujući značaj ekspresije markera unutrašnjeg puta apoptoze u odnosu na kliničko-patološke parametre samo se ekspresija kaspaze 9 pokazala statistički značajnom u odnosu na pol pacijenata sa ACC ($p=0,000$). U odnosu na preživljavanje pacijenata ni jedan od ispitivanih markera se nije pokazao kao značajan statistički parametar. Univarijantnim Koksovim regresionim modelom samo se starost izdvojila kao prediktor preživljavanja posmatrane grupe obolelih od ACC pljuvačnih žlezda.

Zaključak Naši rezultati pokazuju razlike u ekspresiji markera unutrašnjeg puta apoptoze u ACC pljuvačnih žlezda i otvaraju nove puteve istraživanja funkcionalnog značaja ovih molekula u patološkim procesima pljuvačnih žlezda.

Ključne reči: adenoidni cistični karcinom, apoptoza, Apaf-1, kaspaza 9, kaspaza 3

Immunohistochemical Analysis and Prognostic Value of Markers of the Intrinsic Pathway of Apoptosis in Adenoid Cystic Carcinoma of the Salivary Glands

Introduction Adenoid cystic carcinoma (ACC), is one of the most common malignant salivary gland tumors. It participates about 10-15% in salivary neoplasms. It is characterized by a slow growth, high incidence of the nerve invasion, rare regional metastasis, frequent local recurrence and slow development of progressive and relatively indolent distant metastases. The most important factors for the prognosis of this tumor are the clinical stage and histological appearance of the tumor, presence or absence of tumor tissue on the lines of resection, nerve invasion.

Apoptosis is the regulatory mechanism of tissue homeostasis. Dysregulation of apoptosis is a relatively common feature of cancer cells. Depending on the stimuli, activation of apoptotic pathways may include: receptor (extrinsic) and mitochondrial (intrinsic) pathways. In the intrinsic apoptotic pathway, Apaf-1, initiator and effector caspases play an important role. Apaf-1 is a multi domain protein, that binds cytochrome c and procaspase 9, which leads to the formation of apoptosome. This complex proteolytically activates the initiator caspase-9. In the final stage of apoptosis the activated caspase 9 leads to activation of the effector caspase 3, whose entry into the nucleus initiates the degradation phase of apoptosis.

Objective The aim of this study was to examine the immunohistochemical expression of Apaf-1, caspases 9 and 3 in the ACC of the salivary glands, and to correlate the results with clinicopathological parameters in order to determine which of them is an independent prognostic factor.

Materials and Methods The study was designed as a study of sections, which included 50 patients with ACC of the salivary glands, male and female, average age 58 years. In this study, we used the technique of tissue microarray (TMA moulds). Sections from the TMA mould, 5µm thick, were stained with the streptavidin-biotin immunohistochemical technique using primary antibodies specific for: Apaf-1, caspase 9 and caspase 3. Stained tissue sections were analyzed by the light microscope (Olympus type BH-2). Based on the data collected, the database was

created in SPSS 18.0, which was used for a further statistical analysis. The statistical data analysis included methods of descriptive and analytical (inferential) statistics.

Results In fifty examined consecutive cases of ACC, Apaf-1 was identified in the cytoplasm of tumor cells. In 42% of respondents there was a strong intensity of expression, while moderate and weak expressions were present in 30% i.e. 28% of respondents. Caspase 9 showed positivity both in the nucleus and in the cytoplasm of tumor cells, with different levels of immunoreactivity which were statistically significant ($p = 0.000$). The intensity of expression of caspase 9 was moderate in 54% of patients, strong intensity was in 40% of respondents, while the least evaluated expression was weak or lacking (6%). Caspase 3 showed only cytoplasmic positivity in tumor cells, where, the same as with Apaf-1, the most frequently present was a strong expression intensity (42%). Somewhat less frequent positivity of this protein was evaluated as moderate (36%) and weak or lacking (22%). With the χ^2 -test, correlated expression of Apaf-1, caspase 9 and caspase 3 had statistically significant levels of expression between Apaf-1 and caspase 3. In examining the significance of expression of markers of the intrinsic pathway of apoptosis in relation to the clinicopathological parameters only the expression of caspase 9 showed itself as statistically significant in relation to the gender of patients with ACC ($p = 0.000$). Compared to the survival rate of patients none of the markers examined was found as a statistically significant parameter. Using univariate Cox regression model, only the age was established as a predictor of survival in the observed group of patients with ACC of the salivary glands.

Conclusion Our results show differences in the expression of markers of the intrinsic pathway of apoptosis in ACC of the salivary glands and they open new directions in research of the functional importance of these molecules in the pathological processes of the salivary glands.

Key words: adenoid cystic carcinoma, apoptosis, Apaf-1, caspase 9, caspase 3.

Sadržaj:

1.Uvod	1
1.1. Adenoidni cistični karcinom	6
1.1.1. Incidenca	6
1.1.2. Starosna i polna distribucija	6
1.1.3. Lokalizacija	7
1.1.4. Kliničke manifestacije	7
1.1.5. Makroskopski izgled	7
1.1.6. Histopatološke karakteristike	7
1.1.7. Metastaziranje	9
1.1.8. Prognostički faktori	9
1.2. Apoptoza	11
1.2.1. Morfološke promene u apoptozi	11
1.2.2. Mehanizmi apoptoze	12
2. Ciljevi istraživanja	18
3. Materijal i metode	20
3.1 Standardna obrada materijala	21
3.2. Konstrukcija tkivnog mikroniza	23
3.3. Imunohistohemijske metode	25
3.4. Statistička obrada podataka	27
4. Rezultati	29
4.1. Distribucija bolesnika prema starosti i polu	30
4.2. Distribucija bolesnika prema lokalizaciji tumora	30
4.3. Grupisanje bolesnika prema histološkom izgledu tumora	31
4.4. Ishod bolesti	32
4.5. Praćenje bolesnika	32
4.6. Imunohistohemijska ekspresija Apaf-1 u ACC pljuvačnih žlezda	36
4.7. Imunohistohemijska ekspresija kaspaze 9 u ACC pljuvačnih žlezda	42
4.8. Imunohistohemijska ekspresija kaspaze 3 u ACC pljuvačnih žlezda	48
4.9. Analiza korelacije između ekspresije Apaf-1, kaspaze 9 i 3 u ACC pljuvačnih žlezda	54
5. Diskusija	58
6. Zaključci	73
7. Literatura	75

1. UVOD

Pljuvačne žlezde kod čoveka su podeljene u dve grupe: velike i male pljuvačne žlezde. U velike pljuvačne žlezde se ubrajaju parotidna, submandibularna i sublingvalna. Male pljuvačne žlezde, veličine od 1 do 5 mm, su prisutne u sluzokoži usne duplje (u najvećem broju u sluzokoži usana, jezika, obraza i nepca) i orofarinksa. Osnovna funkcija pljuvačnih žlezda je lučenje pljuvačke koja ima značajnu ulogu u očuvanju oralne homeostaze (1).

Oboljenja pljuvačnih žlezda su generalno nespecifične i relativno ograničene simptomatologije. Pacijenti se uglavnom žale na otok, bol, kserostomiju, poremećaj ukusa i ponekad na sijaloreu ili hipersalivaciju. Uprkos prevalenciji napredne tehnologije u identifikaciji oboljenja pljuvačnih žlezda, detaljna anamneza i detaljan klinički pregled igraju značajnu ulogu u postavljanju dijagnoze, zbog čega se posvećuje velika pažnja ovim početnim koracima evaluacije bolesti (1). Bolesti koje se razvijaju u pljuvačnim žlezdama se mogu podeliti na ne-neoplastične i neoplastične. U ne-neoplastična oboljenja spadaju različite razvojne anomalije pljuvačnih žlezda, ciste, infektivne i inflamatorne lezije kao i neke tumorolike promene. U praksi se od ovih promena najčešće sreću različite vrste cista i sijaloadenitisa (2).

Neoplazme pljuvačnih žlezda su retke i čine 1-4% svih neoplazmi kod čoveka. Među brojnim klasifikacijama salivarnih neoplazmi, danas je u upotrebi Klasifikacija svetske zdravstvene organizacije (World Health Organization – WHO) iz 1991. godine (Tabela 1). Ona obuhvata benigne i maligne neoplazme epitelnog, mezenhimnog i limfoidnog porekla (3,4). Epitelne neoplazme pljuvačnih žlezda su 2005. godine, klasifikovane na 10 subtipova benignih i 24 subtipa malignih tumora (Tabela 2) (4).

Tumori pljuvačnih žlezda se skoro podjednako javljaju kod oba pola, najčešće u šestoj deceniji života (5). Razvijaju se i u velikim i u malim pljuvačnim žlezdama. U velikim pljuvačnim žlezdama, najčešća lokalizacija tumora je parotidna žlezda (80%), dok su u malim pljuvačnim žlezdama, najčešće lokalizovani u žlezdama sluzokože nepca (6). Većina ovih neoplazmi je benigna, dok maligniteti čine oko 20% dijagnostikovanih slučajeva (7). Iskustva iz kliničke prakse pokazuju da što je manja pljuvačna žlezda, veća je verovatnoća da se radi o malignom tumoru. Podaci iz literature ukazuju da je različita

učestalost malignih tumora u velikim pljuvačnim žlezdama. Tako, u sublingvalnoj pljuvačnoj žlezdi je više od 90% tumora malignog biološkog ponašanja, u submandibularnoj oko 40%, a u parotidnoj žlezdi od 20 do 25% (8, 9).

Etiološki agensi neoplazmi pljuvačnih žlezda ostaju nejasni. Većina karcinoma usne duplje, etiološki je vezana za pušenje i alkohol, dok kod tumora pljuvačnih žlezda oni nisu značajni etiološki faktori. Mogući faktori rizika za karcinome pljuvačnih žlezda su terapijska zračenja regiona glave i vrata, imunosupresija, a kod nekih tumora značajnu ulogu u nastanku ima Epstein-Bar-ov virus (10). Studija urađena u Švedskoj je prikazala da je kod pacijenata sa Hodgkin limfomom povećana učestalost karcinoma pljuvačnih žlezda (11).

Karcinomi pljuvačnih žlezda čine oko 0,5% svih maligniteta, odnosno 3-5% maligniteta glave i vrata (12, 13). Njihova karakteristična specifičnost je da pokazuju široku varijaciju u histološkom tipu i kliničkom ponašanju (14). Još uvek postoje neslaganja koji je salivarni karcinom najčešći. Prema nekim autorima najučestaliji je mukoepidermoidni karcinom, dok drugi zastupaju mišljenje da je to adenoidni cistični karcinom (15, 16).

Tabela 1. WHO histološka klasifikacija tumora pljuvačnih žlezda (1991)

1. Adenomi	2. Karcinomi
<ul style="list-style-type: none"> • Pleomorfni adenom • Mioepiteliom • Adenom bazalnih ćelija • Warthin-ov tumor • Onkocitom • Kanalikularni adenom • Sebacealni adenom • Duktalni papilom <ul style="list-style-type: none"> ○ Invertni duktalni papilom ○ Intraduktalni papilom ○ Sialoadenoma papiliferum • Cistadenom <ul style="list-style-type: none"> ○ Papilarni cistadenom ○ Mucinozni cistadenom 	<ul style="list-style-type: none"> • Karcinom acinusnih ćelija • Mukoepidermoidni karcinom • Adenoidni cistični karcinom • Polimorfni adenokarcinom niskog stepena • Epitelno-mioepitelni karcinom • Adenokarcinom bazalnih ćelija • Sebacealni karcinom • Papilarni cistadenokarcinom • Mucinozni adenokarcinom • Onkocitni karcinom • Karcinom salivarnog duktusa • Adenokarcinom • Maligni mioepiteliom • Maligni mešoviti tumor • Karcinom skvamoznih ćelija • Karcinom malih ćelija • Nediferentovani karcinom • Drugi karcinomi
3. Ne-epitelni tumori	
4. Maligni limfomi	
5. Sekundarni tumori	
6. Neklasifikovani tumori	
<p data-bbox="606 1422 981 1456">7. Tumorima slične lezije</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sialoadenoza • Onkocitoza • Nekrotizirajuća sialomeptaplazija • Benigna limfoepitelna lezija • Ciste salivarnih žlezda • Hronični sklerozirajući sialoadenitis submandibularne žlezde • Cistična limfoidna hiperplazija u AIDS-u 	

Tabela 2. WHO klasifikacija epitelnih tumora pljuvačnih žlezda (2005)

Benigni epitelni tumori	Maligni epitelni tumori
<ul style="list-style-type: none"> • Pleomorfni adenom • Mioepiteliom • Adenom bazalnih ćelija • Warthin-ov tumor • Onkocitom • Kanalikularni adenom • Sebacealni adenom • Limfadenom <ul style="list-style-type: none"> ○ Sebacealni ○ Ne-sebacealni • Duktalni papilom <ul style="list-style-type: none"> ○ Invertni duktalni papilom ○ Intraduktalni papilom ○ Sialoadenoma papiliferum • Cistični adenom 	<ul style="list-style-type: none"> • Karcinom acinusnih ćelija • Mukoepidermoidni karcinom • Adenoidni cistični karcinom • Polimorfni adenokarcinom niskog stepena maligniteta • Epitelno-mioepitelni karcinom • Svetloćelijski karcinom • Adenokarcinom bazalnih ćelija • Maligni sebacealni tumor • Sebacealni limfadenokarcinom • Cistični adenokarcinom • Kribriformnicistični adenokarcinom niskog stepena • Mucinozni adenokarcinom • Onkocitni karcinom • Karcinom salivarnog duktusa • Adenokarcinom bez drugih specifičnosti • Mioepitelni karcinom • Karcinom u pleomorfnom adenoma • Karcinosarkom • Metastazirajući pleomorfni adenom • Karcinom skvamoznih ćelija • Karcinom malih ćelija • Karcinom velikih ćelija • Limfoepitelni karcinom • Sialoblastom

1.1. Adenoidni cistični karcinom

Adenoidni cistični karcinom (ACC) je jedan od najčešćih malignih tumora pljuvačnih žlezda. Učestvuje sa oko 10-15% kod salivarnih neoplazmi. ACC karakteriše spor rast, visoka tendencija ka invaziji nerva, retko regionalno metastaziranje, česti lokalni recidivi i spor razvoj progresivnih i relativno indolentnih udaljenih metastaza (17).

Ovaj tumor su prvi opisali francuski naučnici (Robin, 1853.god; Lorain i Laboulbene, 1854 godine), kao tumor koji ima cilindričan izgled. Billorth i saradnici, su ga 1859.godine, prvi put nazvali cilindroma, i ukazali da se radi o tumoru koji ima veliku tendenciju ka recidiviranju. Kasnije je dobio ime adenoidni cistični karcinom od strane autora Spies JW, a zahvaljujući predlogu naučnika Foote and Frazell, ovaj tumor je klasifikovan kao tumor pljuvačnih žlezda (18, 19).

1.1.1. Incidenca

ACC je redak epitelni tumor koji se javlja u oko 1% svih malignih tumora glave i vrata (20). Kao što smo već naveli, čini oko 10-15% malignih tumora pljuvačnih žlezda, odnosno 30% maligniteta malih pljuvačnih žlezda (21). Kod pedijatrijskih pacijenata, gde se tumori pljuvačnih žlezda retko sreću, ACC se dijagnostikuje u 4% slučajeva (22).

1.1.2. Starosna i polna distribucija

ACC se najčešće dijagnostikuje u petoj i šestoj deceniji života, mada se može javiti u bilo kom životnom dobu. Dosta je redak kod dece, gde se uglavnom javlja posle četvrte godine života (20, 22, 23, 24, 25).

U odnosu na pol, ACC se opisuje kao tumor koji se skoro podjednako javlja i kod osoba muškog i kod osoba ženskog pola (20, 24, 26, 27, 28, 29). U literaturi su prikazani i podaci o češćem javljanju ovog tumora kod osoba ženskog pola, a što se naročito odnosi na tumore koji su lokalizovani u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi (2, 30, 31, 32, 33). Publikovani su i rezultati koji prikazuju veću učestalost ACC kod osoba muškog pola (34).

1.1.3. Lokalizacija

ACC se može razviti u svim pljuvačnim žlezdama. Male pljuvačne žlezde nepca su ipak najčešća lokalizacija ovog tumora, gde on čini od 30% do 50% od svih epitelnih neoplazmi. U parotidnoj je prisutan u 5% slučajeva, dok se u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi javlja u oko 15% i čini najčešći maligni tumor ove žlezde (2).

Pored lokalizacije u pljuvačnim žlezdama, ACC se takođe može razvijati i u spoljašnjem ušnom kanalu, nazofarinksu, lakrimalnim žlezdama, dojci, vulvi, ezofagusu, cerviksu, koži (35).

1.1.4. Kliničke manifestacije

Simptomatologija ovog tumora je vezana za lokalizaciju. Parotidni i submandibularno lokalizovani tumori se manifestuju sporo rastućim tumefaktom, koji može, ali ne mora da bude udružen sa bolom ili paralizom nerva (facijalisa). Invazija nerva je jedan od karakteristika ovog tumora i može biti prisutna i u njegovoj ranoj fazi razvoja. Tumori lokalizovani u usnoj duplji, u malim pljuvačnim žlezdama, se pored tumefakta manifestuju i ulceracijama na sluzokoži, a tumori koji su lokalizovani u malim pljuvačnim žlezdama nepca mogu dovesti do razvoja oro-antralnih fistula. Ostali simptomi uključuju opstrukciju vazdušnih puteva, epistaksu, bol u uhu, promuklost. Fiksacija za okolne tkivne strukture je prateći nalaz za ovaj tumor. Retko se može manifestovati kao tumor brzog rasta (2, 29).

1.1.5. Makroskopski izgled

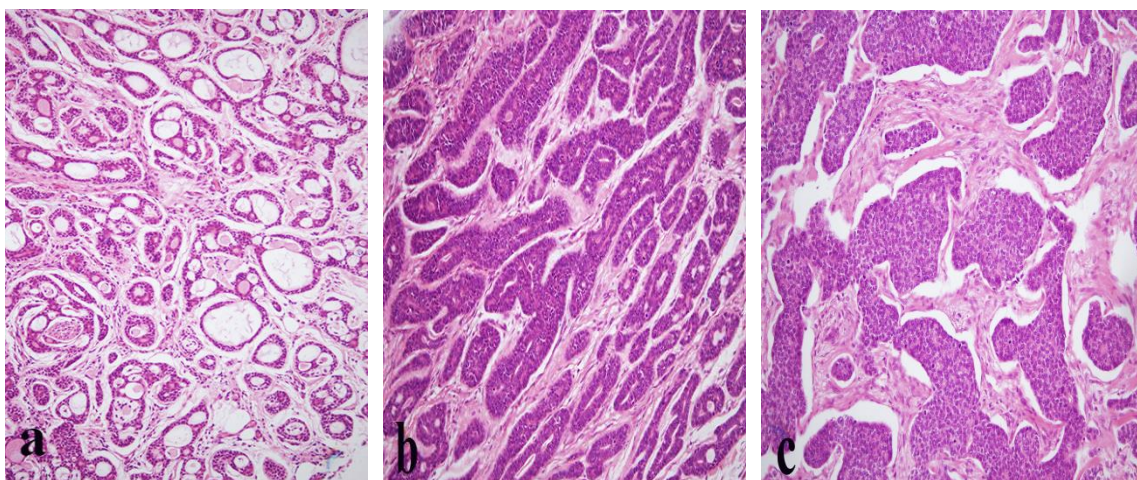
ACC se može razvijati kao dosta ograničen, neinkapsuliran ili delimično inkapsuliran tumor, ili se razvija kao slabo ograničen infiltrativan tumor, solidne građe. Gumaste je do čvrste konzistencije, sivo-beličaste ili svetlo rozikaste boje. Prosečna veličina tumora se kreće od 2 do 4 cm u prečniku (2).

1.1.6. Histopatološke karakteristike

ACC je maligni tumor mioepitelnih i epitelnih ćelija pljuvačnih žlezda. Ćelije ovog tumora su male, nejasnih granica, uniformnih hiperhromatičnih jedara, sa malo citoplazme,

visokog nuklearno-citoplazmatskog odnosa. Stroma tumora je jasno odvojena od epitelne komponente i može da bude mucinozna, miksoidna ili hijalinizovana.

Ćelije ovog tumora formiraju kribriformne, tubularne (duktalne) ili solidne formacije. Retko tumor pokazuje samo jedan od navedenih načina rasta, uglavnom je prisutno više varijanti pri čemu najčešće jedna dominira.



Slika 1. Histološke varijante ACC. Kribriformne (a), tubularne (b) i solidne (c) strukture koje formiraju tumorske ćelije (HE, x100).

Kribriformni izgled tumora (Slika 1a) (izgled “švajcarskog sira”, rešetkast izgled) je najčešća mikroskopska slika ovog tumora pa se često označava kao klasični oblik. Histološki se karakteriše epitelnim (duktalnim) ćelijama koje su raspoređene oko okruglih i ovalnih mikrocističnih (pseudocističnih) prostora. Ove ćelije su okruglih jedara i eozinofilne citoplazme. Oko pseudocističnih formacija, pored epitelnih ćelija, nalaze se i mioepitelne (abluminalne) ćelije koje predstavljaju dominantan tip ćelija u ovom tumoru. One su uniformnog bazaloidnog izgleda, ugaonog do ovalnog oblika, hiperhromatičnih jedara sa neupadljivim ili malim jedarcetom, bez nuklearnog pleomorfizma i mitotske aktivnosti. Između mikrocističnih formacija se nalazi stromalno vezivno tkivo. U lumenu mikrocističnih formacija je prisutan bazofilni mucinozni ili eozinofilni hijalinizovani materijal.

Tubularni izgled tumora (Slika 1b) se najčešće sreće pomešan sa kribriformnim formacijama. Epitelne ćelije grade duktalne odnosno tubularne strukture, koje su okružene mioepitelnim ćelijama i vezivnom stromom. U lumenu ovih struktura se nalazi eozinofilni mucinozni materijal.

Solidni izgled tumora (Slika 1c) je najređa histopatološka slika. Ćelije formiraju ostrva ili gnezda različitog oblika i veličine, sa malom tendencijom ka stvaranju cističnih, duktalnih ili tubularnih struktura. Ostrva ili gnezda grade krupnije ćelije, većih jedara i većeg nuklearnog pleomorfizma. Mitoze su često prisutne, kao i polja nekroze (2, 29).

1.1.7. Metastaziranje

Kliničko ponašanje ACC je paradoksalno iz više razloga. Prvo, tumor je sporog rasta ali je klinički tok nepredvidiv i progresivan. Drugo, česti su recidivi posle hirurškog uklanjanja tumora. Treće, razvoj metastaza u regionalnim limfnim čvorovima je redak, dok su pojave udaljenih metastaza, učestalije (36). Iako je ACC tumor perzistentnog i indolentnog rasta, hematogene metastaze se javljaju u 8,5% do 58,8% slučajeva (21, 26, 37, 38, 39, 40, 41, 42). Dominantna lokalizacija udaljenih metastaza su pluća, a može metastazirati i u kosti, jetru, mozak i druge organe (26, 38, 41, 43, 44, 45). Postoji značajna korelacija između histološke građe tumora i pojave udaljenih metastaza. Udaljene metastaze se češće javljaju kod tumora koji sadrže veću količinu solidnih struktura u mikroskopskoj slici (u 47% slučajeva). Dok, tumori sa dominantnim kribriformnim i tubularnim strukturama nešto ređe metastaziraju, u 29,9% odnosno 27,3% slučajeva (30, 41, 44, 45, 46, 47). Takođe je značajna povezanost lokalizacije tumora sa pojavom udaljenih metastaza. Tumori koji su lokalizovani u submandibularnoj i malim pljuvačnim žlezdama baze jezika i usana češće daju udaljene metastaze (38, 39, 43, 46, 47, 48, 49, 50).

1.1.8. Prognostički faktori

Prognostički faktori za ACC zavise od lokalizacije, veličine i histološke građe tumora. Tumori koji su lokalizovani u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi imaju lošiju prognozu u odnosu na tumore koji su lokalizovani u parotidnoj pljuvačnoj žlezdi. Najlošiju prognozu imaju tumori lokalizovani u malim pljuvačnim žlezdama. Veličina primarnog

tumora je takođe bitan faktor, jer mali tumori zbog lakšeg uklanjanja imaju bolju prognozu u odnosu na tumore koji su veći od 4cm u prečniku. U odnosu na histološki izgled, tubularna i kribriiformna varijanta imaju bolju prognozu u odnosu na tumore kod kojih dominira solidna varijanta (2).

Pozitivne linije resekcije i invazija nerva, pokazali su se kao negativni prediktivni faktori u odnosu na ishod pacijenata sa ACC (21, 51, 52). Nedavna međunarodna studija koja je obuhvatila 495 slučajeva sa ACC, pokazala je da perineuralna invazija nema uticaja na preživljavanje pacijenata, za razliku od intraneuralne invazije koja je nezavisni prediktor loše prognoze (53). Starost i pol pacijenata se nisu pokazali kao faktori od značaja za prognozu ovog tumora (21, 51).

1.2. Apoptoza

Smrt ćelija može biti: programirana ćelijska smrt-apoptoza i nasilna ćelijska smrt-nekroza. Nekroza je nekontrolisan pasivan proces koji obično zahvata veću oblast ćelija, dok je apoptoza kontrolisan i energetski zavistan proces koji može da utiče na pojedinačne ili na manju grupu ćelija. To je prvi uočio krajem 19. veka, anatom Walter Flammig, opisujući folikularne ćelije jajnika koje umiru spontano i taj proces nazvao hromatoliza, ukazujući da se spontana smrt ćelija razlikuje od drugih oblika ćelijske smrti. Ovu spontanu smrt ćelija, kasnije su Kerr i sar., 1970-tih godina, opisali kao apoptoza (54).

Apoptoza je veoma važna u fiziološkim i patološkim stanjima. U fiziološkim uslovima se javlja u toku embrionalnog razvoja tokom oblikovanja tkiva, fiziološka involucija (involucija tkiva endometrijuma, dojki, timusa) itd. Patološka stanja koja dovode do pokretanja apoptoze su: oštećenja (virusna infekcija, bakterijski toksini, oksidansi, slobodni radikali), mikrotalasno i UV zračenje, a razvija se i kao jedan od vidova ćelijske smrti kod degenerativnih bolesti (Alchajmerova i Parkinsonova bolest), kod infarkt miokarda itd (55).

1.2.1. Morfološke promene u apoptozi

Morfološke promene tokom apoptoze se dešavaju u citoplazmi i jedru i vreme potpune fragmentacije ćelije zavisi od vrste ćelije, stimulansa i puta aktivacije (56). Ćelija u apoptozi je odvojena od okolnih ćelija, smanjenog volumena, povećane gustine citoplazme, bazofilnog jedra sa kondenzovanim hromatinom. U kasnijoj fazi apoptoze dolazi do ultrastrukturnih modifikacija citoplazmatskih organela i jedra sa morfološki očuvanom plazma membranom. Na kraju se formiraju apoptopska telašca, koja sadrže citoplazmu i zbijene organele sa ili bez nuklearnih fragmenata. Zatim, apoptopska telašca fagocituju okolne ćelije ili makrofage, uz tipično odsustvo zapaljenske reakcije. Histološkim bojenjem sa hematoksilinom i eozinom, apoptopične ćelije su okruglog ili ovalnog oblika sa tamnom eozinofilnom citoplazmom i gustim ljubičasto prebojenim nuklearno fragmentiranim hromatinom (57).

1.2.2. Mehanizmi apoptoze

Apoptoza je regulatorni mehanizam tkivne homeostaze. U organizmu čoveka se stvaraju ćelije procesom mitoze, a skoro isti broj umire procesom apoptoze u cilju održanja homeostaze.

Fiziološki i patološki faktori, različitim mehanizmima iniciraju apoptotični proces, preko aktivacije enzima kaspaza. Termin kaspaze potiče od naziva cistein-aspartat-specifična proteaza (engl. caspases cysteine-dependent aspartate-specific proteases). To su citoplazmatski enzimi čijom se kaskadnom aktivacijom pokreće program ćelijske smrti. Proteolitička aktivnost kaspaza je specifična za određene proteine koji sadrže aspartat kao supstrat i pripadaju endoproteazama.

Kaspaze, uključene u apoptozu, su generalno podeljene u dve kategorije: inicijalne kaspaze, gde spadaju kaspaze 2, 8, 9, 10 i efektorne kaspaze 3, 6, 7. Kaspaze su u ćelijama prisutne u neaktivnom obliku (prokaspaze) kao monomerne jedinice koje poseduju inaktivne domene. Ovi specifični regioni (prodomeni) su različiti u zavisnosti od vrste kaspaza napr. kaspaze 1, 2, 4, 5, 9 sadrže (caspase recruitment domain- CARD) regrutovane domene, dok kaspaze 8, 10 imaju efektorne domene smrti (death effector domain- DED) (58). Za prodome na prokaspazama vezuju se adaptorni proteini, koji dovode do njihove dimerizacije. Potpuno aktivirane kaspaze su dimeri koji se sastoje iz dve velike i dve male subjedinice. Aktivacijom inicijalnih kaspaza, deluje aktivirajuće na efektorne kaspaze koje dovode do proteolitičke razgradnje ciljnih proteina u ćeliji i do njene smrti (59).

Kaspazna aktivnost u apoptozi je mač sa dve oštrice. Ekstremna kaspazna aktivnost, uslovljava prekomernu ćelijsku smrt, što promovise razvoj različitih neurodegenerativnih stanja (62). Nedostatak kaspazne aktivnosti favorizuje preživljavanje ćelija. Tako na primer, eksperimenti na miševima, koji su imali deficit kaspaze 3, umirali su u materici još pre rođenja ili nekoliko dana po rođenju, sa volumenom mozga koji je bio duplo veći od normalnog, zbog mnoštva prekobrojnih ćelija koje verovatno nisu odstranjene zbog poremećenog signalnog puta apoptoze (61).

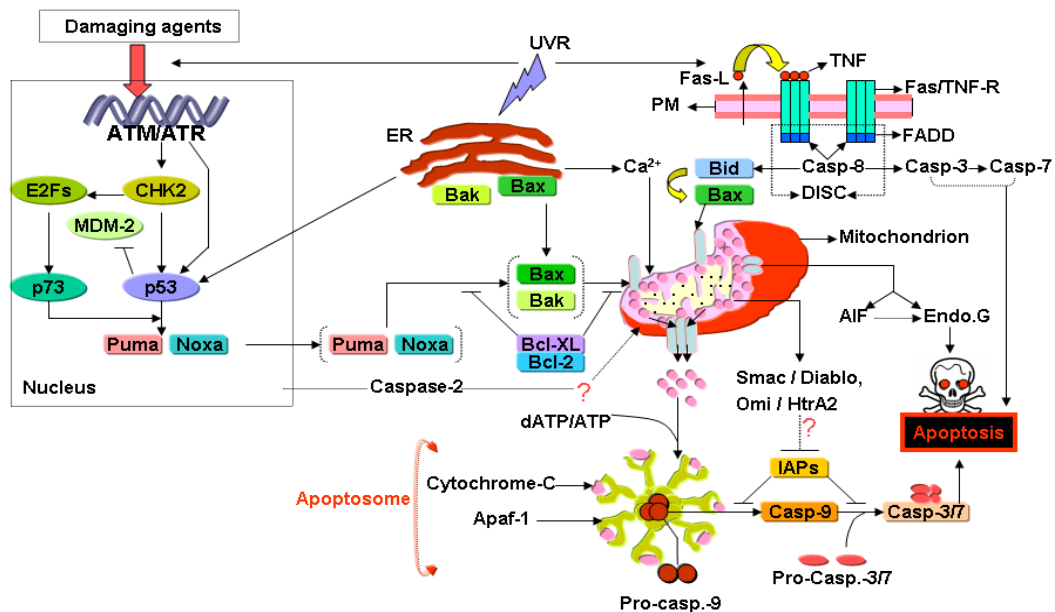
Takođe, deregulacija kaspaza i njihovih puteva u koje su uključene, mogu pomoći u opstanku mutiranih ćelija i promociji tumorogeneze. Međutim, iako kaspaze igraju ključnu ulogu, u dobro dokumentovanim mehanizmima smrti kancerske ćelije, za razliku od mutacije p53, mutacija kaspaznih gena nije česta u humanim tumorskim ćelijama. Genetske i druge studije su pokazale da inaktivacija individualnih kaspaza uglavnom nije dovoljna da spreči kontinuitet kaspazne kaskade ili da poremeti alternativne neapoptotske mehanizme ćelijske smrti. Umesto toga maligne ćelije češće preživljavaju onesposobljavajući medijatore signala ushodno od kaspazne aktivnosti. Uprkos tome smanjenje ekspresije proapoptotskih kaspaza je prijavljena u različitim kancerima (60, 62).

Pored kaspaza, ključnu ulogu kao intracelularni regulatori procesa apoptoze, imaju proteinski produkti Bcl-2 familije gena (engl. *B cell lymphoma 2* - Bcl-2). Ovi proteini sadrže brojne regione sa homologim sekvencama (engl. bcl-2 homology (BH) domains) na osnovu kojih je izvršena funkcionalna klasifikacija ovih proteina. Dele se na proapoptopske koji sadrže BH domene 1-3 i antiapoptopske proteine koji sadrže domene BH 1-4. Proapoptopski proteini koji stimulišu apoptozu su: Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim i Hrk, dok antiapoptopski proteini: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 i Mcl-1, inhibiraju apoptozu (50, 63, 64, 65, 66). Bcl-2 proteini mogu formirati homo- i hetero-dimere, uglavnom locirani na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani okrenutoj prema citozolu, gde mogu da komuniciraju sa molekulima koji učestvuju u signalnoj transdukciji.

U zavisnosti od stimulansa, putevi aktivacije apoptoze mogu biti: receptorski (spoljašnji) i mitohondrijski (unutrašnji) put (Shema 1):

- Receptorski put aktivacije apoptoze izazivaju ekstraćelijski signalni molekuli. Ovi molekuli -ligandi su strukturno veoma slični i pripadaju familiji tumor-nekroze faktora (TNF, Fas ligand). Ligandi se vezuju za transmembranske receptore (receptori smrti) na površini ćelija. Najznačajniji receptori smrti na površni ćelije su: Fas (CD95), receptor-1 TNF (TNF-R1), DR3-DR6. Svi receptori smrti funkcionišu na sličan način: vezivanjem liganda za receptor dolazi do konformacionih promena i aktiviranja citoplazmatskih domena, sastavljeni od oko 80 aminokiselina, koji se nazivaju „domeni smrti“ (DD od engl. death-domen). Aktivirani „domeni smrti“

(DD) vezuju se sa homologim intraćelijskim proteinima koji se nazivaju adapteri (*FADD* od engl. *Fas-associated-death-domain*-; *TRADD* od engl. *TNFR-associated-death-domen*-) tako da se formira signalni kompleks koji indukuje smrt ćelije (DISC od eng. *death-inducing-signalling-complex*). Proteini adapteri sadrže i tzv. „efektorne domene smrti“ (DED od engl. *death effector domains*) koji reaguju sa homologim domenima enzima prokaspaze-8 i aktivira je u kaspazu-8. Osim kaspaze-8, aktivira se i kaspaza-10. Aktivirane inicijalne kaspaze utiču na aktivaciju efektivnih kaspaza-3 i -7. Apoptozu pokrenutu aktivacijom receptora Fas i TNF-R1, inhibira familija Fas-ligand inhibitorni proteini (engl. *FasL-inhibitor-protein*), tako što se vezuju za adapterne proteine (FADD) i inhibiraju aktivaciju prokaspaze 8.



Shema 1. Prikaz unutrašnjeg i spoljašnjeg puta apoptoze, (58).

- Mitohondrijski put aktivacije apoptoze, obično se aktivira kao odgovor na smrtonosne stimulanse iz unutrašnjosti ćelije, kao što je oštećenje DNK, oksidativni stres, hipoksija. Oštećenje DNK inicira apoptozu i u ovom procesu glavnu ulogu ima tumor supresorski gen p53, koji je lokalizovan na sekvenci 17. humanog hromozoma. p53 vrši ekspresiju proapoptotskih članova Bcl-2 familije koji se iz citozola translociraju na spoljašnju membranu mitohondrije i indukuju njenu permeabilnost (67). Delovanjem proapoptotskih Bcl-2 proteina dolazi do stvaranja specifičnih pora (engl. permeability transition) u membrani mitohondrija i izlaska citohroma C u citozol. Citohrom C reaguje sa apoptopički proteaza-aktivirajućim faktorom 1 (Apaf-1 engl. *Apoptotic Protease Activating Factor*). Apaf-1 je multidomenski protein (139 kDa) koji sadrži amino-terminalni domen, centralni oligomerni nukleotid-vezujući domen i karboksi-terminalni domen koji sadrži 12-13 ponavljajućih WD40 sekvenci. Apaf-1 se nalazi u citozolu ćelija kao neaktivni monomer. Vezivanjem citohroma C za WD domen monomera Apaf-1 dolazi do primarnih konformacionih promena. Za centralne nukleotid-vezujuće domene Apaf-1 se vezuje nukleotid deoksi-ATP (dATP) koji izaziva sekundarne konformacione promene i njegovu oligomerizaciju. Vezivanjem ovih biomolekula i navedene konformacione promene dovode do stvaranja multiproteinskog kompleksa-apoptozoma, koji se sastoji od citohroma C, Apaf-1, prokaspaze 9. Ovaj kompleks proteolitički aktivira kaspazu-9. U ovoj kaspazi, CARD domeni se vezuju za specifične domene u amino-terminalnom delu Apaf-1, putem homotipične interakcije. Za razliku od drugih inicijalnih kaspaza, domeni kaspaze 9 se ne uklanjaju tokom apoptoze, već mora da ostane vazana za apoptozom i da zadrži katalitičku aktivnost. Većina studija smatra da ova interakcija prokaspaze 9 i Apaf-1, je važna za povećanje lokalne koncentracije prokaspaze 9, dok neke studije ukazuju na konformacione promene u ovoj kaspazi da bi se povećala njena aktivnost (68).

U završnoj fazi apoptoze, bez obzira na spoljašnji ili unutrašnji signal, aktiviraju se efektorne kaspaze (kaspaze 3 i 7). Stvaranjem aktiviranih kaspaza i njihovim ulaskom u

jedro ćelije, započinje degradaciona faza apoptoze. U degradacionoj fazi, kaspaza-3 i druge aktivirane kaspaze, dovode do razgradnje mnogih strukturnih i drugih proteina unutar ćelije kao što su: strukturni proteini (aktin, fodrin), filamentni proteini (keratin-18, plectin), signalni proteini (Raf-1, Akt-1, D4-GD1, MEKK-1), proteini koji regulišu transkripciju ili DNK replikaciju, kao i proteini koji regulišu DNK i RNK metabolizam (69). Krajnji rezultat procesa apoptoze je fragmentacija DNK molekula endonukleazama (DN-aze). Endonukleaze su enzimi koji spadaju u klasu hidrolaza i katalizuju razgradnju među-nukleotidnih veza unutar molekula nukleinskih kiselina. DN-aze razlazu kako native tako i denaturisane molekule DNK. Poslednjih godina se sve više govori o DN-azama kao glavnim egzekutorima apoptoze, odgovornim za internukleozomalnu fragmentaciju DNK ćelije u apoptozi.

Radna hipoteza

Adenoidni cistični karcinom je jedan od najčešćih tumora pljuvačnih žlezda. Najznačajniji faktori za prognozu ovog tumora su klinički stadijum i histološki izgled tumora, prisustvo ili odsustvo tumorskog tkiva na linijama resekcije, invazija nerva. U cilju sprovođenja adekvatne terapije analizirani su različiti molekularni markeri povezani sa apoptozom u ovom tumoru. Zbog toga smo postavili hipotezu da je razlika u imunohistohemijskoj ekspresiji Apaf-1, kaspaza 9 i 3 povezana sa, diferentovanošću i preživljavanjem kod pacijenata sa adenoidnim cističnim karcinomom pljuvačnih žlezda.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati imunohistohemijsku ekspresiju Apaf-1 u adenoidnom cističnom karcinomu pljuvačnih žlezda i rezultate korelirati sa kliničko-patološkim parametrima (starost, pol, lokalizacija, histopatološki tip tumora i dužina preživljavanja).

2. Ispitati imunohistohemijsku ekspresiju kaspaze 9 u adenoidnom cističnom karcinomu pljuvačnih žlezda i rezultate korelirati sa kliničko-patološkim parametrima (starost, pol, lokalizacija, histopatološki tip tumora i dužina preživljavanja).

3. Ispitati imunohistohemijsku ekspresiju kaspaze 3 u adenoidnom cističnom karcinomu pljuvačnih žlezda i rezultate korelirati sa kliničko-patološkim parametrima (starost, pol, lokalizacija, histopatološki tip tumora i dužina preživljavanja).

4. Korelirati rezultate imunohistohemijske ekspresije Apaf-1, kaspaze 9 i 3, kao i sa kliničko-patološkim parametrima (starost, pol, lokalizacija, histopatološki tip tumora i dužina preživljavanja) i utvrditi koji je od njih nezavistan prognostički parametar.

3. MATERIJAL I METODE

Za izradu ove studije korišćen je biopsijski material bolesnika sa ACC pljuvačnih žlezda, operisanih na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta u Beogradu u periodu od 1998. do 2008. godine.

Ovaj materijal je morfološki obrađen u laboratoriji za Oralnu patologiju, Stomatološkog fakulteta u Beogradu, gde je izvršeno kalupljenje, sečenje i bojenje preparata hematoksilin–eozin (HE) metodom. Imunohistohemijska bojenja su urađena u laboratoriji za imunohistohemiju Instituta za patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Istraživanje je koncipirano kao studija preseka, koja obuhvata 50 pacijenata, muškog i ženskog pola sa ACC pljuvačnih žlezda, prosečne starosti 58 godina (najmlađi ispitanik je imao 29, a najstariji 78 godina). Za svakog pacijenta su iz uputnica za histopatološku analizu prikupljeni podaci o polu, starosti, lokalizaciji tumora. Praćeno je ukupno preživljavanje pacijenata od momenta postavljanja dijagnoze (najkraće vreme praćenja je bilo 8, a najduže 158 meseci).

3.1 Standardna obrada materijala

Uzorci tkiva ACC su fiksirani 24h u neutralnom 10% (pH-7) puferovanom formalinu (37-40% formaldehid u fosfatnom puferu) na sobnoj temperaturi. Posle procesa postupne dehidracije tkiva kroz seriju alkohola rastuće koncentracije od 50% - 98%, jašnjavanja tkiva ksilolom, tkivo je ukalupljeno u parafinske blokove.

Parafinski tkivni blokovi su sečeni na kliznom mikrotomu rezove debljine 5 mikrometara, a potom je sledila deparafinizacija kroz ksilol i serije alkohola opadajuće koncentracije 99,8%-50%.

Proces deparafinizacije tkivnih preseka:

- ksilol 5-10min
- ksilol-96% alkohol (pomešati dve iste količine) 2-3min
- 96% alkohol 5min
- 80% alkohol 3min
- 70% alkohol 2min

- 50% alkohol 2min
- destilovana voda 5min

Preseci tkiva su nakon deparafinizacije, stavljeni na predmetna stakla i obojeni HE standardnom proskripcijom sa Mayer-ovim hematoksilinom.

HE bojenje tkivnih preseka:

- bojiti Mayer-ovim hematoksilinom 2-5 min (kod promene boje kontrolisati pod mikroskopom obojenost jedara)
- dobro isprati u mlakoj tekućoj vodi 5-10 min
- bojiti alkoholnim epozinom 1-2 min
- 80% etilni alkohol 2-3 uranjanja
- 90% etilni alkohol 2-3 uranjanja
- 96% etilni alkohol 2-3 uranjanja
- apsolutni alkohol 5-10 uranjanja
- pomešati iste količine apsolutnog alkohola i ksilola 2-3 min
- ksilol 2 puta po 5 min.
- obrisati pločicu i montirati Canada balsam-om

Reagensi za HE metodu:

1. Mayer-ov hematoksilin:

- hematoksilin -- 1 g
- destilovana voda -- 1 l
- natrijum (kalijum) jodat -- 0,2 g
- kalijum (amonijum)-aluminijum sulfat -- 50 g
- limunska kiselina -- 1 g
- hloralhidrat -- 50 g

Hematoksilin se najpre rastvori u destilovanoj vodi uz blago zagrevanje ako je potrebno. U ovaj rastvor se potom dodaje natrijum (kalijum) jodat, a zatim kalijum

(amonijum)-aluminijum sulfat. Sve se dobro izmeša i doda se limunska kiselina i hloral hidrat, i rastvor se nakon mešanja prokuva 5 minuta. Kada se sastojci kompletno rastvore dobije se crveno-ljubičasta boja. Dobijena smeša se zatim ohladi, profiltrira i čuva u dobro zatvorenoj boci na svetlu.

2. Eozin - 1% vodeni rastvor se pravi od :

- eozin -- 10 g
- destilovana voda --1 L

Profiltrirati pre upotrebe.

3. Etil alkohol koncentracija: 96%, 80%, 70%, 50%.

Preparati obojeni HE metodom su analizirani svetlosnim mikroskopom (Olympus tip BH-2, pod lupom i uvećanjem 10x, 20x i 40x), i određen je histološki tip tumora i procena kvaliteta uzorka. Na svakom reprezentativnom preseku obeležena su najmanje tri polja sa homogenim tumorskim tkivom, a zatim su na isti način pozicionirane oznake prenete na odgovarajući parafinski kalup, koji će se koristiti kao “donor blok” za konstrukciju tkivnog mikroniza (engl. tissue microarray -TMA).

3.2. Konstrukcija tkivnog mikroniza

U ovoj studiji koristili smo tehniku tkivnog mikroniza (Slika 2). Sa svakog parafinskog kalupa, “donor blok”, uzeta su 3 cilindra tkiva (po pacijentu), upotrebom 0,6 mm punkcione igle. Cilindri su u pravilnom nizu poređani na dvostruko lepljivu traku, koja je sa donje strane zalepljena za dno metalne posude za kalupljenje, a sa gornje fiksira cilindre tkiva. Zatim se naliva parafin, temperature 76°C, i prave se parafinski blokovi. Tako su dobijena 3 nova parafinska bloka (TMA kalupi), od kojih su u 2 postavljeni cilindri od 20 slučajeva, a u jednom od 10. Svaki od TMA kalupa je sadržao i po jedan uzorak tkiva za pozitivnu kontrolu za korišćena antitela.



Slika 2. TMA kalup i tkivni preseci ACC pljuvačnih žlezda.

Sa svakog TMA kalupa se seku preseci debljine 5 μ m koji su zatim obojeni HE metodom i posmatrani na svetlosnom mikroskopu u cilju analize morfološke očuvanosti i reprezentativnosti tkivnih uzoraka.

Na pripremljenim tkivnim presecima izvršeno je streptavidin-biotin imunohistohemijsko bojenje pomoću primarnih antitela, specifičnih za: Apaf-1, kaspazu 9 i kaspazu 3. Karakteristike primarnih antitela prikazane su u tabeli 3. Za svako primenjeno antitelo je korišćena pozitivna kontrola po preporuci proizvođača.

Tabela 3. Karakteristike primarnih monoklonskih antitela

Monoklonsko antitelo	Razblaženje	Pozitivna kontrola	Proizvođač
Apaf-1	1:40	Miokard	Novocastra
E23 (Kaspaza 9)	1:100	Karcinom cerviksa	Abcam
CPP32 (Kaspaza 3)	1:50	Tonzila	Novocastra

3.3. Imunohistohemijske metode

Preseci sa TMA kalupa, debljine 5µm su najpre deparafinisani i rehidrirani po sledećoj proceduri:

- I ksilol -- 5-7 minuta, ocediti
- II ksilol -- 5-7 minuta, ocediti
- 100% alkohol -- 3 minuta, ocediti
- 100% alkohol -- 3 minuta, ocediti
- 96% alkohol -- 3 minuta, ocediti
- 96% alkohol -- 3 minuta, ocediti
- destilovana/dejonizovana voda -- 30 sekundi

Po završetku procesa deparafinizacije i rehidratacije, preseci su potopljeni u 3% H₂O₂ (rastvoren u metanolu) 10 min., da bi se blokirala endogena peroksidaza i potom isprani destilovanom vodom. Ovako obrađeni preseci su potopljeni u kivetu sa 250ml 0,01% citratnog pufera (pH 6.0) i tretirani u mikrotalasnoj pećnici 20 minuta na 600W, posle čega su isprani u vodi, 20 minuta.

Dalji proces imunohistohemijskog bojenja se odvijao po sledećoj proceduri:

- ispiranje u fosfatnom puferu (PBS) 5 minuta
- potapanje u kozji serum 10 minuta
- inkubacija primarnim antitelom
- ispiranje u PBS puferu 2 x 5 minuta
- inkubacija biotiniziranim sekundarnim antitelom
- ispiranje u PBS puferu 2x5 minuta
- inkubiranja ABC reagensom (ili RTU streptavidin/peroxidase complex)
- ispiranje u PBS puferu 2x5 minuta
- pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30µL) hromogena diaminobenzidina (DAB)
- ispiranje destilovanom vodom

Po završetku ove faze bojenja pristupa se fazi kontrastiranja, potapanjem tkivnih preseka u Mayer-ov hematoksilin 5 do 10 minuta. Zatim sledi ispiranje destilovanom vodom, a potom uranjanje (10puta) u kivetu sa 0,037 mol/L amonijačne vode i na kraju ispiranje destilovanom vodom 2 do 5 minuta. Tkivni preseki se pokriju vodenim medijumom.

Rastvori korišćeni u imunohistohemijskim metodama:

1. Citratni pufer (10 mmol/l, pH 6,0) se priprema:

- Stock A : 0.1 mol limunske kiseline (MT 210.4)
 - limunska kiselina ($C_6H_8O_7$) -- 10,52 g
 - destilovana voda -- 500 ml
- Stock B: 0.1 mol natrijum citrat (MT 294.10)
 - natrijum citrat ($C_6H_5Na_3O_7$) -- 14,705 g
 - destilovana voda -- do 500 mL

Radni rastvor se pravi tako što se pomeša 9 ml Stock A i 41 ml Stock B pa se do 500 ml dopuni destilovana voda.

2. Fosfatni pufer (Phosphate-Buffered Saline – PBS) (0.02 mol/l, pH 7,0) se priprema:

- NaCl -- 8,00 g
- KCl -- 0,20 g
- KH_2PO_4 -- 0,20 g
- Na_2HPO_4 -- 1,43 g

Dopuniti do 1-og litra destilovanom vodom.

3. Amonijačna voda se priprema:

Uzeti 2,5 ml koncentrovanog amonijum hidroksida i do 1000 ml dopuniti destilovanom vodom.

Imunohistohemijsko bojenje tkivnih preseka sa ACC je analizirano svetlosnim mikroskopom (Olympus tip BH-2). Apaf-1 i kaspaza 3 su pokazivali citoplazmatsku, a kaspaza 9 citoplazmatsku i jedarnu pozitivnost. Vršena je semikvantitativna evaluacija intenziteta bojenja tumorskih ćelija za sva tri antitela, od strane dva nezavisna posmatrača – patologa. Ocena intenziteta ekspresije je kvalifikovana kao: jako izražen intenzitet ekspresije (3+), umeren intenzitet (2+) i slab ili je nedostajao (1+).

Za potvrdu ocene imunohistohemijske ekspresije korišćen je i program Image J. Tkivni mikroniz se sastoji od kontrolnog uzorka i uzoraka na kojima se vrše željene analize. Kontrolni uzorak služi za postavljanje granice pozitivnosti na ostalim merenjima. (šta je pozitivno, a šta je negativno). Svaki uzorak tkiva je prošao obradu na sledeći način. Najpre je uklonjen gradijent svetlosti pomoću funkcije „subtract background“. Zatim je učinjeno razdvajanje željenih boja pomoću filtera „colour deconvolution“ iz programa ImageJ (HE, DAB i ostatak), gde su dobijene osmobarne slike sa intenzitetom boje od 0-255 (crno-belo). Podešavanjem vrednosti treshold od 0-255 su na HE kanalu određene granice tkiva, u okviru kojih je izvršeno merenje intenziteta obojenosti na DAB kanalu. Na svakom sledećem cilindru je na isti način vršeno merenje intenziteta obojenosti, koje je upoređivano sa kontrolom i ukoliko je bilo veće od vrednosti kontrole, smatrano je da je rezultat pozitivan, ukoliko je bilo manje od kontrole, smatrano je da je rezultat negativan.

3.4. Statistička obrada podataka

Na osnovu prikupljenih podataka formirana je baza podataka u –SPSS 18.0 koja je korišćena za dalju statističku obradu. Statistička analiza podataka sastoji se iz metode deskriptivne i analitičke (inferencijalne) statistike. Sva atributivna obeležja posmatranja opisana su apsolutnim i relativnim brojevima. Za opis numeričkih oblika posmatranja koristili smo mere centralne tendencije i aritmetičke sredine i medijane i mere varijabiliteta (standardna devijacija, minimalne i maksimalne vrednosti). Za poređenje atributivnih obeležja posmatranja koristili smo Hi-kvadrat test. Izbor testova za numerička obeležja posmatranja zavisi od prirode raspodele numeričkih obeležja posmatranja i broja grupa. U

slučaju normalne raspodele podataka korišćemo T test, jednofaktorsku analizu varijanse, a kod raspodele podataka različitu od normalne korišćemo Kruskal Wallis-ov test i Mann Whitney test. Za analizu preživljavanja korišćena je Kaplan-Mejerova kriva preživljavanja - po posmatranim faktorima rizika poređićemo ih Long-rang testom, a Koksovom regresionom analizom izdvojićemo prediktore razlika preživljavanja.

4. REZULTATI

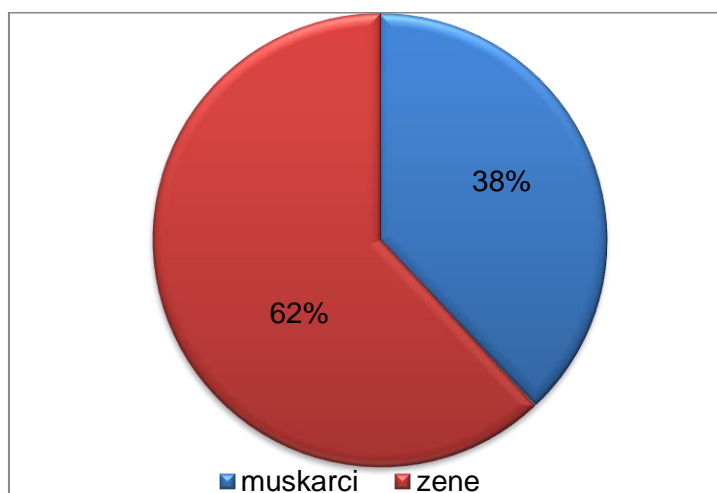
Ova retrospektivna studija obuhvata pedeset konsekutivnih slučajeva ACC pljuvačnih žlezda. Svi su dijagnostikovani na Institutu za patologiju, a operisani na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, u periodu od 1998.do 2008.godine. Kliničko-patološki parametri pacijenata kod kojih je dijagnostikovano ACC su prikazani u Tabeli 4.

4.1. Distribucija bolesnika prema starosti i polu

U odnosu na pol bilo je zastupljeno 19 (38.0%) osoba muškog i 31 (62.0%) osoba ženskog pola (Grafikon1). U posmatranoj grupi pacijenata nije uočena statistička značajnost u odnosu na pol ($p=0,090$).

Prosečna starost pacijenata je bila 58 godina (Tabela 4).Najmlađi ispitanik je imao 29, a najstariji 78 godina.

Grafikon 1. Distribucija bolesnika prema polu



4.2. Distribucija bolesnika prema lokalizaciji tumora

Pedeset slučajeva ispitivanog tumora je bilo lokalizovano na tipičnim mestima u usnoj duplji sa različitom relativnom učestalošću (Tabela 4).

Svi slučajevi ACC su u odnosu na lokalizaciju grupisani u četiri grupe, i to na tumore: parotidne pljuvačne žlezde, submandibularne, malih pljuvačnih žlezda tvrdog nepca i malih pljuvačnih žlezda drugih lokalizacija u usnoj duplji.

Tabela 4. Kliničko-patološke karakteristike pacijenata sa ACC pljuvačnih žlezda

Kliničko-patološki parametri		Dobijene vrednosti	Značajnost (p)
Pol n(%)	Muškarci	19 (38,0%)	p=0,090
	Žene	31 (62,0%)	
Starost (god.) X±SD; (Med;min-max)		58,00±12,79 (59,0; 29-78)	
Lokalizacija (u pljuvačnim žlezdama) n(%)	Parotidna	4 (8,0%)	p=0,000*
	Submandibularna	9 (18,0%)	
	Tvrdo nepce	29 (58,0%)	
	Male pljuvačne	8 (16,0%)	
Histološki tip tumora n(%)	Kribriformni	14 (28,0%)	p=0,726
	Tubularni	18 (36,0%)	
	Solidni	18 (36,0%)	
Ishod bolesti n(%)	Živi	19 (38,0%)	p=0,090
	Umrli	31 (62,0%)	

n(%)- broj pacijenata; *statistički značajna razlika

U odnosu na lokalizaciju tumora, statistički se značajnom pokazala lokalizacija u malim pljuvačnim žlezdama nepca (p=0,000). ACC je u ovim žlezdama bio dijagnostikovao kod 29 odnosno 58% pacijenata. U submandibularnoj i malim pljuvačnim žlezdama usne duplje tumor je bio lokalizovan kod 9 (18%) odnosno 8 (16%) slučajeva. Parotidna pljuvačna žlezda je bila najređa lokalizacija za ovaj tumor sa 4 (8%) slučajeva (Tabela 4).

4.3. Grupisanje bolesnika prema histološkom izgledu tumora

Prema strukturama koje formiraju tumorske ćelije, ACC se opisuje kao kribriformni, tubularni i solidni tumor.

Kod pacijenata sa ACC u našoj studiji tumori sa tubularnom i solidnom mikroskopskom slikom su bili podjednako zastupljeni kod 36, a sa kribriformnom kod 14 obolelih. Nije postojala statistička značajnost (p=0,726) u odnosu na histološki izgled tumora u našem ispitivanju (Tabela 4).

4.4. Ishod bolesti

Od pedeset pacijenata, kod kojih je dijagnostikovana ACC u pljuvačnim žlezdama, na kraju ispitivanja 19 je bilo živo, dok je 31 umro. Nije uočena statistički značajna razlika ($p=0,090$) u učestalosti ispitanika sa različitim ishodom bolesti u ispitivanoj grupi obolelih (Tabela 4).

4.5. Praćenje bolesnika

U ovoj studiji je praćeno ukupno preživljavanje bolesnika sa ACC pljuvačnih žlezda od momenta postavljanja dijagnoze (Tabela 5). Prosečna dužina praćenja obolelih je bila $82,9 \pm 44,6$ meseci. Najkraće vreme praćenja je bilo 8 meseci, a najduže 158 meseci. Medijana preživljavanja, koja je definisana kao vreme nakon kojeg je 50% ispitanika i dalje živo a 50% umrlo, je iznosila 91 mesec (95% CI 46,71-135,29 meseci). Detaljni podaci o preživljavanju pacijenata sa ACC u odnosu na kliničko-patološke parametre su dati u tabeli 5. Dve trećine pacijenata bilo je živo posle pete godine praćenja, a na kraju perioda praćenja 19,2% (Grafikon 2).

U odnosu na preživljavanje, statističku značajnost nije imao pol pacijenata ($p=0,672$) kao ni lokalizacija ($p=0,880$) i histološki tip ($p=0,744$) tumora (Tabela 5).

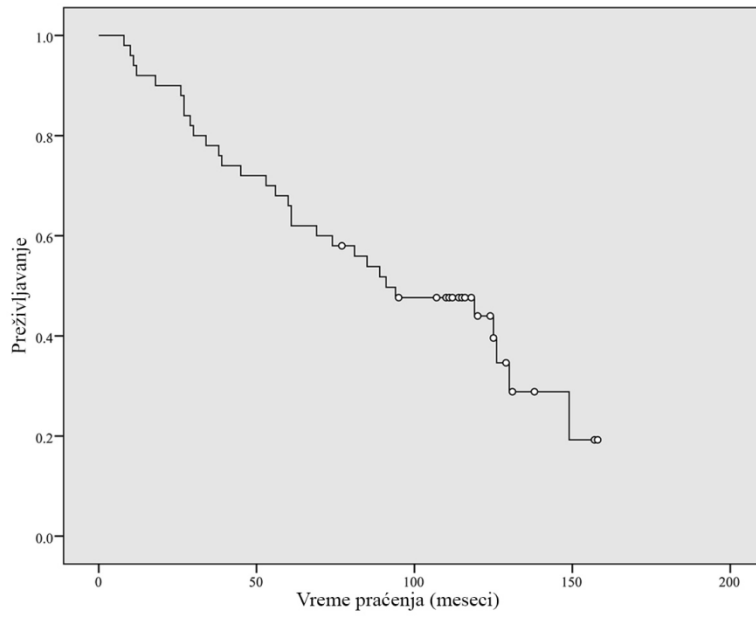
Pol pacijenata nije bio statistički značajan faktor u odnosu na preživljavanje pacijenata ($p=0,672$). Dobijeni rezultati nam pokazuju da je na petogodišnjem nivou ono bilo veće kod osoba ženskog u odnosu na osobe muškog pola (Tabela 5). Kod osoba ženskog pola, preživljavanje, posle pete godine je bilo 74,2%, a kod osoba muškog pola 52,6%. Veća je bila i medijana preživljavanja, koja je kod ispitanica iznosila 119 meseci, a kod ispitanika 69 meseci (Grafikon 3).

Takođe, nije postojala statistički značajna razlika između perioda preživljavanja obolelih od ACC u odnosu na lokalizaciju tumora ($p=0,880$) (Tabela 5).

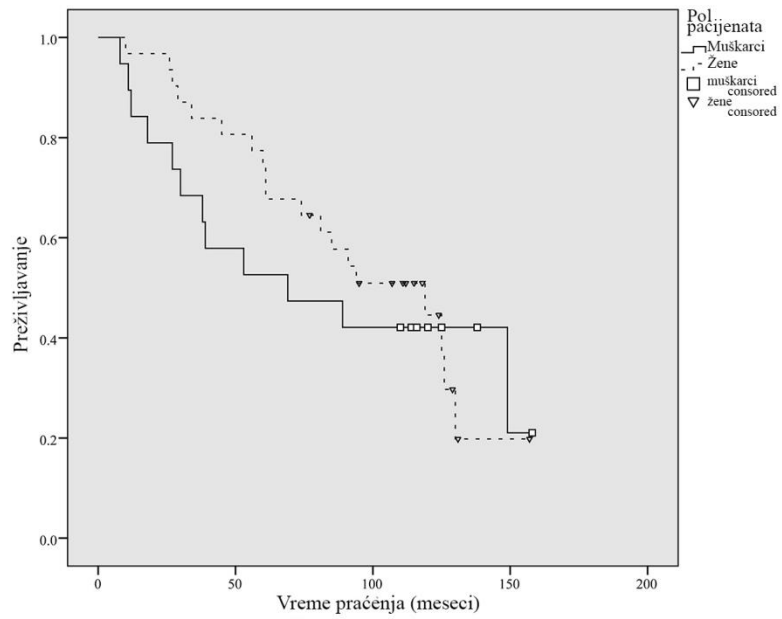
Pacijenti kod kojih je tumor bio dijagnostikovana u parotidnoj pljuvačnoj žlezdi su imali najduže desetogodišnje preživljavanje koje je iznosilo 75%, dok je najkraće bilo kod pacijenata sa tumorom lokalizovanim u malim pljuvačnim žlezdama tvrdog nepca 38,4%. Medijana preživljavanja kod pacijenata sa parotidno lokalizovanim tumorima je iznosila 27 meseci, a kod submandibularno lokalizovanih tumora 130 meseci. Kod pacijenata sa tumorom u malim pljuvačnim žlezdama tvrdog nepca, medijana preživljavanja je iznosila 89 meseci, a 69 meseci kod pacijenata sa tumorom u malim pljuvačnim žlezdama drugih lokalizacija u usnoj duplji (Grafikon 4).

Išičko-patološki parametri		Vreme praćenja								Zna
		1. godina	3. godina	5. godina	7. godina	9. godina	10. godina	11. godina	13. godina	
preživljavanje		92,0%	78,0%	66,0%	55,9%	47,6%	44,0%	28,9%	19,2%	/
	Muškarci	84,2%	68,4%	52,6%	47,4%	42,1%	42,1%	42,1%	21,1%	p=
	Žene	96,8%	83,9%	74,2%	61,1%	50,9%	44,6%	19,8%	19,8%	
Zreždaama) n(%)	Parotidna	100%	75,0%	75,0%	75,0%	75,0%	75,0%	/	/	p=
	Submandibularna	100%	66,7%	66,7%	66,7%	55,6%	55,6%	27,8%	27,8%	
	Tvrdo nepce	89,7%	82,8%	69,0%	55,2%	44,8%	38,4%	25,6%	25,6%	
	Male pljuvačne	87,5%	87,5%	62,5%	50,0%	50,0%	50,0%	50,0%	50,0%	
	Kribrif	92,9%	71,4%	50%	42,9%	42,9%	42,9%	42,9%	/	p=
	Tubularni	88,9%	83,3%	77,8%	66,7%	50,0%	50,0%	30,0%	30,0%	
	Solidni	94,4%	77,8%	66,7%	55,6%	50,0%	40,0%	26,7%	13,3%	

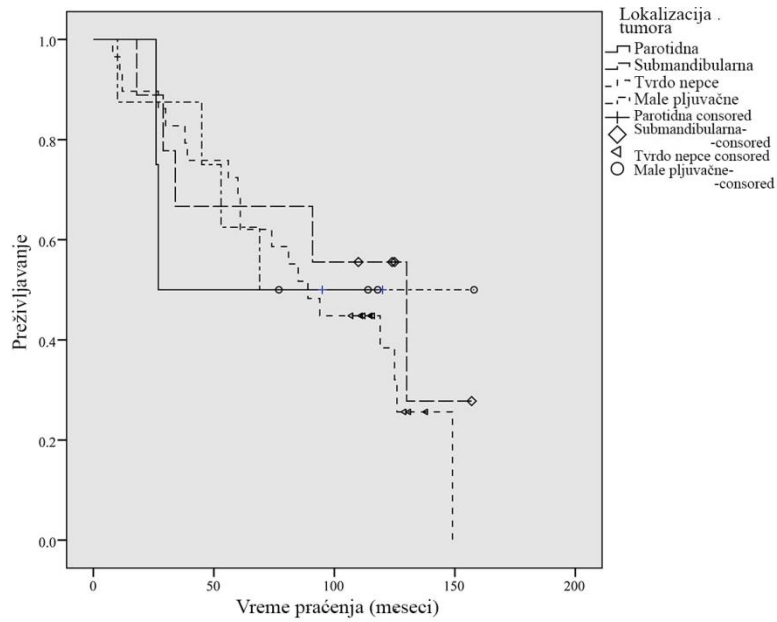
Grafikon 2. Preživljavanje pacijenata sa ACC pljuvačnih žlezda



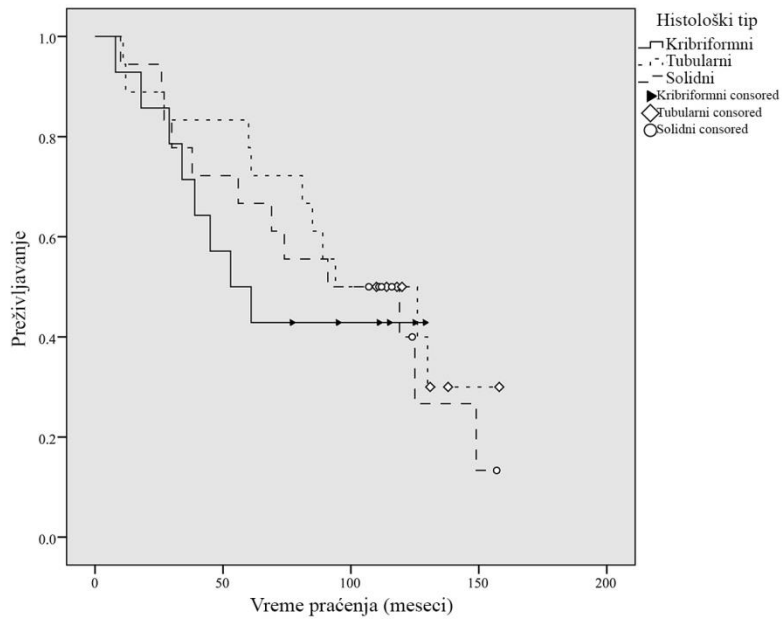
Grafikon 3. Preživljavanje pacijenata obolelih od ACC u odnosu na pol



Grafikon 4. Preživljavanje pacijenata obolelih od ACC u odnosu na lokalizaciju tumora



Grafikon 5. Preživljavanje pacijenata obolelih od ACC u odnosu na histološki tip



Statistički značajna razlika nije postojala ni između perioda preživljavanja pacijenata sa ACC u odnosu na histološki tip tumora ($p=0,744$) (Tabela 5). Pacijenti sa različitim histološkim tipom tumora nisu pokazivali neke velike razlike u broju preživelih pacijenata na desetogodišnjem nivou. Najveće preživljavanje je bilo kod ispitanika sa tubularnom slikom tumora (50%), dok je kod kribriformnih i solidnih tumora ono skoro ujednačeno (42,9% i 40%). Medijana preživljavanja je bila najmanja kod ispitanika sa kribriformnom slikom ACC i iznosila je 53 meseca, dok je kod tubularnih i solidnih tumora bila približnih vrednosti (94 meseca i 91 mesec) (Grafikon 5).

4.6. Imunohistohemijska ekspresija Apaf-1 u ACC pljuvačnih žlezda

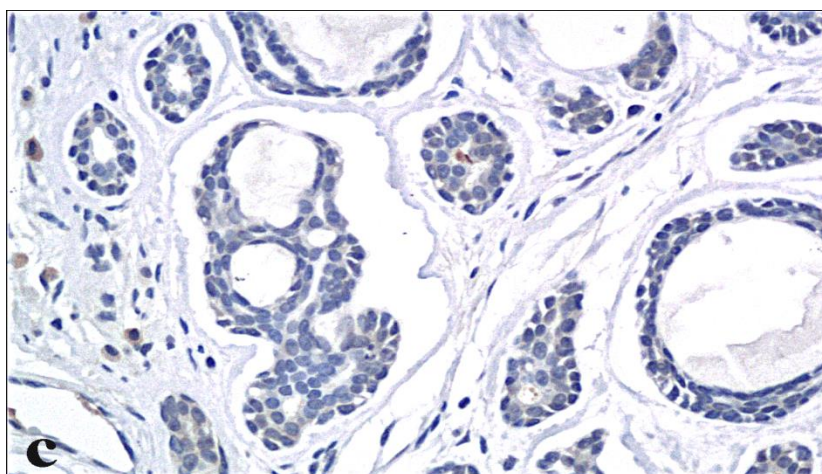
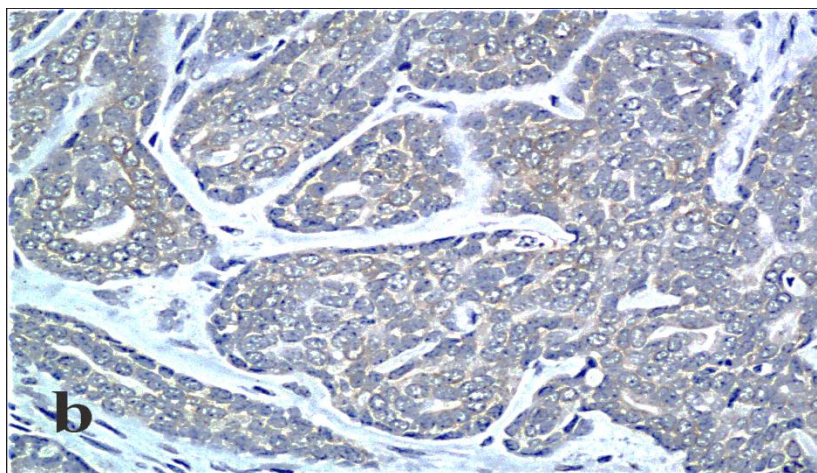
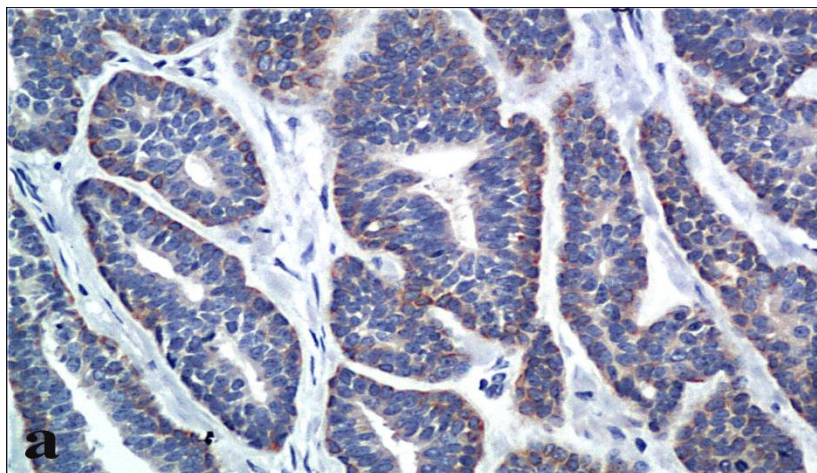
U ovoj studiji je analizirana ekspresija Apaf-1 u tumorskim ćelijama ACC pljuvačnih žlezda, streptavidin-biotin imunohistohemijskom metodom.

U ćelijama ACC, Apaf-1 se eksprimovao u citoplazmi tumorskih ćelija. Ocenu ekspresije, kao što smo naveli u metodama, vršila su dva nezavisna posmatrača –patologa. Statistički testovi su pokazali visok stepen slaganja između dva ocenjivača. U grupi od 50 ispitanika, ocene u pogledu ovog nalaza podudarale su se kod 44 ispitanika, dok su se kod 6 ispitanika razlikovale (Tabela 6).

Tabela 6. Prikaz podudarnosti ocene intenziteta ekspresije Apaf-1 u ACC između dva ocenjivača

		Drugi ocenjivač			Stopa slaganja	Kappa (κ) statistika
		+	++	+++		
ACC n (%)	Prvi ocenjivač				88%	0,817
	+	12 (24,0%)	2 (4,0%)	0 (0%)		
	++	0 (0%)	13(26,0%)	2 (4,0%)		
	+++	0 (0%)	2 (4,0%)	19(38,0%)		

n(%)-broj pacijenata



Slika 3. Streptovidin-biotin imunohistohemijsko bojenje tumorskih ćelija ACC pljuvačnih žlezda. Jak (a, x200), umeren (b, x200) i slab (c, x200) intenzitet ekspresije Apaf -1.

Analize ekspresije Apaf-1 u tumorskim ćelijama ACC u odnosu na kliničko-patološke parametre prikazane su u tabeli 7.

Tabela7. Ekspresija Apaf-1 u ACC pljuvačnih žlezda i korelacija sa kliničko-patološkim parametrima

Ekspresije Apaf-1		+	++	+++	Značajnost (p)	
ACC n(%)		14 (28,0%)	15 (30,0%)	21 (42,0%)	p=0,423	
Kliničko-patološki parametri	Pol n(%)	Muškarci Žene	7 (36,8%) 7 (22,6%)	5 (26,4%) 10 (32,3%)	7 (36,8%) 14 (45,2%)	^a p=0,552
	Starost (god.)X±SD; (Med;min-max)	/	52,50±15,42 (56,5;29-78)	57,80±12,5 (56;39-78)	61,81±10,23 (61;41-75)	^b p=0,106
	Lokalizacija (u pljuvačnim žlezdama) n(%)	Parotidna Submandibularna Tvrđog nepca Male pljuvačne	1 (25,0%) 1 (11,2%) 8 (27,6%) 4 (50,0%)	1 (25,0%) 4 (44,4%) 7 (24,1%) 3 (37,5%)	2 (50,0%) 4 (44,4%) 14 (48,3%) 1 (12,5%)	^a p=0,486
	Histološki tip n(%)	Kribriformni Tubularni Solidni	2 (14,3%) 6 (33,3%) 6 (33,3%)	5 (35,7%) 4 (22,2%) 6 (33,3%)	7 (50,0%) 8 (44,4%) 6 (33,3%)	^a p=0,654
	Ishod bolesti n(%)	Živi Umrli	6 (31,6%) 8 (25,8%)	7 (36,8%) 8 (25,8%)	6 (31,6%) 15 (48,4%)	^a p=0,494

n(%)- broj pacijenata; ^aχ²-test; ^bOne way ANOVA;

Različiti nivoi intenziteta ekspresije Apaf-1 nisu pokazivali statističku značajnost u odnosu na pol (p=0,552) i starost (p=0,106) pacijenata. Kod osoba muškog pola je bila podjednako zastupljena 3+ i 1+ reaktivnost, dok je umerena (2+) ekspresija bila prisutna

kod pet ispitanika. Kod osoba ženskog pola, intenzitet ekspresije Apaf-1 je najčešće bila ocenjena kao 3+, i to kod 14/31 ispitanice. Umerena (2+) pozitivnost je bila prisutna kod 10 osoba ženskog pola, a slaba (1+) reaktivnost kod 7 osoba ženskog pola. U odnosu na starost pacijenata, 1+ i 2+ ekspresija je bila zastupljena kod pacijenata prosečne starosti 56 godina dok je 3+ bila ispoljena kod pacijenata sa medijanom od 61 godine (Tabela 7).

U odnosu na lokalizaciju ACC u pljuvačnim žlezdama, intenzitet ekspresije Apaf-1, nije imao statistički značaj ($p=0,486$) (Tabela 7). Polovina slučajeva parotidno lokalizovanih tumora je pokazivala jaku (3+) imunopozitivnost za ovo antitelo. A kod ostalih slučajeva, je bila umerena (2+) ili slabo izražena (1+) pozitivnost. ACC koji je bio lokalizovan u malim pljuvačnim žlezdama tvrdog nepca u 48% slučajeva je imao jaku (3+) Apaf-1 pozitivnost. Umerena (24,1%) i slabo izražena (27,6%) ekspresija ili je ona nedostajala je bila skoro podjednako zastupljena. Pacijenti kod kojih je tumor bio lokalizovan u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi, imali su isti procenat zastupljenosti jako i umereno ocenjene ekspresije Apaf-1, dok je kod 11,2% ispitanika bila 1+. Polovina pacijenata kod kojih je tumor bio dijagnostikovao u malim pljuvačnim žlezdama drugih lokalizacija usne duplje su pokazivali 1+ intenzitet ekspresije, dok kod 37,5% ocenjena kao 2+, a kod 12,5% je bila 3+.

Posmatrano u odnosu na histološki tip tumora, ekspresija Apaf-1 se nije pokazala kao značajan statistički parametar ($p=0,654$) (Tabela 7). Tumori sa kribriformnom slikom su najčešće imali 3+ ocenjenu pozitivnost, i to kod 50% pacijenata. Umerena ekspresija je bila prisutna kod 35,7% ispitanika, a kod 14,3% je ocenjena kao 1+. ACC sa tubularnom slikom je pokazivao nešto slabiju 3+ ekspresiju Apaf-1 (44,4%), dok je 1+ pozitivnost bila mnogo više izražena (33,3%) u odnosu na tumore sa kribriformnom slikom. Svi slučajevi solidnih tumora su imali podjednaku distribuciju različitih nivoa ekspresije posmatranog parametra.

U ovom radu smo analizirali i značaj procene vrednosti ekspresije Apaf-1 u odnosu na ishod bolesti (Tabela 7). Pacijenti koji su bili živi na kraju ovog ispitivanja, imali su skoro ujednačene vrednosti različitih nivoa ekspresije Apaf-1. Kod skoro polovine pacijenata sa smrtnim ishodom, bila je zastupljena 3+ imunopozitivnost u tumorskim ćelijama. Ocena ekspresije Apaf-1 nije imala statistički značaj ($p=0,494$) u odnosu na preživjele i umrle pacijente.

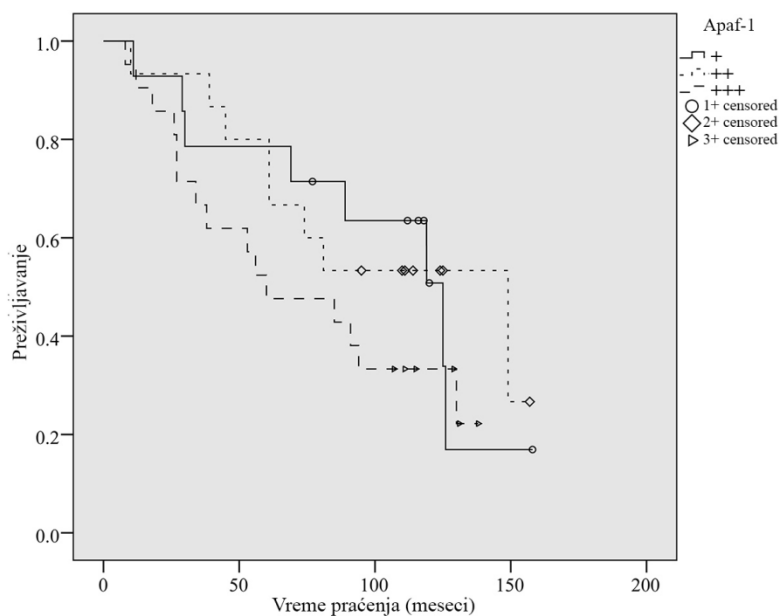
Ispitujući značaj različitih nivoa ekspresije Apaf-1 u odnosu na preživljavanje pacijenata sa ACC nije uočena statistička značajnost ($p=0,340$) (Tabela 8). Sumirajući ove rezultate, može se videti da je na petogodišnjem i desetogodišnjem nivou praćenja, bio približno isti broj preživelih pacijenata sa 1+ i 2+ intenzitetom ekspresije Apaf-1. Niži procenat preživljavanja je uočen kod pacijenata sa 3+ ekspresijom koja je nakon pete godine iznosila 47,6%, a posle deset godina 33,3%. Što se tiče medijane preživljavanja ispitanika sa ACC ona je bila najduža 149 meseci kod pacijenata za 2+ ekspresiju Apaf-1, dok je najkraće iznosila 60 meseci za 3+ ekspresiju ovog markera (Grafikon 7).

Tabela 8. Ekspresija Apaf-1 u ACC pljuvačnih žlezda u odnosu na trinaestogodišnje preživljavanje pacijenata

/	Apaf-1	Vreme praćenja								Značajnost (#p)
		1. godina	3. godina	5. godina	7. godina	9. godina	10. godina	11. godina	13. godina	
(%)	+	92,9%	78,6%	78,6%	71,4%	63,5%	50,8%	16,9%	16,9%	p=0,340
	++	93,3%	93,3%	80,0%	53,3%	53,3%	53,3%	53,3%	26,7%	
	+++	90,5%	66,7%	47,6%	47,6%	33,3%	33,3%	22,2%	22,2%	

(%)- broj preživelih pacijenata; #Long-Rank test;

Grafikon 7. Prikaz preživljavanja pacijenata sa ACC u odnosu na ekspresiju Apaf-1



4.7. Imunohistohemijska ekspresija kaspaze 9 u ACC pljuvačnih žlezda

Imunohistohemijska ekspresija kaspaze 9 u ACC je pokazivala pozitivnost i u citoplazmi i u jedrima ćelija. Procenu intenziteta ekspresije su vršila dva nezavisna posmatrača- patologa. Podudarnost u opisu intenziteta ekspresije između ocenjivača je bila kod 43 ispitanika, odnosno 86%, što ukazuje da je zadovoljavajući indeks pouzdanosti posmatranih parametara (Tabela 9).

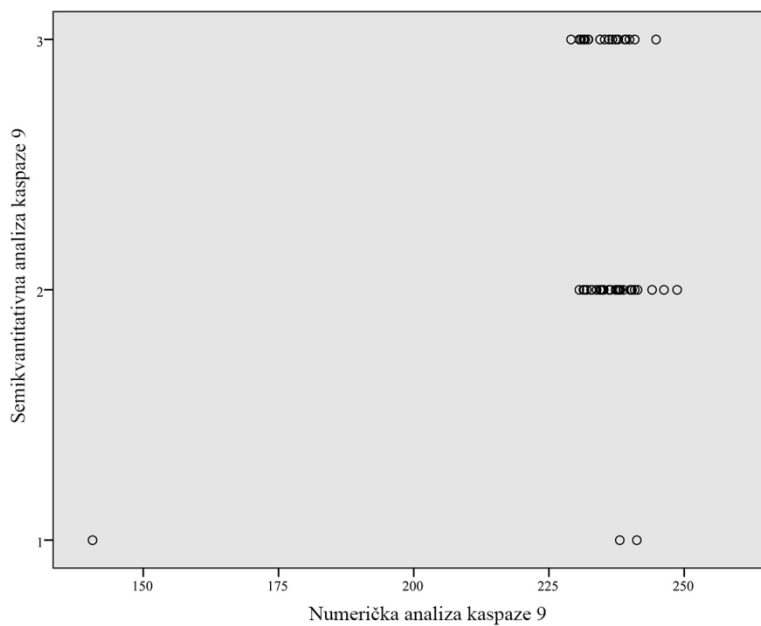
Imunohistohemijska ekspresija kaspaze 9, pored ocene patologa semikvantitativnom metodom, ocenjivana je i numeričkom metodom (Grafikon 8). Spirmanovim koeficijentom korelacije ispitana je povezanost između ova dva načina ocenjivanja radi određivanja pouzdanosti i validnosti numeričke metode. Pokazana je statistički značajna povezanost između ova dva načina ocenjivanja imunohistohemijske ekspresije kaspaze 9 antitela u ACC pljuvačnih žlezda ($p=0,018$).

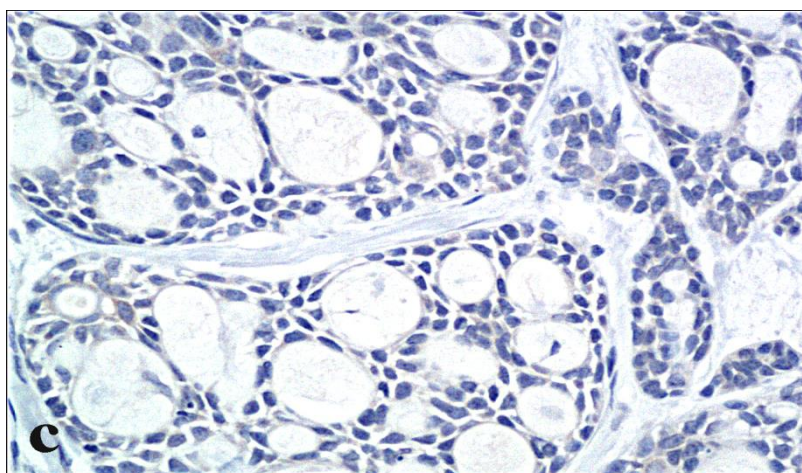
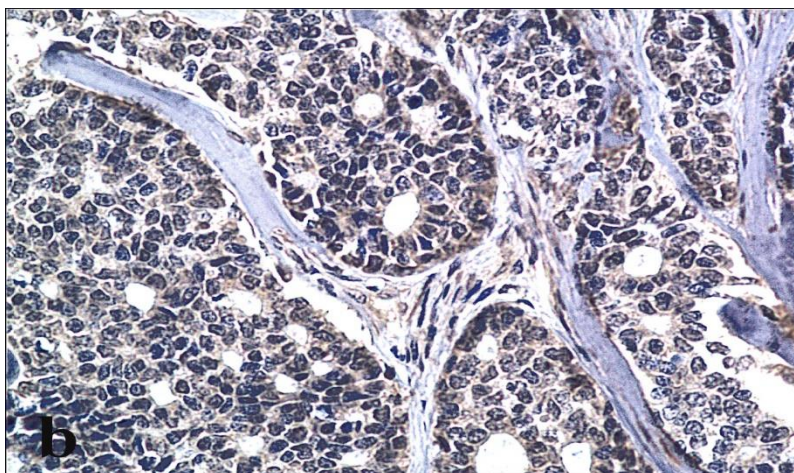
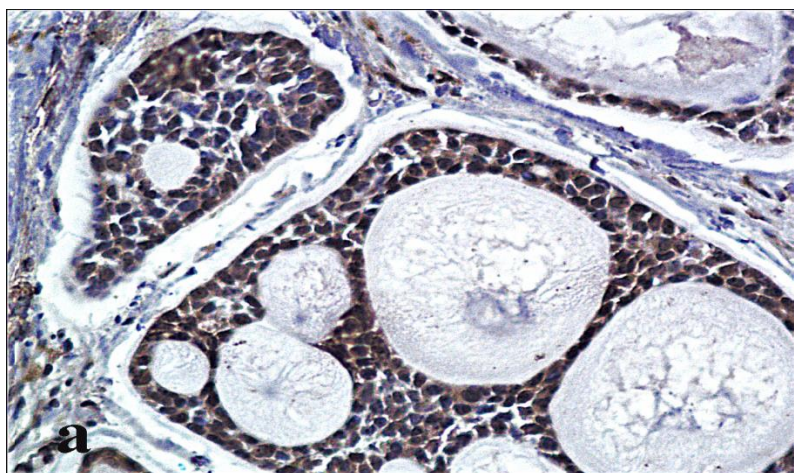
Tabela 9. Prikaz podudarnosti ocene intenziteta ekspresije kaspaze 9 u ACC između dva ocenjivača

		Drugi ocenjivač			Stopa slaganja	Kappa (κ) statistika
		+	++	+++		
ACC n (%)	Prvi ocenjivač					
	+	2 (4,0%)	1 (2,0%)	0 (0%)	86%	0,741
	++	0 (0%)	23 (46,0%)	2 (4,0%)		
+++	0 (0%)	2 (4,0%)	18 (36,0%)			

n(%)-broj pacijenata

Grafikon 8. Korelacija između semikvantitativne i numeričke metode u ekspresiji kaspaze 9 u ACC pljuvačnih žlezda





Slika 4. Streptovidin-biotin imunohistohemijsko bojenje tumorskih ćelija ACC pljuvačnih žlezda. Jak (a, x200), umeren (b, x200) i slab (c, x200) intenzitet ekspresije kaspaze 9.

Ekspresija kaspaze 9 u ACC pljuvačnih žlezda je pokazala različitu imunoreaktivnost koja je statistički značajna ($p=0,000$) (Tabela 10). Kod najvećeg broja pacijenata, (54%), je bila zastupljena umerena (2+) pozitivnost (Slika 4b), u nešto manjem broju slučajeva (42%) je ocenjena kao jaka (3+) pozitivnost (Slika 4a), a najmanji broj ispitanika (6%), je pokazivao slabu ekspresiju ili je ona nedostajala (1+) (Slika 4c).

Poređenjem ekspresije kaspaze 9 u odnosu na pol pacijenata, zaključujemo da postoji statistički značajna razlika ($p=0,000$) (Tabela 10). Kod osoba muškog pola dominantna je bila 2+ ekspresija (89.5%), dok je kod osoba ženskog pola ova reaktivnost bila zastupljena u 32,3% slučajeva. Takođe za razliku od osoba muškog pola, kod ženske populacije najveća imunopozitivnost je bila 3+ (58,1%).

Za razliku od pola pacijenata, ekspresija kaspaze 9 se nije pokazala kao statistički značajna u odnosu na njihovu starost ($p=0,794$), kao ni u odnosu na lokalizaciju ($p=0,564$), i histološki tip ($p=0,308$) tumora (Tabela 10).

Intenzitet ekspresije kaspaze 9, ocenjen sa 3+ je bio zastupljen kod pacijenata srednje starosne dobi od 57,5 godina. Umerena (2+) pozitivnost je bila kod nešto starijih pacijenata, čija je medijana starosti bila 60 godina, a slabo izražena pozitivnost ili je nedostajala, kod nešto mlađih, sa medijanom starosti od 54 godine. U odnosu na lokalizaciju, najčešće je bila zastupljena 2+ pozitivnost, osim kod tumora lokalizovanih u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi koji su češće imali 3+ ocenjenu ekspresiju kaspaze 9. Tumori lokalizovani u parotidnoj pljuvačnoj žlezdi su u 75% slučajeva pokazivali 2+ pozitivnost, a u 25% je ona ocenjena sa 3+. Nije bio nijedan slučaj sa 1+ ocenjenom ekspresijom. Kod tumora koji su bili lokalizovani u pljuvačnim žlezdama tvrdog nepca, 2+ imunopozitivnost je bila prisutna kod 55,2% pacijenata, 3+ kod 37,9%, a 1+ kod svega 6,9% ispitanika. Tumori malih pljuvačnih žlezda drugih lokalizacija u usnoj duplji su u 62,5% slučajeva imali 2+ ekspresiju, a kod 25% je ona bila ocenjena sa 3+. Slab afinitet za ovo antitelo, odnosno 1+ pozitivnost je ocenjena kod 12,5% tumora ove lokalizacije (Tabela 10).

Tabela 10. Ekspresija kaspaze 9 u ACC pljuvačnih žlezda i korelacija sa kliničko-patološkim parametrima

Ekspresije kaspaze 9		+	++	+++	Značajnost (p)	
ACC n(%)		3 (6,0%)	27 (54,0%)	20 (40,0%)	p=0,000*	
Kliničko-patološki parametri	Pol n(%)	Muškarci Žene	0 (0%) 3 (9,7%)	17 (89,5%) 10 (32,3%)	2 (10,5%) 18 (58,1%)	^a p=0,000*
	Starost (god.) X±SD; (Med(min-max))		53,67±4,51 (54; 49-58)	58,81±13,16 (60; 31-78)	57,55±10,3 (57,5; 29-75)	^b p=0,794
	Lokalizacija (u pljuvačnim žlezdama) n(%)	Parotidna Submandibualna Tvrdo nepce Male pljuvačne	0 (0%) 0 (0%) 2 (6,9%) 1 (12,5%)	3 (75,0%) 3 (33,3%) 16 (55,2%) 5 (62,5%)	1 (25,0%) 6 (66,7%) 11 (37,9%) 2 (25,0%)	^a p=0,564
	Histološki tip n(%)	Kribriformni Tubularni Solidni	1 (7,1%) 2 (11,1%) 0 (0%)	5 (35,7%) 11 (61,1%) 11 (61,1%)	8 (57,1%) 5 (27,8%) 7 (38,9%)	^a p=0,308
	Ishod bolesti n(%)	Živi Umrli	1 (5,3%) 2 (6,5%)	9 (47,4%) 18 (58,1%)	9 (47,4%) 11 (35,5%)	^a p=0,707

n(%)- broj pacijenata; *statistički značajna razlika; ^aχ²-test; ^bOne way ANOVA;

Iako statistički nije bilo značaja između ekspresije kaspaze 9 i histološkog tip ACC, iz dobijenih rezultata se može videti da je mali broj slučajeva (3/50) pokazivao 1+ reaktivnost. Umerena (2+) i jaka (3+) ekspresija je bila prisutna kod 61,1% i 27,8% tubularnih odnosno kod 35,7% i 57,1% tumora sa kribriformnom slikom. Solidni tumori su imali isti procenat broja slučajeva sa umerenom ekspresijom kao tubularni, a nešto veći procenat sa 3+ ocenjenom ekspresijom (38,9%) (Tabela 10).

Posmatrajući odnos ocenjenog intenziteta ekspresije kaspaze 9 i ishoda bolesti nije dobijen statistički značaj ($p=0,564$) (Tabela 10). Pacijenti koji su bili živi do kraja perioda praćenja su podjednako imali zastupljenu 3+ i 2+ pozitivnost, dok je kod 58,1% pacijenta sa smrtnim ishodom bila prisutna 2+ pozitivnost.

Različita ekspresija kaspaze 9 se nije pokazala kao značajan statistički parametar ni u odnosu na preživljavanje pacijenata kod koji je dijagnostikovano ACC u pljuvačnim žlezdama ($p=0,650$) (Tabela 11).

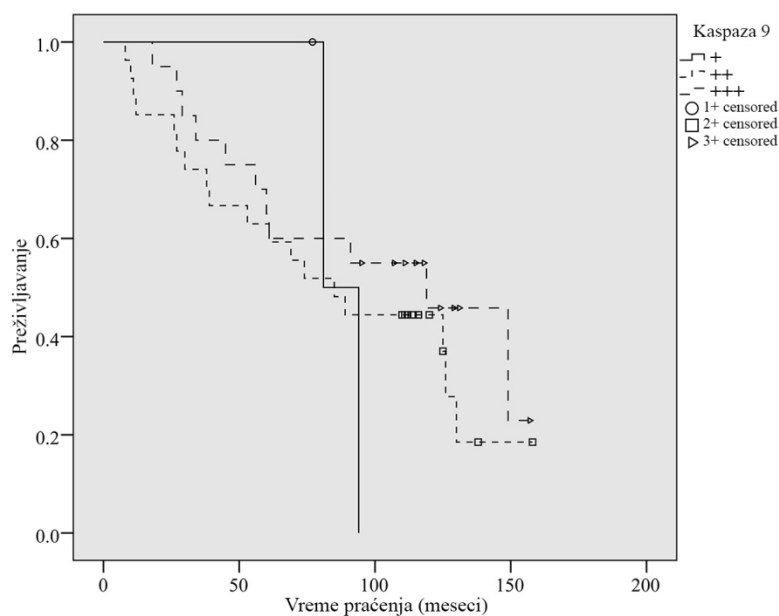
Tabela 11. Ekspresija kaspaze 9 u ACC pljuvačnih žlezda u odnosu na trinaestogodišnje preživljavanje pacijenata

/	Kaspaza 9	Vreme praćenja								Značajnost (#p)
		1. godina	3. godina	5. godina	7. godina	9. godina	10. godina	11. godina	13. godina	
(%)	+	100%	100%	100%	50,0%	0%	/	/	/	p=0,650
	++	85,2%	74,1%	63,0%	51,9%	44,4%	44,4%	18,5%	18,5%	
	+++	100%	80,0%	65,0%	60,0%	55,0%	45,8%	45,8%	22,9%	

(%)- broj preživelih pacijenata; #Long-Rank test;

Ukupno preživljavanje za pacijente sa 2+ i 3+ intenzitetom ekspresije ovog antitela, naročito na petogodišnjem i desetogodišnjem nivou, je bilo približnih vrednosti. Za razliku od ukupnog preživljavanja pacijenata sa ACC, medijana preživljavanja se razlikovala za navedene nivoe ekspresije kaspaze 9, tako da je za pacijente sa 2+ ekspresijom iznosila 85 meseci, a za pacijente sa 3+ ekspresijom, 119 meseci (Grafikon 9).

Grafikon 9. Prikaz preživljavanja pacijenata sa ACC u odnosu na ekspresiju kaspaze 9



4.8. Imunohistohemijaska ekspresija kaspaze 3 u ACC pljuvačnih žlezda

U tumorskim ćelijama ACC pljuvačnih žlezda ekspresija kaspaze 3, slično kao i Apaf-1, je bila prisutna samo u citoplazmi ćelija. Intenzitet ekspresije, su procenjivala dva nezavisna posmatrača - patologa. Stopa slaganja je iznosila 90% (45 od 50 ispitanika). (Tabela 12).

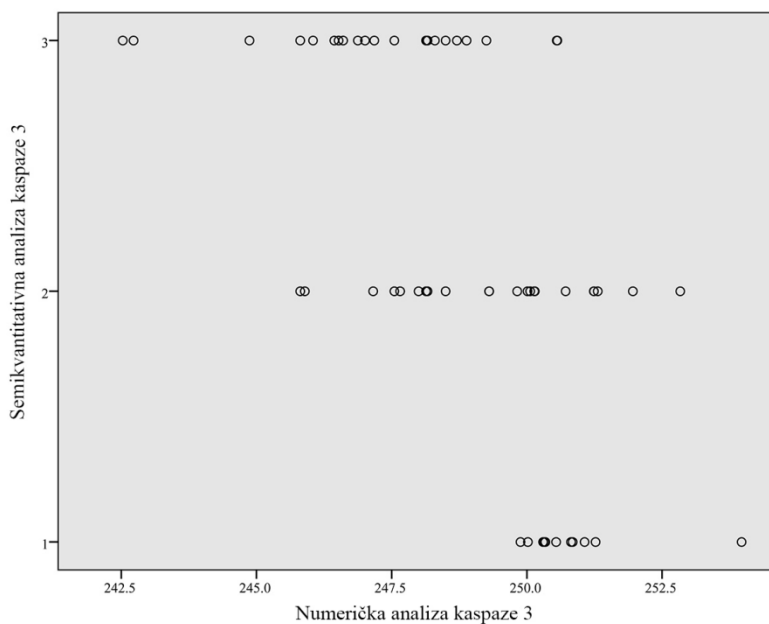
Imunohistohemijaska ekspresija kaspaze 3, pored ocene patologa semikvantitativnom metodom, ocenjivana je i numeričkim metodom (Grafikon 10). Spirmanovim koeficijentom korelacije ispitana je povezanost između ova dva načina ocenjivanja radi određivanja pouzdanosti i validnosti numeričke metode. Pokazana je statistički značajna povezanost između ova dva načina ocenjivanja imunohistohemijaska ekspresije kaspaze 3 antitela ($p=0,000$) u ACC pljuvačnih žlezda.

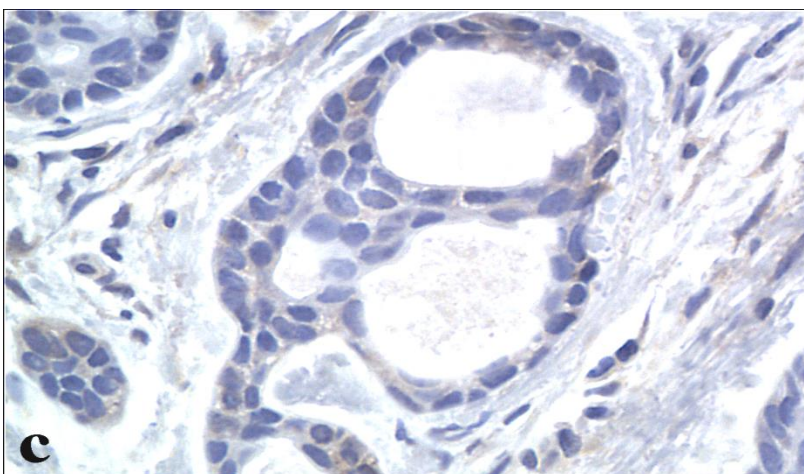
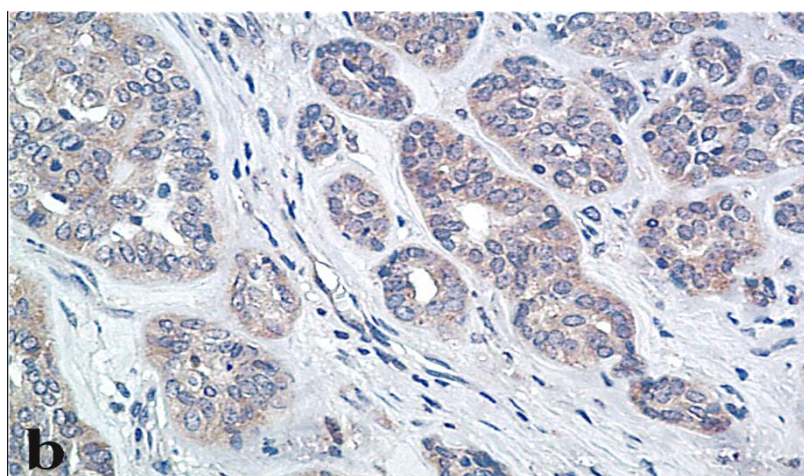
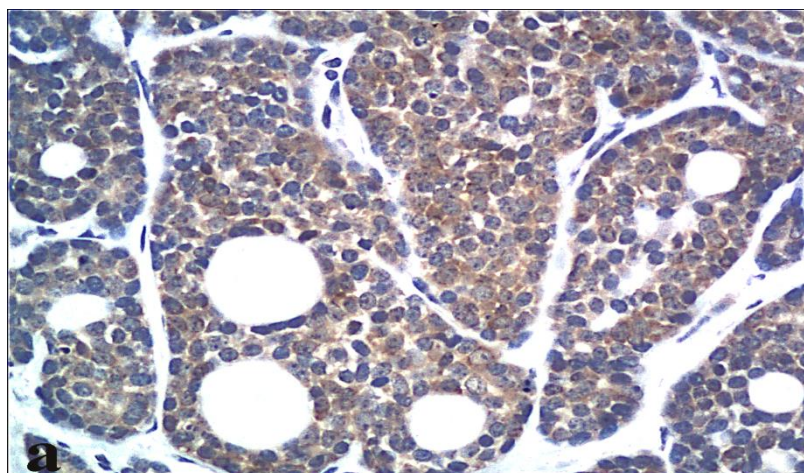
Tabela 12. Prikaz podudarnosti ocene intenziteta ekspresije kaspaze 3 u ACC između dva ocenjivača

		Drugi ocenjivač			Stopa slaganja	Kappa (κ) statistika
		+	++	+++		
ACC n(%)	+	11(22,0%)	0 (0%)	0 (0%)	90%	0,846
	++	0 (0%)	17 (34,0%)	1 (2,0%)		
	+++	0 (0%)	4 (8,0%)	17 (34,0%)		

n(%)-broj pacijenata

Grafikon 10. Korelacija između semikvantitativne i numeričke metode u ekspresiji kaspaze 3 u ACC





Slika 5. Streptovidin-biotin imunohistohemijsko bojenje tumorskih ćelija ACC pljuvačnih žlezda. Jak (a, x200), umeren (b, x200) i slab (c, x200) intenzitet ekspresije kaspaze 3.

Kod nešto manje od polovine pacijenata (21/50 ili 42%) sa dijagnostikovanim ACC u pljuvačnim žlezdama bila je zastupljena jaka (3+) ekspresija kaspaze 3 (Slika 5a). Kod 18 pacijenata je ocenjena kao umerena (2+) (Slika 5b), dok je najmanji broj slučajeva, njih 11, imalo slabo eksprimovanu kaspazu 3 ili je ona nedostajala (Slika 5c) (Tabela 13). Ovo primarno antitelo, nije pokazivalo statističku značajnost između različitih intenziteta ekspresije ($p=0,206$) u ACC pljuvačnih žlezda.

Intenzitet ekspresije kaspaze 3 nije imao statistički značaj ni u odnosu na pol pacijenata ($p=0,354$) (Tabela 13). Kod osoba muškog pola, bio je skoro ujednačen broj pacijenata sa različitim nivoima imunohistohemijske ekspresije kaspaze 3. Za razliku od muškog pola, kod ženske populacije skoro polovina slučajeva (15/31), je imala 3+ pozitivnost, a najmanje je bila zastupljena 1+ pozitivnost, i to kod 5 ispitanica.

Posmatrajući nivo ekspresije kaspaze 3 u odnosu na starost pacijenata, kao što je prikazano u tabeli 13, nije bilo statističkog značaja ($p=0,412$). Srednja vrednost godina pacijenata za sva tri nivoa ocenjene ekspresije (1+, 2+, 3+) kaspaze 3 se poklapa sa najčešćim godinama javljanja ovog tumora, a to je peta i šesta decenija života.

Što se tiče lokalizacije ACC, ekspresija kaspaze 3 nije statistički značajan faktor ($p=0,265$). Ona je bila jako eksprimovana u tumorima svih lokalizacija, osim u ACC malih pljuvačnih žlezda drugih lokalizacija u usnoj duplji koji su najčešće imali zastupljenu umerenu ekspresiju ovog enzima. Slično kao kod ekspresije kaspaze 9 nijedan slučaj parotidno lokalizovanih tumora nije imao 1+ ekspresiju kaspaze 3 (Tabela 13).

U odnosu na histološki tip, kribriformni i solidni tumori nisu pokazivali velika odstupanja u pogledu različitih nivoa ekspresije kaspaze 3. To nije bio slučaj kod pacijenata sa tumorima tubularne mikroskopske slike. Kod ovih pacijenata, u 55,6% slučajeva je bila jako ispoljena kaspaza 3, a u 38,9% je bila umerena. Nije postojala statistička značajnost ekspresije kaspaze 3 u odnosu na histološki tip tumora ($p=0,265$) (Tabela 13).

. U ACC pljuvačnih žlezda, ekspresija kaspaze 3 nije imala statistički značaj ni u odnosu na ishod bolesti ($p=0,153$) (Tabela 13). U grupi preživelih pacijenata najčešće je

bila zastupljena 3+ imunopozitivnost za ovaj marker. Kod pacijenata sa smrtnim ishodom, tumorske ćelije su uglavnom pokazivale i umerenu i jaku ekspresiju ovog antitela.

Tabela 13. Ekspresija kaspaze 3 u ACC pljuvačnih žlezda i korelacija sa kliničko-patološkim parametrima

Ekspresija kaspaze 3		+	++	+++	Značajnost (p)	
ACC n(%)		11 (22,0%)	18 (36,0%)	21 (42,0%)	p=0,206	
Kliničko - patološki parametri	Pol n(%)	Muškarci Žene	6 (31,6%) 5 (16,1%)	7 (36,8%) 11 (35,5%)	6 (31,6%) 15 (48,4%)	^a p=0,354
	Starost (god.) X±SD; (Med(min-max))		53,91±15,90 (54; 29-75)	60,50±13,18 (60; 29-78)	58,00±10,56 (57,5; 39-78)	^b p=0,412
	Lokalizacija (u pljuvačnim žlezdama) n(%)	Parotidna Submandibularna Tvrdo nepce Male pljuvačne	0 (0%) 2 (22,2%) 6 (20,7%) 3 (37,5%)	2 (50,0%) 2 (22,2%) 10 (34,5%) 4 (50%)	2 (50,0%) 5 (55,6%) 13 (44,8%) 1 (12,5%)	^a p=0,532
	Histološki tip n(%)	Kribriformni Tubularni Solidni	5 (35,7%) 5 (35,7%) 5 (27,8%)	4 (28,6%) 7 (38,9%) 7 (38,9%)	5 (35,7%) 10 (55,6%) 6 (33,3%)	^a p=0,265
	Ishod bolesti n(%)	Živi Umrli	4 (21,1%) 7 (22,6%)	4 (21,1%) 14 (45,2%)	11 (57,9%) 10 (32,3%)	^a p=0,153

n(%) - broj pacijenata; ^aχ²-test; ^bOne way ANOVA;

Rezultati ekspresije kaspaze 3 u korelaciji sa preživljavanjem pacijenata obolelih od ACC prikazani su u tabeli 14. Na petogodišnjem nivou, najduže preživljavanje (76,2%) su imali pacijenti sa 3+ ekspresijom ovog markera, a najkraće (55,6%) sa 2+ intenzitetom.

Posle deset godina ujednačeno je bilo preživljavanje kod pacijenata sa 1+ i 2+ ekspresijom (22,7% i 22,2%) a kod pacijenata sa 3+ ekspresijom je bilo nešto veće i iznosilo je 33%.

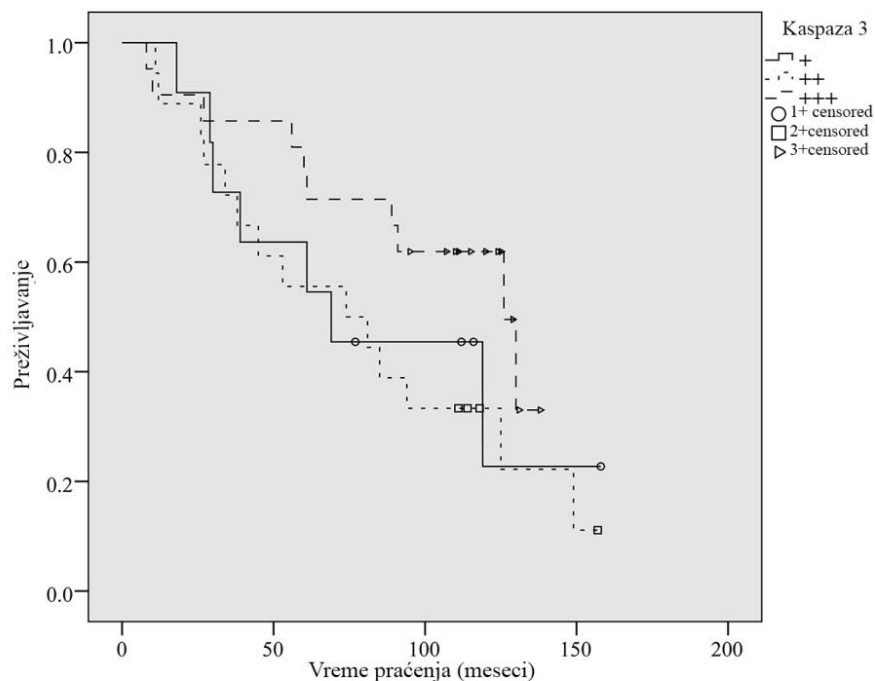
Tabela 14. Ekspresija kaspaze 3 u ACC pljuvačnih žlezda u odnosu na trinaestogodišnje preživljavanje pacijenata

/	Kaspaza 3	Vreme praćenja								Značajnost (#p)
		1. godina	3. godina	5. godina	7. godina	9. godina	10. godina	11. godina	13. godina	
(%)	+	100%	72,7%	63,6%	45,5%	45,5%	22,7%	22,7%	22,7%	p=0,209
	++	88,9%	72,2%	55,6%	44,4%	33,3%	33,3%	22,2%	11,1%	
	+++	90,5%	85,7%	76,2%	71,4%	61,9%	61,9%	33,0%	/	

(%)- broj preživelih pacijenata; #Long-Rank test;

Pacijenti kod kojih je kaspaza 3 bila slabo eksprimovana ili je nedostajala imali su istu medijanu preživljavanja kao i pacijenti sa umerenom ekspresijom. Ona je iznosila 69 meseci. Pacijenti sa jako izraženom ekspresijom kaspaze 3 su imali najdužu medijanu preživljavanja koja je iznosila 126 meseci. Ovde treba naglasiti da je najduže praćenje za pacijente iz ove grupe iznosilo 138 meseci (Grafikon 11).

Grafikon 11. Prikaz preživljavanja pacijenata sa ACC u odnosu na ekspresiju kaspaze 3



4.9. Analiza korelacije između ekspresije Apaf-1, kaspaze 9 i 3 u ACC pljuvačnih žlezda

Različiti nivoi ekspresije Apaf-1, nisu pokazali statistički značaj u odnosu na ekspresiju kaspaze 9 ($p=0,497$) (Tabela 15.). Kod ispitanika sa 1+ ekspresijom kaspaze 9 bila je ravnomerna distribucija različito ocenjenih vrednosti (1+, 2+, 3+) ekspresije Apaf-1. Pacijenti kod koji je bila zastupljena umerena (2+) ekspresije kaspaze 9, imali su najviše zastupljenu 1+ ekspresiju Apaf-1. Ispitanici sa jakom ekspresijom kaspaze 9, su pokazivali i jaku ekspresiju Apaf-1.

Različiti nivoi ekspresije Apaf-1 su pokazali statističku značajnost u odnosu na ekspresiju kaspaze 3 u ACC pljuvačnih žlezda ($p=0,006$) (Tabela 15). U grupi ispitanika sa 1+ ekspresijom kaspaze 3, najčešće je bila zastupljena 1+ reaktivnost Apaf-1. Kod pacijenata sa umerenom i jakom ekspresijom kaspaze 3, Apaf-1 je bio najčešće jake (3+) imunoreaktivnosti.

Tabela 15. Korelacija između ekspresije Apaf-1 u ACC i ekspresije kaspaze 9 i 3

Apaf-1		+	++	+++	Značajnost (ap)
Kaspaza 9 n(%)	+	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	p=0,497
	++	10 (37,0%)	8 (29,6%)	9 (33,3%)	
	+++	3 (15,0%)	6 (30,0%)	11 (55,0%)	
Kaspaza3 n(%)	+	8 (72,7%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	p=0,006*
	++	3 (16,7%)	6 (33,3%)	9 (50,0%)	
	+++	3 (14,3%)	7(33,3%)	11 (52,4%)	

n(%)- broj pacijenata; *statistički značajna razlika; ^aχ²-test;

Različito ocenjena ekspresija kaspaze 9 nije statistički korelirala sa ekspresijom Apaf-1 (p=0,497) (Tabela 16). Ispitanici kod kojih je bio zastupljen 1+ i 2+ intenzitet ekspresije Apaf-1, najčešće su pokazivali umerenu ekspresiju kaspaze 9. Kod obolelih sa jakim ekspresijom Apaf-1 bila je najčešće zastupljena i jaka ekspresija kaspaze 9.

Različito ocenjena ekspresija kaspaze 9 nije statistički korelirala sa ekspresijom kaspaze 3 (p=0,403) (Tabela 16). Kaspaza 9 se najčešće umereno eksprimovala kod pacijenata koji su imali 1+ i 2+ ocenjenu pozitivnost kaspaze 3. Pacijenti kod kojih se jako eksprimovala kaspaza 3 su najčešće imali i jaku ekspresiju kaspaze 9.

Tabela 16. Korelacija između ekspresije kaspaze 9 u ACC i ekspresije Apaf-1 i kaspaze 3

Kaspaza 9		+	++	+++	Značajnost (ap)
Apaf-1 n(%)	+	1 (7,1%)	10 (71,4%)	3 (21,4%)	p=0,497
	++	1 (6,7%)	8 (53,3%)	6 (40,0%)	
	+++	1 (4,8%)	9 (42,9%)	11 (52,4%)	
Kaspaza3 n(%)	+	1 (9,1%)	7 (63,6%)	3 (27,3%)	p=0,403
	++	2 (11,1%)	10 (55,6%)	6 (33,3%)	
	+++	0 (0%)	10 (47,6%)	11 (52,4%)	

n(%)- broj pacijenata; ^aχ²-test;

Različito ocenjena ekspresija kaspaze 3 značajno je statistički korelirala sa ekspresijom Apaf-1 u ACC pljuvačnih žlezda ($p=0,006$) (Tabela 17). Kod 57,1% ispitanika sa 1+ ekspresijom Apaf-1, ekspresija kaspaza 3 je takođe ocenjena sa 1+. Kod pacijenata sa 2+ i 3+ ekspresijom Apaf-1, kaspaza 3 se najčešće jako ekspresovala.

Različito ocenjena ekspresija kaspaze 3 nije statistički korelirala sa ekspresijom kaspaze 9 ($p=0,403$) (Tabela 17). Kod pacijenata sa 1+ ekspresijom kaspaze 9 najčešće je bila prisutna umerena ekspresija kaspaze 3. Isti broj slučajeva sa 2+ ekspresijom kaspaze 9, je bio zastupljen sa jakim i umerenom ekspresijom kaspaze 3. Pacijenti sa 3+ ocenjenim intenzitetom pozitivnosti kaspaze 9 su u 55% slučajeva pokazivali i jaku ekspresiju kaspaze 3.

Tabela 17. Korelacija između ekspresije kaspaze 3 u ACC i ekspresije Apaf-1 i kaspaze 9

Kaspaza 3		+	++	+++	Značajnost (p)
Apaf-1 n(%)	+	8 (57,1%)	3 (21,4%)	3 (21,4%)	^a p=0,006*
	++	2 (13,3%)	6 (40,0%)	7 (46,7%)	
	+++	1 (4,8%)	9 (42,9%)	11 (52,4%)	
Kaspaza 9 n(%)	+	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0 (0%)	^a p=0,403
	++	7 (25,9%)	10 (37,0%)	10 (37,0%)	
	+++	3 (15,0%)	6 (30,0%)	11 (55,0%)	

n(%) - broj pacijenata; *statistički značajna razlika; ^a χ^2 -test;

Univarijantnom Koksovom regresionom analizom, ispitivan je uticaj markera unutrašnjeg puta apoptoze i kliničko patoloških parametara na preživljavanje (Tabela 18). Ovom analizom izdvajaju se statistički značajni faktori, koji se dalje testiraju Cox-ovom multivarijantnom analizom, radi izdvajanja faktora sa nezavisnim dejstvom. Univarijantnom Koksovom analizom izračunavan je i relativni rizik (exp (B)) koji nam pokazuje koliko puta su ispitanici kod kojih je prisutan patološki nalaz, posmatranog faktora, pod većim rizikom za lošije preživljavanje. Univarijantnom Koksovom regresionom analizom samo se starost izdvojila kao statistički značajan factor ($p=0,000$). Obzirom da je samo jedan faktor u univarijantnom modelu izdvojen kao statistički

značajan, multivarijantni regresioni model nije moguće formirati, tako da je starost kao jedini faktor ujedno i prediktor preživljavanja posmatrane grupe obolelih.

Tabela 18. Univarijantna Koksova regresiona analiza uticaja analiziranih faktora na preživljavanje pacijenata sa ACC pljuvačnih žlezda

Analizirani faktori	Univarijantna analiza	
	#expB (95%CI)	Značajnost
Pol	0,854 (0,411-1,774)	p=0,673
Starost	1,155 (1,091-1,222)	p=0,000*
Lokalizacija	1,019 (0,636-1,633)	p=0,938
Histološki tip	0,956 (0,595-1,536)	p=0,853
Apaf-1	1,307 (0,833-2,052)	p=0,244
Numerički Apaf-1	1,092 (0,868-1,373)	p=0,453
Kaspaza 9	0,783(0,436-1,405)	p=0,412
Numerički kaspaza 9	1,001 (0,977-1,027)	p=0,917
Kaspaza 3	0,744 (0,477-1,161)	p=0,193
Numrički kaspaza 3	1,129 (0,972-1,312)	p=0,111

*statistička značajnost; # relativni rizik

5. DISKUSIJA

Adenoidni cistični karcinom je jedan od najčešćih malignih tumora pljuvačnih žlezda (10 do 15 %) i čini oko 1% u odnosu na maligne tumore glave i vrata (22, 29). U odnosu na pol, skoro se podjednako javlja kod muškaraca i kod žena (20, 21, 24, 26, 27, 28, 29), mada u literaturi postoje podaci u kojima je on više zastupljen kod osoba ženskog pola. Jedna velika studija koja je obuhvatala 467 pacijenata sa ACC, uključujući i 18 pacijenata sa lokalizacijom ovog tumora u maksilarnom sinusu, prikazala je da je on bio dijagnostikovao kod 257 (55%) žena i 210 (45%) muškaraca, prosečne starosti 47 godina (najmlađi pacijent je imao 16, a najstariji 80 godina) (30). Sličnu učestalost u odnosu na pol prikazuju i radovi koji su rađeni na manjim serijama ovog tumora (31, 33, 70).

Publikovani su i rezultati u kojima je ovaj tumor bio češće zastupljen kod osoba muškog pola. De Cruz Perez DE i saradnici (34), ispitujući seriju od 129 obolelih od ACC, prikazali su da je zastupljenost tumora u odnosu muškarci–žene bio 1,22 : 1 u korist muškaraca. U ovoj seriji je bila 71 osoba muškog pola i 58 ženskog, prosečne starosti 51,5 godina (najmlađi pacijent je imao 10, a najstariji 96 godina). Takođe nešto veća učestalost ovog tumora kod muškaraca, bila je u ispitivanju koje je obuhvatilo 140 pacijenata sa ACC lokalizovanim u regionu glave i vrata. Prosečna starost ovih ispitanika je bila 57 godina, pri čemu je najmlađi pacijent imao 11, a najstariji 91 godinu (71)

Naši podaci su u saglasnosti sa rezultatima autora koji prikazuju nešto veću učestalost ACC kod osoba ženskog pola. Ova studija je obuhvatila 50 pacijenata sa ACC pljuvačnih žlezda, od kojih su 62% osobe ženskog i 38% osobe muškog pola. Prosečna starost ispitanika je iznosila 58 godina, najmlađi pacijent je imao 29, a najstariji 78 godina. To se slaže sa rezultatima iz literature, jer se ACC najčešće dijagnostikuje kod pacijenata u 5 i 6 deceniji života, mada se može javiti u bilo kom životnom dobu. Kod dece je izuzetno redak (22, 23, 20, 24, 25, 29).

Anatomska distribucija ACC je bila na tipičnim lokalizacijama u usnoj duplji sa različitim relativnom učestalošću. Najčešće je tumor bio lokalizovan u malim pljuvačnim žlezdama tvrdog nepca (29/50 ili 58%) i u ostalim malim pljuvačnim žlezdama (8/50 ili 16%). Za razliku od malih pljuvačnih žlezda, u submandibularnoj (9/50 ili 18%) i parotidnoj (4/50 ili 8%) žlezdi je tumor bio najređe lokalizovan prema našim rezultatima.

Ovi podaci se uglavnom slažu sa podacima iz literature, gde se ovaj tumor prikazuje kao tumor malih pljuvačnih žlezda. Tako je u istraživanju gde je uključeno 129 ispitanika sa ACC najčešća lokalizacija bila u pljuvačnim žlezdama tvrdog nepca (41,9%) (34). Slične rezultate, sa dominantnom lokalizacijom ACC u malim pljuvačnim žlezdama, je dokazan i u drugim studijama (17, 30, 31, 33). U retrospektivnoj studiji koja je obuhvatala 140 pacijenata sa oralnim i ekstraoralno lokalizovanim ACC, male pljuvačne žlezde su se takođe pokazale kao najčešća oralna lokalizacija ovog tumora. Dominantno je zastupljen u pljuvačnim žlezdama tvrdog nepca, 61% slučajeva, a u velikim pljuvačnim žlezdama, kod 39% ispitanika (71).

Na osnovu histološkog izgleda, odnosno struktura koje formiraju tumorske ćelije, ACC se klasifikuje na kribriformni, tubularni i solidni tip. Klasični oblici ACC najčešće pokazuju kombinaciju kribriformne i tubularne histološke slike (2, 29), ali je u drugim istraživanjima kribriformna slika često dominirala (30, 33). U jednoj studiji, od 129 ispitanika sa ACC, oko 55%, je pokazivalo kribriformni sliku. U ovoj seriji je bio skoro približan odnos pacijenata sa tumorom koji su pokazivali tubularnu (27%) i solidnu sliku (22%) (34). Slični rezultati su prikazani u literaturi gde je bila podjednaka zastupljenost solidne i tubularne slike ovog tumora, pored dominacije kribriformnih struktura (32).

Naši rezultati konsektivnih slučajeva salivarnih ACC, su se prema učestalosti u odnosu na histološke strukture, razlikovali od podataka iz literature. Kribriformna struktura tumora, koja se u literaturi navodi kao najčešće prisutna, u našoj studiji je bila zastupljena kod 14, odnosno 28%, od ukupnog broja pacijenata. Dok je, tubularna i solidna slika tumora bila zastupljena kod više od 2/3 pacijenata odnosno kod 72% od ukupnog broja ispitanika.

ACC je malignitet koji mnogi autori smatraju "klinički visokogradusnom neoplazmom". To je tumor nepredvidivog i progresivnog kliničkog toka. U cilju prognoze, ukupno preživljavanje pacijenata sa ACC je praćeno u različitim istraživanjima (29, 36). Na seriji od 105 slučajeva sa ACC, Van Wert i saradnici (53), su prikazali da je 5-, 10-, 20-godišnje preživljavanje iznosilo 68%, 52% i 28%. Za isti period praćenja, u drugoj studiji, kod 68 pacijenata, dobijeni su slični rezultati. Posle pet godina, preživljavanje je

bilo 72%, posle deset godina 44%, a nakon dvadeset godina 34% (31). U literaturi postoje podaci o nižem procentu preživljavanja obolelih od ACC, tako da je petogodišnje preživljavanje iznosilo 56,5%, a za deset godina 32,5% (34). Za razliku od ovih rezultata. Chen MA i saradnici (71), su pratili ukupno preživljavanje 140 pacijenata sa ACC, na petogodišnjem nivou je ono bilo 85%, odnosno 64% na desetogodišnjem nivou. Ovde treba naglasiti da su bili uključeni i pacijenti sa ekstraoralno lokalizovanim ACC. Slični rezultati na desetogodišnjem nivou su prikazani u jednoj velikoj evropskoj studiji koja je obuhvatila ACC glave i vrata, gde je ukupno preživljavanje bilo 65% (72).

U našoj studiji je praćeno ukupno preživljavanje pedeset pacijenata sa ACC pljuvačnih žlezda. Najkraće praćenje ukupnog preživljavanja je bilo 8 meseci, a najduže 158 meseci. Prosečna dužina praćenja pacijenata bila je $82,9 \pm 44,6$ meseci. Petogodišnje preživljavanje, za naše ispitanike, je iznosilo 66%, desetogodišnje 44%, da bi na kraju perioda praćenja od trinaest godina, 19,2% ispitanika bilo živo. Nije uočena statistička značajnost u učestalosti ispitanika sa različitim ishodom bolesti. Dobijeni rezultat, kao i literaturni podaci, pokazuju da se radi o tumoru sa dugoročno lošom prognozom.

5.1. Analiza markera unutrašnjeg puta apoptoze u ACC

Apoptoza, ili programirana smrt ćelije, je neophodna za razvoj organizma i održavanje tkivne homeostaze (73). Poznata su dva osnovna apoptozna puta, spoljašnji i unutrašnji, i oba rezultiraju aktiviranjem kaspazne kaskade kada dolazi do fragmentacije proteina u ćeliji (74). Danas se smatra da su poremećaji u apoptoznim putevima značajni u patogenezi mnogih bolesti, uključujući i maligne tumore. Jedna od pretpostavki je da je supresija apoptoze kritičan događaj u inicijaciji i progresiji maligniteta. Druga pretpostavka je da većina antikancerskih citotoksičnih agenasa koji dovode do regresije tumora, barem delimično se obavlja indukcijom apoptoze (75).

Cilj ovog istraživanja je analiza markera unutrašnjeg puta apoptoze. Unutrašnji put apoptoze je povezan sa promenama propustljivosti membrane mitohondrija i prelaska pro-apoptotskih molekula iz intermembranskog prostora u citosol ćelije. Pro-apoptotski molekuli, uključujući citohrom c u prisustvu Apaf-1 i prokaspaze 9 formiraju apoptosom. Ovaj kompleks aktivira kaspaznu kaskadu i promovira apoptozu. Apaf-1 je ključni efektorni molekul ovog puta, i proučavan je u različitim humanim tumorima.

Evaluacija imunohistohemijske ekspresije antitela specifičnog za Apaf-1 je vršena u malignim melanomima i nevusima. Nivo citoplazmatske ekspresije Apaf-1, je analiziran na uzorcima sa TMA kalupa. U najvećem broju slučajeva, kod 36/70 ili 51,4% pacijenata sa melanomom, Apaf-1 je pokazivao slabo izraženu ekspresiju. Umerena ekspresija je bila zastupljena kod 21(30%) ispitanika, a jaka kod 7(10%) ispitanika. Šest (8,6%) ispitanika sa ovim tumorom, nije pokazivalo imunopozitivnost za ovo antitelo. Za razliku od melanoma, u nevusnim ćelijama, Apaf-1 se pokazao kao visoko imunopozitivan marker, gde je u 76,9% slučajeva ekspresija bila ocenjena kao jako izražena. Na osnovu rezultata ispitivanja apoptoznih mehanizma u melanomu, autori ukazuju da je kompleksno uključivanje molekula Apaf-1 u tumorogenezi. Oni smatraju da gubitak ekspresije Apaf-1 može biti okidač za pokretanje maligne transformacije melanocita. Takođe, su mišljenja da smanjenje nivoa ekspresije Apaf-1 u ćelijama melanoma, koje su u najvećem broju slučajeva pokazivale slabu ekspresiju, može da bude uzrok rezistencije na hemioterapiju (76).

Karcinomi cerviksa su uglavnom pokazivali pozitivnu reakciju za Apaf-1 antitelo. Od 86 pacijentkinja sa karcinomom cerviksa, 42% je pokazivalo jaku imunopozitivnost na Apaf-1. Umerena ekspresija je bila zastupljena kod 34%, a slaba ili je nedostajala kod 24% pacijentkinja. I kod ovog tumora je bila zastupljena citoplazmatska pozitivnost (77).

Slično ćelijama malignog melanoma i karcinoma cerviksa, naši rezultati pokazuju da su ćelije ACC pljuvačnih žlezda u najvećem broju slučajeva Apaf-1 imunopozitivne. Ocenu intenziteta citoplazmatske ekspresije na isečcima sa TMA kalupa, su vršila dva nezavisna patologa uz visoku stopu slaganja. Jaka ekspresija Apaf-1 je bila zastupljena kod 42%, a umerena kod 30% ispitanika. Slaba ekspresija ili je nedostajala je ocenjena kod 28% pacijenata. Za razliku od naših rezultata kod adenokarcinoma debelog creva, postojalo je značajno smanjenje ekspresije Apaf-1 molekula. Od 529 slučajeva sa adenokarcinomom debelog creva samo je 129 ili 22% imalo pozitivnu reakciju na antitelo specifično za Apaf-1. S obzirom da su adenomi pokazivali 100% pozitivnost za ovo antitelo, autori smatraju da je smanjenje ekspresije Apaf-1 u adenokarcinomu povezano sa malignom alteracijom adenoma (78).

Sposobnost tumorskih ćelija da se odupru apoptotskim signalima mogu uticati na agresivnost i prognozu. Veliki broj studija prikazuje rezultate ekspresije, odnosno aktivnosti, faktora apoptozne signalizacije, a koji utiču na apoptoznu otpornost tumorskih ćelija ili ćelijskih linija u in vitro uslovima ili na životinjskim modelima. Međutim, veoma je značajno koreliranje ovih rezultata sa kliničko-patološkim parametrima i prognozom maligniteta (79).

Korelacija između imunohistohemijske ekspresije Apaf-1 i kliničkopatoloških parametara u literaturi prikazuju različit značaj. Ekspresija Apaf-1 se nije pokazala kao statistički značajan parametar u odnosu na godine, pol, histološki subtip i lokalizaciju melanoma, kao ni u odnosu na petogodišnje preživljavanje (76). Kod pacijentkinja sa karcinomom cerviksa, postojala je značajna korelacija između ekspresije Apaf-1 i nodalnog statusa. Slučajevi sa jakom i umerenom ekspresijom Apaf-1 su imali značajno manji broj metastaza u limfnim čvorovima u vreme operacije od slučajeva sa slabom ili negativnom ekspresijom (77).

U kolorektalnom karcinomu, smanjena ekspresija Apaf-1 je bila u korelaciji sa lošim prognostičkim faktorima kao što su dubina invazije, metastaziranje u regionalne limfne čvorove i histološkim gradusom. Univarijantna i/ili multivarijantna analiza nije pokazala statističku značajnost ove ekspresije na ukupno preživljavanje pacijenata sa ovim karcinomom. Petogodišnje preživljavanje kod pacijenata gde je u tumorskom tkivu bila negativna reakcija za Apaf-1, iznosio je 67,7%, a desetogodišnje 62,3%. Kod pacijenata gde je ekspresija Apaf-1 bila pozitivna, petogodišnje preživljavanje je bilo 72,7% a desetogodišnje 67,1% (80). Slične rezultate su prikazali Zlobec I. i saradnici (78), ispitujući ekspresiju Apaf-1 u velikoj seriji od 1420 kolorektalnih karcinoma.

U našem istraživanju, korelacija između ekspresije Apaf-1 i kliničko-patoloških parametara pacijenata sa ACC, se nije pokazala kao statistički značajna. Apaf-1 je najčešće pokazivao 1+ i 3+ pozitivnost, kod 19 osoba muškog pola, a kod najvećeg broja osoba ženskog pola, 14 od 31 ispitanice, su imale 3+ pozitivne ćelije. Srednja vrednost godina pacijenata sa 1+ i 2+ ekspresijom je bila 56 godina, a kod pacijenata sa 3+ ekspresijom, 61 godina. Tumori malih pjuvačnih žlezda tvrdog nepca, kao najzastupljenije lokalizacije u ovoj studiji, u skoro polovini slučajeva, su pokazivali 3+ ocenjenu Apaf-1 pozitivnost. Ni u odnosu na histološki tip, ekspresija Apaf-1 nije imala statističku značajnost. Kribriformni i tubularni tumori su najčešće imali 3+ ocenu ekspresije. Solidna varijanta ACC, koju u mnogim studijama povezuju sa lošijom prognozom, većim kliničkim stadijumom i razvojem udaljenih metastaza (81), imala je podjednaku distribuciju Apaf-1 pozitivnosti.

U odnosu na preživele i umrle pacijente, Apaf-1 nije pokazao statističku značajnost. Pacijenti koju su bili živi na kraju perioda praćenja imali su skoro ujednačene vrednosti različitih nivo ekspresije. Kod pacijenata sa smrtnim ishodom nešto je češće bila zastupljena 3+ pozitivnost, i to kod 15 od 31 umrlog pacijenta.

Ekspresija Apaf-1 nije imala statistički značaj ni u odnosu na ukupno preživljavanje. Pacijenti kod kojih je Apaf-1 pokazivao 1+ pozitivnost, imali su medijanu preživljavanja 125 meseci. Petogodišnje preživljavanje za ove pacijente je iznosilo 78,6%, desetogodišnje 50,8% a trinaestogodišnje 16,9%. Pacijenti sa 2+ ocenjenom ekspresijom su imali najdužu medijanu preživljavanja u ovoj studiji od 149 meseci. Njihovo

petogodišnje preživljavanje je bilo 80%, posle deset godina 53,3%, a posle trinaest 26,7%. Najkraću medijanu preživljavanja su imali pacijenti sa 3+ ocenjenom ekspresijom i ona je iznosila 60 meseci. Petogodišnje preživljavanje ovih pacijenata je bilo 65%, desetogodišnje 45,8%, da bi na kraju trinaestogodišnjeg perioda praćenja iznosilo 22,9%.

U procesu apoptoze bez obzira na vrstu stimulansa, ključni događaj predstavlja kaskadna reakcija proteolitičke aktivacije enzima kaspaza. Kaspaze, kao što smo već opisali, se mogu podeliti na inicijalne (2, 8, 9, 10) i efektorne (kaspaza 3, 6 i 7) (75). Neki autori su u svojim istraživanjima, prikazali različitu kaspaznu ekspresiju u humanim malignitetima. Imajući u vidu da kaspaze u apoptozi igraju centralnu ulogu, oni smatraju da gubitak kaspazne ekspresije doprinosi sposobnosti maligne ćelije da izbegne apoptozu (82). U skladu sa ovim, smanjena kaspazna ekspresija je povezana sa lošom prognozom i/ili otporom na hemioterapiju kod različitih vrsta tumora, kao što su karcinom jednjaka (83), nesitnoćelijski karcinom pluća (84), meduloblastomi dečjeg uzrasta (85) i drugi. Kaspaza 9 koja učestvuje u unutrašnjem putu apoptoze, kao i kaspaza 3, efektorni enzim apoptoze, u ovoj studiji su imunohistohemijski analizirane u ACC pljuvačnih žlezda.

Naši rezultati pokazuju da tumorske ćelije ACC imaju citoplazmatsku i nuklearnu pozitivnost na kaspazu 9. Sličnu pozitivnost su pokazivale i ćelije Ewing's sarkoma (ES) (129). Za razliku od navedenih rezultata ekspresija kaspaze 9 je bila zastupljena samo u citoplazmi ćelija karcinoma prostate, kao i u ćelijama zdravog tkiva prostate (87).

U našem istraživanju procenu intenziteta ekspresije kaspaze 9 su vršila dva nezavisna patologa, pri čemu je indeks saglasnosti u ocenjivanju bio zadovoljavajući. Najveći broj ispitanika, 54%, je imao 2+ ocenjenu ekspresiju ovog enzima. Jako (3+) izražena ekspresija je bila zastupljena kod 42% ispitanika, a samo tri (6%) ispitanika su imala ekspresiju ocenjenu sa 1+. Intenzitet ekspresije kaspaze 9 u ćelijama ACC se pokazao kao statistički značajan. Sumirajući naše rezultate, a oslanjajući se na rezultate iz literature, povećana ekspresija kaspaze 9 u tumorskim ćelijama ACC pljuvačnih žlezda, ide u prilog indolentnom rastu ovog tumora.

Slično našim rezultatima, visoko ocenjenu ekspresiju kaspaze 9 u najvećem broju slučajeva pokazivale su i ćelije karcinoma kolona. Procenu imunohistohemijskog bojenja su vršila tri nezavisna posmatrača, ocenjujući procenat pozitivnih ćelija skorom od 0 do 4. Od ukupno 126 pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, kaspaza 9 se ekspresovala kod 36% ispitanika u svim tumorskim ćelijama (skor 4), a kod 27% ispitanika je imala pozitivnost od 60% do 100% ćelija. Samo kod 8% tumora, ćelije nisu uopšte pokazivale pozitivnost (skor 0) (79). Jaka ekspresija kaspaze 3 je bila i kod pacijenata sa karcinomom prostate. Ova studija je ispitivala i ekspresiju kaspaze 9 u zdravom tkivu prostate i slučajevima sa intraepitelnom neoplazijom prostate (eng- prostate intraepithelial neoplasia (PIN)) pri čemu je dobijen sličan intenzitet bojenja kao i u ćelijama karcinoma prostate (87). Međutim, Gonzalo Rodríguez-Berriguete BS i saradnici (82), su prikazali da je nivo ekspresije kaspaze 9 manji u ćelijama karcinoma u odnosu na normalno tkivo prostate. Detaljnom analizom broja pozitivnih uzoraka je utvrđeno da je došlo do regresije u ekspresiji kaspaze 9, između zdravog tkiva prostate preko benignih hiperplazija, do uzoraka sa karcinomom prostate. Autori, smatraju da smanjenje ekspresije kaspaze 9 u karcinomu prostate, u odnosu na zdravo tkivo, može biti povezano sa neosetljivošću na apoptozu i stoga doprinosi rastu tumora. Takođe su mišljenja da ovo smanjenje može da bude uključeno u malignu transformaciju ćelija, zbog akumulacije onkogenih mutacija koje bi inače bile eliminisane. Kod pacijenata sa ES, kaspaza 9 se u najvećem broju (66%) slučajeva, za razliku od procene njene ekspresije u ACC pljuvačnih žlezda, slabo ekspresovala (1+). Jaka ekspresija (3+) je bila zastupljena kod 34% ispitanika (86).

Govindarajah V. i saradnicu su ispitivali imonohistohemijsku ekspresiju kaspaze 9 kod 60 pacijentkinja sa adenokarcinomom dojke kod pre- i post-menopauzalnih žena. Radi dobijanja preciznijeg rezultata ocene kaspaza 9 pozitivnih ćelija, kao i u našoj studiji, procenjivala su dva posmatrača. Dobijeni rezultati su pokazali da je najveća ekspresija kaspaze 9 bila u tumorima gradusa I i da je opadala sa povećanjem gradusa tumora. Takođe su uočili da je pozitivnost bila zastupljenija u tumorima koji su se razvijali kod post-menopauzalnih u odnosu na tumore kod pre-menopauzalnih žena. Ovu činjenicu autori objašnjavaju time da su tumori dojke kod pre-menopauzalnih žena agresivnijeg ponašanja u odnosu na tumore dojke kod post-menopauzalnih žena (88)

Da bi se utvrdila mogućnost korišćenja kaspaze 9 kao prognostičkog markera, analizirana je i njena ekspresija u odnosu na kliničko-patološke parametre. Ekspresija kaspaze 9 u ćelijama ACC je imala statističku značajnost u odnosu na pol pacijenata. Kod osoba muškog pola, dominantno je bila zastupljena 2+ pozitivnost, i to kod 89,5% ispitanika. Za razliku od muškog pola, dominantna je bila 3+ pozitivnost tumorskih ćelija (58,1%) kod osoba ženskog pola.

U odnosu na starost pacijenata sa ACC, nije postojala statistička značajnost imunohistohemijske ekspresije kaspaze 9. Prosečna starost ispitanika sa jakom ekspresijom je bila 57,5 godina, a sa umerenom 60 godina, dok je slabo izražena pozitivnost ili je ona nedostajala bila zastupljena kod ispitanika prosečne starosne dobi od 54 godine.

U odnosu na lokalizaciju, tumori parotidne pljuvačne žlezde, malih pljuvačnih žlezda tvrdog nepca i drugih malih pljuvačnih žlezda usne duplje, su uglavnom pokazivali umerenu (2+) kaspaza 9 pozitivnost. Takođe smo prikazali da su ćelije ACC lokalizovanih u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi, najčešće pokazivale visoko ocenjenu imunoreaktivnost (3+) za ovo antitelo.

U odnosu na histološki tip tumora, kribriformni i tubularni oblik, su pokazivali sva tri nivoa kaspaza 9 ekspresije, a kod solidnih tumora nije bio nijedan slučaj sa 1+ ocenjenom pozitivnošću. Kribriformni tumori najčešće su imali, (57,1%), jako (3+) izraženu ekspresija kaspaze 9, dok je kod tubularnih i solidnih dominirala umerena (2+) pozitivnost.

U našem radu nije postojala statistički značajna povezanost između ekspresije kaspaze 9 i preživljavanja obolelih od ACC. Ukupno preživljavanje pacijenta je najduže praćeno trinaest godina. Kaspaza 9 pozitivnost koja je ocenjena sa 1+, je bila prisutna kod 3 pacijenta. Umereno ocenjena ekspresija kaspaza 9 je bila prisutna kod dvadesetsedam pacijenata, čija je medijana preživljavanja iznosila 85 meseci. Posle pete godine praćenja, preživljavanje za ove pacijente je iznosilo 63%, nakon desete 44,4% i na kraju trinaestogodišnjeg perioda 18,5%. Dvadeset pacijenata sa jakom ekspresijom kaspaze 9,

imali su medijanu preživljavanja 119 meseci, pri čemu je posle pete godine bilo 65% živih ispitanika, posle desete 45,8%, a nakon trinaeste 22,9 %.

U literaturi su dosta oskudni podaci o povezanosti ekspresije kaspaze 9 u odnosu na kliničko-patološke parametre malignih tumora. Jedna studija je dokazala da je povišen nivo ekspresije kaspaze 9 pokazivao značajnu povezanost sa metastatskim potencijalom nesitnoćelijskog karcinoma pluća (89). Kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, kaspaza 9 se nije pokazala kao nezavistan prognostički parametar. Međutim, korišćenjem Kaplan–Mejerove analize, pacijenti sa visokom ekspresijom ovog molekula u tumorskim ćelijama, imali su kraće preživljavanje bez znakova bolesti u odnosu na pacijente sa niskom ekspresijom (79). Kao i u našem ispitivanju, ekspresija kaspaze 9 se nije pokazala kao značajan parametar ukupnog preživljavanja kod pacijenata sa ES. Međutim, pacijenti sa nižim nivoom ekspresije kaspaze 9 imali su lošije preživljavanje bez znakova bolesti u odnosu na pacijente sa većim nivoom ekspresije ovog molekula. Stoga autori smatraju da nizak nivo ekspresije kaspaze 9 može indikovati pacijente koji bi najverovatnije imali koristi od tretmana preko receptora smrti i kaspaza 8 posredovanog puta apoptoze (86).

Apoptozni proces zavisi i od aktivnosti egzekutornih kaspaza kao što su kaspaze 3 i 7 (82). Kaspaza 3 se smatra osnovnom efektornom kaspazom u kasakadnom putu i najdirektnije je povezana sa programiranom smrti ćelije (90, 91, 92). Zbog svoje uloge, predloženo je da njena ekspresija označava povećanu osetljivost na apoptozu, odnosno aktiviranje apoptoze ili oba procesa (93). Iako ova kaspaza dovodi do razgradnje proteina unutar ćelije, ona ima i veliku ulogu u patogenezi i terapiji niza humanih tumora, a u nekim slučajevima je korelirala sa njihovim kliničkim karakteristikama (83, 84, 94, 95, 96, 97).

U našoj studiji smo prikazali da se kaspaza 3 u ćelijama ACC pljuvačnih žlezda eksprimovala samo u citoplazmi tumorskih ćelija. Ocenu ove ekspresije su takođe vršila dva nezavisna patologa, kao kod dva predhodna antitela. Mišljenja patologa u proceni imunopozitivnosti kaspaze 3 nisu se slagala samo kod pet slučajeva, tako da je stopa slaganja iznosila 90%.

Slična, citoplazmatska lokalizacija kaspaze 3 utvrđena je i kod papilarnog karcinoma štitne žlezde (98), oralnog tumora granularnih ćelija (99), karcinoma želuca i hroničnog gastritisa (100), karcinoma kolona (75), difuznog krupnoćelijskog B limfoma (101), adenokarcinoma prostate (102).

Za razliku od naših istraživanja ćelije nazofaringealnih karcinoma su pokazivale jedarnu pozitivnost, i to uglavnom one ćelije koje su imale morfološke znake apoptoze (103). Neka istraživanja su dokazala da polovina ćelija malignih tumora nervnih ovojnica (peripheral malignant nerve sheat tumora - MPNSTs) su imali citoplazmatsku i nuklearnu pozitivnost kaspaze 3, a polovina ćelija samo nuklearnu. Isti autori su ukazali na nuklearnu pozitivnost ćelije neurofibroma. Oni takođe navode da je prisustvo citoplazmatskog bojenja i visok nivo ekspresije kaspaze 3, češće povezan sa visokim gradusom tumora i visokim mitotskim indeksom (104). U prilog ovoj tezi idu i rezultati jednog istraživanja koje je obuhvatalo tumore pankreasa, gde je ćelijska lokalizacija kaspaze 3 uticala na biološko ponašanje benignih i malignih neoplazmi. Nuklearna lokalizacija kaspaze 3 je statistički bila značajna za benigne tumore pankreasa, dok je citoplazmatska lokalizacija ovog proteina korelirala sa invazivnošću malignih tumora (105).

Ekspresija kaspaze 3 je najčešće bila ocenjena kao jaka i umerena pozitivnost u ćelijama ACC. Od pedeset ispitanika sa ACC, kod 42% je bila zastupljena 3+ imunopozitivnost, a kod 36% je ocenjena sa 2+. Negativna ili slabo izražena ekspresija (1+) je bila najređe zastupljena, kod 22% ispitanika. Učestalost ispitanika sa različitom ekspresijom kaspaze 3 nije pokazivala statističku značajnost.

Slično našim rezultatima, najveći broj tumorskih ćelija papilarnog karcinoma štitne žlezde, je pokazivao ekspresiju kaspaze 3 (98). Visok afinitet za ovo antitelo su pokazivale i ćelije difuznog krupnoćelijskog B limfoma, kod većine ispitanika (70%) (101). Ovo antitelo je pokazivalo pozitivnost i u najvećem broju slučajeva skvamocelularnog karcinoma jednjaka, gde je dominirala jaka ekspresija (106).

Jaka imunopozitivnost je bila prisutna i kod 62% slučajeva sa meningeomom (107). Autori su primetili da se kaspaza 3 dosta eksprimovala oko polja nekroze u atipičnim

meningeomima. Stoga oni smatraju da je kaspazna aktivacija, naročito aktivacija kaspaze 3, uključena u ishemijsku smrt ćelije.

Za razliku od predhodnih rezultata, Varanić A. (108), je prikazao umerenu i slabu ekspresije kaspaze 3 u 96 slučajeva meningeoma. Takođe, nešto manju ekspresiju kaspaze 3 pokazivale su i ćelije adenokarcinoma prostate, gde je bila zastupljena umerena pozitivnost (102). Umerena ekspresija je bila najzastupljenija i kod pacijenata sa oralnim tumorom granularnih ćelija (99) i u ćelijama karcinoma kolona (109).

Za razliku od naših rezultata, kod glioblastoma, intenzitet ekspresije kaspaze 3 je u 73% slučajeva ocenjena sa 1+, od ukupno 30 ispitanika. Umerena (2+) pozitivnost je bila zastupljena kod 16,6%, a visoka kod 3,33% ispitanika. Autori su u ovom radu ukazali da kaspaza 3 ima učešće u procesu migracije ćelija, na šta ukazuju i drugi autori u svojoj publikaciji (110).

Rezultati ekspresije kaspaze 3 u karcinomima želuca se znatno razlikuju od rezultata našeg istraživanja. Od 48 ispitanih slučajeva karcinoma želuca, kaspaza 3 se ekspresovala samo u 15 slučajeva (14,8%), gde je kod 9 slučajeva bila slaba pozitivnost u ćelijama, a u 6 slučajeva umerena pozitivnost. Ovaj tumor nije pokazivao 3+ imunopozitivnu reakciju. U odnosu na histološke tipove, veću ekspresiju kaspaze 3 su pokazivali slučajevi sa intestinalnim gastričnim karcinomom (52,4%), u odnosu na difuzne gastrične karcinome gde je ova pozitivnost bila zastupljena kod 14,8% slučajeva. Takođe je primećeno da je ekspresija kaspaze 3 bila jako smanjena u tumorskim ćelijama u odnosu na njenu ekspresiju u normalnoj sluzokoži želuca i u slučajevima sa hroničnim gastritisom. Stoga autori smatraju da nishodno regulisana ekspresija kaspaze 3 može biti važan unutrašnji faktor koji omogućava tumorskim ćelijama rezistenciju na apoptozu (100).

U literaturi su prikazani različiti rezultati značaja ekspresije kaspaze 3 u odnosu na kliničko patološke parametre.

Ispitujući ekspresiju kaspaze 3 u odnosu na pol i lokalizaciju kod pacijenata sa malignim i atipičnim meningeomima, nije se pokazala kao značajan statistički faktor (108). Slične rezultate su prikazali i Konstantinidou AE i saradnici (107), pri čemu su u njihovom

ispitivanju bili uključeni i slučajevi benignih meningeoma. S obzirom da je ekspresija kaspaze 3 u ovoj studiji bila veća u atipičnin u odnosu na benigne meningeome, autori su mišljenja da se ova efektorna kaspaza može predložiti kao marker progresije benignih tumorskih ćelija u maligne. Takođe, smatraju da kaspaza 3 može imati prognostičku ulogu u recidiviranju benignih meningeoma. Pacijenti kod kojih su dijagnostikovani benigni meningeomi imali su u preko 50% slučajeva recidive. Na ulogu kaspaze 3 kao prediktora biloškog ponašanja tumora ukazuju i Wilson CT i Robinson AR (111). Oni su u svom radu dokazali da je ekspresija kaspaze 3 više ispoljena u adenomima u odnosu na adenokarcinome bazalnih ćelija pljuvačnih žlezda, i nedvosmisleno zaključuju da je kaspaza 3, pored smanjenja bcl-2 ekspresije, pokazatelj benigne u odnosu na malignu morfologiju.

Imunohistohemijska ekspresija kaspaze 3 u ćelijama difuznog krupnoćelijskog B limfoma, takođe nije imala statističkog značaja u odnosu na pol i starost pacijenata kao ni u odnosu na stadijum bolesti (101). Slični rezultati su dobijeni kod pacijenata sa karcinomom kolona. Međutim, u ovoj studiji je kaspaza 3 pokazala statističku značajnost u odnosu na metastaziranje i recidiviranje ovog tumora. Pacijenti kod kojih su bile prisutne metastaze u jetri i kod kojih su se javili recidivi, imali su značajan gubitak ekspresije kaspaze 3 (109). Oudejans JJ i saradnici (103) su pokazali da je potpuno odsustvo aktivnosti kaspaze 3 u biopsijskom materijalu pacijenata sa nazofaringealnim karcinomom, snažno povezano sa veoma slabom kliničkom slikom.

Statističku značajnost nije pokazivala ekspresija kaspaze 3 ni u odnosu na godine, stadijum, prisustvo metastaza u limfnim čvorovima i histološki tip tumora kod pacijenata sa planocelularnim karcinomom jednjaka (106). Nije imala značaja ni u odnosu na faktore koji su pokazatelji agresivnog ponašanja papilarnih karcinoma štitne žlezde, kao što su kapsularna i vaskularna invazija (98).

U našoj studiji rezultati ekspresije kaspaze 3, nisu bili u korelaciji sa ispitivanim kliničko-patološkim parametrima (pol, starost, lokalizaciju i histološki tip tumora, ishod bolesti i ukupno preživljavanje) obolelih sa ACC. Tumori lokalizovani u submandibularnoj i malim pljuvačnim žlezdama tvrdog nepca su najčešće imali zastupljenu jaku ekspresiji

kaspaze 3. Kod parotidno lokalizovanih tumora nije bilo slučajeva sa negativnom odnosno slabom ekspresijom ove kaspaze, a što je pored umerene ekspresije dominiralo kod tumora malih pljuvačnih žlezda drugih lokalizacija u usnoj duplji. U odnosu na histološki tip, različiti nivoi ekspresije kaspaze 3 su bili skoro ujednačeni kod kribriformnih i solidnih tumora. Kod tumora sa tubularnom mikroskopskom slikom najčešće je ocenjena kao jako izražena.

Značajnost ekspresije kaspaze 3 u odnosu na ishod bolesti u literaturi nisu u saglasnosti kod humanih tumora. Naši rezultati ukazuju da kod više od polovine pacijenata sa ACC, a koji su bili živi na kraju perioda praćenja, bila je izražena jaka pozitivnost kaspaze 3. Kod pacijenata sa smrtnim ishodom je najčešće bila umerena ekspresija. I u pogledu preživljavanja pacijenata ekspresija kaspaze 3 u ACC, nije pokazala statistički značaj. Najduže desetogodišnje preživljavanje (61,9%) su imali pacijenti sa jako izraženom ekspresijom kaspaze 3. Najkraće preživljavanje (22,7%), za isti period praćenja, je bilo kod pacijenata sa slabom ili negativnom ekspresijom, dok je kod pacijenta sa umerenom pozitivnošću ono iznosilo 33%.

Slično našim rezultatima, ekspresija kaspaze 3 kod pacijenata sa palnocelularnim karcinomom jezika (112), i kod ispitanika sa dijagnostikovanim MPNSTs (104), takođe nije pokazivala značajnost u odnosu na preživljavanje. Kod pacijenata sa malignim i atipičnim meningeomima, kod kojih je veća ekspresija kaspaze 3 korelirala sa većim gradusom tumora, takođe se nije pokazala kao značajan parametar u odnosu na ukupno preživljavanje (108).

Za razliku od ovih rezultata, u drugoj studiji dobijeni su podaci o ekspresiji kaspaze 3 u meningioma. Univarijantna analiza je pokazala znatno kraće vreme preživljavanja bez znakova bolesti za pacijente kod kojih se eksprimovala kaspaza 3 u odnosu na pacijente bez njene ekspresije (107). Takođe se ekspresija kaspaze 3, pokazala kao relevantan prognostički faktor u proceni preživljavanja pacijenata sa planocelularnim karcinomom jednjaka. Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa pozitivnim izrazom kaspaze 3 je bilo 25%, dok pacijenti sa negativnom kaspazom 3 su imali petogodišnje preživljavanje 6% (106).

U našoj studiji, smo takođe vršili i korelaciju intenziteta ekspresije Apaf-1, kaspaze 9 i 3 u ACC pljuvačnih žlezda. U dostupnoj literaturi nema podataka o korelaciji navedenih markera unutrašnjeg puta apoptoze. Naši rezultati su pokazali statistički značajnu korelaciju ekspresije kaspaze 3 i Apaf-1. Mi smatramo da ovi markeri imaju značajnu ulogu u patogenetskim mehanizmima ACC, i da zajedno sa kaspazom 9, predstavljaju predmet budućih istraživanja, u cilju boljeg razumevanja razvoja ovog tumora i postizanja što boljeg terapijskog odgovora.

Koristeći imunohistohemijsku analizu mi smo pokušali da utvrdimo koji protein unutrašnjeg puta apoptoze, može biti nezavistan prognostički marker u ACC pljuvačnih žlezda. Univarijantnom Koksovom regresionom analizom je dokazano da Apaf-1, kaspaza 9 i 3 nisu prediktori preživljavanja kod pacijenata sa ovim tumorom. Ovde treba naglasiti da je univarijantna Koksova regresiona analiza, pokazala da samo starost pacijenata može biti prediktor slabijeg preživljavanja obolelih od ACC, od svih posmatranih parametara. Obzirom da je samo jedan faktor u univarijantnom modelu izdvojen kao statistički značajan, multivarijantni regresioni model nije bilo moguće formirati.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata u ovom istraživanju došli smo do sledećih zaključaka:

- U adenoidnom cističnom karcinomu ekspresija Apaf-1 nije u korelaciji sa kliničko-patološkim parametrima (pol, starost, lokalizacija, histološki tip tumora, ishod bolesti i ukupno preživljavanje) i zato smatramo da on ne može biti samostalni prognostički faktor.
- Utvrđena je pozitivna korelacija ekspresije kaspaze 9 u odnosu na pol pacijenata sa adenoidnim cističnim karcinomom pljuvačnih žlezda. Značajno izraženija ekspresija kaspaze 9 zabeležena je kod obolelih osoba ženskog pola sa jakim intenzitetom, dok je kod ispitanika muškog pola najveći broj obolelih imao umereno izraženu ekspresiju.
- Različiti nivoi intenziteta ekspresije kaspaze 3 se nisu pokazali kao statistički značajan faktor u odnosu na ispitivane kliničko-patološke parametre pacijenata obolelih od adenoidnog cističnog karcinoma pljuvačnih žlezda.
- Prema rezultatima univarijantne Koksove regresione analize samo se starost pacijenata izdvojila kao prediktor preživljavanja posmatrane grupe obolelih sa adenoidnim cističnim karcinomom.

7. LITERATURA

1. Lukšić I, Virag M, Manojlović S, et al. Salivary gland tumours: 25 years of experience from a single institution in Croatia. *J Craniomaxillofac Surg* 2012; 40(3):75-81.
2. Wenig MB. Atlas of head and neck pathology. Philadelphia, Elsevier Saunders 2008; pp 631.
3. Speight PM, Barret AW. Salivary gland tumours. *Oral Dis* 2002; 8(5):229-240.
4. Barnes L. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005; pp. 430.
5. Licitra L, Grandi C, Prott FJ, et al. Major and minor salivary glands tumours. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 45(2):215–225.
6. Speight P M, Barrett AW. Salivary gland tumours. *Oral Dis* 2002; 8(5):229–240.
7. To VS, Chan JY, Tsang RK, et al. Review of salivary gland neoplasms. *ISRN Otolaryngol* 2012; 16:872982.
8. Loyola AM, De Araujo VC, De Sousa SO. et al. Minor salivary gland tumours. A retrospective study of 164 cases in a Brazilian population. *Eur J Cancer B Oral Ocol* 1995; 31(3):197–201.
9. Arshad AR. Parotid swellings: report of 110 consecutive cases. *Med J Malaysia* 1998; 53(4):417–422.
10. Sun EC, Curtis R, Melbye M, et al. Salivary gland cancer in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8(12):1095–1100.
11. Dong C, Hemminki K. Second primary neoplasms among 53 159 haemato-lymphoproliferativ malignancy patients in Sweden, 1958–1996: a search for common mechanisms. *Br J Cancer* 2001; 85(7):997–1005.
12. Milano A, Longo F, Basile M, et al. Recent advances in the treatment of salivary gland cancers: emphasis on molecular targeted therapy. *Oral Oncol* 2007; 43:729-734.
13. Eveson JW, Cawson RA. Salivary gland tumours: a review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *J Pathol* 1985; 146(1):51-58.
14. Barnes L, Eveson W, Reichart P, et al. Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press: Lyon, France 2005; 210-242.

15. Kokemueller H, Swennen G, Brueggemann N, et al. Epithelial malignancies of the salivary glands clinical experience of a single institution – a review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33(5):423-32.
16. Kokmueller H, Brueggemann N, Swennen G, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands – clinical review of 42 cases. *Oral Oncol* 2005; 42:2-10.
17. Wan Weert S, Bloemenab E, Waal VDI, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: A single-center analysis of 105 consecutive cases over a 30-year period. *Oral Oncol* 2013; 49(8):824–829.
18. Stell PM. Adenoid cystic carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1986; 11(4):267-291.
19. Bradley JP, Opip C. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12(2):127-132.
20. Kokemueller H, Eckardt A, Brachvogel P, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck – a 20 years experience. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:25–31.
21. Spiro RH, Huvos AG, Strong EW. Adenoid cystic carcinoma of salivary origin. A clinicopathologic study of 242 cases. *Am J Surg* 1974; 128(4):512–520.
22. Muenschera A, Diegela T, Jaehnea M, et al. Benign and malignant salivary gland diseases in children: A retrospective study of 549 cases from the Salivary Gland Registry, Hamburg. *Auris Nasus Larynx* 2009; 36(3):326–331.
23. Kim KH, Sung MW, Chung PS, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120(7):721–726.
24. Nascimento AG, Amaral ALP, Prado LAF, et al. Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. A study of 61 cases with clinicopathologic correlation. *Cancer* 1986; 15;57(2):312–319.
25. Da Cruz Perez DE, Pires FR, Alves FA, et al. Salivary glands tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty-three cases. *Int J Pediatric Otorhinolaryngol* 2004; 68(7):895–902.
26. Van der Wal JE, Becking AG, Snow GB, et al. Distant metastases of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands and the value of diagnostic examinations during follow-up. *Head Neck* 2002; 24(8):779–783.
27. Khan AJ, Di Giovanna MP, Ross DA, et al. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. *Int J Cancer* 2001; 96(3):149–158.

28. Phuchareon J, Ohta Y, Woo MJ, et al. Genetic profiling reveals cross-contamination and mis identification of 6 adenoid cystic carcinoma. Cell lines: ACC2, ACC3, ACCM, ACCNS, ACCS and CAC2. PLoS ONE 2009; 4(6): e6040.
29. Coca-Pelaz A , Rodrigo PJ, Bradley JP, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck – An update. Oral Oncol 2015; 51(7):652–661.
30. Gao M, Hao Y, Huang XM, et al. Clinicopathological study of distant metastases of salivary adenoid cystic carcinoma. Int. J Oral Maxillofac Surg 2013; 42(8):923–928.
31. Khan JA, Di Giovanna MP, Ross DA, et al. Adenoid cystic carcinoma: A retrospective clinical review. Int J Cancer 2001; 20; 96(3):149-158.
32. Ko YH, Roh YS, Won HS, et al. Prognostic significance of nuclear surviving expression in resected adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Head Neck Oncol 2010; 30;22:30.
33. Jia L, Esguerra LR, Tang X, et al. Prognostic value of apoptosis and apoptosis-associated proteins in salivary gland adenoid cystic carcinoma. Pathol Int 2004; 54(4):217-223.
34. Da Cruz Perez ED, Alves FA, Nishimoto IN, et al. Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma. Oral Oncol 2006; 42:139–146.
35. Shailesh M, Gondivkara Amol R, Gadbailb Revant C et al. Adenoid cystic carcinoma: A rare clinical entity and literature review. Oral Oncology 2011; 47:231–236.
36. Westra WH. The surgical pathology of salivary gland neoplasms. Otolaryngol Clin North Am 1999; 32(5):919-943.
37. Shingaki S, Saito R, Kawasaki T, et al. Adenoid cystic carcinoma of the major and minor salivary glands. A clinicopathological study of 17 cases. J Maxillofac Surg 1986; 14(1):53–56.
38. Spiro RH. Distant metastases in adenoid cystic carcinoma of salivary. Am J Surg 1997; 174(5):495–498.
39. Chummun S, McLean NR, Kelly CG, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Br J Plast Surg 2001; 54(6):476–480.
40. Fordice J, Kershaw C, El-Naggar A, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: predictors of morbidity and mortality. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1999; 125(2):149–152.

41. Perez DE, Alves FA, Nishimoto IN, et al. Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol* 2006; 422:139–146.
42. Budd GT, Groppe CW. Adenoid cystic carcinoma of the salivary gland: sustained complete response to chemotherapy. *Cancer* 1983; 51(4):589–590.
43. Sung MW, Kim KH, Kim JW, et al. Clinicopathologic predictors and impact of distant metastasis from adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129(11):1193–1197.
44. Bianchi B, Copelli C, Cocchi R, et al. Adenoid cystic carcinoma of intraoral minor salivary glands. *Oral Oncol* 2008; 44(11):1026–1031.
45. Bhayani MK, Yener M, El-Naggar A, et al. Prognosis and risk factors for early-stage adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Cancer* 2012; 118(11):2872–2878.
46. Matsuba HM, Spector GJ, Simpson JR, et al. Adenoid cystic salivary gland carcinoma: a histopathologic review of treatment failure patterns. *Cancer* 1986; 57(3):519–524.
47. Huang MX, Ma DQ, Sun KH, et al. Factors influencing survival rate in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997; 26(6):435–439.
48. Perzin KH, Gullane P, Clairmont AC. Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands: a correlation of histologic features and clinical course. *Cancer* 1978; 42(1):265–282.
49. Goldblatt LI, Ellis GL. Salivary gland tumors of the tongue: analysis of 55 new cases and review of the literature. *Cancer* 1987; 60(1):74–81.
50. Cohen AN, Damrose EJ, Huang RY, et al. Adenoid cystic carcinoma of the submandibular gland: a 35-year review. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131(6):994–1000.
51. Spiro RH, Huvos AG. Stage means more than grade in adenoid cystic carcinoma. *Am J Surg* 1992; 164(6):623–623.
52. Garden AS, Weber RS, Morrison WH, et al. The influence of positive margins and nerve invasion in adenoid cystic carcinoma of the head and neck treated with surgery and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32(3):619–626.

53. Amit M, Binenbaum Y, Trejo-Leider L, et al. International collaborative validation of intraneural invasion as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2015; 37(7):1038-1045.
54. Kerr JFR, Wyllie AH, Curriet AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239
55. Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30:87-101.
56. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 2004; 19:124-128.
57. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005; 12(2):1463-1467.
58. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(3):231–224.
59. Vogler M, Dinsdale D, Dyer MJ, et al. Bcl-2 inhibitors: Small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell Death Differ* 2009;16:360–367.
60. McIlwain RD, Berger T, Mak WT. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5:a008656
61. Salvesen SG, Dixit MV. Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997; 91: 443–446.
62. Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, et al. Caspases and cancer: Mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp Oncol* 2004; 26(2):82–97.
63. Yang J, Xuesong L, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275:1129–1132.
64. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death . *Annu Rev Immunol* 1998; 16:395-419.
65. Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813:532-539.
66. Rahman M, Nakayama K, Rahman MT, et al. Clinicopathologic and biological analysis of PIK3CA mutation in ovarian clear cell carcinoma. *Hum Pathol* 2012; 43(12):2197–2206

67. Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. 2000; 288(5468):1053-1058.
68. Bratton SB, Salvesen SG. Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* 2010; 123:3209–3214.
69. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding and activation. *Mol Cell* 2002; 9:423–432.
70. Bradley JP, McGurk M. Incidence of salivary gland neoplasms in a defined UK population. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2013; 51(5):399–403.
71. Chen MA, Kara Bucci M, Weinberg V, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck treated by surgery with or without postoperative radiation therapy: prognostic features of recurrence. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2006; 66(1):152–159.
72. Laurie SA, Ho AL, Fury MG, et al. Systemic therapy in the management of metastatic or locally recurrent adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a systematic review. *Lancet Oncol* 2011; 12(8):815–824.
73. Armstrong JG, Harrison LG, Spiro RH, et al. The indications for elective treatment of the neck in cancer of the major salivary glands. *Cancer* 1992; 69(3):615.
74. Žlender V. Apoptoza – programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol* 2003; 54:267–274.
75. Chowdhury I, Tharakan B, Bhati GK. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revised. *Cell Mol Biol Lett* 2006; 11(4):506–525.
76. Dai DL, Martinka M, Bush JA, et al. Reduced Apaf-1 expression in human cutaneous melanomas. *Br J Cancer* 2004; 91(6):1089 – 1095.
77. Cornelia Leoa T, Richtera C, Hornb LC, et al. Expression of Apaf-1 in cervical cancer correlates with lymph node metastasis but not with intratumoral hypoxia. *Gynecol Oncol* 2005; 97(2): 602–606.
78. Zlobeca I, Minoia P, Bakera K, et al. Loss of APAF-1 expression is associated with tumour progression and adverse prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2007; 43(6):1101 –1107.

79. Straäter J, Herter I, Merkel G, et al. Expression and prognostic significance of APAF-1, caspase-8 and caspase-9 in stage II/III colon carcinoma: caspase-8 and caspase-9 is associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 2010; 127(4):873–880.
80. Paik SS, Jang KS, Song YS, et al. Reduced expression of Apaf-1 in colorectal adenocarcinoma correlates with tumor progression and aggressive phenotype. *Ann Sur Oncol* 2007; 14(12):3453–3459.
81. Vander Poorten VLM, Balm AJM, Hilgers FJM, et al. The development of a prognostic score for patients with parotid carcinoma. *Cancer* 1999; 85(9):2057–2067.
82. Gonzalo Rodríguez-Berriguete BS, Laura Galvis BS, Benito F, et al. Immunoreactivity to caspase-3, caspase-7, caspase-8 and caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors. *Hum Path* 2012; 43(2):229–237.
83. Hsia JY, Chen CY, Chen JT, et al. Prognostic significance of caspase-3 expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29(1):44-8.
84. Takata T, Tanaka F, Yamada T, et al. Clinical significance of caspase-3 expression in pathologic-stage I, nonsmall-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2001; 96:54-60.
85. Pingoud-Meier C, Lang D, Janss AJ, et al. Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(17):6401-6409.
86. Brownhill S, Cohen D, Burchill S. Proliferation Index: A continuous model to predict prognosis in patients with tumours of the Ewing's Sarcoma Family. *PLoS One*. 2014; 9(8):e104106.
87. Yoo JN, Kim SM, Park SW, et al. Expression analysis of caspase-6, caspase-9 and BNIP3 in prostate cancer. *Tumori* 2010; 96(1):138-142.
88. Vinothini G, Murugan SR, Nagini S. Mitochondria-mediated apoptosis in patients with adenocarcinoma of the breast: Correlation with histological grade and menopausal status. *The Breast* 2011; 20(1):86-92.
89. Papay J, Krenacs T, Moldvay J, et al. Immunophenotypic profiling of nonsmall cell lung cancer progression using the tissue microarray approach. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15(1):19–30.

90. Lima RT, Busacca S, Almeida GM. Micro RNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. *Eur J Cancer* 2011; 47(2):163–174.
91. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376(6535):37-43.
92. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87(2):171.
93. Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 1996; 10(5):587-597.
94. Estrov Z, Thall PF, Talpaz M, et al. Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1998; 92(9):3090-3097.
95. Nakopoulou L, Alexandrou P, Stefanaki K, et al. Immunohistochemical expression of caspase-3 as an adverse indicator of the clinical outcome in human breast cancer. *Pathobiology* 2001; 69(5):266-273.
96. Li YH, Wang C, Meng K, et al. Influence of surviving and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10(13):1984-1988.
97. De Oca J, Azuara D, Sanchez-Santos R, et al. Caspase-3 activity, response to chemotherapy and clinical outcome in patients with colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23(1):21-27.
98. Saffara H, Saniia S, Emamia B, et al. Evaluation of MMP2 and Caspase-3 expression in 107 cases of papillary thyroid carcinoma and its association with prognostic factors. *Pathol Res Prac* 2013; 209(3):195–199.
99. Chrysomali E, Nikitakis GN, Tosios K, et al. Immunohistochemical evaluation of cell proliferation antigen Ki-67 and apoptosis-related proteins Bcl-2 and caspase-3 in oral granular cell tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(5):566-572.
100. Sun Y, Chen YX, Liu J, et al. Differential caspase-3 expression in noncancerous, premalignant and cancer tissues of stomach and its clinical implication. *Cancer Detec Prev* 2006; 30(2):168–173
101. Donoghue S, Baden SH, Lauder I, et al. Immunohistochemical localization of Caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. *Cancer Res* 1999; 59(20):5386-5391.

102. Ummani R, Lehnigk U, Zimmermann U, et al. Immunohistochemical expression of caspase-1 and -9, uncleaved caspase-3 and -6, cleaved caspase-3 and -6 as well as Bcl-2 in benign epithelium and cancer of the prostate. *Exp Ther Med* 2010; 1(1):47-52.
103. Oudejans JJ, Harijadi A, Cillessen AGMS, et al. Absence of caspase 3 activation in neoplastic cells of nasopharyngeal carcinoma biopsies predicts rapid fatal outcome. *Mod Pathol* 2005; 18(7):877–885.
104. Cunha SK, Caruso CA, Faria AP, et al. Evaluation of Bcl-2, Bcl-x and cleaved caspase-3 in Malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas. *An Acad Bras Scienc* 2013; 85(4):1497-1511
105. Satoh K, Kaneko K, Hirota M, et al. The pattern of PP32/caspase-3 expression reflects the biological behavior of the human pancreatic duct cell tumors. *Pancreas* 2000; 21(4):352-357.
106. Hsia JY, ChenCY, JChen TJ, et al. Prognostic significance of caspase-3 expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29(1) 44-48.
107. Konstantinidou A E, Givalos N, Gakiopoulou H, et al. Caspase-3 immunohistochemical expression is a marker of apoptosis, increased grade and early recurrence in intracranial meningiomas. *Apoptosis* 2007; 12(4):695–705.
108. Vranic A. Caspase-3 and survivin expression in primary atypical and malignant meningiomas. *ISRN Neurosci* 2013, 013:626290.
109. Shamsa MT, Atwaa MM, Shamsb EM. Negative correlation between caspase-3 and COX-2 expression in colon cancer: an immunohistochemical study. *Egyptian Journal of Pathology* 2012;1687-4277
110. Zarnescu O, Brehar FM, Chivu M, et al. Immunohistochemical localization of caspase-3, caspase-9 and Bax in U87 glioblastoma xenografts. *J Mol Hist* 2008; 39(6):561-569.
111. Wilson TC, Robinson RA. Basal cell adenocarcinoma and basal cell adenoma of the salivary glands: A clinicopathological review of seventy tumors with comparison of morphologic features and growth control indices. *Head Neck Pathol* 2015; 9(2):205–213.

112. Andressakis D, Lazaris AC, Tsiambas E, et al. Evaluation of caspase-3 and caspase-8 deregulation in tongue squamous cell carcinoma, based on immunohistochemistry and computerised image analysis. *J Laryngol Otol* 2008; 122(11):1213–1218.

BIOGRAFIJA

Dožič dr Branko rođen je u Kolašinu 02.12.1968. godine. Osnovnu i srednju školu je završio u Podgorici. Medicinski fakultet u Beogradu upisao je 1990. godine a završio 1997.godine sa prosečnom ocenom 8.66. Obavezan lekarski staž obavlja u Studentskoj poliklinici u Beogradu, a Državni ispit polaže 1998. godine.

Od 2000. godine radi na Stomatološkom fakultetu, gde je 2013. godine reizabran u zvanje asistenta za naučnu oblast Bazične stomatološke nauke – nastavni predmet Opšta i oralna patologija.

Magistarsku tezu pod nazivom „Ekspresija Ki 67, p53 i EGFR u mukoepidermoidnim karcinomima pljuvačnih žlezda u funkciji kliničko patoloških parametara i lokalizacije“ odbranio je 01.12.2006.godine.

Specijalistički ispit iz Patologije je položio na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu u junu 2008.godine.

Do sada ima objavljeno dvadesetšest radova (šest radova in ekstenzo - čiji spisak je priložen uz biografiju), a poseduje i sertifikate o učešćima na kongresima i edukativnim kursevima.

Koautor je Monografije od nacionalnog značaja pod nazivom „Pljuvačka i oralno zdravlje“ - Zavod za udžbenike . Beograd, 2009.god.

Član je Udruženja patologa Srbije i Lekarske komore Srbije koja mu je i dodelila licencu za rad u zdravstvu.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Branko S. Dožić

broj upisa _____

Izjavljujem

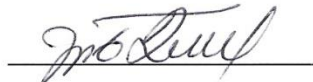
da je doktorska disertacija pod naslovom

"Imunohistohemijska analiza i prognostički značaj markera unutrašnjeg puta apoptoze u adenoidnom cističnom karcinomu pljuvačnih žlezda"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, **1.10.2015. god.**



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Branko Dožić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada **"Imunohistohemijska analiza i prognostički značaj markera unutrašnjeg puta apoptoze u adenoidnom cističnom karcinomu pljuvačnih žlezda"**

Mentor Prof. dr Ivan Boričić

Potpisani Branko Dožić

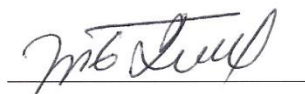
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.10.2015. god.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“Imunohistohemijska analiza i prognostički značaj markera unutrašnjeg puta apoptoze u adenoidnom cističnom karcinomu pljuvačnih žlezda”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

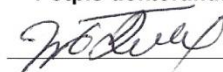
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 01.10.2015.god.

Potpis doktoranda



1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.