



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

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

Кључне речи :

Карцином ларинкса, хронични ларингитис, имунохистохемија, cyclin D1, FGF3, p16, p21

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак:

Планоцелуларни карцином ларинкса представља дијагностички и терапијски проблем. Од свих малигних болести људског организма чини 2%, а од свих карцинома главе и врата 20%. Клинички оториноларинголошки, ларингомикроскопски, патохистолошки преглед, ултразвучни преглед врата и патохистолошки преглед биоптираног ткива су стандарди у дијагностици. У светској литератури као саставни део детекције карцинома ларинкса, поред поменутих, незаобилазна је и имунохистохемијска анализа на појединачни или групу онкогена и антионкогена. CCND1 ген или CyclinD-1.

Ћелијску пролиферацију на специфичним нивоима ћелијског циклуса контролишу различити комплекси протеин киназе. Комплекси се састоје од каталитичке подјединице удружене са специфичном регулаторном подјединицом за формирање активне киназе. FGF3 или INT2. Фибробластни фактори раста (FGF's) сачињавају фамилију повезаних протеина од 16 до 18 кДа који контролишу нормалан раст и диференцијацију мезенхималног, епителијалног и неуроектодермалног ћелијског типа. CDKN2A или p16INK4. Фамилија регулатора ћелијског циклуса означених као „митотски инхибитори“ игра главну улогу у регулацији напредовања кроз ћелијски циклус.

Ови протеини се везују за циклин зависне киназе и инхибишу каталитичку активност Cdk-циклин комплекса. CDKN1A или p21 (WAF1). Припада породици регулатора ћелијског циклуса названи циклин зависни инхибитори киназе (CDK's) који се везују за комплекс циклин-CDK и узрокују прекид ћелијског циклуса у G' фази. p21 (WAF1) је нисходни регулатор тумор супресорског гена p53 и инхибира CDK 2 и 4.



Циљ истраживања:

1. Циљ истраживања је утврдити клинички значај маркера cyclin D-1, FGF3, p16 и p21 код планоцелуларног карцинома ларинкса и хроничног ларингитиса у односу на анатомски субрегион ларинкса, клинички оториноларинголошки преглед, ларингомикроскопски преглед, патохистолошки и ултразвучни преглед врата, TNM класификацију и стадијум малигне болести.
2. Алтернативни циљ истраживања је установити сет тумор маркера за рано откривање планоцелуларног карцинома ларинкса код пацијената са хроничним ларингитисом.

Актуелност истраживања

Из до сада познате литературе се не могу издвојити маркери онкогенезе специфични за планоцелуларни карцином ларинкса, као што је то код карцинома простате, плућа, колоне, дојке... Чињеница је да планоцелуларни карцином ларинкса представља 20% свих карцинома главе и врата, па према томе и велики дијагностички и терапијски проблем.

Посебан проблем представља дијагностиковање окултних метастаза на врату у клинички несигнификантним односно непалпабилним лимфонодусима на врату. Супраглотис, глотис и субглотис као ларингеални субрегиони имају различито ембриолошко порекло због чега различито експримирају поједине онкогенетске маркере. Маркери онкогенезе код планоцелуларног карцинома ларинкса имају променљив ниво експресије у зависности од TNM класификације као и стадијума малигне болести. Дисплазије ларингеалног епитела код хроничног ларингитиса су преканцерозне лезије али је мало истраживања у до сада познатој литератури које би исте повезало са степеном експресије CyclinD1, FGF3, p16 и p21. Хистолошки градус, нуклеарни градус, присуство некрозе у карциномском ткиву, повезаност са лимфом, крвном и перинеуралном инвазијом је такође од интереса у избору тераписког модуса и прогнози.

У досадашњим истраживањима није било свеобухватних испитивања ових маркера у односу на анатомски субрегион ларинкса, клинички оториноларинголошки преглед, ларингомикроскопски преглед, патохистолошки преглед, TNM класификацију, стадијум малигне болести и ултразвучни налаз секундарних депозита на врату.

Предмет и опис истраживања, задаци, методологија, очекивани резултати

Циљ истраживања је утврдити клинички значај маркера cyclin D-1, FGF3, p16 и p21 код планоцелуларног карцинома ларинкса и хроничног ларингитиса у односу на анатомски субрегион ларинкса, клинички оториноларинголошки преглед, ларингомикроскопски преглед, патохистолошки и ултразвучни преглед врата, TNM класификацију и стадијум малигне



болести. Алтернативни циљ истраживања је установити сет тумор маркера за рано откривање планоцелуларног карцинома ларинкса код пацијената са хроничним ларингитисом.

У овој клиничкој ретроспективној студији биће обухваћено 100 (N=100) пацијената лечених на Клиници за оториноларингологију и максиларнофацијалну хирургију Клиничког центра у Крагујевцу од 2000. до 2005. године. Од овог броја радну групу ће чинити 50 пацијената лечених због хроничног ларингитиса (N1=50), а контролну групу 50 пацијената лечених због планоцелуларног карцинома ларинкса (N2=50). Код свих пацијената је урађен клинички оториноларинголошки и ларингомикроскопски преглед са узимањем биопсије, ултразвучни преглед врата, патохистолошки преглед са одређивањем хистолошког и нуклеарног градуса, TNM класификација и класификација према стадијуму малигне болести код карцинома ларинкса, односно одређивање степена дисплазије код хроничног ларингитиса. Исечци из ларинкса добијени у ларингомикроскопској техници се упућују у Центар за патологију Клиничког центра у Крагујевцу. Депарафинишу применом ксилола и сукцесивном изменом алкохола доводе до најблажег раствора (100%, 96%, 70%). Примењују се следећа моноклонска антитела: *cyclin D-1*, *FGF3*, *p16* и *p21*. Исечци омогућују микроскопским прегледом постављање дефинитивне патохистолошке дијагнозе, одређивање хистолошког и нуклеарног градуса, одређивање митотског индекса, процену инвазивности. Применом одговарајућих моноклонских антитела, специфичних за одређене врсте рецептора локализоване у једру, цитоплазми или на мембрани малигне ћелије, могућа је визуализација комплекса антиген-антитело, а самим тим и одређивање броја ћелија које су експримирале туморски антиген, као и ниво те експресије. Вредности експресије се одређују Х скором, изражавају процентуално на најмање 100, а оптимално 500, преко микрометарске мрежице, избројаних туморских ћелија, са коначним сврставањем нивоа експресије у четири групе: негативна (-), слабо позитивна (+), средње позитивна (++) и јако позитивна (+++). Код добијених података се одређују: сензитивност, специфичност, позитивна предиктивна вредност, негативна предиктивна вредност, пре и пост-тест вероватноћа, користи се Крускал Волис, Фишеров тест тачне вероватноће а употребиће се и други тестови у зависности од природе добијених резултата из статистичког пакета „SPSS 10.0 for Windows“. Резултати статистичких тестова биће приказани табеларно и графички.

Од ове студије се очекује да покаже да вредности маркера *cyclin D-1*, *FGF3*, *p16* и *p21* значајно зависе од ембриолошког порекла субрегиона ларинкса код пацијената оболелих од планоцелуларног карцинома ларинкса и хроничног ларингитиса. Експресија наведених маркера ће вероватно бити значајно повезана са клиничким оториноларинголошким налазом, ларингомикроскопским налазом, патохистолошким и ултразвучним налазом, степеном дисплазије код хроничног ларингитиса, TNM класификацијом и стадијумом малигне болести. Вредности експресије маркера су значајно измењене уколико је већи степен дисплазије епитела код хроничног ларингитиса.

Значај истраживања

Статус пацијената са негативним клиничким и патохистолошким налазом у смислу малигнитета код постојања планоцелуларног карцинома ларинкса и/или метастаза на врату, и дисплазије ларингеалног епитела са истовременим постојањем значајно измењених вредности



наведених маркера може да пружи основ да циљано лечење започне и пре позитивне патохистолошке индентификације карцинома ларингеалног епитела.

Промењене вредности онкогена и антионкогена имале би већи онколошки значај од негативног патохистолошког налаза, који за сада представља „златни стандард“ у дијагностици и праћењу оболелих од планоцелуларног карцинома ларинкса.

Дијагностика ће бити прецизнија зато што се одвија на нивоу мањег броја захваћених ћелија што смањује и величину и мутилантност хируршког захвата.

Руководилац пројекта:

асс. Стеван Стојановић

Главни истраживач:

асс. Стеван Стојановић

Ангажовани истраживачи:

доц. др Дејан Баскић

доц. др Љиљана Ердевички

доц. др Бранислав Белић

доц. др Слободан Милисављевић

асс. Слободанка Митровић

асс. Гордана Радосављевић