



Универзитет у Крагујевцу
Факултет медицинских наука

Миљан М. Фолић

УТИЦАЈ ПОЛИМОРФИЗАМА Р582S И А588Т ГЕНА ЗА
HIF-1 α НА ЕКСПРЕСИЈУ ПРОТЕИНА HIF-1 α И VEGF У
ПЛАНОЦЕЛУЛАРНИМ КАРЦИНОМИМА ГЛАВЕ И ВРАТА

Докторска дисертација

Крагујевац, 2014.

*Душану,
Стефану и
Милени*

Ова докторска дисертација је настала као резултат оригиналног ауторског истраживања у области планоцелуларних карцинома главе и врата. У њеном стварању изузетну улогу имала је стручна, и свака друга помоћ поштованих колега, породице и пријатеља.

Посебну захвалност дугујем ментору, проф. др Војку Ђукићу, на стрпљењу, саветима, стручној помоћи и колегијалној подршци, посебно у деловима рада у којима су постојале бројне дилеме и у којима смо заједно трагали за правим одговорима.

Искрену захвалност дугујем проф. др Светозару Дамјановићу, проф. др Вери Тодоровић, доц. др Нели Пушкаш, проф. др Небојши Арсенијевићу и проф. др Јовици Миловановићу због стручних и добронамерних савета и потпуне посвећености сваком делу научног истраживања.

Захваљујем се Наташи Ракић и Снежани Адамовић из Патохистолошке лабораторије Клинике за оториноларингологију и максилофацијалну хирургију и колегама из Генетске лабораторије Клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма Клиничког центра Србије на свесрдној помоћи.

Најзад, али никако на крају, ова дисертација је писани траг искрене љубави према супрузи Милени и нашим синовима Душану и Стефану. Захваљујем се својим и Милениним родитељима, као и брату Марку, који су у сваком тренутку подржавали моју амбицију и нису јој дозвољавали да ни за тренутак буде мања.

САДРЖАЈ

1. УВОД	6
1. 1. Планделуларни карциноми главе и врата	6
1. 2. Епидемиолошке карактеристике планделуларних карцинома главе и врата	8
1. 3. Фактори ризика за настанак планделуларних карцинома главе и врата	10
1. 3. 1. Концепт Field Carcinogenesis	10
1. 3. 2. Дуван и алкохол као фактори ризика за обољевање од планделуларног карцинома главе и врата	10
1. 3. 3. Хумани папилома вирусни као фактор ризика за обољевање од планделуларног карцинома главе и врата	11
1. 3. 4. Остали фактори ризика за обољевање од планделуларног карцинома главе и врата	12
1. 4. Патогенеза и прогресија планделуларног карцинома главе и врата	12
1. 5. Неоваскуларизација	15
1. 6. Стимулатори и инхибитори ангиогенезе	17
1. 7. Густина крвних судова у тумору	19
1. 8. Фактор индукован хипоксијом HIF-1 α	19
1. 9. Ефекти активације фактора индукованог хипоксијом	23
1. 10. Позитивни ефекти интратуморске хипоксије на развој тумора	24
1. 10. 1. Утицај интратуморске хипоксије на ангиогенезу	24
1. 10. 2. Утицај интратуморске хипоксије на ћелијски метаболизам	24
1. 10. 3. Аспекти метастазирања карцинома под утицајем хипоксије	26
1. 10. 4. Утицај интратуморске хипоксије на имунолошки одговор	26
1. 10. 5. Утицај интратуморске хипоксије на карциномске стем ћелије	27
1. 10. 6. Полимофизми гена за HIF-1 α	27
1. 11. Утицај који HIF-1 α остварује код карцинома	29
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	31
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА	32
3. 1. Болесници и материјал	32
3. 2. Узорковање биолошког материјала	33
3. 3. Утврђивање постојања полиморфизама	33
3. 4. Имунохистохемијска анализа	34
3. 5. Статистичка анализа	35

4. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	37
4. 1. Демографске карактеристике и структура пацијената	37
4. 2. Клиничко-патолошке карактеристике пацијената	39
4. 2. 1. Локализација примарног тумора	39
4. 2. 2. Класификација тумора	40
4. 3. Односи полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 α	43
4. 4. Односи експресије протеина HIF-1 α	44
4. 5. Односи експресије протеина VEGF	48
4. 6. Односи вредности микроваскуларне густине туморског ткива	49
4. 7. Утицај полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 α на експресију протеина HIF-1 α и VEGF и вредност MVD	52
5. ДИСКУСИЈА	55
6. ЗАКЉУЧЦИ	65
7. ЛИТЕРАТУРА	66
8. ПРИЛОГ	83

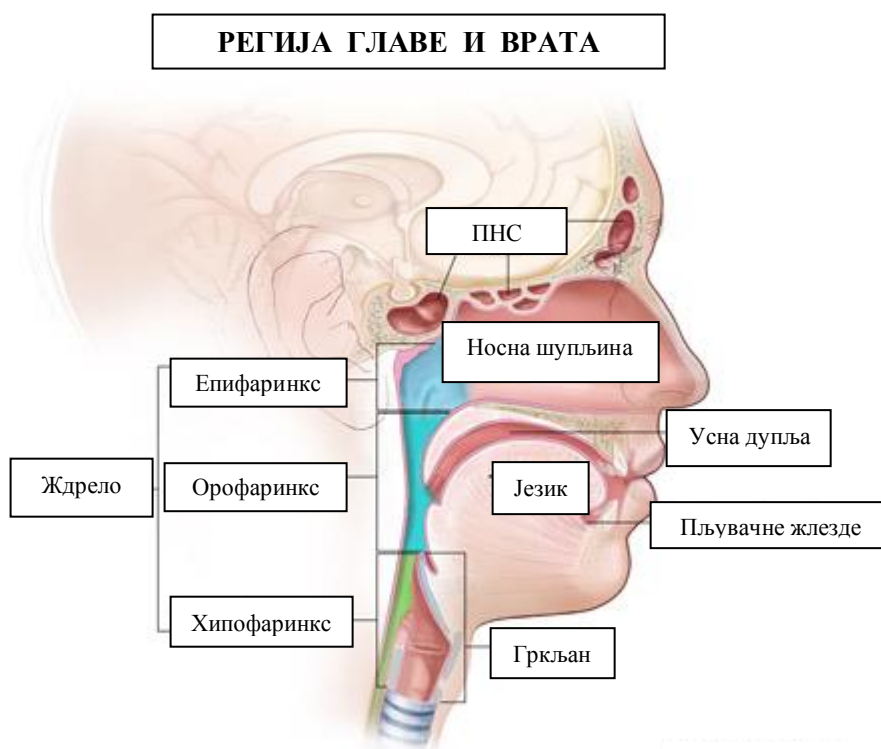
1. УВОД

1.1. Планоцелуларни карциноми главе и врата (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC*)

Ови карциноми представљају туморе који су порекла слузнице горњег аеро-дигестивног тракта и обухватају туморе носне шупљине, параназалних синуса, усне дупље, ждрела, гркљана и пљувачних жлезди. Оно што је заједничко за све ове туморе јесте то да су заступљенији код мушкараца животног доба између 5. и 6. декаде, да им је настанак повезан са повећаним конзумирањем дувана и алкохола, као и да у хистопатолошком смислу међусобно показују изузетну сличност (1).

Анатомски субрегиони главе и врата приказани су на слици 1.

Слика 1. Подела регије главе и врата на субрегионе



Планоцелуларни карциноми су ретки у носној шуљини и синусима, за разлику од усне дупље где је највећа инциденција у односу на остале субрегионе главе и врата. Орални карциноми се односе на туморе који захватају следеће анатомске локализације: доња усна, језик, под усне дупље, десни и тврдо непце (2). У највећем броју случајева први избор терапије код ових тумора је хируршки приступ.

Ждрело је у клиничком и онколошком смислу подељено на 3 спрата: назофаринкс (епифаринкс), орофаринкс (мезофаринкс) и хипофаринкс (ларингофаринкс). У епифаринксу могу настати планоцелуларни карциноми, мада већу учесталост имају слабо диферентовани карциноми или лимфоепителиоми, као и недиферентовани карциноми назофаринкса - UCNT, који имају другачију епидемиологију, молекуларну основу, клиничку слику и терапијски приступ.

Оно што издваја орофарингеалне карциноме од осталих су специфичности локализације, етиолошки чиниоци, као и биолошке карактеристике тумора. Орофарингеални карциноми обухватају туморе унутар анатомских граница задњег зида ждрела, меког непца, непчаних крајника и задње трећине (базе) језика. Присуство лимфног ткива Waldeyer-овог прстена је разлог могућег развоја лимфома у овој регији, мада проценат ових неоплазми није висок. Планоцелуларни карциноми су доминантни малигни тумори орофаринкса са заступљеношћу од преко 95%.

Карциноми хипофаринкса могу инфилтрисати задњи зид, пириформне синусе или посткрикоидну регију и често су удружени са карциномима гркљана (3). Иако се одликују јасном симптоматологијом, врло често су у одмаклим стадијумима приликом постављања дијагнозе. Обзиром да хирургија има ограничено учешће у њиховом лечењу, као и на висок потенцијал регионалног и удаљеног метастазирања, планоцелуларни карциноми хипофаринкса имају најслабију прогнозу од свих карцинома главе и врата.

Планоцелуларни карциноми гркљана чине око 20% од свих малигнух тумора главе и врата. Глотисни ниво гркљана је генератор гласа, па је први знак обично промуклост (4). Обзиром да је овај поремећај гласа лако уочљив, могућа је рана дијагностика ових тумора. Карциноми гркљана могу бити лечени хируршким методама, специфичном онколошком терапијом или комбинованим приступом и најчешће имају добру прогнозу.

1.2. Епидемиолошке карактеристике планоцелуларних карцинома главе и врата

Карциноми ове регије се према учесталости налазе на шестом месту на свету у односу на остале малигнитете људског организма, са приближно 560.000 новооткривених случајева годишње и приближно 300.000 фаталних исхода (1). Упоредјујући податке широм света, уочљиве су разлике у учесталости планоцелуларних карцинома главе и врата у различитим регионима, што зависи од генетске предиспозиције и карциногених фактора спољашње средине који су подложни временским и просторним варијацијама. Њихова највећа инциденција је у Југоисточној Азији где приближно око 75% становништва конзумира орах тропске палме који представља фактор ризика за обољевање од ових карцинома (5). У развијеном делу света висока заступљеност постоји у Централној, Јужној и Источној Европи услед изразите употребе дувана и алкохола. У Европи, у 2008. години је дијагностиковано 132.200 нових случајева карцинома главе и врата (104.600 у мушкој популацији и 27.600 у женској популацији) и утврђено 62.880 леталних случајева (6). Насупрот овим регијама, Јапан, Кина и Западна Африка су регије ниске учесталости планоцелуларних карцинома главе и врата.

Варијације учесталости карцинома орофаринкса прате регионалне варијације карцинома главе и врата. Они имају мању учесталост у поређењу са осталим планоцелуларним карциномима главе и врата и чак 5 пута мању од карцинома усне дупље, а 3 пута мању од карцинома гркљана. Многе студије на пацијентима из САД и Европе указују на пораст учесталости ових карцинома, нарочито у млађој популацији, притом тај пораст није присутан код неорофарингеалне локализације карцинома. То указује на постојање и неких других егзогених фактора ризика, осим дувана и алкохола. Овој претпоставци иду у прилог и објављени резултати да је све већи број оболелих од орофарингеалног планоцелуларног карцинома који не конзумирају ни дуван, ни алкохол. Сматра се да је за ову појаву заслужан хумани папилома вирус, као битан фактор за настанак и развој планоцелуларних карцинома орофаринкса (7).

Инциденција оралних планоцелуларних карцинома је у порасту, нарочито у млађој популацији. Према подацима из 2010. године, у Мађарској је забележено 12.8% оралних карцинома код пацијената узраста између 14 и 50 година, а при том је 78% тих пацијената било мушког пола (8).

Ретроспективна студија спроведена у САД која је обухватила период од 34 године показује да је процент оболелих од оралног карцинома узраста испод 40 година био знатно мањи - чак 5%, а да су мушкарци обољевали 1.7 пута чешће од жена (9). Сличне резултате су објавили скандинавски аутори на пацијентима лечених од 1960. године, према којима је проценат оболелих старости испод 40 година износио 5.5%, иако је полна дистрибуција ишла у прилог женској популацији - чак 1.6 пута је било више жена међу оболелим од оралног карцинома (10). Дакле, последњих година постоји тренд пораста инциденције оралних и орофарингеалних карцинома код млађе популације са знатном преминацијом код мушког пола (11).

Током 2012. године у свету је регистровано 157.000 новооткривених случајева малигнух тумора гркљана, стављајући их на 21. место на свету према учесталости (12). У односу на све малигнитете широм света, малигни тумори гркљана су чинили 1.1% што их чини релативно ретким. Око 88% карцинома ларинкса је дијагностиковано код мушкараца, а то је у сагласности са ранијим трендовима знатно чешћег обољевања мушке популације. Број новооткривених случајева малигнух тумора гркљана у САД износи 3.4 на 100.000 случајева за годину дана, а број леталних исхода 1.1 на 100.000 случајева за годину дана (13). Међу Европским земљама где су најчешће били дијагностиковани карциноми гркљана били су Шпанија, Италија и Пољска. У Великој Британији карцином гркљана је релативно честа малигна болест код мушкараца, док је код жена изузетно редак. Око 80% новооткривених карцинома се јавља у мушкој популацији, чинећи један од највећих односа инциденције међу половима (14).

Једногодишње преживљавање пацијената мушког пола са карциномом гркљана износи преко 85%, а петогодишње око 66%. Релативно преживљавање показује значајне варијације међу особама различитог социоекономског статуса - једногодишње преживљавање је веће за 7.7%, а петогодишње чак за 17.2% код имућнијих особа. Подаци у студијама који се односе на стопу преживљавања код карцинома гркљана у женској популацији су ретки, али говоре да су за 5-6% ниже него код мушкараца (15). Такође, подаци који се односе на мушки пол не могу се екстраполирати на женску популацију, обзиром да постоје значајне разлике у анатомској дистрибуцији и факторима ризика од обољевања (14).

1.3. Фактори ризика за настанак планоцелуларних карцинома главе врата

1.3.1. Концепт „Field Carcinogenesis“

Пацијенти оболели од планоцелуларног карцинома главе и врата често развијају вишеструке премалигне или малигне лезије. На основу ових налаза је Slaughter још 1953. године увео концепт „field carcinogenesis“ или „condemned mucosa“ заснован на хипотези да читава епителна површина горњег аеродигестивног тракта има повећани ризик од развоја малигнух лезија услед мултиплих генетских абнормалности (16, 17). Доказе за ову тезу пружају алтерације у хистолошки нормалној перитуморској слузници код пацијената са HNSCC. Предмет расправа било је питање да ли су се вишеструке промене слузнице развиле независно једна од друге или је прво настала једна лезија која је интраепителном миграцијом малигнух или прогениторних ћелија условила настанак осталих лезија. Бројна истраживања су пружила доказе који потврђују обе тврдње (18, 19). Ова два наизглед супростављена става могу помоћи у разјашњавању поменутог концепта. Заправо, настанак више лезија које су блиске по локализацији могуће је објаснити теоријом клоналне миграције, док је код удаљених лезија врло вероватно реч о независним догађајима (20).

1.3.2. Дуван и алкохол као фактори ризика за обољевање од планоцелуларног карцинома главе и врата

Најзначајнији фактор ризика за развој карцинома горњег аеродигестивног тракта јесте пушење дувана. Овај негативни утицај је највише испитиван код карцинома гркљана. Дуван се спомиње као главни етиолошки фактор у развоју карцинома ларинкса (21). Према скоријим истраживањима у Централној Европи, утицају дувана се приписује настанак карцинома у 87% случајева - у 75% случајева ради се о активном пушењу, а у 12% случајева о ранијем пушењу (22). Од значаја су дужина и интензитет конзумирања дувана, мада је и пасивна изложеност битан фактор (23). Сокић и сарадници су 1994. године у Београду спровели студију на 100 пацијената оболелих од карцинома гркљана, а резултати су указали да вишегодишња пасивна изложеност дуванском диму повећава ризик обољевања око три пута (24). Исти аутори као значајан фактор за настанак ларингеалних карцинома наводе десетогодишње умерено конзумирање дувана (25).

Утицај конзумирања алкохоличких пића на настанак карцинома главе и врата је значајан, мада слабије изражен него утицај дуванског дима. Дуван и алкохол показују синергистички ефекат, па њихова истовремена употреба вишеструко повећава ризик од настанка карцинома горњих аеродигестивних путева (26). Процентуална заступљеност планоцелуларних карцинома главе и врата чији је развој приписан утицају дувана и/или алкохола варира међу ауторима, али је свакако виши од 75% (27, 28).

Инхалаторни агенси највећи утицај испољавају на глотисни ниво гркљана, па дуван управо овде у највећој мери показује своје негативне ефекте. Супраглотис подлеже утицајима инхалаторних и ингестабилних средстава, па тумори овог субрегиона гркљана показују значајну повезаност са конзумирањем и дувана и алкохола (29).

Новија истраживања указују да употреба дувана и алкохола имају различите ефекте на генетске алтерације код планоцелуларних карцинома главе и врата. Наиме, изражена конзумација алкохола може активирати претходне постојеће соматске мутације типа SCNA (Somatic Copy-Number Alterations), али не може индуковати мутације туморског протеина p53, док дуван има управо обрнут механизам деловања код HNSCC (30).

1.3.3. Хумани папилома вирус као фактор ризика за обољевање од планоцелуларног карцинома главе и врата

За разлику од осталих планоцелуларних карцинома главе и врата, инциденција орофарингеланих карцинома се повећала током последње две деценије (31, 32). Хумани папилома вирус је потврђени фактор ризика за настанак орофарингеланих карцинома, мада остварује значајан утицај и на остале карциноме главе и врата (33, 34). Данас се сматра да је више од 50% карцинома орофаринкса повезано са излагањем хуманом папилома вирусом (35). Особе код којих је тестирањем потврђена HPV 16 орална инфекција имају 14 пута већи ризик обољевања од карцинома орофаринкса (36). Као и карциноме грлића материце, HPV позитивне орофарингеалне карциноме одликује веома спор развој, а високи ризик постоји након више од 15 година од излагања вирусом (37). Протеини E6 и E7 хуманог папилома вируса инактивирају тумор супресорске протеине p53 и pRB, доводећи до малигне ћелијске трансформације (38). Такође, код ових карцинома постоји повећана експресија p16 услед смањеног деловања повратне спреге pRB (38).

Пацијенти позитивног HPV статуса који болују од карцинома орофаринкса имају боље преживљавање и терапијски одговор него HPV негативни пацијенти (39-42). Присуство p53 мутација, маркера за HPV негативне орофарингеалне карциноме је повезано са гором прогнозом (43). Активни пушачи који болују од напредних форми орофарингеалних карцинома имају већи ризик од рецидивирања малигне болести у поређењу са непушачима (44).

1.3.4. Остали фактори ризика за обољевање од планоцелуларног карцинома главе и врата

Загађење ваздуха, воде или земљишта тешким металима изнад максимално дозвољене вредности концентрације, представља фактор ризика за настанак различитих малигнух тумора, међу којима су и карциноми главе и врата (45). Изложеност канцерогеним материјама током обављања професионалне дужности у дужем временском периоду такође је етиолошки фактор за ларингеалне карциноме. Поред азбеста, тешких метала и хлорисаних растварача, повећан ризик обољевања од карцинома гркљана је примећен при изложености угљеној или силиконској прабини (46).

На настанак карцинома главе и врата утиче и врста хране коју уносимо у организам (47). Исхрана богата мастима, месним прерађевинама и прженом храном показује повезаност са развојем ових карцинома (48). Резултати студије јапанских аутора из 2012. године иду у прилог протективне улоге конзумирања јогурта код карцинома (49). Значајна повезаност између конзумирања кафе и карцинома горњих аеродигестивних путева није утврђена (50).

Показано је да гастроезофагеални рефлукс не утиче на развој карцинома гркљана и хипофаринкса, али ларингофарингеални рефлукс у мањој мери може допринети настанку карцинома ове регије (51).

1.4. Патогенеза и прогресија планоцелуларног карцинома главе и врата

Доминантна теорија развоја тумора је била теорија клоналне еволуције, коју је поставио Nowell 1976. године (52). Ова теорија се заснива на претпоставци да ћелије карцинома развијају способност да преживе неповољне услове како би наставиле раст и пролиферацију. Ове неповољности се односе на имуни систем који тежи да елиминише

туморске ћелије, покретање програмиране ћелијске смрти, ткивне баријере, затим недовољну васкуларну мрежу итд. Према овој теорији, у ћелијама се понављају генетски догађаји који омогућавају да се превазиђу препреке и који се називају карциногеним догађајима. Већина новонасталих ћелија не преживи имунолошку баријеру или подлеже апоптози. Међутим, на крају се формира клонална популација ћелија које, не само да успева да преживи, већ доживљава бујање. Ове ћелије даљом еволуцијом стичу додатне карактеристике које утичу на понашање тумора. Као резултат свега поменутог, настаје малигни тумор састављен од ћелија које су у великој већини настале од једног клона, тј. генотипски су сличне.

Даља изузетна достигнућа у истраживању развоја тумора пружила су боље разумевање генетских догађаја која се дешавају унутар ћелија током карциногенезе. Fearon и Vogelstein су 1990. године, на основу истраживања малигнух неоплазми дебелог црева, предложили модел молекуларне прогресије према коме одређена збивања на молекуларном нивоу изазивају промену фенотипских карактеристика (53). Ако би се модел молекуларне прогресије применио на планоцелуларне карциноме главе и врата, промене на генетском нивоу би могле изазвати хистолошку прогресију у виду трансформације слузнице од нормалне, преко диспластичне слузнице или *carcinoma in situ*, до форме инвазивног карцинома.

Данас се користе две класификације епителних промена ларинкса, и то Класификација Светске Здравствене организације и Љубљанска класификација (54-57). Класификације су приказане у табели 1.

Табела 1. Поређење класификација интраепителних промена ларинкса између Светске Здравствене Организације и Љубљанске класификације

Класификација СЗО	Љубљанска класификација
Сквамозна хиперплазија	Једноставна хиперплазија
Лака дисплазија	Абнормална (базална/парабазална) хиперплазија
Средње изражена дисплазија	Атипична хиперплазија
Тешка дисплазија	Атипична хиперплазија
<i>Carcinoma in situ</i>	<i>Carcinoma in situ</i>

Прве две промене према Љубљанској класификацији су бенигне, трећа је условно малигна, а четврта представља карцином без инвазије. Критеријуми потребни да би се интраепителна промена прогласила карциномом јесте губитак стратификације читаве дебљине епитела, постојање већег степена ћелијских алтерација и многобројне неправилне митотске фигуре у целој дебљини епитела.

Током еволуције човеков организам је опремљен софистицираним механизмима блокирања и преклапања (*interlocking and overlapping mechanisms*) како би се заштитио од настанка тумора, па се на тај начин потенцијалне туморске ћелије „поправљају“ или подлежу апоптози. Скоро је немогуће да појединачна мутација може избећи дејство репарационих механизма и даље изазвати трансформацију нормалне у малигну ћелију, мада више сукцесивних мутација, које онеспособљавају различите независне одбрамбене механизме то могу постићи. Притом, није толико од значаја специфичан редослед генетских догађаја, колико акумулација истих (58).

Канцерогене мутације углавном захватају гене одговорне за контролу ћелијског циклуса или апоптозе, а настанак тумора изазивају утицајем на онкогене или тумор супресорске гене. Онкогени представљају гене који у уобичајеним околностима учествују у интрацелуларним сигналним путевима и тада се зову прото-онкогенима. Одређене мутације у овим генима доводе до поремећаја њихове активности, што резултује наглашеном ћелијском пролиферацијом и настанком тумора. Тај поремећај може бити квантитативне или квалитативне природе, који редом доводи до прекомерне, односно несвојствене активности. Постоји велики број истражених онкогена који се описују као фактори раста или њихови рецептори, сигнални трансдуктори или транскрипциони фактори.

Тумор супресорски гени се могу назвати чуварима генома, обзиром да њихови продукти спречавају неконтролисан раст и пролиферацију ћелија, тј. настанак догађаја који воде ка развоју карцинома. Ову улогу испуњавају на разноврсне начине, контролом ћелијског циклуса, регулацијом транскрипције, превођењем девијантних ћелија у апоптозу или контролисањем прецизности репликације, поправки или издвајања ћелијске ДНК. Деактивацијом ових гена уклоњена је негативна контрола туморског настанка и створена могућност неконтролисаног раста.

Hanahan и Weinberg су 2000. године изнели став да је потребно 6 значајних корака да би настала малигна трансформација ћелија и назвали их обележјима карцинома (*The hallmarks of cancer*) (59). Једно међу њима јесте стимулација развоја

крвних судова, тј. неоваскуларизација. Без адекватне васкуларизације, тумори већи од 1 cm³ би могли подлећи некрози. Већина тумора има могућности превазилажења ове препреке стимулацијом пролиферације ендотелних ћелија и формирањем нових крвних судова. Да би успеле да преживе неповољне услове који владају у микроокружењу са мало кисеоника, ћелије могу да промене експресију неких протеина уз помоћ HIF-1 α као медијатором (60).

1. 5. Неоваскуларизација

Ангиогенеза је физиолошки процес којим настају нови крвни судови од претходно постојећих судова, чије ендотелне ћелије подлежу пролиферацији и диференцијацији. Ова појава је уобичајена и делотворна при расту и развоју организма, као и при зацељивању повреда. Међутим, она преставља и прекретницу у настанку и расту малигнух тумора, када је означена као патолошка.

Још је 1971. године амерички медицински истраживач Judah Folkman у часопису *New England Journal of Medicine* публикувао рад којим закључује да је ангиогенеза апсолутно неопходна за експанзију тумора преко 1-2 mm у дијаметру, када дифузија кисеоника и есенцијалних хранљивих фактора постаје лимитирајући фактор даљег туморског раста и развоја (61). Од ангиогенезе треба разликовати појам означен термином васкулогенеза, који се заправо односи на стварање нових крвних судова тамо где није било претходно формираних (62). То је заправо процес *de novo* формирања крвних судова од ендотелних прекурсорских ћелија (Endothelial Progenitor Cells, EPC). Обзиром на своју мултипотентност, ове ћелије пореклом из костне сржи пружају алтернативни извор ендотелних ћелија који доприноси формирању нових крвних судова. Доказано је да EPC имају значајно учешће и у процесу патолошке ангиогенезе, нпр. код туморског раста и формирања метастатских промена. Као одговор на присуство туморских цитокина, укључујући VEGF, оне улазе у крвоток и даље мигрирају до туморски измењеног ткива, инкорпорирајући се у туморску васкуларизацију (63). Постојање резервоара EPC у костној сржи и својствена улога у васкулогенези учинило је ендотелне прекурсорске ћелије врло атрактивним за истраживаче у смислу потенцијално нове циљне антитуморске терапије.

Циркулаторне CD34 антиген позитивне ендотелне прекурсорске ћелије су недавно изоловане из организма одраслог човека. Након адхеренције, ове ћелије

показују способност диференцијације у условима *in vitro* (64). Системска примена хетерологних, хомологних, али и аутологних ЕРС код животиња којима је оперативним захватом изазвана исхемија задњег екстремитета, доводи до њиховог инкорпорирања у фокус неоваскуларизације исхемичне регије мишића захваћеног екстремитета (65, 66). Међутим, још од прве спознаје и описа ЕРС 1997. године, изнете су у стручној литератури разне недоумице у вези удела у коме ове ћелије учествују у васкулогенези. Према неким истраживачима, њихово учешће је занемарљиво мало, док резултати других аутора попут Lyden-а из 2001. године, указују да је тај проценат знатно виши, чак око 50%. (16).

Експериментима на мишевима којима је рађено пресађивање костне сржи постављени су докази савременог концепта да постнатална васкулогенеза доприноси како физиолошкој, тако и патолошкој неоваскуларизацији при расту тумора, зарастању озледа или при тешким исхемијама екстремитета или миокарда (67). Утврђено је да се у физиолошким условима ЕРС могу детектовати у великој мери у костној сржи, периферној крви и јетри, у знатно мањој количини у плућима, цревима, кожи, јајницима, материци и мишићима екстремитета, док се не могу наћи у мозгу. Ово говори у прилог заступљеног става о постојању резервоара прекурсорских ћелија у нормалним ткивима.

Раст тумора до клинички релевантне величине је зависан од адекватног снабдевања крвљу и омогућен је формирањем туморске строме где је кључни догађај формирање нових капилара (68, 69). Туморско ткиво наине показује паракрини утицај, делујући на тумор-придружене ЕРС које стичу изразиту способност диференцијације, миграције, адхеренције, ослобађања протеаза итд. Оне су већином локализоване у периферном делу тумора, док се око 4. недеље од почетка ангиогенезе већ не могу наћи у централном некротичном делу. Битна карактеристика васкулогенезе неоплазми је константно одржавање почетне фазе ћелијске диференцијације и формирања васкуларних изданака, што је у складу са принципом имортализације туморских ћелија (67).

Данас су познати бројни специфични фактори који имају улогу позитивних или негативних регулатора ангиогенезе. Фактори који доприносе ангиогенези називају се стимулаторима, међу којима су најзначајнији VEGF, bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor), Ang1 (Angiopoietin 1), PDGF, MMP (Matrix Metalloproteinase), TGF- β (Transforming Growth Factor Beta), Endoglin, eNOS (Nitric Oxide Synthase), COX-2

(Cyclooxygenase-2), Ephrin ligandi и други. У физиолошким условима стимулатори су у константном балансу са инхибиторима попут NRP-1 (Neuropilin-1), Ang 2, Angiostatin, Vasostatin, Endostatin, TSP-1,2 (Trombospondin 1,2), TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloprotheinases) итд. Солидни тумори нису у могућности да порасту изван одређених димензија без адекватног ангажмана додатне васкуларизације, а то управо постижу поремећајем равнотеже ових антагониста.

1. 6. Стимулатори и инхибитори ангиогенезе

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) је фактор раста из фамилије PDGF (Platelet-Derived Growth Factor). Протеини из ове групе имају битну улогу у ћелијском расту и деоби, а њихов највећи значај јесте регулација ангиогенезе и васкулогенезе.

VEGF је најзначајнији и најбоље проучен стимулатор ангиогенезе који делује у оквиру комплексног система надокнаде кисеоника у ткивима са неадекватном циркулацијом. Термином VEGF означен је већи број протеина, редом означених латиничим словима А-Ф, али се првенствено мисли на протеин VEGF-А, ако није другачије означено. Бројним студијама доказано је да он врши индукцију митозе и утиче на миграцију ендотелних ћелија. Такође, има функцију и вазодилатора и стимулатора микроваскуларне пермеабилности, па је обзиром да су ове његове улоге прве пронађене, раније називан фактором васкуларне пермеабилности.

VEGF је гликопротеин молекуларне тежине 34-45 kD, кога излучују туморске ћелије, макрофаги и још неки елементи који учествују у имунолошком одговору. Поред стимулатора ангиогенезе који су одговорни за синтезу VEGF, битан предуслов је свакако постојање хипоксије. HIF-1, главни регулатор ћелијског одговора на хипоксију, директно регулише експресију бројних ангиогених фактора, међу којима и VEGF. Своје дејство VEGF остварује након везивања са Flt-1 и KDR рецепторима на површини ћелије, који припадају фамилији тирозин киназа рецептора. Овај спој доводи до димеризације рецептора и њихове активације путем трансфосфорилације. Даље се ствара четвороструки пораст концентрације цитоплазматског калцијума и повећање пермеабилности малих крвних судова. У наставку долази до екстравазације протеина крвне плазме, који на тај начин стварају подлогу миграцији ендотелних ћелија и за формирање новог матрикса. Металопротеиназе екстрацелуларног матрикса постају активирани, разлажу протеине, омогућавајући пролиферацију, диференцијацију и нову

миграцију ендотелних ћелија. Стабилност новоформираних крвних судова се постиже уградњом перицита, глатких мишићних ћелија и протеина екстраћелијског матрикса. На тај начин су постигнати сви услови за настанак *de novo* васкуларизације.

bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) је у нормалном ткиву присутан на базалној мембрани и у субендотелном екстрацелуларном матриксу крвних судова. У одсуству сигналних пептида, овај фактор остаје везан за мембрану, када је афункционалан. Приликом зарастања рана или током карциногенезе, активирани облик учествује у ангиогенези као један од медијатора. bFGF је идентификован у широком спектру малигнитета, укључујући карцинома главе и врата и позната је његова врло потентна ангиогена активност (70).

Значајно повећање густине крвних судова потврђено је само у случајевима коекспресије VEGF-A и bFGF, док је стабилна васкуларна мрежа индукована само ако је bFGF секретован у комбинацији са PDGF-BB фактором, указујући да је потребна изузетно блиска интеракција међу факторима раста како би се постигао ефективан ангиогени одговор (71).

HGF (Hepatocyte Growth Factor) секретују мезенхималне ћелије и делује као мултифункционалан цитокин на ћелије епителног порекла. Он остварује значајну улогу у регенерацији ткива, али и у ангиогенези, као и туморогенези. У литератури је потврђена повећана експресија HGF и његовог рецептора с-MET, као и асоцијација са гором прогнозом код карцинома главе и врата (70, 72). Студијама о квантитативној експресији фактора ангиогенезе код HNSCC, истовремена прекомерна експресија фактора VEGF, bFGF и HGF је нађена у преко 90% случајева.

PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) је димерични гликопротеин који се састоји од два ланца (AA, BB или AB). Своју значајну улогу у неоваскуларизацији остварује као део сигналних путева зависних од хипоксије. Учествује у диференцијацији и миграцији различитих типова мезенхималних ћелија. Сматра се једним од могућих прогностичких фактора код планоцелуларних карцинома главе и врата.

Ang 1 и 2 се везују за исти Tie 2 рецептор ендотелних ћелија, али показују супротне учинке. Док Ang 1 производи стимулаторни ефекат на сазревање крвних судова, Ang 2 инхибира осетљивост ендотелних ћелија на факторе раста. Ендостатин је антиангиогени фактор, сличне функције као и ангиостатин или тромбоспондин. Он блокира пролиферацију и организацију ендотелних ћелија у нове крвне судове (73). На

анималним студијама је утврђено да блокира ангиогенезу и развој примарних тумора и метастаза.

1. 7. Густина крвних судова у тумору (Microvessel Density, MVD)

Многобројне студије су доказале вредност MVD као прогностичког индикатора код великог броја карцинома, као што су карциноми дебелог црева, простате, дојке, итд. Сходно томе, мерење овог параметра олакшава процену стадијума и вероватноћу могућег рецидивирања малигне болести и помаже при одлуци о врсти онколошког лечења.

Још 1972. године, Врен са сарадницима је обавио квантитативно мерење туморске ангиогенезе и предложио систем градације тумора мозга на основу анализе карактеристика ендотелних ћелија и мерења густине крвних судова. Даљи напредак квантитативних метода омогућила су открића специфичних антитела која се користе у детекцији ендотелних ћелија. Модерне методе мерења MVD-а се врше на основу идентификације једног или више изолованих региона најинтензивније васкуларизације (hotspots). Прво испитивање овог типа је урадио 1990. године Weidner са сарадницима на карциномима простате и дојке. Ове „врхуће тачке“ настају од ангиогених клонова ћелија са највећом способности инвазије или метастазирања и идентификују се микроскопом на малом увећању (до 40x). Након идентификације, броје се новонастали крвни судови под великим увећањем микроскопа (200-400x). Истраживање Weidner-а и велики број каснијих студија потврдили су корисност MVD у стажирању тумора и процени рецидивирања или преживљавања болесника. Различити резултати ових студија се могу објаснити употребом разних антитела као маркера пролиферације ендотелних ћелија, затим местом где је испитивана неоваскуларизација (централни или периферни део тумора), као и врстом испитиваног тумора. Без обзира на поменуто, оригинална метода коју су спровели Weidner и сарадници се и даље употребљава при мерењу MVD.

1. 8. Фактор индукован хипоксијом (Hypoxia-inducible factor, HIF-1)

Ради се о транскрипционом фактору зависном од кисеоника, који игра важну улогу у ангиогенези и расту тумора (74). Сматра се кључним регулатором ћелијског одговора на хипоксију, који подлеже конформационим променама као одговор на

различите концентрације кисеоника у ћелијском окружењу. HIF-1 је откривен 1992. године од стране двојице истраживача Semenz-а и Wang-а, који су га идентификовали у виду протеина који се појављује као одговор на ниску концентрацију кисеоника (75).

У свом активном облику, HIF транскрипциони фактор, представља хетеродимер кога чине једна од три постојеће α субјединице (HIF-1 α , HIF-2 α или HIF-3 α) и β субјединица. HIF-1 α и HIF-1 β субјединице редом имају 826, односно 789 аминокиселина и обе садрже Per/aryl hydrocarbon translocator/Sim (PAS) домене који омогућавају њихову димеризацију и на тај начин функционалност HIF-1 као транскрипционог фактора (76). Такође, обе субјединице припадају bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) фамилији фактора, чију структуру чине два хеликса различите величине, повезана петљом, при чему већи хеликс садржи ДНК-везујуће регионе.

Два домена унутар HIF-1 α позната као N- и C-терминални активациони домени (N-TAD, C-TAD) имају различит допринос функцији HIF-1 α и то путем хидроксилације, уз помоћ ензима пролил хидроксилазе (PHD), односно аспарагинил хидроксилазе. C-TAD се углавном спомиње као контролор регулације циљних гена. Домен завистан од кисеоника (Oxygen-Dependent Degradation Domain, ODDD) унутар HIF-1 α омогућава његову разградњу у условима хипоксије. Овај домен је заправо подељен на два дела, NODDD и CODDD, названа према својој позицији блиској N-, односно C-крају полипептидног ланца.

Експресија HIF-1 α и HIF-1 β mRNK је детектована у свим ткивима људског организма (77). Иако обе субјединице имају неке преклапајуће функције, HIF-1 је врло често повезан са метаболичким и васкуларним одговорима на хипоксију, док HIF-2 има утицај на васкуларни систем, нарочито еритропоезу (78). Гликолитички ензими попут пируват дехидрогеназе налазе се под утицајем HIF-1 који инхибира улазак продуката гликолизе у Кребсов (TCA) циклус у условима ограничене концентрације кисеоника (79). Такође, утицај HIF-1 на неоваскуларизацију је добро објашњен у литератури (80). HIF-2 је структурално врло сличан са HIF-1 α , обзиром да 48% њихових секвенци показује хомологност (81). Он показује експресију специфичну са ткивом бубрега, обзиром да се сматра примарним регулатором реналне продукције еритропоетина (82). Функција HIF-3 α и даље није потпуно објашњена, али познато је да инхибира транскрипциону активност HIF-1 α изоформе.

Протеинска стабилност и транскрипциони потенцијал HIF-1 α субјединице директно зависе од концентрације кисеоника у окружењу (83). За разлику од α

субјединице, HIF-1 β , често обележаван акронимом ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator), има константну експресију у ћелијском једру, показујући кисеонично-независну активност (84). У условима нормалног парцијалног притиска кисеоника, HIF-1 α протеин подлеже брзој деградацији процесом убиквитинације и на тај начин не долази до транскрипције циљних гена. Овај процес се врши уз помоћ VHL протеина (Von Hippel Lindau tumor suppressor), који је заправо део Е3 убиквитин лигаза протеинског комплекса (85). Убиквитинација је део главног механизма којим ћелије регулишу деградацију непотребних и оштећених протеина. За ове протеине се прво везује мали протеин познат под термином убиквитин, а у реакцији везивања као катализатор употребљава се ензим убиквитин лигаза. Убиквитин даље шаље сигнал другим лигазама да везују додатне молекуле убиквитина, на тај начин формирајући полиубиквитински ланац који је у вези са протеинама и омогућава им да разграде обележени протеин.

VHL ген кодира протеин од 213 аминокиселина који се састоји од два домена и који има функцију регулатора HIF-1 α . Мутације које доводе до инактивације VHL гена удружене су са већим бројем тумора (86). Везивање HIF-1 α и VHL врши се пост-транслационом хидроксилацијом пролина уз помоћ ензима пролил хидроксилазе (Prolyl Hydroxylase Domain, PHD) (87). Постоје два места на којима је могућа хидроксилација, Pro 402 и Pro 564 и оба се налазе унутар ODDD домена HIF-1 α који и носи свој назив јер је ова хидроксилација могућа само у присуству кисеоника. Само специфична транс С4 хидроксилација поменутих резидуа пролина омогућава препознавање HIF-1 α од стране VHL који показује чак 2000 пута већи афинитет за хидроксилациону форму (88).

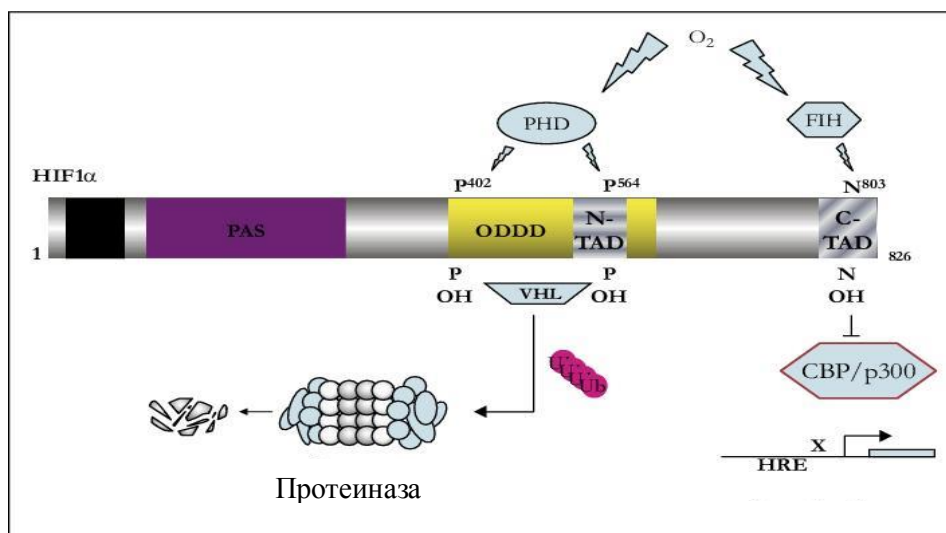
PHD припада фамилији ензима диоксигеназа, који за своје каталитичко дејство захтевају присуство кисеоника, гвожђа и 2-оксо-глутарата, међупроизвода Кребсовог циклуса. Функција овог ензима искључиво зависи од концентрације кисеоника, па се сматра кисеоничним сензором (81). Смањење концентрације кисеоника за 10% доводи до рапидног опадања хидроксилације резидуа пролина у HIF-1 α , што резултира у његовој нуклеарној стабилизацији. Постоје 3 изоформе ензима PHD које имају изразиту хомологост секвенци у С-теминалном домену, док у N-терминалном домену показују значајне разлике (89). Међу изоформама постоје разлике у ткивно-специфичним нивоима експресије, субцелуларној локализацији, протеинима са којима ступају у интеракцију, кисеоничној зависности, као и активности са различитим HIF- α изоформама (89-91).

У процесу деградације HIF-1 α улогу има још један ензим познат као ARD1 ацетилтрансфераза (92). Вршећи трансфер ацетил групе на резидуе лизина ODDD домена HIF-1 α , овај ензим омогућава стварање конформационих промена које поспешују реакцију са V β протеином.

У хипоксичним условима блокирана је разградња HIF-1 α , што има за последицу акумулацију овог протеина и његово повезивање са β субјединицом, резултујући стварањем HIF-1. Протеин p300 је важна компонента HIF-1 транскрипционог комплекса. У условима ниског парцијалног притиска кисеоника, C-TAD домен HIF-1 α интерреагује са CH1 (Cysteine/Histidine-rich1) доменом p300, што доводи до повећане транскрипционе активности HIF-1 (93). Овај протеин врши ацетилацију лизина 709 унутар HIF-1 α и претпоставља се да ову своју функцију може спровести и у нормалним и у хипоксичним условима (94). Међутим, процес ацетилације захтева претходну интеракцију HIF-1 α и p300 која је значајно израженија у хипоксији услед дехидроксилације аспарагина 803. Присуство ове интеракције омогућава ацетилацију лизина 709, као и стабилизацију и трансактивациону активност HIF-1.

У нормалним условима протеин p300 и HIF-1 α нису физички повезани услед брзе деградације HIF-1 α и хидроксилације аспарагина 803 ензимом FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1) (95). Због тога се FIH-1 назива другим кисеоничним сензором. Дакле, иако постоје и други механизми, хидроксилација зависна од кисеоника има највећу улогу у регулацији активности HIF-1 α . Интеракције којима је регулисана стабилизација HIF-1 α су приказане на слици 2.

Слика 2. Механизми деградације и стабилизације HIF-1 комплекса



1. 9. Ефекти активације фактора индукованог хипоксијом

Резултати истраживања које је спровео Venito са сарадницима, публиковани 2009. године јесу спознавање више од 6.000 гена који су зависни од хипоксије, мада у око 70% гена HRE (Hormone Response Element) секвенца није идентификована унутар промотер региона, указујући да HIF-1 није укључен у њихову контролу, или је укључен на индиректан начин (96). У табели 2 је приказано више од 100 директних циљних гена HIF-1, који имају улогу у туморском метастазирању, ангиогенези, енергетском метаболизму, ћелијској пролиферацији и апоптози (97).

Табела 2. Циљни гени HIF-1 и њихова функција

	Улога циљних гена				
	Метастазирање	Ангиогенеза	Енергетски метаболизам	Ћелијска пролиферација	Ћелијска апоптоза
Циљни гени HIF-1	TWIST E-cadherin MMP2 MMP9 TCF3 ZFHX1A ZFHX1B uPAR PAI-1 CXCR4 c-MET CCR7	VEGF CRLR SEMA4D SCF ANGPT2 SENP-1	GLUT1 GLUT3 pfkfb3 PGK1 PKM2 MCT4 PDK1 MXI1	EPO Runx1 Sox9	p53 Puma Bax p21 NPM hUcn2 BNIP3 Noxa

У циљу преживљавања неповољних услова микроокружења које има ниску концентрацију кисеоника, ћелије развијају способност измене експресије неких протеина уз помоћ HIF-1 као медијатором догађаја који ће уследити. Након стабилизације HIF-1 у хипоксичним условима, наступа интеракција са коактиваторима и везивање за секвенцу 5'-RCGTG-3' у проксималним промотерима гена регулисаним хипоксијом. Активацијом циљних гена, хипоксија утиче на неоваскуларизацију, ћелијски прелазак са оксидативног на гликолитички метаболизам, на пролиферацију и преживљавање ћелија, ћелијску апоптозу итд.

1. 10. Позитивни ефекти интратуморске хипоксије на развој тумора

1. 10. 1. Утицај интратуморске хипоксије на ангиогенезу

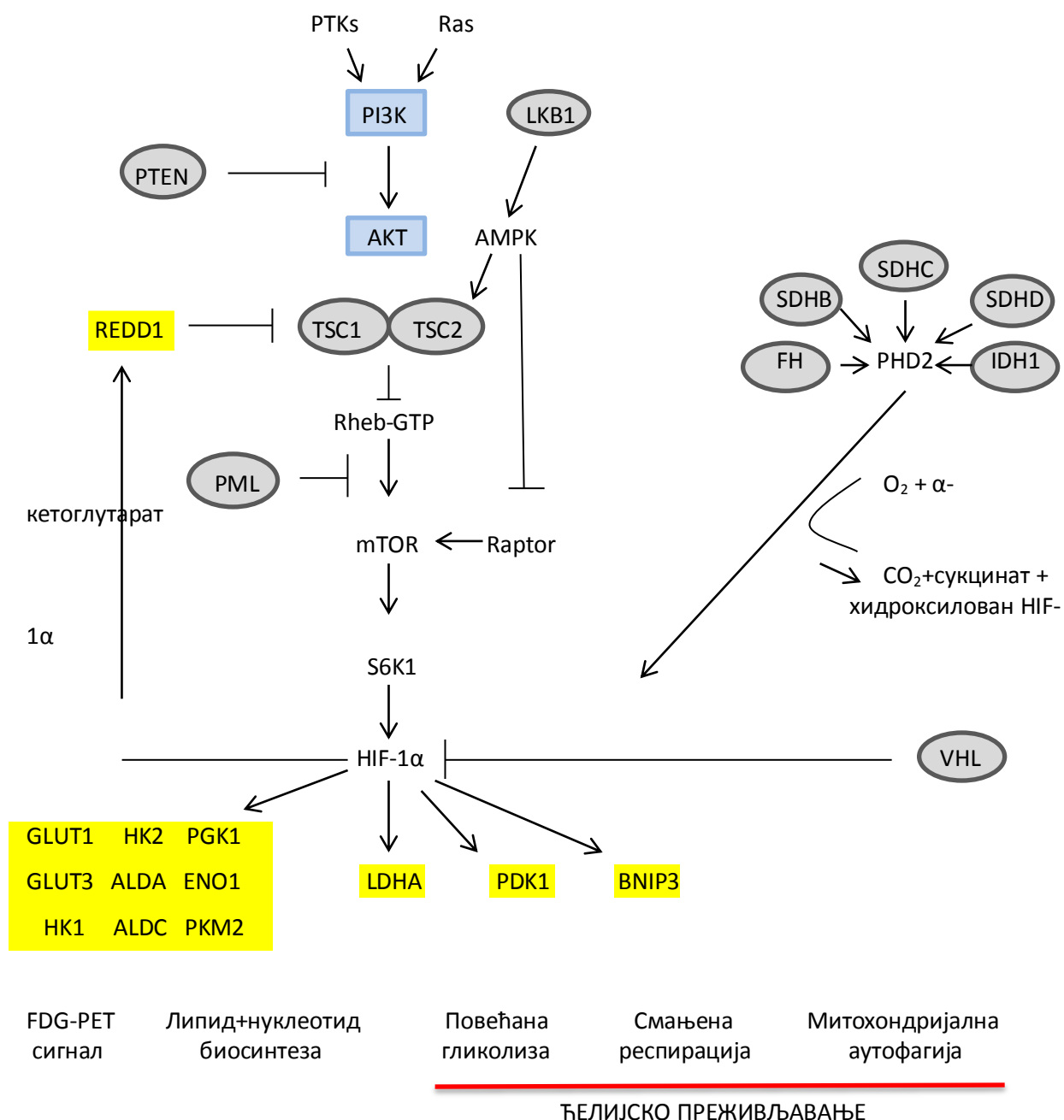
Рекуренција и метастатско ширење и даље су велики клинички проблем. Један од главних фактора који доприноси метастазирању јесте процес неоваскуларизације чији је главни иницијатор интратуморска хипоксија (98). HIF-1 α је главни медијатор догађаја условљених хипоксијом и често се сматра главним регулатором ангиогенезе при хипоксији. Ова регулација се спроводи повећањем експресије VEGF, VEGFR рецептора 1 и 2 и ангиопоетина, који су потребни са развој крвних судова (99-101). VEGF је најпотентнији митоген специфичан за ендотел и зна се да директно учествује у ангиогенези. Он реагује са својим рецептором, VEGFR, који има специфичну експресију на ендотелним ћелијама, стимулишући њихову пролиферацију. Ангиогенезом се повећава број и густина крвних судова, а смањује растојање дифузије кисеоника. Експериментима је утврђено да HIF-1 доприноси ангиогенези механизмима који су много комплекснији од једноставне VEGF индукције, вероватно регрутовањем додатних таргет гена који су укључени у сазревање крвних судова (102).

1. 10. 2. Утицај интратуморске хипоксије на ћелијски метаболизам

Метастатски карциноми се карактеришу репрограмирањем ћелијског метаболизма, што доводи до повећаног преузимања глукозе и њеног искоришћавања у анаболичким и катаболичким процесима. Ради се о толико поузданој особини, да повећано преузимање глукозе има клиничку примену у детекцији метастатских депозита позитронском емисионом томографијом, користећи флуоридеоксиглукозу, FDG, са сензитивношћу од око 90% (103). HIF-1 има улогу медијатора у метаболичким изменама, али и сам одговара на поједине метаболичке алтерације, што говори да се ради о једном механизму повратне спреге (104). Смањена расположивост кисеоника индукује HIF-1, који регулише транскрипцију више стотина гена, диригујући ћелијски прелазак на кисеонично-независне метаболичке путеве који користе гликолизу као примарни начин стварања АТФ (105). HIF-1 регулише експресију хексокиназе, првог ензима гликолитичког пута (Embden-Meyerhoff), као и експресију глукозних транспортера GLUT1 и GLUT3, који су неопходни за ћелијско преузимање глукозе

(105). HIF-1 заправо, вишеструким утицајима регулише готово све аспекте анаеробног метаболизма, што је приказано на слици 3.

Слика 3. Вишеструки утицаји HIF-1 на ћелијски метаболизам



Дакле, гени индуковани HIF-1 пружају двоструку заштиту растућем тумору, поспешујући развој крвних судова и помажући туморском ткиву да се метаболички аклиматизује на снижени ниво кисеоника. Ову метаболичку промену са оксидативне фосфорилације на кисеонично независне метаболичке путеве који постају активни

током продужене хипоксије врши активација Мус онкогена и у корелацији је такође са експресијом HIF-2 α (106, 107).

1. 10. 3. Аспекти метастазирања карцинома под утицајем хипоксије

Рађена су бројна истраживања у циљу откривања фактора који туморским ћелијама омогућавају миграцију и формирање метастаза, па су данас разјашњени бројни аспекти дисеминације малигнух тумора. Кључни догађај који претходи настанку метастазе јесте Мус-посредована активација Snail транскрипционог фактора и смањена експресија протеина E-cadherin. Унутар тумора постоји субпопулација туморских ћелија са предиспозицијом за метастазирање, која у хипоксичним условима подлеже епително-мезенхималној транзицији (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) (108). EMT чини главну фазу у ембриолошком развоју и туморском метастазирању током које епителне ћелије попримају фенотипске карактеристике миграторних мезенхималних ћелија, а да би ово постигле оне претходно мењају своје сигналне ћелијске путеве (109, 110). Инхибиција E-cadherin протеина и прекомерна експресија Snail су обележја ове ћелијске транзиције (111). Губитак кадхеринских адхерентних спојница резултује деструктурисањем цитоскелета и повећаном ћелијском способношћу одвајања од туморског ткива. Узрокујући ову промену кадхерина, хипоксија доприноси настанку метастаза и предиктор је лоше прогнозе и слабог одговора на примењену терапију. Такође, утврђена је позитивна корелација између нивоа експресије Snail и агресивности тумора (99). Дакле, HIF-1 α индукован хипоксијом изазива повећану експресију Snail, а снижава експресију E-cadherin и на тај начин доприноси транзицији епителних у мезенхималне ћелије и самим тим подстиче екстензивност клиничко-патолошких карактеристика бројних тумора, међу којима су и карциноми главе и врата. Путеви транзиције епителних у мезенхималне ћелије покренути стабилизацијом HIF-1 α представљају мултигенску и мултипротеинску каскаду, али прецизни путеви регулације овог сложеног механизма и даље нису потпуно дефинисани.

1. 10. 4. Утицај интратуморске хипоксије на имунолошки одговор

Једно од обележја тумора јесте избегавање имунолошког одговора који има за циљ уништење измењених ћелија. На овај критичан аспект карциногенезе хипоксија такође има сигнификантан утицај. Имунолошке ћелије имају способност препознавања и елиминације малигнух и преканцерских ћелија на основу тумор-специфичних

антигена које презентују на својој површини. Туморско ткиво изазива имунолошку супресију са циљем избегавања одбрамбених механизма организма. Тачан механизам којим се ово постиже и даље је предмет изучавања, али је поуздано тачно да интратуморска хипоксија доприноси имуномодулацији (112). Хипоксично стање показује негативан утицај на сазревање дендритичних ћелија путем инхибиције експресије CD40 и главног комплекса хистокомпатибилности класе II, што резултује сниженим Th1 одговором, као и смањењем експресије Th1 цитокина, интерферона γ , TNF-1 α и интерлеукина-12 (113). Експериментално је доказано да хипоксија доприноси стварању ћелијских популација унутар тумора које делују имуносупресивно. Туморске ћелије изложене хипоксичним условима продукују високе нивое CD39 и CD73 који су одговорни за конверзију АТФ и АДФ у аденозин, као и позитивну регулацију Treg ћелија што утиче на снижење имунолошког одговора (114). Такође регрутују се моноцити пореклом из костне сржи који се убрзано диференцирају у тумор-придружене макрофаге. Ови макрофаги у хипоксичним регијама инхибирају дејство цитотоксичних Т лимфоцита и на тај начин спречавају имунолошки одговор усмерен ка туморским ћелијама (115). Још један модус свог имуносупресивног дејства хипоксија показује утицајем на експресију лецитина Galectin-1, који изазива апоптозу ефекторних Т-ћелија (116). На основу наведеног може се закључити да имуносупресија изазвана интратуморском хипоксијом представља незаобилазан корак у настанку и развоју малигних тумора.

1. 10. 5. Утицај интратуморске хипоксије на карциномске стем ћелије

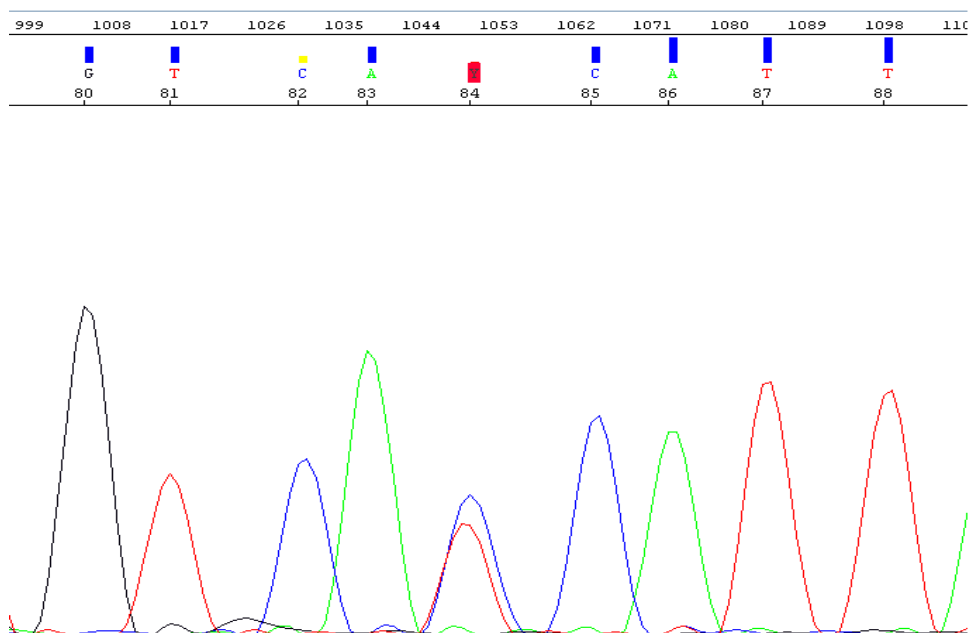
Хипоксија је одговорна и за повећање броја карциномских ћелија које подсећају на стем ћелије (Cancer Stem-like Cell, CSC). Ове плурипотентне ћелије имају повећану способност самообнављања, диференцијације и удаљене миграције (117). Постоје докази да CSC утичу на развој релапса малигне болести након одговарајућег третмана (118). HIF-1 α утиче на пролиферацију и акумулацију карциномских стем ћелија и на тај начин промовише настанак метастаза (119).

1. 10. 6. Полиморфизми гена за HIF-1 α

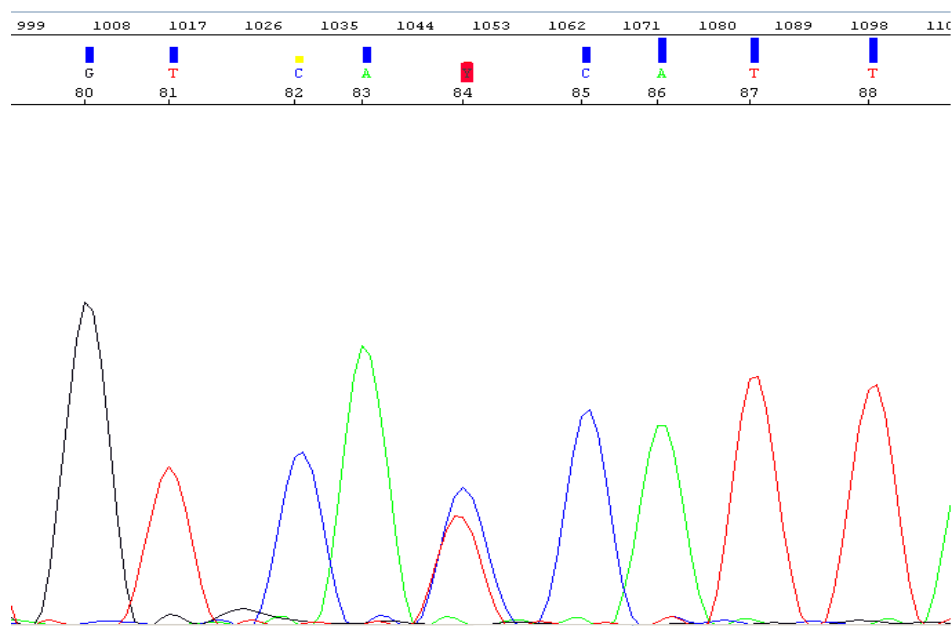
Бројним истраживањима испитивана је улога полиморфизама гена за HIF-1 α у посредовању генетске предиспозиције за карциноме (120-122). Притом највише су истражена два једнонуклеотидна полиморфизма (Single Nucleotide Polymorphisms,

SNPs) егзона 12 хуманог HIF-1 α гена означена као C1772T и G1790A, који резултују заменом аминокиселине пролин серином и аминокиселине аланин треонином, те се у литератури могу пронаћи и као P582S, односно A588T.

Слика 4. P582S полиморфизам HIF-1 α гена



Слика 5. A588T полиморфизам HIF-1 α гена



1. 11. Утицај који HIF-1 α остварује код карцинома

Иако планоцелуларни карциноми главе и врата имају високу фреквенцију, њихова биологија и даље није довољно схваћена. Интратуморска хипоксија је окидач за многа дешавања која утичу на бројне карактеристике тумора, а хипоксични одговор је регулисан преко HIF-1 α . Доказана је повезаност хипоксије са појавом туморских метастаза и повећаном терапијском резистенцијом код планоцелуларних карцинома главе и врата (123). Код истих карцинома повећана експресија HIF-1 α у туморском ткиву стоји у корелацији са узрапредовалим стадијумима малигне болести и смањеним преживљавањем (124). Улога генетских полиморфизама у измени протеинске функције и/или нивоа експресије, као и у предиспонирању различитих обољења код пацијената вишеструко је описана у литератури (125, 126). Даље, резултати више истраживања указују да полиморфизми у гену за HIF-1 α могу утицати на фенотип карцинома, повећавајући туморску агресивност (121, 122). Munoz Guerra и сарадници су објавили да варијантне форме HIF-1 α могу значајно да повећају ризик од настанка оралних карцинома и да су индикатори неповољне прогнозе у раним стадијумима малигне болести (120). Два најбоље истражена полиморфизма у гену за HIF-1 α , P582S и A588T су повезани са значајно повећаном транскрипцијом активношћу овог гена и са развојем регионалних или удаљених метастатских депозита (127, 128).

Док је повезаност експресије HIF-1 α протеина у туморском ткиву и прогнозе обољења дефинитивно доказана бројним испитивањима, значај два SNP у гену за HIF-1 α , као и њихова релација са фенотипом малигне болести требало би даље разјаснити. Досадашњи подаци у литератури о варијантним алелима гена за HIF-1 α и њиховој потенцијалној улози у развоју и прогресији планоцелуларних карцинома главе и врата су ограничени и углавном се односе на оралне карциноме.

Једна од најважнијих улога HIF-1 α на ћелије карцинома јесте индукција неоваскуларизације преко синтезе протеина, углавном VEGF. Ранији радови који су испитивали ангиогенезу вођену VEGF-ом говоре у прилог њеног позитивног утицаја на повећање туморске инвазивности (129, 130). Са оваквим резултатима као подстицајем, развијана је антиангиогена терапија, уз велика очекивања у терапији карцинома. Новија истраживања резултирала су парадоксалним закључцима да индукција, као и супресија ангиогенезе испољавају проинвазивне и прометастатске ефекте (131, 132). Узимајући у

обзир новооткривене чињенице, повезаносте експресије HIF-1 α и VEGF са туморским фенотипом би могла бити реevalуирана.

Стога, у овој студији испитивали смо утицај који мононуклеарни полиморфизми R582S и A588T гена за HIF-1 α остварују на експресију протеина HIF-1 α и VEGF и на клиничко-патолошке карактеристике планоцелуларних карцинома главе и врата.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Главни циљеви испитивања били су:

1. Упоредивање фреквенција генотипова полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 α у узорцима из периферне крви између групе пацијената са планоцелуларним карциномима главе и врата и контролне групе здравих испитаника.
2. Испитивање повезаности полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 α и клиничко-патолошких карактеристика пацијената са планоцелуларним карциномима главе и врата. Параметри чија је зависност од полиморфизама испитивана су: хистолошки градус тумора утврђен приликом патохистолошке верификације малигног тумора, локализација и величина примарног тумора, као и присуство метастаза у регионалним лимфним чворовима врата.
3. Испитивање повезаности полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 α и нивоа експресије HIF-1 α у једру и цитоплазми.
4. Испитивање повезаности полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 α и нивоа експресије VEGF.
5. Утврђивање утицаја поменутих полиморфизама на ниво експресије CD34, тј. на густину крвних судова и васкуларизованост туморског ткива.

Коначни циљ истраживања било је испитивање функционисања сигналних путева индукованих интратуморском хипоксијом код планоцелуларних карцинома главе и врата. Обзиром да је HIF-1 α главни регулатор ћелијског одговора на хипоксију, корелација полиморфизама у гену за HIF-1 α са претходно поменутих параметрима могло би допринети бољем спознавању карциногенезе тумора главе и врата.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

3.1. Болесници и материјал

Истраживање је обављено у виду клиничке, опсервационе студије пресека болесника оболелих од планоцелуларног карцинома главе и врата, код којих је сходно одлуци онколошког конзилијума спроведено иницијално хируршко лечење. Дијагноза планоцелуларног карцинома потврђена је код свих болесника патохистолошком анализом од стране два независна патолога.

Студијска група испитаника састојала се од 75 болесника издвојених методом пригодног узорковања из популације пацијената оболелих од планоцелуларног карцинома главе и врата, хоспитално лечених на Клиници за оториноларингологију и максилофацијалну хирургију Клиничког центра Србије. Сви испитаници у овој групи су примарно лечени хируршки, нису раније имали примарни тумор неке друге локализације, нити је претходно спроведено специфично онколошко лечење тумора радиотерапијом или хемиотерапијом. Тумори су категоризовани у складу са препорукама актуелне међународне класификације (VII издање TNM класификације, UICC). Подаци о полу, узрасту, пушачком статусу болесника, патохистолошкој дијагнози, хистолошком градусу и локализацији тумора прикупљени су из историја болести онколошких болесника Клинике за оториноларингологију и максилофацијалну хирургију Клиничког центра Србије. Испитаници студијске групе након секвенцирања PCR методом подељени су у две подгрупе у зависности од присуства полиморфизама P582S или A588T гена за HIF-1 α .

Контролну групу чинило је 100 здравих добровољаца, који су према социо-епидемиолошким карактеристикама (узраст, пол, телесна тежина, пушачки статус, конзумирање алкохола) одговарали студијској групи. Сврха постојања контролне групе било је упоређивање учесталости генотипова P582S или A588T полиморфизама гена за HIF-1 α између испитаника студијске и контролне групе.

3. 2. Узорковање биолошког материјала

Испитаницима студијске групе током операције узета су два репрезентативна узорка туморског ткива која нису била из некротичног подручја. Један ткивни узорак послужио је за утврђивање постојања полиморфизма гена за HIF-1 α , а други је упућен на имунохистохемијску анализу ради одређивања експресије HIF-1 α , VEGF, CD34, тј. MVD. Испитаницима студијске и контролне групе узимано је 5 mL периферне венске крви у циљу испитивања полиморфизама.

3. 3. Утврђивање постојања полиморфизама

Свежи репрезентативни узорци туморског ткива замрзнути су на температури од минус 80⁰C непосредно након узорковања. Геномска ДНК је изолована стандардном фенол-хлороформ методом, а ДНК из периферне крви коришћењем QIAamp DNA Blood Mini кита према протоколу произвођача (Qiagen - Hilden, Немачка). Да би се утврдило евентуално постојање полиморфизама унутар 12-ог егзона хуманог HIF-1 α гена означених као P582S и A588T, коришћена је PCR метода којом је амплификован фрагмент хуманог HIF-1 α гена дужине 178 базних парова

```
CATGTATTTGCTGTTTTAAAGGACACAGATTTAGACTTGGAGATGTTAGCTCCSTA  
TATCCCAATGGATGATGACTTCCAGTTACGTTCCSTTCGATCAGTTGTCACCATTAG  
AAAGCAGTTCCGCAAGCCCTGAAAGCGCAAGTCCSTCAAAGCACAGTTACAGTATT  
CCAGCAGACTC
```

Притом, употребљавана је секвенца дизајнираних прајмера: форвард PCR прајмер 5'-CAT GTA TTT GCT GTT TTA AAG-3' и реверзни PCR прајмер 5'-GAG TCT GCT GGA ATA CTG TAA CTG-3'. Амплификација је вршена у апарату Thermocycler T3 Combi (Biometra, Немачка) по програму са следећим условима: 30 циклуса денатурације на 95 ⁰C у трајању од 30 секунди, анилинг на 61⁰C током 30 секунди и екстензија на 72⁰C у трајању од 30 секунди. PCR продукти су секвенцирани капиларном електрофорезом у генетичком анализатору (ABI PRISM Genetic Analyzer 3130; Applied Biosystems, USA).

3. 4. Имунохистохемијска анализа

Узорци планоцелуларних карцинома добијени од пацијената са карциномима главе и врата за патохистолошку анализу су обрађени на класичан начин, а ткивни пресеци обојени хематоксилин-еозином.

Имунохистохемијска испитивања су спроведена на пресецима парафинских калупа дебљине 4 μm , претходно фиксираних узорака тумора у 10% раствору пуферисаног неутралног формалина, у току 10 часова. Доказивана је експресија фактора индукованог хипоксијом 1 алфа (Hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF-1 α), васкуларног ендотелног фактора раста (Vascular endothelial growth factor, VEGF), као и молекула CD34 имунохистохемијским методама, а процена интензитета експресије у туморским ћелијама вршена је семиквантитативним поступком. За квантитативну процену експресије HIF-1 α и VEGF у туморским ћелијама, као и за процену густине крвних судова у туморском ткиву, коришћене су морфометријске методе испитивања.

У циљу доказивања експресије HIF-1 α и VEGF коришћено је мишије моноклонско анти-хумано антители на HIF-1 α (произвођача Abcam, Cambridge, UK) и кунџево поликлонско анти-хумано антители на VEGF (произвођача Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA; sc-152). У току имунохистохемијског испитивања експресије појединачних маркера HIF-1 α и VEGF примењена је екстремно сензитивна и специфична имунохистохемијска метода EnVision⁺ Dual Link System/HRP (произвођача DakoCytomation, Carpinteria, California, USA; Code K4065). Такође, примењено је и дупло имунохистохемијско бојење које је омогућило истовремену експресију на истом ткивном пресеку HIF-1 α и VEGF, применом EnVisionTM G/2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DakoCytomation, Carpinteria, California, USA; Code K5361). У току процедуре имунохистохемијских бојења поштовани се принципи контроле квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контролних поступака, према пропозицијама UK NEQAS (UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry).

Све морфометријске и стереолошке анализе спроведене су на микроскопу Olympus BX-51 умреженом са CCD видео камером (PxlLink) повезаном са 19" PC монитором, коришћењем компјутеризованог програма за микроскопску анализу слике (new CAST stereological software package, VIS – Visiopharm Integrator System, version 2.12.1.0; Visiopharm; Denmark).

Квантификација туморских ћелија, које у нуклеусу или цитоплазми експримирају HIF-1 α , као и стереолошка анализа за процену волуменске густине крвних судова, вршена је уз помоћ наведеног компјутерског система. Индекс експресије HIF-1 α у туморским ћелијама прорачунат је као број ћелија са експримираним HIF-1 α на 1.000 туморских ћелија.

Волуменска густина крвних судова одређивана је употребом тестног поља који је покривао цео посматрани препарат тумора.

3.5. Статистичка анализа

Иницијални стадијум туморске болести је утврђиван након комплетног клиничко-патолошког прегледа, поштујући интраоперативни хируршки и радиолошки налаз. Тумори су категоризовани у TNM стадијуме, аналогно важећој међународној класификацији.

Приказан је утицај полиморфизама гена HIF-1 α на експресију протеина HIF-1 α и VEGF у туморским ћелијама планоцелуларног карцинома главе и врата. У оквиру сваке од испитиваних група - карциноми главе и врата са и без полиморфизама гена HIF-1 α , посебно је испитивана експресија протеина HIF-1 α и VEGF у зависности од степена васкуларизације туморског ткива, тј. евентуално присутне ткивне хипоксије.

Добијени подаци су обрађени и приказани на табелама и графиконима као процентуална вредност појединих категорија, или као средња вредност, или медијана. У процесу тестирања хипотезе као гранични ниво статистичке значајности коришћена је вредност $p < 0.05$.

У анализи резултата коришћени су параметријски и непараметријски тестови. За поређење просечних вредности параметарских обележја употребљен је неупарени Студентов Т-тест за две групе података, а код поређења три или више група података коришћена је једнофакторска анализа варијансе (ANOVA). За поређење разлике између учесталости код непараметријских података употребљаван је χ^2 тест, табеле контингенције, а за поређење просечних вредности непараметријских обележја Mann-Whitney тест. У анализи повезаности употребљаване су методе униваријантне и мултиваријантне логистичке регресије са одређивањем количника шансе и интервала поверења.

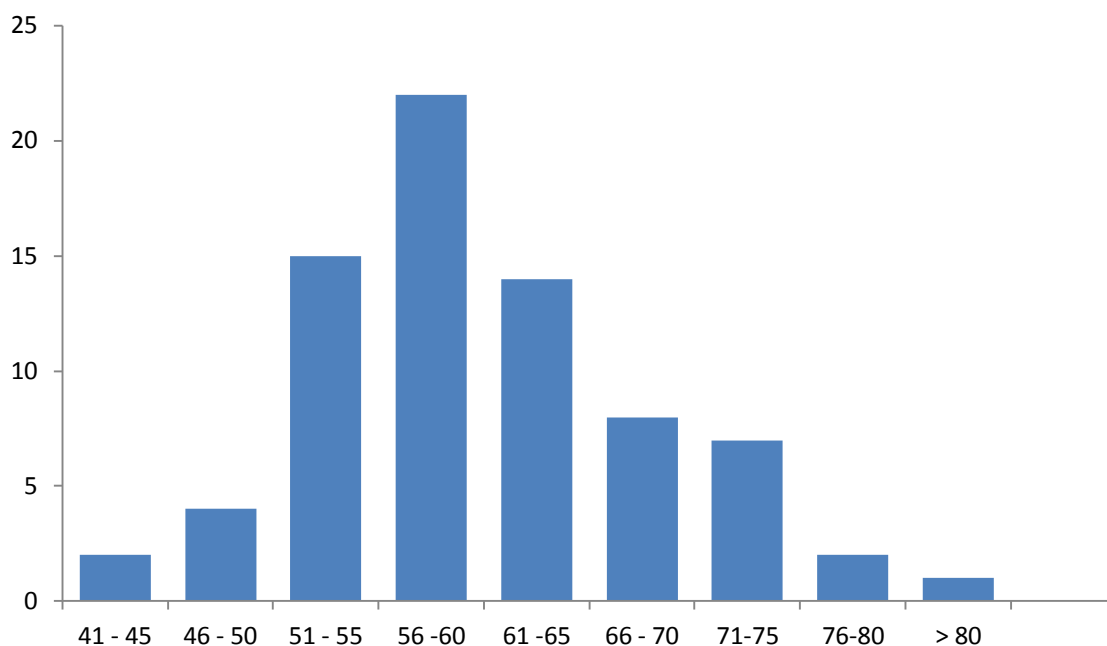
Обрада родатака извршена је помоћу комерцијалног статистичког пакета за РС рачунаре SPSS for Windows 19 (Statistical Package for the Social Sciences for Windows, SPSS Inc. USA).

4. РЕЗУЛТАТИ

4. 1. Демографске карактеристике и структура пацијената

Студијску групу чинило је 75 пацијента са планоцелуларним карциномом главе и врата. Средње старосно доба ових пацијената било је 60.6 година, а распон се кретао од 41. до 84. године. Више од две трећина пацијената је било старосног доба између 50. и 65. година. Тек 10 пацијената било је старости изнад 70 година (графикон 1).

Графикон 1. Старосна дистрибуција пацијената у студијској групи



У групи пацијената оболелих од планоцелуларног карцинома главе и врата, 85% чинили су мушкарци, а 15% жене. Просечно старосно доба било је мање код жена него код мушкараца (56 наспрам 61 година), али Т тестом није утврђена статистички значајна разлика међу испитаницима различитих полова ($p=0,054$).

У табели 3 приказани су старосно доба, полна дистрибуција, статуси конзумирања дувана и алкохола, и фреквенција генотипова HIF-1 α испитаника из студијске и контролне групе.

Табела 3. Социо-демографске карактеристике и генотипска дистрибуција HIF-1 α испитаника из студијске и контролне групе

Параметар	Студијска група, N=75	Контролна група, N=100	р вредност
Старосна доб	60,61 \pm 8,01	58.85 \pm 6.35	0.106
Пол	М 64 Ж 11	М 81 Ж 19	0.453
Никотински статус	Да 59 Не 16	Да 66 Не 34	0.0657
Алкохолни статус	Да 29 Не 46	Да 2 Не 73	0.101
C1772T	CC 54 CT 21 TT 0	CC 80 CT 20 TT 0	0.215
G1790A	GG 73 GA 2 AA 0	GG 97 GA 3 AA 0	0.897

Употребом Т теста за независне узорке, утврђено је да није постојала статистички значајна разлика у старосном добу између испитаника из студијске и контролне групе. Тестом о процентуалној заступљености установљено је да не постоји сигнификантна разлика у полној дистрибуцији између студијске и контролне групе. Статистичка значајност није постигнута ни у разликама у пушачким навикама и конзумирању алкохолних пића.

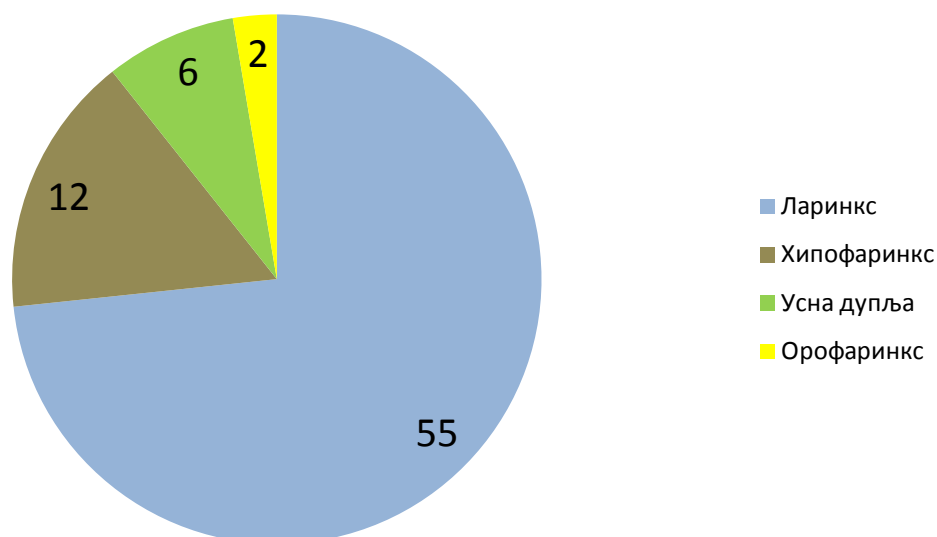
Коришћењем goodness of fit χ^2 теста за биалелне генетске маркере утврђено је да дистрибуција генотипова полиморфизама гена за HIF-1 α у контролној групи здравих испитаника није одступала од Hardy-Weinberg еквилибријума. Упоређивањем фреквенција генотипова полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 α између поменутих група није нађена статистички значајна разлика (редом, $p=0.215$ и $p=0.897$).

4. 2. Клиничко-патолошке карактеристике пацијената

4. 2. 1. Локализација примарног тумора

У испитивању су учествовали болесници са планоцелуларним карциномом главе и врата, а примарни тумор је био локализован у гркљану, ждрелу или усној дупљи (графикон 2).

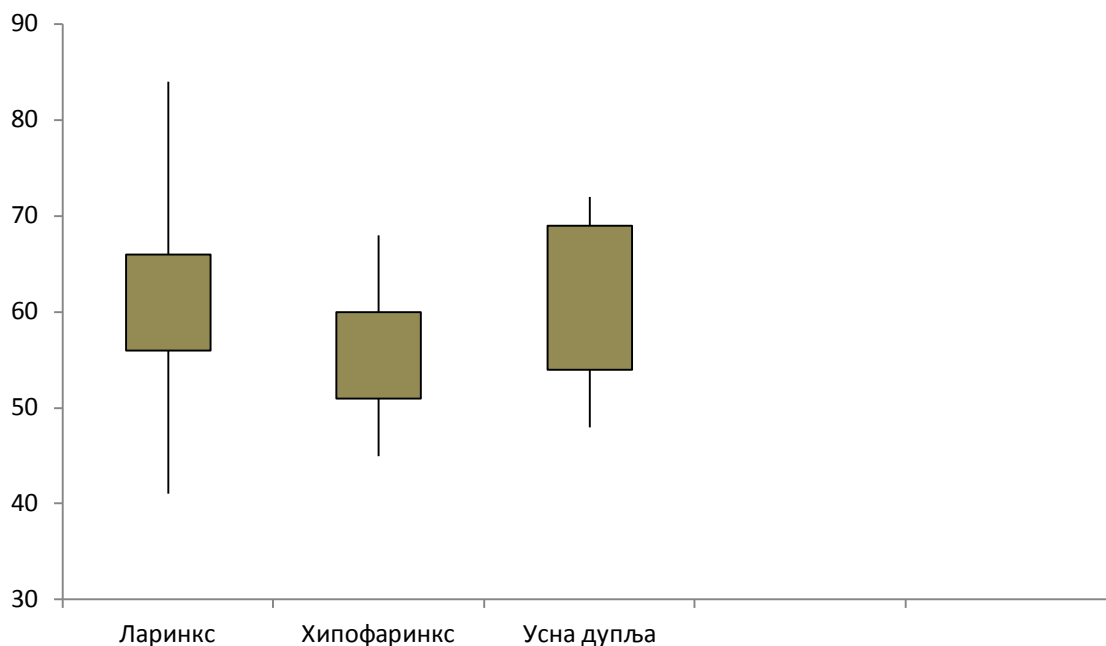
Графикон 2. Заступљеност локализација примарног карцинома



Примарни тумор је био локализован у гркљану код 73 % пацијената. Чак 84 % пацијената са тумором ларинкса су били пушачи. Међутим, употребом Pearson χ^2 теста није утврђен утицај пушачког статуса на примарно место планоцелуларног карцинома ($p=0.750$).

Просечно старосно доба пацијента са карциномом ларинкса износило је 61.3, хипофаринкса 55.7, а усне дупље 61 година. На графикону 3 приказане су средње вредности узраста, интерперцентилни опсег и однос минимум-максимум код болесника.

Графикон 3. Старосно доба пацијената у односу на локализацију примарног тумора



Међутим, једнофакторском анализом варијанси, није утврђена статистички значајна разлика у старосној доби међу пацијентима подељених у групе према локализацији примарног тумора ($p=0.190$).

4. 2. 2. Класификација тумора

Тумори су категоризовани према препорукама међународне TNM класификације (VII издање, UICC). Примарни тумори су према величини подељени у 3 групе:

- Мали тумори (T1 или T2 стадијум) - Метод избора у лечењу је хируршки приступ.
- Средње-велики тумори (T3 стадијум) - Веома често је потребан комбиновани терапеутски приступ, тј. након оперативног лечења спроводи се специфична онколошка терапија.
- Велики тумори (T4 стадијум) – Одмакли стадијум малигне болести.

Према постојању регионалних метастаза у лимфним чворовима врата, болесници су подељени у две групе:

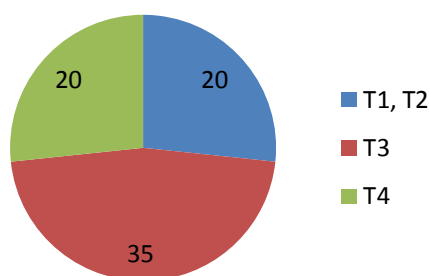
- N0 - одсутне регионалне метастазе
- N1, N2, N3 - присутне регионалне метастазе

У испитивању нису били укључени пацијенти са удаљеним метастазама у организму, обзиром да они захтевају другачији терапијски приступ који не подразумева увек ресекцију примарног тумора.

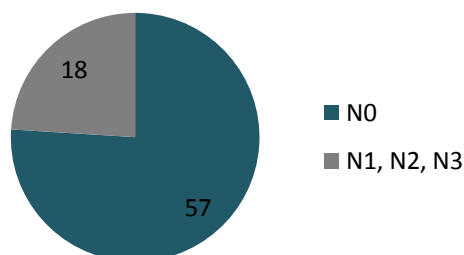
Клиничке карактеристике тумора су такође подељене у категорије, у сагласности са класификацијом АЈСС (American Joint Committee on Cancer). Патолошке карактеристике тумора рефлектују њихов степен диферентованости, на основу чега су категорисани у 3 стадијума (слабо, средње, добро диферентовани тумори).

Клиничко-патолошке карактеристике болесника од HNSCC приказане су на графиконима 4-7.

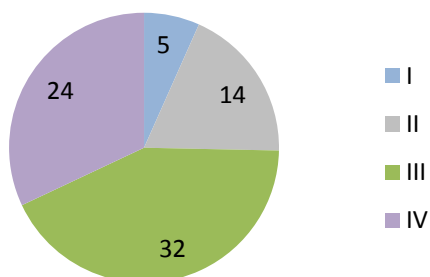
Графикон 4. Т стадијуми тумора



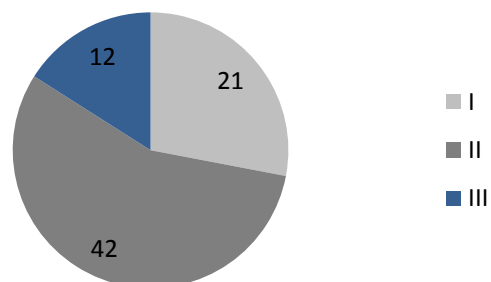
Графикон 5. N стадијуми тумора



Графикон 6. Стадијум према АЈСС



Графикон 7. Хистолошки градус тумора



Неки фактори као што су пол, конзумирање дувана или хистолошки градус би могли да утичу на стадијум тумора приликом започињања терапијског протокола (табела 4.)

Табела 4. Односи клиничких карактеристика тумора са хистолошким градусом тумора, пушачким навикама и полном дистрибуцијом.

		Т статус			N статус	
		T1 или T2	T3	T4	N0	N1-N3
Пол	Ж	6	5	0	9	2
	М	14	30	20	48	16
Пушење	Не	5	7	4	12	4
	Да	15	28	16	45	14
Хистолошки градус	1	8	6	5	13	6
	2	9	25	10	37	7
	3	3	4	5	7	5
	Укупно	20	35	20	57	18

Обзиром да је хистолошки градус тумора мера његове диферентованости, тј. означава процентуалну заступљеност атипичних ћелија у туморском ткиву, испитивана је његова корелација са величином тумора и није утврђена статистички значајна повезаност.

Утицај полне дистрибуције и навика конзумирања дувана на величину примарног тумора и регионално метастазирање је испитиван уз помоћ Pearson χ^2 теста и потврђено је да су болесници мушког пола имали већи Т стадијум тумора у односу на болеснице ($p=0.027$), али полна дистрибуција није показала утицај на N стадијум тумора ($p=0.625$). Пушење се показало као фактор без утицаја на стадијум планоцелуларног карцинома у тренутку започињања терапијског протокола.

4. 3. Односи полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 α

Код 21 пацијента студијске групе утврђено је присуство неког од два истраживана полиморфизма гена за HIF-1 α . Заправо, полиморфизам P582S је био присутан код свих ових пацијената, док је A588T нађен код 3 пацијента и то увек у комбинацији са претходним полиморфизмом. Дакле, испољени утицај полиморфизама одражава дејство полиморфизма P582S, док самостални утицај A588T није могуће утврдити на основу приложених резултата.

Табела 5. Однос полиморфизама гена за HIF-1 α са конзумирањем алкохолних пића, никотинским статусом и полном дистрибуцијом пацијената

Полиморфизам	Алкохол		Никотински статус		Пол		N
	Да	Не	Да	Не	М	Ж	
Да	11	10	17	4	19	2	21
Не	18	36	42	12	45	9	54

Користећи χ^2 тест за табеле контингенције није утврђена статистички значајна повезаност између полиморфизама P582S или A588T гена за HIF-1 α са једне стране и конзумирања дувана или алкохола са друге стране (редом p вредности износе: 0,186; 0,744).

У испитивању релација између полиморфизама и клиничко-патолошких својстава планоцелуларних карцинома главе и врата, користили смо претходну поделу болесника према величини примарног тумора, присуству регионалних метастаза или хистолошком градусу тумора, што је приказано у табели 6.

Табела 6. Однос између полиморфизама гена за HIF-1 α и клиничко-патолошких карактеристика тумора

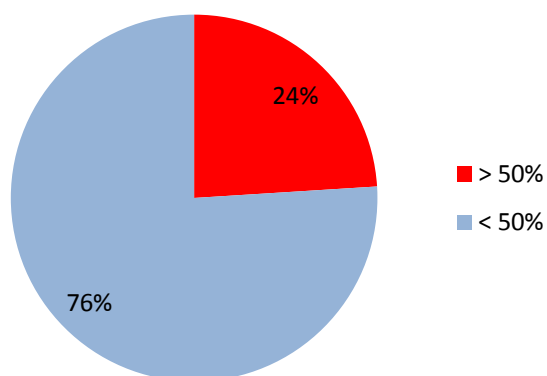
Полиморфизам	Хистолошки градус			Т статус тумора			N статус тумора		Стадијум болести				
	I	II	III	T1	T2	T3	T4	N0	N1-3	I	II	III	IV
Да	6	12	3	5	10	6		16	5	5	9	22	18
Не	15	30	9	15	25	14		41	13	0	5	10	6

Резултати након спроведеног χ^2 теста за табеле контингенције не потврђују статистичку значајност у повезаности између постојања полиморфизма и хистолошког градуса тумора, Т или N статуса тумора, као и стадијума болести. То би значило да не постоји значајан утицај испитиваних полиморфизама гена за HIF-1 α на клиничке одлике тумора у тренутку започињања терапије.

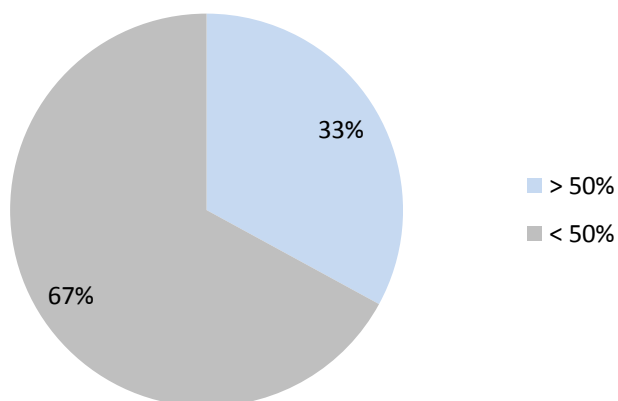
4. 4. Односи експресије протеина HIF-1 α

Пацијенти су подељени према експресији HIF-1 α на групу са израженом експресијом (преко 50%) и на групу са слабијом експресијом (испод 50%). Такође праћена је експресија у једру и у цитоплазми, а као позитиван догађај сматрано је постојање експресије веће од 50% у једру или цитоплазми.

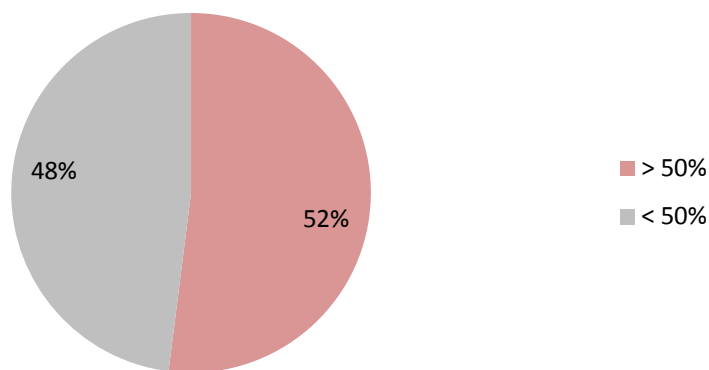
Графикон 8. Процентуална заступљеност експресије HIF-1 α у ћелијском једру код пацијената са планоцелуларним карциномом главе и врата



Графикон 9. Процентуална заступљеност експресије HIF-1 α у ћелијској цитоплазми код пацијената са планоцелуларним карциномом главе и врата



Графикон 10. Процентуална заступљеност укупне експресије HIF-1 α у туморском ткиву код пацијената са планоцелуларним карциномом главе и врата



Табела 7. Односи експресије протеина HIF-1 α и полне дистрибуције, локализације тумора и конзумирања дувана

		HIF-1 α		p вредност
		<50 %	>50 %	
Пол	М	8	3	0.171
	Ж	28	36	
	Укупно	36	39	
Пушење	Да	8	8	1.000
	Не	28	31	
	Укупно	36	39	
Локализација	Ларинкс	25	30	0.105
	Хипофаринкс	6	6	
	Усна дупља	5	1	
	Орофаринкс	0	2	
	Укупно	36	39	

Табела 8. Односи укупне експресије протеина HIF-1 α и клиничко-патолошких карактеристика тумора

Експресија HIF-1 α	T			N		Хистолошки градус		
	T1,T2	T3	T4	N0	N1-N3	I	II	III
> 50%	11	18	10	29	10	8	23	8
< 50%	9	17	10	28	8	11	21	4

У табелама 7 и 8 приказана је повезаност између укупне експресије HIF-1 α протеина и полне структуре болесника, локализације примарног тумора, навика у конзумирању дувана, и клиничко-патолошких карактеристика болесника.

На основу приказаних резултата, користећи χ^2 тест, може се закључити да не постоји статистички значајна повезаност експресије HIF-1 α са величином примарног тумора ($p=0,947$), затим са присуством регионалних метастаза ($p=0,791$), као ни хистолошким градусом малигног тумора ($p=0,41$). Дакле, експресија протеина HIF-1 α у туморском ткиву не утиче на клиничко-патолошке карактеристике планоцелуларних карцинома главе и врата у моменту започињања протокола лечења.

Статистички није утврђена значајна корелација између експресије протеина HIF-1 α у туморском ткиву и густине крвних судова, док је релација између експресија протеина HIF-1 α и VEGF у туморском ткиву врло блиска статистичкој значајности - табела 9.

Табела 9. Односи експресија протеина HIF-1 α , VEGF и MVD

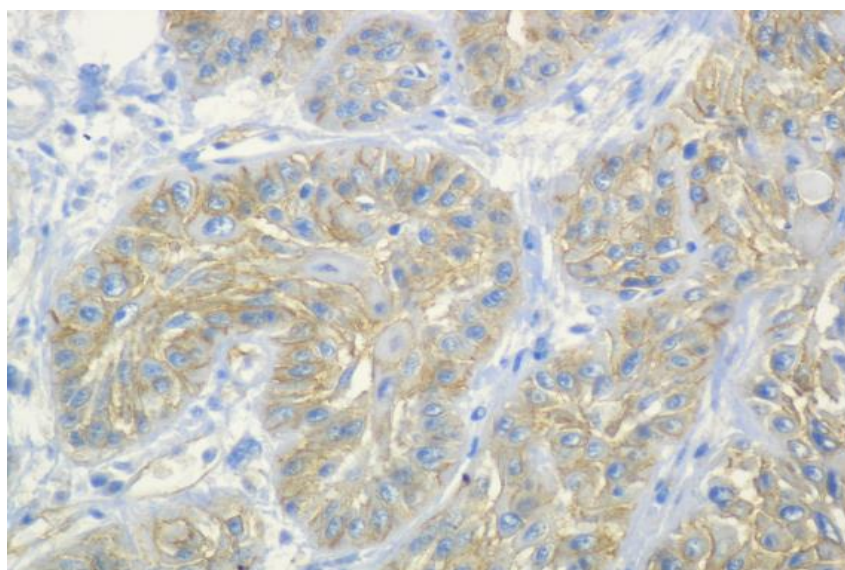
		HIF-1 α		p вредност
		< 50 %	> 50 %	
VEGF	< 50 %	27	22	0.091*
	> 50 %	9	17	
	Укупно	36	39	
MVD	< мед	17	20	0.725
	> мед	19	19	
	Укупно	36	39	

* блиско граничној вредности

4. 5. Односи експресије протеина VEGF

Имонохистохемијски налаз високог нивоа експресије протеина VEGF у туморским ћелијама приказан је на слици 6.

Слика 6. Високи ниво VEGF експресије у ћелијама HNSCC



На исти начин којим је то учињено код експресије фактора индукованим хипоксијом, испитаници су подељени на две групе и на основу експресије VEGF.

Табела 10. Однос експресије протеина VEGF и клиничко-патолошких карактеристика тумора

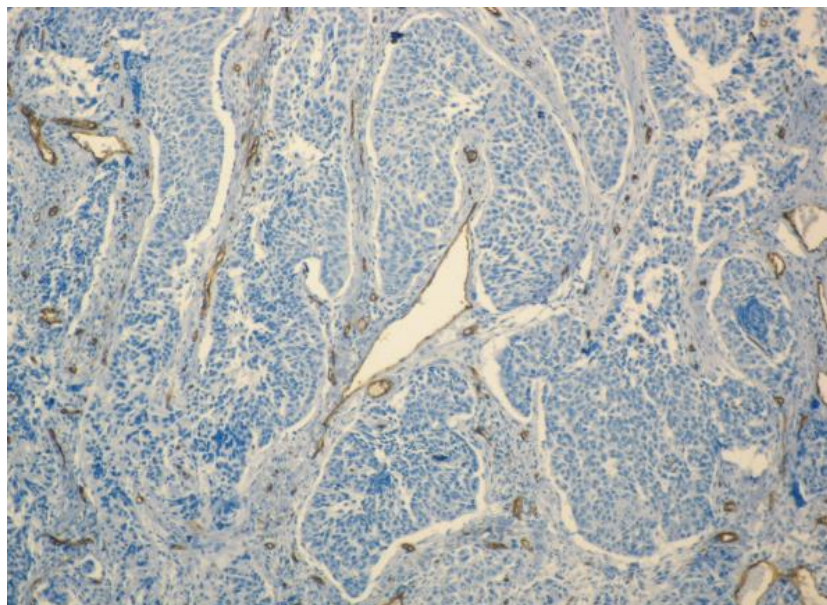
VEGF	T			N		Стадијум			
	T1,T2	T3	T4	N0	N1-N3	I	II	III	IV
Експресија > 50%	5	12	9	19	7	1	4	12	9
Експресија < 50%	15	23	11	38	11	4	10	20	15

Ниво експресије VEGF није показао статистички значајан утицај на стадијум малигне болести ($p=0.825$), регионални метастатски статус пацијената ($p=0.410$) и величину примарног тумора ($p=0.778$). Дакле, ни експресија протеина VEGF у туморском ткиву не утиче на клиничке карактеристике планоцелуларних карцинома главе и врата у моменту започињања протокола лечења.

4. 6. Односи вредности микроваскуларне густине туморског ткива

Приликом одређивања MVD, у детекцији ендотелних ћелија туморске микроваскулатуре коришћено је CD34 антитело. Вредности MVD су мерене према Weidner-овој методи којом се посматрају изоловани региони високе концентрације крвних судова, тзв. „врућа места“. На слици 7 приказан је имунохистохемијски налаз експресије CD34.

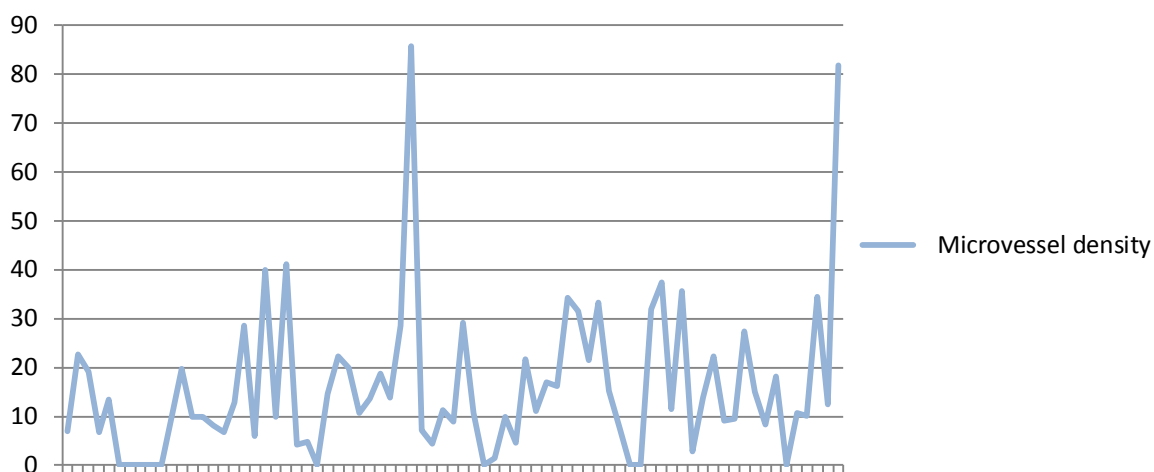
Слика 7. Интензивна CD34 имунореактивност у HNSCC ћелијама



Вредности густине крвних судова су варирале до максималне вредности од 86, а медијана је износила 12. Иако је вредност медијане код мушкараца износила 11.77, а код жена 18.14, статистички значајна разлика међу вредностима овог параметра према полу испитаника није утврђена (Mann-Whitney тест, $p=0.301$).

Дистрибуција густине крвних судова код болесника је приказана на графикану 11.

Графикон 11. Вредности MVD код болесника



Употребом Mann-Whitney теста није утврђена значајна разлика међу вредностима густине крвних судова међу пушачима и непушачима ($p=0,383$). Након израчунавања Spearman-овог коефицијента, утврђена је значајна корелација између вредности MVD и старости болесника ($p=0,006$).

Табела 11. Вредности микроваскуларне густине према никотинском статусу

Никотински конзумент	Средња вредност MVD	Медијана	Највећа вредност MVD
Да	17.73	12,77	86
Не	13.06	10,66	29

Иако су средње вредности густине крвних судова биле различите према величини примарног тумора, присуству регионалне метастазе или стадијуму болести, Mann-Whitney и Kruskal Wallis тест нису показали статистичку значајност те разлике. Вредности MVD и број крвних судова на тестном пољу од $0,366 \text{ mm}^2$ имале су статистички значајну корелацију, што говори у прилог комплементарности ове две методе у процени васкуларизованости ткива ($p=0,039$).

Испитивана је повезаност између густине крвних судова са једне стране и експресије HIF-1 α и VEGF у туморском ткиву са друге стране. Вредности су приказане у табелама 12 и 13.

Табела 12. Односи експресије HIF-1 α и MVD

	HIF-1 α	Вредност	
MVD	<50%	Средња вредност	16.425
		95% Интервал поверења	12.925 – 19.916
		Медијана	12.500
		Минимум	0.000
		Максимум	81.740
	>50%	Средња вредност	17.727
		95% Интервал поверења	7.254 – 28.200
		Медијана	10.880
		Минимум	0.000
		Максимум	85.710

Табела 13. Односи експресије VEGF и MVD

		VEGF	Вредност
MVD	<50%	Средња вредност	19.222
		95% Интервал поверења	14.323 – 24.121
		Медијана	13.640
		Минимум	0.000
		Максимум	85.710
	>50%	Средња вредност	12.045
		95% Интервал поверења	8.050 – 16.040
		Медијана	10.355
		Минимум	0.000
		Максимум	41.100

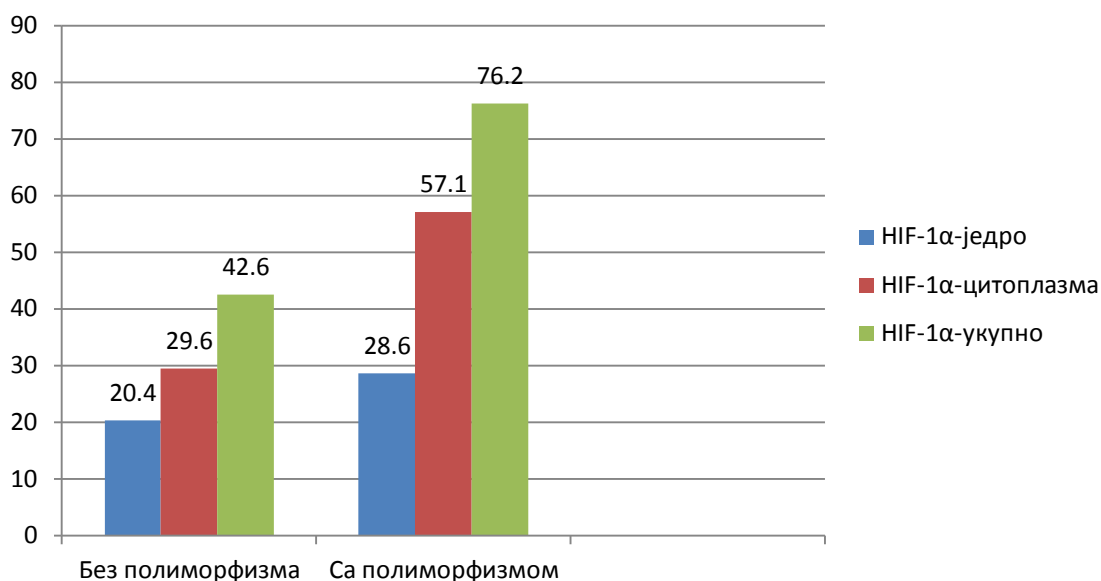
Mann-Whitney тестом није утврђена асоцијација између MVD и експресије HIF-1 α ($p=0.602$), док је у случају корелације са експресијом VEGF добијена гранична вредност ($p=0.055$), која се и регресионом анализом показала као могући предиктор повећане густине крвних судова ($p=0.052$).

4. 7. Утицај полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 α на експресију протеина HIF-1 α , VEGF и вредност MVD

Имунохистохемијским методама, детекцијом моноклонског анти-хуманог антитела на HIF-1 α одређивана је експресија протеина HIF-1 α у једру, цитоплазми и као и укупна ћелијска експресија.

На графикону 12 приказана је процентуална заступљеност болесника са и без полиморфизама гена за HIF-1 α који имају повећану експресију протеина HIF-1 α у ћелијском једру, цитоплазми или укупну експресију.

Графикон 12. Експресија HIF-1 α у једру, цитоплазми и укупна експресија код болесника са и без полиморфизама.



Табела 14. Утицај полиморфизама на експресију HIF-1 α , VEGF и MVD

	χ^2	p
HIF-1α (укупно)	6.84	0.011*
HIF-1α (нуклеус)	0.33	0.563
HIF-1α (цитоплазма)	4,89	0.035*
VEGF	4,04	0,06 ⁺
MVD у везиву	0.49	0.609

* статистичка значајност

⁺ гранична вредност значајности

У табели 14 су приказани резултати испитивања корелације између присуства полиморфизма гена за HIF-1 α и експресије протеина HIF-1 α , VEGF и MVD, уз помоћ χ^2 теста за табеле контингенције.

Логистичком регресионом анализом испитивана је предикторна улога присуства полиморфизма P582S и A588T гена за HIF-1 α на екстензивност клиничко-патолошких карактеристика планоцелуарних карцинома главе и врата, затим на повећану

експресију протеина HIF-1 α и VEGF, као и на повећану густину туморских крвних судова. У првом делу логистичке регресионе анализе учињена је униваријантна логистичка регресија, чији су резултати приказани у табели 15.

Табела 15. Резултати једнофакторске логистичке регресије

	p	Exp(B)	95% C.I.
HIF-1α (укупно)	0.012*	4.31	1.38 - 13.48
HIF-1α (нуклеус)	0.564	1.40	0.45 - 4.39
HIF-1α (цитоплазма)	0.030*	3.17	1.12 – 8.99
VEGF	0.048 ⁺	2.86	1.01 – 8.12
MVD	0.485	1.44	0.62 – 3.97

* статистичка значајност

⁺ гранична вредност

Параметри који су постигли статистичку значајност били су укупна експресија протеина HIF-1 α и експресија HIF-1 α у цитоплазми. Граничну вредност статистичке значајности имао је и параметар експресије VEGF. Статистички значајан утицај фактора добијен униваријантном анализом објашњава утицај тог фактора, али у присуству свих осталих фактора. Фактори који су се униваријантном анализом показали као значајни улазили су у мултиваријантни регресиони модел, где је испитивана независност утицаја сваког фактора који се показао као значајан у претходном моделу.

Овим накнадним статистичким моделом, није утврђена значајна независна повезаност ниједног од поментих фактора са постојањем полиморфизама. Униваријантном и мултиваријантном регресионом анализом израчунава се и релативни ризик који је заправо мера повезаности могућег узрока и очекиване последице. Дакле, појава полиморфизма гена за HIF-1 α ствара више од 4 пута већу вероватноћу од повећане укупне експресије протеина HIF-1 α , а истовремено и 2.86 пута од повећане експресије протеина VEGF.

5. ДИСКУСИЈА

До данас је откривено више од 100 директних циљних гена HIF-1 који су у функционалном смислу повезани са туморским метастазирањем, ангиогенезом, енергетским метаболизмом, ћелијском пролиферацијом и апоптозом (133).

Метастазирање и инвазивност су главне карактеристике малигнух тумора и примарни узрок леталног исхода онколошких болесника. Да би малигне ћелије стекле инвазивније карактеристике, мора доћи до молекуларне реорганизације на површини ћелије, што нарушава контакт са базалном мембраном и омогућава повезивање са претходно непознатим молекулима екстрацелуларног матрикса. Интегрини су најважнији адхезиони рецептори који посредују у ћелијској интеракцији са протеинима екстрацелуларног матрикса. Корелација између интегринских рецептора и туморске инвазивности је испитана код разних врста карцинома, међу којима су и орални планоцелуларни карциноми (134). Хипоксија, посредством HIF-1 α , изазива повећану експресију $\alpha 5$ интегрина и фибронектина, чија је интеракција одговорна за израженију ћелијску инвазивност (135, 136). Инвазивност тумора је потпомогнута епително-мезенхималном транзицијом коју карактерише смањена експресија епителних маркера (E-cadherin, cytokeratin) и/или повећана експресија мезенхималних маркера, попут виментина или фибронектина. EMT је изазвана инхибиторним дејством на E-кадхерин посредством регулатора као што су Snail, Zeb1, SIP1, Slug, E47 или TWIST (137). Есенцијална улога транскрипционог фактора TWIST у настанку метастаза је добро описана у литератури (138). Везујући се за HRE (Hypoxic Response Element) унутар проксималног промотера гена за TWIST, HIF-1 директно активира експресију TWIST-а и индукује EMT. Ова активација представља један од главних механизма туморске прогресије и метастазирања изазваних хипоксијом. Yang и сарадници су показали да коекспресија HIF-1 α , Twist и Snail у примарним планоцелуларним карциномима главе и врата корелира са развојем метастатских депозита и гором прогнозом ових пацијената (139). Тиме су наслутили активну улогу HIF-1 α сигналних путева на прогресију и метастазирање HNSCC и то преко регулације експресије TWIST-а. И други гени, укључујући ген за CCR7 (CC chemokine receptor 7) поседују HRE елемент, који представља везујуће место за HIF-1. CCR7 рецептор за хемокине показује експресију на разним врстама Т-ћелија, на В-ћелијама и зрелим дендритичним ћелијама, а има

способност везивања за лиганде CCL19 и CCL21. Интеракција са лигандима има кључну улогу приликом уласка у лимфне чворове током имунолошких и инфламаторних процеса (140). Експресија CCR7 је потврђена код примарних и метастатских карцинома главе и врата (141). HIF-1 и HIF-2, индуковани хипоксијом, препознају HRE у гену за CCR7 и активирају транскрипцију овог гена. Повећањем експресије CCR7, фактори индуковани хипоксијом потпомажу настанак малигнијих фенотипских форми HNSCC (142).

Туморске ћелије се карактеришу преласком са оксидативног метаболизма на анаеробне гликолитичке метаболичке путеве, што је познато као Warburg-ов ефекат. У малигним ћелијама, HIF-1 α изазива прекомерну експресију и повећану активност неколико гликолитичких протеинских изоформи које се разликују од оних у нормалним ћелијама, укључујући транспортере (GLUT1 и GLUT3) и ензиме (HKI, HKII, PFK-L, ALD-A, ALD-C, PGK1, ENO-alpha, PYK-M2, LDH-A, PFKFB-3). Ове изоформе омогућавају ћелијама карцинома смањену осетљивост на физиолошке инхибиторе, нижи афинитет за неке продукте и већи каталитички капацитет у поређењу са изоформама у нормалном ткиву. HIF-1 α такође може код неких тумора мењати митохондријалну функцију и употребу кисеоника помоћу инактивације пируват дехидрогеназе или може повећати оксидативну фосфорилацију регулацијом експресије субјединице 4 cytochrome c oxidase (143). Група аутора из Мексика је 2009. године претпоставила да би циљна терапија усмерена на глукозне транспортере индуковане активношћу HIF-1 α могла бити ефикаснија него циљна терапија усмерена на HIF-1 α (143). Mxi1, антагониста c-Мус је такође идентификован као циљни ген за HIF-1 комплекс и у ћелијама карцинома супроставља се апоптози, посредованој c-Мус сигналним путевима (144). Притом, ради се о добро координисаном механизму индукованим хипоксијом, којег карактерише смањење нивоа c-Мус и индукција Mxi1 уз доминантан ефекат транскрипционе активности HIF-1.

Описаним утицајима на циљне гене, активном регулацијом ангиогенезе, ћелијске пролиферације и апоптозе, као и другим механизмима од којих су неки и даље недовољно разјашњени, HIF-1 у малигним ткивима посредује у готово свим догађајима изазваним хипоксијом. Утицај два најважнија SNP у гену за HIF-1 α , P582S и A588T, који остварују код различитих врста карцинома широко је истраживана (145-149). Нађено је да ове варијантне форме утичу на подложност настанка бројних тумора, мада

су резултати истраживања о њиховој повезаности са ризиком од малигног обољевања недоследни, чак и контрадикторни.

Мета-анализе су моћни инструменти за сумирање резултата различитих студија и пружају нам поузданије резултате од појединачних случај-контрола студија (150). Једна оваква студија спроведена од стране Не и сарадника, обухвативши преко 10.000 случајева, доказала је да присуство Т алела у С1772Т значајно повећава ризик од настанка малигног тумора (151). Слична мета-анализа из 2013. године показује значајну корелацију између G1790А генотипа и настанка разних врсти карцинома (147). Ови полиморфизми би могли да доведу до пораста трансактивационе способности HIF-1 α , узрокујући повећану експресију гена зависних од хипоксије. На тај начин омогућени су туморско преживљавање и пролиферација кроз стимулацију неоваскуларизације, прелазак на анаеробне метаболичке путеве, пролиферација карциномских стем ћелија, епително-мезенхимална транзиција, избегавање имунолошког одговора организма домаћина итд.

Иако је познато да су планоцелуларни карциноми главе и врата знатно чешће дијагностиковани код мушкараца, резултати поменуте студије су указивали да је ризик израженији код испитаника женског пола. Овакав исход могао би се објаснити утицајем естрогена на повећану експресију HIF-1 α преко Akt сигналног пута, који узрокује повећану ангиогенезу и туморску инвазивност, као и узимањем у обзир карцинома органа специфичних женском полу, попут карцинома оваријума, цервикса или дојке (152, 153).

Очигледна повезаност полиморфизма у гену за HIF-1 α и повећаног ризика од малигног обољевања пронађена је код карцинома цервикса, панкреаса, бубрега, али и главе и врата (151). Резултати истраживања доступних у литератури успостављају повезаност између варијантних алела у гену за HIF-1 α и напредних стадијума планоцелуларног карцинома главе и врата (154). Са друге стране, поједини аутори пружају статистички значајне доказе да P582S и A588T полиморфизми не утичу на клиничко-патолошке карактеристике HNSCC, али су индикатори лошије прогнозе (155, 156). Резултати ове студије потврђују да не постоји значајна корелација између полиморфизама у гену за HIF-1 α и својстава тумора као што су клинички стадијум, величина тумора, присуство метастаза у регионалним лимфним чворовима, као и стадијум ћелијске диференцијације. Miyoshi је, покушавајући да објасни оваква запажања, показао да хипоксични стрес повећава инвазивност и метастазирање

карцинома уз помоћ позитивне регулације MMP протеина од стране HIF-1 α независних путева (157). Свакако да клиничке карактеристике карцинома, између осталог зависе и од изгубљеног времена од појаве тегоба до постављања дефинитивне дијагнозе, од локализације тумора, имунолошког статуса пацијента, изложености факторима ризика и генетске предиспозиције. Претпоставља се да активација HIF-1 α сигналних путева може бити свеprisутни догађај током карциногенезе планоцелуларних карцинома главе и врата, мада су виши нивои експресије HIF-1 α очигледно повезани са терапијским неуспехом (158).

Lin и сарадници су испитивали предикторну улогу HIF-1 α код пацијената оболелих од оралног планоцелуларног карцинома (154). Како би утврдили утицај који овај транскрипциони фактор показује на прогресију карцинома, упоређивали су експресију протеина HIF-1 α у једру међу препаратима оралног карцинома, епителних дисплазија различитог степена и нормалне слузнице. Средње вредности индекса експресије HIF-1 α у једру су биле у значајном порасту од нормалне оралне слузнице, преко епителне дисплазије, до узорака планоцелуларног карцинома. Такође постојао је градицијски однос експресије при поређењу благе, средње и тешке дисплазије. Овакви резултати указују да је експресија HIF-1 α рани догађај у оралној карциногенези. Закључак поменутог истраживања има утемељење у чињеници да је експресија HIF-1 α израз хипоксије, те је највише испољена у туморима у експанзији, што обично подразумева ране форме карцинома. Када би овај однос био линеаран и тако једноставан, велики тумори са већ формираном неоваскуларном мрежом би имали мању експресију протеина HIF-1 α , што врло често није случај. Заправо, доња граница подношљивости хипоксије након које наступа некроза туморског ткива, као и реакција тумора на хипоксију су релативни појмови који у великој мери зависе од врсте здравог ткива од кога је тумор настао, патохистолошког типа тумора, као и туморске локализације. Сматрајући да је утицај интратуморске хипоксије сигнификантан код почетних форми тумора T1 или T2 стадијума, Munoz-Guerra је утврдио значајну разлику у експресији протеина HIF-1 α код ових тумора у односу на DNK узорке здравих добровољаца (120). Такође потврдио је и да је постојање A588T полиморфизма предиктор неповољне прогнозе оралних планоцелуларних карцинома у раним стадијумима. То значи да би циљна терапија усмерена против HIF-1 α дала знатно слабије резултате код напредних форми карцинома, што је и случај и код досадашњих терапеутских модалитета који подразумевају хируршку ресекцију, радиотерапију или

хемиотерапију. Ако би постојали поуздани докази о тачности претходне тврђе, могло би се поставити питање оправданости развијања циљне терапије против HIF-1 α .

У овом испитивању није нађена статистички значајна разлика експресије протеина HIF-1 α у нуклеусу између тумора T1 или T2 стадијума са једне стране и T3 или T4 тумора са друге стране. Такође, није утврђено постојање разлике у нуклеарној HIF-1 α експресији између тумора N0 стадијума и оних који су дали регионалне метастатске депозите. Као што је потврђено већим бројем студија новијег датума, експресија HIF-1 α не може бити предиктор прогресије HNSCC, али би кроз утицај на релапс малигне болести могла бити предиктор лоше прогнозе.

Прогностички значај полиморфизама гена за HIF-1 α и разматрање HIF-1 α у смислу добре генетске мете за циљну молекуларну терапију код одмаклих стадијума тумора су предмети дискусије. Упркос оствареном изванредном напретку, механизми којима полиморфизми у гену за HIF-1 α утичу на фенотипске карактеристике тумора и исход малигне болести и даље нису потпуно јасни. Малигни тумори могу настати након активације онкогена, или деактивацијом тумор супресорских гена и захтевају ћелијску трансформацију коју готово сигурно да P582S и A588T полиморфизми не могу да остваре. Већа је вероватноћа да полиморфизми утичу на нека својства претходно формираних тумора, као што су развојни потенцијал и инвазивност.

Једнонуклеотидни полиморфизми P582S и A588T у гену за HIF-1 α су повезани са повећаном експресијом HIF-1 α . Tanimoto и сарадници су објавили значајну корелацију повећане транскрипционе активности са CT или GA генотипом код карцинома главе и врата (159). Активација HIF-1 α је процес састављен од више корака, те је могуће дискутовати о неколико механизма повећане трансактивације. Замењене аминокиселине се код варијантних форми HIF-1 α протеина налазе унутар или веома близу N-TAD домена који реагује са E3 убиквитин лигазом. Могуће је да конформационе промене настале аминокиселинском супституцијом утичу на стабилност протеина и да на тај начин остварују повећану транскрипциону активност. Још једно од могућих објашњења јесте да измене аминокиселина утичу на додатно ангажовање транскрипционих кофактора CBP/p300 или SRC-1. Потребна су даља истраживања како би се потпуно расветлио утицај полиморфизама на експресију HIF-1 α протеина.

Могуће је да HIF-1 α испољава свој утицај на развој карцинома тако што потенцира дејство постојећих егзогенних неповољних фактора. Употреба дувана и

конзумирање алкохола представљају најзначајније факторе ризика за настанак карцинома главе и врата (21-28). Претходним студијама доказан је синергистички ефекат полимофизама гена за HIF-1 α и утицаја околине, превасходно дувана и алкохола (160). Lin и сарадници су 2008. године објавили да поменути два фактора ризика значајно повећавају ниво експресије HIF-1 α код болесника оболелих од оралног планоцелуларног карцинома (154). Испитивања на пацовима показала су статистички значајну повезаност између изузетно великих количина етанола и високе експресије HIF-1 α mRNA (161). Даље, утврђено је да етанол изазива повећање експресије HIF-1 α протеина али не и mRNA у хуманим мастоцитним ћелијским линијама (162). Дакле, висока експресија протеина HIF-1 α у оралним карциномима може настати као последица директне стимулације малигнућ ћелија алкохолем присутним у крви пацијента. Дуготрајна употреба дувана може изазвати инсуфицијентан доток крви ка тумору и следствено стварање хипоксичних региона унутар туморског ткива, који за узврат могу резултовати високим нивоом експресије HIF-1 α у оралним планоцелуларним карциномима. Ово је нарочито изражено код болесника са варијантним генотиповима HIF-1 α који доприносе интеракционим ефектима између полиморфизама гена за HIF-1 α и дувана или алкохола, повећавајући ризик од настанка оралног карцинома.

У нормалном плочасто-слојевитом епителу слузнице, HIF-1 α бојење се преобладајно може запазити у спинозном слоју, а знатно ређе у базалном или површинским слојевима. У препаратима епителне дисплазије постоје варијације, мада HIF-1 α се може детектовати у готово свим слојевима, док се у узорцима планоцелуларног карцинома може видети фокална или дифузна експресија. У случајевима фокалне експресије, највећа концентрација постоји у окружењу поља некрозе или ћелијске кератинизације. Ова појава би такође могла да утиче на налаз високе HIF-1 α експресије код одмаклих стадијума карцинома, обзиром да је некроза чешће налаз код великих него код малих примарних тумора. У овом испитивању узимани су репрезентативни ткивни узорци ван подручја туморске некрозе, како би се избегао утицај непригодног узорковања.

Ранија истраживања указивала су на значајан ефекат VEGF и неоваскуларизације на туморски раст и метастазирање (163-165). Упркос значајним сазнањима о механизмима који утичу на ангиогенезу, метастатско ширење и релапс након ресекције примарног тумора и придружених лимфних нодуса и даље представља

главни проблем у клиничкој онкологији (166, 167). Стварању секундарних туморских депозита у великој мери доприноси неоваскуларизација, али постоје и други путеви којима тумори стичу већу агресивност. Кључни догађај је настанак интратуморске хипоксије која стабилизацијом HIF-1 активира таргет гене и на тај начин у неповољним условима омогућава преживљавање и пролиферацију малигнућ ћелија.

Најновије истраживање корејских аутора, објављено у фебруару 2014. године извештава о међусобној повезаности експресија HIF-1 α и VEGF, подржавајући концепт присутне активације сигналних путева зависних од хипоксије код карцинома главе и врата, нарочито код HPV-придружених карцинома (157). Као и код HIF-1 α , повећана експресија VEGF у туморском ткиву HNSCC доказана је као показатељ лоше прогнозе, нарочито код локорегионалних напредних стадијума (168). Међутим, подаци о њеној корелацији са величином примарног тумора или присуством метастаза у регионалним лимфним чворовима су двосмислени (169, 170).

Тумори који показују високи ниво експресије VEGF карактеришу се поремећеним процесом ангиогенезе (171). Њихове крвне судове одликује неорганизовано „клијање“, лоша перичитна покривеност као и оштећеност васкуларног интегритета, што дозвољава лакшу интравазацију и дисеминацију малигнућ ћелија (172). Доказано је да компромитован интегритет крвних судова повећава склоност ка метастазирању (173). Са друге стране, тумори са нижом експресијом VEGF и мање израженом ангиогенезом имају веће интеркапиларно растојање и самим тим подложнији су хипоксији, која другачијим путевима може утицати на туморску агресивност. Унутар тумора постоји субпопулација ћелија са предиспозицијом за метастазирање, која у хипоксичним условима подлеже епително-мезенхималној транзицији (EMT, Epithelial to Mesenchymal Transition). HIF-1 α индукован хипоксијом доприноси овој транзицији и тиме подстиче екстензивност клиничких карактеристика карцинома главе и врата (174).

При евалуацији утицаја који фактори индуковани хипоксијом имају на настанак и развој планоцелуларних карцинома главе и врата, требало би узети у разматрање HPV статус. Доказано је да повећана експресија протеина Е6 и Е7 хуманих папилома вируса инхибиторно утиче на p53 сигналне путеве и дестабилизује геном домаћина, омогућавајући опстанак мутација које поспешују даљу карциногенезу независно од вирусног генома (175). Код неких тумора који не показују p53 експресију (p53 негативни тумори) или код носиоца мутације у VHL гену може настати

псеудохипоксија. Овај феномен се одликује HIF-1 α стабилизацијом чак и у нормоксичним условима. У овим случајевима постоји константан високи ниво VEGF експресије, без обзира на парцијални притисак кисеоника у микроокружењу. Овакве аберантне форме HIF-1 α стабилизације такође утичу на немогућност одређивања јасне корелације између VEGF експресије и клиничко-патолошких карактеристика карцинома главе и врата.

У овом истраживању, утицај васкуларизације на својства планоцелуларних карцинома главе и врата употпуњен је одређивањем експресије CD34, тј. MVD који је у ранијој литератури спознат као предиктор лоше прогнозе и као фактор у корелацији са појавом метастатске дисеминације малигног тумора (176, 177). Weidner, који је први осмислио методу израчунавања MVD, 1991. године са сарадницима извештавао је о вредности густине крвних судова у изолованим регионима високе концентрације судова („врућа места“) као добром прогностичком индикатору код карцинома дојке (178). У наредним годинама уследила је експанзија истраживања о MVD као инструменту процене стадијума малигне болести, вероватноћи метастазирања или рецидивирања, затим преживљавања и терапијског одговора (179-184). Насупрот томе, резултати мета-анализе спроведене 2013. године од стране Yu-а и сарадника не иду у прилог повезаности горег петогодишњег преживљавања и MVD (185). Наши резултати подржавају ове закључке, указујући да висока вредност густине крвних судова не мора да буде удружена са већим T или N стадијумом карцинома главе и врата.

Предмет бројних истраживања биле су претпоставке да густина крвних судова у тумору заиста осликава степен туморске ангиогене активности, као и да се на основу MVD може одредити који пацијенти су кандидати за антиангиогену терапију или проценити ефекат тог третмана (186, 187). MVD варира међу различитим врстама тумора и осликава карактеристике здравог ткива од кога је тумор настао, као и новонасталог туморског ткива. Ове варијације не треба интерпретирати са смислом да неки тумори нису зависни од ангиогенезе. Без обзира колика је вредност густине крвних судова, чињеница је да сваки тумор зависи од ангиогенезе, што је доказао Folkman током 90-тих година XX века (188). Према дефиницији, MVD одговара броју крвних судова обојених имунохистохемијским маркером по јединици површине и сходно томе рефлектује интеркапиларно растојање. Стога у туморском ткиву би требало да постоји пропорција између густине крвних судова и броја ћелија подржаних од стране једног крвног суда. Дакле, упркос уобичајеном мишљењу, MVD није мерило

ангиогене активности или функционалног статуса неоваскулатуре, већ једноставно осликава највеће растојање од капилара на коме ћелије могу да преживе (189).

Обзиром да неке туморске ћелије могу имати мање кисеоничне захтеве од нормалних ћелија, тумори могу имати мању вредност MVD од нормалног ткива чијом су трансформацијом настали. Ткиво карцинома колоне показује ниже вредности MVD у односу на коресподентне здраве узорке, док је ситуација потпуно другачија код карцинома простате, обзиром да имају већу густину крвних судова у односу на здраво ткиво (190). Иако у литератури не постоје подаци о разлици у вредности MVD између ткива планоцелуларних карцинома главе и врата и здравог ткива, може се закључити да MVD не може бити показатељ малигне агресивности тумора.

Појава да MVD може имати мању густину крвних судова од здравог ткива може се објаснити чињеницом да туморске ћелије имају слабије захтеве за кисеоником, као и да у хипоксичним условима могу прећи на анаеробне метаболичке путеве, а да при том избегну апоптозу. Дакле, иако укупна васкуларизације тумора брзо расте при туморској експанзији, сама густина крвних судова не мора да буде високе вредности. Из тога следи да не може постојати ни линеарна повезаност између нивоа раста тумора и ефекта антиангиогене терапије, за разлику од конвенционалне хемиотерапије која делује највише на ћелије у пролиферацији.

Познато је да солидни тумори нису у могућности да порасту изван одређених димензија без адекватног ангажмана додатне васкуларизације. Укупан ангиогени утицај туморског микроокружења треба сагледати као суму активности позитивних и негативних регулатора ангиогенезе и зависи од особина туморског и околног здравог ткива. Ниво експресије одређених стимулатора ангиогенезе показује варијације међу појединим туморима и варира током времена и са експанзијом тумора. Стога је извесно да се корелација између MVD и појединачног ангиогеног регулатора не може успоставити код планоцелуларних карцинома главе и врата.

Васкуларизација тумора би требало да осликава његове метаболичке захтеве, мада та корелација у неким случајевима није нимало једноставна. Заправо, метаболички захтеви тумора одређују минимални ниво васкуларизације, а када би тај ниво био нижи, уследила би некроза туморског ткива. Ова појава се некада може манифестовати код појединих тумора, обично у централном делу. За разлику од нормалног ткива, тумори веома често прекомерно развијају васкуларизацију, тј. развијају крвне судове екстензивније него што је потребно за подмирење енергетских

захтева. Такође, код нормалног ткива постоји јасна узрочно-последична повезаност између хипоксије и експресије ангиогених регулатора, док у туморском ткиву фактори ангиогенезе често показују сталну експресију на високом нивоу. Као што је раније поменуто ово се посебно може запазити код тумора без p53 експресије. Статус негативности p53 туморског протеина је проангиоген, кроз повећану експресију VEGF, IL-8 и bFGF (191, 192).

Међу туморским крвним судовима постоји разлика у функционалности, тј. способности преношења кисеоника и хранљивих састојака. Такође, неки тумори развијају стање прекомерне хиперваскуларизације формирањем крвних судова који нису од есенцијалног значаја. Инхибицијом ових слабије функционалних крвних судова или пак судова који су прекомерни, неће бити постигнут већи ефекат редукције тумора, али ако је антиангиогена терапија усмерена на ефикасне крвне судове, од којих зависи да ли ће туморски енергетски захтеви бити подмирени, онда терапијски исход може бити значајно бољи. Међутим, за сада није могуће спровести циљану терапију само против „ефективне васкулатуре“, те треба имати на уму да не постоји тачна зависност између васкуларне редукције и одговора тумора на антиангиогену терапију.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата овог истраживања може се донети закључак да код планоцелуларних карцинома главе и врата постоји активација сигналних путева зависних од хипоксије са HIF-1 α као медијатором ћелијског одговора на стање сниженог притика кисеоника у микроокружењу. Као део ове реакције стимулирана је продукција васкуларног ендотелног фактора раста који активно утиче на неоваскуларизацију, омогућавајући стварање васкуларне мреже неопходне за експанзију и метастазирање тумора.

Утицај полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 α на клиничко-патолошке карактеристике тумора није статистички сигнификантан. Повећана експресија HIF-1 α зависних гена не може бити мерило екстензивности туморских одлика у тренутку започињања терапијског протокола, али вероватно има утицај на терапијски неуспех и рекуренцију малигне болести, што би требало даље испитати.

Густина крвних судова не одражава ангиогену активност или функционални статус неоваскулатуре планоцелуларних карцинома главе и врата, те не мора да буде у јасној корелацији са појединачним факторима ангиогенезе. Иако је показано да експресија протеина VEGF у туморском ткиву може бити предиктор вредности MVD, у евалуацији овог односа би требало да буду укључени и други стимулатори и инхибитори неоваскуларизације.

Полиморфизми P582S и A588T гена за HIF-1 α се нису показали као предикторни фактори прогресије планоцелуларних карцинома главе и врата. Имплементација података о преживљавању болесника или појави релапса малигне болести током петогодишњег редовног праћења у већ постојеће резултате испитивања омогућиће испитивање прогностичког значаја поменутих полиморфизама.

Иако је хипоксија у туморском ткиву неопходна за иницирање каскаде догађаја у карциногенизи, постоје други кофактори који својим дејством потпомажу или онемогућавају настанак малигне болести. Од будућих истраживања се очекује да спознајом утицаја који се интерферирају у целуларни одговор на хипоксију, помогну у решавању загонетке која се зове карциногенеза.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Snow JB, Ballenger JJ, editors. Ballenger's Otorhinolaryngology. Head and Neck Surgery. Sixteenth Edition. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc; 2003.
2. Thompson LDR. Head and Neck Pathology. Foundations in Diagnostic pathology Series. Churchill Livingstone, Philadelphia: Elsevier; 2006.
3. Belbin TJ, Schlecht NF, Smith RV, Adrien LR, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, Bergman A, Chen Q, Childs G, Prystowsky MB. Site-specific molecular signatures predict aggressive disease in HNSCC. *Head Neck Pathol* 2008;2(4):243-56.
4. Djukic V. Paraliza glasnica. Beograd: Partenon; 2013.
5. Jeng J, Chang M, Hahn L. Role of areca nut in betel quid-associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives. *Oral Oncol* 2001;37(6):477-92.
6. de Souza DL, Pérez MM, Curado MP. Predicted incidence of oral cavity, oropharyngeal, laryngeal, and hypopharyngeal cancer in Spain and implications for cancer control. *Cancer Epidemiol* 2011;35(6):510-4.
7. Ramshankar V, Krishnamurthy A. Human Papilloma Virus in Head and Neck Cancers- Role and Relevance in Clinical Management. *Indian J Surg Oncol* 2013;4(1):59-66.
8. Túri K, Barabás P, Csurgay K, Léhner GY, Lőrincz A, Németh ZS. An analysis of the epidemiological and etiological factors of oral tumors of young adults in a Central-Eastern European population. *Pathol Oncol Res* 2013;19(3):353-63.
9. Müller S, Pan Y, Li R, Chi AC. Changing trends in oral squamous cell carcinoma with particular reference to young patients: 1971-2006. The Emory University experience. *Head Neck Pathol* 2008;2(2):60-6.
10. Annertz K, Anderson H, Biörklund A, Möller T, Kantola S, Mork J, Olsen JH, Wennerberg J. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer* 2002 ;101(1):95-9.
11. Brown LM, Check DP, Devesa S. Oral cavity and pharynx cancer incidence trends by subsite in the United States: changing gender patterns. *J Oncol* 2012: 649498.
12. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide:

- IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2013.
13. Cosetti M, Yu GP, Schantz SP. Five-year survival rates and time trends of laryngeal cancer in the US population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134(4):370-9.
 14. Ellis L, Rachet B, Birchall M, Coleman MP. Trends and inequalities in laryngeal cancer survival in men and women: England and Wales 1991-2006. *Oral oncol* 2012;48(3):284-9.
 15. Coleman MP, Babb P, Damiecki P, Grosclaude PC, Honjo S, Jones J. Cancer survival trends in England and Wales 1971–1995: deprivation and NHS Region. *Studies on Medical and Population Subjects No. 61*. London: The Stationery Office 1999.
 16. Slaughter DR, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963-8.
 17. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328:184-94.
 18. van Oijen MG, Slootweg PJ. Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(3):249-56.
 19. Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D. Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. *Cancer Res* 1996;56(11):2484-7.
 20. Jang SJ, Chiba I, Hirai A, Hong WK, Mao L. Multiple oral squamous epithelial lesions: are they genetically related? *Oncogene* 2001;20(18):2235-42.
 21. Ramroth H, Dietz A, Becher H. Intensity and inhalation of smoking in the aetiology of laryngeal cancer. *Int J Environ Res Public Health* 2011;8:976-84.
 22. Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, Samoli E, Ahrens W, Pohlabein H, Slamova A, Schejbalova M, Merletti F, Richiardi L, Kjaerheim K, Castellsague X, Agudo A, Talamini R, Barzan L, Macfarlane TV, Tickle M, Simonato L, Canova C, Conway DI, McKinney PA, Thomson P, Znaor A, Healy CM, McCartan BE, Hashibe M, Brennan P, Macfarlane GJ. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 2011;47:725-31.
 23. Lee YC, Boffetta P, Sturgis EM, Lee YC, Boffetta P, Sturgis EM, Wei Q, Zhang ZF, Muscat J, Lazarus P, Matos E, Hayes RB, Winn DM, Zaridze D, Wunsch-Filho V, Eluf-Neto J, Koifman S, Mates D, Curado MP, Menezes A, Fernandez L, Daudt AW, Szeszenia-Dabrowska N, Fabianova E, Rudnai P, Ferro G, Berthiller J, Brennan P, Hashibe M. Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:1974-81.

24. Sokic S, Adanja B, Marinkovic J, Vlajinac H. Case-control study of risk factors in laryngeal cancer. *Neoplasma* 1994;41(1):43-7.
25. Sokic S, Adanja B, Marinkovic J, Vlajinac H. Risk factors for laryngeal cancer. *Eur J Epidemiol* 1995;11(4):431-3.
26. Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Fabianova E, Rudnai P, Brennan P. Contribution of tobacco and alcohol to the high rates of squamous cell carcinoma of the supraglottis and glottis in Central Europe. *Am J Epidemiol* 2007;165:814-20.
27. Anantharaman D, Samant TA, Sen S, Mahimkar MB. Polymorphisms in tobacco metabolism and DNA repair genes modulate oral precancer and cancer risk. *Oral Oncol* 2011;47(9):866-72.
28. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:541-50.
29. Ramroth H, Dietz A, Becher H. Interaction effects and population-attributable risks for smoking and alcohol on laryngeal cancer and its subsites. A case control study from Germany. *Methods Inf Med* 2004;43:499-504.
30. Urashima M, Hama T, Suda T, Suzuki Y, Ikegami M, Sakanashi C, Akutsu T, Amagaya S, Horiuchi K, Imai Y, Mezawa H, Noya M, Nakashima A, Mafune A, Kato T, Kojima H. Distinct effects of alcohol consumption and smoking on genetic alterations in head and neck carcinoma. *PLoS One* 2013;8(11):e80828.
31. Johnson-Obaseki S, McDonald JT, Corsten M, Rourke R. Head and neck cancer in Canada: trends 1992–2007. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;147(1):74-8.
32. Cole L, Polfus L, Peters ES. Examining the incidence of human papillomavirus-associated head and neck cancers by race and ethnicity in the U.S., 1995–2005. *PLoS One* 2012;7(3):e32657.
33. Blomberg M, Nielsen A, Munk C, Kjaer SK. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978–2007: focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer* 2011;129(3):733-41.
34. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP, Olofsson J, Ferlito A. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck* 2011;33(4):581-6.

35. Adelstein D, Rodriguez C. Human Papillomavirus: Changing Paradigms in Oropharyngeal Cancer. *Current Oncology Reports* 2010;12(2):115-20.
36. Habbous S, Chu KP, Qiu X, La Delfa A, Harland LT, Fadhel E, Hui A, Perez-Ordóñez B, Weinreb I, Liu FF, Waldron J, O'Sullivan B, Goldstein D, Xu W, Huang SH, Liu G. The changing incidence of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer using multiple imputation from 2000 to 2010 at a Comprehensive Cancer Centre. *Cancer Epidemiol* 2013;37(6):820-9.
37. Chaturvedi A, Gillison M. Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer. *Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Head and Neck Cancer* 2010:87-116.
38. Smeets SJ, van der Plas M, Schaaij-Visser TB, van Veen EA, van Meerloo J, Braakhuis BJ, Steenbergen RD, Brakenhoff RH. Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways. *Int J Cancer* 2011;128(7):1596-605.
39. Marur S, D'souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology* 2010;11(8):781-9.
40. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer- systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* 2012;35(5):747-55.
41. Wang XI, Thomas J, Zhang S. Changing trends in human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2012;16(1):7-12.
42. O'Rourke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2012;48(12):1191-201.
43. Amanda P, Panagiotis G, Jan Baptist V. Human papillomavirus-related head and neck tumors: clinical and research implication. *Current Opinion in Oncology* 2009;21(3):201-5.
44. Maxwell JH, Kumar B, Feng FY, Worden F, Lee J, Eisbruch A, Wolf GT, Prince ME Moyer JS. Tobacco Use in Human Papillomavirus-Positive Advanced Oropharynx Cancer Patients Related to Increased Risk of Distant Metastases and Tumor Recurrence. *Clinical Cancer Research* 2010;16(4):1226-35.
45. Poirier MC. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Discov Med* 2012;14:283-8.
46. Chen M, Tse LA. Laryngeal cancer and silica dust exposure: a systemic review and meta-analysis. *Am J Ind Med* 2012;55(8):669-76.

47. Tavani A, Malerba S, Pelucchi C, Dal Maso L, Zucchetto A, Serraino D, Levi F, Montella M, Franceschi S, Zambon A, La Vecchia C. Dietary folates and cancer risk in a network of case-control studies. *Ann Oncol* 2012;23:2737-42.
48. Bradshaw PT, Siega-Riz AM, Campbell M, Weissler MC, Funkhouser WK, Olshan AF. Associations between dietary patterns and head and neck cancer: the Carolina head and neck cancer epidemiology study. *Am J Epidemiol* 2012;175:1225-33.
49. Kawakita D, Sato F, Hosono S, Ito H, Oze I, Watanabe M, Hanai N, Hatooka S, Hasegawa Y, Shinoda M, Tajima K, Murakami S, Tanaka H, Matsuo K. Inverse association between yoghurt intake and upper aerodigestive tract cancer risk in a Japanese population. *Eur J Cancer Prev* 2012;21:453-9.
50. Vassileiou A, Vlastarakos PV, Kandiloros D, Delicha E, Ferekidis E, Tzagaroulakis A, Nikolopoulos TP. Laryngeal cancer: smoking is not the only risk factor. *B-ENT* 2012;8:273-8.
51. Tae K, Jin BJ, Ji YB, Jeong JH, Cho SH, Lee SH. The role of laryngopharyngeal reflux as a risk factor in laryngeal cancer: a preliminary report. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2011;4(2):101-4.
52. Nowel PC. The Clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-8.
53. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
54. Barnes L, Eveson JW, Reichard P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours. WHO classification of tumours, IARC Press, Lyon 2005:140-3.
55. Koren R, Kristt D, Shvero J, Yaniv E, Dekel Y, Gal R. The spectrum of laryngeal neoplasia: The pathologist's view. *Pathol Res Pract* 2002;198:709-15.
56. Hellquist H, Cardesa A, Gale N, Kambic V, Michaelis L. Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of European Society of Pathology. *Histopathology* 1999;34:226-33.
57. Kambic V, Lenart I. Notre classification des prognoses de hyperplasies de l'epithelium du larynx au point de vue pronostic. *JFORL* 1971;20:1145-50.
58. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implication for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488-92.
59. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.

-
60. Sasabe E, Yang Z, Ohno S, Yamamoto T. Reactive oxygen species produced by the knockdown of manganese-superoxide dismutase up-regulate hypoxia-inducible factor-1alpha expression in oral squamous cell carcinoma cells. *Free Radic Biol Med* 2010;48(10):1321-9.
 61. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-6.
 62. Walsh JE, Lathers DM, Chi AC, Gillespie MB, Day TA, Young MR. Mechanisms of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 2007;8(3):227-38.
 63. Ziebart T, Ziebart J, Gauss L, Pabst A, Ackermann M, Smeets R, Konerding M, Walter C. Investigation of inhibitory effects on EPC-mediated neovascularization by different bisphosphonates for cancer therapy. *Biomed Rep* 2013;1(5):719-22.
 64. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witztenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:965-7.
 65. Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK, Rosenberg RD. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 1998;125:1457-68.
 66. Springer ML, Chen AS, Kraft PE, Bednarski M, Blau HM. VEGF gene delivery to muscle: potential role of vasculogenesis in adults. *Mol Cell* 1998;2:549-58.
 67. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85(3):221-8.
 68. Folkman J. Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery. *Perspect Biol Med* 1985;29:10-36.
 69. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal: similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315:1650-9.
 70. Montag M, Dyckhoff G, Lohr J, Helmke BM, Herrmann E, Plinkert PK, Herold-Mende C. Angiogenic growth factors in tissue homogenates of HNSCC: expression pattern, prognostic relevance, and interrelationships. *Cancer Sci* 2009;100(7):1210-8.
 71. Mikami S, Ohashi K, Katsube K, Nemoto T, Nakajima M, Okada Y. Coexpression of heparanase, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Pathol Int* 2004;54(8):556-63.

72. Kim CH, Moon SK, Bae JH. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2006; 126:88-94.
73. Folkman J, Kalluri R. Cancer without disease. *Nature* 2004; 27(6977):787.
74. Sun Q, Zhou H, Binmadi NO, Basile JR. Hypoxia-inducible factor-1-mediated regulation of semaphoring 4D affects tumor growth and vascularity. *J Biol Chem* 2009;284(46):32066-74.
75. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-54.
76. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004;36(1):1-12.
77. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 2001;7:345-50.
78. Semenza GL. Mechanisms of disease: oxygen sensing, homeostasis and disease. *N Engl J Med* 2011;365:537-47.
79. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006;3:187-97.
80. Chiche J, Ricci JE, Pouysségur J. Tumor hypoxia and metabolism-towards novel anticancer approaches. *Ann Endocrinol (Paris)* 2013;74(2):111-4.
81. Rabinowitz MH. Inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain oxygen sensors: tricking the body into mounting orchestrated survival and repair responses. *J Med Chem* 2013;56(23):9369-402.
82. Paliege A, Rosenberger C, Bondke A, Sciesielski L, Shina A, Heyman S. N, Flippin LA, Arend M, Klaus SJ, Bachmann S. Hypoxia-inducible factor-2 α -expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney Int* 2010;77:312-8.
83. Putra AC, Tanimoto K, Arifin M, Hiyama K. Hypoxia-inducible factor-1 α polymorphisms are associated with genetic aberrations in lung cancer. *Respirology* 2011;16(5):796-802.
84. Ren W, Mi D, Yang K, Cao N, Tian J, Li Z, Ma B. The expression of hypoxia-inducible factor-1 α and its clinical significance in lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Swiss Med Wkly* 2011;143:w12855.
85. Zhang Q, Yang H. The Roles of VHL-Dependent Ubiquitination in Signaling and Cancer. *Front Oncol* 2012;2:35.

-
86. Zinamosca L, Laudisi A, Petramala L, Marinelli C, Roselli M, Vitolo D, Montesani C, Letizia C. Von Hippel Lindau disease with colon adenocarcinoma, renal cell carcinoma and adrenal pheochromocytoma. *Intern Med* 2013;52(14):1599-603.
 87. Snell CE, Turley H, McIntyre A, Li D, Masiero M, Schofield CJ, Gatter KC, Harris AL, Pezzella F. Proline-Hydroxylated Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Upregulation in Human Tumours. *PLoS One* 2014;9(2):e88955.
 88. Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 2002;296:1886-9.
 89. Katschinski DM. In vivo functions of the prolyl-4-hydroxylase domain oxygen sensors: direct route to the treatment of anaemia and the protection of ischaemic tissues. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;195(4):407-14.
 90. Rantanen K, Pursiheimo J, Hogel H, Himanen V, Metzen E, Jaakkola PM. Prolyl hydroxylase PHD3 activates oxygen-dependent protein aggregation. *Mol Biol Cell* 2008;19:2231-40.
 91. Barth S, Nesper J, Hasgall PA, Wirthner R, Nytko KJ, Edlich F, Katschinski DM, Stiehl DP, Wenger RH, Camenisch G. The peptidyl prolyl cis/trans isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability. *Mol Cell Biol* 2007;27:3758-68.
 92. Kalvik TV, Arnesen T. Protein N-terminal acetyltransferases in cancer. *Oncogene* 2013;32(3):269-76.
 93. Geng H, Liu Q, Xue C, David LL, Beer TM, Thomas GV, Dai MS, Qian DZ. HIF1 α protein stability is increased by acetylation at lysine 709. *J Biol Chem* 2001;287(42):35496-505.
 94. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell* 2010;38(6):864-78.
 95. Janke K, Brockmeier U, Kuhlmann K, Eisenacher M, Nolde J, Meyer HE, Mairbäurl H, Metzen E. Factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) modulates protein interactions of apoptosis-stimulating p53 binding protein 2 (ASPP2). *J Cell Sci* 2013;126:2629-40.
 96. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res* 2009;37:4587-602.
 97. Liu W, Shen S, Zhao X, Chen G. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Mol Biol* 2012;3(2):165-78.
-

98. Ito K, Scott SA, Cutler S, Dong LF, Neuzil J, Blanchard H, Ralph SJ. Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis* 2011;14(3):293-307.
99. Ahluwalia A, Tarnawski AS. Critical role of hypoxia sensor HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr Med Chem* 2012;19:90e7.
100. Philip B, Ito K, Moreno-Sanchez R, Ralph SJ. HIF expression and the role of hypoxic microenvironments within primary tumours as protective sites driving cancer stem cell renewal and metastatic progression. *Carcinogenesis* 2013;34(8):1699-707.
101. Skuli N, Liu L, Runge A, Wang T, Yuan L, Patel S, Iruela-Arispe L, Simon MC, Keith B. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood* 2009;114:469-77.
102. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002;16:1151-62.
103. Gatenby RA, Gillies RJ: Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4:891-9.
104. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 2010;20(1):51-6.
105. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, Ratcliffe PJ: Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 2009;284:16767-75.
106. Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing overexpression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:1084-101.
107. Rodríguez-Enríquez S, Carreño-Fuentes L, Gallardo-Pérez JC, Saavedra E, Quezada H, Vega A, Marín-Hernández A, Olín-Sandoval V, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1744-51.
108. Cho KB, Cho MK, Lee WY, Kang KW. Overexpression of c-myc induces epithelial mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Cancer Lett* 2010;293:230-9.

-
109. Jiang J, Tang YL, Liang XH. EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol Ther* 2011;11:714-23.
 110. Zhang Q, Bai X, Chen W, Ma T, Hu Q, Liang C, Xie S, Chen C, Hu L, Xu S, Liang T. Wnt/ β -catenin signaling enhances hypoxia induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1 α signaling. *Carcinogenesis* 2011;34:962-73.
 111. Lundgren K, Nordenskjöld B, Landberg G. Hypoxia, Snail and incomplete epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Br J Cancer* 2009;101:1769-81.
 112. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, Coussens LM, Karin M, Goldrath AW, Johnson RS. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res* 2010;70:7465-75.
 113. Yang M, Ma C, Liu S, Sun J, Shao Q, Gao W, Zhang Y, Li Z, Xie Q, Dong Z, Qu X. Hypoxia skews dendritic cells to a T helper type 2-stimulating phenotype and promotes tumour cell migration by dendritic cell-derived osteopontin. *Immunology* 2009;128(1 suppl):e237-e249.
 114. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, Gimotty PA, Gilks CB, Lal P, Zhang L, Coukos G. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* 2011;475:226-30.
 115. Lewis C, Murdoch C. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 2005;167:627-35.
 116. Ito K, Stannard K, Gabutero E, Clark AM, Neo SY, Onturk S, Blanchard H, Ralph SJ. Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer and Metastasis Rev* 2012;31:763-78.
 117. Liang D, Ma Y, Liu J, Trope CG, Holm R, Nesland JM, Suo Z. The hypoxic microenvironment upgrades stem-like properties of ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 2012;12:201.
 118. Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 2012;488:522-6.
 119. Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010;102:789-95.
 120. Munoz-Guerra MF, Fernandez-Contreras ME, Moreno AL, Martin ID, Herraes B, Gamallo C. Polymorphisms in the hypoxia inducible factor 1-alpha and the impact on the prognosis of early stages of oral cancer. *Ann Surg Oncol* 2009;16(8):2351-8.

121. Shieh TM, Chang KW, Tu HF, Shih YH, Ko SY, Chen YC, Liu CJ. Association between the polymorphisms in exon 12 of hypoxia-inducible factor-1 α and the clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2010;46(9):47-53.
122. Chen MK, Chiou HL, Su SC, Chung TT, Tseng HC, Tsai HT, Yang SF. The association between hypoxia inducible factor-1 α gene polymorphisms and increased susceptibility to oral cancer. *Oral Oncol* 2009;45(12):e222-6.
123. Fraga CA, de Oliveira MV, de Oliveira ES, Barros LO, Santos LO, Santos FB, Gomez RS, De-paula Am, Guimares AL. A high HIF-1 α expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients. *Oral Oncol* 2012;48(2):130-5.
124. Secades P, Rodrigo JP, Hermsen M, Alvarez C, Suarez C, Chiara MD. Increase in gene dosage is a mechanism of HIF-1 α constitutive expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48(5):441-51.
125. Farias LC, de Carvalho Fraga CA, de Oliveira MV, Silva TF, Marques-Silva L, Moreira PR, De-Paula AM, Gomez RS, Guimarães AL. Effect of age on the association between p16CDKN2A methylation and DNMT3B polymorphism in head and neck carcinoma and patient survival. *Int J Oncol* 2010;37(1):167-76.
126. Gomes CC, Drummond SN, Guimaraes AL, Andrade CI, Mesquita RA, Gomez RS. P21/WAF1 and cyclin D1 variants and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2008;37(3):151-6.
127. He P, Han Q, Liu J, Liu D, Zhao X, Hu T, Jiang L, Dan H, Zeng X, Li J, Wang J, Chen Q. The Association between Hypoxia-Inducible Factor-1 α Gene C1772T Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-Analysis of 37 Case-Control Studies. *PLoS One* 2013;8(12):e83441.
128. Mera-Menéndez F, Hinojar-Gutiérrez A, Guijarro Rojas M, de Gregorio JG, Mera-Menéndez E, Sánchez JJ, Quintanilla M, Cerezo L, Gamallo C. Polymorphisms in HIF-1 α affect presence of lymph node metastasis and can influence tumor size in squamous-cell carcinoma of the glottic larynx. *Clin Transl Oncol* 2013;15(5):358-63.
129. Skobe M, Rockwell P, Goldstein N, Vosseler S, Fusenir NE. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med* 1997;3:1222-7.
130. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995;95:1789-97.
131. Ebos JML, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009;15:232-9.

-
132. Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009;15(3):220-31.
 133. Wei Liu, Shao-Ming Shen, Xu-Yun Zhao, Guo-Qiang Chen. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Mol Biol* 2012;3(2):165-78.
 134. Ryu MH, Park HM, Chung J, Lee CH, Park HR. Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates oral squamous cell carcinoma invasion via upregulation of alpha5 integrin and fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393(1):11-5.
 135. Arimoto-Ishida E, Sakata M, Sawada K, Nakayama M, Nishimoto F, Mabuchi S, Takeda T, Yamamoto T, Isobe A, Okamoto Y, Lengyel E, Suehara N, Morishige K, Kimura T. Up-regulation of alpha5-integrin by E-cadherin loss in hypoxia and its key role in the migration of extravillous trophoblast cells during early implantation. *Endocrinology* 2009;150:4306-15.
 136. Yamamoto E, Ino K, Miyoshi E, Inamori K, Abe A, Sumigama S, Iwase A, Kajiyama H, Shibata K, Nawa A, Kikkawa K. N-Acetylglucosaminyltransferase V regulates extravillous trophoblast invasion through glycosylation of alpha5beta1 integrin. *Endocrinology* 2009;150:990-9.
 137. Peinado H, Olmedo D, Cano A. Snail, ZEB, and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature Rev Cancer* 2007;7:415-28.
 138. Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Ling MT, Kwok WK, Wang XH, Wong YC, Guan XY, Man K, Chau KL, Fan ST. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* 2006;12(18):5369-76.
 139. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008;10(3):295-305.
 140. Hirao M, Onai N, Hiroishi K, Watkins SC, Matsushima K, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: Critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes. *Cancer Res* 2000;60:2209-17.
 141. Wang J, Xi L, Hunt JL, Gooding W, Whiteside TL, Chen Z, Godfrey TE, Ferris RL. Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell

- carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. *Cancer Res* 2004; 64:1861-6.
142. Li Y, Qiu X, Zhang S, Zhang Q, Wang E. Hypoxia induced CCR7 expression via HIF-1 α and HIF-2 α correlates with migration and invasion in lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2009;8(4):322-30;
143. Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem* 2009;9(9):1084-101.
144. Corn PG, Ricci MS, Scata KA, Arsham AM, Simon MC, Dicker DT, El-Deiry WS. Mxi1 is induced by hypoxia in a HIF-1-dependent manner and protects cells from c-Myc-induced apoptosis. *Cancer Biol Ther*. 2005;4:1285-94.
145. Putra A, Tanimoto K, Arfin M, Hiyama K. Hypoxia-inducible factor-1 α polymorphisms are associated with genetic aberrations in lung cancer. *Respirology* 2011;16:796-802.
146. Li D, Liu J, Zhang W, Ren J, Yan L, Liu H, Xu Z. Association between HIF1 α P582S and A588T polymorphisms and the risk of urinary cancers: a meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8(5):e63445.
147. Liu J, Zhang HX. 1790G/A polymorphisms, but not 1772C/T polymorphisms is significantly associated with cancer: an update study. *Gene* 2013;523(1):58-63.
148. Wang X, Liu Y, Ren H, Yuan Z, Li S, Sheng J, Zhao T, Chen Y, Liu F, Wang F, Huang H, Hao J. Polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1 α gene confer susceptibility to pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2011;12(5):383-7.
149. Szkandera J, Knechtel G, Stotz M, Hofmann G, Langsenlehner U, Krippel P, Langsenlehner T, Dehchamani D, Samonigg H, Renner W, Gerger A. Association of hypoxia-inducible factor-1 α gene polymorphisms and colorectal prognosis *Anticancer Res* 2010:e76345.
150. Muñoz-Guerra MF, Fernández-Contreras ME, Moreno AL, Martín ID, Herráez B. Polymorphisms in the hypoxia inducible factor 1- α and the impact on the prognosis of early stages of oral cancer. *Ann Surg Oncol* 2009;16:2351-8.
151. He P, Han Q, Liu J, Liu D, Zhao X, Hu T, Jiang L, Dan H, Zeng X, li J, Wang J, Chen Q. The Association between Hypoxia-Inducible Factor-1 α Gene C1772T Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-Analysis of 37 Case-Control Studies. *Plos One* 2013;8(12):e83441.
152. Hua K, Din J, Cao Q, Feng W, Zhang Y. Estrogen and progesterin regulate HIF-1 α expression in ovarian cancer cell lines via the activation of Akt signaling transduction pathway. *Oncol Rep* 2009;21:893-8.

-
153. Kazi AA, Jones JM, Koos RD. Chromatin immunoprecipitation analysis of gene expression in the rat uterus in vivo: estrogen-induced recruitment of both estrogen receptor alpha and hypoxia-inducible factor 1 to the vascular endothelial growth factor promoter. *Mol Endocrinol* 2005;19:2006-19.
 154. Lin PY, Yu CH, Wang JT, Chen HH, Cheng SJ, Kuo MY, Chiang CP. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha is significantly associated with the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 2008;37(1):18-25.
 155. Silva P, Slevin NJ, Sloan P, Valentine H, Cresswell J, Ryder D, Price P, Homer JJ, West CM. Prognostic significance of tumor hypoxia inducible factor-1alpha expression for outcome after radiotherapy in oropharyngeal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;72(5):1551-9.
 156. Roh JL, Cho KJ, Kwon GY, Ryu CH, Chang HW, Choi SH, Nam SY, Kim SY. The prognostic value of hypoxia markers in T2-staged oral tongue cancer. *Oral Oncol* 2009;45(1):63-8.
 157. Miyoshi A, Kitajima Y, Ide T, Ohtaka K, Nagasawa H, Uto Y, et al. Hypoxia accelerates cancer invasion of hepatoma cells by upregulating MMP expression in an HIF-1alpha-independent manner. *Int J Oncol* 2006;29(6):1533-9.
 158. Choi HG, Kim JS, Kim KH, Kim KH, Sung MW, Choe JY, Kim JE, Jung YH. Expression of hypoxic signaling markers in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014 Mar 14. [Epub ahead of print]
 159. Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, Oue N, Yasui W, Imai K, Nakachi K, Poellinger L, Nishiyama M. Hypoxia-inducible factor-1alpha polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis* 2003;24(11):1779-83.
 160. Chen MK, Chiou HL, Su SC, Chung TT, Tseng HC, Tsai HT, Yang SF. The association between hypoxia inducible factor-1alpha gene polymorphisms and increased susceptibility to oral cancer. *Oral Oncol* 2009;45(12):e222-6.
 161. Li L, Chen SH, Zhang Y, Yu CH, Li SD, Li YM. Is the hypoxia-inducible factor-1a mRNA expression activated by ethanol-induced injury, the mechanism underlying alcoholic liver disease? *Hepatobil Panc Dis Int* 2006; 5:560-3.
 162. Jeong HJ, Hong SH, Park RK, An NH, Kim HM. Ethanol induces the production of cytokines via the Ca²⁺, MAP kinase, HIF-1a, and NF- κ B pathway. *Life Sci* 2005;77:2179-92.

-
163. Lim SC. Expression of c-erbB receptors, MMPs and VEGF in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomed Pharmacother* 2005;59 Suppl 2:366-9.
 164. Lalla RV, Boisoineau DS, Spiro JD, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129(8):882-8.
 165. Ninck S, Reisser C, Dyckhoff G, Helmke B, Bauer H, Herold-Mende C. Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2003;106(1):34-44.
 166. Ralph SJ, Rodriguez-Enriquez S, Neuzil J, Saavedra E, Moreno-Sanchez R. The causes of cancer revisited: “mitochondrial malignancy” and ROS-induced oncogenic transformation-why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol Aspects Med* 2010;31:145-70.
 167. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33:207-14.
 168. Tse GM, Chan AW, Yu KH, King AD, Wong KT, Chen GG, Tsang RK, Chan AB. Strong immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor predicts overall survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007;14(12):3558-65.
 169. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131(9):624-30.
 170. Onesto C, Hannoun-Lévi JM, Chamorey E, Formento JL, Ramaioli A, Pagès G. Vascular endothelial growth factor-A and Poly(A) binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas: correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 2006;94(10):1516-23.
 171. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2010;10(7):505-14.
 172. Park H, Jung HY, Choi HJ, Kim DY, Yoo JY, Yun CO, Min JK, Kim YM, Kwon YG. Distinct roles of DKK1 and DKK2 in tumor angiogenesis. *Angiogenesis* 2014;17(1):221-34.
 173. Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009;15(3):220-31.
 174. Lundgren K, Nordenskjöld B, Landberg G. Hypoxia, Snail and incomplete epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Br J Cancer* 2009;101(10):1769-81.
-

-
175. Wallace NA, Robinson K, Galloway DA. β -HPV E6 expression inhibits p53 stabilization and increases the tolerance of genomic instability. *J Virol*. 2014 Mar 19. [Epub ahead of print]
 176. Shpitzer T, Chaimoff M, Gal R, Stern Y, Feinmesser R, Segal K. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:865-8.
 177. Penfold CN, Partridge M, Rojas R, Langdon JD. The role of angiogenesis in the spread of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 1996;34:37-41.
 178. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.
 179. Vesalainen S, Lipponen P, Talja M, Alhava E, Syrjanen K. Tumor vascularity and basement membrane structure as prognostic factors in T1–2MO prostatic adenocarcinoma. *Anticancer Res* 1994;14:709-14.
 180. Brawer MK, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA. Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. The role of neovascularity. *Cancer* 1994;73:678-87.
 181. Silberman MA, Partin AW, Veltri RW, Epstein JI. Tumor angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with pathologic stage in Gleason sum 5 to 7 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1997;79:772-9.
 182. Shih CH, Ozawa S, Ando N, Ueda M, Kitajima M. Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2000;6:1161-8.
 183. Hironaka S, Hasebe T, Kamijo T, Ohtsu A, Boku N, Yoshida S, Saitoh H, Ichiai A. Biopsy specimen microvessel density is a useful prognostic marker in patients with T(2–4)M(0) esophageal cancer treated with chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2002;8:124-30.
 184. Gasparini G, Harris AL. Prognostic significance of tumor vascularity. In: Teicher BA, editor. *Antiangiogenic agents in cancer therapy*. Totowa (NJ): Humana Press;1999:317-99.
 185. Yu M, Liu L, Liang C, Li P, Ma X, Zhang Q, Wei Y. Intratumoral vessel density as prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis of literature. *Head Neck* 2014;36(4):596-602.
 186. Beecken WD, Fernandez A, Jousseaume AM, Achilles EG, Flynn E, Lo KM. Effect of antiangiogenic therapy on slowly growing, poorly vascularized tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:382-7.
 187. Folkman J, Hahmfeldt P, Hlatky L. Cancer: looking outside the genome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:76-9.
-

188. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
189. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000;60(5):1388-93.
190. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(12):883-93.
191. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
192. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000;14:34-44.

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Редни број - РБ:	
Идентификациони број - ИБР:	
Тип документације - ТД:	Монографска публикација
Тип записа - ТЗ:	Текстуални штампани материјал
Врста рада - ВР:	Докторска дисертација
Аутор - АУ:	Др мед. Миљан М. Фолић
Ментор - МН:	Проф. др Војко Ђукић
Наслов рада - НР:	Утицај полиморфизама Р582S и А588Т гена за НIF-1 α на експресију протеина НIF-1 α и VEGF у планоцелуларним карциномима главе и врата
Језик публикације - ЈП:	Српски / ћирилица
Језик извода - ЈИ:	Српски / Енглески
Земља публикавања - ЗП:	Србија
Уже географско подручје - УГП:	Шумадија/ Србија
Година - ГО:	2014.
Издавач - ИЗ:	Ауторски репринт
Место и адреса - МС:	34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69
Физички опис рада - ФО:	Страница 82, поглавља 7, слика 5, графикона 12 и табела 15
Научна област - НО:	Медицина
Научна дисциплина- ДИ:	Експериментална и клиничка хирургија
Предметна одредница- кључне речи - ПО:	Планоцелуларни карцином главе и врата, полиморфизам, НIF-1 α , VEGF, ангиогенеза, хипоксија
УДК	
Чува се - ЧУ:	У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Важна напомена - ВН:	

Извод - ИД:

Интратуморска хипоксија је врло битан догађај у канцерогенези, који стабилизацијом HIF-1 и активацијом различитих гена омогућава преживљавање и пролиферацију ћелија у неповољним условима у микроокружењу. HIF-1 се сматра кључним регулатором ћелијског одговора на хипоксију, а као део тог одговора долази до активације VEGF и других фактора који стимулишу неоваскуларизацију и активацију кисеонично-независних метаболичких путева, омогућавајући туморску експанзију и метастазирање. Сprovedено клиничко испитивање се бавило утицајем који полиморфизми P582S и A588T гена за HIF-1 α показују на клиничко-патолошке карактеристике планоцелуларних карцинома главе и врата, експресију протеина HIF-1 α и VEGF, као и на туморску густину крвних судова. Од ове докторске дисертација се очекује да својим дизајном омогући боље разумевање појединих механизма којима интратуморска хипоксија утиче на настанак и развој карцинома. Својим резултатима студија је довела до недвосмислених закључака о постојању активираних HIF-1 α сигналних путева код карцинома главе и врата.

Датум прихватања теме од 25. 09. 2013.

стране НН већа - ДП:

Датум одбране - ДО:

Чланови комисије - КО:

Проф. др Јовица Миловановић, председник
Медицински факултет Београд

Проф. др Небојша Арсенијевић, члан
Факултет Медицинских наука Крагујевац

Проф. др Светозар Дамјановић, члан
Медицински факултет Београд

KEY WORDS DOCUMENTATION**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES**

Accession number - ANO:

Identification number - INO:

Documentation type - DT: Monographic publication

Type of record - TR: Textual material, printed

Contents code - CC: PH. D. Thesis

Author - AU: Miljan M. Folic, M. D.

Menthor/ Co menthor - MN: Professor Vojko Djukic, M.D., Ph. D.

Title - TL: Influence of P582S and A588T polymorphisms in the HIF-1 α gene on the expression of proteins HIF-1 α and VEGF with head and neck squamous cell carcinoma

Language of text - LT: Serbian

Language of abstract - LA: Serbian/ English

Country of publication - CP: Serbia

Locality of publication - LP: Sumadija region/ Serbia

Publication year - PY: 2014.

Publisher - PU: Author reprint

Publication place - PP: 34000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69

Physical description - PD: Thesis contains 82 pages, 7 chapters, 5 figures, 12 graphs, 15 tables

Scientific field - SF: Medicine

Scientific discipline - SD: Clinical et experimental surgery

Subject/key words - SKW: Head and neck squamous cell carcinoma, polymorphism, HIF-1 α , VEGF, angiogenesis, hypoxia

UDC

Holding data - HD: Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Serbia

Note - N:

Abstract - AB:

Intratumoral hypoxia presents as an important moment in carcinogenesis which stabilizes HIF-1 and by activation of different genes enables survival and cell proliferation in unfavorable microenvironmental conditions. HIF-1 is considered the key regulator of cellular response to hypoxia, and as a part of that response comes an activation of VEGF and other angiogenic stimulators and activation of oxygen-independent metabolic pathways, enabling tumor expansion and metastasis. This clinical study investigated the correlation between the existence of P582S and A588T polymorphisms in the HIF-1 α gene on one hand, and the clinical-pathological characteristics of head and neck squamous cell carcinoma, expression level of HIF-1 α and VEGF proteins, as well as tumor microvessel density on the other. This PhD thesis is expected to enable better understanding of individual mechanisms through which intratumoral hypoxia influences occurrence and development of carcinoma. Results of this study have brought us to unambiguous conclusions on existence of HIF-1 α mediated signaling pathways in head and neck squamous cell cancer.

Accepted by the Scientific 25. 09. 2013.

Board on - ABS:

Defended on - DE:

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

Professor Jovica Milovanovic, M. D., Ph. D.

Chairman, Medical Faculty in Belgrade

Professor Nebojsa Arsenijevic, M. D., Ph. D.

Member, Faculty of Medical Sciences in Kragujevac

Professor Svetozar Damjanovic, M. D., Ph. D.

Member, Medical Faculty in Belgrade

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Др Миљан М. Фолић је рођен 26.07.1981. године у Крагујевцу где је завршио Основну школу и Прву крагујевачку гимназију као носилац Вукове дипломе. Дипломирао је на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу 2007. године са просечном оценом 10. Од стране Удружења универзитетских професора и научника Србије изабран је за најбољег студента у Србији 2005. године. По дипломирању, завршио је приправнички лекарски стаж и положио Стручни испит за доктора медицине пред испитном комисијом Министарства здравља Републике Србије.

Од децембра 2007. године до фебруара 2008. године радио је као клинички лекар у Клиници за урологију Клиничког центра Крагујевац. Од маја 2008. године запослен је у Клиници за оториноларингологију и максилофацијалну хирургију Клиничког центра Србије, где и сада ради.

Постдипломске Докторске академске студије уписао је 2007. године на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и клиничка хирургија. Јуна 2009. године положио је Усмени докторантски испит са оценом 10/10.

Специјалистичке студије из оториноларингологије је уписао на Медицинском факултету Универзитета у Београду априла 2011. године уз сагласност Министарства здравља Републике Србије и Управе Клиничког центра Србије.

Током медицинске едукације, учествовао је на бројним домаћим и интернационалним конгресима и похађао инструкционе курсеве којима је унапредио своје лекарске вештине. Члан је Европског ринолошког друштва.

Одлично познаје рад на персоналним рачунарима, посебно из домена комуникације у медицинским сазнањима и размене стручних сазнања. Поседује знања енглеског језика на нивоу конверзације и писања стручних медицинских публикација и немачког језика на нивоу комуникације.

СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

1. Milovanović J, Milovanović A, Ješić S, Jotić A, Čemerikić D, Artiko V, Petrović M, Pavlović B, **Folić M**. Effect of acute experimental aluminium poisoning on hematologic parameters. *Acta Veterinaria* 2012;62(2-3):183-92.
2. Djerić D, **Folić M**, Blazić S, Djorić I. Acute Mastoiditis in Children as Persisting Problem. *Int Adv Otol* 2014;10(1):60-3.
3. Djukić V, Vukasinović M, Stanković P, Milovanović J, **Folić M**. What do we need to help laryngectomized speaking. *Acta Chir Iugosl* 2009;56(3):11-5.
4. Djukić V, Milovanović J, Milovanović A, Stanković P, Pavlović B, **Folić M**, Blazić S. Laser surgery of supraglottic laryngeal carcinoma. *Acta Chir Iugosl* 2009;56(3):85-8.
5. Banko A, Lazarević A, **Folić M**, Cupić M, Jovanović T. Prevalence of Epstein Barr Virus in Biopsy Specimen of Nasopharyngeal Carcinoma from Serbian Patients. *Arch Biol Sci* 2014;66(2):521-8. (Article in press)
6. **Folić M**, Gajić J, Milovanović D. Palpable pruritic purpura probably associated with a calcium channel blocker - case report. *Medicus* 2005;6(2):89-91.
7. Gajić J, Zornić N, **Folić M**, Ružić-Zečević D. Serum levels of urea and creatinine in patients before and after spinal anesthesia. *Medicus* 2005;6(2):86-8.
8. **Folić M**, Đukić-Dejanović S, Đurđević P, Anđelković N, Milovanović D. Hematološki parametri tokom lečenja risperidonom i sertralinom: pilot studija preseka. *Pons* 2007;10:5-10.

AUTHOR'S CURRICULUM VITAE

Doctor of Medicine Miljan M. Folic is born 26th July 1981 in Kragujevac where he has completed elementary school and First Grammar School of Kragujevac with honors. He has graduated from Medical Faculty of University of Kragujevac in 2007 with grade-point average of 10. He has been elected as the best student in Serbia in 2005 on a part of Society of University Professors and Scientists of Serbia. After graduation, he has completed his internship and passed the State License Exam with Republic Ministry of Health.

From December 2007 till February 2008 he has worked as clinician at Urology clinic of Clinical Centre of Kragujevac. Since May 2008 he has been employed at Clinic for Otorhinolaryngology and Maxillofacial surgery of Clinical Centre of Serbia, where he works up to date.

Doctoral academic studies he has enrolled in 2007 at Medical Faculty of University of Kragujevac, department of Experimental and clinic surgery. In June 2009 he has passed Oral examination of PhD studies with grade 10/10.

Specialty studies on Otorhinolaryngology he has enrolled at Medical Faculty of University of Belgrade in April 2011 with approval of the Ministry of Health of Republic of Serbia and Clinical Centre of Serbia.

During his education in the medical field, he has participated at many domestic and international congresses and attended instruction courses where he has elevated his medical practice skills. He is a member of European Rhinology Society.

He is PC literate, special in the domain of communication on medical issues and vocational exchange. His English language knowledge on the level of conversation and written medical publications is advanced, as well as German language on the level of communication.

LIST OF SCIENTIFIC PUBLICATIONS**(both international and national)**

1. Milovanović J, Milovanović A, Ješić S, Jotić A, Čemerikić D, Artiko V, Petrović M, Pavlović B, **Folić M**. Effect of acute experimental aluminium poisoning on hematologic parameters. *Acta Veterinaria* 2012;62(2-3):183-92.
2. Djerić D, **Folić M**, Blazić S, Djorić I. Acute Mastoiditis in Children as Persisting Problem. *Int Adv Otol* 2014;10(1):60-3.
3. Djukić V, Vukasinović M, Stanković P, Milovanović J, **Folić M**. What do we need to help laryngectomized speaking. *Acta Chir Iugosl* 2009;56(3):11-5.
4. Djukić V, Milovanović J, Milovanović A, Stanković P, Pavlović B, **Folić M**, Blazić S. Laser surgery of supraglottic laryngeal carcinoma. *Acta Chir Iugosl* 2009;56(3):85-8.
5. Banko A, Lazarević A, **Folić M**, Cupić M, Jovanović T. Prevalence of Epstein Barr Virus in Biopsy Specimen of Nasopharyngeal Carcinoma from Serbian Patients. *Arch Biol Sci* 2014;66(2):521-8. (Article in press)
6. **Folić M**, Gajić J, Milovanović D. Palpable pruritic purpura probably associated with a calcium channel blocker - case report. *Medicus* 2005;6(2):89-91.
7. Gajić J, Zornić N, **Folić M**, Ružić-Zečević D. Serum levels of urea and creatinine in patients before and after spinal anesthesia. *Medicus* 2005;6(2):86-8.
8. **Folić M**, Đukić-Dejanović S, Đurđević P, Anđelković N, Milovanović D. Hematološki parametri tokom lečenja risperidonom i sertralinom: pilot studija preseka. *Pons* 2007;10:5-10.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Миљан М. Фолић
Датум и место рођења: 26. 07. 1981. год., Крагујевац, Република Србија
Садашње запослење: Лекар на специјализацији из оториноларингологије, Клиника за оториноларингологију и максилофацијалну хирургију, Клинички центар Србије, Београд
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Утицај полиморфизама P582S и A588T гена за HIF-1 α на експресију протеина HIF-1 α и VEGF у планоцелуларним карциномима главе и врата
Број страница: 82
Број слика: 32
Број библиографских података: 192
Установа и место где је рад израђен: Клинички центар Србије, Београд - Клиника за оториноларингологију и максилофацијалну хирургију, Клиника за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма; Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина, Експериментална и клиничка хирургија
Ментор: Проф. др Војко Ђукић
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 24. 05. 2013.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-533/19 од 03. 10. 2013. год.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 1. Проф. др Небојша Арсенијевић, председник 2. Проф. др Војко Ђукић, члан 3. Проф. др Светозар Дамјановић, члан
Комисија за оцену докторске дисертације: 1. Проф. др Јовица Миловановић, председник 2. Проф. др Небојша Арсенијевић, члан 3. Проф. др Светозар Дамјановић, члан
Комисија за одбрану докторске дисертације: 1. Проф. др Јовица Миловановић, председник 2. Проф. др Небојша Арсенијевић, члан 3. Проф. др Светозар Дамјановић, члан
Датум одбране дисертације:

ОБРАЗАЦ 1

Изјава о ауторству

Потписани: Миљан Фолић

Број уписа: 2007/02

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**УТИЦАЈ ПОЛИМОРФИЗАМА Р582S И А588Т ГЕНА ЗА HIF-1 α НА
ЕКСПРЕСИЈУ ПРОТЕИНА HIF-1 α И VEGF У ПЛАНОЦЕЛУЛАРНИМ
КАРЦИНОМИМА ГЛАВЕ И ВРАТА**

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

У Крагујевцу, 08. 06. 2014. год.

Потпис аутора

Миљан Фолић

ОБРАЗАЦ 2

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

Име и презиме аутора: Миљан Фолић

Број уписа: 2007/02

Студијски програм: Експериментална и клиничка хирургија

Наслова рада: **УТИЦАЈ ПОЛИМОРФИЗАМА Р582S И А588Т ГЕНА ЗА HIF-1 α НА
ЕКСПРЕСИЈУ ПРОТЕИНА HIF-1 α И VEGF У
ПЛАНОЦЕЛУЛАРНИМ КАРЦИНОМИМА ГЛАВЕ И ВРАТА**

Ментор: Проф. др Војко Ђукић

Потписани: Миљан Фолић

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

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

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

У Крагујевцу, 08. 06. 2014. год.

Потпис аутора

Миљан Фолић

ОБРАЗАЦ 3

Изјава о коришћењу

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

**УТИЦАЈ ПОЛИМОРФИЗАМА Р582S И А588Т ГЕНА ЗА HIF-1 α НА
ЕКСПРЕСИЈУ ПРОТЕИНА HIF-1 α И VEGF У ПЛАНОЦЕЛУЛАРНИМ
КАРЦИНОМИМА ГЛАВЕ И ВРАТА**

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

У Крагујевцу, 08. 06. 2014. год.

Потпис аутора

Милош Фелик