



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Nikola D. Živković

**MARKERI PROLIFERACIJE I
INTERMEDIJARNIH FILAMENATA U
DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOZI
BENIGNIH I MALIGNIH TUMORA
PLJUVAČNIH ŽLEZDA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2016.



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Nikola D. Živković

**PROLIFERATION AND INTERMEDIATE
FILAMENT MARKERS IN THE
DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF BENIGN
AND MALIGNANT TUMORS OF
SALIVARY GLANDS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.

З А Х В А Л Н И Ц А

Експериментални део ове докторске дисертације је спроведен у Центру за патологију, Клиничког Центра у Нишу и Института за патологију, Медицинског факултета, Универзитета у Нишу, под менторством Проф. др Драгана Михаиловића. Овом приликом му се срдечно захваљујем на саветима који су ми помогли у истраживању, као и на помоћи при писању дисертације. Изванредни методолошки приступ ми је показао пут ка визионарству, креативности и инвентивности у науци, на чему сам му неизмерно захвалан.

Захваљујем се свим члановима комисије, а посебно Проф. др Маји Јовичић Миленџијевић за корисне сугестије и пријатељске савете у бројним тренуцима када је то било потребно, на вратима увек отвореним за моја питања и на помоћи да се теза приведе крају. Захваљујући њеној предусретљивости и несебичности омогућено ми је да се упознам са савременим дијагностичким процедурама. Проф. др Жаклини Мијовић, хвала на изузотној сарадњи и помоћи у реализацији теме, на одлучном и стручном усмеравању и на корисним сугестијама. Проф. др Зорану Пешићу на корисним саветима у сагледавању пацијената са клиничке стране. Проф. др Светиславу Татићу, хвала на спремности и стрпљењу да уложи време у још једно ишчитавање још једне тезе и на конструктивним саветима током писања рада.

Хвала проф. др Мирославу Трајановићу руководиоцу пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије бр. 41017.

Захваљујем се Драгану Радојковићу на стрпљењу и великој помоћи у техничкој обради и иновативним идејама у сређивању текста.

Велико хвала кумовима, а пре свега правим и искреним пријатељима, породицама Гавриловић, Цветановић и Костић.

Посебно се захваљујем брату Младену и својим родитељима, Весни и Добрици, за сву љубав и подршку коју су ми пружили, јер они су заслужни за све што данас јесам.

Аутор

У Нишу, 2016. године

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Prof. dr Dragan Mihailović,
lekar specijalista patologije i patološke anatomije, Univerzitet u Nišu,
Medicinski fakultet

Naslov: Markeri proliferacije i intermedijarnih filamenata u diferencijalnoj
dijagnozi benignih i malignih tumora pljuvačnih žlezda

Uvod. Tumori pljuvačnih žlezda su relativno retke neoplazme, koje karakteriše visok stepen pleomorfizma i histološkog preklapanja. Često se i u jednom tumoru mogu videti više ćelijskih tipova, tako da je neophodno je primeniti dodatna histochemijska i imunohistochemijska bojenja, kao i morfometrijsku analizu tumorskih ćelija u cilju adekvatne dijagnoze. **Materijal i metode.** Istraživanje je obuhvatilo 30 benignih i 30 malignih tumora, i to pleomorfni adenom (10), Vartin tumor (10), adenom bazalnih ćelija (6), mioepiteliom (4), adenoidnocistični karcinom (6), mukoepidermoidni karcinom (8), karcinom pljuvačnih kanala (6), polimorfni karcinom niskog gradusa (6) i mioepitelni karcinom (4). Analizirana je ekspresija Ki67, p53, HER-2, p63, CEA, EMA, S-100, CK14, WT-1, GFAP, α SMA i vimentina. Morfometrijska analiza vršena je u softverkom paketu „ImageJ”. Analizirani su: površina, perimetar, Feretov dijametar, integrisana optička gustina, cirkularnost i zaobljenost jedara. **Rezultati.** Ki67 proliferativni indeks je statistički značajno veći kod malignih tumora ($p < 0,001$). Najveću vrednost je pokazao adenoidnocistični karcinom, a najmanju adenom bazalnih ćelija. Imunohistochemijski, plemorfni adenomi su pozitivni na S-100, GFAP, CK14, α SMA WT1 i EMA. Vartin tumor je pozitivan na CK14, CEA i p63; adenom bazalnih ćelija pokazuje pozitivnost na S-100, CEA i vimentin, dok su mioepitelni tumori pozitivni na vimentin, GFAP, S100, CK14, α -SMA. Adenoidnocistični karcinom pokazuje pozitivnost na CEA i S-100; mukoepidermoidni eksprimira CK14; karcinom pljuvačnih kanala pozitivan na EMA, CEA, p53 i HER-2, dok je polimorfni karcinom niskog gradusa pozitivan na CK14, p63, EMA, S100 i vimentin. Morfometrijska analiza pokazuje statistički značajno većane vrednosti integrisane optičke gustine ($p < 0,001$) i parametara veličine jedara ($p < 0,05$) kod malignih tumora. Najveće vrednosti za sve parametre je pokazao karcinom pljuvačnih kanala. **Zaključak.** Imunohistochemijskom analizom ustanovili smo histogenezu tumora u cilju diferencijacije. Ki67 proliferativni indeks je jako koristan u diferencijaciji benignih od malignih tumora. Morfometrijski parametri integrisane optičke gustine i veličine jedara pokazuju statistički veće vrednosti u grupi malignih tumora.

Naučna oblast:	Medicinske nauke
Naučna disciplina:	Patologija
Ključne reči:	Pljuvačne žlezde, benigni tumori, maligni tumori, diferencijalna dijagnoza, imunohistohemija, morfometrija
UDK:	616.316-006.03/.04-079.4-097(043.3)
CERIF klasifikacija:	B 520 Opšta patologija, patološka anatomija
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Professor Dragan Mihailović, M.D., Ph.D.,
Faculty of Medicine, University of Niš

Title:

Proliferation and intermediate filament markers in the differential diagnosis of benign and malignant tumors of salivary glands

Abstract:

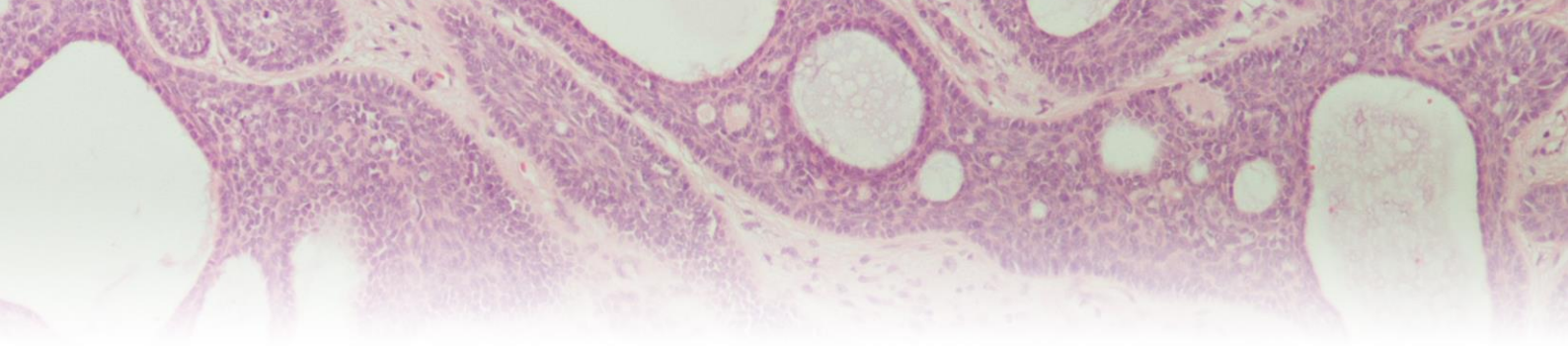
Introduction: Salivary gland tumors are rather rare neoplasms characterized by a high level of pleomorphism and histological overlapping. Very often, one tumor may contain several cell types, therefore, it is necessary to include additional histochemical and immunohistochemical staining, as well as the morphometric analysis of tumor cells, in terms of an appropriate diagnosis. **Materials and methods:** The research encompassed 30 benign and 30 malignant tumors, including pleomorphic adenoma (10), Warthin's tumor (10), basal cell adenoma (6), myoepithelioma (4), adenoid cystic carcinoma (6), mucoepidermoid carcinoma (8), salivary duct carcinoma (6), polymorphous low-grade carcinoma (6), and myoepithelial carcinoma (4). The expression of Ki67, p53, HER-2, p63, CEA, EMA, S-100, CK14, WT-1, GFAP, α SMA and vimentin was analyzed. The morphometric analysis was performed using "ImageJ" software pack. The area, perimeter, Feret diameter, integrated optical density, nucleus circularity and roundness were analyzed. **Results:** The Ki67 proliferative index was statistically significantly higher in malignant tumors ($p < 0.001$). Adenoid cystic carcinoma exhibited the highest value, whereas the lowest value was exhibited by basal cell adenoma. Immunohistochemically, pleomorphic adenomas were positive to S-100, GFAP, CK14, α SMA, WT1 and EMA. Warthin's tumor was positive to CK14, CEA and p63; basal cell adenoma showed positivity to S-100, CEA, and vimentin, whereas myoepithelial tumors were positive to vimentin, GFAP, S100, CK14, α SMA. Adenoid cystic carcinoma exhibited positivity to CEA and S-100, mucoepidermoid carcinoma to CK14, salivary duct carcinoma to EMA, CEA, p53 and HER-2, while polymorphous low-grade carcinoma exhibited positivity to CK14, p63, EMA, S100 and vimentin. The morphometric analysis showed statistically significantly increased values of integrated optical density ($p < 0.001$) and nuclear size parameters ($p < 0,05$) in malignant tumors. The highest values for all parameters were exhibited by salivary duct carcinoma **Conclusion:** The immunohistochemical analysis was used to determine tumor histogenesis with the aim of differentiation. The Ki67 proliferative index is highly useful in the differentiation of benign from malignant tumors. The morphometric parameters of integrated optical density and nuclear size show statistically higher values in the malignant tumor group.

Scientific Field:	Medical sciences
Scientific Discipline:	Pathology
Key Words:	Salivary glands,benign tumors, malignant tumors, differential diagnosis, immunohistochemistry, morphometry
UDC:	616.316-006.03/.04-079.4-097(043.3)
CERIF Classification:	B 520 General pathology, pathological anatomy
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

SADRŽAJ

1.	UVOD	10
1.1	Embriologija pljuvačnih žlezda	10
1.2	Anatomija pljuvačnih žlezda	12
1.3	Histološke karakteristike pljuvačnih žlezda.....	13
1.4	Dosadašnja istraživanja	15
1.5	Etiologija tumora pljuvačnih žlezda	18
1.6	Epidemiologija tumora pljuvačnih žlezda.....	19
1.7	Patohistološke karakteristike tumora pljuvačnih žlezda	20
1.7.1	<i>Mukoepidermoidni karcinom</i>	20
1.7.2	<i>Adenoidni cistični karcinom.....</i>	22
1.7.3	<i>Karcinom pljuvačnih kanala.....</i>	24
1.7.4	<i>Polimorfni adenokarcinom niskog gradusa.....</i>	25
1.7.5	<i>Mioepitelni karcinom</i>	27
1.7.6	<i>Pleomorfni adenom.....</i>	29
1.7.7	<i>Vartinov tumor</i>	31
1.7.8	<i>Adenom bazalnih ćelija</i>	33
1.7.9	<i>Mioepiteliom</i>	35
1.8	Imunohistohemija	36
1.8.1	<i>Markeri ćelijske proliferacije.....</i>	36
1.8.1.1	<i>Ki-67</i>	36
1.8.1.2	<i>HER-2</i>	37
1.8.1.3	<i>p53.....</i>	37
1.8.2	<i>Markeri intermedijarnih filamenata</i>	38
1.8.2.1	<i>Glijalni fibrilarni kiseli protein - GFAP.....</i>	38
1.8.2.2	<i>Vimentin.....</i>	39
1.8.2.3	<i>S100</i>	39
1.8.2.4	<i>Epitelni membranski antigen – EMA.....</i>	40
1.8.2.5	<i>Citokeratin 14.....</i>	41
1.8.2.6	<i>α-glatkomišićni aktin - α-SMA</i>	41
1.8.3	<i>Ostali markeri u diferencijalnoj dijagnostici tumora pljuvačnih žlezda</i>	42
1.8.3.1	<i>p63.....</i>	42
1.8.3.2	<i>Wilms tumor 1 - WT1</i>	43
1.8.3.3	<i>Karcinoembrionalni antigen - CEA</i>	44
2.	NAUČNO RADNA HIPOTEZA	45
2.1	H₀ – Nulta hipoteza istraživanja.....	45
2.2	H₁ – Radna hipoteza istraživanja	45

3.	CILJEVI RADA	46
4.	MATERIJAL I METODE.....	47
4.1	Imunohistohemijska analiza	48
4.2	Morfometrijska analiza	49
4.3	Statistička obrada podataka	50
5.	REZULTATI.....	51
5.1	Rezultati imunohistohemijska analiza ekspresije intermedijarnih filamenata benignih i malignih tumora pljuvačnih žlezda.....	51
5.2	Ki67 proliferativni indeks benignih i malignih tumora pljuvačnih žlezda.....	57
5.3	Morfometrijska analiza benignih i malignih tumora pljuvačnih žlezda	60
5.3.1	<i>Površina jedra.....</i>	60
5.3.2	<i>Obim jedra, Perimetar</i>	62
5.3.3	<i>Cirkularnost jedra.....</i>	64
5.3.4	<i>Feretov dijametar jedra</i>	66
5.3.5	<i>Integrisana optička gustina jedra</i>	68
5.3.6	<i>Zaobljenost jedra</i>	70
5.3.7	<i>Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresije.....</i>	72
5.3.8	<i>Procena klasifikacionih karakteristika proliferativnog indeksa na osnovu ROC analize.....</i>	73
5.3.9	<i>Procena klasifikacionih karakteristika površine jedra na osnovu ROC analize.....</i>	74
5.3.10	<i>Procena klasifikacionih karakteristika obima jedra na osnovu ROC analize ...</i>	75
5.3.11	<i>Procena klasifikacionih karakteristika cirkularnosti na osnovu ROC analize..</i>	76
5.3.12	<i>Procena klasifikacionih karakteristika Feretovog dijametara na osnovu ROC analize.....</i>	77
5.3.13	<i>Procena klasifikacionih karakteristika integrisane optičke gustine na osnovu ROC analize.....</i>	78
5.3.14	<i>Procena klasifikacionih karakteristika zaobljenosti na osnovu ROC analize ...</i>	79
6.	DISKUSIJA	81
6.1	Imunohistohemija	81
6.2	Proliferacija tumora	89
6.3	Morfometrijska analiza	92
7.	ZAKLJUČAK	94
8.	LITERATURA.....	96
9.	BIOGRAFIJA	114



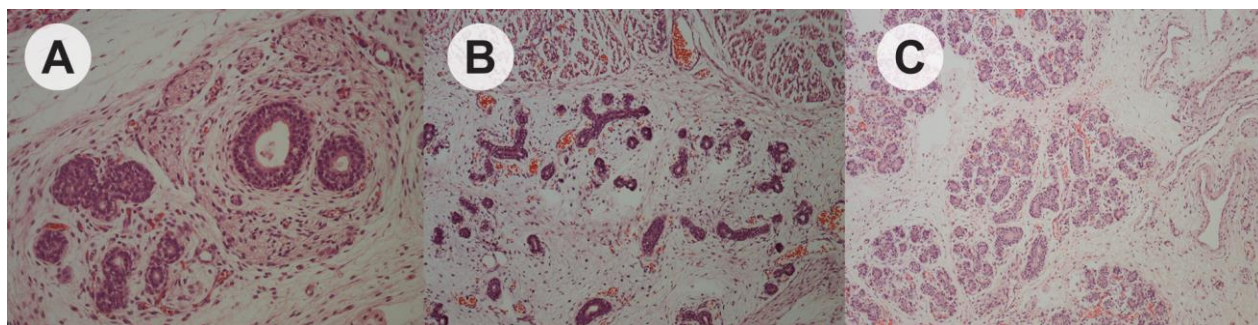
1. UVOD

Sistem pljuvačnih žlezda u ljudi se može podeliti u dve grupe žlezda sa egzokrinim lučenjem. U grupu glavnih ili velikih pljuvačnih žlezda se ubrajaju parotidna, submandibularna i sublingvalna žlezda. Grupu pomoćnih čine na stotine malih žlezda, koje su prisutne u sluzokoži gornjih partija digestivnog i respiratornog sistema.

Osnovna funkcija pljuvačnih žlezda jeste lučenje pljuvačke, neophodne u procesu varenja i podmazivanja, imunitetu, a u krajnjoj liniji održavanju homeostaze.

1.1 Embriologija pljuvačnih žlezda

Rana istraživanja ukazuju da razvoj pljuvačnih žlezda počinje u periodu od šeste do osme nedelje postkonceptijskog razvoja, kada oralni ektoderm zalazi u susedni mezoderm, gde se formiraju mesta za glavne pljuvačne žlezde. Smatra se da postoje tri glavne faze u procesu nastanka pljuvačnih žlezda.^{1,2} Prvu fazu karakteriše formiranje pupoljaka razgranatih kanala. Dvoredni trepljasti epitel oblaže lumenove, dok se spolja nalaze mioepitelne ćelije ektodermalnog porekla.³ U drugoj fazi dolazi do formiranja ranih lobulusa i kanalisanja duktusa. Treću fazu karakteriše sazrevanje acinusa i interkalatnih duktusa, kao i smanjenje intersticijalnog vezivnog tkiva (*Slika 1*).



Slika 1. Razvoj parotidne pljuvačne žlezde, A - I faza razvoja, H&E, uveličanje x20; B - II faza razvoja, H&E, uveličanje x10; C - III faza razvoja, H&E, uveličanje x10

Tokom šeste gestacione nedelje prva se formira primordijalna parotidna žlezda. Nastaje od zadnjeg stomodeuma, a kapsula žlezde vodi poreklo od okolnog menzenhima zajedno sa limfnim nodusom.⁴ U sedmoj nedelji se pomera u dorzalnog i latealnog pravcu, i zauzima preaurikularni položaj. Oko desete nedelje razvija se facijalni nerv, koji deli žlezdu na površni i duboki režanj.⁵ Do trećeg meseca žlezda dobija opštu formu. Tokom šestog meseca kreće diferencijacija trepljastog epitela ekskretornih duktusa u kubične, skvamozne i peharaste ćelije. Intralobularni kanal i diferencijacija acinusa počinje oko osmog meseca, dok se diferencijacija mioepitelne ćelije dešava u periodu od devetnaeste do dvadesetčetvrtne nedelje. Od 25. do 32. nedelje mioepitelne ćelije postaju izdužene sa citoplazmatskim produžecima. U tom periodu kreće i lučenje pljuvačke, u vidu mukozne tečnosti.^{6,7} Tokom šeste gestacione nedelje u podu usta se pojavljuju pupoljci, koji se potom šire oko milohoidnog mišića u submandibularni trougao, od koji se na kraju razvija submandibularna pljuvačna žlezda. Kapsula žlezde se u potpunosti razvija posle trećeg gestacionog meseca.² Sublingvalna žlezda se poslednja razvija, u odnosu na ostale glavne pljuvačne žlezde. Epitelni pupoljci rastu na dole iz udubljenja između donje vilice i jezika. U dvanaestoj gestacionoj nedelji od tubuloacinarnih jedinica gornjeg respiratornog ektoderma nastaju male pljuvačne žlezde.⁸

Jaskoll i Melnick su u svom radu prikazali kompleksna molekularna dešavanja i signalne puteve, koji su reorganizovali klasičnu morfogenezu. Razvoj pljuvačne žlezde je primer za granajuću morfogenezu, osnovni proces koji je prisutan i u razvoju drugih organa, poput pluća, pankreasa, bubrega i dojke.^{9,10}

1.2 Anatomija pljuvačnih žlezda

Parotidna žlezda je najveća i najteža od svih glavnih pljuvačnih žlezda. U proseku, težina parotidne žlezde iznosi od 15 do 30 g. Nalazi se preaurikularno i duž zadnje ivice donje vilice. Facijalnim nervom je podeljena na površni i duboki režanj. Površni režanj se malazi uz bočnu stranu mazetera, dok se duboki nalazi između mastoidnog nastavka temporalne kosti i tela donje vilice. Glavni ekskretorni kanal parotidne pljuvačne žlezde, označen još i kao Stensenov kanal (*eng. Stensen's duct*), se uliva u usnu duplju u visini drugog gornjeg molara. Većina benignih tumora je lokalizovana u površnom reznju i mogu biti uklonjeni površnom parotidektomijom.¹¹ Akcesorna parotidna žlezda može biti lokalizovana napred, preko mazetera, i to između parotidnog kanala i jagodične kosti. Kanal akcesorne se direktno uliva u glavni kanal parotidne žlezde. Histološki, tkivo ove žlezde se razlikuje od tkiva parotidne žlezde u tome što pored seroznih, može sadržati i mucinozne acinuse.¹²

Submandibularna je druga pljuvačna žlezda po veličini, težine oko 7 do 16 g. Nalazi se u submandibularnom trouglu, a prostire se od donje ivice donje vilice do digastričnog mišića. U istoj loži se nalaze i submandibularni limfni čvorovi, facijalna arterija i vena, milohioidni mišić, kao i lingvalni, milohioidni i hipoglosni nerv. Ekskrecija pljuvačke iz submandibularne pljuvačne žlezde, u podu usne duplje, se odvija preko Vartonovog kanala (*eng. Wharton's duct*). Tokom disekcije vrata ili ekscizije same žlezde, milohioidni mišić se mora povući put napred, da ne bi došlo do oštećenja lingvalnog nerva i submandibularnog ganglionona.¹³

Najmanja od tri glavne pljuvačne žlezde je sublingvalna, težine od 2 do 4 g. Histološki, izgrađena je od mucinoznih acinusa. Nalazi se u submukozi prednjeg dela poda usne duplje, a iznad milohioidnog mišića. Za razliku od parotidne i submandibularne, sublingvalna pljuvačna žlezda nema pravu kapsulu, već je parcijalno prekrivena oralnom sluzokožom. Izlučivanje pljuvačke je ili direktno većim brojem kanala u podu usne duplje, ili ulivanjem kanala u Bartolinov kanal (*eng. Bartholin's duct*), koji se dalje uliva u Vartonov.¹⁴

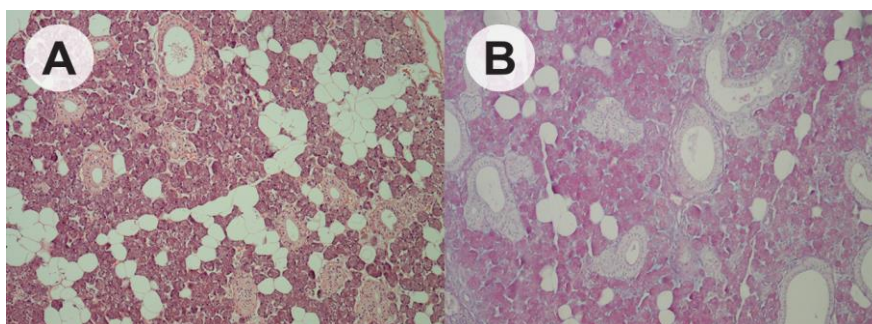
Između 600 i 1000 malih pljuvačnih žlezda je smešteno u usnoj duplji i orofarinksu. Najveći broj ovih žlezda se nalzi u usnama, jeziku, sluzokoži obraza i nepcu. Takođe se nalaze i u krajnicima, supraglotisu, kao i u paranazalnim šupljinama. Svaka žlezda poseduje

jedan kanal, koji se izliva direktno u usnoj duplji. Histološki, male pljuvačne žlezde su izgrađene od seroznih, mucinoznih acinusa, ili su mešovite.¹⁴

1.3 Histološke karakteristike pljuvačnih žlezda

Sve žlezde su izgrađene od parenhima (sekretorne jedinice sa pridruženim kanalima) i strome (okolno vezivno tkivo koje zalazi u žlezdano i deli ga na lobuluse). Sinteza se odvija intracelularno, a potom se produkti oslobađaju iz sekretornih granula različitim mehanizmima. Pljuvačne žlezde, kao i ostale žlezde sa egzokrinim lučenjem, pljuvačku izlučuju kroz kanale (duktuse) iz struktura nalik balonu, koji su označeni kao acinusi. Sami acinusi se mogu podeliti u tri osnovne vrste, i to serozni, mucinozni i mešoviti.

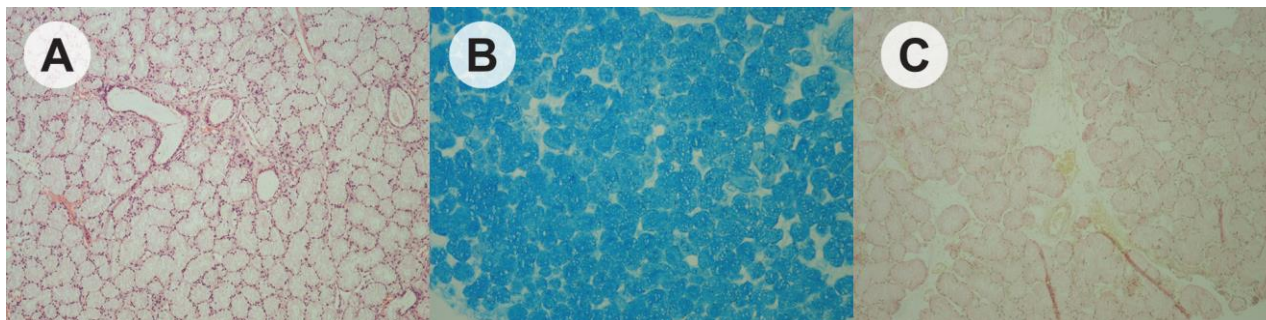
Serozni acinusi su grubo sferičnog oblika. Epitelne ćelije ovih acinusa su kruškolikog oblika (ili nalik piramidi) sa gustom citoplazmom. Jedra su raspoređena bazalno, a u citoplazmi se nalaze bazofilne PAS (Periodic Acid-Schiff) pozitivne zimogene granule, čiji broj varira u zavisnosti od faze sekretornog ciklusa. Osnovni enzim prisutan u zimogenim granulama je amilaza ili α -amilaza. U granulama su takođe prisutni i drugi proteini poput aglutinina, prolinom bogati proteini i histatini. Drugi enzimi, kao što je nespecifični antibakterijski lizozim, laktoferin, tripsin i himotripsinu slična proteaza, lizin endopeptidaza i histidin peptidaza, takođe su prisutni u citoplazmi acinarnih ćelija.^{15,16} Acinus poseduje centralni lumen putem koga se drenaža nastavlja u interkalatni kanal. Izlučivanje je potpomognuto mioepitelnim ćelijama, koje su smeštene između spoljašnjeg dela acinusa i bazalne membrane (*Slika 2*).



Slika 2. Histološka građa parotidne žlezde (serozna žlezda), A - H&E, uveličanje x10; B - AB-PAS, uveličanje x10

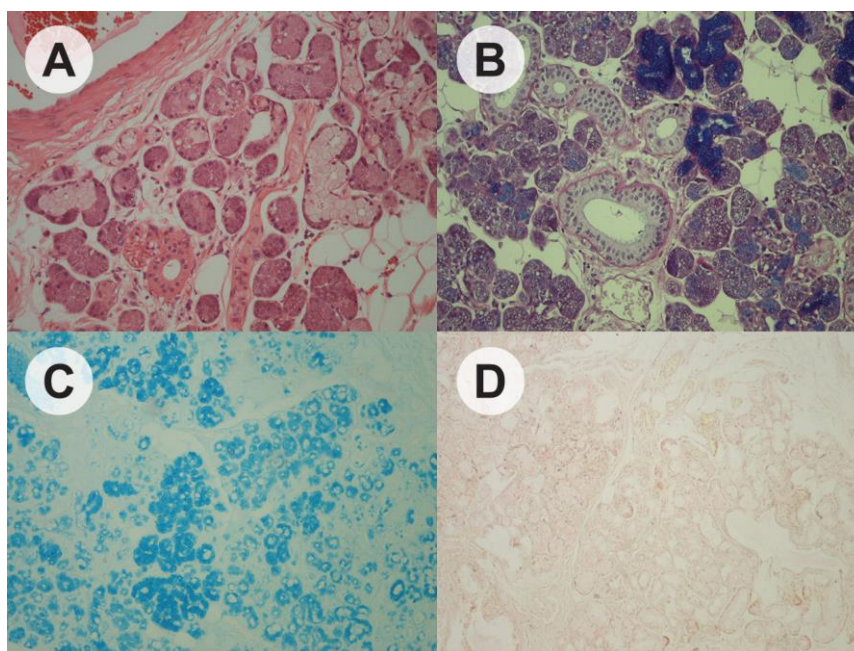
Mucinozni acinusi su veći od seroznih, i nepravilnog su oblika. Epitel ovih acinusa je cilindričan, sa izduženim, bazalno postavljenim jedrima i obilnom, svetlom citoplazmom

(Slika 3). Sekretorne ćelije mucinoznih acinusa sadrže kisele (Alcian blue i Mucicarmin pozitivni) i neutralne sijalomucine (PAS pozitivni), u različitim koncentracijama.¹⁷ Takođe, karakteristike ovih sijalomucina se razlikuju u submandibularnoj i sublingvalnoj pljuvačnoj žlezdi.¹⁸



Slika 3. Histološka građa sublingvalne žlezde (mucinozna žlezda). *A – H&E, uveličanje x10; B – Alcian blue, uveličanje x10; C – Mucicarmin, uveličanje x10*

Mešoviti, seromucinozni, acinusi se viđaju u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi (Slika 4). Poseduju karakteristike oba tipa acinsa. Mucinozne sekretorne ćelije su skoncentrisane u blizini interkalatnog kanala, a serozne ćelije su polumesečastog oblika.¹⁹



Slika 4. Histološka građa submandibularne pljuvačne žlezde (mešovita žlezda), *A – H&E, uveličanje x20; B – AB-PAS, uveličanje x20; C – Alcian blue, uveličanje x10; D – Mucicarmin, uveličanje x20*

Transport pljuvačke, kao i elektrolitna modifikacija, se obavlja sistemom kanala, koji su podeljeni na intralobularne i interlobularne kanale. Prvi deo, označen kao interkalatni kanal, je u direktnom kontaktu sa acinusima. Histološki, kanal je obložen jednoređnim kubičnim epitelom, a sa spoljašnje strane se nalaze, nepravilno raspoređene, mioepitelne

ćelije. U ovom segmentu odvija se sekrecija bikarbonata i apsorpcija hlorida iz primarne pljuvačke. Dužina interkalatnog kanala varira, pa je najduži u parotidnoj žlezdi, dok je jedva uočljiv u sublingvalnoj. Nastavlja se strijatnim kanalom, koji je obložen jednorednim cilindričnim epitelom. Citoplazma ovih ćelija je jako eozinofilna zbog velikog broja mitohondrija. Na bazalnoj strani se uočavaju karakteristične membranske invaginacije. U ovom segmentu se odvija reapsorbcija natrijuma i sekrecija kalijuma. Strijatni kanal, zajedno sa interkalatnim, je označen kao intralobularni deo sistema, odnosno kao sekretorni deo zbog njihove metaboličke aktivnosti. Intralobularni sistem kanala sa acinusom predstavljaju sekretornu jedinicu pljuvačne žlezde – salivon.^{20,21}

Naredni deo je interlobularni, odnosno ekskretorni deo sistema kanala, koji je smešten u vezivnom tkivu septi pljuvačnih žlezda. Obloženi su pseudostratifikovanim cilindričnim epitelom i pojedinačnim peharastim ćelijama. Kalibar ovih kanala se progresivno povećava do ulaska u glavni sekretorni kanal, koji je obložen nekeratinizujućim pločastoslojevitim epitelom, a sa spoljašnje strane se nalaze bazalne ćelije. Ove ćelije su relativno uniformne. U ovom delu, često su prisutni fenomeni metaplazije, kao i određeni broj malignih tumora pljuvačnih žlezda.^{19,22}

1.4 Dosadašnja istraživanja

Tumori pljuvačnih žlezda poseduju jedan od najvećih dijapazona u histološkom smislu. Godinama unazad se razmatralo i postavljale razne teorije o histogenezi i morfogenezi tumora, od kojih su mnoge ostale na nivou pretpostavke. Hipoteze koje su izazivale, a nekim delom i danas izazivaju, najveći broj polemika, zasnivju se na vezi histogeneze tumora i embriogeneze, odnosno na rezervne (stem) ćelije kanalskog (duktalnog) sistema.^{21,22,23,24} Uloga ovih ćelija jeste regeneracija parenhima pljuvačnih žlezda, ali isto tako učestvuju i u procesu metaplazije u zapaljenskim, reaktivnim uslovima. Batsakis je osamdesetih godina dvadesetog veka postavio hipotezu o dve stem progenitorske ćelije, koje su lokalizovane na proksimalnim i distalnim delovima kanalnih sistema. Shodno lokalizaciji same ćelije i tumor će imati karakteristike ili terminalnih duktuloacinusnih struktura, ili pak karakteristike ekskretornog dela kanalnog sistema.²⁵ Born i Burns sa kolegama su imunohistohemijskim metodama dokazali prisustvo nediferentovanih bazalnih ćelija oko kanalnog sistema, ali bez jasnih dokaza da se radi o rezervnim (stem) ćelijama.^{26,27} Međutim,

sa druge strane postoje brojni eksperimentalni dokazi o proliferativnom kapacitetu diferentovanih acinusnih i mioepitelnih ćelija.^{28,29}

Dardick i Nostrand u svom istraživanju navode da veza između normalne strukture pljuvačne žlezde i histološke slike samog tumora može da nam pomogne samo u razumevanju morfološke klasifikacije, Ipak, moramo imati na umu da sličnost ne mora nužno značiti i to da tumor vodi poreklo iz strukture koju imitira.²⁴ Međutim, i sam Dardick predlaže morfogenetski pristup diferencijaciji stem ćelija, koja je nastala kao posledica različitih genskih ekspresija.^{30,31}

Intrakalatni kanal predstavlja jednu od najvažnijih struktura pljuvačne žlezde koja se povezuje sa morfogenezom velikog broja različitih tumora.²⁴ U tu grupu tumora se ubrajaju pleomorfni adenom, adeom bazalnih ćelija, karcinom bazalnih ćelija, mioepiteliom, adenoidno cistični karcinom, embrionalni karcinom, epitelno-mioepitelni karcinom. Kao i sam interkalatni kanal, i ovi tumori pokazuju kako epitelnu, tako i mioepitelnu diferencijaciju.^{30,32,33,34,35} Prema Batsakis-u ovi tumori i nastaju iz rezervnih ćelija interkalatnog kanala, i to istim pravcem kao i embrionalne terminalne tubularne ćelije.²⁵ Statistički gledano i najveći broj tumora pljuvačnih žlezda, oko 80%, jeste lokalizovan u parotidnoj žlezdi, gde je dužina interkalatnog kanala i najveća. Nasuprot tome, u sublingvalnoj je učestalost tumora oko 1%, gde je interkalatni kanal i jedva vidljiv.³¹

Foote i Frazel su 1953. godine prvi objavili histološku klasifikaciju malignih tumora pljuvačnih žlezda³⁶, a zatim 1979. godine Batsakis.³⁷ Svetska zdravstvena organizacija (*eng. WHO*) je 1972. godine objavila prvu klasifikaciju tumora ove oblasti, a tek je 1991. godine izdala revidirano izdanje. Tumori epitelnog porekla su prikazani u *Tabeli 1*. Najčešći maligni tumori neepitelnog porekla su maligni fibrozni histiocitom, maligni švanom i rabdomiosarkom. Ne-Hoćkinovi limfomi sa različitim stepenom diferencijacije se najčešće sreću u ovoj regiji. MALT (*eng. Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) limfom, a posebno limfom marginalne zone (*eng. marginal zone lymphoma*), su povezani sa hroničnim sijaloadenitisom koji je imunski posredovan, u sklopu sindroma Sjögren.^{38,39} Planocelularni karcinom i melanom kože regije glave i vrata, najčešće su polazište metastaza u pljuvačnim žlezdama. Hematogene metastaze u ovoj regiji su veoma retke, a najčešće potiču iz bubrega, dojke i pluća.⁴⁰ Treba imati u vidu da određeni benigni tumori, poput pleomorfnog adenoma, adenoma bazalnih ćelija, mioepitelioma i onkocitoma, mogu maligno da alterišu.⁴¹

Tabela 1. Benigni i maligni epitelni tumori pljuvačnih žlezda

BENIGNI EPITELNI TUMORI	MALIGNI EPITELNI TUMORI
Pleomorfni adenom	Karcinom acinusnih ćelija
Mioepiteliom	Mukoepidermoidni karcinom
Adenom bazalnih ćelija	Adenoidni cistični karcinom
Warthin tumor	Polimorfni adenokarcinom niskog gradusa
Onkocitom	Epitelno-mioepitelni karcinom
Kanalikularni adenom	Svetloćelijski karcinom
Sebacealni adenom	Adenokarcinom bazalnih ćelija
Limfadenom	Sebacealni karcinom
• sebacealni	Sebacealni limfadenokarcinom
• nesebacealni	Cistadenokarcinom
Duktalni papilom	Kribriformni cistadenokarcinom niskog gradusa
• invertni papilom	Mucinozni adenokarcinom
• intraduktalni papilon	Onkocitni karcinom
• sialoadenoma papilliferum	Karcinom pljuvačnih kanala
Cistadenom	Adenokarcinom [NOS]
	Mioepitelni karcinom
	Karcinom iz pleomorfnog adenoma
	Karcinosarkom
	Metastazirajući pleomorfni adenom
	Planocelularni karcinom
	Karcinom malih ćelija
	Karcinom velikih ćelija
	Limfoepitelijalni karcinom
	Sijaloblastom

Druga polovina dvadesetog veka se pokazala kao izuzetan period u istraživanju i identifikaciji novih tumora pljuvačnih žlezda. U prilog ovome ukazuje i činjenica da je 1953. godine opisano 16 tumora ove lokalizacije, a 1996. godine već 36, što će reći da se broj novootkrivenih entiteta udvostručio.^{36,42} Po prvoj klasifikaciji opisano je 6, a kasnije 13 benignih tumora, dok je broj malignih tumora bio 10, a potom 23.

1.5 Etiologija tumora pljuvačnih žlezda

Tokom godina istraživanja, došlo je do napretka u razjašnjavanju porekla i otkrivanju specifičnog uzroka u nastanku tumora pljuvačnih žlezda. Najpoznatiji razlog je izlaganje radijaciji, čemu u prilog ide činjenica o povećanoj incidenci kod ljudi koji su preživeli eksploziju nuklearne bombe, kao i kod bolesnika na zračnoj terapiji tumora drugih lokalizacija. Takođe, je uočena povećana učestalost tumora kod dece obolele od leukemije, koja su na hemioterapiji i profilaktičkom zračenju glave.⁴³ Efekat odgovora na niske doze zračenja pokazao je srednju vrednost latentnog perioda za maligne tumore od 11 godina, a za benigne tumore 21,5 godina.⁴⁴ Od potencijalno važnih, jedino infekcija EBV je identifikovana u patogenezi ovih tumora, naročito u Azijskoj i Eskimo populaciji. Za sada nema dokaza da infekcije drugim virusima poput herpes virusa, humanog papiloma virusa ili HIV, imaju ulogu u nastanku tumora.^{45,46} Za razliku od tumora drugih lokalizacija, naročito u predelu glave i vrata, povećanje incidence tumora pljuvačnih žlezda nije povezano sa stilom života, osim za Vartinov tumor. Mnoge studije su pokazale udruženost konzumiranja cigareta i ovog tumora.^{47,48} Swanson i Burns su objavili članak u kome su opisali povećani rizik za razvoj malignih tumora pljuvačnih žlezda kod osoba koje rade u frizerskim i kozmetičkim salonima.⁴⁹

U novije vreme je pokazano da u osnovi razvoja tumora pljuvačnih žlezda stoje određene genetske malformacije. Dokazano je da u sklopu autozomno dominantno naslednog Turban tumora postoji povećana učestalost udruženosti sa cilindromima, trihoepiteliomima i bazalno ćelijskim adenomima pljuvačnih žlezda.^{50,51} Poznata je pojava povećane učestalosti pleomorfog adenoma, karcinoma acinusnih ćelija, Vartinovog tumora i limfoepitelnog karcinoma unutar jedne porodice.^{52,53} Citogenetička analiza benignih tumora ukazuje na trizomiju hromozoma 8, kao i na recipročnu translokaciju, koji uzrokuju aktivaciju onkogenog HMGIC lokalizovanog na hromozomu 12q13 i PLAG1 na hromozomu 8q12.⁵⁴ Dokazano je da PLAG1, nuklearni protein, aktivira transkripciju faktora rasta humanog insulina II (IGF-II), bitnog u tumorogenezi.⁵⁵ Pojedini histološki tipovi tumora su, takođe, povezani sa specifičnim abnormalnostima - carcinoma ex pleomorphic adenoma (8q12-13 i 12q13-15 rearanžman), adenoidno cistični karcinom (translokacija [6; 9] [q21-24; p13-23]), i mukoepidermoidni karcinom (translokacija [11; 19] [q14-21; p12-13]).⁵⁴

1.6 Epidemiologija tumora pljuvačnih žlezda

Tumori pljuvačnih žlezda su veoma retke neoplazme. S'obzirom na njihovu patohistološku sliku, ovi tumori predstavljaju veoma veliki dijagnostički izazov. Učestalost ovih tumora se kreće od 3 do 6% svih tumora regije glave i vrata, sa godišnjom incidencom od 0,05 do 2 novootkrivena na 100.000 ljudi.^{56,57} Parotidna žlezda je najčešće mesto tumora pljuvačnih žlezda, sa učestalošću od 80-85%, a skoro 75% ovih tumora su benigne neoplazme. Druga po učestalosti je submandibularna žlezda, sa 10%, ali polovina tumora ove lokalizacije su maligne neoplazme. Sa frekvencom od 1% je sublingvalna žlezda, ali oko 80% tumora su maligni. Male pljuvačne žlezde su mesta sa najčešćom frekvencom malignih tumora.^{58,59} Epidemiološki podaci prikazuju različitu učestalost u različitim etničkim grupama i delovima sveta, što dodatno otežava globalnu incidencu ovih tumora.^{60,61} U Sjedinjenim Američkim Državama maligni tumori pljuvačnih žlezda čine 6% karcinoma glave i vrata, a u odnosu na ostale lokalizacije učestalost im je 0,3%. Podaci Britanskih istraživača prikazuju učestalost mukoepideroidnog karcinoma od 2,1%, što je značajno manje u odnosu na globalnu učestalost, koja se kreće od 5 do 15%. Veoma visoka incidenca je prijavljena na Grenlandu.⁶² Pojedine studije prikazuju da 9% malignih tumora pljuvačnih žlezda čine limfomi i metastatski tumori, što treba imati u vidu u pogledu diferencijalne dijagnoze.⁶³ Veliki rizik za povećanu učestalost karcinoma pljuvačnih žlezda je detektovan nakon migracija u predele sa niskom incidencom, što ukazuje da genetski ili rano stečeni faktori sredine igraju bitnu ulogu u etiologiji ovih tumora.⁶⁴

U odnosu na polove, u žena se znatno češće sreću tumori ove lokalizacije, ali i taj odnos značajno varira u zavisnosti od tipa samog tumora. Prosečna starost pacijenata je 46-47 godina, ali pik pojedinih tumora je u šestoj i sedmoj deceniji života. Međutim, pik za pleomorfni adenom i mukoepidermoidni karcinom, kao najučestalije tumore, je u četvrtoj i petoj deceniji. U pacijenata ispod 17 godina učestalost tumora mezenhimnog i epitelnog porekla je jednaka, kao i odnos benignih i malignih tumora. Pleomorfni adenom, mukoepidermoidni karcinom i karcinom acinusnih ćelija čine 90% svih epitelnih tumora pljuvačnih žlezda ove populacija. Među svim bolesnicima, nezvano za životnu dob, pol i biološko ponašanje tumora, pleomorfni adenom je najučestaliji, sa frekvencom od 50%. Warthin tumor je drugi po učestalosti među benignim, dok je mukoepidermoidni karcinom najčešći među malignim tumorima. Većina kanalikularnih adenoma i polimorfni adenokarcinoma niskog gradusa su porekla malih pljuvačnih žlezda. Warthin tumor se najčešće javlja u parotidnoj žlezdi ili periparotidnom limfnom nodusu.^{63,65,66}

1.7 Patohistološke karakteristike tumora pljuvačnih žlezda

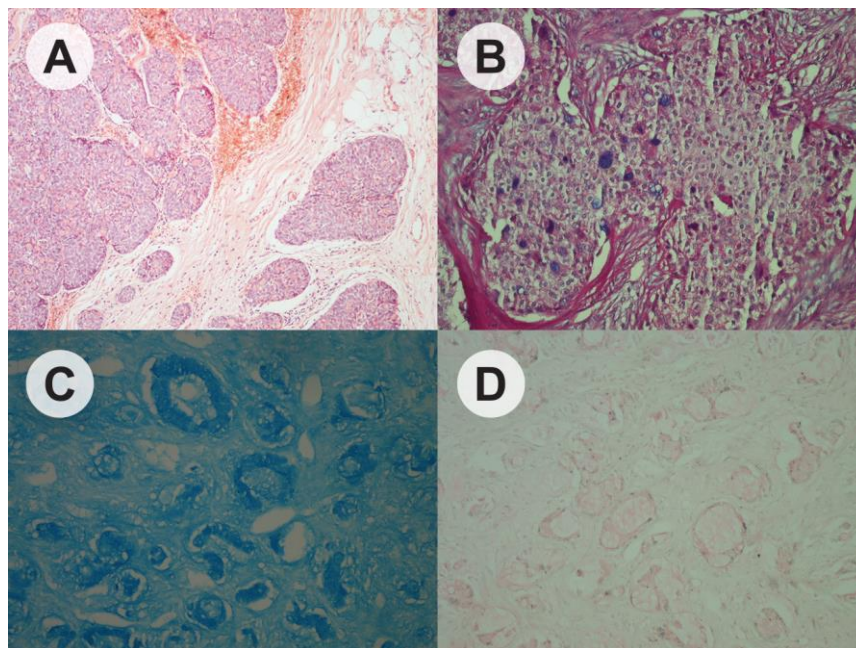
1.7.1 Mukoepidermoidni karcinom

(„*Carcinoma mucoepidermoides*”)

Mukoepidermoidni karcinom predstavlja najčešći primarni maligni tumor pljuvačnih žlezda, sa najčešćom lokalizacijom u parotidnoj žlezdi.⁶⁵ U odnosu na polove, nešto je frekventniji u žena, i to u odnosu 3:2.⁶³ Ovaj tumor karakteriše višegodišnji rast, i odsustvo bolova. Kada ima intraoralnu prezentaciju, površina tumora je plavo-crvene prebojenosti i može da oponaša mukokelu ili neki tumor vaskularnog porekla.^{65,67} Po jednoj teoriji vodi poreklo od ćelija ekskretornih kanala, dok je po drugoj porekla rezervnih ćelija istih kanala.⁴⁰ Prognoza tumora zavisi od stepena maligniteta, gradusa tumora, stadijuma tumorske bolesti, pola i starosti bolesnika.⁶⁸

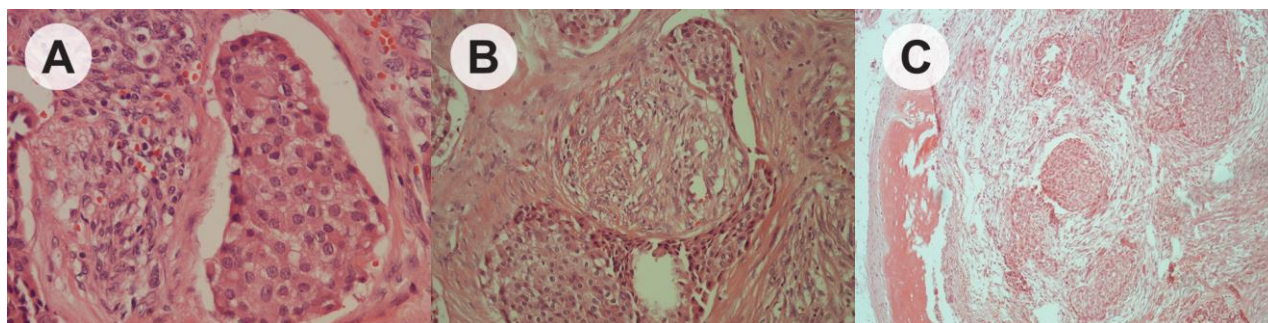
Makroskopski, reč je o tumoru solidno-cistične građe, čvrste konzistencije, svetle prebojenosti, sa relativno jasnim marginama.

Patohistološki, mukoepidermoidni karcinom je izgrađen od epidermoidnih (skvamoidnih) i mukus produkujućih ćelija. Stepem diferentovanosti ćelija, kao i njihova arhitektonika, uključujući formiranje cističnih struktura, zavise od samog tumora. Pojedini tumori mogu da budu relativno jasno ograničeni, ali je uvek prisutna infiltracija okolnog parenhima pljuvačne žlezde. Obično su multicističnih karakteristika sa solidnom komponentom, koja vremenom može da postane dominantna. Cistične strukture su obložene mukusnim, kuboidalnim i bazalnim ćelijama. Takođe su prisutne epidermoidne ćelije, ali je keratinizacija veoma retka. Mukusne ćelije su velike, sa svetlom citoplazmom i periferno raspoređenim jedrima, i čine oko 10% ćelijske populacije tumora. Ove ćelije vrše produkciju sijalomucina, i mogu da se dokažu histohemijskim metodama bojenja, Mucicarmin ili Alcian blue. Svetle, cilindrične ili onkocitne ćelije mogu, takođe, biti prisutne. Ove ćelije pokazuju PAS pozitivnost, što ukazuje na sadržaj glikogena u citoplazmi (*Slika 5*). Fokusi skleroze i ekstravazacija mucina su česti u tumoru. Ovi fenomeni su praćeni jakom zapaljenskom reakcijom do formiranja germinativnih centara, što može da navede na lažnu sliku postojanja infiltracije lokalnih limfnih nodusa. Perineuralna invazija, nekroze, kao i povećana mitotska aktivnost su retki u ovom tipu karcinoma.^{63,69}



Slika 5. Mukoepidermoidni karcinom, A – solidna forma rasta tumora, H&E, uveličanje x10; B – AB-PAS, uveličanje x20; C- Alcian blue, uveličanje x20; D - Mucicarmin, uveličanje x10

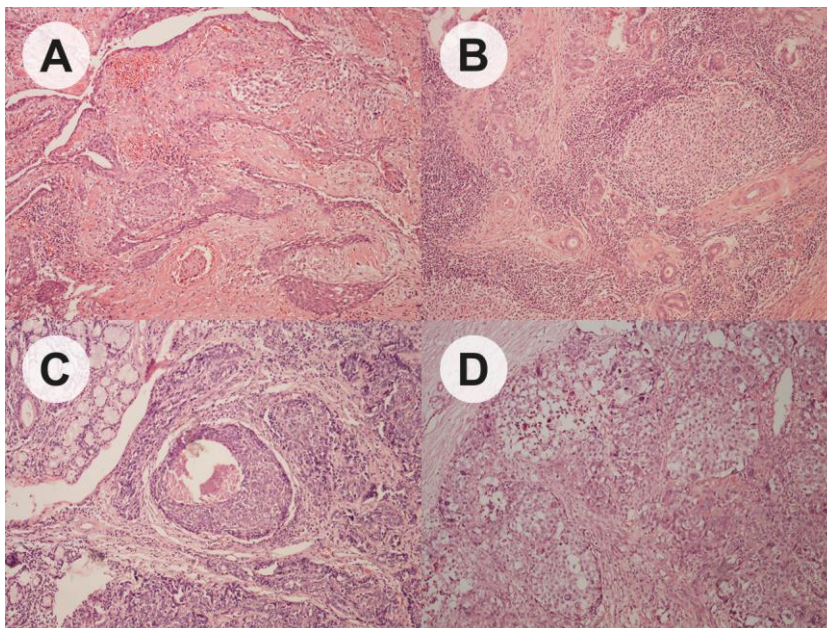
Institut za Patologiju Oružanih Snaga (*eng. The Armed Forces Institute of Pathology (AFIP)*) je dao scoring sistem u određivanju gradusa tumora. Uključili su pet karakteristika – intracistična komponenta (<20%, skor 2), perineuralna invazija (skor 2), prisustvo nekroza (skor tri), broj mitozā (>4 / 10 vidnih polja velikog uveličanja (*eng. hpf*), skor 3) i anaplazija (skor 4). U ukupnom rezultatu, skor 0-4 odgovara karcinomu niskog gradusa, skor 5-6 karcinomu srednjeg, a skor 7 i više bi odgovarao karcinomu visokog gradusa. Ovaj sistem se pokazao kao veoma dobar za karcinome parotidne i intraoralne lokalizacije, ali ne i za submandibularnu lokalizaciju. Tumori koji su tu lokalizovani imaju veoma veliki metastatski potencijal, bez obzira na gradus.⁷⁰ Kasnije je ovaj sistem unapređen i dodato je još i limfovaskularna invazija, zahvatanje kosti, kao i širenje u obliku ostrvaca ili gnezda⁷¹ (Slika 6).



Slika 6. Mukoepidermoidni karcinom, A – limfovaskularna invazija, H&E, uveličanje x40; B – perineuralna invazija, H&E, uveličanje x20; C – infiltracija koštanog tkiva, H&E, uveličanje x10

Imunohistohemijski, tumorske ćelije su pozitivne na citokeratine velike molekularne težine, kao što se CK5/6, CK14, zatim na EMA, CEA i p63, dok su negativne na S100 i α SMA. Ponekada se može detektovati fokalna pozitivnost na GFAP i vimentin.⁶³

Diferencijalno dijagnostički treba imati u vidu nekrotizujuću metaplaziju, LESA, invertni papilom, planocelularni karcinom, svetloćelijski karcinom, adenoskvamozni karcinom, kao i metastaze malignih tumora drugih lokalizacija (Slika 7).



Slika 7. A – *Sialometaplasia necroticans*, uveličanje x10; B – LESA, uveličanje x10; C – *Metastases carcinoma planocellularae*, uveličanje x10; D – *metastasis melanoma malignum*, uveličanje x10

1.7.2 Adenoidni cistični karcinom

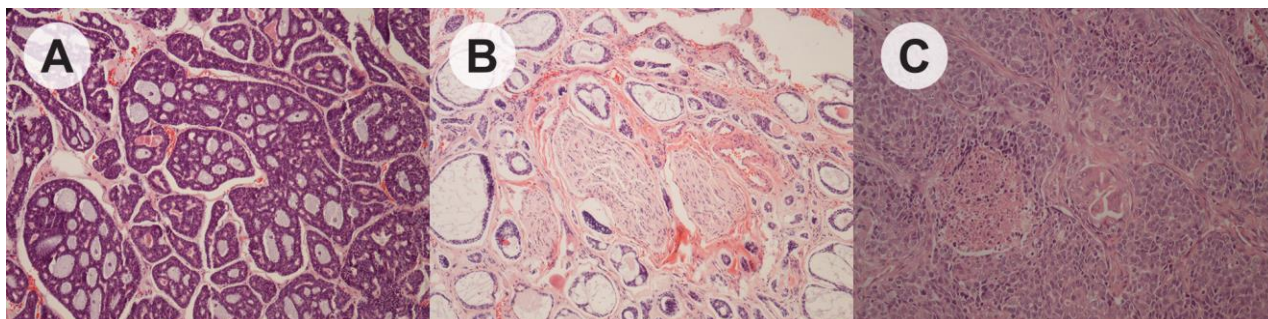
(„*Carcinoma adenoides cysticum*”)

Adenoidni cistični karcinom je drugi po učestalosti, i čini 20% svih malignih tumora pljuvačnih žlezda. Učestalost među polovima je jednaka, sa pikom u srednjoj životnoj dobi. Klinički se karakteriše visokim stepenom recidiviranja, kao i pojavom metastaza.⁶⁵

Makroskopski se prezentuje kao čvrsta, svetla dobro ograničena tumorska promena.

Patohistološki, tumor grade dva tipa ćelija, duktalne i modifikovane mioepitelne ćelije sa hiperhromnim, uglastim jedrima i svetlom citoplazmom. Postoje tri forme ovog tumora. Tubularna forma, koju čine jasni duktusi i tubulusi, obloženi aplatiranim epitelom, a sa spoljašnje strane se nalaze mioepitelne ćelije. Kribriformni tip, izgrađen od tumorskih plaža sa mikrocističnim prostorima koji su ispunjeni hijalnim ili bazofilnim mukoidnim

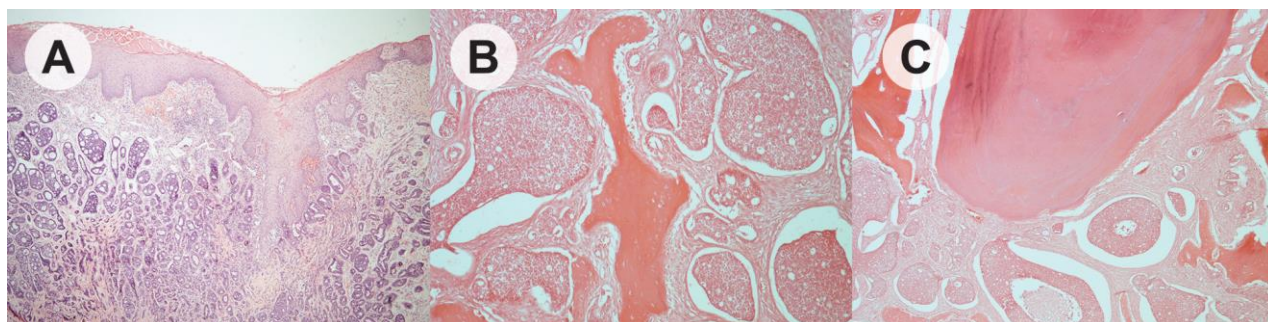
materijalom. Solidni ili bazaloidni tip čine tumorske plaže izgrađene od uniformnih bazaloidnih ćelija, bez tubularnih ili mikrocističnih prostora. Svaka od formi rasta tumora se posmatra kao dominantniji ili učestaliji deo tumora (*Slika 8*).



Slika 8. Adenoidni cistični karcinom, A – kribriformni tip, H&E, uveličanje x10;
B – tubularni tip sa perineuralnom invazijom, H&E, uveličanje x10;
C – solidni tip, H&E, uveličanje x20

Stroma je uglavnom hijalinizovana, ponekada do te mere da je dominantna u tumoru. Perineuralna invazija je uobičajena i vrlo često upadljiva karakteristika ovih tumora.^{63,72}

Kod adenoidnog cističnog karcinoma histološki gradus tumora, kao prognostički marker, je veoma problematičan. Određuje se na osnovu odnosa komponenti tumora. Generalno, tumori sa tubularnom i kribriformnom prezentacijom imaju bolju prognozu, i označeni su niskostepenim gradusom. Za razliku od njih, ako je prisutno više od 30% solidne komponente, tumor pokazuje znatno agresivniji tok.^{73,74} Agresivne varijante tumora su prikazane na *Slici 9*.



Slika 9. Adenoidni cistični karcinom, A – solidno-kribriformni tip sa infiltracijom kože obraza, H&E, uveličanje x4; B - solidno-kribriformni tip sa infiltracijom koštanog tkiva gornje vilice, H&E, uveličanje x10; C - solidno-tubularni tip sa probijem koštanog tkiva gornje vilice i tumorskim plažama koje su prisutne oko korena zuba, H&E, uveličanje x10

Imunohistohemijski, luminalne ćelije su pozitivne na CEA, EMA i CK14, dok su bazaloidne ćelije pozitivne na vimentin, p63 i α SMA.⁶³

Diferencijalno dijagnostički se uključuju pleomorfni adenom, polimorfni adenokarcinom niskog gradusa, adenom ili adenokarcinom bazalnih ćelija.

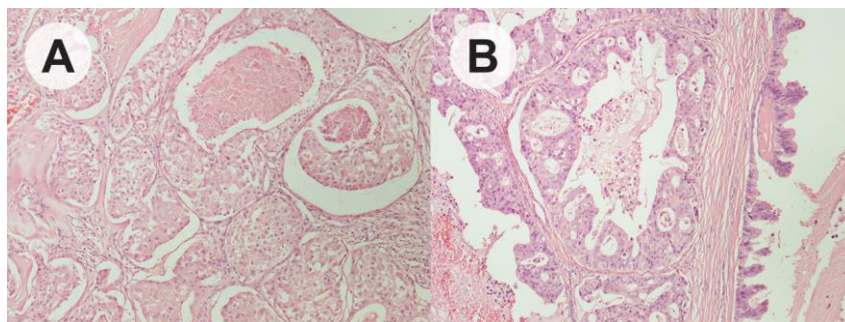
1.7.3 Karcinom pljuvačnih kanala

(„*Salivary duct carcinoma*”)

Karcinom pljuvačnih kanala je visoko maligni epitelni tumor pljuvačnih žlezda sa slikom, gotovo identičnom, duktalnog invazivnog karcinoma dojke. Učestalost ovog tumora iznosi 9% od svih primarnih malignih tumora pljuvačne žlezde, sa predominacijom u žena, i to u odnosu 4:1. Najčešće je lokalizovan u parotidnoj žlezdi.^{63,65} Karakteriše se veoma brzim rastom i variranjem u veličini. Bol i pareza facijalnog nerva su ponekad prisutni. U trenutku postavljanja dijagnoze, neretko, tumor je velikih dimenzija sa udaljenim metastazama.⁷⁵ U svojim studijama Barnes (104 bolesnika) i Jaehne (50 bolesnika) prikazali su da se recidiv javlja između 33% i 48% slučajaja, a da su udaljene metastaze bile prisutne kod 48% bolesnika. Smrtnost je velika i iznosi oko 65% unutar četiri godine od postavljanja dijagnoze.^{75,76}

Makroskopski, tumor je solidne građe sa cističnom komponentom, čvrste konzistencije, bele do sive boje sa vidljivom infiltracijom okolnog parenhima.

Patohistološki, karcinom pljuvačnih kanala podeseća, kako arhitektonski, tako i citološki, na duktalni invazivni karcinom dojke. Prisutan je polimorfizam epitelnih ćelija sa kribriformnim tipom rasta. Prisutne su intraduktalne, komedo nekroze, kao i hiperplazija dukalnog epitela sa slikom „rimskih mostova” (eng. *“Roman bridge formation”*) (Slika 10). Kao dokaz skvamozne diferencijacije, koja se može po nekada videti u tumoru, prisutna su psamomska telašca, kao i područja solidnog i papilarnog rasta tumora. Citološki, ćelije poseduju svetlu, eozinofilnu citoplazmu, krupna polimorfna jedra sa prominentnim jedarcima i grubim hromatinom. Istaknut je veliki broj patoloških mitozata. U pojedinim slučajevima, ćelije mogu imati vretenastu ili sarkomatoidnu diferencijaciju, slično metaplastičnom karcinomu dojke.^{63,77}



Slika 10. Karcinom pljuvačnih kanala, A – intraduktalne komedo nekroze, H&E, uveličanje x10; **B** – hiperplazija intraduktalnog epitela, H&E, uveličanje x10

Kod intrakanalnog (intraduktalnog) karcinoma pljuvačnih žlezda postoji strogo definisani kriterijum o intaktnim mioepitelnim ćelijama, oko samih duktusa. Ovaj tumor je često prisutan u literaturi kao karcinom pljuvačnih kanala niskog gradusa. Zapravo velika većina ovih karcinoma je čist intraduktalni karcinom ili sa mikroinvazijom. Svetska Zdravstvena organizacija je usvojila termin „kribriiformni cistadenokarcinom niskog stepena”, koji je doveo do velikih polemika. Da li je intraduktalni karcinom entitet za sebe ili zapravo premaligna lezija još uvek nije razjašnjeno.^{63,41}

Imunohistohemijski, tumorske ćelije su pozitivne na CEA, EMA, p53, HER-2, a negativne na mioepitelne markere p63, α SMA i CK14, vimentin i WT1.⁶³

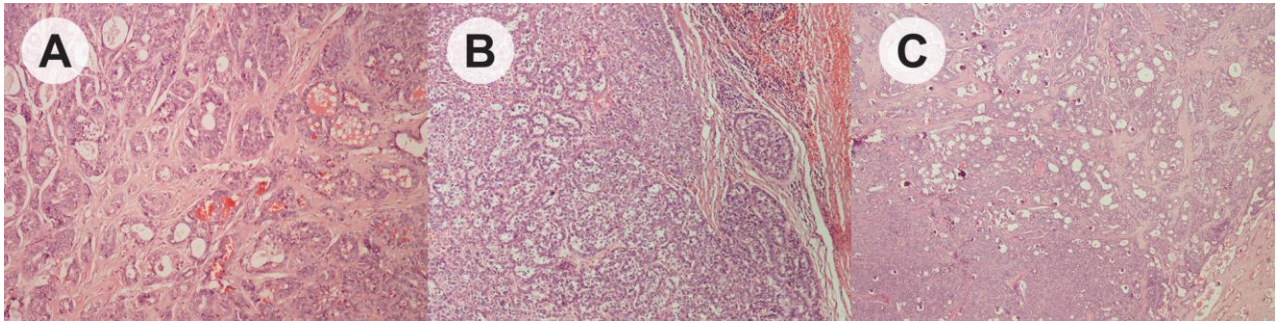
Diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze metastaze dukalnog karcinoma dojke i planocelularnog karcinoma, kao i maligni onkocitom i mukoepideroidni karcinom. U ovom tipu karcinoma postoji karakteristični kribriiformni ćelijski aranžman koji isključuje planocelularni karcinom, područja sa peharastim ćelijama se viđaju isključivo u područjima sa metaplazijom.

1.7.4 Polimorfni adenokarcinom niskog gradusa („*Polymorphous low-grade adenocarcinoma*”)

Polimorfni adenokarcinom niskog gradusa predstavlja primarni maligni epitelni tumor pljuvačnih žlezda sa veoma polimorfnom prezentacijom, monomorfnim ćelijama, infiltrativnim rastom i niskim metastatskim potencijalom. Učestalost tumora iznosi 26% svih intraoralnih karcinoma. Zastupljeniji je u nešto starijoj poulaciji (oko 70% bolesnika je od 50 do 70 godina starosti), sa predominacijom u žena, i to u odnosu 2:1. U oko 60% slučajeva je lokalizovan na nepcu, potom na bukalnoj sluzokoži, retromolarno, gornjoj usni i podu jezika. Retko je prisutan u velikim pljuvačnim žlezdama. Prezentuje se u vidu bezbolne mase, koja može da bude praćena krvarenjem, telangiektazijama i ulceracijama.^{63,65}

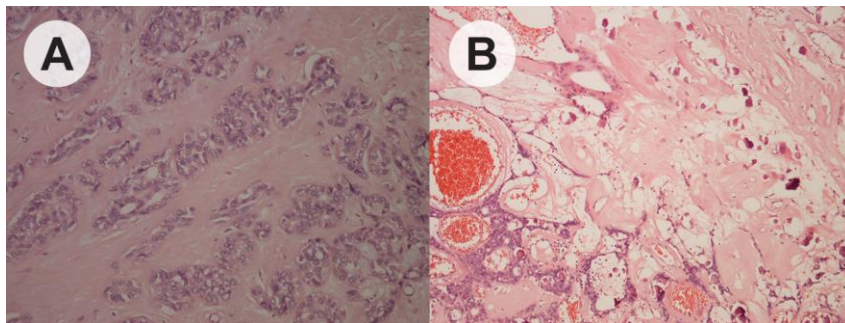
Makroskopski, tumor je jasno ograničen, ali bez kapsule. Čvrste je konzistencije, prljavo žute prebojenosti, lobuliranog izgleda.

Patohistološki, tumor je izgrađen od monomorfnih ćelija, male do srednje veličine sa malim, ovalnim i hiperhromnim jedrima, baz jasno uočljivih jedaraca. Mitoze i nekroze su retke. Pod polimorfizmom u samom nazivu ovog tumora podrazumevamo solidni, kribriiformni, tubularni, trabekularni, fascikularni (*eng. streaming*), linearni (*eng. indian file*) i cistični tip rasta (*Slika 11*). Uočava se targetoidna perineuralna i perivaskularna invazija.^{31,63}



Slika 11. Polimorfni adenokarcinom niskog gradusa, A – tubularni tip rasta, H&E, uveličanje x10; B – solidno-kribriformni tip rasta, H&E, uveličanje x10, C – solidno-cistični tip rasta, H&E, uveličanje x4

Stroma može da bude hijalinizovana, mukoidna ili fibrozna, što može dodatno komplikovati diferencijalnu dijagnozu (*Slika 12*).



Slika 12. Polimorfni adenokarcinom niskog gradusa, A – tubularni tip rasta tumora sa hijalinizovanom stromom, H&E, uveličanje x10; B – kribriformni tip rasta tumora sa mukoidnom stromom i mikrokalcifikatima, H&E, uveličanje x10

Imunohistohemijski, tumorske ćelije su pozitivne na CEA, EMA, vimentin, S100 i CK14, a negativne na p63, α SMA i GFAP.⁶³

Diferencijalno dijagnostički se uključuje pleomorfni adenom i adenoidni cistični karcinom.

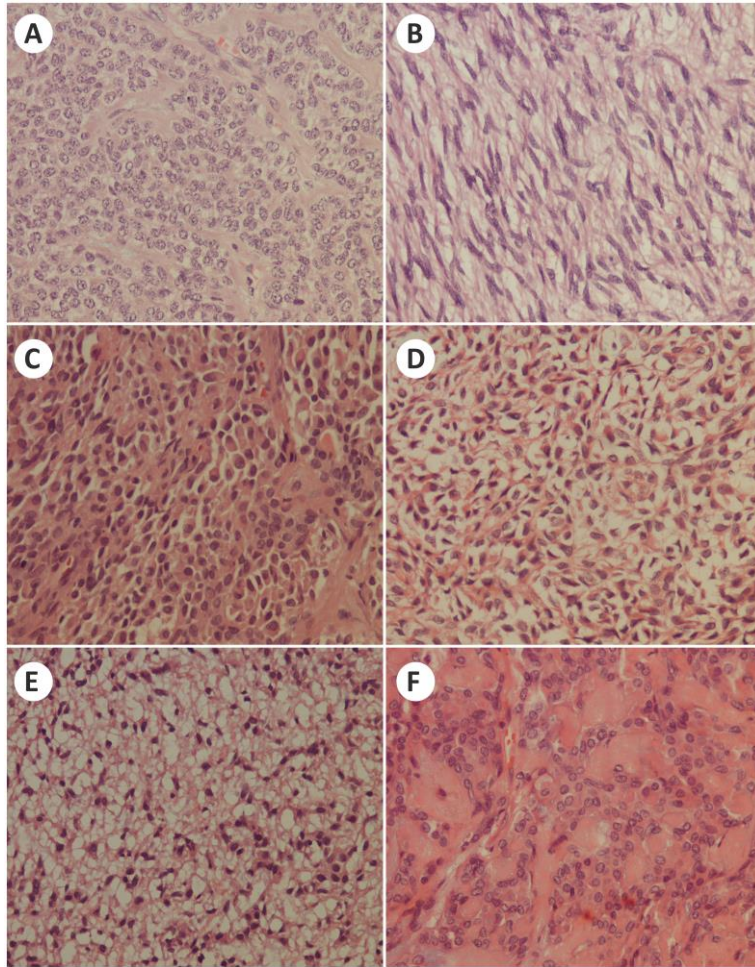
1.7.5 Mioepitelni karcinom

(„*Myoepithelial carcinoma; Myoepithelioma malignum*”)

Mioepitelni karcinom predstavlja maligni tumor izgrađen isključivo od tumorskih mioepitelnih ćelija. Karakteriše se infiltrativnim rastom i sposobnošću za metastaziranje. Nastaje *de novo*, ali u velikom procentu (oko 50%) se razvija iz mioepitelioma i pleomorfnog adenoma. Učestalost tumora je oko 2% u odnosu na sve maligne tumore pljuvačnih žlezda. Javlja se u starijoj životnoj dobi, sa pikom u šestoj deceniji i sa jednakom učestalošću među polovima. Najčešća lokalizacija mu je u parotidnoj (75%), a potom u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi. Klinički se karakteriše lokalno destruktivnim rastom, sa zahvatanjem lokalnog koštanog tkiva. Udaljene metastaze su prisutne u odmakloj bolesti. Prvi put je opisan 1975. godine.^{63,78,79}

Makroskopski, tumor ne poseduje kapsulu, ali može da bude jasno ograničen, lobulirane površine. Veličina tumora varira od 2 do 5cm. Na reznoj površini, tumor je bele boje, sedefastog sjaja, sa poljima nekroze i cistične degeneracije.

Patohistološki, tumor je multinodularne građe, a same plaže su izgrađene od ćelija koje mogu imati vretenast, plazmocitoidni, epiteloidni, stelatni (zvezdasti), svetloćelijski i izgled pečatnog prstena (eng. *signet ring cell*) (Slika 13). U centru tumorskog nodulusa su često prisutne nekroze. Nodulusi mogu biti međusobno približeni, ili odvojeni okolnom stromom koja je miksoidna ili hijalina. Veoma često mioepitelni karcinom ima sliku sarkoma. Tumorske ćelije povremeno formiraju strukture nalik duktusima, ali luminalne ćelije nisu prisutne. Za postavljanje dijagnoze mioepitelioma, kako benignog, tako i malignog, neophodno je odsustvo duktusa. Ćelijski polimorfizam može biti prisutan, ali je neupadljiv. Mitotska aktivnost je umereno povećana, tako da su lokalni infiltrativni rast i destrukcija osnovni i prvi parametar malignog tumora mioepitelnog porekla.^{41,80,81}



Slika 13. Mioepitelni tumor, A – epitelooidni tip, H&E, uveličanje x40; B – vretenasti tip, H&E, uveličanje x40; C – plazmocitoidni tip, H&E, uveličanje x40; D – stelatni tip, H&E, uveličanje. x40; E – svetloćelijski tip, H&E, uveličanje x40; F – hijalina stroma tumora, H&E, uveličanje x40

Imunohistohemijski, tumorske ćelije kako kod malignog, tako i benignog tumora mioepitelnog porekla, su pozitivne na vimentin, CK-AE1/AE3, S-100 i calponin, umereno do slabo pozitivne na α SMA, GFAP, CK14 i p63, a negativne su na p53, CEA, EMA i HER-2.⁶³

Diferencijalna dijagnoza mioepitelnog karcinoma uključuje pleomorfni adenom i mioepiteliom.

1.7.6 Pleomorfni adenom

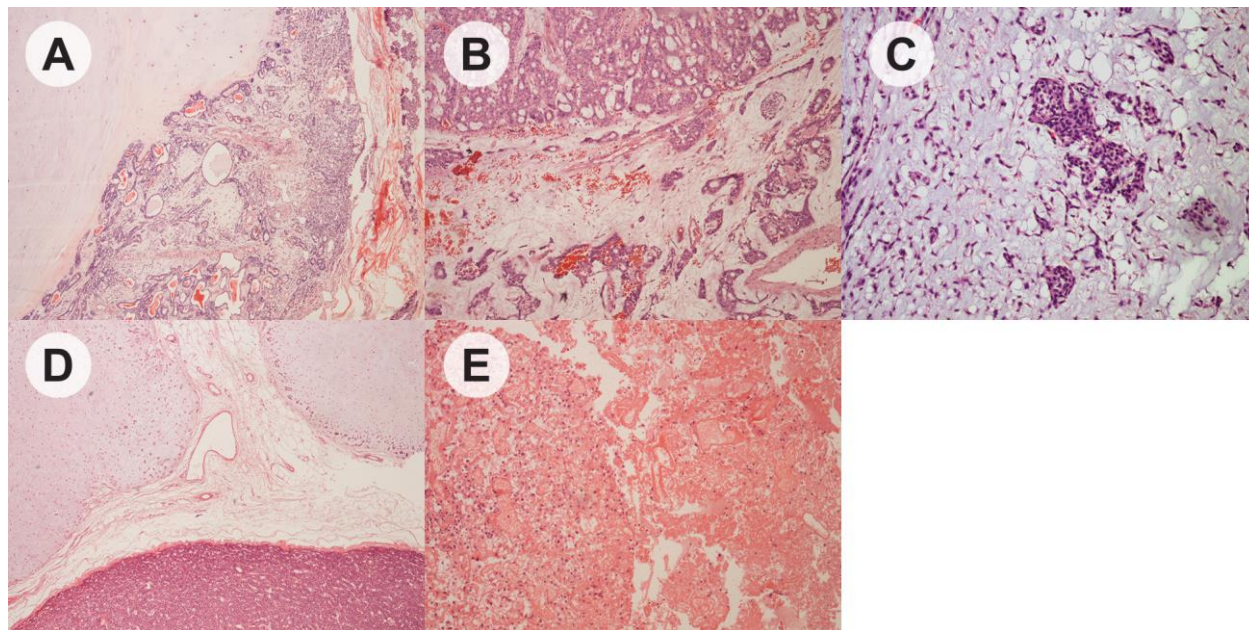
(„*Adenoma pleomorphum; Tumor mixtus*”)

Pleomorfni adenom, označen još i kao mešoviti tumor (tumor mixtus), predstavlja najčešću neoplazmu pljuvačnih žlezda. Sreće se u svim životnim dobima, ali pik incidence je u petoj deceniji. Jednako je zastupljen među polovima, sa blagom dominacijom u žena. U 80% slučajaja lokalizovan je u parotidnoj žlezdi, i to u donjem polu. Ako je lokalizovan u dubokom režnju ima prezentaciju parafaringealnog tumora; obično su sporog rasta i bezbolni su. Mali tumori se prezentuju kao glatke, čvrste, mobilne kuglice, dok tumori većih dimenzija mogu oštetiti kožu i sluzokožu koja ih pre pokriva. Multifokalni i rekurentni tumori mogu biti fiksirani za okolno tkivo. Sporadično se mogu javiti sa drugim tumorima, naročito sa Wartinovim tumorom. Veličina tumora varira od 2 do 5cm, ali mogu dostići i enormne dijemetre. U slučajevima kada se javi infarceracija tumora, mogu se javiti bol i parestezije. Na nepcu se najčešće javljaju na prelazu između mekog i tvrdog nepca, kada mogu biti fiksirani, zbog blizine periosta.^{63,66}

Makroskopski su jasno definisani, okruglog do ovalnog oblika. Debljina kapsule varira, a može i nedostajati, naročito u manjim, mukusnim žlezdama. Ponekad mogu da probiju samu kapsulu i da daju izgled formiranja novog tumora, koji se prezentuje kao satelitski nodus; međutim, uvek je u kontaktu sa tumorom. Spoljašnja površina tumora je lobulirana, a na preseku su homogenog izgleda, uglavnom belo prebojeni. Kada je reč o tumoru sa obilnom hrskavičavom ili miksohondroidnom stromom, imaju sedefasti sjaj.

Patohistološki, tumor je izgrađen od epitelne, mioepitelne i mezenhimne komponente, koja može biti mukoidnog, miksoidnog ili hondroidnog izgleda. Epitelna komponenta formira plaže ili strukture nalik duktusima, a same ćelije mogu biti kuboidalne, vretenaste, plazmocitoidne, skvamozne i ćelije svetle citoplazme. Ponekada epitelna komponenta može biti predominantna u tumoru, što je označeno kao celularni pleomorfni adenom, ali je bez prognostičkog značaja. Duktuse čine luminalne, kuboidalne ćelije, a mogu da imaju i abluminalni sloj mioepitelnih ćelija. Luminalne ćelije, ponekada, imaju svetlu citoplazmu i hiperhromna jedra, što može da zada veliki diferencijalno dijagnostički problem ka adenoidno cističnom ili epitelno-mioepitelnom karcinomu. U lumenu duktusa, koji je obično malog kalibra, može se videti eozinofilna materija, do formiranja slike mikrocista. Prisutna područja skvamozne metaplazije sa keratinizacijom, ali i svetloćelijska i mukusna metaplazija, daju sliku koja podseća na mukoepidermoidni karcinom. Mioepitelne ćelije u

tumoru mogu da daju izgled retikularne potke, ali i istovremeno da imaju vretanasto-ćelijski izgled, što daje sliku švanoma. Fokusi onkocitne metaplazije se takođe viđaju. Mezenhimna komponenta tumora je mukoidna, miksoidna, kartilaginozna ili hijalina. I ona može da čini dominantnu komponentu (*Slika 14*).



Slika 14. Pleomorfni adenom. *A – epitelna komponenta tumora formira solidno-cistične plaže sa hondroidnom stromom, H&E, uveličanje x4; B – celularni tip tumora sa tubularnom epitelnom komponentom, H&E, uveličanje x10; C – dominantna mukoidna stroma tumora, H&E, uveličanje x20; D – sinhroni rast pleomorfnog adenoma i mioepitelioma, H&E, uveličanje x4; E – područje ishemijske nekroze, H&E, uveličanje x10*

Ćelije sa mukoidnom supstancom su zapravo mioepitelne ćelije. Ovde mogu da se vide i područja koštane metaplazije. Višegodišnji tumori pokazuju izraženu hijalinizaciju, u tolikoj meri da je epitelna komponenta prisutna u tragovima i sa znacima degeneracije. Takvi tumori predstavljaju veliki rizik za malignu transformaciju.^{66,82,83}

Imunohistohemijski, epitelne duktalne ćelije su pozitivne na EMA, CEA GFAP, CK14, dok je mioepitelna komponenta pozitivna na α SMA, p63, vimentin, S100 i GFAP. Poslednjih godina je uočena i pozitivna reakcija sa WT1. Naime, modifikovane mioepitelne ćelije pokazuju izrazitu citoplazmatsku ekspresiju proteina.⁶³

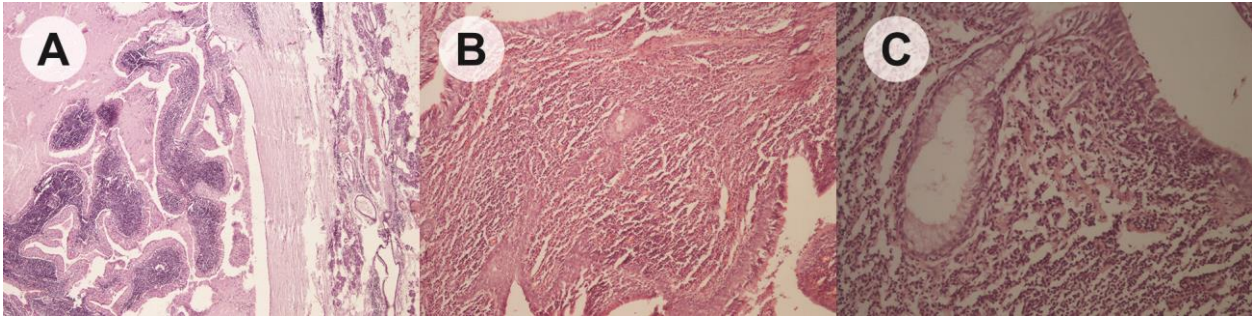
1.7.7 Vartinov tumor

(„*Warthin tumor*“)

Warthin tumor predstavlja entitet koji je još u literaturi označen i kao adenolymphoma, cystadenolymphoma i papilarni limfomatozni cistadenom. Drugi je po učestalosti, među epitelnim tumorima pljuvačnih žlezda, a najčešće je lokalizovan u parotidnoj žlezdi i periparotidnom limfnom nodusu. Relativno je jednako zastupljen među polovima, mada postoje i podaci da je pedesetih godina dvadesetog veka bio znatno češći u muškaraca i to u odnosu 10:1. Klinički se manifestuje kao multicentrična, bezbolna lezija veličine od 2-4cm, koja je u oko 15% bolesnika obostrana. Primećene su i fluktuacije u veličini, kao i bol, ali samo kao posledica lokalne inflamacije i fibroze.^{63,66}

Makroskopski, tumor je sferičnog do ovalnog oblika, jasno ograničen, a na preseku je pretežno cistične građe. Veličina cisti varira, od 1mm, pa do nekoliko santimetara i ispunjene su svetlom, mukoidnom ili kremasto belom do mrkom materijom. Solidni delovi tumora su čvrste konzistencije, često fibrozirani.

Patohistološki, tumor je jasno ograničen tankom vezivno-tkivnom kapsulom. Dve glavne komponente učestvuju u građi tumora, i to epitelna i limfoidna. Cistične strukture se razlikuju po obliku i veličini, a u lumenu su prisutne papilarne projekcije. Same papile poseduju vaskularnu potku sa limfoidnim tkivom. Epitelnu komponentu čini dvoredni epitel; unutrašnji, luminalni red sačinjen od onkocitnih, cilindričnih ćelija u palisadnom rasporedu. Ove ćelije imaju ovalna jedra, bogatu citoplazmu, a na površini mogu biti prisutne cilije. Ponekad se može videti i slika koja podseća na apokrinu metaplaziju. Periferno od njih se nalaze zaravnjene, kubične, bazalne ćelije, čija je citoplazma istih karakteristika. Atipija nije prisutna. Karakteristična je i veoma mala mitotska aktivnost. U pojedinim slučajevima se može videti nekroza (najčešće kao posledica infarkcije), infekcija i krvarenje, kao posledica dijagnostičke ili neke druge manipulacije. Papilarni proliferati mogu imati izgled obrisaka, poput duha (*eng. ghost-like*). Takođe se mogu uočiti i područja metaplazije, i to skvamozne i peharaste, što daje spongiozni izgled. Na periferiji tumora je izražena fibroza, sa gustim hipocelularnim vlaknima kolagenog tkiva, kao i miofibroblastna proliferacija (*Slika 15*). Neretko je prisutna i mešovita zapaljenska infiltracija.^{63,84,85}



Slika 15. Warthin tumor, A – papilarni proliferati u cističnoj strukturi tumora, H&E, uveličanje x4; B – područje skvamozne metaplazije, H&E, uveličanje x10; C – područje peharaste metaplazije, H&E, uveličanje x20

Imunohistohemijski, periferni sloj ćelija je pozitivan na p63 i CK14, fokalno su pozitivne na vimentin, dok su luminalne ćelije negativne na ove markere, a pozitivne su na CEA. S100 je eksprimiran od strane dendritskih ćelija. EMA je difuzno pozitivna, u oba sloja epitelne komponente tumora.⁶³

Patohistološka slika tumora je prilično jedinstvena i teško zamenljiva sa ostalim tumorima pljuvačne žlezde. U određenim stanjima može postojati sličnost sa limfoepitelijalnim cistama, limfoepitelijalnim sijaloadenitisom ili MALT limfomom, kada su i kanali pljuvačne žlezde cistično izmenjeni. Takođe, u uslovima kada je čitav tumor infarceriran ili kada postoje područja skvamozne ili peharaste metaplazije. Tada slika Warthin tumora može biti slična mukoepidermoidnom karcinomu.

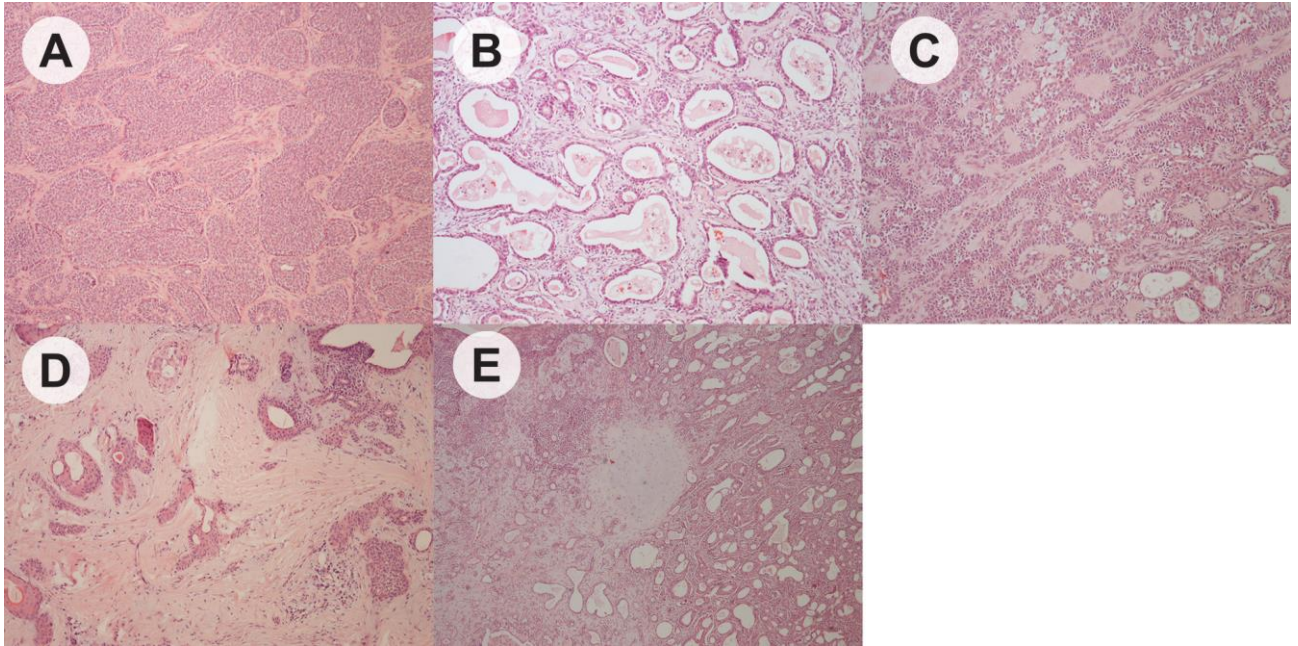
1.7.8 Adenom bazalnih ćelija

(„*Basal cell adenoma*”)

Ovaj tip adenoma predstavlja retku benignu neoplazmu pljuvačnih žlezda, bazaloidnog fenotipa. Stroma se karakteriše odsustvom miksohondroidne komponente, koja se viđa u pleomorfnom adenomu. O učestalosti ovog tumora teško je govoriti, s'obziroma da je do 1991. godine kada ga je Svetska Zdravstvena Organizacija uvela u klasifikaciju pod tim entitetom, označavan kao monomorfni adenom ili ne-pleomorfnom adenom.⁸⁶ Generalno, sreće se u 1-3% slučajeva svih tumora pljuvačnih žlezda, sa pikom u sedmoj deceniji. Među polovima je češći u žena, sa odnosom 2:1. Najčešće je lokalizovan u velikim pljuvačnim žlezdama, i to u parotidnoj. Klinički se prezentuje kao jasno ograničeni, pokretni nodus, čvrste konzistencije.^{63,87}

Makroskopski, prezentuju se kao tumori sa kapsulom, solidne do cistične građe, belosive do braon prebojenosti, veličine od 1-3 cm. Membranozni tip može biti multinodularan ili multifokalan.

Patohistološki, tumor je izgrađen od bazaloidnih ćelija, nejasnih međućelijskih granica, svetle citoplazme sa ovalnim do okruglim jedrima. Ćelije formiraju solidne, trabekularne ili tubularne formacije. Kod solidnog tipa rasta, tumorske plaže su različitog oblika sa perifernim radijalnim ćelijskim rasporedom (*eng. palisading*), međusobno odvojene gustim snopovima kolagenih vlakana. Trabekularni tip se odlikuje bazaloidnim ćelijama koje formiraju uske trake ili trabekule, odvojene vaskularnom stromom. Retko, u stromi mogu biti prisutne brojne tumorske mioepitelne ćelije. Kod tubularnog tipa dominiraju duktalne strukture. Membranozni tip se karakteriše širokim trakama hijalinog veziva, po periferiji tumorskih plaža, kao i intracitoplazmatskim inkluzijama (*Slika 16*).



Slika 16. Adenom bazalnih ćelija; A – solidni tip rasta tumora, H&E, uveličanje x10; B - tubularni tip rasta tumora, H&E, uveličanje x10; C - trabekularni tip rasta tumora, H&E, uveličanje x10; D - membranozni tip rasta tumora, H&E, uveličanje x10; E - tubularni tip rasta tumora sa područjem hondroidne metaplazije, H&E, uveličanje x10

Imunohistohemijski, ćelije na periferiji tumorskih plaža ekspresuju p63, vimentin, SMA i S100, dok su luminalne ćelije pozitivne na CK14, CEA i S100. Analizirajući ekspresiju markera dolazimo do zaključka da je adenom bazalnih ćelija, histogenetski, porekla ćelija interkalatnih kanala.⁶³

U svakoj varijanti adenoma mogu se videti cistične strukture, skvamozna i onkocitna (u tubularnom tipu) diferencijacija, kao i kribriformni rast.^{63,65,88}

1.7.9 Mioepiteliom

(„*Myoepithelioma*“)

Mioepiteliomi predstavljaju veoma redak entitet među tumorima pljuvačnih žlezda sa učestalošću od oko 1,5%. Javlja se pretežno u starijoj populaciji, sa pikom u trećoj deceniji života, i to sa jednakom zastupljenosti u polovima. Najčešće je lokalizovan u parotidnoj žlezdi, a manifestuje se kao jasno ograničena, bezbolna masa, dugog toka. Prvi put su opisani 1943. godine, a Svetska Zdravstvena Organizacija ih je odvojila od pleomorfno adenoma i klasifikovala ih tek 1991.^{63,86,89}

Makroskopski, tumor je jasno ograničen, čvrste konzistencije, bele do žute boje na preseku, najvećeg dijametra do 3 cm.

Patohistološki, tumor je čine plaže ili trake ćelija sa mioepitelnom diferencijacijom. Same ćelije mogu imati vretenast, plazmocitoidni, epiteloidni, zvezdast i svetloćelijski izgled. Tumori su uglavnom izgrađeni od jednog tipa ćelija, ali se mogu javiti i u različitim kombinacijama. Kod vretenasto-ćelijskog tipa ćelije su raspoređene u trakama koje se međusobno prepleću, pa daju izgled tumora koji je mezenhimnog porekla. Plazmocitoidne ćelije su ovalnog oblika sa ekscentrično postavljenim jedrima, a citoplazma je obilna, eozinofilna, gusta do hijalinog izgleda. Mioepiteliomi izgrađeni od ovog tipa ćelija su još i označeni kao hijalini, imajući u vidu izgled strome tumora. Epiteloidne ćelije su ovalnog do okruglog oblika, sa centralno postavljenim jedrom. Okolna stroma ima kolageni ili mukoidni izgled. Svetloćelijski tip čine ćelije poligonalnog oblika, nejasnih međućelijskih granica i veoma svetlom, optički praznom citoplazmom, zbog velike količine glikogena koja je sadržana u njoj. U ovom tipu mioepitelioma mogu se uočiti intracitoplazmatske mikrocistične strukture. Kod zvezdasto-ćelijskog tipa mioepitelioma ćelije su ovalnog oblika, nejasno ograničene, umerene citoplazme i centralno postavljenih jedara (*Slika 13*). Sam tumor ima rešetkast izgled.^{90,91}

Imunohistohemijski, tumorske ćelije su pozitivne na vimentin, CK-AE1/AE3, S-100 i calponin, umereno do slabo pozitivne na α SMA, GFAP, CK14 i p63, a negativne su na p53, CEA, EMA i HER-2.⁶³

Diferencijalna dijagnoza ovog retkog tumora uključuje pleomorfni adenom, mukoepidermoidni karcinom, epitelno-mioepitelni karcinom i karcinom acinusnih ćelija.

1.8 Imunohistohemija

Primenom imunohistohemijskih metoda mogu se da se dobiju dodatne i veoma bitne informacije, ponekad neophodne u diferencijalnoj dijagnozi i prognozi, a vezane su za ćelijsku diferencijaciju i proliferaciju. Imunohistohemija je prvi put primenjena na zamrzanim isečcima, a tek kasnije na tkivu fiksiranom u formalinu. Fiksacija i obrada tkiva je prva i najbitnija karika u imunohistohemijskoj obradi. Za analizu ćelijske diferencijacije koristi se veliki panel antitela, u zavisnosti od tkiva koje se analizira. Svakako, najveću primenu ima anti-Ki67. Proteklih godina uveden je čitav niz antitela, a prateći njihovu eksresiju, određuje se i ćelijska diferencijacija. Primenom različitih panela dobijaju se dodatne informacije potrebne za adekvatnu patohistološku dijagnostiku. Uglavnom je neophodno primeniti veći broj markera, jer ni jedno antitelo nije strogo specifično za određeni ćelijski tip. U pljuvačnim žlezdama postoje tri osnovna tipa epitelnih ćelija, koje se mogu diferencirati primenom imunohistohemije, i to su acinusne, duktalne i mioepitelne ćelije.^{92,93}

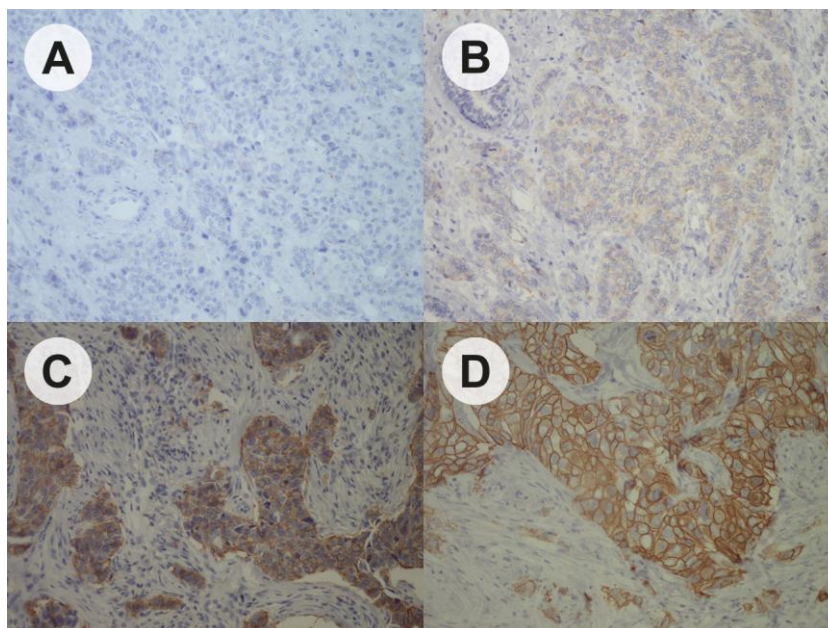
1.8.1 Markeri ćelijske proliferacije

1.8.1.1 Ki-67

Proliferativna aktivnost tumora je definisana kao frakcija rasta. Može se odrediti brojanjem aktivnih ćelija, koje nisu u G0 fazi ćelijskog ciklusa, u odnosu na ukupan broj ćelija. MKI67 gen se nalazi na hromozomu 10 i kodira Ki-67 protein. Antigen Ki-67 je aktivan u svim fazama ćelijskog ciklusa (G1, S, G2, faza mitotske ćelijske deobe), ali ne i u G0 fazi.⁹⁴ Poslednjih godina koristi se monoklonsko antitelo MIB-1, koje detektuje rekombinantne fragmente Ki-67 antigena. Antitelo reaguje selektivno sa jedrima ćelija koje su u proliferaciji. Ki-67 imunoreaktivnost je veoma važan prognostički marker u brojnim malignim tumorima, uključujući i karcinome glave i vrata, kao i karcinome pljuvačnih žlezda.^{95,96} Brojanje mitotskih figura predstavlja tradicionalan način procene proliferacije samog tumora. Haapasalo i saradnici su 1989. godine uveli određivanje mitotske aktivnosti, u procentima, kao broj mitotskih figura po volumenu (MV indeks), u zoni tumorskog tkiva. Ovaj način je našao primenu u brojanju Ki-67 pozitivnih ćelija (Ki-67 proliferativni indeks).⁹⁷

1.8.1.2 HER-2

c-ErbB-2 gen, poznat još i kao HER2/neu, je protoonkogen lokalizovan na 17q hromozomu. Član je familije ErbB grupe proteina, označene još i kao receptor epidermalnog faktora rasta, receptor za EGF (*eng. epidermal growth factor receptor (EGFR)*). Primećeno je da je amplifikacija ili ekspresija udružena sa ćelijskom atipijom, polimorfizmom, visokom agresivnošću i metastatskim potencijalom.⁹⁸ Ovaj transmembranski glikoprotein je eksprimiran, u 20-30%, na membranama ćelija duktalnog infiltrativnog karcinoma dojke, i u 15-20% svih karcinoma dojke. Po datim preporukama ocenjuje se ekspresija semikvantitativnom analizom tumorskih ćelija. Negativnim nalazom podrazumevaju se ocene 0 (odsustvo reakcije) i 1 (nepotpuno membransko bojenje u više od 10% ćelija). Granični nalaz ili ocena 2 (*eng. equivocal/borderline*) podrazumeva potpuno membransko, ali slabo bojenje u >10% ćelija, i na kraju ocenom 3, pozitivna reakcija, podrazumevamo intenzivno, potpuno bojenje u više od 10% tumorskih ćelija.^{99,100} Na *Slici 17* su prikazani različiti nivoi ekspresije HER2 na preparatima karcinoma dojke.



Slika 17. anti-HER2, Invazivni duktalni karcinom dojke, uveličanje x20. A – Skor 0 – osustvo reakcije; B – Skor 1 – nepotpuno membransko bojenje; C – Skor 2 – potpuno slabo membransko bojenje; D – Skor 3 – potpuno intezivno membransko bojenje

1.8.1.3 p53

TP53 gen je lokalizovan na kratkom kraku hromozoma 17. Kodira tumor supresorni p53 protein, čija je funkcija modulacija transkripcije gena koji utiču na rast tumora. Modulacija podrazumeva zastoj ćelijskog ciklusa, apoptozu, održavanje genskog integriteta,

inhibiciju angiogeneze i ćelijsko starenje, zato je još i označen kao čuvar genoma. Supresorna funkcija p53 je prisutna isključivo u divljem tipu (*eng. wild type*), dok je kod mutirane forme supresija smanjena ili u potpunosti odsutna. Neadekvatna, ili odsustna funkcija p53 odražava se na nekontrolisan rast, što je i jedna od osnovnih karakteristika ćelija malignih tumora u ljudi, gde se i susreće.^{101,102} Najčešći mehanizam direktnog oštećenja p53 jeste tačkasta (point) mutacija gena. Postoje i indirektni putevi oštećenja putem DNK virusa, kao što je na primer humani papiloma virus. Takođe, do inaktivacije p53 može doći i kao posledica mutacije gene čiji proizvodi inetruguju sa p53, ili prenose informacije do ili od samog gena. MDM2 je najvažniji negativni regulator p53.¹⁰³ Mutiran p53 gen kodira proteine čiji je poluživot produžen, a kao posledica dolazi do prekomerne ekspresije p53 proteina. Sam kompleks povratnog ćelijskog sistema, ili p53 mreža, je u normalnim uslovima neaktivna. Do aktivacije dolazi u uslovima oštećenja ili samog ćelijskog stresa. Takve ćelije mogu biti okidač za nastanak kancerogeneze, imajući u vidu da potencijalno mogu imati neku od mutacija. Mutiran p53 je često udružen sa lošom prognozom, ali konkretna povezanost sa karcinomima pljuvačnih žlezda nije u potpunosti razjašnjena.^{104,105}

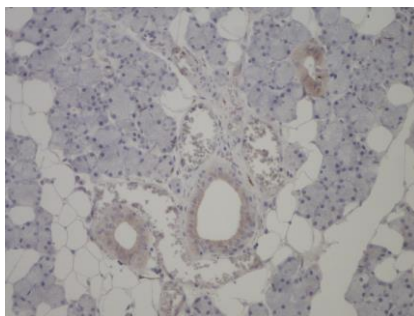
1.8.2 Markeri intermedijarnih filamenata

Intermedijarni filamenti predstavljaju intracitoplazmatske proteine koji su u kontaktu sa ćelijskom membranom, a funkcija im je očuvanje ćelijske strukture, u smislu jačanja i organizacije ćelije u tkivima. Najvažnija funkcija im je da obezbede mehaničku podršku ćelijskoj membrani, koja je u kontaktu sa drugim ćelijama ili ekstraćelijskim matriksom. Grupisani su u šest glavnih klasa, i to: tip I (kiseli keratini), tip II (osnovni proteini), tip III (intermediarni filamenti mezenhimalnog tkiva), tip IV (neurifilamenti), nestandardni tip IV i tip V (laminini).¹⁰⁶

1.8.2.1 Glijalni fibrilarni kiseli protein - GFAP

Glijalni fibrilarni kiseli protein (*eng. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)*) je 50 kDa intracitoplazmatski fibrilarni protein i predstavlja deo citoskeleta astrocita, te primenom anti-GFAP antitela dokazuje se astrocitno poreklo ćelija. Sa drugim intermedijarnim filamentima utiče na strukturnu morfologiju ćelija. Funkcionalno, sam GFAP u astrocitima održava motilitet i stabilnost ćelije obezbeđujući strukturalnu stabilnost. Nakon povrede CNS izazvane traumama, genetskim poremećajima ili hemikalijama, dolazi do uvećanja astrocita i povećane količine GFAP, što se imunohistohijskim metodama lako i dokazuje. Nasuprot ovim procesima, sa malignom alteracijom astrocita dolazi do regresije proizvodnje GFAP. Tako, kod astrocitoma dolazi do smanjene ekspresije GFAP, ili je odsutna, u zavisnosti od stepena maligne alteracije, za

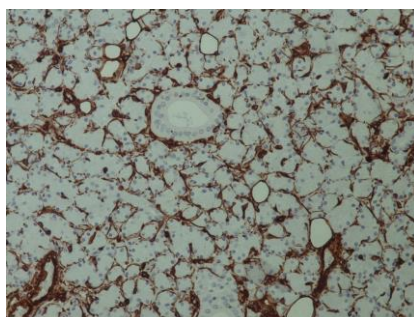
razliku od zdravog moždanog tkiva, gde je izražena. Pored ćelija CNS, GFAP pokazuje senzitivnost za Švanove ćelije, ćelije glije, tumorske ćelije pljuvačnih žlezda, mioepitelne ćelije dojke.^{107,108} U tkivu zdrave pljuvačne žlezde GFAP može da pokaže ekspresiju u ćelijama strijatnog kanala.¹⁰⁹ Ekspresija GFAP u tkivu pljuvačne žlezde je prikazana na *Slici 18*.



Slika 18. Umerena ekspresija GFAP u luminalnim ćelijama strijatnog kanala, uveličanje x20

1.8.2.2 Vimentin

Vimentin je 57 kDa intermedijarni filament, koji pripada trećoj klasi. Pokazuje veoma visoku specifičnost za ćelije mezenhimalnog porekla. Koekspresija intermedijarnih filamenata, naročito vimentika i citokeratina, je prisutna u različitim tumorskim ćelijama, pa je neophodna primena velikog panela markera u cilju diferencijalne dijagnostike. Pored ćelija mezenhimalnih tkiva, vimentin pokazuje senzitivnost i za mioepitelne ćelije, melanocite, ćelije endokrinog porekla i endotela.^{109,110} U zdravom tkivu pljuvačne žlezde vimentin se ekspresuje u interkalatnim i periacinusnim mioepitelnim ćelijama (*Slika 19*).

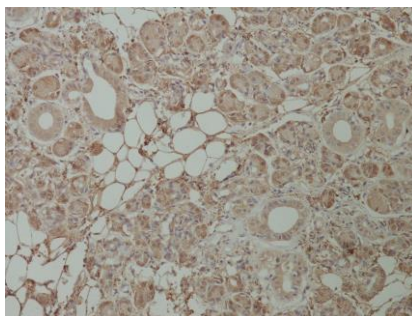


Slika 19. Citoplazmatska ekspresija vimentina u periacinusnim i interkalatnim mioepitelnim ćelijama, uveličanje x20

1.8.2.3 S100

S100 protein je 21-24 kDa, podeljen u dva podtipa A i B. S100A grade alfa i beta lanci, dok je S100B izgrađen od beta lanaca. Pripada familiji kalcijum vezujućih proteina, poput kalmodulina i troponina C. Familija S100 je uključena u mnogim kalcijum zavisnim

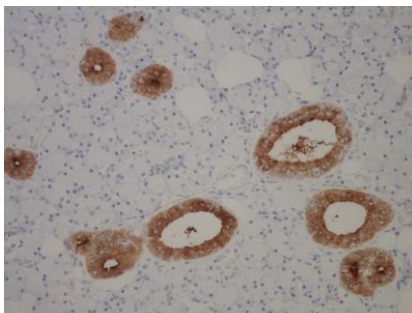
citoplazmatskim aktivnostima, poput fosforilacije proteina, ćelijske proliferacije (uključujući malignu transformaciju) i ćelijske diferencijacije. Anti-S100 antitelo se koristi u dijagnostici švanoma, astroglioma i gotovo svim benignim i malignim melanocitnim lezijama, adenokarcinomima ovarijuma, pljuvačnih žlezda, endometrijuma i dojke. Pokazano je. takođe, da je S100 antigen prisutan u antigen prezentujućim Langerhansovim ćelijama kože.^{109,111} U zdravom tkivu pljuvačne žlezde S100 se eksprimuje u luminalnim interkalatnim ćelijama, acinusnim i mioepitelnim ćelijama (*Slika 20*).



Slika 20. Ekspresija S100 u luminalnim ćelijama interkalatnih kanala i ćelijama acinusa, uveličanje x20

1.8.2.4 Epitelni membranski antigen – EMA

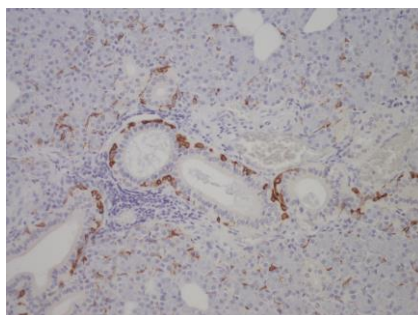
Epitelni membranski antigen (EMA), protein koji prida heterogenoj grupi masnih globula ljudskog mleka. Osim u mleku, ovi proteini su prisutni i u mnogim kako normalnim i tako i malignim epitelima. EMA u kombinaciji sa drugim antitelima ima veoma šireku primenu u diferencijalnoj dijagnostici mnogih maligniteta. Predstavlja veoma važan marker u potvrđivanju mestastaza karcinoma dojke u jetri, limfnim nodusima i kostima. Takođe je veoma značajan u diferencijaciji limfoma od anaplastičnih karcinoma, kao i za potvrdu mnogih vretenastoćelijskih karcinoma.¹¹² EMA je pozitivan u luminalnim ćelijama ekskretornih i interkalatnih kanala pljuvačne žlezde, ponekada i u ćelijama acinusa i periacinusnim mioepitelnim ćelijama (*Slika 21*).



Slika 21. Izražena ekspresija EMA u luminalnim ćelijama ekskretornim i interkalatnim kanalima, uveličanje x20

1.8.2.5 Citokeratin 14

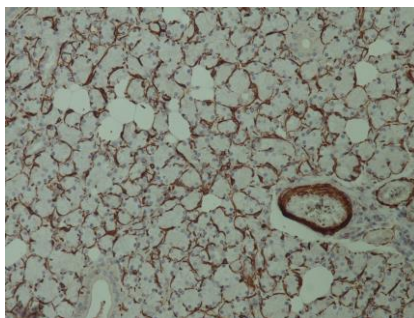
Citokeratin 14 (CK14) je 50 kDa protein koji pripada I kalsi intermedijarnih filamenata (kiseli filamenti). Obično se primenjuje u kombinaciji sa citokeratinom 5/6 (CK5/6), tip II intermedijarnih filamenata (osnovni proteini) ili p63, u diferencijalnoj dijagnostici karcinoma prostate i mioepitelnih ćelija karcinoma dojke i pljuvačnih žlezda. Široku primenu je našao, takođe, u dijagnostici planocelularnog karcinoma pluća.^{113,114} U zdravom tkivu pljuvačne žlezde detektuje bazalne ćelije ekskretornih kanala, kao i mioepitelne ćelije intrkalatnih kanala i acinusa (*Slika 22*).



Slika 22. Izražena ekspresija CK14 u bazalnim ćelijama ekskretornih kanala, mioepitelnim ćelijama interkalatnih duktusa i periacinusnim mioepitelnim ćelijama, uveličanje x20

1.8.2.6 α -glatkomišićni aktin - α -SMA

Aktin je protein, komponenta citoskeleta, prisutan u mišićnim i ne mišićnim ćelijama. Postoje tri izotopa (α , β , γ), koji se razlikuju po aminokiselinama i izoelektričnoj tački. Anti- α glatkomišićni aktin (eng. *Smooth Muscle Actin - SMA*) reaguje sa glatkim mišićima krvnih sudova, kao i sa ćelijama parenhimatoznih organa, u zavisnosti od količine aktina u glatkim mišićima, mioepitelnim ćelijama i pericitima. Takođe se eksprimira u stromalnim ćelijama creva, testisa i ovarijuma. Antitelo ne reaguje sa aktinom fibroblasta (β i γ citoplazmatski aktin), kao ni sa poprečnoprugastim i miokardnim mišićnim ćelijama.¹¹⁵ U tkivu pljuvačne žlezde pokazuje pozitivnu reakciju sa mioepitelnim ćelijama interkalatnih kanala i acinusa (*Slika 23*).

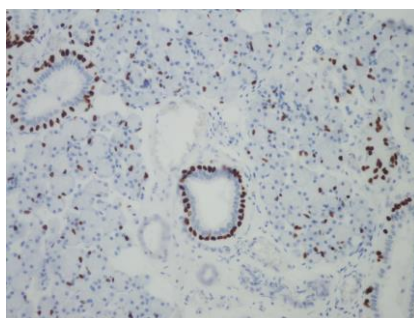


Slika 23. Ekspresija α SMA prisutna u periacinusnim mioepitelnim ćelijama, uveličanje x20

1.8.3 Ostali markeri u diferencijalnoj dijagnostici tumora pljuvačnih žlezda

1.8.3.1 p63

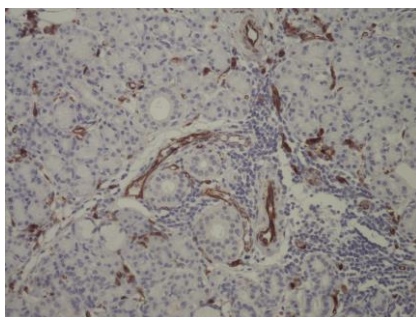
p63 zajedno sa p73 je član p53 familije proteina. Postoji najmanje šest različitih transkripta p63, koji nastaju kao posledica različitih spajanja i kodiranja dva različita N (TA i Δ N) i tri različita C (α , β i γ) kraja. Proteinski izotopi TAp63 α , TAp63 β i TAp63 γ sadrže N-terminal transaktivacioni (TA) domen, dok ostala tri izotopa Δ Np63 α , Δ Np63 β i Δ Np63 γ , ne sadrže. Najbitnija lokalizacija p63 se nalazi u bazalnom sloju pločastoslojevitog i prelaznog epitela. Bazalne ćelije, kao progenitorne ćelije suprabazalnih, podvrgavaju ćelijskoj diferencijaciji i apoptozi u procesu regeneracije epitela. Kod p63 deficitarnih miševa nedostaje pločastoslojeviti epitel i njegovi derivati, uključujući dlaku, zube, mlečne, suzne i pljuvačne žlezde.¹¹⁶ Ekspresira se u bazalnim ćelijama ekskretornih kanala i mioepitelnim ćelijama interkalatnih kanala i acinusa pljuvačne žlezde (*slika 24*).



Slika 24. Jedarna ekspresija p63 u mioepitelnim ćelijama interkalatnih kanala i acinusa, uveličanje x20

1.8.3.2 Wilms tumor 1 - WT1

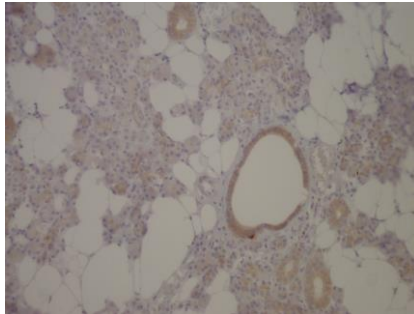
WT1 gen, je tumor supresorni gen koji je uključen u indukciji Vilms-ovog tumora, malignog tumora bubrega u dece. Nalazi se na hromozomu 11p13, i aktivan je u 5-10% sporadičnih Vilms tumora, a u 100% „*Denys-Drash*” pacijenata, sindromom koji je povezan sa genitourinarnim abnormalnostima i Vilms tumorom. Kodira transkripcioni faktor koji prepoznaje odgovor na rani rast (eng. *early growth response* (EGR-1)), sekvenca koja je pronađena u promotoru gena za faktor rasta. Protein kodiran od strane WT1 reguliše transkripciju i drugih gena, i može da funkcioniše i kao aktivator i kao represor transkripcije. Transkripciona aktivnost ovog proteina može biti izmenjena kao posledica interakcije WT1 i p53. Pokazano je da u nedostatku divljeg alela p53, WT1 funkcioniše kao aktivator transkripcije EGR-1.^{117,118} Anti-WT1 antitelo se vezuje za jedra ćelija i ima široku dijagnostičku primenu, pored Vilms-ovog tumora, kod malignih tumora jajnika, mezotelioma, melanoma, a takođe ekspresiju pokazuju i neoplastične mioepitelne ćelije pleomorfnog adenoma i mioepitelnih tumora. U studiji je Langman pokazao citoplazmatsku ekspresiju i tumačio je kao pozitivnu reakciju.¹¹⁹ U praksi se inače pozitivnom reakcijom smatra jedarna ekspresija WT1 (*Slika 25*).



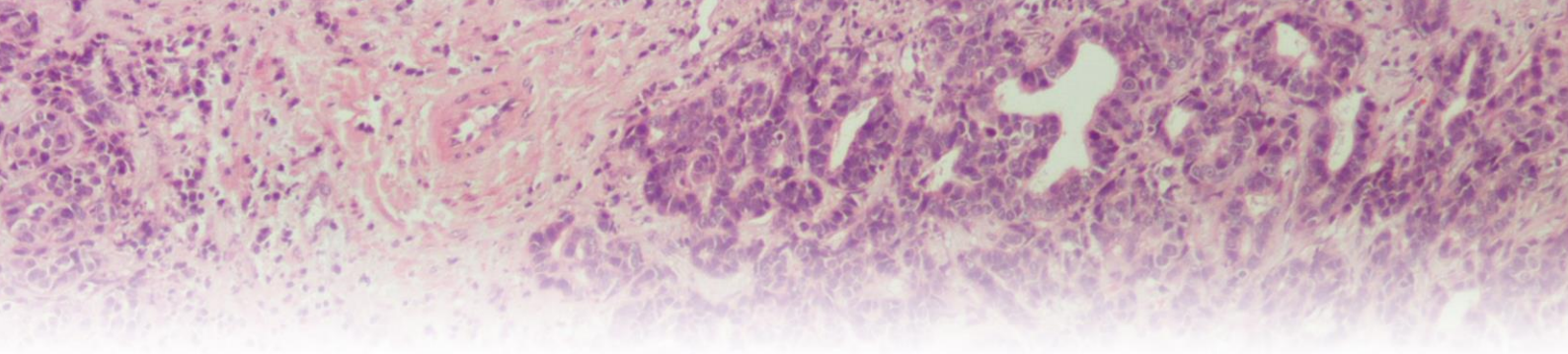
Slika 25. Zdravo tkivo ne ekspresira WT1 protein. Ekspresija je prisutna u intersticijalnim kapilarima, uveličanje x20

1.8.3.3 Karcinoembrionalni antigen - CEA

Karcinoembrionalni antigen je član superfamilije imunoglobulina koji regulišu ćelijsku signalizaciju i adheziju. Gen je lokalizovan na dugom kraku hromozoma 19, a sam protein je prvo opisan u intrahepatičnim žučnim putevima kao bilijarni glikoprotein, a kasnije i u leukocitima, epitelu i endotelu. CEA inhibiše ćelijsku diferencijaciju i olakšava rast tumora, a takođe je prisutan i u procesu angiogeneze, apoptoze, metastaziranja, kao i u adaptaciji imunskog odgovora. Ekspimiran je u mnogim malignim tumorima, kao što su kolorektalni karcinom, karcinom pluća i dojke.¹²⁰ CEA pokazuje pozitivnost u luminalnim ćelijama interkalatnih i ekskretornih kanala pljuvačne žlezde (*Slika 26*).



Slika 26. Umerena ekspresija CEA u luminalnim ćelijama ekskretornih i interkalatnih kanala i ćelijama acinusa, uvećanje x20



2. NAUČNO RADNA HIPOTEZA

Na osnovu navedenih različitih stavova o značaju adekvatne diferencijalne dijagnoze tumora pljuvačnih žlezda, postavili smo sledeću hipotezu istraživanja:

2.1 H_0 – Nulta hipoteza istraživanja

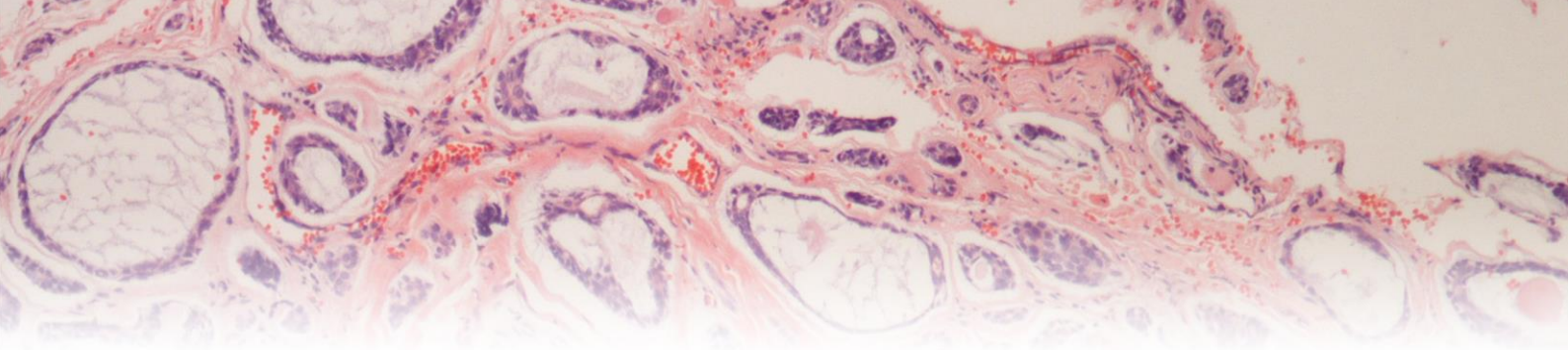
Visina Ki67 proliferativnog indeksa i parametri morfometrijskih karakteristika jedara ne zavise od biološkog ponašanja tumora (benigni ili maligni), kao i od tipa tumora.

Ako se i utvrdi postojanje određenog stepena zavisnosti, ta zavisnost nije nastala pod dejstvom sistemskog faktora, već je slučajnog karaktera i nije statistički značajna.

2.2 H_1 – Radna hipoteza istraživanja

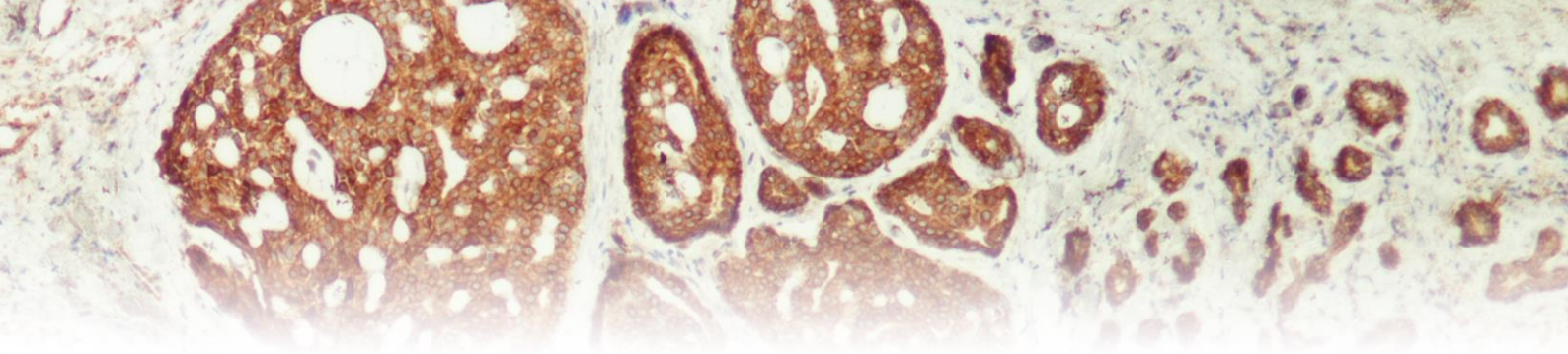
Visina Ki67 proliferativnog indeksa i parametri morfometrijskih karakteristika jedara zavise od biološkog ponašanja tumora (benigni ili maligni), kao i od tipa tumora.

Ako se utvrdi postojanje određenog stepena zavisnosti, ta zavisnost je nastala pod dejstvom sistemskog faktora, odnosno zavisnih komponenti i statistički je značajna.



3. CILJEVI RADA

1. Ispitivanje ekspresije određenih markera u benignim i malignim tumorima pljuvačnih žlezda.
2. Određivanje Ki67 indeksa u tumorima pljuvačnih žlezda.
3. Ispitivanje povezanosti visine Ki67 indeksa i biološkog ponašanja tumora.
4. Utvrđivanje morfometrijskih karakteristika jedara benignih i malignih tumora pljuvačnih žlezda.



4. MATERIJAL I METODE

Celokupno istraživanje je sprovedeno u Centru za patologiju Medicinskog fakulteta u Nišu. Analizirani materijal predstavlja tkivo dobijeno operacijskom i biopsijskom procedurom pljuvačnih žlezda, sa Klinike za Maksilofacijalnu hirurgiju u Nišu. Odnos polova je varirao u zavisnosti od tumora, ali je prisutna blaga predominacija ženskog pola, što je izraženije u malignim tumorima. Starosna dob bolesnika je dosta varirala, u opsegu od 12 do 75 godina, naročito u benignim lezijama. Maligniteti u dečijem dobu nisu bili registrovani. Nakon primenjene intervencije tkivo se fiksira u 10% formalinu, najmanje 24h, po preporukama Američkog udruženja onkologa i koleđa patologa (eng. *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP)*).¹²¹ Istraživanje je obuhvatilo 60 reprezentativnih tumora pljuvačnih žlezda, 30 benignih i 30 malignih. Od ukupno 60 pregledanih materijala, 58 je bilo operativnih, a 2 su bili biopsijski materijali. Operativni materijal je podrazumevao, najčešće parotidektomiju (u 40 bolesnika) ili tumorektomiju (u 10 bolesnika). Ostatak je činio materijal dobijen radikalnijim hirurškim metodama lečenja. U grupi benignih tumora posmatrani su pleomorfni adenom, Vartinov tumor, adenom bazalnih ćelija i mioepiteliom, a od malignih adenoidnocistični karcinom, mukoepidermoidni karcinom, karcinom pljuvačnih kanala, polimorfni karcinom niskog gradusa i mioepitelni karcinom. Detaljniji prikaz analiziranih tumora dat je u Tabeli 2. Mikroskopskom analizom dobijenih preparata vršena je preliminarna dijagnostika. Istovremeno, određivan je i reprezentativni isečak, što podrazumeva veličinu tumorskog polja sa minimalnim poljima nekroze i zapaljenskim infiltratom na kome su se radila imunohistohemijska bojenja. Imajući u vidu polimorfnost tumora pljuvačnih žlezda, još jedan od parametara za izbor isečka bila je i najpolimorfnija slika na patohistološkom preparatu. Kao kontrola služilo je zdravo tkivo pljuvačne žlezde.

Tabela 2. Karakteristike pacijenata

Tip tumora	Broj (N)	Pol (mušarac/žena)	Srednja starost
Pleomorfni adenom	10	6/4	40
Warthin tumor	10	5/5	62
Adenom bazalnih ćelija	6	2/4	67
Mioepiteliom	4	2/2	59
Mukoepidermoidni karcinom	8	2/6	47
Adenoidno cistični karcinom	6	3/3	55
Karcinom pljuvačnih kanala	6	4/2	61
Polimorfni adenokarcinom niskog gradusa	6	2/4	64
Mioepitelni karcinom	4	2/2	59

4.1 Imunohistohemijska analiza

Analizirana je ekspresija Ki67, p53 i HER-2 antigena, kao markera proliferacije. U sklopu diferencijalne dijagnostike analizirana je ekspresija karcinoembrionalnog antigena, epitelnog membranskog antigena, kiselog glijalnog fibrilarnog proteina, p63 antigena, vimentina, citokeratina 14, α -glatkomišićnog aktina, S-100 protein i Vilms tumor 1 antigena. Pravljene su digitalne mikrofotografije, kako osnovnih, tako i preparata dobijenih imunohistohemijskim bojenjem.

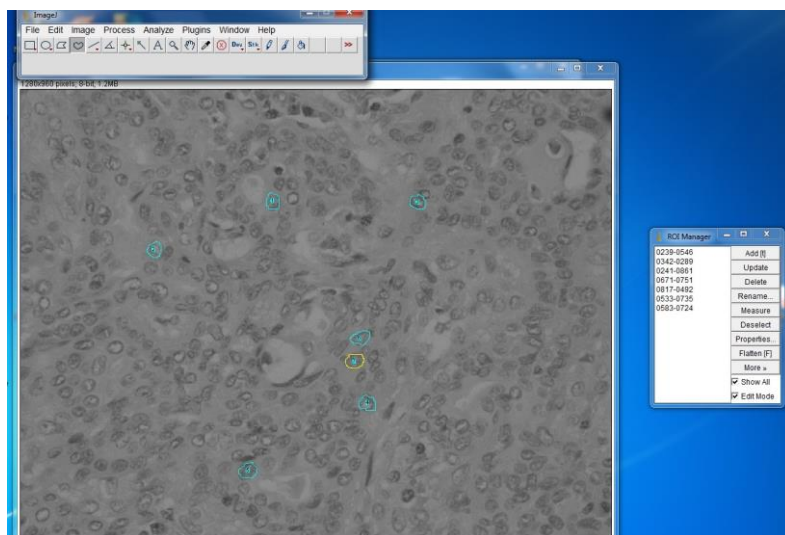
Imunohistohemijska bojenja vršena su na isečcima debljine do 5 μ m, dobijenih iz parafinskih blokova. Za analizu je uziman reprezentativan isečak, a primenjena su sledeća antitela: anti-Ki67 (MiB-1, ready to use; DAKO, Glostrup, Denmark), anti-p53 (DO-7, ready to use; DAKO, Glostrup, Denmark), anti-p63 (e DAK-p63, ready to use; DAKO, Glostrup, Denmark), anti-HER-2 (HercepTest™, DAKO, Glostrup, Denmark), anti-CEA (II-7, ready to use; DAKO, Glostrup, Denmark), anti-EMA (E29, ready to use; DAKO, Glostrup, Denmark), anti-S-100 (S-100, ready to use; DAKO, Glostrup, Denmark), anti-CK14 (LL002, 1:20; Novocastra Laboratories, Newcastle, UK), anti-WT-1 (6F-H2, ready to use; DAKO, Glostrup, Denmark), anti-GFAP (6F2, ready to use; DAKO, Glostrup, Denmark), anti- α SMA (1A4, ready to use; DAKO, Glostrup, Denmark), anti-vimentin (V9, ready to use; DAKO, Glostrup, Denmark).

Za pozitivnu reakciju smatra se bojenje jedara za sledeće markere: Ki67, p53, p63 i WT1. Pozitivno membransko bojenje analizirano je za HER-2, a za CEA i EMA membransko i citoplazmatsko, a za S-100 jedarno i citoplazmatsko. Pozitivno citoplazmatsko bojenje vidi se kod α SMA, GFAP, CK14 i vimentina.

Ki67 indeks određivan je analizom i brojanjem pozitivnih jedara na 10 vidnih polja, na povećanju x40. Indes je izražen u procentima, kao odnos pozitivnih tumorskih ćelija u odnosu na negativne, neobojene ćelije.

4.2 Morfometrijska analiza

Morfometrijska analiza vršena je u softverkom paketu „ImageJ” verzija 1.43u (public domain software, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Mikrofotografije, u boji, su dobijene digitalnom kamerom visoke rezolucije (Nikon, DS-Fi1, Tokyo, Japan), koja je povezana sa mikroskopom (Nikon, ECLIPSE 50i, Tokyo, Japan). Nakon toga slika je prebačena na kompatibilni računar i vršena je analiza jedarnih parametara primenom paketa. Osmobitna slika je menuelno obrađivana, nakon kalibracije, korišćenjem kompjuterskog miša (Slika 27). Analizirano je 100 nasumično odabranih tumorsko-ćelijskih jedara, na uveličanju x40, i to ćelija koje se ne preklapaju.



Slika 27. Princip rada u softverskom paketu „ImageJ”

Analizirano je šest jedarnih parametara: površina (eng. *area*), perimetar (eng. *perimeter*), cirkularnost (eng. *circularity*), zaobljenost (eng. *roundness*), Feretov dijametar (eng. *Feret diameter*) i integrisana optička gustina (eng. *Integrated Optical Density*).

4.3 Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka rađena je u programskom paketu SPSS 15.0. Dobijeni re-zultati su prikazani tabelarno i grafički.

Kontinualne varijable su predstavljene osnovnim statističkim parametrima - aritmetičkom sredinom (\bar{X}), standardnom devijacijom (SD), medijanom (Me) kao merom centralne tendencije, te opsegom, tj. minimalnim i maksimalnim vrednostima. Kvalitativna obeležja ispitivanih promenljivih data su učestalosti (n) i procentualnom zastupljenošću (%).

U zavisnosti od veličine uzorka, normalnost distribucije kontinualnih varijabli, ispitivana je Kolmogorov-Smirnov ili Shapiro-Wilk-ovim testom.

Za ocenu značajnosti razlike (p) kontinualnih varijabli između dve nezavisne grupe ispitanika korišćeni su Studentov t-test nezavisnih uzoraka, kod normalne distribucije podataka, ili Mann-Whitnijev U test, kod distribucije koja odstupa od normalne. Kao prag statističke značajnosti definisana je standardna vrednost - $p < 0,05$.

Za testiranje značajnosti razlike između više nezavisnih grupa korišćena je ANOVA, a na osnovu testiranja homogenosti varijansi po Levenu sprovedena je sledstvena Post Hoc analizom, odnosno multipna poređenja Tukey HSD (za homogene varijanse) ili Tamhaneovim testom u slučaju nehomogenosti varijansi.

Za testiranje statističke značajnosti razlika apsolutnih frekvencija između uzoraka korišćen je χ^2 test, ili Fisher-ov test egzaktno verovatnoće, ukoliko je apsolutna frekvencija obeležja manja od 5.

Posmatrajući tip tumora kao dihotomnu varijablu, u cilju utvrđivanja nezavisnih varijabli koje mogu da statistički značajno prediktuju maligni tip tumora, sprovedene su univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza.

Određivanje graničnih (cut-off) vrednosti ispitivanih parametara koje razdvajaju tumore po njihovom biološkom ponašanju na benigne i maligne vršeno je ROC (Receiver operating characteristics) analizom. Kao granične vrednosti definisane su one vrednosti kod kojih je zbir senzitivnosti i specifičnosti najveći.

5. REZULTATI

5.1 Rezultati imunohistohemijaska analiza ekspresije intermedijarnih filamenata benignih i malignih tumora pljuvačnih žlezda

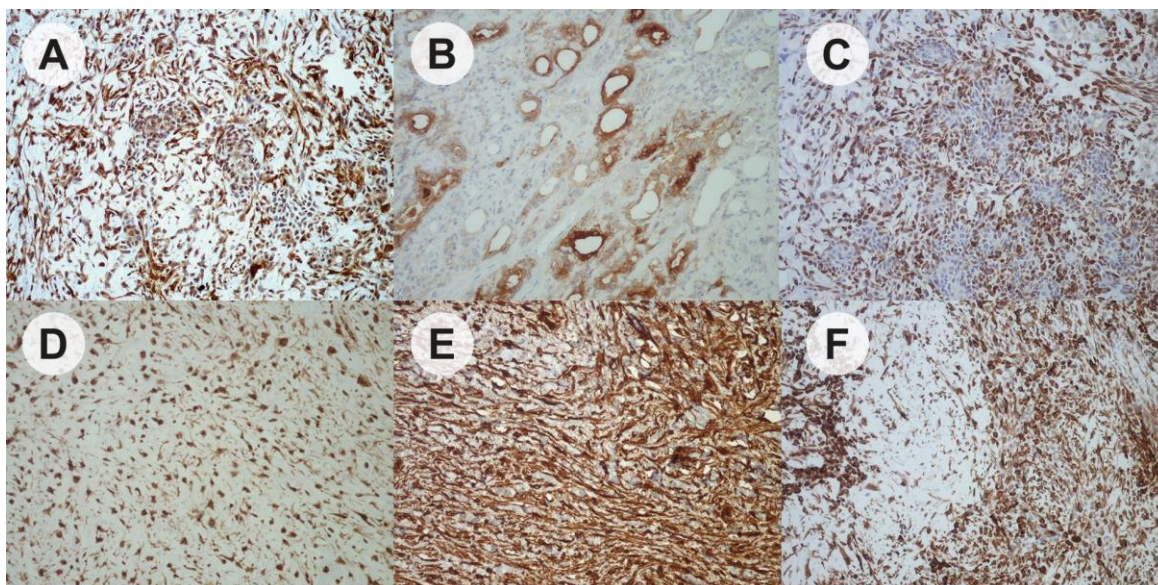
Rezultati imunohistohemijske analize ekspresije markera proliferacije i intermedijarnih filamenata, kao i ostalih markera koji su analizirani u istraživanju su prikazani u *Tabeli 3*.

Tabela 3. Imunohistohemijaska ekspresija

Tip tumora	CEA	EMA	Vimentin	p63	α SM A	S100	CK14	WT1	GFA P	p53	HER2
Tumor mixtus	+ (5/10) L	+ (5/10) L	+ (9/10) ABL	+ (10/10) ABL	+ (7/10) ABL	+ (8/10) ABL	+ (7/10) L/ABL	+ (10/10) ABL	+ (10/10) ABL	+ (1/10) L	- (0/10)
Warthin tumor	+ (6/10) L	+ (10/10) L	+ (4/10) ABL	+ (10/10) ABL	- (0/10)	- (0/10)	+ (10/10) ABL	+ (3/10) L/ABL	- (0/10)	+ (5/10) L	- (0/10)
Basal cell adenoma	+ (3/6) L	+ (4/6) L	+ (6/6) ABL	+ (6/6) ABL	+ (5/6) ABL	+ (4/6) ABL	+ (6/6) ABL	+ (3/6) ABL	- (0/6)	+ (3/6) L/ABL	- (0/6)
Mioepithelioma/ Myoepithelial carcinoma	- (0/8)	- (0/8)	+ (8/8) M	+ (8/8) M	+ (8/8) M	+ (7/8) M	+ (8/8) M	+ (7/8) M	+ (2/8) M	- (0/8)	- (0/8)
Carcinoma mucoepidermoides	+ (8/8) SK	+ (8/8) SK	- (0/8)	+ (8/8) SK/INT	- (0/8)	- (0/8)	+ (8/8) SK	- (0/8)	- (0/8)	+ (5/8) SK/INT	+ (1/8) SK
Carcinoma adenoides cysticum	+ (4/6) L	+ (5/6) L	+ (5/6) ABL	+ (6/6) ABL	+ (5/6) ABL	+ (6/6) L/ABL	+ (6/6) L	- (0/6)	- (0/6)	+ (3/6) L/ABL	- (0/6)
Salivary duct carcinoma	+ (6/6) L	+ (6/6) L	- (0/6)	- (0/6)	- (0/6)	+ (1/6) ABL	- (0/6)	- (0/6)	- (0/6)	+ (4/6)	+ (3/6) L
Polymorphus low-grade adenocarcinoma	+ (5/6) L/ABL	+ (6/6) L/ABL	+ (6/6) ABL	+ (1/6) ABL	- (0/6)	+ (6/6) L/ABL	+ (6/6) L/ABL	+ (2/6) ABL	- (0/6)	+ (3/6) L/ABL	- (0/6)

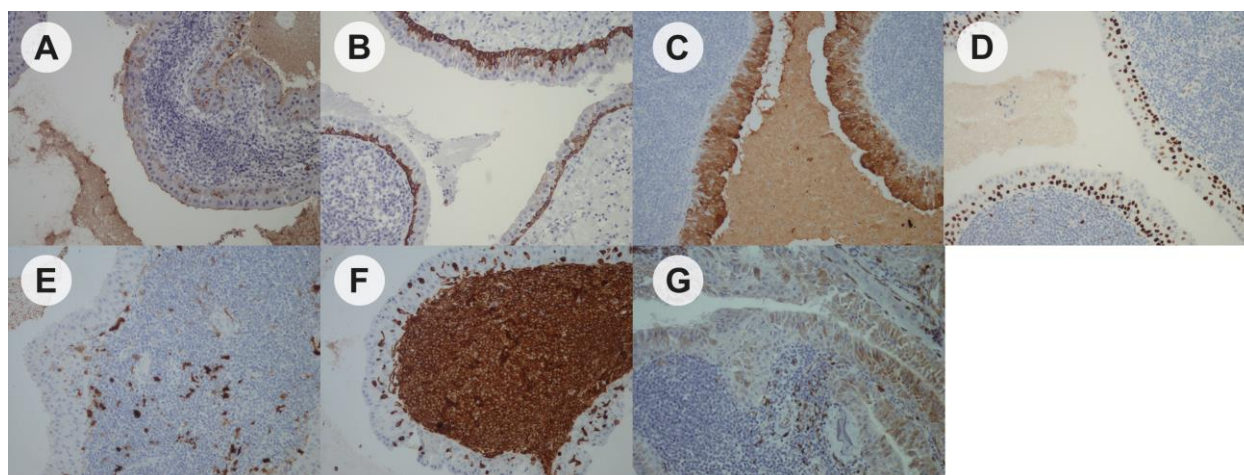
+ prisutna ekspresija proteina; - odsutna ekspresija proteina; ABL – abluminalne ćelije; L – luminalne ćelije; M – mioepitelne ćelije; SK – skvamoidne ćelije; INT – intermedijarne ćelije

Ekspresija proteina se prati u duktalnoj i mioepitelnoj komponenti pleomorfnog adenoma. Neoplastične ćelije su pokazale jaku ekspresiju GFAP (10/10), p63 (10/10), WT1 (10/10), vimentin (9/10) i S100 (8/10) (*Slika 28*).



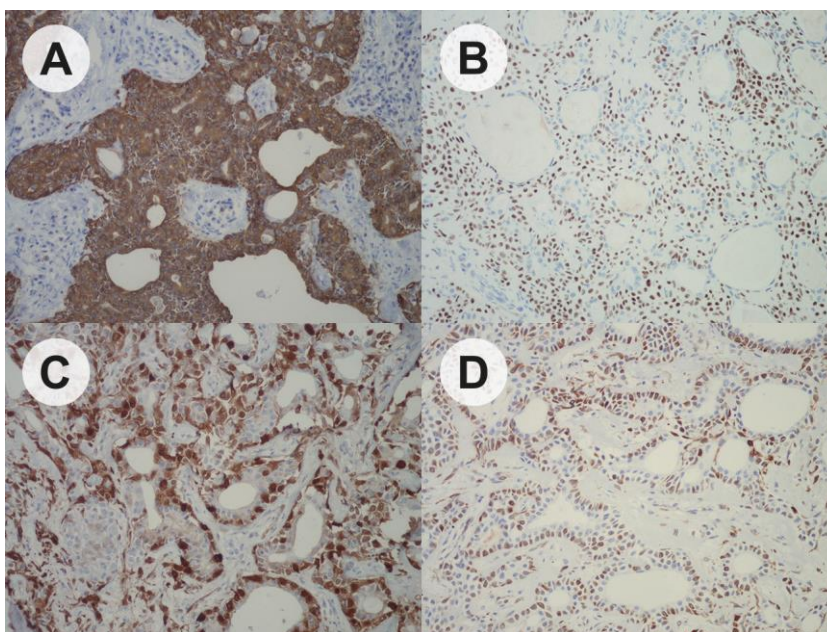
Slika 28. Tumor mixtus, uveličanje x20; **A** – Difuzna, intenzivna ekspresija α SMA u mioepitelnoj komponenti tumora; **B** – Ekspresija CEA u luminalnim ćelijama; **C** – intenzivna citoplazmatska ekspresija GFAP u epitelnim i mioepitelnim ćelijama; **D** – Jedarna ekspresija S100; **E** – Citoplazmatska ekspresija vimentina; **F** – Ekspresija WT1 u citoplazmi neoplastičnih mioepitelnih ćelija

Epitel u Vartinovom tumoru je dvoredan i čine ga unutrašnji (luminalni) sloj onkocitnih ćelija, svetle, bogate citoplazme čija su jedra u palisadnom rasporedu. Ove ćelije su pokazale pozitivnost na EMA (10/10), fokalno na CEA (6/10) i fokalno na WT1u apikalnim delovima (3/10). Bazalni sloj je pokazao ekspresiju CK 14 (10/10). Vimentin se ekspimirao u stromi tumora, a fokalno je obojio pojedinačne epitelne ćelije. S100 je označio dendritske ćelije. Slika 29 pokazuje ekspresiju antitela od značaja u diferencijaciji ovog tipa tumora.



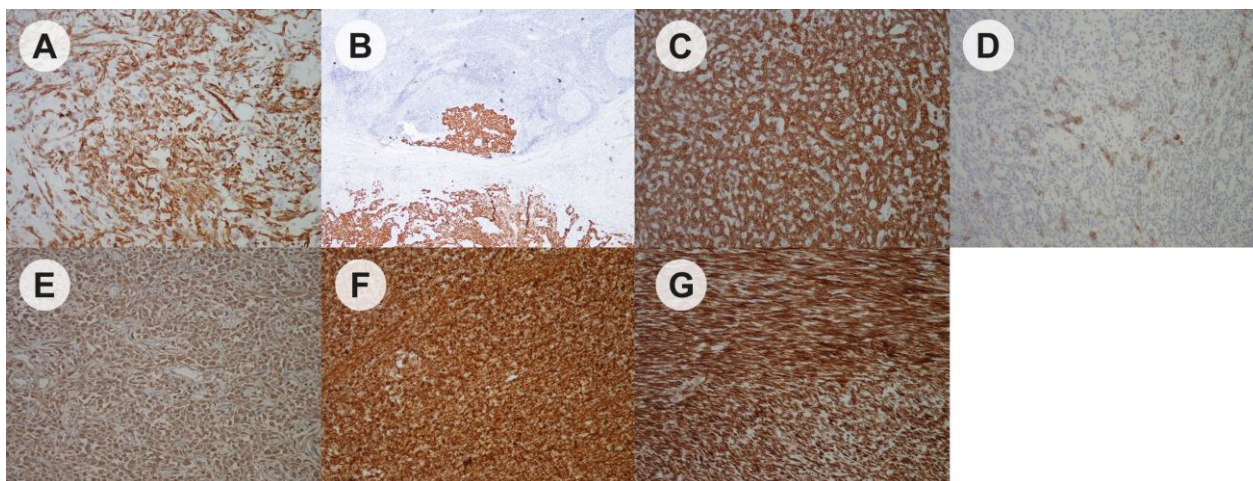
Slika 29. Warthin tumor, uveličanje x20; **A** – Fokalna, pretežno apikalna ekspresija CEA u luminalnim ćelijama; **B** – ekspresija CK14 u bazalnom sloju dvorednog epitela; **C** – ekspresija EMA u celoj debljini epitelne komponente; **D** – p63 – jedarna ekspresija u ćelijama bazalnog sloja **E** – dendritske ćelije ekspimiraju S100; **F** – Fokalna ekspresija vimentina u epitelnim ćelijama i u stromalnoj komponenti tumora; **G** – Fokalna ekspresija WT1 u luminalnim ćelijama

U grupi adenoma bazalnih ćelija analizirali smo sva četiri tipa rasta tumora. Ukupno je bilo šest slučajeva iz ove grupe tumora. Najbrojniji je, generalno, solidni tip rasta. Praćena je ekspresija u luminalnim i bazaloidnim ćelijama. Odsustvo pozitivne reakcije primećeno je sa GFAP. WT1, CEA i S100 su pokazali fokalnu pozitivnost, vimentin i CK14 su se ekspresirali u bazaloidnim ćelijama u tubularvom tipu, odnosno na periferiji tumorskih plaža u solidnom tipu rasta (*Slika 30*).



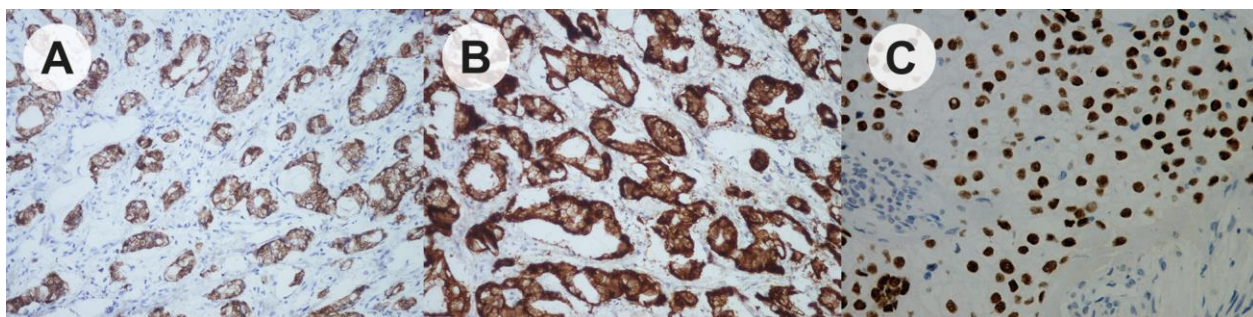
Slika 30. Basal cell adenoma, uvećanje x20; A – CK14 – intezivna citoplazmatska ekspresija u neoplastičnim ćelijama; B – Jedarna ekspresija p63 u bazaloidnim ćelijama; C – Jedarna i citoplazmatska ekspresija S100 u bazaloidnim ćelijama; D – Intezivna citoplazmatska i salba jedarna ekspresija WT1 u bazaloidnim ćelijama tumorskih plaža

U grupi mioepitelnih tumora analizirano je četiri mioepitelioma i četiri mioepitelnih karcinoma. Pokazali su slabu, fokalnu pozitivnost na GFAP, odsustvo reakcije sa CEA i EMA, dok su sa ostalim markerima intermedijarnih filamenata pokazali izrazitu pozitivnost (*Slika 31*).



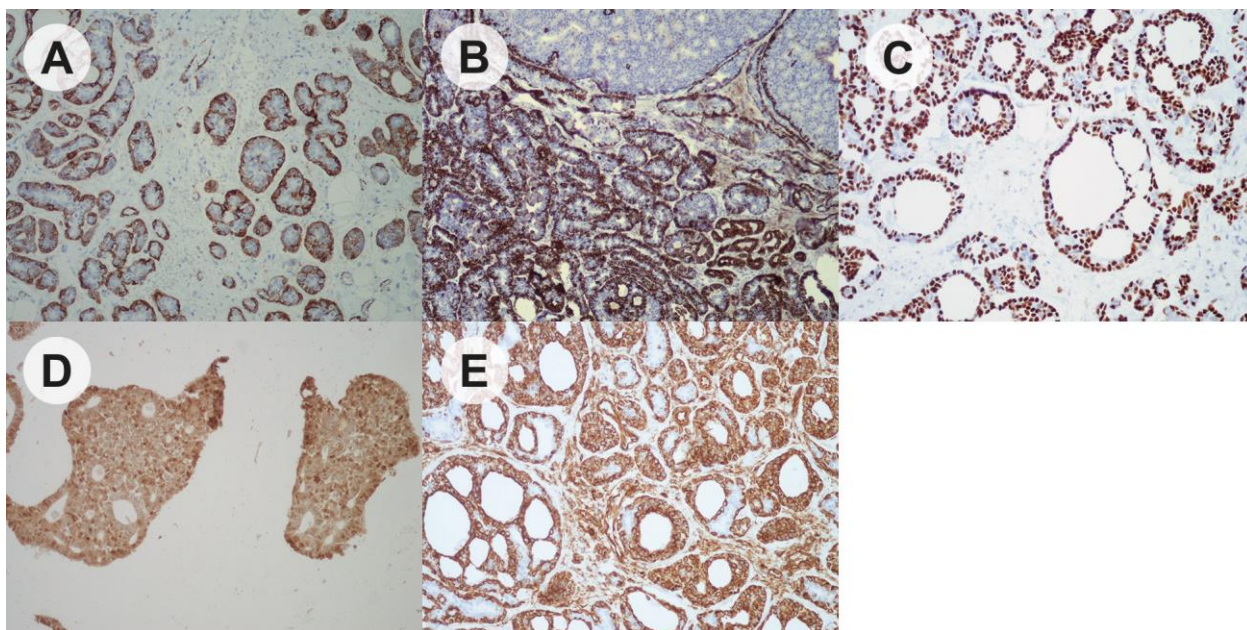
Slika 31. Tumori mioepitelnog porekla, uveličanje x20; **A** – Neoplastične mioepitelne ćelije pokazuju intenzivnu ekspresiju α SMA; **B** – Metastaza mioepitelnog karcinoma u limfnom nodusu (anti-CK14, uveličanje x4); **C** – Ekspresija CK14 kod Myoepithelioma; **D** – Fokalna, zanemarljivo slaba ekspresija EMA; **E** – Citoplazmatska, difuzna ekspresija S100; **F** – Intenzivna ekspresija vimentina; **G** – Neoplastične mioepitelne ćelije pokazuju jaku citoplazmatsku ekspresiju WT1

Jaka pozitivnost je uočena sa CEA i EMA (8/8), kao i sa p63 i CK14 u epidermoidnim i intermedijarnim ćelijama mukoepidermoidnog karcinoma (8/8). Tumorske ćelije, u našem istraživanju su pokazale potpuno odsustvo reakcije na S100, α SMA i vimentin (Slika 32).



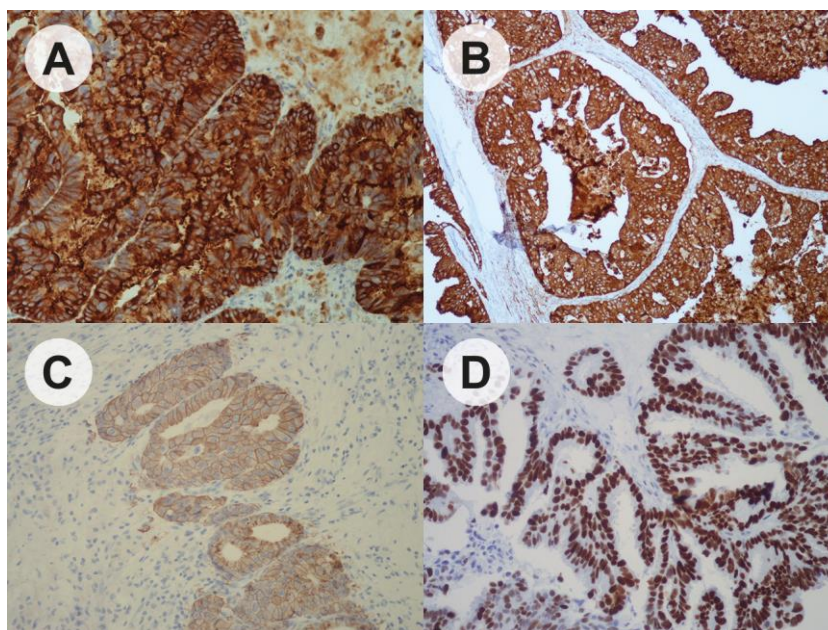
Slika 32. Carcinoma mucoepidermoides, uveličanje x20; **A** – Citoplazmatska ekspresija CK14 u epidermoidnim i intermedijarnim ćelijama; **B** – Difuzna ekspresija EMA; **C** – Jedarna ekspresija p63 u epidermoidnim i intermedijarnim ćelijama

Ekspresija CK14 kod adenoidno cističnog karcinoma prisutna je u unutrašnjim, luminalnim ćelijama, dok su mioepitelne ćelije, spoljašnji sloj, negativne. U solidnom tipu rasta detektovana je fokalna ekspresija. Potpuno odsustvo reakcije uočeno je sa GFAP, i slaba fokalna pozitivnost sa WT1 na periferiji tumorskih plaža (Slika 33).



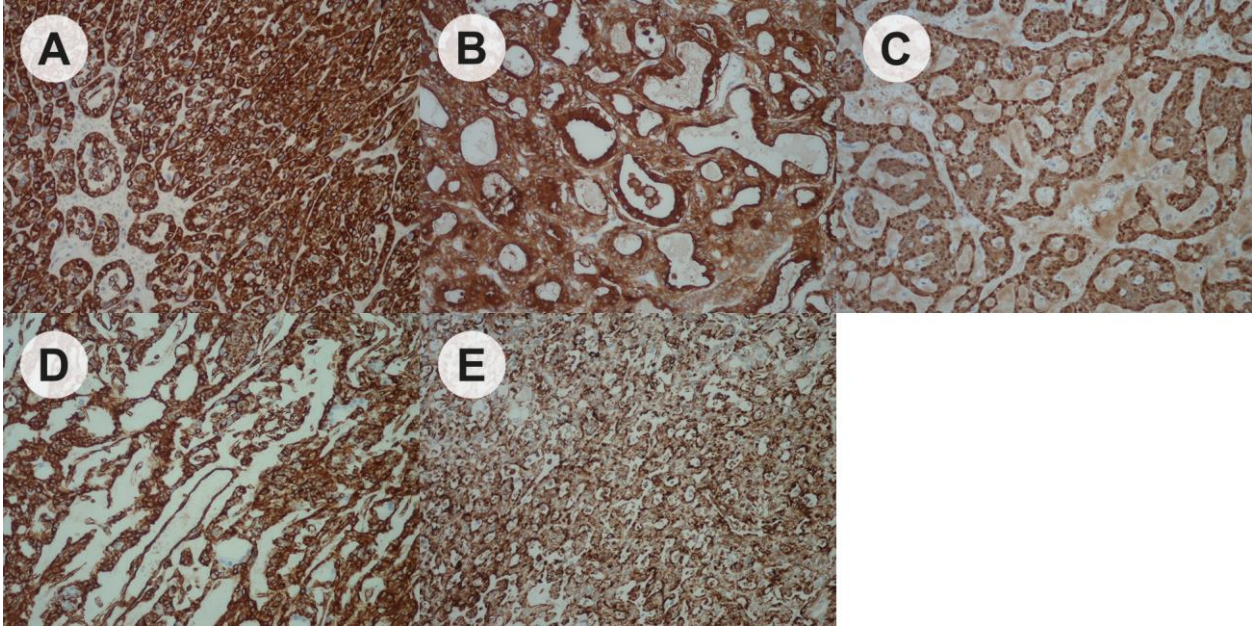
Slika 33. Carcinoma adenoides cysticum, uveličanje x20; **A** – Spoljašnji, abluminalni deo pokazuje jaku pozitivnost na α SMA; **B** – Luminalne ćelije ekspresuju CK14 u kribriformnom i tubularnom delu tumora, ćelije solidnog dela pokazuju fokalnu ekspresiju,; **C** - p63 ekspresivan od strane mioepitelnih, ablumenskih ćelija; **D** – S100, difuzna reakcija svih ćelija; **E** – Vimentin, jaka ekspresija u ablumenskim ćelijama

Analizom šest slučajeva karcinoma pljuvačnih kanala utvrdili smo apsolutnu ekspresiju CEA, EMA i p53 (6/6). Intenzivna, kompletna ekspresija HER2 bila je prisutna u tri tumora ove grupe. Ekspresija mioepitelnih markera je u potpunosti bila odsutna (Slika 34).



Slika 34. Salivary duct carcinoma, uveličanje x20; **A** – Intenzivno citoplazmatsko prebojavanje CEA; **B** – Difuzna ekspresija EMA; **C** – Intenzivna, kompletna membranska ekspresija HER2; **D** – Jedarna ekspresija p53

Za razliku od adenoidno cističnog karcinoma, u grupi od šest polimorfnih adenokarcinoma niskog gradusa prisutna je difuzna ekspresija CK14 (6/6). S100, vimentin i EMA su bili apsolutno eksprimirani, dok je α SMA bio negativan. Uočena je fokalana ekspresija WT1, naročito u kribriformnim delovima tumora (*Slika 35*).

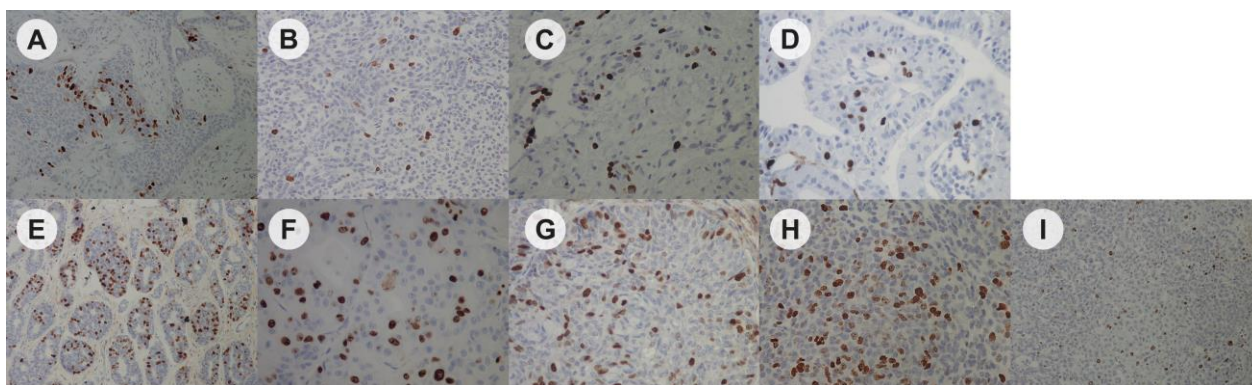


Slika 35. Polymorphus low-grade adenocarcinoma, uveličanje x20; A – Difuzna i intezivna ekspresija CK14; B – Ekspresija EMA u luminalnim i abluminalnim ćelijama; C – Homogeno prebojavanje neoplastičnih ćelija S100; D – Citoplazmatska ekspresija vimentina;

E – Ekspresija WT1 u kribriformnom delu tumora

5.2 Ki67 proliferativni indeks benignih i malignih tumora pljuvačnih žlezda

U našem istraživanju analizirana je ekspresija Ki67 kod svih 60 tumora pljuvačnih žlezda. U diferencijaciji agresivnosti i biološkom ponašanju tumora granična vrednost je bila 5%. Za pozitivnu reakciju se smatra intezivno jedarno bojenje, nalik intezitetu bojenja u bazalnom sloju pločastoslojevitog epitela (*Slika 36*).



Slika 36. Ekspresi Ki 67 u benignim i malignim tumorima pljuvačnih žlezda; **A** – Basal cell adenoma, uveličanje x20; **B** – Myoepithelioma, uveličanje x40; **C** – Tumor mixtus, uveličanje x40; **D** – Warthin tumor, uveličanje x40; **E** – Carcinoma adenoides cysticum, uveličanje x20; **F** – Salivary duct carcinoma, uveličanje x40; **G** – Carcinoma mucoepidermoides, uveličanje x40; **H** – Myoepithelial carcinoma, uveličanje x40; **I** - Polymorphus low-grade adenocarcinoma, uveličanje x20

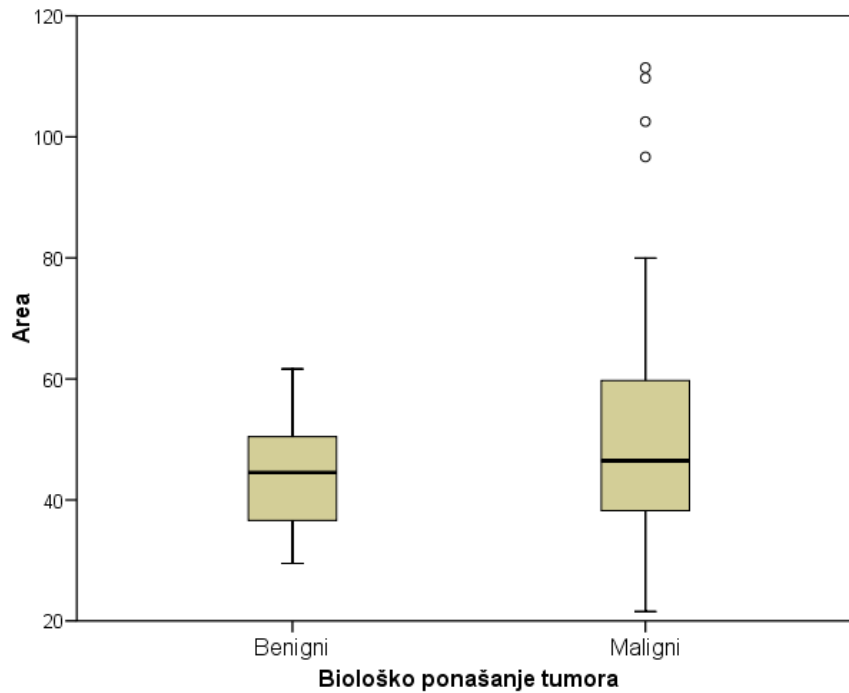
Vrednost proliferativnog indeksa statistički je značajno viša kod malignih ($21,57 \pm 16,13$ (17,99)) u odnosu na benigne tumore ($2,48 \pm 1,05$ (2,40)) – $p < 0,001$ (*Tabela 4*, *Grafikon 1*).

Tabela 4. Vrednost proliferativnog indeksa kod benignih i malignih tumora

Tumori	X ± SD	(Me)	Min –	Max
Benigni	$2,48 \pm 1,05$	(2,40)	1,30 –	5,30
Maligni	$21,57 \pm 16,13^{***}$	(17,99)	1,18 –	72,30

Podaci su predstavljeni kao X±SD (Me) Min–Max

*** – $p < 0,001$ (Mann-Whitney U Test)



Grafikon 1. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega proliferativnog indeksa kod benignih i malignih tumora

Na osnovu Kruskal Wallis testa vrednosti proliferativnog indeksa, prikazane u tabeli 2 i na grafikonu 3, statistički značajno zavise od tipa tumora, kako malignih ($p < 0,001$), tako i benignih ($p < 0,05$).

Gledano po tipu tumora najveća vrednost proliferativnog indeksa je kod adenoidno cističnog karcinoma i statistički je značajno veća u odnosu na mucoepidermoidni karcinom ($p < 0,05$), u odnosu na mioepitelni karcinom ($p < 0,01$) i sve ostale tumore ponaosob ($p < 0,001$). Najniže vrednosti proliferativnog indeksa su kod mioepitelioma, bliska je ovoj kod polimorfno adenokarcinoma niskog gradusa (*Tabela 5, Grafikon 2*).

Vrednosti proliferativnog indeksa kod svih malignih tumora, izuzev polimorfno adenocarcinoma niskog gradusa, veće su nego kod svih benignih tumora.

Tabela 5. Vrednosti proliferativnog indeksa u odnosu na tip tumora

Tip tumora ^{***}	X ± SD	(Me)	Min – Max
Benigni[*]			
Myoepithelioma	2,48 ± 1,05	(2,40)	1,30 – 5,30
Tumor mixtus	5,97 ± 4,05 ^{ah*g**}	(4,60)	1,20 – 13,00
Basal cell adenoma	3,85 ± 3,71	(2,34)	0,76 – 12,00
Warthin tumor	4,78 ± 1,65 ^{ah**}	(5,18)	2,05 – 6,98
Maligni^{***}			
Myoepithelial carcinoma	17,48 ± 10,24 ^{acdi***b**}	(16,65)	3,40 – 37,40
Carcinoma adenoides cysticum	32,87 ± 18,86^{abcdh***e**g*}	(31,63)	3,60 – 72,30
Carcinoma mucoepidermoides	18,29 ± 9,76 ^{acdh***b**}	(19,53)	7,96 – 39,55
Polymorphus low grade adenocarcinoma	2,57 ± 1,32	(2,78)	1,18 – 4,78
Salivary duct carcinoma	28,69 ± 10,17 ^{abcdh***eg*}	(27,56)	15,52 – 43,39

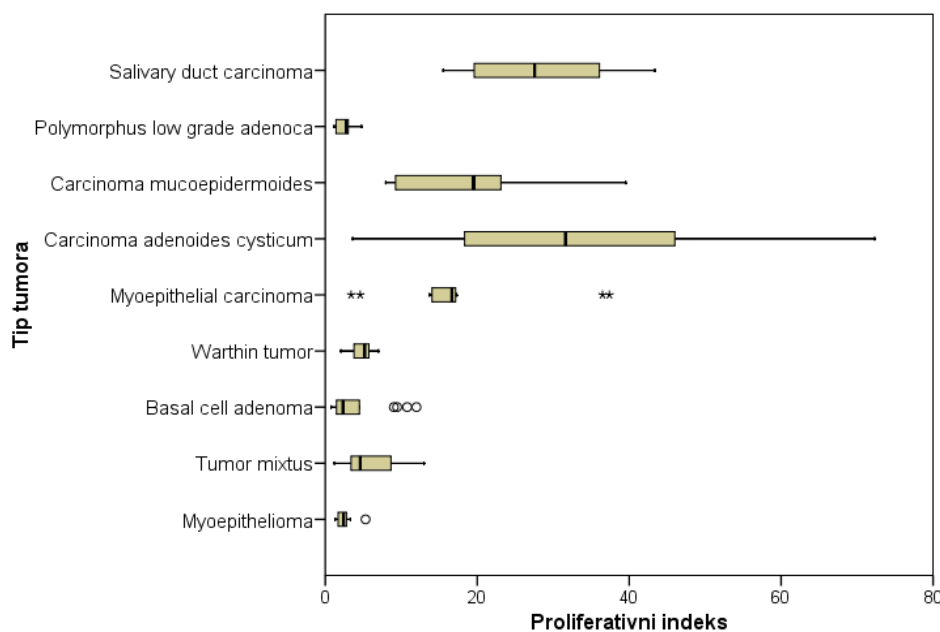
Kruskal Wallis test:

	χ^2	df	p
Benigni tumori	10,37	3	0,0157 [*]
Maligni tumori	29,51	4	0,0000 ^{***}
Svi tumori	76,81	8	0,0000 ^{***}

Podaci su predstavljeni kao X±SD (Me) Min–Max

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 (Kruskal Wallis test, Mann-Whitney U Test)

a - vs Myoepithelioma, b - vs Tumor mixtus, c - vs Basal cell adenoma, d - vs Warthin tumor,
e - vs Myoepithelial carcinoma, f - vs Carcinoma adenoides cysticum, g - vs Carcinoma mucoepidermoides,
h - vs Polymorphus low-grade adenocarcinoma, i - vs Salivary duct carcinoma



Grafikon 2. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega proliferativnog indeksa kod različitih tipova tumora

5.3 Morfometrijska analiza benignih i malignih tumora pljuvačnih žlezda

5.3.1 Površina jedra

(Area)

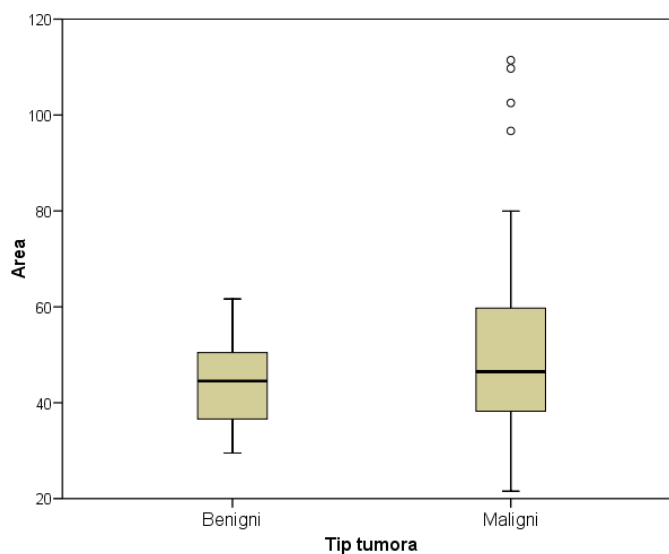
Vrednosti površine jedra statistički su značajno više kod malignih ($51,43 \pm 20,20$ (46,47)) u odnosu na benigne tumore ($44,19 \pm 8,34$ (44,52)) – $p < 0,05$ (Tabela 6, Grafikon 3).

Tabela 6. Vrednosti Area kod benignih i malignih tumora

Tumori	X ± SD	(Me)	Min –	Max
Benigni	$44,19 \pm 8,34$	(44,52)	29,50 –	61,65
Maligni	$51,43 \pm 20,20^*$	(46,47)	21,57 –	111,43

Podaci su predstavljeni kao X±SD (Me) Min–Max

* – $p < 0,05$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Grafikon 3. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega Area kod benignih i malignih tumora

Na osnovu ANOVE analize, vrednosti površine jedra, date u tabeli 7 i na grafikonu 4, statistički značajno zavise od tipa tumora, kako u grupi malignih tumora ($p < 0,001$), tako i u grupi benignih tumora ($p < 0,01$).

Površina jedra je najveće vrednost pokazala kod karcinoma pljuvačnih kanala, statistički značajno veće u odnosu na polimorfni adenokarcinom niskog gradusa ($p < 0,05$), mukoepidermoidni karcinom i Vartinov tumor ($p < 0,01$) i sve ostale tumore ponaosob ($p < 0,001$) izuzev na mioepitelni karcinom.

Vrednosti površine jedra svih malignih tumora, osim adenoidno cističnog karcinoma niskog gradusa, veće su nego kod benignih tumora.

Tabela 7. Vrednosti površine jedra u odnosu na tip tumora

Tip tumora ^{***}	X ± SD	(Me) Min – Max
Benigni^{**}		
Myoepithelioma	42,42 ± 7,36	(42,67) 30,75 – 51,23
Tumor mixtus	35,82 ± 3,57	(35,69) 31,59 – 40,31
Basal cell adenoma	40,97 ± 7,70	(40,80) 29,50 – 51,64
Warthin tumor	48,17 ± 7,84 ^{b*}	(48,90) 34,44 – 61,65
Maligni^{***}		
Myoepithelial carcinoma	55,01 ± 12,39	(61,25) 36,41 – 65,32
Carcinoma adenoides cysticum	35,23 ± 8,02 ^{d***}	(36,49) 21,57 – 50,54
Carcinoma mucoepidermoides	49,94 ± 6,95 ^{f***b**}	(51,98) 38,86 – 58,45
Polymorphus low-grade adenocarcinoma	54,23 ± 12,38	(50,08) 39,47 – 70,44
Salivary duct carcinoma	83,22 ± 19,19^{abcf***dg**h*}	(79,63) 57,06 – 111,43

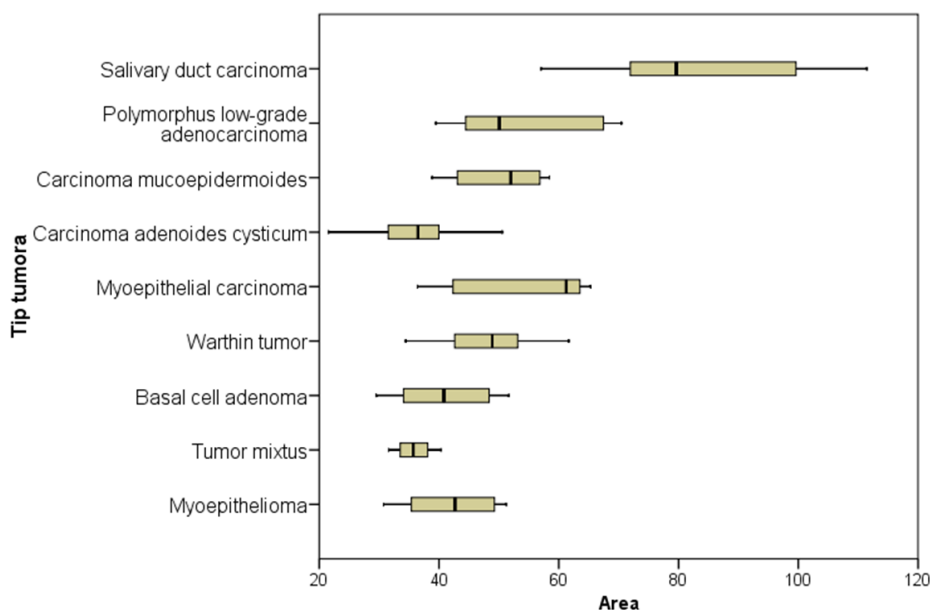
ANOVA

	F	df	p
Benigni tumori	5,08	3	0,0038 ^{**}
Maligni tumori	32,63	4	0,0000 ^{***}
Svi tumori	25,35	8	0,0000 ^{***}

Podaci su predstavljeni kao X±SD (Me) Min–Max

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 (ANOVA, Post Hoc Test, Tamhane test)

a - vs Myoepithelioma, b - vs Tumor mixtus, c - vs Basal cell adenoma, d - vs Warthin tumor, e - vs Myoepithelial carcinoma, f - vs Carcinoma adenoides cysticum, g - vs Carcinoma mucoepidermoides, h - vs Polymorphus low-grade adenocarcinoma, i - vs Salivary duct carcinoma



Grafikon 4. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega Area kod različitih tipova tumora

5.3.2 Obim jedra, Perimetar

(Perimeter, (Perim))

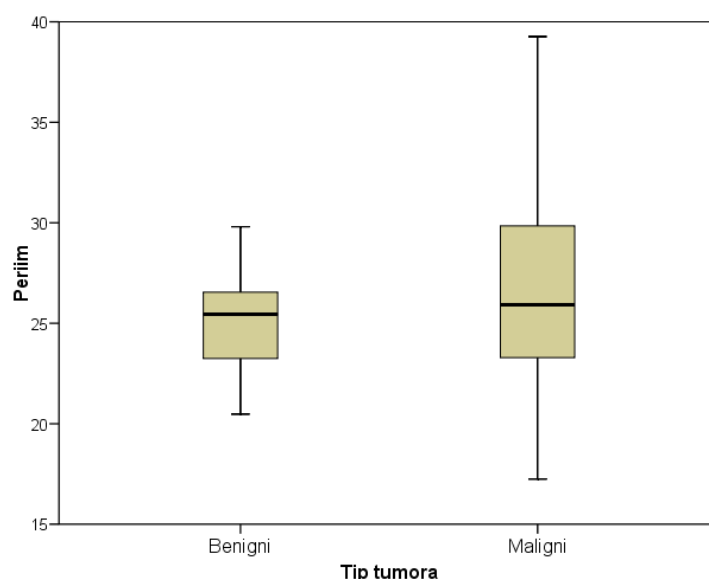
Vrednosti obima jedra statistički značajno su više kod malignih ($26,75 \pm 5,08$ (25,92)) u odnosu na benigne tumore ($25,15 \pm 2,29$ (25,44)) – $p < 0,05$ (Tabela 8, Grafikon 5).

Tabela 8. Vrednost perimetra kod benignih i malignih tumora

Tumori	$X \pm SD$	(Me)	Min –	Max
Benigni	$25,15 \pm 2,29$	(25,44)	20,48 –	29,80
Maligni	$26,75 \pm 5,08$ *	(25,92)	17,25 –	39,26

Podaci su predstavljeni kao $X \pm SD$ (Me) Min–Max

* – $p < 0,05$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Grafikon 5. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega perimetra kod benignih i malignih tumora

ANOVA analiza, je potvrdila da vrednosti obima jedra (perim), date u tabeli 9 i na grafikonu 6, statistički značajno zavise od tipa tumora, kako u grupi malignih ($p < 0,001$), tako i u grupi benignih tumora ($p < 0,05$). Takođe je potvrđeno da vrednosti obima jedra statistički značajno zavise od tipa tumora, nezavisno od njegove prirode ($p < 0,001$).

Obim jedra je pokazao najveće vrednost kod karcinoma pljuvačnih kanala, statistički značajno veće u odnosu na polimorfni adenokarcinom niskog gradusa ($p < 0,05$), mukoepidermoidni karcinom ($p < 0,01$) i sve ostale tumore ponaosob ($p < 0,001$) izuzev na mioepitelni karcinom.

Vrednosti obima jedra svih malignih tumora, osim adenoidno cističnog karcinoma, veće su nego kod benignih tumora.

Tabela 9. Vrednosti perimetra u odnosu na tip tumora

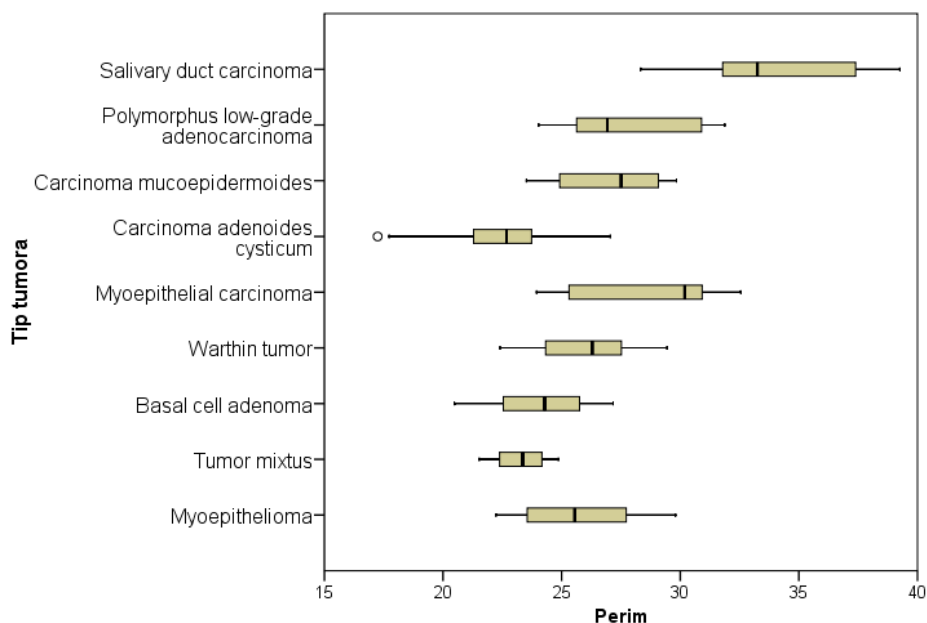
Tip tumora ^{***}	X ± SD	(Me) Min – Max
Benigni[*]		
Myoepithelioma	25,59 ± 2,47	(25,55) 22,23 – 29,80
Tumor mixtus	23,28 ± 1,37	(23,36) 21,53 – 24,86
Basal cell adenoma	24,04 ± 2,09	(24,28) 20,48 – 27,17
Warthin tumor	25,95 ± 2,09 ^{***f}	(26,30) 22,41 – 29,44
Maligni^{***}		
Myoepithelial carcinoma	28,85 ± 3,43	(30,19) 23,95 – 32,55
Carcinoma adenoides cysticum	22,19 ± 2,63	(22,68) 17,25 – 27,05
Carcinoma mucoepidermoides	27,07 ± 2,25 ^{f***c*}	(27,50) 23,51 – 29,84
Polymorphus low-grade adenocarcinoma	27,85 ± 2,98 ^{f*}	(26,93) 24,04 – 31,88
Salivary duct carcinoma	33,93 ± 3,87^{abcd f***g**h*}	(33,25) 28,33 – 39,26

ANOVA			
	F	df	p
Benigni tumori	3,71	3	0,0174 [*]
Maligni tumori	31,61	4	0,0000 ^{***}
Svi tumori	22,59	8	0,0000 ^{***}

Podaci su predstavljeni kao X±SD (Me) Min–Max

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 (ANOVA, Post Hoc Test, Tamhane test)

a - vs Myoepithelioma, b - vs Tumor mixtus, c - vs Basal cell adenoma, d - vs Warthin tumor,
e - vs Myoepithelial carcinoma, f - vs Carcinoma adenoides cysticum, g - vs Carcinoma mucoepidermoides,
h - vs Polymorphus low-grade adenocarcinoma, i - vs Salivary duct carcinoma



Grafikon 6. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega Perim kod različitih tipova tumora

5.3.3 Cirkularnost jedra

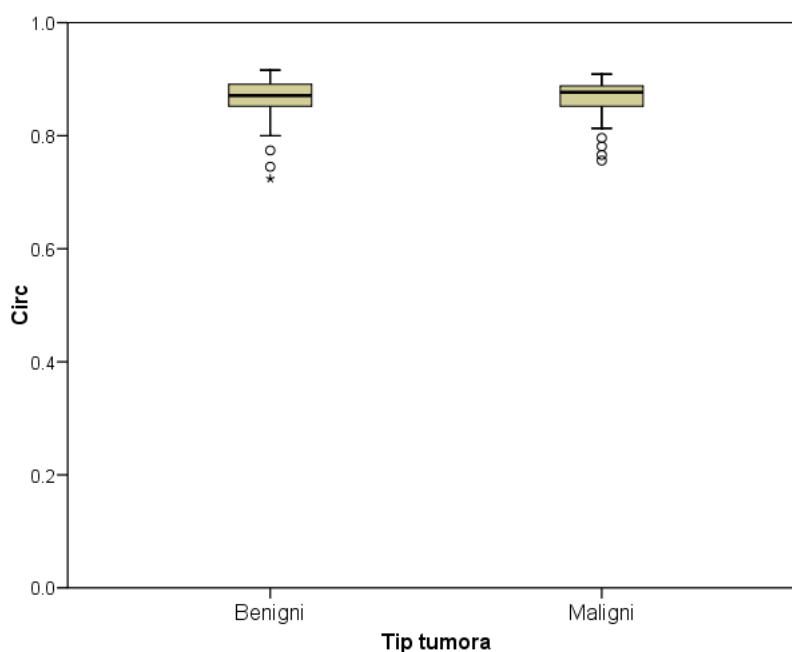
(Circularity, (Circ))

Cirkularnost je pokazala više vrednosti kod malignih ($0,87 \pm 0,03$ (0,88)) u odnosu na benigne tumore ($0,86 \pm 0,04$ (0,87)) (Tabela 10, Grafikon 7), ali ova razlika nije statistički značajna.

Tabela 10. Vrednosti cirkularnosti jedra kod benignih i malignih tumora

Tumori	$X \pm SD$	(Me)	Min –	Max
Benigni	$0,86 \pm 0,04$	(0,87)	0,72 –	0,92
Maligni	$0,87 \pm 0,03$	(0,88)	0,76 –	0,91

Podaci su predstavljeni kao $X \pm SD$ (Me) Min–Max
(Man-Whitney U test)



Grafikon 7. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega Circ kod benignih i malignih tumora

ANOVA analiza, potvrdila je da vrednosti za cirkularnost (Tabela 11, Grafikon 8) statistički značajno zavise od tipa tumora, kod benignih, malignih, ali i svih tumora, bez obzira na njihovu prirodu ($p < 0,001$).

Cirkularnost je nešto veće vrednosti pokazala kod karcinoma pljuvačnih kanala, statistički značajno veće u odnosu na polimorfni adenokarcinom niskog gradusa ($p < 0,05$), kao i mioepiteliom ($p < 0,01$) kod koga je cirkularnost najniža, statistički značajno niža u odnosu na Warthin tumor ($p < 0,01$), ali i na adenom bazalnih ćelija i adenoidno cistični karcinom ($p < 0,05$).

Tabela 11. Vrednosti cirkularnosti jedra u odnosu na tip tumora

Tip tumora***	X ± SD	(Me)	Min –	Max
Benigni***				
Myoepithelioma	0,80 ± 0,04	(0,82)	0,72 –	0,86
Tumor mixtus	0,83 ± 0,02	(0,82)	0,81 –	0,86
Basal cell adenoma	0,87 ± 0,02 ^{a*}	(0,87)	0,82 –	0,92
Warthin tumor	0,88 ± 0,02 ^{a**}	(0,89)	0,85 –	0,91
Maligni***				
Myoepithelial carcinoma	0,82 ± 0,04	(0,83)	0,76 –	0,86
Carcinoma adenoides cysticum	0,88 ± 0,02 ^{a*}	(0,88)	0,83 –	0,91
Carcinoma mucoepidermoides	0,85 ± 0,04	(0,86)	0,77 –	0,90
Polymorphus low-grade adenocarcinoma	0,86 ± 0,02	(0,86)	0,84 –	0,88
Salivary duct carcinoma	0,89 ± 0,01^{a**h*}	(0,89)	0,86 –	0,90

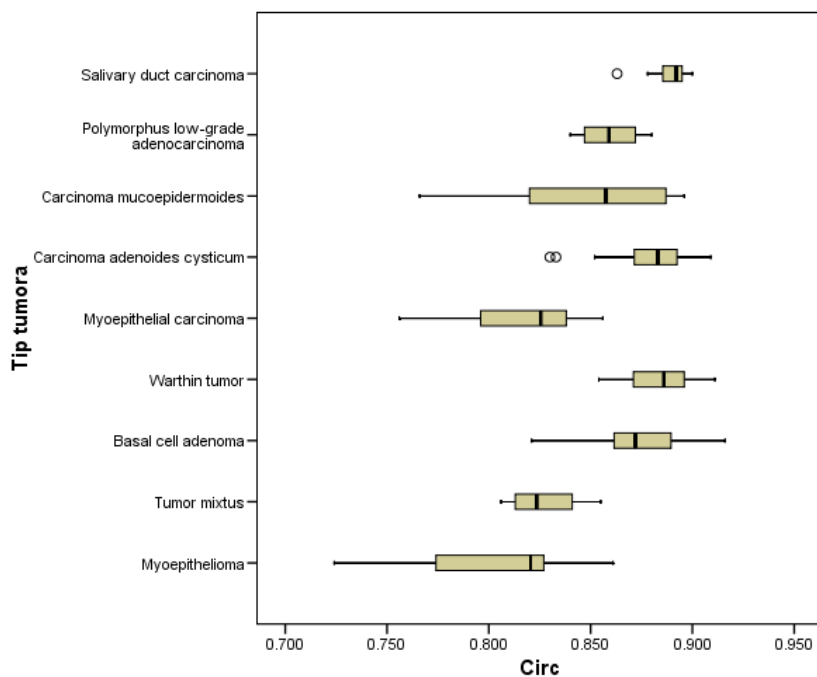
ANOVA

	F	df	p
Benigni tumori	27,69	3	0,0000***
Maligni tumori	9,70	4	0,0000***
Svi tumori	14,96	8	0,0000***

Podaci su predstavljeni kao X±SD (Me) Min–Max

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 (ANOVA, Post Hoc Test, Tamhane test)

a - vs Myoepithelioma, b - vs Tumor mixtus, c - vs Basal cell adenoma, d - vs Warthin tumor,
e - vs Myoepithelial carcinoma, f - vs Carcinoma adenoides cysticum, g - vs Carcinoma mucoepidermoides,
h - vs Polymorphus low-grade adenocarcinoma, i - vs Salivary duct carcinoma



Grafikon 8. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega Circ kod različitih tipova tumora

5.3.4 Feretov dijametar jedra

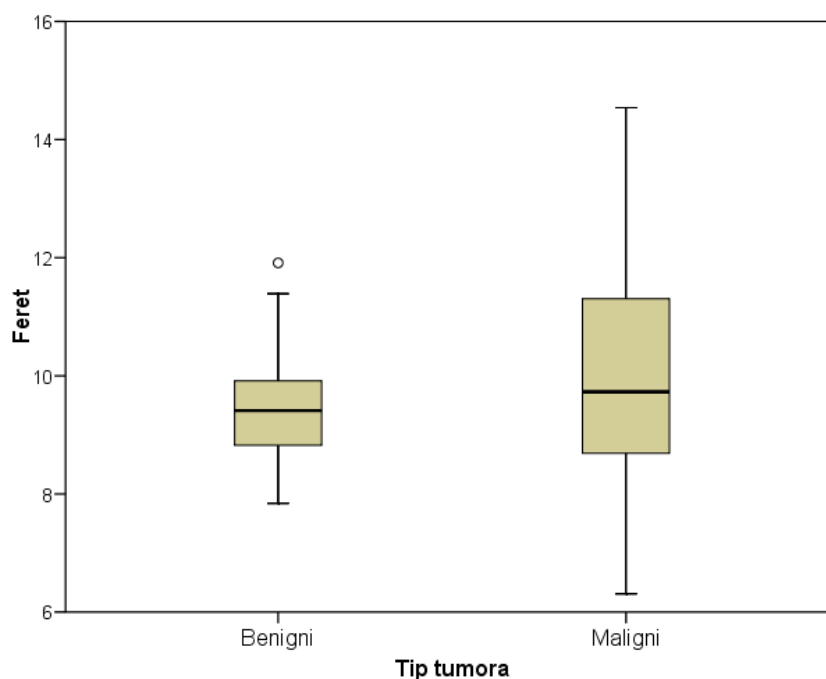
(Feret)

Vrednosti Feretovog dijametra (Feret) su više kod malignih ($9,92 \pm 1,81$ (9,73)) u odnosu na benigne tumore ($9,44 \pm 0,86$ (9,41)), ali dobijena razlika nije statistički značajna (Tabela 12, Grafikon 9).

Tabela 12. Vrednosti Feret kod benignih i malignih tumora

Tumori	$X \pm SD$	(Me)	Min –	Max
Benigni	$9,44 \pm 0,86$	(9,41)	7,84 –	11,91
Maligni	$9,92 \pm 1,81$	(9,73)	6,31 –	14,54

Podaci su predstavljeni kao $X \pm SD$ (Me) Min–Max
(Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Grafikon 9. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega za Feret kod benignih i malignih tumora

ANOVA analiza, potvrdila je da vrednosti Feret (Tabela 13, Grafikon 10) statistički značajno zavise od tipa tumora, kod benignih ($p < 0,05$), malignih, ali i svih tumora, bez obzira na njihovu prirodu ($p < 0,001$).

Feret je najveće vrednosti pokazao kod karcinoma pljuvačnih kanala, statistički značajno veće u odnosu na mucoepidermoidni karcinom ($p < 0,05$), mioepitelioma, Vartinov tumor ($p < 0,01$), kao i pleomorfni adenom, adenom bazalnih ćelija i adenoidni cistični karcinom ($p < 0,001$).

Tabela 13. Vrednosti Feretovog dijametra u odnosu na tip tumora

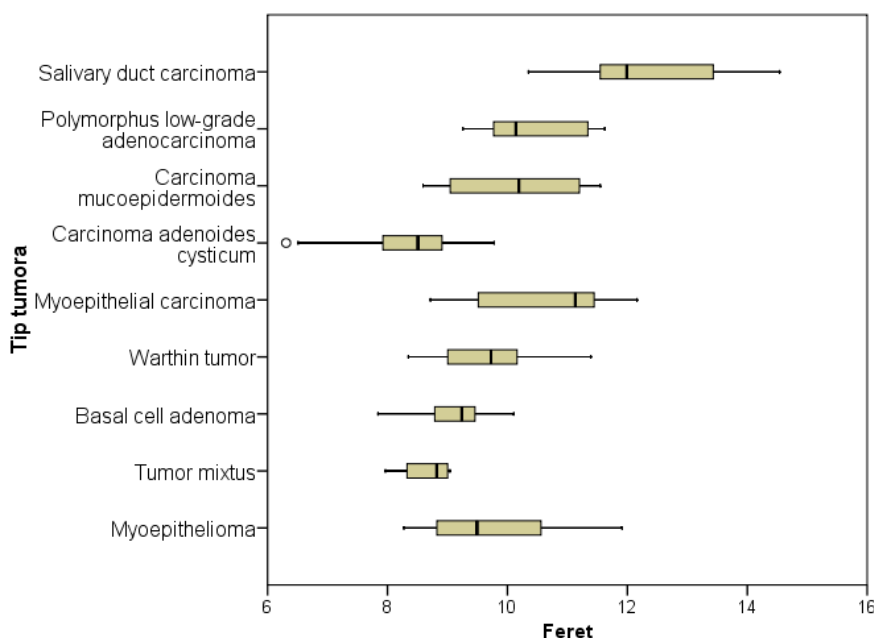
Tip tumora ^{***}	X ± SD	(Me)	Min – Max
Benigni*			
Myoepithelioma	9,71 ± 1,10	(9,49)	8,27 – 11,91
Tumor mixtus	8,66 ± 0,49	(8,829)	7,97 – 9,04
Basal cell adenoma	9,07 ± 0,65	(9,24)	7,84 – 10,11
Warthin tumor	9,69 ± 0,79 ^{f***}	(9,73)	8,35 – 11,39
Maligni^{***}			
Myoepithelial carcinoma	10,68 ± 1,30	(11,13)	8,72 – 12,16
Carcinoma adenoides cysticum	8,30 ± 0,97	(8,51)	6,31 – 9,78
Carcinoma mucoepidermoides	10,11 ± 1,09 ^{f***}	(10,19)	8,59 – 11,55
Polymorphus low-grade adenocarcinoma	10,42 ± 0,90 ^{f**b*}	(10,14)	9,26 – 11,62
Salivary duct carcinoma	12,31 ± 1,43^{bcf***ad**g*}	(11,99)	10,35 – 14,54

ANOVA			
	F	df	p
Benigni tumori	3,42	3	0,0241 *
Maligni tumori	26,03	4	0,0000 ***
Svi tumori	18,45	8	0,0000 ***

Podaci su predstavljeni kao X±SD (Me) Min–Max

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 (ANOVA, Post Hoc Test, Tamhane test)

a - vs Myoepithelioma, b - vs Tumor mixtus, c - vs Basal cell adenoma, d - vs Warthin tumor,
e - vs Myoepithelial carcinoma, f - vs Carcinoma adenoides cysticum, g - vs Carcinoma mucoepidermoides,
h - vs Polymorphus low-grade adenocarcinoma, i - vs Salivary duct carcinoma



Grafikon 10. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega Feret kod različitih tipova tumora

5.3.5 Integrisana optička gustina jedra

(Intergated Optical Density, (IOD))

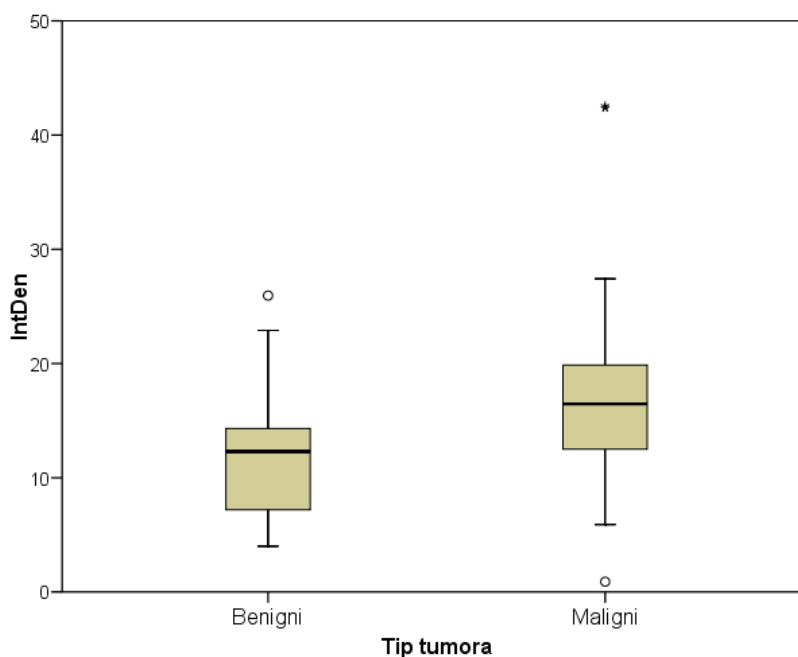
Integrisana optička gustina (IOD, IntDen) je statistički značajno viših vrednosti kod malignih tumora ($16,87 \pm 7,45$ (16,46)) u odnosu na benigne ($11,93 \pm 5,20$ (12,30)) – $p < 0,001$ (Tabela 14, Grafikon 11).

Tabela 14. Vrednosti IOD kod benignih i malignih tumora

Tumori	$X \pm SD$	(Me)	Min –	Max
Benigni	$11,93 \pm 5,20$	(12,30)	4,01 –	25,95
Maligni	$16,87 \pm 7,45^{***}$	(16,46)	0,90 –	42,55

Podaci su predstavljeni kao $X \pm SD$ (Me) Min–Max

*** – $p < 0,001$ (MannWhitny U test)



Grafikon 11. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega za IntDen kod benignih i malignih tumora

ANOVA analiza, potvrdila je da vrednosti IntDen (Tabela 15, Grafikon 12) statistički značajno zavise od tipa tumora, kod malignih ($p < 0,01$), tako i benignih i svih tumora, bez obzira na njihovu prirodu ($p < 0,001$).

Vrednost IOD kod mukoepidermoidnog karcinoma, koja je druga po veličini, statistički je značajno viša u odnosu na mioepiteliom, pleomorfni adenom, Vartinov tumor i mioepitelni karcinom ($p < 0,001$). Statistički značajne razlike između ostalih tipova tumora date su u tabeli 15.

Tabela 15. Vrednosti integrisane optičke gustine jedra u odnosu na tip tumora

Tip tumora***	X ± SD	(Me)	Min –	Max
Benigni***				
Myoepithelioma	5,88 ± 1,32	(5,93)	4,01 –	7,84
Tumor mixtus	4,53 ± 0,38	(4,54)	4,07 –	4,98
Basal cell adenoma	15,81 ± 4,54 ^{abe***}	(14,32)	10,95 –	25,95
Warthin tumor	13,19 ± 3,42 ^{abe***}	(12,95)	5,96 –	21,82
Maligni**				
Myoepithelial carcinoma	7,30 ± 1,38	(6,87)	5,90 –	9,06
Carcinoma adenoides cysticum	15,40 ± 3,52 ^{abe***}	(16,15)	9,30 –	22,05
Carcinoma mucoepidermoides	19,27 ± 3,58 ^{abde***}	(19,03)	14,43 –	25,79
Polymorphus low-grade adenocarcinoma	18,71 ± 6,79 ^{ab*}	(18,95)	9,02 –	25,90
Salivary duct carcinoma	20,79 ± 13,17	(14,23)	0,90 –	42,55

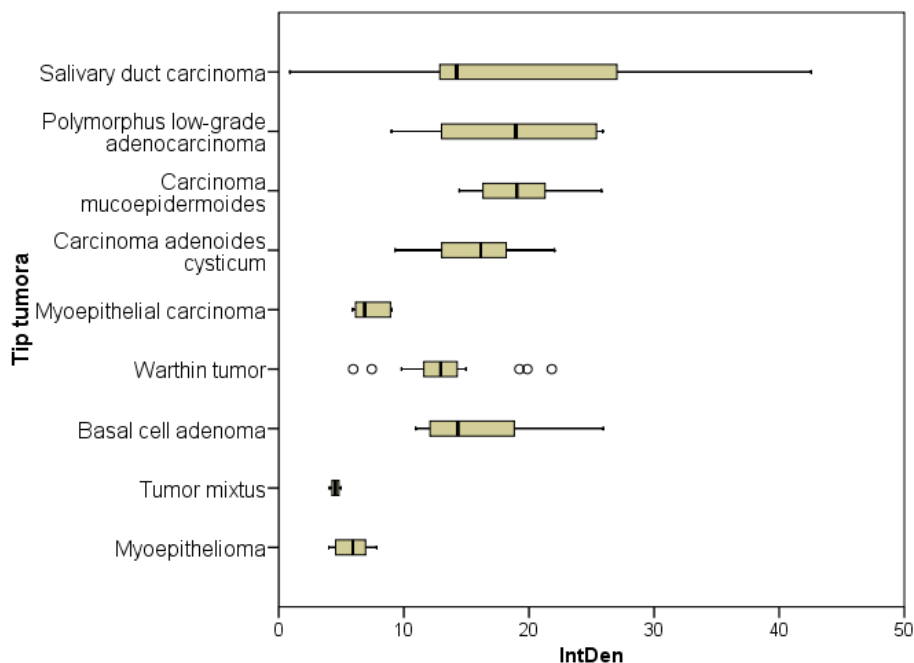
ANOVA

	F	df	p
Benigni tumori	24,21	3	0,0000 ^{***}
Maligni tumori	4,98	4	0,0016 ^{**}
Svi tumori	10,53	8	0,0000 ^{***}

Podaci su predstavljeni kao X±SD (Me) Min–Max

Podaci su predstavljeni kao X±SD (Me) Min–Max

* – p<0,05, *** – p<0,001 (ANOVA, Post Hoc Test, Tamhane test)

a - vs Myoepithelioma, b - vs Tumor mixtus, d - vs Warthin tumor,
e - vs Myoepithelial carcinoma**Grafikon 12.** Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega integrisane optičke gustine kod različitih tipova tumora

5.3.6 Zaobljenost jedra

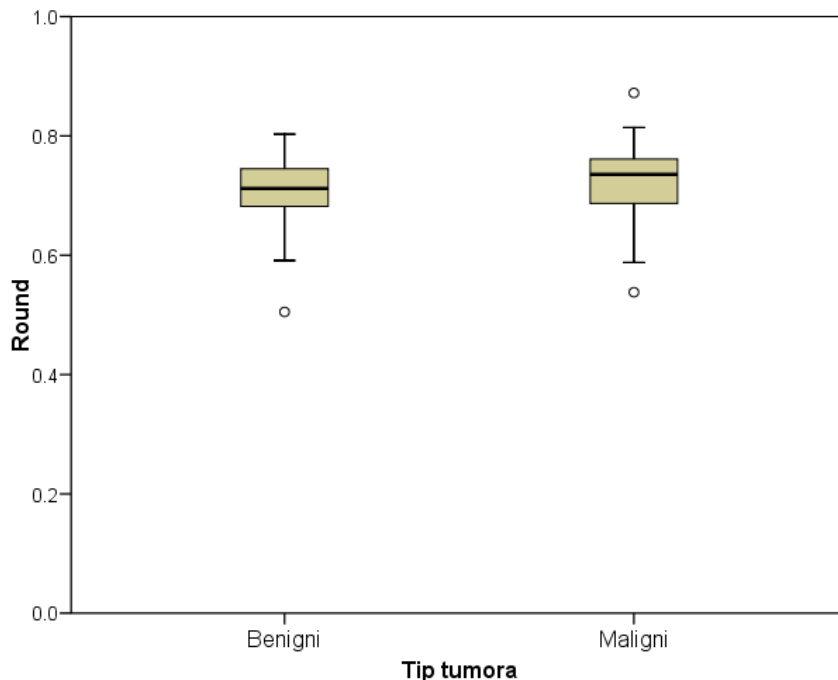
(Roundness (Round))

Vrednosti za zaobljenost (Round) jedara su veće kod malignih ($0,73 \pm 0,06$ (0,71)) u odnosu na benigne tumore ($0,71 \pm 0,05$ (0,71)) (Tabela 16, Grafikon 13), ali dobijena razlika nije statistički značajna.

Tabela 16. Vrednosti zaobljenosti jedra kod benignih i malignih tumora

Tumori	$X \pm SD$	(Me)	Min –	Max
Benigni	$0,71 \pm 0,05$	(0,71)	0,51 –	0,80
Maligni	$0,73 \pm 0,06$	(0,74)	0,54 –	0,87

Podaci su predstavljeni kao $X \pm SD$ (Me) Min–Max
(Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Grafikon 13. Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega za Round kod benignih i malignih tumora

ANOVA analiza pokazala je da vrednosti za zaobljenost jedara (Tabela 17, Grafikon 14) statistički značajno zavise od tipa tumora, kod benignih ($p < 0,01$) i svih tumora zajedno, ali gledajući samo maligne tumore, značajnost ne postoji.

Zaobljenost jedra ima najveću vrednost kod karcinoma pljuvačnih kanala koja je statistički značajno veća u odnosu na adenom bazalnih ćelija i mioepiteliome ($p < 0,05$).

Tabela 17. Vrednosti zaobljenosti jedra u odnosu na tip tumora

Tip tumora**	X ± SD	(Me)	Min –	Max
Benigni**				
Myoepithelioma	0,66 ± 0,07	(0,67)	0,51 –	0,75
Tumor mixtus	0,69 ± 0,04	(0,69)	0,65 –	0,74
Basal cell adenoma	0,71 ± 0,05	(0,70)	0,61 –	0,80
Warthin tumor	0,73 ± 0,03	(0,74)	0,63 –	0,78
Maligni				
Myoepithelial carcinoma	0,71 ± 0,04	(0,73)	0,64 –	0,74
Carcinoma adenoides cysticum	0,73 ± 0,04	(0,73)	0,66 –	0,80
Carcinoma mucoepidermoides	0,71 ± 0,10	(0,71)	0,54 –	0,87
Polymorphus low-grade adenocarcinoma	0,70 ± 0,05	(0,70)	0,61 –	0,75
Salivary duct carcinoma	0,76 ± 0,02^{ac*}	(0,76)	0,71 –	0,79

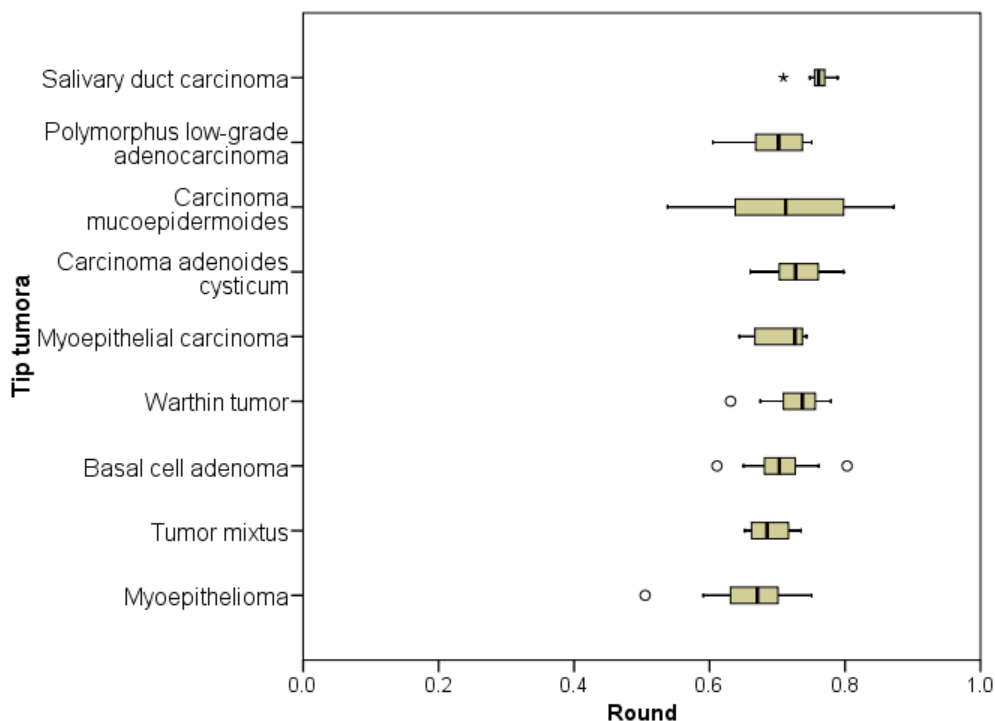
ANOVA

	F	df	p
Benigni tumori	6,06	3	0,0013**
Maligni tumori	2,03	4	0,1018
Svi tumori	3,47	8	0,0014**

Podaci su predstavljeni kao X±SD (Me) Min–Max

* – p<0,05, ** – p<0,01 (ANOVA, Post Hoc Test, Tamhane test)

a - vs Myoepithelioma, c - vs Basal cell adenoma

**Grafikon 14.** Vrednosti medijane, 25. i 75. percentila i opsega Round kod različitih tipova tumora

5.3.7 Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresije

Da bi se dobio odgovor na pitanje da li se na osnovu vrednosti morfoloških parametara može predvideti da li je reč o malignom tumoru, sprovedene su univarijantna i multivarijantna logistička regresija.

Na osnovu rezultata univarijantne logističke regresione analize, utvrđeno je da su kod malignih tumora statistički značajno veći sledeći morfometrijski parametri: area, perim ($p < 0,05$) i IOD ($p < 0,001$). Povećanje area za jednu mernu jedinicu povećava verovatnoću za malignim tumorom za 3,3% (IP 0 do 6%), povećanje perim za jediničnu vrednost povećava verovatnoću za malignim tumorom za 10,9% (IP 0 do 22%), a IOD za čak 14,4% (IP 6–23%).

Tabela 18. Vrednosti OR za procenu uticaja statistički značajnih morfoloških parametara od interesa za diferencijaciju malignih tumora, rezultati univarijantne logističke regresione analize

	OR	95,0% IP		p
		Donja	Gornja	
Area	1,033	1,00	1,06	* 0,0215
Perim	1,109	1,00	1,22	* 0,0402
IntDen	1,144	1,06	1,23	*** 0,0003

* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$

Značajne prediktorske varijable iz univarijantne analize uvrštene su u model multivarijantne logističke regresije.

Tabela 19. Vrednosti OR za procenu uticaja statistički značajnih morfoloških faktora od interesa za diferencijaciju malignih tumora, rezultati multivarijantne logističke regresione analize

	OR	95,0% IP		p
		Donja	Gornja	
IntDen	1,144	1,063	1,231	*** 0,0003
Constant	0,17			0,0013

*** – $p < 0,001$

Multivarijantna logistička regresiona analiza iz polaznog modela sa tri prediktorske varijable Backward Conditional metodom u trećem, finalnom koraku, kao jedini značajni prediktor za maligne tumore izdvaja IntDen ($p < 0,001$). Jedinično povećanje vrednosti IOD povećava verovatnoću da je maligni tumor za 14,4% (IP 6,3–23,1%). Promene vrednosti

ličnog IOD uslovljavaju 18,3% promena odnosa verovatnoća za biološko ponašanje tumora ($R^2=0,183$).

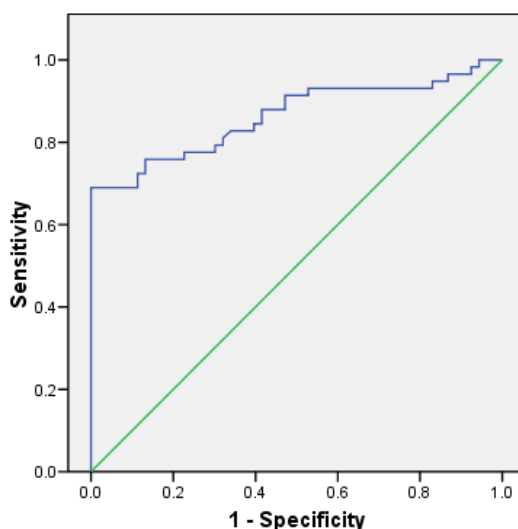
Univarijantnom logističkom regresionom analizom, utvrđeno je da na verovatnoću da je reč o malignom tumoru statistički značajno utiče i proliferativni indeks ($p<0,001$). Povećanje proliferativnog indeksa za jednu mernu jedinicu povećava verovatnoću za maligni tumor za 26,6% (IP od 14,7 do 39,8%).

Tabela 20. Vrednosti OR za procenu uticaja proliferativnog indeksa na verovatnoću za malignim tumorom, rezultati univarijantne logističke regresione analize

	OR	95,0% IP		p
		Donja	Gornja	
Proliferativni indeks	1,266	1,147	1,398	*** 0,0000

*** – $p<0,001$

5.3.8 Procena klasifikacionih karakteristika proliferativnog indeksa na osnovu ROC analize



Grafikon 15. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika proliferativnog indeksa za biološko ponašanje tumora

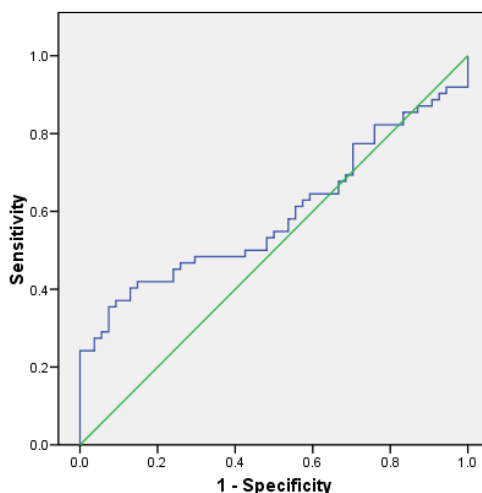
Specifičnost počinje značajnije da opada kada senzitivnost pređe 68,97%. Površina ispod krive (area under the curve – AUC) iznosi 0,863 sa standardnom greškom procene od 0,036, tako da je statistička značajnost $p<0,001$, a 95% interval poverenja (0,792 do 0,934) ukazuje na veliku pouzdanost u zaključivanju.

Tabela 21. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika proliferativnog indeksa

PI	Senzitivnost	Specifičnost	Senzitivnost + specifičnost
...
9,25	0,7069	0,8868	1,59
9,41	0,6897	0,8868	1,58
9,73	0,6897	0,9057	1,60
10,39	0,6897	0,9245	1,61
11,39	0,6897	0,9434	1,63
12,50	0,6897	0,9811	1,67
13,34	0,6897	1,0000	1,69
13,69	0,6724	1,0000	1,67
14,05	0,6552	1,0000	1,66
14,75	0,6379	1,0000	1,64
15,31	0,6207	1,0000	1,62
16,06	0,6034	1,0000	1,60
...

ROC analiza definiše senzitivnost i specifičnost za svaku vrednost proliferativnog indeksa. Kada se kao cut-off izabere vrednost proliferativnog indeksa od 13,43 zbir senzitivnosti i specifičnosti je najveći, odnosno senzitivnost metode tada iznosi 68,97%, a specifičnost je 100,00%.

5.3.9 Procena klasifikacionih karakteristika površine jedra na osnovu ROC analize



Grafikon 16. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika vrednosti površine jedra za biološko ponašanje tumora

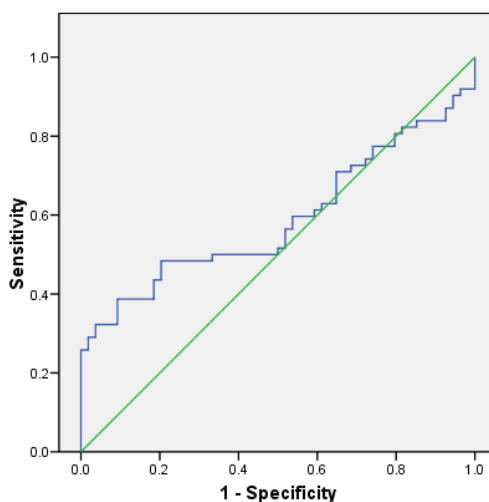
Specifičnost počinje značajnije da opada već kada senzitivnost pređe 35,48%. Površina ispod krive (AUC) iznosi 0,591 sa standardnom greškom procene od 0,090, tako da nema statističke značajnosti, a 95% interval poverenja (0,487 do 0,696) ukazuje na nedovoljnu pouzdanost u zaključivanju.

Tabela 22. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika površine jedra

Area	Senzitivnost	Specifičnost	Senzitivnost + specifičnost
...
52,27	0,3871	0,8704	1,26
52,78	0,3710	0,8704	1,24
53,33	0,3710	0,8889	1,26
53,56	0,3710	0,9074	1,28
54,33	0,3548	0,9074	1,26
55,96	0,3548	0,9259	1,28
56,95	0,3387	0,9259	1,26
57,09	0,3226	0,9259	1,25
57,36	0,3065	0,9259	1,23
58,02	0,2903	0,9259	1,22
58,44	0,2903	0,9444	1,23
...

ROC analiza definiše senzitivnost i specifičnost za svaku vrednost Area. Kada se kao cut-off izabere vrednost Area od 55,96 zbir senzitivnosti i specifičnosti je najveći, tj. senzitivnost metode tada iznosi svega 35,48%, a specifičnost je 92,59%.

5.3.10 Procena klasifikacionih karakteristika obima jedra na osnovu ROC analize



Grafikon 17. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika obima jedra za biološko ponašanje tumora

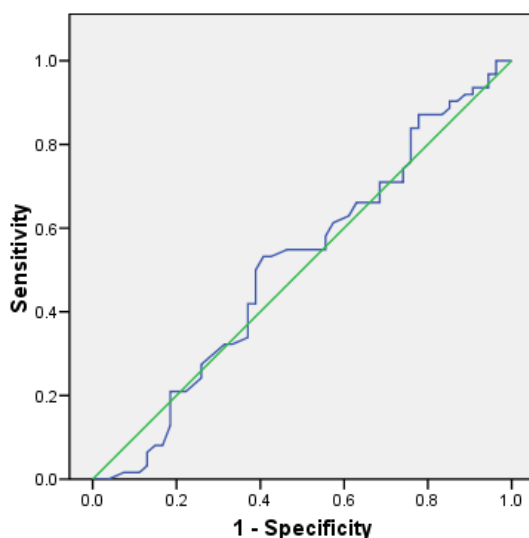
Specifičnost značajnije da opada već kada senzitivnost pređe 32,26%. Površina ispod krive (AUC) iznosi 0,590, standardna grešku procene od 0,095, bez statističke značajnosti, i 95% interval poverenja (0,485 do 0,695) ukazuju na nedovoljnu pouzdanost u zaključivanju.

Tabela 23. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika obima jedra

Perim	Senzitivnost	Specifičnost	Senzitivnost + specifičnost
...
28,51	0,3548	0,9074	1,26
28,67	0,3387	0,9074	1,25
28,71	0,3226	0,9074	1,23
28,83	0,3226	0,9259	1,25
28,96	0,3226	0,9444	1,27
29,04	0,3226	0,9630	1,29
29,13	0,3065	0,9630	1,27
29,31	0,2903	0,9630	1,25
29,56	0,2903	0,9815	1,27
29,68	0,2742	0,9815	1,26
29,74	0,2581	0,9815	1,24
...

ROC analiza definiše senzitivnost i specifičnost za svaku vrednost perimetra. Kada se kao cut-off izabere vrednost perimetra od 29,04, za koju je najveći zbir senzitivnosti i specifičnosti je, senzitivnost metode tada iznosi svega 32,26%, a specifičnost je 96,30%.

5.3.11 Procena klasifikacionih karakteristika cirkularnosti na osnovu ROC analize



Grafikon 18. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika cirkularnosti jedra za biološko ponašanje tumora

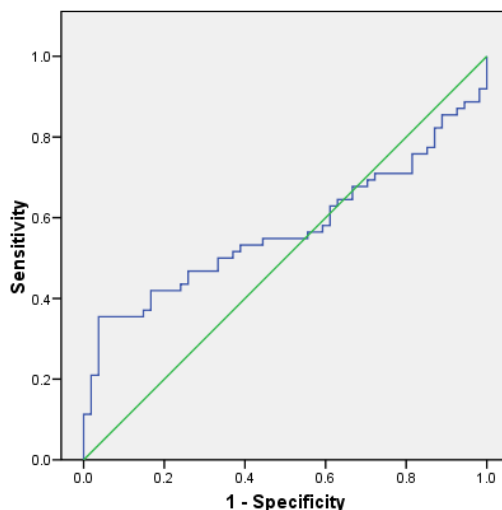
Specifičnost značajnije počinje da opada kada senzitivnost pređe 53,23%. Površina ispod krive (AUC) je svega 0,511, standardna greška procene 0,055 (statistički bez značaja) i 95% interval poverenja (0,404 do 0,619) ukazuju na nedovoljnu pouzdanost u zaključivanju.

Tabela 24. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika cirkularnosti jedra

Circ	Senzitivnost	Specifičnost	Senzitivnost + specifičnost
...
0,87	0,5484	0,4444	0,99
0,87	0,5484	0,4815	1,03
0,87	0,5484	0,5185	1,07
0,87	0,5484	0,5370	1,09
0,87	0,5323	0,5741	1,11
0,88	0,5323	0,5926	1,12
0,88	0,5000	0,6111	1,11
0,88	0,4677	0,6111	1,08
0,88	0,4355	0,6111	1,05
0,88	0,4194	0,6111	1,03
0,88	0,4194	0,6296	1,05
...

ROC analiza definiše senzitivnost i specifičnost za svaku vrednost cirkularnosti. Kada se kao cut-off izabere vrednost Circ od 0,88, za koju je najveći zbir senzitivnosti i specifičnosti, senzitivnost metode tada iznosi 53,23%, a specifičnost je 59,26%.

5.3.12 Procena klasifikacionih karakteristika Feretovog dijametra na osnovu ROC analize



Grafikon 19. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika Feretovog dijametra za biološko ponašanje tumora

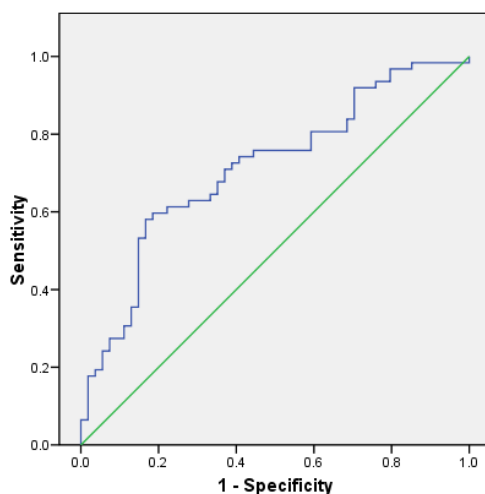
Specifičnost značajnije da opada kada senzitivnost pređe 64,52%. Površina ispod krive (AUC) je 0,571, standardna greška procene 0,054 (statistički bez značaja), 95% interval poverenja (0,465 do 0,677), te daje nedovoljnu pouzdanost u zaključivanju.

Tabela 25. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika Feret

Feret	Senzitivnost	Specifičnost	Senzitivnost + specifičnost
...
8,90	0,6774	0,3148	0,99
8,91	0,6774	0,3333	1,01
8,92	0,6613	0,3333	0,99
8,94	0,6452	0,3333	0,98
8,98	0,6452	0,3519	1,00
9,02	0,6452	0,3704	1,02
9,03	0,6290	0,3704	1,00
9,04	0,6290	0,3889	1,02
9,11	0,6129	0,3889	1,00
9,17	0,5968	0,3889	0,99
9,21	0,5806	0,3889	0,97
...

ROC analiza definiše senzitivnost i specifičnost za svaku vrednost Feret. Kada se kao cut-off izabere vrednost Feret od 9,02, za koju je maksimalan zbir senzitivnosti i specifičnosti, senzitivnost metode iznosi svega 64,52%, a specifičnost svega 37,04%.

5.3.13 Procena klasifikacionih karakteristika integrisane optičke gustine na osnovu ROC analize



Grafikon 20. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika integrisane optičke gustine jedra za biološko ponašanje tumora

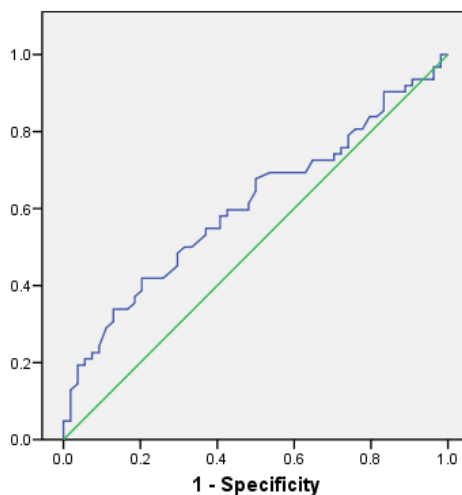
Specifičnost počinje značajnije da opada kada senzitivnost pređe 59,68%. Površina ispod krive (AUC) iznosi 0,713, standardna greška procene od 0,048, statistička značajnost je $p < 0,001$, a 95% interval poverenja (0,619 do 0,807) što ukazuje na relativnu pouzdanost u zaključivanju.

Tabela 26. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika integrisane optičke gustine jedra

IntDen	Senzitivnost	Specifičnost	Senzitivnost + specifičnost
...
14,29	0,6129	0,7407	1,35
14,35	0,6129	0,7593	1,37
14,41	0,6129	0,7778	1,39
14,55	0,5968	0,7778	1,37
14,82	0,5968	0,7963	1,39
14,97	0,5968	0,8148	1,41
15,08	0,5806	0,8148	1,40
15,34	0,5806	0,8333	1,41
15,55	0,5645	0,8333	1,40
15,86	0,5484	0,8333	1,38
16,22	0,5323	0,8333	1,37
...

ROC analiza definiše senzitivnost i specifičnost za svaku vrednost integrisane optičke gustine. Kada se kao cut-off izabere vrednost integrisane optičke gustine od 14,97, za koju je maksimalan zbir senzitivnosti i specifičnosti, senzitivnost metode iznosi 59,68%, a specifičnost 81,48%.

5.3.14 Procena klasifikacionih karakteristika zaobljenosti na osnovu ROC analize



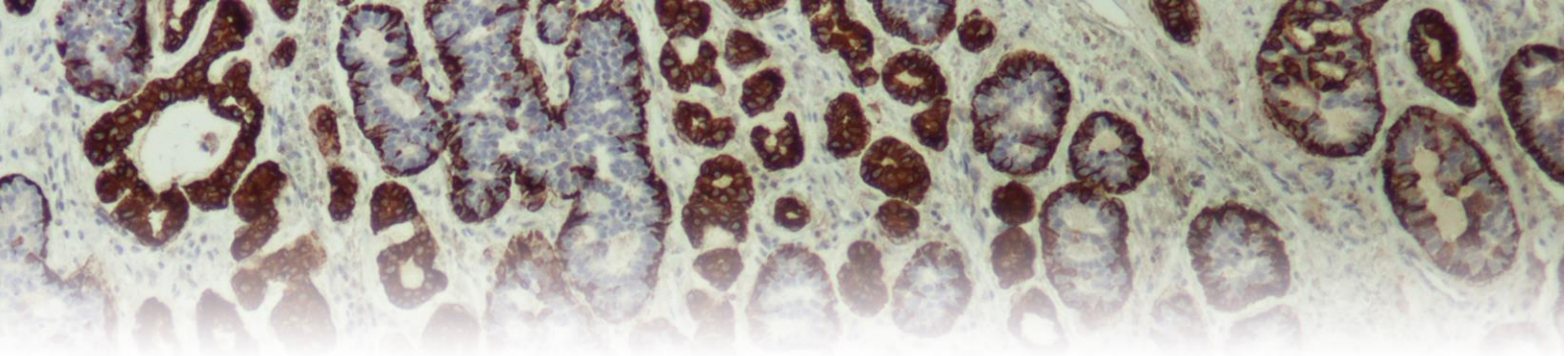
Grafikon 21. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika zaobljenosti jedra za biološko ponašanje tumora

Specifičnost počinje značajnije da opada već kada senzitivnost pređe 41,94%. Površina ispod krive (AUC) iznosi 0,607, standardna greška procene od 0,048, statistička značajnost je $p < 0,05$, a 95% interval poverenja (0,504 do 0,709), što ukazuje na malu pouzdanost u zaključivanju.

Tabela 27. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika zaobljenosti

Round	Senzitivnost	Specifičnost	Senzitivnost + specifičnost
...
0,74	0,4839	0,7037	1,19
0,74	0,4677	0,7037	1,17
0,74	0,4516	0,7037	1,16
0,74	0,4194	0,7407	1,16
0,75	0,4194	0,7593	1,18
0,75	0,4194	0,7963	1,22
0,75	0,4032	0,7963	1,20
0,75	0,3871	0,7963	1,18
0,75	0,3710	0,8148	1,19
0,75	0,3548	0,8148	1,17
0,76	0,3387	0,8333	1,17
...

ROC analiza definiše senzitivnost i specifičnost za svaku vrednost zaobljenosti jedra. Kada se kao cut-off izabere vrednost zaobljenost od 0,75, za koju je maksimalan zbir senzitivnosti i specifičnosti, senzitivnost metode iznosi svega 41,94%, a specifičnost 79,63%.



6. DISKUSIJA

Tumori pljuvačnih žlezda predstavljaju veoma heterogenu grupu neoplazmi, koje su izgrađene od različitih masa tumorskih ćelija i stromom promjenljivih karakteristika. Epitelna komponenta tumora često pokazuje znake metaplazije, degeneracije i nekroze, a u stromi su prisutni znaci hronične i akutne inflamacije, kao i fibroze, što u mnogome komplikuje dijagnostiku ove grupe tumora. Takođe, treba uvek imati na umu da se u pljuvačnim žlezdama, kao i u drugim organima mogu naći metastatski depoziti tumora drugih lokalizacija. Najčešće se radi o primarnim malignim tumorima kože glave i vrata. Heterogenost tumora, naročito karcinoma pljuvačnih žlezda, je dobro poznat problem. Obično, područje sa najvećom proliferativnom aktivnosti i određuje biološko ponašanje tumora, pa se i iz tog razloga ovo područje i uzima za dodatna ispitivanja i dalju analizu u diferencijalnoj dijagnostici (imunohistohemija, in situ hibridizacija, morfometrija,...).¹²² Nedostaci ovog načina ispitivanja predstavljaju veću mogućnost greške zbog inflamacije i nekroze, koje mogu da maskiraju sliku i daju lažno pozitivne ili negativne rezultate. Istovremeno, može doći do otpadanja tkiva, pa se reakcija mora ponoviti, što je finansijski neisplativo. U slučaju komparacije rezultata sa drugim studijama iz drugih centara, mora se voditi strogo računa o uveličanjima pod kojima se posmatra, kao i o površini vidnog polja pod najvećim povećanjem.

6.1 Imunohistohemija

Do pojavljivanja trenutno važeće klasifikacije Svetke Zdravstvene Organizacije (*eng. WHO*), 2005. godine, prikazano u Tabeli 1, kriterijumi u diferencijalnoj dijagnozi su se dosta menjali.⁶³ Tada su uvedeni entiteti metastazirajući pleomorfni adenom, sijaloblastom, svetloćelijski karcinom, karcinom krupnih (velikih ćelija; *eng. large cell carcinoma*) i limfoepitelni karcinom. Tokom poslednje decenije, dijagnostički kriterijumi su se dosta menjali, a tendencija i dalje postoji. Velika heterogenost tumora, preklapanja velikog broja

karakteristika, naročito tipa rasta, različitih tumora, predstavljaju veliki dijagnostički izazov za patologe. U tom pogledu, a u poslednje vreme, neretki su slučajevi menjanja dijagnoze, promene naziva benignih u maligne i obratno.¹²³ Veliki broj slučajeva je sada svrstano u pleomorfne adenome, upravo zbog velike heterogenosti ovog tumora. Ovo sugeriše na činjenicu da bi dijagnostikom tumora pljuvačnih žlezda trebalo da se bave visokospecijalizovane ustanove sa adekvatnim pomoćnim dijagnostičkim metodama. Danas, u dijagnostičkom izveštaju, patolog se izjašnjava o tipu tumora i varijanti, histološkom i nuklearnom gradusu, ako je reč o malignom tumoru, prisustvu invazije i stanju resekcionih ivica. Takođe, dijagnoza je upotpunjena imunohistochemijskim profilom tumorskih ćelija, kao i proliferativnim indeksom, iako to nema kliničku značajnost.⁵⁴

Histološki gledano, postoji dvostruka struktura u organizaciji pljuvačne žlezde, i to luminalni deo (acinusi i duktalni epitel) i abluminalni deo (mioepitelne i bazalne ćelije). Sekretorni acinusi i interkalatni kanali su obloženi mioepitelnim ćelijama, dok su strijatni i ekskretorni kanali obloženi bazalnim ćelijama. Primenom imunohistochemije mogu se detektovati luminalne i abluminalne strukture, što ima veoma veliku primenu u razjašnjavanju kompleksne arhitekture tumora pljuvačnih žlezda i njihovu diferencijalnu dijagnozu.

Luminalne ćelije mogu da se detektuju primenom CEA i EMA, s'obzirom da ove ćelije pokazuju imunoreaktivnost sa datim antitelima. Sa druge strane abluminalne ćelije pokazuju ekspresiju CK14, vimentina i SMA, a u novije vreme sve veću primenu ima p63. p63 je postao veoma koristan marker kako za mioepitelne ćelije, tako i za bazalne ćelije. Treba imati u vidu da se p63 primenjuje i u diferencijalnoj dijagnostici planocelularnog karcinoma. Nuklearna ekspresija je prisutna i u zdravim i modifikovanim (neoplastičnim) varijantama. Langman je 2011. godine u studiji sa svojim saradnicima pokazao značaj primene WT1 antitela u dijagnostici neoplastičnih mioepitelnih ćelija.¹¹⁹ Marker je negativan u zdravom tkivu. Takođe, primenom GFAP, markiraju se neoplastične mioepitelne ćelije, što je i našlo ogromnu primenu u dijagnostici mioepitelioma i pleomorfno adenoma. Shah je u svojoj studiji dokazao veliki značaj ovog markera, s'obzirom da je pokazao apsolutnu pozitivnost GFAP u pleomorfno adenomu.¹²⁴

Mukoepidermoidni karcinom je maligni epitelni tumor pljuvačnih žlezda izgrađen od mucinoznih, epidermoidnih, intermedijarnih, cilindričnih, svetlih i onkocitnih ćelija. Imunohistochemijskom analizom tumorske ćelije su pozitivne na citokeratine velike

molekularne težine, kao što se CK5/6, CK14, zatim na EMA, CEA i p63, dok su negativne na S100 i α SMA. Ponekada se može detektovati fokalna pozitivnost na GFAP i vimentin. U skladu sa već objavljenim rezultatima iz prethodnih velikih studija, CK14 je marker visoke senzitivnosti u ovom tipu karcinoma.¹²⁵ Pokazano je da ima veliku ekspresiju u intermedijarnim i epidermoidnim ćelijama. p63 se pokazao kao veoma koristan marker u diferencijalnoj dijagnostici. Fonseca i saradnici su upoređivali mukoepidermoidni karcinom niskog gradusa sa retencionim cistama i papilarnim cistadenomima, što i predstavlja vrlo često dijagnostičku dilemu. Pokazali su da je ekspresija p63 u cistama bila u bazalnim slojevima, dok je u niskostepenom mukoepidermoidnom karcinomu bila difuzna u suprabazalnom sloju epidermoidnog dela tumorskih plaža.¹²⁶ Primenom p63 može se onkocitna varijanta tumora razlikovati od onkocitoma i onkocitnog karcinoma. Naime, kod mukoepidermoidnog karcinoma više od 50% tumorskih ćelija je difuzno pozitivno, za razliku od onkocitnih tumora gde je pozitivnost markera prisutna isključivo na periferiji plaža.¹²⁷ Vimentin je pokazao pozitivnost u stromi tumora, što nema dijagnostičkog značaja, takođe kao ni SMA, koji je obeležio glatke mišiće krvnih sudova i miofibroblaste u dezmodoplastičnom stromalnom tkivu oko tumorskih plaža. EMA je bio visoko pozitivan u većini slučajeva, dok je CEA naglasio mucinozne ćelije. Visoka pozitivnost CEA i EMA je u skladu sa dostupnim literaturnim podacima.⁶⁹ Već je rečeno da su tumorske ćelije ovog tipa karcinoma negativane na S100, ali su Lanzel i saradnici u svojoj studiji pokazali veliku primenjivost ovog proteina u detekciji perineuralne invazije. U velikom broju slučajeva na standardnim H&E preparatima mali nervi se ne mogu sa velikom sigurnošću detektovati, a i postoji velika mogućnost zamene sa delovima strome. Upravo primenom S100 se nervne strukture dokazuju, a samim tim i prisustvo ili odsustvo perineuralne invazije, koja je veoma bitan prognostički faktor.¹²⁸ HER-2 je bio pozitivan u 1 slučaju, i to u karcinomima visokog gradusa sa udaljenim metastazama. U diferencijalnoj dijagnozi mukoepidermoidnog karcinoma treba isključiti onkocitne tumore, zapaljenske bolesti (LESA), kao i metastatsku bolest (planocelularni karcinom, melanom). Primeri diferencijalno dijagnostičkih dilema.

Adenoidni cistični karcinom je bifazični maligni epitelni tumor pljuvačnih žlezda. Već je rečeno da postoje tri forme rasta ovog tumora, a to su kribriiformni, tubularni i solidni. Sama heterogenost tumora je veliki diferencijalno dijagnostički problem, naročito kribriiformni tip rasta, koji se viđa i u drugim neoplazmama pljuvačnih žlezda. U tom pogledu, u praksi patologa, veoma često se nailazi na dilemu da li je reč o adenoidno cističnom karcinomu ili polimorfnom adenokarcinomu niskog gradusa, i to kada je kribriiformni tip rasta dominantan

u tumoru. Primenom već datog panela antitela može se diferencirati dijagnoza ovih malignih tumora, što je od velikog značaja, s'obzirom da je reč o tumorima sa jako različitim biološkim ponašanjem. Za razliku od polimorfnog adenokarcinoma niskog gradusa, adenoidni cistični karcinom je znatno agresivniji sa velikim metastatskim potencijalom. Kribriformne strukture adenoidno cističnog karcinoma izgrađene su od luminalnih ćelija koje su pozitivne na CK14, i ćelija koje imaju svetlu citoplazmu i homogeni hromatin. Reč je o mioepitelnim ćelijama koje se nalaze na periferiji tumorskih plaža i koje oblažu pseudocistične strukture. Te ćelije su negativne na CK14, ali pokazuju ekspresiju vimentina i α SMA, što je i pokazano u drugim studijama.^{129,130,131} Kribriformne strukture polimorfnog adenokarcinoma niskog gradusa su izgrađene od jednog ćelijskog tipa, i difuzno su pozitivne na CK14. Araújo je u svojoj studiji pokazao da je reč o tumoru izgrađenom od luminalnih ćelija koje su porekla sa spoja acinusa i interkalatnih kanala, gde i ne postoje mioepitelne ćelije.¹³² Regezi je sugerisao na upotrebu S100, kao diferencijalno dijagnostičkog markera ova dva tipa tumora.¹³³ Naime, adenoidni cistični karcinom pokazuje jako slabu pozitivnost na protein, dok polimorfni adenokarcinom pokazuje izraženu ekspresiju. Kasnijih godina je ovo stanovište opovrgnuto, jer ekspresija antitela može varirati i dovesti do pogrešne dijagnoze. EMA i CEA su pozitivni u luminalnim ćelijama oba tumora, što je i u skladu sa podacima iz literature.^{34,134} Treba još napomenuti da tubularne strukture, prisutne i kod jednog i drugog tumora, mogu dovesti do pogrešnog tumačenja. Tubuli kod adenoidno cističnog karcinoma su u najvećem broju slučajeva obloženi dvorednim epitelom, za razliku od polimorfnog adenokarcinoma, gde se viđa jedan red kubičnog epitela. Takođe, atipija jedara je karakteristika adenoidno cističnog karcinoma.

Velika dijagnostička dilema može da nastane u diferencijaciji pleomorfnog adenoma i polimorfnog adenokarcinoma niskog gradusa. To je naročiti problem kada se govori o malim, incizionim biopsijama. U tom slučaju može se stvoriti lažna slika o infiltrativnom rastu, ako je reč o tumorima malih pljuvačnih žlezda, gde pleomorfni adenom najčešće ne poseduje kapsulu, a može imati i fokalne ekstenzije u susedne žlezde i prezentovati se kao maligna neoplazma. Oba tipa tumora se sastoje od relativno uniformnih ćelija koje karakteriše odsustvo atipije. Miksohondroidna područja su patognomoničan nalaz za pleomorfni adenom, za razliku od polimorfnog adenokarcinoma niskog gradusa, gde hondroidna područja nisu nikada prisutna. Takođe, adenomi malih pljuvačnih žlezda se karakterišu povećanom celularnošću i malom količinom ili potpunim odsustvom miksoidne ili hondroidne strome.⁴² Veoma bitan parametar o malignitetu, kada je reč o polimorfnom adenokarcinomu niskog stepena, jeste perineuralna invazija, o kojoj se ne može izjasniti na

malom biopsijskom uzorku. U ovakvim slučajevima neophodna je primena imunohistohemije. U prvom redu se primenjuju markeri mioepitelne diferencijacije i GFAP. Nakazato i saradnici su još 1982. godine ukazali na ukrštenu ekspresiju GFAP, vimentina i citokeratina u diferencijaciji pleomorfog adenoma.¹³⁵ GFAP pokazuje veoma izraženu citoplazmatsku ekspresiju u duktalnim epitelnim i mioepitelnim ćelijama adenoma, dok je zanemarljivo mala pozitivnost registrovana u ćelijama polimorfog adenokarcinoma niskog gradusa.¹³⁶ Naši rezultati, pokazuju potpuno odsustvo pozitivne reakcije GFAP kod ovog tipa karcinoma, a apsolutnu pozitivnost kod pleomorfog adenoma, što je u skladu sa velikim studijama koje su se bavile diferencijalnom dijagnozom ova dva entiteta.^{137,138} Takođe, veoma značajan nalaz u diferencijaciji jeste i ekspresija α SMA u pleomorfnom adenomu i adenoidno cističnom karcinomu, koja je odsutna u polimorfom adenokarcinomu niskog gradusa.¹³⁹ Kao što je već i rečeno, za dokazivanje neoplastičnih (modifikovanih) mioepitelnih ćelija, u poslednje vreme, koristi se WT1. Leader i Langman su u svojim studijama sugerisali na značaj ovog markera. WT1 je pokazao apsolutnu citoplazmatsku pozitivnost u abluminalnim ćelijama sa mioepitelnom diferencijacijom pleomorfog adenoma. Te ćelije su pokazale i ekspresiju p63. Sličan nalaz smo imali i kod mioepitelioma, što se i poklapa sa podacima iz literature. Kod adenoma bazalnih ćelija intezivna citoplazmatska ekspresija je prisutna na periferiji tumorskih plaža, takođe su ove ćelije pozitivne na p63. Slaba pozitivnost je fokalno uočena i u centru plaža. Analizom ekspresije WT1 u Vartinovom tumoru uočili smo slabu, fokalnu pozitivnost u apikalnim delovima luminalnih ćelija. Za razliku od benignih tumora, gde je ekspresija bila prisutna u visokom procentu, kod malignih tumora pljuvačnih žlezda ekspresija WT1 je bila znatno slabija. U mukoepidermoidnom karcinomu nalaz je bio apsolutno negativan. Kod polimorfog adenokarcinoma niskog gradusa intezitet ekspresija je varirala u zavisnosti od varijante ćelijskog aranžmana. Intraluminalna materija je intezivno obojena. Primećena je pozitivnost u jedrima bazaloidnih ćelija adenoidno cističnog karcinoma.^{119,140} U skladu sa nalazima objavljenih studija, i naši rezultati ukazuju na značaj imunohistohemijskog dokazivanja mioepitelnih ćelija u dijagnostici polimorfog adenokarcinoma niskog gradusa.

Karcinom pljuvačnih kanala je takođe još jedan od entiteta koji mogu da daju diferencijalno dijagnostičke dileme imajući u vidu patohistološku prezentaciju tumora. Reč je o veoma agresivnom malignom epitelnom tumoru koji vodi poreklo od intralobularnih i interlobularnih kanala. U sklopu agresivnosti ovog tumora, pored lokalne infiltracije, jeste i veoma visoki metastatski potencijal. Imunohistohemijskom analizom tumorske ćelije su

pozitivne na CEA, EMA, p53, HER-2, a negativne na mioepitelne markere p63, α SMA i CK14, kao i na vimentin i WT1, što je od velikog značaja u diferentovanju ovog tipa karcinoma od mukoepidermoidnog.¹⁴¹ Na osnovu naših rezultata, a u skladu sa podacima iz dostupne literature, ekspresija HER-2 i p53, ne samo da ima dijagnostički, već i veliki prognostički značaj. Ekspresija ova dva antitela je udružena sa velikom proliferativnom aktivnošću tumora, i neretko je prisutna kod već postojeće metastatske bolesti.^{75,142} Imunohistohemijskom analizom utvrdili smo veoma visoki Ki67 proliferativni indeks ovog tumora. Giannoni je u studiji pokazao da je proliferativni indeks benignih tumora malih pljuvačnih žlezda, takođe, veoma visok i iznosi 12%.¹⁴³ Nasuprot ovom podatku, Norgard je prikazao da je proliferativni indeks preko 4% udružen sa većim procentom recidiva adenoidno cističnog karcinoma.¹⁴⁴ Jaehne je u svojoj studiji pokazao da je proliferativni indeks kod karcinoma pljuvačnih kanala iznosio oko 35%.⁷⁵ Veoma visoka vrednost Ki67 proliferativnog indeksa, ekspresija HER-2 i p53, ide u prilog agresivnosti ovog tipa karcinoma.^{145,146}

Mioepitelni tumori predstavljaju veliki dijagnostički izazov za patologe. Reč je o tumorima koji su prepoznati tek sredinom dvadesetog veka, a uvršteni u klasifikaciju 1991. godine. Tumor se karakteriše visokim stepenom pleomorfizma, i patohistološka prezentacija može biti veoma različita. Tumorske mioepitelne ćelije mogu biti vretenastog, epiteloidnog, stelatnog, svetloćelijskog, plazmocitoidnog izgleda. Stroma tumora može biti hijalinizovana ili mukoidna, ali nikada miksohondroidna kao u pleomorfnom adenomu. Ova grupa tumor, i benigni i maligni, su veoma često loše prepoznati, i dijagnostikovani kao pleomorfni adenom, maligni mešoviti tumor, karcinom iz pleomorfnog adenoma ili kao neka od varijanti tumora mezenhimnog porekla. Imunohistohemijskom analizom tumorske ćelije su pozitivne na vimentin, CK-AE1/AE3, S-100 i calponin, umereno do slabo pozitivne na α SMA, GFAP, CK14 i p63, a negativne su na p53, CEA, EMA i HER-2.¹⁴¹ U diferencijaciji benignih od malignih mioepitelnih tumora imunohistohemija nije od značaja. Primenom markera dokazujemo isključivo poreklo ovih neoplazmi. Osnovni postupak jeste detaljna mikroskopska analiza tumora. Posmatra se margina, koja je infiltrativna kod mioepitelnog karcinoma, dok je mioepiteliom jasno ograničen. Polja nekroze su prisutna isključivo u mioepitelnom karcinomu. Treba voditi računa o limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, koja može biti prisutna u karcinomu. Takođe, veoma bitni su i klinički podaci o postojanju metastaza. Sledeći korak jeste računanje proliferativnog indeksa, koji je znatno veći kod maligne varijante. U oko 40% mioepitelni tumori nastaju *de novo*, dok u ostatku nastaju na

terenu pleomorfnog adenoma. Za postavljanje dijagnoze mioepitelnog tumora, imperativ je odsustvo tubularnih formacija. Pojedine varijante mogu da formiraju pseudocistične ili pseudotubularne formacije, kao i prisustvo skvamozne metaplazije, pa da daju sliku adenoidno cističnog karcinoma, polimorfnog adenokarcinoma niskog gradusa ili mukoepidermoidnog karcinoma. U takvim slučajevima imunohistohemija i predloženi panel antitela je neophodan postupak u diferencijaciji. Vretenastoćelijska varijanta tumora može da zada dijagnostičku dilemu u odnosu na miome, lejomiosarkome ili fibrosarkome, ali primenom citokeratina ova mogućnost se odbacuje.¹⁴⁷ Na osnovu studije Bilal i saradnika, p63 predstavlja jedan od najsuverenijih markera u diferencijaciji mioepitelних ćelija. Pokazali su da je antitelo pokazalo apsolutnu ekspresiju u svim benignim tumorima sa ovim tipom diferencijacije. U mioepiteliomima bila je jaka ekspresija kod vretenastoćelijskog tipa, dok je u ostalim formama ekspresija bila umerenija. U Warthin tumoru zapažena je intezivna reakcija u bazalnom sloju, dok je ekspresija bila odsutna u luminalnim, cilindričnim ćelijama. Kod adenoma bazalnih ćelija izražena jedarna ekspresija je prisutna u perifernim, bazalnim ćelijama, koje su u palisadnom rasporedu.^{148,149} Eventualna ekspresija p53, koja je kontradiktorna, u dostupnoj literaturi ukazuje na moguću malignu alteraciju u benignim tumorima pljuvačnih žlezda.¹⁵⁰

Adenom bazalnih ćelija je uveden u klasifikaciju Svetske Zdravstvene Organizacije 1991. godine. Do tada je sa kanalikuliranim adenomom označavan kao ne-pleomorfni adenom ili monomorfni adenom. Na osnovu histološke prezentacije i načinu rasta i rasporeda neoplastičnih ćelija podeljen u više varijanti, solidni, koji je i najčešći, tubularni, trabekularni i membranozni.³¹ Uglavnom se u tumoru viđa više varijanti načina rasta, ali je jedna dominantna, na osnovu koje se dalje vrši morfološka subklasifikacija adenoma bazalnih ćelija. Svi imaju fibroznu stromu, ali bez miksohondroidnih područja, koja se viđaju u pleomorfnom adenomu. Cistična degeneracija, skvamozna metaplazija, keratinizacija i kribriformni rast su povećali mogućnost ovom tumoru za dijagnostičkom greškom. Generalno, tumorske plaže su izgrađene od tamnih, plavih ćelija na periferiji, koje često imaju palisadni aranžman. U centralnim delovima su prisutne nešto krupnije ćelije, svetlije citoplazme. Kod svih varijanti postoji mioepitelna diferencijacija, koja na standardnim H&E preparatima nije očigledna, ali imunohistohemijskom analizom je dokazana.¹⁵¹ U diferencijalnu dijagnozu adenoma bazalnih ćelija se uključuje polimorfni adenokarcinom niskog gradusa i pleomorfni adenom, kao i neke od varijanti mioepitelioma. Imunohistohemijskom analizom naših rezultata, a u skladu sa podacima iz literature, pokazali

smo da ćelije na periferiji tumorskih plaža eksprimiraju p63, vimentin, SMA i S100, dok su ćelije u unutrašnjosti ili luminalne, ako govorimo o tubularnoj varijanti, pozitivne na CK14, CEA i S100. Analizirajući ekspresiju markera dolazimo do zaključka da je adenom bazalnih ćelija, histogenetski, porekla ćelija interkalatnih kanala.¹⁵²

Vartinov tumor predstavlja veoma kontraverzan benigni entitet u pogledu morfologije i još uvek u potpunosti nejasne etiologije. Histološka prezentacija tumora je poprilično jedinstvena i ne tako veliki diferencijalno dijagnostički problem. Parenhimatoznu komponentu tumora gradi dvoredni epitel, unutrašnji, onkocitni i spoljašnji bazaloidni sloj ćelija, sa formiranjem cističnih, žlezdanih i papilarnih struktura, koje su praćene gustom limfoidnom stromom. Neki autori smatraju da tumor vodi poreklo od zaostalih epitelnih ćelija intraparotidnog limfnog nodusa i to heterotopične pljuvačne žlezde.¹⁵³ Sa druge strane molekularna istraživanja ukazuju da je epitelna komponenta tumora poliklonska, bez gubitka klonalnih alela, što govori da se ne radi o pravoj neoplazmi.¹⁵⁴ Najšire zastupljena hipoteza jeste da tumor vodi poreklo od zaostalih pljuvačnih kanala u limfnom nodusu nakon začetka. Ova hipoteza je podržana na osnovu relativno čestog prisustva epitela sa onkocitnom i papilarnom prezentacijom u intra- i periparotidnom limfnom nodusu. Opisani epitel je gotovo identičan sa epitelnom komponentom tumora. Warthin tumor se gotovo uvek viđa u parotidnoj pljuvačnoj žlezdi. Unutrašnji, luminalni red ćelija pokazuje veoma slične karakteristike sa luminalnim ćelijama strijatnog kanala. Ćelije imaju obilnu, jako eozinofilnu citoplazmu bogatu mitohondrijama. Označene su kao oksifilne ili onkocitne ćelije. Takođe je primećeno da se broj ovih ćelija povećava, normalno, tokom starenja i ta pojava je označena kao onkocitoza ili onkocitna metaplazija.¹⁵⁵ Metaplazija može da se vidi i u samom tumoru, ii to može dovesti do diferencijalno dijagnostičkih dilema. U tim slučajevima treba isključiti mukoepidermoidni karcinom, metastatski karcinom, limfom, kao i različite cistične lezije i zapaljenske bolesti. Imunohistohemijskim metodama smo pokazali da je spoljašnji, bazaloidni sloj ćelija sa mioepitelnom diferencijacijom, što je u skladu sa dosadašnjim nalazima.¹⁵⁶ Te ćelije su pozitivne na SMA, p63 i CK14, fokalno pozitivne na vimentin i S100, dok su luminalne ćelije negativne na ove markere, a pozitivne na CEA. Područja metaplazije pokazuju sličan imunofenotip kao i bazaloidni sloj. Iako ovaj benigni tumor ne predstavlja veliki dijagnostički problem, treba biti obazriv, jer su opisani slučajevi maligne alteracije, i to planocelularnog karcinoma i mukoepidermoidnog karcinoma.^{157,158}

6.2 Proliferacija tumora

Tumori pljuvačnih žlezda su relativno retke neoplazme sa oko 34 različitih tipova. Imajući u vidu njihovu veliku varijabilnost u histološkoj prezentaciji i biološkom ponašanju, tumori ove lokalizacije predstavljaju veliki izazov kako za hirurga, tako i za patologa u pogledu dijagnoze, prognoze i tretmana. Evaluacija mitotskog indeksa, pre svega Ki67 proliferativnog indeksa pokazala se kao veoma bitan parametar u diferencijalnoj dijagnostici, predviđanju biološkog ponašanja i agresivnosti u mnogim tumorima. Našim istraživanjem smo obuhvatili 60 tumora pljuvačnih žlezda, benignih i malignih, analizirali smo proliferacioni indeks i u korelaciji sa ostalim kliničko-patološkim karakteristikama dobili smo značajne rezultate u diferencijalnoj dijagnostici ovih neoplazmi.

Za potrebe našeg istraživanja koristili smo 5% kao graničnu vrednost za Ki67 proliferativni indeks, ali u dostupnoj literaturi postoje studije koje su se vodile višim vrednostima za agresivnost tumora, i to >10%.^{159,160} Naši rezultati se kreću u opsegu od 0,76% do 13% u grupi benignih tumora. Najveću vrednost je pokazao celularni rekurentni pleomorfni adenom mekog nepca. U grupi malignih tumora opseg je bio od 1,18% do 72,30%. Najveću proliferaciju je pokazao adenoidno cistični karcinom, potom karcinom pljuvačnih kanala, dok je najmanju pokazao polimorfni adenokarcinom niskog gradusa. Diferencijalno dijagnostički ovo su veoma značajni i korisni podaci, naročito u slučajevima kada se radi o sličnoj, gotovo preklapajućom histološkom prezentacijom.

Slično rezultatima našeg istraživanja, Shida i saradnici su dobili nešto veće vrednosti Ki67 proliferativnog indeksa u grupi adenoma bazalnih ćelija.¹⁶¹ Sa rezultatima Horii i saradnika se poklapaju naši rezultati, koji ukazuju na najveću proliferativnu aktivnost pleomorfno adenoma u grupi benignih tumora.¹⁶² Sa druge strane, Terada iznosi podatke o proliferaciji u Warthin tumoru oko 3%, što već ne korelira sa našim rezultatima.¹⁶³ Upoređujući ekspresiju p53 i Ki67, Saghravanian i saradnici navode da je od velikog značaja u diferencijaciji polimorfno adenokarcinoma niskog gradusa i adenoidno cističnog karcinoma. U njihovoj studiji 24% jedara tumorskih ćelija je pokazalo ekspresiju Ki67, dok je svega 3,88% u grupi polimorfno adenokarcinoma niskog gradusa. Pokazani rezultati date studije su u korelaciji sa našim rezultatima.¹⁶⁴ U svojoj studiji Hellquist i saradnici su pokazali da je proliferacioni indeks veći od 10% nezavisno parametar u odnosu na agresivnost karcinoma acinusnih ćelija. Do sličnih rezultata su došli i Triantafyllidou i Suzzi sa svojim saradnicima.^{165,166} Nagao je u svojoj studiji pokazao da visok stepen proliferativne

aktivnosti u bolesnika sa mioepitelnim karcinomom korelira sa nepovoljnim tokom bolesti.¹⁶⁷ Na osnovu velike varijabilnosti dobijenih rezultata u našem istraživanju, a i od strane drugih istraživača, po našem mišljenju jedan je od dokaza da niska vrednost proliferativnog indeksa nije uvek strogo povezana sa tumorom niskog gradusa. rezultati našeg istraživanja pokazuju da vrednost Ki67 proliferativnog indeksa varira u zavisnosti od slučaja do slučaja, kao i od histološkog tipa samog tumora. Proliferativni indeks je varirao od 0,76% (kod adenoma bazalnih ćelija) do 72,30% (kod adenoidnog cističnog karcinoma). Svakako smo dokazali da je indeks znatno veći u grupi malignih tumora pljuvačnih žlezda.

Ispitivanje ekspresije p53 i Ki67 je široko zastupljena metoda u utvrđivanju evolucije i prognoze malignih tumora svih lokalizacija. p53 je najčešće identifikovani mutirani gen u malignim neoplazmama, naročito u zastupljen kod karcinoma dojke, želuca, jetre i prostate. Ekspresija p53 je udružena sa negativnom prognozom bolesti, i obično je prisutna kod agresivnih malignih tumora visokog gradusa. Mutacija gena je uočena i kod tumora pljuvačnih žlezda, ali su rezultati još uvek nedovoljni i nepotpuni. Weber je sa svoji saradnicima analizirao ekspresiju p53 u grupi benignih tumora. Pokazali su da ekspresija proteina postoji jedino u grupi pleomorfnog adenoma i mioepitelioma. Svoje rezultate su tumačili kao povećanu sklonost tumora ka malignoj alteraciji.¹⁵⁰ Al-Ani i Al-Azzawi su pokazali u njihovom istraživanju jako malu ekspresiju p53 u pleomorfnom adenomu, ali je zato ekspresija u mukoepidermoidnom karcinomu bila oko 60% i u adenoidno cističnom karcinomu oko 20%.¹⁶⁸ Kada je reč o diferencijalnoj dijagnozi karcinomim pljuvačnih žlezda, p53 nema velikog značaja. U našem istraživanju, povećana ekspresija proteina je prisutna u karcinomu pljuvačnih kanala (4/6). Dobijeni rezultati, koji i jesu u skladu sa podacima iz literature, bili su i očekivani. Reč je o karcinomu visokog gradusa sa velikim metastatskim potencijalom. Analizom ekspresije p53 u mukoepidermoidnom karcinomu, registrovana je pozitivnost u 5 bolesnika, što i nije bilo u skladu sa kliničkim tokom bolesti. U ovom slučaju ekspresija p53 može imati diferencijalno dijagnostički značaj u razdvajanju mukoepidermoidnog karcinoma od drugih lezija, naročito ako su u pitanju male biopsije. U prvom redu se misli pseudoepiteliomatoznu hiperplaziju i nekrotizujuću sijalometaplaziju, gde je ekspresija p53 negativna. Iako je tumor sa dobrom prognozom i terapija se obično završava hirurškom intervencijom, polimorfni adenokarcinom niskog gradusa je pokazao pozitivnost u 50% slučaja (3/6). Isti odnos je nađen i kod adenoidnog cističnog karcinoma (3/6), dok je kod mioepitelnog karcinoma ekspresija bila odsutna. Ekspresija p53 kod pleomorfnog adenoma je bila jako mala, svega 10% (1/10), i to kod rekurentnog adenoma koji

je bio lokalizovan na mekom nepcu. U grupi Vartinovog tumor i adenoma bazalnih ćelija pozitivnost je iznosila 50%, dok je kod mioepitelioma bila odsutna u potpunosti. Dobijeni rezultati ekspresije p53 su u skladu sa drugim studijama.¹⁶⁹ Na osnovu iznetih rezultata, i sa korelacijom rezultata iz literature p53 bi mogao da bude marker diferencijacije benignih od malignih tumora, ali isključivo u kombinaciji sa drugim markerima.

Karcinom pljuvačnih kanala je adenokarcinom visokog gradusa koji pokazuje veliku fenotipsku sličnost i biološko ponašanje kao duktalni karcinom dojke visokog gradusa. Bolesnici sa lokalno uznapredovalom, rekurentnom ili metastatskom bolesti su dosta limitirani u pogledu terapije i generalno podležu bolesti. Ispitivanje gena, različitih markera ćelijskih puteva, hromozomskih aberacija, receptora hormona i faktora rasta su u mnogome pomogli u razumevanju samih tumora, a i za razvoj i napredovanje terapije. Danas se zna da HER2 i receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) igraju centralnu ulogu u patogenezi karcinoma dojke. Međutim, nivoi ekspresije ovih proteina ne mogu sami predvideti odgovore na terapiju. Istovremena imunohistohemijska analiza i ispitivanje amplifikacije gena kod granične ekspresije dokazuju da postoji grupa bolesnika koji pokazuju visoku amplifikaciju i odlični su kandidati za terapiju trastuzumabom (anti-HER2). Ova korelacija je do danas još uvek slabo definisana, kada je reč o karcinomima pljuvačnih žlezda, zbog relativno malog broja testiranih tumora.¹⁴²

Našim istraživanjem smo dokazali da je ekspresija HER-2 udružena sa karcinomima visokog gradusa. Pozitivna ekspresija (3+) je bila prisutna kod tri karcinoma pljuvačnih kanala i jednom mukoepidermoidnom karcinomu. Kod ovih karcinoma bila je prisutna lokalna infiltracija (2/6 karcinoma pljuvačnih kanala), kao i metastaze u regionalnim limfnim nodusima (4/8 mukoepidermoidnih karcinoma, 1/6 karcinoma pljuvačnih kanala), što ukazuje da i sama ekspresija proteina nije uvek udružena sa metastatskom bolesti, kako su i pokazali Williams i Ettl sa svojim saradnicima.^{142,170} Graničnu ekspresiju (2+, equivocal) je pokazalo dva karcinoma pljuvačnih kanala, što bi zahtevalo dodatnu CISH/SISH/FISH analizu. Ostali benigni i maligni tumori pljuvačnih žlezda su bili negativni (0, 1+).

6.3 Morfometrijska analiza

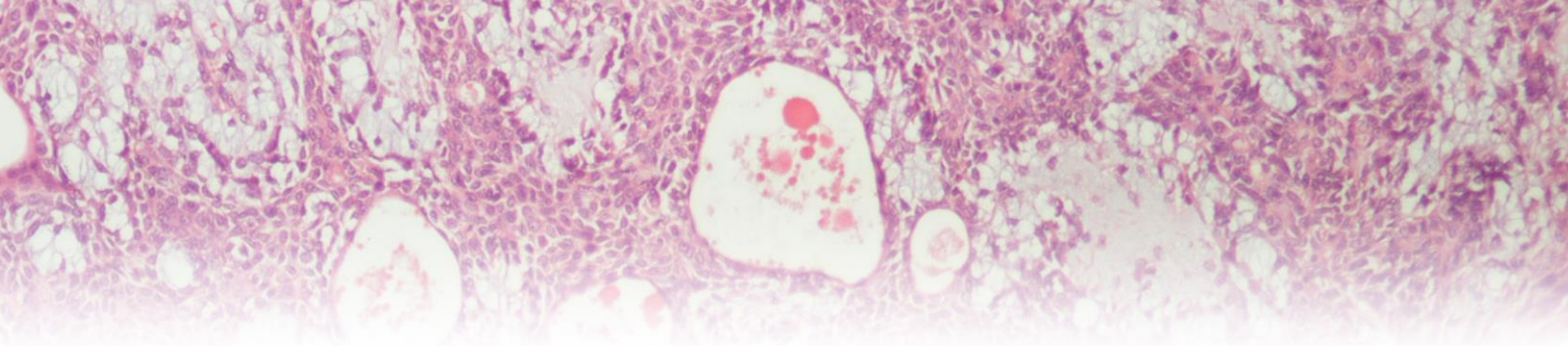
Korišćenjem softverskog paketa „ImageJ” analizirano je šest jedarnih parametara: površina, perimetar, cirkularnost, zaobljenost, Feretov dijametar i integrisana optička gustina 30 benignih i 30 malignih tumora pljuvačnih žlezda. Digitalne fotografije se rađene na prethodno pregledanim preparatima bojenim standardnom hematoksilin-eozin metodom (H&E).

Praćenje jedarnih parametara benignih i malignih tumora vršeno je unutar grupa, kao i između grupa tumora. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) nađena je za jedarne parametre koji se odnose na veličinu jedara (površina i perimetar) i zavisi od prirode i tipa tumora. Najveća je bila u karcinomu pljuvačnih kanala. Feretov dijametar je bio veći u grupi malignih tumora, ali nije nađena statistički značajna razlika. Vrednosti parametara koji se odnose na oblik jedra (cirkularnost i zaobljenost) su minimalno bili veći u grupi malignih tumora, a najveću vrednost je pokazao karcinom pljuvačnih kanala. Vrednosti integrisane optičke gustine statistički značajno zavise od prirode i tipa tumora ($p < 0,05$). Najveću vrednost je pokazao karcinom pljuvačnih kanala.

Primenom multivarijantne logističke regresione analize Integrisana optička gustina se izdvojila kao najbitniji prediktor u diferencijaciji benignih od malignih tumora pljuvačnih žlezda ($p < 0,001$).

U nama dostupnoj literaturi, generalno, jako je malo studija koje su se bavile morfometrijskim karakteristikama tumora. Već svetlostnom mikroskopijom možemo da uočimo neke od karakteristika jedara. Jasno se vidi da li je reč o hiperhromnim jedrima, krupnim ili malim, da li je prisutna atipija, kakav je hromatin, da li su ivice ravne, površina nazupčana. Kako je do sada više puta napomenuto, diferencijalna dijagnoza tumora pljuvačnih žlezda je često veoma teška, a morfometrija omogućava kvantifikaciju patohistološkog nalaza, a samim tim i smanjuje mogućnost greške u postavljanju definitivne dijagnoze. Morfometrijska analiza tumora pljuvačnih žlezda je do sada primenjivana i mali je broj studija koje su komparirale rezultate ovih analiza u različitim tipovima tumora. U dosadašnjim istraživanjima autori su uglavnom istraživali jedarnu površinu, cirkularnost, perimetar i integrisanu optičku gustinu, korišćenjem različitih softverskih paketa.^{171,172} Layfield je u svojoj studiji objavio rezultate vezane za ove parametre, i pokazao njihovu

dijagnostičku značajnost u diferencijaciji benignih i malignih mešovityh tumora parotidne žlezde.¹⁷³ Prvulović je sa svojim saradnicima objavila studiju u diferencijaciji duktalnog i lobularnog karcinoma dojke na citološkom materijalu. Takođe je istakla i primenjivost ove metode, ne samo u diferencijaciji, već i u gradiranju samog karcinoma.¹⁷⁴ Oz i saradnici su objavili studiju koja se bavila morfometrijskim karakteristikama ćelija oralne sluzokože u pacijenata sa diabetes mellitus-om tip I, i pokazali kako su jedarni parametri statistički veći u ovoj grupi bolesnika.¹⁷⁵ Obad-Kovačević je svoje istraživanje uključila morfometrijske karakteristike benignih i malignih tumora parotidne žlezde, proučavajući karakteristike cele ćelije. Došli su do zaključka da je odnos površine jedara i citoplazme znatno veći, u korist jedara, kod malignih tumora. U zaključku su naveli da je ova metoda znatno teža za izvođenje, i predložili su jedarne karakteristike kao najkorisnije u diferencijaciji tumora. Njihovi rezultati ukazuju na povećane vrednosti ovih parametara u malignim tumorima.¹⁷⁶ Kawahara i saradnici su ispitivali karakteristike karcinoma pljuvačnih kanala sa skvamoznom diferencijacijom. Pokazali su da je srednja vrednost jedarne površine ove varijante karcinoma manja od srednje vrednosti planocelularnog karcinoma nastalom na terenu pleomorfnoq adenoma, a veća od površine mukoepidermoidnog karcinoma srednjeg i visokog gradusa maligniteta. Pokazali su, takođe, statistički značajnu razliku između površine jedara karcinoma pljuvačnih kanala i ostalih karcinoma pljuvačnih žlezda sa skvamoznom diferencijacijom.¹⁷⁷



7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata sprovedenog istraživanja, procenom i poređenjem karakteristika benignih i malignih tumora pljuvačnih žlezda na standardnim hematoksilin-eozin preparatima, analizom imunohistohemijske ekspresije markera proliferacije i intermedijarnih filamenata, analizom Ki67 proliferativnog indeksa, analizom morfometrijskih parametara jedarnih karakteristika, utvrđeno je da:

1. U grupi benignih tumora pljuvačnih žlezda, plemorfni adenomi su pozitivni na S-100, GFAP, CK14, α SMA, CEA, EMA i WT1. Warthin tumor je pozitivan na CK14, CEA i p63. Adenom bazalnih ćelija pokazuje pozitivnost na S-100, CEA, p63 i vimentin, dok mioepiteliom na vimentin, GFAP, S100, CK14, α -SMA, CEA i WT1. Ekspresija HER2 u grupi benignih tumora je bila u potpunosti odsutna.
2. U grupi malignih tumora pljuvačnih žlezda, epitelne ćelije adenoidnocističnog karcinoma eksprimuju CEA, CK14, p63, S-100 i α -SMA. Mukoepidermoidni karcinom je pozitivan na vimentin, CK14 i p63. Karcinom pljuvačnih kanala pokazuje pozitivnost na EMA, CEA, p53 i HER-2, dok polimorfni adenokarcinom niskog gradusa na CK14, p63, EMA, S100 i vimentin.
3. Ki67 proliferativni indeks pokazuje statistički značajne razlike između benignih i malignih tumora pljuvačnih žlezda. U grupi malignih tumora proliferativni indeks se kretao u opsegu od 1,18% do 72,30%, dok se u grupi benignih tumora kretao od 1,30% do 5,30%.
4. Najveću proliferativnu aktivnost u grupi benignih tumora ima pleomorfni adenom, a najmanju adenom bazalnih ćelija. Dobijeni rezultati su u skladu sa frekvencom recidiviranja tumora, kao i sa stepenom maligne alteracije.

5. Najveću proliferativnu aktivnost u grupi malignih tumora pokazuje adenoïdnocistični karcinom, dok najmanju pokazuje polimorfni adenokarcinom niskog gradusa. Dobijene vrednosti su u skladu sa biološkim ponačanjem tumora, lokalnom agresivnošću, kao i sa brzinom davanja metastaza.
6. Morfometrijski parametri koji se odnose na veličinu jedara tumorskih ćelija, odnosno površina i dijametar, statistički su značajno viši u grupi malignih tumora. Najveće vrednosti pokazuje karcinom pljuvačnih kanala.
7. Morfometrijski parametri koji se odnose na oblik jedara tumorskih ćelija, odnosno cirkularnost i zaobljenost jedara, statistički značajno zavise od tipa. Najveće vrednosti pokazuje karcinom pljuvačnih kanala.
8. Vrednosti integrisane optičke gustine jedara statistički su značajno veće u grupi malignih tumora. Najveću vrednost pokazuje karcinom pljuvačnih kanala. Multivarijantna logistička regresiona analiza pokazala je da je ova varijabla najznačajniji prediktor za diferencijaciju jedara malignih ćelija.
9. Morfometrijski parametri integrisane optičke gustine i veličine jedara pokazuju statistički značajno veće vrednosti u grupi malignih tumora.

8. LITERATURA

1. Arey LB. Developmental anatomy; a textbook and laboratory manual of embryology. Revised 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, Inc., 1974.
2. Gibson MH. The prenatal human submandibular gland: a histological, histochemical and ultrastructural study. *Anat Anz.* 1983; 153:91–105.
3. Bernfield M, Banerjee S, Cohn R. Dependence of salivary epithelial morphology and branching morphogenesis upon acid mucopolysaccharide-protein (proteoglycan) at the epithelial surface. *J Cell Biol.* 1972; 52:674–689.
4. Johns M. The salivary glands: anatomy & embryology. *Otolaryngol Clin North Am.* 1977; 10:261.
5. Gasser RF. The early development of the parotid gland around the facial nerve and its branches in man. *Anat Rec.* 1970; 167:63–77.
6. Azuma M, Sato M. Morphogenesis of normal human salivary gland cells in vitro. *Histol Histopathol.* 1994; 9:781–790.
7. Adi MM, Chisholm DM, Waterhouse JP. Stereological and immunohistochemical study of development of human fetal labial salivary glands and their S-100 protein reactivity. *J Oral Pathol Med.* 1994; 23:36–40.
8. Kontis TC, Johns ME. Anatomy and Physiology of the Salivary Glands. In: Bailey BJ (ed) *Head and Neck Surgery – Otolaryngology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
9. Jaskoll T, Melnick M. Submandibular gland morphogenesis: stage-specific expression of TGF- α /EGF, IGF, TGF- β , TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF β 2, TGF- β 3, and EGF-r null mutations. *Anat Rec.* 1999; 256:252–268.

10. Uehara T. Localization of FGF-6 and FGFR-4 during prenatal and early postnatal development of the mouse sublingual gland. *J Oral Sci.* 2006; 48:9–14.
11. Davis RA, Anson BJ, Budinger JM, Kurth LR. Surgical anatomy of the facial nerve and parotid gland based upon a study of 350 cervicofacial halves. *Surg Gynecol Obstet.* 1956; 102:385–412.
12. Frommer J. The human accessory parotid gland: its incidence, nature, and significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977; 43:671–676.
13. Woodburne RT, Burkel WE. *Essentials of Human Anatomy*, Eighth edn. New York, Oxford: Oxford University Press, 1988.
14. Hollinshead WH. *Anatomy for Surgeons: Volume I, The Head and Neck*, Third ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1982.
15. Caselitz J, Jaup T, Seifert G. Lactoferrin and lysozyme in carcinomas of the parotid gland. A comparative immunocytochemical study with the occurrence in normal and inflamed tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1981; 394:61–73.
16. Takano K, Malamud D, Bennick A, Oppenheim F, Hand AR. Localization of salivary proteins in granules of human parotid and submandibular acinar cells. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4:399–405.
17. Quintarelli G. Histochemical identification of salivary mucins. *Ann N Y Acad Sci.* 1963; 106:339–363.
18. Reddy MS, Bobek LA, Haraszthy GG, Biesbrock AR, Levine MJ. Structural features of the low-molecular-mass human salivary mucin. *Biochem J.* 1992; 287:639–643.
19. Junquera L, Carneiro J. *Basic Histology: Text & Atlas*, Tenth edn. New York: McGraw-Hill, 2003.
20. Korsrud FR, Brandtzaeg P. Characterization of epithelial elements in human major salivary glands by functional markers: localization of amylase, lactoferrin, lysozyme, secretory component, and secretory immunoglobulins by paired immunofluorescence staining. *J Histochem Cytochem.* 1982; 30:657–666.

21. Riva A, Serra GP, Proto E, Faa G, Puxeddu R, Riva FT. The myoepithelial and basal cells of ducts of human major salivary glands: a SEM study. *Arch Histol Cytol.* 1992; 55(suppl):115–124.
22. Regezi JA, Batsakis JG. Histogenesis of salivary gland neoplasms. *Otolaryngol Clin North Am.* 1977; 10:297–307.
23. Eversole LR. Histogenetic classification of salivary tumors. *Arch Pathol.* 1971; 92:433–443.
24. Dardick I, van Nostrand AW. Morphogenesis of salivary gland tumors. A prerequisite to improving classification. *Pathol Annu.* 1987; 22:1–53.
25. Batsakis JG. Salivary gland neoplasia: an outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980; 49:229–232
26. Born IA, Schwechheimer K, Maier H, Otto HF. Cytokeratin expression in normal salivary glands and in cystadenolymphomas demonstrated by monoclonal antibodies against selective cytokeratin polypeptides. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1987; 411:583–589.
27. Burns BF, Dardick I, Parks WR. Intermediate filament expression in normal parotid glands and in pleomorphic adenomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1988; 413:103–112.
28. Dardick I, Dardick AM, MacKay AJ, Pastolero GC, Guillane PJ, Burford-Mason AP. Pathobiology of salivary glands. IV. Histogenetic concepts and cycling cells in human parotid and submandibular glands cultured in floating collagen gels. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993; 76:307–318.
29. Burgess KL, Dardick I, Cummins MM, Burford-Mason AP, Bassett R, Brown DH. Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of the rat parotid gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996; 82:674–680.
30. Dardick I, Burford-Mason AP. Current status of the histogenetic and morphogenetic concepts of salivary gland tumorigenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4:639–677.
31. Zarbo RJ. Salivary gland neoplasia: a review for the practicing pathologist. *Mod Pathol.* 2002; 15:298–323.

32. Hubner G, Klein HJ, Kleinsasser O, Schiefer HG. Role of myoepithelial cells in the development of salivary gland tumors. *Cancer*. 1971; 27:1255–1261.
33. Erlandson RA, Cardon-Cardo C, Higgins PJ. Histogenesis of benign pleomorphic adenoma (mixed tumor) of the major salivary glands. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol*. 1984; 8:803–820.
34. Gnepp DR, Chen JC, Warren C. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary gland. An immunohistochemical and clinicopathologic study. *Am J Surg Pathol*. 1988; 12:461–468.
35. Williams SB, Ellis GL, Auclair PL. Immunohistochemical analysis of basal cell adenocarcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993; 75:64–69.
36. Foote FW, Frazell EL. Tumors of the major salivary glands. *Cancer*. 1953; 6(6):1065-1133.
37. Batsakis JG. *Tumors of the Head and Neck: Clinical and Pathological Considerations*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1979:573
38. Roh JL, Huh J, Suh C. Primary non-Hodgkin's lymphomas of the major salivary glands. *J Surg Oncol*. 2008; 97(1):35-39.
39. Anderson LA, Gadalla S, Morton LM, Landgren O, Pfeiffer R, Warren JL, Berndt SI, Ricker W, Parsons R, Engels EA. Population-based study of autoimmune conditions and the risk of specific lymphoid malignancies. *Int J Cancer*. 2009; 125(2):398-405.
40. Hanna EY, Suen JY. Neoplasms of the salivary glands. In: Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA, Krause CJ, Schuller DE, Richardson MA, (eds). *Otolaryngology Head & Neck Surgery*. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc., 1998:1255-1302.
41. Cheuk W, Chan JK. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology*. 2007; 51(1):1-20.
42. Ellis GL, Auclair PL. Tumors of the salivary glands. *Atlas of Tumor Pathology*, third series, Fascicle 11. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1996.

43. Prasannan L, Pu A, Hoff P, Weatherly R, Castle V. Parotid carcinoma as a second malignancy after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1999; 21:535–538.
44. Modan B, Chetrit A, Alfandary E, Tamir A, Lusky A, Wolf M, Shpilberg O. Increased risk of salivary gland tumors after low-dose irradiation. *Laryngoscope.* 1998; 108:1095–1097.
45. Iezzoni JC, Gaffey MJ, Weiss LM. The role of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 1995; 103:308–315.
46. Raab-Traub N, Rajadurai P, Flynn K, Lanier AP. Epstein- Barr virus infection in carcinoma of salivary gland. *J Virol.* 1991; 65:7032–7036.
47. Kotwall CA. Smoking as an etiologic factor in the development of Warthin's tumor of the parotid gland. *Am J Surg.* 1992; 164:646–647.
48. Pinkston JA, Cole P. Cigarette smoking and Warthin's tumor. *Am J Epidemiol.* 1996; 144:183–187.
49. Swanson GM, Burns PB. Cancers of the salivary gland: workplace risks among women and men. *Annu Epidemiol.* 1997; 7:369-374.
50. Reingold IM, Keasbey LE, Graham JH. Multicentric dermaltype cylindromas of the parotid glands in a patient with florid turban tumor. *Cancer.* 1977; 40:1702–1710.
51. Jungehulsing M, Wagner M, Damm M. Turban tumour with involvement of the parotid gland. *J Laryngol Otol.* 1999; 113: 779–783.
52. Depowski PL, Setzen G, Chui A, Koltai PJ, Dollar J, Ross JS. Familial occurrence of acinic cell carcinoma of the parotid gland. *Arch Pathol Lab Med.* 1999; 123:1118–1120.
53. Merrick Y, Labeck H, Nielsen H, Hansen HS. Familial clustering of salivary gland carcinoma in Greenland. *Cancer.* 1986; 57:2097–2102.
54. Pinto AE, Fonseca I, Martins C, Soares J. Objective biologic parameters and their clinical relevance in assessing salivary gland neoplasms. *Adv Anat Pathol.* 2000; 7:294–306.

-
55. Voz ML, Agten NS, Van de Ven WJM, Kas K. PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. *Cancer Res.* 2000; 60:106–113.
 56. de Oliveira FA, Duarte EC, Taveira CT, Máximo AA, de Aquino EC, Alencar Rde C, et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian population. *Head Neck Pathol.* 2009; 3(4):271-275.
 57. Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, Gatta G, McGurk M, Licitra L. Major and minor salivary gland tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010; 74(2):134-138.
 58. Ettl T, Schwarz-Furlan S, Gosau M, Reichert TE. Salivary gland carcinomas. *Oral Maxillofac Surg.* 2012; 16:267-283.
 59. Lukšić I, Virag M, Manojlović S, Macan D. Salivary gland tumours: 25 years of experience from a single institution in Croatia. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012; 40(3):e75-81.
 60. Fonseca FP, Carvalho Mde V, de Almeida OP, Rangel AL, Takizawa MC, Bueno AG, et al. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 114(2):230-239.
 61. Vasconcelos AC, Nör F, Meurer L, Salvadori G, Souza LB, Vargas PA, et al. Clinicopathological analysis of salivary gland tumors over a 15-year period. *Braz Oral Res.* 2016; 30:e2.
 62. Albeck H, Nielsen NH, Hansen HE, Bentzen J, Ockelmann HH, Bretlau P, et al. Epidemiology of nasopharyngeal and salivary gland carcinoma in Greenland. *Arctic Med Res.* 1992; 51(4):189-195.
 63. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC, 2005.
 64. Boysen T, Friberg J, Andersen A, Poulsen GN, Wohlfahrt J, Melbye M. The Inuit cancer pattern--the influence of migration. *Int J Cancer.* 2008; 122(11):2568-2572.
 65. Mayers EN, Ferris RL. *Salivary Gland Disorders.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2007.

66. Zhan KY, Khaja SF, Flack AB, Day TA. Benign Parotid Tumors. *Otolaryngol Clin North Am.* 2016; 49(2):327-342.
67. Bhattacharyya N, Fried MP. Determinants of survival in parotid gland carcinoma: a population-based study. *Am J Otolaryngol.* 2005; 26(1):39-44.
68. Pires FR, de Almeida OP, de Araujo VC, Kowalski LP. Prognostic factors in head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130(2):174-180.
69. Wolfish EB, Nelson BL, Thompson LD. Sinonasal tract mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 19 cases combined with a comprehensive review of the literature. *Head Neck Pathol.* 2012; 6(2):191–207.
70. Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer.* 1998; 82:1217–1224.
71. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A, Bodian C, et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25: 835–845.
72. Nagao T, Gaffey TA, Serizawa H, Sugano I, Ishida Y, Yamazaki K, et al. Dedifferentiated adenoid cystic carcinoma: a clinicopathologic study of 6 cases. *Mod Pathol.* 2003; 16:1265–1272.
73. Kokemueller H, Eckardt A, Brachvogel P, Hausamen JE. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--a 20 years experience. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(1):25-31.
74. da Cruz Perez DE, de Abreu Alves F, Nobuko Nishimoto I, de Almeida OP, Kowalski LP. Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol.* 2006; 42(2):139-146.
75. Jaehne M, Roeser K, Jaekel T, Schepers JD, Albert N, Loning T. Clinical and immunohistologic typing of salivary duct carcinoma: a report of 50 cases. *Cancer.* 2005; 103(12): 2526-2533.
76. Barnes L, Rao U, Krause J, Contis L, Schwartz A, Scalamogna P. Salivary duct carcinoma. Part I. A clinicopathologic evaluation and DNA image analysis of 13

- cases with review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78(1):64-73.
77. Padberg BC, Sasse B, Huber A, Pfaltz M. Sarcomatoid salivary duct carcinoma. *Ann Diagn Pathol.* 2005; 9:86–92.
78. Dean A, Sierra R, Alamillos FJ, Lopez-Beltran A, Morillo A, Arévalo R, et al. Malignant myoepithelioma of the salivary glands: Clinicopathological and immunohistochemical features. *Brit J Oral Max Surg.* 1999; 37:64–66.
79. Said S, Campana J. Myoepithelial carcinoma ex pleomorphic adenoma of salivary glands: A problematic diagnosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 99:196-201.
80. Savera AT, Sloman A, Huvos AG, Klimstra DS. Myoepithelial carcinoma of salivary glands: A clinicopathologic study of 25 patients. *Am J Surg Pathol.* 2000; 24:761–774.
81. Badal S, Ahmed S, Patil PS, Badal A. Malignant myoepithelioma of the maxilla posing a diagnostic dilemma. *Natl J Maxillofac Surg.* 2013; 4:235-238.
82. Khetrapal S, Jetley S, Hassan MJ, Jairajpuri Z. Cystic change in pleomorphic adenoma: a rare finding and a diagnostic dilemma. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(11): ED07-8.
83. Takamine K, Ueda Y, Nakano K, Ochiai T, Sugita Y, Kubo K, et al. Notch as a Possible Cell Differentiation Factor in Pleomorphic Adenomas. *Int J Med Sci.* 2015; 12(10):759-763.
84. Daguci L, Simionescu C, Stepan A, Munteanu C, Daguci C, Bataiosu M. Warthin tumor: Morphological study of the stromal compartment. *Rom J Morphol Embryol.* 2011; 52:1319–1323.
85. Singh AP, Tandon A, Chowdhary A, Mujoo S. Adenolymphoma: A probing entity: Case report and review. *J Nat Sci Biol Med.* 2013; 4(2):492-496.
86. Siefert G, Sobin LH. Histological classification of salivary gland tumours. In: World Health Organization, International histological classification of tumours. Berlin Springer, 1991.

87. Kanaujia SK, Singh A, Nautiyal S, Ashutosh K. Basal cell adenoma of parotid gland: case report and review of literature. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015; 67(4):430-433.
88. González-García R, Nam-Cha SH, Muñoz-Guerra MF, Gamallo-Amat C. Basal cell adenoma of the parotid gland. Case report and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006; 11(2): E206-9.
89. Sheldon WH. So-called mixed tumors of the salivary glands. *Arch Pathol.* 1943; 35:1–20.
90. Politi M, Toro C, Zerman N, Mariuzzi L, Robiony M. Myoepithelioma of the parotid gland: Case report and review of literature. *Oral Oncology EXTRA.* 2005; 41:104–108.
91. Kong M, Drill EN, Morris L, West L, Klimstra D, Gonen M, et al. Prognostic factors in myoepithelial carcinoma of salivary glands: a clinicopathologic study of 48 cases. *Am J Surg Pathol.* 2015; 39:931-938.
92. de Araujo VC, de Sousa SOM, Carvalho YR, de Araujo NS. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *App Immunohistochem Mol Morphol.* 2000; 8(3):195-202.
93. Ben-Izhak O, Akrish S, Nagler RM. Ki67 and salivary cancer. *Cancer Invest.* 2008; 26(10):1015-1023.
94. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol.* 2004; 15(9):1319-1329.
95. Skalova A, Lehtonen H, von Boguslawsky K, Leivo I. Prognostic significance of cell proliferation in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland: clinicopathological study using MIB1 antibody in paraffin sections. *Hum Pathol.* 1994; 25(9):929-935.
96. Dodd RL, Slevin NJ. Salivary gland adenoid cystic carcinoma: a review of chemotherapy and molecular therapies. *Oral Oncol.* 2006; 42(8):759-769.
97. Haapasalo H, Pesonen E, Collan Y. Volume corrected mitotic index (M/V-INDEX). The standard of mitotic activity in neoplasms. *Pathol Res Pract.* 1989; 185(5):551-554.

98. Xu R, Perle MA, Inghirami G, Chan W, Delgado Y, Feiner H. Amplification of Her-2/neu gene in Her-2/neu-overexpressing and -nonexpressing breast carcinomas and their synchronous benign, premalignant, and metastatic lesions detected by FISH in archival material. *Mod Pathol.* 2002; 15(2):116-124.
99. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist.* 2009; 14(4):320-368.
100. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2013; 31(31):3997-4013.
101. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004; 10(8):789-799.
102. Selivanova G, Wiman KG. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene.* 2007; 26(15):2243-2254.
103. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(2):95-107.
104. Alves FA, Pires FR, De Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP. PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(6):593-597.
105. Chari NS, Pinaire NL, Thorpe L, Medeiros LJ, Routbort MJ, McDonnell TJ. The p53 tumor suppressor network in cancer and the therapeutic modulation of cell death. *Apoptosis.* 2009; 14(4):336-347.
106. Santos GC, Carvalho KC, Falzoni R, Simoes AC, Rocha RM, Lopes A, et al. Glial fibrillary acidic protein in tumor types with cartilaginous differentiation. *Mod Pathol.* 2009; 22(10):1321-1327.
107. Viale G, Gambacorta M, Coggi G, Dell'Orto P, Milani M, Doglioni C. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in normal and diseased human breast. *Virchows Arch A Pathol Anat.* 1991; 418:339-348.

108. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 2000; 25:1439-1451.
109. Lin F, Prichard J. *Handbook of practical immunohistochemistry. Frequently asked questions. Second edition.* New York: Springer, 2015.
110. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 2000; 12:79-90.
111. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type (review). *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1450:191-231.
112. Ramezani M, Mohamadzaheeri E, Khazaei S, Najafi F, Vaisi-Raygani A, Rahbar M, et al. Comparison of EMA, CEA, CD10 and Bcl-2 biomarkers by immunohistochemistry in squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma of the skin. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016; 17(3):1379-1383.
113. Tacha DE, Bloom K, Kyshtoobayava A, Gofstein S. A rapid double immunostaining technique with a single combination of CK5, CK14, p63, CK7 and CK18 distinguishes between hyperplasia of the usual type, atypical hyperplasia, microinvasive and basal phenotype breast cancers. *Mod Pathol.* 2009; 22(Supplement 1s):388A.
114. Hicks DG. Immunohistochemistry in the diagnostic evaluation of breast lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2011; 19(6):501-505.
115. Gottlieb C, Raju U, Greenawald KA. Myoepithelial cells in the differential diagnosis of complex benign and malignant breast lesions: An immunohistochemical study. *Mod Pathol.* 1990; 3(2):135-140.
116. Marin MC, Kaelin WG. p63 and p73: old members of a new family [minireview]. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1470:M93-M100.
117. Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris JF, Rauscher FJ 3rd, Hill DE, et al. Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:5100-5104.
118. Li X, Ottosson S, Wang S, Jernberg E, Boldrup L, Gu X, et al. Wilms' tumor gene 1 regulates p63 and promotes cell proliferation in squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer.* 2015; 15:342.

119. Langman G, Andrews CL, Weissferdt A. WT1 expression in salivary gland pleomorphic adenomas: a reliable marker of the neoplastic myoepithelium. *Mod Pathol.* 2011; 24:168–174.
120. Alkushi A, Irving J, Hsu F, Dupuis B, Liu CL, Rijn M, et al. Immunoprofile of cervical and endometrial adenocarcinomas using a tissue array. *Virchows Arch.* 2003; 442:271-277.
121. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134:e48-72.
122. Van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol.* 1998; 51(10):716-724.
123. Stodulski D, Majewska H, Skálová A, Mikaszewski B, Biernat W, Stankiewicz C. Histological reclassification of parotid gland carcinomas: importance for clinicians. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016. DOI 10.1007/s00405-016-4048-8.
124. Shah SS, Chandan VS, Wilbur DC, Khurana KK. Glial fibrillary acidic protein and CD 57 immunolocalization in cell block preparations is a useful adjunct in the diagnosis of pleomorphic adenoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131(9):1373-1377.
125. Loyola AM, de Sousa SO, Araújo NS, Araújo VC. Study of minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma differentiation based on immunohistochemical expression of cytokeratins, vimentin and muscle-specific actin. *Oral Oncol.* 1998; 34(2):112-118.
126. Fonseca FP, de Andrade BA, Lopes MA, Pontes HA, Vargas PA, de Almeida OP. p63 expression in papillary cystadenoma and mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013; 115(1):79–86.
127. Weinreb I, Seethala RR, Perez-Ordoñez B, Chetty R, Hoschar AP, Hunt JL. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma: clinicopathologic description in a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol.* 2009; 33(3):409–416.

128. Lanzel E, Robinson RA, Zimmerman MB, Pourian A, Hellstein JW. The use of immunohistochemistry in detection of perineural invasion in mucoepidermoid carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016; 121(6):636-642.
129. Araújo VC, Carvalho YR, Araújo NS. Actin versus vimentin in myoepithelial cells of salivary gland tumours. A comparative study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 77:387-391.
130. Araújo VC, Loducca SV, Sousa SO, Williams DM, Araújo NS. The cribriform features of adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma: cytokeratin and integrin expression. *Ann Diagn Pathol.* 2001; 5(6):330-334.
131. Cavalcante RB, Lopes FF, Ferreira AS, Freitas Rde A, de Souza LB. Immunohistochemical expression of vimentin, calponin and HHF-35 in salivary gland tumors. *Braz Dent J.* 2007; 18(3):192-197.
132. Araújo V, Sousa S, Jaeger M, Jaeger R, Loyola A, Crivelini M, et al. Characterization of the cellular component of polymorphous low-grade adenocarcinoma by immunohistochemistry and electron microscopy. *Oral Oncol.* 1999; 35(2):164-172.
133. Regezi JA, Zarbo RJ, Stewart JC, Courtney RM. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary gland. A comparative histologic and immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 71:469-475.
134. Thompson LD, Penner C, Ho NJ, Foss RD, Miettinen M, Wieneke JA, et al. Sinonasal tract and nasopharyngeal adenoid cystic carcinoma: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 86 cases. *Head Neck Pathol.* 2014; 8(1):88-109.
135. Nakazato Y, Ishizeki J, Takahashi K, Yamaguchi H, Kamei T, Mori T. Localization of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein-related antigen in pleomorphic adenoma of the salivary glands. *Lab Invest.* 1982; 46(6):621-626.
136. Gnepp DR, el-Mofty S. Polymorphous low grade adenocarcinoma: glial fibrillary acidic protein staining in the differential diagnosis with cellular mixed tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 83(6):691–695.

137. Castle JT, Thompson LD, Frommelt RA, Wenig BM, Kessler HP. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: a clinicopathologic study of 164 cases. *Cancer*. 1999; 86:207-219.
138. Curran AE, White DK, Damm DD, Murrah VA. Polymorphous low-grade adenocarcinoma versus pleomorphic adenoma of minor salivary glands: resolution of a diagnostic dilemma by immunohistochemical analysis with glial fibrillary acidic protein. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 91(2):194–199.
139. Prasad ML, Barbacioru CC, Rawal YB, Husein O, Wen P. Hierarchical cluster analysis of myoepithelial/basal cell markers in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2008; 21(2):105–114.
140. Leader R, Deol-Poonia RK, Sheard J, Triantafyllou A. Immunohistochemical localization of WT1 in epithelial salivary tumors. *Pathol Res Pract*. 2014; 210(11):726-732.
141. Zhu S, Schuerch C, Hunt J. Review and updates of immunohistochemistry in selected salivary gland and head and neck tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2015; 139(1):55-66.
142. Ettl T, Stiegler C, Zeitler K, Agaimy A, Zenk J, Reichert TE, Gosau M, Kühnel T, Brockhoff G, Schwarz S. EGFR, HER2, survivin, and loss of pSTAT3 characterize high-grade malignancy in salivary gland cancer with impact on prognosis. *Hum Pathol*. 2012; 43(6):921-931.
143. Giannoni C, el-Naggar AK, Ordoñez NG, Tu ZN, Austin J, Luna MA, Batsakis JG. C-erbB-2/neu oncogene and Ki-67 analysis in the assessment of palatal salivary gland neoplasms. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995; 112:391–398.
144. Norgard S, Franzen G, Boysen M, Halvorsen TB. Ki-67 as prognostic marker in adenoid cystic carcinoma assessed with the monoclonal antibody MIB1 in paraffin sections. *Laryngoscope*. 1997; 107:531–536.
145. Hellquist HB, Karlsson MG, Nilsson C. Salivary duct carcinoma—a highly aggressive salivary gland tumor with overexpression of c-erbB-2. *J Pathol*. 1994; 172:35– 44.

146. Kamio N. Coexpression of p53 and c-erbB-2 proteins is associated with histological type, tumor stage, and cell proliferation in malignant salivary gland tumors. *Virchows Arch.* 1996; 428:75–83.
147. Politi M, Robiony M, Avellini C, Orsaria M. Epithelial-myoepithelial carcinoma of the parotid gland: Clinicopathological aspect, diagnosis and surgical consideration. *Ann Maxillofac Surg.* 2014; 4(1):99-102.
148. Bilal H, Handra-Luca A, Bertrand JC, Fouret PJ. P63 is expressed in basal and myoepithelial cells of human normal and tumor salivary gland tissues. *J Histochem Cytochem.* 2003; 51(2):133-139.
149. Edwards PC, Bhuiya T, Kelsch RD. Assessment of p63 expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and basal cell and canalicular adenomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(5):613-619.
150. Weber A, Langhanki L, Schütz A, Gerstner A, Bootz F, Wittekind C, et al. Expression profiles of p53, p63, and p73 in benign salivary gland tumors. *Virchows Arch.* 2002; 441(5):428–436.
151. Dardick I, Daley T, van Nostrand AW. Basal cell adenoma with myoepithelial cell-derived “stroma”: a new major salivary gland tumor entity. *Head Neck Surg.* 1986; 8:257–267.
152. de Sousa SOM, de Araújo NS, Corrêa L, Soubhia AMP, de Araújo VC. Immunohistochemical aspects of basal cell adenoma and canalicular adenoma of salivary glands. *Oral Oncol.* 2001; 37(4):365-368.
153. Chapnik JS. The controversy of Warthin’s tumor. *Laryngoscope.* 1983; 93(6):695–716.
154. Arida M, Barnes EL, Hunt JL. Molecular assessment of allelic loss in Warthin tumors. *Mod Pathol.* 2005; 18(7):964–968.
155. Faur A, Lazăr E, Cornianu M, Dema A, Vidita CG, Gălușcan A. Warthin tumor: a curious entity--case reports and review of literature. *Rom J Morphol Embryol.* 2009; 50(2):269-273.

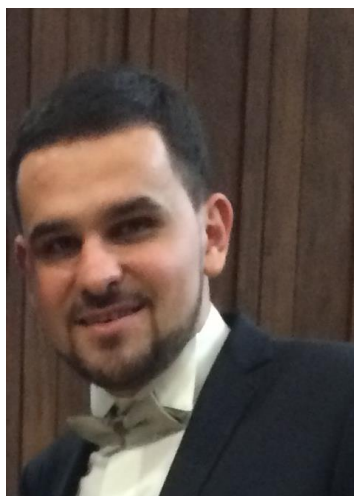
-
156. Schwerer MJ, Kraft K, Baczako K, Maier H. Cytokeratin expression and epithelial differentiation in Warthin's tumour and its metaplastic (infarcted) variant. *Histopathology*. 2001; 39(4):347-352.
 157. Allevi F, Biglioli F. Squamous carcinoma arising in a parotid Warthin's tumour. *BMJ Case Rep*. 2014; pii: bcr2014207870. doi: 10.1136/bcr-2014-207870.
 158. Nagao T, Sugano I, Ishida Y, Tajima Y, Furuya N, Kondo Y, Nagao K. Mucoepidermoid carcinoma arising in Warthin's tumour of the parotid gland: report of two cases with histopathological, ultrastructural and immunohistochemical studies. *Histopathology*. 1998; 33(4):379-386.
 159. Norberg-Spaak L, Dardick I, Leidin T. Adenoid cystic carcinoma: use of cell proliferation, BCL-2 expression, histologic grade, and clinical stage as predictors of clinical outcome. *Head Neck*. 2000; 22(5):489-497.
 160. Hellquist HB, Sundelin K, Di Bacco A, Tylor M, Manzotti M, Viale G. Tumour growth fraction and apoptosis in salivary gland acinic cell carcinomas. Prognostic implications of Ki-67 and bcl-2 expression and of in situ end labelling (TUNEL). *J Pathol*. 1997; 181(3):323-329.
 161. Shida H, Tanaka A, Fukuda M, Shigematsu H, Kusama K, Sakashita H. A case of basal cell adenoma in the parotid gland. *Jpn J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 51(7):352-355.
 162. Horii A, Yoshida J, Sakai M, Okamoto S, Kubo T. Flow cytometric analysis of DNA content and Ki-67-positive fraction in the diagnosis of salivary gland tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1998, 255(5):265-268.
 163. Terada T. Hyperplastic intraparotid lymph nodes with incipient Warthin's tumor presenting as a parotid tumor. *Pathol Res Pract*. 2008; 204(11):863-866.
 164. Saghravanian N, Mohtasham N, Jafarzadeh H. Comparison of immunohistochemical markers between adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. *J Oral Sci*. 2009; 51(4):509-514.
 165. Suzzi MV, Alessi A, Bertarelli C, Cancellieri A, Procaccio L, Dall'olio D, et al. Prognostic relevance of cell proliferation in major salivary gland carcinomas. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2005; 25(3):161-168.

-
166. Triantafillidou K, Dimitrakopoulos J, Iordanidis F, Koufogiannis D. Management of adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 64(7):1114–1120.
167. Nagao T, Sugano I, Ishida Y, Tajima Y, Matsuzaki O, Konno A, et al. Salivary gland malignant myoepithelioma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of ten cases. *Cancer.* 1998; 83(7):1292–1299.
168. Al-Ani LS, Al-Azzawi LM. Evaluation of immunohistochemical expression of P53 and PCNA in pleomorphic adenoma, mucoepidermoid and adenoid cystic carcinomas of salivary glands. *Tikrit J Dent Sci.* 2013; 1(1):1–8.
169. Faur AC, Sas I, Motoc AG, Cornianu M, Zamfir CL, Lazăr DC, et al. Ki-67 and p53 immunostaining assessment of proliferative activity in salivary tumors. *Rom J Morphol Embryol.* 2015; 56(4):1429-1439.
170. Williams MD, Roberts DB, Kies MS, Mao L, Weber RS, El-Naggar AK. Genetic and expression analysis of HER-2 and EGFR genes in salivary duct carcinoma: empirical and therapeutic significance. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:2266-2274.
171. de Vicente Rodriguez JC, López Arranz JS, Vega Alvarez JA, Santos Oller JM, Gener González M. Morphometric study of epithelial neoplasms of the parotid gland. *ev ADM.* 1990; 47(4):215-219.
172. Gentile R, Zeppa P, Zabatta A, Vetrani A. The role of morphometry in the cytology of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Pathologica.* 1994; 86(2):167-169.
173. Layfield LJ, Hall TL, Fu YS. Discrimination of benign versus malignant mixed tumors of the salivary gland using digital image analysis. *Cytometry.* 1989; 10:217–221.
174. Prvulović I, Kardum-Skelin I, Sustercić D, Jakić-Razumović J, Manojlović S. Morphometry of tumor cells in different grades and types of breast cancer. *Coll Antropol.* 2010; 34(1):99-103.
175. Oz ZS, Bektas S, Battal F, Atmaca H, Ermis B. Nuclear morphometric and morphological analysis of exfoliated buccal and tongue dorsum cells in type-1 diabetic patients. *J Cytol.* 2014; 31(3):139-143.

176. Obad-Kovačević D, Kardum-Skelin I, Jelić-Puškarić B, Vidjak V, Blašković D. Parotid gland tumors: correlation between routine cytology and cytomorphometry by digital image analysis using conventional and newly introduced cytomorphometric parameters. *Diagn Cytopathol.* 2013; 41(9):776-784.
177. Kawahara A, Harada H, Akiba J, Kage M. Salivary duct carcinoma cytologically diagnosed distinctly from salivary gland carcinomas with squamous differentiation. *Diagn Cytopathol.* 2008; 36(7):485-493.

9. BIOGRAFIJA

(CURRICULUM VITAE)



Dr Nikola Živković je rođen 19.10.1982. godine u Nišu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Nišu sa odličnim uspehom, kao nosilac „Vukove diplome“. Medicinski fakultet u Nišu upisao je školske 2001/02. godine, i diplomirao je 28.12.2007. godine, sa prosečnom ocenom 9,65 i ocenom 10 na diplomskom ispitu iz patologije. Tokom studija bio je angažovan kao demonstrator na Predmetu patologija. Učesnik je mnogobrojnih domaćih i inostranih studentskih kongresa. Obavezni lerski staž obavio je u Kliničkom Crntru u Nišu i položio je stručni ispit. Specijalistički ispit iz patologije položio je marta 2014. godine. Radnik je Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu u svojstvu Asistenta za UNO patologija i Centra za patologiju, KC Niš, kao lekar specijalista patologije u kabinetu za patologiju dojke.

Doktorske akademske studije iz oblasti molekularne medicine upisao je školske 2008/09. godine i položio je sve ispite predviđene planom i programom. Po pokretanju specijalističkog staža odobren mu je prelazak na oblast klinička medicina.

Autor je većeg broja naučnih i stručnih radova koji su saopšteni i objavljeni u vodećim i značajnim domaćim i inostranim stručnim časopisima.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

МАРКЕРИ ПРОЛИФЕРАЦИЈЕ И ИНТЕРМЕДИЈАРНИХ ФИЛАМЕНАТА У ДИФЕРЕНЦИЈАЛНОЈ ДИЈАГНОЗИ БЕНИГНИХ И МАЛИГНИХ ТУМОРА ПЉУВАЧНИХ ЖЛЕЗДА

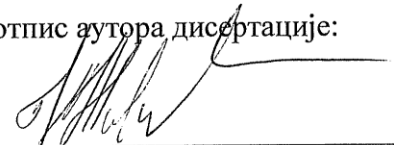
која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио ауторска права, нити злоупотребио интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Др Никола Д. Живковић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

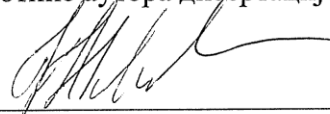
Наслов дисертације:

**МАРКЕРИ ПРОЛИФЕРАЦИЈЕ И ИНТЕРМЕДИЈАРНИХ ФИЛАМЕНАТА У
ДИФЕРЕНЦИЈАЛНОЈ ДИЈАГНОЗИ БЕНИГНИХ И МАЛИГНИХ ТУМОРА
ПЉУВАЧНИХ ЖЛЕЗДА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Др Никола Д. Живковић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

МАРКЕРИ ПРОЛИФЕРАЦИЈЕ И ИНТЕРМЕДИЈАРНИХ ФИЛАМЕНАТА У ДИФЕРЕНЦИЈАЛНОЈ ДИЈАГНОЗИ БЕНИГНИХ И МАЛИГНИХ ТУМОРА ПЉУВАЧНИХ ЖЛЕЗДА

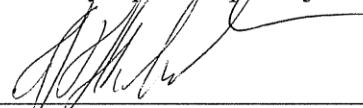
Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Др Никола Д. Живковић