

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Jelena Stojković - Filipović

**EKSPRESIJA PROTEINA ODRŽAVANJA
MINIHROMOZOMA U KERATINOCITNOJ
INTRAEPIDERMALNOJ NEOPLAZIJI I
INVAZIVNOM PLANOCELULARNOM
KARCINOMU KOŽE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2016. godine

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDECINE**

Jelena Stojković - Filipović

**EXPRESSION OF MINICHROMOSOME
MAINTENANCE PROTEINS IN
KERATINOCYTIC INTRAEPIDERMAL
NEOPLASIA AND INVASIVE SQUAMOUS
CELL CARCINOMA OF THE SKIN**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2016

Mentor:
Prof. dr Dimitrije Brašanac
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor:
Prof. dr Ljiljana Medenica
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije za ocenu završene doktorske disertacije:

1. Prof. dr Miloš Nikolić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Nada Tomanović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Doc. dr Danica Todorović, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

DATUM ODBRANE: ____ / ____ / ____

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se mentoru, profesoru dr Dimitriju Brašancu na ukazanom poverenju, idejama, konstruktivnom usmeravanju, vremenu i pomoći tokom rada na doktorskoj tezi, komentoru, profesorki dr Ljiljani Medenici i članovima komisije, profesoru dr Milošu Nikoliću, docentkinji dr Nadi Tomanović i docentkinji dr Danici Todorović. Takođe, zahvaljujem se dragim kolegama dr Martini Bosić, dr Branislavu Lekiću i dr Ivanu Zaletelu na podršci, savetima i nesebičnoj pomoći tokom izrade teze. Posebno se zahvaljujem svojoj porodici i prijateljima na razumevanju, hrabrenju da istrajem i bezgraničnoj pomoći bez koje nikada ne bih uspela da završim započeti posao.

Maj 2016. godine

Autor

EKSPRESIJA PROTEINA ODRŽAVANJA MINIHROMOZOMA U KERATINOCITNOJ INTRAEPIDERMALNOJ NEOPLAZIJI I INVAZIVNOM PLANOCELULARNOM KARCINOMU KOŽE

SAŽETAK:

Aktinična keratoza (AK) predstavlja proliferaciju neoplastično transformisanih keratinocita ograničenih na deo epiderma i smatra se inicijalnom kliničkom manifestacijom bolesti koja može da progredira do planocelularnog tj. skvamocelularnog karcinoma (engl. squamous cell carcinoma, SCC), ranim stadijumom u biološkom spektru SCC. Iz tog razloga, a prema konceptu progresije u evoluciji AK, predložena je nova nomenklatura za AK, *keratinocitna intraepidermalna neoplazija* (engl. keratinocyte intraepidermal neoplasia, KIN), prema analogiji sa cervikalnom intraepidermalnom neoplazijom. Skvamocelularni karcinom kože in situ (engl. squamous cell carcinoma in situ - SCCIS) ili Bowenova bolest (engl. Bowen disease, BD) je maligna neoplazma ograničena na epiderm, kod koga se neoplastično transformisani keratinociti nalaze čitavom debljinom epiderma, bez znakova dermalne invazije. Kutani SCC je drugi najčešći maligni tumor kože, koji se manifestuje različitim promenama od lako izlečivih, superficijalno invazivnih kancera do veoma infiltriranih tumora koji metastaziraju dovodeći do smrtnog ishoda. Može nastati de novo, ali češće nastaje iz prekursorskih lezija, AK i SCCIS, koje, kao što je već pomenuto, prema pojedinim autorima predstavljaju SCC u ranijim evolutivnim fazama. Iako AK, SCCIS i SCC možemo smatrati različitim stadijumima iste bolesti, ne progrediraju sve lezije u SCC. Molekularni mehanizmi ove progresije još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni.

Proteini održavanja minihromozoma (engl. minichromosome maintenance proteins, MCM) predstavljaju kompleks proteina koji ima ključnu ulogu u regulaciji replikacije DNK tokom ćelijskog ciklusa. MCM grupa jedarnih proteina učestvuje u započinjanju i održavanju replikacije DNK molekula. Usklađenost funkcionalne interakcije između MCM proteina i drugih komponenti, posredstvom protein kinaza koje učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa, omogućava početak sinteze DNK molekula samo jednom tokom ćelijskog ciklusa, održavajući, na taj način stabilnost genoma ćelije. MCM proteini ekspresivani su u ćelijama u kojima je ćelijski ciklus u toku, dok se u ćelijama koje su u stanju mirovanja i diferencijacije njihova ekspresija gubi, pa predstavljaju potencijalno korisne markere proliferacije ćelija, posebno u tumorima.

Kancerogeneza planocelularnih (skvamocelularnih) neoplazmi kože još uvek nije u potpunosti razjašnjena i u fazi je ispitivanja. Jedan od poremećaja koji ima uticaja na neadekvatnu proliferaciju keratinocita svakako je i abnormalna ekspresija i funkcija MCM proteina.

Cilj ove studije bio je ispitivanje ekspresije MCM 2, 5 i 7 u AK, BD i invazivnom SCC, analiza ispoljavanja ovih proteina u *in situ* lezijama klasifikovanim kao keratinocitna intraepidermalna neoplazija (KIN), poređenje ekspresije MCM 2, MCM5 i MCM7 i prognostičkih parametara SCC kao što su dimenzije, dubina invazije, debljina i gradus tumora, kao i procena različitih načina evaluacije imunohistohemijskog bojenja i ekspresije MCM proteina u odnosu na tip lezije i prognostičke paramete.

Istraživanje je sprovedeno na 315 slučajeva, od čega 91 promena AK, 50 promena BD i 174 invazivni SCC, od toga podjednak broj dobro (G1), srednje (G2) i slabo (G3) diferentovanih SCC (po 58 slučajeva). Prema KIN klasifikaciji, od 141 preinvazivne lezije, 50 promena KIN 1, 40 KIN 2, a 51 KIN 3. Ekspresija MCM2, MCM5 i MCM7 proteina je ispitivana imunohistohemijski (IHH). Radi efikasnije, ekonomičnije, brže i lakše analize tokom IHH pocesa korišćena je tehnika tkivnog mikroniza, (engl. tissue microarray – TMA). Analizirani su distribucija imunopozitivnosti i broj pozitivnih ćelija tj. obim ekspresije (semikvantitativno).

Ekspresija MCM2, MCM5 i MCM7 bila je značajnao različita kod svakog od pojedinačnih, ispitivanih histopatoloških entiteta. U analizi distribucije pozitivnih ćelija bazalna distribucija bila je dominantna kod AK, difuzna kod BD, dok su periferna i difuzna distrivucija bile gotovo podjednako zastupljene kod SCC. U slučaju *in situ* lezija, klasifikovanih kao KIN, difuzna distribucija bila je uočena češće kod KIN3 u odnosu na KIN1, KIN2 ili KIN1 i KIN2 zajedno. Takođe, difuzna distribucija bila je izraženija kod KIN2 lezija u odnsou na KIN1. U slučaju SCC, MCM2, MCM5 i MCM7 pokazala su dominantno perifernu distibuciju u najvećem broju slučajeva dobro diferentovanih SCC (G1). U slučaju srednje diferentovanih SCC (G2) periferna i difuzna distribucija sva tri proteina bile su uočene u gotovo podjednakom broju slučajeva, dok je kod najvećeg broja slabo diferentovanih SCC (G3) dominirala difuzna distribucija pozitivnih ćelija. Analizom distribucije MCM2, MCM5 i MCM7 u odnsou na prognostičke parametre SCC iako je kod većih i debljih tumora difuzna distribucija bila dominantna, značajna razlika uočena je u slučaju kada je granica debljine tumora iznosila 6mm.

Semikavantitativnom procentom broja pozitivnih ćelija, sa granicom 50% utvrđena je razlika u obimu ekspresije u odnosu na histopatološki tip lezije. Procenat

pozitivnih MCM2, MCM5 i MCM7 ćelija rastao je od AK, BD do SCC, ali je razlika u broju pozitivnih ćelija bila je značajna samo za MCM2 i MCM5. U slučaju MCM7, utvrđena je značajna razlika u ekspresiji između AK i SCC. I kod KIN lezija procenat pozitivnih ćelija rastao je od KIN1 do KIN3. Obim ekspresije MCM2, MCM5 i MCM7 bio je različit između KIN3, KIN1 i KIN2, kao i kada su KIN1 i KIN2 činile jednu grupu. Razlika u ekspresiji MCM2 i MCM5 bila je manja između KIN1 i KIN2, a u slučaju MCM7 i nije imala statističku značajnost. Ekspresija sva tri proteina takođe se razlikovala kod SCC različitog stepena diferentovanosti. Procenat MCM2, MCM5 i MCM7 pozitivnih ćelija povećavao se od dobro ka slabo diferentovanim tumorima i bio značajno različit između tumora različitih gradusa, SCC G1, SCC G2 i SCC G3. Pojedinačnim poređenjem, razlika u ekspresiji bila nešto manje izražena između SCC G2 i G3. Kada je analiziran obim ekspresije MCM2, MCM5 i MCM7 pozitivnih ćelija, sa granicom 50%, u odnosu na prognostičke parametre SCC, utvrđena je razlika u ekspresiji sva tri proteina samo u odnosu na debljinu tumora, kada je granica debljine iznosila 6mm. Ekspresija se nije značajno razlikovala kod SCC različite veličine.

Ovo je prva studija u kojoj je procenjavana distribucija i ekspresija MCM proteina u keratinocitnim neoplazmama kože. Prema rezultatima ove studije difuzna distribucija i veći obim ekspresije MCM2, MCM5 i MCM7 proteina ćelijskog ciklusa u BD u odnosu na AK, KIN3 u odnosu na KIN1 i KIN2, kao i kod slabodiferentovanih SCC u odnosu na dobrodiferentovane SCC ukazuje na njihovu ulogu u progresiji *in situ* i invazivnih keratinocitnih neoplazmi. Utvrđena korelacija sa debljinom tumora 6mm, kao prognostičkim parametrom SCC, ukazuje na zaključak da je ekspresija MCM2, MCM5 i MCM7 proteina udružena sa faktorima rizika SCC. Takođe, činjenica da su slični rezultati dobijeni u slučaju svakog od proteina pojedinačno govori u prilog i dokazuje njihov značaj u evaluaciji progresije *in situ* lezija, kao i mogućih prognostičkih indikatora invazivnijih tumora sa većim rizikom za diseminaciju.

KLJUČNE REČI: aktinična keratoza; planocelularni karcinom kože; proteini održavanja minihromozoma.

NAUČNA OBLAST: Dermatoonkologija

EXPRESSION OF MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEINS IN KERATINOCYTIC INTRAEPIDERMAL NEOPLASIA AND INVASIVE SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE SKIN

ABSTRACT:

Actinic keratosis (AK) is proliferation of a neoplastic transformed keratinocytes confined to the epidermis and is considered as part of the initial clinical manifestation of the disease which can progress to squamous cell carcinoma (SCC), early stage in the biological spectrum SCC. The concept of progression with three possible steps in evolution from AK towards SCC is defined as a keratinocyte intraepidermal neoplasia (KIN), according to the level of epidermal involvement, analogous to cervical intraepithelial neoplasm (CIN). Squamous cell skin carcinoma in situ (SCCIS) or Bowen's disease (BD) is a malignant neoplasm confined to the epidermis, with full-thickness keratinocyte atypia, but no signs of dermal invasion. Cutaneous SCC is the second most common malignant tumor of the skin, which is manifested as broad spectrum of lesions, from easily curable superficial to invasive and very infiltrated tumors that metastasize, leading to death. Although it can arise de novo, SCC, however, often arises from precursor lesions, AK and BD, which, as already mentioned, according to some authors actually represent SCC in earlier evolutionary stages. Although AK, SCCIS and SCC can be considered as different stages of the same disease not all the lesions progressed in SCC. Molecular mechanisms of progression have not yet been fully understood and explained.

Minichromosome maintenance proteins (MCM) represent a complex of proteins that play a key role in the regulation of DNA replication during the cell cycle. MCM are group of the nuclear proteins involved in initiation and maintenance of DNA replication. Functional interactions between the MCM proteins and other components, by means of protein kinases which are involved in regulation of cell cycle, allows the DNA synthesis initiation, complete and accurate DNA replication to once per cell cycle, maintaining the genome stability.

Expressed in cells in which the cell cycle is in progress, with lost of expression in quiescent and differentiated cells, MCM proteins represent potentially useful markers of cell proliferation, particularly in cancer.

The aim of this study was to investigate MCM 2, 5 and 7 expression in AK, BD and invasive SCC, analysis of expression in situ lesions classified as keratinocyte

intraepidermal neoplasia (KIN), comparison MCM 2, MCM5 and MCM7 expression and prognostic parameters of SCC such as size, depth of invasion, thickness and tumor grade, as well as the evaluation of different methods of evaluation and immunohistochemical staining in relation to the type of lesion and prognostic parameters.

The study was conducted on 315 cases, of which 91 were AK, 50 BD and 174 invasive SCC, of which an equal number of good (G1), medium (G2) and poorly (G3) differentiated SCC (58 cases). According KIN classification from 141 preinvasive lesions, 50 changes were KIN 1, 40 KIN 2 and 51 KIN 3. For MCM2, MCM5 and MCM7 expression immunohistochemistry (IHH) was done. Tissue microarray (TMA) was used for efficient, more economical, faster and easier analysis. The distributions of immunopositive cells were evaluated.

Semiquantitative estimation of the number of positive cells was determined and expressed semiquantitatively. The MCM2, MCM5, and MCM7 immunostaining distribution was significantly different in AK, BD, and SCC. Basal expression of all three proteins was observed more frequently in AK, diffuse expression dominated in BD, and peripheral and diffuse distributions were observed in almost equal numbers in SCC. For *in situ* lesion classified as KIN, diffuse staining was more frequent in KIN3 than in KIN1, KIN2, or KIN1 and KIN2 combined and more frequent in KIN2 than in KIN1. All three proteins showed peripheral distribution in most SCC-WD cases and diffuse distribution in SCC-PD; peripheral and diffuse distributions were present in similar numbers of SCC-MD cases. Analysis of the immunostaining distribution in relation to SCC prognostic parameters showed more frequent diffuse staining in larger and thicker tumors, but the difference was statistically significant only for the 6-mm thickness threshold. Semiquantitative estimation of the number of positive cells showed the strongest association with lesion type using the 50% cut-off value. There was a statistically significant difference between AK, BD, and SCC, except for MCM7 between AK and SCC. There was an increase in the number of positive cells from KIN1 to KIN3 and from SCC-WD to SCC-PD. The most pronounced difference was between KIN 3 and KIN1, KIN2, and KIN1 and KIN2 combined, whereas the difference was less prominent when KIN1 and KIN2 were compared for MCM2 and MCM5, or did not reach statistical significance for MCM7. With respect to SCC grade, all MCM proteins showed highly significant differences between SCC-WD and both SCC-MD and SCC-PD and slightly less prominent differences between SCC-MD and SCC-PD. Analysis of the extent of immunostaining using the 50% threshold revealed statistically significant differences for

all MCM proteins in relation to 6-mm thick SCC. No association between the size of the lesion and the level of MCM expression could be established.

This is the first study in which distribution and expression of MCM proteins was evaluated in the keratinocyte skin neoplasms. Results from this analysis on MCM2, MCM5, and MCM7 expression in AK, BD, and SCC showed more prominent diffuse distribution and higher numbers of positive cells in BD than in AK, in KIN3 than in KIN1 and KIN2, and in SCC-PD than in SCC-WD, suggesting their role in the progression of both *in situ* and invasive cutaneous SCC. Comparison with SCC prognostic features revealed correlation only with 6 mm tumor thickness, which could imply association of MCM proteins with the high-risk factors in SCC. Finally, we observed similar results with all three MCM proteins, supporting them as suitable markers for the evaluation of progressing *in situ* lesions and possible indicators of invasive tumors with higher risk for metastatic dissemination.

KEYWORDS: actinic keratosis; squamous cell carcinoma of the skin; minichromosome maintenance proteins

SCIENTIFIC FIELD: Dermat oncology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. In situ i inavazivni planocelularni karcinom kože.....	2
1.1.1. SOLARNA (AKTINIČNA) KERATOZA.....	2
1.1.1.1. DEFINICIJA.....	2
1.1.1.2. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA.....	5
1.1.1.3. UČESTALOST, UZRAST I POL.....	7
1.1.1.4. LOKALIZACIJA.....	8
1.1.1.5. KLINIČKA SLIKA.....	9
1.1.1.6. HISTOLOŠKA SLIKA.....	11
1.1.1.7. KIN KLASIFIKACIJA AK.....	13
1.1.1.8. TERAPIJA AK.....	15
1.1.2. BOWEN-ova BOLEST.....	18
1.1.2.1. DEFINICIJA.....	18
1.1.2.2. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA.....	19
1.1.2.3. UČESTALOST, UZRAST I POL.....	21
1.1.2.4. LOKALIZACIJA.....	22
1.1.2.5. KLINIČKA SLIKA.....	23
1.1.2.6. HISTOLOŠKA SLIKA.....	24
1.1.2.7. TERAPIJA BD.....	25
1.1.3. PLANOCELULARNI KARCINOM KOŽE (SCC).....	26
1.1.3.1. DEFINICIJA.....	26
1.1.3.2. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA.....	26
1.1.3.3. UČESTALOST, UZRAST I POL.....	29
1.1.3.4. LOKALIZACIJA.....	31
1.1.3.5. KLINIČKA SLIKA.....	31
1.1.3.6. HISTOLOŠKA SLIKA.....	33
1.1.3.7. TERAPIJA SCC.....	39
1.2. Čelijski ciklus i kancerogeneza.....	41
1.2.1. ČELIJSKI CIKLUS.....	41
1.2.1.1. INICIJACIJA REPLIKACIJE DNA.....	44
1.2.1.2. STVARANJE REPLIKACIONE VILJUŠKE.....	48
1.2.1.3. ODRŽAVANJE GENSKE STABILNOSTI.....	49

1.2.2. PROTEINI ODRŽAVANJA MINIHROMOZOMA	51
1.2.3. ĆELIJSKI CIKLUS, PROTEINI ODRŽAVANJA MINIHROMOZOMA I KANCEROGENEZA.....	55
1.2.4. ĆELIJSKI CIKLUS I PLANOCELULARNI KARCINOM KOŽE.....	58
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	61
3. MATERIJAL I METODE.....	63
3.1. MATERIJAL.....	64
3.2. METODE.....	65
3.2.1. Formiranjem tkivnog mikroniza.....	65
3.2.2. Imunohistohemijski protokol.....	66
3.2.2.1. Priprema uzoraka.....	66
3.2.2.2. Deparafinizacija.....	66
3.2.2.3. Blokada endogene peroksidaze.....	66
3.2.2.4. Antigensko demaskiranje.....	66
3.2.2.5. Primarna antitela.....	67
3.2.2.6. Vizuelizacioni sistem.....	67
3.2.2.7. Dehidracija isečaka.....	67
3.2.2.8. Kontroli uzorci.....	67
3.2.2.9. Evaluacija imunohistohemiskog bojenja.....	67
3.2.2.10. Automatsko brojanje ćelija.....	68
3.2.2.11. Statistička analiza rezultata.....	73
4. REZULTATI.....	73
4.1. Ekspresija MCM2.....	74
4.1.1. Distribucija.....	74
4.1.1.1. Distribucija ciklina MCM2 prema histopatološkoj dijagnozi.....	74
4.1.1.2. Distribucija MCM2 prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN)....	76
4.1.1.3. Distribucija MCM2 prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC).....	77
4.1.1.4. Distribucija MCM2 prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC).....	78
4.1.1.5. Distribucija MCM2 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC)	79
4.1.1.6. Distribucija MCM2 proteina prema površini planocelularnog karcinoma (SCC).....	80
4.1.1.7. Distribucija MCM2 proteina prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN).....	80

4.1.2. Obim ekspresije (semikvantitativno, do i preko 50% pozitivnih ćelija).....	82
4.1.2.1. Odnos obima ekspresije MCM2 prema histopatološkoj dijagnozi.....	82
4.1.2.2. Odnos obima ekspresije MCM2 prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN).....	83
4.1.2.3. Odnos obima ekspresije MCM2 prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC).....	84
4.1.2.4 Odnos obima ekspresije MCM2 prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC).....	84
4.1.2.5. Odnos obima ekspresije MCM2 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC).....	85
4.1.2.6. Odnos obima ekspresije MCM2 prema površini planocelularnog karcinoma (SCC).....	86
4.1.2.7. Odnos obima ekspresije MCM2 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN).....	86
4.1.3. Obim ekspresije (semikvantitativno, manje od 33%, od 33-66% i preko 66% pozitivnih ćelija).....	87
4.1.3.1. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema histopatološkoj dijagnozi.....	87
4.1.3.2. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN).....	88
4.1.3.3. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC).....	89
4.1.3.4. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC).....	90
4.1.3.5. Odnos obima ekspresije MCM2 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC).....	90
4.1.3.6. Odnos obima ekspresije MCM2 prema površini planocelularnog karcinoma (SCC).....	91
4.1.3.7. Odnos obima ekspresije MCM2 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN).....	92
4.2. Ekspresija MCM5.....	93
4.2.1. Distribucija.....	93
4.2.1.1. Distribucija MCM5 prema histopatološkoj dijagnozi.....	93

4.2.1.2. Distribucija proteina MCM5 prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN).....	95
4.2.1.3. Distribucija MCM5 proteina stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC).....	96
4.2.1.4. Distribucija MCM5 prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC).....	96
4.2.1.5. Distribucija MCM5 proteina prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC).....	97
4.2.1.6. Distribucija MCM5 proteina prema površini planocelularnog karcinoma (SCC).....	98
4.2.1.7. Distribucija MCM5 proteina prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN).....	99
4.2.2. Obim ekspresije (semikvantitativno, do i preko 50% pozitivnih ćelija).....	100
4.2.2.1. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema histopatološkoj dijagnozi.....	100
4.2.2.2. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN).....	101
4.2.2.3. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC).....	102
4.2.2.4. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC).....	103
4.2.2.5. Odnos obima ekspresije MCM5 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC).....	103
4.2.2.6. Odnos obima ekspresije MCM5 prema površini planocelularnog karcinoma (SCC).....	104
4.2.2.7. Odnos obima ekspresije MCM5 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN).....	104
4.2.3. Obim ekspresije (semikvantitativno, manje od 33%, od 33-66% i preko 66% pozitivnih ćelija).....	105
4.2.3.1. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema histopatološkoj dijagnozi.....	105
4.2.3.2. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN).....	106
4.2.3.3. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC).....	107
4.2.3.4. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC).....	108

4.2.3.5 Odnos obima ekspresije MCM5 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC).....	109
4.2.3.6. Odnos obima ekspresije MCM5 prema površini planocelularnog karcinoma (SCC).....	110
4.2.3.7. Odnos obima ekspresije MCM5 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN).....	111
4.3. Ekspresija MCM7.....	112
4.3.1. Distribucija.....	112
4.3.1.1. Distribucija MCM7 prema histopatološkoj dijagnozi.....	112
4.3.1.2. Distribucija proteina MCM7 prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN).....	114
4.3.1.3. Distribucija MCM7 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC).....	116
4.3.1.4. Distribucija MCM7 prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC).....	116
4.3.1.5. Distribucija MCM7 proteina prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC).....	116
4.3.1.6. Distribucija MCM7 proteina prema površini planocelularnog karcinoma (SCC).....	118
4.3.1.7. Distribucija MCM7 proteina prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN).....	118
4.3.2. Obim ekspresije (semikvantitativno, do i preko 50% pozitivnih ćelija).....	120
4.3.2.1. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema histopatološkoj dijagnozi.....	120
4.3.2.2. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN).....	121
4.3.2.3 Odnos obima ekspresije MCM7 prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC).....	122
4.3.2.4. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC).....	122
4.3.2.5. Odnos obima ekspresije MCM7 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC).....	123
4.3.2.6. Odnos obima ekspresije MCM7 prema površini planocelularnog karcinoma (SCC).....	124
4.3.2.7. Odnos obima ekspresije MCM7 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN).....	124

4.3.2. Obim ekspresije (semikvantitativno, manje od 33%, od 33-66% i preko 66% pozitivnih ćelija).....	125
4.3.2.1. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema histopatološkoj dijagnozi.....	125
4.3.2.2. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN).....	126
4.3.2.3. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC).....	127
4.3.2.4. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC).....	128
4.3.2.5. Odnos obima ekspresije MCM7 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC).....	128
4.3.2.6. Odnos obima ekspresije MCM7 prema površini planocelularnog karcinoma (SCC).....	130
4.3.2.7. Odnos obima ekspresije MCM7 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN).....	130
4.4. Automatsko brojanje ćelija.....	132
5. DISKUSIJA.....	136
6. ZAKLJUČCI.....	180
7. LITERATURA.....	183

1. UVOD

1.1. In situ i inavazivni planocelularni karcinom kože

1.1.1. SOLARNA (AKTINIČNA) KERATOZA

1.1.1.1. DEFINICIJA

Aktinična keratoza (engl. actinic keratosis, AK) predstavlja kutanu neoplazmu nastalu proliferacijom citološki abnormalnih epidermalnih keratinocita (Duncan i sar., 2012; Ackerman i Mones, 2006), usled izmenjene regulacije razvoja ovih ćelija (Rossi i sar., 2007). Neoplastično izmenjeni keratinociti ograničeni su na epiderm (Rigel i sar., 2008; Berner 2005) te se, stoga, AK može definisati kao intraepidermalna proliferacija atipičnih keratinocita (Ackerman i Mones, 2006).

U bukvalnom prevodu, aktinična keratoza znači stanje (-osis) povećanja keratotičnog tkiva (kerat-) indukovano svetlosnim zracima (-aktis), uglavnom UV (engl. ultraviolet – UV) zračenjem (Duncan i sar., 2012). Zbog uloge sunčevih (UV) zraka u etiologiji ove vrste promena, AK je nazivana solarna, a zbog pojave u starijoj životnoj dobi i senilna keratoza (Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008). Termin aktinična keratoza je relativno skorašnji i kraće se koristi, ali je u potpunosti je zamenio prethodna dva naziva, umnogome jer se skraćenica SK najčešće koristi za termin seboroična keratoza (Rigel i sar., 2008).

Prvi histološki opis koji odgovara AK dao je francuski dermatolog Dubreuilh još krajem devetnaestog veka, imenujući ga “keratosis senilis” i prvi predstavio koncept prekancerozne keratoze koja ima prirodnu tendenciju da pređe u epitelini kancer (Dubreuilh 1898). Freudenthal, nemački dermatolog i dermatopatolog, je 1926.godine prikazao definitivne histopatološke karakteristike keratosis senilis, pokušavajući da utvrdi “tranziciju“ ovih lezija do kancera (Freudenthal 1926). Nakon toga, američki dermatopatolog Sutton je dao svoju histopatološku verziju suprotno prekanceroznom konceptu koji je Dubreuilh predložio, a podržavajući Freudenthalov koncept konverzije ka karcinomu, tvrdeći da solarna keratoza nije ništa drugo do superficijalni skvamocelularni karcinom (engl. squamous cell carcinoma, SCC) (Sutton 1938). Nemački dermatolog i dermatopatolog Lever je 1949.godine definisao keratosis senilis kao SCC gradusa ½. (Lever 1949). U daljoj kategorizaciji ove vrste promena, Pinkus je

1958.godine u potpunosti opisao ovaj entitet i predložio naziv aktinična keratoza (Pinkus 1958). Dakle, AK je kao entitet/ pojam opisana krajem devetnaestog veka, a akademska o rasprava o njenom biološkom toku razvoja (engl. natural history) i malignom potencijalu traje od početka dvadesetog veka (Werner i sar., 2013). Pojedini autori idalje smatraju AK prekanceroznom ili premalignom lezijom, sa potencijalom za razvoj u skvamocelularni/planocelularni karcinom (Callen 1997; Habif 1996; MacKie 2004; Jorizzo i sar., 2004; Yu i sar., 2003; Odom i sar., 2000; Feldman i Fleischer, 2011). Termin “premaligna” koristi se jer su u ovoj vrsti lezija atipični keratinociti ograničeni na deo epiderma (Rigel i sar., 2008). U ovom svetlu AK se predstavlja kao intraepidermalna keratinocitna displazija (Heaphy i Ackerman, 2000) ili samo epidermalna displazija (Rosen i Lebwohl, 2013), a pojedni autori je čak definišu kao benignu intraepitelialnu neoplazmu koju čine proliferisani atipični keratinociti, a koja može progredirati u SCC (Schmitt i Miot, 2012). Drugi autori, pak, redefinišu AK i prema ovom konceptu termin “premaligno” nije tačan i adekvatan, već se AK smatra kancerskom lezijom (Heaphy i Ackerman, 2000), malignom neoplazmom – kancerom (Ackerman 1997; Ackerman i Mones, 2006; Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008), incipijentnim SCC (Ackerman 1997), malignom neoplazmom u evoluciji (Fu i Cockerell, 2003), epitelnom neoplazijom od samog početka (Salache 2000; Cockerell 2000), superficialnim SCC (Heaphy, Ackerman 2000; Werner i sar., 2013), superficijalnim SCC in situ (Rosen i sar., 2013), početnom formom ili inicijalnom fazom SCC tj. intraepitelnim SCC u evoluciji (Duncan i sar., 2012). AK se, dakle, može definisati kao početni deo spektra ne-melanomskog kutanog kancera (engl. non-melanoma skin cancer – NMSC) (Duncan i sar., 2012), tj. keratinocitne neoplazme (Ackerman i Mones, 2006) ili inicijalna lezija u kontinuumu bolesti koja može progredirati u SCC (Duncan i sar., 2012; Rosen i Lebwohl, 2013). Na ćelijskom nivou, AK i superficijalni SCC su identični ne mogu se razlikovati (Cockerell 2003; Fu i Cockerell, 2003; Yantsos i sar., 1999). Činjenicu da je AK incipijentna forma SCC, osim preklapajuće histološke abnormalnosti i karakteristike da se AK najčeće nalazi na obodu SCC lezija, potvrđuju i saznanja da oba entiteta imaju veoma sličan profil genske ekspresije. Molekularnom analizom utvrđen je sličan genski profil AK i SCC, uključujući alteraciju p53, p16INK4a, MYC i receptora za epidermalni faktor rasta (Ratushnu i sar., 2012). Prema podacima studije u kojoj je analizirano 47 000 gena kod AK i SCC, tehnikom mikronizova DNK, (DNA microarray) i njihovim profiliranjem, samo devet gena je pokazalo različitu ekspresiju (Ra i sar., 2011).

U tom smislu, s obzirom da AK karakteriše proliferacija keratinocita ograničenih na epidem, a odražavajući kontinuum progresije ove vrste promena, predložene su i nove nomenklature za AK, npr. *keratinocitna intraepidermalna neoplazija* (engl. keratinocytic intraepidermal neoplasia, KIN) prema analogiji sa cervikalnom intraepidermalnom neoplazijom (Yantsos i sar., 1999; Cockerel 2000; Cockerel i Wharton, 2005), zatim *solarni keratotični intraepitelialni skvamocelularni karcinom* (Heaphy i Ackerman, 2000) ili in situ SCC tip AK I-III (Rowert-Huper i sar., 2007), *proliferativna aktinična keratoza*, prema Goldenbergovom konceptu ili *inflamirana aktinična keratoza*, u okviru kog naziva Berhane deli spektar AK na tri podgrupe prema kliničkim kategorijama (Anwar i sar., 2004). Iako ovi nazivi bolje odražavaju prirodu samog oboljenja, naglašavajući progresivnu karakteristiku ovih keratinocitnih lezija i koncept AK kao inicijalne lezije u kontinuumu bolesti, još uvek nisu stekli široku primenu.

Ono što AK čini još uvek nepotpuno definisanim entitetom je hronična i dinamična priroda ove dermatoze. U tom smislu razumljivo je zašto postoje kontroverze u definisanju AK, s obzirom da ova vrsta promena može imati potpuno različito biološko ponašanje tokom vremena, pokazujući, sa jedne strane, potencijal za progresiju u SCC ili, sa druge strane, sklonost regresiji, a kod pojedinih AK, mogu biti izražena oba oblika ponašanja istovremeno (Werner i sar., 2013). Dakle, ne progrediraju sve AK u SCC (Duncan i sar., 2012), a koja AK će se razviti u invazivni SCC (engl. invasive squamous cell carcinoma, ISCC) nije lako predvidivo (Marks i sar., 1988) i za sada nema striktnih, kliničkih kriterijuma prema kojima bi se moglo odrediti koja AK će vremenom preći u invazivni tumor (Rosen i Lebwohl, 2013; Marks i sar., 1988). To zavisi od puno faktora, prvenstveno imunskog odgovora domaćina i karakteristika keratinocita (Fu i Cockerell, 2003). Prema pojedinim studijama, progresija AK u SCC iznosi 0-0.53% po leziji godišnje; regresija pojedinačnih lezija javlja se kod 15-63% godišnje, sa procentom ponovnog javljanja od 15-53%. Spontana, kompletna regresija na većem polju kao što je lice ili skalp može nastati se kod 0-7.2% pacijenta (Werner i sar., 2013). Takodje, u literaturi se navodi da čak do 25% AK može regresirati tokom godinu dana, naročito ukoliko se smanji izloženost UV zracima ili redovno koristi antisolarna zaštita (Duncan i sar., 2012). Prema drugim podacima razvoj invazivnog SCC iz postojeće AK se procenjuje na 0.075–0.096% po leziji godišnje (Cockerell 2003; Rigel i sar., 2008). Dakle, za osobu sa 7.7 AK, što predstavlja prosečan broj lezija na koži kod jedne osobe, SCC će se razviti u stopi 10.2% u periodu od 10 godina (Cockerell 2003; Rigel i sar., 2008). Druge publikovane stope su i veće i iznose 13-20% kod nelečenih promena u

desetogodišnjem periodu. Ovi podaci su slični podacima kod drugih intraepitelijalnih neoplazija (Rigel i sar., 2008) kao npr. u slučaju nelečene neoplazme grlića materice gde približno 15% cervikalne intraepidermalne neoplazije (CIN) niskog ili srednjeg gradusa (CIN I I II) progredira u in situ formu (CIN III) i uznapređovalu formu karcinoma sa zahvatanjem dubljih slojeva, obično tokom perioda od 10-20 godina, a retko i tokom samo 6 meseci (Rigel i sar., 2008). Vreme za koje AK predje u invazivni SCC iznosi približno dve godine, s tim što kod imunokompromitovanih pacijenata može biti i kraće (Schmitt i Miot, 2012). Marks i saradnici su izračunali da rizik od progresije AK u SCC iznosi manje od 1 prema 1000 tokom jedne godine (Marks i sar., 1988). U drugoj studiji autori su, koristeći matematičku ekstrapolaciju, utvrdili značajno veću stopu transformacije, od 6 do 10% tokom 10 godina (Dodson i sar., 1991). Prema podacima iz pet kliničkih studija za period od 1988. do 1998. godine, rizik od progresije AK u SCC za individualnu leziju iznosio je od 0.025% do 16% godišnje (Duncan i sar., 2012). Takođe, procenjeno je da se 27-82% SCC razvije iz postojeće AK (Schmitt i Miot, 2012), 26.7% iz same lezije, a 55.7% iz neposredne blizine/okoline (Lebwohl 2003), kao i da se u 82 (Schmitt i Miot, 2012) -97% (Schmitt i Miot, 2012; Cockerell 2003) slučajeva AK nalazi u okolini SCC.

Osim zbog njihovog potencijanog razvoja u invazivni SCC, AK su klinički značajne lezije i zbog činjenice da su pokazatelji individualne sklonosti za razvoj melanoma ili ne-melanomskih kancera kože kod određene osobe, pre svega bazocelularnog karcinoma (engl. basal cell carcinoma, BCC) (Duncan i sar., 2012). Restrospektivnom multivariacionom analizom utvrđeno je da starije osobe sa AK imaju šest puta veći rizik za razvoj malignih tumora generalno, pa se AK mogu smatrati markerom za fenotip sa većim rizikom za razvoj različitih tumora (Schmitt i Miot, 2012). Prisusvo AK šestostruko povećava rizik od razvoja kutanih maligniteta generalno (Chen i sar., 2005). U tom smislu, osobe sa AK je neophodno dugoročno pratiti u smislu prevencije, rane dijagnostike i blagovremenog lečenja kutanih maligniteta (Duncan i sar., 2012).

1.1.1.2. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA

Iako u razvoju AK ulogu imaju i geneski faktori i faktori sredine (Duncan i sar., 2012; Schmitt i Miot, 2012), odavno je sasvim jasno da je najznačajniji faktor koji

doprinosi stvaranju AK česta izloženost UV zračenju tj. sunčevoj svetlosti (Duncan i sar., 2012). UV radijacija predstavlja glavni faktor u nastajanju AK (Duncan i sar., 2012; Berman i Cockerell, 2013), jer dovodi do inicijalne mutacije u keratinocitima (Berman i Cockerell, 2013). Pored toga, ima uticaj i na ekspanziju tumorskih ćelija (Berman i Cockerell, 2013). Dakle, UV radijacija UVB deo spektra (290-320nm) svojim mutagenim efektom ima ključnu ulogu u oštećenju keratinocitne DNA, utičući na formiranje timidinskih dimera (Cockerell 2003; Schmitt i Miot, 2012). Ove promene, posledično, dovode do mutacija na genima za telomerazu i p53 tumor supresorni protein (Schmitt i Miot, 2012). Pojačana aktivnost telomeraze i inaktivacija p53 onemogućavaju apoptozu oštećenih ćelija vodeći akumulaciji genskih oštećenja i produženju životnog veka ćelije do tačke besmrtnosti (Cockerell 2003). Kada sistem apoptoze ne funkcioniše, genski i imunosupresivni poremećaji dovode do aberantne proliferacije, koja može nastati usled poremećaja različitih signalnih puteva (Berman i Cockerell, 2013). Pomenuta genska oštećenja dokazuju malignu prirodu AK (Cocckerell 2003). U tom smislu, smanjenje ozonskog omotača u stratosferi, kao prirodnog filtera za UV-B radijaciju, omogućava prodiranje veće količine ovog zračenja do zemljine površine predstavljajući, na taj način, glavni etiološki factor u porastu incidencije AK (Rossi i sar., 2007). Ozonski omotač filtira najveći deo UVB spektra, omogućavajući prodiranje samo 3-6% ovih zraka (Berman i Cockerell, 2013). Takodje, i UVA deo spektra (320-400nm) doprinosi oštećenju i to stvaranjem reaktivnih kiseoničnih jedinjenja, oksidativnim oštećenjima nukleinske kiseline, membrane i lipida (Berman i Cocckerell, 2013), imunosupresijom i parakrinim proliferativnim stimulusima iz fibroblasta (Schmitt i Miot, 2012). Ponovno jatrogeno izlaganje UV zračenju, u formi fototerapije, posebno UVA bez ili u kombinaciji sa psoralenom (PUVA) kao fotosenzibilizatorom, može indukovati AK i povećava rizik za nastanak AK i SCC (46% i 19%) (Schmitt i Miot, 2012). Dakle, UV radijacija utiče na nastanak AK i posledičnu transformaciju u ISCC na dva načina – prvo, ono izaziva mutacije na dezoksiribonukleinskoj kiselini (DNK), koje, ukoliko se ne poprave, vode u nekontrolisan ćelijski rast i formiranje tumora; i drugo, deluje imunosupresivno, onemogućavajući borbu organizma protiv tumora (Duncan i sar., 2012). Vitiligo kao entitet, udružen je sa povećanim rizikom za razvoj AK usled nedostatka UV protekcije melaninom, ali i zbog prolongirane UV terapije (Akimoto 2000).

1.1.1.3. UČESTALOST, UZRAST I POL

AK predstavlja veoma čestu kutanu neoplazmu (Rossi i sar., 2007) i činjenica da milioni pacijenata širom sveta imaju promene ovog tipa čini je jednom od najčešćih dermatoloških stanja (Schmitt i Miot, 2012). Incidencija AK je u porastu (Schmitt i Miot, 2012), naročito među starijom populacijom (Uhlenhake i sar., 2010) i u populaciji koja živi u zoni bliže ekvatoru (Lucas i sar., 2006; Rosen i Lebwohl, 2013). Prema sudiji sprovedenoj u Južnoj Koreji koja je obuhvatila šesnaestogodišnji period od 1991. do 2006. godine, utvrđeno je povećanje incidencije 2.14 puta u odnosu na poslednju dekadu dvadesetog veka (1991-1998) (Kim i sar., 2010).

Prevalencija AK razlikuje se prema regiji i populaciji u kojoj se procenjuje. Regioni sa većom UV ekspozicijom imaju veću prevalenciju AK. Na primer, u Australiji (Queensland) ona iznosi 55% kod muškaraca i 37% kod žena, između 30-70. godine života (Frost i sar., 2000), dok je u Engleskoj 15.4% kod muškaraca i 5.9% kod žena starijih od 40 godina (Memon i sar., 2000; Rosen i Lebwohl, 2013). Ova stopa se retrospektivno povećava na 34.1% i 18.2% kod osoba starijih od 70 godina, posebno ukoliko postoji udruženost sa znacima ekspozicije suncu kao što su solarna elastozna i lenigo (Memon i sar., 2000; Rosen i Lebwohl, 2013). U Južnom Velsu prevalencija je 23% (Rosen i Lebwohl, 2013), dok se u SAD se kreće od 16-25% (Salashe 2000). U studiji rađenoj u Sao Paulu (Sao Paulo), na grupi ispitanika japanskog porekla, prevalencija je iznosila 13.4%, a prosečna godina pojave promena bila je 69 (Isaoka i sar., 2009). Prevalencija AK raste kod populacije starije životne dobi i iznosi od 10% kod osoba svetle puti uzrasta od 20-29. godina, do 80% kod osoba uzrasta 60-69 godina (Duncan i sar., 2012). U SAD, 2004. godine prevalencija je procenjena na 39.5 miliona, od čega su 26 miliona bili pacijenti stariji od 65 godina (Uhlenhake 2013).

Da je AK često kutano oboljenje pokazuju i podaci iz SAD, gde je tokom desetogodišnjeg perioda (1990-1999. godine) AK je bila razlog pregleda kod 47 miliona pacijenata ili je činila 14% svih dermatoloških pregleda (Gupta i sar., 2002), a 2002. godine više od 8.2 miliona poseta lekaru bilo je u vezi sa AK (Cohen 2010). Kao primarna dijagnoza AK je utvrđena kod 4.55 miliona prvih lekarskih pregleda u periodu 1993-1994. godine, prema podacima Nacionalne ambulante za zdravstvenu zaštitu i istraživanje u SAD (Salashe 2000). Prema studiji rađenoj u Brazilu 2006. godine, AK je bila četvrta dijagnoza po učestalosti, utvrđena kod 5,1% pacijenata, a u Francuskoj je 2008. godine dijagnostikovana kod 4.7% pacijenata (Schmitt i Miot, 2012). U Australiji

se procenjuje da 40-50% populacije uzrasta preko 40 godina ima najmanje jednu leziju (Schmitt i Miot, 2012), dok prema podacima studije koja je rađena u Italiji, prosečan broj AK bio je 6-8 AK kod pacijenata na prvom pregledu (Rossi i sar., 2007).

U nezavisne faktore rizika za razvoj AK spadaju godine - stariji uzrast (Rigel i sar., 2008; Rosen i Lebwohl, 2013; Duncan i sar., 2012; Rossi i sar., 2007; Schmitt i Miot, 2012), pol (Rossi i sar., 2007; Duncan i sar., 2012) i to muski (Duncan i sar., 2012; Rosen i Lebwohl, 2013; Schmitt i Miot, 2012), kumulativna izloženost suncu (Berman i Cockerell, 2013; Duncan i sar., 2012; Rosen i Lebwohl, 2013; Rossi i sar., 2007; Rigel i sar., 2008; Uhlenhake i sar., 2010), tip kože (Duncan i sar., 2012; Rosen i Lebwohl, 2013; Rossi i sar., 2007; Rigel i sar., 2008; Uhlenhake i sar., 2010), geografska širina (Stockfleth i Kerl, 2006), povećana izloženost sunčevoj svetlosti (tokom odmora ili rekreacije) (Stockfleth i Kerl, 2006), kumulativna izloženost sunčevim zracima (Duncan i sar., 2012; Rosen i Lebwohl; 2013, Rigel i sar.; 2008), izloženost arteficialnim izvorima UV zračenja (Rossi i sar., 2007) kao što je korišćenje solarijuma (Duncan i sar., 2012), pozitivna lična anamneza u smislu kancera kože (Schmitt i Miot, 2012), ranijeg prisustva AK (Duncan i sar., 2012), intenzivnim opekotinama od sunca u detinjstvu (Stockfleth i Kerl, 2006), pojedina genetska oboljenja kao što su xeroderma pigmentosum (Rossi i sar., 2007; Stockfleth i Kerl, 2006) i albinizam (Rossi i sar., 2007), imunodeficijencija (Duncan i sar., 2012; Stockfleth i Kerl, 2006) i primena hemioterapije (Duncan i sar., 2012). Svakako, AK se mogu javiti i kod mladih osoba, posebno ukoliko su pretrpele značana izlaganja suncu (Duncan i sar., 2012).

1.1.1.4. LOKALIZACIJA

AK se najčešće javljana na fotoeksponiranim regijama (Berman i Cockerell, 2013, Rosen i Lebwohl, 2013; Rossi i sar., 2007; Duncan i sar., 2012; Schmitt i Miot, 2012; Rigel i sar., 2008), najčešće na glavi, (Cohen 2010; Rosen i Lebwohl; 2013, Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008), poglavini (Schmitt i Miot, 2012; Rossi i sar., 2007) posebno bez kose ili sa proređenom kosom (Berman i Cockerell, 2012, Rosen i sar., 2013), na licu (Berman, Cockerel 2012; Schmitt i Miot, 2012; Rosen i Lebwohl, 2013; Rigel i sar., 2008), vratu (Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008; Schmitt i Miot, 2012), predelu dekoltea (Schmitt i Miot, 2012), podlakticama (Berman i Cockerell, 2012; Duncan i sar., 2012; Rosen i sar., 2013), dorzumima šaka (Berman i Cockerell, 2012;

Duncan i sar., 2012; Rossi i sar., 2007; Schmitt i Miot, 2012; Rosen i sar., 2103) i gornjim partijama leđa (Rossi i sar., 2007). Od toga 75% promena se verifikuje na glavi, vratu i podlakticama (Rosen i Lebwohl, 2013). Promene mogu biti pojedinačne, mada su obično grupisane na zonama najintenzivnijeg izlaganja suncu. Promene se, značajno ređe, mogu naći i na drugim lokalizacijama, čak i na delovima kože koji nisu izloženi UV zračenju (Rigel i sar., 2008).

1.1.1.5. KLINIČKA SLIKA

Prema kliničkim karakteristikama, AK možemo podeliti na tipične i atipične.

Tipične ili eritematozne se najčešće, javljaju se u vidu sporo rastućih (Schmitt i Miot, 2012), crvenih papula (Rigel i sar., 2008; Duncan i sar., 2012; Schmitt i Miot, 2012), minimalno infiltriranih (Schmitt i Miot, 2012), najčešće 2 do 6mm u dijametri, ređe u vidu plakova (Rossi i sar., 2007) koji mogu varirati u veličini, dostižući i više cm u dijametri (Duncan i sar., 2012). Obično su ravne površine (Duncan i sar., 2012), nekada sa telangiektazijama (Rossi i sar., 2007; Schmitt i Miot, 2012), mada se inicijalno mogu javiti i u formi eritematoznih makula sa pričvršćenom skvamom (Rigel i sar., 2008), za koje se kaže da ih je “često lakše napipati nego videti” (Duncan i sar.,2012). Na okolnoj koži obično se, klinički, uočavaju znaci fotooštećenja u vidu suve kože (Rossi i sar., 2008) izmenjene pigmentacije (Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008), sa pegama ili solarnim lentigom (Duncan i sar.,2012) i većim brojem bora (Rigel i sar., 2008), Retko, AK mogu biti pigmentovane, sa perifernim širenjem, što diferencijalno-dijagnostički može ličiti na lentigno maligna (Rossi i sar., 2007).

AK se retko razvijaju kao solitarne lezije (Stockfleth i Kerl, 2006), uglavnom su promene ovog tipa multiple (Schmitt i Miot, 2012; Rossi i sar., 2007; Rosenn i Lebwohl, 2013) i javljaju se na tzv. poljima kancerizacije (engl. field cancerisation) (Rossi i sar., 2007). Prosečan broj AK kod jedne osobe iznosi 6 do 8 prilikom prvog dermatološkog pregleda (Rossi i sar., 2007).

Pored tipičnih-eritematoznih AK postoje i drugi klinički subtipovi ovih promena. **Hipertrofične AK (HAK)** se karakterišu debljim, skvamoznim papulama ili plakovima, boje kože, sivkastog ili eritematoznog tona (Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008). Eritematozna osnova je obično šira od skvame koja je prekriva (Rigel i sar., 2008). Hiperkeratotična skvama vremenom postaje beličasta ili zučkasto-smeđa (Rigel i sar.,

2008). Ovakve vrste promena mogu se naći na bilo kojoj foto-eksponiranoj regiji, ali se najčešće viđaju na dorzumima šaka, ramenima i kapilicijumu (Duncan i sar., 2012), a pacijentima smetaju upravo zbog debljine (Rigel i sar., 2008). HAK je često teško klinički razlikovati od SCC, pa je biopsija u ovoj formi AK neophodna (Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008) i to dovoljno duboka kako bi tačno mogla da se proceni eventualna proliferacija keratinocita u dermu (Duncan i sar., 2012). Jedna od kliničkih varijanti HAK je tzv. **kožni rog** (cornu cutaneum, CC) (Rigel i sar., 2008; Duncan i sar., 2012), koji se manifestuje honičnom hipertrofičnom protuberancijom na papuloznoj bazi eritematoznoj ili boje kože (Duncan i sar., 2012). Prema definiciji CC mora biti visine koja iznosi barem ½ najdužeg dijametra osnove. Od 38% do 40% CC predstavlja AK (Duncan i sar., 2012). **Aktinični heilitis** (engl. actinic heilitis, AH) predstavlja konfluentnu AK na usnama i to uglavnom na donjoj (Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008), obično kod ljudi hronično izloženim suncu (Rigel i sar., 2008). Klinički, AH može ličiti na klasičnu formu AK, u vidu jasno ograničene eritematozne papule ili plaka, nekada samo eritema sa skvamom koji može zahvatati čitavu donju usnu (Rigel i sar., 2008). Ređe, AH se manifestuje erozijom ili frisurom na izmenjenoj, eritematoznoj, suvoj, ispucaloj usni, perzistentna ulceracija ili infiltrisana zona i leukoplakija (bela ploča) uvek zahteva histološku verifikaciju u smislu mogućeg SCC (Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008).

Pigmentna AK (engl. *pigmented* AK - PAK), je podtip AK kod koga često nedostaje eritem, ali je prisutna pigmentacija mrežastog oblika. Ove vrste promena je klinički često teško razlikovati od retikularne seboroične keratoze, lentiga, pa čak i lentigo maligna vrste melanoma. Dermatoskopski pregled, u tom slučaju, može biti od pomoći (Tschandl i sar., 2015). Klinička prezentacija na fotoeksponiranoj koži, znaci solarnog oštećenja u okolini, hiperkeratoza koja se može palpatorno utvrditi govore u prilog PAK, ali je često histopatološka (HP) verifikacija neophodna u diferencijalnoj dijagnozi u odnosu na melanom (Rigel i sar., 2008). **Lihenoidna** AK (engl. *lichenoid* AK, LAK) čija je glavna karakteristika histološko prisusvo gustog, trakastog inflamatornog infiltrata, klinički se obično prezentuje (ili karakteriše) lezijama sličnim klasičnoj AK sa izraženijim eritemom, posebno u okolini lezije. Subjektivni simptomi u vidu pruritusa i senzitivnosti kod ove vrste AK su obično izraženiji i najčešće koincidiraju sa pojavom lihenoidnog infiltrata u postojećoj AK (Rigel i sar., 2008). **Atrofična** AK (engl. *atrophic* AK) se klinički manifestuje minimalnim promenama na površini kože obično u vidu

blagog crvenila sa diskretnom skvamom, a histološki atrofičnim epidermom (Rigel i sar., 2008).

Svaka induracija ili zadebljanje, bol i pojava ulceracija na već postojećim promenama ukazuju na moguću transformciju AK u SCC (Duncan i sar., 2012). Iako, nema jasnog načina da se klinički razlikuju AK i mikroinvazivni SCC, ipak, parametri koji mogu da upućuju na povećan rizik su induracija, (Duncan i sar., 2012; Schmitt i Miot, 2012), inflamacija (Duncan i sar., 2012; Schmitt i Miot, 2012; Berhane i sar., 2002), dijametar veći od 1cm, brzi rast, eritem, ulceracije (Duncan i sar., 2012, Schmitt i Miot, 2012), a HP verifikacijom klinički indurovanih AK u preko 50% slučajeva bude utvrđen SCC (Duncan i sar., 2012). Procenat metastaziranja SCC nastalih iz AK se različito navodi, od 1- 2% do preko 20% u zavisnosti, pre svega, od dubine invazije i lokalizacije promena (Duncan i sar., 2012). AK koje se javljaju na mukozi, posebno aktinični heilitis (Schmitt i Miot, 2012), kao i promene na ušnim školjkama i poglavini (Duncan i sar., 2012) obično prelaze u invazivni SCC slabijeg stepena diferencijacije (Duncan i sar., 2012) uz veći metastatski potencijal (Schmitt i Miot, 2012; Duncan i sar., 2012).

Dijagnoza AKse najčeće postavlja se na osnovu kliničke slike (Schmitt i Miot, 2012; Cockerell 2000) i dermoskopije kao neizvazivne metode (Tschandl i sar., 2015; Senel 2011; Lee i sar., 2013; Stockfleth i Kerl, 2006; Zalaudek i sar., 2012; Peris i sar., 2007). Novije dijagnostičke tehnike, kao što je konfokalna mikroskopija još uvek su u fazi kliničkih ispitivanja (Stockfleth i Kerl, 2006; Pellacani i sar., 2015).

Mada je klinička slika AK uglavnom karakteristična, lezije ponekad mogu ličiti na seboroičnu karatozu, Bowenovu bolest, SCC, BCC, diskoidni lupus erythematosus, solarni lentigo, porokeratozu i virusne bradavice (Schmitt i Miot, 2012). Dermoskopski, pigmentnu AK je neophodno razlikovati od lentigo maligna melanoma i superficijalnog i/ili pigmentovanog bazocelularnog karcinoma (Senel 2011).

1.1.1.6. HISTOLOŠKA SLIKA

Histološka potvrda AK je neophodna ukoliko postoji klinička sumnja (u dijagnostičkom smislu), kada su lezije u bilo kom smislu neobične, kao u slučaju velikih, eritematoznih, pruritičnih, infiltrativnih lezija, lezija koje krvare i ulcerišu (Cockerell 2003; Fu i Cockerell, 2003; Rossi i sar., 2007) ili ukoliko se planiraju specijalni vidovi

terapije (Stockfleth, Karl 2006). Sve pomenute pojave mogu govoriti u prilog progresije AK u SCC (Fu i Cockerell, 2003). Biopsiju je tehnički potrebno udariti tako da je, pored epiderma, neophodno zahvatiti i derm kako bi se mogla isključiti eventualna zahvacenost dubljih struktura (Cockerell 2003; Fu i Cockerell, 2003).

Histološki, AK se karakteriše fokusima u epidermu, u kojima se nalaze atipični, pleomorfni keratinociti (Cockerell 2000; Cockerell 2003; Fu i Cockerel, 2003; Rossi i sar., 2007). Bazalni sloj obično izgleda bazofilnije, zbog nagomilanih atipičnih keratinocita (Cockerell 2000; Cockerell 2003; Fu i Cockerell, 2003) koji pokazuju gubitak polarizacije, a atipične ćelije imaju pleomorfne nukleuse (većih dimenzija i hiperhromatične), svetlu ili vakuolizovanu eozinofilnu citoplazmu (Cockrerel 2003). Prisutni su hiperkeratoza i parakeratoza (parakeratoza obično nad zonama abnormalnih keratinocita u epidermu (Cockrell 2000; Cockerell 2003; Fu i Cockerell, 2003). Epiderm između adneksa, obično je izmenjen, dok je u okolini folikula dlake i ekrinih žlezda neizmenjen. Ovakav nalaz daje aspekt naizmeničnih vertikalnih pruga hiperkeratoze i parakeratoze, neizmenjenog epiderma i izmenjenog adneksalnog epiderma. U dermu su, obično, prisutni znaci bazofilne solarne elastoze i limfocitni infiltrat, perivaskularni ili lihenoidan, varijabilnog intenziteta (Rossi i sar., 2007; Roewert-Hubert, 2007). AK se gotovo uvek histološki nalazi sa znacima solarne elastoze u dermu, tako da je u slučaju nedostatka elementata solarne elastoze neohodno revidirati dijagnozu, osim ukoliko se radi o pacijentu sa genodermatozom i adnormalnom DNK reparacijom (Cockerell 2000; Cockerel 2003; Fu i Cockerell, 2003). Promene kod AK i SCC na citološkom novou su identične (Cockerel 2000; Cockerell 2003; Fu i Cockerell, 2003; Yantsos i sar., 1999, Schmitt i Miot, 2012), jer se u oba slučaja histološki nalaze atipični keratinociti sa gubitkom polariteta, nuklearnim pleomorfizmom, poremećenim sazrevanjem i povećanim brojem mitotskih figura (Akerman 2003), pa mozemo da kažemo da citotološki AK ispunjava sve kriterijume SCC.

Histološke karakteristike AK mogu se podeliti na promene koje se viđaju kod ranih i kod u potpunosti razvijenih lezija. *Rane lezije* karakterišu atipični keratinociti fokalno u bazalnom sloju epiderma, sa velikim pleomornim nukleusima, povećane gustine jedara, naizmenična pojava orto- i parakeratoze, kao i znaci solarne elastoze. *Potpuno razvijene lezije* karakteriše hiperlazija (retko atrofija) epiderma, naizmenična orto i parakeratoza, atipični keratinociti koji involviraju uglavnom donju polovinu epiderma, ponekad fokalno i čitav epiderm, atipični keratinociti duž adneksalnog epitela, diskeratotične ćelije i mitotske figure, solarna elastoza i limfocitni infiltrat varijabilne

gustine (Stockfleth i Kerl, 2006). Postoje različiti histološki tipovi AK, pa se u tom smislu ove vrste promena dele se na hipertrofični (James i sar., 2006; Rosso i sar., 2007), atrofični (James i sar., 2006; Rosso i sar., 2007), bovenoidni (James i sar., 2006; Rosso i sar., 2007), akantolitički (James i sar., 2006; Rosso i sar., 2007; Cockerell 2003), lihenoidni (James i sar., 2006; Rosso i sar., 2007), pigmentni (James i sar., 2006; Rosso i sar., 2007; Cockerell 2003) i epidermolitični tip (Rosso i sar., 2007). **Hipertrofični** tip se karakteriše izraženom hiperkeratozom, zadebljalim epidermom u pojedinim zonama, bez očigledne invazije derma. Kod **atrofičnog** tipa hiperkeratoza je umereno izražena, postoji atrofija epiderma sa atipičnim keratinocitima u bazalnom sloju. Kod **Bovenoidnog** tipa, atipija se uočava čitavom širinom epiderma, slično kao kod Bowenove bolesti (engl. Bowen's disease, BD) sa tom razlikom što je kod ovog tipa AK u folikularnom epidermu nema atipičnih keratinocita. **Akantolitički** tip karakteriše pojava "praznina" ili intercelularnih lakuna i gubitkom povezanosti keratinocita. U **lihenoidnoj** AK histološki se nalazi trakast infiltrat u zoni bazalne membrane, a kod **pigmentovane** forme postoji povećana količina melanina, posebno u bazalnim ćelijama, kao i veća koncentracija melanofaga u dermu. Treba naglasiti da se pomenute posebne karakteristike mogu preklapati, a da se histološki tip određuje prema najizraženijim karakteristikama (Rossi i sar., 2007; Roewert-Hubert i sar., 2007).

1.1.1.7. KIN KLASIFIKACIJA AK

Kao što je već pomenuto, AK predstavlja proliferaciju keratinocita ograničenu na epiderm, a prema nivou atipičnih keratinocita u epidermu predložena je posebna klasifikacija ovih promena. Naziv "*keratinocitna intraepidermalna neoplazija*" predložili su Cockerell i saradnici, 1999.godine (Yantsos i sar., 1999), analogno nazivu "cervikalna intraepidermalna neoplazija", u kome cervikalna intraepitelialna neoplazija (CIN) predstavlja inicijalnu "preinvazivnu" leziju cervikalnog karcinoma (Cockerell i Wharton, 2005). KIN klasifikacija bazirana je na kliničkoj slici, stepenu ćelijske atipije epidermalnih keratinocita i proširenosti atipičnih keratinocita u epidermu (Yantsos i sar., 1999). Ovako definisana AK ima tri faze tokom razvoja u SCC i to KIN1, KIN2 i KIN3 (Yantsos i sar., 1999). Najranije, obično subkliničke lezije, označene su kao KIN1. Ukoliko su klinički vidljive, lezije se obično manifestuju vidu ravnih eritematoznih makula ili plaža (engl. patch) na fotooštećenoj koži. Ponekad, postoji samo izmenjena

boja kože indikativna za solarno oštećenje, bez hrapavosti ili skvame. Histološki, kod KIN1 lezija uočavaju se hiperhromatični nukleusi sa malim ali prominentnim nukleolusima. Obično zadržavaju okrugli ili ovalni oblik, ali su varijabilni u veličini, uz gubitak nuklearnog polariteta. U većini ćelija nukleusi se nalaze orjentisani pod tupim uglom umesto normalno u odnosu na epiderm. Suprabazalni keratinociti retko ispoljavaju citoplazamsku bazofiliju ili eozinofiliju. Nema znakova hiperkeratoze ili parakeratoze. Histološke i citološke abnormalnosti su veoma diskretne u odnosu na okolni epiderm i epitel infundibuluma folikula, jer adneksali epiderm nije zahvaćen u KIN1 lezijama (Yantsos i sar.,1999). U ovom slučaju atipija je ograničena na bazalni i suprabazalni sloj (Schmitt i Miot, 2012). Sledeća faza u progresiji ovog procesa je KIN2. Ove lezije se manifestuju u vidu eritematoznih ili blede eritematoznih papula ili plakova sa grubom, hiperkeratotičnom površinom i minimalnom induracijom i predstavljaju promene koje se obično klinički smatraju AK (Yantsos i sar.,1999). Histološki, kod ove vrste promena proliferacija atipičnih keratinocita nalazi se u donje dve trećine epiderma (Yantsos i sar.,1999; Schmitt i Miot, 2012). Na manjem uveličanju, uočavaju se promene karakteristične za AK u vidu intraepidermalnih zona atipičnih keratinocita koje se smenjuju sa zonama neizmenjenog (normalnog) epiderma. Postoje zone orto- i parakeratoze. Na većem uveličanju nukleusi keratinocita u zahvaćenim zonama imaju nepravilne obrise i prominentne nukleoluse zbog kondenzovanog hromatina na periferiji nuklearne membrane. Broj mitotskih figura je povišen u bazalnom i suprabazalnom sloju. Promene u citoplazmi su očiglednije u odnosu na KIN1, i nalazi se eozinofilija, bazofilija, diskeratoza i ponekad svetloćelijska promena. Akantoliza i, retko, intraepidermalna vakuolizacija, mogu biti prisutne, a česta je i povećana pigmentacija. Lezije KIN2 se dodatno dele na KIN2a i KIN2b. KIN2a se sastoje od promena kod kojih atipični keratinociti zahvataju najmanje donje dve trećine epiderma uz abnormalno orožavanje. Ostale abnormalnosti, kao što su značajna akantozna ili zahvaćenost epitelnih struktura adneksa su odsutne. Ako se atipični keratinociti nalaze u strukturama adneksa ili ako postoji produžetak atipičnih keratinocita paralelno sa epidermom u papilarnom dermu lezije se klasifikuju kao KIN2b. Stepem hiperkeratoze, parakeratoze i akantozne je obično izraženiji nego u KIN2a. Klinički, KIN2a lezije su eritematoznije, indurovanije, a hiperkeratoza je više izražena nego kod KIN2a lezija. Sve KIN lezije na usni i konjunktivi se klasifikuju kao KIN2b kada zahvataju laminu propriju, zbog izraženijeg malignog potencijala (Yantos i sar.,1999). KIN3 je uznepredovalija forma proliferacije atipičnih keratinocita, ograničena na epiderm. Klinički, ove lezije su obično eritemo/skvamozni

plakovi na značajnije fotooštećenoj koži ili na koži bez fotooštećenja kao na primer kod Bowenoidne papuloze, eritroplazije Queyrat ili SCC in situ indukovanog arsenom (Yantsos i sar.,1999). Histološki, postoji proliferacija atipičnih keratinocita čitavom debljinom epiderma (Yantsos i sar.,1999; Schmitt i Miot, 2012), uključujući i adneksalne structure (Yantsos i sar.,1999). Akantozna je često iregularna, a nalaze se i papilomatoza, hiperkeratoza, parakeratoza i zahvatanje epitela infundibulima folikula dlake. Čelije su upadljivo atipične sa binuklearnim keratinocitima, prominentnom diskeratozom i ponekad abnormalnim mitotskim figurama. Akantoliza takođe može biti prisutna. Bowenoidna AK i SCC in situ predstavljaju forme KIN3.

1.1.1.8. TERAPIJA AK

Na početku priče o terapiji AK neophodno je napomenuti da je određenim merama prevencije moguće u značajnoj meri smanjiti pojavu ovih promena. U tom smislu, na prvom mestu je upotreba fotoprotektivnih faktora, prvenstveno antisolarnih kremova (engl. sun protection factor, SPF) više od 15, na svakih 2-3 sata, mehanička fotoprotekcija odećom i izbegavanje najjačeg sunca sredinom dana. Redovna primena antisolarnih kremova i korišćenje preventivnih faktora vremenom mogu redukovati i do 24% AK (Uhlenhake 2013).

Nedostatak kliničkih kriterijuma i nemogućnost predviđanja koja AK će perzistirati, koja će regredirati, a koja će postati invazivni SCC (Duncan i sar., 2012; Goldenberg i Perl, 2014; Samrao i Cockerell, 2013) čini terapiju ovog entiteta nestandardizovanom (Duncan i sar., 2012). Ipak, činjenica da postoji mogućnost progresije u SCC, obavezuje na eradikacioni tretman svake AK (Uhlenhake 2013). Rizik od progresije AK u SCC se smatra niskim, ali je visoko varijabilan (Werner i sar., 2013). Faktori rizika za progresiju AK su imunosupresija, podatak o prethodnim nemelanomskim kutanim kancerima, visokorizične lokalizacija (usne, nos, obrve), muški pol, stariji uzrast, Fitzpatrik tip kože I i II, kao i kontinuirana izloženost sunčevom zračenju (Samrao i Cockerell, 2013). Takođe, opravdanost terapije AK postoji i u smislu smanjivanja simptoma kao što su bol ili pruritus (Duncan i sar., 2012); neretko razlog za započinjanje terapije AK je i estetski momenat, naručito jer se većina AK nalazi na vidljivim delovima kože.

Prilikom izbora adekvatnog tretmana ne postoje apsolutne smernice ili prihvaćeni algoritmi. U tom smislu, pre odluke o terapiji neophodno je razmotriti broj lezija (Uhlenhake 2013; Samrao i Cockerell, 2013), debljinu (Goldenberg i Perl, 2014.), trajanje (Uhlenhake 2013), lokalizaciju (Uhlenhake 2013; Goldenberg i Perl, 2014; Samrao i Cockerell, 2013), proširenost (Uhlenhake 2013; Samrao i Cockerell, 2013), klinički tok (Uhlenhake 2013), godine pacijenta (Uhlenhake 2013; Samrao i Cockerell, 2013), komorbiditete (Uhlenhake 2013; Samrao i Cockerell, 2013), faktore rizika kao što je imunosupresija (Uhlenhake 2013, Samrao i Cockerell, 2013), anamnezu u smislu kutanih kancera (Uhlenhake 2013), prethodne terapije, eventualne recidive (Goldenberg i Perl, 2014), izloženost suncu, kao i cenu terapije (Uhlenhake 2013; Goldenberg i Perl, 2014; Samrao i Cockerell, 2013), upućenost terapeuta u terapijske procedure (Uhlenhake 2013; Samrao i Cockerell, 2013) i sposobnost tolerancije neželjenih efekata (Goldenberg i Perl, 2014).

Terapijski modaliteti se mogu grubo podeliti na terapiju lezija (engl. lesion-directed therapy) ili terapiju zone lezija (engl. field-directed therapy) (Duncan i sar., 2012; Uhlenhake 2013). Kao što sama reč kaže, terapijom lezija deluje se na svaku AK ponaosob, dok se terapija zone lezija koristi u tretmanu brojnih kliničkih lezija na određenoj zoni kao i subkliničkih promena (Uhlenhake 2013). Većina terapijskih varijanti pojedinačnih lezija je destruktivna i funkcioniše po principu fizičkog otklanjanja AK. Takvi, destruktivni vidovi terapije su, ujedno, i najčešći u tretiranju AK (Duncan i sar., 2012). U **terapiju pojedinačnih lezija** spadaju (Duncan i sar., 2012):

1. Krioterapija tečnim azotom (krioterapija)
2. Kiretiranje promena (sa ili bez elektrohirurgije)
3. Površna (tangencijalna) ekscizija (engl. shave excision)

Najčešće korišćen terapijski modalitet je **krioterapija**, bilo da se aplikuje u vidu spreja ili nanosi na leziju štapićem sa pamučnim vrhom (Uhlenhake 2013; Duncan i sar., 2012). Optimalno vreme aplikacije je 10-15 sekundi (od 5, 6 do 20 sekundi) (Duncan i sar., 2012). Sprej terapija je efikasna u 98,8%, za vreme praćenja 1-8.5 godina, a procenat efikasnosti zavisi od dužine aplikacije (1-5 sekundi 39% izlečenja, 20 sekundi 83% izlečenja) (Uhlenhake 2013). Ova tehnika pogodna je za tretiranje malog broja klinički jasnih simptomatskih lezija (Duncan i sar., 2012). Neželjeni efekat može biti hiperpigmentacija, usled oštećenja melnocita hladnoćom, naročito usled duže aplikacije. Prednost su lako izvođenje, bez anestezije, a negativne strane su bol i neprijatnost prilikom primene, pojava bula i krasti (Uhlenhake 2013; Duncan i sar., 2012), eventualne

infekcije (Uhlenhake 2013), hiperpigmentacija, ožiljaci i alopecija u tretiranim zonama (Uhlenhake 2013; Duncan i sar., 2012). Prilikom prolongirane i dublje aplikacije na rukama retko je moguće oštećenje tetiva i nerava (Duncan i sar., 2012). Ova terapijska metoda nije pogodna za imunokompromitovane pacijente (Uhlenhake 2013). **Kiretiranje** – mehaničko odstranivanje (struganje) atipičnih keratinocita, sa ili bez upotrebe elektrohirurgije, je terapijska metoda pogodna za mali broj lezija, za zaostale lezije nakon biopsije i tretiranje hipertrofičnih AK. Za izvođenje je potrebna lokalna anestezija. Ukoliko se koristi elektrohirurgija, ona služi ujedno za destrukciju atipičnih ćelija i hemostazu. U slučaju primene ovog terapijskog modaliteta savetuje se njena minimalna upotreba radi prihvatljivog kozmetskog efekta. Ukoliko nije moguće uspostaviti homeostazu elektorhiruški može se koristiti aluminijum hlorid. Kiretaža je, generalno, efikasna terapija ali su mogući ožiljci, neprijatnost prilikom davanja anestezije, potrebno je nekoliko nedelja za potpuni oporavak, postoji rizik od infekcija i rezidualnih depigmentacija (Duncan i sar., 2012). **Površna ekscizija** (engl. shave excision), treći vid terapije po učestalosti, indikovana je kada postoji sumnja na SCC ili BCC, za HP verifikaciju, pa je to ujedno terapijska i dijagnostička procedura. Izvodi se skalpelom, nakon primene lokalne anestezije. Neophona je hemostaza nakon procedure, period zarastanja traje 1-2 nedelje, a potencijalne komplikacije su infekcija, ožiljak i poremećaji pigmentacije (Duncan i sar., 2012).

Terapija zone lezija (engl. field-directed therapy) se koristi kod slabije definisanih lezija, lezija koje imaju tendenciju spajanja, kod većeg broja kliničkih i subkliničkih lezija na većoj površini. S obzirom da kod osoba sa većim brojem AK kumulativni rizik za razvoj barem jednog invazivnog SCC iznosi od 6 do 10% u odnosu na broj lezija i period perzistiranja, od velikog je značaja tretiranje čitave zone (Uhlenhake 2013). Ova vrsta terapije može se podeliti na *lokalnu* koju primenjuje pacijent i *proceduralnu*, koju primenjuje lekar (Duncan i sar., 2012; Uhlenhake 2013). U prvoj grupi najznačajniji su:

- 5-fluorouracil (5FU) (Duncan i sar., 2012; Uhlenhake 2013; Cohen 2010, Stockfleth i Kerl, 2006)
- imiquimod (Duncan i sar., 2012; Uhlenhake 2013; Cohen 2010; Stockfleth i Kerl, 2006)
- diclofenac (Duncan i sar., 2012; Uhlenhake 2013; Cohen 2010; Stockfleth i Kerl, 2006)
- ingenol mebutat (Uhlenhake 2013)

U proceduralnu terapiju koju primenjuje lekar ubrajaju se:

- Kriopiling (Duncan i sar., 2012; Uhlenhake 2013; Cohen 2010; Stockfleth i Kerl, 2006)
- Dermoabrazija (Duncan i sar., 2012; Uhlenhake 2013; Cohen 2010)
- Hemijski piling (Duncan i sar., 2012; Uhlenhake 2013; Cohen 2010, Stockfleth i Kerl 2006)
- Laserska terapija (Laser resurfacing) (Duncan i sar., 2012; Uhlenhake 2013; Cohen 2010; Stockfleth i Kerl 2006)
- Fotodinamska terapija (Duncan i sar., 2012; Uhlenhake 2013; Cohen 2010; Stockfleth i Kerl, 2006)

1.1.2. BOWEN-ova BOLEST

1.1.2.1. DEFINICIJA

Bowenova bolest (engl. Bowen disease, BD) ili skvamocelularni karcinom in situ (engl. squamous cell carcinoma in situ - SCCIS) kože je maligna neoplazma ograničena na epiderm, bez znakova dermalne invazije (Arlette i Trotter, 2004). Američki dermatolog John T. Bowen, po kome je SCCIS nazvan Bowenova bolest, dao je prvi opis ovog entiteta još 1912. godine (Bowen 1912) pod nazivom “prekancerozna dermatoza” (Bowen 1912), opisavši dva pacijentasa histološkim karakteristikama poremećene arhitekture epiderma (Bowen 1912, Bowen 1920). Godinu dana ranije, francuski dermatolog Louis Auguste Queyrat opisao je identične histopatološke karakteristike promena sa glansa kod tri pacijenta, upotrebivši naziv “erythroplasia” (Queyrat 1911), po kome se koristi naziv Erythroplasia Queyrat (EQ) za određene forme SCCIS.

Mada je naziv Bowenova bolest za ovu vrstu karcinoma in situ opšte prihvacen i zvaničan sinonim koji se i danas koristi, sama reč “bolest” nije u potpunosti odgovarajuća jer se zapravo radi o vrsti tumora (Sterry i Stockfelth, 2009). Može se reći da naziv Bowenova bolest predstavlja klinički izraz za SCCIS kože (Arlette i Trotter, 2004). Za SCCIS na mukozama koristi se naziv Erythroplasia Queyrat (Sterry i Stockfelth, 2009).

Iako se ovaj sinonim upotrebljava za promene na penisu, prema pojedinim autorima podrazumeva i slične promene na ženskim genitalijama, u okolini anusa i na oralnoj mukoži (Sterry i Stockfelth, 2009). Drugi autori, pak, samo genitalne lezije koje imaju histološke karakteristike SCCIS kod muskaraca klasifikuju kao Erythroplasia Queyrat, odvajajući vulvarnu intraepitelijalnu neoplaziju (VIN) kod žena i Bowenoidu papulozu (engl. Bowenoid papulosis, BP) kao posebnu formu genitalnih lezija (Rigel i sar., 2008; Cox i sar., 2007).

1.1.2.2. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA

Maligna alteracija epidermalnih ćelija može biti izazvana brojnim, različitim faktorima koji su značajni za nastanak i razvoj SCCIS. U tu grupu spadaju izloženost sunčevom zračenju (Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008; Sterry i Stockfelth, 2009; Cox i sar., 2007), jonizujuća radijacija (Duncan i sar., 2012; Sterry i Stockfelth, 2009, Arlette i Trotter, 2004, Cox i sar., 2007), izloženost arsenu (Rigel i sar., 2008; Duncan i sar., 2012; Sterry i Stockfelth, 2009; Arlette i Trotter, 2004), imunosupresija (Duncan i sar., 2012; Arlette i Trotter, 2004; Cox i sar., 2007) sindrom stečene imunodeficijencije (engl. acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) ili jatrogena, obično kod osoba sa transplantiranim organima (Cox i sar., 2007) i infekcije određenim vrstama humanih papiloma virusa (engl. Human papillomavirus, HPV) (Duncan i sar., 2012; Arlette i Trotter, 2004; Cox i sar., 2007). UV radijacija, posebno kumulativni efekat UV zračenja tokom dugotrajne izloženosti suncu najčešći je uzrok SCC kože generalno, pa u tom smislu ima ulogu u i patogenezi SCCIS (Arlette i Trotter, 2004). Očekivano, veća incidencija SCCIS utvrđena je u geografskim regijama sa većom izloženošću suncu Reizner i sar., 1994; Arlette i Trotter, 2004). Činjenica da se promene kod SCCIS najčešće javljaju u kasnijoj životnoj dobi (Duncan i sar., 2012; Cox i sar., 2007), da su predilekciona mesta za pojavu promena uglavnom fotoeksponirane zone (Duncan i sar., 2012; Arlette i Trotter, 2004), da se promene češće javljaju kod pripadnika bele rase, sa svetlom kožom osetljivom na sunce koji su češće boravili na suncu (Arlette i Trotter, 2004), a ređe kod osoba sa tamnijim tipom kože, kao i da je učestalost veća kod osoba na PUVA terapiji (dozno zavisno) (Arlette i Trotter, 2004; Duncan i sar., 2012) potvrđuju značaj UV radijacije u patogenezi ovog tumora. UV radijacija dovodi do razvoja ovog kutanog maligniteta uzrokujući oštećenja DNK i imunosupresiju (Arlette i Trotter, 2004).

Efekat oštećenja DNA je multigeniski i utiče, pre svega, na smanjenu sposobnosti DNA popravke (Arlette i Trotter, 2004). Osnova oštećenja je nastanak ćelijskih klonova sa p53 mutacijom među fotooštećenim ćelijama kože sa posledičnom displastičnom progresijom i in situ lezijama (Arlette i Trotter, 2004). Pacijenti sa transplantiranim organima, nakon niza godina imunosupresivne terapije, imaju veći rizik za nastanak SCCIS (Duncan i sar., 2012; Arlette i Trotter, 2004). Kod ovih osoba promene se mogu javiti i na fotoneeksponiranim regijama (Arlette i Trotter, 2004). I u ovom slučaju dolazi do klonalne ekspanzije p53 mutiranih ćelija, mada različiti tipovi imunosupresivne terapije (ciklosporin, azatioprin, sistemski kortikosteroidi) mogu imati različite puteve indukcije maligne transformacije (Arlette i Trotter, 2004). Nastanak određenih vrsta SCCIS direktno je povezana i sa HPV infekcijom (Duncan i sar., 2012; Arlette i Trotter, 2004), najčešće kod genitalnih lezija, ređe i ekstragenitalnih (Cox i sar., 2007). HPV 16 tip virusa se detektuje kod velikog broja anogenitalnih formi (Duncan i sar., 2012), a u pojedinim slučajevima i periungvalnih i palmoplantarnih (Duncan i sar., 2012; Arlette i Trotter, 2004). U ekstragenitalnim formama SCCIS, HPV DNK izolovana je kod oko 31% slučajeva, a konkretno HPV tip 16 dokazan je u oko 60% slučajeva periungvalnih i palmoplantarnih lezija (Arlette i Trotter, 2004; Cox i sar., 2007). Dakle, HPV infekcija predstavlja značajan etiološki faktor za razvoj SCCIS u opštoj populaciji, kao i kod imunosuprimiranih (Arlette i Trotter, 2004). Ostali faktori značajni za razvoj SCCIS su izloženost elementarnom arsenu u vodi ili neorganskom arsenu u pojedinim medikamentima (Arlette i Trotter, 2004). Ovi pacijenti uglavnom imaju veći broj lezija i keratotične promene na dlanovima i tabanima (Arlette i Trotter, 2004). Jonizujuća radijacija, termalna oštećenja i hronične dermatoze takođe mogu dovesti do razvoja SCCIS (Arlette 2004; Cox 2007). SCCIS pokazuju veliki stepen ćelijske proliferacije, sa 40-50% Ki-67 (proliferativni marker) imunohistohemijski pozitivnih keratinocita (Arlette i Trotter, 2004). Takođe, kod SCCIS postoji gubitak adekvatne kontrole ćelijskog ciklusa, odnosno uočene su posebne karakteristike ekspresije pojedinih proteina koji učestvuju u regulaciji ovog ciklusa u odnosu na ćelije normalne kože i invazivne forme SCC. Ekspresija inhibitora ciklin zavisne kinase (engl. cyclin dependent kinase inhibitors, CDKI), proteina p21^{WAF1/CIP1} je (paradoksalno) veoma izražena kod SCCIS, kao fenotipski nediferenciarne lezije, dok invazivne forme SCC ekspresija korelira sa stepenom diferencijacije (Arlette i Trotter, 2004). P16^{INK4a} inhibitor CDK4 i CDK6 pokazuje ekspresiju čitavom debljinom u 70% SCCIS, a takođe je značajno eksprimovan i kod invazivnog SCC. UV indukovana p16 mutacija uočena je kod SCC, tako da je

abnormanla ekspresija p16 rezultat prekomerne ekspresije mutiranog proteina. Ekspesija p16 ima uticaja na progresiju SCC. Malo se zna o ciklin E/CDK2/p27 putu kod kutanih SCCIS, mada je ekspresija ciklina E smanjena u invazivnim formama tumora.

1.1.2.3. UČESTALOST, UZRAST I POL

Tačna incidencija SCCIS još uvek nije definitivno utvrđena. Prema podacima studije rađenoj upopulaciji na Havajima, procenjena je na 142 na 100.000 (Reizner i sar.,1994). U Kanadskoj pokrajini Alberta, za petogodišnji period od 1990.do 2000. godine prosečna godišnja incidencija iznosila je 22.4 lezije na 100.000 žena i 27.8 na 100.000 muškaraca (Arlette i Trotter, 2004). Utvrđena incidencija prema studiji rađenoj u Velikoj Britaniji iznosi 15 na 100.000 (Cox i sar., 2007).

SCCIS se može javiti u bilo kom uzrastu, ali su pacijenti najčešće stariji od 60 godina (Duncan i sar., 2012; Cox i sar., 2007). Veoma retko promene ovog tipa mogu se naći i kod osoba mlađih od 30 godina, npr. kod pacijenata sa transplantiranim organima (Drake i Walling, 2008). Periungvalne promene, kao posebna prezentacija SCCIS, obično se nalaze kod osoba uzrasta oko 55.godine i najčešće su prisutne 3-5 godina pre postavljanja dijagnoze (Arlette i Trotter, 2004). Promene na penisu najčešće se javljaju kod osoba u srednjim pedesetim godinama, a uobičajeno je da do postavljanja prave dijagnoze protekne, u proseku, dve godine (Arlette i Trotter, 2004).

Učestalost SCCIS u odnosu na pol se procenjuje kao podjednaka kod muškaraca i kod žena, mada određen broj sudija pokazuje neznatno veću učestalost kod žena (Duncan i sar., 2012; Cox 2007).

Potencijal za razvoj invazivnog SCC iz SCCIS iznosi od 3% (Duncan i sar., 2012; Arlette 2003; Cox i sar., 2007; Shimitzu i sar., 2011; Westers-Attema i sar., 2014, Arlette i Trotter, 2004) do 5% za kutane promene (Duncan i sar., 2012; Cox 2007; Shimitzu i sar., 2011; Wester-Attemai sar., 2014). Ukoliko SCCIS pređe u invazivni SCC, procenjuje se da, približno 13% (Duncan i sar., 2012) ili do 1/3 (Westers-Attema i sar., 2014) ovih karcinoma metastazira, od čega se oko 10% slučajeva završi letalno usled diseminacije bolesti (Duncan i sar., 2012). Ranije mišljenje da pacijenti sa SCCIS imaju generalno povećan rizik za razvoj maligniteta drugih organa danas se ne smatra relevantnim (Duncan i sar., 2012; Cox i sar., 2007). U tom kontekstu, nema racionalnog opravdanja za rutinsku eksploraciju ovih pacijenta u cilju utvrđivanja maligniteta drugih organa (Duncan i sar., 2012; Arlette i Trotter, 2004), osim u slučajevima prethodne

izloženosti aresnu (Duncan i sar., 2012). Sa druge strane, pacijenti sa SCCIS imaju veći rizik za razvoj ne-melanomskih tumora kože (NMSC) (Duncan i sar., 2012; Arlette i Trotter, 2004) i približno 30-50% ovih pacijenata ima takav tumor uz SCIS ili posle njega (Duncan i sar., 2012; Cox i sar., 2007), najčešće bazocelularni karcinom (Cox i sar., 2007). Pretpostavka je da pomenuti povećan rizik predstavlja poledicu slične etiologije kod svih NMSC, a to je pre svega UV radijacija (Cox i sar., 2007). Kod žena sa promenama u vulvarnoj regiji ili muškaraca sa perianalnim promenama, postoji povećan rizik od kancera materice, cerviksa, vagine ili anusa, zbog HPV infekcije kao potencijalnog etiološkog faktora (Duncan i sar., 2012).

1.1.2.4. LOKALIZACIJA

Mada se SCCIS može pojaviti na bilo kom delu tela, najčešće se nalazi na fotoekspoziranim zonama kao sto su glava i vrat (Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008; Westers-Attema i sar., 2014). Osim pomenutih zona promene se često nalaze i na potkolenicama (Duncan i sar., 2012; Westers-Attema i sar., 2014), naročito kod žena (Duncan i sar., 2012). Ostala mesta na kojima se mogu pojaviti SCCIS lezije su trup (Rigeli sar., 2008; Sterry i Stockfelth, 2009) lice, prsti (Sterry i Stockfelth, 2009), periungvalno (Duncan i sar., 2012), nokatnio ležište (Sterry i Stockfelth, 2009) i pregibne zone (Duncan i sar., 2012). Prema studiji koja je obuhvatila 3274 pacijenata, lokalizacija promena bila je nešto drugačija prema polu. Naime, kod žena u 55% slučajeva promenesu bile lokalizovanena glavi i vratu, 17% na donjim esktremitetima, 17% na gornim ekstremitetima, a 11% na trupu. Kod muškaraca, pak, distribucija promena je bila na glavi i vratu u 63% slučajeva, kod 5% na donjim ekstremitetima, 17% na gornjim ekstremitetima i 15% na trupu (Arlette i Trotter, 2004). Prema drugim podacima kod 75% pacijenata ženskog pola (Cox i sar., 2007) promena je lokalizovan na potkolenicama (Kossard i Rossen, 1992; Council i Ha, 2002). Kao što je pomenuto, SCCIS se osim na koži može javiti i na sluzokozi i to oralnoj ili genitalnoj (Duncan i sar., 2012; Kangi sar., 2014; Sterry i Stockfelth, 2009). Gentitalne, promene se najčešće viđaju naglansu penisa, vulvi (Sterry i Stockfelth, 2009; Kang i sar., 2014) i perianalnoj regiji (Sterry i Stockfelth, 2009).

1.1.2.5. KLINIČKA SLIKA

Izgled promena SCCIS razlikuje se prema tome da li se one nalaze na koži ili na sluzokoži i kliničke karakteristike promena umnogome zavise od karakteristika kože/sluzokože na kojoj promena nastaje (Arlette i Trotter, 2004). **Na koži**, SCCIS može nastati de novo ili iz postojeće AK (Rigel i sar., 2008). Tipična prezentacija na koži je u vidu diskretnog, spororastućeg, jasno ograničenog eritematoznog plaka, iregularnih ivica, obično sa skvamom ili krastom (Duncan i sar., 2012; Sterry i Stockfelth, 2009; Rigel i sar., 2008; Arlette i Trotter 2004; Cox i sar., 2007). Eritem može varirati od bledo ružičaste, boje lososa do zagasito lividnog tona, a skvama može biti beličasta, žućkasta (Arlette 2003), neatherentna ili veoma atherentna (Arlette i Trotter, 2004). Plakovi vremenom mogu dobiti nodularni ili verukozni izgled (Arlette i Trotter, 2004). Ponekad, promene mogu imati anularni ili bizarni aspekt sa izgledom centralne involucije (Sterry, Stockfelth, 2009). Hiperkeratotične promene su uglavnom sivog ili smeđeg tona (Arlette i Trotter, 2004). Promene su obično asimptomatske, mada mogu biti praćene svrabom (Arlette i Trotter, 2004; Arlette 2003). Lezije su obično solitarne, ali se kod 10-20% pacijenata mogu naći i multiple (Duncan i sar., 2012; Cox i sar., 2007). Veličina lezije obično zavisi od njenog trajanja; ponekad dostiže i nekoliko santimetara u dijametru (Arlette i Trotter, 2004). Retka, ali tipična varijanta SCCIS javlja se na periungvalno i/ili na nokatnom ležištu (Sterry i Stockfelth, 2009). Ove vrste promena su se ranije uglavnom nalazile kod stomatologa i radiologa zbog profesionalne izloženosti. U ovom slučaju i HPV infekcija takođe predstavlja etiološki faktor (Sterry i Stockfelth, 2009). SCCIS indukovani arsenom obično se javljaju u vidu klasične kliničke prezentacije, s tim što su promene obično multifokalne i pojavljuju se na foto-neeksponiranim zonama trupa (Rigel i sar., 2008). Promene su obično udružene sa palmo-platarnom keratozom i gutatnom hipo- ili hiperpigmentacijom (Rigel i sar., 2008). U ređe oblike SCCIS spada i pigmentna varijanta ovog tumora, koja se nalazi kod manje od 2% slučajeva (Duncan i sar., 2012), uglavnom kod osoba sa tamnijim tipom kože i može ličiti na melanocitne lezije (Rigel i sar., 2008). Hiperkeratotična i verukozna forma SCCIS, sa druge strane, mogu klinički simulirati virusnu bradavicu (Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008).

Klinički, kao što je delom već pomenuto, SCCIS može ličiti na superficijalni BCC, dermatitis, psoriazu, lichen planus, AK, benignu lihenoidnu keratozu, amelanotični melanoma (Duncan i sar., 2012) i gljivične infekcije (Arlette i Trotter, 2004). Hiperkeratotične ili verukozne promene je ponekad teško razlikovati od virusnih

bradavica, seboroičnih keratoza, dok pigmentni tip nekada predstavlja diferencijalno-dijagnostički problem u odnosu na melanoma (Duncan i sar., 2012). Osnovna histološka karakteristika SCCIS je atipija keratinocita koja se uočava čitavom debljinom epiderma (Kirkham 2008; Sterry i Stockfelth, 2009) uz nepravilnu arhitekturu, poremećeno sazrevanje ćelija, gubitak polariteta, brojne mitoze uključujući atipične forme, diskeratotične ćelije i zahvaćenosti susedne pilosebacealne jedinice (Kirkham 2008). U okviru atipije koja se nalazi čitavom debljinom epiderma kod SCCIS su uključene i intraepidermalne porcije adneksalnih struktura (Duncan i sar., 2012). Zahvaćenost se proteže od bazalnog do kornealnog sloja (uključujući i njega), s tim što bazalna membrana ostaje intaktna (Duncan i sar., 2008). Karakteristično, prisutne su parakeratoza i hiperkeratoza, akantoza sa kompletnom dezorganizacijom epidermalne arhitekture. Mestimično, u epidemu se mogu naći i velike, okrugle, kreatinizovane ćelije sa eozinofilnom citoplazmom i hipohromatičnim nukleusom, kao i multinuklearne ćelije. Ove atipične ćelije se mogu videti i u pilosebacealnoj jedinici unutar izvodnih delova dlačnog folikula u epidermu, folikularnog infundibuluma i sebacealne žlezde. Gornji slojevi derma su obično infiltrirani brojnim hroničnim inflamatornim ćelijama uključujući limfocite, plazma ćelije i histiocite (Duncan i sar., 2008).

1.1.2.6. HISTOLOŠKA SLIKA

Osnovna histološka karakteristika SCCIS je atipija keratinocita koja se uočava čitavom debljinom epiderma (Kirkham 2008, Sterry 2009) uz nepravilnu arhitekturu, poremećeno sazrevanje ćelija, gubitak polariteta, brojne mitoze uključujući atipične forme, diskeratotične ćelije i zahvaćenosti susedne pilosebacealne jedinice (Kirkham 2008). U okviru atipije koja se nalazi čitavom debljinom epiderma kod SCCIS su uključene i intraepidermalne porcije adneksalnih struktura (Duncan 2012). Zahvaćenost se proteže od bazalnog do kornealnog sloja (uključujući i njega), s tim što bazalna membrana ostaje intaktna (Duncan 2008). Karakteristično, prisutne su parakeratoza i hiperkeratoza, akantoza sa kompletnom dezorganizacijom epidermalne arhitekture. Mestimično, u epidemu se mogu naći i velike, okrugle, kreatinizovane ćelije sa eozinofilnom citoplazmom i hipohromatičnim nukleusom, kao i multinuklearne ćelije. Ove atipične ćelije se mogu videti i u pilosebacealnoj jedinici unutar izvodnih delova dlačnog folikula u epidermu, folikularnog infundibuluma i sebacealne žlezde. Gornji

slojevi derma su obično infiltrirani brojnim hroničnim inflamatornim ćelijama uključujući limfocite, plazma ćelije i histiocite (Duncan 2008).

1.1.2.7. TERAPIJA BD

Postoje brojni, različiti terapijski modaliteti za eradikaciju SCCIS lezija (Duncan i sar., 2012; Arlette i Trotter, 2004). Naravno, nisu svi vidovi terapije odgovarajući za sve vrste SCCIS (Duncan i sar., 2012; Westers-Attema i sar., 2014). Takođe, nakon primene bilo koje terapijske opcije postoji rizik od terapijskog neuspeha i recidiva u oko 5-10% slučajeva (Westers-Attema i sar., 2014). Pre odluke o adekvanoj terapiji neophodno je proceniti iskustvo i obučnost lekara (Arlette i Trotter, 2004), veličinu i lokalizaciju promene (Duncan i sar., 2012; Arlette 2003, Wester-Attema i sar., 2014) kao i karakteristike pacijenta (Wester-Attema i sar., 2014) u smislu godišta i opšteg zdravstvenog stanja (Duncan i sar., 2012), ali i posledičnog kozmetskog efekta (Kang 2014). Kako SCCIS ima prolongiran tok i relativno nizak potencijal za progresiju u invazivnu formu, moguće je pacijentu predstaviti/ponuditi terapijske opcije (Arlette 2003). Generalno, terapija SCCIS se deli u tri osnovne kategorije (Duncan i sar., 2012):

1. Hiruška i destruktivna terapija
2. Lokalna terapija
3. Nehiruška, ablativna terapija

U prvu grupu sadaju ekscizija, Mohs mikrografska hirurgija, kiretaža sa ili bez elektrohirurgije, hemijska ablacija trihlorsirćetnom kiselinom i krioterapija tečnim azotom (Duncan i sar., 2012). U lokalne terapeutike spadaju 5FU i 5% imikvimod (Duncan i sar., 2012). U nehiruške ablativne tehnike spadaju laserska ablacija, radioterapija i fotodinamička terapija (Duncan i sar., 2012; Kang 2014).

Ostale terapijske opcije su kombinovani tretmani i to kiretaža i krioterapija, posebno za promene na ušnim školjkama, krioterapija i 5FU (Shimizu i sar., 2011), imikvimod i 5FU (Cox i sar., 2007), intraleziona primena interferona alfa 2b i bleomicina; oralna primena isotretinoina uz subkutanu primenu interferona alfa i/ili 5FU za multiple lezija kod pacijenta prethodno izloženih arsenu, zatim kombinacija bleomicina i krioterapije, posebno kod pacijenta sa HPV 16 indukovanim SCCIS (Shimizu i sar., 2011). S obzirom da pacijenti sa transplantiranim organima imaju veći rizik za ponovni razvoj tumora nakon lečenja (Shimizu i sar, 2011) izbor adekvatnog tretmana je veoma značajan. U jednoj studiji kod imunokompromitovanih pacijenta sa hroničnom

limfocitnom leukemijom uspešno je primenjivana kombinovana terapija imikvimoda topikalno sa oralnom primenom sulindaka (Shimizu i sar.,2011; Cox i sar., 2007).

1.1.3. PLANOCELULARNI KARCINOM KOŽE

1.1.3.1. DEFINICIJA

Kutani planocelularni ili skvamocelularni karcinom (engl. squamous cell carcinoma, SCC) je maligna neoplazma epidermalnih keratinocita koja predstavlja širok spektar promena od lako izlečivih, superficijalno invazivnih kancera do veoma infiltriranih tumora koji metastaziraju dovodeći do smrtnog ishoda (Grossman i Leffel, 2012). Mada može nastati de novo, SCC ipak, češće nastaje iz prekursorskih lezija, AK (Stratigos i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2012; Kallini i sar., 2015) i SCCIS (Grossman i Leffel, 2012; Stratigos i sar., 2015), koje, kao što je već pomenuto, prema pojedinim autorima zapravo predstavljaju SCC u ranijim evolutivnim fazama (Akerman 1997; Ackerman i Mones, 2006; Duncan i sar., 2012; Rigel i sar., 2008; Wu i sar., 2006, Salache 2000; Cockerell 2000; Hearphy, Akerman 2000; Werner i sar., 2013; Rosen i Lebwahl, 2013) De novo, SCC obično nastaje na inicijalno ozračenju koži (sa ili bez manifestacija hroničnog radiodermatitisa) ili na hronično inflamiranoj koži (hronične rane ili hronične inflamatorne bolesti) (Stratigos i sar., 2015).

1.1.3.2. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA

Postoje brojni faktori koji mogu dovesti do nastanka SCC, kao i pojedina stečena i urođena kutana stanja koja predstavljaju predispoziciju za razvoj SCC. Najznačajniji etiološki faktor za nastanak SCC predstavlja kumulativna hronična izloženost UV zračenju (Breuninger i sar., 2013; Kallini i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2012; Edge i sar., 2010; Stratigos i sar., 2015), naročito kod osoba čija je koža osetljiva na UV zrake (Breuninger i sar., 2013; Stratigos i sar., 2015). Dokazana je linearna korelacija između SCC incidencije i izloženosti UV zracima (Grossman i Leffel, 2012), a tumorske promene se mogu javiti decenijama nakon intenzivnoj izlaganja suncu (Kallini i sar., 2015). Intenzivna UV radijacija je, čak, značajnija za nastanak i razvoj SCC u odnosu na pojavu

BCC (Grossman i Leffel, 2012), dva najčešća NMSC (Kallini i sar., 2015). U tom smislu, u faktore rizika za razvoj SCC spadaju svetliji tip kože (Kallini i sar., 2015; Breuninger i sar., 2013; Edge 2010, Grossman i Leffel, 2012) -Fitzpatrik tip I i II (Kallini i sar., 2015), starija životna dob (Breuninger i sar., 2013; Edge i sar., 2010; Grossman i Leffel, 2012; Stratigos i sar., 2015), prisustvo AK (Breuninger i sar., 2013), zanimanja na otvorenom (Stratigos i sar., 2015; Kallini i sar., 2015) (poljoprivrednici, građevinski radnici) (Kallini i sar., 2015), od čega se, ipak, najznačajnijim faktorom rizika smatra prisustvo AK (Breuninger i sar., 2013; Grossman i Leffel, 2012) i SCCIS (Grossman i sar., 2012). Iako je SCC redak kod osoba sa tamnijim tipom kože, predstavlja najčešći kutani kancer i kod afro-američke populacije (Kallini i sar., 2015), ali se kod njih se obično javlja na foto-neeksponiranim zonama (Kallini i sar., 2015). Takođe, i veštački izvori UV zračenja kao to je PUVA terapija i solarijumi imaju značaj u patogenezi SCC (Stratigos i sar., 2015). Kao dokaz da je UV zračenje značajno u nastanku SCC je i činjenica da postoji direktna korelacija PUVA terapije i incidencije SCC, zbog mutagenog ali i opšte imuno-supresivnog efekta ovog terapijskog modaliteta (Kallini i sar., 2015).

Pored maligne transformacija usled UV ekspozicije i drugi faktori imaju ulogu u nastanku ove vrste tumora, a to su hronične infekcije (posebno ukoliko su udružene sa drenirajućim sinusima kao što je perianalna pioderma, osteomijelitis, lupus vulgaris, lepra (Grossman i Leffel, 2012), zatim hronične ulceracija na nogama (Grossman i Leffel, 2012; Rigel i sar., 2008; Stratigos i sar., 2015), opekotine (Grossman i Leffel, 2012; Breuninger i sar., 2013; Stratigos i sar., 2015), ožiljci (Grossman i Leffel, 2012; Rigel i sar., 2008; Breuninger i sar., 2013; Stratigos i sar., 2015), lihenoidne i bulozne dermatoze (Breuninger i sar., 2015), diskoidni lupus, oralna forma lichen planus-a, morfea, lichen sclerosus, pilonidalni sinus, acne conglobata, hidradenitis suppurativa, benigni familijarni pemfigus (Haily-Haily disease), disekantni folikulitis u kapilicijumu, necrobiosis lipoidica (Grossman i Leffel, 2012) i izloženost HPV tipa 16, 18 i 31 (Kallini i sar., 2015). SCC je češće uočen i na transplantiranoj koži, epidermalnim, dentalnim i dermoidnim cistama (Grossman i Leffel, 2012). Izloženost arsenu (Breuninger i sar., 2013; Grossman i Leffel, 2012; Stratigos i sar., 2015), aromatičnim/policikličnim ugljovodonicima (Grossman i Leffel, 2012), insekticidima, herbicidima (Grossman i Leffel, 2012) takođe može pokrenuti malignu transformaciju (Breuninger i sar., 2013). Imunosupresivna stanja kao što je jatrogena imunosupresija nakon transplantacije organa (Breuninger i sar., 2013; Kallini i sar., 2015; Edge i sar., 2010; Stratigos i sar., 2015) ili

imunosupresija u malignim bolestima (Breuninger i sar., 2013; Grossman i Leffel, 2012; Stratigos i sar., 2015), nakon hemioterapije, posebno kod pacijenata sa leukemijom i limfomima (Edge i sar., 2010; Stratigos i sar., 2015), usled terapije klasičnim imunosupresivima ili biološkim agensima (Stratigos i sar., 2015) kao i u infekciji virusom humane imunodeficijencije(HIV) (Breuninger i sar., 2013; Grossman i Leffel, 2012) takođe predstavljaju povećan rizik za razvoj SCC i predispoziciju za nepovoljniji tok bolesti (Breuninger i sar., 2013). Genetski sindromi kao što su okulokutani albinizam (Breuninger i sar., 2013; Kallini i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2012; Stratigos i sar., 2015), xeroderma pigmentosum (Breuninger i sar., 2013; Kallini i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2015; Stratigos i sar., 2015) retko autozomalno-recesivno oboljenje (Kallini i sar., 2015) kod koga postoji redukovana sposobnost za popravku DNA oštećenja (Kallini i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2012; Stratigos i sar., 2015) uzrokovanim sunčevim zračenjem (Kallini i sar., 2015), Muir-Torre sindrom i hereditarne forme epidermolysis bullosa (Breuninger i sar., 2013; Stratigos i sar., 2015) takođe spadaju u faktore rizika za SCC. Pojava SCC opisivana je i kod supeficijalne aktinične, palmarne i plantarne diseminovane forme porokeratoze (Grossman i Leffel, 2012) i epidermodysplasia verruciformis, oboljenja sa naslednim defektom u protekciji od specifičnih tipova HPV (Stratigos i sar., 2015). Pacijenti sa dijagnostikovanom SCC imaju 44-50% kumulativni rizik za nastanak drugog NMSC (18-30% rizik od SCC) tokom narednih 3-5 godina (Grossman i Leffel, 2012). Kod ovih pacijenata postoji i povećan rizik od ekstrakutanih kancera (Hemminki i Dong, 2000).

Razvoj SCC odvija se višestepenim procesom maligne transformacije koji počinje nastankom klona mutiranih ćelija u epidermu, sa posledičnim stvaranjem fokalnih zona u kojima se nalazi gubitak normalne arhitekture i celularna atipija koja rezultira fokalnim poremećajem keratinizacije (Stratigos i sar., 2015). U najvećem broju slučajeva, razvoj SCC iz normalnih keratinocita počinje mutacijama na ćelijskoj DNK i posledičnom genskom nestabilnošću. Alteracija u genskoj ekspresiji dovodi do gubitka kontrole rasta ćelija, penetracije bazalne membrane i, konačno, invazije u okolno tkivo. Tokom razvoja SCC, keratinociti postaju rezistentni na apoptozu (programirana ćelijska smrt) i imunski odgovor (Grossman i Leffel, 2012). Najvažnija mutacija je na tumor supresornom genu *p53* (Stratigos i sar., 2015). Osim toga utvrđeni su i poremećaji ekspresije ciklina D1, humane telomerazne reverzne transkriptaze i p16 (Grossman i Leffel, 2012). Za apoptozu keratinocita koji su pretrpeli UV radijaciju neophodna je adekvatna funkcija *p53* tumora supresornog gena,

jer predstavlja ključni mehanizam protiv nastanka i razvoja malignih ćelija, uklanjajući premaligne ćelije koje nose mutaciju. Kod keratinocita, UV radijacija pozitivno reguliše *p53*, što dovodi do kašnjenja u progresiji ćelijskog ciklusa dok se DNK oštećenje ne popravi, ili omogućava apoptozu, a na taj način i eliminaciju ćelije kod kojih nije moguća ispravka (Grossman i Leffel, 2012). E6 protein, koji je kodiran onkogenim HPV, vezuje se za *p53* dovodeći do njegove brze degradacije, što onemogućava *p53*-apoptotički put. To je osnovni mehanizam kojim HPV indukuju nastanak SCC (Grossman i Leffel, 2012).

1.1.3.3. UČESTALOST, UZRAST I POL

SCC pripada grupi NMSC u okviru koje, zajedno sa BCC (Grossman i Leffel, 2012), spada u najčešće malignitete bele populacije (Stratigos i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2012). SCC predstavlja drugi po učestalosti kutani kancer (Stratigos i sar., 2015; Kallini i sar., 2015; Breuninger i sar., 2013) posle BCC (Kallini i sar., 2015) i čini 20% svih kutanih maligniteta (Stratigos i sar., 2015). Uočeno je da se broj novoobolelih od SCC rapidno povećava među belom populacijom (Breuninger i sar., 2013). Tačna incidencija SCC, ipak, nije utvrđena jer se u većini državnih registara za rak, ova dva NMSC obično ne beleže posebno (Grossman i Leffel, 2012). Iako epidemiološki podaci nisu u potpunosti precizni, utvrđeno je da se incidencija SCC poslednjih 30 godina povećala za 50-200% (Stratigos i sar., 2015). Generalno je prihvaćeno da se godišnje dijagnostikuje oko 200.000 SCC slučajeva u SAD (Grossman i Leffel, 2012). Prema podacima nacionalne baze podataka, takođe u SAD, 2006.godine registrovano je 2.2 miliona pacijenata lečenih od NMSK, od toga oko 600.000 slučajeva SCC (Stratigos i sar., 2015). Prema podacima novije studije u SAD, procenjeno je da 3900 do 9000 osoba godišnje umire od SCC (Karia i sar., 2013). Incidencija SCC varira u odnosu na geografsku širinu i oštećenje ozonskog omotača (Edge i sar., 2010), povećava se sa smanjenjem geografske širine (Stratigos i sar., 2015), pa najveću incidenciju imaju Australija (Edge i sar., 2010; Stratigos i sar., 2015) i Novi Zeland (Edge i sar., 2010). Prema podacima 19 studija u Evropi, incidencija kutanog SCC među belom populacijom varira, sa najvišom u Švajcarskoj (28.9 na 100.000 godišnje), a najnižom u Hrvatskoj (8.9 na 100.000), uz zaključak da se incidencija ipak više razlikuje zbog sveobuhvatnosti i preciznosti evidencije slučajeva, nego fenotipske varijabilnosti (Xiang 2014; Stratigos i

sar., 2015). Prema izveštaju Nemačkog federalnog kancer registra, u sadašnjem trenutku životni rizik od SCC među belom populacijom iznosi oko 15%, skoro duplo više nego dve decenije ranije. Ovakvi podaci posledica su drugačijeg životnog stila u kome se više vremena provodi na otvorenom, promena u stilu odevanja u kome je veći deo kože izložen suncu, smanjenja ozonskog omotača, ali i generalno dužeg životnog veka ljudi (Grossman i Leffel, 2012). Bez obzira na povećanu incidenciju SCC, mortalitet od SCC se, za isti period, smanjio za 20%, usled boljeg saznanja o prirodi tumora ali i agresivnijim oblicima lečenja visoko rizičnih lezija (Grossman i Leffel, 2012).

Iako se smatra malignom neoplazmom sa relativno niskim metastatskim potencijalom, za razliku od BCC, SCC ipak nosi određeni rizik od metastaziranja (Grossman i Leffel, 2012), inicijalno u regionalne limfne noduse, a potom u udaljene organe (Stratigos i sar., 2015) i zato je uzrok većine smrtnih slučajeva od NMSC (Grossman i Leffel, 2012; Edge i sar., 2010). Procenat metastaziranja procenjuje se na 2-5% godišnje, ali se ovi podaci uzimaju sa određenom rezervom (Stratigos i sar., 2015). Uprkos niskom stepenu udaljenih metastaza njihova pojava je udružena sa lošom prognozom i preživljavanjem manje od 2 godine (Stratigos i sar., 2015). Metastatski potencijal SCC je relativno nizak, posebno UV indukovane forme (Rigel i sar., 2008; Grossman i Leffel, 2012). Oko 5% pacijenata sa SCC ima udaljene metastaze, koje obično nastaju limfogeno (Breuninger i sar., 2013; Grossman i Leffel, 2012). Incidencija metastaza takođe raste sa veličinom tumora i stepenom imunosupresije (Rigel i sar., 2008; Grossman i Leffel, 2012). Metastatski potencijal se povećava na 9.2% tumore 2-5cm i 14.3% za one veće od 5cm (Grossman i Leffel, 2012). Takođe, tumori manje od 4mm duboki, gradirani kao Clark I-III, imaju limitiran metastatski potencijal, dok polovima tumora dubine preko 4mm i Clark novoa IV I V može metastazirati (Grossman i Leffel, 2012). Prema podacima jedne studije 23% pacijenata sa metastatskim SCC je bilo imunosuprimirano iz nekog razloga (Dinegard i sar., 1990; Grossman i Leffel, 2012). Lezije na mestima ožiljka ili inflamacije takođe su više sklone metastaziranju (Rigel i sar., 2008). Takođe, promene sa pojedinih lokalizacija (usna i uvo), imaju nešto veći rizik za pojavu metastaza (Rigel i sar., 2008; Grossman i Leffel, 2012). Stepen diferencijacije tumora, takođe, korelira sa procentom recidiviranja i metastaziranja. Lošije diferentovani SCC (Broders gradus 3 i 4) imaju procenat recidiva 28.6%, metastaziranja 32.8% u odnosu na dobro diferentovane SCC, sa procentom recidiva 13.6% i metastaziranja 9.2% (Grossman i Leffel, 2012).

SCC obično nastaje u poodmaklom životnom dobu (Kallini i sar., 2015; Stratigos i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2012, Breuninger i sar.,2013), a značajno povećanje incidencije ovog tumora beleži se nakon 40te godine života (Grossman i Leffel, 2012). U SAD, SCC se najčešće javlja sredinom šeste dekade (Kallini i sar., 2015), u Nemačkoj oko 70. godine (Breuninger i sar., 2013). U drugim svetskim regionima kao što su Australija, Novi Zeland, Florida i Kalifornija, SCC se javlja u ranijoj životnoj dobi, čak i kod osoba mlađih od 20-30 godina (Kallini i sar., 2015). Kod pacijenta sa oboljenjem Xeroderma pigmentosum, SCC obično nastaje u značajno ranijem životnom dobu, obično oko 8. godine, a pacijenti preko 20 godina života imaju preko 1000 puta veći rizik za razvoj SCC (Kallini i sar., 2015). Kod pacijenata sa transplantiranim organima incidencija SCC je osamnaestostruko povećana tokom perioda od 20 godina i ovi pacijenti, iz raznih razloga, razviju SCC u oko 70% slučajeva (Kallini i sar., 2015), najčešće 3-7 godina nakon imunosupresivne terapije kortikosteroidima, azatioprinom i ciklosporinom (Grossman i Leffel, 2012). Kod ovih pacijenta rizik za nastajanje SCC povećan je za 65-250 puta u odnosu na opštu populaciju (Stratigos i sar.,2015).

1.1.3.4. LOKALIZACIJA

Lokalizacija SCC lezija se donekle razlikuje kod osoba svetle ili tamne kože. Kod belaca, promene se u 90% slučajeva nalaze na fotoeksponiranim zonama (Grossman i Leffel, 2012; Kallini i sar., 2015; Edge i sar., 2010; Rigel i sar., 2008; Stratigos i sar., 2015) i to na glavi, vratu (Kallini i sar., 2015; Brauninger i sar., 2013; Grossman i Leffel, 2012; Edge i sar., 2012; Stratigos i sar., 2015) u oko 55% (Kallini i sar., 2015), zatim na dorzumima šaka (Grossman i Leffel, 2012; Kallini i sar., 2015; Stratigos i sar., 2015) i podlakticama (Kallini i sar., 2015; Stratigos i sar., 2015) u 18% slučajeva (Kallini i sar., 2015). Pomenute lokalizacije se odnose na muškarce i žene, mada se kod žena promene često nalaze i na nogama (Kallini i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2012) i to u oko 13% slučajeva (Kallini i sar., 2015). Ostale lokalizacije podrazumevaju ramena i leđa (4%), gornje ekstremitete (3%) i druge zone (7%) (Kallini i sar., 2005). Kutani SCC se često nalazi i na očnim kaptcima (Edge i sar., 2010) i ušnim školjkama (Stratigos i sar., 2015). Kod osoba sa tamnijim tipom kože SCC se javlja podjednako i na fotoneksponiranim i fotoneksponiranim zonama (Gossman i Leffel 2012).

1.1.3.5. KLINIČKA SLIKA

Tipična prezentacija SCC je u vidu solitarne lezije (Grossman i Leffel, 2012; Rigel i sar.,2008) nastale iz prekusornih promena (Grossman i Leffel, 2012), AK, BD i EQ (Breuninger i sar., 2013), ređe de novo (Breuninger i sar.,2013), osim kod imunosuprimiranih osoba kod kojih se mogu javiti brojne, eruptivne promene (Grossman i Leffel, 2012). Klinički izgled kutanog SCC može biti raznolik (Grossman i Leffel, 2012, Breuninger i sar., 2013, Kallini i sar., 2015) i zavisi, pre svega, od lokalizacije (Kallini i sar., 2015). Najčešća klinička prezentacija SCC je u vidu čvrste papule (Grossman i Leffel, 2012; Rigel i sar., 2008; Kallini i sar., 2015) ili plaka (Kallini i sar., 2015; Breuninger i sar., 2013; Grossman i Leffel, 2012) eritematoznih ili boje kože, ređe pigmentovanih (Grossman i Leffel, 2012), često površine prekrivene krastom (Breuninger i sar., 2013) ili ulcerisane (Breuninger i sar., 2013; Rigel i sar., 2008; Stratigos i sar., 2015). Takođe, promena može biti inicijalno samo u vidu ulceracije (Grossman i Leffel, 2012; Breuninger i sar., 2013; Stratigos i sar., 2015; Kallini i sar., 2015), ravnih ili uzdignutih ivica (Breuninger i sar., 2013; Stratigos i sar., 2015), bez tendencije zarastanja (Kallini i sar., 2015), ređe nodusa (Grossman i Leffel, 2012; Rigel i sar., 2008) glatke površine ili u formi kožnog roga (Grossman i Leffel, 2012). Kada nastaje de novo, keratotična faza obično nedostaje i tada se SCC kliniki manifestuje u vidu asimptomatskog plaka manjih dimenzija ili nodusa koji se vremenom uvećava, nekada i ulceriše (Stratigos i sar., 2015). Tumor, dakle, može imati endofitnu ili egzofitnu (invazivnu) komponentu (Rigel i sar.,2008). Granica često može biti nejasna u odnosu na okolnu kožu. Sa uvećanjem, promena obično postaje čvršća i uzdignuta. Progresivna tumorska invazija na kraju rezultira fiksacijom za dublja tkiva i promena postaje palpatorno nepokretna (Grossman i Leffel, 2012). Ukoliko nastaje na mestu prethodne opekotine ili ožiljka različite etiologije naziva se Marjolin ulkus i obično se nalazi na donjim ekstremitetima (Kallini i sar., 2015). Ova forma SCC ima agresivnu prirodu, sklonost lokalnom recidivu i metastazama u limfne noduse (Kallini i sar., 2015).

Kada se javlja na usnama SCC se obično nalazi na donjoj (Kallini i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2012) i to češće kod muškaraca, uzrasta prosečno 53 godine (Kallini i sar., 2015). Obično počinje kao papula (Kallini i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2012), hrapave površine (Grossman i Leffel, 2012) ili plak (Kallini i sar., 2015) na kojima se javljaju fissure i koji, vremenom, može postati erodovan ili ulcerisati (Kallini i sar., 2015). Genitalne promene (na vulvi, penisu ili perianalno) indukovane su HPV i najčešće

se manifestuju u vidu promena verukozne površine, koja se uvećava, a dimenzije mogu biti varijabilne (od manje od 1cm do više od 5cm) (Kallini i sar., 2015). Takođe, promene koje klinički imaju aspekt veruke, ali su rezistente na terapiju najčeće su zapravo SCC (Kallini i sar., 2015).

Na kraju, na klinički izgled ili karakteristike SCC značajno utiče stepen diferencijacije tumora. Dobro diferentovani tumori obično imaju karakteristike zadebljelih, papula ili plakova sa skvamom. Sa druge strane, slabo diferentovani SCC najčeće su mekane konzistencije, bez skvame, erodovani ili ulcerisani, uz posledičnu hemoragiju (Kallini i sar., 2015).

Često je diferenciranje između rano invazivnog SCC i hiperkeratotične AK veoma teško i skoro nemoguće samo na osnovu kliničkog izgleda. U tim slučajevima neophodna je biopsija i histopatološka verifikacija, naročito kod pacijenata sa povećanim rizikom za nastanak metastaza (Brauninger i sar., 2013). U diferencijalnoj dijagnozi, u obzir dolaze promene koje mogu klinički ličiti na AK (BD, ravna i iritirana SK, superficijalni BCC, veruka plana, benigna lihenoidna keratoza, psorijaza, seboroični dermatitis, hronični kutani lupus, porokeratoza, verruca vulgaris, lentigo maligna, solarni lentigo), zatim promene koje mogu ličiti na SCCIS (AK, amelanotični melanom, condyloma acuminatum, numularni ekcem (Kallini i sar., 2015). Pigmentni SCC može imitirati melanom, a ulcerativne lezije mogu ličiti na traumatu, BCC, herpes virus infekcije (Grossman i Leffel, 2012).

1.1.3.6. HISTOLOŠKA SLIKA

Sumnja na SCC se inicijalno bazira na kliničkom nalazu (Stratigos i sar., 2015), ali se definitivna dijagnoza kutanog SCC potvrđuje biopsijom lezije i histopatološkom analizom (Kallini i sar., 2015; Brauninger i sar., 2013), koja je značajna u određivanju prognostičkih parametara (Stratigos i sar., 2015). Uzorak za biopsiju može biti u vidu incizione biopsije ili terapijske ekscizije (Brauninger i sar., 2013). Osnovna histološka karakteristika SCC je prisustvo atipičnih keratinocita ispod bazalne membrane, u dermu ili dublje (Grossman i sar., 2012; Brauninger i sar., 2013). Donja ivica može široko invadirati derm ili može biti u vidu pojedinačnih fokusa mikroinvazije. Atipične skvamozne ćelije karakteriše prisustvo povećanog broja mitozu, atipične mitotske figure, nuklearna hiperhromazija i gubitak intercelularnih mostova. Skvamozna diferencijacija se

histološki uočava kao fokusi keratinizacije u koncentričnim krugovima skvamoznih ćelija koji se nazivaju keratinske perle (Brauninger i sar., 2013). Gubitak diferencijacije udružen je sa smanjenom produkcijom keratina (Grossman i Leffel, 2012). Sa druge strane, prisustvo ožiljka može indikovati rekurentnu bolest ili agresivniji SCC udružen sa ožiljkom.

Histološko gradiranje SCC bazira se na stepenu ćelijske diferencijacije. Tumori manjeg gradusa su uglavnom sačinjeni od uniformnih ćelija koje podsećaju na diferencirane (zrele) keratinocite, sa intercelularnim mostovima i produkcijom keratina. Sa druge strane, SCC većeg gradusa karakterišu atipične ćelije, gubitak interćeljskih mostova i minimalna ili u potpunosti odsutna produkcija keratina, kao i manje jasna razlika između malignih ćelija i susedne strome (Grossman i Leffel, 2012). Formalnu gradirajuću šemu prema keratinocitnoj diferencijaciji ustanovio je Broders još 1932.godine (Broders 1932) i ona je i danas aktuelna. Prema tome, tumori su gradirani na skali od 1 do 4 prema procentu nediferentovanih ćelija (Gossman i Leffel, 2012). **Gradus I** podrazumava dobro diferentovane tumore, kod kojih je 75-100% skvamoznih ćelija diferentovano. **Gradus II** podrazumeva srednje diferentovane tumore, sa 50-75% diferentovanih ćelija. **Gradus III** čine slabije diferentovani tumori, kod kojih je 25-50% ćelija diferentovano. **Gradus IV** su anaplastični tumori sa manje od 25% diferentovanih ćelija (Kallini i sar., 2015). U praksi se češće koristi podela na dobro, srednje i slabo diferentovane SCC koja pored obima keratinizacije razmatra i prisustvo citološke atipije i mitozu (Calonjei sar.,2011).

Postoji nekoliko histoloških podtipova SCC. Kod **akantolotičkog** tipa (Stratigos i sar., 2015, Breuningeri sar., 2013, Grossman i Leffel, 2012) postoji akantoliza keratinocita koja stvara pseudožlezdane strukture (Stratigos i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2012). Ova varijanta čini 2-4% svih SCC i ima veći metastatski rizik u odnosu na uobičajene forme SCC (Stratigos i sar., 2015). Kod **svetloćelijskog** SCC, keratinociti deluju prozračno zbog hidropsnog citoplazmatskog otoka (Grossman i Leffel, 2012). **Vretenastoćelijski** SCC (Breuninger i sar., 2013; Grossman i Leffel, 2012, Stratigos i sar., 2015) je relativno retka forma koja se obično viđa na fotoeksponiranim regijama kod starijih pacijenata (Stratigos i sar., 2015) i agresivnog je ponašanja (Stratigos i sar., 2015, Breuninger i sar., 2013), a karakterišu ga atipične ćelije vretenastog oblika. Kod **verukoznog** karcinoma (Breuningeri sar., 2013, Grossman i Leffel, 2012, Stratigos i sar., 2015), koji je dobro diferentovan (Stratigos i sar., 2015) sa lokalno invazivnim rastom ali malim metastatskim potencijalom (Stratigos i sar., 2015), superficijalna komponenta liči

na virusnu bradavicu sa papilomatozom, dok se dublji delovi protežu u derm i dublje structure (Grosman i Leffel, 2012). Kod **keratoakantoma** se nalaze keratinom ispunjeni krateri (Grossman i Leffel, 2012), a uz donju ivicu gust limfocitni infiltrat odgovoran za spontanu regresiju u najvećem broju slučajeva.

Tumori koji imaju značajniji stepen recidiva i metastaziranja nazivamo SCC visokog rizika (engl. high risk SCC). Karakteristike prema kojima se određuje rizik SCC su:

1. Dijametar tumora (veći od 2cm) (Edge i sar., 2010; Grossman i Leffel, 2012)
2. Dubina invazije više od 2mm (Edge i sar., 2010), i invazija retikularnog derma i potkožnog masnog tkiva (Grossman i Leffel, 2012; Edge i sar., 2010)
3. Tumorska invazija kosti (Grossman i Leffel, 2012; Edge i sar., 2010), mišića (Grossman i Leffel, 2012), nerva (Grossman i Leffel 2012; Edge i sar., 2010)
4. Lokalizacija na usni ili ušnoj školjci (Grossman i Leffel, 2012; Edge i sar., 2010)
5. Tumor na terenu ožiljka (Edge i sar., 2010)
6. Diferentovanost tumora (Edge i sar., 2010) i Broders gradus 3 ili 4 (Grossman i Leffel, 2012)
7. Mitotski indeks (Kallini i sar.,2015)
8. Imunosuresija (Grossman i Leffel, 2012; Edge i sar.,2010)
9. Odsustvo inflamatornog infiltrata (Grossman i Leffel, 2012)

Dijagnoza SCC se, kao što je pomenuto, uvek postavlja biopsijom i histopatološkim pregledom. Svaka perzistentna lezija koja se uvećava ili ne zarasta, posebno ukoliko se nalazi na fotoekspoziranim regijama zahteva biopsiju. Važno je da se biopsijom obezbedi dovoljno duboko tkivo kako bi se mogla napraviti razlika između *in situ* i invazivne forme SCC. Ako su lezije ravne (engl. flat) ili minimalno iznad nivoa kože (manje od 1mm), moguća je površna (shave) biopsija, sa minimalnom post biosionom ranom i ožiljkom. Za elevirane lezije, koristi se tzv. “bušeća” tehnika (engl. punch technique) ili dublja shave ekscizija. S obzirom da kod keratoakantoma dijagnoza umnogome zavisi od kompletne arhitekture, preporučuje se ekscizionna biopsija ili incizionna elipsa koja prolazi kroz čitavu leziju (Grossman i Leffel, 2012).

Kod proširenije forme bolesti, pored histopatološke analize neophodne su i dodatne dijagnostičke procedure. U slučaju zahvaćenosti limfnih nodusa (u kom slučaju su mogući recidivi bolesti, a mortalitet je značajno povećan) neophodan je ultrazvučni pregled, posebno kod tumora visokog rizika (Stratigos i sar., 2015). U slučaju kliničke

sumnje neophodna je histološka potvrda i to punkcionom biopsijom ili otvorenom biopsijom limfnog nodusa (Stratigos i sar., 2015). Kod većih, infiltrativnih tumora sa znacima zahvaćenosti dubljih struktura potrebne su dodante dijagnostičke procedure, kao što je kompjuterizovana tomografija (engl. computerized, computed tomography, CT) ili magnetna rezonanca (engl. magnetic resonance imaging, MRI) za preciznu procenu proširenosti tumora, kao i eventulanih (udaljenih) metastaza (Stratigos i sar., 2015).

Određivanje stadijuma SCC

Trenutni klasifikacioni sistemi obuhvataju **TNM sistem UICC** (Union for International Cancer Control) iz 2009.godine (**Tabela 1**) (Sobin i sar., 2009) i **AJCC** (American Joint Committee on Cancer) iz 2010. godine (**Tabela 2**) (Edge i sar., 2010). Obe klasifikacije podrazumevaju određivanje stadijuma prema karakteristikama primarnog tumora i prisustvi zahvaćenosti regionalnih limfnih nodusa i udaljenih mesta (metastaza).

Tabela 1. UICC TNM klasifikacija (Union for International Cancer Control)

UICC TNM klasifikacija	
T klasifikacija	
T1	Tumori manje i jednako 2cm najveće horizontalne širine
T2	Tumori veći od 2cm najveće horizontalne širine
T3	Duboka infiltracija (skeletni mišići, hrskavica, kost)
T4	Infiltracija baze lobanje i vertebralnih pršljenova (column)
N klasifikacija	
Nx	Regionalni limfni nodusi ne mogu biti evaluirani
No	Bez merastaza u regionalnim limfnim nodusima
N1	Metastaza u solitarnom limfnom nodusu, najvećag dijametra više od 3cm
N2	Metastaze u solitarnom limfnom nodusu, najvećeg dijametra manje i jednako 3cm do maksimalno 6cm Multiple metastaze u limfnim nodusima, sve maksimalnog dijametra manje i jednako 6cm
N3	Metastaze u limfnim nodusima dijametra većeg od 6cm
M klasifikacija	
Mo	Bez udaljenih metastaza
M1	Udeljene metastaze

Tabela 2. AJCC TNM klasifikacija (American Joint Committee on Cancer)

AJCC TNM klasifikacija	
T klasifikacija	
TX	Primarni tumor se ne može oceniti
T0	Nema dokaza o primarnom tumoru
Tis	Karcinom in situ
T1	Tumori manje i jednako 2cm najveće horizontalne širine +0-1 karakteristike visokog rizika*
T2	Tumori manje i jednako 2cm najveće horizontalne širine +2-5 karakteristike visokog rizika
T3	Infiltracija facijalnih i kranijalnih kostiju ¹
T4	Infiltracija skaletnih kostiju ili baze lobanje
N klasifikacija	
Nx	Regionalni limfni nodusi ne mogu biti evaluirani
No	Bez metastaza u regionalnim limfnim nodusima
N1	Metastaza u solitarnom, ipsilateralnom limfnom nodusu, najvećeg dijametra manje i jednako 3cm
N2a	Metastaze u solitarnom, istostranom limfnom nodusu, najvećeg dijametra više od 3cm do maksimalno 6cm Multiple metastaze u limfnim nodusima, sve maksimalnog dijametra manje i jednako 6cm
N2b	Multiple metastaze u istostranim limfnim nodusima, sve maksimalnog dijametra manje i jednako 6cm
N2c	Multiple metastaze u istostranim ili kontraletalnim limfnim nodusima, sve maksimalnog dijametra manje i jednako 6cm
N3	Metastaze u limfnim nodusima dijametra većeg od 6cm
M klasifikacija	
Mo	Bez udaljenih metastaza
M1	Udeljene metastaze

*Karakteristike visokog rizika podrazumevaju: manje od 2 mm histološke debljine tumora, manje i jednako novo invazije u retikularnom dermu, perineuralna invazija, perioralni region, uvo, slabo diferentovani ili nediferentovani tumori

¹Infiltracija mišića i hrskavica nije klasifikovana

Histološko merenje vertikalnog rasta tumora predstavlja dodatni parametar u klasifikaciji koji omogućava bolju procenu rizika od metastaziranja (**Tabela 3**).

Tabela 3. Klasifikacija prema vertikalnom rastu tumora

Stepen rizika	Karakteristike tumora	Procenat metastaziranja
Bez rizika (T1)	Vertikalna debljina manje i jednako 2mm	0%
Niskog rizika (T2)	Vertikalna debljina 2.01-6mm	4%
Visokog rizika (T3)	Vertikalna debljina više od 6 mm	16%

Povećan rizik od metastaza za T2 i T3: imunosupresija, lokalizacija na ušnoj školjci, dediferencijacija i dezmopalstični tip tumora

Konačno, prema TNM klasifikaciji formirana je podela na kliničke stadijume bolesti (**Tabela 4**).

Tabela 4. TNM klasifikacija i klinički stadijum bolesti

Klinički stadijum	T	N	M
Stadujum O	Tis	N0	M0
Stadijum I	T1	N0	M0
Stadijum II	T2	N0	M0
Stadijum III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stadijum IV	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	Sva ki T	N3	M0
	T4	Svaki N	M0
	Sva ki T	Svaki N	M1

1.1.3.7. TERAPIJA SCC

Postoje različiti terapijski modaliteti u terapiji SCC, a odluka o izboru terapijske opcije zavisi od procene rizika recidiva tumora i metastaziranja (Grossman i Leffel, 2012). Osnovni cilj primarnog lečenja SCC je odstranjenje tumora u potpunosti uz očuvanje funkcije i prihvatljiv estetski efekat (Stratigos i sar., 2015). Terapija SCC se može se podeliti u pet grupa (Grossman i Leffel, 2012):

1. Neekscizivne ablativne tehnike
2. Mohs mikrografska hirurgija (engl. Mohs micrographic surgery)
3. Konvencionalna hiruška ekscizija
4. Lokalna terapija
5. Radioterapija

Primarni tretman ili terapija prvog izbora SCC je kompletna hiruška ekscizija, sa histopatološkom proverom ekscizionih margina (Stratigos i sar., 2015). Ipak, u posebnim slučajevima (ređe) moguća je primena **neekscizionih ablativnih tehnika**, kao što su *elektrodisekacija, kiretaža, terapija tečnim azotom, CO₂ laser, intraleziona hemioterapija i fotodinamska terapija*. Ovakvi vidovi terapije ne daju mogućnost kontrole hirurških margina, pa iz tog razloga nisu, kao tretman, u potpunosti prikladne za većinu invazivnih SCC (Grossman i Leffel, 2012).

Konvencionalna kompletna hiruška ekscizija, sa histopatološkom kontrolom ekscizionih margina, kao što je napomenuto, predstavlja terapiju prvog izbora za kutani SCC (Stratigos i sar., 2015), posebno za male primarne SCC (Grossman i Leffel, 2012). Postoje dve forme hiruške ekscizije koje je moguće primeniti: **standardna hiruška ekscizija** i **mikrografska hirurgija** i njene varijane (**Mohs mikrografska hirurgija**). Hiruške margine treba da budu prilagođene kliničkoj veličini i agresivnosti SCC, što je definisano brojnim kliničkim i histološkim faktorima (Stratigos i sar., 2015). Preporučene margine su 4 mm za lezije niskog rizika ili SCC dubine manje od 2mm (Grossman i Leffel, 2012, Stratigos i sar., 2015); za SCC kliničkog dijametra većeg od 2cm, više od 6mm debljine, ili tumore sa ostalim prognostičkim karakteristikama (srednja ili loša diferencijacija, rekurentni tumori, perineuralna invazija, zahvaćenost dubljih subkutanih slojeva/ili lokalizacija na poglavini, ušnim školjkama, usnama, i očnim kaptima) margina od 6mm se smatra neophodnom. Prema EDF-EADO-EORTC konsenzusu, pak, preporuka je minimalna margina od 5mm čak i za tumore niskog rizika, tumore vertikalne debljine manje od 6mm bez faktora visokog rizika (Stratigos i sar., 2015). Za tumore

histološke debljine veće ili jednako 6 mm ili kod tumora visoko rizičnih patohistoloških karakteristika, subkutane invazije, perineuralne invazije, rekurentnih tumora i/ili tumora na visoko rizičnim lokalizacijama preporučuje se proširena margina od 10mm (Stratigos i sar., 2015). **Mohs mikrografska hirurgija** je terapija izbora kada je potreban visok stepen izlečenja i odstranjenje tumora u potpunosti sa minimalnim oštećenjem tkiva, tako da su indikacije za Mohs hiruški pristup duboko infiltrirani SCC, loše definisane kliničke margine, lokalizacija tumora na usnama, ušnim školjkama, nokatnom ležištu, vrhu nosa, kapcima, genitalijama; prethodna radiaciona terapija na zoni na kojoj se nalazi tumor, zahvaćenost nerva, kostiju, mišića, imunosuprimirani pacijenti, recidiv velikog SCC, verukozani karcinom i SCC na hroničim ožiljnim stanjima (Grossman i Leffel, 2012).

U slučaju tipičnih keratoakantoma, posebno na licu, moguća je primena **intralezionalne hemioterapije** (metotreksat, 5FU, bleomicin). Ukoliko povlačenje tumora nije rapidno, ovi tumori se tretiraju hiruški kao ostali SCC (Stratigos i sar., 2015).

Zračna terapija se koristi za lečenje superficijalno invazivnih i lezija srednjeg rizika (Grossman i Leffel, 2012), kao alternativna terapija hiruškoj kod SCC malih dimenzija na regijama niskog rizika, kod inoperabilnih tumora (Stratigos i sar., 2015), za tumore dijametra manje od 2 cm niskog rizika centralno na licu, kapcijima, obrvama, periorbitalnoj regiji, nosu, usnama, bradi, periaurikularnoj zoni, za tumore dijametra više od 2 cm na obrazima, čelu, vratu, poglavini, kod pacijenata starijih od 55 godina (Kallini i sar., 2015) ili za veće tumore na licu i šakama (Stratigos i sar., 2015). Takođe, služi i kao značajna adjuvantna (pomoćna) terapija uz hirušku eksciziju, za tretiranje rezidualne mikroskopske bolesti i kao profilaksa metastatske bolesti (Grossman i Leffel, 2012). Ne preporučuje se za lečenje verukoznog karcinoma gde postoji nizak stepen anaplastične transformacije (Grossman i Leffel, 2012, Stratigos i sar., 2015) ili kod pacijenata sa gendermatozama sa sklonošću ka kutanim kancerima (Xeroderma pigmentosum, Basal cell nevus syndrome) (Stratigos i sar., 2015). Zračna terapija se može koristiti kao adjuvantna u slučajevima identifikovanog perineuralnog SCC u uzorcima tkiva.

U novije terapijske modalitete spadaju inhibitori EGFR (engl. Epidermal growth factor receptor – receptor epidermalnog faktora rasta), kao druga terapijska linija, posle mono ili polihemioterapiskog neuspeha, mada još uvek na nivou kliničkih studija (Stratigos i sar., 2015).

Prevenција je najznačajniji aspekt u smanjenju incidencije i razvoja SCC, uključujući edukaciju u smislu izbegavanja izlaganja suncu i primenjivanje mera zaštite (protektivna garderoba i antisolarni kremovi visokog zaštitnog faktora). Nadoknada

vitamina D, statini i nesteroidni anti inflamatorni lekovi kao hemoprotektivni agensi su još u ispitivanju. Tretiranje tzv. polja kancerizacije (engl. field cancerisation) foto oštećene kože je takođe jedna od preventivnih mera za razvoj SCC. Kod pacijanata sa visokim rizikom za razvoj SCC, kao što su pacijenti na dugogodišnjoj PUVA terapiji, transplantiranim organima ili pacijenti na terapiji BRAF inhibitorima, moguća je hemoprevencija primenom oralnih retinoida (acitretin ili isotretinoin). Mada je pokazano da redukuje pojavu tumora, ova terapija je udružena sa neželjenim efektima što limitira primenu, uz činjenicu da protektivni efekat nestaje ubrzo nakon prestanka uzimanja leka.

1.2. Ćelijski ciklus i kancerogeneza

1.2.1. ĆELIJSKI CIKLUS

Ćelijski ciklus predstavlja niz događaja koji se dešavaju unutar ćelije i koji dovode do njene podele i umnožavanja (AbreuVelez i Howard, 2015; Imoto i sar., 2011). Tokom ovog fundamentalnog procesa, generisanja ćelija iz njih samih, dolazi do dupliranja kompletnog ćelijskog sadržaja, a potom podele tog sadržaja na dve identične “ćerke” ćelije (Imoto i sar., 2011; Sanchez-Berrondo i sar., 2012; Morgan i sar., 2002; Tachibana i sar., 2005). Ćelijski ciklus je veoma organizovan i regulusan proces, koji odgovara specifičnim potrebama određenog tkiva ili tipu ćelija (Sandal 2002; Israels i Israelis, 2001), čija je svrha podela genetskog materijala ćelije i prenošenje genetskih informacija sa jedne ćelijske generacije na drugu (Israels i Israelis, 2001). U tom smislu, inicijalni i najvažniji događaj tokom ćelijskog ciklusa je unožavanje (replikacija) i podela genoma (Knockleby i Lee, 2010) tj. deoksiribonukleinske kiseline, DNK, nosioca genskih informacija, koja mora biti potpuna, precizna i tačna kako bi obe ćelije imale identičnu kopiju hromozoma (Israelis i Israelis 2001; Takisawa i sar., 2000). Pravilna duplikacija i segregacija čitavog genoma podrazumeva koordinaciju različitih regulatornih tačaka u ćeliji (Knockleby i Lee, 2010), koje služe za praćenje i regulaciju progresije ćelijskog ciklusa (AbreuVelez i Howard, 2015). Bilo kakva abnormalnost ili poremećaj regulacije ćelijskog ciklusa je osnova patološkog procesa na nivou ćelije (Buru i Cross, 2003).

Oštećenje gena koji su uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa predstavlja osnovu neoplastične transformacije ćelije (Sandal 2002).

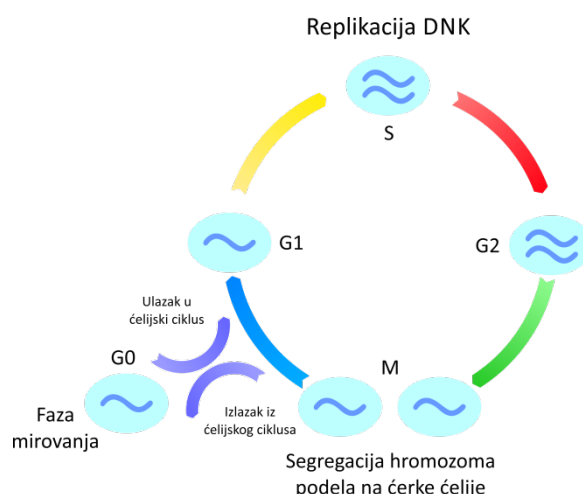
Ćelijski ciklus obuhvata nekoliko faza. U ciklusu ćelija eukariota, koje imaju nucleus, možemo da izdvojimo tri osnovne: 1. interfaza, tokom koje ćelija raste i nakuplja hranljive materije neophodne za mitozu i dupliciranje DNK (G1, S, G2 faze), 2. mitozu (M faza) tokom koje ćelija počinje da se deli na dve identične “ćerke ćelije” i 3. završna faza, citokineza, tokom koje su nove ćelije kompletno podeljene (AbreuVelez i Howard, 2015). Dakle, dva su ključna događaja koja se dešavaju tokom ćelijskog ciklusa - sinteza DNK, nazvana S faza, i mitozu, nazvana M faza (Sandal 2000; Israelis i Israelis 2001; Canepa i sar., 2007; Tachibana i sar., 2005; Imoto i sar., 2011). Tokom S faze dešava se sinteza ili duplikacija DNK u hromozomima, a tokom M faze dupliranje ostalih delova ćelije koji se potom dele podjednako na dve ćerke ćelije (Sandal 2002; Morgan i sar., 2002; Canepa i sar., 2007; Van der Heuvel 2005; Tachibana i sar., 2005; Imoto i sar., 2011). Periodi između ova dva procesa nazivaju se pauze (engl. gap, G) (Buru i Corss, 200; Canepa i sar., 2007; van der Heuvel 2005; Imoto i sar., 2011), tokom kojih se dešava priprema za sintezu DNK i mitozu (Tachibana i sar., 2005). U tom smislu, ćelijski ciklus je podeljen na četiri faze G1, S, G2, M (**Slika 1**) (Buru i Cross, 2003; Israelis i Israelis 2001; Sandal 2002; Tachibana i sar., 2005; Canepa i sar., 2007; Gillett i Barnes, 1998; Morgan i sar., 2002; Imoto i sar., 2011).



Slika 1. Ćelijski ciklus - Faze ćelijskog ciklusa. G1 i G2 pauze – faze “odmora” tokom interfaze. S faza replikacije DNK. M, mitozu (*Modifikovano iz Emersy's Elements of Medical genetics*)

G1 faza povezuje završetak M faze i inicijaciju S faze sledećeg ciklusa (van der Heuvel 2005; Imoto i sar., 2011) i u njoj se dešava priprema ćelije za sintezu DNK (Tachibana i sar., 2005). G2 faza razdvaja S i M fazu (van der Heuvel 2005; Imoto i sar., 2011) i služi za pripremu ćelije za mitozu (Tachibana i sar., 2005). Pored toga, utvrđeno je i postojanje posebne tzv. faze mirovanja, G0 (Buru i Cross, 2003; Canepa i sar., 2007;

Gillett i Barnes, 1998; Morgan i sar., 2001), tokom koje se ćelija ne deli i u koju može alternativno preći, napuštajući ćelijski ciklus (**Slika 2**). Većina ćelija u ljudskom organizmu se zapravo nalazi u fazi mirovanja, tj. metabolički aktivnom stanju van ćelijskog ciklusa (Tachibana i sar., 2015), dok se u manjem broju ćelija (kao što su ćelije koštane srži, epitelne ćelije), koje su aktivne, ćelijski ciklus kontinuirano odigrava (Tachibana i sar., 2005).



Slika 2. Ćelijski ciklus. DNA replikacija se dešava jednom tokom ćelijskog ciklusa, tokom S faze. Ćelija može napustiti ćelijski ciklus prelazeći u fazu mirovanja G0, tokom starenja i diferencijacije (*Modifikovano prema Tachibana i sar., J.Pathol 2005*)

Regulacija ćelijskog ciklusa podrazumeva da se događaji tokom svake faze u potpunosti završe pre prelaska u sledeću. Tzv. kontrolne tačke za praćenje integriteta DNK postavljene su u drugom delu G1 faze i na prelasku G2 u M fazu, kako bi se sprečila progresija mutiranih i oštećenih ćelija (Israelis i Israelis 2001). Tokom G1 faze, ćelija raste i metabolički je najaktivnija. Trajanje ove faze je promenljivo, za razliku od S, G2 i M faze, čija dužina je prilično konstantna. Zato je dužina G1 faze najznačajnija za trajanje čitavog ćelijskog ciklusa.

Proteini uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa u direktnoj su i uskoj međusobnoj povezanosti i interakciji sa ciljem da se nakon odgovarajuće stimulacije i ulaska ćelije u ćelijski ciklus (ili započinjanja ćelijskog ciklusa) osigura tačna i potpuna replikacija DNK pred ćelijsku deobu (Gillett i Barnes, 1998; Arias, Walter 2007). Osim precizne regulacije replikacije DNK tokom ćelijskog ciklusa od velikog značaja za pravilnu ćelijsku deobu je i neophodnost da se replikacija DNK desi samo jednom tokom ćelijskog ciklusa (Bell i

Dutta, 2002; Tachibana i sar., 2005; Li i Jin, 2010; Truong i Wu, 2011; Takisawa i sar., 2000; Wu i sar., 2014; Lei 2005; Madine i sar., 2000; Wu i sar., 2012; Samson i Bell, 2013; Chuang i sar., 2012).

U ćelijama većine tkiva, ćelijski ciklus i deoba ćelija se ne dešava tokom rasta i razvoja u stanje terminalnog sazrevanja i diferencijacije u kojem ćelija dostiže svoju finalnu funkcionalnu ulogu (Lei 2001), osim u tkivima i organima koji tokom života zadržavaju sistem regeneracije iz sopstvenih stem ćelija, kao što je koža, debelo crevo ili grlić materice, gde su ćelije kontinuirano u dinamičnom stanju rasta i diferencijacije tokom kojeg se ćelijski ciklus nepraktidno odvija (Stoeber i sar., 2001).

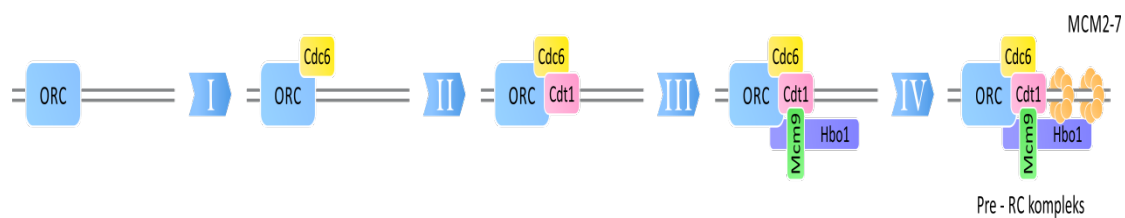
1.2.1.1. INICIJACIJA REPLIKACIJE DNK

Replikacija hromozomalne DNA je centralni biološki događaj koji se odigrava unutar ćelije (Wu i sar., 2014; Takisawa i sar., 2000; Wu i sar., 2012) To je korak integrisan u ćelijski ciklus deobe ćelije i stogo je regulisan (Chuang i sar., 2012; Fernandez-Ciz i sar., 2013; Stoeber i sar., 2001) kompleksnom mrežom ekstra i intracelularnih signalnih puteva (Stoeber i sar., 2001). Zbog svoje kompleksnosti (Tye 1999) i veličine (Tye 1999) (koja se procenjuje na od 10^7 do preko 10^9 bp (Li i Jin, 2010; Wu i sar., 2014)) genom eukariota se, u ćeliji, nalazi organizovan u hromosome (Lei i Tye, 2001), pa humani genom nije jedna kontinuirana spirala DNK, već je podeljen na 46 hromozoma svake diploidne ćelije (Tachibana i sar., 2005). Da bi se sinteza DNK završila u ograničenom vremenskom roku, svaki hromozom sadrži hiljade polaznih tačaka (engl. starting points) na kojima se replikacija simultano dešava, koje se nazivaju mesta početka replikacije (engl. origins of replication) (Tachibana i sar., 2005; Diffley 2011; Wu i sar., 2014, Samson i sar., 2013). Aktivacija ovih mesta je usklađena i odvija se u određenom trenutku tokom S faze (Lei i Tye, 2001; Type i sar., 1999; Tachibana i sar., 2005, Madinei sar., 2000; Chuang i sar., 2012), samo jednom tokom ćelijskog ciklusa (Tachibana i sar., 2005; Wu i sar., 2014; Maioranoi sar., 2006; Takisawai sar., 2000; Samson 2013; Wu i sar., 2012; Troung i sar., 2011; Wu i sar., 2012; Diffley 2011, Li i Jin, 2010) radi održanja genske stabilnosti (Wu i sar., 2014; Wu i sar., 2012; Troung i sar., 2011). Pre početka replikacije DNK, ta mesta moraju, na neki način biti "pripremljena" za dalji proces sinteze (Chuang i sar., 2012; Stoeber i sar., 2001). To se dešava tokom G1 faze ćelijskog ciklusa, kao uvod u sintezu DNK, a podrazumeva tačno određene korake tokom kojih

dolazi do stvaranja “privlačenja” i “montiranja” kompleksa određenih proteina na mestima replikacije - delovima replikacione viljuške (Lei i Tye, 2001; Diffley 2011). Ovaj veoma kompleksan proces je univerzalan za sve organizme i u njegovom izvođenju i regulaciji funkciju ima najmanje dvadeset proteina, od kojih jednu od glavnih uloga ostvaruju proteini odražavanja minihromozoma (engl. minichromosome maintenance proteins, MCM) (Lei i Tye, 2001; Tye 1999; Medine 2000). Njihovo prisutvo na hromatinu tokom S faze je ključno za proces DNA replikacije (Tachibana i sar., 2005; Knockleby i Lee, 2010; Chuang i sar., 2012; Arias i sar., 2007; Wu i sar., 2012, Truong i Wu; 2011). Kompletan hromatin koji će biti replikovano tokom S faze mora, prethodno biti, uslovno, “obeleženo” (Chuang i sar., 2012; Arias i sar., 2007; Wu i sar., 2012; Stoeber i sar., 2001) vezivanjem ovih proteina tokom rane M i G1 faze ćelijskog ciklusa (Tachibana i sar., 2005, Masatai sar., 2011, Stoeber i sar., 2001), što se drugačije, figurativno, naziva “davanjem dozvole” (eng. licencing) za započinjanje DNK replikacije (Tachibana i sar., 2005; Knockleby 2010, Chuang i sar., 2012; Arias i sar., 2007, Wu i sar., 2012; Truong i sar., 2011). Inicijacija sinteze DNK je usklađena sa fazom ćelijskog ciklusa, pozitivnom i negativnom regulacijom (Tye 1999). Pozitivna regulacija podrazumeva signalizaciju pokretanja DNK sinteze, a negativna - prevenciju reinicijacije (Tye 1999). Određeni red i matematička preciznost kojom se pomenuti događaji odvijaju osiguran je tačnim obrascem genske ekspresije u diferenciranim ćelijama (Tye 1999). Inicijacija započinje istovremeno na više replikacionih mesta na DNK (Wu i sar., 2014; Samson i Bell, 2013), a dešava se u dva koraka. Prvi je selekcija ili odabir mesta replikacije, a drugi je regrutovanje proteina koji imaju ulogu u replikaciji na pomenutim mestima i, posledično, proces sinteze DNK (Wu i sar., 2014). Uvođenje u sintezu možemo podeliti na 1. formiranje prereplikativnog kompleksa (engl. prereplicative complex, pre-RC) na mestima replikacije, čime se uslovno daje dozvola za početak replikacije; 2. aktivaciju pre-RC tj. konverziju pre-RC u inicijalni kompleks (Takisawa i sar., 2000; Truong i Wu, 2011), čime aktivno započinje sinteza DNK i 3. prevenciju eventualne re-replikacije (Takisawa i sar., 2000). Ključnu ulogu u regulaciji rane faze inicijacije imaju dva kompleksa: kompleks prepoznavanja mesta početka replikacije (engl. origin recognition complex, ORC) i kompleks održavanja minihromozoma (Knockleby 2010), kao pozitivni regulatori (Knockleby 2010). Osim ovih i drugi regulatorni proteini (Cdt1, Cdc6, geminin, Cdc45 i Cdc7- DDK su neophodni u regulaciji inicijacije DNK replikacije (Knockleby 2010). Inicijatorni protein, ORC, sastavljen je od više podjedinica (Li 2010; Diffley 2011), (ORC1-5) (Knockleby 2010), čije je formiranje

neohodno pre početka sinteze DNK, prepoznaje, a potom se i vezuje za mesta replikacije (Samson i Bell, 2013; Knockleby 2010; Li i Jin, 2010), po izlasku ćelije iz mitoze, tokom rane G1 faze (Knockleby 2010; Li i Jin, 2010). U daljem toku G1 faze, dolazi do regrutovanja proteina koji se naziva protein ciklusa ćelijske deobe 6 (engl. cell division cycle 6 – Cdc6) (Samson i Bell, 2013), a potom vezivanje drugog faktora DNK replikacije, Cdt1 (Li i Jin, 2010; Knockleby 2010; Samson i Bell, 2013). Dakle, ORC predstavlja platformu za vezivanje Cdc6 i Cdt1 proteina (Wu i sar.,2014), a svi oni platformu koja olakšava vezivanje MCM2-7 kompleksa posredno za hromatin (Li i Ji 2010; Tachibana i sar., 2005; Samson i Bell, 2013; Fernandez-Cid i sar., 2013), tokom G1 faze (Fernandez-Cid i sar., 2013). Vezivanje MCM2-7 kompleksa omogućava protein MCM9 (Li i Jin, 2010; Takisawa i sar.,2000; Truong i Wu, 2011), koji se direktno vezuje za Cdc1 (Truong i Wu, 2011), a taj način mu (Cdc1) omogućava ulogu u 1. stabilizaciji MCM2-7 tokom njihovog regrutivanja (Samson i Bell, 2013) i 2. aktivaciji ovog kompleksa, stimulišući njegovu helikaznu aktivnost (Truong i Wu, 2011).Osim toga, u vezivanju MCM kompleksa za hromatin značajnu ulogu ima i MCM10(Takisawai sar., 2000, Truong i Wu, 2011), nazvan protein vezivanja za hromatin (engl. chromatin-binding protein) (Takisawa i sar., 2000).

Vezivanje MCM2-7 kompleksa je proces koji zavisi od hidrolize ATP-a (Samson i Bell, 2013; Fernandez-Cid i sar., 2013), koju vrši Cdc6 (Fernandez-Cid i sar., 2013). Međusobno vezani pomenuti proteini (ORC, Cdc6, Cdt1 i MCM2-7) formiraju pre-RC (Li i Jin, 2010, Wu i sar., 2014; Tachibana i sar., 2005; Fernandez-Cid i sar., 2013; Truong i Wu, 2011) (**Slika 3**), a njihovo međusobno povezivanje traje nekoliko sekundi (Samson i Bell, 2013), tokom kasne mitoze i rane G1 faze (Truong i Wu, 2011). Formiranjem i vezivanjem pre-RC za mesta replikacije, uslovno se “daje dozvola” za započinjanje replikacije (Tachibana i sar., 2005; Knockleby i sar., 2010; Chuang i sar., 2012; Arias i sar., 2007; Wu i sar., 2012; Fernandez-Cid i sar., 2013). To se smatra ključnim korakom koji omogućava početak replikacije DNK (Li i Jin, 2010), a dešava se tokom kasne M i rane G1 faze (Diffley 2011).



Slika 3. Montiranje pre-RC tokom “davanja dozvole” za replikaciju. (I) U ranoj G1 fazi, Cdc6 se regrutuje na mesto replikacije preko interakcije sa ORC kompleksom. (II) Cdc6 regrutuje Cdt1 na mesto replikacije. (III) Dva pozitivna regulatora Mcm9 i Hbo1 se preko Cdt1 vezuju za mesto replikacije. (IV) MCM2-kompleks se montira na mesto replikacije tokom kasne G1 faze. Pre-RC je kompletno formiran i mesto replikacije je spremno za kopiranje (engl.fired) tokom S faze (*Modifikovano prema Li, Jin. Protein Cell. 2010*)

Mozemo da kažemo da je uvod u sintezu DNK vezivanje inicijatora i replikatora. U tom kontekstu, **replikator** je DNK sekvenca za koju se vezuje inicijator, a **inicijator** kompleks koji čine ORC, Cdc6, Cdt1 i MCM 2-7 (Bell i Dutta, 2002). Regulacija pre-RC komponenti vrši se fosforilacijom, dejstvom ciklin zavisnih kinaza (engl. cyclin dependent kinases, CDKs), a dodatnu kontrolu ovog kompleksa ostvaruju MCM9 i Hbo1 proteini (Li i Jin, 2010). Inaktivacija ovih inicijatornih faktora (*ORC, Cdc6, Cdt1 i MCM 2-7*) ključna je u prevenciji reinicijacije DNA replikacije (Li i Jin, 2010, Truong i Wu, 2011). Pre-RC ostaje vezan za hromatin do kasne G1 faze (Tachibana i sar., 2005). Tokom tranzicije iz G1 u S fazu (G1-S granica), pre-RC aktiviraju CDK2i Dbf4-zavisna kinaza (Dbf4-dependent kinase, DDK)(Wu i sar., 2012, Tachibana i sar., 2005, Wu i sar., 2014, Truong i Wu, 2011). U daljem toku, dolazi do porasta koncentracije ciklina A/E/CDK2 i Cbf4/Cdc7, dalje aktivacije pre-RC (Tachibana i sar., 2005; Wu i sar., 2014), formiranjem pre-inicijalnog kompleksa (engl. pre-initiation complex, pre-IC)(Douglas i sar., 2008) i nastavka S faze (Tachibana i sar., 2005; Wu i sar., 2014). Iako se vezivanje MCM2-7 kompleksa i formiranje pre-RC dešava u G1 fazi, oni bivaju aktivirani od strane CDK2 i DDK tek tokom S faze (Truong i Wu, 2011). Ulogu u aktivaciji pre-RC ima i Cdc45 (Takisawa i sar., 2000; Truong i Wu, 2011), vezivanjem za MCM kompleks na početku S faze (Truong i Wu, 2011), što je preduslov za dalje delovanje drugih kinaza (Takisawa i sar., 2000) u inicijaciji DNA replikacije (Truong i Wu, 2011)

1.2.1.2. STVARANJE REPLIKACIONE VILJUŠKE

Nakon aktivacije pre-RC, u nastavku ćelijskog ciklusa, dolazi do aktivacije MCM proteina kao replikativnih helikaza (Wu i sar., 2014; Sanchez-Ferrondo i sar., 2012), vezivanjem Cdc45 i GINS (jap. 'go, ichi, ni, san' - '5, 1, 2, 3') proteina (Makarova i sar., 2005) na mestima replikacije (Wu i sar., 2014) - pretpostavka je da se Cdc45 vezuje direktno za MCM, tokom G1 faze, ali da ta povezanost postaje stabilna tek tokom S faze (Takisawa i sar., 2000). Vezivanje Cdc45 i GINS uslovljeno je aktivacijom pre-RC (Wu i sar., 2014), ali, sa druge strane i samo vezivanje Cdc45 predstavlja korak u aktivaciji pre-RC (Takisawa i sar., 2000; Truong i Wu, 2011). Cdc45, GINS i MCM međusobno raguju formirajući CMG kompleks koji deluje kao aktivna helikaza (Wu i sar., 2014), dovodeći do odvijanja DNK navoja tokom elongacione faze DNK replikacije (Diffley 2011), ali i **privlačenja** brojnih replikatronih proteina: DNK polimeraza, replikacionog proteina A (engl. replication protein A, RPA), jedarnog antigena proliferišućih ćelija (engl. proliferating cell nuclear antigen, PCNA (Takisawa i sar., 2000, Truong i Wu, 2011), replikacionog faktora C (engl. replication factor C, RFC) (Truong i Wu, 2011), topoizomeraze i primaza (Wu i sar., 2014), kao i njihovog **vezivanja** za hromatin (Takisawa i sar., 2000) tj. mesta replikacije (Wu i sar., 2014). Smatra se da i Cdc1 protein takođe stimuliše MCM2-7 helikaznu aktivnost, kojom dolazi do odvijanja DNK (Truong i Wu, 2011).

Dakle, u daljem toku replikacije dolazi do razdvajanja DNK navoja i formiranja tzv. **replikacione** viljuške, u kome učestvuje na desetine polipeptida koji deluju sinhronizovano koordinišući sintezu DNK, među kojima je i pomenuti CMG kompleks (Cdc45/MCM2-7/GINS) (Wu i sar., 2014).

Mehanizam odvijanja DNK heliksa tokom inicijacije i elongacije idalje nije u potpunosti jasan (Sanchez-Berrondo i sar., 2012). Pojedini podaci ukazuju na činjenicu da aktivacija DDK dovodi do promena građe MCM, što posledično indukuje "topljenje" (engl. melting) mesta replikacije na DNK (Takisawa i sar., 2000). Uočeno je da pre-RC ostaje izvesno vreme na mestu replikacije pre nego što se helikaza aktivira i aktivno započne DNK replikacija (Diffley 2011). Aktivacija helikaze dešava se samo tokom S i G2 faze (Diffley 2011). To je kompleksan proces koji obuhvata preoblikovanje MCM2-7 grupe proteina, u kojoj se dupli heksamer razdvaja i pojedinačni heksameri posebno vezuju oko svake niti DNK lanca (Diffley 2011). Za ovaj korak je neophodno prethodno vezivanje Cdc45 i GINS proteina za MCM2-7 (uz učešće Sld2, Sld3, Sld7 i Dpb11) i

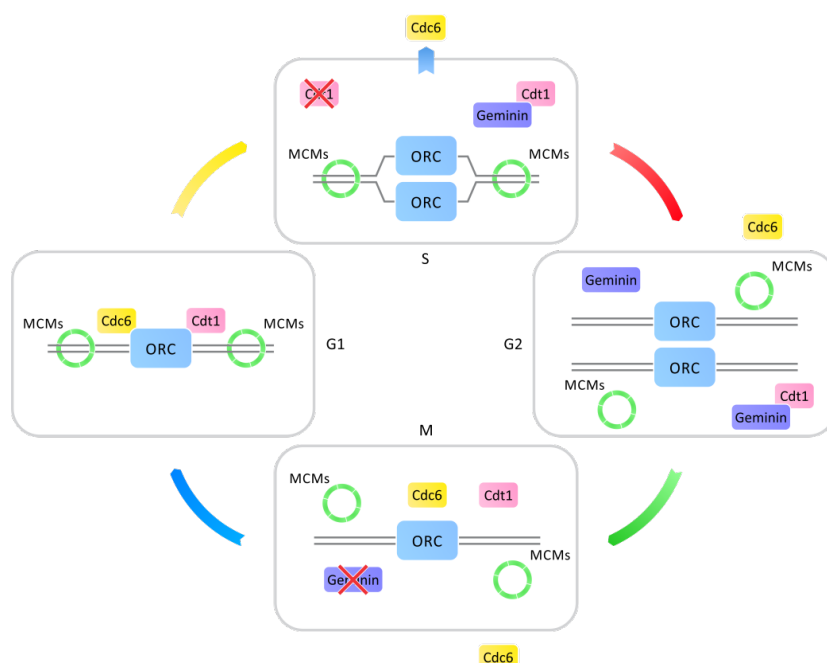
delovanje Cdc45-Mcm2-7-GINS kompleksa kao helikaze, za odvijanje DNK lanca tokom elongacione faze replikacije DNK (Diffley 2011). U proseku ostvarivanja pomenute uloge prvo dolazi do vezivanja, a potom aktivacije helikaze, a postojanje ova dva odvojena koraka i njihova različita regulacija takođe ima značaja u kontroli replikacije DNK (Diffley 2011). Helikaza ne može ponovo vezati za mesta replikacije u S fazi i na taj način je onemogućeno ponovno replikovanje DNK, odnosno moguće je samo jednom tokom ćelijskog ciklusa (Diffley 2011).

1.2.1.3. ODRŽAVANJE GENSKE STABILNOSTI

U kontroli DNA replikacije tj. pravilne duplikacije DNK i očuvanja genske stabilnosti (kao preduslova normalne ćelijske proliferacije) uključeni su 1. ograničavanje replikacije na S fazu i 2. prevencija ponovne replikacije (Bell i Dutta, 2002; Tachibana i sar., 2005; Li i Jin, 2010; Truong i Wu, 2011; Takisawa i sar., 2000; Wu i sar., 2014, Lei i Tye, 2001, Madine i sar., 2000; Wu i sar., 2012; Samson i Bell, 2013; Chuang i sar., 2012). Održavanje stabilnosti genoma u ćeliji regulisano je direktnom inhibicijom pre-RC i to inhibicijom Cdc6, MCM2-7 ORC, inhibicijom Cdt1-MCM2-7 kompleksa i njegovim izmeštanjem iz jedra, kao i direktnom fosforilacijom MCM2-7, sve pod uticajem CDK (Diffley 2011).

Tokom ćelijskog ciklusa i procesa replikacije DNK, dolazi do fosforilacije MCM podjedinica i izmeštanja MCM kompleksa sa dela DNK koji je replikovano (Tachibana i sar., 2005). Na taj način replikovana DNK više nije "obeležena" za nastavak replikacije (za razliku od nereplikovanog dela DNK vezanog za MCM), što obezbeđuje da se replikacija desi samo jednom tokom ćelijskog ciklusa (Tachibana i sar., 2005), odnosno prevenira rereplikaciju (Li i Jin, 2010). Ovo je regulisano na dva načina: 1. kontrolom dostupnosti određenih komponenti pre-RC u nukleusu i 2. regulacijom aktivnosti komponenti pre-RC, hemijskom modifikacijom (Wu i sar., 2014). Na primer, Cdc6 i Cdc1 proteini, prisutni samo u kasnoj M i G1 fazi, fosforilisani su kada je pre-RC aktivan tokom tranzicije iz G1 u S fazu, a kada ćelija uđe u S fazu dolazi do njihove brze degradacije (Wu i sar., 2014). Pored toga, funkcija Cdt1 se inhibira direktnom interakcijom sa malim nuklearnim proteinom, gemininom (Diffley 2011; Knockleby 2010; Truong i Wu, 2011), sa posledičnim blokiranjem Cdt1-MCM interakcije na hromatinu (Knockleby 2010; Li i Jin, 2010; Truong i Wu, 2011) i prevencijom vezivanja

pre-RC (Li i Jin, 2010; Truong i Wu, 2011) ili PCNA-zavisnom degradacijom Cdt1 (Diffley 2011), tokom S (Diffley 2011; Truong i Wu, 2011) i G2 faze (Truong i Wu, 2011). Smanjenje regulacije Cdc6 dešava se, ubikvitin-posredovanom proteolizom i inhibicijom Cdc6 transkripcije i vezivanjem specifičnih inhibitora (Li i Jin, 2010), a nakon fosforilacije i izbacivanjem iz jedra (Tachibana i sar.,2000) (**Slika 4**). Kontrola dostupnosti pojedinih komponenti pre-RC - MCM, Cdc6 (Wu i sar., 2014; Li i Jin, 2010) i Cdt1 (Li i Jin, 2010) ostvaruje se i njihovim transportom iz nukleusa, tokom S, G2 i M faze (Wu i sar., 2014). Čak i MCM2-7 kompleks može biti fosforilisan, dejstvom Cdc28 i prebačen iz jedra u citoplazmu tokom S, G2 i M faze (Li i Jin, 2010). pored degradacije proteina i translokacije pojedinih komponenti pre-RC i fosforilacija svake od komponenti pre-RC remeti/prekida njihovu aktivnost neophodnu za vezivanje, “montiranje” pre-RC za mesta replikacije. Glavnu ulogu u pomenutom procesu regulacije imaju CDK (Wu i sar., 2014, L, Jin 2010). U tom smislu, CDK-zavisna fosforilacija MCM igra negativnu ulogu u replikaciji DNA (Takisawa i sar., 2000). Kada je aktivnost CDKs minimalna, tokom G1 faze, komponente pre-RC nisu fosforilisane i omogućeno je vezivanje pre-RC. Suprotno, kada su CDKs aktivne, tokom prelaska u S fazu, od komponenti pre-RC koje su fosforilisane, pojedine bivaju degradirane ili transportivane u citoplazmu, ostale gube svoju funkciju u formiranju pre-RC (Wu i sar., 2014).



Slika 4. MCM vezani za hromatin regulišu DNA replikaciju. ORC se vezuje za mesta replikacije. U G1 fazi, ORC služi kao platforma za Cdc6 i Cdt1 (engl. licensing factors), neophodne za regrutovanje MCM proteinskog kompleksa za hromatin, poslednji korak u formiranju pre-RC. Tokom S faze, MCM deluju kao DNA helikaza, u odvijanju namotaja hromatina

(engl. super coiled state of chromatin). MCM se izmeštaju sa replikovanog hromatina, a ponovno vezivanje tokom S, G2 i rane M faze je prevenirano/sprečeno 1. izmeštanjem Cdc6 u citoplazmu, 2. degradacijom Cdt1 i 3. inhibicijom Cdt1, gemininom. Tokom mitoze, nuklearna opna se dezintegriše/raspada i degradacija inhibitora DNK replikacije omogućava formiranje pre-RC (*Modifikovano prema Tachibana i sar., J Pathol. 2005*)

1.2.2. **PROTEINI ODRŽAVANJA MINIHROMOZOMA**

Proteini održavanja minihromozoma (engl. **Mini Chromosome Maintenance** proteins) su familija proteina koja se nalazi u svim ćelijama eukariota i sastoji se od 6 proteina, koji su označeni kao MCM2-7 (Labib i Diffley, 2001; Knockleby 2010; Bailis i Frosburg, 2006; Tye 1999; Simon i Schwacha, 2014). Oni su, prvobitno identifikovani kao proteini neohodni za održavanje minihromozoma (engl. **maintenance of minichromosome**) kod gljivice *Saccharomyces cerevisiae* (Tay 1999; Maiorano i sar., 2006; Masata i sar., 2011), što je sugerisalo njihovu ulogu u replikaciji DNK (Tay 1999, Maiorano i sar., 2006). Danas se, definitivno, zna da ovaj kompleks, koji sadrži 2-7 navoja (Simon i Schwacha, 2014) ima ključnu ulogu u **regulaciji replikacije DNK** (Maiorano i sar., 2006; Tachibana i sar., 2005; Samson i Bell, 2013; Knockleby 2012; Simon i Schwacha, 2014; Truong i Wu, 2011; Fernandez-Cidi sar., 2013; Kusunoki i Ishimi, 2013; Li i Jin, 2010; Masata i sar., 2010; Wu i sar., 2012; Chuang i sar., 2012; Arias i sar., 2007). MCM2-7 je heksamer šest srodnih polipeptida (mcm2-7) koji imaju sposobnost međusobne interakcije (Maiorano i sar., 2006; Lei i Tye, 2001). Na taj način, oni, *in vivo*, formiraju prstenastu strukturu, tj. heteroheksamer (Labib i Diffley, 2001, Bailis i Frosburg, 2006; Maiorano i sar., 2006) i tako se, u procesu sinteze DNK (Lei i Tye, 2001), vezuju za mesta replikacije (Bailis i Frosburg, 2006; Maiorano i sar., 2006), u okviru pre-RC (Bailis i Frosburg; 2006, Maiorano i sar., 2006; Simon i Schwacha, 2014, Li i Jin, 2010, Wu i sar., 2014; Tachibana i sar., 2005; Fernandez-Cid i sar., 2013; Truong i Wu, 2011; Knockleby 2010; Chuang i sar., 2012; Arias i sar., 2007; Wu i sar., 2012; Simon i Schwacha, 2014). MCM kompleks, dakle, predstavlja komponentu faktora licenciranja (pre-RC), pa se drugačije naziva **faktor davanja dozvole** (engl. **licencing factor**) za replikaciju DNK (Labib i Diffley, 2001; Knockleby 2010; Chuang i sar., 2012; Arias i sar., 2007; Wu i sar., 2012; Fernandez-Cid i sar., 2013; Tachibana i sar., 2005; Truong i Wu, 2011).

MCM kompleks ima esencijalnu ulogu u regulaciji replikacije DNK eukariotskih ćelija (Tachibana i sar., 2005; Maiorano i sar., 2006; Samson i Bell, 2013; Knockleby 2012; Simon i Schwacha, 2014; Truong i Wu, 2011; Fernandez-Cid i sar., 2013; Kusunoki i Ishimi, 2013; Li 2010; Masata i sar., 2010; Wu i sar., 2012; Chuang i sar., 2012; Arias i sar., 2007), na taj način što učestvuje u **inicijacijalnoj** (Takisawa i sar., 2000; Diffley 2011; Knockleby 2010; Labib 2001; Bailis i Frosburg, 2006; Cortezi sar.,

2004; Tye 1999; Maiorano i sar., 2006; Li i Jin, 2010; Wu i sar., 2014; Tachibana i sar., 2005; Fernandez-Cid i sar., 2013; Truong i Wu, 2011; Wu i sar., 2014) i **elongacionoj** fazi replikacije eukariotske DNK (Bailis i Frosburg 2006; Labib i Diffley, 2006; Cortez i sar., 2004; Tye 1999; Maiorano i sar., 2006; Simon i Schwacha; 2014), specifično u formiranju i elongaciji replikacione viljuške (Knockleby 2010; Bailis i Frosburg, 2006; Laskey, Madine 2003). MCM2-7 proteini su jedarni proteini (Tye 1999), koji se vezuju za hromatin zavisno od faze ćelijskog ciklusa (Maiorano i sar., 2006). Tokom kasne M i tokom G1 faze dolazi do njihovog čvrstog povezivanja sa hromatinom (Simon i Schwacha 2014; Maiorano i sar., 2016) i to traje tokom S faze (Blow i Dutta, 2005), da bi krajem S i tokom G2 faze oni bili uklonjeni sa hromatina (Maiorano i sar., 2006; Li i Jin; 2010, Wu i sar., 2014; Knockleby 2010; Truong i Wu, 2011; Tachibana i sar., 2005). Ovaj fenomen dešava se precizno usklađenom interakcijom sadrugim komponentama pre-RC, koja je pod uticajem CDK (Tye 1999; Li i Jin, 2010; Truong i Wu, 2011; Wu i sar., 2012). Na taj način se ostvaruje ograničavanje replikacije hromozoma samo jednom tokom ćelijskog ciklusa (Maiorano i sar., 2006, Bell i Dutta, 2002, Tachibana i sar., 2005, Truong i Wu, 2011; Takisawa i sar., 2000; Wu i sar., 2014; Lei i Tye, 2001; Madine i sar., 2000; Wu i sar., 2012; Samson i Bell, 2013; Chuang i sar., 2012; Wu i sar., 2012; Diffley 2011; Li i Jin, 2010), što znači da MCM kompleks igra glavnu ulogu u održavanju stabilnosti genoma (Bailis i Frosburg, 2006; Diffley 2011). Nakon mitoze njihova ekspresija se smanjuje i oni gube svoju ulogu odvajajući se od ORC (Blow i Dutta, 2005).

Tokom ćelijskog ciklusa MCM kompleks je moguće detektovati u jedru, na mestima replikacije DNK (Maiorano i sar., 2006; Knockleby 2010), na aktivnoj replikacionoj viljušci (Bailis i Frosburg, 2006) ali i na drugim mestima, npr. centrozomu (Knockleby 2010). U fazi ćelijskog mirovanja, MCM proteini bivaju izmešteni iz nukleusa (Bailis i Frosburg, 2006). Kada je DNK replikacija završena svi MCM proteini se izmeštaju sa hromatina, ali ostaju rastvoreni u jedru tokom G2 faze i rane mitoze (Tachibana i sar., 2005). Sprečavanje ponovnog vezivanja MCM za DNK ostvaruje se povećanom aktivnošću ciklinA/CDK2 i funkcionalnom inaktivacijom faktora koji imaju ulogu u njihovom vezivanju (Tachibana i sar., 2005).

Osim familije šest MCM2-7 proteina identifikovani su još i MCM1, MCM8, MCM9 i MCM10 proteini (Maiorano i sar., 2006). MCM1 je transkripcioni faktor sa potencijalnom ulogom u sintezi DNK i smatra se da reguliše Cdc6 ekspresiju; MCM10 je neophodan za inicijaciju sinteze DNK (Maiorano i sar., 2006), vezivanje MCM2-7 za

hromatin (Takisawa i sar., 2000) i stabilizaciju DNA polimeraze (Maiorano 2006); MCM 9 ima ulogu u vezivanju MCM2-7 kompleksa za Cdt1 u okviru pre-RC, kao i u kontroli pre-RC kompleksa (Li i Jin, 2010), moguće i kao DNK helikaza (Maiorano i sar., 2006), dok uloga MCM8 još uvek nije u potpunosti jasna, sa pretpostavkom da ima udela kao DNK helikaza (Maiorano i sar., 2006).

Pored uloge u inicijaciji i elongaciji replikacije DNA (Takisawa i sar., 2000; Bailis i Frosburg, 2006; Bell i Duta, 2002; Tachibana i sar., 2005; Takisawa i sar., 2000; Diffley 2012; Knockleby 2010; Labib i Diffley, 2001; Cortez i sar., 2004; Tye 1999, Maiorano i sar., 2006; Li i Jin, 2010; Wu i sar., 2014; Fernandez-Cid i sar., 2013; Truong i Wu, 2011; Wu i sar., 2012; Bailis i Frosburg, 2006; Labib i Diffley, 2006; Tye 1999, Maiorano i sar., 2006; Simon i Schwacha, 2014) MCM2-7 deluju i kao DNA helikaze (Labib i Diffley, 2001; Knockleby 2010; Takisawa i sar., 2000; Diffley 2012; Maiorano i sar., 2006, Tachibana i sar., 2005; Bailis i Frosburg, 2006; Lei i Tye, 2001; Simon i Schwacha, 2014; Truong i Wu, 2011), a smatra se da posreduju i u regulaciji reduplikacije centrozoma i segregaciji hromozoma (Knockleby 2010).

U inicijalnoj fazi replikacije DNK, MCM protein učestvuju u prepoznavanju i izdvajanju dela hromatina adekvatnog za replikaciju, koji, na taj način dobija "dozvolu" za replikaciju (Tachibana i sar., 2005; Knockleby 2010; Chuang i sar., 2012; Arias i sar., 2007; Wu i sar., 2012; Fernandez-Cid i sar., 2013), tokom G1 faze ćelijskog ciklusa (Fernandez-Cid i sar., 2013; Knockleby 2010; Diffley 2012), u odnosu na hromatin koji je nekompetentan za replikaciju (tokom G2 faze i mitoze) (Labib i Diffley, 2001). MCM2-7 kompleks se (u okviru pre-RC, zajedno sa ORC, Cdc6 i Cdt1 (Li i Jin, 2010; Wu i sar., 2014; Tachibana i sar., 2005; Fernandez-Cid i sar., 2013; Truong i Wu, 2011)), tokom G1 faze, nakupljaoko određenih delova DNK, na kojima će, posledično, doći do replikacije (Labib i Diffley, 2001; Bailis i Frosburg, 2006; Li i Jin, 2010; Wu i sar., 2014; Tachibana i sar., 2005; Fernandez-Cid i sar., 2013; Truong i Wu, 2011). Direktno vezivanje MCM 2-7 proteinskog kompleksa za Cdt1 protein (u okviru pre-RC) (Labib i Diffley, 2001), a time i za hromatin omogućavaju MCM9 (Li i Jin, 2010, Takisawa i sar., 2000; Truong i Wu, 2011) i MCM10 (Takisawa i sar., 2000; Truong i Wu, 2011), koji osim direktne interakcije, dovode do pozitivne regulacije Cdt1 (Li i Jin, 2010, Truong i Wu, 2011). Nakon vezivanja MCM kompleksa na mestu replikacije, dolazi do njegove aktivacije, (pod) dejstvom CDK2 i DDK (Wu i sar., 2012; Tachibana i sar., 2005, Wu i sar., 2014; Truong i Wu, 2011; Bailis i Frosburg, 2006; Kusunoki i Ishimi, 2014), a na taj način i aktivacije replikacije DNK (Knockleby 2010). U daljem toku postaje aktivan deo

MCM kompleksa koji ima funkciju DNK helikaze (Labib i Diffley, 2001; Knockleby 2010; Takisawa i sar., 2000; Diffley 2012), replikativne helikaze (Tachibana i sar., 2005; Bailis i Frosburg, 2006; Lei i Tye, 2001; Labib i Diffley, 2001; Simon i Schwacha, 2013; Truong i Wu, 2011; Fernandez-Cid i sar., 2013; Arias i sar., 2014) tj. ATPaza-zavisne helikaze (Knockleby 2010). Svojom APTaznom aktivnošću MCM kompleks omogućava odmotavanje DNK navoja u inicijalnoj fazi, na mestima replikacije (Simon 2014; Knockleby 2010), tokom S faze (Simon i Schwacha, 2014), ali i dalju aktivnost kao helikaza, tokom elongacije (Knockleby 2010). Nakon aktivacije replikacije, MCM proteini se pomeraju se duž hromatina, na replikacionoj viljušci (Bailis i Frosburg, 2006) i učestvuju u elongaciji DNK lanca (Labib i Diffley, 2001; Samson i Bell, 2014). Pretpostavlja se da oni imaju još neku od uloga u strukturiranju replikacione viljuške, kao i da je ta uloga neohodna u održanju stabilnosti genoma tokom S faze (Bailis i Frosburg, 2006). Takođe, i na centrozomu MCM kompleks deluje u ATPaza- zavisnom maniru, što ukazuje na moguću dodatnu ulogu ovih proteina u razdvajanju hromozoma (Knockleby 2010). Osim toga, postoje indicije da MCM proteini mogu biti ključne kontrolne tačke u očuvanju stabilnosti replikacione viljuške, posredovati u signaliziranju u kontrolnim tačkama tj. popravci eventualne greške, tokom G1 faze, pre inicijacije replikacije, kada su lokalizovani na mestima na kojima još nije došlo do replikacije (Bailis i Frosburg, 2006). U tom smislu, MCM proteini ostvaruju **ulogu u stabilnosti genoma tokom S faze** (Bailis i Frosburg, 2006). Posredni dokaz za dodatne uloge MCM kompleksa je tzv. "MCM paradoks" tj. činjenica da je količina MCM proteina u ćeliji daleko veća u odnosu na broj mesta replikacije, kao i da većina ovih proteina nije lokalizovana na mestima nove sinteze DNA. Osim toga, čak i malo smanjenje nivoa MCM dovodi do nestabilnosti hromozoma i može dovesti do greške tokom inicijacije sinteze DNA. Dakle, postoje brojni ili rezervoari MCM proteina koji imaju različitu ulogu replikaciji i očuvanju integriteta genoma (Bailis i Frosburg, 2006).

1.2.3. ĆELIJSKI CIKLUS, PROTEINI ODRŽAVANJA MINIHROMOZOMA I KANCEROGENEZA

Kako je već pomenuto, da bi se održavao integritet ćelijskog genoma razvijeni su brojni mehanizmi koji kontrolišu i osiguravaju jednu i pravilnu duplikaciju genoma tokom svakog ćelijskog ciklusa (Lei i Tye, 2001; Li i Jin, 2010). Bilo koja vrsta neadekvatne replikacije tokom ćelijskog ciklusa, prekomerna ili nedovoljna, uzrokuje nestabilnost genoma, što je osnovna karakteristika kancera jer je preduslov abnormalne ćelijske proliferacije (Lei i Tye, 2001). Proliferacija je programiran proces kojim dolazi do produkcije ograničenog broja ćelija tokom razvoja multinuklearnog organizma (Tye 1999). Nekontrolisana i nepravilna proliferacija je glavna odlika neoplastične transformacije ćelija kancera, a tumorske ćelije imaju stečeno oštećenje gena koji su direktno uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa. Normalno, u zrelim tkivima, u kojima je funkcija ovih gena očuvana, postoji ravnoteža između programirane ćeliske smrti (apoptoze) i proliferacije (ćelijske deobe) (Sandal 2001). Kod neoplastično izmenjenih ćelija postoji poremećena ili neadekvatna regulacija ćelijskog ciklusa u nekom njegovom segmentu (Buru i Cross, 2003). Gubitak pravilne funkcije MCM protein uzrokuje neadekvatnu regulaciju sinteze DNK i nestabilnost genoma (Bailis i Frosburg, 2006), osnovu neoplastične transformacije ćelije.

Povećana ekspresija MCM molekula nalazi se u ćelijama koje aktivno proliferišu i u kojima je ćelijski ciklus aktivan, a smanjena je u ćelijama koje su u stanju mirovanja, (Madine i sar., 2000; Freeman i sar.,1999), kada se nalaze odvojeni od hromatina (Bailis i Frosburg, 2006). Ta karakteristika čini ih potencijalno dobrim dijagnostičkim markerima malignih ćelija, ali i ćelija sa potencijalom za malignu transformaciju (Bailis i Frosburg, 2006), tj, pre-kancerskih ćelija koje su u nekoj fazi maligne transformacije (Lei 2005). Krucijalna uloga ovih proteina u ograničavanju DNK replikacije jednom tokom ćelijskog ciklusa i očuvanju stabilnosti genoma, čini ih potencijalnim metama ćelijskih onkogeno koji na taj način mogu da dovedu do poremećaja regulacije replikacionog procesa (Bailis i Frosburg, 2006). Dakle, izmenjena regulacija aktivnosti MCM može doprineti nestabilnosti genoma i abnormalnoj ćelijskoj proliferaciji (Bailis i Frosburg, 2006).

Zbog uloge MCM u sintezi DNK, njihova aktivnost je bitna u regulaciji replikacije DNK kod ćelija koje su u deobi, dok izostaje kod ćelija u koje su u stanju mirovanja (Madine i sar., 2000; Freeman i sar.,1999). Iz tog razloga njihova ekspresija

korelira sa ćelijskom proliferacijom, što to ih čini značajnim **markerima ćelijske proliferacije** (Tye 1999). Takođe, značaj MCM proteina je i u njihovoj ekspresiji tokom čitavog ćelijskog ciklusa, čak i tokom prelaska ćelije iz G0 u ranu G1 fazu, što ih čini superiornijim u odnosu na druge proliferativne markere, kao što su Ki-67 (Szelachowska i sar., 2006; Gueiros i sar., 2011; Freeman i sar., 1999; Ha i sar., 2004; Gambichler i sar., 2009a; Gambichler i sar., 2008; Chantral i sar., 2003; Kato i sar., 2003; Torres-Rendon i sar., 2009; Kodani i sar., 2001; Scott i sar., 2006; Gueiros i sar., 2011), PCNA (Liu i sar., 2007; Ha i sar., 2004; Shin i sar., 2010; Gambichler i sar., 2008; Chantral i sar., 2003; Kato i sar., 2003; Torres-Rendon i sar., 2009; Kodani i sar., 2001; Scott i sar., 2006; Gueiros i sar., 2011) nuklearni proteini p16, p21 (Ha i sar., 2004; Freeman i sar., 1999) i p53. (Ha i sar., 2004; Freeman i sar., 1999; Gambichler i sar., 2009a).

Ekspresija MCM proteina ukazuje na ćelije u proliferaciji, ali ih nije moguće detektovati u ćelijama koje su prošle proces DNK reparacije, za razliku od PCNA markera (Liu i sar., 2007). Iz navedenih razloga jasno je da MCM proteini imaju potencijal da postanu nova generacija proliferativnih markera, značajna za skrining, procenu ishoda i terapijskog odgovora različitih tumora (Tachibana i sar., 2005). Uzajamni odnos ćelijske proliferacije i povećane ekspresije MCM u ćelijama kod kojih je aktivan ćelijski ciklus, čini ove proteine veoma korisnim i značajnim dijagnostičkim markerima malignih ćelija, ćelija sa malignim potencijalom (Bailis 2004), tj, ćelija koje su u fazi maligne transformacije (Lei 2005), ali i potencijalnim, obećavajućim metama savremene antineoplastične terapije (Yu i sar., 2004; Lei 2005), koja bi bila usmarena ka generalnoj inhibiciji proliferacije, kroz specifičnu inhibiciju MCM2-7 u tumorskim ćelijama (Simon i Schwacha, 2014)

Za poboljšanje prognoze kod pacijenata oboljelih od maligne bolesti, najznačajna je prvenstveno rana detekcija, a potom i blagovremeno lečenje kancera. U tom smislu pronalaženje proteina koji direktno regulišu DNK replikaciju i preciznije odslikavaju proliferaciju ćelija tumora, samim tim i potencijalne biološke karakteristike i ponašanje tumora, ima veliki značaj. Činjenica da su MCM proteini pokazatelji upravo proliferacije malignih ćelija, čini ih veoma interesantnim u onkološkim ispitivanjima i to u više aspekata. Procena ekspresije nivoa MCM proteina u različitim malignitetima kod čoveka je odnedavno u fokusu ekstenzivnog istraživanja, u pokušaju da se poboljša i olakša dijagnoza tumora i proceni ishod u kliničkom istraživanju. Pokazano je da su MCM proteini značajno ispoljeni u malignim ćelijama različitih tkiva, u poređenju sa neizmenjenim ćelijama istih tkiva (Giaginis i sar., 2010). Takođe, razlika u ekspresiji ovih

proteina utvrđena je između normalnih, displastičnih i malignih ćelija određenih tkiva (Freeman i sar., 1999). Postoje značajni klinički dokazi o identifikaciji antitela prema MCM proteinima u velikom broju ćelija kod kojih je aktivan ćelijski ciklus, značajnije nego antitela prema drugim, zasada poznatim markerima ćelijske proliferacije kao što su PCNA i Ki-67 (Giaginis i sar., 2010). Dakle, zbog neospornih dokaza o korisnosti ovih proteina kao markera ćelijske proliferacije, MCM predstavljaju obećavajuće molekule, značajne za određivanje dijagnostičkih i prognostičkih parametara, u različitim humanim malignitetima (Giaginis i sar., 2010).

MCM proteini, uključeni u proces replikacije DNA i regulacije ćelijskog ciklusa, su u određenom broju studija procenjeni kao pouzdani markeri proliferacije malignih ćelija (Feeman i sar., 1999; Scott i sar., 2006; Tamura i sar., 2010; Going i sar., 2002; Murphy i sar., 2005). Iz tog razloga, ekspresija ovih proteina proučavana je u brojnim skvamocelularnim tumorima uključujući SCC usne duplje (Tamura i sar., 2010; Szelachowska i sar., 2006; Torres-Rendon i sar., 2009; Kodani i sar., 2003; Kodani i sar., 2001; Scott i sar., 2006), jednjaka (Kato i sar., 2003; Ahn et Chan i sar., 2010), grkljana (Chantral i sar., 2003; Chantral i sar., 2006), grlića materice (Das i sar., 2013) i jezika (Gueiros i sar., 2011) i brojnim drugim tumorima. Osim u tumorima, patološka ekspresija je uočena i u displastičnom tkivu (međustanje u progresiji od normalnog tkiva do neoplazije; u funkcionalnom smislu ćelije koje se nalaze u ćelijskom ciklusu), kao što je skvamozna cervikalna intraepitelna displazija (Shi i sar., 2007; Nicol i sar., 2012), vulvarna intraepidermalna neoplazija (Davidson i sar., 2003), laringealna (Chantral i sar., 2003; Chantral i sar., 2006) i oralna displazija (Scott i sar., 2006; Kodani i sar., 2001).

U koži, ekspresija MCM proteina je do sada ispitivana kod nevusa, kutanog melanoma (Boyd i sar., 2008; Gambichler i sar., 2009) i u metastazama melanoma (Boyd i sar., 2008), zatim kod T ćelijskih limfoproliferativnih oboljenja (Gambichler i sar., 2008), carcinoma Merkelovih ćelija (Gambichler i sar., 2009a), bazocelularnom karcinomu (Liaw i Boyd, 2009; Abdou i sar., 2014; Liu i sar., 2007) trihoepiteliomu, (Liaw i Boyd, 2009), keratoakantomu (Abdou i sar., 2014) i seboroičnoj keratozi, (Abdou i sar., 2014). Do sada su publikovane (ili objavljeni rezultati) samo tri studije u kojima je procenjena ekspresija MCM u SCC (Liu i sar., 2007; Abdou i sar., 2014), BD (Liu i sar., 2007; Abdou i sar., 2014) i AK (Shini sar., 2010).

1.2.4. ČELIJSKI CIKLUS I PLANOCELULARNI KARCINOM KOŽE

Kancerogeneza planocelularnih (skvamocelularnih) neoplazmi kože još uvek nije u potpunosti razjašnjena i u fazi je ispitivanja. Mali broj studija koji je do sada objavljen o ulozi pojedinih proteina ćelijskog ciklusa neosporno govori o njihovom značaju u nastanku ovih neoplazmi, ali još uvek nije moguće doneti konačan zaključak, jer su rezultati različiti, ponekad čak i oprečni. Za sada je, ipak, sasvim jasno da je osnovni uzrok nastanka SCC kože UV zračenje i da je oko 90% ne-melanocitnih tumora kože posledica ove vrste zračenja (Breuninger i sar., 2013; Kallini i sar., 2015; Grossman i Leffel, 2012; Edge i sar., 2010; Stratigos i sar., 2015; Duncan i sar., 2012; Berman i sar., 2013; Berner i sar., 2005; Schmitt i Miot, 2012; Rossi i sar., 2007; Rigel i sar., 2008, Sterry i Stockfelth, 2009; Cox i sar., 2007; Arlette i Trotter, 2004). Takođe, do sada je definitivno potvrđeno i da je najčešća genetska abnormalnost, koja se nalazi kod više od 80% SCC, mutacija p53, tumor-supresora koji indukuje apoptozu (Grossman i Leffel, 2012; Stratigos i sar., 2015). Pored toga, i disfunkcije drugih gena imaju uticaj na nastanak ove vrste neoplazme, čineći da ne funkcionišu različiti regulatorni i kontrolni mehanizmi ćelijskog ciklusa, omogućavajući na taj način ćelijama sa genetskim nedostacima da se umnožavaju i prenose genetsko oštećenje na ćelije potomke.

Jedan od poremećaja koji ima uticaja na neadekvatnu proliferaciju keratinocita svakako je i abnormalna ekspresija i funkcija MCM proteina. U slučaju skvamoznog epitela, MCM pozitivne ćelije ograničene su na bazalni, proliferativni sloj ćelija epiderma, a ekspresija ovih proteina odsutna kod terminalno diferenciranih keratinocita (Tachibana i sar., 2005). Kod neoplastično transformisanog epitela, veći je broj proliferativnih ćelija i one se nalaze u površnijim slojevima (iznad bazalnog), a sa povećanjem histološkog radusa (tj. stepena slabo ili nediferentovanih ćelija) raste i broj ćelija u proliferaciji (Tachibana i sar., 2005). Dakle, nediferencirane, proliferišuće ćelije lokalizovane su površnije, tako da je MCM pozitivne ćelije moguće pronaći i u površnijim slojevima epiderma (Tachibana i sar., 2005).

AK, BD i SCC imaju istu molekularnu osnovu, a to je neoplastična transformacija i proliferacija atipičnih keratinocita (Cockerell 2000; Cockerell 2003; Fu i Cockerell; 2003), i na ćelijskoj osnovi oni su nerazdvojni (Cockerell 2003; Fu i Cockerell, 2003). Takođe, u određenom broju slučajeva i klinička diferencijacija AK, BD i incipientnog SCC je teška, ponekad nemoguća, upravo zbog njihove velike sličnosti u izgledu, a

nedostataka specifičnih identifikujućih karakteristika svake od lezija ponaosob. Isto tako, kod većine SCC, u na ivici lezije, u epidermu se mogu prepoznati karakteristike AK (Cockerel 2003; Fu i Cockerell, 2003), govoreći u prilog činjenici da u evoluciji ove vrste neplazme dolazi do progresije, a ne transformacije (Evans i Cockerell, 2000), kao i da su transformisane ćelije u okolini invazivnog dela tumora najverovatnije neoplastični klon od koga je karcinom i nastao. Prema tome, a uz činjenicu da nema jedinstvenih kliničkih i histopatoloških karakteristika AK koje bi mogle da predskazuju njenu transformaciju u invazivni SCC (Heaphy i Ackerman, 2000; Moy 2000; Fu i Cockerell, 2003), nameće se potreba za specifičnim markerima koji bi mogli da **identifikuju** malignu leziju u različitim kliničkim uorcima (za dijagnostikovanje, diferenciranje i razgraničavanje između entiteta – AK, BD i invazivnog SCC), kao i za **predviđanje** koja od lezija ima potencijalno agresivnije ponašanje na molekularnom nivou. Cockerell je predložio da stepen ćelijske atipije AK može biti značajan faktor progresije u SCC i da bi njegova evaluacija mogla biti od koristi u procenjivanju prognoze ove vrste neoplazme (Cockerel 2000). Proliferativna aktivnost ćelija kancera ima prognostičku značajnost (Tachibana i sar., 2005), a veća proliferacija karakteriše progresiju in situ lezija, od AK do BD (Brašanac i sar.,2005).

Koristeći samo morfološke kriterijume, često je, takođe, teško razlikovati/razdvojiti displastične ćelije od onih kod kojih postoje samo reaktivne promene. U identifikaciji displastičnog epitela, kriterijumi koji se koriste su prisustvo mitozu u većem broju i patološkoj distribuciji, ukazujući da postoji veći stepen proliferacije (Freeman i sar., 1999). Ekspresija MCM proteina, kao rani događaj u neoplazmi omogućava to razlikovanje (Liaw i Boyd, 2008). Činjenica da je MCM proteine moguće identifikovati kod ćelija koje su u aktivnom procesu proliferacije, ali i ćelija koje potencijalno mogu postati proliferativno aktivne, čini ove proteine specifičnijim i senzitivnijim markerima kancerogeneze kancerogeneze epitelinih ćelija u odnosu na konvencionalne markere proliferacije (Liu i sar., 2007, Stoeber i sar., 2001). U tom smislu, poslednjih godina aktuelna je procena ekspresije ovih markera u odnosu na značajne kliničko-patološke karakteristike, važne za prognozu i stepen preživljavanja pacijenata obolelih od ove vrste tumora (Giaginis i sar., 2010). MCM proteini imaju ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa (Giaginis i sar., 2010), a verifikacija parametara ćelijskog ciklusa od značaja je u predviđanju rasta, progresije i odgovora na terapiju (Chantral i sar., 2006). Takođe, karakteristike tumora koje mogu biti od koristi za predikciju agresivnosti ne tumače se uvek dosledno tokom histopatološke evaluacije, što

povećava stepen subjektivnosti i neuniformnost prilikom dijagnostikovanja, pa su neopohodni dodatni pouzdaniji parametri za objektivniju procenu displastičnih i malignih lezija, koji bi bili od pomoći u interpretaciji nedovoljno morfološki jasnih slučajeva ili prilikom analize heterogenog tkiva.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su:

1. Ispitivanje ekspresije proteina održavanja minihromozoma MCM 2, 5 i 7 u aktiničnoj keratozi, Bowen-ovoj bolesti i invazivnom planocelularnom karcinomu kože.
2. Analiza ispoljavanja MCM 2, 5 i 7 u in situ lezijama klasifikovanim kao keratinocitna intraepidermalna neoplazija (KIN).
3. Poređenje ekspresije MCM 2, 5 i 7 i prognostičkih parametara planocelularnog karcinoma kože – dimenzije, debljina i gradus tumora.
4. Procena različitih načina evaluacije imunohistohemijskog bojenja i ekspresije MCM proteina u odnosu na tip lezije i prognostičke parametre.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. MATERIJAL

Za imunohistohemijsko bojenje korišćeni su parafinski kalupi Instituta za patologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Iz ranije specijalno dizajnirane i popunjene baze podataka o biopsijama kože odabrani su, od 2012. godine unazad, slučajevi AK, BD i SCC do popunjavanja po 50 slučajeva KIN1, KIN2 i KIN3 preinvazivnih lezija kao i po 50 slučajeva dobro, srednje i slabo diferentovanog SCC. Iako je inicijalno, bilo odabrano 360 slučajeva, posle imunohistohemijskog bojenja, iz tehničkih razloga, došlo je do gubitka određenog broja uzoraka, tako da je konačan broj, adekvatan za evaluaciju i tumačenje dobijenih rezultata bio 315.

Od ukupnog broja, na osnovu histološke dijagnoze, 91 promena bila je aktinična keratoza (AK), 50 promena Bowenova bolest (BD) i 174 invazivni planocelularni karcinom (SCC), od toga podjednak broj dobro (G1), srednje (G2) i slabo (G3) diferentovanih SCC (po 58 slučajeva). Prema KIN klasifikaciji, od 141 preinvazivne lezije, 50 promena (35.5%) bile su KIN 1, 40 KIN 2, a 51 KIN 3.

Među ispitanicima bilo je 198 muškaraca i 117 žena. Prosečna starost pacijenata bila je 72.9 ± 10.5 (raspon 9-100 godina), a u odnosu na pol 73.09 ± 9.7 godina za muškarce (raspon 31-100 godina) i 72.6 ± 11.7 godina za žene (raspon 9-97 godina). Prema histološkim dijagnozama, kod pacijenata sa AK prosečna starost bila je 72.1 ± 7.5 (u rasponu 44-91 godina), sa BD bila je 72.24 ± 11.2 (raspon 36-100), a sa SCC 73.5 ± 11.6 (u rasponu 9-99) godina. Prema KIN klasifikaciji, prosečna starost pacijenata sa KIN1 iznosila je 71.9 ± 7.9 (raspon 44-86), KIN2 72.1 ± 7.2 (raspon 57-91), a KIN3 72.3 ± 11.1 (raspon 36-100).

Najveći broj uzoraka bio je lokalizovan na glavi i vratu, 224 promene (71.1%), potom na ekstremitetima, 60 promena (19.0%), a najmanje na trupu 31 promena (9.8%). Razvrstano prema dijagnozama, na glavi je bilo 75 AK (82.4%), 22 BD (44.0%) i 127 SCC (73.0%); na trupu 6 AK (6.6%), 15 BD (30.0%) i 10 SCC (5.7%), a na ekstremitetima 10 AK (11.0%), 13 BD (26.0%) i 37 SCC (21.3%).

Trajanje promena do ekscizije, izraženo u mesecima, iznosilo je 43.9 ± 28 (raspon 2-120) kod AK, 47.9 ± 28.3 (raspon 3-120) kod BD i 38.6 ± 37 (raspon 0-360).

Maksimalna dimenzija tumora iznosila je u proseku 24.5 mm (raspon 11-85mm) kod AK, 30.54 mm (raspon 11-85 mm) kod BD i 35.89 mm (raspon 3-160) kod SCC. Koristeći KIN klasifikaciju dimenzije su bile 23.8 mm (raspon 11-85) za KIN1, 24.5 mm (raspon 11-85) za KIN2, i 30.3 mm (raspon 9-63) za KIN3.

Debljina tumora određivana je okularnim mikroskopom, a iznosila je u proseku 20.0 mm (raspon 11-85) kod AK, 28.0 mm (raspon 9-63) i 31.0 mm (raspon 3-160.0) kod SCC. U KIN lezijama.

Površina tumora iznosila je 113.3 mm² (u rasponu 12-981) u slučaju AK, 228.8 mm² (raspon 24-1060) kod BD, a 482.05 mm² (raspon 5-6304) u slučaju SCC. Prema tumorskom gradusu (diferentovanosti) vrednosti površina lezija su bile: SCC-G1 484.3 mm² (raspon 5-4239), SCC-G2 443.24 mm² (raspon 44-6304) i SCC-G3 518.62 mm² (raspon 19-3572). Kod lezija klasifikovanih kao KIN prosečna površina iznosila je 93.98 mm² kod KIN1 (raspon 16-754), 134.75 mm² KIN2 (raspon 12-981), i 226.20 mm² kod KIN3 (raspon 24-1060).

Nijedan od pacijenata nije primao imunosupresivnu terapiju, niti je imao udružen visceralni ili kutani malignitet. Sve promene dobijene su hiruškom ekcizijom i sve su bile primarne promene koje nisu prethodno lečene.

3.2. METODE

3.2.1. Formiranje tkivnog mikroniza

Radi efikasnije, ekonomičnije, brže i lakše analize tokom IHH procesa korišćena je tehnika tkivnog mikroniza, (engl. tissue microarray –TMA), specijalna vrsta formiranja histopatoloških uzoraka (Konoen i sar., 1998) kojom se može uraditi IHH bojenje za kraće vreme, na većem broju uzoraka, uz manji utrošak imunohistohemijskih reagenasa i očuvanje najvećeg dela originalnog tkivnog uzorka. Za konstrukciju TMN korišćeni su delovi tkiva kože iz uzoraka fiksiranih formalinu i kalupljenih u parafinske blokove.

Na HE bojenim pločicama, u svakom uzorku, flomasterom različite boje označavana su tri tipična mesta sa kojih su, iz odgovarajućeg parafinskog kalupa (kalup davalac), iglom unutrašnjeg promera 1,2 mm uzimani tkivni cilindri za formiranje tkivnog mikroniza. Ukupno 60 tkivnih cilindara (20 slučajeva) je prenošeno u svaki kalup primalac u 6 kolona i 10 redova, uz dodatna 2 cilindra (uzorci limfnog nodusa i sluznice debelog creva) koji su bili postavljeni u prvom i trećem redu za orijentaciju TMA i kao pozitivne i negativne kontrole pri imunohistohemijskom bojenju. Po formiranju pojedinačnog TMA u metalni kalup se izlivaio tečni parafin iz kojeg su, posle hlađenja, na mikrotomu urađeni preseci debljine 5µm, za HE bojenje, kojim je kontrolisano da li uzorak odgovara planiranom i konsektivni preseci prebacivani na specijalne adhezivne

pločice (Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific, Germany) za dalju IHH proceduru. Tehnika tkivnog mikroniza je korišćena jer omogućava ispitivanje većeg broja uzoraka sa znatno manjim utroškom antitela i drugih hemikalija, uz minimalno oštećenje parafinskih kalupa iz kojih se materijal uzima, a u cilju testiranja većeg broja uzoraka smeštenih u jednom parafinskom bloku, za kratko vreme i uz identične tehničke uslove bojenja.

3.2.2. Imunohistohemijski protokol

3.2.2.1. Priprema uzoraka

Najpre su na mikrotomu iz parafinskih kalupa sečeni uzorci tkiva debljine 4-5 μ m na specijalne pločice (Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific) koje omogućavaju bolje pripajanje tkiva. Zatim su sušeni u termostatu 120 minuta na 60°C čime je postignuto bolje prijanjanje tkiva za pločicu.

3.2.2.2. Deparafinizacija

Deparafinizacija se obavljala potapanjem preparata u ksilol (20 minuta) i seriju alkohola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70% - 2 puta po 4 minuta), a završavala se potapanjem isečaka u destilovanu vodu (ispiranje dva puta).

Svrha deparafinizacije bila je odstranjivanje parafina sa pločice jer njegovo prisustvo otežava bojenje, a ujedno pojačava nespecifično bojenje.

3.2.2.3. Blokiranje endogene peroksidaze

Ova etapa je vršena potapanjem pločica u 3% vodeni rastvor vodonik peroksida, tokom 15 minuta. Nakon toga pločice su ispirane u vodi (2 puta). Na taj način je inaktivirana endogena peroksidaza prisutna u tkivima u cilju samanjivanja nespecifičnog bojenja.

3.2.2.4. Antigensko demaskiranje

Naredni korak bilo je demaskiranje antigena (engl. antigen retrieval, AR) koje je postignuto visokom temperaturom, u vodenom kupatilu sa citratnim puferom na 95°C, PH 6.0. u trajanju 30 min. IHH bojenje, kao što je već spomenuto, radi se na parafinskim uzorcima fiksiranim u formalinu. Svrha fiksacije tkiva je očuvanje celularnog integriteta kojim se olakšava morfolološko ispitivanje. Fiksirajući efekat formalina i do stvaranja metilenskih veza između susednih proteinskih lanaca što na kraju rezultuje čvrstim vezama u tkivnom matriksu kao i mogućim izmenama trodimenzionalne građe proteina, dovodeći do redukcije ili gubitka antigenske reaktivnosti (Jasani 2001). Fiksacija u formalinu, tako, dovodi do maskiranja (sakrivanja) mnogih antigena (antigenskih

epitopa), koji zato ne mogu biti prepoznati od strane specifičnih antitela, dovodeći do neadekvatnog IHH bojenja (Dodson 2002). Jedan od načina antigenskog demaskiranja je demaskiranje visokom temperaturom koja uklanja formalinske veze na površini proteina. Nakon kuvanja pločice su se hladile 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je vršeno ispiranje preparata u fosfatnom puferu (engl. phosphate buffered saline, PBS) i to dva ispiranja po tri minuta.

3.2.2.5. Primarna antitela

Nakon toga na preparate je nanošeno primarno antitelo. Korišćena su sledeća primarna, mišja monoklonska antitela: MCM2 (Abcam, ab 109459, razblaženje 1:200), MCM5 (Abcam, ab 76023, razblaženje 1:100) i MCM7 (Abcam, ab 2360, razblaženje 1:200).

Preparati su sa svim primarnim antitelima inkubirani u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi, tokom 60 minuta. Potom je vršeno ispiranje preparata u PBS i to dva ispiranja po pet minuta. Na ovaj način se uklanja višak antitela koja nisu vezana za specifične antigene.

3.2.2.6. Vizuelizacioni sistem

Za vizuelizaciju je korišćen Ultravisoin LP sistem za dekteciju (Lab Vision Thermo scientific, CA, USA), baziran na dekstranskom polimeru za koji je vezan enzim peroksidaza (engl. horseradish peroxidase, HRP), koji ima afinitet vezivanja za primenjena antitela. Kao hromogen (boja za vizuelizaciju mesta na kojima se dogodila reakcija primenjenih antitela s atktivnim antigenom) korišćen je 3.3' diamino-benzidin – DAB, nakon čega su preparati kontrastirani (za vizuelizaciju tkivne morfologije) Mayer-ovim hematoksilinom.

3.2.2.7. Dehidratacija isečaka

Dehidratacija tkiva je vršena potapanjem preparata u alkohol rastuće koncentracije - etanol (70%, 96%, 100%), po 2.5 minuta i ksilol, 2.5 minuta. Nakon dehidratacije rađeno je pokrivanje pločica čime je bio završen proces.

3.2.2.8. Kontrolni uzorci

Za pozitivnu kontrolu korišćeno je tkivo limfnog čvora (germinativni centri folikula), odnosno crevna mukoza. Za negativnu kontrolu korišćeni su interfolikularni limfociti limfnog čvora, kao i vezivno-vaskulna stroma lamine proprije crevne mukoze.

3.2.2.9. Evaluacija IHH bojenja

Mikroskopsko analiziranje pločica je rađeno je na Olympus BX50 svetlosnom mikroskopu, na uveličanju 200 puta.

Pozitivno bojenje podrazumevalo je braon obojenost jedara. Ocenjivanje rezultata IHH jedarnog bojenja bazirano je na analizi distribucije i obima bojenja pod svetlosnim mikroskopom. Distribucija pozitivnih ćelija ocenjivana je kao bazalna (B), suprabazalna (S) i difuzna - čitavom debljinom preparata (D) kod intraepidermalnih lezija (AK, DB, KIN1-3), a kod SCC kao periferna (P), centralna (C) i difuzna - razbacana (D), u zonama tumorskog tkiva.

Obim ekspresije procenjivan je u delovima sa najizraženijom ekspresijom, semikvantitativno na dva načina.

Prvi način: 1+ obojeno do 25% ćelija,; 2+ obojeno 26-50% ćelija; 3+ obojeno 51-75% ćelija, i 4+ obojeno više od 75% ćelija.

Drugi način: 1+ obojeno do 33% ćelija, 2+ obojeno 33%-66% ćelija, 3+ obojeno više od 66% ćelija.

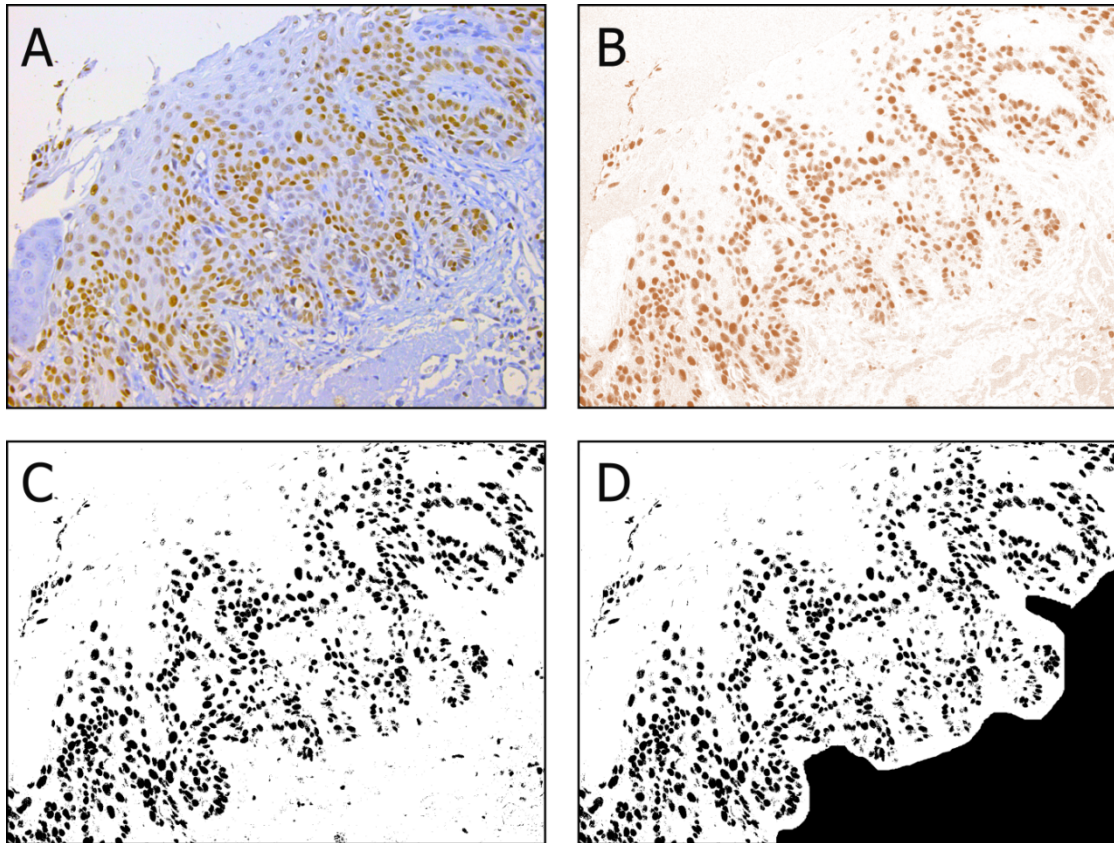
3.2.2.10. Automatsko brojanje ćelija

Pored semikvantitativnog određivanja MCM pozitivnih ćelija u preparatima, u ovom istraživanju rađeno je prepoznavanje pozitivnih ćelija i korišćenjem kompjuterskog sistema. To je urađeno u cilju poređenja rezultata dobijenih različitim metodama i procene adekvatnosti rutinske upotrebe ovakvog načina evaluiranja broja IHH pozitivnih ćelija u preparatima keratinocitnih lezija, a radi lakše rutinske analize i kao (eventulana) dodanta kontrola subjektivne procene posmartača. Za ovu vrstu analize korišćen je deo uzorka, a obuhvatao je 34 AK (6 KIN1 i 28 KIN2) i 36 SCC (9 dobro diferentovanih, 3 srednje diferentovana i 24 slabo diferentovana). U ovaj poduzorak je odabran veći broj lezija višeg gradusa budući da je u njima i beći procenat pozitivnih ćelija te su bile reprezentativnije za provcenu upotrebljivosti ovakvog načina analize imunohistochemijske ekspresije MCM proteina. Broj MCM pozitivnih ćelija, u pomenutim preparatima prvo je određivan ručno, uz korišćenje ekranske mrežice (engl. screen grid). Potom je isti proces rađen korišćenjem kompjuterskog programa, a onda su dobijeni rezultati upoređivani.

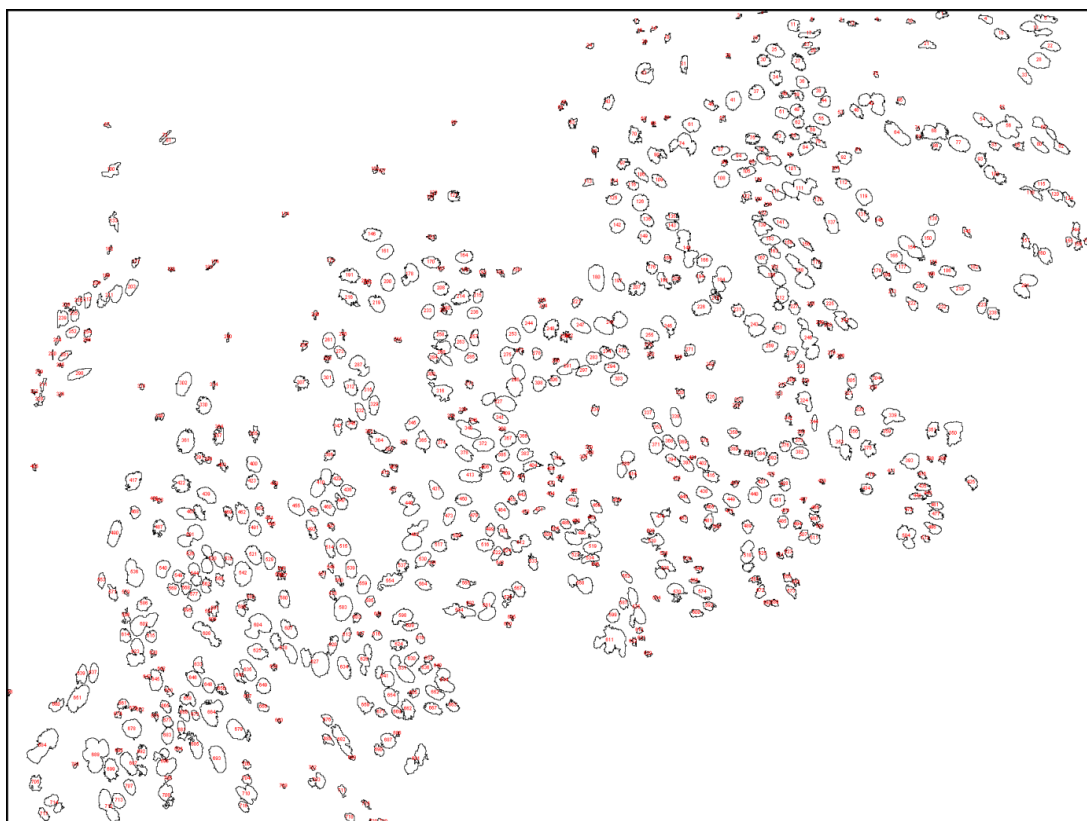
U cilju automatskog određivanja broja imunohistochemijskih pozitivnih (DAB-pozitivnih) ćelija korišćen je besplatni program za analizu slike, *Fiji* (<http://fiji.sc/Fiji>) (Schindelin i sar., 2012). Za analizu su korišćene digitalne slike dobijene pomoću Leica DM4000 B LED mikroskopa pod uveličanjem od 200x (objektiv 20x), digitalnom kamerom Leica DFC29, a uz pomoć Leica Application Suite (LAS, v4.4.0) programskog sistema. Digitalne fotografije su sačuvane u TIFF formatu, dimenzija 2048 x 1536 piksela, sa rezolucijom od 300 DPI (engl. dots per inch) i dubinom bita (boja) (engl. bit

depth) od 24 (**Slika 3.2.2.10.1.A**). Za analizu je ukupno korišćeno 70 digitalnih slika, od toga 32 uzoraka sa dijagnozom SCC i 34 sa dijagnozom AK.

Nakon učitavanja slika u programski paket *Fiji*, pomoću commande Color Deconvolution i odabiranja opcije H DAB (putanja: *Fiji*>Image>Color>Color Deconvolution), izvršeno je izdvajanje DAB signala, odnosno boje, od signala poreklom od hematoksilina, koji je korišćen za kontrastiranje imunohistohemijskih preparata (**Slika 3.2.2.10.1.B**). U daljoj analizi, fotografijama sa DAB signalom određen je prag (eng. *threshold*) (putanja: *Fiji*>Image>Adjust>Threshold), pri čemu su za svaku sliku automatski određene podrazumevane pragovne (eng. *default threshold*) vrednosti (**Slika 3.2.2.10.1.C**). Ova metoda je neophodan korak u automatskom brojanju ćelija, a podrazumeva da se slika u boji konvertuje u 8-bitnu paletu sivih tonova (engl. *grayscale*), a zatim u crno-belu sliku (engl. *binary*), prema unapred zadatim vrednostima, odnosno granicama. Da bi se izbegao uticaj nespecifičnog bojenja DAB-om na vrednosti automatskog brojanja ćelija, pomoću Freehand selections alatke i opcije Clear (putanja: *Fiji*>Edit>Clear), obeleženi su i obrisani oni delovi slike, koji bi eventualno mogli uticati na konačnu vrednost broja DAB-pozitivnih ćelija (**Slika 3.2.2.10.1.D**). Ovako obrađene slike su predstavljale finalne digitalne fotografije, koje su korišćene za automatsko brojanje ćelija, koje je urađeno uz pomoć opcije Analyze Particles (putanja: *Fiji*>Analyze>Analyze Particles) (**Slika 3.2.2.10.2**). Vrednosti veličine (engl. *size*) i cirkularnosti (engl. *circularity*) ćelija, kao parametri koje je neophodno uneti prilikom automatskog brojanja ćelija, utvrđeni su prethodnim poređenjem sa slikama na kojima je manuelnom metodom određen tačan broj DAB-pozitivnih ćelija, nakon čega su uzete prosečne vrednosti ova dva parametra, koje su zatim primenjene na sve slike uključene u ovo istraživanje. Za svaki tip tumora određene su posebne vrednosti veličine i cirkularnosti ćelija.



Slika 3.2.2.10.1. Prikaz grafičke obrade slike u procesu automatskog brojanja ćelija. A originalna imunohistohemijska slika AK (uveličanje x200); B – Ista slika nakon izdvajanja DAB signala. C – Konverzija u crno-belo sliku pomoću threshold efekta; D – Isecanje onih delova slike koji bi mogli uticati na proces automatskog brojanja ćelija. U ovom slučaju sa slike je uklonjeno vezivno tkivo ispod epitela, što je predstavljeno crnim regionom, koji neće biti uzet u obzir prilikom automatskog izračunavanja broja ćelija.



Slika3.2.2.10.2. Prikaz metode automatskog brojanja ćelija. Na slici su prikazani obrisi, odnosno konture (engl. *outline*) DAB-pozitivnih signala. U zavisnosti od vrednosti zadatih veličina i cirkularnosti, program odabira konture koje će automatski izbrojati. Na ovaj slici, metodom manualnog brojanja izbrojano je 706 DAB-pozitivnih ćelija, dok je automatskom metodom izbrojano 715 ćelija, što predstavlja razliku od 9 ćelija, odnosno grešku od 1.3%.

3.2.2.11. Statistička analiza rezultata

Za sve imunohistohemijske markere (MCM2, MCM5 i MCM7) vršeno je poređenje distribucije pozitivnih ćelija sa histopatološkim tipom lezije -AK, BD i SCC, i KIN tipom, kao i parametrima koji ukazuju na veću agresivnost tumora: maksimalna dimenzija lezije, stepen diferentovanosti i maksimalna debljina i površina SCC.

Vršeno je poređenje bazalne, suprabazalne i difuzne distribucije ćelija kod *in situ* lezija (AK, BD i KIN), odnosno periferne, centralne i difuzne kod SCC. U cilju validnijih statističkih rezultata difuzna distribucija je poređena sa ostalim tipovima distribucije objedinjenim u grupu ne-difuznih, a to je podrazumevalo bazalno i suprabazano za *in situ* lezije, odnosno periferno i centralno za SCC.

Isti tipovi poređenja vršeni su i kod obima ekspresije pri čemu su slučajevi grupisani u one sa do 50% pozitivnih ćelija (0+/++) i preko 50% pozitivnih ćelija

(+++/+), kao i do 33% (0/+), između 33-66% (++) i preko 66% pozitivnih ćelija (+++).

Za statističku analizu rezultata korišćen je softverski paket SPSS (engl. Statistical Package for Social Sciences) za Windows, verzija 20.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike. Od metoda **deskriptivne statistike** korišćene su: mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana), mere varijabiliteta (interval varijacije - opseg, standardna devijacija, koeficijent varijacije) i relativni brojevi (frekvence). Vrednosti kontinuiranih varijabli prikazane su kao prosečna vrednost \pm SD, a diskontinuiranih varijabli kao brojevi i procenti. Distribucija vrednosti (provera numeričkih vrednosti, tj. procena normalnosti raspodele) proveravana je upotrebom Shapiro-Wilk testa. Od metoda **analitičke statistike** korišćeni su neparametarski testovi za nezavisne uzorke: **χ^2 test**, **Kruskal-Wallis** i **Mann-Witney test**. Za procenu rasporeda (distribucije) i broja (obima) MCM pozitivnih ćelija u odnosu na histopatološku dijagnozu, stepen diferentovanosti (gradus) tumora, dijametral (granica 20mm) i debljinu tumora (granice 2mm, 4 mm i 6 mm) korišćen je χ^2 test. Za procenu rasporeda (distribucije) i broja (obima) MCM pozitivnih ćelija u odnosu na površinu tumora korišćen je Kruskal-Wallis test, a za međugrupno poređenje Mann-Witney test. Podaci su prikazani tabelarno i grafički. Vrednosti verovatnoće (*P*) manje od 0.05 smatrane su statistički značajnim.

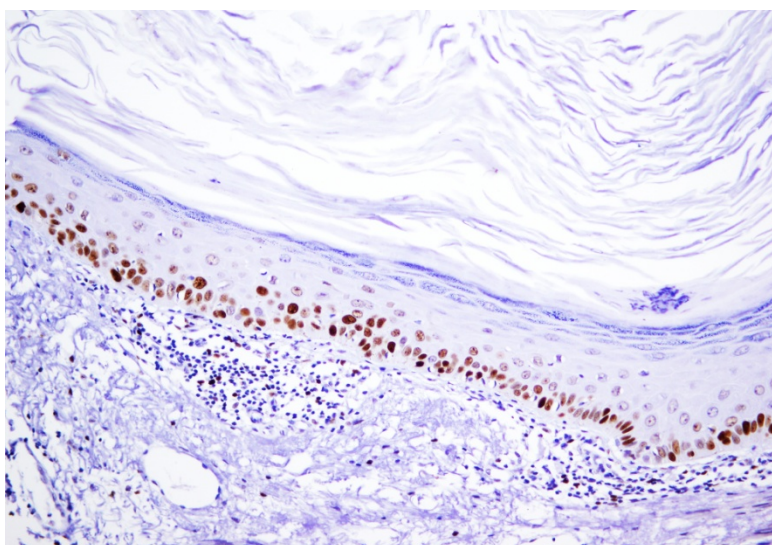
2. R E Z U L T A T I

4.1 Ekspresija MCM2

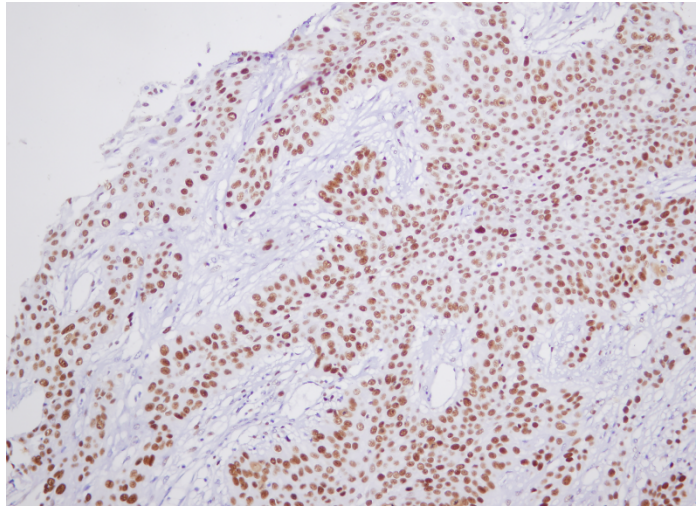
4.1.1 Distribucija

4.1.1.1. Distribucija MCM2 prema histopatološkoj dijagnozi

Najveći broj aktiničnih keratoza (AK) je imao bazalnu distribuciju (**Slika 4.1.1.1.a**) MCM2 pozitivnih ćelija – 62 slučaja (68.1%), a potom, gotovo podjednak broj difuznu 15 (16.5%) i suprabazalnu – 14 (15.4%). Najveći broj - 45 slučajeva (90.0%) Bovenove bolesti (BD) imao je difuzni tip distribucije. Preostali slučajevi su imali suprabazalnu 4 (8.0%), a samo jedan bazalnu (2.0%) distribuciju pozitivnih ćelija. Kod SCC, u gotovo istom broju bili su zastupljeni periferni (88 slučajeva – 50.6%) i difuzni raspored (**Slika 4.1.1.1.b**) pozitivnih ćelija (86 slučajeva – 49.4%). Centralna distribucija nije bila zastupljena ni kod jednog SCC.



Slika 4.1.1.1.a Bazalna distribucija MCM2 kod aktinične keratoze



Slika 4.1.1.1.b Difuzna distribucija MCM2 kod planocelularnog karcinoma

Poređenjem distribucije proteina MCM2 i histopatološke dijagnoze, primenom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u distribuciji ovog proteina između AK, BD i SCC ($p < 0.001$). Istim testom statistički značajna razlika u ekspresiji MCM2 nađena je kada je upoređivana distribucija pojedinačno između AK i BD, AK i SCC, kao i BD i SCC ($p < 0.001$).

Grupisanje svih slučajeva bez difuznog rasporeda ćelija u grupu ne-difuznih, u odnosu slučajeva sa difuznom distribucijom prikazano je u **Tabeli 4.1.1.1a**. Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je visoko statistički značajna razlika između AK, BD i SCC, kao i kada su upoređivane AK i BD, AK i SCC, BD i SCC ($p < 0.001$).

Tabela 4.1.1.1a. Distribucija MCM2 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM2	UKUPNO	AK	BD	SCC
distribucija	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
difuzno	146 (46.3%)	15 (16.5%)	45 (90.0%)	86 (49.4%)
ne-difuzno	169 (53.7%)	76 (83.5%)	5 (10%)	88 (50.6%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Kada su slučajevi grupisani kao intraepidermalne lezije (AK i BD) i poređeni sa invazivnim SCC, gotovo podjednak broj intraepidermalnih promena pokazao je bazalnu 63 (44.7%) i difuznu 60 (42.6%) distribuciju MCM2, dok je kod značajno manje lezija - 18 (12.8%), bila uočena suprabazalna distribucija. Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je statistički značajna razlika između intraepidermalnih lezija i SCC ($p < 0.001$). Grupisanjem svih slučajeva intraepidermalnih lezija (AK+BD) i SCC bez difuznog rasporeda ćelija u

grupu sa ne-difuznom distribucijom MCM2, u odnosu na grupu sa difuznom distribucijom (**Tabela 4.1.1.1b.**) i međusobnim upoređivanjem, u tom slučaju, upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji MCM2 između AK+BD u odnosu na SCC ($p=0.224$, $p>0.05$).

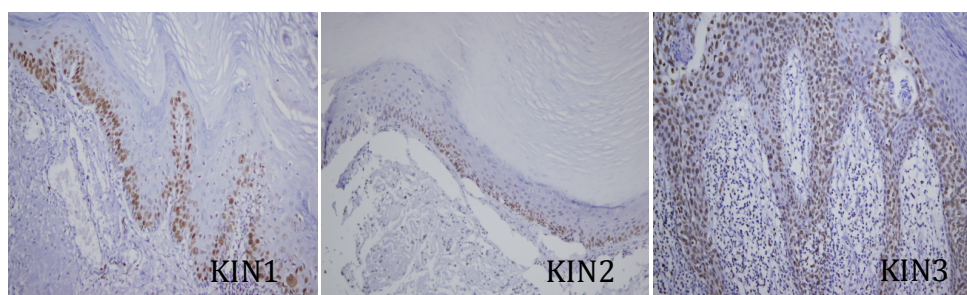
Tabela 4.1.1.1b. Distribucija MCM2 proteina prema histopatološkoj dijagnozi, grupa intraepidermalnih promena u odnosu na SCC

MCM2	UKUPNO	AK i BD	SCC
distribucija	broj (%)	broj (%)	broj (%)
difuzno	146 (46.3%)	60 (42.6%)	86 (49.4%)
ne-difuzno	169 (53.7%)	81 (57.4%)	88 (50.6%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

4.1.1.2. Distribucija proteina MCM2 prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN)

Kada su lezije klasifikovane kao KIN, u KIN1 i KIN2 lezijama dominirala je bazalna distribucija, 40 (80.0%) KIN1 i 22 (55.0%) KIN2, a kod KIN3 difuzna - 46 (90.2%) (**Slika 4.1.1.2.**).



Slika 4.1.1.2. Distribucija MCM2 kod keratinocitne intraepidermalne neoplazije

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji MCM2 između KIN1, KIN2 i KIN3 ($p<0.001$). Kada su posebno upoređivani KIN1 i KIN2, razlika u distribuciji MCM2 bila je statistički značajna ($p=0.012$, $p<0.05$), a poređenjem KIN1 i KIN3 ($p<0.001$), kao i KIN2 i KIN3 ($p<0.001$), visoko statistički značajna.

Kada su grupisani slučajevi ne-difuzne u odnosu na difuznu distribuciju, KIN1 i KIN2 lezije su dominantnije imale ne-difuznu distribuciju MCM2 pozitivnih ćelija, u odnosu na KIN3 (**Tabela 4.1.1.2.**)

Tabela 4.1.1.2. Distribucija MCM2 proteina prema KIN

MCM2	UKUPNO	KIN1	KIN2	KIN3
distribucija	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
difuzno	60 (42.6%)	3 (6.0%)	11 (27.5%)	46 (90.2%)
ne-difuzno	81 (57.4%)	47 (94.0%)	29 (72.5%)	5 (9.8%)

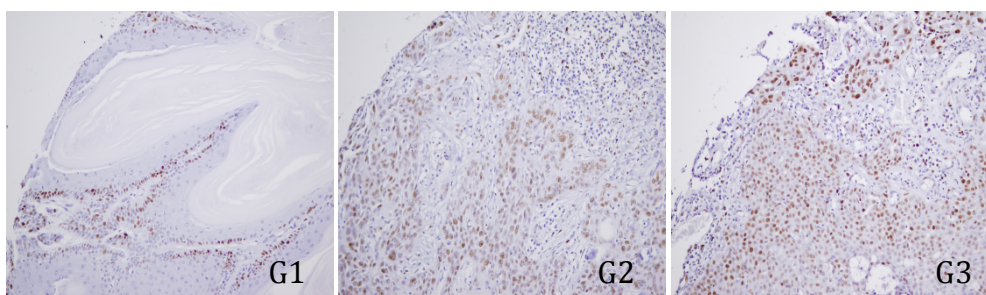
Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, poređenjem slučajeva sa ne-difuznom i difuznom distribucijom, utvrđena je visoko statistički značajna razlika u distribuciji MCM2 između KIN1, KIN2 i KIN 3 lezija ($p < 0.001$). Poređenjem slučajeva sa ne-difuznom i difuznom distribucijom, između KIN1:KIN2, KIN1:KIN3 i KIN2:KIN3, χ^2 testom, utvrđena je visoko statistički značajna razlika među svim grupama ($p < 0.001$).

Kada su grupisane in situ lezije koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) najveći broj slučajeva KIN1+KIN2 grupe imao je bazalnu distribuciju MCM2 pozitivnih ćelija, 62 (68.9%), dok je podjednak broj imao suprabazalnu i difuznu distribuciju, 14 (15.6%). Najveći broj lezija koje su se nalazile čitavom debljinom epiderma (KIN3) imao je difuznu distribuciju 46 (90.2%), a značajno manji suprabazalnu 4 (7.8%), dok je samo kod jedne lezije bila uočena bazalna distribucija (2.0%). Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je visoko statistički značajna razlika u distribuciji MCM2 između lezija koje ne zahvataju čitav epiderm (KIN1+KIN2) i lezija koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) ($p < 0.001$). Grupisanjem na promene sa ne-difuznom i difuznom distribucijom, kod većeg broja promena iz KIN1+KIN2 grupe - 76 (84.4%), uočena je ne-difuzna distribucija, dok je veći broj KIN 3 lezija 46 (90.2%) imao izraženu difuznu distribuciju. Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je visoko statistički značajna razlika i između ovih grupa ($p < 0.001$).

4.1.1.3. Distribucija MCM2 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC)

Nijedan SCC nije pokazao centralnu distribuciju MCM2. U SCC-G1 distribucija MCM2 pozitivnih ćelija bila je dominantno periferna 53 (91,4%). SCC-G2 i SCC-G3 pokazali su izraženiju difuznu distribuciju, zastupljenije kod SCC-G3 49 (84.5%), nego kod SCC-G2, 32 (55.2%). (**Slika 4.1.1.3.**)



Slika 4.1.1.3. Distribucija MCM2 kod planocelularnih karcinoma (G1, G2, G3)

Poređenjem distribucije MCM2 prema gradusu tumora, upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji visoko statistički značajna razlika između sve tri grupe SCC, kao i kada su posebno poređeni SCC-G1 i SCC-G2, SCC-G1 i G3 i SCC-G2 i G3, čak i kada su poređene grupa SCC G1+G2 i SCC G3 ($p < 0.001$).

4.1.1.4. Distribucija MCM2 prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC)

SCC su, prema dimenzijama, bili podeljeni u dve grupe: najvećeg prečnika do 20 mm, i preko 20 mm. Difuzni tip distribucije bio je zastupljen u 51 slučaju (46.4%) u lezijama do 20 mm i 35 (54.7%) slučajeva prečnika većeg od 20 mm. Periferni tip distribucije bio je uočen kod 59 (53.6%) lezija do 20 mm i 29 (45.3%) kod promena prečnika većeg od 20 mm.

Poređenjem distribucije MCM2 između lezija dimenzija do 20 mm i većih od 20 mm, upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika (**Tabela 4.1.1.4.**).

Tabela 4.1.1.4. Distribucija MCM2 proteina prema dimenzijama lezije

MCM2 distribucija	UKUPNO broj (%)	≤20 mm broj (%)	>20mm broj (%)
difuzno	86 (49.4%)	51 (46.4%)	35 (54.7%)
periferno	88 (50.6%)	59 (53.6%)	29 (45.3%)

4.1.1.5. Distribucija MCM2 proteina prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC)

Svi SCC, bez obzira na gradus, bili su, prema debljini, podeljeni u tri grupe. Prva grupa: SCC debljine do i više od 2mm, druga grupa SCC debljine do i više od 4mm i treća grupa SCC debljine do i više od 6mm.

U grupi SCC debljine do 2 mm bilo je samo 20 tumora, od čega je 13 (65.0%) imalo perifernu distribuciju MCM2 pozitivnih ćelija. Tumora debljine preko 2 mm bilo je 145, od toga je gotovo podjednak broj imao difuznu 79 (51.3%) i perifernu 75 (48.7%) distribuciju (Tabela 4.1.1.5a.)

Tabela 4.1.1.5a. Distribucija MCM2 prema debljini SCC, prva grupa

MCM2 distribucija	UKUPNO broj (%)	≤2 mm broj (%)	>2 mm broj (%)
difuzno	86 (49.4%)	7 (35.0%)	13 (65.0%)
periferno	88 (50.6%)	75 (48.7%)	79 (51.3%)

χ^2 testom, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji MCM2 između ovih grupa.

U drugoj grupi tumori debljine do 4 mm imali su perifernu distribuciju u 54 slučaja (63.5%), a tumori deblji od 4 mm difuznu distribuciju u 55 slučajeva (61.8%) (Tabela 4.1.1.5b.).

Tabela 4.1.1.5b. Distribucija MCM2 prema debljini SCC, druga grupa

MCM2 distribucija	UKUPNO broj (%)	≤4 mm broj (%)	>4 mm broj (%)
difuzno	86 (49.4%)	31 (36.5%)	55 (61.8%)
periferno	88 (50.6%)	54 (63.5%)	34 (38.2%)

χ^2 testom, utvrđeno je da **postoji visoko statistički značajna razlika** između ovih grupa (p=0.001).

U trećoj grupi, kod SCC debljine do 6mm češće je uočavana periferna distribucija - kod 74 slučaja (56.9%), za razliku od SCC debljih od 6mm koji su češće, 30 (68.2%), ispoljavali difuznu distribuciju MCM2 pozitivnih ćelija (Tabela 1.1.5c.).

Tabela 4.1.1.5c.Distribucija MCM2 prema debljini SCC, treća grupa

MCM2	UKUPNO	≤6 mm	>6 mm
distribucija	broj (%)	broj (%)	broj (%)
difuzno	86 (49.4%)	56 (43.1%)	30 (68.2%)
periferno	88 (50.6%)	74 (56.9%)	14 (31.8%)

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji visoko statistički značajna razlika u distribuciji MCM2 između ovih grupa ($p=0.001$).

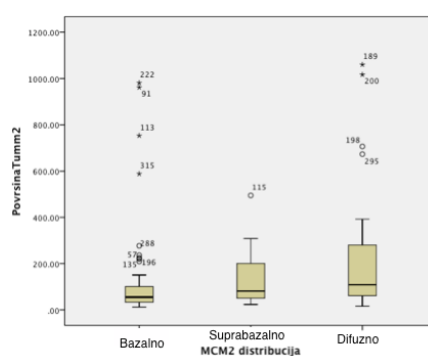
4.1.1.6. Distribucija MCM2 proteina prema površini planocelularnog karcinoma (SCC)

Srednja vrednost površine SCC koji su imali difuznu distribucija MCM2 iznosila je 260.62mm^2 (raspon $18.8\text{-}3571.8\text{mm}^2$), a onih kod kojih je uočena periferna distribucija 176.63mm^2 (raspon $4.71\text{-}6303.6\text{mm}^2$). Tumori veće površine imali su dominantnije difuznu distribuciju MCM2 pozitivnih ćelija, za razliku od tumora manje površine kod kojih je bila izraženija periferna distribucija. Upotrebom Mann-Whitney testa utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u distribuciji MCM2 prema površini SCC ($p=0.026$).

4.1.1.7. Distribucija MCM2 proteina prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN)

Promene klasifikovane kao KIN, srednje vrednosti površine 54.95mm^2 (raspon $11.8\text{-}981.3\text{mm}^2$) imale su bazalnu distribuciju MCM2 pozitivnih ćelija. Sa povećanjem površine, MCM distribucija se menjala od bazalne ka difuznoj, tako da je suprabazalna bila zastupljena kod KIN lezija srednje vrednosti površine 80.86mm^2 (raspon $23.6\text{-}494.6\text{mm}^2$), a difuzna kod lezija srednje vrednosti površine 107.94mm^2 (raspon $15.7\text{-}1059.8\text{mm}^2$) (**Grafikon1.1.7.**)

Grafikon 4.1.1.7. Distribucija MCM2 prema površini KIN



Korišćenjem Kruskal-Wallis testa utvrđeno je da postoji visoko statistički značajna razlika u distribuciji MCM2 u odnosu na površinu KIN ($p=0.001$).

Upotrebom Mann-Whitney testa, kada su porednjene grupe sa bazalnom i suprabazalnom distribucijom nije utvrđena statistički značajna razlika ($p=0.073$), kao i između grupa sa suprabazalnom i difuznom distribucijom ($p=0.403$), ali je između grupa sa bazalnom i difuznom distribucijom MCM2 pozitivnih ćelija, razlika bila visoko statistički značajna ($p<0.001$).

Kada su grupisani slučajevi sa ne-difuznom i difuznom distribucijom MCM2, u odnosu na površinu lezija klasifikovanih kao KIN, kod promena srednje vrednosti 62.8mm^2 (raspon $11.8-981.3\text{mm}^2$) zastupljenija je bila ne-difuzna distribucija, a promene, srednje vrednosti 107.94mm^2 (raspon $15.7-1059.8\text{mm}^2$) imale su difuznu distribuciju MCM2 pozitivnih ćelija. Upotrebom Mann-Whitney testa utvrđena je statistički značajna razlika u MCM2 distribuciji prema površini KIN ($p=0.001$).

Kod grupisanih in situ lezija koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma, (KIN1+KIN2 grupa), promene sa srednjom vrednosti površine - 73.0mm^2 (raspon $31.4-494.6\text{mm}^2$) imale su suprabazalnu distribuciju, dok su promene sa bazalnom i difuznom distribucijom imale sličnu srednju vrednost površine lezija, 52.2mm^2 (raspon $11.8-981.25\text{mm}^2$), odnosno 51.42mm^2 (raspon $15.7-150.7\text{mm}^2$).

Upotrebom, Kruskal-Wallis testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u MCM2 distribuciji između ovih grupa ($p=0.216$), kao nikada su, upotrebom Mann-Whitney testa, posebno poredjene grupe sa bazalnom i suprabazalnom ($p=0.131$), bazalnom i difuznom ($p=0.625$), kao i suprabazalnom i difuznom distribucijom ($p=0.085$).

Grupisanjem KIN slučajeva sa ne-difuznom i difuznom distribucijom, kod in situ promena koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma (KIN1+KIN2), srednje vrednosti

površine, 62.8mm² (raspon 11.78-981.3mm²) imale su ne-difuznu distribiciju, dok je difuzna distribucija uočena kod promena srednje površine 107.94mm² (raspon 15.7-1059.8mm²).

Upotrebom Mann-Whitney testa utvrđena je visoko statistički značajna razlika u MCM2 distribuciji između ovih grupa (p=0.001).

4.1.2 Obim ekspresije (semikvantitativno, do i preko 50% pozitivnih ćelija)

4.1.2.1. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

Veći broj AK - 64 (70.3%) imao je manje od 50% MCM2 pozitivnih ćelija. U slučaju BD skoro svi slučajevi imali su više od 50% pozitivnih ćelija 49 (98.0%), dok je samo kod jedne lezije bilo je manje od 50%. Kod SCC, 81 slučaj (46,6%) je imao manje od 50% pozitivnih ćelija u odnosu na 93 (53,4%) SCC sa više od 50%. Obim ekspresije u odnosu na histopatološki tip lezije prikazan je u **Tabeli 4.1.2.1.**

Tabela 4.1.2.1. Obim ekspresije MCM2 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM2	UKUPNO	AK	BD	SCC
obim	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
ekspresije				
Manje od 50%	146 (46.3%)	64 (70.3%)	1 (2.0%)	81 (46.6%)
Više od 50%	169 (53.7%)	27 (29.7%)	49 (98.0%)	93 (53.4%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da **postoji visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji između AK, BD i SCC (p<0.001). Takođe upotrebom χ^2 testa, a poređenjem svake od grupa pojedinačno, AK:BD AK:SCC, kao i BD:SCC utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM2 (p<0.001).

Grupisanjem intraepidermalnih lezija u odnosu na SCC, nešto veći broj AK i BD lezija 76 (53.9%) je imao više od 50% pozitivnih ćelija, u odnosu na 93 (53.4%) SCC kod kojih je bilo manje od 50% pozitivnih ćelija. Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da ne

postoji statistički značajna razlika u ekspresiji MCM2 pozitivnih ćelija između grupe intraepidermalnih lezija i SCC (p=0.936).

4.1.2.2. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN)

Veći broj KIN1 slučajeva - 40 (80.0%) imao je manje od 50% MCM2 pozitivnih ćelija. U slučaju KIN2, iako je veći broj ćelija opet imao manje od 50% pozitivnih ćelija ta razlika je bila manja, dok je kod KIN3 značajno veći broj slučajeva 50 (98.0%) imao je više od 50% pozitivnih ćelija (Tabela 4.1.2.2a.).

Tabela 4.1.2.2a. Obim ekspresije MCM2 proteina prema KIN

MCM2	UKUPNO	KIN1	KIN2	KIN3
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	65 (46.1%)	40 (80.0%)	24 (60.0%)	1 (2.0%)
Više od 50%	76 (53.9%)	10 (20.0%)	16 (40.0%)	50 (98.0%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** između KIN grupa (p<0.001). Međugrupnim poređenjem KIN1:KIN2 utvrđena je **statistički značajna razlika** (p=0.038, p<0.05), dok je između grupa KIN1:KIN3 i KIN2:KIN3, razlika bila **visoko statistički značajna** (p<0.001).

Grupisanjem in situ lezija koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma (KIN1+KIN2), veći broj - 64 (71.1%) je imao manje od 50% pozitivnih ćelija, za razliku od lezija koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) čiji je značajno veći broj, 50 (98.0%), imao više od 50% pozitivnih ćelija (Tabela 4.1.2.2b).

Tabela 4.1.2.2b. Obim ekspresije MCM2 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM2	UKUPNO	KIN1+KIN2	KIN3
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	65 (46.1%)	64 (71.1%)	1 (2.0%)
Više od 50%	76 (53.9%)	26 (28.9%)	50 (98.0%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM2 poređenjem in situ lezija koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) sa lezijama koje se zahvataju čitav epiderm (KIN3).

4.1.2.3. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC)

SCC podeljeni prema histopatološkom gradusu, razvrstani na slučajeve koji imaju do 50% i one koji imaju više od 50% MCM2 pozitivnih ćelija prikazani su u **Tabeli 4.1.2.3.**

Tabela 4.1.2.3. Obim ekspresije MCM2 proteina prema gradusu SCC

MCM2 obim ekspresije	UKUPNO broj (%)	SCC G1 broj (%)	SCC G2 broj (%)	SCC G3 broj (%)
Manje od 50%	81 (46.6%)	50 (86.2%)	22 (37.9%)	9 (15.5%)
Više od 50%	93 (53.4%)	8 (13.8%)	36 (62.1%)	49 (84.5%)

Skraćenice: SCC – planocelularni karcinom

Primenom χ^2 testa utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u obimu ekspresije MCM2 pozitivnih ćelija i gradusa SCC, među grupama SCC G1, SCC G2 i SCC G3 ($p < 0.001$), kao i pojedinačnim poređenjem grupa SCC G1:G2 ($p < 0.001$), SCC G1:G3 ($p < 0.001$) i SCC G2:G3 ($p = 0.006$). Takođe, kada su poređene grupa SCC G1+G2 i SCC G3, upotrebom istog testa, razlika u ekspresiji MCM2 bila je **visokoko statistički značajna** ($p < 0.001$).

4.1.2.4. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC)

Kada su SCC, prema dimenzijama, bili podeljeni u dve grupe (najvećeg prečnika do i preko 20 mm), gotovo podjednak broj SCC prečnika do 20 mm pokazao je pozitivno bojenje kod manje i kod više od 50% ćelija (**Tabela 4.1.2.4.**). Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika.

Tabela 4.1.2.4. Obim ekspresije MCM2 prema dimenzijama lezije

MCM2 obim ekspresije	UKUPNO broj (%)	≤20 mm broj (%)	>20mm broj (%)
Manje od 50%	81 (46.6%)	54 (49.1%)	27 (42.2%)
Više od 50%	93 (53.4%)	56 (50.3%)	37 (57.8%)

4.1.2.5. Odnos obima ekspresije MCM2 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC)

Kod procene obima ekspresije MCM2 prema debljini SCC, tumori su bili podeljeni u tri grupe, sa graničnim vrednostima 2mm, 4mm i 6mm.

Tumori debljine do 2mm imali su nešto više slučajeva sa manje do 50% pozitivnih ćelija, dok je kod tumora debljine više od 2mm bilo obrnuto (**Tabela 4.1.2.5a.**).

Tabela 4.1.2.5a. Obim ekspresije MCM2 prema debljini SCC, prva grupa

MCM2	UKUPNO	≤2 mm	>2 mm
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	81 (46.6%)	11 (55.0%)	70 (45.5%)
Više od 50%	93 (53.4%)	9 (45.6%)	84 (54.5%)

Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u obimu ekspresije MCM2 između SCC debljine do i preko 2 mm ($p=0.421$).

U slučaju grupe SCC debljine do i više od 4mm vrednosti su date u tabeli **Tabeli 4.1.2.5b.**

Tabela 4.1.2.5b. Obim ekspresije MCM2 prema debljini SCC, druga grupa

MCM2	UKUPNO	≤4 mm	>4 mm
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	81 (46.6%)	49 (57.6%)	32 (36.0%)
Više od 50%	93 (53.4%)	36 (42.4%)	57 (64.0%)

U ovom slučaju, primenom χ^2 testa, poređenjem ove dve grupe SCC utvrđena je **statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM2 ($p=0.004$).

Vrednosti za treću grupu SCC prema debljini date su u **Tabeli 4.1.2.5c**

Tabela 4.1.2.5c. Obim ekspresije MCM2 prema debljini SCC, trećagrupa

MCM2	UKUPNO	≤6 mm	>6 mm
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	81 (46.6%)	68 (52.3%)	13 (29.5%)
Više od 50%	93 (53.4%)	62 (47.7%)	31 (70.5%)

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u obimu ekspresije MCM2 između SCC debljine do i preko 6 mm ($p=0.009$).

4.1.2.6. Odnos obima ekspresije MCM2 prema površini planocelularnog karcinoma (SCC)

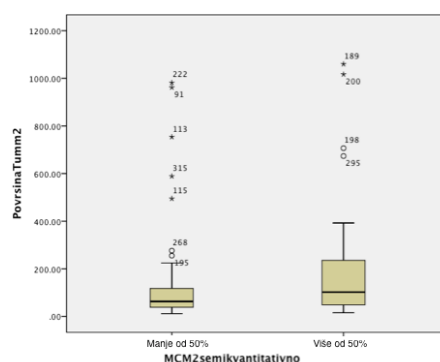
SCC prosečne vrednosti površine 176.63mm^2 (opseg $4.71\text{-}6303.6\text{mm}^2$) imali su manje od 50% pozitivnih ćelija, a SCC prosečne vrednosti površine 253.6mm^2 (opseg $18.8\text{-}3571.8\text{mm}^2$) više od 50% MCM2 pozitivnih ćelija.

Primenom Mann-Whitney testa nije utvrđena statistički značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM2 u odnosu na površinu SCC ($p=0.088$).

4.1.2.7. Odnos obima ekspresije MCM2 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN)

Promene klasifikovane kao KIN, srednje vrednosti površine 62.8mm^2 (opseg $11.8\text{-}981.5\text{mm}^2$) u većem broju slučajeva imale manje od 50% MCM2 pozitivnih ćelija, i obrnuto, promene srednje površine 102.1mm^2 (opseg $15.7\text{-}1059.8\text{mm}^2$) više od 50% (Grafikon 4.2.1.7.)

Grafikon 4.2.1.7. Odnos obima ekspresije MCM2 prema površini KIN



Upotrebom Mann-Whitney testa utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM2 u odnosu na površinu KIN ($p=0.004$).

Kod grupisanih in situ lezija koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma, (KIN1+KIN2 grupa), promene sa više od 50% pozitivnih ćelija imale su srednju vrednost površine 51.02mm^2 (raspon $11.8\text{-}981.25\text{mm}^2$), ali to nije bilo značajno drugačije od srednje vrednosti površine slučajeva sa manje od 50% pozitivnih ćelija, 59.7mm^2 (raspon $11.8\text{-}981.3\text{mm}^2$) i, primenom Mann-Whitney testa nije utvrđena statistički značajna razlika ($p=0.575$).

U slučaju KIN3 lezija, koje se nalaze čitavom debljinom epiderma, samo jedan slučaj je imao manje od 50% pozitivnih ćelija, dok je srednja vrednost površine ostalih slučajeva iznosila 178.9mm² (23.6-1059.8mm²).

4.1.3. Obim ekspresije (semikvantitativno, manje od 33%, od 33-66% i preko 66% pozitivnih ćelija)

4.1.3.1. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

Najveći broj AK - 60 (65.9%) imao je između 33-66% MCM2 pozitivnih ćelija. U slučaju BD najveći broj, 46 (92.0%) je imao više od 66% pozitivnih ćelija, ali nije bilo slučajeva sa manje od 33% pozitivnih ćelija. Najveći broj SCC imao je između 33-66% MCM2 pozitivnih ćelija. Obim ekspresije u odnosu na histopatološki tip lezije prikazan je u **Tabeli 4.1.3.1a.**

Tabela 4.1.3.1a. Obim ekspresije MCM2 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM2	UKUPNO	AK	BD	SCC
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	64 (20.3%)	20 (22.0%)	0	44 (25.3%)
Od 33-66%	138 (43.8%)	60 (65.9%)	4 (8.0%)	74 (42.5%)
Više od 66%	113 (35.9%)	11 (12.1%)	46 (92.0%)	56 (32.2%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji između AK, BD i SCC ($p < 0.001$). Takođe, poređenjem svake od grupa pojedinačno, AK i BD AK i SCC, kao i BD i SCC, upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM2 ($p < 0.001$).

Grupisanjem slučajeva na AK i BD, kao grupu intraepidermalnih lezija, u odnosu na SCC najveći broj slučajeva intraepidermalnih lezija - 64 (45.4%) i SCC - 74 (42.5%) imao je od 33 do 66% pozitivnih ćelija. Obim ekspresije u odnosu na histopatološki tip lezija grupisanih kao intraepidermalne i invazivni SCC prikazan je u **Tabeli 4.1.3.1b.**

Tabela 4.1.3.1b. Obim ekspresije MCM2 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM2	UKUPNO	AK+BD	SCC
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	64 (20.3%)	20 (14.2%)	44 (25.3%)
Od 33-66%	138 (43.8%)	64 (45.4%)	74 (42.5%)
Više od 66%	113 (35.9%)	57 (40.4%)	56 (32.2%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji **statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM2 pozitivnih ćelija između grupe intraepidermalnih lezija i SCC (p=0.042).

4.1.3.2. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN)

Najveći broj KIN1 -38 (76.0%) i KIN2 slučajeva - 22 (55.0%) imao je od 33-66% MCM2 pozitivnih ćelija. U slučaju KIN3, najveći broj slučajeva 47 (92.2%) imao je više od 66% pozitivnih ćelija, bez ijednog slučaja sa manje od 33% pozitivnih ćelija (**Tabela 4.1.3.2a.**).

Tabela 4.1.3.2a. Obim ekspresije MCM2 proteina prema KIN

MCM2	UKUPNO	KIN1	KIN2	KIN3
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	20 (14.2%)	11 (22.0%)	9 (22.5%)	0 (0.0%)
Od 33-66%	64 (45.4%)	38 (76.0%)	22 (55.0%)	4 (7.8%)
Više od 66%	57 (40.4%)	1 (2.0%)	9 (22.5%)	47 (92.2%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** između KIN grupa (p<0.001). Takođe, i poređenjem KIN1:KIN2 (p=0.007), KIN1:KIN3, KIN2:KIN3 (p<0.001), upotrebom istog testa utvrđena je **visoko statistički značajna razlika**.

Kada su grupisane in situ lezije, najveći broj slučajeva KIN1+KIN2 grupe - 60 (66.7%) imao je između 33-66%, dok je najveći broj KIN3 imao više od 66% pozitivnih ćelija (**Tabela 4.1.3.2b.**).

Tabela 4.1.3.2b. Obim ekspresije MCM2 proteina prema KIN

MCM2	UKUPNO	KIN1+KIN2	KIN3
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	20 (14.2%)	20 (22.2%)	0 (0%)
Od 33-66%	64 (45.4%)	60 (66.7%)	4 (7.8%)
Više od 66%	57 (40.4%)	10 (11.1%)	47 (92.2%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u obimu ekspresije MCM2 poređenjem lezija koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) sa lezijama koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) ($p < 0.001$).

4.1.3.3. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC)

Između SCC različitih gradusa, broj slučajeva sa većim brojem pozitivnih ćelija rastao je sa povećanjem gradusa. Najveći broj SCC G1 33 (56.9%) imao je manje od 33% pozitivnih ćelija. Najveći broj SCC G2 imao je između 33-66% pozitivnih ćelija, dok je najveći broj SCC G3, 39 (67.2%) imao preko 66% ćelija. (Tabela 4.1.3.3.).

Tabela 4.1.3.3. Obim ekspresije MCM2 proteina prema gradusu SCC

MCM2	UKUPNO	SCC G1	SCC G2	SCC G3
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	44 (25.3%)	33 (56.9%)	9 (15.5%)	2 (3.4%)
Od 33-66%	74 (42.5%)	24 (41.4%)	33 (56.9%)	17 (29.3%)
Više od 66%	56 (32.2%)	1 (1.7%)	16 (27.6%)	39 (67.2%)

Skraćenice: SCC – planocelularni karcinom

Primenom χ^2 testa utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u obimu ekspresije MCM2 i gradusa SCC, među grupama SCC G1, SCC G2 i SCC G3 ($p < 0.001$), kao i pojedinačno među grupama SCC G1:G2, SCC G1:G3 i SCC G2:G3 ($p < 0.001$). Takođe, kada su poredene grupe SCC G1+G2 i SCC G3, a upotrebom istog testa, razlika u ekspresiji MCM2 bila je **visoko statistički značajna** ($p < 0.001$).

4.1.3.4. Odnos obima ekspresije MCM2 proteina prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC)

Najveći broj SCC prečnika do 20 mm imao je između 33 i 66% MCM2 pozitivnih ćelija, dok je podjednak broj tumora prečnika preko 20 mm imao 33-66% i preko 66% pozitivnih ćelija (Tabela 4.1.3.4). Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u obimu ekspresije MCM2 proteina između tumora dimenzija do i preko 20mm (p=0.475).

Tabela 4.1.3.4. Obim ekspresije MCM2 prema dimenzijama lezije

MCM2 obim ekspresije	UKUPNO broj (%)	≤20 mm broj (%)	>20mm broj (%)
Manje od 33%	44 (25.3%)	28 (25.5%)	16 (25.0%)
Od 33-66%	74 (42.5%)	50 (45.5%)	24 (37.5%)
Više od 66%	56 (32.2%)	32 (29.1%)	24 (37.5%)

4.1.3.5. Odnos obima ekspresije MCM2 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC)

Kod procene ovog obima ekspresije MCM2 prema debljini SCC, tumori su bili podjeljeni u tri grupe, sa graničnim vrednostima 2mm, 4mm i 6mm.

Najveći broj tumora debljine manje od 2mm i više od 2mm imao je između 33-66% MCM2 pozitivnih ćelija, dok je veći broj tumora debljine . (Tabela 4.1.3.5a.)

Tabela 4.1.3.5a. Obim ekspresije MCM2 prema debljini SCC, prva grupa

MCM2 obim ekspresije	UKUPNO broj (%)	≤2 mm broj (%)	>2mm broj (%)
Manje od 33%	44 (25.3%)	7 (35.0%)	37 (24.0%)
Od 33-66%	74 (42.5%)	9 (45.0%)	65 (42.2%)
Više od 66%	56 (32.2%)	4 (20.0%)	52 (33.8%)

Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u obimu ekspresije MCM2 između SCC debljine do i preko 2 mm (p=0.383).

U slučaju grupe SCC debljine do i preko od 4mm, vrednosti su date u tabeli **Tabeli 4.1.3.5b.**

Tabela 4.1.3.5b. Obim ekspresije MCM2 prema debljini SCC, druga grupa

MCM2	UKUPNO	≤4 mm	>4 mm
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	44 (25.3%)	27 (31.8%)	17 (19.1%)
Od 33-66%	74 (42.5%)	39 (45.9%)	35 (39.3%)
Više od 66%	56 (32.2%)	19 (22.4%)	37 (41.6%)

U ovom slučaju, primenom χ^2 testa, poređenjem ove dve grupe SCC, debljine do i preko 4mm utvrđena je **statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM2 u ovom obimu (p=0.017).

U trećem slučaju, za SCC koji su prema debljini bili podeljeni na one čija je debljina bila do i veća od 6 mm (**Tabela 4.1.3.5c.**), upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u obimu ekspresije MCM2 između ovih grupa (p=0.119).

Tabela 4.1.3.5c. Obim ekspresije MCM2 prema debljini SCC, treća grupa

MCM2	UKUPNO	≤6 mm	>6 mm
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	44 (25.3%)	38 (29.2%)	6 (13.6%)
Od 33-66%	74 (42.5%)	52 (40.0%)	22 (50.0%)
Više od 66%	56 (32.2%)	40 (30.8%)	16 (36.4%)

4.1.3.6. Odnos obima ekspresije MCM2 prema površini planocelularnog karcinoma (SCC)

SCC sa manje od 33% pozitivnih ćelija i između 33-66% pozitivnih ćelija bili su identične prosečne vrednosti površine 176.63mm², ali različitog opsega; SCC opsega 4.71-6303.6mm² imali su manje od 33% pozitivnih ćelija, a opsega 38.5-2355.0mm² između 33-66% pozitivnih ćelija. Tumori sa više od 66% MCM2 pozitivnih ćelija imali su prosečnu vrednost površine 268.5mm² (opseg 18.8-3571.8mm²).

Primenom Kruskal-Wallis testa nije utvrđena statistički značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM2 u odnosu na površinu SCC (p=0.115).

Upotrebom Mann-Whitney testa i daljim (međugrupnim) poređenjem grupa: manje od 33% i grupe 33-66% MCM2 pozitivnih ćelija (p=0.770), grupe sa manje od 33% i grupe sa više od 66% pozitivnih ćelija (p=0.086), kao i grupe 33-66% i grupe sa

više od 66% pozitivnih ćelija ($p=0.064$) nije utvrđena statistički značajna razlika.

4.1.3.7. Odnos obima ekspresije MCM2 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN)

KIN lezije sa srednjom vrednosti površine 49.5mm^2 (opseg $11.8-981.3\text{mm}^2$) imale su 33-66% pozitivnih ćelija, KIN lezije sa srednjom vrednošću površine 75.4mm^2 ($11.8-961.6\text{mm}^2$) manje od 33% pozitivnih ćelija, a KIN lezije sa srednjom vrednošću površine 117.8mm^2 (opseg $15.7-1059.8\text{mm}^2$) imale su više od 66% MCM2 pozitivnih ćelija.

Upotrebom Kruskal-Wallis testa nije utvrđena statistički značajna razlika između grupasa manje od 33%, 33-66% i više od 66% pozitivnih ćelija u odnosu na površinu KIN lezija ($p<0.001$).

Upotrebom Mann-Whitney testa i daljim poređenjem grupa sa manje od 33% i grupe 33-66% MCM2 pozitivnih ćelija ($p=0.560$) nije utvrđena statistički značajna razlika. Za razliku od toga, među grupom manje od 33% i više od 66% pozitivnih ćelija ($p=0.009$), kao i grupe 33-66% i grupe sa više od 66% pozitivnih ćelija ($p<0.001$), uvrđena je **visoko statistički značajna razlika**.

Kada su grupisane in situ lezije, koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2), lezije srednje vrednosti površine 75.36mm^2 (opseg $11.8-961.6\text{mm}^2$) imale su manje od 33% MCM2 pozitivnih ćelija, lezije srednje vrednosti površine 49.5mm^2 (opseg $11.8-981.3.6\text{mm}^2$) između 33-66% pozitivnih ćelija, dok su KIN1+KIN2 lezije, srednje vrednosti površine 72.22mm^2 (opseg $15.7-150.7\text{mm}^2$) imale više od 66% pozitivnih ćelija.

Upotrebom Kruskal-Wallis testa nije utvrđena statistički značajna razlika među grupama sa manje od 33%, 33-66% i više od 66% pozitivnih ćelija u odnosu na površinu KIN1+KIN2, in situ lezija koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma ($p<0.001$). Daljim međugrupnim poređenjem, a upotrebom Mann-Whitney testa, između KIN1+KIN2 lezija sa manje od 33% i 33-66% ($p=0.545$), grupa sa manje od 33% i više od 66% ($p=0.619$), kao i grupa sa 33-66% i više od 66% ($p=0.827$) nije utvrđena statistički značajna razlika.

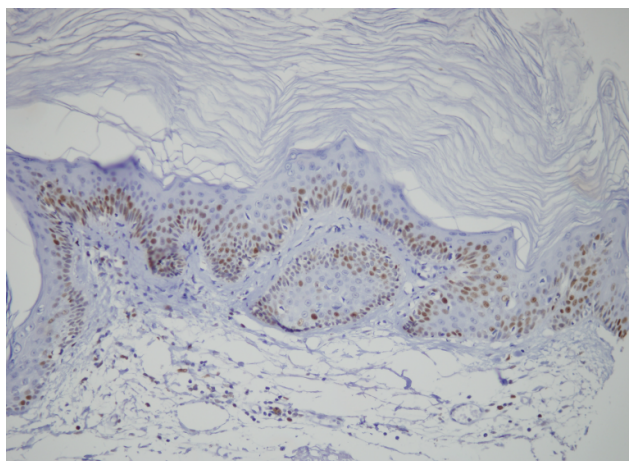
U slučaju lezija koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3), promene manje srednje vrednosti površine, 80.07mm^2 (opseg $23.6-150.7\text{mm}^2$) imale su između 33-66% MCM2 pozitivnih ćelija, dok je srednja vrednost površine KIN3 koji su imali više od 66% pozitivnih ćelija iznosila 189.97mm^2 (opseg $32.9-1059.8\text{mm}^2$). Upotrebom Mann-Whitney testa, statistička razlika među ovim grupama nije utvrđena ($p=0.071$).

4.2. Ekspresija MCM5

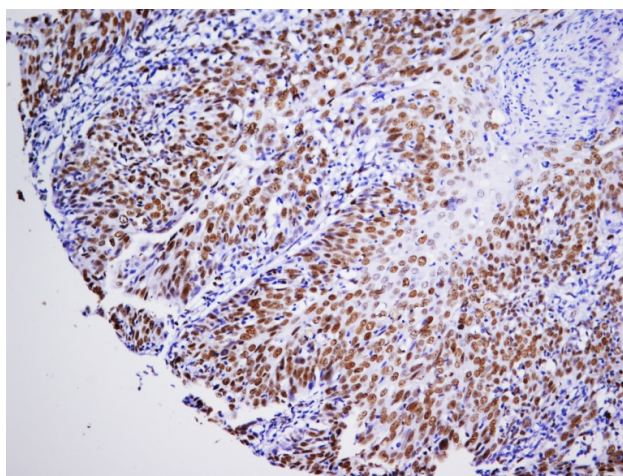
4.2.1 Distribucija

4.2.1.1. Distribucija MCM5 prema histopatološkoj dijagnozi

Najveći broj AK je imao bazalnu distribuciju (**Slika 4.2.1.1.a**) MCM5 pozitivnih ćelija – 66 slučajeva (72.5%), potom difuznu 19 (20.9%), a najmanji broj suprabazalnu – 6 (6.6%). Najveći broj slučajeva BD je imao difuzni tip distribucije – 45 slučajeva (90.0%), preostali slučajevi su imali suprabazalnu 4 (8.0%), osim jednog slučaja sa bazalnom (2.0%) distribucijom MCM5 pozitivnih ćelija. Kod SCC, u sličnom broju bila je zastupljena periferna (90 slučajeva – 51.7%) i difuzna distribucija (**Slika 4.2.1.1.b**) pozitivnih ćelija (84 slučajeva – 48.3%). Centralna distribucija nije bila uočena ni kod jednog SCC.



Slika 4.2.1.1.a Bazalna distribucija MCM5 kod aktinične keratoze



Slika 4.2.1.1.b Difuzna distribucija MCM5 kod planocelularnog karcinoma

Poređenjem distribucije proteina MCM5 prema histopatološkoj dijagnozi, upotrebljavajući χ^2 test, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u distribuciji ovog proteina između AK, BD i SCC ($p < 0.001$). Istim testom, takođe je utvrđena visoko statistički značajna razlika kada je upoređivana MCM5 distribucija između AK i BD, AK i SCC, kao i BD i SCC ($p < 0.001$).

Grupisanjem svih slučajeva bez difuznog rasporeda ćelija u grupu ne-difuznih prikazano je u **Tabeli 4.2.1.1a**. Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je visoko statistički značajna razlika između AK, BD i SCC, kao i kada su međusobno upoređivane AK i BD, AK i SCC, BD i SCC ($p < 0.001$).

Tabela 4.2.1.1a. Distribucija MCM5 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM5 distribucija	UKUPNO broj (%)	AK broj (%)	BD broj (%)	SCC broj (%)
difuzno	148 (47.0%)	19 (20.9%)	45 (90.0%)	84 (48.3%)
ne-difuzno	167 (53.0%)	72 (79.1%)	5 (10.0%)	90 (51.7%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Kada su slučajevi intraepidermalnih lezija, grupisani kao AK i BD, upoređivani sa SCC, gotovo podjednak broj intraepidermalnih promena pokazao je bazalnu 67 (47.5%) i difuznu 64 (45.4%) distribuciju MCM5, dok je kod značajno manje lezija 10 (7.1%) uočena suprabazalna distribucija. Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** između grupe AK i BD u odnosu na SCC ($p < 0.001$).

Grupisanjem svih slučajeva bez difuznog rasporeda ćelija u grupu sa ne-difuznom distribucijom MCM5 (**Tabela 4.2.1.1b**) i međusobnim upoređivanjem, upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u MCM5 distribuciji između grupe intraepidermalnih lezija (AK i BD) u odnosu na SCC ($p = 0.610$, $p > 0.05$).

Tabela 4.2.1.1b Distribucija MCM5 proteina prema histopatološkoj dijagnozi, grupa intraepidermalnih promena u odnosu na SCC

MCM5 distribucija	UKUPNO broj (%)	AK i BD broj (%)	SCC broj (%)
difuzno	148 (47.0%)	64 (45.4%)	77 (54.6%)
ne-difuzno	167 (53.0%)	77 (54.6%)	90 (51.7%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

4.2.1.2. Distribucija proteina MCM5 prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN)

Kada su lezije klasifikovane kao KIN, kod KIN1 i KIN2 lezija dominirala je bazalna distribucija, kod 44 (88.0%) KIN1 i 22 (55.0%) KIN2, dok je kod KIN3 bila dominantna difuzna distribucija MCM5 pozitivnih ćelija, uočena kod 46 (90.2%). (Slika 1-3). Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je visoko statistički značajna razlika u distribuciji MCM5 između KIN1, KIN2 i KIN3 ($p < 0.001$) kao i međusobnim poređenjem KIN1:KIN2 ($p = 0.002$), KIN1:KIN3 i KIN2:KIN3 ($p < 0.001$).

Kada su grupisani slučajevi ne-difuzne u odnosu na difuznu distribuciju MCM5, bilo je više KIN1 i KIN2 slučajeva sa ne-difuzno distribuiranim MCM5 pozitivnim ćelijama, za razliku od KIN3 (Tabela 4.2.1.2.)

Tabela 4.2.1.2. Distribucija MCM5 proteina prema KIN

MCM5 distribucija	UKUPNO broj (%)	KIN1 broj (%)	KIN2 broj (%)	KIN3 broj (%)
difuzno	64 (45.4%)	4 (8.0%)	14 (35.0%)	46 (90.2%)
ne-difuzno	77 (54.6%)	46 (92.0%)	26 (65.0%)	5 (9.8%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

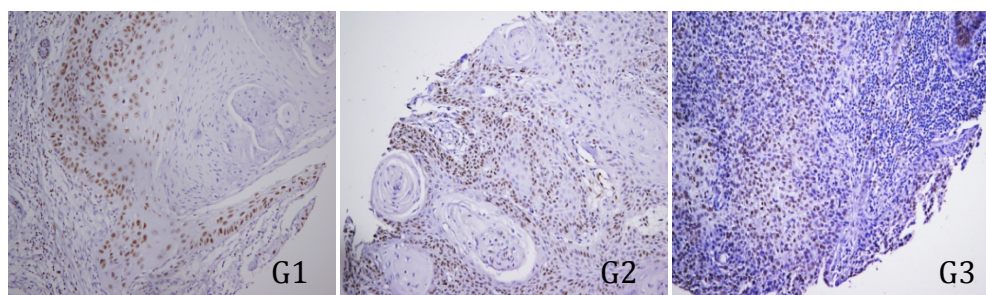
Upotrebom χ^2 testa, poređenjem slučajeva sa ne-difuznom i difuznom distribucijom, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u distribuciji MCM5 između KIN1, KIN2 i KIN 3 lezija ($p < 0.001$). Poređenjem slučajeva sa ne-difuznom i difuznom distribucijom među grupama KIN1:KIN2 ($p = 0.001$), KIN1:KIN3 i KIN2:KIN3 ($p < 0.001$), takođe je, istim testom, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika**.

Kada su poređene in situ lezije koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) najveći broj slučajeva KIN1+KIN2 grupe imao je bazalnu distribuciju MCM5 pozitivnih ćelija, 66 (73.3%), a značajno manji broj difuznu 18 (20.0%) i suprabazalnu 6 (6.7%). Sa druge strane, najveći broj lezija koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) imao je difuznu distribuciju 46 (90.2%), a značajno manji suprabazalnu 4 (7.8%), dok je smo kod jedne lezije bila uočena bazalna distribucija (2.0%). Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je visoko statistički značajna razlika u distribuciji MCM5 između lezija koje ne zahvataju čitav epiderm (KIN1+KIN2) i lezija koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) ($p < 0.001$).

Grupisanjem na promene sa ne-difuznom i difuznom distribucijom kod većeg broja promena iz KIN1+KIN2 grupe 72 (80.0%) uočena je ne-difuzna distribucija, dok je veći broj KIN 3 lezija 46 (90.2%) imao izraženu difuznu distribuciju MCM5. Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** između ovih grupa ($p < 0.001$).

4.2.1.3. Distribucija MCM5 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC)

Nijedan SCC nije pokazao centralnu distribuciju MCM5. Kod SCC G1 distribucija MCM5 pozitivnih ćelija bila je dominantno periferna 53 (91,4). SCC G2 i SCC G3 pokazali su izraženije difuznu MCM5 distribuciju, kod 30 (51.7%) SCC G2 i 49 (84.5%) SCC G3 slučajeva (**Slika 4.2.1.3.**).



Slika 4.2.1.3. Distribucija MCM2 kod planocelularnih karcinoma (G1, G2, G3)

Poređenjem distribucije MCM5 prema gradusu tumora, upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** između sve tri grupe SCC ($p < 0.001$), kao i kada su posebno poređeni SCC G1:G2, SCC G1:G3 i SCC G2:G3, čak i kada su poređene grupa SCC G1+G2 :SCC G3 ($p < 0.001$).

4.2.1.4. Distribucija MCM5 prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC)

SCC su prema dimenzijama su podeljeni u dve grupe: najvećeg prečnika do/jednako 20 mm i preko 20 mm. Periferni tip distribucije bio je zastupljeniji u lezijama do/jednako 20 mm, u 61 slučaju (55.5%), dok je kod SCC najvećeg prečnika većeg od 20 mm dominantno bio zastupljen difuzni tip distribucije, kod 35 (54.7%) slučajeva (**Tabela 4.2.1.4.**).

Tabela 4.2.1.4. Distribucija MCM5 proteina prema dimenzijama lezije

MCM5	UKUPNO	≤20 mm	>20 mm
distribucija	broj (%)	broj (%)	broj (%)
difuzno	84 (48.3%)	49 (44.5%)	35 (54.7%)
periferno	90 (51.7%)	61 (53.6%)	29 (45.3%)

Poređenjem ove dve grupe SCC, upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji MCM5 ($p=0.197$).

4.2.1.5. Distribucija MCM5 proteina prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC)

Svi SCC, bez obzira na gradus su, prema debljini, bili podeljeni u tri grupe. Prva grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 2 mm, druga grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 4 mm i treća grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 6 mm.

U prvoj grupi, bilo je 20 tumora SCC debljine do/jednako 2 mm, od čega je 13 (65.0%) imalo perifernu distribuciju MCM5 pozitivnih ćelija. Tumora debljine preko 2 mm bilo je 154, od toga je isti broj 77 (50.0%) imao difuznu i perifernu distribuciju (**Tabela 4.2.1.5.**).

Tabela 4.2.1.5a. Distribucija MCM5 prema debljini SCC, prva grupa

MCM5	UKUPNO	≤2 mm	>2 mm
distribucija	broj (%)	broj (%)	broj (%)
difuzno	84 (48.3%)	7 (35.0%)	77 (50.0%)
periferno	90 (51.7%)	13 (65.0%)	77 (50.0%)

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između ovih grupa ($p=0.207$). U drugoj grupi, tumori debljine manje/jednako 4mm imali su dominantnije perifernu MCM5 distribuciju, kod 54 (63.5%), a tumori deblji od 4mm difuznu, kod 55 (61.8%) (**Tabela 4.2.1.5b.**).

Tabela 4.2.1.5b. Distribucija MCM5 prema debljini SCC, druga grupa

MCM5	UKUPNO	≤4 mm	>4 mm
distribucija	broj (%)	broj (%)	broj (%)
difuzno	84 (48.3%)	29 (34.1%)	55 (61.8%)
periferno	90 (51.7%)	56 (65.9%)	34 (38.2%)

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji visoko statistički značajna razlika između ovih grupa ($p < 0.001$).

U trećoj grupi, kod SCC debljine manje/jednako 6 mm češće je uočavana periferna distribucija, kod 76 (58.5%), za razliku od SCC debljih od 6 mm koji su češće, 30 (68.2%), ispoljavali difuznu distribuciju MCM5 pozitivnih ćelija (**Tabela 4.2.1.5c**).

Tabela 4.2.1.5c. Distribucija MCM5 prema debljini SCC, treća grupa

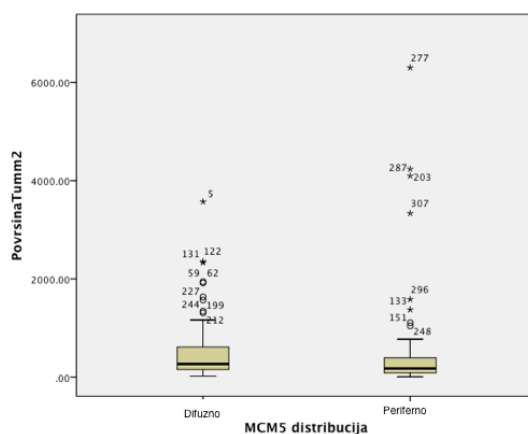
MCM5	UKUPNO	≤6 mm	>6 mm
distribucija	broj (%)	broj (%)	broj (%)
difuzno	84 (48.3%)	54 (41.5%)	30 (68.2%)
periferno	90 (51.7%)	76 (58.5%)	14 (31.8%)

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** između ovih grupa ($p = 0.002$).

4.2.1.6. Distribucija MCM5 proteina prema površini planocelularnog karcinoma (SCC)

Srednja vrednost površine SCC koji su imali difuznu distribuciju MCM5 iznosila je 266.90mm^2 (raspon $18.8\text{-}3571.8\text{mm}^2$), a SCC kod kojih je bila uočena periferna distribucija 176.23mm^2 (raspon $4.71\text{-}6303.6\text{mm}^2$). Upotrebom Mann-Whitney testa utvrđeno je da postoji **statistički značajna razlika** u distribuciji MCM5 prema površini tumora ($p = 0.010$) (**Grafikon 4.2.1.6.**).

Grafikon 4.2.1.6. Distribucija MCM5 prema površini SCC



4.2.1.7. Distribucija MCM5 proteina prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN)

Promene klasifikovane kao KIN, koje su imale srednju vrednost površine 54.95 mm² (raspon 11.8-961.6 mm²) imale su bazalnu distribuciju MCM5 pozitivnih ćelija. Suprabazalna distribucija bila zastupljena kod KIN lezija srednje vrednosti površine 125.6 mm² (raspon 23.6-494.6 mm²), a difuzna kod lezija srednje vrednosti površine 107.94 mm² (raspon 15.7-1059.8 mm²).

Korišćenjem Kruskal-Wallis testa utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u distribucija MCM5 u odnosu na površinu KIN lezija (p=0.001)

Upotrebom Mann-Whitney testa, kada su poređene grupe sa bazalnom i suprabazalnom distribucijom nije utvrđena statistični značajna razlika (p=0.088), kao ni između grupa sa suprabazalnom i difuznom distribucijom (p=0.806), ali je između grupa sa bazalnom i difuznom distribucijom MCM5 pozitivnih ćelija, razlika bila **visoko statistički značajna** (p<0.001).

Kada su grupisani slučajevi sa ne-difuznom u odnosu na difuznu distribuciju MCM5 pozitivnih ćelija, u odnosu na površinu lezija klasifikaovanih kao KIN, kod promena površine srednje vrednosti 62.8 mm² (raspon 11.8-961.6 mm²) zastupljenija je bila ne-difuzna distribucija, a promene površine, srednje vrednosti 107.94 mm² (raspon 15.7-1059.8 mm²) imale su difuzno distribuirane MCM5 pozitivne ćelije. Upotrebom Mann-Whitney testa utvrđena je **statistički značajna razlika** u distribuciji (p=0.001).

Kod grupisanih in situ lezija koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma, (KIN1+KIN2 grupa), promene sa najvećom srednjom vrednošću površine, 78.5 mm² (raspon 42.4-494.6 mm²) imale su suprabazalnu distribuciju MCM5 pozitivnih ćelija;

slučajevi sa srednjom vrednošću površine 54.95 mm² (raspon 11.8-961.63 mm²) bazalnu, a slučajevi sa srednjom vrednošću površine 51.42 mm² (raspon 15.7-981.25 mm²) difuznu distribuciju pozitivnih ćelija.

Upotrebom, Kruskal-Wallis testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji između ovih grupa (p=0.442), kao ni kada su posebno poređene grupe sa bazalnom i suprabazalnom (p=0.209), bazalnom i difuznom (p=1.0), kao i suprabazalnom i difuznom distribucijom MCM5 (p=0.280), u odnosu na površinu KIN+KIN2 lezija, a korišćenjem Mann-Whitney testa.

Grupisanjem na promene sa ne-difuznom i difuznom distribucijom, in situ promene (KIN1+KIN2) srednje vrednosti površine, 55.74 mm² (raspon 11.8-961.6 mm²) imale su ne-difuznu distribuciju, dok je difuzna distribucija MCM5 uočena kod promena srednje vrednosti površine 51.42 mm² (raspon 15.7-981.25 mm²).

Upotrebom Mann-Whitney testa utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** između ovih grupa (p<0.001).

4.2.2 Obim ekspresije (semikvantitativno, do i preko 50% pozitivnih ćelija)

4.2.2.1. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

Veći broj AK 62 (68.1%) imao je manje od 50% MCM5 pozitivnih ćelija. Gotovo svi slučajevi BD imali su više od 50% pozitivnih ćelija 49 (98.0%), samo kod jedne lezije bilo je manje od 50%. Kod SCC, više slučajeva 101 (58.0%) imalo više od 50% pozitivnih ćelija. Obim ekspresije u odnosu na histopatološki tip lezije prikazan je u **Tabeli 4.2.2.1.**

Tabela 4.2.2.1a. Obim ekspresije MCM5 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM5	UKUPNO	AK	BD	SCC
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	136 (43.2%)	62 (68.1%)	1 (2.0%)	73 (42.0%)
Više od 50%	179 (56.8%)	29 (31.9%)	49 (98.0%)	101 (58.0%)

Skrećenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna** razlika u ekspresiji MCM5 između AK, BD i SCC ($p < 0.001$). Takođe upotrebom χ^2 testa, a poređenjem svake od grupa pojedinačno, AK:BD AK:SCC i BD:SCC, utvrđena je **visoko statistički značajna** razlika u ekspresiji MCM5 ($p < 0.001$).

Grupisanjem slučajeva intraepidermalnih lezija (AK i BD), u odnosu na SCC u oba slučaja veći broj lezija imao više je od 50% pozitivnih ćelija (**Tabela 4.2.2.1b**).

Tabela 4.2.2.1b. Obim ekspresije MCM5 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM5	UKUPNO	AK+BD	SCC
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	136 (43.2%)	63 (44.7%)	73 (42.0%)
Više od 50%	179 (56.8%)	78 (55.3%)	101 (58.0%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji MCM5 pozitivnih ćelija između grupe intraepidermalnih lezija i SCC ($p = 0.627$).

4.2.2.2 Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN)

Veći broj KIN1 slučajeva 41 (82.0%) imao je manje od 50% MCM5 pozitivnih ćelija. Kod KIN2, nešto veći broj slučajeva je imao manje od 50% pozitivnih ćelija, dok je kod KIN3 značajno veći broj slučajeva 50 (98.0%) imao je više od 50% pozitivnih ćelija. (**Tabela 4.2.2.2a**.)

Tabela 4.2.2.2a. Obim ekspresije MCM5 proteina prema KIN

MCM5	UKUPNO	KIN1	KIN2	KIN3
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	63 (44.7%)	41 (82.0%)	21 (52.5%)	1 (2.0%)
Više od 50%	78 (55.3%)	9 (18.0%)	19 (47.5%)	50 (98.0%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM5 između KIN grupa ($p < 0.001$). Poređenjem KIN1:KIN2 ($p = 0.003$), KIN1:KIN3 i KIN2:KIN3 ($p < 0.001$), razlika bila **visoko statistički značajna**.

Grupisanjem in situ lezija koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2), veći broj 62 (68.9%) je imao manje od 50% pozitivnih ćelija, za razliku od lezija koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) gde je značajno veći broj slučajeva 50 (98.0%) imao više od 50% pozitivnih ćelija (**Tabela 4.2.2.2b**).

Tabela 4.2.2.2b. Obim ekspresije MCM5 proteina prema KIN

MCM5	UKUPNO	KIN1+KIN2	KIN3
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	63 (44.7%)	62 (68.9%)	1 (2.0%)
Više od 50%	78 (55.3%)	28 (31.1%)	50 (98.0%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u obimu ekspresije MCM5 poređenjem in situ lezija koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) sa lezijama koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) ($p < 0.001$).

4.2.2.3. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC)

SCC podeljeni prema histopatološkom gradusu, razvrstani na one kojih je bilo manje od 50% i više od 50% MCM5 pozitivnih ćelija dati su u **Tabeli 4.2.2.3**.

Tabela 4.2.2.3. Obim ekspresije MCM5 proteina prema gradusu SCC

MCM5 obim ekspresije	UKUPNO broj (%)	SCC Gradus1 broj (%)	SCC Gradus 2 broj (%)	SCC gradus 3 broj (%)
Manje od 50%	73 (42.0%)	49 (84.5%)	17 (29.3%)	7 (12.1%)
Više od 50%	101 (53.4%)	9 (15.5%)	41 (70.7%)	51 (87.9%)

Skraćenice: SCC – planocelularni karcinom

Primenom χ^2 testa utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM5 kod SCC različitih gradusa, među grupama SCC G1, SCC G2 i SCC G3 ($p < 0.001$). Kada su međusobno poređene grupe SCC G1:G2, SCC G1:G3, razlika je bila **visoko statistički značajna** ($p < 0.001$), a između SCC G2:G3 ($p = 0.022$), **statistički značajna**. Takođe, kada su poređene grupa SCC G1+G2:SCC G3, upotrebom istog testa utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM5 ($p < 0.001$).

4.2.2.4. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC)

Veći broj SCC prečnika manje/jednako 20 mm i preko 20 mm imalo je više od 50% MCM5 pozitivnih ćelija (Tabela 4.2.2.4.). Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u obimu ekspresije MCM5 proteina između ovih grupa (p=0.555)

Tabela 4.2.2.4. Obim ekspresije MCM5 prema dimenzijama lezije

MCM5 obim ekspresije	UKUPNO broj (%)	≤20 mm broj (%)	>20 mm broj (%)
Manje od 50%	73 (42.0%)	48 (43.6%)	25 (39.1%)
Više od 50%	101 (53.4%)	62 (56.4%)	39 (60.9%)

4.2.2.5. Odnos obima ekspresije MCM5 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC)

Kod procene obima ekspresije MCM5 prema debljini SCC, tumori su bili podjeljeni u tri grupe. Prva grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 2 mm, druga grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 4 mm i treća grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 6 mm.

Tumori debljine manje/jednako od 2 mm imali su nešto više slučajeva sa manje od 50% pozitivnih ćelija, dok je kod tumora debljine više od 2 mm bilo obrnuto (Tabela 4.2.2.5a.).

Tabela 4.2.2.5a. Obim ekspresije MCM5 prema debljini SCC, prva grupa

MCM5 obim ekspresije	UKUPNO broj (%)	≤2 mm broj (%)	>2 mm broj (%)
Manje od 50%	73 (42.0%)	12 (60.0%)	61 (39.6%)
Više od 50%	101 (53.4%)	8 (40.0%)	93 (60.4%)

Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u obimu ekspresije MCM5 između SCC između ovih grupa (p=0.082).

U slučaju SCC debljine manje/jednako i više od 4 mm vrednosti su date u Tabeli 4.2.2.5b.

Tabela 4.2.2.5b. Obim ekspresije MCM5 prema debljini SCC, druga grupa

MCM5	UKUPNO	≤4 mm	>4 mm
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	73 (42.0%)	49 (57.6%)	24 (27.0%)
Više od 50%	101 (53.4%)	36 (42.4%)	65 (73.0%)

Primenom χ^2 testa i poređenjem ove dve grupe SCC utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM5 ($p < 0.001$).

U trećem slučaju, kod SCC koji bili podeljeni na one čija je debljina bila manja/jednaka ili veća od 6 mm (**Tabela 4.2.2.5c.**), upotrebom χ^2 testa, takođe je utvrđena **visoko statistički značajna razlika** u obimu ekspresije MCM5 ($p < 0.001$)

Tabela 4.2.2.5c. Obim ekspresije MCM5 prema debljini SCC, druga grupa

MCM5	UKUPNO	≤6 mm	>6 mm
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	73 (42.0%)	62 (47.7%)	11 (25.0%)
Više od 50%	101 (53.4%)	68 (52.3%)	33 (75.0%)

4.2.2.6. Odnos obima ekspresije MCM5 prema površini planocelularnog karcinoma

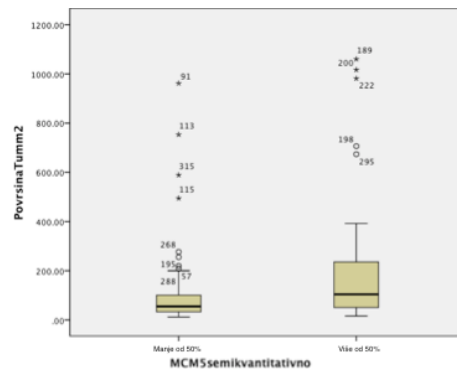
SCC prosečne vrednosti površine 176.63 mm² (opseg 4.71-6303.6 mm) imali su manje od 50% pozitivnih ćelija i obrnuto, SCC prosečne vrednosti površine 251.2 mm² (opseg 18.8-3571.8 mm²) više od 50% MCM5 pozitivnih ćelija.

Primenom Mann-Whitney testa nije utvrđena statistički značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM5 u odnosu na površinu SCC ($p = 0.057$).

4.2.2.7. Odnos obima ekspresije MCM5 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN)

Promene klasifikovane kao KIN, srednje vrednosti površine 54.9 mm² (opseg 11.8-961.6 mm²) u većem broju slučajeva imale su manje od 50% MCM5 pozitivnih ćelija, a promene srednje vrednosti površine 104.0 mm² (opseg 15.7-1059.8 mm²) više od 50%. (**Grafikon 4.2.2.7.**)

Grafikon 4.2.2.7. Odnos obima ekspresije prema površini KIN



Upotrebom Mann-Whitney testa utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM5 u odnosu na površinu KIN ($p=0.001$).

Kod grupisanih in situ lezija koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma, (KIN1+KIN2 grupa), promene sa manje od 50% pozitivnih ćelija imale srednju vrednost površine 53.38 mm^2 (raspon $11.8-961.63 \text{ mm}^2$), a slučajevi sa više od 50% pozitivnih ćelija, srednju vrednost površine 63.98 mm^2 (raspon $15.7-981.3 \text{ mm}^2$). Primenom Mann-Whitney testa nije utvrđena statistički značajna razlika ovog obima ekspresije MCM5 u odnosu na površinu ($p=0.903$)

U slučaju KIN3 lezija, koje se nalaze čitavom debljinom epiderma, nije bilo slučajeva sa manje od 50% MCM5 pozitivnih ćelija.

4.2.2. Obim ekspresije (semikvantitativno, manje od 33%, od 33-66% i preko 66% pozitivnih ćelija)

4.2.3.1 Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

Najveći broj AK, 58 (63.7%) imao je između 33-66% MCM5 pozitivnih ćelija. U slučaju BD, najveći broj imao je više od 66% pozitivnih ćelija 44 (88.0%), ali nije bilo slučajeva sa manje od 33% pozitivnih ćelija. Najveći broj SCC imao je između 33-66% MCM2 pozitivnih ćelija. Obim ekspresije u odnosu na histopatološki tip lezije prikazan je u **Tabeli 4.2.3.1a.**

Tabela 4.2.3.1a. Obim ekspresije MCM5 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM5	UKUPNO	AK	BD	SCC
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	58 (18.4%)	19 (20.9%)	0	39 (22.4%)
Od 33-66%	135 (42.9%)	58 (63.7%)	6 (12.0%)	71 (40.8%)
Više od 66%	122 (38.7%)	14 (15.4%)	44 (88.0%)	64 (36.8%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM5 između AK, BD i SCC ($p < 0.001$). Takođe upotrebom χ^2 testa, a poređenjem svake od grupa pojedinačno, AK:BD AK:SCC i BD:SCC utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM5 ($p < 0.001$).

Grupisanjem intraepidermalnih lezija (AK i BD), u odnosu na SCC najveći broj slučajeva intraepidermalnih lezija 64 (45.4%) i SCC 71 (40.8%) imao je od 33 do 66% MCM5 pozitivnih ćelija. Obim ekspresije u odnosu na histopatološki tip lezije prikazan je u **Tabeli 4.2.3.1b.**

Tabela 4.2.3.1b. Obim ekspresije MCM5 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM5	UKUPNO	AK+BD	SCC
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	58 (18.4%)	19 (13.5%)	39 (22.4%)
Od 33-66%	135 (42.9%)	64 (45.4%)	71 (40.8%)
Više od 66%	122 (38.7%)	58 (41.1%)	64 (36.8%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji MCM5 pozitivnih ćelija između grupe intraepidermalnih lezija i SCC ($p = 0.126$).

4.2.3.2 Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN)

Najveći broj KIN1 40 (80.0%) i KIN2 slučajeva 18 (45.0%) imao je od 33-66% MCM5 pozitivnih ćelija. U slučaju KIN3, najveći broj slučajeva 45 (88.2%) imao je više

od 66% pozitivnih ćelija, bez ijednog slučaja sa manje od 33% pozitivnih ćelija (**Tabela 4.2.3.2a**).

Tabela 4.2.3.2a. Obim ekspresije MCM5 proteina prema KIN

MCM5	UKUPNO	KIN1	KIN2	KIN3
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	19 (13.5%)	10 (20.0%)	9 (22.5%)	0 (0.0%)
Od 33-66%	64 (45.4%)	40 (80.0%)	18 (45.0%)	6 (11.8%)
Više od 66%	58 (41.1%)	0 (0.0%)	13 (32.5%)	45 (88.2%)

Skrećenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** između KIN grupa ($p < 0.001$), kao i međugrupnim poređenjem KIN1:KIN2, KIN1:KIN3, KIN2:KIN3 ($p < 0.001$).

Kada su grupisane in situ lezije koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) najveći broj slučajeva KIN1+KIN2 grupe 58 (64.4%) imao je između 33-66%, a najveći broj KIN3 više od 66% pozitivnih ćelija (**Tabela 4.2.3.2b**).

Tabela 4.2.3.2b. Obim ekspresije MCM5 proteina prema KIN

MCM5	UKUPNO	KIN1+KIN2	KIN3
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	19 (13.5%)	19 (21.1%)	0 (0%)
Od 33-66%	64 (45.4%)	58 (64.4%)	6 (11.8%)
Više od 66%	58 (41.1%)	13 (14.4%)	45 (88.2%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u obimu ekspresije MCM5 između lezija koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) u odnosu na lezije koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) ($p < 0.001$).

4.2.3.3. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC)

Među SCC različitih gradusa, broj slučajeva sa većim brojem pozitivnih ćelija rastao je sa povećanjem gradusa. Najveći broj SCC G1 32 (55.2%) imao je manje od 33% pozitivnih ćelija, najveći broj SCC G2 27 (46.6%) između 33-66% pozitivnih ćelija,

dok je najveći broj SCC G3 35 (60.3%) imao preko 66% MCM5 pozitivnih ćelija. (Tabela 4.2.3.3.).

Tabela 4.2.3.3. Obim ekspresije MCM5 proteina prema gradusu SCC

MCM2	UKUPNO	SCC Gradus1	SCC Gradus 2	SCC gradus 3
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	39 (22.4%)	32 (55.2%)	5 (8.6%)	3 (5.2%)
Od 33-66%	71 (40.8%)	23 (39.7%)	27 (46.6%)	26 (44.8%)
Više od 66%	64 (36.8%)	3 (5.2%)	21 (36.2%)	35 (60.3%)

Skaćenice: SCC – planocelularni karcinom

Primenom χ^2 testa utvrđeno je da **postoji visoko statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM5 i gradusa SCC, između grupa SCC G1, SCC G2 i SCC G3 ($p < 0.001$), kao i poređenjem pojedinačno SCC G1:G2, SCC G1:SG3 ($p < 0.001$). Poređenjem SCC G2:G3, upotrebom istog testa, nije utvrđena statistički značajna razlika ($p = 0.186$). Kada su poređene grupe SCC G1+G2:SCC G3, upotrebom χ^2 testa, razlika u ekspresiji MCM5 bila je **visoko statistički značajna** ($p < 0.001$).

4.2.3.4. Odnos obima ekspresije MCM5 proteina prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC)

SCC prečnika manje/jednako i više od 20 mm imali su najveći broj slučajeva sa preko 66% MCM5 pozitivnih ćelija (Tabela 4.2.3.4.).

Tabela 4.2.3.4. Obim ekspresije MCM5 prema dimenzijama lezije

MCM5	UKUPNO	≤20 mm	>20 mm
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	7 (6.0%)	3 (4.3%)	4 (8.7%)
Od 33-66%	48 (41.4%)	33 (47.1%)	15 (32.6%)
Više od 66%	61 (52.6%)	34 (48.6%)	27 (58.7%)

Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM5 proteina između SCC ove dve grupe ($p = 0.240$).

4.2.3.5. Odnos obima ekspresije MCM5 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC)

Kod procene ovog obima ekspresije MCM5 prema debljini SCC, tumori su bili podeljeni u tri grupe. Prva grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 2 mm, druga grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 4 mm i treća grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 6 mm.

Najveći broj tumora prve grupe imao je između 33-66% MCM5 pozitivnih ćelija (Tabela 4.2.3.5a.).

Tabela 4.2.3.5a. Obim ekspresije MCM5 prema debljini SCC, prva grupa

MCM5	UKUPNO	≤2 mm	>2 mm
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	7 (6.0%)	0 (0.0%)	7 (6.6%)
Od 33-66%	48 (41.4%)	6 (60.0%)	42 (39.6%)
Više od 66%	61 (52.3%)	4 (40.0%)	57 (53.8%)

Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM5 između SCC debljine manje/jednako 2 mm i preko 2 mm (p=0.385).

U slučaju grupe SCC debljine manje/jednako i više od 4 mm vrednosti su date u Tabeli 4.2.3.5b.

Tabela 4.2.3.5b. Obim ekspresije MCM5 prema debljini SCC, druga grupa

MCM5	UKUPNO	≤4 mm	>4 mm
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	7 (6.0%)	4 (8.9%)	3 (4.2%)
Od 33-66%	48 (41.4%)	21 (46.7%)	27 (38.0%)
Više od 66%	61 (52.3%)	20 (44.4%)	41 (57.7%)

I u ovom slučaju, primenom χ^2 testa, poređenjem SCC nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji MCM5 između grupa (p=0.299).

Takođe, ni u trećem slučaju, SCC koji su, prema debljini, bili podeljeni manje/jednako ili više od 6 mm (Tabela 4.2.3.5c.), upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u obimu ekspresije MCM5 (p=0.375).

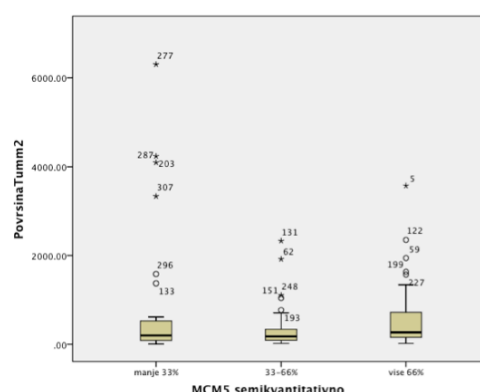
Tabela 4.2.3.5c. Obim ekspresije MCM5 prema debljini SCC, druga grupa

MCM5	UKUPNO	≤6 mm	>6 mm
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	7 (6.0%)	6 (7.3%)	1 (2.9%)
Od 33-66%	48 (41.4%)	36 (43.9%)	12 (35.3%)
Više od 66%	61 (52.3%)	40 (48.8%)	21 (61.8%)

4.2.3.6. Odnos obima ekspresije MCM5 prema površini planocelularnog karcinoma (SCC)

Prosečna vrednost površine SCC sa manje od 33% pozitivnih ćelija iznosila je 197.82 mm² (opseg 4.7-6303.6 mm²), SCC sa 33-66% pozitivnih ćelija 175.84 mm² (opseg 18.84-2331.45 mm²), dok su SCC najveće srednje vrednosti površine 267.69 mm² (19.6-3571.8 mm²) imali više od 66% MCM5 pozitivnih ćelija (**Grafikon 4.2.3.6.**).

Grafikon 4.2.3.6. Odnos obima ekspresije MCM5 prema površini SCC



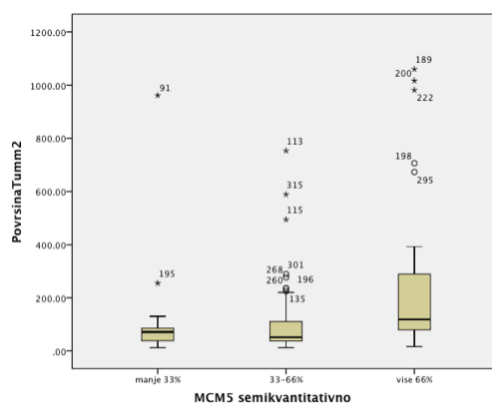
Primenom Kruskal-Wallis testa utvrđena je **statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM5 u odnosu na površinu SCC (p=0.014).

Upotrebom Mann-Whitney testa i daljim poređenjem grupa: manje od 33% i 33-66% MCM5 pozitivnih ćelija (p=0.427), manje od 33% i više od 66% pozitivnih ćelija (p=0.133) nije utvrđena statistički značajna razlika, ali je poređenjem grupe 33-66% i više od 66% pozitivnih ćelija, istim testom, utvrđena **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM5 u odnosu na površinu SCC (p=0.003).

4.2.3.7. Odnos obima ekspresije MCM5 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN)

KIN lezije sa srednjom vrednosti površine 50.6 mm² (opseg 11.8-753.6 mm²) imale su 33-66% pozitivnih ćelija, KIN lezije sa srednjom vrednošću površine 70.7 mm² (11.8-961.6 mm²) manje od 33% pozitivnih ćelija, a KIN lezije sa najvećom vrednošću srednje površine 117.8 mm² (opseg 15.7-1059.8 mm²) više od 66% MCM5 pozitivnih ćelija (Grafikon 4.2.3.7.)

Grafikon 4.2.3.7. Odnos obima ekspresije MCM5 prema površini KIN



Upotrebom Kruskal-Wallis testa utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** između grupa sa manje od 33%, 33-66% i više od 66% MCM5 pozitivnih ćelija u odnosu na površinu KIN lezija (p<0.001).

Upotrebom Mann-Whitney testa i daljim poređenjem grupa sa manje od 33% i grupe 33-66% MCM5 pozitivnih ćelija (p=0.965) nije utvrđena statistički značajna razlika. Za razliku od toga, između grupa sa manje od 33% i više od 66% pozitivnih ćelija (p=0.002), kao i grupe 33-66% i grupe sa više od 66% pozitivnih ćelija (p<0.001), razlika je bila **visoko statistički značajna**.

Kada su grupisane in situ lezije, koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2), lezije srednje površine 75.36 mm² (opseg 15.7-981.3 mm²) imale su više od 66% MCM5 pozitivnih ćelija, lezije srednje vrednosti površine 50.63 mm² (opseg 11.8-753.6 mm²) između 33-66% pozitivnih ćelija, dok su KIN1+KIN2 lezije, srednje vrednosti površine 70.65 mm² (opseg 11.8-961.6 mm²) imale manje od 33% pozitivnih ćelija.

Upotrebom Kruskal-Wallis testa nije utvrđena statistički značajna razlika među grupama sa manje od 33%, 33-66% i više od 66% pozitivnih ćelija u odnosu na površinu

KIN1+KIN2, in situ lezija ne zahvataju čitavu debljinu epiderma ($p=0.990$). Daljim međugrupnim poređenjem, a uporebom Mann-Whitney testa, između KIN1+KIN2 lezija sa manje od 33% i 33-66% ($p=0.929$), grupa sa manje od 33% i više od 66% ($p=0.791$), kao i grupa sa 33-66% i više od 66% ($p=0.941$) takođe nije utvrđena statistički značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM5 u odnosu na površinu KIN1+KIN2.

U slučaju lezija koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3), promene srednje vrednosti površine, 99.02 mm^2 (opseg $37.68-288.9 \text{ mm}^2$) imale su između 33-66% MCM5 pozitivnih ćelija, dok je srednja vrednost površine KIN3 koji su imali više od 66% pozitivnih ćelija iznosila 189.97 mm^2 (opseg $23.6-1059.8 \text{ mm}^2$).

Upotrebom Mann-Whitney testa, među ovim grupama utvrđena je **statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM5 u odnosu na površinu KIN3 ($p=0.34$).

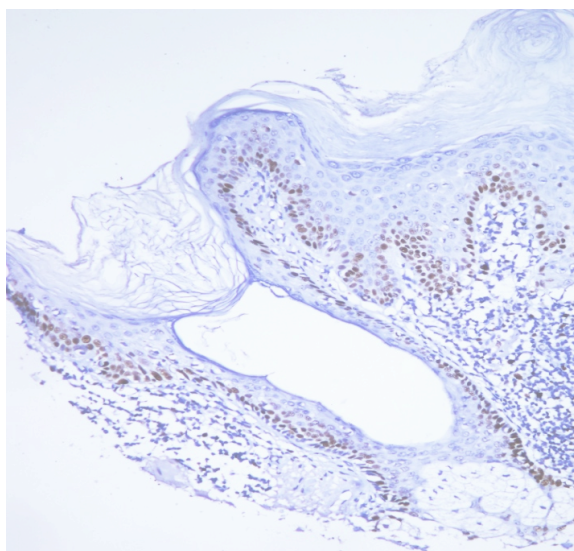
Nijedan od KIN 3 slučajeva nije imao manje od 33% MCM5 pozitivnih ćelija.

4.3. Ekspresija MCM7

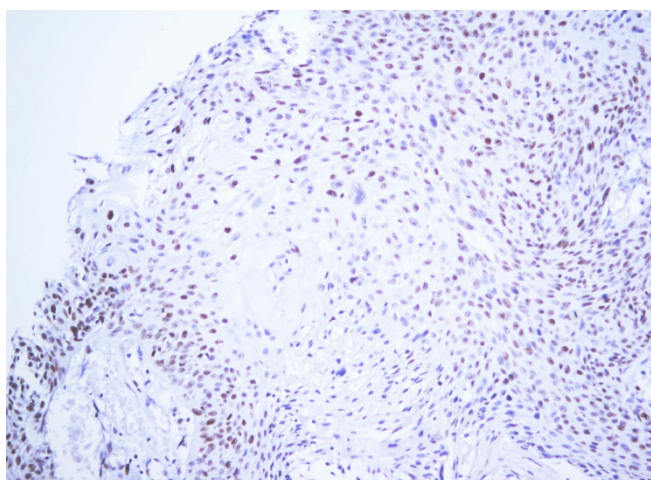
4.3.1. Distribucija

4.3.1.1 Distribucija MCM7 prema histopatološkoj dijagnozi

Najveći broj AK je imao bazalnu distribuciju (**Slika 4.3.1.1.a**) MCM7 pozitivnih ćelija, 63 slučaja (69.2%), potom difuznu 15 (16.5%), a najmanji broj suprabazalnu, 13 (14.3%). Najveći broj slučajeva BD je imao difuzni tip distribucije – 43 slučaja (86.0%). Preostali slučajevi imali su suprabazalnu 5 (10.0%), odnosno bazalnu 2 (4.0%) distribuciju pozitivnih ćelija. Kod SCC, bili su zastupljeni periferni - 91 slučaj (52.3%) i difuzni tip distribucije - 83 slučaja (47.7%) (**Slika 4.3.1.1.b**). Centralna distribucija nije bila uočena ni kod jednog SCC.



Slika 4.3.1.1.a Bazalna distribucija MCM7 kod aktinične keratoze



Slika 4.3.1.1.b Difuzna distribucija MCM7 kod planocelularnog karcinoma

Poređenjem distribucije proteina MCM7 prema histopatološkoj dijagnozi, upotrebljavajući χ^2 test, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u distribuciji ovog proteina između AK, BD i SCC ($p < 0.001$). Istim testom, takođe je utvrđena visoko statistički značajna razlika u MCM7 distribuciji između AK i BD, AK i SCC, kao i BD i SCC ($p < 0.001$)

Grupisanje svih slučajeva bez difuznog rasporeda ćelija u grupu ne-difuznih prikazano je u **Tabeli 4.3.1.1a**. Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** između AK, BD i SCC, kao i kada su međusobno upoređivane grupe AK:BD, AK:SCC, BD:SCC ($p < 0.001$).

Tabela 4.3.1.1a. Distribucija MCM7 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM7	UKUPNO	AK	BD	SCC
distribucija	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
difuzno	174 (55.2%)	15 (16.5%)	43 (86.0%)	83 (47.7%)
ne-difuzno	141 (44.8%)	76 (83.5%)	7 (14.0%)	91 (52.3%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Kada su slučajevi grupisani na intraepidermalne lezije (AK+BD) u odnosu na SCC, najveći broj intraepidermalnih promena pokazao je bazalnu 65 (46.1%), potom difuznu 58 (41.1%) distribuciju MCM7, dok je kod 18 lezija (12.8%) bila uočena suprabazalna distribucija. Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** između grupe AK+BD u odnosu na SCC ($p < 0.001$). Grupisanjem svih slučajeva bez difuznog rasporeda ćelija u grupu sa ne-difuznom distribucijom MCM7 (**Tabela 4.3.1.1b.**) i međusobnim upoređivanjem, upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji MCM7 između grupe intraepidermalnih lezija (AK+BD) i SCC ($p = 0.244$, $p > 0.05$)

Tabela 4.3.1.1b. Distribucija MCM7 proteina prema histopatološkoj dijagnozi, grupa intraepidermalnih promena u odnosu na SCC

MCM7	UKUPNO	AK i BD	SCC
distribucija	broj (%)	broj (%)	broj (%)
difuzno	174 (55.2%)	58 (41.1%)	83 (47.7%)
ne-difuzno	141 (44.8%)	83 (58.9%)	91 (52.3%)

4.3.1.2. Distribucija proteina MCM7 prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN)

Kada su lezije klasifikovane kao KIN, kod KIN1 i KIN2 lezija dominirala je bazalna distribucija, 41 (82.0%) KIN1, 22 (55.0%) KIN2), dok je kod KIN3 bila dominantna difuzna distribucija, uočena kod 45 slučajeva (88.2%) (**Slika 3-3**). Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna** razlika u distribuciji MCM7 između KIN1, KIN2 i KIN3 ($p < 0.001$). Kada su posebno upoređivane grupe KIN1:KIN2 ($p = 0.009$), KIN1:KIN3 i KIN2:KIN3 ($p < 0.001$), razlika u distribuciji MCM7 bila je takođe **visoko statistički značajna**.

Grupisanjem slučajeva ne-difuzne u odnosu na difuznu distribuciju MCM7, KIN1 i KIN2 lezije imale su dominantnije izraženu ne-difuznu distribuciju, u odnosu na KIN3 (Tabela 4.3.1.2.)

Tabela 4.3.1.2. Distribucija MCM7 proteina prema KIN

MCM7 distribucija	UKUPNO broj (%)	KIN1 broj (%)	KIN2 broj (%)	KIN3 broj (%)
difuzno	58 (41.1%)	3 (6.0%)	11 (25.5%)	44 (86.3%)
ne-difuzno	83 (58.9%)	47 (94.0%)	29 (72.5%)	7 (13.7%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, poređenjem slučajeva sa ne-difuznom i difuznom distribucijom, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u distribuciji MCM7 između KIN1, KIN2 i KIN 3 lezija ($p < 0.001$).

Poređenjem slučajeva sa ne-difuznom i difuznom distribucijom, pojedinačno među grupama KIN1:KIN2 ($p = 0.005$), KIN1:KIN3 i KIN2:KIN3 ($p < 0.001$), χ^2 testom, urazlika je, takođe, bila **visoko statistički značajna**.

Kada su poređene in situ lezije koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) najveći broj slučajeva KIN1+KIN2 grupe imao je bazalu distribuciju MCM7 pozitivnih ćelija, 22 (55.0%), a značajno manji difuznu, 11 (20.0%) i suprabazalnu, 7 (17.5%) . Najveći broj lezija koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) imao je difuznu distribuciju 45 (88.2%), a značajno manji suprabazalnu 5 (9.8%), dok je u samo u jednom slučaju bila uočena bazalna distribucija (2.0%). Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u distribuciji MCM7 između lezija koje ne zahvataju čitav epiderm (KIN1+KIN2) i koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) ($p < 0.001$). Grupisanjem na promene sa ne-difuznom i difuznom distribucijom kod većeg broja promena iz KIN1+KIN2 grupe 29 (72.5%) uočena je ne-difuzna distribucija, dok je veći broj KIN 3 lezija 44 (86.3%), obrnuto, imao izraženu difuznu distibuciju. Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je visoko statistički značajna razlika između ovih grupa ($p < 0.001$).

4.3.1.3. Distribucija MCM7 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC)

Nijedan SCC nije pokazao centralnu distribuciju. U SCC G1 distribucija MCM7 pozitivnih ćelija bila je dominantno periferna 53 (91,4); podjednak broj SCC G2 29 (50%) imao je difuznu i perifernu distribuciju, dok je značajno veći broj SCC G3, 49 (84.5%), imao difuznu distribuciju MCM7 pozitivnih ćelija (**Slika 3-4**).

Poređenjem distribucije MCM7 prema gradusu tumora, upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** između sve tri grupe SCC ($p < 0.001$), kao i kada su posebno poređeni SCC G1:G2, SCC G1:G3 i SCC G2:G3, čak i kada su poređene grupe SCC G1+G2 :SCC G3 ($p < 0.001$).

4.3.1.4. Distribucija MCM7 prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC)

SCC su prema dimenzijama bili podjeljeni u dve grupe: najvećeg prečnika do/jednako 20 mm i preko 20 mm. Periferni tip distribucije bio je zastupljeniji u lezijama do/jednako 20 mm, u 62 slučaja (56.4%), a difuzni kod SCC prečnika većeg od 20 mm, 35 (54.7%) slučajeva (**Tabela 4.3.1.4.**).

Tabela 4.3.1.4. Distribucija MCM7 proteina prema dimenzijama lezije

MCM7 distribucija	UKUPNO broj (%)	≤20 mm broj (%)	>20 mm broj (%)
difuzno	83 (47.7%)	48 (43.6%)	35 (54.7%)
periferno	91 (52.3%)	62 (56.4%)	29 (45.3%)

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika ($p=0.159$) u distribuciji MCM7 između lezija najvećeg prečnika do/jednako 20 mm i većih od 20 mm.

4.3.1.5. Distribucija MCM7 proteina prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC)

Svi SCC, bez obzira na gradus bili su, prema debljini, podjeljeni u tri grupe. Prva grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 2 mm, druga grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 4 mm i treća grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 6 mm.

U prvoj grupi, 13 od 20 SCC (65.0%) debljine do/jednako 2 mm imalo je perifernu distribuciju MCM7 pozitivnih ćelija. Od 154 tumora debljine preko 2 mm

gotovo isti broj slučajeva imao perifernu, 78 (50.6%) i difuznu 76 (49.4%) distribuciju (Tabela 4.3.1.5a.)

Tabela 4.3.1.5a. Distribucija MCM7 prema debljini SCC, prva grupa

MCM7 distribucija	UKUPNO broj (%)	≤2 mm broj (%)	>2 mm broj (%)
difuzno	83 (47.7%)	7 (35.0%)	76 (49.4%)
periferno	91 (52.3%)	13 (65.0%)	78 (50.6%)

χ^2 testom, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između ovako podjeljenih SCC ($p=0.227$).

U drugoj grupi, tumori debljine manje/jednako 4 mm imali su dominantnije perifernu distribuciju - 57 (67.1%), a tumori deblji od 4 mm difuznu - 55 (61.8%) (Tabela 4.3.1.5b.).

Tabela 4.3.1.5b. Distribucija MCM7 prema debljini SCC, druga grupa

MCM7 distribucija	UKUPNO broj (%)	≤4 mm broj (%)	>4 mm broj (%)
difuzno	83 (47.7%)	28 (32.9%)	55 (61.8%)
periferno	91 (52.3%)	57 (67.1%)	34 (38.2%)

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** između SCC različitih dimenzija ($p<0.001$).

U trećoj grupi, kod SCC debljine manje/jednako 6 mm češće je uočavana periferna distribucija, kod 77 (59.2%) slučajeva, za razliku od SCC debljih od 6 mm koji su u većem broju ispoljavali difuznu distribuciju MCM7 pozitivnih ćelija (Tabela 3.1.5c.). Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** između ovih SCC ($p=0.002$).

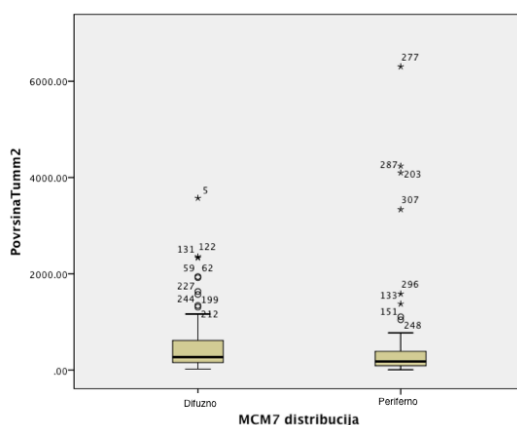
Tabela 4.3.1.5c. Distribucija MCM7 prema debljini SCC, treća grupa

MCM7 distribucija	UKUPNO broj (%)	≤6 mm broj (%)	>6 mm broj (%)
difuzno	83 (47.7%)	55 (40.8%)	30 (68.2%)
periferno	91 (52.3%)	77 (59.2%)	14 (31.8%)

4.3.1.6. Distribucija MCM7 proteina prema površini planocelularnog karcinoma (SCC)

Srednja vrednost površine SCC koji su imali difuznu distribuciju MCM7 iznosila je 266.90 mm² (raspon 18.8-3571.8 mm²), a SCC kod kojih je bila uočena periferna distribucija imali su srednju vrednost površine 175.84 mm² (raspon 4.71-6303.6 mm²). Upotrebom Mann-Whitney testa utvrđeno je da postoji **statistički značajna razlika** u distribuciji MCM7 prema površini tumora (p=0.008) (**Grafikon 4.3.1.6.**)

Grafikon 4.3.1.6. Distribucija MCM7 proteina prema površini SCC



4.3.1.7. Distribucija MCM7 proteina prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN)

Promene klasifikovane kao KIN, srednje vrednosti površine 53.38 mm² (raspon 11.8-981.3 mm²) imale su bazalnu distribuciju MCM7 pozitivnih ćelije, KIN lezije srednje vrednosti površine 80.86 mm² (raspon 31.4-494.6 mm²) suprabazalnu, a srednje vrednosti površine 111.47mm² (raspon 15.7-1059.8mm²) difuznu distribuciju.

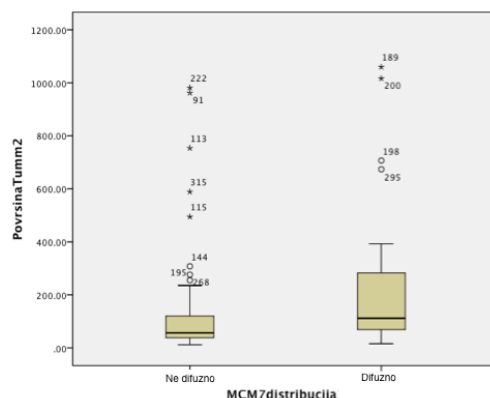
Korišćenjem Kruskal-Wallis testa utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u distribuciji MCM7 u odnosu na površinu KIN lezija (p=0.001).

Upotrebom Mann-Whitney testa, kada su porednjene grupe sa bazalnom i suprabazalnom distribucijom utvrđena je **statistički značajna razlika** (p=0.045) u distribuciji MCM7 pozitivnih ćelija, između grupa sa bazalnom i difuznom visoko statistički značajna razlika (p<0.001), dok između grupa sa suprabazalnom i difuznom distribucijom nije utvrđena statistički značajne razlike (p=0.372).

Kada su grupisani slučajevi sa ne-difuznom i difuznom distribucijom MCM7, u odnosu na površinu lezija klasifikovanih kao KIN, kod promena, srednje vrednosti površine 56.52 mm² (raspon 11.8-981.3 mm²) zastupljenija je bila ne-difuzna distribucija, a promene, srednje vrednosti površine 111.47 mm² (raspon 15.7-1059.8 mm²)

imale su difuznu distribuciju MCM7 pozitivnih ćelija. Upotrebom Mann-Whitney testa utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u distribuciji MCM7 u odnosu na površinu KIN ($p=0.001$) (**Grafikon 4.3.1.7.**)

Grafikon 4.3.1.7.Distribucija MCM7 proteina prema površini KIN



Kod grupisanih in situ lezija koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma, (KIN1+KIN2 grupa), promene sa srednjom vrednošću površine, 78.36 mm^2 (raspon $31.4-494.6 \text{ mm}^2$) imale su suprabazalnu distribuciju MCM7 pozitivnih ćelija. Srednja vrednost površine KIN1+KIN2 sa bazalnom - 51.81 mm^2 (raspon $11.8-981.25 \text{ mm}^2$), i difuznom distribucijom - 51.42 mm^2 (raspon $15.7-981.25 \text{ mm}^2$), bila je gotovo identična.

Upotrebom, Kruskal-Wallis testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji između ovih grupa ($p=0.188$), kao ni kada su posebno, međusobno poređene grupe sa bazalnom i suprabazalnom ($p=0.112$), bazalnom i difuznom ($p=0.603$), kao i suprabazalnom i difuznom distribucijom ($p=0.068$) MCM7, u odnosu na površinu KIN+KIN2 lezija, a upotrebom Mann-Whitney testa.

Grupisanjem na promena sa ne-difuznom i difuznom distribucijom, in situ promene koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) srednje vrednosti površine, 51.42 mm^2 (raspon $15.7-150.72 \text{ mm}^2$) imale su difuznu, a slučajevi srednje vrednosti površine 55.74 mm^2 (raspon $11.8-981.25 \text{ mm}^2$) ne-difuznu distribuciju MCM7.

Upotrebom Mann-Whitney testa nije utvrđena statistički značajna razlika između ovih grupa ($p=0.410$).

Kod promena koje se nalaze čitavom debljinom epiderma, KIN3, slučajevi srednje vrednosti površine 164.85 mm^2 (opseg $43.9-307.7 \text{ mm}^2$) imali su suprabazalnu distribuciju MCM7 pozitivnih ćelija, a srednja vrednost površine bila je 193.11 mm^2 (opseg $23.6-1059.75 \text{ mm}^2$) kod slučajeva koji su imali difuznu distribuciju MCM7 pozitivnih ćelija.

Grupisanjem na slučajeve sa ne-difuznom i difuznom distribucijom, kod promena koje se nalaze čitavom debljinom epiderma, KIN3, slučajevi srednje vrednosti površine 150.72 mm² (opseg 37.7-307.72 mm²) imali su ne-difuznu, a slučajevi srednje vrednosti površine 193.11mm² (opseg 23.55-1059.8mm²) difuznu MCM7 distribuciju. Upotrebom Mann-Whitney testa, uvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u difuznoj i ne-difuznoj distribuciji MCM7 u odnosu na površinu KIN3 (p=0.189).

4.3.2. Obim ekspresije (semikvantitativno, do i preko 50% pozitivnih ćelija)

4.3.2.1. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

Veći broj AK 54 (59.3%) imao je manje od 50% MCM7 pozitivnih ćelija. Skoro svi slučajevi BD imali su više od 50% pozitivnih ćelija - 49 (98.0%), a samo je jedan slučaj imao manje od 50%. Kod SCC, skoro podjednak broj slučajeva imao je manje i više od 50% pozitivnih ćelija. Obim ekspresije u odnosu na histopatološki tip lezije prikazan je u **Tabeli 4.3.2.1a**.

Tabela 4.3.2.1a. Obim ekspresije MCM7 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM7	UKUPNO	AK	BD	SCC
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	140 (44.4%)	54 (59.3%)	1 (2.0%)	85 (48.9%)
Više od 50%	175 (55.6%)	37 (40.7%)	49 (98.0%)	89 (51.1%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM7 između AK, BD i SCC (p<0.001), kao i poređenjem AK:BD, BD:SCC (p<0.001). Poređenjam AK:SCC nije utvrđena statistički značajna razlika (p=0.104).

Grupisanjem slučajeva intraepidermalnih lezija (AK i BD), u odnosu na SCC u oba slučaja veći broj lezija imao više je od 50% pozitivnih ćelija (**Tabela 4.3.2.1b**).

Tabela 4.3.2.1b. Obim ekspresije MCM7 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM7	UKUPNO	AK+BD	SCC
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	140 (44.4%)	55 (39.0%)	85 (48.9%)
Više od 50%	175 (55.6%)	86 (61.0%)	89 (51.1%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji MCM7 pozitivnih ćelija između grupe intraepidermalnih lezija i SCC (p=0.080).

4.3.2.2 Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN)

Veći broj KIN1 slučajeva 33 (66.0%) imao je manje od 50% MCM7 pozitivnih ćelija. U slučaju KIN2, neznatno veći broj slučajeva 21 (52.6%) je imao manje od 50% pozitivnih ćelija, dok je kod KIN3 značajno veći broj slučajeva 50 (98.0%) imao je više od 50% pozitivnih ćelija. (Tabela 4.3.2.2a.)

Tabela 4.3.2.2a. Obim ekspresije MCM7 proteina prema KIN

MCM7	UKUPNO	KIN1	KIN2	KIN3
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	55 (39.0%)	33 (66.0%)	21 (52.5%)	1 (2.0%)
Više od 50%	86 (61.0%)	17 (34.0%)	19 (47.5%)	50 (98.0%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM7 između KIN grupa (p<0.001). Međugrupnim poređenjem KIN1:KIN2 (p=0.194) nije utvrđena statistički značajna razlika, ali je između KIN1:KIN3 KIN2:KIN3, istim testom, utvrđena visoko statistički značajna razlika (p<0.001).

Grupisanjem in situ lezija koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2), veći broj 54 (60.0%) je imao manje od 50% pozitivnih ćelija, za razliku od lezija koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) gde je značajno veći broj slučajeva - 50 (98.0%) imao više od 50% pozitivnih ćelija (Tabela 4.3.2.2b).

Tabela 4.3.2.2b. Obim ekspresije MCM7 proteina prema KIN

MCM7	UKUPNO	KIN1+KIN2	KIN3
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	55 (39.0%)	54 (60.0%)	1 (2.0%)
Više od 50%	86 (61.0%)	36 (40.0%)	50 (98.0%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM7, poređenjem in situ lezija koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) u odnosu na lezije koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) ($p < 0.001$).

4.3.2.3. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC)

Slučajevi SCC, podeljeni prema histopatološkom gradusu, razvrstani na one koji su imali do 50% i više od 50% MCM7 pozitivnih ćelija dati su u **Tabeli 4.3.2.3.**

Tabela 4.3.2.3. Obim ekspresije MCM7 proteina prema gradusu SCC

MCM7	UKUPNO	SCC Gradus1	SCC Gradus 2	SCC gradus 3
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	85 (48.9%)	50 (86.2%)	26 (44.8%)	9 (15.5%)
Više od 50%	89 (51.1%)	8 (13.8%)	32 (55.2%)	49 (84.5%)

Skraćenice: SCC – planocelularni karcinom

Primenom χ^2 testa utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM7 kod SCC različitih gradusa, među grupama SCC G1, SCC G2 i SCC G3 ($p < 0.001$). Kada su međusobno poređeni SCC G1:G2, SCC G1:G3 ($p < 0.001$), SCC G2:G3 ($p = 0.001$), kao i kada su poređeni SCC G1+G2:SCC G3 razlika u ekspresiji MCM7 bila je visoko statistički značajna ($p < 0.001$).

4.3.2.4. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema dimenzijama SCC

Veći broj SCC prečnika manje/jednako 20 mm i preko 20 mm imalo je više od 50% MCM7 pozitivnih ćelija (**Tabela 4.3.2.4.**). Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena

statistički značajna razlika u obimu ekspresije MCM7 proteina između tumora dimenzija do 20 mm i većih od 20 mm (p=0.305).

Tabela 4.3.2.4. Obim ekspresije MCM7 prema dimenzijama lezije

MCM7	UKUPNO	≤20 mm	>20 mm
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	85 (48.9%)	57 (51.8%)	28 (43.8%)
Više od 50%	89 (51.1%)	53 (48.2%)	36 (56.2%)

4.3.2.5. Odnos obima ekspresije MCM7 prema debljini SCC

Kod procene obima ekspresije MCM7 prema debljini SCC, tumori su bili podjeljeni u tri grupe. Prva grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 2 mm, druga grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 4 mm i treća grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 6 mm.

Tumori debljine manje/jednako od 2 mm imali su jednak broj slučajeva sa manje i više od 50% pozitivnih slučajeva (**Tabela 4.3.2.5a.**).

Tabela 4.3.2.5a. Obim ekspresije MCM7 prema debljini SCC, prva grupa

MCM7	UKUPNO	≤2 mm	>2 mm
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	85 (48.9%)	10 (50.0%)	75 (48.7%)
Više od 50%	89 (51.1%)	10 (50.0%)	79 (51.3%)

Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u obimu ekspresije MCM7 između SCC debljine manje/jednako 2 mm i preko 2 mm (p=0.913).

U slučaju SCC debljine manje/jednako i više od 4mm vrednosti su date u **Tabeli 4.3.2.5b.**

Tabela 4.3.2.5b. Obim ekspresije MCM7 prema debljini SCC, druga grupa

MCM7	UKUPNO	≤4 mm	>4 mm
obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 50%	85 (48.9%)	52 (61.2%)	33 (37.0%)
Više od 50%	89 (51.1%)	33 (38.8%)	56 (62.9%)

Primenom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM7 između tumora ovih dimenzija (p=0.001).

U trećem slučaju SCC koji bili podjeljeni na one čija je debljina bila manja/jednaka ili veća od 6 mm (Tabela 4.3.2.5c.), upotrebom χ^2 testa, takođe je utvrđena visoko statistički značajna razlika u obimu ekspresije MCM7 između SCC. (p=0.009).

Tabela 4.3.2.5c. Obim ekspresije MCM7 prema debljini SCC, druga grupa

MCM7 obim ekspresije	UKUPNO broj (%)	≤6 mm broj (%)	>6 mm broj (%)
Manje od 50%	85 (48.9%)	71 (54.6%)	14 (31.8%)
Više od 50%	89 (51.1%)	59 (45.4%)	30 (68.2%)

4.3.2.6. Odnos obima ekspresije MCM7 prema površini planocelularnog karcinoma (SCC)

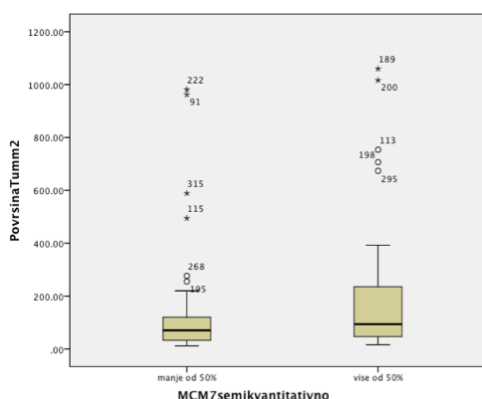
SCC prosečne vrednosti površine 176.63 mm² (opseg 4.71-6303.6 mm) imali su manje od 50% pozitivnih ćelija i obrnuto, SCC prosečne vrednosti površine 251.2 mm² (opseg 18.8-3571.8 mm²) više od 50% MCM7 pozitivnih ćelija.

Primenom Mann-Whitney testa nije utvrđena statistički značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM7 u odnosu na površinu SCC (p=0.069).

4.3.2.7. Odnos obima ekspresije MCM7 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN)

Promene klasifikovane kao KIN, srednje vrednosti površine 70.65 mm² (opseg 11.8-981.6 mm²) u većem broju slučajeva imale su manje od 50% MCM7 pozitivnih ćelija, a pomene srednje vrednosti površine 93.8 mm² (opseg 15.7-1059.8mm²) više od 50% (Grafikon 4.3.2.7.).

Grafikon 4.3.2.7. Odnos obima ekspresije MCM7 prema površini KIN



Upotrebom Mann-Whitney testa utvrđena je **statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM7 u odnosu na površinu KIN ($p=0.020$).

Kod grupisanih in situ lezija koje ne zahvataju čitavu debljinu epiderma, (KIN1+KIN2 grupa), promene sa manje od 50% pozitivnih ćelija imale su srednju vrednost površine 69.87 mm^2 (raspon $11.8-981.25 \text{ mm}^2$), a slučajevi sa više od 50% pozitivnih ćelija, srednju vrednost površine 49.85 mm^2 (raspon $15.7-753.6 \text{ mm}^2$).

Primenom Mann-Whitney testa nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji MCM7 u odnosu na površinu KIN1+KIN2 ($p=0.561$).

U slučaju lezija, koje se nalaze čitavom debljinom epiderma, KIN3, nije bilo nijednog slučaja sa manje od 50% pozitivnih ćelija. Srednja vrednost površine ostalih slučajeva (više od 50% pozitivnih ćelija), iznosila je 178.9 mm^2 ($23.6-1059.8 \text{ mm}^2$).

4.3.2. Obim ekspresije (semikvantitativno, manje od 33%, od 33-66% i preko 66% pozitivnih ćelija)

4.3.2.1. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

Najveći broj AK - 70 (76.9%) imao je između 33-66% MCM7 pozitivnih ćelija. U slučaju BD najveći broj imao je više od 66% pozitivnih ćelija 44 (88.0%), ali nije bilo slučajeva sa manje od 33% pozitivnih ćelija. Najveći broj SCC imao je između 33-66% MCM7 pozitivnih ćelija. Obim ekspresije u odnosu na histopatološki tip lezije prikazan je u Tabeli 4.3.2.1a.

Tabela 4.3.2.1a. Obim ekspresije MCM7 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM7	UKUPNO	AK	BD	SCC
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	54 (17.1%)	7 (7.7%)	0	47 (27.0%)
Od 33-66%	152 (48.3%)	70 (76.9%)	6 (12.0%)	76 (43.7%)
Više od 66%	109 (34.6%)	14 (15.4%)	44 (88.0%)	51 (29.3%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM7 između AK, BD i SCC ($p < 0.001$). Takođe upotrebom χ^2 testa, a poređenjem svake od grupa pojedinačno, AK:BD AK:SCC i BD:SCC, utvrđena je visoko statistički značajna razlika u ekspresiji MCM7 ($p < 0.001$).

Grupisanjem intraepidermalnih lezija (AK i BD), u odnosu na SCC, najviše slučajeva u obe grupe imalo - identičan broj 76 (53.9%), ima je od 33 do 66% MCM7 pozitivnih ćelija. Obim ekspresije u odnosu na histopatološki tip lezije prikazan je u **Tabeli 4.3.2.1b.**

Tabela 4.3.2.1b. Obim ekspresije MCM7 proteina prema histopatološkoj dijagnozi

MCM7	UKUPNO	AK+BD	SCC
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	54 (17.1%)	7 (5.0%)	47 (27.0%)
Od 33-66%	152 (48.3%)	76 (53.9%)	76 (53.9%)
Više od 66%	109 (34.6%)	58 (41.1%)	51 (29.3%)

Skraćenice: AK – aktinična keratoza, BD – Bowen-ova bolest, SCC – planocelularni karcinom

Upotrebom χ^2 testa, utvrđeno je da postoji visoko statistički značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM7 pozitivnih ćelija između grupe intraepidermalnih lezija i SCC ($p < 0.001$).

4.3.2.2. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji (KIN)

Najveći broj KIN1 45 (90.0%) i KIN2 slučajeva 25 (62.5%) imao je od 33-66% MCM7 pozitivnih ćelija. U slučaju KIN3, najveći broj 45 (88.2%) imao je više od 66% pozitivnih ćelija, bez ijednog slučaja sa manje od 33% (**Tabela 4.3.2.2.**)

Tabela 4.3.2.2a. Obim ekspresije MCM7 proteina prema KIN

MCM7	UKUPNO	KIN1	KIN2	KIN3
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	7 (5.0%)	2 (4.0%)	5 (12.5%)	0 (0.0%)
Od 33-66%	76 (53.9%)	45 (90.0%)	25 (62.5%)	6 (11.8%)
Više od 66%	58 (41.1%)	3 (6.0%)	10 (25.0%)	45 (88.2%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** između KIN grupa ($p < 0.001$), kao i međugrupnim poređenjem KIN1:KIN2, KIN1:KIN3, KIN2:KIN3 ($p < 0.001$).

Kada su grupisane in situ lezije koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) najveći broj slučajeva KIN1+KIN2 grupe 70 (77.8%) imao je između 33-66% pozitivnih ćelija (**Tabela 4.3.2.2b.**)

Tabela 4.3.2.2b. Obim ekspresije MCM7 proteina prema KIN

MCM7	UKUPNO	KIN1+KIN2	KIN3
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	7 (5.0%)	7 (7.8%)	0 (0%)
Od 33-66%	76 (53.9%)	70 (77.8%)	6 (11.8%)
Više od 66%	58 (41.1%)	13 (14.4%)	45 (88.2%)

Skraćenice: KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM7 između lezija koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2) u odnosu na lezije koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3) ($p < 0.001$).

4.3.2.3. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema stepenu diferentovanosti (gradusu) planocelularnog karcinoma (SCC)

Kod SCC različitih gradusa, broj slučajeva sa većim brojem pozitivnih ćelija rastao je sa povećanjem gradusa. Najveći broj SCC G1 38 (65.5%) imao je manje od 33% pozitivnih ćelija, najveći broj SCC G2 38 (65.5%) između 33-66% pozitivnih ćelija, dok je najveći broj SCC G3 36 (62.1%) imao preko 66% MCM7 pozitivnih ćelija (**Tabela 4.3.2.3.**).

Tabela 4.3.2.3. Obim ekspresije MCM7 proteina prema gradusu SCC

MCM7	UKUPNO	SCC Gradus1	SCC Gradus 2	SCC gradus 3
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	47 (27.0%)	38 (65.5%)	7 (12.1%)	2 (3.4%)
Od 33-66%	76 (43.7%)	18 (31.0%)	38 (65.5%)	20 (34.5%)
Više od 66%	51 (29.3%)	2 (3.4%)	13 (22.4%)	36 (62.1%)

Skraćenice: SCC – planocelularni karcinom

Primenom χ^2 testa utvrđeno je da postoji **visoko statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM7 u odnosu na gradus, a među grupama SCC G1, SCC G2 i SCC G3 ($p < 0.001$), kao i pojedinačnim poređenjem SCC G1:G2, SCC G1:SG3 i SCC G2:G3 ($p < 0.001$). Takođe, kada su poređene grupe SCC G1+G2:SCC G3, upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM7 ($p < 0.001$).

4.3.2.4. Odnos obima ekspresije MCM7 proteina prema dimenzijama planocelularnog karcinoma (SCC)

Obe grupe SCC, prečnika manje/jednako i više od 20 mm, imali su najveći broj slučajeva sa 33-66% MCM7 pozitivnih ćelija (**Tabela 4.3.2.4.**).

Tabela 4.3.2.4. Obim ekspresije MCM7 prema dimenzijama lezije

MCM7	UKUPNO	≤20 mm	>20 mm
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	47 (27.0%)	32 (29.1%)	15 (23.4%)
Od 33-66%	76 (43.7%)	49 (44.5%)	27 (42.2%)
Više od 66%	51 (29.3%)	29 (26.4%)	22 (34.4%)

Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM7 proteina između SCC ove dve grupe ($p=0.493$).

4.3.2.5. Odnos obima ekspresije MCM7 prema debljini planocelularnog karcinoma (SCC)

Kod procene ovog obima ekspresije MCM7, SCC su, prema debljini, bili podeljeni u tri grupe. Prva grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 2 mm, druga grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 4 mm i treća grupa: SCC debljine manje/jednako i više od 6 mm.

Jednak broj tumora prve grupe imao je manje od 33% i između 33-66% MCM7 pozitivnih ćelija. Najveći broj SCC druge grupe imao je 33-66% pozitivnih ćelija (**Tabela 4.3.2.5a.**).

Tabela 4.3.2.5a. Obim ekspresije MCM7 prema debljini SCC, prva grupa

MCM7	UKUPNO	≤2 mm	>2 mm
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	47 (27.0%)	8 (40.0%)	39 (6.6%)
Od 33-66%	76 (43.7%)	8 (40.0%)	68 (44.2%)
Više od 66%	51 (29.3%)	4 (20.0%)	47 (30.5%)

Upotrebom χ^2 testa, nije utvrđena statistički značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM7 između SCC debljine manje/jednako 2 mm i preko 2 mm ($p=0.341$).

Za SCC debljine manje/jednako i više od 4 mm vrednosti su date u **Tabeli 4.3.2.5b.**

Tabela 4.3.2.5b. Obim ekspresije MCM7 prema debljini SCC, druga grupa

MCM7	UKUPNO	≤4 mm	>4 mm
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	47 (27.0%)	30 (35.3%)	17 (19.1%)
Od 33-66%	76 (43.7%)	40 (47.1%)	36 (40.4%)
Više od 66%	15 (29.3%)	15 (17.6%)	36 (40.4%)

I u ovom slučaju, primenom χ^2 testa, poređenjem ove dve grupe SCC utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ekspresiji MCM7 ($p=0.002$).

Takođe, i u trećem slučaju, SCC koji su, prema debljini, bili podeljeni manje/jednako ili više od 6 mm (**Tabela 4.3.2.5c.**), upotrebom χ^2 testa, utvrđena je **statistički značajna razlika** u obimu ekspresije MCM7 ($p=0.036$).

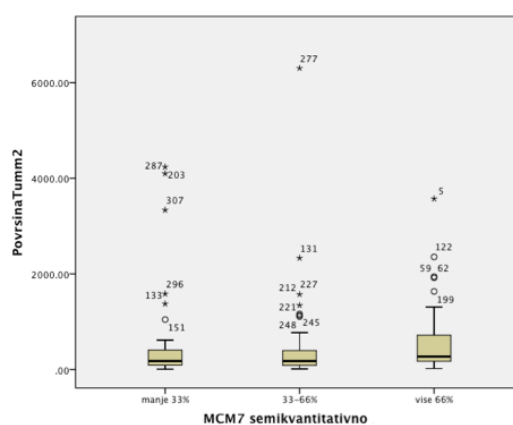
Tabela 4.3.2.5c. Obim ekspresije MCM7 prema debljini SCC, druga grupa

MCM7	UKUPNO	≤6 mm	>6 mm
Obim ekspresije	broj (%)	broj (%)	broj (%)
Manje od 33%	47 (27.0%)	41 (31.5%)	6 (13.6%)
Od 33-66%	76 (43.7%)	56 (43.1%)	20 (45.5%)
Više od 66%	51 (29.3%)	33 (25.4%)	18 (40.9%)

4.3.2.6. Odnos obima ekspresije MCM7 prema površini planocelularnog karcinoma (SCC)

Prosečna vrednost površine SCC sa manje od 33% pozitivnih ćelija iznosila je 176.62 mm² (opseg 4.7-4239.0 mm²), SCC sa 33-66% pozitivnih ćelija 176.63 mm² (opseg 12.56-6303.55 mm²), dok su SCC najveće srednje vrednosti površine 268.47 mm² (19.6-3571.8 mm²) imali više od 66% MCM7 pozitivnih ćelija (**Grafikon 4.3.2.6.**).

Grafikon 4.3.2.6. Odnos obima ekspresije MCM7 prema površini SCC



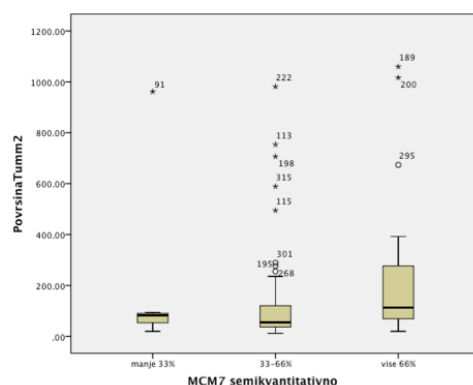
Primenom Kruskal-Wallis testa utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** u ovom obimu ekspresije MCM7 u odnosu na površinu SCC (p=0.009).

Upotrebom Mann-Whitney testa i daljim poređenjem grupe sa manje od 33% i grupe više od 66% pozitivnih ćelija (p=0.010) uvrđena je **statistički značajna razlika**. Između grupa 33-66% i više od 66% pozitivnih ćelija razlika je bila **visoko statistički značajna** (p=0.005). Jedino poređenjem grupa manje od 33% i 33-66% MCM7 pozitivnih ćelija (p=0.992) nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji MCM7 u odnosu na površinu SCC.

4.3.2.7. Odnos obima ekspresije MCM7 prema površini keratinocitne intraepidermalne neoplazije (KIN)

KIN lezije sa srednjom vrednosti površine 54.95 mm² (opseg 11.8-981.25 mm²) imale su 33-66% pozitivnih ćelija, KIN lezije sa srednjom vrednošću površine 82.43 mm² (19.63-961.6 mm²) manje od 33% pozitivnih ćelija, a KIN lezije sa najvećom vrednošću srednje površine 113.04 mm² (opseg 19.6-1059.8 mm²) više od 66% MCM7 pozitivnih ćelija (**Grafikon 4.3.2.7.**).

Grafikon 4.3.2.7. Odnos obima ekspresije MCM7 prema površini KIN



Upotrebom Kruskal-Wallis testa utvrđena je **visoko statistički značajna razlika** među grupama sa manje od 33%, 33-66% i više od 66% MCM7 pozitivnih ćelija u odnosu na površinu KIN lezija ($p < 0.001$).

Upotrebom Mann-Whitney testa i daljim međugrupnim poređenjem: grupa sa manje od 33% i 33-66% ($p = 0.676$) i manje od 33% i više od 66% ($p = 0.169$) MCM7 pozitivnih ćelija, nije utvrđena statistički značajna razlika. Za razliku od toga, poređenjem grupe 33-66% i više od 66% pozitivnih ćelija razlika je bila visoko statistički značajna ($p < 0.001$).

Kada su grupisane in situ lezije, koje ne zahvataju celu debljinu epiderma (KIN1+KIN2), lezije srednje površine 82.43 mm^2 (opseg $19.6-961.6 \text{ mm}^2$) imale su manje od 33% MCM7 pozitivnih ćelija, lezije najmanje vrednosti srednje površine 53.38 mm^2 (opseg $11.8-981.25 \text{ mm}^2$) između 33-66% pozitivnih ćelija, dok su KIN1+KIN2 lezije, srednje vrednosti površine 58.88 mm^2 (opseg $19.63-150.72 \text{ mm}^2$) imale više od 66% pozitivnih ćelija.

Upotrebom Kruskal-Wallis testa nije utvrđena statistički značajna razlika između grupa sa manje od 33%, 33-66% i više od 66% pozitivnih ćelija u odnosu na površinu (KIN1+KIN2), in situ lezija koje ne zahvataju celu debljinu epiderma ($p = 0.839$). Daljim međugrupnim poređenjem, a upotrebom Mann-Whitney testa, između KIN1+KIN2 lezija sa manje od 33% i 33-66% ($p = 0.601$), grupa sa manje od 33% i više od 66% ($p = 0.757$), kao i grupa sa 33-66% i više od 66% ($p = 0.726$) takođe nije utvrđena statistički značajna razlika.

U slučaju lezija koje se nalaze čitavom debljinom epiderma (KIN3), promene manje srednje vrednosti površine, 114.61 mm^2 (opseg $37.68-706.5 \text{ mm}^2$) imale su između

33-66% MCM2 pozitivnih ćelija, dok je srednja vrednost površine KIN3 koji su imali više od 66% pozitivnih ćelija iznosila 188.40 mm² (opseg 23.6-1059.8 mm²).

Upotrebom Mann-Whitney testa, među ovim grupama nije utvrđena statistički značajna razlika u ovom obimu ekspesije MCM7 u odnosu na površinu KIN3 (p=0.502).

4.4. Automatsko brojanje ćelija

U **Tabeli 4.4.1 i 4.4.2** prikazani su uporedni rezultati manuelnog i automatskog brojanja ćelija, kao i numerička i procentualna razlika između ove dve metode za svaku analiziranu sliku.

Tabela 4.4.1. Rezultati ručnog i automatskog brojanja ćelija kod SCC

MCM protein i SCC gradus	Ručno	Automatski	Razlika+	Procenat
MCM2-G3	1299	992	307	23.7
MCM2-G3	592	556	36	6.1
MCM2-G1	395	335	60	15.2
MCM2-G3	1078	1004	74	6.9
MCM2-G1	132	145	-13	9.9
MCM2-G3	1298	1361	-63	4.9
MCM2-G3	1091	1105	-14	1.3
MCM2-G3	915	1214	-299	32.7
MCM2-G3	430	482	-52	12.1
MCM2-G1	440	489	-49	11.1
MCM2-G2	389	393	-4	1
MCM5-G3	818	784	34	4.2
MCM5-G3	419	442	-23	5.5
MCM5-G3	225	366	-141	62.7
MCM5-G1	362	317	45	12.4
MCM5-G3	456	524	-68	14.9
MCM5-G1	139	131	8	5.8
MCM5-G3	406	506	-100	24.6
MCM5-G3	413	478	-65	15.7
MCM5-G3	797	1061	-264	33.1
MCM5-G3	374	358	16	4.3
MCM5-G1	626	548	78	12.5
MCM5-G2	323	307	16	5
MCM7-G3	896	862	34	3.8
MCM7-G3	382	394	-12	3.1
MCM7-G3	381	347	34	8.9
MCM7-G3	129	190	-61	47.3
MCM7-G1	245	247	-2	0.8
MCM7-G3	444	445	-1	0.2
MCM7-G1	84	84	0	0
MCM7-G3	497	761	-264	53.1
MCM7-G3	512	514	-2	0.4
MCM7-G3	823	1091	-268	32.6
MCM7-G3	287	374	-87	30.3
MCM7-G1	346	324	22	6.4
MCM7-G2	257	284	-27	10.5

Skraćenice: SCC planocelularni karcinima, G1: dobro diferentovan; G2: srednje diferentovan; G3: slabo diferentova

Tabela 4.42. Rezultati ručnog i automatskog brojanja ćelija kod AK

MCM protein i KIN	Ručno+	Automatski	Razlika	Procenat
MCM2-KIN2	433	573	-140	32.3
MCM2-KIN2	135	136	-1	0.7
MCM2-KIN2	437	542	-105	24
MCM2-KIN2	586	584	2	0.3
MCM2-KIN2	190	223	-33	17.4
MCM2-KIN2	630	629	1	0.2
MCM2-KIN2	292	259	33	11.3
MCM2-KIN2	321	374	53	16.5
MCM2-KIN2	484	491	-7	1.4
MCM2-KIN2	706	715	-9	1.3
MCM2-KIN1	126	102	24	19
MCM2-KIN1	87	104	-17	19.5
MCM5-KIN2	611	717	-106	17.3
MCM5-KIN2	392	417	-25	6.4
MCM5-KIN2	547	421	126	23
MCM5-KIN2	183	206	-23	12.6
MCM5-KIN2	615	601	14	2.3
MCM5-KIN2	427	254	173	40.5
MCM5-KIN2	454	441	13	2.9
MCM5-KIN2	687	832	-145	21.1
MCM5-KIN1	123	97	26	21.1
MCM5-1KIN1	96	79	17	17.7
MCM7-KIN2	93	172	-79	85
MCM7-KIN2	163	172	-9	5.5
MCM7-KIN2	353	393	-40	11.3
MCM7-KIN2	480	481	-1	0.2
MCM7-KIN2	173	211	-38	22
MCM7-KIN2	576	622	-46	8
MCM7-KIN2	325	266	59	18.2
MCM7-KIN2	409	404	5	1.2
MCM7-KIN2	599	618	-19	3.2
MCM7-KIN2	507	550	-43	8.5
MCM7-KIN1	134	124	10	7.5
MCM7-KIN1	107	102	5	4.7

Skraćenice: KIN: keratinocitna intraepidermalna neoplazija

Metodom deskriptivne statistike utvrđena je minimalna vrednost (-84.95 za AK i - 797.62 za SCC), maksimalna vrednost (40.52 za AK i 23.63 za SCC), srednja vrednost (-4.25 za AK i -30.29 za SCC), SD (21.15 za AK i 133.02 za SCC). Koeficijent varijacije (CV) kod

AK iznosio je 0.55 (55%) za manulano i 0.58 (58%) za automatko brojanje. Koeficijent varijacije kod SCC iznosio je 0.61 (61%) za manulano i 0.61 (60%) za automatko brojanje. Za određivanje statistički značajne razlike između automatskog i manuelnog brojanja korišćen je neparametarski test za zavisani uzorak Wilcoxon test ($p=0.201$ za AK, $p=0.136$ za SCC) kojim je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika između manuelnog i automatskog brojanja. Procenat odstupanja ili razlika određivan je kao razlika broja ručno i automatski određenih pozitivnih ćelija i broja ručno određenih MCM pozitivnih ćelija.

3. DISKUSIJA

Iako MCM proteini generalno spadaju u grupu nuklearnih proteina, njihova lokalizacija je promenljiva, a to je regulisano funkcijom CDKs (Sclafani i Hozen, 2007). MCM proteini bivaju uneti u nukleus tokom rane G1 faze, kada je aktivnost CDK minimalna, a dislocirani iz nukleusa tokom S faze, kada je aktivnost CDK intenzivna (Labib i Diffley, 2001, Truong i Wu, 2011, Wu i sar., 2012). Dakle, aktivnost MCM je bitna u replikaciji DNK ćelija koje se dele, a gubi se u ćelijama koje su u stanju mirovanja (Madine 2000). U tom smislu, povišen nivo MCM2-7 proteina ukazuje na manifestnu proliferaciju ćelija, kako malignih, tako i ćelija sa malignim potencijalom, tj. ćelija koje su u fazi maligne transformacije (Lei 2005). Superiornost proteina i njihova veća senzitivnost u odnosu na standardne proliferativne markere ogleda se u činjenici da njihova ekspresija postoji tokom čitavog ćelijskog ciklusa (Bell i Duta, 2002) i zato komponente MCM kompleksa mogu biti od značaja kao potencijalni markeri proliferacije displastičnih lezija i kancera (Abdou i sar, 2014), ali i potencijalni ciljni molekuli za naprednu anti-kancersku terapiju (Lei 2005).

U ovom radu ispitivana je nuklearna imunopozitivnost MCM2 u AK, BD i SCC. Svi slučajevi, svake od dijagnoza bili su pozitivni na bojenje MCM2 tj. dokazano je prisustvo MCM2 proteina u svim lezijama. Distribucija MCM2 pozitivnih ćelija bila je, u najvećem broju slučajeva AK – 62 (68.1%) bazalna, značajno, manje suprabazalna i difuzna; grupisanjem AK na promene sa difuznom i ostalim formama distribucije u grupu (ne-difuzno) upadljivo veći broj slučajeva 76 (83.5%) je imao ne-difuzno raspoređene MCM2 ćelije. Ovakav rezultat u potpunosti odslikava i potvrđuje histološke karakteristike AK gde su maligno transformisane ćelije ograničene na određeni deo debljine epiderma. Kod BD je dominirala difuzna distribucija MCM2 pozitivnih ćelija (45 slučajeva - 90.0%), što odgovara činjenici da je to zapravo SCC in situ, tj. lezija u kojoj se maligne ćelije nalaze čitavom debljinom epiderma.

Kod SCC, gotovo podjednako je bila zastupljena difuzna (86 slučajeva – 49.4%) i periferna (88 – 50.6%) distribucija ovog proteina. Podjednak broj SCC sa različitim vidovima distribucije (perifernom i difuznom distribucijom) može se objasniti različito diferentovanim tumorima koje je čitava grupa obuhvatala, i ide u prilog pretpostavci da se distribucijom ovog proliferativnog markera može razlikovati SCC prema toj morfološkoj karakteristici. Uvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji MCM2 proteina prema histopatološkoj dijagnozi, između AK, BD i SCC, kao i kada su grupisane samo intraepidermalne lezije u odnosu na SCC. Takođe razlika je bila značajna i kada su poređeni slučajevi sa ne-difuznom i difuznom distribucijom između AK, DB i SCC, čak i

kada su grupisane intreapidermalne lezije u odnosu na invazivne. Ovakav rezultat ukazuje da procena distribucije MCM2 može biti od koristi za razlikovanje keratinocitnih neoplazija raličitih histopatoloških karakteristika, tj. stepena zahvaćenosti epiderma, ali i invazivnih lezija, u slučaju kada morfološke karakteristike nisu u dovoljno jasne.

U radu Freeman i saradnika , kod kojih je ispitivana ekspresija MCM2 proteina u normalnoj koži (2 uzorka), psorijazi (3 slučaja), AK (1 slučaj), BD (5 slučajeva) i SCC (13 slučajeva), distribucija u normalnoj koži bila je ograničena na bazalni sloj, kod AK MCM2 pozitivne ćelije nalazile su se kod više od 50% epiderma, odnosno više od 90% epiderma kod BD (Freeman i sar.,1999). U studiji Abdou i saradnikaispitivana je nuklearna ekspresija MCM2 u normalnoj koži, lezijama psorijaze, keratoakantomima, seboroičnim keratozama, bazocelularnom karcinomu (BCC) i SCC (Abdou i sar., 2014). U slučaju SCC, ekspresija MCM2 bila je uglavnom na periferiji malignih gnezda - ukupan broj SCC bio značajno manji u odnosu na našu studiju, samo 21 SCC, a samo 10% slučajeva SCC bilo je slabodiferentovano. U morfološki normalnoj koži je MCM2 distribucija bila ograničena na bazalni sloj, gde su proliferativno aktivne ćelije. Kod psorijatičnih lezija MCM2 ekspresija je bila utvrđena u 100% slučajeva, ograničena na bazalni i suprabazalni sloj epiderma, dok kod ostalih tipova lezija distibucija nije ni bila navedena.

U slučaju drugih lezija u koži, deCarvalho i saradnici publikovali su slučaj melanoakantoma (MA), kod koga je uočena MCM2 pozitivnost, u bazalnom i suprabazalnom sloju, uz objašnjenje da je MCM2 kao marker proliferacije posledica akantotičnog fenomena kod MA, potvrđujući reaktivnu etiologiju lezije (das Chagas E Silva de Carvalho i sar., 2013).

S obzirom da nema drugih radova o ekspresiji MCM2 u koži sa kojim bi bilo moguće komparirati dobijene rezultate, najsličnija ćelijska struktura nalazi se u organima sa pločastoslojevitim epitelom.Chatrathi saradnici su procenjivali ekspresiju MCM2 u larinksu i to neizmenjenom epitelijumu larinksa (8), laringealnoj displaziji (10) i SCC (10). Ekpresija je određivana kvantitativno, određivanjem LI, kao procenat pozitivnih ćelija (nukleusa) u odnosu na ukupan broj ćelija (minimim 500). U skvamoznom epitelu neizmenjene mukoze larinksa, MCM2 espresija bila je ograničen na bazalni sloj, u lezijama atipične hiperplazije (niskog gradusa) na donju trećinu epiderma, a kod in situ lezija (visoki gradus), MCM2 pozitivne ćelije bile su eksprimovane čitavom debljinom epiderma (Chatrath i sar., 2006). Dakle, distribucija MCM2 pozitivnih ćelija se menjala, od striktno bazalne kod normalnog epitela, do difuzne kod in situ lezija, i bila je statistički

značajna, slično našem istraživanju, a ovakvi rezultati potvrđujući korisnost MCM2 kao markera proliferacije kod lezija poreklom od skvamocelularnog epitela. Slično, u radu Scarpini i saradnika ispitivana je ekspresija MCM2 u normalnom epitelu (3), analnoj intraepidermalnoj neoplaziji (AIN) (42) i analnom SCC (9). Pozitivnost je određivana kao LI, odnos pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija po slučaju (minimum 400). Distribucija je procenjena prema trećinama, superficijalni deo, srednja i bazalna trećina. Za svaki pojedinačni slučaj merena je epitelna debljina i podeljena na 3. Kako se manjao epitel od normalnog preko AIN, distribucija MCM2 se menjala od bazalnog, preko srednjih do superficialnih slojeva i bila značajno izraženija u gornjim, identično kao u našim rezultatima. Sa druge strane, kod SCC, gde je došlo do gubitka epitelne orijentacije, ekspresija bila je značajno veća, uniformno, analogno difuznom u našem slučaju. LI kod SCC bio je sličan kao u bazalnom i srednjem sloju AIN 2/3, ali veći nego u superficialnim slojevima AIN2/3. Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da je MCM2 obećavajući marker u poboljšanju detekcije AIN i SCC (Scarpini i sar., 2008).

U istraživanju Kodani i saradnika procenjena je ekspresija MCM2 u odnosu na kliničko patološke parametre oralnih SCC. U njihovim rezultatima, ekspresija ovog proteina bila je predominantno na periferiji tumorskih gnezda, a MCM2 ekspresija značajan parametar u prognozi kod pacijenata sa oralnim SCC (Kodani i sar., 2003).

Sa druge strane, u radu Gueiros i saradnika koji su ispitivali ekspresiju MCM2 u SCC jezika, rezultati su bili drugačiji u odnosu na naše. U njihovom slučaju, distribucija pozitivnih ćelija bila je uočena na periferiji i u centralnim partijama tumora, dok prema našim rezultatima nijedan SCC nije pokazao centralnu distribuciju pozitivnih ćelija (Gueiros i sar., 2011). Broj ispitivanih slučajeva bio značajno manji nego u našoj studiji (63 pacijenata), a distribucija iskazana u odnosu na celu grupu tumora bez analize u odnosu na stepen diferentovanosti SCC.

Ekspresija MCM2 tj. distribucija pozitivnih MCM2 ćelija procenjena je i u drugim organima, drugačije histološke građe. U radu Ananthanarayanan i saradnika koji su procenjivali MCM2 ekspresiju u tkivu prostate, takođe je uočen rastući trend pozitivnih ćelija, kao i u našoj studiji, ali u njihovom slučaju od normalnog tkiva, preko prostatične intraepitelijalne neoplazije (PIN) i kancera, sa promenom lokalizacije proliferativnih ćelija od bazalnog ka luminalnim slojevima. Takođe, u žlezdama bliže izmenjenom (kancerskom) tkivu uočena je veće ekspresija MCM2 u odnosu na udaljene žlezde i ovakav rezultat ukazuje na činjenicu izmenjena proliferacija može postojati ne samo kod pre-neoplastičnih lezija, već i kod normalnog epitela u neposrednoj blizini

tumorski izmenjenih ćelija, kao još jedan od dokaza da je MCM2 obećavajući marker za detekciju ćelija sa potencijalom za malignu transformaciju (Ananthanarayanan i sar., 2006).

U slučaju ostalih tumora, u studiji Ramnath i saradnika ispitivana je ekspresija MCM2 kod ne-sitnoćelijskih karcinoma pluća - NSCLC (adenokarcinoma, SCC, krupnoćelijskih karcinoma, adenoskvamoznih karcinoma i mešoviti NSCLC). Procenat pozitivnih ćelija procenjivan je i kategorizovan kao 1 (0-24% pozitivnih ćelija), 2 (25-49%), 3 (50-74%) i 4 (75-100% pozitivnih ćelija). Prema njihovim rezultatima, postojala je razlika u ekspresiji MCM2 u odnosu na histopatološki tip tumora. Kod adenokarcinoma je uočeno značajno manje pozitivnih ćelija, a razlika je bila statistički značana (Ramnath i sar., 2001). U radu Ayaru i saradnika ispitivana je ekspresija MCM2 proteina u normalnom, benignom i malignom biliarnom i pankreatičnom tkivu. Semikvantitativna determinacija obima ekspresije je izražena računanjem LI, kao procenat pozitivnih ćelija tj. broj pozitivnih ćelija u odnosu na minimum 200 epitelijalnih ćelija. U benignim biliarnim strukturama ekspresija je bila ograničena na bazalnu proliferativnu zonu, za razliku od malignih struktura (karcinom pankreasa, ampularni karcinom i holangiokarcinom), gde su se pozitivne ćelije nalazile u svim slojevima tkiva, analogno difuznom u našem slučaju (Ayar i sar., 2008). U studiji Meng i saradnika ispitivana je ekspresija MCM2 kod 92 pacijenta sa kancerom prostate. Ekspresija je bila niska i ograničena na bazalni sloj kod ne-malignih žlezda, dok je kod malignih bila povećana (Meng i sar., 2001).

Nalazi svih pomenutih studija idu u prilog činjenici da distribucija MCM2 markera može biti od značaja u IHH diferenciranju različitih tipova tumora. Sa druge strane, u radu Gray i saradnika ispitivana je ekspresija MCM2 proteina kod 107 kolorektalnih polipa sa idejom da bi ekspresija pomenutog proteina mogla da bude od koristi u diferenciranju rektalnih polipa sa abnormalnom proliferacijom (SAPA) u odnosu na tradicionalne hiperplastične polipe (HPP). Kod većine SPAP (59.0%) i HP (52.9%) uočena je ekspresija ograničena na atipičnu trećinu kripte. Razlika nije bila značajna uz zaključak da MCM2 imunohistohemijska analiza nema značaja u diferenciranju ove dve vrste polipa.

U slučaju kada su, u našoj studiji, lezije bile klasifikovane kao KIN, u prvoj grupi, kod KIN1, distribucija MCM2 pozitivnih ćelija bila je dominantno bazalna, uočena kod 40 (80.0%) slučajeva, različito od KIN2 i KIN 3 kod kojih je bila zastupljenija difuzna

distribucija. Takođe, uočeno je da je broj slučajeva KIN2 i KIN3 sa difuznom MCM 2 distribucijom rastao od 11 (27.5%) KIN2 ka KIN3 - 90.2% (46 slučajeva). Kada su bile grupisane KIN1 i KIN2 lezije i u ovoj grupi značano veći broj promena 62 (68.9%) pokazao je bazalnu distribuciju, a grupisanjem na difuznu i sve ostale forme distribucije kao ne-difuzno, dominirao je ne-difuzni tip kod 76 (84.4%). Kod KIN3 lezija dominirala je difuzna distribucija kod 46 (90.2%) slučajeva. Ovakav rezultat distribucije MCM2 proliferativnog markera pokazuje da je distribuciju MCM2 proteina moguće koristiti za gradiranje AK (KIN) lezija i određivanje stepena epidermalne zahvaćenosti.

Freeman i saradnici objavili su u svojoj studiji još 1999. godine da je ekspresija MCM2 kod normalnog cervikalnog epitela ograničena na bazalni (proliferativni) sloj, a odsutna kod terminalno diferenciranih keratinocita u superficijalnim slojevima (Freeman i sar., 1999). Kod premaligne cervikalne intraepitelijalne neoplazije (CIN) proliferativni ćelijski slojevi se povećavaju sa većom histološkim gradusom, što dovodi do pojave MCM2 pozitivnih ćelija prema površini lezija (Freeman i sar., 1999), kao i u našem slučaju, čime se potvrđuje analogija KIN i CIN klasifikacije, osnovna ideja prema kojoj je KIN podela inicijalno osmišljena i primenjena. Rezultati slični našima objavljeni su i u radu Scott i saradnika, gde je ispitivana ekspresija MCM2 u oralnom epitelu, kod benignih keratoza (9 slučajeva), blage displazije (17 slučajeva), umerene (16 slučajeva) i izražene displazije (14 slučajeva), a distribucija ocenjivana u superficijalnoj, srednjoj i donjoj trećini epiderma i bazalnom sloju. Distribucija ovog proteina bila je ograničena na bazalni sloj kod benigne oralne keratoze, a nalazila se u superficijalnijim slojevima kod promena sa umerenom i izraženom displazijom i SCC. U displaziji, MCM2 je bio ekspresivan u svim slojevima epitela. Od keratoze, preko slabe, umerene i veoma izražene displazije MCM2 protein je bio izražen u rastućem broju ćelija, kao i u našoj studiji, posebno u superficijalnijim ćelijama. MCM2 LI (odnos ukupnog broja ćelija i pozitivnih ćelija – minimum 500) je bio različit između benignih keratoza i lezija sa slabom displazijom u odnosu na promene sa umerenom i veoma izraženom displazijom, uz zaključak da MCM2 predstavlja senzitivni marker za histološku i citološku dijagnozu oralnih maligniteta i displastičnih lezija i da MCM2 IHH može biti od velikog značaja u kliničkoj praksi, u određenim slučajevima, za detekciju displastičnih lezija oralne sluznice (Scott i sar., 2006). U studiji Torres-Rendon i saradnika, u kojoj je ispitivana ekspresija MCM2 kod 81 slučajeva oralne epitelne displazije (1 slučaj slabe displazije, 28 slučajeva umerene, 52 slučajeva izražene displazije), uočena je ekspresija MCM2 pozitivnih ćelija od bazalnog, suprabazalnog sloja do superficijalnih slojeva u (Torres-Rendon i sar.,

2009). U studiji Going i saradnikaispitivana je ekspresija MCM2 proteina u nedisplastičnom skvamoznom epitelu ezofagusa (NDSEE) i displastičnom skvamoznom epitelu ezofagusa (DSEE) i određivana semikvantitativno (0, manje od 10%, 10-30%, 30-70%, 70-90% više od 90%, 100%). MCM2 pozitivne ćelije kod NDSEE bile su uočene u suprabazalnom sloju, dok su se pozitivne ćelije kod DSEE nalazile i u površnijim slojevima. U slučaju DSEE ekspresija MCM2 pozitivnih ćelija bila je čitavom debljinom mukozne pozvršine. Uočen je visok nivo ekspresije u proliferativno aktivnim slojevima, u odnosu na niži nivo ekspresije u diferenciranijim slojevima, ukazujući da MCM2 može biti dijagnostički marker i marker koji ukazuje na poremećaj ćelijskog ciklusa i diferencijacije kod displastično izmenjenog epitela ezofagusa (Going i sar., 2002). Kodani i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM2 proteina u displastičnim lezijama oralne mukoze (pored normalne oralne mukoze i SCC). Nuklearna obojenost tretirana je kao pozitivan rezultat. Prema njihovim rezultatima uočena je MCM2 pozitivnost u bazalnim displastičnim ćelijama, a sa stepenom gradusa displazije pozitivne ćelije su bile ekspimirane ka površnijim slojevima, analogno našim rezultatima (Kodani i sar., 2001). U radu Nicol i saradnika, procenjavana je ekspresija MCM2 kod CIN lezija i invazivne forme SCC. Evaluacija je procenjavana semikvantitativno, brojanje je rađeno manualno, LI je određivan kao procenat pozitivnih (nukleusa) ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija (minimum 200) u reprezentativnom polju. Određivanje pozitivnosti bilo je prema bazalnom i peribazalnom sloju (1-3 sloja), srednji/intermedijarni (oko 8 slojeva) i superficijalni/gornji (5-6 slojeva), a uzorak je činio 54 normalna epitela, 24 CIN1 (low grade), 20 CIN2/CIN3 (high grade) i 216 invazivnih tumora, od toga 192 SCC. Uočena je progresija ekspresije MCM2 ćelija od bazalnog, preko srednjeg do superficijalnog (čitav epiderm) sa progresijom CIN lezija (Nicol i sar., 2012). Davidson i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM2 u VIN lezijama (3 VIN1, 8 VIN2 i 20 VIN3) kao i u normalnom epitelu (6). Pozitivnost je su izražavana kao procenat pozitivnih ćelija u odnosu na 1000 ćelija u tri vidna polja, a distribucija ocenjivana od bazalnog sloja ka površnijim slojevima. U VIN1 lezijama pozitivne ćelije bile su ograničena na suprabazane slojeve; kod VIN2 osim u suprabazalnim i u površnijim slojevima, dok su kod VIN3 lezija, pozitivne ćelije zahvatale čitav epitel, a razlika je bila statistički značajna, uz zaključak da korišćenje MCM2 ekspresije može biti od značaja u dijagnostikovanju VIN (Davidson 2003). U radu Scarpini i saradnikaispitivana je ekspresija MCM2 analnoj intraepidermalnoj neoplaziji (AIN), gradirano kao AIN1 (20), 2 i 3 (22). Distribucija MCM2 bila je izraženija od bazalnog ka superficijalnim slojevima i korelirala je sa AIN

gradusom (Scarpini i sar., 2008). Procena distribucije MCM2 ispitivana je i u normalnom tkivu, premalignim lezijama i kanceru prostate. Tkivo je bilo selektovano kao neizmenjeno/normalno, intraepitelijalna neoplazija niskog gradusa (LGPIN) i visokog gradusa (HGPIN). Procenjivan je intenzitet i procenat imunopozitivne zone. Intenzitet je određivan na skali od 0-3, u kom slučaju je 0 označavala odsutnu obojenost, a 3 intenzivnu obojenost. Procenat pozitivnih ćelija takođe je izražavan na skali 0-3 na 40x uveličanju (vidnom polju). MCM2 pozitivnost se povećavala od normalnog tkiva ka HGPIN i kanceru sa promenom distribucije pozitivnih ćelija od bazalnih ka luminalnim slojevima (Ananthanarayanan i sar., 2006). Rezultati svih prethodno navedenish studija u skladu su sa našim rezultatima i na taj način procenom distribucije MCM2 proteina potvrđuje se smislenost i adekvatnost podele keratinocitnih kutanih lezija ograničenih na epiderm.

Kada je procenjivana distribucija MCM2 pozitivnih ćelija u SCC podeljenim prema stepenu diferentovanosti, utvrđeno je da je kod dobro-diferentovanih tumora distribucija MCM2 dominantno bila periferna, kod 54 (91.4%). Srednje (SCC G2) i slabije diferentovani SCC (G3) dominantno su imali difuzno distribuirane MCM2 pozitivne ćelije. Takođe je utvrđeno da se broj SCC sa difuznom distribucijom MCM2 povećavao kako je diferentovanost tumora opadala. Neznatno više od polovine SCC G 32 (55.2%), a značajno veći broj SCC G3, 49 (84.5%) imalo je difuznu ditribuciju MCM2 pozitivnih ćelija. Ako bazalnu distribuciju kod AK, na neki način poistovetimo sa perifernom distribucijom kod dobro diferentovanih SCC možemo da uočimo analogiju distribucije ćelija u proliferaciji kod ova dva entiteta, čime se može potvrdi titeorija da je AK početni SCC, a ne prekancerozna lezija. U tom smislu, takođe, difuzna distribucija kod BD tj. progresivnijim intraepidermalnim lezijama, korelira sa slabije diferentovanim SCC, što potkerpljuje pomenutu pretpostavku. Statistički značajna razlika u distribuciji MCM2 kao markera ćelijske proliferacije između tumora različitog stepena diferentovanosti govori u prilog činjenici da se distribucija MCM2 proteina može koristiti kao potencijalni marker stepena atipije tj. određivanje gradusa SCC. U studiji Torres-Rendon i saradnika, u kojoj je ispitivana ekspresija kod 38 oralnih SCC (5 rano invazivnih, 22 dobro diferentovanih, 10 umereno diferentovanih, 1 slabo diferentovan), ekspresija MCM2 proteina bila je intenzivna - u čitavim invazivnim frontovima (pandan difuznoj distribuciji), a periferno distribuirana oko keratinskih perli (karakteristika bolje diferentovanih SCC) (Torres-Rendon i sar., 2009). Nešto drugačije rezultate objavili su Kodani i saradnici koji su ispitivali ekspresiju MCM2 proteina u SCC oralne mukoze. Oni

su uočili perifernu ekspresiju pozitivnih ćelija u dobro i srednje diferentovanim SCC, dok su pozitivne ćelije u slabo diferentovanim tumorima bile «rasute» bez specifične lokalizacije, analogno difuznoj ekspresiji u našem slučaju (Kodani sar.,2001). Iste rezultate dobili su Kato isaradnici, koji su ispitivali ekspresiju MCM2 proteina kod 93 SCC ezofagusa u odnosu na gradus tumora, kao jednu od kliničko-patoloških karakteristika tumora. Imunoreaktivnost, tj. ekspresija je uočena na periferiji dobro i srednje diferentovanih SCC, dok su MCM2 pozitivne ćelije bile tumora bile rasute (scattered) kod slabo diferentovanih tumora. U ovoj studiji pokazana je značajna korelacija (povezanost) MCM2 ekspresije (LI) i gradusa tumora (Kato i sar., 2003).

Kada su, u našoj studiji, tumori bili razvrstani prema dimenzijama, što predstavlja jedan od kliničkih kriterijuma agresivnosti tumora, kod SCC prečnika do i više od 20 mm periferna i difuzna distribucija je bila gotovo podjednako zastupljena, a poređenjem nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji MCM2, uz zaključak da ovaj protein tj. njegova distribucija ne korelira sa veličinom tumora, tj. da veličina tumora ne govori direktno o proliferativnom kapacitetu SCC. Za sada nema objavljenih radova u kojima je procenjena distribucija MCM2 u odnosu na dimenzije tumora, kao značajnog kliničko-patološkog parametra, koji bi mogao govoriti o biološkom ponašanju tumora, a time i eventualnoj prognozi kod pacijenata.

Kada je, pak, procenjena distribucija MCM2 prema debljini tumora, kao jednog od parametara koji ukazuje na veću agresivnost, rezultati su bili drugačiji. U prvoj grupi, SCC debljine manje i više od 2 mm, tanji tumori imali su češće perifernu distribuciju (65%), a kod debljih tumora periferna i difuzna distribucija bila je gotovo podjednako zastupljena. Statistički, nije utvrđena značajna razlika u distribuciji MCM2 proteina, pa zaključujemo da granica debljine tumora od 2 mm nije u korelaciji sa distribucijom proliferativnih ćelija, a samim tim ni stepenom agresivnosti. Ovaj parametar u određivanju stadijuma SCC razlikuje tumore koji nemaju (do 2 mm) od onih koji imaju (preko 2 mm debljine) metastatski kapacitet, te izostanak korelacije sa MCM2 ekspresijom možda govori o tome da ovaj protein nije primaran u ranoj fazi pojave agresivnijeg biološkog ponašanja. Sa druge strane, kada su kao granica debljine tumora uzimane vrednosti 4 mm i 6 mm, u oba slučaja tanji tumori imali su perifernu, a deblji difuznu distribuciju MCM2 pozitivnih ćelija. U oba slučaja razlika u distribuciji u odnosu na debljinu tumora bila je statistički značajna, što ukazuje da difuzna distribucija MCM2 proteina, kao markera proliferacije, korelira sa parametrima veće agresivnosti (tumori preko 6 mm imaju značajan procenat pojave metastatskog širenja), ponašanjem tumora i

da je, ujedno, procenu distribucije ovog proteina moguće koristiti za procenu agresivnosti tumora. U radu Brantsch i saradnika, u kome je procenjivan rizik od metastaziranja i lokalnih recidiva kao faktora agresivnosti SCC, uzorku od 615 pacijenata, uočene su metastaze kod 4%, a lokalni recidivi kod 3% SCC debljine 2.1-6 mm, odnosno metastaze kod 16%, i lokalni recidivi kod 12% SCC debljine preko 6 mm. Prema njihovim rezultatima zaključak je da je debljina tumora preko 2 mm rizik za metastaziranje, a preko 6 mm taj rizik postaje značajno veći (Brantsch i sar., 2012). Međusobnim poređenjem utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u distribuciji MCM2 proteina kod tumora različite površine: tumori veće površine pokazali su dominantno difuznu distribuciju i obrnuto, tumori manje površine perifernu. Za sada nema objavljenih radova u kojima je procenjivana distribucija MCM2 u odnosu na površinu bilo koje vrste tumora.

Kada je semikvantitativno određivan tj. procenjivan obim ekspresije (manje i više od 50% MCM2 pozitivnih ćelija), veći broj AK (70.3%) imao je manje od polovine pozitivnih ćelija, dok su skoro svi slučajevi BD imali su više od 50% pozitivnih ćelija (49 BD, 98.0%). Ovakav nalaz potkrepljuje da su AK i BD lezije u kojima postoji progresija neoplastične transformacije keratinocita. Statistički utvrđena značajna razlika između AK i BD, u našem radu, govori u prilog MCM2 proteina kao markera proliferacije, korisnog u IHH diferenciranju intraepidermalnih keratinocitnih lezija. MCM2 ekspresija se uočava kod keratinocitnih neoplazmi u začetku, tako da može biti od koristi za razlikovanje malignih ćelija od reaktivno izmenjenih, što ponekad može biti teško korišćenjem samo morfoloških karakteristika. Sa druge strane približno jednak broj SCC imao je manje (81 – 46.6%) i više (93 -53.4%) od 50% pozitivnih ćelija, što se može objasniti procenjivanjem ekspresije MCM 2 u grupi SCC različitiog stepena diferentovanosti. Freeman i saradnici procenjivali su ekspresiju MCM2 u normalnoj koži (2 uzorka), psorijazi (3 slučaja), AK (1 slučaj), BD (5 slučajeva) i SCC (13 slučajeva). Prema njihovim rezultatima procenat MCM2 pozitivnih ćelija kod BD iznosio je 89%, kod kutanih SCC 79%, a vrednosti za jedan slučaj AK nisu navedene. U studiji Scott i saradnika, ispitivana je ekspresija MCM2 kod 11 SCC, izražavana kao LI (odnos broja epitelialnih ćelija i MCM2 pozitivnih ćelija - minimum 500 po slučaju). Ukupan LI MCM 2 kod oralnih SCC iznosio je 92% (opseg 80-98%). U radu Freeman i saradnika utvrđena je statistički značajna razlika u ekspresiji MCM2 između normalne kože i BD, kao i poređenjem normalne kože i SCC (Freeman i sar., 1999). Međutim, kada su, u našem radu, grupisane intraepidermalne lezije (AK i BD) i SCC, iako je veći broj lezija obe grupe (76- 53.9% vs 93 - 53.4%) imao više od polovine MCM2 pozitivnih ćelija nije

utvrđena statistički značajna razlika. Na osnovu toga zaključujemo da ovaj obim ekspresije MCM2 proliferativnog markera može biti od koristi za diferenciranje AK, BD i invazivnog SCC, ali ne i za diferenciranje intraepidermalnih od invazivnih lezija. Razlog za to može biti mogućnost progresije preinvazivnih lezija u SCC u bilo kom momentu, dakle i iz lezija sa manjim brojem MCM2 pozitivnih ćelija. U radu Abdou i saradnika, kod kojih je procenjivan obim imunoreaktivnosti kao procent pozitivnih ćelija, ekspresija MCM2 je utvrđena kod 14 - 66.7% SCC (Abdou i sar., 2014). U slučaju drugih kutanih maligniteta, Abdou i saradnici su uočili MCM2 ekspresiju MCM2 proteina kod 16 (80%) BCC koja se kretala se u rangu od 0-90%, sa srednjom vrednošću 24.4%. Ekspresija MCM2 bila je veća kod BCC, a poređenjem ove dve vrste kutanih tumora, utvrđena je statistički značajna razlika u ekspresiji MCM2. Poređenjem malignih lezija (BCC i SCC) i nemalignih (benignih) hiperproliferativnih lezija kože (psorijaza, seboroična keratoza, keratoakantom) nije utvrđena statistički značajna razlika (Abdou i sar.,2014). U radu Liaw i Boyd-a, gde je ispitivana ekspresija MCM2 proteina kod 15 slučajeva BCC sa folikularnom diferencijacijom (BCCFD) i trihoepitelioma (TE) ekspresija je određivana na 200 evaluiranih ćelija u 5 posebnih polja, a procenat pozitivnih ćelija je izražavan u četiri kategorije (I 0-25%, II 25-50%, III 50-75%, IV 75-100%). Najveći broj BCCFD je imao 25-50% pozitivnih ćelija, a TE od 0-25% MCM2 pozitivnih ćelija i nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji ovog proteina, pa MCM2 ekspresija nije od značaja u diferenciranju ove dve vrste tumora (Liaw i Boyd 2009). Ekspresija MCM2 proteina u melanocitnim lezijama, određivana je u studiji Boyd i saradnikakoji su procenjivali ekspresiju ovog proteina kod benignih i displastičnih nevusa, primarnih melanoma i metastaza melanoma. Broj MCM2 imunopozitivnih ćelija procenjivan je brojanjem ćelija sa pozitivno obojenim nukleusom, među 200 ćelija svakog preparata. Prema njihovim rezultatima ekspresija je procentualno rasla od benignih nevusa (1.2%), displastičnih nevusa (6.15%), primarnih kutanih melanoma (49.1%) i metastaza melanoma (40.9%). Iako se radi o melanocitnim tumorima, kao i u našem slučaju, uočeno je da je ekspresija MCM2 bila veća kod invazivnih melanocitnih neoplazmi, melanoma u odnosu na nevuse, tj. da je postojala statistički značajna razlika u ekspresiji MCM2 prema histopatološkoj dijagnozi, te da procena ekspresije MCM2 može biti od koristi za razlikovanje benignih od malignih formi melanocitnih tumora. Razlike nije bilo jedino poređenjem ekspresije u primarnim kutanim melanomima u odnosu na metastaze melanoma (Boyd i sar., 2008). Osim u koži, ekspresija MCM2 proteina ispitivana je i u sluznicama. U studiji Torres-Rendon i saradnika , upoređivana je ekspresija MCM2

proteina u normalnoj oralnoj mukozi (NOM), oralnoj epidermalnoj displaziji (OED) i oralnom SCC (OSCC), izražavana kao LI (odnos ukupnog broja ćelija i broj pozitivnih ćelija, umnožen sa 100). Ekspresija MCM2 bila je progresivno veća od NOM, preko OED do OSCC, a razlika je bila visoko statistički značajna. Takođe, utvrđena je veća ekspresija kod OED koje su progredirale u OSCC u odnosu na one kod kojih nije došlo do ekspresije i razlika je bila statistički značajna. (Torres-Rendon i sar., 2009). I u drugoj studiji, ekspresija MCM2 procenjavana je u normalnoj oralnoj mukozi (12), displastičnim lezijama (69) i SCC (35) (Kodani i sar., 2001). Ekspresija je procenjavana prema broju pozitivnih ćelija (nukleusa) na 1000 ćelija, u 5 vidnih polja, izražavana u procentu pozitivnih ćelija. I prema njihovim rezultatima uočena je statistički značajna razlika u broju pozitivnih ćelija (LI) između normalne mukoze, displazije i SCC (Kodani i sar., 2001). Kodani i saradnici su takođe utvrdili značajno veći LI (%) MCM2 pozitivnih ćelija kod SCC oralne sluznice u odnosu na displastične lezije i normalan epitel (Kodani i sar., 2001), dokazujući na ovaj način da lezije oralne displazije karakteriše niža ćelijska proliferacija, kao i da se ekspresija MCM2 može koristiti u predikciji maligne transformacije oralne displazije. Povećana ekspresija MCM2 uočena je tokom transformacije od normalnog laringealnog epitela, preko displazije do SCC. U radu Chantrath i saradnika, koji su ispitivali ekspresiju MCM2 u normalnom skvamoznom epitelu laringisa, laringealnoj displaziji i SCC, a ekspresija je određivana kvantitativno, određivanjem LI, kao procenat pozitivnih ćelija (nukleusa) u odnosu na ukupan broj ćelija (minimum 500), vrednost LI rasla je progresivno od normalne sluznice, preko displazije do SCC i razlika u ekspresiji MCM2 bila je visoko statistički značajna (Chantrathi sar., 2003). U radu Nicol i saradnika, procenjavana je ekspresija MCM2 kod CIN lezija i invazivne forme SCC. Brojanje je rađeno manualno, LI je određivan kao procenat pozitivnih (nukleusa) ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija (minimum 200) u reprezentativnom polju, a uzorak je činio 54 normalna epitela, 24 CIN1 (low grade), 20 CIN2/CIN3 (high grade) i 216 invazivnih tumora, od toga 192 SCC. Uočen je progresivan rast procenta pozitivnih MCM2 ćelija sa progresijom CIN lezija i razlika je bila statistički značajna. Uočena je značajna razlika u procentu pozitivnih ćelija između normalnog epitela i CIN1, CIN viših gradusa i invazivnog SCC, kao i CIN i invazivnih tumora. (Nicol i sar., 2012). U radu Mukherjee i saradnika, ispitivana je MCM2 pozitivnost u uzorcima cervikalnog brisa kod žena koje su rutinski pregledane (404) i koje su kontrolisane jer su prethodno imale SCC (51). Od 404 žena nalaz cervikalnog brisa pokazao je pozitivnost u 16 slučajeva, a potom je histopatološki potvrđeno da kod

svakog od ovih slučajeva postoji maligna transformacija (neoplazma) i to u 6 slučajeva CIN1-3, u jednom slučaju adenokarcinoma, kod 9 slučajeva SCC. Sa druge strane, od 51 žene koje su primarno imale SCC, 40 je bilo MCM2 negativno, dok je 3 slučaja histološki potvrđen SCC. Senzitivnost i specifičnost imunohistohemijskog MCM2 testa bila je visoka, bez lažno negativnih rezultata, dokazujući korisnost MCM imunohistohemije kao značajne tehnike za dijagnostikovanje cervikalnih kancera ali i pre-kancerskih stanja, značajno veće od opšte korišćenog Pap testa (Mukherjee i sar., 2007). Reena i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM2 u benignom (30) i malignom tkivu dojke (70, IDC 56, DCIS 4, ILC 2, nonductal 4, mešoviti tip 4). Ekspresija MCM2 kvantifikovana je kao LI, procenat pozitivnih epitelijalnih ćelija (na malom uveličanju, u zonama maksimalne ekspresije, u odnosu na minimum 500 ćelija po slučaju). Ekspresija u malignom tkivu dojke bila je značajno veća u odnosu na benigne lezije. S obzirom da su bile ispitivane benigne lezije sa niskim rizikom za malignu transformaciju slaba ekspresija ovog proliferativnog markera bila je očekivana. U tom smislu, dakle, veća MCM2 ekspresija kod benignih lezija visokog rizika mogla bi da potvrdi rizik za potencijalnu malignu transformaciju (Reena i sar., 2008). U studiji Vargas i saradnika, ispitivana je ekspresija MCM2 kod različitih tumora pljuvačne zlazde (13 cističnih adenoid karcinoma ACC, 10 karcinoma ex pleomorfni adenoma CEPA, 10 mukoeptermoidnih karcinoma MEC, 10 polimorfni adenokarcinoma niskog gradusa PLGA, 10 pleomorfni adenoma PA i 9 acinic-cell karcinoma AcCC), u cilju procenjivanja korisnosti u dijagnostikovanju i predikciji ponašanja tumora. Ekspresija MCM2 je izražavana je kao LI, tj. procenat pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj tumorskih ćelija. Ekspresija MCM2 bila je veća kod ACC nego CEPA, AcCC, MEC, PA i PLGA. Determinisano MCM2 ekspresijom, ACC imaju veću proliferativnu stopu u odnosu na ostale tumore pljuvačne žlezde, što je u skladu sa činjenicom da su ACC visokog stepana malignosti sa velikom stopom recidiva i lošijom dugoročnom pognozom. Razlika u ekspresiji u odnosu na PLGA ima posebnog značaja jer oba tumora mogu imati slična histopatološke karakteristike, pa mogu predstavljati dijagnostičke teškoće posebno kod malih biopsija, u kom slučaju MCM2 kao značajan proliferativni marker može biti od koristi za diferenciranje graničnih slučajeva. Prema dobijenim podacima MCM2 može biti senzitivni proliferativni marker kod malignih tumora pljuvačne žlezde i može se koristiti u diferenciranju pleomorfni adenoma i karcinoma, adenoidni cistični karcinoma i polimorfni adenokarcinoma niskog gradusa (Vargasi sar.,2008). Ekspresija MCM2 ispitivana u normalnom, benignom i malignom bilijarnom i pankreatičnom tkivu, u radu Ayaru i saradnika (izražavana kao

semikvantitativna determinacija obima ekspresije je izražena računanjem LI, kao procenat pozitivnih ćelija tj. broj pozitivnih ćelija u odnosu na minimum 200 epitelijalnih ćelija), bila je ekstremno niska u normalnom pankreatičnom i bilijarnom značajno viša u malignom tkivu i razlika je bila značajna (Ayary i sar., 2008). Rezultati svih prethodno navedenih studija, bez obzira što se radilo o različitim tkivima (tumorima), različitom broju ispitivanih slučajeva i različitim načinima evaluacije imunohistohemijskog bojenja, nedvosmisleno koreliraju sa rezultatima naše studije, odnosno idu u prilog pretpostavci da je procena proliferativnog statusa analizom ekspresije MCM2 proteina veoma značajna i u dijagnostikovanju neoplazmi, ali i eventualnom IHH razgraničavaju histološki nedovoljno jasnih lezija, potvrđujući da MCM2 može naći mesto u dodatnim dijagnostičkim metodama.

U značajno manjem broju istraživanja dobijeni su drugačiji rezultati. U studiji Ferenc i saradnikaispitivana je ekspresija MCM2 na uzorku kod 32 dezmoidna tumora. Slučajevi su karakterisani kao pozitivni ukoliko je bilo preko 5% pozitivnih ćelija. Pozitivnost se izražavala kao procenat pozitivnih ćelija, LI, odnos pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija izbrojan kod svakog slučaja na 10 polja velikog uveličanja (400x). Prema njihovim rezultatima MCM2 ekspresija nije uočena ni kod jednog tumora ukazujući na nisku mitotsku aktivnost dezmoidnih tumorskih ćelija, obzirom da je dezmoida fibromatoza klonalna proliferacija dubokog mekog tkiva koja se karakteriše infiltrativnim rastom i tendencijom ka lokalnom recidiviranju bez sposobnosti metastaziranja (Ferenc i sar., 2010). U radu Guzinska-Ustymowicz i saradnika u kome je ispitivana ekspresija MCM2 kod 47 pacinata sa kolorektalnim kancerom ekspresija ovog proteina određivana je semikvantitativno i definisana kao negativna (ukoliko je je bilo manje od 50% pozitivnih ćelija) i pozitivna (pozitivna reakcija kod više od 50% ćelija). Prema njihovim rezultatima nije bilo značajne razlike u ekspresiji MCM2 u odnosu na histološki tip tumora (Guzinska-Ustymowicz i sar., 2009).

Primenom KIN klasifikacije, a procenjivanjem ekspresije MCM2 u našem radu je utvrđeno da veći broj KIN1 i KIN2 lezija imao je manje od polovine pozitivnih ćelija, ali je taj broj opadao od KIN1 (40-80.0%) ka KIN2 (24 – 60.05%). U slučaju KIN 3 gotovo sve lezije (50 – 98.0%) imale su više od 50% MCM2 pozitivnih ćelija, samo 1 KIN3 imao je manje od 50%. Statističkom analizom utvrđena je statistički značajna razlika između KIN grupa, kao i kada su grupisane lezije koje zahvataju 2/3 epiderma (KIN1 i KIN 2) u odnosu na čitav epiderm, KIN3. Na osnovu ovakvog rezultata moguće je zaključiti da je ovaj vid klasifikacije adekvatan, kao i da se ekspesija MCM2 može koristiti u IHH

diferenciranju intrepeidermalnih lezija koje morfološki nije lako kategorisati. Takođe, dati rezultati pokazuju da ekspresija MCM2 proteina korelira sa progresijom in situ promena, ukazujući da ekspresija MCM2 proteina može biti pouzdan marker za dijagnozu i gradiranje AK i in situ lezija kao KIN promena, što je veoma važno s obzirom da stepen atipije ćelija predstavlja značajan faktor za progresiju u invazivni SCC (Cockerel 2000). U studiji Shin i saradnika, takođe je ispitivana ekspresija MCM2 proteina kod AK gradiranih prema KIN klasifikaciji. Za procenu imunoreaktivnost korišćen je kvantitativni metod i određivana srednja vrednost broja imunopozitivnih ćelija. I prema njihovim rezultatima, broj pozitivnih ćelija rastao je sa gradusom AK (KIN) i utvrđena je značajna, pozitivna korelacija u imunoreaktivnosti MCM2 i KIN gradusa. Takođe poređenjem KIN 1 i KIN 2, kao i KIN 2 i KIN3 utvrđena je visoko statistiki značajna razlika, što se u potpunosti slaže sa rezultatima u našoj studiji. To je jedini do sada publikovani rad u kome je ekspresija MCM2 analizirana u odnosu na KIN klasifikaciju (Shin i sar., 2010). U radu Freeman i saradnika, gde je ispitivana ekspresija MCM2 proteina kod cervikalne intraepidermalne neoplazije, kao promena analognim KIN lezijama, kod CIN1 promena bilo je 44% MCM2 pozitivnih ćelija, a kod CIN3 97% (90-100). Statistička analiza u ovoj studiji rađena je samo normalnog epitela cerviksa i CIN3, i pri tome utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji MCM2 proteina (Freeman i sar 1999). U radu Scott i saradnika, u kome je ispitivana ekspresija MCM2 proteina u lezijama usne duplje, izražavana kao labelling index (LI), procenom imunopozitivnosti kao odnos svih epitelialnih ćelija i broja pozitivnih ćelija (minimum 500 po slučaju), srednja vrednost LI bila je 9.2% kod benignih keratoza, a procentulano rasla od 21.6% kod blage displazije, 58.8% umerene displazije i 77.7% kod izražene displazije, dakle utvrđena je povećana ekspresija MCM2 pozitivnih ćelija. (Scott i sar., 2006). Davidson i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM2 u VIN lezijama (3 VIN1, 8 VIN2 i 20 VIN3) kao i u normalnom epitelu (6). Pozitivnost je su izražavana kao procenat pozitivnih ćelija u odnosu na 1000 ćelija u tri vidna polja. Procenat pozitivnih ćelija rastao je od VIN 1 ka VIN 3 lezijama (32.3% vs 85.0% vs 93.4%) i uočena je statistički značajna razlika u ekspresiji MCM2 proteina uz zaključak da je ekspresiju ovog proteina moguće koristiti za bolju dijagnostiku VIN (Davidson i sar., 2003). Tan i saradnici, ispitivali su ekspresiju MCM2 kod 41 uzorka bronhijalnih biopsija koje su činili normalna mukoza, metaplastične lezije, displastične lezije, i in situ karcinomi. Procenat pozitivnih ćelija rastao je od normalne mukoze ka metaplaziji, kao i od metaplazije ka displaziji. U tom smislu, MCM2 protein ocenjen je kao senzitivni marker za detekciju premalignih ćelija pluća (Tan i sar.,

2001). Dakle, rezultati naše i svih pomenutih studija govore da MCM2 kao marker proliferacije predstavlja obećavajući protein koji je moguće koristiti u dodatnoj dijagnostici. Sa druge strane, u studiji u kojoj je ispitivana ekspresija MCM2 kod oralne epitelijalne displazije (OED), nije utvrđena korelacija LI MCM2 i gradusa displazije (Torres-Rendon i sar., 2009). Mogući razlozi nekompatibilnih rezultata su selekcija slučajeva za analizu (od 134 slučajeva ukupno bilo je 41 OED koje su progredirale u karcinom, od 81 slučaja OED, samo 1 je okarakterisan kao slaba/blaga displazija, 28 umerena, a 52 izražena displazija). Takođe i prema rezultatima Kodani i saradnika, koji su ispitivali ekspresiju MCM2 u displastičnim lezijama oralne sluznice, LI tj. procenat MCM2 pozitivnih ćelija povećavao se od slabe, umerene i izražene displazije, ali razlika nije bila statistički značajna (Kodani i sar., 2001).

Kada je, u našoj studiji, bio procenjivan obim ekspresije MCM2 prema gradusu tumora, dobro diferencirani SCC imali su veći broj slučajeva sa manje manje od polovine pozitivnih ćelija (SCC G1 50-86.2%). Kako je stepen diferentovanosti tumora bio manji, tako je rastao broj slučajeva sa više od polovine pozitivnih ćelija (SCC G2 36-62.1% i SCC G3 49-84.5%). Dakle, lošije diferentovani tumori su u većoj meri ekspresovali protein MCM2. Statističkom analizom utvrđeno je da postoji značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM2 kod tumora različitog gradusa tj. ćelijske diferentovanosti, što je dokazalo da je broj maligno transformisanih ćelija u proliferaciji veći kod slabije diferentovanih tumora. To potvrđuje ulogu MCM2 proteina kao pouzdanog markera proliferacije i malignosti tumora, ali i govori u prilog pretpostavci da je ovaj marker moguće koristiti za određivanje stepena diferentovanosti SCC. I u radu Freeman i saradnika, u kome je ispitivana ekspresija MCM2 proteina kod 13 SCC kože različitog gradusa, utvrđeno je povećanje ekspresije ovog proteina od dobro, preko srednje do slabo diferentovanih tumora (Freeman i sar., 1999). Sa druge strane, naši rezultati razlikuju se od rezultata jedine studije Abdou i saradnika, u kojoj je procenjena ekspresija MCM2 u odnosu na gradus SCC kože, prema kojima nije bilo statistički značajne razlika u ekspresiji kod tumora različitog gradusa. Različite rezultate moguće je eventualno objasniti značajno manjim brojem ispitivanih slučajeva (21 SCC) i različitom evaluacijom imunopozitivnih ćelija. Takođe, u proceni ekspresije MCM2 proteina, kod oralnih SCC, u studiji Torres-Rendon i saradnika, nije utvrđena korelacija u ekspresiji (LI) i diferencijaciji tumora, kod kojih su za evaluaciju ekspresije MCM2 selektovani invazivni frontovi OSCC (Torres-Rendon i sar., 2009). I kod drugih vrsta humanih neoplazmi, ispitivana je ekspresija MCM2 u odnosu na diferentovanost tumora. U studiji

Vargas i saradnika ispitivana je ekspresija MCM2 kod različitih tumora pljuvačne zlazde. Među ovim tumorima ispitivana je ekspresija MCM2 (izražavana je kao LI, tj. procenat pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj tumorskih ćelija) u odnosu na gradus mukoepidermoidnih karcinoma. Ovi tumori bili su podeljeni na grupu tumora niskog, srednjeg i visokog gradusa, ali nije bilo statističke korelacije. Dakle, MCM2 LI nije bio udružen sa histopatološkim gradusom tumora (Vargas i sar., 2008). U slučaju ekspresije MCM2 kod gastričnih adenokarcinoma ispitivana je ekspresija ovog proteina kod 30 intestinalnih i 36 difuznog tipa. Ekspresija je izražavana kao LI, procenat pozitivnih ćelija određen kao odnos pozitivnih ćelija MCM2 u odnosu na ukupan broj ćelija (minimim 1000 nasumično izabranim poljima u čitavom preparatu) nije bila u korelaciji sa tumorskim gradusom (dobro+srednje diferentovani u odnosu na slabo diferentovane tumore) kao jednom od kliničko-patoloških karakteristika (Giaginis i sar., 2011). U radu Czyzewske i saradnika, ispitivana je ekspresija kod 100 kancera želuca u odnosu na histološki gradus tumora. Procenat pozitivnih ćelija je određivan semikvantitativno na svakom od 10 polja vizualizacije u odnosu na celokupan broj ćelija. Potom je određivana srednja vrednost u odnosu na sva polja, označena kao proliferacioni indeks (PI), izražen kao procenat pozitivnih ćelija. Prema PI slučajevi su podeljeni na pozitivne (sa više od 50% pozitivnih ćelija) i negativne (manje od 50%). Prema njihovim rezultatima nije bilo značajne razlike u ekspresiji u odnosu na gradus histološke diferencijacije (Czyzewska i sar., 2009). I u studiji Ramnath i saradnik koji su ispitivali ekspresiju MCM2 kod SCC i adenocarcinoma pluća nije utvrđena značajna udruženost MCM2 ekspresije i histopatološkog gradusa tumora (Ramnath i sar., 2001). Ipak, u daleko većem broju studija u kojima je ispitivana ekspresija MCM2 u tumorima drugih organa, potvrđena je identična opservacija da ekspresija MCM2 korelira sa gradusom tumora. Npr. u studiji Scott i saradnika, u kojoj je ispitivana ekspresija MCM2 kod SCC oralne duplje, a izražavana kao LI, uočena je veća ekspresija kod slabije diferentovanih tumora (Scott i sar., 2006). Chantrath i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM2 u laringealnim SCC. Ekspresija je određivana kvantitativno, izražavana kao LI, kao procenat pozitivnih ćelija (nukleusa) u odnosu na ukupan broj ćelija (minimim 500). Poređenjem SCC različitog stepena diferencijacije, veću ekspresiju MCM2 imali su slabije diferentovani SCC (Chantrath i sar., 2006). U radu Kato i saradnika ispitivana je ekspresija MCM2 proteina u SCC ezofagusa. Ekspresija je izražavana kao LI, procenat pozitivnih (nukleusa) ćelija u invazivnim frontovima tumora u tri uzastopna vidna polja. Ekspresija je procenjivana u odnosu na histološki gradus tumora i LI se povećavao sa

većim gradusom tumora, kao i u našoj studiji. Razlika u ekspresiji bila je statistički značajna, uz zaključak da je ekspresija MCM2 pouzdan marker u evaluaciji proliferativnog potencijala tumora, sa većom ekspresijom kod tumora većeg stepena biološke agresivnosti, a samim tim i značajan prognostički parametar (Kato i sar., 2003). U studiji u kojoj je procenjena ekspresija MCM2 kod kancera prostate utvrđeno je da se ekspresija ovog proteina povećavala od kancera niskog, srednjeg do visokog gradusa (Ananthanarayanan i sar., 2006). U studiji Gozalez i saradnik ispitivana je ekspresija MCM2 u tumorima dojke, u odnosu na gradus tumora. Ekspresija je izražavana kao LI, procenat pozitivnih ćelija (nukleusa epitelijalnih ćelija), u zonama tumora sa maksimalnom frekvencijom pozitivnih ćelija na malom uveličanju. Prema njihovim rezultatima utvrđena je korelacija ekspresije ovog proteina u odnosu na gradus tumora, dokazujući da ekspresija MCM2 može biti od značaja za bolju procenu prognoze u evaluaciji tumora dojke, kao i odlukama o terapijskom pristupu (Gonzalez i sar., 2003). Ovakav zaključak potvrđuju i rezultati Shettu i saradnika kod invazivnih tumora dojke (invazivni duktalni, lobularni, mucinozni, miksni) Ekspresija MCM2 je izražavana kao LI, procenat pozitivnih (nukleusa) ćelija, u odnosu na 400 ćelija u preparatu. I prema njihovim rezultatima tumori većeg gradusa (slabije diferentovanosti) pokazali su povećanu ekspresiju MCM2 proteina. U ovoj studiji MCM2 je procenjen kao najznačajniji samostalni prediktor ishoda (Shetty i sar., 2005). Takođe, Reena i saradnici koji su ispitivali su ekspresiju MCM2 u malignom tkivu dojke (70, IDC 56, DCIS 4, ILC 2, neduktalni 4, mešoviti tip 4). Ekspresija MCM2 kvantifikovana je kao LI, procenat pozitivnih epitelijalnih ćelija (na malom uveličanju, u zonama maksimalne ekspresije, u odnosu na minimum 500 ćelija po slučaju). Ekspresija je bila procenjena u odnosu na histološki gradus, a tumori su bili podeljeni u tri grupe (gradus 1, gradus 2 i gradus 3). MCM2 LI bio je najveći kod najslabije diferentovanih tumora (gradus 3), manji kod srednje diferentovanih (gradus 2), a najmanji kod dobro diferentovanih tumora (gradus 1) (Reena i sar., 2008). U radu Kobierzycki i saradnika procenjena je ekspresija MCM2 kod 51 invazivnog duktalnog kancera dojke i to na čitavom uzorku. Ekspresija je izražavana kao procenat pozitivnih ćelija na određenom vidnom polju, pod uveličanjem 400x, a ocenjivanje pozitivnih ćelija tj. obojenih nukleusa ćelija vršeno je kompjuterskim softverom. Konačan rezultat svakog uzorka bio je prosek procenata pozitivnih ćelija u tri zone (hot spot). Prema njihovim rezultatima postojala je pozitivna korelacija u ekspresiji MCM2 i gradusa tumora, u čitavom uzorku, kao i u tkivnom mikronizu (Kobierzycki i sar., 2012). U radu Giaginis i saradnika ispitivana je ekspresija MCM2 kod 96

kolorektalnih kancera u odnosu na gradus tumora. Ekspresija je bila izražavana kao LI, procenat pozitivnih ćelija (odnos pozitivnih u odnosu na ukupan broj minimum 1000 ćelija po jednom slučaju). Tumori su prema histološkom gradusu bili podeljeni na dobro, srednje i slabo-diferentovane, a takođe gradirani prema Dukes klasifikaciji na A, B, C i D grupu. MCM2 ekspresija bila je značajno udružena sa Dukes stadijumom i histološkom gradusom tumora (Giaginis i sar.,2009). U studiji Gakiopoulou i saradnika ispitivana je ekspresija MCM2 kod 43 kancera ovarijuma niskog malignog potencijala i 85 adenokarcinoma. Ekspresija je izražavana kao procenat pozitivnih ćelija, LI, odnos pozitivnih (nukleusa) ćelija u odnosu na ukupan broj tumorskih ćelija u preparatu (oko 1000 izbrojanih tumorskih ćelija). Adenokarcinomi su bili gradirani prema histološkoj diferencijaciji, tj. gradusu tumora i ekspresija je bila veća kod tumora većeg gradusa tj. lošije diferentovanih tumora (Gakiopoulou i sar., 2007). U radu Sington i saradnika ispitivana je ekspresija MCM2 proteina kod 51 miksofibrosarkoma u odnosu na gradus tumora. Ekspresija je izražavana kvantitativno, izračunavanjem MCM2 pozitivnih ćelija, a izražavan kao LI procenat pozitivnih ćelija, tj. odnos pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj 500-100 ćelija u reprezentativnom vidnom polju. Poređenjem ekspresije kod miksofibrosarkoma visokog (20), srednjeg (21) i niskog gradusa (10), LI se povećavao sa povećanjem gradusa. Utvrđena je značajna razlika u ekspresiji MCM2 poređenjem tumora visokog i srednjeg gradusa, kao i srednjeg u odnosu na tumore niskog gradusa, ukazujući da bi određivanje ekspresije (LI) MCM2 u pojedinačnim slučajevima moglo da omogući određivanje kategorizacije tumora prema gradusu. U tom smislu određivanje MCM2 LI moglo bi biti od značaja/korisnosti u gradiranju uzoraka dobijenih punkcionom biopsijom i/ili citoloških uzoraka ove vrste tumora, a upotreba antitela prema MCM2 proteinima značajna u histopatološkoj analizi. (Sington i sar.,2004). Dudderidge i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM2 proteina kod 170 slučajeva karcinoma bubrega u odnosu na gradus tumora. Tumori su bili podeljeni u četiri grupe (G1-4). Ekspresija MCM2 bila je izražavana kvantitativno određivanjem ćelija sa pozitivnim nukleusima (u proseku 681 po slučaju), a procenat pozitivnih ćelija LI je određivan kao odnos pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija. Utvrđena je jasna udruženost povećanja ekspresije MCM2 (LI) sa povećanjem gradusa tumora, ukazujući da je MCM2 koristan prognostički molekularni marker koji može biti korišćen u rutinskoj kliničkoj praksi (Dudderidge i sar.,2005). Isti autor sa saranicima ispitivao je ekspresiju MCM2 proteina kod 58 kancera prostate u odnosu na gradus tumora, kao jednu od kliničko/patoloških parametara. Tumori su bili podeljeni prema Gleason skor. Ekspresija je određivana

kvantitativnom analizom, a broj pozitivnih ćelija označavan kao LI, odnos pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija (srednja vrednost 893 po slučaju). Prema rezultatima ovog istraživanja utvrđena je značajna razlika u ekspresiji MCM2 u odnosu na Gleason gradus tumora (Dudderidge i sar., 2007). Rodins i saradnici koji su ispitivali ekspresiju MCM2 u tumorima bubrega uočili su takođe značajnu poveznost ekspresije MCM2 proteina i histopatološkog gradusa tumora (Rodins i sar., 2002). U studiji Hashimoto i saradnika, u kojoj je ispitivana ekspresija MCM2 kod 145 adenokarcinoma pluća, MCM2 LI je korelirao sa histopatološkim gradusom tumora (Hashimoto i sar., 2004). U slučaju neuroloških neoplazmi, Wharton i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM2 kod 32 oligodendroglioma (ekspresija je izražavana kao LI – procenat pozitivnih ćelija na 1000 ćelija) i utvrdili udruženost ekspresije i gradusa tumora, tj. značajno veću ekspresiju MCM2 kod tumora gradus III u odnosu na gradus II (Wharton i sar., 2001). Kod intracerebralnih glioma (uključujući difuzne i anaplastične astrocitome i glioblastome) ekspresija MCM2 se povećavala je sa povećanjem gradusa tumora, od difuznih astrocytoma, preko anaplastičnih astrocitoma do glioblastoma (Scott i sar., 2005).

Prema rezultatima naše studije, i tumori manjeg i većeg prečnika (kojim se određuje veličina tumora), dakle manjih i većih dimenzija, imali su više od polovine MCM2 pozitivnih ćelija (56-50.3% vs 37-57.8%). Statistički, nije utvrđena razlika u ovom obimu ekspresije MCM2 proteina kod tumora različitih dimenzija, kao jednog od parametara koji govore o agresivnosti. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima studije Abdou i saradnikakoji su takođe procenjivali ekspresiju MCM2 proteina kod SCC u odnosu na veličinu tumora i kod kojih, takođe, nije utvrđena razlika u ekspresiji MCM2 u odnosu na veličinu tumora, iako je način evaluacije bojenja u ovoj studiji bio drugačiji, a ocena imunoreaktivnost ocenjivana kao procenat pozitivnih ćelija izražen kroz srednju vrednot, medijana i opseg (Abdou i sar., 2014). Sa druge strane, u radu Shettyi saradnikakod invazivnih tumora dojke, tumori su, prema veličini bili podeljenji na manje od 11mm, dimenzija od 11-20 mm, 21-30 mm, 31-40 mm i preko 40mm. Statističkom analizom nije utvrđena korelacija ekspresije sa veličinom tumora (Shetty i sar., 2005). U studiji Reena i saradnika ispitivana je ekspresija MCM2 kod malignih tumora dojke u odnosu na veličinu tumora do 2cm, više od 2 cm i više od 5cm. Prema njihovim rezultatima nije utvrđena korelacija u ekspresiji MCM2 i veličine tumora (Reena i sar., 2008). U radu Giaginis i saradnikaispitivana je ekspresija MCM2 kod 96 kolorektalnih kancera u odnosu na veličinu tumora, ali nije utvrđena značajna razlika (Giaginis i sar., 2009). Prema rezultatima Tokuyasu i saradnika, koji su ispitivali ekspresiju MCM2

kod karcinoma želuca, LI ovog proteina nije bio značajno drugačiji kod tumora različitih dimenzija (Tokuyasu i sar., 2008). U radu Rodins i saradnika, koji su ispitivali ekspresiju MCM2 u tumorima bubrega takođe nije utvrđena poveznost ekspresije MCM2 proteina i veličine tumora (Rodins i sar., 2002). Prema rezultatima studije Vargas i saradnika, koji su ispitivali ekspresiju MCM2 kod tumora pluća nije bilo korelacije veličine tumora i ekspresije MCM2 (izražavane kao LI, tj. procenat pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj tumorskih ćelija). Ovakav rezultat upućuje na zaključak da veći tumori nisu nužno udruženi sa većom proliferativnom aktivnošću (Vargasi sar., 2008). Szajerka i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM2 proteina kod 48 adenokarcinoma nadbubrežne žlezde, različitih dimenzija. Ni u slučaju ove vrste tumora nije bilo korelacije u ekspresiji MCM2 i dijametra tumora (Szajerka i sar., 2008).

Različito od navedenih, u manjem broju studija utvrđena je korelacija ekspresije MCM2 proteina u odnosu na veličinu tumora. Dudderidge i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM2 proteina kod 170 slučajeva karcinoma bubrega u odnosu na veličinu tumora. Tumori su prema dimenzijama bili podeljeni u četiri grupe (15-45 mm, 50-65 mm, 70-90 mm, 95-150 mm). Utvrđeno je povećanje ekspresije MCM2 sa povećanjem veličine tumora, a razlika je bila statistički značajna. (Dudderidge i sar., 2005) I u radu Gonzalez i saradnika, u kome je ispitivana je ekspresija u tumorima dojke koji su bili podeljeni u grupe manje od 1.1 cm, 1.1-2.0 cm, 2.1-3.0 cm, 3.1-4.0 cm i više od 4 cm. Ekspresija je određivana LI, a utvrđena je značajna korelacija sa veličinom tumora (Gonzalez i sar., 2003).

Kada su, u našem istraživanju, tumori bili podeljeni prema debljini, što je jedan od parametara potencijalne agresivnosti SCC, u grupi tumora tanjih i debljih od 2 mm nije bilo razlike u ekspresiji MCM2. S druge strane, u slučaju granica debljine 4 i 6 mm, veći broj tanjih tumora imao je manje od 50% pozitivnih ćelija i obrnuto. Poređenjem slučajeva utvrđena je statistički značajna razlika u obe grupe. Nema publikovanih radova koji su analizirali debljinu SCC kože i obim MCM2 ekspresije. U radu Gueiros i saradnika, koji su ispitivali ekspresiju MCM2 u SCC jezika, u odnosu na kliničko-patološke parametre nije utvrđena korelacija u odnosu na debljinu tumora, mada u njihovim rezultatima nisu navedene vrednosti debljine (Gueiros i sar., 2011). Ipak, zaključeno je da se ekspresija MCM2 može smatrati značajnim parametrom prognoze SCC jezika obzirom da je utvrđena korelacija sa nodalnim recidivima.

Kada je procenjavana ekspresija MCM2 pozitivnih ćelija i površina tumora, naši rezultati su pokazali da tumori manje površine u većem broju imaju manje od polovine

pozitivnih ćelija, i obrnuto - tumori veće površine češće su imali više od 50% pozitivnih ćelija. Statističkom analizom dokazano je da postoji značajna razlika, tj. da ekspresija korelira sa površinom SCC. Za sada nema studija u kojima je to ispitivano humanim neoplazmama.

Procenjivanjem obima ekspresije MCM2, semikvantitativnom metodom, prema trećinama, AK, BD i SCC rezultati su pokazali da je kod najvećeg broja AK 60 (65.9%) utvrđeno između 33-66% pozitivnih ćelija, a samo 11 slučajeva (12.1%) imalo više od 66%, za razliku od BD gde je preko 90% slučajeva imalo više od 66% pozitivnih ćelija, a samo 4 slučaja (8.0%) od 33-66% MCM2 pozitivnih ćelija. Nijedan slučaj BD nije imao manje od 1/3 pozitivnih ćelija, što je i objašnjivo činjenicom da se radi o in situ lezijama koje zahvataju čitav epiderm. Statističkom analizom dokazana je visoko značajna razlika u ovom obimu ekspresije između AK i BD, pa zaključujemo da ekspresija MCM2 proteina, i procena ekspresije u ovom obimu, može biti od značaja za IHH diferenciranje in situ lezija. Najveći broj slučajeva SCC imao je 74 (42,5%) između 33-66% pozitivnih ćelija, ali broj slučajeva sa manje od 1/3 (44-25.3%) i više od 2/3 pozitivnih ćelija nije bio drastično različit, moguće zbog činjenice da su ispitivanjem bili obuhvaćeni tumori različitih stepena diferentovanosti. Kada su grupisane intraepidermalne lezije (AK i BD) u odnosu na SCC, u obe grupe, najveći broj slučajeva, u gotovo podjednakom procentu (64-45.4% vs 74-42.5%), imalo je između 33-66% pozitivnih ćelija. Statističkom analizom utvrđena je značajna razlika u ekspresiji MCM2 kod različitih lezija, AK, BD i SCC, čak i između intraepidermalnih promena i invazivih oblika. Prema tome, ovaj obim ekspresije MCM2 proteina se može koristiti za IHH diferenciranje intraepidermalnih keratinocitnih lezija i invazivnih formi neoplazmi poreklom od ovih ćelija.

Kod tumora različitog stepena diferentovanosti, broj slučajeva sa većim brojem MCM2 pozitivnih ćelija, podeljeno na trećine, rastao je sa gradusom. Najveći broj SCC G1(33-56.9%) imao je manje od 33% pozitivnih ćelija, isti broj SCC G2, između 33-66%, a najveći broj slučajeva SCC G3 (39-67.2%) preko 2/3 MCM2 pozitivnih ćelija. Drugim rečima, bolje diferentovani timori imali su manji broj pozitivnih ćelija (u proliferaciji) i obrnuto, što je i očekivan rezultat. Statističkom analizom, utvrđena je značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM2 u odnosu na stepen diferentovanosti SCC između SCC svih gradusa, kao i kada su grupisani SCC G1 i G2 u odnosu na SCC G3.

Određivanjem obima ekspresije MCM2 proteina prema trećinama, kod tumora manjeg i većeg prečnika od 20 mm, kao pokazatelja veličine tumora, najveći broj slučajeva manjih SCC imao je od 33-66% MCM2 pozitivnih ćelija (74-42.5%), dok je

podjednak broj većih tumora (24-37.5%) imao od 33% i preko 66% pozitivnih ćelija. Statističkom analizom nije utvrđena značajna razlika, sa zaključkom da ekspresija MCM2, ni u ovom obimu, ne korelira sa veličinom SCC.

Najveći broj SCC i tanjih i debljih od 2 mm (9-45.0% vs 65-42.2%) i tanjih i debljih od 6 mm (52- 40.0% vs 22-50.0%) imao je između 33 i 66% MCM2 pozitivnih ćelija. U oba slučaja nije bilo statistički značajne razlike. Za razliku od toga, kod tumora tanjih od 4 mm najveći broj (39-45.9%) je imao od 33-66%, a debljih od 4 mm više od 2/3 MCM2 pozitivnih ćelija. Statističkom analizom utvrđena je značajna razlika u ekspresiji MCM2 prema trećinama pozitivnih ćelija kod tumora debljih i tanjih od 4 mm.

U slučaju grupisanja tumora prema površini, čija vrednost može govoriti o agresivnosti, SCC identične prosečne vrednosti površine imali su tumori sa manje od 33%, kao i između 33-66% pozitivnih ćelija. Statistički nije utvrđena značajna razlika u ekspresiji MCM2, procenjivano prema trećinama pozitivnih ćelija u odnosu na površinu tumora, tako da nema korelacije u ekspresiji MCM 2 i prema ovom pokazatelju ponašanja tumora.

Kompletna analiza obima ekspresije MCM2 proteina u odnosu na tip lezije, KIN klasifikaciju i prognostičke parametre SCC pokatala je slične rezultate primenom 50% i 33%-66% graničnih vrednosti broja pozitivnih ćelija, ali je primena 50% granične vrednosti dobijena statistički značajna povezanost sa više potencijalno značajnih prognostičkih karakteristika.

Imunopozitivnost MCM5 je bila utvrđena kod svih slučajeva AK, BD SCC, a distribucija je, kao i kod MCM2, u najvećem broju AK bila bazalna (66 – 72.5%), dok su lezije BD imale najveći broj slučajeva sa difuznom distribucijom (45-90%). Ovakav raspored pozitivnih ćelija je u skladu sa morfološkim karakteristikama i većim brojem proliferišućih keratinocita od AK ka BD. Kod invazivnih tumora, periferna i difuzna distribucija bile su zastupljene u sličnom broju slučajeva (90 – 51.7%, odnosno 84 – 48.3%), najverovatnije zbog tumora različitog stepena diferencijacije koji su bili obuhvaćeni u ispitivanoj grupi. Centralna distribucija nije bila uočena ni kod jednog SCC.

Statističkom analizom utvrđena je visoko značajna razlika između pojedinačnih dijagnoza tj. tipa lezija, kao i kada su grupisane AK i BD kao intraepidermalne lezije u odnosu na SCC. Kada su analizirani slučajevi sa difuznom distribucijom u odnosu na sve ostale (ne-difuzno), razlika između pojedinačnih entiteta (AK, DB i SCC) je i dalje postojala, ali nije bila značajna između grupe intraepidermalnih promena u odnosu na invazivne forme, identično kao i u slučaju MCM2 proteina.

I u radu Freeman i saradnika, kod kojih je ispitivana ekspresija MCM5 proteina u normalnoj koži (2 uzorka), psorijazi (3 slučaja), AK (1 slučaj), BD (5 slučajeva) i SCC (13 slučajeva), prezentovani su slični rezultati. Naime, u njihovom istraživanju, kod AK nuklearno bojenje uočeno je kod 40% ćelija, pretežno u donjim delovima epiderma, a kod BD, bilo je 90% pozitivnih ćelija čitavom debljinom epiderma (Freeman i sar.,1999). U studiji Liu i saradnika, ispitivana je ekspresija MCM5 u koži, a procenjena kod normalne kože i različitih kutanih lezija (psorijaze, Bowenoidne papuloze, BD, SCC i BCC). Vršena je semikvantitativna evaluacija, a broj pozitivnih ćelija izražavan je računanjem LI (procenat pozitivnih ćelija izražavan je kao odnos pozitivnih ćelija, u polju najvećeg broja pozitivnih ćelija, minimum 200, prema ukupnom broju ćelija). Prema njihovim rezultatima MCM5 ekspresija u normalnoj koži bila je ograničena na bazalni sloj i susedne ćelije suprabazalnog sloja, što je u skladu sa ulogom MCM5 proteina kao proliferativnog markera, koji je bio ekspresivan samo u mitotski aktivnim ćelijama. Kod BP i BD ekspresija je uočena difuzno, u čitavom epidermu, identično našim rezultatima. U slučaju SCC lezija MCM5 pozitivne ćelije bile su uočene u različitim delovima tumorskih plaža, u zavisnosti od stepena diferencijacije SCC (Liu i sar., 2007).

Budući da nema drugih publikovanih studija ekspresije MCM5 u in situ i invazivnom SCC kože, dobijeni rezultati su upoređivani sa drugim tumorima, pre svega poreklom od pločasto-slojevitog epitela, zbog analogije sa promenama u epidermu. U radu Scott i saradnika, ispitivana je MCM5 pozitivnost u ćelijama briseva usne duplje i to

kod 23 slučaja normalne mukoze (NM), benignih proliferativnih lezija (BPL), lezijama blage displazije (LBD) kao i 33 SCC. Čelije NM, BPL i LBD bile su MCM5 negativne, ali su svi slučajevi SCC bili MCM5 pozitivni, ukazujući da procena MCM5 imunopozitivnosti omogućava detekciju malignih ćelija i da na taj način može doprineti dijagnostici invazivnog SCC bez biopsije. (Scott i sar., 2006) U radu Scarpini i saradnika ispitivana je ekspresija MCM5 u normalnom epitelu anusa, analnoj intraepidermalnoj neoplaziji (AIN) i analnom SCC. Distribucija MCM5 se menjala od bazalne, preko srednjih do površnih slojeva i bila značajno izraženija u gornjim delovima kako se epitel menjao od normalnog do invazivnog SCC, tj kako se menjala histopatološka dijagnoza (Scarpini i sar., 2008). U radu Ayaru i saradnika ispitivana je ekspresija MCM5 proteina u normalnom benignom i malignom biliarnom i pankreatičnom tkivu i to semikvantitativnom determinacijom pozitivnih ćelija. U benignim bilijarnim strukturama ekspresija je bila ograničena na bazalnu proliferativnu zonu, za razliku od malignih lezija, gde su se pozitivne ćelije nalazile u svim slojevima tkiva (Ayary i sar., 2008).

Kod intaepidernalnih lezija, klasifikovanih kao KIN, bazalna distribucija je dominirala, u značajnom broju KIN1 lezija (44 – 88.0%), u nešto manjem kod KIN2 (22 – 55.0%), gde je bilo uočeno nešto više slučajeva sa difuznom distribucijom 14 (35.5%), koja se, pak, predominantno nalazila kod KIN3 lezija (46 – 90.2%). Kada su grupisane KIN1+KIN2 bazalna distribucija bila je dominantno izražena (66 – 73.3%). Statističkom analizom, utvrđena je značajna razlika u distribuciji MCM5 pozitivnih ćelija između KIN lezija pojedinačno, kao i između lezija koje su zahvatale 2/3 epiderma (KIN1+KIN2) u odnosu na one sa pozitivnim ćelijama u čitavom epidermu (KIN3). I u slučaju grupisanja KIN lezija na one sa difuznom u odnosu na sve ostale (ne-difuzna distribucija) razlika je bila statistički veoma značajna. Freeman i saradnici uočili su da je ekspresija MCM5 proteina kod normalnog cervikalnog epitela ograničena na bazalni (proliferativni) sloj, a odsutna kod terminalno diferenciranih keratinocita u superficijalnim slojevima (Freeman i sar., 1999). Sa druge strane, kod cervikalne intraepitelijalne neoplazije (CIN) gde se proliferativni ćelijski slojevi povećavaju sa većom histološkim gradusom, MCM5 pozitivne ćelije nalazile su se u površnijim slojevima lezija (Freeman i sar., 1999). Davidson i saradnici ispitivali su distribuciju MCM5 proteina u VIN lezijama (3 VIN1, 8 VIN2 i 20 VIN3) kao i u normalnom epitelu (6). Pozitivnost je su izražavana kao procenat pozitivnih ćelija u odnosu na 1000 ćelija u tri vidna polja, a distribucija ocenjivana od bazalnog sloja ka površnijim slojevima. Prema njihovim rezultatima, u VIN1 slučajevima MCM5 pozitivne ćelije su se nalazile samo u suprabazalnim epitelnim

slojevima, kod VIN2 u suprabazalnim i u površnijim slojevima, dok su u slučaju VIN3 bile distribuirane čitavom debljinom epitela, slično našim rezultatima u slučaju KIN3 lezija (Davidson i sar., 2003). U studiji Going i saradnika ispitivana je ekspresija MCM5 proteina u nedisplastičnom skvamoznom epitelu ezofagusa (NDSEE) i displastičnom skvamoznom epitelu ezofagusa (DSEE). MCM5 pozitivne ćelije kod NDSEE bile su uočene u suprabazalnom sloju, dok su se pozitivne ćelije kod DSEE nalazile i u površnijim slojevima (Going i sar., 2001). U radu Scarpini i saradnika ispitivana je ekspresija MCM5 analnoj intraepidermalnoj neoplaziji (AIN), gradirano kao AIN1 (20), 2 i 3 (22). Distribucija MCM5 bila je izraženija od bazalnog ka superficijalnim slojevima i korelirala je sa AIN gradusom (Scarpini i sar., 2008).

Kao što je pomenuto u delu o distribuciji MCM5 prema histopatološkim dijagnozama, generalno kod SCC su bile zastupljene periferna i difuzna distribucija MCM5 pozitivnih ćelija. Kada je, pak, distribucija MCM5 bila posmatrana u odnosu na stepen diferentovanosti tumora, uočeno je da su bolje diferentovani tumori imali dominantno periferno raspoređene MCM5 pozitivne ćelije (53 – 91.4%), ali se distribucija menjala u difuznu kod umereno (30 – 51.7%) i slabije diferentovanih SCC (49 – 84.5%). Dakle, MCM5 proliferativni marker moguće je upotrebiti za IHH procenu gradusa tumora, kao pokazatelja njegove agresivnosti. Liu i saradnici su takođe procenjivali ekspresiju MCM5 u odnosu na gradus SCC. Prema njihovim rezultatima, ekspresija je uočena u svim slojevima tumorskih gnezda kod umereno i slabo diferentovanih SCC, osim u centru keratinskih fokusa. U slučaju dobro-diferentovanih SCC, bilo je nebojenih ćelija (bez ekspresije MCM5) u blizini keratinskih perli (Liu i sar., 2007).

Dimenzije tumora su u korelaciji sa stepenom njegove agresivnosti i invazivnog potencijala. Iz tog razloga, upoređivana je distribucija proliferativnog markera MCM5 prema SCC definisanih dimenzija prečnika manje i više od 20 mm. Iako je periferni tip distribucije bio izraženiji kod manjih (61 – 55.5%), a difuzni kod većih SCC (35 – 54.7%), ta razlika nije imala statističku značajnost. U tom smislu nije dokazana korelacija MCM5 i dimenzija SCC. U literaturi nema publikacija u kojima je procenjivana distribucija MCM5 pozitivnih ćelija u odnosu na dimenzije SCC.

Veći broj SCC debljine do 2 mm (3 – 65.0%) imao je periferno distribuirane MCM5 pozitivne ćelije dok su tumori deblji od 2 mm u podjednakom broju (77 – 50.0%) imali perifernu i difuznu distribuciju MCM5 pozitivnih ćelija. Statističkom analizom nije utvrđena razlika u ekspresiji MCM5 između ovako podeljenjih tumora. Sa druge strane, u

slučaju tumora debljine do 4 mm veći broj je pokazao perifernu distribuciju MCM5 (56 – 65.9%), kao i kod granične vrednosti 6 mm (76 – 58.5%), dok je distribucija kod tumora debljih od 4 mm (55 – 61.8%), odnosno 6 mm (30 – 68.2%) bila difuzna. U oba slučaja postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji ovog proteina, prema debljini tumora. Ovakav rezultat se u potpunosti podudara sa rezultatima u slučaju MCM2 proteina, što ukazuje da proliferativni kapacitet neoplastično transformisanih keratinocita korelira sa debljinom tumora ali ne za tanje tumore (granična vrednost 2 mm), što može ukazivati na povezanost MCM5 ekspresije sa karakteristikama SCC koje se vižaju kod tumora agresivnijeg biološkog ponašanja. Za sada nema publikovanih radova u kojima je procenjena distribucija MCM5 u odnosu na debljinu tumora.

U slučaju distribucije MCM5 pozitivnih ćelija prema površini tumora, SCC manje površine imali su češće periferno raspoređene MCM5 pozitivne ćelije, za razliku od onih sa većom površinom kod kojih je dominirala difuzna distribucija. Ni ovaj potencijalni parametar tumorske agresivnosti nije do sada ispitan u odnosu na distribuciju MCM5 pozitivnih ćelija. Kod promena klasifikovanih kao KIN, lezije manje površine imale su bazalnu MCM5 distribuciju, dok su veće imale difuznu, ali su promene sa najvećom površinom imale suprabazalno raspoređene MCM5 pozitivne ćelije. Statistička analiza nije pokazala značajnu razliku, tj. korelaciju distribucije MCM5 kod KIN lezija. Međutim, u slučaju grupisanja slučajeva sa difuznom distribucijom, u odnosu na ostale forme distribucije (ne-difuzno), promene manje površine imale su u većem broju ne-difuzno raspoređene ćelije, dok je kod lezija veće površine uočena difuzna distribucija u većem broju slučajeva. Statistički, utvrđena je razlika i korelacija distribucije prema površini KIN lezija. Nema studija u kojima je na ovaj način analizirana distribucija MCM5 proliferativnog markera kod neoplazmi ograničenih na epiderm u kozi ili epitel u drugim organima.

Kada je procenjivan obim ekspresije MCM5, uočeno je da je najveći broj AK (62 – 68.1%) imao manje od 50% MCM5 pozitivnih ćelija, a da su gotovo svi slučajevi BD (49 – 98.0%) imali preko 50%. U slučaju SCC neznatno veći broj (101 – 58.0%) je imao više od 50%. Statističkom analizom utvrđena je značajna razlika u ovom obimu ekspresije između AK, BD i SCC. I u radu Freeman i saradnika, broj pozitivnih ćelija bio je značajno veći kod BD i SCC, nego kod (Freeman i sar., 1999). U studiji Liu i saradnika, procenat pozitivnih MCM5 ćelija kod BD bio je 83.8%. Takođe, utvrđena je statistički značajna razlika u ekspresiji MCM5 između BD i BP, uz zaključak da MCM5 protein predstavlja koristan marker proliferacije u koži (Liu i sar., 2007). Osim u lezijama kože,

ekspresija MCM5 ispitivana je i u drugim organima. U radu Ayaru i saradnika, u normalnom, benignom i malignom biliarnom i pankreatičnom tkivu, ekspresija je bila je ekstremno niska u normalnom pankreatičnom i bilijarnom tkivu, a značajno viša u malignom tkivu, statistički značajno različita (Ayary i sar., 2008). U radu Gakiopoulou, ispitivana je ekspresija MCM5 kod 43 kancera ovarijuma niskog malignog potencijala i 85 adenokarcinoma. Ekspresija je izražavana kao procenat pozitivnih ćelija (LI) u odnosu na ukupan broj izbrojanih tumorskih ćelija u preparatu (oko 1000). LI MCM5 je bio značajnije veći kod adenokarcinoma u odnosu na tumore nižeg stepena maligniteta. (Gokiopoulou i sar., 2007). U studiji Ferenc i saradnika ispitivana je ekspresija MCM5 na TMA uzorku kod 32 dezmoidnih tumora. Slučajevi su karakterisani kao pozitivni ukoliko je bilo preko 5% pozitivnih ćelija. Pozitivnost se izražavala kao procenat pozitivnih ćelija, LI, odnos pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija izbrojan kod svakog slučaja in 10 high-power fields na uveličanju 40x. Prema njihovim rezultatima MCM5 ekspresija nije uočena ni kod jednog tumora ukazujući na nisku mitotsku aktivnost dezmoidnih tumorskih ćelija, s obzirom da je dezmoid-type fibromatoza klonalna proliferacija dubokog mekog tkiva koja se karakteriše infiltrativnim rastom i tendencijom ka lokalnoj rekurenciji, ali ne i sposobnosti metastaziranja (Ferenc i sar., 2010). U radu Guida i saradnika uočena je povećana ekspresija MCM5 proteina u anaplastičnom tireoidnom kanceru za razliku od normalnog tireoidnog tkiva i papilarnog tireoidnog kancera (Guida i sar., 2005). Williams i saradnici koristili su imunofluorometrični esej za detektovanje nivoa MCM5 u ćelijama izolovanim iz gastričnog aspirata kod 40 pacijenata nakon gastroskopije u slučajevima suspektinih ili potvrđenih ezofagealnih karcinoma ili simptoma dispepsije. Ovim testom su, sa visokom specifičnošću i senzitivnošću, razlikovani pacijenti sa ili bez kancera, s obzirom da je uočena povišena vrednost MCM5 u gastričnom aspiratu, kod pacijenata sa ezofagealnim kancerom. Imajući u vidu razliku u nivou MCM5 u slučaju malingne i nemalingne (benigne) bolesti utvrđenu u ovoj studiji, zaključeno je da je ovim načinom moguće detektovati i male lezije u ranom stadijumu SCC ezofagusa, tj. da je u tom smislu moguće koristiti MCM5 proteina, ali da je neophodan veći broj slučajeva radi determinacije da li se ovaj test može koristiti kao dijagnostički skrining test za detekciju ranih, izlečivih tumora (Williams i sar., 2004). U radu Mukherjee i saradnika ispitivana je MCM5 pozitivnost u uzorcima cervikalnog brisa kod žena koje su rutinski pregledane (404) i koje su kontrolisane jer su prethodno imale SCC (51). Od 404 žena nalaz cervikalnog brisa pokazao je pozitivnost u 16 slučajeva, a potom je histopatolški potvrđeno da kod svakog od ovih slučajeva postoji maligna

transformacija (neoplazma) i to u 6 slučajeva CIN1-3, u jednom slučaju adenokarcinomom, kod 9 slučajeva SCC. Sa druge strane, kod 51 žene koje su primarno imale SCC, 40 je bilo MCM5 negativno, dok je u 3 slučaja histološki potvrđen SCC. Senzitivnost i specifičnost imunohistohemijskog MCM5 testa bila je visoka, bez lažno negativnih rezultata, dokazujući korisnost MCM imunohistohemije kao značajne tehnike za dijagnostikovanje cervikalnih kancera ali i pre-kancerskih stanja (Mukherjee i sar., 2007).

Kod promena klasifikvanih kao KIN, broj pozitivnih ćelija rastao je od KIN1 ka KIN3. Više slučajeva KIN1 (41 – 82.0%), u nešto manim broju KIN2 (21 – 52.5%) su imali su manje od od 1/2 pozitivnih ćelija, dok su gotovo sve promene KIN 3 imale više od 50% pozitivnih ćelija (50 – 98.0%). I lezije grupisane na one kod kojih je do 2/3 epiderma zahvaćeno neoplastičnim ćelijama (KIN1+KIN2) imale su procentualno najviše lezija sa manje od 50% pozitivnih ćelija (62 – 68.9%), a samo 1 KIN3 lezija (2.0%) je imunopozitivnost manje od 50% ćelija. U oba slučaja, utvrđena je statistički značajna razlika u ekspresiji MCM 5 kod KIN lezija. Ovakav rezultat potvrđuje da je obim ekspresija MCM5 koristan za diferenciranje i gradaciju KIN lezija, kao i MCM2. Davidson i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM5 u VIN lezijama (3 VIN1, 8 VIN2 i 20 VIN3) kao i u normalnom epitelu (6). Pozitivnost je su izražavana kao procenat pozitivnih ćelija u odnosu na 1000 ćelija u tri vidna polja. Procenat MCM5 pozitivnih ćelija rastao je i u ovom slučaju rastao od VIN1 ka VIN 3 lezijama (44.2%, 85.1% i 94.1%) i uočena je statistički značajna razlika u ekspresiji MCM5 proteina uz zaključak da je ekspresiju ovog proteina moguće koristiti za bolju dijagnostiku VIN (Davidson i sar., 2003). Slično, Murphy i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM5 u CIN lezijama i utvrdili linearnu korelaciju ekspresije ovog proteina i gradusa displazije (Murphy i sar., 2005).

Kada je procenjivan obim ekspresije kod SCC različitog stepena ćelijske diferentovanosti broj MCM5 pozitivnih ćelija je rastao sa povećanjem gradusa tj. smanjanjem diferentovanosti tumora. Manje od 1/2 pozitivnih ćelija imalo je 49 – 84% dobro diferentovanih tumora. Tumori slabije i veoma loše diferentovani imali su u većem broju više od 50% pozitivnih ćelija (41 – 70.7% vs 51 – 87.9%). Visoko statistički značajna razlika u ekspresiji MCM5 markera proliferacije, između SCC različitog gradusa potvrđuje da kod slabije diferentovanih tumora postoji nalazi veći broj ćelija u procesu proliferacije, i da MCM5 može biti od koristi u dodatnom IHH određivanju gradusa SCC, kao i u slučaju MCM2 proteina. I u radu Freeman i saradnika, kod kojih je ispitivana ekspresija MCM5 proteina kod 13 SCC različitog gradusa, utvrđeno je

povećanje ekspresije ovog proteina od dobro, preko srednje do slabo diferentovanih tumora (Freeman i sar., 1999). U studiji Liu i saradnika, umereno i slabo diferentovani tumori imali su sličnu učestalost MCM5 pozitivnih ćelija, dok je kod dobro diferentovanih procenat bio manji. Izražena numerički, ekspresija MCM5 pozitivnih ćelija iznosila je 63.5% kod dobro diferentovanih, 77.5% kod umereno diferentovanih, a 79.8% slabo diferentovanih SCC (Liu i sar., 2007). Osim u koži ekspresija MCM5 u odnosu na gradus tumora ispitivana je i u drugim organima. U studiji Gakiopoulou i saradnika, ispitivana je ekspresija ovog proteina kod 43 kancera ovarijuma niskog malignog potencijala i 85 adenokarcinoma. Adenokarcinomi su bili stratifikovani prema gradusu tumora i ekspresija je, kao i u slučaju naših rezultata, bila veća kod tumora većeg gradusa tj. lošije diferentovanih tumora (Gakiopoulou i sar., 2007). U studiji Gigantis i saradnika, rezultati nisu bili identični kao i našoj. Ispitivano 96 kolorektalnih kancera, ekspresija je bila izražavana kao LI, procenat pozitivnih ćelija (odnos pozitivnih u odnosu na minimum 1000 ćelija po jednom slučaju). Tumori su prema histološkom gradusu bili podeljeni na dobro, srednje i slabo-diferentovane, a takođe gradirani prema Dukes klasifikaciji na A, B, C i D grupu. Prema njihovim rezultatima nije bilo značajne korelacije u ekspresiji ovog proteina u odnosu na sa Dukes stadijum i histološki gradus kolorektalnih kancera (Giaginis i sar., 2009)

U slučaju procene dimenzija tumora, SCC prečnika do i preko 20 mm, veći broj slučajeva imao je više od 50% pozitivnih ćelija, pa statistika analiza nije pokazala značajnost. Nema publikovanih studija sa analizom MCM5 ekspresije u odnosu na dimenzije tumora.

U ekspresiji MCM5 proteina kod tumora različite debljine, iako je veći broj tumora debljine do 2 mm imao manje od 50% MCM5 pozitivnih ćelija (12 – 60.0%), a debljih od 2 mm više od 50% (93 – 60.4%), statistička analiza nije pokazala značajnu razliku. Kada su korišćene granične vrednosti 4 mm i 6 mm, deblji tumori su značajno češće pokazivali više od 50% pozitivnih ćelija postoji što navodi na zaključak da je donja granica 4 mm, a posebno 6 mm debljine adekvatnija u proceni agresivnijeg ponašanja. Nema publikovanih radova sa ovim tipom poređenja MCM5 ekspresije.

U slučaju rezultata ekspresije MCM5 prema površini SCC, u ovom radu, iako su tumori manje površine ekprimovali manje pozitivnih ćelija i obrnuto, to nije imalo statističku značajnost. Ovakav rezultat je drugačiji u odnosu na ekspresiju MCM2 proteina prema ovom tipu procene agresivnije prirode SCC. Ne postoji nijedan rad koji je analizirao površinu SCC u odnosu na MCM5 ekspresiju, ali razlika uočena za MCM2 i

MCM5 protein može biti indikator razlika u njihovom uticaju na rast tumora, što je potrebno ispitati u većem broju tumora različitog porekla.

U slučaju ispitivanih promena klasifikovanih kao KIN, svi slučajevi KIN3 imali su više od 50% MCM5 pozitivnih ćelija. Kod ostale dve grupe, broj pozitivnih ćelija, rastao je sa porastom površine promena. Statističkom proverom uvrđena je značajna razlika u ekspresiji MCM5 proteina u odnosu na površinu KIN1 i KIN2 lezija. Dakle, kod intraepidermalnih promena, za razliku od invazivnog SCC, ekspresija MCM5 proteina korelira sa površinom i tipom lezija, što može biti posledica različitih mehanizama rasta in situ lezija (veća površina) u odnosu na invazivne (veća debljina) uz povećan proliferativni kapacitet ispoljen preko više MCM5 imunopozitivnosti. Za sada nema publikovanih radova u kojima je na ovaj način ispitivana ekspresija MCM5 proliferativnog proteina.

Kada je, semikvantitativno procenjivana pozitivnost MCM5 ćelija prema trećinama, i kod AK i SCC najveći broj slučajeva imao je između 33-66% pozitivnih ćelija, a BD preko 66%. Statističkom analizom, razlika u ekspresiji između ova tri entiteta bila je visoko značajna. Sa druge strane, kada je upoređivana grupa intraepidermalnih lezija u odnosu na invazivne promene, razlika u ekspresiji nije pokazala statistički značajnu razliku, uz zaključak da ovaj obim ekspresije MCM5 nije koristan za IHH

Kod promena gradiranih kao KIN, iako su i KIN1 i KIN2 imale najveći broj slučajeva sa 33-66% MCM5 pozitivnih ćelija, njihov broj se smanjivao od 40 – 80.0% KIN1 do 18 – 45.0% KIN2. U slučaju KIN3 promena očekivano, najveći broj slučajeva imao je preko 66% MCM5 pozitivnih ćelija. Ova ekspresija MCM5 proteina, bila je statistički značajno različita između KIN lezija pojedinačno, kao i kada u bile grupisane lezije sa zahvatanjem dela epiderma (gde je najveći broj slučajeva 58 – 64.4% imao između 33-66%,) u odnosu na KIN3 koje su najčešće imale preko 66% (45 – 88.2%). Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima MCM2 proteina, što ukazuje da je ekspresija oba proliferativna markera i u ovom obimu može biti od značaja za gradiranje ovih lezija.

U proceni obima ekspresije MCM5 pozitivnih ćelija prema stepenu diferentivanosti SCC, broj pozitivnih ćelija rastao je sa porastom gradusa tumora, pa su dobro diferentovani SCC najčešće imali manje od 33% pozitivnih ćelija (32 – 55.2%), umereno diferentovani od 33-66% (27 – 46.6%), a slabo diferentovani preko 66% pozitivnih ćelija. Ovakav rezultat, identičan kao i kod MCM2 proteina, u kome ekspresija markera proliferacije korelira sa lošijom diferencijacijom SCC u skladu je povećanim proliferativnim kapacitetom slabije diferentovanih tumora.

U slučaju obima ekspresije i dimenzija tumora, SCC prečnika do i preko 20 mm, u obe grupe bilo je više tumora sa više od 66% pozitivnih MCM5 ćelija (34 – 48.6% vs 27 – 58.7%) i razlika nije bila statistički značajna, tako da ekspresija MCM5, ni u ovom obimu ne korelira sa veličinom SCC, kao prognostički parametrom.

Kod grupisanja tumora prema debljini i proceni ekspresije MCM5, bilo je tri grupe tumora sa granicama 2 mm, 4 mm i 6 mm. Prema rezultatima, statističkom analizom ni u jednoj od grupa nije utvrđena značajna razlika u ekspresiji MCM5 proteina kod tumora razlilite debljine, za razliku od podele tumora sa graničnom vrednošću pozitivnih ćelija 50%, što govori i da metoda semikvantitativne procene imunopozitivnosti utiče na upotrebljivost dobijenih rezultata u proceni agresivnosti SCC.

U proceni obima ekspresije MCM5 semikvantitativno prema trećinama, u odnosu na površinu SCC kao eventualnog pokazatelja faktora agresivnosti, tumori najmanje površine imali su od 33-66% pozitivnih ćelija, a najveće površine više od 66% pozitivnih MCM5 ćelija. Satistička analiza pokazala je značajnu razliku u ekspesiji MCM5 prema površini SCC. U slučaju procene ovog obima ekspresije MCM5 u odnosu na lezije klasifikovane kao KIN, u odnosu na površinu, promene najmanje vrednosti površine imale su 33-66% pozitivnih ćelija, KIN lezije većom vrednošću površine manje od 33% pozitivnih ćelija, dok su slučajevi lezije sa najvećom vrednošću površine imale više od 66% MCM5 pozitivnih ćelija i razlika među njima bila je satistički značajna. Dakle, granične vrednosti od 66% su bolje korelirale sa površinom tumora od podele na nivou 50% pozitivnih ćelija. Budući da ne postoji nijedna studija koja je analizirala površinu tumora u odnosu na MCM5 ekspresiju, neophodno je dalje ispitivanje u cilju utvrđivanja značaja ovog odnosa za ponašanje tumora različitih lokalizacija.

Procenom distribucije pozitivnih ćelija, uočen je isti obrazac kao i kod prethodna dva proteina. Naime, kod AK, dominirana je bazalna distribucija pozitivnih ćelija (63 – 69.2%), kod BD difuzna (43 – 86.0%), dok je kod SCC bila gotovo podjednako zastupljena periferna (91 – 52.3%) i difuzna distribucija (83 – 47.7%), bez centralne distribucije. Statističkom analizom utvrđena je visoko značajna razlika između pomenutih dijagnoza, kao i kada su grupisane AK i BD kao intraepidermalne lezije u odnosu na SCC. Kada su analizirani slučajevi sa difuznom distribucijom u odnosu na sve ostale (nedifuzno), razlika između pojedinačnih entiteta (AK, DB i SCC) je idalje postojala, ali nije bila značajna između grupe intraepidermalnih promena u odnosu na invazivne forme, identično kao i u slučaju MCM2 i MCM5 proteina.

MCM7 do sada nije ispitivan u keratinocitnim tumorima kože, ali jeste u melanocitnim lezijama gde nije ustanovljeno postojanje razlike između uobičajenih i displastičnih nevusa, i malignog melanoma (Gambichler i sar., 2009). U slučaju skvamocelularnih lezija drugih tkiva, Tamura i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM7 kod oralne displazije i oralnog SCC (OSCC). Analizirano je 10 neizmenjenih oralnih epitela, 50 displazija i 113 OSCC. U neizmenjenom epitelu pozitivne ćelije bile su ograničene na bazalni i suprabazalni slojev, dok su se kod displazije pozitivne ćelije nalazile u bazalnom i spiniznom sloju. Kod OSCC bila je zastupljena periferna ili nespecifična distribucija ovog proteina (Tamura i sar., 2010). U radu Padmanabhan i saradnika procenjivana je ekspresija MCM7 u tkivu prostate i to benignom epitelu, intraepitelnoj neoplazmi prostate (engl. prostate intraepithelial neoplasia, PIN) i adenokarcinomu. Rezulati su pokazali veću ekspresiju MCM7 u bazalnim ćelijama benignog epitela, PIN i epitelijalnim tumorskim ćelijama adenocarcinoma, ali ne i u benignim luminalnim epitelijalnim ćelijama. Na osnovu ovakvog nalaza zaključeno je da MCM7 može predstavljati dobar diskriminatorni marker proliferacije između benignog epitela, PIN i invazivnog adenokacinoma (Padmanabhani i sar., 2004).

I u ovoj kategoriji, identično kao i u slučaju prethodna dva proteina, kod KIN1 i KIN2 dominirala je bazalna distribucija, ali opadajućem procentu slučajeva (41 – 82.0%) vs (22 – 55.0%), dok je kod KIN3 lezija difuzna distribucija bila dominantno zastupljena, kod najvećeg broja lezija (45 – 88.2%). Kada su grupisane KIN1+KIN2 i u ovoj grupi, najveći broj slučajeva imao je bazalnu distribuciju MCM7 pozitivnih ćelija (22 – 55.0%), za razliku od difuzne kod KIN3 (45 – 88.2%) Statističkom analizom, utvrđena je visoko značajna razlika u distribuciji MCM7 pozitivnih ćelija između KIN lezija pojedinačno, kao i između lezija koje su zahvatale 2/3 epiderma (KIN1+KIN2) u odnosu na one sa

pozitivnim ćelijama u čitavom epidermu (KIN3). I u slučaju grupisanja KIN lezija na one sa difuznom u odnosu na sve ostale (ne-difuzna distribucija), razlika je bila statistički veoma značajna, kao i poređenjem onih KIN koje nisu zahvatale čitav epiderm i in situ lezija. Dakle, koristeći rezultate distribucije MCM7, a posebno uzevši u obzir da su identični rezultati dobijeni i u slučaju MCM2 i 5 proteina, možemo da kažemo da distribucija MCM proteina korelira sa morfološkim karakteristikama intreepidermalnih keratinocitnih neoplastičnih lezija i da može biti od koristi za njihovu dopunsku IHH dijagnostiku. Freeman i saradnici su uočili da je ekspresija kod normalnog cervikalnog epitela ograničena na bazalni (proliferativni) sloj, a odsutna kod terminalno diferenciranih keratinocita u superficijalnim slojevima (Freeman i sar., 1999). Sa druge strane, kod premaligne cervikalne intraepitelijalne neoplazije (CIN) proliferativni ćelijski slojevi su se povećavaju sa većim histološkim gradusom, što je dovelo do pojave MCM7 pozitivnih ćelija u površnijim slojevima lezija (Freeman i sar., 1999). U radu Kreuter i saradnika ispitivana je ekspresija MCM7 proteina kod analne intraepitelijalne neoplazije (AIN) u cilju rane dijagnostike AIN i prevencije razvoja analnog kancera kod 49 HIV pozitivnih pacijenata. Ispitivana je ekspresija MCM7 (pored MCM3, MCM4, MCM6) u normalnoj/neizmenjenoj mukozi, i analnoj displaziji niskog i visokog gradusa. AIN je histološki gradirana u 3 grupe različitog stepena maligniteta (ograničeno na donju trećinu, donje dve trećine i čitavom deljinom epitela. AIN 1 je označena kao displazija niskog stepena maligniteta (low-grade), a AIN2-3 analna displazija visokog stepena maligniteta (high-grade). Ekspresija je procenjivana kvantitativno kao procenat pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija u vidnom polju. Određivana je senzitivnost i specifičnost, a procenat pozitivnih ćelija rangiran kao 25%, 50% i 75% imunopozitivnih ćelija. Ispitivano je 49 uzoraka (8 AIN1, 10 AIN2 i 14 AIN3). U slučaju normalne mukoze MCM7 pozitivne ćelije bile su ograničene na bazalni sloj. Progresijom lezija odlezija nižeg ka višem gradusu, tj. stepenu maligniteta, MCM7 ekspresija se povećavala od bazalnog, preko srednjih do superficijalnih (površnih) slojeva, a značajna statistička razlika u ekspresiji utvrđena je između normalne mukoze i AIN1, normalne mukoze i AIN2-3, kao i između AIN1 i AIN2-3 i zaključeno je da je MCM7 protein dobar IHH marker za dodatnu dijagnostiku analne displazije visokog stepena maligniteta (Kreuter i sar., 2009).

U ovoj studiji, distribucija MCM7 proteina menjala se u odnosu na stepen diferentovanosti SCC od periferne kod dobro diferentovanih tumora (53 – 91.4%), do difuzne kod slabo diferentovanih SCC (49 – 84.5%), dok je podjednak broj srednje

diferentovanih tumora pokazao perifernu i difuznu distribuciju (29 – 50%). Statistički značajna razlika u distribuciji u odnosu na stepen diferentovanosti SCC, kao i poređenjem dobro i srednje diferentovanih tumora u odnosu na slabo diferentovane, ukazuje da se distribucija MCM7, koja se menja sa stepenom diferentovanosti tumora, samim tim sa agresivnim ponašanjem i invazivnošću tumora, u tom smislu može koristiti u dodatnoj IHH analizi, kod morfološki nedovoljno jasnih lezija, i da ju je, stoga, moguće koristiti u proceni biološkog ponašanja tumora. Uz to, činjenica da su rezultati distribucije u odnosu na diferentovanost tumora identični kao i kod MCM2 i MCM5, dodatno potvrđuje značaj MCM proteina kao novih (značajnih) biomarkera u procenivanju ove vrste tumora. Samo u jednom radu do sada, Timura i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM7 u odnosu na gradus tumora i to kod 113 oralnih SCC (OSCC). Kod dobro i srednje diferentovanih OSCC distribucija MCM7 dominirala je u perifernim delovima tumora, dok kod slabo diferentovanih tumora nije bilo specifične distribucije pozitivnih ćelija (Timura i sar., 2010).

Kao i u slučaju MCM2 i MCM5, dimenzije tumora nisu bile u korelaciji sa distribucijom MCM7. Iako su tumori manjih dimenzija u većem broju slučajeva imali perifernu (62 – 56.4%), a veći difuznu (48 – 43.6%) distribuciju pozitivnih ćelija razlika nije bila statistički značajna. Do sada nema publikovanih radova koji bi poredili dimenzije tumora i MCM7 distribuciju.

U slučaju procene distribucije MCM7 proteina kod invazivnih SCC različite debljine, tumori debljine do 2 mm imali su dominantno periferno raspoređene MCM7 pozitivne ćelije (20 – 65%), dok je među debljim tumorima gotovo podjednak broj imao perifernu i difuznu distribuciju (78 – 50.6% vs 76 – 49.4%). Kako nije potvrđena statistički značajna razlika u distribucija MCM7, granica od 2 mm u debljini SCC ne korelira dobro sa ekspresijom MCM proteina kao proliferativnih markera. Za razliku od toga, kada je granica debljine SCC bila 4 mm i 6 mm, u oba slučaja tanji tumori pokazali su u većem broju slučajeva perifernu distribuciju MCM 7 (u prvoj grupi 57 – 67.1%, u drugoj 77 – 59.2%), a tumori deblji od 4 i 6 mm dominantno difuznu (prva grupa 55 – 61.8, druga 30 – 68.2%). Takođe, u oba slučaja, utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji MCM7 u odnosu na debljinu SCC. U tom smislu, možemo reći da postoji korelacija distribucije MCM7 i SCC debljine 4 mm i više. Ni za ova poređenja nema literaturnih podataka.

Procenom distribucije MCM7 prema površini tumora, uočeno je da SCC manje površine imaju perifernu, a tumori veće difuznu distribuciju MCM7 pozitivnih ćelija.

Statistički značajna razlika ukazuje da postoji korelacija distribucije MCM7 pozitivnih ćelija i površine tumora. Za sada nema publikovanih radova u kojim je rađeno slično istraživanje u tumorskom tkivu.

I u slučaju intraepidermalnih lezija klasifikovanih kao KIN postojala je razlika u distribuciji MCM7 pozitivnih ćelija prema površini lezija. Distribucija se menjala od bazalne kod promena najmanje površine, preko suprabazalne kako su vrednosti površine bivale veće, do difuzne kod KIN lezija najveće površine. Razlika je bila visoko statistički značajna, ukazujući da postoji korelacija distribucije MCM7 pozitivnih ćelija, dakle ćelija koje su u proliferaciji i površine KIN. Grupisanjem promena na one sa ne-difuznom i difuzom distribucijom MCM7 pozitivnih ćelija, promene manje površine imale su češće ne-difuznu distribuciju MCM7 i obrnuto. Statistički uvrđena visoko značajna razlika i korelacija distribucije prema površini KIN takođe govori u prilog površine KIN lezija kao potencijalnog prognostičkog parametara kod ove vrste keratinocitnih neoplazmi. Međutim, kada su grupisani KIN1 i KIN2, lezije sa bazalnom i difuzom distribucijom MCM7 bile su sličnih vrednosti površine, dok je kod promena veće površine najzastupljenija bila suprabazana distribucija. Statističkom analizom nije utvrđena značajna razlika u distribuciji, čak ni kada su grupisane KIN1 i KIN2 lezije sa difuznom u odnosu na ostale tipove distribucije. Ni kog in situ lezija (KIN3), kod kojih su slučajevi veće površine imal difuznu, a manje suprabazalnu distribuciju, nije utvrđena korelacija, čak ni među grupama sa difuznom i ne-difuzmom distribucijom. Ne postoji nijedan rad u kome je MCM7 ekspresija poređena sa preinvazivnim lezije različitog gradusa, bilo kog epitela.

Semikvantitativnim određivanjem stepena ekspresije MCM7 proteina, uočeno je više AK koje su imale manje od polovine MCM7 pozitivnih ćelija (54 – 59.3%). Ekspresija je bila sasvim drugačija kod BD, gde je samo jedan slučaj imao manje od polovine pozitivnih ćelija. U slučaju SCC, u gotovo istom broju tumori su imali manje i više od 50% pozitivnih ćelija (85 – 48.9% vs 89 – 51.1%). Statistički značajna razlika u obimu ekspresije ovog proteina između histološki različitih tipova neoplastično transformisanih keratinoicitnih lezija, ukazuje na korelaciju ekspresije ovog proliferativnog proteina i tipa neoplazme. Međutim, u slučaju procene ekspresije kod lezija ograničenih na epiderm (AK i BD) u odnosu na invazivne tumore, u oba slučaja, ekspresija MCM7 proteina bila je kod više od 50% kod većeg broja lezija, a razlika nije bila statistički značajna. Potpuno isti rezultat MCM2 i MCM5 proteina definitivno potvrđuje zaključak da ekspresija ovih proliferativnih proteina, u ovom obimu ima značaja

za IHH diferenciranje različitih histoloških tipova keratinocitnih neoplazmi, ali ne i intreepidermalnih lezija u odnosu na invazivnu formu tumora. Od drugih kutanih neoplazmi, slično istraživanje radili su Gambichler i saradnici ispitujući ekspresiju MCM7 proteina (uz MCM4 i MCM6) u karcinomu Merkelovih ćelija (MCC) u odnosu na melanom (MM). Istraživanje je rađeno na vrlo malom broju (8 slučajeva) oba tumora. Nuklearna pozitivnost je smatrana pozitivnim rezultatom, a obim ekspresije određivan je kao procenat pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija na određenom vidnom polju. Prema njihovim rezultatima, ekspresija MCM7 bila je duplo veća u tumorskim ćelijama MCC u odnosu na MM i razlika je bila statistički značajna ukazujući na veći proliferativni kapacitet MCC kao neuroendokrinog karcinoma kože (Gambichler i sar., 2009). Takođe, isti autor ispitivao je ekspresiju MCM7 proteina u T-ćelijskim limfoproliferativnim oboljenjima, kod 14 pacijenata sa parapsorijazom u plakovima (PP), 17 pacijenata sa Mycosis fungoides (MF) i 8 pacijenata sa CD30-pozitivnom limfomatoidnom papulozom (LyP). Ekspresija je određivana kvantitativno, kao procenat pozitivnih limfocita (nukleusa) u odnosu na ukupan broj limfocita u određenom vidnom polju. I prema njihovim rezultatima postojala je značajna razlika u ekspresiji MCM7 pozitivnih ćelija u odnosu na histopatološku dijagnozu, na taj način što je ekspresija je bila veća kod MF i LyP u odnosu na PP, dakle lezije većeg malignog potencijala, uz zaključak da MCM7 može biti koristan marker u diferencijaciji ove vrste kutanih maligniteta (Gambichler i sar., 2008). Sa druge strane, u drugom radu Gambicher i saradnika ispitivana je ekspresija MCM7 proteina, u melanocitnim kutanim lezijama, kod benignih melanocitnih nevusa (37), displastičnih nevusa (25) i suprficijalno širećeg melanoma (58). Ekspresija MCM7 je procenivana kao pozitivno nuklearno bojenje, a određivana kvantitativno, kao procenat pozitivnih ćelija (melanocita) na vidnom polju, u odnosu na ukupan broj pozitivnih ćelija. Statističkom analizom, nije utvrđena značajna rezlika u ekspresiji ovog proteina u odnosu na različite histopatološke dijagnoze melanocitnih lezija. Prema njihovim rezultatima IHH procenom MCM7 ekspresija nema značaja u diferecijalnoj dijagnozi kutanih melanocitnih lezija (Gambichler 2009). U slučaju drugih skvamocelularnih lezija, Tamura i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM7 kod oralne displazije i oralnog SCC (OSCC). Analizirano je 10 neizmenjenih oralnih epitela, 50 displazija i 113 OSCC. Procenat pozitivnih ćelija određivan je kao LI, odnost pozitivnih (nukleusa) ćelija u odnosu na minimum 1000 ćelija u vidnom polju. Procenat pozitivnih ćelija je rastao od normalnog epitela (29.2% srednji LI), preko displazije (32.2%) do OSCC (51.1%). Razlika je bila statistički značajna, utvrđena između displazije

i OSCC (Tamura i sar., 2010). U radu Padmanabhan i saradnika ispitivana je ekspresija MCM7 epitelnim ćelijama benignog tkiva prostate, intraepitelialne neoplazme prostate (PIN) i epitelialnim ćelijama adenokarcinoma, a izražavana kao proliferacioni indeks (PI), procenat ćelija sa pozitivnim nukleusom (broj pozitivnih ćelija u odnosu na minimum 200 ćelija). Vrednost PI je progresivno rasla od benignog luminalnog epitela, preko ne-bazalnog epitela PIN do invazivnog kancera i razlika je bila statistički značajna. U tom smislu MCM7 predstavlja marker proliferacije koji može služiti za dodatno razlikovanje epitela benigne prostate, PIN i adenokarcinoma (Padmanabhan i sar., 2004). U studiji Facchetti i saradnika procenjivana je ekspresija MCM7 proteina kod 15 glioblastoma. Glioblastomi su bili podeljeni u dve citološke grupe (sitnoćelijski i pleomorfni ćelija). MCM7 pozitivnost je izražavana kao LI, procenat pozitivnih (nukleusa) ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija u vidnom polju (40x). Oni su utvrdili statistički značajnu razliku u ekspresiji ovog proteina između dve različite histološke vrste glioblastoma. Ekspresija MCM7 bila je veća kod sitnoćelijskih glioblastoma (glioblastomi koji pokazuju agresivnije biološko ponašanje). Takođe, utvrđena je veća MCM7 ekspresija kod sitnoćelijskih glioblastoma nego kod oligodendroglioma. Prema njihovim rezultatima MCM proteini predstavljaju značajan marker proliferacije, validan i za dijagnozu cerebralnih glioblastoma (Faconetti i sar., 2006). U radu Fujjoka i saradnika ispitivana je ekspresija MCM7 kod adenokarcinoma pluća, dijametra manje od 3 cm, i to 84 non-bronho-alveolarnih i 16 bronho-alveolarnih karcinoma. Ekspresija je izražavana kao procenat pozitivnih ćelija tj. odnos pozitivnih u odnosu na minimum 1000 ćelija. Ekspresija MCM7 bila je značajno veća kod ne-bronhoalveolarnih tumora, ukazujući da ovaj histopatološki tip ima veći potencijal proliferacije i agresivnosti (Fujjoka i sar., 2009). U radu Toyokawa i saradnika ispitivana je ekspresija MCM7 proteina u normalnom tkivu ina TMN uzorku kod 331 pacijenata sa ne-sitnoćelijskim kancerom pluća (NSCLC). U normalnom tkivu pluća nije bilo ekspresije MCM7. Kod NSCLC ekspresija je utvrđena kod 61.1% slučajeva. Ekspresija je značajno korelirala sa histopatološkim tipom tumora, a veća ekspresija MCM7 uočena je i u tumorskom tkivu u odnosu na normalne ćelije (Toyokawa i sar., 2011). U radu Guida i saradnika utvrđena je povećana ekspresija MCM7 proteina u anaplastičnom tireoidnom kanceru za razliku od normalnog tireoidnog tkiva i, manje agresivnog, papilarnog karcinoma štitaste žlezde (Guida i sar., 2005). Sa druge strane, prema rezultatima Li i saradnika koji su ispitivali ekspresiju MCM7 proteina kod 212 endometrijalnih karcinoma u odnosu na histološki tip (173 endometrijskih i 39 ne-endometrijskih) nije bilo značajne korelacije (Li i sar.,

2005). U studiji Ferenc i saradnika ispitivana je ekspresija MCM7 na TMA uzorku kod 20 dezmoidnih tumora. Sluajevi su karakterisani kao pozitivni ukoliko je bilo preko 5% pozitivnih ćelija. Pozitivnost je izražavana kao procenat pozitivnih ćelija, LI, odnos pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija izbrojan kod svakog slučaja na 10 polja uveličanja 40x. Prema njihovim rezultatima MCM7 ekspresija je uočena kod 20% dezmoidnih slučajeva (više od 5% nuklearnog bojenja u tumoru). Kod ostalih slučajeva izostala je ekspresija MCM7 proteina ili je bila uočena kod malog broja ćelija. Ovako nizak nivo MCM7 ekspresije može se objasniti čestom niskom mitotskom aktivnošću dezmoidnih tumorskih ćelija, obzirom da je dezmoidna fibromatoza klonalna proliferacija dubokog mekog tkiva koja se karakteriše infiltrativnim rastom i tendencijom ka lokalnoj rekurenciji bez sposobnosti metastaziranja (Ferenc i sar., 2010).

U slučaju ekspresije MCM7 kod intraepidermalnih lezija klasifikovanih kao KIN, KIN1 i KIN2 lezije imale su više slučajeva sa manje od polovine pozitivnih ćelija (33 – 66.0% vs 21 – 52.5%), ali je taj broj bio neznatno manji u slučaju KIN2. Gotovo sve KIN3 lezije ispoljavale su MCM7 pozitivnost u više od 50% ćelija (50 – 98.0%). Razlika između svake od pomenutih grupa bila je visoko statistički značajna. Takođe, značajna razlika uočena je i u ekspresiji MCM7 između KIN 1 i KIN3, kao i KIN2 i KIN3, ali nije utvrđena poređenjem KIN1 i KIN 2. Može se zaključiti da ekspresija MCM7 korelira sa progresijom intraepidermalnih lezija, posebno višeg gradusa (KIN3). U radu Kreutier i saradnika, u kome je ispitivana ekspresija MCM7 kod analne intraepitelne neoplazije (AIN) u cilju rane dijagnostike AIN, korišćen je obim ekspresije 25%, 50 i 75% pozitivnih ćelija, a određivana senzitivnost i specifičnost. U slučaju granice 25% i 50% pozitivnih ćelija utvrđena je značajna senzitivnost i specifičnost MCM7 proteina u dijagnostikovanju AIM visokog stepena maligniteta (Kreutier i sar., 2009). U radu Henderson i saradnika utvrđena je minimalna nuklearna ekspresija anti MCM7 antitela u normalnom tkivu i CIN I lezijama, a značajno veća ekspresija (tj. veći broj pozitivnih ćelija) kod displazije većeg gradusa (CIN II i CIN III) (Henderson i sar., 2011).

Semikvantitativno određivana ekspresija ovog proliferativnog markera se povećavala sa smanjenjem stepena diferentovanosti, od najvećeg broja kod dobro diferentovanih SCC sa manje od 50% pozitivnih ćelija (50 – 86.2%), preko nešto većeg broja srednje diferentovanih SCC sa više od polovine pozitivnih ćelija (32 – 55.2%) i najviše slabo diferentivanih formi tumora sa više od polovine pozitivnih ćelija (49 – 84.5%). Ovakav rezultat u skladu je sa pretpostavkom da dobro diferentovani tumori imaju manji broj ćelija u proliferaciji, a samim tim i potencijalno manje agresivan tok.

Statistički značajna razlika između SCC različitog stepena agresivnosti ukazuje da ekspresija MCM 7 proteina korelira sa gradusom i da se može koristiti kao prognostički marker kod invazivnih formi ove vrste tumora. Razlika u ekspresiji u odnosu na diferentovanost SCC uočena je i u slučaju MCM2 i MCM5. Tamura i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM7 kod oralnih SCC u odnosu na histološku diferencijaciju tumora. Kod 47 dobro diferentovanih tumora LI MCM7 bio je 44.0% , kod 46 srednje diferentovanih 53.6%, a kod 20 slabo-diferentovanih 62.3%., a razlika je bila statistički značajna. (Tamura i sar., 2010). U radu Fuijoka i saradnika ispitivana je ekspresija MCM7 kod adenokarcinoma pluća, a veća ekspresija je korelirala sa slabijom diferencijacijom tumora (Fuijoka i sar., 2009). Li i saradnici ispitivali su ekspresiju MCM7 proteina kod endometrijalnih karcinoma u odnosu na histološki gradus tumora kao jedan od kliničko-patoloških parametara. Procenat MCM7 pozitivnih ćelija bio je manji kod dobro diferentovanih promena, odnosno veći kod srednje i slabije diferentovanih, a korelacija je bila statistički značajna u odnosu na histološki gradus tumora (Li i sar., 2005). U studiji Facchetti i saradnika ispitivana je ekspresija MCM7, kao dijagnostičkog tumorskog markera kod 66 primarnih astrocitoma u odnosu na gradus tumora (Gradus I-IV, WHO). Prema WHO klasifikaciji tumori su diferencirani na pilocitične astrocitome (PA, gradus I), difuzne astrocitome (DA, Gradus II), anaplastiče astrocitome (AA, gradus III) i glioblastoma multiforme (GBM, gradus IV). Ekspresija je izražavana kao LI, tj. procenat pozitivnih ćelija u odnosu na 1000 ćelija po slučaju, u reprezentativnom vidnom polju, uveličanje 40x. Li MCM2 se značajno povećavao od 2.94% kod PA, 8.37% kod DA, 13.8% AA do 26,6% GBM, a razlika je bila statistički značajna. (Facchetti i sar., 2006).

Kao ni u slučaju procene ekspresije MCM2 i MCM5 proteina prema dimenzijama SCC i u slučaju MCM7, veći broj tumora manjih dimenzija imao je manje od polovine MCM7 pozitivnih ćelija (57 – 51.8%), ali razlika u odnosu na veće tumore nije bila statistički. U radu Tamura i saradnika ispitivana je ekspresija MCM7 kod oralnih SCC. Iako se LI povećavao sa porastom veličine tumora, takođe nije utvrđena statistički značajna razlika, (Tamura i sar., 2010). Suprotno tome, u radu Fuijoka i saradnika kod adenokarcinoma pluća, tumori su, prema veličini, bili podeljeni na dve grupe - manji od 2 cm i grupu većih od 2 cm. Prema njihovim rezultatima ekspresija MCM7 je korelirala sa veličinom tumora, tj. veći tumori su pokazivali veću ekspresiju ovog proteina (Fuijoka i sar., 2009).

Kod SCC tanjih i debljih od 2mm identičan broj tumora imao je manje i više od 50% pozitivnih ćelija (10 – 50.0%), pa nije utvrđena statistički značajna razlika. Sa druge

strane, kada je granica u debljini tumora iznosila 4 mm i 6 mm, u oba slučaja, tanji tumori su imali manje od polovine pozitivnih ćelija i obrnuto, a razlika je bila statistiki značajna. U koži, ekspresija MCM7 u odnosu na debljinu lezija, ispitivana je u radu Gambichler i saradnika, kod 58 superficijalno širećih melanoma, i to prema Breslow debljini. Medijana Breslow tumorske debljine iznosila je 0.93 mm (0.1 – 4.6 mm). Ekspresija MCM7 bila je procenivana kao pozitivno nuklearno bojenje, a određivana kvantitativno, kao procenat pozitivnih ćelija (melanocita) na vidnom polju, u odnosu na ukupan broj pozitivnih ćelija. I u njihovom slučaju utvrđena je statistički značana razlika u ekspresiji MCM7 u odnosu na Breslow debljinu (i Clark nivo) (Gamblichler i sar., 2009).

U slučaju poređenja ekspresije MCM7 prema površini SCC, iako su tumori manje površine u većem broju slučajeva imali manje od 50% pozitivnih ćelija razlika nije bila statistički značajna. U slučaju intraepidermalnih lezija, klasifikovanih kao KIN, ekspresija MCM7 povećavala se sa povećanjem površine lezije. Statistički značajna razlika ukazala je da postoji korelacija površine ovih vrsta keratinocitnih neoplazmi i proliferativnog kapaciteta, tj. da je površina u ovom slučaju može biti parametar tumorske agresivnosti. Ovakav nalaz sugerije moguću povezanost MCM proteina kao proliferativnih markera sa površinom preinvazivnih lezija ali ne i invazivnog planocelularno karcinoma čija egresivnost se ispoljava većom debljinom koja kotrelira sa obimom MCM7 ekspresije. Ne postoje do sada publikovani radovi koji analiziraju broj MCM7 pozitivnih ćelija sa površinom tumora.

Kada je, semikvantitativno procenjivan broj pozitivnih MCM7 ćelija prema trećinama, i kod AK (70 – 76.9%) i kod SCC (76 – 43.7%) najveći broj slučajeva imao je između 33-66% pozitivnih ćelija, dok je kod BD najveći broj imao preko 66% (44 – 88.0%). Statističkom analizom, razlika u ekspresiji između ova tri entiteta bila je visoko značajna.

Procenjivanjem ekspresije MCM7 proteina semikvantitativno, na ovaj način, među intraepidermalnim lezijama klasifikovanim kao KIN, najveći broj KIN1 i KIN 2 slučajeva imao je od 33-66% pozitivnih ćelija, dok je većina KIN 3 lezija imala preko 66% MCM7 pozitivnih ćelija 45 – 88.2%. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji MCM7 među KIN lezijama, kao i između intraepidermalnih promena koje zahvataju 2/3 epiderma (KIN1 i KIN2), u odnosu na one sa zahvatanjem čitave debljine epiderma. Dakle, ekspresija MCM7 može se koristiti kao IHH marker proliferacije KIN lezija za njihovo gradiranje. Do sada nisu publikovani radovi sa

analizom preinvazivnih lezija klasifikovanih kao KIN u odnosu na broj MCM7 pozitivnih ćelija.

Kao i u slučaju semikvantitativnog određivanja MCM7 pozitivnih ćelija prema polovinama, i u ovom slučaju, ekspresija MCM7 postepeno je rasla sa opadanjem gradusa SCC. Dakle, dobro diferentovani tumori imali su najviše slučajeva sa manje od 33% ćelija (38 – 65.5%). U istom broju srednje diferentovani tumori imali su 33-66% pozitivnih ćelija, dok je najveći broj slabo diferentovanih SCC imao preko 66% pozitivnih ćelija. Statistički visoko značajna razlika ukazala je na korelaciju ekspresije MCM7 proteina u odnosu na gradus SCC. Tumori nižeg/manjeg gradusa tj. boljeg stepena diferencijacije, a samim tim i manjeg malignog potencijala imali su manji broj ćelija u proliferaciji (aktivnom ćelijskom ciklusu). Za sada nema objavljenih rezultata sa kojima koje bi moglo vršiti poređenje.

U slučaju ovog obima ekspresije i dimenzija SCC, tumori prečnika manje i više od 20 mm, u obe grupe bilo je najviše tumora sa 33-66% pozitivnih MCM7 ćelija (49 – 44.5% vs 27 – 42.2%) i razlika nije bila statistički značajna, tako da ekspresija MCM7 (proliferacija ćelija), ni u ovom obimu ne korelira sa veličinom SCC, kao prognostički faktorom.

U proceni ekspresije MCM7, na ovaj način, kod tumora različite debljine, kada je ta granica bila 2 mm, podjednak broj SCC tanjih od 2 mm imao je manje od jedne trećine i od 33-66% pozitivnih ćelija. Statističkom analizom nije utvrđena značajna razlika u ovom obimu ekspresije MCM7, identično kao i u slučaju MCM2 i MCM5 proteina. Međutim kod tumora debljine do i preko 4 mm razlika je bila statistički značajna. I u slučaju SCC debljine do i preko 6 mm najveći broj slučajeva imao je 33-66% MCM7 pozitivnih ćelija (56 – 43.1% vs 20 – 45.5%), ali je razlika takođe bila statistički značajna. To je drugačije od rezultata kod MCM5 gde ni u jednoj od grupa nije utvrđena značajan razlika u ekspresiji MCM5 proteina prema tumorima razlilite debljine. S druge strane, u slučaju ekspresije MCM2 proteina rezultati su u skladu sa dobijenim kod MCM7. Sve ovo govori da, iako pokazuju vrlo sličan obim ekspresije u svim ispitivanim lezijama, pojedini pripadnici MCM familije proteina se razlikuju u odnosu na određene prognostičke karakteristike SCC. Potrebno je više ispitivanje multiplih MCM proteina u različitim tumorima da bi se ove razlike bolje objasnile, a većina dosadašnjih radova se odnosi na ispitivanje samo jednog ili dva MCM proteina u pojedinačnim tumorima. Nema publikovanih radova koji su procenjivali obim ekspresije MCM7 u odnosu na debljinu bilo koje humane neoplazme.

Kada je procenjivana ekspresija MCM7 prema trećinama u odnosu na površinu tumora kao parametra agresivnosti, tumori veće površine imali su veći procenat pozitivnih ćelija i razlika je bila statistički značajna (kao i kod MCM5). Tumori najmanje površine imali su od 33-66% pozitivnih ćelija, a najveće površine više od 66% pozitivnih MCM5 ćelija.

KIN lezije najmanje površine imale su 33-66% pozitivnih ćelija, a najveće površine preko 66% MCM7 pozitivnih ćelija. Uvrđena je statistički značajna razlika u ekspresiji MCM7 u odnosu na površinu KIN lezija. Ne postoji nijedan publikovani rad o odnosu obima MCM7 ekspresije i površine tumora, što predstavlja pogodan parameter za praćenje rasta tumora kože.

U ovom istraživanju, kao jedna od, tj. dodatna metoda za određivanje MCM pozitivnih ćelija bilo je i kompjutersko prepoznavanje i memorisanje pozitivnih ćelija za koji je korišćen specijalizovani kompjuterski program (ili softver), besplatni program za analizu slike, *Fiji* (Fiji is just ImageJ; <http://fiji.sc/Fiji>) (Schindelin i sar., 2012).

Cilj ovakvog načina procene tj. preciznog markiranja pozitivnih ćelija bilo je procena adekvatnosti pomenutog pristupa preparatima u svakodnevnoj, rutinskoj imunopatološkoj analizi IHH potvrđeno pozitivnih ćelija za određeni MCM protein (marker). Takođe, ideja je bila da se proceni i uporedi rezultat dobijen ovim načinom analize sa rezultatom pozitivnih ćelija koji je određen maualnim brojanjem od strane stručnog/obučenog posmatrača. Na taj način, ideja je bila da se oceni adekvatnost, tačnost, tj. stepen eventualne greške koju kompjuterski sistema pravi iz određenih razloga, kao i da se procene razlozi eventualnih nedostataka pomenute metode, kako bi se na njih moglo u daljem toku uticati. Pored toga, bilo je od značaja da se utvrdi da li bi ovo mogao da bude način provere objektivnosti posmatrača, kao, eventualni, kontrolni mehanizam, lak za korišćenje, čime bi se moglo brže i jednostavnije doći do željenog rezultata, sa što ekonomičnijim trošenjem, pre svega ljudskih resursa.

Iz rezultata je proisteklo da je stepen odstupanja oko 15%. Takav stepen odstupanja, sam po sebi i nije drastično različit, i na osnovu njega moglo bi se zaključiti da je ovaj metod procenjivanja broja pozitivnih ćelija u preparatu adekvatan za upotrebu. Ali, određeni tehnički problemi, koji su uočeni u pojedinačnim slučajevima bitno menjaju

sveobuhvatan pogled na pomenuti pristup problemu, doprinose drugačijoj analizi i imaju uticaj na konačan zaključak. To se odnosilo na pojedinačne slučajeve, kod kojih je uočeno značajnije odstupanje u procenjenom broju pozitivnih ćelija koji je određivao posmatrač u odnosu na kompjuterski sistem. U slučaju AK, jedan od ograničavajućih faktora, bilo je nehomogeno jedarno bojenje i intenzitet bojenja kao kriterijum pozitivnosti; u tri preparata AK, jedra su bila krupnija (više su ličila na jedra kod SCC) nego u ostalim AK, pa su u tom slučaju bili odgovarajući parametri zadati sistemu za SCC. Dakle, postojala je neselektivnost u odnosu na HP dijagnozu. U pet različitih analiziranih slučajeva intenzitet jedarnog bojenja, tj. stepen obojenosti nije bio adekvatan, kao kriterijum pozitivnosti. U sedam slučajeva AK, problem je bilo dodirivanje ćelija u preparatu, jer je kompjuterski program registrovao grupisane ćelije, tj. njihova jedra registrovao kao jedno.

U slučaju preparata SCC, pak, u jednom slučaju, kompjuterski sistem je zbijena jedra tumačio kao jednu masu koju je automatski isključivao iz analize zbog zadatih parametara veličine i cirkularnosti. Takođe, u pet slučajeva, zaključeno je da je osetljivost programa velika u odnosu na ljudsko oko, te su markirane i ćelije koje je ljudsko previdelo. Dalje, program nije adekvatno razlikovao tipove tkiva - endotelne ćelije nisu bile isključene iz analize, na osnovu veličine i cirkularnosti. Nukleolarno bojenje, kao i intenzitet bojenja su, takođe, predstavljali problem, tj. kompjuterski sistem i ljudsko oko su ih različito uočavali i tumačili. Takođe, treba spomenuti i neselektivnost programa u odnosu na tip ćelija. Konkretno, limfocite koji su se u preparatu nalazili blizu jedan drugom, program je on tumačio i registrovao kao jednu veću pozitivnu ćeliju. Pored toga i broj intraepitelnih limfocita pravio je smetnju u smislu neadekvatnog tumačenja intenziteta bojenja u odnosu na intenzitet koji je postavljen kao kriterijum pozitivnosti.

Iz pomenutih razloga na osnovu rezultata dobijenih u ovom studiji zaključak je da automatsko bojenje nije adekvatan model koji bi mogao da se koristi u rutinskoj praksi, za procenu imunohistohemijske MCM pozitivnosti u keratinocitnim neoplazmama

5. ZAKLJUČCI

1. Distribucija sva tri ispitivana proteina značano se razlikovala u odnosu na histološki tip lezije, idući od bazalne kod AK ka difuznoj kod BD, odslikavajući proliferativne neoplastično transformisane keratinocite. Semikvantitativnom procenom ekspresije MCM pozitivnih ćelija utvrđeno je da se obim ekspresije povećavao od AK, preko BD do SCC, dakle postojala je i kvantitativna razlika u odnosu na tip lezije. Ovakav rezultat govori u prilog uloge pomenutih proteina u progresiji *in situ* lezija. Na osnovu ovog nalaza može se zaključiti da je MCM proteine moguće koristiti u IHH analizi morfološki negovoljno jasnih lezija.

I u slučaju invazivne forme SCC, distribucija MCM pozitivnih ćelija kretala se od periferne ka difuznoj sa smanjenjem diferencijacije tumorskih ćelija, odnosno broj MCM pozitivnih ćelija povećavao se sa gradusom tumora. Ovakav rezultat potvrđuje pretpostavku da MCM proteini imaju značajnu ulogu i u progresiji invazivnih keratinocitnih neoplazmi, kao i da mogu biti od značaja za procenu agresivnosti SCC i dodatnu IHH dijagnostiku.

2. U slučaju *in situ* lezija, klasifikovanih kao KIN, difuzna distribucija bila je uočena češće kod KIN 3, u odnosu na KIN1 i KIN2, a obim ekspresije je rastao je od KIN1 do KIN3. Ovakav nalaz dekvatno odslikava biološku prirodu intraepidermalnih lezija klasifikovanih na ovaj način idući u prilog neoplastične prirode ove vrste promena.

3. Analizom distribucije MCM2, MCM5 i MCM7 u odnosu na prognostičke parametre SCC, uočeno je da su veći i deblji tumori imali dominantno difuznu distribuciju pozitivnih ćelija, ali je značajna razlika uočena samo u slučaju kada je granica debljine tumora iznosila 6 mm. Slična povezanost sa debljinom preko 6 mm utvrđena je i za obim ekspresije preko 50% pozitivnih ćelija. Ovakav nalaz ukazuje na povezanost difuzne distribucije i povećanog obima ekspresije MCM sa prognostičkim karakteristikama SCC koje ukazuju na agresivnije biološko ponašanje.

4. I distribucija i semikvantitativno određen obim ekspresije MCM proteina dali su slične rezultate kada su poređeni sa histopatološkim tipom lezije i prognostičkim karakteristikama SCC, ali je obim ekspresije uz korišćenje granice od 50% dao bolju povezanost sa ispitivanim parametrima nego kada su 33% i 66% korišćene kao granične vrednosti broja pozitivnih ćelija.

Automatsko brojanje ćelija nije se pokazalo dovoljno pouzdanim za procenu obima MCM imunopozitivnosti u keratinocitnim intraepidermalnim i invazivnim lezijama.

6. LITERATURA

Abdou AG, Elwahed MG, Serag El-Dien MM, Eldien DS. Immunohistochemical expression of MCM2 in nonmelanoma epithelial skin cancers. *Am J Dermatopathol.* 2014;36:959-64.

Abreu Velez AM, Howard MS. Tumor-suppressor Genes, Cell Cycle Regulatory Checkpoints, and the Skin. *N Am J Med Sci.* 2015;7(5):176-88.

Ackerman AB, Mones JM. Solar (actinic) keratosis is squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2006;155:9-22. Erratum in: *Br J Dermatol.* 2006;155(2):500.

Ackerman AB. Respect at last for solar keratosis. *Dermatopathol: Pract Concept* 1997;3:101–103.

Ackerman AB. Solar keratosis is squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2003;139:1216-7.

Ahn JH, Chan HK. Expression of minichromosome maintenance protein7 and Smad 4 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Korean J Pathol.* 2010;44:346–353.

Akimoto S, Suzuki Y, Ishikawa O. Multiple actinic keratoses and squamous cell carcinomas on the sun-exposed areas of widespread vitiligo. *Br J Dermatol.* 2000;142:824-5.

Ananthanarayanan V, Deaton RJ, Yang XJ, Pins MR, Gann PH. Alteration of proliferation and apoptotic markers in normal and premalignant tissue associated with prostate cancer. *BMC Cancer.* 2006;6:73.

Anwar J, Wrone DA, Kimyai-Asadi A, Alam M. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol* 2004;22:189–96.

Arias EE, Walter JC. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev.* 2007;21(5):497-518.

Arlette JP, Trotter MJ. Squamous cell carcinoma in situ of the skin: history, presentation, biology and treatment. *Australas J Dermatol.* 2004;45(1):1-9.

Arlette JP. Treatment of Bowen's disease and erythroplasia of Queyrat. *Br J Dermatol.* 2003;149:Suppl 66:43-9.

Ayaru L, Stoeber K, Webster GJ, Hatfield AR, Wollenschlaeger A, Okoturo O, et al. Diagnosis of pancreaticobiliary malignancy by detection of minichromosome maintenance protein 5 in bile aspirates. *Br J Cancer.* 2008;98(9):1548-54.

Bailis JM, Forsburg SL. MCM proteins: DNA damage, mutagens and repair. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14:17-21.

Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:333-74.

Berman B, Cockerell CJ. Pathobiology of actinic keratosis: ultraviolet-dependent keratinocyte proliferation. *J Am Acad Dermatol.* 2013;68:10-9.

Berner A. Actinic keratosis and development of cutaneous squamous cell carcinoma. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2005;125(12):1653-4.

Blow JJ, Dutta A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:476-86.

Bowen JT. Precancerous dermatoses: a study of two cases of chronic atypical epithelial proliferation. *J. Cutan. Dis.* 1912;30:241-55.

Bowen JT. Precancerous dermatoses: the further course of two cases previously reported. *Arch. Derm. Syphilol.* 1920;1:23-4

Boyd AS, Shakhtour B, Shyr Y. Minichromosome maintenance protein expression in benign nevi, dysplastic nevi, melanoma, and cutaneous melanoma metastases. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:750-754.

Brasanac D, Boricic I, Todorovic V, Tomanovic N, Radojevic S. Cyclin A and beta-catenin expression in actinic keratosis, Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol*. 2005;153(6):1166-75.

Breuninger H, Brantsch K, Eigentler T, Häfner HM. Comparison and evaluation of the current staging of cutaneous carcinomas. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2012;10(8):579-86.

Breuninger H, Eigentler T, Bootz F, Hauschild A, Kortmann RD, Wolff K, et al. Brief S2k guidelines-Cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2013;11 Suppl 3:39-47.

Broders AC: Practical points on the microscopic grading of carcinoma. *N Y State J Med* 1932;32:667.

Bury J, Cross S. Molecular biology in diagnostic histopathology: Part I - The cell cycle. *Current Diagnostic Pathol* 2003;9:266-275.

Callen JP, Bickers DR, Moy RL. Actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36(4):650-3.

Calonje E, Brenn T, Lazar A, McKee PH. McKee's Pathology of the Skin with Clinical Correlations (4th edition), pp 1115–1140. China: Elsevier Saunders, 2011.

Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*. 2007;59(7):419-26.

Chatrath P, Scott IS, Morris LS, Davies RJ, Bird K, Vowler SL, et al. Immunohistochemical estimation of cell cycle phase in laryngeal neoplasia. *Br J Cancer*. 2006;95:314-21.

Chatrath P, Scott IS, Morris LS, Davies RJ, Rushbrook SM, Bird K, et al. Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions. *Br J Cancer*. 2003;89:1048-54.

Chen GJ, Feldman SR, Williford PM, Hester EJ, Kiang SH, Gill I, et al. Clinical diagnosis of actinic keratosis identifies an elderly population at high risk of developing skin cancer. *Dermatol Surg*. 2005;31(1):43-7.

Cho Mar K, Eimoto T, Nagaya S, Tateyama H. Cell proliferation marker MCM2, but not Ki67, is helpful for distinguishing between minimally invasive follicular carcinoma and follicular adenoma of the thyroid. *Histopathology*. 2006;48(7):801-7.

Chuang CH, Yang D, Bai G, Freeland A, Pruitt SC, Schimenti JC. Post-transcriptional homeostasis and regulation of MCM2-7 in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(11):4914-24.

Cockerell CJ, Wharton JR: New histopathological classification of actinic keratosis (incipient intraepidermal squamous cell carcinoma). *J Drugs Dermatol* 2005; 4:462.

Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol*. 2000;42(1 Pt 2):11-7.

Cockerell CJ. Pathology and pathobiology of the actinic (solar) keratosis. *Br J Dermatol*. 2003;149 Suppl 66:34-6.

Cohen JL. Actinic keratosis treatment as a key component of preventive strategies for nonmelanoma skin cancer. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2010 Jun;3(6):39-44.

Cortez D, Glick G, Elledge SJ. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(27):10078-83.

Council N, Ha Mr. Clinical Practice Guidelines: Non-melanoma skin cancer: Guidelines for treatment and management in Australia, 2002. Available at: <http://www.nhmrc.gov.au/guidelines>.

Cox NH, Eedy DJ, Morton CA. Guidelines for management of Bowen's disease: 2006 update. *Br J Dermatol* 2007;156:11–21.

Czyzewska J, Guzińska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemon A, Bandurski R. Immunohistochemical evaluation of Ki-67, PCNA and MCM2 proteins proliferation index (PI) in advanced gastric cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009;47(2):289-96.

Das M, Prasad SB, Yadav SS, Govardhan HB, Pandey LK, Singh S, et al. Over expression of minichromosome maintenance genes is clinically correlated to cervical carcinogenesis. *PLoS One.* 2013;8(7):e69607.

Davidson EJ, Morris LS, Scott IS, Rushbrook SM, Bird K, Laskey RA, et al. Minichromosome maintenance (Mcm) proteins, cyclin B1 and D1, phosphohistone H3 and in situ DNA replication for functional analysis of vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer.* 2003;88:257-62.

das Chagas E Silva de Carvalho LF, Farina VH, Cabral LA, Brandão AA, Coletta RD, Almeida JD. Immunohistochemical features of multifocal melanoacanthoma in the hard palate: a case report. *BMC Res Notes.* 2013;6:30

Diffley JF. Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011;366(1584):3545-53.

Dinehart SM, Chu DZ, Maners AW, Pollack SV. Immunosuppression in patients with metastatic squamous cell carcinoma from the skin. *J Dermatol Surg Oncol.* 1990;16:271-4.

Dodson A. Modern methods for diagnostic immunocytochemistry. *Current Diagnostic Pathology* 2002; 8:113-122.

Dodson JM, DeSpain J, Hewett JE, Clark DP. Malignant potential of actinic keratoses and the controversy over treatment. A patient-oriented perspective. *Arch Dermatol.* 1991;127:1029–1031.

Douglas IL, Aggarwal P, Diehl AJ Phosphorylation of MCM3 on ser112 regulates its incorporation into the MCM2–7 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:8079–8084.

Drake AL, Walling HW. Variations in presentation of squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease) in immunocompromised patients. *J Am Acad Dermatol* 2008;59:68–71.

Dubreuilh W: Des hyperkératoses circonscrites. In: *Third International Congress of Dermatology. Official Transactions*, edited by JJ Pringle. London, Waterlow and Sons, 1898, p. 125

Dudderidge TJ, Stoeber K, Loddo M, Atkinson G, Fanshawe T, Griffiths DF, et al. Mcm2, Geminin, and KI67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(7):2510-7.

Duncan K, Geisse J, Leffel D. Epithelial Precancerous Lesions. In: Goldsmith LA, editor. *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine*, 8th ed. New York: The McGraw-Hill; 2012.p.1262-1283.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *AJCC Cancer Staging Manual* (ed 7). New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Springer, 2010.

Evans C, Cockerell CJ. Actinic keratosis: time to call a spade a spade. *South Med J.* 2000;93(7):734-6.

Facoetti A, Ranza E, Benericetti E, Ceroni M, Tedeschi F, Nano R. Minichromosome maintenance protein 7: a reliable tool for glioblastoma proliferation index. *Anticancer Res.* 2006;26(2A):1071-5.

Feldman SR, Fleischer AB Jr. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma revisited: clinical and treatment implications. *Cutis.* 2011;87(4):201-7.

Ferenc T, Kopczynski J, Stalinska L, Tosik D, Sidor M, Lopaczyńska D, et al. Minichromosome maintenance (MCM) and AgNOR proteins expression in desmoid tumours: a tissue microarray analysis. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010;48(4):581-8.

Fernández-Cid A, Riera A, Tognetti S, Herrera MC, Samel S, Evrin C, et al. An ORC/Cdc6/MCM2-7 complex is formed in a multistep reaction to serve as a platform for MCM double-hexamer assembly. *Mol Cell.* 2013;50(4):577-88.

Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, et al. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res.* 1999;5(8):2121-32.

Freudenthal W: Verruca senilis und keratoma senile. *Arch f Dermat u Syph (Berlin).* 1926;158:529

Frost C, Williams G, Green A. High incidence and regression rates of solar keratoses in a queensland community. *J Invest Dermatol.* 2000;115:273-7.

Fu W, Cockerell CJ. The actinic (solar) keratosis: a 21st-century perspective. *Arch Dermatol.* 2003;139(1):66-70.

Gakiopoulou H, Korkolopoulou P, Levidou G, Thymara I, Saetta A, Piperi C, et al. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 in non-benign epithelial ovarian tumours: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications. *Br J Cancer.* 2007;97(8):1124-34.

Gambichler T, Bischoff S, Bechara FG, Altmeyer P, Kreuter A. Expression of proliferation markers and cell cycle regulators in T cell lymphoproliferative skin disorders. *J Dermatol Sci* 2008; 49:125–132.

Gambichler T, Breininger A, Rotterdam S, Altmeyer P, Stücker M, Kreuter A. Expression of minichromosome maintenance proteins in Merkel cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009;23:1184-8.

Gambichler T, Shtern M, Rotterdam S, Bechara FG, Stücker M, Altmeyer P, et al. Minichromosome maintenance proteins are useful adjuncts to differentiate between benign and malignant melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60(5):808-13.b

Giaginis C, Vgenopoulou S, Vielh P, Theocharis S. MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol Histopathol.* 2010;25(3):351-70.

Gillett CE, Barnes DM. Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol* 1998; 51:310-6. *Genes Dev.* 2007;21(5):497-518.

Going JJ, Keith WN, Neilson L, Stoeber K, Stuart RC, Williams GH. Aberrant expression of minichromosome maintenance proteins 2 and 5, and Ki-67 in dysplastic squamous oesophageal epithelium and Barrett's mucosa. *Gut*. 2002;50:373-7.

Goldenberg G, Perl M. Actinic keratosis: update on field therapy. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2014;7(10):28-31.

Gonzalez MA, Pinder SE, Callagy G, Vowler SL, Morris LS, Bird K, et al. Minichromosome maintenance protein 2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(23):4306-13.

Gray D, Obermann EC, Evans M, Hartmann A, Cooper K, Blaszyk H. MIB-1 and MCM-2 immunohistochemical analysis does not aid in identification of serrated colorectal polyps with abnormal proliferation. *Am J Clin Pathol*. 2006;125(3):407-12.

Grossman D, Leffel D. Squamous Cell Carcinoma. In: Goldsmith LA, editor. *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine*, 8th ed. New York: The McGraw-Hill; 2012.p.1283-1294.

Gueiros LA, Coletta RD, Kowalski LP, Lopes MA. Clinicopathological features and proliferation markers in tongue squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011;40:510-5.

Guida T, Salvatore G, Faviana P, Giannini R, Garcia-Rostan G, Provitera L, et al. Mitogenic effects of the up-regulation of minichromosome maintenance proteins in anaplastic thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(8):4703-9.

Gupta AK, Cooper EA, Feldman SR, Fleischer AB Jr. A survey of office visits for actinic keratosis as reported by NAMCS, 1990-1999: national ambulatory medical care survey. *Cutis* 2002;70:8-13.

Guzińska-Ustymowicz K, Stepień E, Kemonia A. MCM2, Ki-67 and PCNA protein expression in pT3G2 colorectal cancer indicated lymph node involvement. *Anticancer Res*. 2008;28(1B):451-7.

Ha SA, Shin SM, Namkoong H, Lee H, Cho GW, Hur SY, et al. Cancer-associated expression of minichromosome main- tenance 3 gene in several human cancers and its involvement in tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 2004;10: 8386—95.

Habif TP, editor. In: *Clinical dermatology: a color guide to diagnosis and therapy.* 3rd ed. St Louis: Mosby; 1996.

Hashimoto K, Araki K, Osaki M, Nakamura H, Tomita K, Shimizu E, et al. MCM2 and Ki-67 expression in human lung adenocarcinoma: prognostic implications. *Pathobiology.* 2004;71(4):193-200.

Heaphy MR Jr, Ackerman AB. The nature of solar keratosis: a critical review in historical perspective. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43(1 Pt 1):138-50.

Hemminki K, Dong C: Subsequent cancers after in situ and invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Arch Dermatol.* 2000;136:647.

Imoto Y, Yoshida Y, Yagisawa F, Kuroiwa H, Kuroiwa T. The cell cycle, including the mitotic cycle and organelle division cycles, as revealed by cytological observations. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2011;60 Suppl 1:117-36.

Ishioka P, Marques SA, Hirai AT, Marques ME, Hirata SH, Yamada S. Prevalence of precancerous skin lesions and non-melanoma skin cancer in Japanese-Brazilians in Bauru, São Paulo State, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2009;25:965-71.

Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *Stem Cells* 2001; 19:88-91.

James C, Crawford RI, Martinka M, Marks R. Actinic keratosis. In: James C, Crawford RI, Martinka M, Marks R, editors. *Pathology & Genetics, Skin tumors.* Lyon: IARC Press; 2006. p.30-3.

Jasani B, Rhodes A. The roles and mechanism of high-temperature antigen retrieval in diagnostic pathology. *Current Diagnostic Pathology* 2001; 7:153-160.

Jorizzo JL, Carney PS, Ko WY, Robins P, Weinkle SH, Werschler WP. Treatment options in the management of actinic keratosis. *Cutis* 2004; 74(Suppl. 6):9–17.

Kallini JR, Hamed N, Khachemoune A. Squamous cell carcinoma of the skin: epidemiology, classification, management, and novel trends. *Int J Dermatol*. 2015;54(2):130-40.

Kang HK, Yun JH, Son YM, Roh JY, Lee JR. Photodynamic Therapy for Bowen's Disease of the Vulva Area. *Ann Dermatol*. 2014;26(2):241-5.

Karia PS, Han J, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *J Am Acad Dermatol* 2013;68: 957- 66.

Kato H, Miyazaki T, Fukai Y, Nakajima M, Sohda M, Takita J, et al. A new proliferation marker, minichromosome maintenance protein 2, is associated with tumor aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*. 2003;84:24-30.

Kim HS, Cho EA, Bae JM, Yu DS, Oh ST, Kang H, et al. Recent trend in the incidence of premalignant and malignant skin lesions in Korea between 1991 and 2006. *J Korean Med Sci*. 2010;25:924-9.

Kim M, Kim JH, Kim JH, Kim DH, Yu YS. Differential expression of stem cell markers and vascular endothelial growth factor in human retinoblastoma tissue. *Korean J Ophthalmol*. 2010;24(1):35-9.

Kirkham N. Tumors and Cysts of the Epidermis. In: Elder D, editor. *Lever's Histopathology of the Skin*. 10th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p.791–849.

Knockleby J, Lee H. Same partners, different dance: involvement of DNA replication proteins in centrosome regulation. *Cell Cycle*. 2010;9:4487-91.

Kobierzycki C, Pula B, Wojnar A, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P. Tissue microarray technique in evaluation of proliferative activity in invasive ductal breast cancer. *Anticancer Res*. 2012;32(3):773-7.

Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoke K, et al. Minichromosome maintenance 2 is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2003;32:468–474.

Kodani I, Shomori K, Osaki M, Kuratate I, Ryoke K, Ito H. Expression of minichromosome maintenance 2 (MCM2), Ki-67, and cell-cycle-related molecules, and apoptosis in the normal-dysplasia-carcinoma sequence of the oral mucosa. *Pathobiology.* 2001;69:150-8.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998;4:844-7.

Korkolopoulou P, Givalos N, Saetta A, Goudopoulou A, Gakiopoulou H, Thymara I, et al. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 expression in muscle-invasive urothelial cancer: a multivariate survival study including proliferation markers and cell cycle regulators. *Hum Pathol.* 2005;36(8):899-907.

Kossard S, Rosen R. Cutaneous Bowen's disease. An analysis of 1001 cases according to age, sex, and site. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 406–410.

Kreuter A, Jesse M, Potthoff A, Brockmeyer NH, Gambichler T, Stücker M, et al. Expression of proliferative biomarkers in anal intraepithelial neoplasia of HIV-positive men. *J Am Acad Dermatol.* 2010;63(3):490-8.

Kusunoki S, Ishimi Y. Interaction of human minichromosome maintenance protein-binding protein with minichromosome maintenance 2-7. *FEBS J.* 2014;281(4):1057-67.

Labib K, Diffley JF. Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11:64-70.

Laskey RA, Madine MA. A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks. *EMBO Rep.* 2003;4(1):26-30.

Lebwohl M. Actinic keratosis: epidemiology and progression to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2003;149 Suppl 66:31-3.

Lee JH, Won CY, Kim GM, Kim SY. Dermoscopic features of actinic keratosis and follow up with dermoscopy: a pilot study. *J Dermatol.* 2014;41(6):487-93.

Lei M, Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 8):1447-54.

Lei M. The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy *Curr Cancer Drug Targets.* 2005;5(5):365-80.

Lever WF. *Histopathology of the Skin.* Philadelphia: J.B. Lippincott, 1949;279–80.

Li C, Jin J. DNA replication licensing control and rereplication prevention. *Protein Cell.* 2010;1(3):227-36.

Liaw K, Boyd AS. MCM2 expression in basal cell carcinomas and trichoepitheliomas. *J Cutan Pathol.* 2009;36:1121–1122.

Liu H, Takeuchi S, Moroi Y, Lin N, Urabe K, Kokuba H, et al. Expression of minichromosome maintenance 5 protein in proliferative and malignant skin diseases. *Int J Dermatol.* 2007;46(11):1171-6.

Lucas R, McMichael T, Smith W, Armstrong B. Solar ultraviolet radiation: global burden of disease from solar ultraviolet radiation; environmental burden of disease series No. 13. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2006.

MacKie RM, Quinn AG. Non-melanoma skin cancer and other epi-dermal skin tumours. In: *Rook's Textbook of Dermatology* (Burns T, Breathnach SM, Cox NH, Griffiths CEM, eds), 7th edn. Oxford: Blackwell Publishing, 2004; 36.1–36.39.

Madine MA, Swietlik M, Pelizon C, Romanowski P, Mills AD, Laskey RA. The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. *J Struct Biol.* 2000;129(2-3):198-210.

Maiorano D, Lutzmann M, Méchali M. MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(2):130-6.

Makarova KS, Wolf YI, Mekhedov SL, Mirkin BG, Koonin EV. Ancestral paralogs and pseudoparalogs and their role in the emergence of the eukaryotic cell. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(14):4626–38.

Marks R, Rennie G, Selwood TS. Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet.* 1988;1:795–797.

Mašata M, Juda P, Raška O, Cardoso MC, Raška I. A fraction of MCM 2 proteins remain associated with replication foci during a major part of S phase. *Folia Biol (Praha).* 2011; 57(1):3-11.

Memon AA, Tomenson JA, Bothwell J, Friedmann PS. Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population. *Br J Dermatol* 2000;142:1154-9.

Meng MV, Grossfeld GD, Williams GH, Dilworth S, Stoeber K, Mulley TW, et al. Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7(9):2712-8.

Morgan D, Murray AW, Hunt T, Nurse P. The cell cycle and programmed cell death. In: Alberts B. et al. *Molecular Biology of The Cell.* 4th ed. New York: Garland Science; 2002.p. 983-1026.

Moy RL. Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(1 Pt 2):8-10.

Mukherjee G, Muralidhar B, Bafna UD, Laskey RA, Coleman N. MCM immunocytochemistry as a first line cervical screening test in developing countries: a prospective cohort study in a regional cancer centre in India. *Br J Cancer.* 2007;96(7):1107-11.

Murphy N, Ring M, Heffron CC, King B, Killalea AG, Hughes C, et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2005;58(5):525-34.

Murphy N, Ring M, Heffron CC, Martin CM, McGuinness E, Sheils O, et al. Quantitation of CDC6 and MCM5 mRNA in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Mod Pathol.* 2005;18:844-9.

Nicol AF, Lapa e Silva JR, Cunha CB, Amaro-Filho SM, Oliveira N, Grinsztejn B, et al. Evaluation of MCM-2 expression in TMA cervical specimens. *PLoS One.* 2012;7:e32936.

Nishihara K, Shomori K, Fujioka S, Tokuyasu N, Inaba A, Osaki M, et al. Minichromosome maintenance protein 7 in colorectal cancer: implication of prognostic significance. *Int J Oncol.* 2008;33(2):245-51.

Nishihara K, Shomori K, Tamura T, Fujioka S, Ogawa T, Ito H. Immunohistochemical expression of geminin in colorectal cancer: Implication of prognostic significance. *Oncol Rep.* 2009;21(5):1189-95.

Odom RB, James WD, Berger TB. *Andrews' Diseases of the Skin.* Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2000; 810–12.

Padmanabhan V, Callas P, Philips G, Trainer TD, Beatty BG. DNA replication regulation protein Mcm7 as a marker of proliferation in prostate cancer. *J Clin Pathol.* 2004;57(10):1057-62.

Pellacani G, Ulrich M, Casari A, Prow TW, Cannillo F, Benati E, et al. Grading keratinocyte atypia in actinic keratosis: a correlation of reflectance confocal microscopy and histopathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(11):2216-21.

Peris K, Micantonio T, Piccolo D, Fagnoli MC. Dermoscopic features of actinic keratosis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2007;5(11):970-6.

Pinkus H: Keratosis senilis: A biologic concept of its pathogenesis and diagnosis based on the study of normal epidermis and 1730 seborrheic and senile keratoses. *Am J Clin Pathol* 1958; 29:193.

Murphy N, Ring M, Heffron CC, Martin CM, McGuinness E, Sheils O, et al. Quantitation of CDC6 and MCM5 mRNA in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Mod Pathol*. 2005;18:844-9.

Queyrat L. Erythroplasie du gland. *Bull. Soc. Franc Derm Syph* 1911;22:378–81.

Ra SH, Li X, Binder S. Molecular discrimination of cutaneous squamous cell carcinoma from actinic keratosis and normal skin. *Mod Pathol*. 2011;24:963–73.

Ramnath N, Hernandez FJ, Tan DF, Huberman JA, Natarajan N, Beck AF, et al. MCM2 is an independent predictor of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(22):4259-66.

Ratushny V, Gober MD, Hick R, Ridky TW, Seykora JT. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2012;122:464.

Reena RM, Mastura M, Siti-Aishah MA, Munirah MA, Norlia A, Naqiyah I, Rohaizak M, Sharifah NA. Minichromosome maintenance protein 2 is a reliable proliferative marker in breast carcinoma. *Ann Diagn Pathol*. 2008;12(5):340-3.

Reizner GT, Chuang TY, Elpern DJ, Stone JL, Farmer ER. Bowen's disease (squamous cell carcinoma in situ) in Kauai, Hawaii. A population-based incidence report. *J Am Acad Dermatol* 1994;31:596–600.

Rigel D, Cockerell C, Carucci J, Wharton J. Actinic Keratosis, Basal cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, et al. editors. *Dermatology*. 2nd ed. Elsevier Limited; 2008. p.1641-1659.

Rodins K, Cheale M, Coleman N, Fox SB. Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility. *Clin Cancer Res.* 2002;8(4):1075-81.

Roewert-Huber J, Stockfleth E, Kerl H. Pathology and pathobiology of actinic (solar) keratosis - an update. *Br J Dermatol.* 2007;157

Rosen T, Lebwohl MG. Prevalence and awareness of actinic keratosis: barriers and opportunities. *J Am Acad Dermatol.* 2013;68(1 Suppl 1):S2-9.

Rossi R, Mori M, Lotti T. Actinic keratosis. *Int J Dermatol.* 2007;46(9):895-904.

Rowert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, Ulrich C, Eberle J, Kerl H. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *Br J Dermatol.* 2007;156:8-12.

Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(1 Pt 2):4-7.

Samrao A, Cockerell CJ. Pharmacotherapeutic management of actinic keratosis: focus on newer topical agents. *Am J Clin Dermatol.* 2013;14(4):273-7.

Samson RY, Bell SD. MCM loading-an open-and-shut case? *Mol Cell.* 2013;50(4):457-8.

Sanchez-Berrondo J, Mesa P, Ibarra A, Martínez-Jiménez MI, Blanco L, Méndez J, et al. Molecular architecture of a multifunctional MCM complex. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(3):1366-80.

Sandal T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *Oncologist* 2002; 7:73-81.

Scarpini C, White V, Muralidhar B, Patterson A, Hickey N, Singh N, et al. Improved screening for anal neoplasia by immunocytochemical detection of minichromosome maintenance proteins. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(10):2855-64.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7):676–82.

Schmitt JV, Miot HA. Actinic keratosis: a clinical and epidemiological revision. *An Bras Dermatol.* 2012;87:425-34.

Sclafani RA, Holzen TM. Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet.* 2007;41:237-80.

Scott IS, Heath TM, Morris LS, Rushbrook SM, Bird K, Vowler SL, et al. A novel immunohistochemical method for estimating cell cycle phase distribution in ovarian serous neoplasms: implications for the histopathological assessment of paraffin-embedded specimens. *Br J Cancer.* 2004;90(8):1583-90.

Scott IS, Odell E, Chatrath P, Morris LS, Davies RJ, Vowler SL, et al. A minimally invasive immunocytochemical approach to early detection of oral squamous cell carcinoma and dysplasia. *Br J Cancer.* 2006;94(8):1170-5.

Senel E. Dermatoscopy of non-melanocytic skin tumors. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2011;77(1):16-21.

Shetty A, Loddo M, Fanshawe T, Prevost AT, Sainsbury R, Williams GH, et al. DNA replication licensing and cell cycle kinetics of normal and neoplastic breast. *Br J Cancer.* 2005;93(11):1295-300.

Shi J, Liu H, Wilkerson M, Huang Y, Meschter S, Dupree W, et al. Evaluation of p16INK4a, minichromosome maintenance protein 2, DNA topoisomerase IIalpha, ProEX C, and p16INK4a/ProEX C in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol.* 2007;38:1335-44.

Shin JW, Kim YK, Cho KH. Minichromosome maintenance protein expression according to the grade of atypism in actinic keratosis. *Am J Dermatopathol*. 2010;32:794-8.

Shomori K, Nishihara K, Tamura T, Tatebe S, Horie Y, Nosaka K, et al. Geminin, Ki67, and minichromosome maintenance 2 in gastric hyperplastic polyps, adenomas, and intestinal-type carcinomas: pathobiological significance. *Gastric Cancer*. 2010;13(3):177-85.

Simon NE, Schwacha A. The Mcm2-7 replicative helicase: a promising chemotherapeutic target. *Biomed Res Int*. 2014;2014(4):549719.

Sington JD, Freeman A, Morris LS, Vowler SL, Arch BN, Fisher C, et al. Minichromosome maintenance protein in myxofibrosarcoma. *Mod Pathol*. 2004;17(2):235-40.

Soares AB, Altemani A, de Araújo VC. Study of histopathological, morphological and immunohistochemical features of recurrent pleomorphic adenoma: an attempt to predict recurrence of pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(4):352-8.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours (Uicc International Union Against Cancer)* (ed 7), John Wiley & Sons, 2009.

Sterry W, Stockfleth E. Malignant epithelial tumors. In: Plewing B, Landthaler W. editors. *Braun-Falco's Dermatology*. 3rd ed. Springer; 2009. p.1358-1376.

Stockfleth E, Kerl H; Guidelines for the management of actinic keratoses. Guideline Subcommittee of the European Dermatology Forum. *Eur J Dermatol*. 2006;169(3):599-606.

Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, Bobrow L, et al. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 11)::2027-41.

Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvehy J, Del Marmol V, Pehamberger H, et al. European Dermatology Forum (EDF); European Association of Dermato-Oncology (EADO); European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*. 2015;51(14):1989-2007.

Sutton RL Jr. Early epidermal neoplasia: descriptions and interpretations—the theory of mutation in the origin of cancer. *Arch Derm Syphil* 1938; 37:737–80.

Suzuki S, Kurata M, Abe S, Miyazawa R, Murayama T, Hidaka M, et al. Overexpression of MCM2 in myelodysplastic syndromes: association with bone marrow cell apoptosis and peripheral cytopenia. *Exp Mol Pathol*. 2012;92(1):160-6.

Szajerka A, Dziegiel P, Szajerka T, Zabel M, Winowski J, Grzebieniak Z. Immunohistochemical evaluation of metallothionein, Mcm-2 and Ki-67 antigen expression in tumors of the adrenal cortex. *Anticancer Res*. 2008;28(5B):2959-65.

Szelachowska J, Dziegiel P, Jelen-Krzyszewska J, Jelen M, Matkowski R, Pomiecko A, et al. Mcm-2 protein expression predicts prognosis better than Ki-67 antigen in oral cavity squamocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2006;26:2473-8.

Tachibana KE, Gonzalez MA, Coleman N. Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *J Pathol*. 2005;205(2):123-9.

Takisawa H, Mimura S, Kubota Y. Eucariotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12:690-6.

Tamura T, Shomori K, Haruki T, Nosaka K, Hamamoto Y, Shiomi T, et al. Minichromosome maintenance-7 and geminin are reliable prognostic markers in patients with oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 2010;39:328-34.

Tan DF, Huberman JA, Hyland A, Loewen GM, Brooks JS, Beck AF, et al. MCM2--a promising marker for premalignant lesions of the lung: a cohort study. *BMC Cancer*. 2001;1:6.

Tokuyasu N, Shomori K, Nishihara K, Kawaguchi H, Fujioka S, Yamaga K, et al. Minichromosome maintenance 2 (MCM2) immunoreactivity in stage III human gastric carcinoma: clinicopathological significance. *Gastric Cancer*. 2008;11(1):37-46.

Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2009;100:1128–1134.

Toyokawa G, Masuda K, Daigo Y, Cho HS, Yoshimatsu M, Takawa M, et al. Minichromosome Maintenance Protein 7 is a potential therapeutic target in human cancer and a novel prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2011;10:65.

Truong LN, Wu X. Prevention of DNA re-replication in eukaryotic cells. *J Mol Cell Biol*. 2011;3(1):13-22.

Tschandl P, Rosendahl C, Kittler H. Dermatoscopy of flat pigmented facial lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29 :120-7.

Tye BK. MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:649-86.

Uhlenhake E, Sanguenza OP, Lee AD, Jorizzo JL. Spreading pigmented actinic keratosis: a review. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63(3): 499–506.

Uhlenhake EE. Optimal treatment of actinic keratosis. *Clin Interv Aging*. 2013;8:29-35.

van den Heuvel S. Cell-cycle regulation. *WormBook*. 2005;21:1-16.

Vargas PA, Cheng Y, Barrett AW, Craig GT, Speight P. Expression of Mcm-2, Ki-67 and geminin in benign and malignant salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(5):309-18.

Werner RN, Sammain A, Erdmann R, Hartmann V, Stockfleth E, Nast A. The natural history of actinic keratosis: a systematic review. *Br J Dermatol*. 2013;169(3):502-18.

Westers-Attema A, van den Heijkant F, Lohman BG, Nelemans PJ, Winnepenninckx V, Kelleners-Smeets NW, et al. Bowen's disease: A six-year retrospective study of treatment with emphasis on resection margins. *Acta Derm Venereol.* 2014;94(4):431-5.

Williams GH, Swinn R, Prevost AT, De Clive-Lowe P, Halsall I, Going JJ et al. Diagnosis of oesophageal cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in gastric aspirates. *Br J Cancer.* 2004;91(Pt 11):714–719.

Wojnar A, Kobierzycki C, Krolicka A, Pula B, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P. Correlation of Ki-67 and MCM-2 proliferative marker expression with grade of histological malignancy (G) in ductal breast cancers. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010;48(3):442-6.

Wojnar A, Kobierzycki C, Krolicka A, Pula B, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, et al. Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes. *Sci China Life Sci.* 2014;57:482-7.

Wu R, Wang J, Liang C. Cdt1p, through its interaction with Mcm6p, is required for the formation, nuclear accumulation and chromatin loading of the MCM complex. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 1):209-19.

Wu L, Liu Y, Kong D. Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes. *Sci China Life Sci.* 2014 May;57(5):482–7.

Xiang F, Lucas R, Hales S, Neale R. Incidence of Nonmelanoma Skin Cancer in Relation to Ambient UV Radiation in White Populations, 1978-2012: Empirical Relationships. *JAMA Dermatol.* 2014;150(10):1063-71.

Yantsos VA, Conrad N, Zabawski E, Cockerell CJ. Incipient intraepidermal cutaneous squamous cell carcinoma: a proposal for reclassifying and grading solar (actinic) keratoses. *Semin Cutan Med Surg.* 1999;18(1):3-14.

Yu TC, Rahman Z, Ross BS. Actinic keratoses—surgical and physical therapeutic modalities. *Cutis.* 2003;71:381–4.

Yu Z, Feng D, Liang C. Pairwise interactions of the six human MCM protein subunits. *J Mol Biol.* 2004;340:1197-206.

Zalaudek I, Giacomel J, Schmid K, Bondino S, Rosendahl C, Cavicchini S, et al. Dermatoscopy of facial actinic keratosis, intraepidermal carcinoma, and invasive squamous cell carcinoma: a progression model. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66(4):589-97.

SPISAK SKRAĆENICA:

5FU – 5-fluorouracil

ACC - cistični adeno karcinom

AcCC - acinic-cell karcinoma

AH – aktinični heilitis

AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije (acquired immune deficiency syndrome)

AIN - analna intraepidermalna neoplazija

AK – aktinična keratoza (actinic keratosis)

BCC – bazocelularni karcinom (basal cell carcinoma)

BCCFD - BCC sa folikularnom diferencijacijom

BP - Bowenoidna papuloza

BP – Bowenoid-na papuloza

CC – cornu cutaneum (kožni rog)

Cdc6 – (protein) ciklusa ćelijske deobe 6 (cell division cycle 6 (protein))

CDKI –inhibitor ciklin zavisne kinaze (cyclin dependent kinase inhibitor)

CEPA karcinom ex pleomorfni adenom

CIN – cervikalna intraepitelna neoplazija (cervical intraepithelial neoplasia)

CT– kompjuterizovana tomografija (computed tomography)

DDK- Dbf4-zavisna kinaza (Dbf4-dependent kinase)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DSEE - displastičnom skvamoznom epitelu ezofagusa

EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta (epidermal growth factor receptor)

EQ – Erythroplasia Queyrat

G - pauza (gap)

HAK – hipertrofična aktinična keratoza

HGPIN - intraepitelijalna neoplazija visokog gradusa

HIV - virus humane imunodeficijencije (human immunodeficiency virus)

HP – histopatološki

HPP - hiperplastične polipe

HPV – humani papilloma virus

IDC 56, DCIS 4, ILC dojka

ISCC – invazivni skvamocelularni karcinom (invasive squamous cell carcinoma)

KIN – keratinocitna intraepidermalna neoplazija (keratinocytic intraepidermal neoplasia)

LAK – lihenoidna aktinična keratoza

LGPIN - intraepitelijalna neoplazija niskog gradusa

LI – labelling index

LyP - limfomatoidna papuloza

M - mitoza

MA - melanoakantom

MCM- (protein) odražavanja minihromozoma (minichromosome maintenance (protein))

MEC - mukoeipiermoidni karcinom

MF – mycosis fungoides

MM - melanom

MRI – magnetna rezonanca (magnetic resonance imaging)

NDSEE - nedisplastični skvamozni epitel ezofagus

NMSC - ne-melanomski tumori kože (non-melanoma skin cancer)

NOM - normalnoj oralnoj mukozi

NSCLC - ne-sitnoćelijski karcinom pluća

OED - oralna epitelijalna displazija

OED - oralnoj epidermalnoj displaziji

ORC- kompleks prepoznavanja mesta početka replikacije (origin recognition complex)

OSCC - oralni planocelularni karcinom

PA- pleomorfni adenom

PAK – pigmentna aktinična keratoza

PCNA- jedarni antigen proliferišućih ćelija (proliferating cell nuclear antigen)

PI - proliferacioni indeks

PIN - prostatična intraepitelijalna neoplazija

PLGA - polimorfni adenokarcinom niskog gradusa

pre-IC- pre-inicijalni kompleks (pre-initiation complex)

pre-RC- prereplikativni kompleks (prereplicative complex)

PP - parapsorijaza u plakovima

RFC – replikacioni faktor C (replication factor C)

RPA- replikacioni protein A (replication protein A)

S - sinteza (DNK)

SAPA – reckasti polipi sa abnormalnom proliferacijom

SCC – skvamocelularni karcinom (squamous cell carcinoma)

SCCIS – skvamocelularni karcinom in situ (squamous cell carcinoma in situ)

SPF – zaštitni factor od sunčevog zračenja (sun protection factor)

TE - trihoepitelioma

UV – ultravioletno

VIN – vulvarna intraepitelna neoplazija

OSNOVNI BIOGRAFSKI PODACI

Dr Jelena (Mile) Stojković-Filipović rođena je 20.8.1974. godine u Beogradu. Od 2001. godine zaposlena je Na Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije, gde radi kao lekar specijalista dermatovenerolog na II ženskom odeljenju. Dr Stojković-Filipović je magistar medicinskih nauka iz oblasti dermatoonkologije.

STRUČNA BIOGRAFIJA, DIPLOME I ZVANJA

Jelena Stojković-Filipović se upisala na Medicinski fakultet u Beogradu školske 1993/94. godine, a završila 2000. godine sa prosečnom ocenom 9.00. Stručni ispit za doktora medicine položila je 2000. godine pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravlja.

Magistarske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu upisala je školske 2000/01. godine, a usmeni magistarski ispit položila je 2004. godine. Magistarsku tezu pod nazivom *"Ekspresija ciklina i regulatornih proteina ćelijskog ciklusa u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože"* odbranila je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 26.01.2009. godine pred komisijom u sastavu: prof. dr Gordana Konjević, predsednik komisije, prof. dr Miloš Nikolić i Naučni savetnik dr Vera Todorović. Mentor magistarske teze je bio prof. dr Dimitrije Brašanac.

Specijalizaciju iz dermatovenerologije upisala je 2001. godine i u celini je obavila na Institutu za dermatovenerologiju KCS u Beogradu. Specijalistički ispit položila je 18.06.2006. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu sa ocenom odličan. Trenutno, radi na izradi doktorske teze *"Ekspresija proteina održavanja minihromozoma u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu kože"* mentor Prof. dr Dimitrije Brašanac.

Dr Jelena Stojković-Filipović je zaposlena na neodređeno vreme na Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu od 6.10.2000. godine.

Aktivno je učestvovala u radu domaćih i međunarodnih simpozijuma i kongresa. Dobitnik je AMED stipendije Evropske Akademije Dermatovenerologa za učešće na EADV Kongresu 2008. godine. Dobitnik je nagrade za najbolji prikaz slučaja na XIV Beogradskim dermatološkim danima u novembru 2008. godine i najbolju studiju na XVIII kongresu Udruženja dermatovenerologa Srbije sa međunarodnim učešćem, 2009. godine.

Dr Jelena Stojković-Filipović je bila član organizacionog odbora XVIII Kongresa Udruženja dermatovenerologa Srbije koji je održan juna 2009. godine u Beogradu.

Tokom 2010. godine boravila je na Univerzitetskoj Klinici u Beču (Medical University of Vienna, Vienna General Hospital, Department of Dermatology, Professor and Chairman Hubert Pehamberger), u okviru jedinica Dermato-onkologije, Dermatopatologije, Dermatohirurgije, Flebologije, Fototerapije, kao i Estetske dermatologije.

Kao predavač po pozivu 2013. godine i 2014. godine održala predavanja u okviru programa American Academy of Dermatology (AAD Program No 413100; Program Director Robert A. Schwartz MD, MPH), New Jersey Medical School Dermatology Grant Rounds, New Jersey Medical School.

Počani je član Sigma The Scientific Research Society, Rutgers University; New Jersey Medical School. Član je Evropske akademije za dermatovenerologiju (EADV), Internacionalnog udruženja dermoskopije (International Dermoscopy Society IDS), Evropskog udruženja za dermatološku onkologiju, Udruženja dermatovenerologa Srbije, intersekcijakog odbora za melanom Srpskog lekarskog društva kao i Društva medicinskih mikologa Srbije.

U časopisu British Journal of Dermatology participirala kao recenzent.

Aktivno vlada engleskim jezikom.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Jelena Stojković-Filipović
broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Ekspresija proteina održavanja minihromozoma u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18.6.2016.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jelena Stojković-Filipović

Broj upisa _____

Studijski program Dermatoonkologija

Naslov rada "Ekspresija proteina održavanja minihromozoma u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu"

Mentor Prof. dr Dimitrije Brašanac

Potpisani



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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18.6.2016.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

“Ekspresija proteina održavanja minihromozoma u keratinocitnoj intraepidermalnoj neoplaziji i invazivnom planocelularnom karcinomu“

koja je moje autorsko delo.

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


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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18.6.2016.



1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.