

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Дејан М. Рашић

**ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ПРОТЕИНА
ОДРЖАВАЊА МИНИХРОМОЗОМА 2, 5
и 7 У БАЗОЦЕЛУЛАРНОМ
КАРЦИНОМУ КОЖЕ
ПЕРИОКУЛАРНЕ РЕГИЈЕ**

Докторска дисертација

Београд, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Dejan M. Rašić

**SIGNIFICANCE OF THE EXPRESSION
OF MINICHROMOSOME
MAINTENANCE PROTEINS 2, 5 and 7 IN
PERIOcular BASAL CELL
CARCINOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

МЕНТОР:

Проф. др Димитрије Брашанац,

редовни професор на Катедри патологије Медицинског факултета Универзитета у Београду

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. Проф. др Аница Бобић Радовановић,

ванредни професор на Катедри офталмологије Медицинског Факултета Универзитета у Београду

2. Доц. др Мартина Босић,

доцент на Катедри патологије Медицинског факултета Универзитета у Београду

3. Проф. др Славица Кнежевић Ушај,

редовни професор на Катедри патологије Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду

ДАТУМ ОДБРАНЕ: _____

ЗАХВАЉУЈЕМ СЕ

Ментору,

проф. др Димитрију Брашанцу, што ми је пружио прилику да спроведем ово истраживање, за његов надзор, вођење и помоћ у обликовању тезе, за подршку и разумевање, за промишљене коментаре, за сво време и енергију коју је уложио у ишчитавање и кориговање свих верзија до коначне.

Члановима комисије,

проф. др Аници Бобић Радовановић, доц. др Мартини Босић и проф. др Славици Кнежевић Ушај на њиховом времену, подршци и конструктивним саветима.

Желео бих да изразим своје посебно поштовање и захвалност колегама др Новици Боричићу, доц. др Мартини Босић, и др Браниславу Лекићу, на одличној сарадњи и на њиховој великој и несебичној помоћи током извођења експерименталног дела рада и статистичке обраде података.

Такође, посебно се захваљујем г-дину Мишку Рувидићу, г-ђи Светлани Миљковић, г-ђи Наталији Абрамовић, доц. др Јелени Стојковић Филиповић, проф. др Мирославу Кнежевићу.

Породици

Миленку, Надежди, Вери

Јустину и Лаву

ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ПРОТЕИНА ОДРЖАВАЊА МИНИХРОМОЗОМА 2, 5 и 7 У БАЗОЦЕЛУЛАРНОМ КАРЦИНОМУ КОЖЕ ПЕРИОКУЛАРНЕ РЕГИЈЕ

РЕЗИМЕ

Увод

Базоцелуларни карцином коже (енгл. *basal cell carcinoma*, *BCC*) је далеко најчешћи канцер коже перокуларне регије кога одликује локално инвазиван/деструктиван начин раста, склоност рецидивима, као и веома ниска инциденца метастазирања. Последњих година посебно се проучава улога једне нове групе једарних протеина који су названи протеини одржавања минихромозома (енгл. *minichromosome maintenance proteins* - МЦМ), чија је улога омогућавање правилне репликације ДНК током ћелијског циклуса - омогућавају започињање, одржавање репликације и процес транскрипције ДНК молекула. МЦМ протеини се испољавају у ћелијама у којима је ћелијски циклус у току, док се у ћелијама које су у стању мировања и диференцијације њихова експресија губи тако да представљају потенцијално корисне маркере ћелијске пролиферације, особито у туморима. Истраживања која се баве улогом и функцијом односно анализом експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у *BCC* перокуларне регије нису до сада публикована, нити је било студија која су испитивале испољавање МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на прогностичке параметре *BCC* коже као што су дубина инвазије и димензије, нити је вршена упоредна евалуација испољавања МЦМ молекула различитим методама (семиквантитативно, индекс обележавања, дистрибуција позитивних ћелија).

Циљ

Циљ ове дисертације је анализа испољавања МЦМ протеина 2, 5 и 7 у *BCC* коже перокуларне регије, поређење експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 и прогностичких параметара *BCC* коже перокуларне регије - хистолошки подтип,

димензије (површина и највећи измерени пречник) тумора, дубина туморске инвазије, као и процена различитих начина евалуације имунохистохемијског бојења и експресије МЦМ протеина у односу на хистолошки подтип *BCC* коже периокуларне регије и остале прогностичке параметре.

Материјал и методе рада

Истраживањем је обухваћено 294 случаја базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије – студија пресека у петнаестогодишњем периоду од 1998-2013. године, из архивског материјала (парафински калупи) Института за патологију Медицинског факултета Универзитета у Београду као и Офталмопатолошке лабораторије Клинике за очне болести Клиничког центра Србије, техником ткивног микрониза (енгл. *tissue microarray*) и имунохистохемијског бојења на примарна антитела МЦМ 2, МЦМ 5 и МЦМ 7. Анализа је обухватила дистрибуцију имунопозитивности, семиквантитативно одређивање процента обојених ћелија (до 10%, >10-50% и >50%) као и индекс обележавања (енгл. *labeling index*) на начињеним фотографијама дигиталном камером високе резолуције, бројањем најмање 500 ћелија из сваког анализираног узорка, применом посебно дизајнираног софтвера за аутоматску анализу слике. Резултати имунохистохемијског бојења су анализирани у односу на хистопатолошки подтип базоцелуларног карцинома и, хистопатолошке прогностичке параметре *BCC* (подтип, димензије, дубину инвазије). За одређивање статистичке значајности односа резултата имунохистохемијског бојења и наведених карактеристика тумора коришћени су хи-квадрат, *Fisher*, *Mann-Whitney* и *Kruskal-Wallis* тестови, односно АНОВА и мултипли т-тест (*Tukey*), код анализе индекса обележавања.

Резултати

Дистрибуција имунопозитивности за сва три испитивана МЦМ протеина у целокупном узорку била је доминантно дифузна, уз постојање високо статистички значајне разлике у дистрибуцији МЦМ 7 протеина. Тумори високог ризика у поређењу са туморима ниског ризика показују статистички значајно различиту дистрибуцију имунопозитивности МЦМ 2 и високо статистички значајно различиту дистрибуцију имунопозитивности МЦМ 7 протеина, док тумори ниског ризика у поређењу са туморима мешовитог ризика показују статистички значајно различиту

дистрибуцију имунопозитивности МЦМ 5 протеина. Дистрибуција имунопозитивности у целокупном узорку у односу на дубину туморске инвазије показује статистички значајну разлику у дистрибуцији МЦМ 2 протеина, док је дистрибуција имунопозитивности у односу на дубину туморске инвазије код тумора високог ризика показала статистички значајну разлику за МЦМ 7 протеин. Дистрибуција имунопозитивности у целокупном узорку у односу на површину тумора показује високо статистички значајну разлику у дистрибуцији МЦМ 7 протеина. Анализом обима експресије имунопозитивности добијени резултати показују веома јасну дистинкцију, са статистички значајном разликом, између испитиваних протеина, а у односу на ризичне групе базоцелуларног карцинома и у односу на дубину инвазије базоцелуларног карцинома. Наиме, највећи број тумора све три ризичне групе, све три дубине инвазије, као и све три групе пречника тумора, показује експресију МЦМ 2 протеина у обиму од 10-50%, МЦМ 5 протеина у обиму >50%, а МЦМ 7 протеина у обиму <10%. Највишу експресију МЦМ 2 и 7 протеина показују тумори високог ризика, а најмању тумори ниског ризика, док насупротив томе највишу експресију МЦМ 5 протеина показују тумори ниског ризика, а најмању тумори високог ризика. Надаље, највећи проценат тумора који захватају ретикуларни дерм је позитиван на МЦМ 2 протеин, оних који захватају целу дебљину капка/поткожно/масно ткиво на МЦМ 5 протеин, а оних који захватају мишићни слој на МЦМ 7 протеин. Имуноекспресија МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на највећи измерени пречник, иако расте са порастом истог, није показала статистички значајну разлику. У односу на површину тумора, обим експресије МЦМ протеина се нешто разликује у односу на претходне резултате, али без статистички значајне разлике – тумори највеће површине показује експресију МЦМ 2 протеина у обиму <10%, МЦМ 5 протеина у обиму 10-50%, а МЦМ 7 протеина у обиму >50%, што значи да како тумор расте, опада експресија МЦМ 2 протеина, а повећава се за МЦМ 5 и 7 протеине. Највиши обим експресије МЦМ 2 протеина имају тумори високог ризика, они који захватају ретикуларни дерм, а најмањи тумори ниског ризика и највеће површине. Највиши обим експресије МЦМ 5 протеина имају тумори ниског ризика, они који захватају целу дебљину капка/поткожно/масно ткиво, и највећег пречника, а најмањи тумори високог ризика. Највиши обим експресије МЦМ 7 протеина имају тумори високог ризика, они који захватају мишићни слој, и они највеће површине, а најмањи тумори ниског ризика и највећег пречника. Анализом

индекса обележавања показало се да највећи проценат имуноекспресије у ткиву базоцелуларног карцинома, са статистички значајном разликом, показује МЦМ 5 протеин, а најмањи МЦМ 7, као и да су тумори ниског степена ризика за појаву рецидива имали највећи проценат имуноекспресије сва три МЦМ протеина, док је у односу на дубину инвазије највећи проценат тумора који захватају целу дебљину капка/поткожно/масно ткиво позитиван на МЦМ 5 и МЦМ 2 протеин, а оних који захватају ретикуларни дерм на МЦМ 7 протеин. Односно, проценат имуноекспресије сва три МЦМ протеина опада како расте агресивност тумора, а расте како се повећава дубина туморске инвазије за МЦМ 2 и 5 протеин, а опада за МЦМ 7. То значи да тумори са већим ризиком од појаве рецидива имају мању експресију сва три МЦМ протеина – како се повећава хистопатолошка агресивност смањује се индекс пролиферације, насупротив чињеници да са порастом дубине инвазије расте проценат имуноекспресије МЦМ 2 и 5 протеина, али не и МЦМ 7 – како тумор све дубље продире расте индекс пролиферације за МЦМ 2 и 5 протеин, али не и за МЦМ 7. Поређење начина евалуације имунохистохемијских бојења, семиквантитативног насупротив аутоматском бројању, показало је умерено до значајно слагање што указује како на поузданост оба начина евалуације, тако и на високу поузданост аутоматског бројања, као и на конзистентност добијених резултата од стране испитивача.

Закључак

Ово је прва студија у којој је процењивана експресија и дистрибуција протеина одржавања минихромозома 2, 5 и 7 у базоцелуларном карциному коже периокуларне регије. Анализом добијених резултата уочено је да су тумори имали доминантно дифузну дистрибуцију позитивних ћелија и то у односу на готово све испитиване параметре. Имуноекспресија МЦМ протеина у односу на димензије тумора (површину и највећи измерени пречник) није показала статистички значајну разлику. Анализом имуноекспресије МЦМ протеина у односу на дубину туморске инвазије као и поређењем исте према различитим хистопатолошким подтипovima тумора уочено је да је дифузна дистрибуција имунопозитивности била преобладајући облик имуноекспресије, уз чињеницу да је сваки од анализираних МЦМ протеина имао веома јасно ограничен семиквантитативан опсег своје имунопозитивности у готово 2/3 испитиваних случајева. Аутоматско бројање ћелија показало се значајно поузданим за процену обима имунопозитивности и да се може

користити уместо напорног мануелног бројања, или мање прецизне семиквантитативне процене обима имуноекспресије. И поред сличности, уочене су и разлике у имуноекспресији МЦМ 2, 5 и 7 протеина у односу на одређене карактеристике базоцелуларног карцинома, што указује на потребу додатних упоредних испитивања како у овој врсти тумора, на истој или другачијој локализацији, тако и у различитим туморима, што би допринело и процени њихове индивидуалне употребљивости у процени биолошког потенцијала тумора.

Кључне речи

МЦМ 2, МЦМ 5, МЦМ 7, базоцелуларни карцином коже, периокуларна регија, капци

Научна област: Медицина

Ужа научна област: Офталмологија, Патологија

SIGNIFICANCE OF THE EXPRESSION OF MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEINS 2, 5 and 7 IN PERIOcular BASAL CELL CARCINOMA

SUMMARY

Introduction

Basal cell carcinoma (BCC) is by far the most common cancer of the periocular region which is characterized by locally invasive/destructive way of growth, high relapse rate and a very low incidence of metastasis. In recent years, the role of a new group of nuclear proteins which are called minichromosome maintenance (MCM) proteins have been studying, especially their role in the process of DNA replication during the cell cycle - initiation, replication maintenance and transcription process of the DNA molecule. MCM proteins are expressed in cells in which the cell cycle is in progress, while in cells that are quiescent, their expression is lost, so they represent potentially useful markers of cell proliferation, particularly in cancer. In the literature, papers that analyze the role and function of MCM 2, MCM 5 and MCM 7 proteins expression in the BCC of the periocular region have not yet been published, nor has there been studies that have examined the expression of MCM 2, MCM 5 and MCM 7 proteins in relation to the prognostic parameters of BCC such as the depth of invasion and dimensions, nor a comparative evaluation of the expression of MCM molecules with different methods (semi-quantitative, labeling index, distribution of positive cells).

Aim

The aim of this thesis is to analyze the manifestation of MCM proteins 2, 5 and 7 in the BCC of the periocular region, a comparison of MCM 2, 5 and 7 proteins expression and prognostic parameters of BCC of the periocular region - histological subtype, size of the tumour (area and largest diameter), depth of tumour invasion, and evaluation of different ways of immunohistochemical staining and MCM proteins expression compared to the histological subtypes of BCC and other prognostic parameters.

Material and methods

The study included 294 cases of basal cell carcinoma of the BCC of the periocular region - cross-sectional study in a fifteen-year period from 1998 to 2013, from archival material (paraffin blocks) from Institute of Pathology, School of Medicine, University of Belgrade and Ophthalmic Pathology Laboratory, Clinic of Eye Diseases, Clinical Center of Serbia. The technique used was tissue microarray, and immunohistochemical staining with the primary antibody MCM 2, MCM 5 and MCM 7. The analysis included distribution of immunopositivity, semi-quantitative determination of the percentage of stained cells (<10%, >10-50% and >50%) as well as the labeling index from the photographs made on digital camera of high resolution, counting at least 500 cells from each sample analyzed, using specially designed software for automatic image analysis. Immunohistochemical results were analyzed in relation to the histopathological subtype of BCC, and the clinical and histopathological prognostic parameters of BCC (histological subtype, tumour size, depth of invasion). To determine the statistical significance of the relationship and the results of immunohistochemical staining of the tumor following characteristics, we used

chi-square, Fisher, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests, or ANOVA and multiple t-test (Tukey), when analyzing the labeling index.

Results

The distribution of immunopositivity for all three MCM proteins tested in the entire sample was dominantly diffuse, with the presence of highly statistically significant differences in the distribution of MCM 7 proteins. High-risk tumors compared to low-risk tumors show a statistically significant difference in the distribution of MCM 2 protein immunopositivity and a highly statistically significant difference in the distribution of immunopositivity of the MCM 7 protein, while low-risk tumors compared to mixed-risk tumors show a statistically significantly different distribution of immunopositivity for MCM 5 protein. The distribution of immunopositivity in the entire sample relative to the depth of tumor invasion shows a statistically significant difference in the distribution of MCM 2 protein, while the distribution of immunopositivity relative to the depth of tumor invasion in high-risk tumors showed a statistically significant difference for the MCM 7 protein. The distribution of immunopositivity in the entire sample relative to the tumor surface shows a highly statistically significant difference in the distribution of MCM 7 protein. By analyzing the extent of expression of immunopositivity, the results obtained show a very clear distinction, with a statistically significant difference, between the tested proteins, and in relation to the risk groups of basocellular carcinoma and in relation to the depth of the invasion of basocellular carcinoma. Namely, the largest number of tumors of all three risk groups, all three depths of invasion, and all three groups of tumor diameters, demonstrate the expression of MCM 2 protein in the range of 10-50%, MCM 5 protein in the volume >50%, and MCM 7 protein in volume <10%. The highest expression of MCM 2 and 7 proteins show high-risk tumors, and the smallest low-risk tumors, while in contrast,

the highest expression of MCM 5 proteins show low-risk tumors, and the smallest, tumors of high risk. Furthermore, the highest percentage of tumors that involve the reticular derm is positive for the MCM 2 protein, those that capture the entire lid/subcutaneous/fat tissue thickness on the MCM 5 protein, and those that involve the muscle layer on the MCM 7 protein. Immunoexpression of MCM proteins 2, 5, and 7 in relation to the largest measured diameter, although growing with the increase of the same, showed no statistically significant difference. In relation to the area of the tumor, the extent of MCM protein expression is somewhat different compared to previous results, but without statistically significant difference - tumors of the largest area exhibit MCM 2 protein expression in the range of <10%, MCM 5 proteins in the range 10-50%, and MCM 7 proteins in the range >50%, which means that as the tumor grows, the expression of MCM 2 proteins decreases, and increases for MCM 5 and 7 proteins. The highest volume of expression of MCM 2 protein have high-risk tumors, those that involve reticular derm, and the smallest, tumors of low risk and the largest area. The highest volume of expression MCM 5 protein have low-risk tumors, those that involve the entire lid/subcutaneous/fat tissue thickness, and the largest diameter, and the smallest, tumors of high risk. The highest volume of expression of MCM 7 proteins have high-risk tumors, those that involve the muscle layer, and those of the largest surface, and the smallest, tumors of low risk and the largest diameter. By analyzing the labeling index, it was found that the highest percentage of immunoexpression in the tissue of basocellular carcinoma, with a statistically significant difference, showed MCM 5 protein and the smallest MCM 7, and that tumors of low risk of recurrence had the highest percentage of immunoexpression of all three MCM proteins, In relation to the depth of the invasion, the highest percentage of tumors affecting the entire lid/subcutaneous/fat tissue thickness is positive for MCM 5 and MCM 2 proteins, and those that involve the reticular derm on the MCM 7 protein. That is, the percentage of

immunoexpression of all three MCM proteins decreases as tumor aggressiveness increases, and it increases as the depth of tumor invasion for MCM 2 and 5 proteins increases and decreases for MCM 7. This means that tumors at higher risk of recurrence have less expression of all three MCM proteins - as histopathological aggression increases, the proliferation index decreases, as the incidence of invasion increases the percentage of immunoexpression of MCM 2 and 5 proteins, but not MCM 7 - as the tumor progresses deeper, proliferation index increases for MCM 2 and 5 proteins, but not for MCM 7. Comparison of the methods of evaluating immunohistochemical staining, semi-quantitative versus automatic counting, has shown moderate to significant agreement, which indicates both the reliability of both methods of evaluation, as well as the high reliability of automatic counting, as well as the consistency of the results obtained by the examiner.

Conclusion

This is the first study in which the expression and distribution of minichromosome maintenance proteins 2, 5, and 7 in the basocellular carcinoma of the skin of the periocular region was evaluated. An analysis of the obtained results showed that the tumors had a dominant diffuse distribution of positive cells in comparison with almost all the parameters tested. Immunoexpression of MCM proteins relative to the tumor size (area and largest measured diameter) did not show a statistically significant difference. By analyzing the immunoexpression of MCM proteins relative to the depth of tumor invasion as well as by comparing it with different histopathological tumor subtypes, it was observed that the diffuse distribution of immunopositivity was the predominant form of immunoexpression, with the fact that each of the analyzed MCM proteins had a very limited semiconductive range of its immuno-positiveness in almost two-third of the cases examined. Automatic counting of cells proved to be significantly reliable for assessing the extent of

immunopositivity, and thus it has been shown that it can also be used in the routine work of the pathologist. Despite similarities, differences in immunoexpression of MCM 2, 5, and 7 proteins were observed in relation to certain characteristics of basocellular carcinoma, indicating the need for additional comparative studies in this type of tumor, on the same or different localization, as well as in different tumors, which would contribute to assessing their individual usability in assessing the biological potential of the tumor.

Key words

MCM 2, MCM 5, MCM 7, basal cell carcinoma, periocular region, eyelids

Scientific field: Medicine

The branch of scientific field: Ophthalmology, Pathology

САДРЖАЈ

1. УВОД	25
1.1. Базоцелуларни карцином коже	25
1.1.1. Патогенеза	25
1.1.2. Учесталост, узраст и пол	28
1.1.3. Локализација	28
1.1.4. Клинички изглед	33
1.1.4.1. Нодуларни (или нодуло-улцеративни) подтип базоцелуларног карцинома	33
1.1.4.2. Цистична варијанта базоцелуларног карцинома	35
1.1.4.3. Пигментовани базоцелуларни карцином	36
1.1.4.4. Кератотички базоцелуларни карцином	37
1.1.4.5. Инфилтративна варијанта базоцелуларног карцинома	37
1.1.4.6. Микронодуларни базоцелуларни карцином	37
1.1.4.7. Склерозирајући базоцелуларни карцином	37
1.1.4.8. Површински или суперфицијални базоцелуларни карцином	38
1.1.5. Хистолошка слика	44
1.1.5.1. Хистопатолошки подтипови базоцелуларног карцинома	44
1.1.5.2. Одређивање стадијума базоцелуларног карцинома периокуларне регије/капка	49
1.1.6. Терапија и прогноза	51
1.2. Протеини одржавања минихромозома	54

1.2.1. Ђелијски циклус и маркери пролиферације	54
1.2.2. Протеини одржавања минихромозома и њихова улога у ћелијском циклусу	55
1.2.3. Протеини одржавања минихромозома и канцерогенеза	57
1.2.4. Протеини одржавања минихромозома у клиничко-патолошким студијама њихове експресије као антигена пролиферације	59
1.2.4.1. Експресија МЦМ фамилије протеина у не-неопластичким болестима	59
1.2.4.2. Улога МЦМ протеинског комплекса у неопластичким лезијама	59
1.2.4.3. Експресија протеина одржавања минихромозома у базоцелуларном карциному коже	62
1.2.5. Улога МЦМ фамилије протеина у лечењу канцера	63
2. ЦИЉЕВИ РАДА	64
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА	65
3.1. Формирање ткивног микрониза	65
3.2. Имунохистохемијски протокол	68
3.2.1. Припрема узорака	68
3.2.2. Депарафинизација	68
3.2.3. Блокирање ендогене пероксидазе	68
3.2.4. Антигенско демаскирање	69
3.2.5. Примарна антитета	69
3.2.6. Визуелизациони систем	70
3.2.7. Дехидратација исечака	70
3.2.8. Контролни узорци	70

3.3. Евалуација имунохистохемијског бојења	70
3.3.1. Дистрибуција имунопозитивности	72
3.3.2. Обим експресије имунопозитивности	72
3.3.3. Индекс обележавања	72
3.4. Статистичка анализа резултата	75
4. РЕЗУЛТАТИ РАДА	77
4.1. Клиничке карактеристике пацијената	77
4.2. Карактеристике базоцелуларних карцинома	78
4.3. Имунохистохемијска анализа експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7	81
4.3.1. Дистрибуција имунопозитивности	81
4.3.1.1. Однос дистрибуције имунопозитивности према ризичним групама базоцелуларног карцинома	82
4.3.1.2. Однос дистрибуције имунопозитивности према дубини инвазије базоцелуларног карцинома	83
4.3.1.3. Однос дистрибуције имунопозитивности према дубини инвазије и ризичним групама базоцелуларног карцинома	84
4.3.1.3.1. Тумори ниског ризика	85
4.3.1.3.2. Тумори мешовитог ризика	86
4.3.1.3.3. Тумори високог ризика	87
4.3.1.4. Однос дистрибуције имунопозитивности према површини тумора	88
4.3.1.5. Однос дистрибуције имунопозитивности према највећем измереном пречнику тумора	89

4.3.2. Обим експресије имунопозитивности	90
4.3.2.1. Однос обима експресије према ризичним групама базоцелуларног карцинома	90
4.3.2.2. Однос обима експресије према дубини инвазије базоцелуларног карцинома	91
4.3.2.3. Однос обима експресије имунопозитивности према дубини инвазије и ризичним групама базоцелуларног карцинома	93
4.3.2.3.1. Тумори ниског ризика	93
4.3.2.3.2. Тумори мешовитог ризика	94
4.3.2.3.3. Тумори високог ризика	96
4.3.2.4. Однос обима експресије према површини тумора	97
4.3.2.5. Однос обима експресије према највећем измереном пречнику тумора	98
4.3.3. Индекс обележавања одређен аутоматским бројањем ћелија	99
4.3.3.1. Индекс обележавања одређен аутоматским бројањем ћелија, према хистопатолошким одликама тумора у односу на ризик од појаве рецидива	99
4.3.3.2. Индекс обележавања одређен аутоматским бројањем ћелија, према дубини туморске инвазије	101
4.3.3.3. Индекс обележавања одређен аутоматским бројањем ћелија, према дубини туморске инвазије у односу на ризичне групе базоцелуларног карцинома	102
4.3.3.3.1. Тумори ниског ризика	102
4.3.3.3.2. Тумори мешовитог ризика	105
4.3.3.3.3. Тумори високог ризика	106
4.3.3.4. Индекс обележавања одређен аутоматским бројањем ћелија према површини тумора	108
4.3.3.5. Индекс обележавања одређен аутоматским бројањем ћелија према највећем измереном пречнику тумора	109

4.3.4. Процена различитих начина евалуације имунохистохемијског бојења	110
4.3.4.1. Процена различитих начина евалуације експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије	110
4.3.4.2. Процена различитих начина евалуације експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије, а према хистопатолошким одликама тумора у односу на учесталост појаве рецидива	112
4.3.4.2.1. Тумори ниског ризика	112
4.3.4.2.2. Тумори мешовитог ризика	114
4.3.4.2.2. Тумори високог ризика	116
4.4. Резиме резултата рада у односу на испољену статистички значајну разлику и високо статистички значајну разлику	118
4.4.1 Дистрибуција имунопозитивности	118
4.4.1.1. Дистрибуција имунопозитивности и ризичне групе	118
4.4.1.2. Дистрибуција имунопозитивности и дубина инвазије	118
4.4.1.3. Дистрибуција имунопозитивности и дубина туморске инвазије према ризичним групама	118
4.4.1.3.1. Тумори ниског ризика	118
4.4.1.3.2. Тумори мешовитог ризика	118
4.4.1.3.3. Тумори високог ризика	118
4.4.1.4. Дистрибуција имунопозитивности и површина тумора	118
4.4.1.5. Дистрибуција имунопозитивности и пречник тумора	119
4.4.2 Обим имунопозитивности	119
4.4.2.1. Обим имунопозитивности и ризичне групе	119

4.4.2.2. Обим имунопозитивности и дубина инвазије	119
4.4.2.3. Обим имунопозитивности и дубина туморске инвазије према ризичним групама	119
4.4.2.3.1. Тумори ниског ризика	120
4.4.2.3.2. Тумори мешовитог ризика	120
4.4.2.3.3. Тумори високог ризика	120
4.4.2.4. Обим имунопозитивности и површина тумора	120
4.4.2.5. Обим имунопозитивности и пречник тумора	121
4.4.3. Аутоматско бројање	121
4.4.3.1. Аутоматско бројање и ризичне групе	121
4.4.3.2. Аутоматско бројање и дубина туморске инвазије	121
4.4.3.3. Аутоматско бројање и дубина инвазије према ризичним групама	122
4.4.3.3.1. Тумори ниског ризика	122
4.4.3.3.2. Тумори мешовитог ризика	122
4.4.3.3.3. Тумори високог ризика	122
4.4.3.4. Аутоматско бројање и површина тумора	123
4.4.3.5. Аутоматско бројање и највећи пречник тумора	123
4.4.4. Поређење начина евалуације ИХХ бојења	123
4.4.4.1. Семиквантитативно према аутоматском у целокупном узорку БЦЦ	123
4.4.4.2. Семиквантитативно према аутоматском у односу на ризичне групе	123
4.4.4.2.1. Тумори ниског ризика	123
4.4.4.2.2. Тумори мешовитог ризика	123
4.4.4.2.3. Тумори високог ризика	123

5. ДИСКУСИЈА	124
6. ЗАКЉУЧЦИ	158
7. ЛИТЕРАТУРА	160

1. УВОД

1.1. БАЗОЦЕЛУЛАРНИ КАРЦИНОМ КОЖЕ

Базоцелуларни карцином (енгл. *basal cell carcinoma*) коже је малигна неоплазма за коју се сматра да настаје од, или је према пореклу веома блиско повезана са базалним и стем ћелијама епидермиса или стем ћелијама длачних фоликула [1-6]. Према подацима из Сједињених Америчких Држава, више од трећине свих малигних тумора коже чине не-меланомски канцери - први по учесталости је базоцелуларни карцином коже који представља 75-90% свих не-меланомских канцера тог органа [1,3]. У периокуларној регији – очни капци, унутрашњи и спољашњи угао ока, овај малигни тумор је убедљиво најучесталији, односно представља најчешћи примарни малигни тумор коже ове регије [23-32]. Базоцелуларни карцином углавном настаје *de novo*, међутим, иако припада малигним неоплазмама, метастазира у веома ниској инциденти – 0,0288-0,55% случајева [1-6,15-20]. Оно што га заправо чини малигним је локално инвазиван/деструктиван начин раста и честа склоност рецидивима. Од фактора ризика за појаву базоцелуларног карцинома идентификовано је неколико. На првом месту то су светлија кожа и повећано излагање сунчевој светлости, затим јонизујуће зрачење и старије животно доба, присуство имunosупресије, као и породична склоности ка развоју не-меланомских канцера коже [1-6]. Наследна предиспозиција за развој овог тумора свакако постоји и запажа се у неколико стања/синдрома од којих су албинизам, *xeroderma pigmentosum* и синдром невоидних базоцелуларних карцинома (енгл. *nevroid basal cell carcinoma syndrome*) - *Gorlin-Goltz*-ов синдром најчешћи и најважнији [1-6,15-20,59-61].

1.1.1. ПАТОГЕНЕЗА

Није у потпуности познато или јасно који је тачан узрок настанка базоцелуларног карцинома коже. Претпоставља се да постоји генетска предиспозиција, а свакако у спрези са факторима средине. У литератури најчешће спомињана дуготрајна изложеност сунцу, али и рентгенском и гама зрачењу,

вероватно је најближа истини [1-6,15-20]. Такође, са настанком базоцелуларног карцинома коже у тесну везу се доводи и присуство имуносупресије током лечења кортикостероидима [1-6,15-20]. Исто тако, поједине болести попут *xeroderma pigmentosum*, *Bazex-Dupré-Christol*-овог синдрома, али и дејство алкохола, предиспонирају настанак овог облика канцера коже [1-6,15-20].

За разлику од тачне етиологије која није у потпуности позната или разјашњена, патогенетски механизам настанка базоцелуларног карцинома коже доста добро је поткрепљен везом између овог тумора и пилосебацеалних јединица, чињеницом да се ови тумори најчешће откривају на подручјима коже прекривеним длакама [1-6,15-20]. Ово, наравно, не би могло у потпуности да важи и за кожу периокуларне регије, с обзиром на то да иста нема длака, али поседује трепавице, а значајан број ових тумора управо захвата или настаје на рубу капка, где се трепавице и налазе. У бројним радовима се потенцира на вези између плурипотентних ћелија базалног слоја епидермиса или фоликуларних структура као месту настанка овог тумора, из разлога што ове ћелије настају континуирано током живота, а могу да стварају длаке, лојне и апокрине знојне жлезде [1-6,15-20]. Базоцелуларни карцином обично полази из епидермиса, или из спољашњег омотача фоликула длаке, места где се налазе стем ћелије, испод дуктуса лојних жлезда [1-6,15-20].

Уопште узев, наше разумевање молекуларне генетике канцера коже, током последње деценије прошлог века, значајно је напредовало. Разјашњава се улога интрацелуларних сигналних путева како у базоцелуларним карциномима који се јављају спорадично, тако и онима који се добијају наслеђеним мутацијама, попут *Gorlin-Goltz*-овог (аутозомно доминантног) синдрома [7-12,59,60].

Сигнални пут, назван уметнути/јеж (енгл. *patched/hedgehog*), сматра се да утиче на диференцијацију разних ткива током феталног развоја, и да након ембриогенезе има улогу у регулацији раста ћелија и њихових морфолошко-физиолошких промена [7-12]. Губитак инхибиције овог пута повезује се са настанком различитих малигнитета (медулобластом, рабдомиосарком, итд.), укључујући и базоцелуларни карцином коже [7-12]. Један екстраћелијски протеин којег кодира *hedgehog* ген, везује се за одређени рецепторски комплекс на ћелијској мембрани, чиме започиње каскада догађаја који воде до пролиферације ћелија [7-12]. За настанак базоцелуларног карцинома најважнији је, од три позната људска хомолога, тзв. звучни јеж (енгл. *sonic*

hedgehog, *SHH*) протеин [7-12]. Друга два су тзв. уметнути (енгл. *patched*, *PTCH*) протеин, лиганд-везујућа компонента *hedgehog* рецепторског комплекса на ћелијским мембранама и, тзв. заглађени (енгл. *smoothened*, *SMO*) протеин, који се сматра одговорним за превођење *hedgehog* сигнала на гене [7-12]. Механизам, најупрошћеније посматрано, може се описати на следећи начин: *SHH* веже *PTCH*, који онда отпушта и активира *SMO*, а *smoothened* сигнал се преводи до једра; у одсуству *SHH*, *PTCH* се веже за *SMO* и инхибира га [7-12]. Ако се појаве мутације у *PTCH* гену, оне спречавају везивање на *SMO*, што надаље симулира присутност *SHH* [7-12]. Тиме се остварује константна или конститутивна активност невезаног *SMO*, чиме провођење *hedgehog* сигнала постаје неометано [7-12]. Исто тако, активирање истог сигналног пута може да настане и мутацијама *SMO* гена, са истим последичним нерегулисаним подстицањем туморског раста [7-12].

Докази који поткрепљују настанак неоплазија дејством ултраљубичастог (УВ) зрачења, указују да се исто дешава барем путем два механизма. Први је иницијација продужене пролиферације ћелија, чиме се повећава шанса за настанак грешака у транскрипцији ДНК, које воде у трансформацију ћелије [15-20,33-35]. Други механизам је директно оштећење репликације ДНК, што доводи до активације протоонкогена или деактивације тумор-супресорских гена [15-20,33-35].

Продужена изложеност УВ зрачењу може да има и неке локалне учинке, попут супресије имунског система коже и губитка имунолошког одговора на појаву тумора коже [33-35]. У литератури је показано да УВ зрачење мења нуклеотиде двају тумор-супресорских гена, *TP53* и *PTCH* - оба су повезана са настанком и развојем базоцелуларног карцинома [33-35]. Исто тако, у спорадичним случајевима базоцелуларног карцинома, пронађене су тзв. помак оквира читања (енгл. *frameshift*) мутације *BAX* гена (са *Bcl-2* повезан *X* протеин; гена повезаних са апоптозом), где је редукција *Bcl-2* протеина виђана у агресивнијим/инфилтративнијим типовима овог карцинома [33-35].

Расветљавање кључних сигналних путева и њихове улоге у патогенези кутаних неоплазми, као што је нпр. *sonic hedgehog* сигнални пут, унапредило је наша сазнања о овом малигнитету, дајући подстицај напретку тзв. циљних терапија [7-12].

1.1.2. УЧЕСТАЛОСТ, УЗРАСТ И ПОЛ

Као најчешћи канцер коже чија се инциденца удвостручава сваких 25 година, највише због климатских промена, базоцелуларни карцином је ипак најмање одговоран за смртне исходе, зато што има најмању склоност метастазирању [1-6,15-20,33]. Припадници беле расе, за разлику од припадника црне расе и особа тамнијег тена, су у већем ризику од развоја овог карцинома, као и особе које живе у сунчаним и топлим деловима света, или су професионално везане за дужи боравак на отвореном простору [1-6,15-20,33].

Са изузетком појединих синдрома [синдром невоидних базоцелуларних карцинома - *Gorlin-Gotz*-ов синдром, *Bazex-Dupré-Christol*-ов синдром, *Rombo* синдром, синдром линеарног унилатералног базоцелуларног невуса (енгл. *linear unilateral basal-cell nevus syndrome*), *xeroderma pigmentosum*], овај тумор коже ретко се виђа код пацијената млађих од 40 година (5-20% случајева јавља се у животној доби од 20-40 година) али, у овој старосној групи, чешће се јављају агресивнији типови тумора [15-20,59-61]. Ризик за појаву овог тумора се повећава са старењем, а врх инциденције је између 50. и 80. године живота [15-20].

Поједини аутори наводе да су особе мушког пола, посебно беле расе, током живота у ризику од развијања овог облика карцинома коже у 33-39%, док су особе женског пола, исте расе, у 23-38% [1-6,15-20,33].

1.1.3. ЛОКАЛИЗАЦИЈА

Анатомска дистрибуција базоцелуларног карцинома коже, која одговара дистрибуцији ембрионалних фузионих плоча и тиме подупиरे тезу да у патогенези овог канцера грешке у ембрионалном развоју могу да имају одређену улогу, може се описати на следећи начин: овај тумор се најчешће појављује на кожи главе (лице; нос, посебно врх носа и носна крила) и то у 70% случајева, затим на кожи трупа у 25% случајева, док се са најмањом учесталошћу јавља на кожи пениса, вулве или перианалне регије, у 5% случајева [1-6,15-20].

На кожи периокуларне регије тумор се најчешће јавља на **доњем капку** (у 48-73% случајева), затим у **унутрашњем углу** ока (у 25-30% случајева), на **горњем**

кашку у 15% случајева, док је најмања учесталост појављивања забележена у пределу спољашњег угла ока, и то у 5% случајева [23-32]. (Слика 1, 2, 3 и 4)



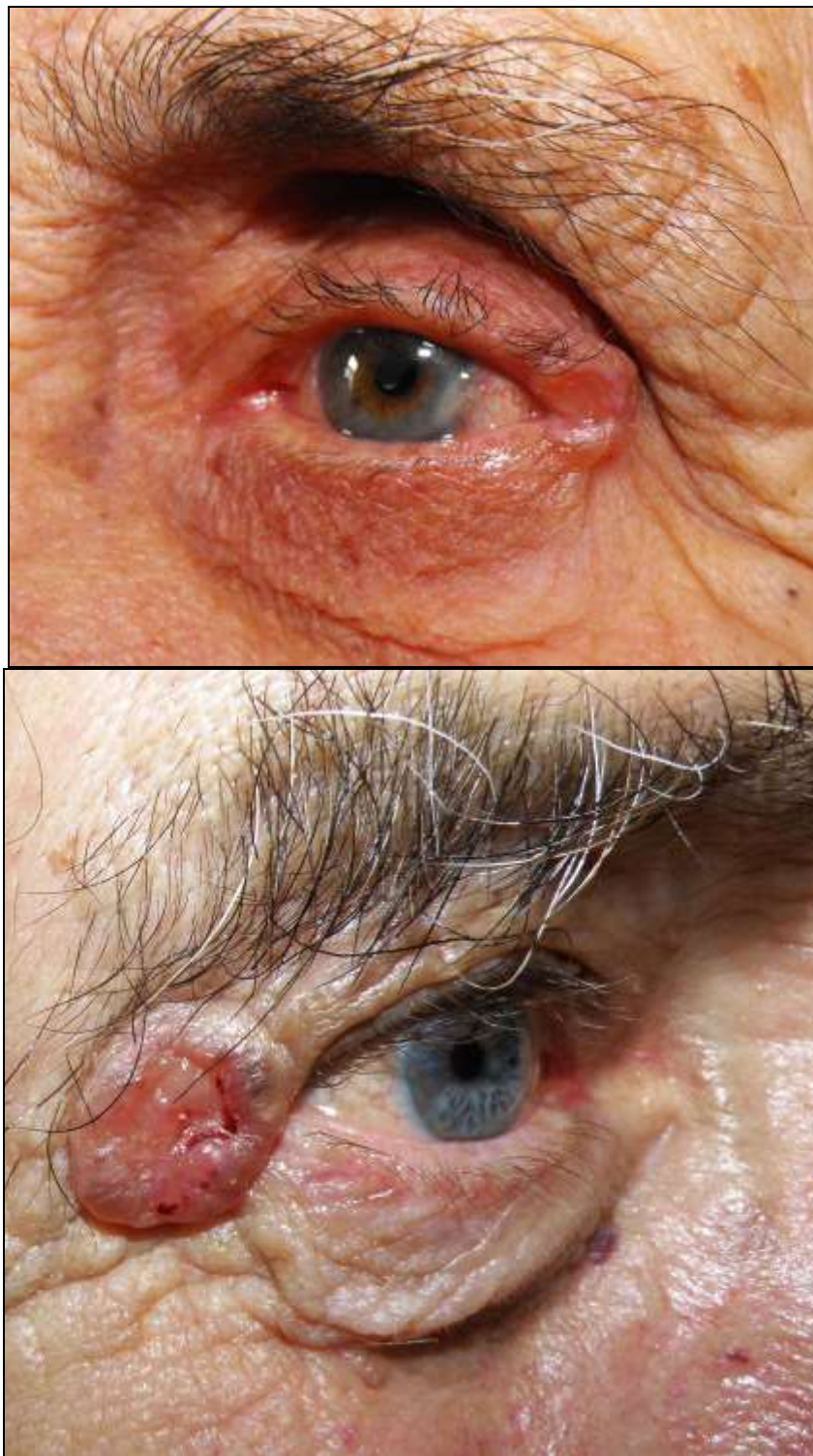
Слика 1. Нодуло-улцеративни тумор који захвата готово цео доњи капак и унутрашњи угао десног ока правећи механички ектропијум. На левом оку се види ектропијум доњег капка са туморском променом која захвата унутрашњу трећину руба доњег капка.



Слика 2. Мања и већа нодуло-улцеративна лезија која захвата унутрашњи угао
ока.



Слика 3. Нодуларна и нодуло-улцеративна лезија која захвата горњи капак.



Слика 4. Нодуларна лезија која захвата спољашњи угао ока.

1.1.4. КЛИНИЧКИ ИЗГЛЕД

Анамнеза уз клиничку слику је довољна да се постави високо оправдана сумња на постојање базоцелуларног карцинома коже, наравно од стране искусног клиничара.

Дефинитивна дијагноза се поставља хистопатолошким анализом узорка узетог инцизионом или ексцизионом биопсијом [13-14]. Понекад је, додуше ретко, у диференцијално-дијагностичке сврхе, неопходно спровести и имунохистохемијску анализу тумора [62-66].

Кожа је често сјајна, бисерног изгледа, затегнута, прозирна. Промена је изнад нивоа коже и може да личи на восак свеће који је капнуо на кожу, односно има изглед воштане папуле са централном депресијом/ерозијом/улцерацијом, издигнутих рубова са проширеним крвним судовима на површини. Тумор није болан и не сврби.

1.1.4.1. Нодуларни (или нодуло-улцеративни) подтип базоцелуларног карцинома је, са клиничког становишта, најчешћи облик испољавања овог тумора на кожи периокуларне регије, који има изглед лезије издигнутих воштаних рубова, са површинским телангиектазијама, са или без централне депресије. Више од 60% базоцелуларних карцинома коже капака припадају овом типу [1-6,15-20]. Раст тумора, обично прати појава централне улцерације што помаже у дијагнози. Депоновање хемосидерина унутар ткива тумора последица је интратуморског крварења из малих крвних судова [15-20]. Нодуларни тумор може да изгледа и као циста, што се често у очима недовољно искусног офталмолога може схватити као инклузиона или ретенциона циста капка. (Слика 5 и 6)



Слика 5. Нодуло-улцеративна лезија доњег капка, са и без захватања руба капка.



Слика 6. А. Нодуло-улцеративна лезија горњег капка. **Б.** Мултипли базоцелуларни карцином коже периокуларне регије - три нодуларне лезије, једна на горњем капку, друга која захвата руб доњег капка и трећа у пределу спољашње трећине доњег капка.

1.1.4.2. Цистична варијанта базоцелуларног карцинома није честа и има изглед плавосивкасте цистичне лезије испуњене муцином желатинозне конзистенције, иако може да има и полипоидни изглед [15-20].

1.1.4.3. Пигментовани базоцелуларни карцином је ретка варијанта нодуларног подтипа овог тумора, која се одликује присуством раптрканих смеђе-црних макула у ткиву тумора или у целини пигментованом неоплазмом [15-20], због чега, са клиничког становишта, зна да подсети на меланом, иако би увек требало имати на уму да је меланом на капцима изузетно редак. Типично, нека подручја овог тумора не садрже пигмент те се могу видети воштани издигнути рубови са телангиектазијама што помаже у клиничкој диференцијацији. (Слика 7)



Слика 7. Нодуло-улцеративни пигментовани тумор са површинским плитким екскоријацијама.

1.1.4.4. Кератотички базоцелуларни карцином одликује се израженијим орожавањем на површини [15-20].

1.1.4.5. Инфилтративна варијанта базоцелуларног карцинома ураста у дермис између влакана колагена, те је клинички мање упадљива и понекад може да се схвати, посебно од стране недовољно искусних офталмолога, као хронични улцерозни блефаритис [15-20]. (Слика 8)



Слика 8. Инфилтративна форма тумора унутрашњег угла и целог доњег капка са захватањем површине ока и предње орбите.

1.1.4.6. Микронодуларни базоцелуларни карцином је такође агресивнији подтип овог тумора као и инфилтративни. Није склон улцерацијама и чврст је на додир. Може имати наизглед добро дефинисани руб [15-20].

1.1.4.7. Склерозирајући базоцелуларни карцином, који се јавља у 10% свих случајева, клинички личи на ожиљак, како због инфилтрације простора између

колагенских влакана тако и индукције пролиферације фибробласта у дермису, чиме се повећава депозиција колагена (интерстицијска склероза) [15-20]. Пошто најмање личи на нодуларни (нодуло-улцеративни) облик базоцелуларног карцинома (изгледа равно или лагано улегнуто, фиброзно и чврсто, а улцерација, крварење и појава краста су ретки), спада у најтеже ентитете за клиничко дијагностиковање. (Слика 9)



Слика 9. Доминантно склерозирајућа форма тумора.

1.1.4.8. Површински или суперфицијални базоцелуларни карцином, који клинички изгледа као еритематозни, добро ограничени плак, често са беличастим љуспицама, а неретко је мултицентричан, тј. постоји клинички нормална кожа између подручја захваћених тумором, најчешће расте споро, и има минималну тенденцију ка инвазивном расту [15-20].

Пацијенти са базоцелуларним карциномом обично пријављују споро растућу промену на кожи која прокрвари приликом повреде или додира, односно присуство ранице која дуго не зараста, са крастом на површини чије уклањање такође провоцира крварење. У почетку, тумор је малих димензија, најчешће неколико милиметара у пречнику али, временом које се мери годинама или чак деценијама (овај тумор споро расте - око 0,5 *cm* током годину и по дана [1-6,15-20,32]), уколико се не лечи, може да достигне величину и од неколико центиметара [42-44]. (Слика 10 и 11)



Слика 10. Дуготрајућа нелечена лезија великих димензија, клиничких одлика нодуло-улцеративне и инфилтративне лезије.



Слика 11. Нелечена нодуло-улцеративна лезија спољашњег и унутрашњег угла ока.

Међутим, поједини облици базоцелуларног карцинома имају особине веома деструктивног инфилтративног раста, немилосрдно разарајући околно ткиво – у клиничкој пракси сусрећемо туморе са инвазијом вежњаче, продором у очну шупљину/орбиту, продором у очну јабучицу, разарањем костију орбите, итд. (Слика 10, 11, 12 и 13)



Слика 12. Нодуло-улцеративни тумор који захвата унутрашњи угао десног ока, продире у предњу орбиту и покрива површину очне јабучице.



Слика 13. Улцеративна лезија са фибрином на површини, која захвата цео доњи капак. Компјутеризована томографија орбите (сагитални пресек) показује дубок туморски продор у структуре предње доње орбите (стрелица).

Тумор понекад расте и у пределу обрве. (Слика 14)



Слика 14. Нодуло-улцеративни тумор у пределу обрве.

По правилу, овај карцином примарно не захвата слузокожу – описани су екстремно ретки случајеви примарног базоцелуларног карцинома вежњаче [57] и сузне брадавице [58].

1.1.5. ХИСТОЛОШКА СЛИКА

1.1.5.1. Хистопатолошки подтипови базоцелуларног карцинома коже су: [15-20,45-56]

- нодуларни (солидни)
- цистични
- микронодуларни
- мултифокални суперфицијални
- инфилтративни
- склерозирајући (морфеаформни)
- пигментовани
- аденоидни (проминентно присуство стромалног муцина)
- кератотички (сквамозна диференцијација и кератинизација у централним деловима острваца)
- инфундибулоцистични
- метатипични (гнезда и траке крупних светлих ћелија, без палисадирања)
- базосквамозни
- фиброепителиоматозни
- мешовити
- остале ретке варијанте:
 1. фоликуларни (пиларни)
 2. матрикални
 3. трихолемални
 4. са себацеалном диференцијацијом
 5. са апокрином диференцијацијом
 6. са екрином диференцијацијом

7. са неуроендокрином диференцијацијом
8. гранулираних ћелија (енгл. *granular cell*)
9. светлих ћелија (енгл. *clear cell*)
10. ћелија изгледа прстена печатњака (енгл. *signet ring*)
11. са мултинуклеарним циновским ћелијама
12. адамантоидни
13. шваноидни

У односу на агресивност тумора и склоности ка рецидивима, хистопатолошка подела базоцелуларног карцинома је извршена и на туморе ниског (*low-grade*) и високог (*high-grade*) градуса [1-6,15-20,45-56].

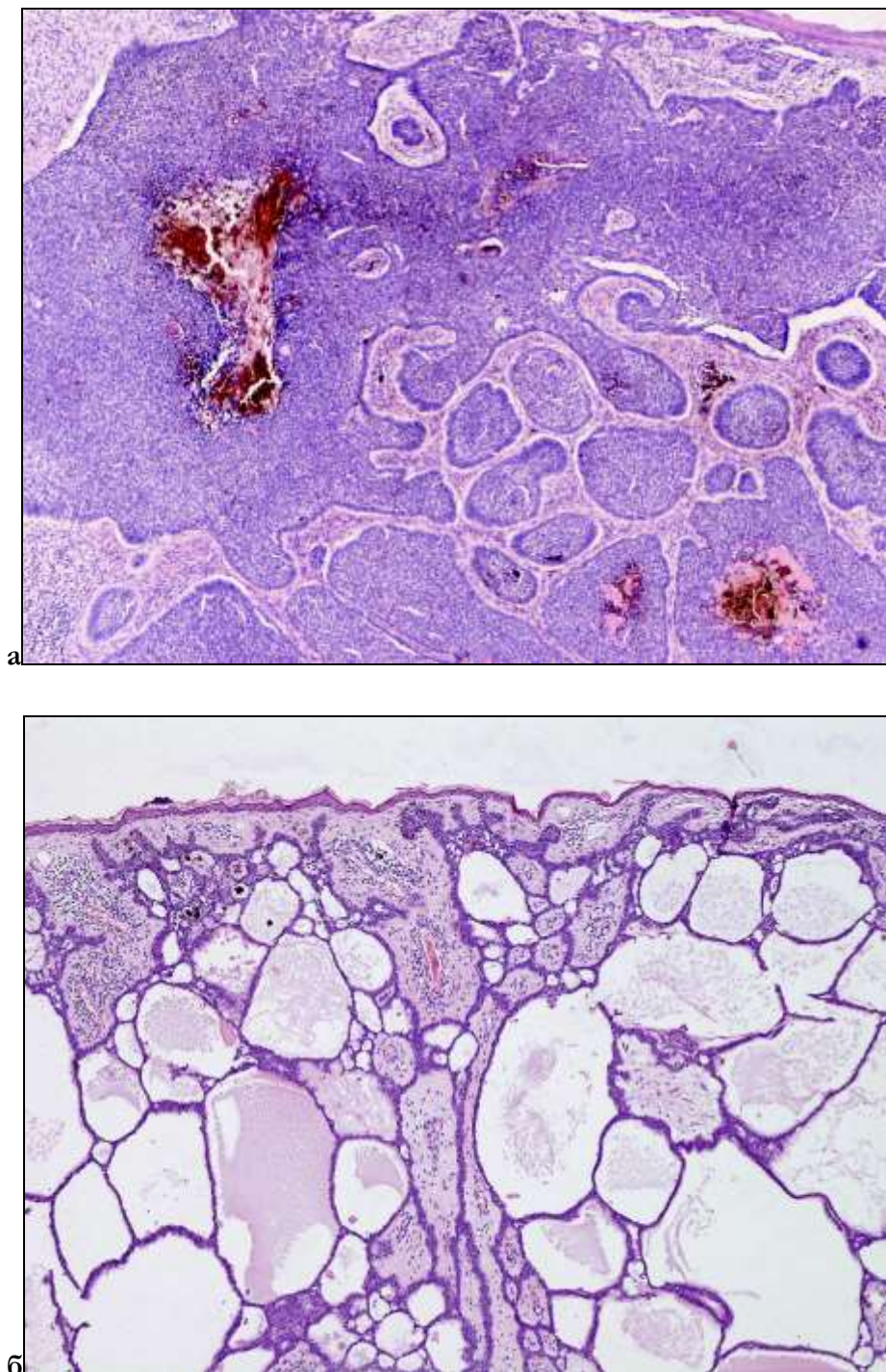
Low-grade тумори су:

1. нодуларни (солидни)
2. цистични
3. пигментовани (Слика 15)
4. аденоидни (Слика 15)
5. кератотички
6. инфундибулоцистични
7. фиброепителиоматозни
8. као и остале ретке варијанте (видети раније).

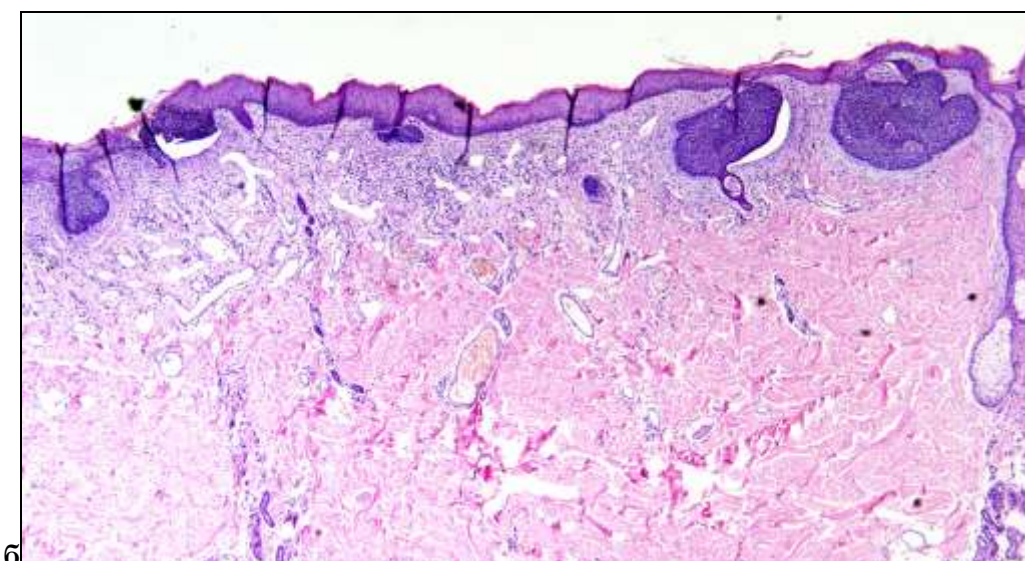
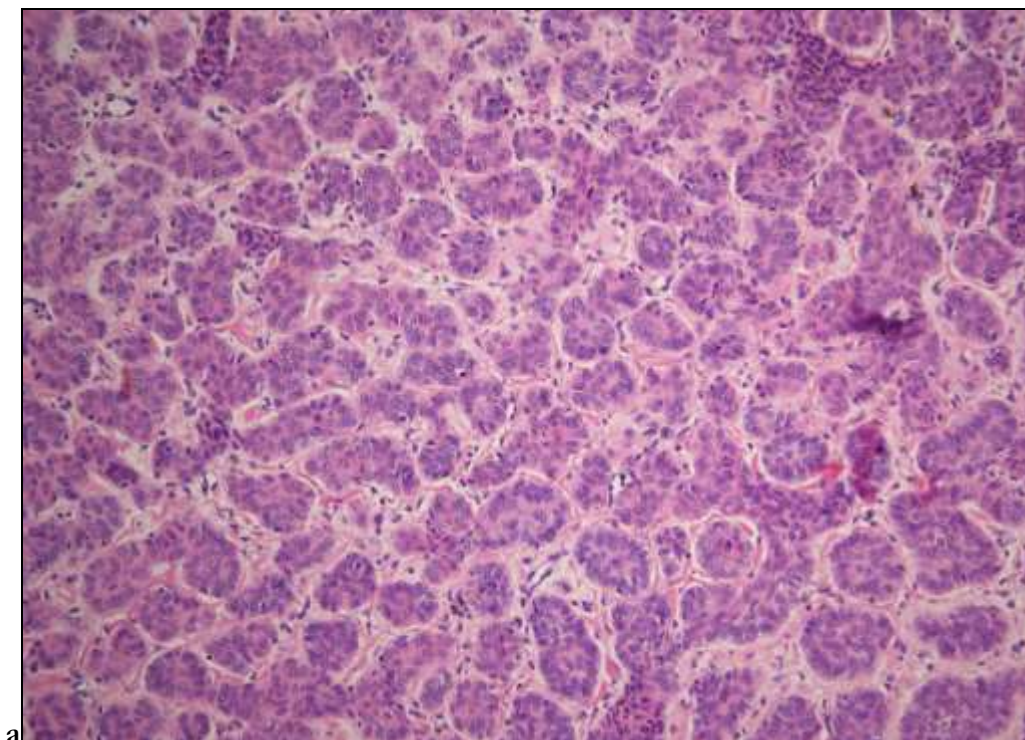
High-grade тумори су: (Слика 16)

1. микронодуларни
2. мултифокални суперфицијални
3. инфилтративни
4. склерозирајући (морфеаформни)
5. базосквामозни (метатипични)

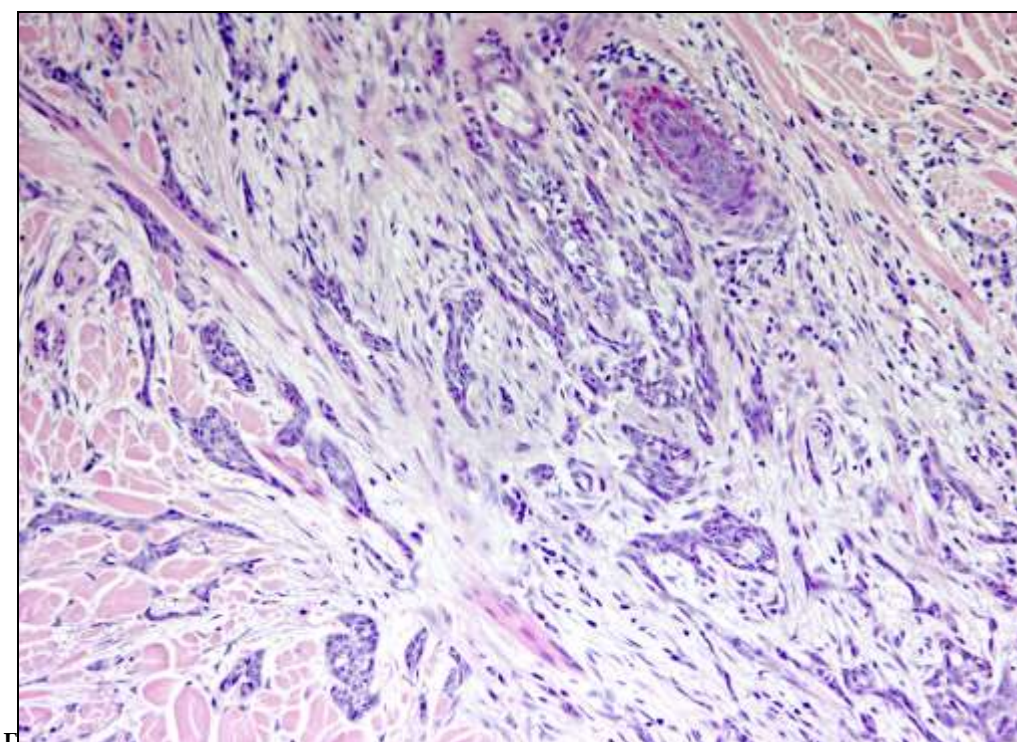
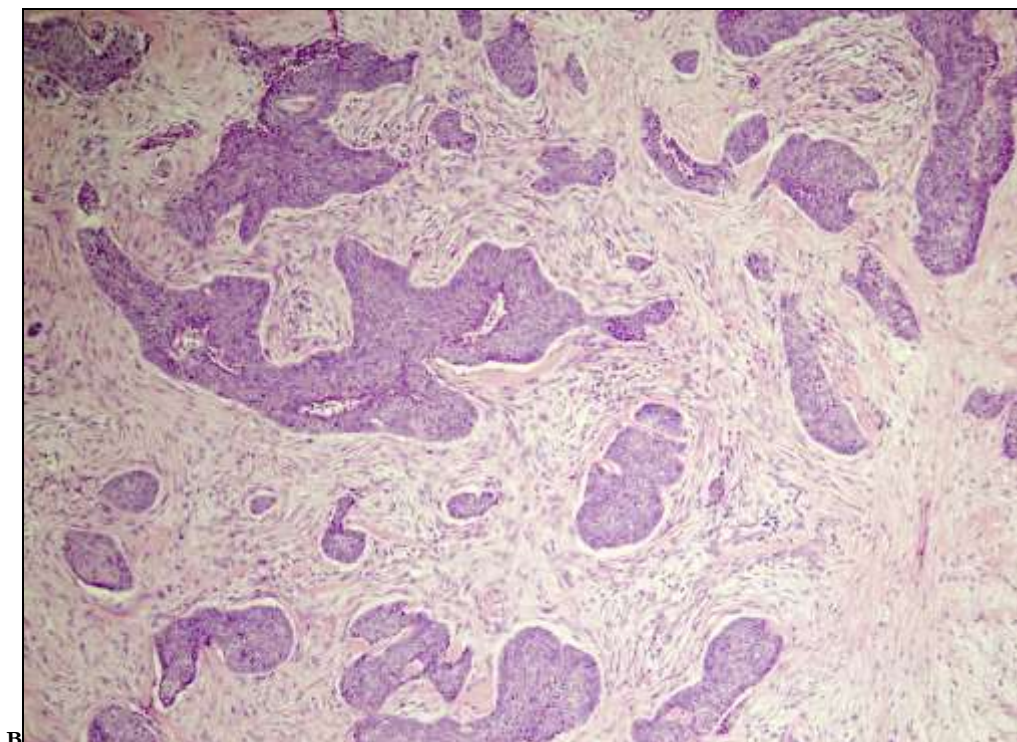
Група тумора који имају хистопатолошке одлике тумора и ниског и високог градуса, у овом раду, сврстани су у категорију мешовити (*mixed*).



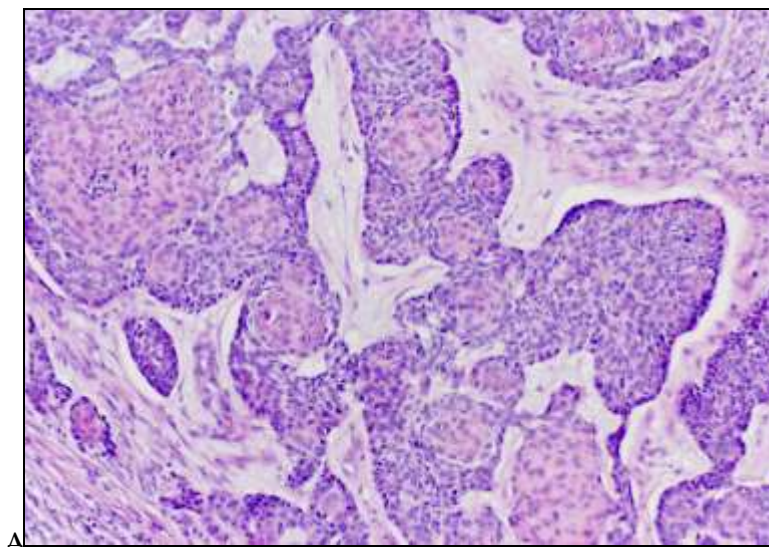
Слика 15. Пигментовани (а) и аденоидни (б) хистопатолошки подтип базоцелуларног карцинома.



Слика 16. *High-grade* хистопатолошки подтипови базоцелуларног карцинома: (а) микронодуларни, (б) суперфицијални, (в) инфилтративни, (г) морфеаформни и (д) метастатични.



Слика 16 (наставак). *High-grade* хистопатолошки подтипови базоцелуларног карцинома: (а) микронодуларни, (б) суперфицијални, (в) инфилтративни, (г) морфеаформни и (д) метатипични.



Слика 16 (наставка). *High-grade* хистопатолошки подтипови базоцелуларног карцинома: (а) микронодуларни, (б) суперфицијални, (в) инфилтративни, (г) морфеаформни и (д) метатипични.

Учесталост појављивања појединих хистопатолошких подтипова базоцелуларног карцинома је следећа: од *low-grade* тумора убедљиво најчешћи је нодуларни (солидни), присутан у преко 30% случајева, док су остале варијанте ретке (<0,5-3%); од *high-grade* тумора најчешће се појављују, са мање-више сличном учесталости (<6%), инфилтративни, микронодуларни и базосквамозни, а нешто ређе (~3%) суперфицијални и склерозирајући (морфеаформни), а најређе (<0,5%) метатипични [1-6,15-20,45-56].

1.1.5.2. Одређивање стадијума базоцелуларног карцинома периокуларне регије/капка

Класификациони систем који је коришћен приликом израде ове докторске тезе је **ТНМ класификациони систем малигнух тумора 8. издање, UICC** (*Union for International Cancer Control*) и **AJCC** (*American Joint Committee on Cancer*) [21], који је почео да се примењује од јануара **2018. године**. Разлике у односу на претходну, до скоро важећу, 7. верзију [22] приказане су у Табели 1.

Табела 1. ТНМ класификациони системи карцинома коже капка. [21-22]

(п)ТНМ класификација 7. издање (UICC/AJCC)		(п)ТНМ класификација 8. издање (UICC/AJCC)	
(п)Т класификација		(п)Т класификација	
T1	Тумор 5 mm или мањи у највећој димензији, који не захвата тарзус или руб капка	T1	Тумор 10 mm или мањи у највећој димензији
		T1a	не захвата тарзус или руб капка
		T1b	захвата тарзус или руб капка
		T1c	захвата капак целом дебљином
T2a	Тумор већи од 5 mm у највећој димензији, али не већи од 10 mm у највећој димензији, или било који тумор који захвата тарзус или руб капка	T2	Тумор већи од 10 mm, али не већи од 20 mm у највећој димензији
		T2a	не захвата тарзус или руб капка
T2b	Тумор већи од 10 mm у највећој димензији, али не већи од 20 mm у највећој димензији, или било који тумор који захвата капак целом дебљином	T2b	захвата тарзус или руб капка
		T2c	захвата капак целом дебљином
T3a	Тумор већи од 20 mm у највећој димензији, или било који тумор који захвата околне структуре (очну јабучицу или орбиту), или било који T са перинеуралном инвазијом	T3	Тумор већи од 20 mm, али не већи од 30 mm у највећој димензији
		T3a	не захвата тарзус или руб капка
T3b	Тумор за чије комплетно уклањање је потребна енуклеација, екзентерација или ресекција костију	T3b	захвата тарзус или руб капка
		T3c	захвата капак целом дебљином
T4	Тумор није ресектабилан због широког захватања очних, орбиталних, краниофацијалних структура или мозга	T4	Било који тумор капка који захвата околне очне, или орбиталне, или структуре лица
		T4a	захвата очне или орбиталне структуре
		T4b	захвата (или еродира кроз) коштане зидове орбите или се шири у параназалне шупљине или захвата сузну кесу/сузноносни канал или мозак
(п)Н класификација		(п)Н класификација	
Nx	Регионални лимфни нодуси не могу да буду процењени	Nx	Регионални лимфни нодуси не могу да буду процењени
N0	Без метастаза у регионалним лимфним нодусима (на основу клиничке процене или снимања, cN0; на основу биопсије, pN0)	N0	Без метастаза у регионалним лимфним нодусима
N1	Метастаза у регионалном лимфном нодусу	N1	Метастаза у једном ипсилатералном регионалном лимфном нодусу, 3 cm или мања у највећој димензији
		N1a	потврђена клинички
		N1b	потврђена биопсијом
		N2	Метастаза у једном ипсилатералном регионалном лимфном нодусу већа од 3 cm у највећој димензији, или билатерална метастаза или метастаза у контралатералном лимфном нодусу
		N2a	потврђена клинички
		N2b	потврђена биопсијом
(п)М класификација		(п)М класификација	
M0	Без удаљене метастазе	M0	Без удаљене метастазе
M1	Удаљена метастаза	M1	Удаљена метастаза

Класификациони систем подразумева и одређивање клиничко/патолошких стадијума болести према карактеристикама примарног тумора и присуства захваћености регионалних лимфних нодуса и удаљених метастаза. (Табела 2)

Табела 2. Подела на клиничке/патолошке стадијуме болести. [21-22]

(п)ТНМ класификација 7. издање (UICC/AJCC)				(п)ТНМ класификација 8. издање (UICC/AJCC)			
(п)Стадијум	(п)Т	(п)Н	(п)М	(п)Стадијум	(п)Т	(п)Н	(п)М
Стадијум <i>IA</i>	T1	N0	M0	Стадијум <i>IA</i>	T1	N0	M0
Стадијум <i>IB</i>	T2a	N0	M0	Стадијум <i>IB</i>	T2a	N0	M0
Стадијум <i>IC</i>	T2b	N0	M0				
Стадијум <i>II</i>	T3a	N0	M0	Стадијум <i>IIA</i>	T2b, T2c, T3	N0	M0
				Стадијум <i>IIB</i>	T4	N0	M0
Стадијум <i>IIIA</i>	T3b	N0	M0	Стадијум <i>IIIA</i>	Било који Т	N1	M0
Стадијум <i>IIIB</i>	Било који Т	N1	M0	Стадијум <i>IIIB</i>	Било који Т	N2	M0
Стадијум <i>IIIC</i>	T4	Било који Н	M0				
Стадијум <i>IV</i>	Било који Т	Било који Н	M1	Стадијум <i>IV</i>	Било који Т	Било који Н	M1

1.1.6. ТЕРАПИЈА И ПРОГНОЗА

Терапија базоцелуларног карцинома је хируршка ексцизија у здраво ткиво [1-6,15-20,23-32]. Базоцелуларни карцином периокуларне регије, посебно тумори који захватају кожу капака и који су значајне величине (према 8. издању ТНМ класификације карцинома коже капака тумори већи од 10 *mm*, а нарочито они већи од 20 *mm*), представљају терапијски/хируршки изазов – „племенито” ткиво капка од велике је важности за очување интегритета очне јабучице, а тиме и вида уопште, те се хируршке технике морају прилагодити чињеници да није довољно само уклонити тумор до у здраво, већ да се реконструктивним техникама стање на капку (капцима) мора довести како у анатомско тако и у функционално одрживо стање уз, такође значајан, естетски прихватљив резултат. Како наведено није увек једноставно и

могуће, покушавано је и са нехируршким терапијама базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије [75,82,83].

Циљ лечења базоцелуларног карцинома је елиминисање тумора уз очување физичких и естетских карактеристика. Као што је напоменуто, базоцелуларни карцином коже је веома деструктиван и инфилтрише околно ткиво, па су операције понекад екстензивне и беспштедне. За мале промене, може се користити криотерапија [92], електрокаутеризација, киретажа, али је радикално отклањање увек најбољи метод лечења, уз неопходну хистопатолошку верификацију [1-6,15-20,23-32].

Од нехируршких приступа који се користе у лечењу базоцелуларног карцинома коже, спомињу се 5% флуороурацил, интерферон, имиквимод, тазаротен, орални нестероидни антиинфламаторни лекови, фотодинамска терапија, али су они најчешће коришћени за мале и јасно ограничене промене [2-4,67,80,81,84,85,89-91].

Треба напоменути да и поред адекватне терапије, базоцелуларни карцином коже показује изразиту склоност ка поновном јављању [2-4].

Конвенционална комплетна хирушка ексцизија, са хистопатолошком контролом линија ресекције, представља терапију првог избора за овај тумор, посебно за мале примарне базоцелуларне карциноме [1-6,93,94]. Постоје две форме хирушке ексцизије које је могуће применити: стандардна хирушка ексцизија и микрографска хирургија и њене варијанте (*Mohs*-ова микрографска хирургија), која је терапија избора када је потребан висок степен излечења и одстрањење тумора у потпуности са минималним оштећењем ткива [1-6,97-99].

Базоцелуларни карцином је обично радиосензитиван [1-6,86-88]. Зрачна терапија се посебно користи за лечење рецидива, или као алтернативна терапија хирушкој код иноперабилиних тумора. Такође, служи и као значајна адјувантна (помоћна) терапија уз хирушку ексцизију за третирање резидуалне микроскопске болести, у случајевима идентификованог перинеуралног раста, и као профилакса метастатске болести [36-41,86-88].

Избегавање излагања сунцу, заштитна гардероба и примењивање крема високог заштитног фактора као мера заштите, укључујући едукацију, помажу

превенцији развоја базоцелуларног карцинома коже што је можда и најзначајнији аспект у смањењу инциденције овог тумора [34-35].

Најновија конзервативна терапија (иако не без значајних нежељених ефеката) укључује примену антагониста *SMO* рецептора који делују на *hedgehog* сигнални пут, супстанција названих висмодегиб (*Erivedge*®), антагониста прве, или сонидегиб (*Odomso*®), антагониста друге класе, у виду капсула које се пију 1x дневно током годину дана [68-74,76-79]. Овај вид терапије не уклања тумор у целости, али значајно смањује његов волумен [68-74,76-79], што је од значаја код великих лезија, код метастатских базоцелуларних карцинома, код иноперабилних пацијената или оних који не могу да буду кандидати за зрачну терапију, као и код рецидива тумора након хирургије и/или зрачне терапије [68-74,76-79].

Базоцелуларни карцином, иако је у питању малигна неоплазма, генерално, ретко узрокује удаљене метастазе, са изузетком метатипичног (базосквामозног) подтипа, и екстремно ретко (изузетно) има смртни исход [31-41,47]. За процењивање метастаза у лимфне чворове, требало би посебно обратити пажњу на паротидне, пре и ретроаурикуларне, субокципиталне и горње цервикалне лимфне чворове.

Прогноза базоцелуларног карцинома коже по питању ризика од појаве рецидива, пре свега зависи од хистолошког подтипа тумора, димензија тумора, као и од дубине туморске инвазије уз, наравно, стања линија ресекције након хируршке ексцизије [1-6,15-20,23-41,47].

Прогноза базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије је, као и за исти тумор на другим локализацијама, углавном одлична, са готово 100% преживљавањем [1-6,15-20,23-32]. На основу података из литературе, као и на основу личног клиничког офталмолошког и офталмохируршког искуства од преко 20 година, може да се констатује да је стопа смртности од базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије готово једнака нули.

Код великих запуштених лезија степен козметског наружења периокуларне регије може да буде значајан, може да буде угрожено нормално физиолошко функционисање очне јабучице, понекад са последичним губитком како функционалног тако и анатомског интегритета овог органа, док потреба за поновним хируршким интервенцијама услед појаве рецидива зна да буде изражена, а у таквим

случајевима често је неопходна и радикална хируршка интервенција – егзентерација орбите [95-96], или зрачна терапија са свим својим могућим пратећим компликацијама [86-88].

1.2. ПРОТЕИНИ ОДРЖАВАЊА МИНИХРОМОЗОМА

У патогенези многих бенигних и малигних лезија, али и неких не-неопластичких стања, антигени пролиферације су међу најважнијим биолошким маркерима. Како је канцер један од главних узрока морбидитета и морталитета, у циљу доприноса стандардним дијагностичким протоколима, утврђивању прогнозе, као и лечењу или праћењу оболелих, откривање улоге ових маркера у патогенези ове веома озбиљне болести, предмет је бројних фундаменталних истраживања. Персонализовано лечење болесника са канцером као врхунски императив савремене медицине заправо представља нашу способност да исти откријемо у раним стадијумима и пажљиво пратимо и делујемо на његову прогресију. Међутим, персонализовано лечење би могло да се заснива и на утврђивању и препознавању биомаркера пролиферације, и то прецизним установљавањем и потпуним разумевањем њиховог места и улоге у физиологији ћелије. Препознавање биолошког тока канцера, утврђивање његове прогнозе као и остваривање палете терапијских могућности у својој основи има темељну анализу неопластичке пролиферације и абнормалног, неконтролисаног ћелијског раста, а чији виталан део су управо ти, са ћелијском пролиферацијом повезани антигени, који су уназад неколико деценија у фокусу бројних базичних истраживања која се баве њиховим откривањем, упоређивањем и спознајом њихове основне биолошке улоге, са циљем могуће клиничке апликације тих сазнања.

1.2.1. ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС И МАРКЕРИ ПРОЛИФЕРАЦИЈЕ

Једна строго контролисана секвенца веома прецизно надзираних сегментних догађаја, процес инициран, координиран, регулисан и праћен од стране великог

броја молекула и међу собом повезаних, изукрштаних, условљених, а притом каскадних путева, процес који у својој бити подразумева дупликацију и дељење ДНК, назива се ћелијски циклус, основа пролиферације ћелија. Овај витални део физиологије свих живих бића односно ћелијске кинетике, има 4 препознате различите фазе: G1 фазу (пресинтетичку), S фазу (синтеза ДНК), G2 фазу (премитотску) и M фазу (митозу) [100-113]. Интересантно, период заустављеног деобног циклуса, назива се тиха или G0 фаза, у којој се ћелија „одмара”. Једанпут поновљена и завршена пре наступа митозе, репликација геномске ДНК је суштина догађања у сваком ћелијском циклусу.

Као најстарији познати антиген ћелијске пролиферације (откривен од стране немачких аутора у раним 80-тим годинама прошлог века у граду Киел по коме је и добио име), а који има различите експресије током различитих фаза ћелијског циклуса, и чији се индексни скор рутински користи као дијагностички и прогностички маркер многих тумора, нехистонски протеин Ки-67 проучаван је нашироко у својој улози у стандардним биолошким евалуацијама клиничког тока и лечења канцера [111]. Од других маркера пролиферације ћелија, значајно место као једни од најпоузданијих, заузимају и једарни антиген пролиферишућих ћелија (енгл. *Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA*), и, тзв. протеини одржавања минихромозома.

1.2.2. ПРОТЕИНИ ОДРЖАВАЊА МИНИХРОМОЗОМА И ЊИХОВА УЛОГА У ЋЕЛИЈСКОМ ЦИКЛУСУ

Последњих година, у фокус пажње многих истраживача, поново улази једна група протеина такође откривених у раним 80-тим годинама прошлог века у *Bik-Kwon* лабораторији, који су названи протеини одржавања минихромозома (енгл. *MiniChromosome Maintenance Proteins* - МЦМ), чија се улога у омогућавању правилне репликације ДНК током ћелијског циклуса посебно проучава [111,114-120,122,123,125,126,129,130,132]. МЦМ је група од шест једарних протеина, чије присуство је утврђено у свим еукариотским ћелијама, али не и у прокариотским [111,114-120,122,123,125,126,129,130,132]. Поред основних шест протеина, касније је идентификовано још четири: МЦМ 1, МЦМ 8, МЦМ 9 и МЦМ 10 [111,121,124,127]. Ови молекули омогућавају започињање и одржавање репликације ДНК [111,114-132].

Усклађеност функционалне интеракције између МЦМ протеина и других компоненти одговорних за одвијање ћелијског циклуса, посредством протеин-киназа које учествују у његовој регулацији, омогућава почетак (и одвијање) само једне синтезе ДНК молекула током сваког ћелијског циклуса [111,114-120,122,123,125,126,129,130,132]. Улога ових протеина удружена је са учешћем транскрипционих фактора, што сугерише да су ови протеини укључени и у процес транскрипције ДНК [111,114-132]. МЦМ протеини се испољавају у ћелијама у којима је ћелијски циклус у току, док се у ћелијама које су у стању мировања и диференцијације њихова експресија губи [111,114-132], тако да представљају потенцијално корисне маркере пролиферације ћелија, особито у туморима [111,114-132]. Првобитно идентификована код гљивице *Saccharomyces cerevisiae* [114], фамилија од шест протеина одржавања минихромозома представља кључног чиниоца регулације репликације ДНК, улогом тзв. давања дозволе (енгл. *licencing*) за репликацију [111,114-132]. Давање „дозволе” за копирање, адекватном, репликативно компетентном делу хроматина, у иницијалној фази репликације ДНК, препознавањем и издавањем истог, један је од процеса у коме учествује МЦМ 2-7 протеински комплекс током Г1 фазе ћелијског циклуса [111,114-132].

Код еукариотских ћелија, у регулацији репликације ДНК, МЦМ 2-7 протеински комплекс има једну од суштинских и добро познатих улога, у отпочињању репликације и елонгацији ДНК, на тај начин што учествује у формирању и продужавању тзв. репликационе виљушке [111,114-120,122,123,125,126,129,130,132]. Као група једарних протеина, овај комплекс се, током једне прецизно усклађене интеракције са другим компонентама ћелијског циклуса, чврсто повезује са хроматином и то само у одређеним фазама овог циклуса – током касне М и током Г1 фазе, све до краја С фазе, да би током Г2 фазе ови протеини били уклоњени са хроматина – чиме се постиже да се само једном током ћелијског циклуса оствари репликација хромозома [111,114-120,122,123,125,126,129,130,132]. Тиме је МЦМ 2-7 протеински комплекс обезбедио главну улогу у одржавању стабилности генома. После деобе ћелије, престаје потреба за експресијом ових протеина, тако да се у фази ћелијског мировања ови протеини измештају из једра [111,114-120,122,123,125,126,129,130,132].

МЦМ 2-7 комплекс протеина поред тога што делује као ДНК хеликаза, сматра се и да посредује у сегрегацији хромозома, као и у регулацији редупликације центрозома [111,129-130].

1.2.3. ПРОТЕИНИ ОДРЖАВАЊА МИНИХРОМОЗОМА И КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Нестабилност генома као последица неадекватне регулације синтезе ДНК, а то је основа канцерогенезе, резултат је губитка, поред осталог, и правилне функције МЦМ протеина [133,134,136,137]. Дерегулација функције овог протеинског комплекса доводи до дефеката хромозома који могу да допринесу настанку тумора [134,136,137].

Одлика МЦМ молекула да им се повећава експресија у активно пролиферишућим ћелијама (у којима је ћелијски циклус активан), док је иста смањена у ћелијском стању мировања, чини их потенцијално добрим дијагностичким маркерима, како канцерских тако и пре-канцерских ћелија, односно ћелија са потенцијалом за малигну трансформацију или оних које се већ налазе у некој од фаза малигне трансформације [133-137].

Исто тако, овај протеински комплекс, због своје виталне улоге у очувању стабилности генома ограничавањем репликације ДНК на само једном одиграни процес током ћелијског циклуса деобе, може да буде и потенцијална мета онкогена, који би дерегулацијом активности ових молекула, угрозили репликациони процес, и тиме допринели нестабилности генома и, последично, настанку абнормалне, неконтролисане ћелијске пролиферације [133-137].

Поједини истраживачи сматрају МЦМ протеински комплекс, као маркер ћелијске пролиферације, супериорним у односу на друге маркере пролиферације као што су Ки-67 и *PCNA*, из разлога што је њихова експресија у корелацији са ћелијском пролиферацијом током читавог ћелијског циклуса [111,133-137,158]. С тим у вези, ови протеини се сматрају новом генерацијом пролиферативних маркера значајних како за скрининг, тако и за процену одговора различитих тумора на примењену терапију или терапијски протокол, а због ученог узајамног односа

пролиферације ћелија и повећања експресије ових протеина, и веома значајним и корисним дијагностичким маркерима малигнух и премалигнух ћелија, као и обећавајућом метом савремене антинеопластичке терапије усмерене ка инхибицији пролиферације преко сузбијања специфичне улоге МЦМ протеинског комплекса [111,133-137].

Како је рано откривање односно благовремено започињање лечења малигнитета од суштинског значаја за побољшање животне прогнозе пацијената оболелих од канцера, велики значај има проналажење молекула који директно утичу односно регулишу репликацију ДНК, а самим тим и пролиферацију туморске ћелије, чиме се отвара могућност за боље разумевање потенцијалних биолошких аспеката понашања одређених типова тумора. А чињеница да су МЦМ протеини управо показатељи ћелијске пролиферације, па тако и малигне ћелијске пролиферације, означава их у онколошким испитивањима, са више аспеката, веома интересантним биолошким маркерима [111,134,138-140].

Од недавно присутно у фокусу опсежних и темељних истраживања различитих малигнитета код човека, процена односно утврђивање обима експресије МЦМ протеинског комплекса има за циљ побољшање и/или олакшавање дијагностике тумора (како клиничке тако и хистопатолошке) и, омогућавање бољег увида и/или процене исхода саме болести и/или лечења исте [111,134].

Непобитно је показана и/или доказана статистички значајна разлика у испољавању ових молекула, како у различитим малигним неоплазијама, тако и у истом типу тумора али различитих ткива, у односу на испољавање ових молекула у неизмењеним ћелијама истих ткива или и у бенигнух паралелама, као што је и непобитно утврђена разлика у експресији ових протеина између нормалних, бенигнух, диспластичких и малигнух ћелија одређених типова тумора и/или истих тумора у различитим ткивима [111,134,138-140].

Због свега наведеног, дакле због неоспорних доказа о корисности ових протеина као маркера ћелијске пролиферације, МЦМ протеини представљају значајне и поуздане како дијагностичке тако и прогностичке параметре пролиферације различитих хуманих канцера.

1.2.4. ПРОТЕИНИ ОДРЖАВАЊА МИНИХРОМОЗОМА У КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИМ СТУДИЈАМА ЊИХОВЕ ЕКСПРЕСИЈЕ КАО АНТИГЕНА ПРОЛИФЕРАЦИЈЕ

Оно што је веома значајно са практичног аспекта је чињеница да се експресија МЦМ протеинског комплекса, како у туморским тако и у нетуморским лезијама, једноставно може процењивати путем имунохистохемије. Тиме се отвара једна релативно широка доступност овом антигенском комплексу пролиферације бројним потенцијалним истраживачким пројектима, који би могли да се фокусирају, не само на њима, већ и на евалуацији коекспресије различитих чланова ове фамилије протеина у пренеопластичким, неопластичким и не-неопластичким лезијама.

1.2.4.1. Експресија МЦМ фамилије протеина у не-неопластичким болестима

Cortez и сарадници [141] показали су да се МЦМ 2 и 3, као и МЦМ 7 могу користити као тачке за контролу С фазе ћелијског циклуса.

Willcox и сарадници [142] су показали да у дијабетесу тип 1, α и β ћелије панкреаса подлежу повећаној пролиферацији током прогресије овог типа дијабетеса, што је потврђено присуством високог нивоа коекспресије Ки-67 и МЦМ. То указује на пролиферациони одговор на аутоимунски напад који се одвија током развоја овог типа дијабетеса.

Quian и сарадници [143] су показали да МЦМ комплекс може да буде ефикасан и у нашем разумевању патогенезе многих вирусних болести и да дерегулација МЦМ фамилије протеина може да буде стратегија за спречавање синтезе вирусне ДНК у ћелијама домаћина, чиме би могао да се модификује ћелијски процес који доводи до инфекције, односно доприноси развоју вирусне болести.

1.2.4.2. Улога МЦМ протеинског комплекса у неопластичким лезијама

Током последњих деценије, испитивана је улога и функција МЦМ протеина како у различитим туморима [139-140], тако и у диспластичким ткивима [138], где је забележена патолошка експресија овог протеинског комплекса.

Бројне студије су показале да је експресија МЦМ протеинског комплекса присутна у неким пренеопластичким лезијама, као и малигним неоплазијама, и често удружена са вишим ступњевима ћелијске атипичности и лошом прогнозом [111,138-140].

Експресија МЦМ фамилије протеина је проучавана у менингеому [192] (МЦМ 2-7), олигодендроглијалним туморима [190] (МЦМ 7), астроцитому [191] (МЦМ 3), миксофибросаркому [210] (МЦМ 2), дезмоидним туморима [193] (МЦМ 2, 5 и 7), *Hodgkin*-овом лимфому [213,214] (МЦМ 6), мијелодиспластичким синдромима [212] (МЦМ 2), хондросаркому [211] (МЦМ 6), нестиноћелијском [151-153] (МЦМ 7; МЦМ 4; МЦМ 2) и аденокарциному плућа [155] (МЦМ 2), као и премалигним лезијама плућа [156] (МЦМ 2), сквамозелуларном карциному језика [162] (МЦМ 2), усне дупље [163-168] (МЦМ 7; МЦМ 2; МЦМ 2; МЦМ 2; МЦМ 2; МЦМ 2) и ларинкса [161] (МЦМ 2), карциному бубрежних ћелија [188,189] (МЦМ 2; МЦМ 2), туморима једњака [157-160] (МЦМ 7; МЦМ 2; МЦМ 2 и 5; МЦМ 5), дебелог црева [200-202] (МЦМ 2; МЦМ 2; МЦМ 2 и 7), жучне кесе [171] (МЦМ 2 и 5), коре надбубрега [215] (МЦМ 2), плувачних жлезда [169-170] (МЦМ 2; МЦМ 2), аналној [204,205] (МЦМ 3, 4, 6 и 7; МЦМ 2 и 5) и вулварној [187] (МЦМ 2 и 5) интраепителној неоплазији, карциному простате [206-209] (МЦМ 2; МЦМ 7; МЦМ 7; МЦМ 2), дојке [196-199] (МЦМ 2; МЦМ 2; МЦМ 2; МЦМ 2), ендометријума [186] (МЦМ 7), грлића материце [179-185] (МЦМ 2, 4, 5, 6, 7 и 10; МЦМ 2 и 5; МЦМ 5; МЦМ 5; МЦМ 2; МЦМ 2; МЦМ 3 и 4), јајника [194] (МЦМ 2 и 5), штитасте жлезде [172,173] (МЦМ 2; МЦМ 5 и 7), желудачном аденокарциному [174] (МЦМ 2 и 5), уротелном карциному [203] (МЦМ 2 и 5), карциному Меркелових ћелија [144] (МЦМ 4, 6 и 7), и неоплазијама коже [145-150] (МЦМ 7; МЦМ 3, 4 и 7; МЦМ 2; МЦМ 2; МЦМ 2; МЦМ 2, 5 и 7).

Резиме ових студија могао би да прикаже на следећи начин:

1. У кожи је експресија МЦМ протеина проучавана у релативно малом броју студија. Експресија МЦМ 2 протеина, односно МЦМ 5 протеина у актиничкој кератози [149,159] и сквамозелуларном карциному коже [148,150], МЦМ 4, МЦМ 6 и МЦМ 7 протеина у карциному Меркелових ћелија [144], МЦМ 3, МЦМ 4 и МЦМ 7 протеина у бенигним [146,147] и малигним меланоцитним лезијама [146,147] и њиховим метастазама [147], затим код Т ћелијских лимфопрлиферативних обољења коже [145], кератоакантому [148] и

себороичкој кератози [148]. *Sbin* и сарадници [149] утврдили су значајну позитивну корелацију између МЦМ 2 имуноактивности и градуса актиничке кератозе. Они су МЦМ 2 означили као поуздан маркер у њеној дијагнози и градирању и предложили даља истраживања ради утврђивања његове прогностичке вредности. Такође, висока експресија ова два маркера у дисплазијама коже, благог и средњег градуса [150], могла би да буде од помоћи у проучавању малигне трансформације ових кожних дисплазија.

2. У студијама нестиноћелијских карцинома плућа утврђено је да је експресија МЦМ 2,4 и 7 протеина значајно присутна и да утиче на петогодишњу прогнозу [151-153]. Ови налази су указали на могућу улогу ових протеина у прогресији канцерских ћелија и самим тим отворили могућност за потенцијалну циљну терапију ове болести.
3. Хистоморфолошке и имунохистохемијске студије на малигној трансформацији рецидивирајућег плеоморфног аденома простате такође су показале повећану експресију МЦМ 2 протеина [209].
4. Нуклеарна експресија МЦМ 2 протеина је показана и у великом броју канцера дојке [196-199]. Њихова експресија у диспластичким и малигним канцерским ћелијама може да послужи и као прогностички фактор и за утврђивање градуса канцера дојке [196-199].
5. Експресија МЦМ 3 протеина проучавана је у туморима астроцита [191] као и карциному цервикса [185].
6. Експресија МЦМ 4 протеина показана је у менингеому [192] и карциному цервикса [185]. Такође, МЦМ 4 протеин игра суштинску улогу у пролиферацији неких нестиноћелијских карцинома плућа [152]. Ако се узме у обзир да је такав налаз и у корелацији са клиничко-патолошким одликама хистологије не-аденокарцинома, МЦМ 4 протеин би могао да има и терапијски потенцијал као циљна терапија појединих популација канцерских ћелија плућа [152].
7. Повећана експресија МЦМ 2 протеина могла би да буде удружена и са вишим стадијумом канцера езофагуса [158].
8. Експресија МЦМ 2 и 5 протеина је показана у карциногенези аденокарцинома желуца [174-177], и менингеома [192]. Коекспресија МЦМ 2 и МЦМ 7 протеина као маркера пролиферације и диференцијације, процењивана је и у канцеру

колона [201,202]. У менингиомима, поред експресије МЦМ 4 и МЦМ 5 протеина [192], проучавана је и експресија МЦМ 6 и МЦМ 7 протеина [192].

9. Прекомерна експресија МЦМ 2-7, 8 и 10 протеина је показана и у карциногенези хепатоцелуларног карцинома [178], где је утврђено да су повишени нивои МЦМ 2, 6 и 7 протеина били повезани са испољавањем нежељених ефеката овог тумора и лошијом прогнозом, и где се МЦМ 6 показао значајно бољим како у дијагностици овог карцинома јетре, тако и као предсказивач лошијег преживљавања у односу на МЦМ 2 и 7 протеине.
10. Студија која је проучавала експресију МЦМ 7 протеина у сквамозелуларном карциному једњака је показала да се овај протеин појављује у карциномима који су више инвазивни [157].
11. Аберантна експресија МЦМ протеина на површини диспластичке мукозе једњака и *Barrett*-ове мукозе може да укаже на њихов пролиферациони потенцијал [159].
12. Присуство МЦМ 7 протеина је откривено у већем броју ћелија него Ки-67 и *PCNA* у свим случајевима глиобластома [190]. Такође, експресија МЦМ 7 протеина је показана и у прогресији канцера простате [207-208] и у трофобластним болестима [195], као и метастатском карциному колона [201,202].
13. Повећани нивои експресије МЦМ 7 протеина су у корелацији са слабијом диференцијацијом не-бронхиоалвеоларног карцинома плућа, са величином овог тумора и његовом лошијом прогнозом [154]. Такође је показано да експресија МЦМ 7 протеина сигнификантно корелира са лошијим хистолошких градусом, одраслим животним добом и смањеним преживљавањем у случајевима карцинома ендометријума [186]. Установљено је и да је експресија МЦМ 7 протеина удружена са стадијумом тумора и перинеуралном инвазијом код интраепителне неоплазије и инвазивног аденокарцинома простате [207,208].

1.2.4.3. Експресија протеина одржавања минихромозома у базоцелуларном карциному коже

Претраживањем релевантне литературе, пронађена су само три рада у којима је анализирана експресија МЦМ протеинског комплекса у базоцелуларном карциному коже, и то МЦМ 2 [148, 216] односно МЦМ 5 протеина [217]. У помену

три објављена рада анализира се мали број случајева {20 [148], 11 [216] и 15 [217]} и то не из периокуларне регије.

Испитивања која би обухватала анализу експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у базоцелуларном карциному коже периокуларне регије нису до сада публикована. Такође, није било студија испољавања МЦМ протеина у односу на прогностичке параметре базоцелуларног карцинома коже, као што су дубина инвазије и димензије, нити је вршена упоредна евалуација испољавања МЦМ молекула различитим методама (семиквантитативно, индекс обележавања, дистрибуција позитивних ћелија).

1.2.5. УЛОГА МЦМ ФАМИЛИЈЕ ПРОТЕИНА У ЛЕЧЕЊУ КАНЦЕРА

Чињеница да се експресија МЦМ протеина повећава у ћелијама које су у деоби, упућује на још један, веома значајан аспект истраживања ових протеина, а то је потенцијална употреба у новом приступу антиканцерској терапији. У том смислу значајна је и чињеница да се експресија МЦМ молекула и иРНК ових протеина разликује (повећава) у ћелијама канцера у односу на ћелије нормалног ткива, а да специфични инхибитори активности ових молекула могу да утичу на инхибицију пролиферације специфичних неопластичких ћелија [218-219]. Резултати почетних истраживања показују да би МЦМ молекули могли да буду идеална мета антиканцерске терапије [218-219].

2. ЦИЉЕВИ РАДА

1. Анализа испољавања МЦМ протеина 2, 5 и 7 у базоцелуларном карциному коже периокуларне регије.

2. Поређење експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 и прогностичких параметара базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије - хистолошки подтип, димензије (највећи пречник и површина) тумора и, дубина туморске инвазије.

3. Процена различитих начина евалуације имунохистохемијског бојења и експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на хистолошки подтип базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије и остале прогностичке параметре.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживањем је обухваћен архивски материјал (парафински калупи) Института за патологију Медицинског факултета Универзитета у Београду као и Офталмопатолошке лабораторије Клинике за очне болести Клиничког центра Србије. Иницијално, узорак је чинило 294 адекватних за евалуацију и тумачење добијених резултата одабраних случајева базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије - студија пресека у петнаестогодишњем периоду од 1998-2013. године, из раније специјално дизајниране и попуњене базе података.

После имунохистохемијског бојења, услед одређених техничких недостатака, дошло је до губитка одређеног броја узорака, тако да је коначан број случајева адекватних за процену и тумачење добијених резултата био 282 за МЦМ 2 протеин, 283 за МЦМ 5 протеин, и 273 за МЦМ 7 протеин.

Сви тумори су били примарни у смислу да нису били претходно лечени (нису анализирани рецидиви), и добијени су хирушком екцизијом. Исто тако, нити један пацијент није био на имуносупресивној терапији, нити је постојала удруженост са другим висцералним или кутаним малигнитетима или синдромима.

3.1. ФОРМИРАЊЕ ТКИВНОГ МИКРОНИЗА

Ради ефикасније, економичније, брже и лакше анализе коришћена је техника ткивног микрониза (ТМН), (енгл. *tissue microarray*), специјална врста формирања хистопатолошких узорака [220] којом се може урадити имунохистохемијско (ИХХ) бојење за краће време, на већем броју узорака, уз мањи утрошак имунохистохемијских реагенаса и очување највећег дела оригиналног ткивног узорка. За конструкцију ТМН коришћени су делови ткива базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије из узорака фиксираних у формалину и калуплених у парафинске блокове. Техника ткивног микрониза омогућава испитивање већег броја узорака са знатно мањим утрошком антитела и других хемикалија, уз минимално оштећење парафинских калупа из којих се материјал узима, за разлику од класичне

анализе која често доводи до потпуне истрошености материјала. Два до три ткивна цилиндра по узорку су се показала бољим од појединачних узорака и у потпуности одговарајућим када су поређени у односу на резултате на целим исечцима [221].

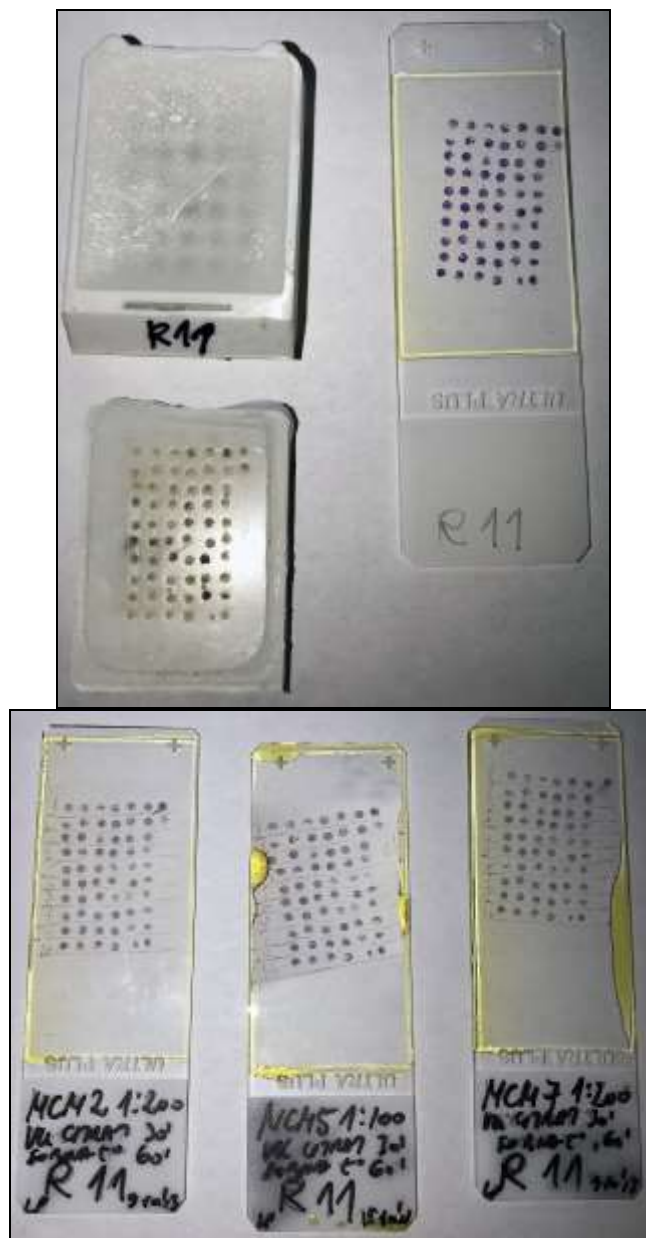
На хематоксилин-еозин (ХЕ) бојеним плочицама из сваког узорка, фломастером различите боје (црвена, зелена и плава) означена су три типична места. Онда се тако обележена плочица приносила припадајућем парафинском блоку (калуп давалац) да би као матрица послужила да се на исти начин обележе и три типична места на калупу, са кога се затим иглом унутрашњег пречника 1,2 *mm* узимао ткивни цилиндар за формирање ткивног микрониза. (Слика 17)



Слика 17. Приказ обележавања типичних места на плочици и припадајућем калупу.

Укупно 60 ткивних цилиндара (од 20 случајева) је преношено у сваки калуп прималац у 6 колона и 10 редова, уз додатна 2 цилиндра (узорци лимфног нодуса и цревне слузнице) који су постављани као последњи у првом и трећем реду за оријентацију ТМН и као позитивне контроле при имунохистохемијском бојењу. По

формирању појединачног ТМН у метални калуп се изливао течни парафин из којег се, после хлађења, на микротому најпре урадио пресек дебљине 5 μm за ХЕ бојење којим се контролисало да ли узорак одговара планираном. (Слика 18)



Слика 18. Приказ ткивног микрониза на плочици и припадајућем калупу.

За сваки конструисани калуп са ТМН попуњавала се табела у програму *Word*, у којој је сваки ткивни цилиндар обележен идентификационим бројем калупа и бојом којом су означени различити делови тумора на ХЕ бојеним препаратима. На тај начин се формирала мапа за сваки ТМН која је омогућавала препознавање узорка и делова тумора који се испитују на пресецима ткивних цилиндара.

3.2. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКИ ПРОТОКОЛ

3.2.1. Припрема узорака

Из новоформираних парафинских калупа са ТМН, на микротому су се секли исечци дебљине 5 микрона на адхезивне плочице (*Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific, Germany*), на којима су у даљем току истраживања извођена имунохистохемијска бојења, а који су затим сушени у термостату 120 минута на 60°C, чиме је постигнуто боље пријањање ткива за плочицу.

3.2.2. Депарафинизација

Депарафинизација се обављала потапањем препарата у ксилол (20 минута) и серију алкохола опадајуће концентрације (100%, 96%, 70% - 2 пута по 4 минута), а завршавала се потапањем исечака у дестиловану воду (испирање два пута).

Сврха депарафинизације била је одстрањивање парафина са плочице, јер његово присуство отежава бојење, а уједно појачава неспецифично бојење.

3.2.3. Блокирање ендогене пероксидазе

Ова етапа вршена је потапањем плочица у 3% водени раствор водоник пероксида, током 15 минута. Након тога плочице су испиране у води (2 пута). На тај начин је инактивирана ендогена пероксидаза присутна у ткивима у циљу смањивања неспецифичног бојења.

3.2.4. Антигенско демаскирање

Наредни корак било је демаскирање антигена (енгл. *antigen retrieval*) које је постигнуто високом температуром, у воденом купатилу са цитратним пуфером на $+95^{\circ}\text{C}$, pH 6,0 у трајању од 30 минута. Имунохистохемијско бојење, као што је већ споменуто, ради се на парафинским узорцима фиксираним у формалину. Сврха фиксације ткива је очување ћелијског интегритета којим се олакшава морфолошко испитивање. Фиксирајућим ефектом формалина долази до стварања метилених веза између суседних протеинских ланаца, што на крају резултује чврстим везама у ткивном матриксу као и могућим изменама тродимензионалне грађе протеина, доводећи до редукције или губитка антигенске реактивности [222]. Фиксација у формалину, тако, доводи до маскирања (сакривања) многих антигена (антигенских епитопа), који зато не могу да буду препознати од стране специфичних антитела, доводећи до неадекватног ИХХ бојења [223]. Један од начина антигенског демаскирања је демаскирање високом температуром која уклања формалинске везе на површини протеина. Након кувања плочице су се хладиле 30 минута на собној температури, а потом је вршено испирање препарата у фосфатном пуферу (енгл. *phosphate buffered saline*) и то два испирања по три минута.

3.2.5. Примарна антитела

Након тога на препарате је наношено примарно антитело. Коришћена су следећа примарна, мишја моноклонска антитела: МЦМ 2 (*Abcam, ab 109459*, разблажење 1:200), МЦМ 5 (*Abcam, ab 76023*, разблажење 1:100) и МЦМ 7 (*Abcam, ab 2360*, разблажење 1:200).

Препарати су са свим примарним антителима инкубирани у влажној комори, на собној температури, током 60 минута. Потом је вршено испирање препарата у фосфатном пуферу и то два испирања по пет минута. На овај начин се уклања вишак антитела која нису везана за специфичне антигене.

3.2.6. Визуелизациони систем

За визуелизацију је коришћен *Ultravision LP* систем за детекцију (*Lab Vision Thermo scientific, CA, USA*), базиран на декстранском полимеру за који је везан ензим пероксидаза (енгл. *horseradish peroxidase*), који има афинитет везивања за примењена антитела. Као хромоген (боја за визуелизацију места на којима се догодила реакција примењених антитала са активним антигеном) коришћен је 3,3' диамино-бензидин – ДАБ, након чега су препарати контрастрирани (за визуелизацију ткивне морфологије) *Mayer*-овим хематоксилином.

3.2.7. Дехидратација исечака

Дехидратација ткива је вршена потапањем препарата у алкохол растуће концентрације - етанол (70%, 96%, 100%), по 2,5 минута и ксилол, 2,5 минута. Након дехидратације рађено је покривање плочица чиме је био завршен процес.

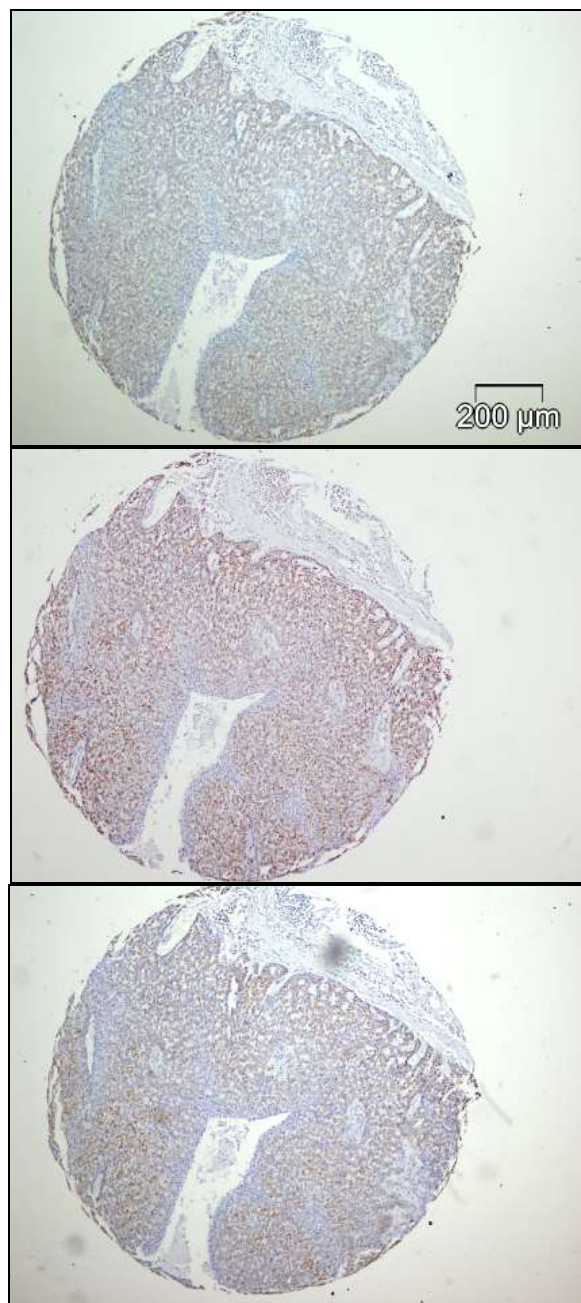
3.2.8. Контролни узорци

За позитивну контролу коришћено је ткиво лимфног чвора (герминативни центри фоликула), односно цревна мукоза, због великог броја пролиферишућих ћелија у тим ткивима. Контролни узорци су били на истим плочицама са испитиваним туморским ткивом да би се обезбедили идентични технички услови обраде.

3.3. ЕВАЛУАЦИЈА ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКОГ БОЈЕЊА

Позитивно бојење подразумевало је браон обојеност једара. За семиквантитативну анализу броја позитивних ћелија и процену дистрибуције имунопозитивности коришћене су дигиталне слике сваког ткивног цилиндра добијене помоћу *Olympus BX50* микроскопа под увећањем од **100x** (објектив 10x), дигиталном камером *Olympus DP70*, уз помоћ одговарајућег програмског система за дигиталну аквизицију слике истог произвођача. Дигиталне фотографије су сачуване

у *TIFF* формату, димензија 2048x1536 пиксела, са резолуцијом од 300 тачака по инчу (енгл. *dots per inch, DPI*) и дубином бита (боја) (енгл. *bit depth*) од 24. За анализу су коришћене укупно 2403 дигиталне слике. (Слика 19)



Слика 19. Изглед дигиталне слике истог ткивног цилиндра бојеног са три различита антитела на увељичању 100X

[Експресија (а) МЦМ 2, (б) МЦМ 5 и (в) МЦМ 7 протеина у истом ткивном узорку]

3.3.1. Дистрибуција имунопозитивности

Иста је одређивана, у зонама туморског ткива, као периферна или базална и, разбацана или дифузна.

3.3.2. Обим експресије имунопозитивности

Семиквантитативно одређивање процента обојених ћелија процењивано је у деловима тумора са најизраженијом експресијом и груписано у категорије <10%, 10-50% и >50%. Будући да три ткивна цилиндра узета из сваког тумора представљају различите делове узорка, потенцијално различитих карактеристика, на сваком је вршено одређивање дистрибуције и обима експресије имунопозитивности, да би на крају обим семиквантитативно одређене експресије имунопозитивности био одређен на основу просека сва три цилиндра.

3.3.3. Индекс обележавања (енгл. *labeling index*)

Поред семиквантитативног одређивања МЦМ позитивних ћелија у препаратима, у овом истраживању рађено је препознавање МЦМ позитивних ћелија и коришћењем компјутерског система. То је урађено у циљу поређења резултата добијених различитим методама и процене адекватности употребе оваквог начина евалуирања броја ИХХ позитивних ћелија, а ради лакше рутинске анализе и као могућа додатна контрола субјективне процене посматрача.

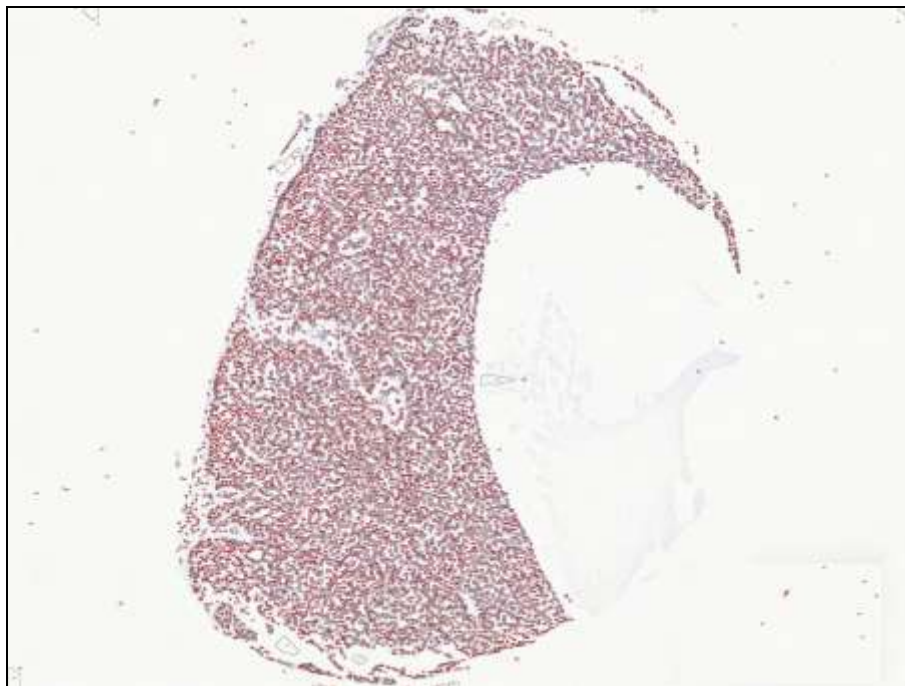
У сваком узорку је бројано најмање 500 ћелија, а индекс обележавања је одређен као однос броја позитивних од укупно избројаних ћелија на снимку. Бројање се вршило применом аутоматског бројања коришћењем софтвера за анализу слике.

У циљу аутоматског одређивања броја имунохистохемијских позитивних (ДАБ-позитивних) ћелија коришћен је бесплатни програм за анализу слике, *Fiji* (<http://fiji.sc/Fiji>) [224]. За анализу су коришћене дигиталне слике сваког ткивног цилиндра добијене помоћу *Olympus BX50* микроскопа под **увеличањем од 200x** (објектив 20x), дигиталном камером *Olympus DP70*, уз помоћ одговарајућег

програмског система за дигиталну аквизицију слике истог произвођача. Под поменутим увеличањем, фотографисана су места са најизраженијом имунопозитивнишћу. Дигиталне фотографије су сачуване у *TIFF* формату, димензија 2048x1536 пиксела, са резолуцијом од 300 *DPI* и дубином бита (боја) од 24.

За анализу је укупно коришћено 2403 дигиталне слике.

Након учитавања слика у програмски пакет *Fiji* помоћу команде *Color Deconvolution* одабирања опције X ДАБ (путања: *Fiji>Image>Color>ColorDeconvolution*), извршено је издвајање ДАБ сигнала, односно боје, од сигнала пореклом од хематоксилина, који је коришћен за контрастирање имунохистохемијских препарата. У даљој анализи, фотографијама са ДАБ сигналом одређен је праг (енгл. *threshold*) (путања: *Fiji>Image>Adjust>Threshold*), при чему су за сваку слику аутоматски одређене подразумеване праговне (енгл. *default threshold*) вредности. Ова метода је неопходан корак у аутоматском бројању ћелија, а подразумева да се слика у боји конвертује у 8-битну (енгл. *binary*) палету сивих тонова (енгл. *grayscale*), а затим у црно-белу слику, према унапред задатим вредностима, односно границама. Да би се избегао утицај неспецифичног бојења ДАБ-ом на вредности аутоматског бројања ћелија, помоћу *Freehand selections* алатке и опције *Clear* (путања: *Fiji>Edit>Clear*), обележени су и обрисани они делови слике, који би евентуално могли утицати на коначну вредност броја ДАБ-позитивних ћелија. Овако обрађене слике су представљале финалне дигиталне фотографије, које су коришћене за аутоматско бројање ћелија, које је урађено уз помоћ опције *Analyze Particles* (путања: *Fiji>Analyze>Analyze Particles*). Вредности величине (енгл. *size*) и циркуларности (енгл. *circularity*) ћелија, као параметри које је неопходно унети приликом аутоматског бројања ћелија, утврђени су претходним поређењем са сликама на којима је мануелном методом одређен тачан број ДАБ-позитивних ћелија, након чега су узете просечне вредности ова два параметра, које су затим примењене на све слике укључене у ово истраживање. (Слика 20)



Слика 20. Приказ методе аутоматског бројања ћелија. На фотографији се виде контуре (енгл. *outline*) ДАБ позитивних и негативних ћелија. У зависности од задатих параметара, програм аутоматски бира контуре које ће бити избројане. Приказано је 8026 ћелија, од којих је 3707 позитивно, а 4319 негативно.

Резултати имунохистохемијског бојења са добијених дигиталних фотографија увеличања 100 и 200x, анализирани су у односу на параметре који указују на мању (*low-risk*), умерену (*mixed*) или већу (*high-risk*) агресивност тумора, односно мању, умерену или већу склоности ка рецидивима:

а) хистопатолошки подтип базоцелуларног карцинома, у односу на ризик од појаве рецидива

У групу *low-grade* тумора сврстани су:

1. нодуларни (солидни)
2. цистични
3. пигментовани
4. аденоидни
5. кератотички
6. инфундибулоцистични

7. фиброепителиоматозни
8. као и остале ретке варијанте (видети у Уводу).

У групу *high-grade* тумора сврстани су:

1. микронодуларни
2. мултифокални суперфицијални
3. инфилтративни
4. склерозирајући (морфеаформни)
5. базосквამозни (метатипични)

Група тумора који имају хистопатолошке одлике тумора и ниског и високог градуса, у овом раду, сврстани су у категорију мешовити (*mixed*).

б) димензије (највећи пречник и површина) тумора и, дубину туморске инвазије.

3.4. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА

За статистичку анализу резултата коришћен је софтверски пакет *SPSS* (енгл. *Statistical Package for Social Sciences*) за *Windows*, верзија 20.0 (*SPSS, Inc, Chicago, IL, USA*). Коришћене су методе дескриптивне и аналитичке статистике.

Од метода дескриптивне статистике коришћене су: мере централне тенденције (аритметичка средина и медијана), мере варијабилитета [интервал варијације - опсег, стандардна девијација (СД), коефицијент варијације] и релативни бројеви (фреквенце). Вредности континуираних варијабли приказане су као просечна вредност \pm СД, а дисконтинуираних варијабли као бројеви и проценти. Дистрибуција вредности (провера нумеричких вредности, тј. процена нормалности расподеле) проверавана је употребом *Shapiro-Wilk*-овог теста.

Од метода аналитичке статистике, коришћени су непараметарски тестови за независне узорке: χ^2 , *Fisher*, *Kruskal-Wallis* и *Mann-Whitney* тестови, односно *ANOVA* и мултипли Т-тест (*Tukey*), код анализе индекса обележавања. За процену распореда (дистрибуције) и броја (обима) МЦМ позитивних ћелија у односу на хистопатолошки подтип тумора, површину и дубину туморске инвазије, коришћени

су χ^2 и *Kruskal-Wallis*-ов тест, а за међугрупно поређење *Mann-Whitney*-ев тест. Подаци су приказани табеларно. Вредности вероватноће (p) мање од 0,05 сматране су као статистички значајне.

4. РЕЗУЛТАТИ РАДА

4.1. КЛИНИЧКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА

Анализирани су ткивни исечци добијени ексцизионим биопсијама од укупно 294 пацијента, од којих је **136 (46,3%) мушкараца** и **158 (53,7%) жена**. (Табела 1)

Табела 1. Демографске одлике пацијената.

	УКУПНО	МУШКАРЦИ	ЖЕНЕ
Број пацијената	294	136 (46,3%)	158 (53,7%)
Распон година	29–87	30–87	29–87
Просек година ± СД	65,78 ± 11,41	65,86 ± 10,82	65,70 ± 11,93

Локализација тумора у односу на пол пацијената приказана је у Табели 2.

Табела 2. Локализација тумора и пол пацијената.

ПОЛ	ДОЊИ КАПАК	УНУТРАШЊИ УГАО	ГОРЊИ КАПАК	ПРОДОР У ОРБИТУ	УКУПНО
мушки	69 (50,7%)	47 (34,6%)	17 (12,5%)	3 (2,2%)	136 (100,0%)
женски	65 (41,1%)	60 (38,0%)	30 (19,0%)	3 (1,9%)	158 (100,0%)
Укупно	134 (45,6%)	107 (36,4%)	47 (16,0%)	6 (2,0%)	294 (100,0%)

Употребом χ^2 теста утврђено је да нема статистички значајне разлике између група (локализација базопцелуларног карцинома), а у односу на категорију (пол пацијента), и то:

1. доњи капак и унутрашњи угао ока ($p=0,243$; $p>0,05$)

2. доњи капак и горњи капак ($p=0,070$; $p>0,05$)
3. доњи капак и продор у орбиту ($p=1,0$; $p>0,05$)
4. унутрашњи угао ока и горњи капак ($p=0,369$; $p>0,05$)
5. унутрашњи угао ока и продор у орбиту ($p=1,0$; $p>0,05$)
6. горњи капак и продор у орбиту ($p=0,661$; $p>0,05$)

Локализација тумора у односу на старост пацијената приказана је у Табели 3.

Табела 3. Локализација тумора и старост пацијената.

	ДОЊИ КАПАК	УНУТРАШЊИ УГАО	ГОРЊИ КАПАК	ПРОДОР У ОРБИТУ
Године живота Просек \pm СД	65,93 \pm 11,706	65,20 \pm 11,278	67,06 \pm 10,547	62,50 \pm 15,057

Применом непараметарског теста *Kruskal-Wallis* за поређење три или више група, не уочава се статистички значајна разлика између група (локализација базоцелуларног карцинома), а у односу на категорију (године живота пацијената у тренутку дијагнозе, и то:

1. доњи капак и унутрашњи угао ока ($p= 0,567$; $p>0,05$)
2. доњи капак и горњи капак ($p= 0,725$; $p>0,05$)
3. доњи капак и продор у орбиту ($p= 0,688$; $p>0,05$)
4. унутрашњи угао ока и горњи капак ($p= 0,363$; $p>0,05$)
5. унутрашњи угао ока и продор у орбиту ($p= 0,848$; $p>0,05$)
6. горњи капак и продор у орбиту ($p= 0,811$; $p>0,05$)

4.2. КАРАКТЕРИСТИКЕ БАЗОЦЕЛУЛАРНИХ КАРЦИНОМА

Хистопатолошки подтип базоцелуларног карцинома у односу на ризик од појаве рецидива је приказан у Табели 4.

Табела 4. Хистопатолошки подтип тумора у односу на ризик од појаве рецидива.

ПОДТИП	БРОЈ (%)
<i>ниског ризика</i>	187 (63,6%)
<i>мешовити</i>	59 (20,1%)
<i>високог ризика</i>	48 (16,3%)
Укупно	294 (100,0%)

Локализација базоцелуларних карцинома у односу на хистолошки тип базоцелуларних карцинома стратификованих према ризичним групама дата је у Табели 5.

Табела 5. Локализација тумора у односу на хистопатолошке ризичне групе.

	ХИСТОПАТОЛОШКЕ РИЗИЧНЕ ГРУПЕ БАЗОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА		
	<i>ниског ризика</i>	<i>мешовити</i>	<i>високог ризика</i>
ЛОКАЛИЗАЦИЈА			
доњи капак	86 (46,0%)	29 (49,1%)	19 (39,6%)
унутрашњи угао	71 (38,0%)	19 (32,2%)	17 (35,4%)
горњи капак	26 (13,9%)	9 (15,3%)	12 (25,0%)
продор у орбиту	4 (2,1%)	2 (3,4%)	0 (0%)
УКУПНО	187 (100,0%)	59 (100,0%)	48 (100,0%)

Дубина инвазије тумора у анализираним туморима дата је у Табели 6, а у односу на хистопатолошке ризичне групе у Табели 7.

Табела 6. Дубина туморске инвазије.

ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ БАЗОЦЕЛУЛАРНИХ КАРЦИНОМА	БРОЈ (%)
Папиларни дерм	2 (0,7%)
Ретикуларни дерм	232 (78,9%)
Мишићни слој	27 (9,2%)
Цела дебљина капка/поткожно/масно ткиво	32 (10,9%)
Продор у кост	1 (0,3%)
Укупно	294 (100,0%)

Табела 7. Дубина туморске инвазије према хистопатолошким одликама тумора у односу на ризик од појаве рецидива.

ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ БАЗОЦЕЛУЛАРНИХ КАРЦИНОМА	ХИСТОПАТОЛОШКЕ РИЗИЧНЕ ГРУПЕ БАЗОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА		
	<i>ниског ризика</i>	<i>мешовити</i>	<i>високог ризика</i>
Папиларни дерм	2 (1,1%)	0	0
Ретикуларни дерм	158 (84,5%)	35 (59,3%)	39 (81,3%)
Мишићни слој	10 (5,3%)	13 (22,0%)	4 (8,3%)
Цела дебљина капка/поткожно/масно ткиво	17 (9,1%)	11 (18,7%)	4 (8,3%)
Продор у кост	0	0	1 (2,1%)
УКУПНО	187 (100,0%)	59 (100,0%)	48 (100,0%)

Број тумора у односу на највећи измерени пречник приказан је у Табели 8.

Табела 8. Број тумора у односу на највећи измерени пречник.

Највећи измерени пречник тумора	БРОЈ (%)
<10 <i>mm</i>	111 (38,4%)
10-20 <i>mm</i>	142 (49,1%)
>20 <i>mm</i>	36 (12,5%)
УКУПНО	289 (100,0%)

У пет случајева (1,7%) највећи измерени пречник тумора није могао да буде утврђен.

4.3. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ МЦМ ПРОТЕИНА 2, 5 и 7

4.3.1. ДИСТРИБУЦИЈА ИМУНОПОЗИТИВНОСТИ

Услед техничких недостатака дошло је до губитка одређеног броја узорака, тако да је број случајева код којих није могао да се одреди тип дистрибуције имунопозитивности био 12 (4,1%) за МЦМ 2 протеин, 11 (3,7%) за МЦМ 5 протеин, и 21 (7,1%) за МЦМ 7 протеин.

Табела 9. Дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома.

ТИП дистрибуције имунопозитивности	МЦМ 2	МЦМ 5	МЦМ 7
дифузна	203 (72,0%)	228 (80,6%)	179 (65,6%)
периферна	79 (28,0%)	55 (19,4%)	94 (34,4%)
УКУПНО	282 (100,0%)	283 (100,0%)	273 (100,0%)

4.3.1.1. Однос дистрибуције имунопозитивности према ризичним групама базоцелуларног карцинома

Табела 10. Дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, а према хистопатолошким одликама тумора у односу на ризик од појаве рецидива.

Хистопатолошки ПОДТИП тумора	МЦМ 2		МЦМ 5		МЦМ 7	
	дифузна	периферна	дифузна	периферна	дифузна	периферна
<i>ниског ризика</i>	138 (76,7%)	42 (23,3%)	152 (84,9%)	27 (15,1%)	124 (71,7%)	49 (28,3%)
<i>мешовити</i>	35 (64,8%)	19 (35,2%)	41 (73,2%)	15 (26,8%)	34 (63,0%)	20 (37,0%)
<i>високог ризика</i>	30 (62,5%)	18 (37,5%)	35 (72,9%)	13 (27,1%)	21 (45,7%)	25 (54,3%)
Укупно	203 (72,0%)	79 (28,0%)	228 (80,6%)	55 (19,4%)	179 (65,6%)	94 (34,4%)
УКУПНО	282 (100,0%)		283 (100,0%)		273 (100,0%)	

Употребом χ^2 теста утврђено је да нема статистички значајне разлике у дистрибуцији МЦМ 2 ($p=0,065$; $p>0,05$) и МЦМ 5 ($p=0,053$; $p>0,05$) протеина између група у односу на прогностичку категорију базоцелуларног карцинома **за цео узорак**, док је за дистрибуцију **МЦМ 7 протеина**, у истој категорији, **утврђена високо статистички значајна разлика** између група ($p=0,004$; $p<0,01$).

Употребом χ^2 теста утврђена је **статистички значајна разлика** у дистрибуцији **МЦМ 2** ($p=0,048$; $p<0,05$) протеина између *high-risk* и *low-risk* подтипова базоцелуларног карцинома, **високо статистички значајна разлика за дистрибуцију МЦМ 7** ($p=0,001$; $p<0,01$) протеина, у истој категорији, док је за дистрибуцију МЦМ 5 протеина, у истој категорији, утврђено да нема статистички значајне разлике ($p=0,053$; $p>0,05$).

Употребом χ^2 теста утврђено је да нема статистички значајне разлике у дистрибуцији МЦМ 2 ($p=0,808$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,973$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,083$; $p>0,05$) протеина између *high-risk* и *mixed* подтипова базоцелуларног карцинома.

Употребом χ^2 теста утврђено је да нема статистички значајне разлике у дистрибуцији МЦМ 2 ($p=0,082$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,224$; $p>0,05$) протеина између *low-risk* и *mixed* подтипова базоцелуларног карцинома, док је **за дистрибуцију МЦМ 5 протеина**, у истој категорији, **утврђена статистички значајна разлика** између група ($p=0,046$; $p<0,05$).

4.3.1.2. Однос дистрибуције имунопозитивности према дубини инвазије базоцелуларног карцинома

У статистичку анализу нису ушли туморска инвазија у кост (само један случај) и туморска инвазија папиларног дерма (само два случаја).

Табела 11. Дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома у односу на дубину туморске инвазије.

ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ	МЦМ 2		МЦМ 5		МЦМ 7	
	дифузна	периферна	дифузна	периферна	дифузна	периферна
<i>Ретикуларни дерм</i>	153 (68,3%)	71 (31,7%)	179 (80,3%)	44 (19,7%)	138 (64,2%)	77 (35,8%)
<i>Мишићни слој</i>	22 (88,0%)	3 (12,0%)	24 (88,9%)	3 (11,1%)	20 (76,9%)	6 (23,1%)
<i>Цела дебљина капка/поткожно /масно ткиво</i>	26 (86,7%)	4 (13,3%)	23 (76,7%)	7 (23,3%)	20 (66,7%)	10 (33,3%)
Укупно	201 (72,0%)	78 (28,0%)	226 (80,7%)	54 (19,3%)	178 (65,7%)	93 (34,3%)
УКУПНО	279 (100,0%)		280 (100,0%)		271 (100,0%)	

Употребом χ^2 теста утврђена је **статистички значајна разлика** у дистрибуцији МЦМ 2 протеина у односу на дубину инвазије ($p=0,019$; $p>0,05$), док је показано да нема статистички значајне разлике у дистрибуцији МЦМ 5 ($p=0,472$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,431$; $p>0,05$) протеина у истој категорији.

4.3.1.3. Однос дистрибуције имунопозитивности према дубини инвазије и ризичним групама базоцелуларног карцинома

У статистичку анализу нису ушли туморска инвазија у кост (само један случај - тумор високог ризика) и туморска инвазија папиларног дерма (само два случаја - тумори ниског ризика).

4.3.1.3.1. Тумори ниског ризика

Табела 12. Дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на дубину туморске инвазије, у туморима ниског ризика (*low-risk*).

ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ	МЦМ 2		МЦМ 5		МЦМ 7	
	дифузна	периферна	дифузна	периферна	дифузна	периферна
<i>Ретикуларни дерм</i>	112 (74,2%)	39 (25,8%)	128 (85,3%)	22 (14,7%)	102 (70,8%)	42 (29,2%)
<i>Мишићни слој</i>	9 (90,0%)	1 (10,0%)	9 (90,0%)	1 (10,0%)	8 (80,0%)	2 (20,0%)
<i>Цела дебљина капка/поткожно /масно ткиво</i>	16 (94,1%)	1 (5,9%)	14 (82,4%)	3 (17,6%)	13 (76,5%)	4 (23,5%)
Укупно	137 (77,0%)	41 (23,0%)	151 (85,3%)	26 (14,7%)	123 (71,9%)	48 (28,1%)
УКУПНО	178 (100,0%)		177 (100,0%)		171 (100,0%)	

Употребом χ^2 теста утврђено је да нема статистички значајне разлике у дистрибуцији МЦМ 2 ($p=0,108$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,863$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,748$; $p>0,05$) протеина у односу на дубину инвазије, а према хистопатолошким одликама тумора у односу на ризик од појаве рецидива (тумори ниског ризика – *low-risk*).

4.3.1.3.2. Тумори мешовитог ризика

Табела 13. Дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на дубину туморске инвазије туморима мешовитог ризика (*mixed*).

ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ	МЦМ 2		МЦМ 5		МЦМ 7	
	дифузна	периферна	дифузна	периферна	дифузна	периферна
<i>Ретикуларни дерм</i>	19 (55,9%)	15 (44,1%)	23 (67,6%)	11 (32,4%)	19 (57,6%)	14 (42,4%)
<i>Мишићни слој</i>	9 (81,8%)	2 (18,2%)	11 (84,6%)	2 (15,4%)	8 (66,7%)	4 (33,3%)
<i>Цела дебљина капка/поткожно /масно ткиво</i>	7 (77,8%)	2 (22,2%)	7 (77,8%)	2 (22,2%)	7 (77,8%)	2 (22,2%)
Укупно	35 (64,8%)	19 (35,2%)	41 (73,2%)	15 (26,8%)	34 (63,0%)	20 (37,0%)
УКУПНО	54 (100,0%)		56 (100,0%)		54 (100,0%)	

Употребом χ^2 теста утврђено је да нема статистички значајне разлике у дистрибуцији МЦМ 2 ($p=0,197$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,474$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,748$; $p>0,05$) протеина.

4.3.1.3.3. Тумори високог ризика

Табела 14. Дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на дубину туморске инвазије у туморима високог ризика (*high-risk*).

ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ	МЦМ 2		МЦМ 5		МЦМ 7	
	дифузна	периферна	дифузна	периферна	дифузна	периферна
<i>Ретикуларни дерм</i>	22 (56,4%)	17 (43,6%)	28 (71,8%)	11 (28,2%)	17 (44,7%)	21 (55,3%)
<i>Мишићни слој</i>	4 (100,0%)	0 (0,0%)	4 (100,0%)	0 (0,0%)	4 (100,0%)	0 (0,0%)
<i>Цела дебљина капка/поткожно /масно ткиво</i>	3 (75,0%)	1 (25,0%)	2 (50,0%)	2 (50,0%)	0 (0,0%)	4 (100,0%)
Укупно	29 (61,7%)	18 (38,3%)	34 (72,3%)	13 (27,7%)	21 (45,7%)	25 (54,3%)
УКУПНО	47 (100,0%)		47 (100,0%)		46 (100,0%)	

Употребом χ^2 теста утврђено је да нема статистички значајне разлике у дистрибуцији МЦМ 2 ($p=0,197$; $p>0,05$) и МЦМ 5 ($p=0,282$; $p>0,05$), док постоји **статистички значајна разлика** у дистрибуцији **МЦМ 7** ($p=0,017$; $p<0,05$) протеина.

4.3.1.4. Однос дистрибуције имунопозитивности према површини тумора

Табела 15. Дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, у односу на површину тумора.

Дистрибуција имунопозитивности	МЦМ 2	МЦМ 5	МЦМ 7
	Средња вредност \pm СД (распон) %	Средња вредност \pm СД (распон) %	Средња вредност \pm СД (распон) %
ДИФУЗНО	143,536 \pm 190,4362 (1,6–1256,0)	141,596 \pm 186,9683 (1,6–1256,0)	153,033 \pm 184,5618 (1,6–1236,4)
ПЕРИФЕРНО	130,307 \pm 194,7068 (4,7–1133,5)	135,664 \pm 211,4070 (4,7–1133,5)	113,809 \pm 198,0986 (3,1–1256,0)

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста утврђено је да нема статистички значајне разлике у дистрибуцији имунопозитивности МЦМ 2 ($p=0,194$; $p>0,05$) и МЦМ 5 ($p=0,394$; $p>0,05$) протеина, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, у односу на површину тумора, док за дистрибуцију имунопозитивности МЦМ 7 ($p=0,008$; $p<0,01$) протеина постоји високо статистички значајна разлика, у истој категорији.

4.3.1.5. Однос дистрибуције имунопозитивности према највећем измереном пречнику тумора

Табела 16. Дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, у односу на највећи измерени пречник тумора.

ПРЕЧНИК ТУМОРА	МЦМ 2		МЦМ 5		МЦМ 7	
	дифузна	периферна	дифузна	периферна	дифузна	периферна
<10 mm	70 (67,3%)	34 (32,7%)	86 (81,9%)	19 (18,1%)	59 (59,0%)	41 (41,0%)
10-20 mm	106 (76,8%)	32 (23,2%)	112 (81,8%)	25 (18,2%)	94 (69,6%)	41 (30,4%)
>20 mm	23 (65,7%)	12 (34,3%)	27 (75,0%)	9 (25,0%)	24 (70,6%)	10 (29,4%)
Укупно	199 (71,8%)	78 (28,2%)	225 (80,9%)	53 (19,1%)	177 (65,8%)	92 (34,2%)
УКУПНО	277 (100,0%)		278 (100,0%)		269 (100,0%)	

Употребом χ^2 теста утврђено је да нема статистички значајне разлике у дистрибуцији имунопозитивности МЦМ 2 ($p=0,183$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,623$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,194$; $p>0,05$) протеина, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, у односу на највећи измерени пречник тумора.

4.3.2. ОБИМ ЕКСПРЕСИЈЕ ИМУНОПОЗИТИВНОСТИ

4.3.2.1. Однос обима експресије према ризичним групама базоцелуларног карцинома

Табела 17. Обим имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према хистопатолошким одликама тумора у односу на ризик од појаве рецидива.

Подтип	МЦМ 2			МЦМ 5			МЦМ 7		
	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%
<i>ниског ризика</i>	14 (7,5%)	112 (59,9%)	61 (32,6%)	10 (5,4%)	50 (26,7%)	127 (67,9%)	114 (61,0%)	69 (36,9%)	4 (2,1%)
<i>мешовити</i>	9 (15,3%)	37 (62,7%)	13 (22,0%)	5 (8,5%)	15 (25,4%)	39 (66,1%)	42 (71,2%)	17 (28,8%)	0 (0,0%)
<i>високог ризика</i>	4 (8,3%)	39 (81,2%)	5 (10,5%)	4 (8,3%)	21 (43,8%)	23 (47,9%)	34 (70,8%)	14 (29,2%)	0 (0,0%)

Применом непараметарског теста *Kruskal-Wallis* за поређење три или више група, уочава се **статистички значајна разлика** код семиквантитативне експресије **МЦМ 2** ($p=0,01; p<0,05$), **МЦМ 5** ($p=0,042; p<0,05$) и **МЦМ 7** ($p=0,186; p<0,05$) протеина.

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење *high-risk* и *low-risk* подтипова базоцелуларног карцинома, утврђено је да постоји **високо статистички значајна разлика** у семиквантитативној експресији **МЦМ 2** ($p=0,008; p<0,01$) протеина и **статистички значајна разлика** за **МЦМ 5** ($p=0,012; p<0,05$), док је за семиквантитативну експресију **МЦМ 7** ($p=0,389; p>0,05$) протеина утврђено да нема статистички значајне разлике.

Поређењем *high-risk* и *mixed* подтипова базоцелуларног карцинома, утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у семиквантитативној

експресији МЦМ 2 ($p=0,621$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,093$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,968$; $p>0,05$) протейна.

Поређењем *low-risk* и *mixed* подтипова базоцелуларног карцинома, утврђено је да постоји **статистички значајна разлика** у семиквантитативној експресији **МЦМ 2** ($p=0,045$; $p<0,05$) протейна, док не постоји статистички значајна разлика за МЦМ 5 ($p=0,701$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,134$; $p>0,05$).

4.3.2.2. Однос обима експресије имунопозитивности према дубини инвазије базоцелуларног карцинома

Табела 18. Обим имунопозитивности МЦМ протейна 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према дубини туморске инвазије.

ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ	МЦМ 2			МЦМ 5			МЦМ 7		
	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%
<i>Ретикуларни дерм</i>	18 (7,8%)	150 (64,7%)	64 (27,6%)	10 (4,3%)	74 (31,9%)	148 (63,8%)	140 (60,3%)	88 (37,9%)	4 (1,7%)
<i>Мишићни слој</i>	8 (29,6%)	16 (59,3%)	3 (11,1%)	8 (29,6%)	3 (11,1%)	16 (59,3%)	24 (88,9%)	3 (11,1%)	0 (0,0%)
<i>Цела дебљина капка/поткожно /масно ткиво</i>	1 (3,1%)	19 (59,4%)	12 (37,5%)	0 (0,0%)	7 (21,9%)	25 (78,1%)	25 (78,1%)	7 (21,9%)	0 (0,0%)
Укупно	27 (9,3%)	185 (63,6%)	79 (27,1%)	18 (6,2%)	84 (28,9%)	189 (64,9%)	189 (64,9%)	98 (33,7%)	4 (1,4%)
УКУПНО	291 (100,0%)			291 (100,0%)			291 (100,0%)		

Применом непараметарског теста *Kruskal-Wallis* за поређење три или више група, уочава се **високо** статистички значајна разлика између семиквантитативно одређене експресије МЦМ 2 ($p=0,002$; $p<0,01$) и МЦМ 7

($p=0,003$; $p<0,01$) протеина у односу на дубину туморске инвазије, а нема статистички значајне разлике у експресији МЦМ 5 ($p=0,082$; $p>0,05$) протеина у истој категорији.

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење дубине инвазије базоцелуларног карцинома у *ретикуларни дерм* и *мишићни слој*, у односу на семиквантитативно одређену експресију МЦМ протеина у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, утврђено је да постоји **високо статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 2** ($p=0,002$; $p<0,01$) и **МЦМ 7** ($p=0,004$; $p<0,01$) протеина, док је за семиквантитативну експресију МЦМ 5 ($p=0,176$; $p>0,05$) протеина утврђено да нема статистички значајне разлике.

Поређењем тумора са инвазијом у *ретикуларни дерм* и оних са захватањем *целе дебљине капка/поткожног/масног ткива*, утврђено је да постоји **статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 7** ($p=0,048$; $p<0,05$) протеина, док за семиквантитативну експресију МЦМ 2 ($p=0,175$; $p>0,05$) и МЦМ 5 ($p=0,092$; $p>0,05$) протеина разлика није била статистички значајна.

Поређењем базоцелуларних карцинома са инвазијом у *мишићни слој* и тумора са захватањем *целе дебљине капка/поткожног/масног ткива*, утврђено је да постоји **високо статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 2** ($p=0,002$; $p<0,01$) протеина, и **статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 5** ($p=0,040$; $p<0,05$) протеина, док за МЦМ 7 ($p=0,276$; $p>0,05$) разлика није била статистички значајна.

4.3.2.3. Однос обима експресије имунопозитивности према дубини инвазије и ризичним групама базоцелуларног карцинома

4.3.2.3.1. Тумори ниског ризика

Табела 19. Обим имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 према дубини туморске инвазије у туморима ниског ризика (*low-risk*).

ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ	МЦМ 2			МЦМ 5			МЦМ 7		
	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%
<i>Ретикуларни дерм</i>	12 (7,6%)	94 (59,5%)	52 (32,9%)	8 (5,1%)	46 (29,1%)	104 (65,8%)	93 (58,9%)	61 (38,6%)	4 (2,5%)
<i>Мишићни слој</i>	2 (20,0%)	6 (60,0%)	2 (20,0%)	1 (10,0%)	2 (20,0%)	7 (70,0%)	8 (80,0%)	2 (20,0%)	0 (0,0%)
<i>Цела дебљина капка/поткожно /масно ткиво</i>	0 (0,0%)	10 (58,8%)	7 (41,2%)	0 (0,0%)	1 (5,9%)	16 (94,1%)	13 (76,5%)	4 (23,5%)	0 (0,0%)
Укупно	14 (7,6%)	110 (59,5%)	61 (33,0%)	9 (4,9%)	49 (26,5%)	127 (68,6%)	114 (61,6%)	67 (36,2%)	4 (2,2%)
УКУПНО	185 (100,0%)			185 (100,0%)			185 (100,0%)		

Применом непараметарског теста *Kruskal-Wallis* за поређење три или више група, утврђено је да нема статистички значајне разлике између семиквантитативно одређене експресије МЦМ 2 ($p=0,257$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,059$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,160$; $p>0,05$), у односу на дубину туморске инвазије, код тумора ниског ризика (*low-risk*).

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење дубине инвазије базоцелуларног карцинома у *ретикуларни дерм* и *мишићни слој*, у односу на семиквантитативно одређену експресију МЦМ протеина у туморима ниског ризика (*low-risk*), утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у

семиквантитативној експресији МЦМ 2 ($p=0,217$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,884$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,180$; $p>0,05$) протеина.

Поређењем базоцелуларних карцинома са инвазијом у *ретикуларни дерм* и тумора са захватањем *целе дебљине капка/поткожног/масног ткива*, утврђено је да постоји **статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 5** ($p=0,017$; $p<0,05$), док не постоји статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 2 ($p=0,320$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,148$; $p>0,05$) протеина, у категорији базоцелуларних карцинома ниског ризика.

Поређењем тумора са инвазијом у *мишићни слој* и онох са захватањем *целе дебљине капка/поткожног/масног ткива*, утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 2 ($p=0,106$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,088$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,834$; $p>0,05$) протеина.

4.3.2.3.2. Тумори мешовитог ризика

Табела 20. Обим имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 према дубини туморске инвазије у туморима мешовитог ризика (*mixed*).

ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ	МЦМ 2			МЦМ 5			МЦМ 7		
	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%
<i>Ретикуларни дерм</i>	5 (14,3%)	23 (65,7%)	7 (20,0%)	2 (5,7%)	11 (31,4%)	22 (62,9%)	21 (60,0%)	14 (40,0%)	
<i>Мишићни слој</i>	3 (23,1%)	9 (69,2%)	1 (7,7%)	3 (23,1%)	1 (7,7%)	9 (69,2%)	12 (92,3%)	1 (7,7%)	
<i>Цела дебљина капка/поткожно/ масно ткиво</i>	1 (9,1%)	5 (45,5%)	5 (45,5%)	0 (0,0%)	3 (27,3%)	8 (72,7%)	9 (81,8%)	2 (18,2%)	
Укупно	9 (15,3%)	37 (62,7%)	13 (22,0%)	5 (8,5%)	15 (25,4%)	39 (66,1%)	42 (71,2%)	17 (28,8%)	
УКУПНО	59 (100,0%)			59 (100,0%)			59 (100,0%)		

Применом непараметарског теста *Kruskal-Wallis* за поређење три или више група, утврђено је да нема статистички значајне разлике између семиквантитативно одређене експресије МЦМ 2 ($p=0,110$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,795$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,160$; $p>0,05$).

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење дубине инвазије базоцелуларног карцинома у **ретикуларни дерм** и **мишићни слој**, тумора мешовитог ризика (*mixed*), утврђено је да постоји **статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 7** ($p=0,034$; $p<0,05$) протеина, док за МЦМ 2 ($p=0,266$; $p>0,05$) и МЦМ 5 ($p=0,978$; $p>0,05$) није било значајне разлике.

Поређењем тумора са инвазијом у **ретикуларни дерм** и захватањем **целе дебљине капка/поткожног/масног ткива**, утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 2 ($p=0,138$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,497$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,190$; $p>0,05$) протеина.

Поређење дубине инвазије базоцелуларног карцинома у **мишићни слој** и захватања **целе дебљине капка/поткожног/масног ткива** утврђено је да постоји **статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 2** ($p=0,049$; $p<0,05$) протеина, али не и за МЦМ 5 ($p=0,612$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,449$; $p>0,05$).

4.3.2.3.3. Тумори високог ризика

Табела 21. Обим имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 према дубини туморске инвазије, у туморима високог ризика (*high-risk*).

ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ	МЦМ 2			МЦМ 5			МЦМ 7		
	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%
<i>Ретикуларни дерм</i>	1 (2,6%)	33 (84,6%)	5 (12,8%)	0 (0,0%)	17 (43,6%)	22 (56,4%)	26 (66,7%)	13 (33,3%)	
<i>Мишићни слој</i>	3 (75,0%)	1 (25,0%)	0 (0,0%)	4 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (100,0%)	0 (0,0%)	
<i>Цела дебљина капка/поткожно/ масно ткиво</i>	0 (0,0%)	4 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (75,0%)	1 (25,0%)	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
Укупно	4 (8,5%)	38 (80,9%)	5 (10,6%)	4 (8,5%)	20 (42,6%)	23 (48,9%)	33 (70,2%)	14 (29,8%)	
УКУПНО		47 (100,0%)			47 (100,0%)		47 (100,0%)		

Применом непараметарског теста *Kruskal-Wallis* за поређење три или више група, уочава се **високо** статистички значајна разлика између семиквантитативно одређене експресије МЦМ 2 ($p=0,001$; $p<0,01$) и МЦМ 5 ($p=0,001$; $p<0,01$) протеина у односу на дубину туморске инвазије, а према хистопатолошким одликама тумора високог ризика (*high-risk*), док нема статистички значајне разлике у експресији МЦМ 7 ($p=0,380$; $p>0,05$) протеина у истој категорији.

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење дубине инвазије базоцелуларног карцинома у *ретикуларни дерм* и *мишићни слој* утврђено је да постоји **високо** статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 2 ($p=0,001$; $p<0,01$) и МЦМ 5 ($p=0,000$; $p<0,001$) протеина, док за МЦМ 7 ($p=0,172$; $p>0,05$) статистички значајне разлике није утврђена.

Поређење тумора са дубином инвазије у *ретикуларни дерм* и захватањем целе дебљине капка/поткожног/масног ткива, тврђено је да не постоји

статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 2 ($p=0,578$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,236$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,738$; $p>0,05$) протеина.

Поређењем дубине инвазије у *мишићни слој* и захватања *целе дебљине капка/поткожног/масног ткива* утврђено је да постоји **статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 2** ($p=0,04$; $p<0,05$) и **МЦМ 5** ($p=0,011$; $p<0,05$) протеина, док за МЦМ 7 ($p=0,317$; $p>0,05$) протеина, није било значајне разлике.

4.3.2.4. Однос обима експресије према површини тумора

Табела 22. Обим експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, у односу на површину тумора.

	МЦМ 2			МЦМ 5			МЦМ 7		
	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%	<10%	10-50%	>50%
Средња вредност површине тумора \pm СД (распон) (mm^3)	149,386 \pm 214,0952 (9,4-954,6)	123,689 \pm 193,4842 (1,6-1256,0)	99,838 \pm 100,1054 (4,7-490,6)	121,847 \pm 222,1080 (9,4-954,6)	122,568 \pm 190,7785 (3,1-1236,4)	117,530 \pm 160,9289 (1,6-1256,0)	129,001 \pm 192,5394 (3,1-1256,0)	96,905 \pm 127,0221 (1,6-529,9)	138,400 \pm 155,2015 (19,6-314,0)

На основу *Shapiro-Wilk*-овог теста закључује се да расподела података одступа од нормалне дистрибуције ($p<0,05$), те се из тог разлога мора применити непараметарски *Kruskal-Wallis*-ов тест, којим је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 2 ($p=0,739$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,365$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,276$; $p>0,05$) протеина у односу на површину тумора.

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење <10% и 10-50% семиквантитативно одређене експресије МЦМ протеина, утврђено је да не постоји

статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ 2 ($p=0,557$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,484$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,103$; $p>0,05$) протеина. Разлика није била значајна ни при поређењу **<10%** и **>50%** - МЦМ 2 ($p=0,751$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,177$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,780$; $p>0,05$) нити при поређењу **10-50%** и **>50%** - МЦМ 2 ($p=0,553$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,467$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,510$; $p>0,05$).

4.3.2.5. Однос обима експресије према највећем измереном пречнику тумора

Табела 23. Однос семиквантитативно одређеног обима експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према највећем измереном пречнику тумора.

Највећи измерени пречник тумора	МЦМ 2			МЦМ 5			МЦМ 7		
	<10% <i>n</i> (%)	10-50% <i>n</i> (%)	>50% <i>n</i> (%)	<10% <i>n</i> (%)	10-50% <i>n</i> (%)	>50% <i>n</i> (%)	<10% <i>n</i> (%)	10-50% <i>n</i> (%)	>50% <i>n</i> (%)
<10 mm	13 (11,7%)	67 (60,4%)	31 (27,9%)	9 (8,1%)	35 (31,5%)	67 (60,4%)	71 (64,0%)	38 (34,2%)	2 (1,8%)
10-20 mm	8 (5,6%)	95 (66,9%)	39 (27,5%)	7 (4,9%)	41 (28,9%)	94 (66,2%)	92 (64,8%)	48 (33,8%)	2 (1,4%)
>20 mm	5 (13,9%)	24 (66,7%)	7 (19,4%)	3 (8,3%)	9 (25,0%)	24 (66,7%)	24 (66,7%)	12 (33,3%)	0 (0,0%)
Укупно	26 (9,0%)	186 (64,4%)	77 (26,6%)	19 (6,6%)	85 (29,4%)	185 (64,0%)	187 (64,7%)	98 (33,9%)	4 (1,4%)
УКУПНО	289 (100,0%)			289 (100,0%)			289 (100,0%)		

Применом непараметарског теста *Kruskal-Wallis* за поређење три или више група, не уочава се статистички значајна разлика код семиквантитативне експресије МЦМ 2 ($p=0,333$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,550$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,938$; $p>0,05$) протеина.

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење **<10 mm** и **10-20 mm** највећег измереног пречника базоцелуларног карцинома у односу на семиквантитативно одређену експресију МЦМ протеина утврђено је нема

статистички значајне разлике у семиквантитативној експресији МЦМ 2 ($p=0,522$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,285$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,876$; $p>0,05$) протеина. Значајне разлике није било ни између група <10 mm и >20 mm - МЦМ 2 ($p=0,344$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,549$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,721$; $p>0,05$) и 10-20 mm и >20 mm - МЦМ 2 ($p=0,129$; $p>0,05$), МЦМ 5 ($p=0,937$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,793$; $p>0,05$) протеина.

4.3.3. ИНДЕКС ОБЕЛЕЖАВАЊА ОДРЕЂЕН АУТОМАТСКИМ БРОЈАЊЕМ ЋЕЛИЈА

4.3.3.1. Индекс обележавања одређен аутоматским бројањем ћелија, према хистопатолошким одликама тумора у односу на ризик од појаве рецидива

Табела 24. Обим имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 одређен аутоматским бројањем, у односу на ризичне групе базоцелуларног карцинома.

МЦМ 2			МЦМ 5			МЦМ 7		
<i>low-risk</i>	<i>mixed</i>	<i>high-risk</i>	<i>low-risk</i>	<i>mixed</i>	<i>high-risk</i>	<i>low-risk</i>	<i>mixed</i>	<i>high-risk</i>
Средња вредност ±	Средња вредност ±	Средња вредност ±	Средња вредност ±	Средња вредност ±	Средња вредност ±	Средња вредност ±	Средња вредност ±	Средња вредност ±
СД	СД	СД	СД	СД	СД	СД	СД	СД
(распон)	(распон)	(распон)	(распон)	(распон)	(распон)	(распон)	(распон)	(распон)
(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
39,145±	37,280 ±	34,365 ±	56,101 ±	53,405 ±	50,533 ±	12,440 ±	11,039 ±	11,777 ±
18,5937	17,4811	14,2802	20,8693	20,4192	16,1919	11,5501	11,6796	10,8961
(0,4-84,1)	(0,7-74,2)	(6,0-72,2)	(0,1-89,7)	(0,6-86,9)	(2,5-80,9)	(0,0-59,3)	(0,1-38,2)	(0,0-45,9)

На основу вредности *Shapiro-Wilk*-овог теста ($p>0,05$), подаци за МЦМ 2 протеин показују нормалну дистрибуцију, док је тестирањем хомогености варијанси (*Levene*-ов тест) уочено да је $p>0,05$ чиме је закључено да се испуњава претпоставка о

хомогености варијанси, и да се стога може применити једнофакторска *ANOVA*. Овим тестом утврђено је нема статистички значајне разлике у обиму имунопозитивности МЦМ 2 ($p=0,318$; $p>0,05$) протеина одређеном аутоматским бројањем, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према хистопатолошким одликама тумора у односу на ризик од појаве рецидива.

Применом *Kruskal-Wallis*-овог теста утврђено је да **постоји статистички значајна разлика** обиму имунопозитивности **МЦМ 5** ($p=0,020$; $p<0,05$) протеина одређеном аутоматским бројањем, док за дистрибуцију МЦМ 7 протеина, у истој категорији, разлика не постоји ($p=0,313$; $p>0,05$).

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење **high-risk** и **low-risk** подтипова базоцелуларног карцинома у односу на обим имунопозитивности одређен аутоматским бројањем, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, а према хистопатолошким одликама тумора у односу на ризик од појаве рецидива, утврђено је да постоји **високо статистички значајна разлика** у имунопозитивности **МЦМ 5** ($p=0,006$; $p<0,01$), док за МЦМ 7 протеин, у истој категорији, значајна разлика не постоји ($p=0,777$; $p>0,05$).

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење **high-risk** и **mixed** подтипова базоцелуларног карцинома у односу на обим имунопозитивност одређен аутоматским бројањем, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према хистопатолошким одликама тумора у односу на ризик од појаве рецидива, утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у обиму имунопозитивности МЦМ 5 ($p=0,116$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,281$; $p>0,05$) протеина. Истим тестом је показано да не постоји статистички значајна разлика у обиму имунопозитивности МЦМ 5 ($p=0,279$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,138$; $p>0,05$) протеина између **low-risk** и **mixed** подтипова базоцелуларног карцинома.

4.3.3.2. Индекс обележавања одређен аутоматским бројањем хелија, према дубини туморске инвазије

Табела 25. Анализа имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 одређене аутоматским бројањем, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према дубини туморске инвазије.

	МЦМ 2	МЦМ 5	МЦМ 7
	Средња вредност \pm СД (распон) %	Средња вредност \pm СД (распон) %	Средња вредност \pm СД (распон) %
<i>Ретикуларни дерм</i>	38,507 \pm 17,9347 (0,4-84,1)	55,046 \pm 19,5313 (0,1-89,7)	13,456\pm11,9781 (0,0-59,3)
<i>Мишићни слој</i>	27,900 \pm 16,7845 (0,7-65,5)	44,711 \pm 26,4772 (0,6-85,1)	6,759 \pm 7,3791 (0,1-30,5)
<i>Цела дебљина капка/поткожно /масно ткиво</i>	42,894\pm14,8009 (15,3-74,2)	61,669\pm15,2831 (16,9-86,5)	6,628 \pm 7,0215 (0,2-26,4)

На основу вредности *Shapiro-Wilk*-овог теста ($p > 0,05$), подаци за МЦМ 2 протеин показују нормалну дистрибуцију, док је тестирањем хомогености варијанси (*Levene*-ов тест) уочено да је $p > 0,05$ чиме је закључено да се испуњава претпоставка о хомогености варијанси, и да се стога може применити једнофакторска *ANOVA*. Овим тестом утврђена је **високо статистички значајна разлика у обиму имунопозитивности МЦМ 2** ($p = 0,003$; $p < 0,01$) протеина.

Истим тестом утврђено је да постоји **високо статистички значајна разлика у обиму имунопозитивности МЦМ 2** протеина у односу на дубину инвазије, **ретикуларни дерм** и **мишићни слој** ($p = 0,009$; $p < 0,01$), и **мишићни слој** и захватање

целе дебљине капка/поткожног/масног ткива ($p=0,003$; $p<0,01$), док нема статистички значајне разлике између дубине инвазије у *ретикуларни дерм* и захватања *целе дебљине капка/поткожног/масног ткива* ($p=0,381$; $p>0,05$).

На основу вредности *Kolmogorov-Smirnov*-овог и *Shapiro-Wilk*-овог теста ($p<0,05$), подаци за МЦМ 5 и 7 протеина не показују нормалну дистрибуцију, те се мора применити *Kruskal-Wallis*-ов тест. Овим тестом утврђена је **статистички значајна разлика у обиму имунопозитивности МЦМ 5** ($p=0,038$; $p<0,05$) протеина, као и **високо статистички значајна разлика у обиму имунопозитивности МЦМ 7** ($p=0,000$; $p<0,001$) протеина, одређене аутоматским бројањем, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према дубини туморске инвазије.

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење дубине инвазије базоцелуларног карцинома у *ретикуларни дерм* и *мишићни слој*, утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у обиму експресије МЦМ 5 ($p=0,098$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,098$; $p>0,05$) протеина, нити за поређење инвазије у *ретикуларни дерм* и *целе дебљине капка/поткожног/масног ткива*, - МЦМ 5 ($p=0,069$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,069$; $p>0,05$), док је поређењем дубине инвазије базоцелуларног карцинома у *мишићни слој* и *целе дебљине капка/поткожног/масног ткива*, утврђена **статистички значајна разлика у обиму експресије МЦМ 5** ($p=0,020$; $p<0,05$) и **МЦМ 7** ($p=0,02$; $p<0,05$) протеина.

4.3.3.3. Индекс обележавања одређен аутоматским бројањем ћелија, према дубини туморске инвазије у односу на ризичне групе базоцелуларног карцинома

4.3.3.3.1. Тумори ниског ризика

Табела 26. Анализа имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 одређене аутоматским бројањем, према дубини туморске инвазије, а у односу на хистопатолошке одлике тумора ниског ризика (*low-risk*).

ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ	МЦМ 2	МЦМ 5	МЦМ 7
	Средња вредност \pm СД (распон)	Средња вредност \pm СД (распон)	Средња вредност \pm СД (распон)
	%	%	%
Ретикуларни дерм	39,055 \pm 19,0705 (0,4-84,1)	55,473 \pm 21,3667 (0,1-89,7)	13,138\pm12,0746 (0,0-59,3)
Мишићни слој	32,400 \pm 17,1639 (7,2-65,5)	52,490 \pm 23,1509 (3,8-85,1)	8,580 \pm 7,1811 (1,0-23,1)
Цела дебљина капка/поткожно /масно ткиво	43,694\pm15,1783 (15,3-71,5)	65,529\pm12,4001 (46,9-86,5)	8,124 \pm 7,5318 (0,3-26,4)

На основу вредности *Shapiro-Wilk*-овог теста подаци за МЦМ 2 протеин показују нормалну дистрибуцију, док је тестирањем хомогености варијанси *Levene*-ов тестом иста испуњена чиме је закључено да се може применити једнофакторска *ANOVA*. Овим тестом утврђена **статистички значајна разлика у обиму имунопозитивности МЦМ 2** ($p=0,01$; $p<0,05$) протеина одређене аутоматским бројањем, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према дубини туморске инвазије, а у односу на хистопатолошке одлике тумора ниског ризика (*low-risk*).

Применом *Kruskal-Wallis*-овог теста утврђено је да не постоји статистички значајна разлика обиму имунопозитивности МЦМ 5 ($p=0,180$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,173$; $p>0,05$) протеина одређеном аутоматским бројањем, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према дубини туморске инвазије, а у односу на хистопатолошке одлике тумора ниског ризика (*low-risk*).

За међугрупно поређење анализе имунопозитивности МЦМ 2 протеина према дубини инвазије базоцелуларног карцинома у туморима ниског ризика (*low-risk*), коришћена је једнофакторска *ANOVA*, којом је утврђено да постоји **високо статистички значајна разлика** у односу на дубину инвазије, **ретикуларни дерм** и

мишићни слој ($p=0,007$; $p<0,01$), док нема статистички значајне разлике између дубине инвазије у **ретикуларни дерм** и захватања **целе дебљине капка/поткожног/масног ткива** ($p=0,871$; $p>0,05$), ка ни између дубине инвазије у **мишићни слој** и захватања **целе дебљине капка/поткожног/масног ткива** ($p=0,121$; $p>0,05$), у истој категорији.

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење дубине инвазије базоцелуларног карцинома у **ретикуларни дерм** и **мишићни слој**, у односу на аутоматским бројањем одређену експресију, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, а у односу на хистопатолошке одлике тумора ниског ризика (*low-risk*), утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у обиму експресије МЦМ 5 ($p=0,646$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,646$; $p>0,05$) протеина. Истим тестом утврђено је да нема статистички значајне разлике у обиму експресије МЦМ 5 ($p=0,080$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,08$; $p>0,05$) протеина у односу на дубину инвазије у **ретикуларни дерм** и захватања **целе дебљине капка/поткожног/масног ткива**, као ни у обиму експресије МЦМ 5 ($p=0,138$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,138$; $p>0,05$) протеина у односу на дубину инвазије **мишићни слој** и захватања **целе дебљине капка/поткожног/масног ткива**, у истој категорији.

4.3.3.3.2. Тумори мешовитог ризика

Табела 27. Анализа имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 одређене аутоматским бројањем, према дубини туморске инвазије у туморима мешовитог ризика (*mixed*).

	МЦМ 2	МЦМ 5	МЦМ 7
ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ	Средња вредност ± СД (распон) %	Средња вредност ± СД (распон) %	Средња вредност ± СД (распон) %
<i>Ретикуларни дерм</i>	38,069±17,0713 (6,3-71,6)	54,643±17,4205 (3,0-86,9)	15,011±12,4485 (0,3-38,2)
<i>Мишићни слој</i>	28,485±17,4852 (0,7-52,6)	46,738±27,6629 (0,6-74,1)	5,654±8,3409 (0,1-30,5)
<i>Цела дебљина капка/поткожно /масно ткиво</i>	45,164±15,6068 (21,5-74,2)	57,345±19,6968 (16,9-83,9)	4,764±6,6764 (0,2-19,2)

На основу вредности *Shapiro-Wilk*-овог теста подаци за МЦМ 2 протеин показују нормалну дистрибуцију, док је тестирањем хомогености варијанси *Levene*-ов тестом иста испуњена чиме је закључено да се може применити једнофакторска *ANOVA*. Овим тестом утврђено је да нема статистички значајне разлике у обиму имунопозитивности МЦМ 2 ($p=0,058$; $p>0,05$) чиме се испуњава услов за доношење закључка да не постоји статистички значајна разлика ни у међугрупном поређењу за овај протеин ($p>0,05$).

Применом *Kruskal-Wallis*-овог теста утврђено је да не постоји статистички значајна разлика обиму имунопозитивности МЦМ 5 ($p=0,704$; $p>0,05$) протеина, док

постоји **високо** статистички значајна разлика обиму имунопозитивности МЦМ 7 ($p=0,001$; $p<0,01$) протеина.

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење дубине инвазије базоцелуларног карцинома у **ретикуларни дерм** и **мишићни слој**, утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у обиму експресије **МЦМ 5** ($p=0,618$; $p>0,05$) и **МЦМ 7** ($p=0,618$; $p>0,05$) протеина. Истим тестом утврђено је да нема статистички значајне разлике у обиму експресије **МЦМ 5** ($p=0,545$; $p>0,05$) и **МЦМ 7** ($p=0,545$; $p>0,05$) протеина у односу на дубину инвазије у **ретикуларни дерм** и захватања **целе дебљине капка/поткожног/масног ткива**, као ни у односу на дубину инвазије **мишићни слој** и захватања **целе дебљине капка/поткожног/масног ткива**.

4.3.3.3.3. Тумори високог ризика

Табела 28. Анализа имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 одређене аутоматским бројањем, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према дубини туморске инвазије, а у односу на хистопатолошке одлике тумора високог ризика (*high-risk*).

	МЦМ 2	МЦМ 5	МЦМ 7
ДУБИНА ИНВАЗИЈЕ	Средња вредност \pm СД (распон) %	Средња вредност \pm СД (распон) %	Средња вредност \pm СД (распон) %
Ретикуларни дерм	36,679\pm13,6788 (15,9-72,2)	53,679 \pm 12,5848 (29,7-80,9)	13,346\pm11,3359 (0,3-45,9)
Мишићни слој	14,750 \pm 5,9411 (6,0-18,7)	18,675 \pm 16,8371 (2,5-41,6)	5,800 \pm 4,6210 (0,3-11,6)
Цела дебљина капка/поткожно/м асно ткиво	33,250 \pm 8,7500 (22,2-41,7)	57,150\pm10,9583 (44,9-68,9)	5,400 \pm 5,5576 (1,2-13,5)

На основу вредности *Shapiro-Wilk*-овог теста, подаци за МЦМ 2, 5 и 7 протеине показују нормалну дистрибуцију, чиме је закључено да се испуњава претпоставка о хомогености варијанси, и да се стога може применити једнофакторска *ANOVA*. Овим тестом утврђена је **статистички значајна разлика у обиму имунопозитивности МЦМ 2** ($p=0,001$; $p<0,05$) и **високо статистички значајна разлика у обиму имунопозитивности МЦМ 5** ($p=0,000$; $p<0,001$) протеина, док за МЦМ 7 ($p=0,187$; $p>0,05$) протеин нема статистички значајне разлике, чиме се испуњава услов за доношење закључка да не постоји статистички значајна разлика ни у међугрупуном поређењу за овај протеин ($p>0,05$).

За међугрупуно поређење анализе имунопозитивности МЦМ 2 и 5 протеина одређене аутоматским бројањем коришћена је једнофакторска *ANOVA*, којом је утврђено да постоји **високо статистички значајна разлика у обиму имунопозитивности МЦМ 2** ($p=0,007$; $p<0,01$) и **МЦМ 5** ($p=0,000$; $p<0,001$) протеина у односу на дубину инвазије, *ретикуларни дерм* и *мишићни слој*, као и **високо статистички значајна разлика у обиму имунопозитивности МЦМ 5** ($p=0,000$; $p<0,001$) протеина у односу на дубину инвазије, *мишићни слој* и захватање *целе дебљине капка/поткожног/масног ткива*, док нема статистички значајне разлике у обиму имунопозитивности МЦМ 2 ($p=0,871$; $p>0,05$) и МЦМ 5 ($p=0,864$; $p>0,05$) протеина између дубине инвазије у *ретикуларни дерм* и захватања *целе дебљине капка/поткожног/масног ткива*, као ни за МЦМ 2 ($p=0,121$; $p>0,05$) протеин за дубину инвазије у *мишићни слој* и захватања *целе дебљине капка/поткожног/масног ткива*.

4.3.3.4. Индекс обележавања одређен аутоматским бројањем ћелија према површини тумора

Табела 29. Анализа имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 одређене аутоматским бројањем, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према површини тумора.

	МЦМ 2	МЦМ 5	МЦМ 7
Средња вредност површине тумора \pm СД	38,084 \pm 17,7524	54,651 \pm 20,1371	12,050 \pm 11,4477
(распон)	(0,4-84,1)	(0,1-89,7)	(0,0-59,3)
(%)			

Применом *Spearman*-овог теста не уочава се корелација између површине тумора и броја МЦМ 2 ($r=0,088$; $p=0,132$) и МЦМ 7 ($r=0,036$; $p=0,545$) позитивних ћелија, док **постоји слаба, позитивна корелација** између површине тумора и броја **МЦМ 5** ($r=0,128$; $p=0,03$) позитивних ћелија, одређених аутоматским бројањем.

4.3.3.5. Индекс обележавања одређен аутоматским бројањем ћелија према највећем измереном пречнику тумора

Табела 30. Однос аутоматским бројањем одређеног обима експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, према највећем измереном пречнику тумора.

Највећи измерени пречник тумора	МЦМ 2	МЦМ 5	МЦМ 7
	Средња вредност \pm СД (распон) %	Средња вредност \pm СД (распон) %	Средња вредност \pm СД (распон) %
<10 mm	35,789 \pm 18,8070 (0,4-73,9)	50,690 \pm 22,6609 (0,3-86,0)	11,495 \pm 11,4229 (0,1-56,2)
10-20 mm	39,544\pm16,6457 (0,7-84,1)	57,713\pm17,3321 (0,1-89,7)	12,222 \pm 11,2020 (0,0-59,3)
>20 mm	38,111 \pm 15,9316 (4,9-69,9)	54,364 \pm 18,8546 (0,7-80,3)	12,261\pm11,3863 (0,0-43,0)

На основу вредности *Kolmogorov-Smirnov*-овог и *Shapiro-Wilk*-овог теста, као и тестирањем хомогености варијанси (*Levene*-ов тест), закључено је да се испуњава претпоставка о хомогености варијанси за податке за МЦМ 2 протеин, и да се стога може применити једнофакторска *ANOVA*. Овим тестом утврђено је да нема статистички значајне разлике аутоматским бројањем одређеног обима имунопозитивности МЦМ 2 ($p=0,237$; $p>0,05$) протеина, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, а према највећем измереном пречнику тумора.

Применом теста једнофакторска *ANOVA* за међугрупно поређење <10 mm и 10-20 mm, <10 mm и >20 mm, и 10-20 mm и >20 mm највећег измереног пречника

базоцелуларног карцинома у односу на аутоматским бројањем одређену експресију МЦМ 2 ($p=0,207$; $p>0,05$), ($p=0,767$; $p>0,05$), ($p=0,899$; $p>0,05$) протеина у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, утврђено је нема статистички значајне разлике у експресији.

На основу вредности *Kolmogorov-Smirnov*-овог и *Shapiro-Wilk*-овог теста, подаци за МЦМ 5 и 7 протеине не показују нормалну дистрибуцију, те се мора применити *Kruskal-Wallis*-ов тест. Овим тестом утврђено је да нема статистички значајне разлике аутоматским бројањем одређеног обима имунопозитивности МЦМ 5 ($p=0,143$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,811$; $p>0,05$) протеина, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, а према највећем измереном пречнику тумора.

Применом *Mann-Whitney*-јевог теста за међугрупно поређење **<10 mm и 10-20 mm**, **<10 mm и >20 mm**, и **10-20 mm и >20 mm** највећег измереног пречника базоцелуларног карцинома у односу на аутоматским бројањем одређену експресију МЦМ 5 ($p=0,057$; $p>0,05$) ($p=0,625$; $p>0,05$) ($p=0,327$; $p>0,05$) и МЦМ 7 ($p=0,514$; $p>0,05$) ($p=0,763$; $p>0,05$) ($p=0,958$; $p>0,05$) протеина у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, утврђено је нема статистички значајне разлике у експресији.

4.3.4. ПРОЦЕНА РАЗЛИЧИТИХ НАЧИНА ЕВАЛУАЦИЈЕ ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКОГ БОЈЕЊА

4.3.4.1. Процена различитих начина евалуације експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије

Анализом, односно поређењем (*Cohen*-ов *кафра* коефицијент) семиквантитативно и аутоматским бројањем процењеног/одређеног обима имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, добијени су резултати који су приказани у Табели 31.

Табела 31. Процена различитих начина евалуације имунохистохемијског бојења и експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома.

<i>Семиквантитативно</i>	МЦМ 2			УКУПНО
	<i>на супрот</i>	<10%	10-50%	
<i>Аутоматском бројању</i>				
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	11 (64,7%)	172 (86,9%)	69 (87,3%)	252 (85,7%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	6 (35,3%)	26 (13,1%)	10 (12,7%)	42 (14,3%)
Укупно	17 (100,0%)	198 (100,0%)	79 (100,0%)	294 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>значајно слагање</u> ($k=0,710$; $p<0,000$)				
	МЦМ 5			УКУПНО
	<10%	10-50%	>50%	
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	6 (35,3%)	57	171	234 (79,6%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	11 (64,7%)	21	28	60 (20,4%)
Укупно	17 (100,0%)	78 (100,0%)	199 (100,0%)	294 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>умерено слагање</u> ($k=0,575$; $p<0,000$)				
	МЦМ 7			УКУПНО
	<10%	10-50%	>50%	
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	153 (95,0%)	92 (70,2%)	2 (100,0%)	247 (84,0%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	8 (5,0%)	39 (29,8%)	0 (0,0%)	47 (16%)
Укупно	161 (100,0%)	131 (100,0%)	2 (100,0%)	294 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>значајно слагање</u> ($k=0,677$; $p<0,000$)				

4.3.4.2. Процена различитих начина евалуације експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије, а према хистопатолошким одликама тумора у односу на учесталост појаве рецидива

4.3.4.2.1. Тумори ниског ризика

Анализом, односно поређењем (*Cohen-ов каппа* коефицијент) семиквантитативно и аутоматским бројањем процењеног/одређеног обима имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, а према хистопатолошким одликама тумора ниског ризика (*low-risk*), добијени су резултати који су приказани у Табели 32.

Табела 32. Процена различитих начина евалуације имунохистохемијског бојења и експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, а у односу на хистопатолошке одлике тумора ниског ризика (*low-risk*).

<i>Семиквантитативно</i> <i>на супрот</i> <i>Аутоматском бројању</i>	МЦМ 2			УКУПНО
	<10%	10-50%	>50%	
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	7 (63,6%)	102 (85,7%)	51 (89,5%)	160 (85,6%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	4 (36,4%)	17 (14,3%)	6 (10,5%)	27 (14,4%)
Укупно	11 (100,0%)	119 (100,0%)	57 (100,0%)	187 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>значајно слагање</u> ($\kappa=0,720$; $p<0,000$)				
	МЦМ 5			УКУПНО
	<10%	10-50%	>50%	
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	4 (33,3%)	34 (77,3%)	118 (90,1%)	156 (83,4%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	8 (66,7%)	10 (22,7%)	13 (9,9%)	31 (16,6%)
Укупно	12 (100,0%)	44 (100,0%)	131 (100,0%)	187 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>значајно слагање</u> ($\kappa=0,638$; $p<0,000$)				
	МЦМ 7			УКУПНО
	<10%	10-50%	>50%	
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	90 (91,8%)	61 (70,1%)	2 (100,0%)	153 (81,8%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	8 (8,2%)	26 (29,9%)	0 (0,0%)	34 (18,2%)
Укупно	98 (100,0%)	87 (100,0%)	2 (100,0%)	187 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>значајно слагање</u> ($\kappa=0,643$; $p<0,000$)				

4.3.4.2.2. Тумори мешовитог ризика

Анализом, односно поређењем (*Cohen-ов кафра* коефицијент) семиквантитативно и аутоматским бројањем процењеног/одређеног обима имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, а према хистопатолошким одликама тумора мешовитог ризика (*mixed*), добијени су резултати који су приказани у Табели 33.

Табела 33. Процена различитих начина евалуације имунохистохемијског бојења и експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, а у односу на хистопатолошке одлике тумора мешовитог ризика (*mixed*).

<i>Семиквантитативно</i> <i>на супрот</i> <i>Аутоматском бројању</i>	МЦМ 2			УКУПНО
	<10%	10-50%	>50%	
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	4 (80,0%)	34 (87,2%)	13 (86,7%)	51 (86,4%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	1 (20,0%)	5 (12,8%)	2 (13,3%)	8 (13,6%)
Укупно	5 (100,0%)	39 (100,0%)	15 (100,0%)	59 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>значајно слагање</u> ($\kappa=0,720$; $p<0,000$)				
	МЦМ 5			УКУПНО
	<10%	10-50%	>50%	
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	1 (25,0%)	10 (66,7%)	33 (82,5%)	44 (74,6%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	3 (75,0%)	5 (33,3%)	7 (17,5%)	15 (25,4%)
Укупно	4 (100,0%)	15 (100,0%)	40 (100,0%)	59 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>умерено слагање</u> ($\kappa=0,472$; $p<0,000$)				
	МЦМ 7			УКУПНО
	<10%	10-50%	>50%	
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	37 (100,0%)	17 (77,3%)	/	54 (91,5%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	0 (0,0%)	5 (22,7%)	/	5 (8,5%)
Укупно	37 (100,0%)	22 (100,0%)	/	59 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>готово савршено слагање</u> ($\kappa=0,810$; $p<0,000$)				

4.3.4.2.2. Тумори високог ризика

Анализом, односно поређењем (*Cohen*-ов *kappa* коефицијент) семиквантитативно и аутоматским бројањем процењеног/одређеног обима имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, а према хистопатолошким одликама тумора ниског ризика (*high-risk*), добијени су резултати који су приказани у Табели 34.

Табела 34. Процена различитих начина евалуације имунохистохемијског бојења и експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, а у односу на хистопатолошке одлике тумора високог ризика (*high-risk*).

<i>Семиквантитативно</i> <i>на супрот</i> <i>Аутоматском бројању</i>	МЦМ 2			УКУПНО
	<10%	10-50%	>50%	
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	0 (0,0%)	36 (90,0%)	5 (71,4%)	41 (85,4%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	1 (100,0%)	4 (10,0%)	2 (28,6%)	7 (14,6%)
Укупно	1 (100,0%)	40 (100,0%)	7 (100,0%)	48 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>умерено слагање</u> ($k=0,523$; $p<0,000$)				
	МЦМ 5			УКУПНО
	<10%	10-50%	>50%	
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	1 (100,0%)	13 (68,4%)	20 (71,4%)	34 (70,8%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	0 (0,0%)	6 (31,6%)	8 (28,6%)	14 (29,2%)
Укупно	1 (100,0%)	19 (100,0%)	28 (100,0%)	48 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>умерено слагање</u> ($k=0,465$; $p<0,000$)				
	МЦМ 7			УКУПНО
	<10%	10-50%	>50%	
ПОКЛАПАЊЕ У БРОЈАЊУ	26 (100,0%)	14 (63,6%)	/	40 (83,3%)
РАЗЛИКА У БРОЈАЊУ	0 (0,0%)	8 (36,4%)	/	8 (16,7%)
Укупно	26 (100,0%)	22 (100,0%)	/	48 (100,0%)
<i>Карра</i> коефицијент: <u>значајно слагање</u> ($k=0,677$; $p<0,000$)				

4.4. РЕЗИМЕ РЕЗУЛТАТА РАДА У ОДНОСУ НА ИСПОЉЕНУ СТАТИСТИЧКИ ЗНАЧАЈНУ РАЗЛИКУ И ВИСОКО СТАТИСТИЧКИ ЗНАЧАЈНУ РАЗЛИКУ

4.4.1 ДИСТРИБУЦИЈА ИМУНОПОЗИТИВНОСТИ

4.4.1.1. Дистрибуција имунопозитивности и ризичне групе

ЦЕО УЗОРАК

високо статистички значајна разлика **МЦМ 7**

HIGH-RISK и *LOW-RISK*

статистички значајна разлика **МЦМ 2**

високо статистички значајна разлика **МЦМ 7**

HIGH-RISK и *MIXED*

LOW-RISK и *MIXED*

статистички значајна разлика **МЦМ 5**

4.4.1.2. Дистрибуција имунопозитивности и дубина инвазије

ЦЕО УЗОРАК

статистички значајна разлика **МЦМ 2**

4.4.1.3. Дистрибуција имунопозитивности и дубина туморске инвазије према ризичним групама

4.4.1.3.1. Тумори ниског ризика

4.4.1.3.2. Тумори мешовитог ризика

4.4.1.3.3. Тумори високог ризика

статистички значајна разлика **МЦМ 7**

4.4.1.4. Дистрибуција имунопозитивности и површина тумора

ЦЕО УЗОРАК

високо статистички значајна разлика **МЦМ 7**

4.4.1.5. Дистрибуција имунопозитивности и пречник тумора

4.4.2 ОБИМ ИМУНОПОЗИТИВНОСТИ

4.4.2.1. Обим имунопозитивности и ризичне групе

ЦЕО УЗОРАК

статистички значајна разлика **МЦМ 2,5 и 7**

HIGH-RISK и *LOW-RISK*

високо статистички значајна разлика **МЦМ 2**

статистички значајна разлика **МЦМ 5**

HIGH-RISK и *MIXED*

LOW-RISK и *MIXED*

статистички значајна разлика **МЦМ 2**

4.4.2.2. Обим имунопозитивности и дубина инвазије

ЦЕО УЗОРАК

високо статистички значајна разлика **МЦМ 2 и 7**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и МИШИЋНИ СЛОЈ

високо статистички значајна разлика **МЦМ 2 и 7**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

статистички значајна разлика **МЦМ 7**

МИШИЋНИ СЛОЈ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

високо статистички значајна разлика **МЦМ 2**

статистички значајна разлика **МЦМ 5**

4.4.2.3. Обим имунопозитивности и дубина туморске инвазије према ризичним групама

4.4.2.3.1. Тумори ниског ризика

ЦЕО УЗОРАК

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и МИШИЋНИ СЛОЈ

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

статистички значајна разлика **МЦМ 5**

МИШИЋНИ СЛОЈ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

4.4.2.3.2. Тумори мешовитог ризика

ЦЕО УЗОРАК

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и МИШИЋНИ СЛОЈ

статистички значајна разлика **МЦМ 7**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

статистички значајна разлика **МЦМ 5**

МИШИЋНИ СЛОЈ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

статистички значајна разлика **МЦМ 2**

4.4.2.3.3. Тумори високог ризика

ЦЕО УЗОРАК

високо статистички значајна разлика **МЦМ 2 и 5**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и МИШИЋНИ СЛОЈ

високо статистички значајна разлика **МЦМ 2 и 5**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

МИШИЋНИ СЛОЈ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

статистички значајна разлика **МЦМ 2 и 5**

4.4.2.4. Обим имунопозитивности и површина тумора

ЦЕО УЗОРАК

<10% и 10-50%

<10% и >50%

10-50% и >50%

4.4.2.5. Обим имунопозитивности и пречник тумора

ЦЕО УЗОРАК

<10 *mm* и 10-20 *mm*

<10 *mm* и >20 *mm*

10-20 *mm* и >20 *mm*

4.4.3. АУТОМАТСКО БРОЈАЊЕ

4.4.3.1. Аутоматско бројање и ризичне групе

ЦЕО УЗОРАК

статистички значајна разлика **МЦМ 5**

HIGH-RISK и *LOW-RISK*

високо статистички значајна разлика **МЦМ 5**

HIGH-RISK и *MIXED*

LOW-RISK и *MIXED*

4.4.3.2. Аутоматско бројање и дубина туморске инвазије

ЦЕО УЗОРАК

високо статистички значајна разлика **МЦМ 2**

статистички значајна разлика **МЦМ 5**

високо статистички значајна разлика **МЦМ 7**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и МИШИЋНИ СЛОЈ

високо статистички значајна разлика **МЦМ 2**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

МИШИЋНИ СЛОЈ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

високо статистички значајна разлика **МЦМ 2**

статистички значајна разлика **МЦМ 5 и 7**

4.4.3.3. Аутоматско бројање и дубина инвазије према ризичним групама

4.4.3.3.1. Тумори ниског ризика

ЦЕО УЗОРАК

статистички значајна разлика **МЦМ 2**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и МИШИЋНИ СЛОЈ

високо статистички значајна разлика **МЦМ 2**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

МИШИЋНИ СЛОЈ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

4.4.3.3.2. Тумори мешовитог ризика

ЦЕО УЗОРАК

високо статистички значајна разлика **МЦМ 7**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и МИШИЋНИ СЛОЈ

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

МИШИЋНИ СЛОЈ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

4.4.3.3.3. Тумори високог ризика

ЦЕО УЗОРАК

статистички значајна разлика **МЦМ 2**

високо статистички значајна разлика **МЦМ 5**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и МИШИЋНИ СЛОЈ

високо статистички значајна разлика **МЦМ 2 и 5**

РЕТИКУЛАРНИ ДЕРМ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

МИШИЋНИ СЛОЈ и ЦЕЛА ДЕБЉИНА КАПКА/ДУБЉЕ СТРУКТУРЕ

високо статистички значајна разлика **МЦМ 5**

4.4.3.4. Аутоматско бројање и површина тумора

ЦЕО УЗОРАК

слаба позитивна корелација МЦМ 5

4.4.3.5. Аутоматско бројање и највећи пречник тумора

ЦЕО УЗОРАК

<10 *mm* и 10-20 *mm*

<10 *mm* и >20 *mm*

10-20 *mm* и >20 *mm*

4.4.4. ПОРЕЂЕЊЕ НАЧИНА ЕВАЛУАЦИЈЕ ИХХ БОЈЕЊА

4.4.4.1. Семиквантитативно према аутоматском у целокупном узорку базоцелуларног карцинома

значајно слагање МЦМ 2 и 7

умерено слагање МЦМ 5

4.4.4.2. Семиквантитативно према аутоматском у односу на ризичне групе

4.4.4.2.1. Тумори ниског ризика

значајно слагање МЦМ 2, 5 и 7

4.4.4.2.2. Тумори мешовитог ризика

значајно слагање МЦМ 2

умерено слагање МЦМ 5

готово савршено слагање МЦМ 7

4.4.4.2.3. Тумори високог ризика

умерено слагање МЦМ 2 и 5

значајно слагање МЦМ 7

5. ДИСКУСИЈА

У овом раду испитивана је нуклеарна имунопозитивност протеина одржавања минихромозома 2, 5 и 7 у базоцелуларном карциному коже периокуларне регије. Истраживање овог типа, на узорку од 294 тумора периокуларне регије, са прогностичким параметрима који су анализирани као што су хистопатолошки подтип тумора, дубина туморске инвазије и димензије тумора (највећи измерени пречник и површина тумора), уз упоредну евалуацију испољавања наведених МЦМ молекула различитим методама и њиховим међусобним поређењем (дистрибуција позитивних ћелија, семиквантитативно одређивање обима имунопозитивности, аутоматско одређивање имуноекспресије индексом обележавања), до сада, у светској литератури, према нашим најбољим сазнањима, нису рађена. Резултати овог рада, стога, моћи ће једино да се пореде са радовима који су се бавили истраживањем и анализирањем експресије поменутих МЦМ протеина у другим типовима тумора (коже и висцералних органа).

Базоцелуларни карцином се очекивано најчешће јављао код пацијената у седмој деценији живота, у 65-66. години живота (Табела 1). Овакав налаз се поклапа са налазима из литературе, где се наводи да је врх инциденције за појаву овог карцинома између 50. и 80. године живота [15-20].

У нашем узорку, базоцелуларни карцином се нешто чешће јављао код особа женског пола (у 53,7%) у односу на особе мушког пола (Табела 1). У налазима литературе може да се пронађе податак да је тумор нешто чешћи код мушкараца [1-6,15-20,33].

У односу на локализацију тумора на кожи периокуларне регије (Табела 2), тумор се најчешће јављао на доњем капку (у 45,6% случајева), затим у унутрашњем углу ока (у 36,4% случајева), на горњем капку у 16% случајева, док је у 2% случајева забележен туморски продор у орбиту. Овакав налаз се поклапа са налазима из литературе [23-32]. У нашој серији, није било тумора са захватањем спољашњег угла ока, док се у литератури захватање ове анатомске локализације наводи у 5% случајева. Према резултатима ове дисертације, није било статистички значајне разлике у

поређењу локализације тумора у односу на пол пацијената (Табела 2), као ни у поређењу локализације тумора у односу на године живота пацијената у тренутку дијагнозе (Табела 3), што одговара налазима из литературе [23-32].

Најчешћи хистопатолошки подтип тумора у односу на ризик од појаве рецидива били су тумори ниског ризика, у 63,6% случајева, док је најмањи забележени број тумора у нашој серији био оних са високим ризиком, 16,3% (Табела 4). Овакав налаз у складу је са раније публикованим [1-6,15-20,23-32,45-56]. Што се тиче локализације тумора у односу на хистопатолошке ризичне групе базоцелуларног карцинома, учесталост јављања тумора ниског, мешовитог и високог ризика, пратила је у потпуности учесталост јављања тумора у односу на локализацију (Табела 5). Тумори ниског ризика су, наравно, били најучесталији, и то са опадајућом учесталошћу у односу на локализацију тумора, од најчешће до најређе. Исто важи и за остале две категорије тумора. Једино одступање је забележено код тумора који су захватили горњи капак, где су тумори високог ризика други по учесталости. Подаци из литературе који су се бавили овом проблематиком нису пронађени. Такође, као занимљивост, показано је да од 6 тумора који су имали продор у орбиту, нити један није био из групе високог ризика, а да је највише било оних ниског ризика, што вероватно може да се објасни тиме да чак и тумори ниског ризика, код дуготрајућих лезија, могу да направе продор у очну шупљину, што указује на потребу ране дијагностике и лечења и тумора ниског ризика.

Анализа резултата броја тумора у односу на највећи измерени пречник, класификованих према 8. издању ТНМ класификације (*UICC/AJCC*) [21], говори о томе да је у готово 50% случајева највећи измерени пречник тумора био 10-20 *mm* (Табела 8), што још једном потврђује запажање из свакодневне клиничке праксе да се значајан део пацијената јавља касно на лечење. Налази литературе поткрепљују податак из ове дисертације да је значајан број тумора у тренутку јављања пацијената на лечење већих димензија [2,3,13,31,32,92-95].

За разлику од већине других карцинома, базоцелуларни карцином коже одликује висок проценат пролиферативно активних туморских ћелија, односно имуноекспресија Ки-67 антигена 20-41% [148]. Овде би требало напоменути и чињеницу да неки од најагресивнијих малигних тумора, као рецимо мултиформни глиобластом, меланом или саркоми меких ткива, имају фракцију раста од око 25%,

27% и 18%, следствено [148]. Сагледавајући различите туморе кроз само њихов пролиферативни аспект, када је у питању базоцелуларни карцином можемо доћи до интересантног запажања да овај тумор има релативно висок проценат пролиферишућих ћелија али, насупротив томе, обично је спорорастући и са минималним метастатским потенцијалом.

Како је активност МЦМ 2-7 протеинског комплекса битна у репликацији ДНК ћелија у деоби, а престаје у ћелијама које су у стању мировања [119], манифестна пролиферација ћелија, како малигних, тако и ћелија са малигним потенцијалом, односно оних које су у фази малигне трансформације, показаше повећан ниво МЦМ 2-7 протеина, што се може и доказати већим обимом имуноекспресије ових протеина [117,218].

Анализом резултата овог рада уочава се да је дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома била најчешће **дифузна**, за МЦМ 2 протеин у 72%, за МЦМ 5 у 80,6% а за МЦМ 7 протеин у 65,6% случајева (Табела 9). Овакав налаз указује да је тумор у свим својим деловима митотски/пролиферативно активан, а не како би можда могло да се очекује да је митотски индекс највиши у периферним деловима тумора који се одликују палисадирањем ћелија, основној морфологији овог карцинома која је присутна и у највећем броју његових хистопатолошких подтипова. У односу на податке из литературе који су се бавили експресијом МЦМ протеина у базоцелуларном карциному коже, налаз ове дисертације се делом поклапа док је делом у супротности - у 11 случајева базоцелуларног карцинома испитиваних на експресију МЦМ 5 протеина [216], дистрибуција имунопозитивности је била периферна (иако се не наводи тачан број тумора), као и у другом раду [217], где је дистрибуција имунопозитивности МЦМ 2 протеина такође била периферна у свих 15 случајева базоцелуларног карцинома са фоликуларном диференцијацијом, док је у трећем раду [148], у 20 случајева базоцелуларног карцинома који су испитивани на експресију МЦМ 2 протеина, имунопозитивност била присутна у 80% (16 од 20) и била је дифузног карактера у свим позитивним узорцима.

Дифузна дистрибуција имунопозитивности, као преобладајући облик (62,5-84,9%) имуноекспресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, може се рећи да је очекивано присутна и у **готово свим**

хистопатолошким подтипovima тумора у односу на ризик од појаве рецидива. Једино забележено одступање је у имуноекспресији МЦМ 7 протеина у туморима високог ризика, где је у 54,3% присутна периферна дистрибуција. (Табела 10)

МЦМ 2 протеин је статистички значајно више експримован у туморима високог ризика него у туморима ниског ризика, а МЦМ 7 протеин је у истој категорији високо статистички значајно више експримован. Овакав налаз указује да је МЦМ 2, а посебно МЦМ 7 протеин добро додатно дијагностичко оруђе за диференцирање тумора високог ризика у односу на оне ниског ризика.

МЦМ 5 протеин је статистички значајно више експримован у туморима ниског ризика него у туморима мешовитог ризика. Овакав налаз указује да се имунопозитивност МЦМ 5 протеина губи како тумор постаје агресивнији, и да би МЦМ 5 могао да буде маркер хистопатолошки повољније категорије тумора.

За дистрибуцију МЦМ 7 протеина, у целом узорку, утврђена је високо статистички значајна разлика између група.

С обзиром на то да нема других радова о експресији МЦМ протеина у базоцелуларном карциному коже са којима би било могуће поредити резултате добијене у овој дисертацији, у даљем тексту биће изнети подаци везано за друге туморе, како коже тако и других органа другачије хистолошке грађе, из радова који су се бавили овом проблематиком.

ДИСТРИБУЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ МЦМ ПРОТЕИНА испитивана је у сквамозелуларном карциному (*SCC*) различитих локализација односно ткива, туморима бубрега, карциномима дојке и штитасте жлезде, малигним туморима билијарног и панкреатичног ткива, и туморима простате.

Дифузна експресија МЦМ протеина била је присутна у *SCC* коже перианалне регије [205], без осврта на степен диферентованости овог карцинома. У овом раду испитивана је експресија МЦМ 5 протеина. Исти тип имуноекспресије, али МЦМ 2 протеина, показан је и код 38 *SCC* усне дупље (5 почетно инвазивних, 22 добро диферентована, 10 умерено диферентованих и 1 слабо диферентован) [164], и то код умерено и слабо диферентованих тумора. Резултати других истраживача [165,166], на истом типу тумора (*SCC* оралне мукозе), показали су дифузну експресију МЦМ 2

позитивних ћелија само код слабо диферентованих *SCC*. Исте резултате добили су и аутори [158] који су испитивали експресију МЦМ 2 протеина код 93 *SCC* езофагуса у односу на градус тумора.

Детерминација обима експресије МЦМ 2 и 5 протеина у малигном билијарном и панкреатичном ткиву (карцином панкреаса, ампуларни и холангиокарцином) [171], показала је дифузну дистрибуцију, без поређења обима експресије у односу на диферентованост тумора.

Утврђивање обима експресије МЦМ 2 протеина у 92 случаја карцинома простате [209], показала је такође дифузну дистрибуцију, без статистички значајне разлике у односу на Глисонов скор.

Периферна експресија имунопозитивности МЦМ протеина забележена је у 21 случају сквамозелуларног карцинома различитих локализација и ткива (кожа лица, ноге и стопала, језик, вулва), и то у 66,7% случајева [148]. У овом раду испитивана је експресија МЦМ 2 протеина. Исти тип имуноекспресије, истог МЦМ протеина, показан је и код 38 *SCC* усне дупље (5 почетно/површно инвазивних, 22 добро диферентована, 10 умерено диферентованих и 1 слабо диферентован) [164], и то код добро диферентованих и почетно/површно инвазивних тумора. Резултати других истраживача [165,166], на истом типу тумора (*SCC* оралне мукозе), показали су периферну експресију МЦМ 2 позитивних ћелија у добро и средње диферентованим *SCC*. Исте резултате добили су и аутори [158] који су испитивали експресију МЦМ 2 протеина код 93 *SCC* езофагуса у односу на градус тумора. У 113 случајева *SCC* усне дупље [163], дистрибуција МЦМ 7 протеина била је периферна у највећем броју случајева, и то код добро и умерено диферентованих тумора. Експресија МЦМ 2 протеина у односу на клиничко-патолошке параметре *SCC* усне дупље [165,166], показала је преобладајућу периферну локализацију, док је у 63 случаја *SCC* језика [162], без анализе у односу на степен диферентованости овог тумора, дистрибуција имунопозитивности МЦМ 2 протеина такође у највећем броју случајева била периферна.

У 56 случајева тумора бубрега [189] (36 светлоћелијских карцинома, 7 папиларних/хромофилних карцинома, 5 онкоцитома и 8 карцинома транзиционих ћелија), експресија МЦМ 2 протеина била је такође преобладајућу периферна, без

статистички значајне разлике у односу на градус тумора одређиван према *Fuhrman*-у и *WHO* класификационом систему.

У 70 случајева примарног карцинома дојке [197] (56 инвазивних дукталних карцинома, 4 дуктална карцинома *in situ*, 2 инвазивна лобуларна карцинома, 4 недуктална карцинома и 4 карцинома мешовитог дукталног/лобуларног хистопатолошког подтипа), експресија МЦМ 2 протеина најчешће је била периферне дистрибуције, без поређења обима експресије у односу на диферентованост тумора.

У 22 случаја минимално инвазивог фоликуларног карцинома штитасте жлезде [172] (6 тумора са васкуларном инвазијом и инвазијом капсуле, 7 тумора само са васкуларном инвазијом и 9 тумора само са инвазијом капсуле), експресија МЦМ 2 протеина најчешће је била периферне дистрибуције. У овом раду, као контролна група послужио је фоликуларни аденом штитасте жлезде у коме је дистрибуција имунопозитивности, међутим, претежно била дифузна.

Централна експресија имунопозитивности МЦМ протеина, и то дистрибуција МЦМ 2 протеина, показана је у одређеним случајевима *SCC* језика [162], али без анализе у односу на степен диферентованости овог тумора.

Неспецифична (без посебне/специфичне преобладајуће локализације) експресија имунопозитивности МЦМ протеина, и то дистрибуција МЦМ 7 протеина, показана је у 20 случајева слабо диферентованог *SCC* усне дупље [163].

Периферна и дифузна дистрибуција имунопозитивности МЦМ 2, 5 и 7 протеина биле су заступљене у сличном или готово подједнаком броју случајева у кератиноцитним туморима коже [150], као и у меланоцитним лезијама [146], где није установљено постојање разлике између бенигнух и диспластичких невуса, и меланома.

У сажетку, може да се закључи следеће: у кератиноцитним и меланоцитним лезијама коже, дифузна и периферна дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина биле су подједнако заступљене. Дифузна дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина претежно је била изражена код умерено/средње и слабо диферентованих *SCC* мукозе различитих локализација, а периферна код почетно/површно инвазивних и добро диферентованих. Код других наведених

тумора није вршено поређење обима експресије и степена диферентованости тумора. За разлику, дифузна дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина била је присутна у готово свим хистопатолошким подтипovima базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије, уз једино одступање код МЦМ 7 протеина (видети раније). Ово би могло да значи да базоцелуларни карцином нема пролиферативни „фронт”, већ да све ћелије имају подједнаку способност пролиферације.

Дифузна дистрибуција имунопозитивности била је преобладајући облик (64,2-88,9%) имуноекспресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, и у односу на дубину туморске инвазије. Код МЦМ 2 протеина забележена је статистички значајна разлика у дистрибуцији у односу на дубину инвазије, односно како тумор захвата дубље структуре капка, тако се и дифузна имуноекспресија овог протеина повећава, чиме овај маркер ћелијске пролиферације додатно добија на значају као потенцијално средство у препознавању тумора који показују склоност ка агресивнијем, инфилтративнијем расту. (Табела 11)

Код МЦМ 5 и 7 протеина није било статистички значајне разлике у дистрибуцији у односу на дубину инвазије.

У литератури, за сада, нема публикованих радова у којима је процењивана дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на дебљину базоцелуларног карцинома са којима би било могуће компарирати резултате добијене у овој дисертацији, тако да ће у даљем тексту биће изнети подаци везано за друге туморе, како коже тако и других органа другачије хистолошке грађе, из радова који су се бавили овом проблематиком.

Поређење дистрибуције имунопозитивности МЦМ 2, 5 и 7 протеина у односу на дубину туморске инвазије односно дебљину тумора испитивано је у сквамозелуларном карциному коже и суперфицијално ширећем меланому коже.

У раду Стојковић Филиповић и сарадника [150] процењивана је дистрибуција имунопозитивности МЦМ 2 протеина у односу на дебљину *SCC* коже, где је уочено да је код тумора дебљине ≤ 2 *mm*, дистрибуција била периферна (у 65%), док су код

дебљих тумора периферна и дифузна дистрибуција била готово подједнако заступљене. Међутим, када је за дебљину тумора узимана вредност 4 и 6 *mm*, тумори дебљине до 4 *mm* имали су периферну дистрибуцију, а они дебљине 6 *mm* дифузну, и то је била статистички значајна разлика. У истом раду, процењивана је дистрибуција имунопозитивности МЦМ 5 протеина у односу на дебљину *SCC* коже, где је уочено да је код тумора дебљине ≤ 2 *mm*, дистрибуција била периферна (у 65%), док су код дебљих тумора периферна и дифузна дистрибуција била готово подједнако заступљене, а статистичком обрадом није уочена разлика у експресији МЦМ 5 протеина између овако подељењих тумора. Међутим, када је за дебљину тумора узимана вредност 4 и 6 *mm*, тумори дебљине до 4 *mm* имали су периферну дистрибуцију (у 65,9%), а они дебљине > 6 *mm* дифузну (у 68,2%), и то је била статистички значајна разлика. Такође од истих аутора, процењивана је дистрибуција имунопозитивности МЦМ 7 протеина у односу на дебљину *SCC* коже, где је уочено да је код тумора дебљине ≤ 2 *mm*, дистрибуција била периферна (у 65%), док су код дебљих тумора периферна и дифузна дистрибуција била готово подједнако заступљене (50,6% према 49,4%), а статистичком обрадом није уочена разлика у експресији МЦМ 7 протеина између овако подељењих тумора. Међутим, када је за дебљину тумора узимана вредност 4 и 6 *mm*, тумори дебљине до 4 *mm* имали су периферну дистрибуцију (у 67,1%), а они дебљине > 6 *mm* дифузну (у 68,2%), и то је била статистички значајна разлика. Аутори стога закључују да дифузна дистрибуција МЦМ протеина 2, 5 и 7 корелира са већом дебљином тумора, што је свакако параметар њихове веће агресивности – *SCC* преко 6 *mm* имају значајан проценат појаве метастатског ширења.

Код 58 суперфицијално ширећих меланома коже [146], експресија МЦМ 7 протеина у односу на *Breslow*-љеву дебљину лезија, показала је статистички значајну разлику у експресији како у односу на *Breslow*-љеву дебљину тако и у односу на *Clark*-ов ниво дубине инвазије, у смислу да дебљи меланоми имају повећану и дифузну експресију.

У сажетку, дифузна дистрибуција имунопозитивности је била повезана с већом дубином туморске инвазије само за МЦМ 2 протеине код базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије, док је у другим туморима (сквамозелуларни карцином коже и суперфицијално ширећи меланом коже), где је вршена иста

анализа, и дифузна дистрибуција имунопозитивности корелирала са већом дебелином тумора и за МЦМ 5 и МЦМ 7.

Није утврђена статистички значајна разлика у типу **дистрибуције имунопозитивности** за МЦМ 2 и 5 протеине у односу на површину тумора, док је МЦМ 7 протеин значајно чешће дифузно експримиран, у овој категорији, што говори да што је већа површина тумора то је и већа дифузна експресија МЦМ 7 протеина. (Табела 15)

Будући да не постоји ниједна студија која је анализирала експресију имунопозитивности МЦМ 2, 5 и 7 протеина у односу на површину базоцелуларног карцинома коже уопште па и коже периокуларне регије, чини се неопходним наставити даља испитивања са циљем утврђивања значаја овог односа за понашање овог тумора на различитим локализацијама.

Поређење дистрибуције имунопозитивности МЦМ 2, 5 и 7 протеина у односу на површину тумора, потенцијалном параметру агресивности тумора, још је једино испитивано у сквамозелуларном карциному коже [150], где је процењивана дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7, и уочено да тумори веће површине имају доминантно дифузну, а тумори мање површине доминантно периферну дистрибуцију МЦМ 2, 5 и 7 имунопозитивности.

Димензије тумора, односно његов највећи измерени пречник, у корелацији су са степеном туморске агресивности као и инвазивним потенцијалом, и представљају елемент за одређивање стадијума тумора [21,22]. Из тих разлога упоређивана је **дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на највећи измерени пречник** базоцелуларног карцинома.

Дифузна дистрибуција имунопозитивности доминира (59,0-81,9%) и у свим категоријама пречника тумора, код сва три МЦМ протеина, али без статистички значајне разлике између група. (Табела 16)

Будући да не постоји ниједна студија која је анализирала експресију имунопозитивности МЦМ 2, 5 и 7 протеина у односу на највећи измерени пречник базоцелуларног карцинома коже, чини се неопходним наставити даља испитивања са циљем утврђивања значаја овог односа за понашање овог тумора на различитим локализацијама.

Поређење дистрибуције имунопозитивности МЦМ 2, 5 и 7 протеина у односу на пречник тумора једино је испитивано у сквамoцелуларном карциному коже.

У раду Стојковић Филиповић и сарадника [150] процењивана је дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на димензије/пречник *SCC* коже, где је уочено, код тумора пречника до и више од 20 *mm*, да су периферна и дифузна дистрибуција биле готово подједнако заступљене, без статистички значајне разлике, што је навело истраживаче на закључак да дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина не корелира са овом граничном димензијом тумора (која се користи при дефинисању стадијума).

СЕМИКВАНТИТАТИВНО, и то код свих хистопатолошких подтипова базоцелуларног карцинома, експресија МЦМ 2 протеина је у далеко највећем броју случајева испољена у категорији 10-50%, МЦМ 5 протеина у категорији >50%, док је за МЦМ 7 протеин то у категорији <10% (Табела 17). Ово је можда и најзначајнији налаз, с обзиром на то да постоји веома јасна дистинцкија (статистички значајна разлика) у обиму експресије између различитих МЦМ протеина, а која се притом не мења, односно, високо је конзистентна и у односу на хистопатолошки подтип тумора. Овакав налаз могао би да допринесе још бољем разумевању канцерогенезе базоцелуларног карцинома, кроз призму МЦМ протеина и њихових појединачних улога у ћелијском циклусу. Такође, за МЦМ 2 и 7 протеин, у наведеним опсезима највише (по броју случајева) испољеног обима имунопозитивности одређеног семиквантитативно, проценат случајева расте како се повећава агресивност тумора (у виду дубине инвазије), док за МЦМ 5 протеин опада, из чега може да се закључи да МЦМ 2 и 7 протеини могу да буду добри параметри веће, а МЦМ 5 протеин параметар мање агресивности тумора.

Семиквантитивна анализа експресије имунопозитивности МЦМ протеина испитивана је у сквамозелуларном карциному коже, карциномима цервикса, менингиому, анапластичком карциному штитасте жлезде, неситноћелијском карциному плућа, аденокарциному плућа и колоректалном канцеру.

Семиквантитативно одређена дистрибуција имунопозитивности МЦМ 2, 5 и 7 протеина у *SCC* коже [150] (мање и више од 50% МЦМ позитивних ћелија), показала је да је нешто већи број *SCC* (у 53,4; 58,0 и 51,1%) имао више од 50% позитивних ћелија, у односу на оне који су имали мање од 50% позитивних ћелија. У истом раду, када је семиквантитативно одређена експресија била подељена у категорије <33%, 33-66% и >66%, највећи број случајева (42,5%) *SCC* имао је између 33-66% позитивних ћелија на МЦМ 2 и 5 протеине, а број случајева са мање од 1/3 (25,3%) и више од 2/3 (32,2%) позитивних ћелија није био драстично различит, док је имуноекспресија МЦМ 7 протеина, у истим условима, статистички високо значајно расла са опадањем градуса/диференцијације *SCC*, односно, добро диферентовани тумори (мањег малигног потенцијала) су имали најмањи проценат позитивних ћелија, а слабо диферентовани (већег малигног потенцијала) највећи.

У 20 случајева примарног карцинома цервикса (10 *SCC* и 10 аденокарцинома) [181], експресија МЦМ 5 протеина (скоринг систем 0-3: 0%, базални слој ћелија, <10%, >10%-<50% и >50%) била је виша у свим случајевима карцинома и свим градусима дисплазије у поређењу са нормалном контролом, као и у свим случајевима који су били повезани са *HPV* инфекцијом.

У 28 менингеома (*WHO* градус I 14 случајева, *WHO* градус II 7 случајева и *WHO* градус III 7 случајева) [192], МЦМ 2-7 протеински комплекс је статистички значајно више експримован него у контролном нормалном (арахноидалном) ткиву – МЦМ 2 протеин 8x више, МЦМ 5 4x, и МЦМ 7 5x више (МЦМ 3 5x, МЦМ4 4x, МЦМ 6 3x), али не постоји статистички значајна разлика у експресији ових протеина у међугрупном поређењу (између менингеома различитог градуса).

У 52 случаја анапластичког карцинома штитасте жлезде [173], експресија МЦМ 5 и 7 протеина била је [за МЦМ 5 протеин 65% случајева имало је >10% позитивних ћелија (у просеку 25% позитивних ћелија), а за МЦМ 7 протеин 73% случајева имало је >10% позитивних ћелија (у просеку 30% позитивних ћелија)],

статистички високо значајно виша у поређењу са нормалним ткивом или ткивом папиларног карцинома штитасте жлезде (0% позитивних случајева), што је навело ауторе на закључак како је експресија МЦМ протеина у високој корелацији са степеном диферентованости ћелија, односно степеном малигнитета, с обзиром на то да је анапластички карцином штитасте жлезде високо малиган канцер одговоран за више од половине смртних исхода пацијената са карциномом тироидеје.

У 221 неситноћелијском карциному плућа [153], експресија МЦМ 2 протеина мања од 25% (број позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија сврстан је у четири групе: 0-24%, 25-49%, 50-74%, и $\geq 75\%$) била је повезана са бољим преживљавањем него у осталим групама. Слично томе, у 331 неситноћелијском карциному плућа [151], експресија МЦМ 7 протеина (ткивни микрониз, семиквантитативно; консензус три истраживача, негативан резултат – нема позитивних ћелија, позитиван резултат $>30\%$ позитивних нуклеуса ћелија) је забележена у 191 случају (у 57,7%) и била удружена са лошом прогнозом. Такође, у 145 аденокарцинома плућа (122 не-бронхиоалвеоларна и 22 бронхиоалвеоларна) [155], експресија МЦМ 2 протеина била је у сигнификантној корелацији са полом пацијената, хистолошким подтипом тумора, степеном диферентованости и патолошким стадијумом болести, и била удружена са лошијом прогнозом код пацијената са не-бронхиоалвеоларним подтипом тумора.

У 55 случајева колоректалног канцера [201], експресија МЦМ 2 протеина (семиквантитативно; негативан налаз је тумачен као одсуство имунопозитивности или ако је $<50\%$ ћелија било позитивно, а позитиван као нуклеарно бојење у $>50\%$ ћелија) била је у корелацији са појавом метастаза у регионалним лимфним чворовима, али не и са хистолошким типом тумора.

У сажетку, код других тумора, у односу на базопелуларни карцином коже, не уочава се тако јасна дистинкција у испољавању експресије имунопозитивности између појединих МЦМ протеина. Исто тако, у зависности од типа тумора, разликује се и експресија сваког појединог МЦМ протеина у односу на степен агресивности тумора, што наводи на закључак да улогу ових протеина у канцерогенези треба посматрати за сваки канцер понаособ, а не уопштено, али се и сасвим јасно може потврдити закључак литературе да су МЦМ протеини далеко више експримовани у малижном него у нормалном или ткиву бенигну тумора.

У међугрупном поређењу, МЦМ 2 протеин је високо статистички значајно више експримован у туморима високог ризика него у туморима ниског ризика. Овакав налаз за МЦМ 2 протеин на неки начин потврђује и претходни (код дистрибуције имунопозитивности), и указује да је МЦМ 2 протеин заиста добро додатно дијагностичко оруђе за диференцирање тумора високог ризика у односу на оне ниског ризика (Табела 17). МЦМ 5 протеин је према резултатима ове дисертације статистички значајно више експримован у туморима високог ризика него у туморима ниског ризика, док за МЦМ 7 протеин нема статистички значајне разлике у семиквантитативној експресији између група.

Поређење семиквантитативне дистрибуције имунопозитивности МЦМ 2, 5 и 7 протеина у односу на **диферентованост/градус тумора** испитивано је у сквамозелуларном карциному (*SCC*) различитих локализација односно ткива, карциномима једњака, аденокарциному плућа, карциному бубрега, колоректалном канцеру, карциномима дојке, карциному ендометријума, малигним епителним туморима јајника, карциному бешике са инвазијом мишића детрусора, карциному простате и туморима пљувачне жлезде.

У раду наших аутора [150] процењивана је експресија МЦМ 2, 5 и 7 протеина у односу на градус *SCC* коже, где је, и у случају семиквантитативног одређивања позитивних ћелија према половинама (<50% и >50%) и у случају семиквантитативног одређивања позитивних ћелија према трећинама (<33%, 33-66% и >66%), имуноекспресија МЦМ 2, 5 и 7 протеина статистички високо значајно расла са опадањем градуса/диференцијације *SCC*, односно, добро диферентовани тумори (мањег малигног потенцијала) су имали најмањи проценат позитивних ћелија, а слабо диферентивани (већег малигног потенцијала) највећи. Такође, у 93 случаја *SCC* једњака [158], експресија МЦМ 2 протеина била је статистички значајно повезана са хистолошким градусом тумора - већа експресија виши градус.

У 8 случајева карцинома једњака [159] (4 аденокарцинома и 4 *SCC*), експресија МЦМ 2 и 5 протеина била је повећана у деловима тумора који су били слабије диферентовани.

У 145 аденокарцинома плућа (122 не-бронхиоалвеоларна и 22 бронхиоалвеоларна) [155], експресија МЦМ 2 протеина била је у сигнификантној корелацији са степеном диферентованости тумора.

У 176 случајева радикалне нефректомије због карцинома бубрега [188], експресија МЦМ 2 протеина била је у снажној корелацији са градусом тумора.

У 202 случаја колоректалног канцера *Dukes*-овог Б и Ц стадијума [202], експресија експресија МЦМ 2 протеина била је у корелацији са хистолошком диференцијацијом тумора.

У 56 случаја дукталног карцинома дојке [196], експресија МЦМ 2 протеина била је најизраженија у случајевима тумора градуса Г3, са статистичком значајношћу у односу на туморе градуса Г1 и Г2, као и у 74 случаја примарног инвазивног карцинома дојке [197], где је експресија МЦМ 2 протеина била је са статистичком значајношћу виша у туморима вишег градуса, исто као и у 70 случајева примарног карцинома дојке (56 инвазивних дукталних карцинома, 4 дуктална карцинома *in situ*, 2 инвазивна лобуларна карцинома, 4 недуктална карцинома и 4 карцинома мешовитог дукталног/лобуларног хистопатолошког подтипа) [197], где је експресија МЦМ 2 протеина била са позитивном корелацијом у односу на хистолошки градус тумора [најизраженија код лоше диферентованих (градуc 3), а најмање код добро диферентованих тумора (градуc 1)], или у 56 случајева примарног карцинома дојке [199], где је експресија МЦМ 2 протеина са позитивном корелацијом у односу на хистолошки градус што је ауторе навело на закључак да имуноекспресија МЦМ 2 протеина може да буде од користи као маркер пролиферације код карцинома дојке.

У 212 случајева карцинома ендометријума [186], експресија МЦМ 7 протеина показала је значајну повезаност са хистолошким градусом тумора и старошћу пацијента (добро диферентовани тумори и млађи пацијенти имали су нижи проценат имуноекспресије), што је навело ауторе на закључак да је експресија МЦМ 7 протеина поуздан и користан маркер пролиферације као и прогностички фактор.

У 128 случајева небенигних епителних тумора јајника (43 тумора ниског малигног потенцијала и 85 аденокарцинома) [194], експресија МЦМ 2 и 5 протеина кореспондирала је са вишим градусом, и била у јакој позитивној корелацији са експресијом Ки-67 и *p53*.

У 66 случајева карцинома бешике са инвазијом мишића детрусора [203], експресија МЦМ 2 и 5 протеина показала је значајну позитивну корелацију са градусом и одмаклим стадијумом тумора (већа код агресивнијих тумора у одмаклом стадијуму), и била у корелацији са Ки-67 и p53 имуноекспресијом, што је ауторе навело на закључак како је имунопозитивност на ова два протеина поуздан индекс пролиферације и користан прогностички маркер код пацијената са овим типом карцинома бешике.

У 320 случајева карцинома простате [207], експресија МЦМ 7 протеина (имуноекспресија је градирана семиквантитативно у виду скорa од 0-4 у односу на проценат позитивних ћелија у узорку: 0%, <20%, 20-50%, 50-80% и >80%) била је значајно већа код слабо диферентованих (*Gleason*-ов скор ≥ 8) тумора (43,5% узорака ових тумора имало је повећану експресију), у односу на добро диферентоване туморе (са мањим *Gleason*-овим скором; 30% узорака ових тумора имало је повећану експресију), као и значајно удружена са локалном туморском инвазијом. Насупрот томе, у 92 случаја карцинома простате [209], експресија МЦМ 2 протеина није била удружена са било којим клиничко-патолошким параметрима, укључујући и степен туморске диференцијације.

Исто тако, у 62 случаја тумора плувачне жлезде (13 аденоидно цистичних карцинома, 10 карцинома из плеоморфног аденома, 10 мукоепидермоидних карцинома, 10 полиморфних *low-grade* аденокарцинома, 10 плеоморфних аденома и 9 карцинома ацинарних ћелија) [170], експресија МЦМ 2 протеина била је без позитивне корелације у односу градус тумора, као и у 66 случајева аденокарцинома желуца [174], где није била удружена нити са једним од клиничко-патолошких параметара, укључујући и степен туморске диференцијације.

У сажетку, у односу на хистопатолошки подтип односно степен диферентованости малигне неоплазме као мерилу агресивности канцера, налази ове дисертације се мање-више поклапају са налазима других аутора у другим туморима, који говоре да се експресија МЦМ протеина повећава како расте агресивност тумора.

Поређењем семиквантитативног обима експресије МЦМ протеина у базоцелуларном карциному коже у односу на **дубину инвазије**, највећи број

случајева је забележен код продора у ретикуларни дерм, да би затим значајно опао код тумора са продором у мишићни слој, а онда опет порастао код тумора са најдубљим продором. Нађена је високо статистички значајна разлика између семиквантитативно одређене експресије МЦМ 2 и МЦМ 7 протеина у односу на дубину туморске инвазије, док у истој категорији нема статистички значајне разлике у експресији МЦМ 5 протеина. (Табела 18)

У међугрупном поређењу, МЦМ 2 протеин је високо статистички значајно више експримован у туморима са продором у ретикуларни дерм него у туморима са продором у мишићни слој, као и у туморима са инвазијом у мишићни слој у односу на оне који захватају целу дебљину капка/поткожно/масно ткиво, док нема статистички значајне разлике у семиквантитативној експресији овог протеина у туморима са продором у ретикуларни дерм у односу на оне који захватају целу дебљину капка/поткожно/масно ткиво. (Табела 18)

У међугрупном поређењу, МЦМ 5 протеин је статистички значајно више експримован у туморима са продором у мишићни слој у односу на оне који захватају целу дебљину капка/поткожно/масно ткиво, али нема статистички значајне разлике између осталих група. (Табела 18)

У међугрупном поређењу, МЦМ 7 протеин је високо статистички значајно више експримован у туморима са продором у ретикуларни дерм него у туморима са продором у мишићни слој, а статистички значајно више експримован у туморима са продором у ретикуларни дерм у односу на оне који захватају целу дебљину капка/поткожно/масно ткиво, док нема статистички значајне разлике у семиквантитативној експресији овог протеина у туморима са продором у мишићни слој у односу на оне који захватају целу дебљину капка/поткожно/масно ткиво. То говори да како тумор продире у дубље структуре, експресија овог протеина опада. (Табела 18)

У литератури нису пронађени подаци који су испитивали обим експресије имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на дубину туморске инвазије, како за базоцелуларни карцином коже тако и за било који други тумор.

У односу на **површину тумора**, не постоји статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ протеина 2, 5 и 7 како у целом узорку тако и у међугрупном поређењу. (Табела 22)

У литератури нису пронађени подаци који су испитивали обим експресије имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на површину тумора, како за базоцелуларни карцином коже тако и за било који други тумор.

Семиквантитативно, и то у свим категоријама **највећег измереног пречника** базоцелуларног карцинома, експресија МЦМ 2 протеина је далеко највише испољена у категорији 10-50%, МЦМ 5 протеина у категорији >50%, док је за МЦМ 7 протеин у категорији <10%, и то са веома израженом процентуалном конзистентношћу која се креће у веома малом распону, од 64,0-64,7% случајева у укупном збиру или, појединачно према категоријама пречника, од 60,4-66,9% случајева, што значи да готово 2/3 анализираних тумора из наше серије има веома уједначену семиквантитативну експресивност сва три МЦМ протеина, сваког у свом јасно дефинисаном семиквантитативном опсегу. (Табела 23)

У односу на пречник тумора, не постоји статистички значајна разлика у семиквантитативној експресији МЦМ протеина 2, 5 и 7 како у целом узорку тако и у међугрупном поређењу. (Табела 23)

Поређење семиквантитативне дистрибуције имунопозитивности МЦМ 2, 5 и 7 протеина у односу на пречник тумора испитивано је још у *ССС* коже, малигну ткиву дојке, колоректалном карциному, аденокарциному надбубрежне жлезде, карциному желуца, туморима плувачних жлезда, карциному бубрега и аденокарциному плућа.

У раду наших аутора [150] процењивана је дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на димензије/пречник *ССС* коже, где је уочено, код тумора пречника до и више од 20 *mm*, да су периферна и дифузна дистрибуција биле готово подједнако заступљене, без статистички значајне разлике, што је навело истраживаче на закључак да дистрибуција имунопозитивности МЦМ протеина не

корелира са овом граничном димензијом тумора (која се користи при дефинисању стадијума).

У малигном ткиву дојке [198], у односу на величину тумора (<2 *cm*, >2 *cm* и >5 *cm*), није утврђена корелација у експресији МЦМ 2 протеина и величине тумора, што је показано и у другом раду код 120 инвазивних карцинома дојке [139], где су тумори подељени на <11 *mm*, 11-20 *mm*, 21-30 *mm*, 31-40 *mm* и >40 *mm*.

Сличан налаз су показале и студије 96 колоректална карцинома [140], 48 аденокарцинома надбубрежне жлезде [215], 103 карцинома желуца стадијума III (60 интестиналног типа и 43 дифузног типа) [177], 56 карцинома бубрега [189] и 62 тумора плувачних жлезда [170], у којима такође није утврђена статистички значајна разлика у имуноекспресији МЦМ 2 протеина у односу на величину тумора, што наводи на закључак да пролиферативна активност одређена преко експресије МЦМ протеина не показује јасну повезаност са димензијама ових тумора.

Насупрот томе, други аутори показују у својим резултатима статистички значајну разлику у имуноекспресији МЦМ 2 протеина у односу на величину тумора. Наиме, код 170 случајева карцинома бубрега [188] (тумори су према димензијама били подељени на 15-45 *mm*, 50-65 *mm*, 70-90 *mm* и 95-150 *mm*), утврђено је повећање експресије МЦМ 2 протеина са повећањем величине тумора, као и у туморима дојке [199] који су били подељени на <1,1 *cm*, 1,1-2,0 *cm*, 2,1-3,0 *cm*, 3,1-4,0 *cm* и >4 *cm*.

Код аденокарцинома плућа [154], који су према величини били подељени на две групе, <2 *cm* и >2 *cm*, експресија МЦМ 7 протеина била је у корелацији са величином тумора, односно већи тумори су имали већу експресију истог.

У сажетку, у базоцелуларном карциному коже, као и у већини других тумора у којима је испитивана корелација семиквантитативно одређене експресије МЦМ протеина у односу на пречник/величину тумора, није утврђена корелација односно статистички значајна разлика у имуноекспресији истих у односу на величину тумора, што наводи на закључак да пролиферативна активност одређена преко експресије МЦМ протеина не показује јасну повезаност са димензијама ових тумора. Ипак, требало би нагласити и следеће – радови који су се бавили испитивањем експресије МЦМ протеина у малигнитетима одређеног органа (посебно бубрег [189; 188] и дојка [139,198; 199]), без посебног испитивања за сваки појединачан тумор из групе тумора

који су анализирани, могу да покажу и сасвим опречне резултате, што указује на неопходност испитивања експресије МЦМ протеина како за сваки тумор понаособ, уз следствено међутуморско поређење, тако и за сваки МЦМ протеин посебно, а све са циљем добијања валидних резултата.

Према резултатима ове дисертације, највећи забележени **ПРОЦЕНАТ ПОЗИТИВНИХ ЋЕЛИЈА У ТУМОРУ (ИНДЕКС ОБЕЛЕЖАВАЊА)** у односу на **хистопатолошки подтип тумора**, за сва три МЦМ протеина, имају тумори ниског ризика, затим тумори умереног, а потом тумори највишег ризика за појаву рецидива. У односу на појединачне протеине, налаз је веома конзистентан – највећи забележени проценат позитивних ћелија у тумору има МЦМ 5 протеин (56,1% за *low-risk* туморе, 53,4% за *mixed* и 50,5% за *high-risk* туморе), затим МЦМ 2 протеин (39,2% за *low-risk* туморе, 37,3% за *mixed* и 34,4% за *high-risk* туморе), и на крају МЦМ 7 протеин (12,4% за *low-risk* туморе, 11,0% за *mixed* и 11,8% за *high-risk* туморе). За МЦМ 2 и 7 протеине нема статистички значајне разлике у обиму имунопозитивности одређеном аутоматским бројањем, али за МЦМ 5 протеин има. (Табела 24)

У међугрупном поређењу, МЦМ 5 протеин је високо статистички значајно више експримован у туморима високог ризика у односу на оне ниског ризика, али нема статистички значајне разлике између осталих група, како за овај протеин тако и за остала два (Табела 24). То говори да како расте агресивност тумора, тако расте и експресија овог протеина, што је веома значајан налаз, зато што МЦМ 5 протеин сврстава у маркер веће агресивности тумора.

У односу на податке из литературе који су се бавили експресијом МЦМ протеина у базоцелуларном карциному коже, налаз ове дисертације је у супротности - у 11 случајева базоцелуларног карцинома испитиваних на експресију МЦМ 5 протеина [216], број позитивних ћелија, у просеку, био је значајно мањи и износио је $21,2 \pm 5,7\%$. У другом раду [217], код 15 случајева базоцелуларног карцинома са фоликуларном диференцијацијом, бројање позитивних ћелија је вршено на пет различитих поља у једном узорку, до укупног броја од 200 ћелија, а проценат позитивних ћелија је био подељен у 4 категорије, 0–25%; 25–50%; 50–75% и 75–

100%. По категоријама, било је 5 случајева у првој категорији, 6 у другој, и по 2 у трећој и четвртој. У овом раду је иначе поређена МЦМ 2 имунопозитивност код базоцелуларног карцинома са фоликуларном диференцијацијом и трихоепителиома, где је закључено да МЦМ 2 протеин није од користи у диференцијалној дијагнози између ова два тумора. У трећем раду [148], у 20 случајева базоцелуларног карцинома који су испитивани на експресију МЦМ 2 протеина, имунопозитивност је била присутна у 80% (16 од 20) и кретала се у рангу од 0-90%, са средњом вредношћу од 24,4% и медијаном од 7,5%, али без осврта на хистопатолошки подтип тумора или на дубину туморске инвазије. У истом раду [148], код 21 *BCC* коже, експресија МЦМ 2 протеина утврђена је код 14 (66,7%) и кретала се у опсегу од 0-40%, са средњом вредношћу од 9,8%, али без осврта на хистолошки градус или дебљину тумора. Поређењем ове две врсте кутаних тумора, аутори указују да је експресија МЦМ 2 протеина била статистички значајно већа код *BCC*.

Процент позитивних ћелија МЦМ протеина у односу **на хистопатолошки подтип** односно **градуc тумора** испитиван је у бројним другим туморима. Налази из тих студија приказани су у даљем тексту.

У 10 случајева примарног меланома коже и 5 случајева метастазе меланома коже [147], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; минимум 200 ћелија, 5 поља увеличања 400x, број позитивних ћелија у односу на укупан број) била је значајно већа код примарног меланома коже (49,1%) и метастазе меланома коже (40,9%) него у контролним групама, бенижном невусу (1,2%; 10 случајева) и диспластичком невусу (6,1%; 10 случајева), чиме је показано да малигне неоплазме имају значајно већу експресију овог протеина у односу на бенигне. У другом раду, у 58 случајева суперфицијално ширећег меланома коже [146], испитивана је експресија МЦМ 3, 4 и 7 протеина и упоређивана са истом у бенижним невоцелуларним невусима и диспастичким невусима. Имунохистологија за МЦМ 7 протеин (три насумично одабрана поља увеличања 100x, проценат позитивних ћелија у односу на укупан број) није показала значајне разлике у експресији између испитиваних група.

У 51 случају *T* ћелијских лимфопролиферативних болести коже (парапсориаза *en plaque*, *mycosis fungoides low* и *high-risk* и лимфоматоидна папулоза) [145], експресија МЦМ 7 протеина (три насумично одабрана поља увеличања 400x, број позитивних ћелија у односу на укупан број) била је значајно већа у случајевима

high-risk mycosis fungoides (36%) у поређењу са парапсоријазом (4%) и лимфоматоидном папулозом (23,2%), што је навело ауторе на закључак да МЦМ 7 имуноекспресија може да буде један нови биолошки маркер ћелијске пролиферације, с обзиром на то да је МЦМ 7 протеин, за разлику од Ки-67 и *PCNA*, стабилан током целог ћелијског циклуса. Такође од стране истих аутора [146], испитивана је експресија МЦМ 7 протеина и у меланоцитним лезијама коже (37 бенигнух меланоцитних невуса, 25 диспластичких невуса и 58 суперфицијелно ширећег меланома), где није утврђена значајна разлика у експресији овог протеина у односу на различите хистопатолошке дијагнозе.

Експресија МЦМ 2, 5 и 7 протеина у 33 случаја *SCC* различитих локализација (6 цервикса, 13 коже, 8 ларинкса, 3 езофагуса и 3 плућа) [138], показала је да су умерено и слабо диферентовани тумори имали већу (78-80%) експресију у односу на добро диферентоване туморе (69%). У истом раду [138], за *SCC* коже, проценат МЦМ 2 позитивних ћелија износио је 79 %.

У 66 узорака ткива усне дупље [167], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; 500 ћелија, проценат позитивних ћелија од укупног броја ћелија добијен средњом вредношћу из 5 различитих бројања; три истраживача са међусобном разликом у бројању мањом од 5%; коначна вредност индекса обележавања била је средња вредност добијена од три испитивача) износила је 92% (опсег 80-98%) и била већа у диспластичком (умерена и изражена дисплазија) и ткиву *SCC*, него у бенигној кератози и дисплазији благог степена, што је навело ауторе на закључак да је имуноекспресија МЦМ 2 протеина одлично дијагностичко оруђе у раном откривању *SCC* усне дупље.

У 46 случајева *SCC* усне дупље [165], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; 1000 ћелија) била је значајно већа у умерено диферентованом (45,5%) него у добро диферентованом (35,5%) туморима, док је виши ниво експресије овог протеина био у корелацији са вишим градусом (инфилтративнијим растом) овог тумора (51,0% градус IV насупрот 37,7% градус I), што је све заједно повезано са прогнозом.

Слично томе, у 38 случајева *SCC* усне дупље [164], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; 5 репрезентативних поља увеличања 400x, број

позитивних ћелија кроз укупан број ћелија пута 100, мануелно бројање, два истраживача са међусобном разликом у бројању мањом од 10%) била је високо статистички значајна (81,16%) него у нормалном (39,94%) или диспластичком (73,62%) ткиву усне дупље, посебно оног које је прогредирало у *SCC*.

У 35 случајева *SCC* усне дупље [166], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; 1000 ћелија) била је такође значајно већа у *SCC* него у диспластичком ткиву усне дупље, али није била у корелацији са експресијом *p53*, што је био и закључак другог рада [183] за исти тумор друге локализације (192 *SCC* цервикса, мануелно бројање, минимум 200 ћелија у репрезентативном пољу).

У 113 случајева истог тумора исте локализације [163], експресија МЦМ 7 протеина (индекс обележавања; најмање 1000 ћелија по узорку, 400x поље увеличања) била је значајно већа (51,1%) него у нормалном (29,2%) или диспластичком (32,2%) ткиву усне дупље, и корелирала је са хистолошким градусом тумора [највећа експресија (62,3%) код најслабије диферентованих тумора; код добро диферентованих износила је 44,0%, а код умерено диферентованих 53,6%] и лошијом прогнозом [лошија прогноза (стадијум III и IV) код веће експресије (53,3% и 52,7%)].

Експресија МЦМ 5 протеина такође у 33 случаја, али само *SCC* усне дупље [167], у узорку ћелија добијених узимањем бриса оралне мукозе, показала је имунопозитивност на МЦМ 5 протеин у свим случајевима, указујући, поред осталог, да је могућа детекција малигнућ ћелија и на тај начин што може да допринесе дијагностици инвазивног *SCC* без биопсије.

У 8 случајева примарног инвазивног *SCC* цервикса [182], експресија МЦМ 5 протеина била је статистички значајно виша у поређењу са нормалним ткивом и цервикалном интраепителном неоплазијом.

Такође у 8 случајева примарног инвазивног *SCC* цервикса [183], експресија али МЦМ 2 протеина (ткивни микролиз, аутоматско бројање, проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија, увеличање 400x), била је статистички значајно виша (47,6%) у поређењу са нормалним ткивом (4,7%) и цервикалном интраепителном неоплазијом (31,6-32,9%).

У 10 случајева *SCC* гркљана [161], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; средња вредност из пет појединачних бројања; четири испитивача са међусобном разликом у бројању мањом од 5%; коначна вредност индекса обележавања била је средња вредност добијена од свих испитивача) је била у значајној позитивној корелацији како са експресијом Ки-67 тако и са имуноекспресијом у нормалном, диспластичком и ткиву *SCC*, у смислу значајно веће експресије овог протеина у *SCC* него у претходне две наведене контролне групе, што је навело ауторе на закључак да имуноекспресија МЦМ 2 протеина може да буде објективан и поуздан фактор у градирању промена у епителу ларинкса.

У 93 случаја *SCC* једњака [158], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; број позитивних ћелија на три суседна поља великог увеличања 400 \times ; два патолога) била је значајно виша у *SCC* у поређењу са нормалним ткивом, као и статистички значајно повезана са статусом тумора, захватањем регионалних лимфних чворова, појавом метастаза, патолошким стадијумом болести, хистолошким градусом и лошијом прогнозом и, по мишљењу аутора, показала се поузданијим и кориснијим маркером у процењивању туморског раста и евалуације агресивности и прогнозе *SCC* једњака, него Ки-67.

У 8 случајева карцинома једњака [159] (4 аденокарцинома и 4 *SCC*), експресија МЦМ 2 и 5 протеина (индекс обележавања; проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија сврстан је у 6 група: 0, <10%, 10-30%, 30-70%, 70-90%, >90%) била је повећана у деловима тумора који су били слабије диферентовани.

У 79 случајева карцинома простате [208], експресија МЦМ 7 протеина (индекс обележавања; минимум 200 ћелија по случају, проценат позитивних у односу на укупан број ћелија) била је значајно већа (22,7%) у поређењу са нормалним ткивом (1,2-8,2%) и простатичком интраепителном неоплазијом (3,1-10,6%), као и у односу на експресију Ки-67 (9,8%).

У 92 случаја карцинома простате [209], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; број ћелија на пољу 400 \times претходно одабраним на пољу 100 \times са најинтензивнијим бојењем, минимум 500 ћелија по случају) била је значајно већа у поређењу са нормалним ткивом и значајно удружена са преживљавањем (већа

експресија краће преживљавање), док није била удружена са другим стандардним клиничко-патолошким параметрима.

Код 66 примарних астроцитома [190], у односу на градус тумора (пилоцитични астроцитом – градус I, дифузни астроцитом – градус II, анапластички астроцитом – градус III и *glioblastoma multiforme* – градус IV), експресија МЦМ 7 протеина (процент позитивних ћелија у односу на 1000 ћелија по случају, у репрезентативном видном пољу, увећање 40x), показала је статистички значајан раст у односу на повећање градуса тумора (2,94 %, 8,37 %, 13,8 % и 26,6 %).

У 15 глиобластома (9 ситноћелијских и 6 мултиформних) [190], МЦМ 7 протеин (индекс обележавања; поље највећег увећања 400x, 1000 ћелија по узорку, процент позитивних ћелија од укупног броја ћелија у видном пољу, два истраживача са међусобном разликом у бројању мањом од 3%) је статистички значајно више експримован (9,6-58,4%) у односу на Ки-67 (2,5-30,5%) и PCNA (6,2-18,2%), и имала је статистички значајну разлику између две различите хистолошке врсте глиобластома - наиме, била је већа код ситноћелијских (агресивнији у биолошком понашању) него код глиобластома плеоморфног ћелијског састава, што ауторе наводи на закључак да је МЦМ 7 протеин одличан маркер ћелијске пролиферације, као и дијагностичко оруђе.

Другачији резултати добијени су код 32 дезмоидна тумора [193] (случајеви су карактерисани као позитивни уколико је било преко 5% позитивних ћелија, у укупном број ћелија избројаних код сваког случаја на 10 поља великог увећања 400x), где није уочена експресија МЦМ 2 и 5 протеина нити у једном случају, док је експресија МЦМ 7 протеина била забележена у 4 случаја, указујући на ниску митотску активност, што се уклапа у до сада познати модел клиничког понашања ових тумора који се одликују инфилтративним растом и тенденцијом ка локалним рецидивима (веома слично базоцелуларном карциному), али не и способношћу метастазирања.

У малигном билијарном и панкреатичном ткиву (карцином панкреаса, ампуларни и холангиокарцином) [171], експресија МЦМ 2 и 5 протеина (изражена рачунањем индекса обележавања као процента/броја позитивних ћелија у односу на минимум 200 ћелија) је била, са статистички значајном разликом, екстремно ниска у

нормалном и бенижном, а значајно виша у малигном панкреатичном и билијарном ткиву.

Код аденокарцинома плућа [154], 84 небронхо-алвеоларних и 16 бронхо-алвеоларних, пречника мањег од 3 *mm*, експресија МЦМ 7 протеина (процент позитивних ћелија у односу на минимум 1000 ћелија) била је значајно већа код небронхоалвеоларних тумора, указујући на то да овај хистопатолошки подтип тумора има већи потенцијал пролиферације и агресивности, док је код 331 пацијената са неситноћелијским карциномом плућа [151], такође у виду ткивног микрониза, експресија МЦМ 7 протеина утврђена у 61,1% случајева, за разлику од негативног налаза у нормалном ткиву плућа.

Експресија МЦМ 2 протеина код неситноћелијских карцинома плућа [162], показала је разлику у експресији у односу на хистопатолошки тип тумора – код аденокарцинома, за разлику од осталих испитиваних тумора (*SCC*, крупноћелијски, аденосквामозни и мешовити неситноћелијски карцином) уочено је статистички значајно мање позитивних ћелија. Процент позитивних ћелија процењиван је и категоризован као 1 (0-24% позитивних ћелија), 2 (25-49%), 3 (50-74%) и 4 (75-100% позитивних ћелија).

У 22 случаја минимално инвазивог фоликуларног карцинома штитасте жлезде (6 тумора са васкуларном инвазијом и инвазијом капсуле, 7 тумора само са васкуларном инвазијом и 9 тумора само са инвазијом капсуле) [172], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; минимум 3000-4000 ћелија у најизраженије позитивним деловима тумора, број позитивних ћелија у односу на укупан број, на најмање 10 поља увеличања 400x) била је у највећем броју случајева периферна, значајно виша (25,9-28,4%) у поређењу са контролном (фоликуларни аденом штитасте жлезде; претежно дифузна дистрибуција МЦМ 2 имунопозитивности) групом (10,7%) и, такође, у целини значајно виша (26,7%) у поређењу са експресијом Ки-67 (2,07%) у истом узорку, а у корелацији са хистолошким критеријумима инвазије капсуле и/или васкуларне инвазије, што је навело ауторе на закључак да је МЦМ 2, а не Ки-67 користан маркер пролиферације у диференцијацији између минимално инвазивог фоликуларног карцинома штитасте жлезде и фоликуларног аденома штитасте жлезде.

У 52 случаја анапластичког карцинома штитасте жлезде [173], експресија МЦМ 5 и 7 протеина била је [за МЦМ 5 протеин 65% случајева имало је >10% позитивних ћелија (у просеку 25% позитивних ћелија), а за МЦМ 7 протеин 73% случајева имало је >10% позитивних ћелија (у просеку 30% позитивних ћелија)], статистички високо значајно виша у поређењу са нормалним ткивом или ткивом папиларног карцинома штитасте жлезде (0% позитивних случајева), што је навело ауторе на закључак како је експресија МЦМ протеина у високој корелацији са степеном диферентованости ћелија.

У 212 случајева карцинома ендометријума (узорак је чинило 173 ендометријумских и 39 не-ендометријумских карцинома) [186], експресија МЦМ 7 протеина [ткивни микрониз (два узорка по случају); проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија, увеличање 400x, 200-500 ћелија по узорку, резултати класификовани у четири групе (<25%, 25–50%, 51–75% и >75%), два патолога] показала је значајну повезаност са хистолошким градусом тумора и старосћу пацијента (добро диферентовани тумори и млађи пацијенти имали су нижи проценат имуноекспресије), као и са преживљавањем (краће преживљавање виши проценат имуноекспресије), али не и у односу на хистолошки подтип тумора.

У 176 случајева радикалне нефректомије због карцинома бубрега [188], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; на увеличању 100x одабрано је поље са најизраженијом позитивношћу ћелија да би затим на 3-4 поља увеличања 400x биле избројане позитивне ћелије и просечна вредност од 681 ћелије је узимана за сваки тумор) била је значајно виша него експресија Ки-67 и геминина (нпр. за градус IV тумора: 65,02%-19,33%-8,97%), а исто тако била је како у снажној корелацији са скраћењем дужине времена преживљавања – већа експресија краће преживљавање (*hazard ratio* 1:30,2), тако и са градусом тумора - већа експресија виши градус (грабус I 36,14%, градус IV 65,02%), лошија прогноза, што је навело ауторе на закључак да имуноекспресија МЦМ 2 представља потенцијално користан прогностички молекуларни маркер који би могао да се користи у рутинској клиничкој пракси.

У 56 случајева тумора бубрега [189] (36 светлоћелијских карцинома, 7 папиларних/хромофилних карцинома, 5 онкоцитома и 8 карцинома транзиционих ћелија), експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; број позитивних

туморских ћелија у односу на укупан број ћелија на пољу површине $0,25 \text{ mm}^2$, са просечно избројаним бројем ћелија од по случају од 3212) била је преобладајуће периферна, са укупним индексом обележавања од 0,2-91,5% (значајно већим од Ки-67, 0,2-40,5%), уз значајне разлике у индексу обележавања између карцинома транзиционих ћелија (56,5%) и светлоћелијског карцинома (36,4%), као и значајно удружена са градусом тумора (50:25%, *high:low-grade*) и његовим ангиогеним фенотипом, али не и са година старости пацијента, полом пацијента, величином или стадијумом тумора, уз, иако не статистички сигнификанту, повезаност са преживљавањем у смислу 100% преживљавања пацијената са ниском експресијом МЦМ 2 протеина у поређењу са 84% преживљавања пацијената са високом експресијом МЦМ 2 протеина.

У 6 случајева аденокортикалног карцинома [215], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; два патолога; проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија сврстан је у 5 категорија: 0%, 1-10%, 11-25%, 26-50% и >50%) била је статистички значајно већа него у контролним бенигним туморима и нормалном ткиву коре надбубрега, што је навело ауторе на закључак да је експресија овог протеина од посебне важности као маркер диспластичких лезија и поуздан индикатор малигнитета у сумњивим случајевима тумора коре надбубрега.

У 56 случаја дукталног карцинома дојке [196], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; аутоматско бројање, проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија на три поља високог увећања $400\times$ одабраним као места најизраженије имуноекспресије – *hot spots*; бирана независно од стране два патолога уз консензус код случајева који су то захтевали) била је најизраженија у случајевима тумора градуса Г3, са статистичком значајношћу у односу на туморе градуса Г1 и Г2, што је ауторе навело на закључак да имуноекспресија МЦМ 2 протеина може да буде од користи као маркер пролиферације код карцинома дојке.

У 74 случаја примарног инвазивног карцинома дојке [197], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; аутоматско/стереолошко бројање, проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија, најмање 500 ћелија) била је са статистичком значајношћу виша у туморима вишег градуса (52,4% за градус 3, наспрот 22,9% код градуса 1).

У 70 случајева примарног карцинома дојке (56 инвазивних дукталних карцинома, 4 дуктална карцинома *in situ*, 2 инвазивна лобуларна карцинома, 4 недуктална карцинома и 4 карцинома мешовитог дукталног/лобуларног хистопатолошког подтипа) [198], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; на малом увећању, у зонама максималне експресије, проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија, минимум 500 ћелија, два патолога са међусобном разликом у бројању мањом од 5%), била је са позитивном корелацијом у односу на хистолошки градус тумора [најизраженија код лоше диферентованих (градуc 3), а најмање код добро диферентованих тумора (градуc 1)].

У 56 случајева примарног карцинома дојке [199], експресија МЦМ 2 протеина [ткивни микрониз, индекс обележавања; проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија, минимум 500 ћелија, два патолога (за 20% узорака био је укључен и трећи патолог)са међусобном разликом у бројању мањом од 5%, а као коначан број позитивних ћелија узимана је средња вредност добијена од стране поменутих истраживача] била је чешћа и виша (78,3%) у односу на експресију Ки-67 (38,6%) код свих узорака, и са позитивном корелацијом у односу на величину тумора, митотски индекс, хистолошки градус и скор *Nottingham* прогностичког индекса, као и са укупним преживљавањем, дужином периода без болести (енгл. *disease-free interval*), развојем локалних рецидива и појавом удаљених метастаза, што је навело ауторе на закључак да је имуноекспресија МЦМ 2 протеина јак прогностички фактор код карцинома дојке, независан и супериоран у односу на хистолошки градус, стање регионалних лимфних чворова и Ки-67 позитивност, али не и у односу на скор *Nottingham* прогностичког индекса.

У 29 случајева рецидивирајућег плеоморфног аденома пљувачне (паротидне) жлезде [169], експресија МЦМ 2 протеина (минимум 1000 ћелија по случају, увећање 400x, проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија, два истраживача) била је ниска, али двоструко већа у односу на аденом (1,2% према 0,6%), док за два забележена случаја појаве карцинома из рецидивирајућег плеоморфног аденома нема нумеричких података о висини имуноекспресије осим запажања аутура да је у малишним деловима имуноекспресија МЦМ протеина била израженија него у осталим бенишним деловима тумора.

У 62 случаја тумора пљувачне жлезде (13 аденоидно цистичних карцинома, 10 карцинома из плеоморфног аденома, 10 мукоепидермоидних карцинома, 10 полиморфних *low-grade* аденокарцинома, 10 плеоморфних аденома и 9 карцинома ацинарних ћелија) [170], експресија МЦМ 2 протеина (ткивни микрониз; индекс обележавања; у укупно 6 насумично одабраних поља високог увељачања 400x, проценат позитивних ћелија у односу на укупан број избројаних ћелија, два поља високог увељачања по пресеку, а укупно три пресека по случају, бројање без клиничких података) била је значајно већа у свим туморима (5,32-28,15%) у односу на Ки-67 (2,55-13,10%) и геминин (0,69-4,69%), највећа у аденоидно цистичном карциному (28,15%), а најнижа у полиморфном *low-grade* аденокарциному (5,32%), већа у карциному из плеоморфног аденома (20,35%) него у плеоморфном аденому (6,93%), али без позитивне корелације у односу градус тумора или преживљавање.

У 128 случајева небенигних епителних тумора јајника (43 тумора ниског малигног потенцијала и 85 аденокарцинома) [194], експресија МЦМ 2 и 5 протеина (индекс обележавања; минимум 300 ћелија, увељачање 200x и 400x, проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија, имунофлуоресценција) била је статистички значајно виша у аденокарциномима (15-35% за МЦМ 2 и 20-40% за МЦМ 5) у односу на туморе ниског малигног потенцијала (5-5,5% за МЦМ 2 и 5-10% за МЦМ 5), кореспондирала је са вишим градусом (10% за градус I, 17,5% за градус II и 30% за градус III за МЦМ 2, а 30% за градус I, 20% за градус II и 42,5% за градус III за МЦМ 5) тумора, као и са присуством изражене резидуалне болести (27,5:15% за МЦМ 2 и 35:20% за МЦМ 5) и лошијом прогнозом (само код аденокарцинома), и била у јакој позитивној корелацији са експресијом Ки-67 и p53.

Код 43 канцера оваријума ниског малигног потенцијала и 85 аденокарцинома [194], испитивање експресије МЦМ 5 протеина (процент позитивних ћелија у односу на укупан број избројаних туморских ћелија у препарату - око 1000), показало је значајније већи број позитивних ћелија у аденокарциномима него у туморима нижег степена малигнитета.

У 30 случајева карцинома жучне кесе [171], експресија МЦМ 2 и 5 протеина (индекс обележавања; минимум 200 ћелија, проценат позитивних у односу на укупан број ћелија) била је значајно већа у малигним (76,5%) него у контролним бенигним (5%) туморима.

У 66 случајева аденокарцинома желуца [174], експресија МЦМ 2 и 5 протеина [индекс обележавања; минимум 1000 ћелија, број позитивних ћелија у односу на укупан број, узорци класификовани као ниска (<50% позитивних ћелија) и висока (>50% позитивних ћелија) експресија; два патолога] показала је да МЦМ 2 имунопозитивност није удружена нити са једним од клиничко-патолошких параметара, али је чешћа у интестиналном подтипу овог карцинома у односу на дифузни подтип.

У 40 случајева аспирата желуца код пацијената са сумњом на карциномом једњака или већ постављеном дијагнозом истог [160], повишен ниво експресије МЦМ 5 протеина био је значајно повезан са каснијом клиничко-патохистолошким потврдом постојања карцинома једњака код пацијената код којих је постојала сумња на исти.

У 66 случајева карцинома бешике са инвазијом мишића детрусора [203], експресија МЦМ 2 и 5 протеина (индекс обележавања; два испитивача са међусобним варијацијама у бројању мањим од 5%, минимум 1000 ћелија, поље увеличања 400x, проценат позитивних ћелија у односу на укупан број) показала је значајну позитивну корелацију са градусом, лошим преживљавањем, и била у корелацији са Ки-67 и p53 имуноекспресијом, што је ауторе навело на закључак како је имунопозитивност на ова два протеина поуздан индекс пролиферације и користан прогностички маркер код пацијената са овим типом карцинома бешике.

У сажетку, може да се закључи следеће: у базоцелуларном карциному коже периокуларне регије, тумори најнижег ризика за појаву рецидива имају највећи проценат позитивних ћелија сва три МЦМ протеина. У другим туморима, експресија МЦМ протеина се повећавала са порастом агресивности тумора (лошији хистолошки градус, израженији метастатски потенцијал), што је у супротности са налазом ове дисертације, али говори о самој природи базоцелуларног карцинома коже, као спорорастућем, локално инвазивном тумору, изражено ниског метастатског потенцијала. Одступање од поменутог забележено је у меланоцитиним лезијама коже, где није било значајне разлике у односу на врсту лезије, у карциному ендометријума, где није било разлике у односу на степен агресивности тумора, као и у дезмоидним туморима, где је експресија МЦМ протеина забележена у занемарљивом броју случајева.

Према резултатима овог рада, највећи забележени **процент позитивних ћелија у тумору** у односу на **дубину туморске инвазије** има опет МЦМ 5 протеин (средња вредност 44,7-61,7%), најизраженије код тумора који захватају целу дебљину капка, затим МЦМ 2 протеин (средња вредност 27,9-42,9%), исто најизраженије код тумора који захватају целу дебљину капка, и на крају МЦМ 7 протеин (средња вредност 6,6-13,5%), али најизраженије код тумора који захватају ретикуларни дерм. МЦМ 2 и 7 протеини показују високо статистички значајну разлику у обиму имунопозитивности, а МЦМ 5 протеин статистички значајну разлику. (Табела 25) У туморима ниског ризика, највећи индекс обележавања за МЦМ 2 и 5 протеин имају тумори са најдубљим продором, а за МЦМ 7 протеин тумори са најповршнијим продором, у туморима мешовитог ризика налаз је исти, док се у туморима високог ризика налаз разликује једино у томе што је индекс обележавања за МЦМ 2 протеин највиши у туморима најповршнијег продора. (Табеле 26-28)

У међугрупном поређењу, МЦМ 2 протеин је статистички значајно више испољен у туморима који захватају ретикуларни дерм у односу на туморе који захватају мишићни слој, као и у туморима који захватају мишићни слој у односу на туморе који захватају целу дебљину капка/поткожно/масно ткиво, док је код МЦМ 5 и 7 протеина утврђена статистички значајна разлика у обиму имуноекспресије између тумора који захватају мишићни слој у односу на туморе који захватају целу дебљину капка/поткожно/масно ткиво. У осталим категоријама, за сва три МЦМ протеина, нема статистички значајне разлике у обиму имуноекспресије (Табела 25). Овакав налаз говори да се експресија МЦМ протеина смањује како расте дубина туморске инвазије.

У поређењу са претходним налазима, може да се резимира следеће: имуноекспресија МЦМ 5 протеина расте са повећањем агресивности тумора у смислу хистопатолошке категоризације (од тумора ниског до тумора високог ризика), али се смањује са повећањем дубине туморске инвазије (од ретикуларног дерма до најдубљих продора).

У литератури, постоји само једна студија која је анализирала проценат позитивних ћелија и то на МЦМ 7 протеин, у односу на дубину туморске инвазије, и то у 58 случајева суперфицијално ширећег меланома коже [146] (као контролне групе послужили су бенигни невоцелуларни невуси и диспастички невуси), где

имунохистологија за МЦМ 7 протеин (три насумично одабрана поља увеличања 100x, проценат позитивних ћелија у односу на укупан број), није показала значајне разлике у експресији између испитиваних група, али је била у значајној корелацији са *Breslow*-левом дебљином тумора и *Clark*-овим нивоом туморске инвазије - дебљи тумори већа експресија.

У сажетку, може да се закључи следеће: у базоцелуларном карциному коже периокуларне регије, тумори са најдубљим продором имају највећи проценат позитивних ћелија за МЦМ 2 и 5 протеин, уз одступање за МЦМ 7 протеин који је највише експримован у туморима са најплићим продором. У суперфицијелно ширећем меланому коже, експресија МЦМ 7 протеина се повећавала са порастом дубине инвазије/дебљине тумора, што је у супротности са налазом овог рада и највероватније је последица различитих природа ове две малигне неоплазме.

Анализом имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7 одређене аутоматским бројањем, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, **према површини тумора**, показано је да највећи проценат имуноекспресије има МЦМ 5 протеин (54,6%), затим МЦМ 2 (38,1%), а затим МЦМ 7 (12,1%) протеин (Табела 29), чиме се поново подвлачи значај МЦМ 5 протеина у одређивању агресивности базоцелуларног карцинома, с обзиром на то да највећу експресију овог протеина имају тумори највеће површине, што је и статистички показано позитивном корелацијом између површине тумора и броја МЦМ 5 позитивних ћелија, одређених аутоматским бројањем.

У литератури нису пронађени подаци који су испитивали проценат позитивних ћелија МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на површину тумора, како за базоцелуларни карцином коже тако и за било који други тумор.

Анализом МЦМ експресије у односу на димензије базоцелуларног карцинома, највећи проценат позитивних туморских ћелија на МЦМ 2 и 5 протеине забележен је у групи 10-20 *mm*, док је највећи проценат позитивних туморских ћелија на МЦМ 7 протеин у групи >20 *mm*.

Анализом индекса обележавања одређеног аутоматским бројањем ћелија према највећем измереном пречнику тумора утврђено је да нема статистички значајне разлике у имуноекспресији сва три МЦМ протеина, како у целокупном узроку тако ни при међугрупном поређењу. (Табела 30)

У литератури проценат позитивних ћелија на МЦМ протеине у тумору у односу на величину тумора испитиван је у карциномима дојке и аденокарциному желуца.

У 74 случаја примарног инвазивног карцинома дојке [197], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; аутоматско/стереолошко бројање, проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија, најмање 500 ћелија) била је без позитивне корелације са величином тумора, што је био и налаз студије у 70 случајева примарног карцинома дојке (56 инвазивних дукталних карцинома, 4 дуктална карцинома *in situ*, 2 инвазивна лобуларна карцинома, 4 недуктална карцинома и 4 карцинома мешовитог дукталног/лобуларног хистопатолошког подтипа) [198], експресија МЦМ 2 протеина (индекс обележавања; проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија, минимум 500 ћелија, два патолога са међусобном разликом у бројању мањом од 5%).

Насупрот томе, у 56 случајева примарних инвазивних карцинома дојке различитих подтипова (43 дуктална без специјалног типа, 2 тубуларна мешовита, 3 медуларна/атипична медуларна, 3 класична лобуларна, 1 лобуларни мешовити, 2 тубуларна и 2 мешовита без специјалног типа) [199], експресија МЦМ 2 протеина [ткивни микрониз, индекс обележавања; проценат позитивних ћелија у односу на укупан број ћелија, минимум 500 ћелија, два патолога (за 20% узорака био је укључен и трећи патолог) са међусобном разликом у бројању мањом од 5%, а као коначан број позитивних ћелија узимана је средња вредност добијена од стране поменутих истраживача], била је са позитивном корелацијом у односу на величину тумора.

У 66 случајева аденокарцинома желуца [174], експресија МЦМ 2 и 5 протеина [индекс обележавања; минимум 1000 ћелија, број позитивних ћелија у односу на укупан број, узорци класификовани као ниска (<50% позитивних ћелија) и висока (>50% позитивних ћелија) експресија; два патолога] показала је да МЦМ 2 имунопозитивност није удружена нити са једним од клиничко-патолошких

параметара, док је експресија МЦМ 5 протеина била значајно удружена са величином тумора.

У сажетку, налази добијени анализом експресије МЦМ протеина у односу на величину/пречник базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије, мање-више поклапају се са налазима добијеним испитивањем других тумора по истим критеријумима, у смислу већег процента позитивних ћелија у већим туморима.

У литературу не постоји нити једна студија која је анализира/поредила различите начине евалуације имунохистохемијских бојења (семиквантитативно и аутоматско бројање), било које хумане неоплазме.

Анализом, односно поређењем (*Cohen-ов кафра* коефицијент) семиквантитативно и аутоматским бројањем процењеног/одређеног обима имунопозитивности МЦМ протеина 2, 5 и 7, у целокупном узорку базоцелуларног карцинома, дошло се до закључка да постоји значајно слагање приликом процене имуноекспресије за МЦМ 2 и 7 протеин, и умерено слагање за МЦМ 5 протеин. (Табела 31)

Овакав налаз указује како на поузданост аутоматског бројања као начина евалуације имуноекспресије, за које може да се каже да је и објективно, тако и на конзистентност добијених резултата од стране испитивача у погледу семиквантитативног (субјективног) процењивања обима имуноекспресије.

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Анализом дистрибуције МЦМ 2, МЦМ 5 и МЦМ 7 протеина у базоцелуларном карциному коже периокуларне регије, уочено је да су тумори имали доминантно дифузну дистрибуцију позитивних ћелија.

2. Поређењем експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 и прогностичких параметара базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије, закључено је да је и у односу на хистопатолошки подтип тумора, дифузна дистрибуција имунопозитивности доминантна (са једним изузетком код МЦМ 7 протеина и тумора високог ризика где је иста периферна). То га издваја од већине малигних тумора који често показују периферну дистрибуцију у боље диферентованим варијантама, с периферним присуством пролиферативних ћелија.

3. У односу на димензије тумора (површину и највећи измерени пречник), није било статистички значајне разлике у имуноекспресији МЦМ протеина, ни семиквантитивно нити аутоматски, осим постојања слабе позитивне корелације између површине тумора и броја МЦМ 5 позитивних ћелија одређеног аутоматским бројањем.

4. Анализа имуноекспресије МЦМ протеина у односу на дубину туморске инвазије као и поређењем исте према различитим хистопатолошким подтиповима тумора, дала је заправо најзанимљивије резултате - дифузна дистрибуција имунопозитивности била је преодминантан облик имуноекспресије, као и чињеница да је сваки од анализираних МЦМ протеина имао веома јасно ограничен семиквантитативан опсег своје имунопозитивности у готово 2/3 испитиваних случајева, МЦМ 2 протеин у опсегу 10-50%, МЦМ 5 протеин у опсегу >50% и МЦМ 7 протеин у опсегу <10%.

5. Проценом различитих начина евалуације имунохистохемијског бојења и експресије МЦМ протеина 2, 5 и 7 у односу на хистолошки подтип базоцелуларног карцинома коже периокуларне регије и остале прогностичке параметре, закључено је да се аутоматско бројање ћелија показало значајно поузданим за процену обима

имунопозитивности и да се може користити уместо напорног мануелног бројања, или мање прецизне семиквантитативне процене обима имуноекспресије.

6. И поред сличности, уочене су и разлике у имуноекспресији МЦМ 2, 5 и 7 протеина у односу на одређене карактеристике базоцелуларног карцинома, што указује на потребу додатних упоредних испитивања како у овој врсти тумора, на истој или другачијој локализацији, тако и у различитим туморима, што би допринело и процени њихове индивидуалне употребљивости у процени биолошког потенцијала тумора.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Correia de Sá TR, Silva R, Lopes JM. Basal cell carcinoma of the skin (part 1): epidemiology, pathology and genetic syndromes. *Future Oncol.* 2015;11:3011-21.
2. Correia de Sá TR, Silva R, Lopes JM. Basal cell carcinoma of the skin (part 2): diagnosis, prognosis and management. *Future Oncol.* 2015;11:3023-38.
3. Marzuka AG, Book SE. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale J Biol Med.* 2015 Jun;88:167-79.
4. Alter M, Hillen U, Leiter U, Sachse M, Gutzmer R. Current diagnosis and treatment of basal cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015;13:863-74.
5. Sellheyer K. Basal cell carcinoma: cell of origin, cancer stem cell hypothesis and stem cell markers. *Br J Dermatol.* 2011;164:696-711.
6. Ferrándiz C, Fuente MJ, Ferrándiz L, Carrascosa JM. Basal cell carcinoma. *Cancer Treat Res.* 2009;146:263-78.
7. Otsuka A, Levesque MP, Dummer R, Kabashima K. Hedgehog signaling in basal cell carcinoma. *J Dermatol Sci.* 2015;78:95-100.
8. Tilli CM, Van Steensel MA, Krekels GA, Neumann HA, Ramaekers FC. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2005;152:1108-24.
9. Meyer T. Molecular pathogenesis of basal cell carcinoma. *Cancer Treat Res.* 2009;146:193-204.
10. Meyer T. Molecular events in skin cancer. *Cancer Treat Res* 2009;146:189-192.
11. Iwasaki JK, Srivastava D, Moy RL, Lin HJ, Kouba DJ. The molecular genetics underlying basal cell carcinoma pathogenesis and links to targeted therapeutics. *J Am Acad Dermatol.* 2010;66:e167-e178.
12. Montagna E, Lopes OS. Molecular basis of basal cell carcinoma. *An Bras Dermatol.* 2017;92:517-520.
13. Hoorens I, Vossaert K, Ongenaes K, Brochez L. Is early detection of basal cell carcinoma worthwhile? Systematic review based on the WHO criteria for screening. *Br J Dermatol.* 2016;174:1258-65.

14. Kadouch DJ, van Haersma de With A, Limpens J, van der Wal AC, Wolkerstorfer A, et al. Is a punch biopsy reliable in subtyping basal cell carcinoma? A systematic review. *Br J Dermatol.* 2016;175:401-3.
15. Weedon D. Skin Pathology (2nd edition). *London: Churchill Livingstone, 2002; pp.765-72.*
16. Barnhill RL, Crowson AN, Magro CM, Piepkorn MW. Dermatopathology (3rd edition). *New York: McGraw-Hill, 2010; pp.578-90.*
17. Calonje E, Brenn T, Lazar A, McKee PH. McKee's Pathology of the Skin with Clinical Correlations (4th edition). *China: Elsevier Saunders, 2012; pp.1088–101.*
18. Roberts F, Thum CK. Lee's Ophthalmic Pathology (3rd edition). *London: Springer-Verlag, 2014; pp.304-6.*
19. Salomão D, Tóth J, Kennedy S. Eyelid pathology. In: Eye Pathology, Heegaard S, Grossniklaus H (editors). *New York: Springer-Verlag, 2015; pp.482-87.*
20. Miller S, Moresi M. Neoplasms of the skin: actinic keratosis, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. In: Bolognia J, Jorizzo J, Rapini R, eds. *Dermatology, volume 2. London: Mosby, 2003; p1677-1693.*
21. Edge SB, Byrd DR, Compton CC et al (eds.). AJCC Cancer Staging Manual (7th ed). *New York: Springer-Verlag, 2010; pp.523-30.*
22. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, et al (eds.). AJCC Cancer Staging Manual (8th ed). *New York: Springer-Verlag, 2017; pp.779-86.*
23. Silverman N, Shinder R. What's New in Eyelid Tumors. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* 2017;6:143-52.
24. Pe'er J. Pathology of eyelid tumors. *Indian J Ophthalmol.* 2016;64:177-90.
25. Sun MT, Wu A, Huilgol SC, Selva D. Accuracy of Biopsy in Subtyping Periocular Basal Cell Carcinoma. *Ophthalm Plast Reconstr Surg.* 2015;31:449-51.
26. Milman T, McCormick SA. The molecular genetics of eyelid tumors: recent advances and future directions. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2013;251:419–33.
27. Jebodhsingh KN, Calafati J, Farrokhyar F, Harvey JT. Recurrence rates of basal cell carcinoma of the periocular skin: what to do with patients who have positive margins after resection. *Can J Ophthalmol.* 2012;47:181-4.
28. Ben Simon GJ, Lukovetsky S, Lavinsky F, Rosen N, Rosner M. Histological and clinical features of primary and recurrent periocular basal cell carcinoma. *ISRN Ophthalmol.* 2012;2012:354829.

29. Soysal HG, Soysal E, Markoç F, Ardiç F. Basal cell carcinoma of the eyelids and periorbital region in a Turkish population. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2008;24:201-6.
30. Prabhakaran VC, Gupta A, Huilgol SC, Selva D. Basal cell carcinoma of the eyelids. *Compr Ophthalmol Update.* 2007;8:1–14.
31. Латковић З. Тумори капака. У: Олга Литричин и сарадници. Тумори ока. Завод за уџбенике и наставна средства – Београд, 1998; стр.5-66.
32. Латковић З. Тумори очних капака. Диференцијална дијагноза тумора епителног порекла. Светозар Марковић, Београд, 1983; стр.21-60.
33. Verkouteren JAC, Ramdas KHR, Wakkee M, Nijsten T. Epidemiology of basal cell carcinoma: scholarly review. *Br J Dermatol.* 2017;177:359-72.
34. Sánchez G, Nova J, Rodriguez-Hernandez AE, Medina RD, Solorzano-Restrepo C, et al. Sun protection for preventing basal cell and squamous cell skin cancers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;7:CD011161.
35. Li C, Athar M. Ionizing Radiation Exposure and Basal Cell Carcinoma Pathogenesis. *Radiat Res.* 2016;185:217-28.
36. Nguyen-Nielsen M, Wang L, Pedersen L, Olesen AB, Hou J, Mackey H, et al. The incidence of metastatic basal cell carcinoma (mBCC) in Denmark, 1997-2010. *Eur J Dermatol.* 2015;25:463-8.
37. McCusker M, Basset-Seguin N, Dummer R, Lewis K, Schadendorf D, et al. Metastatic basal cell carcinoma: prognosis dependent on anatomic site and spread of disease. *Eur J Cancer.* 2014;50:774-83.
38. Litwin AS, Shah-Desai SD, Malhotra R. Two new cases of metastatic basal cell carcinoma from the eyelids. *Orbit.* 2013;32:256-9.
39. Weiss GJ, Korn RL. Metastatic basal cell carcinoma in the era of hedgehog signaling pathway inhibitors. *Cancer.* 2012;118:5310-9.
40. McGrane J, Carswell S, Talbot T. Metastatic spinal cord compression from basal cell carcinoma of the skin treated with surgical decompression and vismodegib: case report and review of Hedgehog signalling pathway inhibition in advanced basal cell carcinoma. *Clin Exp Dermatol.* 2017;42:80-3.
41. Nongrum HB, Bhuyan D, Royte V, Dkhar H. Metastatic basal cell carcinoma to the lungs: Case report and review of literature. *Indian Dermatol Online J.* 2014;5(Suppl 1):S26-9.

42. Yazdani Abyaneh MA, Engel P, Slominski A, Ragsdale B, Agag R, et al. Giant Basal Cell Carcinomas Express Neuroactive Mediators and Show a High Growth Rate: A Case-Control Study and Meta-Analysis of Etiopathogenic and Prognostic Factors. *Am J Dermatopathol.* 2017;39:189-94.
43. Jiménez-Hernández F, Caballero-Centeno AM, Barrera-Pérez M, Ramos-Garibay JA. Giant Basal Cell Carcinoma: A 12-Year Follow-up Case Report. *Am J Dermatopathol.* 2016;38:52-5.
44. Rakic VS, Brasanac DC, Janjić ZM, Bogdanovic SM, Arafeh MA. Clinical and pathological features of the giant, invasive basal cell carcinoma of the scalp. *J Craniofac Surg.* 2013;24:e610-4.
45. Mina MA, Picariello A, Fewkes JL. Superficial basal cell carcinomas of the head and neck. *Dermatol Surg.* 2013;39:1003-8.
46. Berk DR, Ball Arefiev KL, Gladstone HB. Adamantinoid basal cell carcinoma: a predictor of more-aggressive clinical behavior. *Dermatol Surg.* 2012;38:1346-50.
47. Fernández-Aceñero MJ1, Cenjor C, Córdova S. Clear cell basal cell carcinoma with pulmonary metastasis: case report and literature review. *Am J Dermatopathol.* 2011;33:379-82.
48. Brankov N, Prodanovic EM, Hurley MY. Pigmented basal cell carcinoma: increased melanin or increased melanocytes? *J Cutan Pathol.* 2016;43:1139-42.
49. Kirzhner M, Jakobiec FA. Clinicopathologic and immunohistochemical features of pigmented Basal cell carcinomas of the eyelids. *Am J Ophthalmol.* 2012;153:242-252.e2.
50. Lee V, Lucarelli MJ, Ramey NA, Khedr SS, Potter HA, Albert DM. Multiple pigmented basal cell carcinomas of the eyelids. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131:1412.
51. Tambe SA, Ghate SS, Jerajani HR. Adenoid type of Basal cell carcinoma: rare histopathological variant at an unusual location. *Indian J Dermatol.* 2013;58:159.
52. Tan CZ, Rieger KE, Sarin KY. Basosquamous Carcinoma: Controversy, Advances, and Future Directions. *Dermatol Surg.* 2017;43:23-31.
53. Allen KJ1, Cappel MA, Killian JM, Brewer JD. Basosquamous carcinoma and metatypical basal cell carcinoma: a review of treatment with Mohs micrographic surgery. *Int J Dermatol.* 2014;53:1395-403.

54. Betti R, Crosti C, Ghiozzi S, Cerri A, Moneghini L, Menni S. Basosquamous cell carcinoma: a survey of 76 patients and a comparative analysis of basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas. *Eur J Dermatol.* 2013;23:83-6.
55. Zheng S, Guo Y, Mones JM. Basal cell carcinoma with myoepithelial differentiation. *Am J Dermatopathol.* 2011;33:863-6. *signet ring*
56. East E, Fullen DR, Arps D, Patel RM, Palanisamy N, et al. Morpheaform Basal Cell Carcinomas With Areas of Predominantly Single-Cell Pattern of Infiltration: Diagnostic Utility of p63 and Cytokeratin. *Am J Dermatopathol.* 2016;38:744-50.
57. Husain SE, Patrinely JR, Zimmermann LE, Font RL. Primary basal cell carcinoma of the limbal conjunctiva. *Ophthalmology.* 1993;100:1720-2.
58. Ugurlu S, Ekin MA, Altinboga AA. Primary basal cell carcinoma of the caruncle: case report and review of the literature. *Ophthalm Plast Reconstr Surg.* 2014;30:e62-4.
59. Jones EA, Sajid MI, Shenton A, Evans DG. Basal cell carcinomas in Gorlin syndrome: a review of 202 patients. *J Skin Cancer.* 2011;2011:217378.
60. John AM, Schwartz RA. Basal cell naevus syndrome: an update on genetics and treatment. *Br J Dermatol.* 2016;174:68-76.
61. Evans DG, Farndon PA. Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, et al, editors. SourceGeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. 2002 Jun 20 [updated 2015 Oct 1].
62. Stanoszek LM, Wang GY, Harms PW. Histologic Mimics of Basal Cell Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141:1490-1502.
63. Costache M, Bresch M, Boer A. Desmoplastic trichoepithelioma versus morphoeic basal cell carcinoma: a critical reappraisal of histomorphological and immunohistochemical criteria for differentiation. *Histopathology* 2008; 52:865-76.
64. Katona TM, Perkins SM, Billings SD. Does the panel of cytokeratin 20 and androgen receptor antibodies differentiate desmoplastic trichoepithelioma from morpheaform/infiltrative basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 2008;35:174-9.
65. Izikson L, Bhan A, Zembowicz A. Androgen receptor expression helps to differentiate basal cell carcinoma from benign trichoblastic tumours. *Am J Dermatopathol* 2005;27:91-5.

66. Abdelsayed RA, Guijarro-Rojas M, Ibrahim NA, Sanguenza OP. Immunohistochemical evaluation of basal cell carcinoma and trichoepithelioma using Bcl-2, Ki67, PCNA and P53. *J Cutan Patbol* 2000;27:169-75.
67. Ariza S, Espinosa S, Naranjo M. Nonsurgical Therapies for Basal Cell Carcinoma: A Review. *Actas Dermosifiliogr*. 2017;108:809-17.
68. Bakshi A, Chaudhary SC, Rana M, Elmets CA, Athar M. Basal cell carcinoma pathogenesis and therapy involving hedgehog signaling and beyond. *Mol Carcinog*. 2017;56:2543-57.
69. Ozgur OK, Yin V, Chou E, Ball S, Kies M, et al. Hedgehog Pathway Inhibition for Locally Advanced Periocular Basal Cell Carcinoma and Basal Cell Nevus Syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2015;160:220-227.e2.
70. Piérard-Franchimont C, Hermanns-Lê T, Paquet P, Herfs M, Delvenne P, et al. Hedgehog- and mTOR-targeted therapies for advanced basal cell carcinomas. *Future Oncol*. 2015;11:2997-3002.
71. Fecher LA, Sharfman WH. Advanced basal cell carcinoma, the hedgehog pathway, and treatment options - role of smoothed inhibitors. *Biologics*. 2015;9:129-40.
72. Wong KY, Fife K, Lear JT, Price RD, Durrani AJ. Vismodegib for Locally Advanced Periocular and Orbital Basal Cell Carcinoma: A Review of 15 Consecutive Cases. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2017;5(7):e1424.
73. Calzavara Pinton P, Licitra L, Peris K, Santoro A, Ascierto PA. Vismodegib in the treatment of basal cell carcinoma: indications for clinical practice. *Future Oncol*. 2015;11:1429-35.
74. Erdem GU, Sendur MA, Ozdemir NY, Yazıcı O, Zengin N. A comprehensive review of the role of the hedgehog pathway and vismodegib in the management of basal cell carcinoma. *Curr Med Res Opin*. 2015;31:743-56.
75. Yin VT, Pfeiffer ML, Esmaeli B. Targeted therapy for orbital and periocular basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2013;29:87-92.
76. Doan HQ, Silapunt S, Migden MR. Sonidegib, a novel smoothed inhibitor for the treatment of advanced basal cell carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2016;9:5671-8.
77. Collier NJ, Ali FR, Lear JT. The safety and efficacy of sonidegib for the treatment of locally advanced basal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2016;16:1011-8.

78. Ramelyte E, Amann VC, Dummer R. Sonidegib for the treatment of advanced basal cell carcinoma. *Expert Opin Pharmacother.* 2016;17:1963-8.
79. Burness CB, Scott LJ. Sonidegib: A Review in Locally Advanced Basal Cell Carcinoma. *Target Oncol.* 2016;11:239-46.
80. Williams HC, Bath-Hextall F, Ozolins M, Armstrong SJ, Colver GB, et al. Surgery Versus 5% Imiquimod for Nodular and Superficial Basal Cell Carcinoma: 5-Year Results of the SINS Randomized Controlled Trial. *J Invest Dermatol.* 2017;137:614-9.
81. Papakostas D, Stockfleth E. Topical treatment of basal cell carcinoma with the immune response modifier imiquimod. *Future Oncol.* 2015;11:2985-90.
82. Prokosch V, Thanos S, Spaniol K, Stupp T. Long-term outcome after treatment with 5% topical imiquimod cream in patients with basal cell carcinoma of the eyelids. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;249:121-5.
83. Choontanom R, Thanos S, Busse H, Stupp T. Treatment of basal cell carcinoma of the eyelids with 5% topical imiquimod: a 3-year follow-up study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245(8):1217-20.
84. Muranushi C, Olsen CM, Green AC, Pandeya N. Can oral nonsteroidal antiinflammatory drugs play a role in the prevention of basal cell carcinoma? A systematic review and metaanalysis. *J Am Acad Dermatol.* 2016;74:108-19.e1.
85. Bettencourt MS. Treatment of superficial basal cell carcinoma with ingenol mebutate gel, 0.05%. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2016;9:205-9.
86. Strom TJ, Caudell JJ, Harrison LB. Management of BCC and SCC of the Head and Neck. *Cancer Control.* 2016;23:220-7. РАДИОТХ
87. Strom T, Harrison LB. Radiotherapy for management of basal and squamous cell carcinoma. *Curr Probl Cancer.* 2015;39:237-47.
88. Cho M1, Gordon L, Rembielak A, Woo TC. Utility of radiotherapy for treatment of basal cell carcinoma: a review. *Br J Dermatol.* 2014;171:968-73.
89. Zou Y, Zhao Y, Yu J, Luo X, Han J, et al. Photodynamic therapy versus surgical excision to basal cell carcinoma: meta-analysis. *J Cosmet Dermatol.* 2016;15:374-82.
90. Fargnoli MC, Peris K. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma. *Future Oncol.* 2015;11:2991-6.
91. Kotimäki J. Photodynamic therapy of eyelid basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009;23:1083-7.

92. Lindgren G, Larkö O. Cryosurgery of eyelid basal cell carcinomas including 781 cases treated over 30 years. *Acta Ophthalmol.* 2014;92:787-92.
93. Migden MR, Chang ALS, Dirix L, Stratigos AJ, Lear JT. Emerging trends in the treatment of advanced basal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2017;64:1-10.
94. Puig S, Berrocal A. Management of high-risk and advanced basal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol.* 2015;17:497-503.
95. Gerring RC, Ott CT, Curry JM, Sargi ZB, Wester ST. Orbital exenteration for advanced periorbital non-melanoma skin cancer: prognostic factors and survival. *Eye (Lond).* 2017;31:379-88.
96. Hoffman GR, Jefferson ND, Reid CB, Eisenberg RL. Orbital Exenteration to Manage Infiltrative Sinonasal, Orbital Adnexal, and Cutaneous Malignancies Provides Acceptable Survival Outcomes: An Institutional Review, Literature Review, and Meta-Analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2016;74:631-43.
97. O'Halloran L, Smith H, Vinciullo C. Periocular Mohs micrographic surgery in Western Australia 2009-2012: A single centre retrospective review and proposal for practice benchmarks. *Australas J Dermatol.* 2017;58:106-10.
98. Michelotti B, Mathis R, Roberts J, Travelute C, Billingsley E, Wilkinson M. Periorbital Mohs reconstruction: characterization of tumor histology, anatomic location, and factors influencing postoperative complications. *Dermatol Surg.* 2014;40:1084-93.
99. Narayanan K1, Hadid OH, Barnes EA. Mohs micrographic surgery versus surgical excision for periocular basal cell carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;(2):CD007041.
100. Gillett CE, Barnes DM. Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol* 1998;51:310-6.
101. Takisawa H, Mimura S, Kubota Y. Eucariotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:690-6.
102. Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *Stem Cells* 2001;19:88-91.
103. Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, et al. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci.* 2001;114:2027-41.
104. Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:333-74.
105. Bury J, Cross S. Molecular biology in diagnostic histopathology: Part I - The cell cycle. *Current Diagnostic Pathol* 2003;9:266-75.

106. van den Heuvel S. Cell-cycle regulation. *WormBook*. 2005;21:1-16
107. Blow JJ, Dutta A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:476-86.
108. Arias EE, Walter JC. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev*. 2007;21:497-518.
109. Sclafani RA, Holzen TM. Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet*. 2007;41:237-80.
110. Li C, Jin J. DNA replication licensing control and rereplication prevention. *Protein Cell*. 2010;1:227-36.
111. Karimi S, Sadr M. Mini-Chromosome Maintenance Protein Family: Novel Proliferative Markers - The Pathophysiologic Role and Clinical Application. In: DNA Replication and Related Cellular Processes. Edited by: Kušić-Tišma J. *InTech*, 2011:1-14.
112. 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.
113. Wojnar A, Kobierzycki C, Krolicka A, Pula B, Podhorska-Okolow M, et al. Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes. *Sci China Life Sci*. 2014;57:482-7.
114. Maine GT, Sinha P, Tye BK. Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics*. 1984; 106:365-85.
115. Kearsley SE, Labib K. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta*. 1998;1398:113-36.
116. Tye BK. MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:649-86.
117. Lei M, Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci*. 2001;114:1447-54.
118. Labib K, Diffley JF. Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11:64-70.

119. Madine MA, Swietlik M, Pelizon C, Romanowski P, Mills AD, et al. The roles of the MCM, ORC, and CDC6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. *J Struct Biol.* 2000;129:198-210.
120. Laskey RA, Madine MA. A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks. *EMBO Rep.* 2003;4:26-30.
121. Gozuacik DM, Chami D, Lagorce J, Faivre Y, Murakami O, et al. Identification and functional characterization of a new member of the human Mcm protein family: hMCM8. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:570-9.
122. Bailis JM, Forsburg SL. MCM proteins: DNA damage, mutagens and repair. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14:17-21.
123. Yu Z, Feng D, Liang C. Pairwise interactions of the six human MCM protein subunits. *J Mol Biol.* 2004;340:1197-206.
124. Yoshida K. Identification of a novel cell-cycle-induced MCM family protein MCM9. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:669-74.
125. Maiorano D, Lutzmann M, Mechali M. MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:130-6.
126. Evrin C, Clarke P, Zech J, Lurz R, Sun J, et al. A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:20240-5.
127. Moore K, Aves SJ. MCM10 and DNA replication in fission yeast. In: The Eukaryotic cell cycle. Edited by: Bryant JA, Francis D. *Abingdon: Taylor and Francis;* 2008:45-69.
128. 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 (Praba).* 2011;57(1):3-11.
129. 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.

130. Sanchez-Berrondo J, Mesa P, Ibarra A, Martínez-Jiménez MI, Blanco L, et al. Molecular architecture of a multifunctional MCM complex. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:1366-80.
131. Samson RY, Bell SD. MCM loading—an open-and-shut case? *Mol Cell.* 2013;50(4):457-8.
132. Kusunoki S, Ishimi Y. Interaction of human minichromosome maintenance protein-binding protein with minichromosome maintenance 2-7. *FEBS J.* 2014;281:1057-67.
133. Sandal T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *Oncologist.* 2002;7:73-81.
134. Alison MR, Hunt T, Forbes SJ. Minichromosome maintenance (MCM) proteins may be pre-cancer markers. *Gut.* 2002;50:290-1.
135. Ha SA, Shin SM, Namkoong H, Lee H, Cho GW, et al. Cancer-associated expression of minichromosome maintenance 3 gene in several human cancers and its involvement in tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 2004;10: 8386-95.
136. Tachibana KE, Gonzalez MA, Coleman N. Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *J Pathol.* 2005;205:123-9.
137. Tachibana KE, Gonzalez MA, Coleman N. Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *J Pathol.* 2005;205:123-9.
138. Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, Coleman N. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res.* 1999;5:2121-32.
139. Shetty A, Loddo M, Fanshawe T, Prevost AT, Sainsbury R, et al. DNA replication licensing and cell cycle kinetics of normal and neoplastic breast. *Br J Cancer.* 2005;93:1295-300.
140. Giaginis C, Georgiadou M, Dimakopoulou K, Tsourouflis G, Gatzidou E, et al. Clinical significance of MCM-2 and MCM-5 expression in colon cancer:

- association with clinicopathological parameters and tumor proliferative capacity. *Dig Dis Sci*. 2009;54:282-91.
141. 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.
142. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Evidence of increased islet cell proliferation in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2010;53:2020-8.
143. Qian Zh, Leung-Pineda V, Xuan B, Piwnica-Worms H, Yu D. Human cytomegalovirus protein pUL117 targets the mini-chromosome maintenance complex and suppresses cellular DNA synthesis. *PLoS Pathogens* 2010;6:1-14 (e1000814).
144. Gambichler T, Breininger A, Rotterdam S, Altmeyer P, Stücker M, et al. Expression of minichromosome maintenance proteins in Merkel cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;23:1184-8.
145. 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; 49:125–32.
146. Gambichler T, Shtern M, Rotterdam S, Bechara FG, Stücker M, et al. Minichromosome maintenance proteins are useful adjuncts to differentiate between benign and malignant melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 2009;60:808-13.
147. 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;58:750–4.
148. 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.

149. 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.
150. Stojkovic-Filipovic J, Brasanac D, Bosic M, Boricic N, Lekic B. Expression of minichromosome maintenance proteins in actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2016 Jun 13. [Epub ahead of print]
151. Toyokawa G, Masuda K, Daigo Y, Cho HS, Yoshimatsu 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.
152. Kikuchi J, Kinoshita I, Shimizu Y, Kikuchi E, Takeda K, et al. Minichromosome maintenance (MCM) protein 4 as a marker for proliferation and its clinical and clinicopathological significance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2011;72:229-37.
153. 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;19:4259-66.
154. Fujioka S, Shomori K, Nishihara K, Yamaga K, Nosaka K, et al. Expression of minichromosome maintenance 7 (MCM7) in small lung adenocarcinoma (pT1): prognostic implication. *Lung Cancer.* 2009;65:223-9.
155. 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;71:193-200.
156. Tan DF, Huberman JA, Hyland A, Loewen GM, Brooks JS, et al. MCM2 - a promising marker for premalignant lesions of the lung: a cohort study. *BMC Cancer.* 2001;1:6.
157. Ahn JH, Chan HK. Expression of minichromosome maintenance protein 7 and Smad 4 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Korean J Pathol.* 2010;44:346-53.

158. Kato H, Miyazaki T, Fukai Y, Nakajima M, Sohda M, 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.
159. Going JJ, Keith WN, Neilson L, Stoeber K, Stuart RC, et al. 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.
160. Williams GH, Swinn R, Prevost AT, De Clive-Lowe P, Halsall I, et al. Diagnosis of oesophageal cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in gastric aspirates. *Br J Cancer.* 2004;91:714-19.
161. Chatrath P, Scott IS, Morris LS, Davies RJ, Rushbrook SM, et al. Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki-67 in laryngeal squamous epithelial lesions. *Br J Cancer.* 2003;89:1048-54.
162. 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.
163. Tamura T, Shomori K, Haruki T, Nosaka K, Hamamoto Y, 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.
164. Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT, Speight PM. Expression of MCM2, geminin and Ki-67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous cell carcinomas. *Br J Cancer.* 2009;100:1128-34.
165. Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, et al. Minichromosome maintenance 2 is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2003;32:468-74.
166. Kodani I, Shomori K, Osaki M, Kuratate I, Ryoike K, et al. 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.
167. 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;94:1170-5.
168. Szelachowska J, Dziegiel P, Jelen-Krzyszewska J, Jelen M, Matkowski R, et al. MCM-2 protein expression predicts prognosis better than Ki-67 antigen in oral cavity squamocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2006;26:2473-8.
169. 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;40:352-8.
170. 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;37:309-18.
171. Ayaru L, Stoeber K, Webster GJ, Hatfield AR, Wollenschlaeger A, et al. Diagnosis of pancreaticobiliary malignancy by detection of minichromosome maintenance protein 5 in bile aspirates. *Br J Cancer*. 2008;98(9):1548-54.
172. Cho Mar K, Eimoto T, Nagaya S, Tateyama H. Cell proliferation marker MCM2, but not Ki-67, is helpful for distinguishing between minimally invasive follicular carcinoma and follicular adenoma of the thyroid. *Histopathology*. 2006;48:801-7.
173. 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;90:4703-9.
174. Giaginis C, Giagini A, Tsurouflis G, Gatzidou E, Agapitos E, Kouraklis G, Theocharis S. MCM-2 and MCM-5 expression in gastric adenocarcinoma: clinical significance and comparison with Ki-67 proliferative marker. *Dig Dis Sci*. 2011;56:777-85.

175. Shomori K, Nishihara K, Tamura T, Tatebe S, Horie Y, et al. Geminin, Ki-67, and minichromosome maintenance 2 in gastric hyperplastic polyps, adenomas, and intestinal-type carcinomas: pathobiological significance. *Gastric Cancer*. 2010;13:177-85.
176. 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;47:289-96.
177. Tokuyasu N, Shomori K, Nishihara K, Kawaguchi H, Fujioka S, et al. Minichromosome maintenance 2 (MCM2) immunoreactivity in stage III human gastric carcinoma: clinicopathological significance. *Gastric Cancer*. 2008;11:37-46.
178. Liu Z, Li J, Chen J, Shan Q, Dai H, et al. MCM family in HCC: MCM6 indicates adverse tumor features and poor outcomes and promotes S/G2 cell cycle progression. *BMC Cancer*. 2018;18:200-10.
179. Das M, Prasad SB, Yadav SS, Govardhan HB, Pandey LK, et al. Over expression of minichromosome maintenance genes is clinically correlated to cervical carcinogenesis. *PLoS One*. 2013;8:e69607.
180. 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;96:1107-11.
181. Murphy N, Ring M, Heffron CC, King B, Killalea AG, et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2005;58:525-34.
182. Murphy N, Ring M, Heffron CC, Martin CM, McGuinness E, 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.

183. Nicol AF, Lapa e Silva JR, Cunha CB, Amaro-Filho SM, Oliveira N, et al. Evaluation of MCM-2 expression in TMA cervical specimens. *PLoS One*. 2012;7:e32936.
184. Shi J, Liu H, Wilkerson M, Huang Y, Meschter S, 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.
185. Gan N, Du Y, Zhang W, Zhou J. Increase of MCM3 and MCM4 expression in cervical squamous cell carcinomas. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2010;31:291-4.
186. Li SS, Xue WC, Khoo US, Ngan HY, Chan KY, et al. Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis. *Histopathology*. 2005;46:307-13.
187. Davidson EJ, Morris LS, Scott IS, Rushbrook SM, Bird K, 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.
188. Dudderidge TJ, Stoeber K, Loddo M, Atkinson G, Fanshawe T, et al. MCM2, Geminin, and Ki-67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2510-7.
189. 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;8:1075-81.
190. Facoetti A, Ranza E, Benericetti E, Ceroni M, Tedeschi F, et al. Minichromosome maintenance protein 7: a reliable tool for glioblastoma proliferation index. *Anticancer Res*. 2006;26:1071-5.
191. Söling A, Sackewitz M, Volkmar M, Schaarschmidt D, Jacob R, et al. Minichromosome maintenance protein 3 elicits a cancer-restricted immune response in patients with brain malignancies and is strong independent predictor of

- survival in patients with anaplastic astrocytoma. *Clinical Cancer Research*. 2005;11:249-58.
192. Saydam O, Senol O, Schaaij-Visser TBM, Pham TV, Piersma SR, et al. Comparative protein profiling reveals minichromosome maintenance (MCM) proteins as novel potential tumor markers for meningiomas. *J Proteome Res*. 2010;9:485–94.
193. Ferenc T, Kopczynski J, Stalinska L, Tosik D, Sidor M, et al. Minichromosome maintenance (MCM) and AgNOR proteins expression in desmoid tumours: a tissue microarray analysis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010;48:581-8.
194. Gakiopoulou H, Korkolopoulou P, Levidou G, Thymara I, Saetta A, 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;97:1124-34.
195. Xue WC, Khoo US, Ngan HY, Chan KY, Chiu PM, et al. Minichromosome maintenance protein 7 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with Ki67, PCNA and clinicopathological parameters. *Histopathology*. 2003;43:485-90.
196. Wojnar A, Kobierzycki C, Krolicka A, Pula B, Podhorska-Okolow M, et al. Correlation of Ki-67 and MCM-2 proliferative marker expression with grade of histological malignancy (G) in ductal breast cancers. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010;48:442-6.
197. Cobanoglu U, Mungan S, Gundogdu C, Ersoz S, Ozoran Y, et al. The expression of MCM-2 in invasive breast carcinoma: a stereologic approach. *Bratisl Lek Listy*. 2010;111:45-9.
198. Reena RM, Mastura M, Siti-Aishah MA, Munirah MA, Norlia A, et al. Minichromosome maintenance protein 2 is a reliable proliferative marker in breast carcinoma. *Ann Diagn Pathol*. 2008;12:340-3.

199. Gonzalez MA, Pinder SE, Callagy G, Vowler SL, Morris LS, et al. Minichromosome maintenance protein 2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21:4306-13.
200. 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;125:407-12.
201. Guzińska-Ustymowicz K, Stepień E, Kemon A. MCM2, Ki-67 and PCNA protein expression in pT3G2 colorectal cancer indicated lymph node involvement. *Anticancer Res.* 2008;28:451-7.
202. Nishihara K, Shomori K, Fujioka S, Tokuyasu N, Inaba A, et al. Minichromosome maintenance protein 7 in colorectal cancer: implication of prognostic significance. *Int J Oncol.* 2008;33:245-51.
203. Korkolopoulou P, Givalos N, Saetta A, Goudopoulou A, Gakiopoulou H, 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;36:899-907.
204. Kreuter A, Jesse M, Potthoff A, Brockmeyer NH, Gambichler T, et al. Expression of proliferative biomarkers in anal intraepithelial neoplasia of HIV-positive men. *J Am Acad Dermatol.* 2010;63:490-8.
205. Scarpini C, White V, Muralidhar B, Patterson A, Hickey N, et al. Improved screening for anal neoplasia by immunocytochemical detection of minichromosome maintenance proteins. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:2855-64.
206. Majid S, Dar AA, Saini S, Chen Y, Shahryari V, et al. Regulation of minichromosome maintenance gene family by MicroRNA-1296 and genistein in prostate cancer. *Cancer Res.* 2010;70:2809-18.

207. Ren B, Yu G, Tseng GC, Cieply K, Gavel T, et al. MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer progression. *Oncogene*. 2006;25:1090-8.
208. 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;57:1057-62.
209. 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;7:2712-8.
210. Sington JD, Freeman A, Morris LS, Vowler SL, Arch BN, et al. Minichromosome maintenance protein in myxofibrosarcoma. *Mod Pathol*. 2004;17:235-40.
211. Helfenstein A, Frahm SO, Krams M, Drescher W, Parwaresch R, et al. Minichromosome maintenance protein (MCM6) in low-grade chondrosarcoma: distinction from enchondroma and identification of progressive tumors. *Am J Clin Pathol*. 2004;122:912-8.
212. Suzuki S, Kurata M, Abe S, Miyazawa R, Murayama T, et al. Overexpression of MCM2 in myelodysplastic syndromes: association with bone marrow cell apoptosis and peripheral cytopenia. *Exp Mol Pathol*. 2012;92:160-6.
213. Khodadad K, Karimi S, Esfahani-Monfared Z, Khosravi A, Bandarchi-Chamkhaleh B. Correlation of Minichromosome Maintenance Protein 6 Expression Rate and Clinical Outcome in Patients With Hodgkin's Lymphoma. *Acta Med Iran*. 2017;55:550-5.
214. Karimi Sh, Mohammadi F, Khodadad K, Emami H, Seyfollahi L. High Expression of Minichromosome Maintenance Protein 6 in Classic Hodgkin's Lymphoma Points to a Cell Cycle Arrest in G1 Phase. *Archives of Iranian Medicine* 2008;11: 532 – 8.

215. Szajerka A, Dziegiel P, Szajerka T, Zabel M, Winowski J, et al. Immunohistochemical evaluation of metallothionein, MCM-2 and Ki-67 antigen expression in tumors of the adrenal cortex. *Anticancer Res.* 2008;28:2959-65.
216. Liu H, Takeuchi S, Moroi Y, Lin N, et al. Expression of minichromosome maintenance 5 protein in proliferative and malignant skin diseases. *Int J Dermatol* 2007;46:1171-6.
217. Liaw K, Boyd AS. MCM 2 expression in basal cell carcinomas and trichoepitheliomas. *J Cutan Pathol* 2009;36:1121-2.
218. Lei M. The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005;5:365-80.
219. Simon NE, Schwacha A. The MCM 2-7 replicative helicase: a promising chemotherapeutic target. *Biomed Res Int.* 2014;2014:549719.
220. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998;4:844-7.
221. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *BioTechniques.* 2004;36:98-105.
222. Jasani B, Rhodes A. The roles and mechanism of high-temperature antigen retrieval in diagnostic pathology. *Current Diagnostic Pathology.* 2001;7:153-60.
223. Dodson A. Modern methods for diagnostic immunocytochemistry. *Current Diagnostic Pathology.* 2002;8:113-22.
224. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9:676–82.

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

AJCC - енгл. *American Joint Committee on Cancer*, Амерички здружени комитет за канцер

ANOVA - енгл. *Analysis of Variance*, анализа варијансе

BAX – енгл. *Bcl-2-Associated X protein*; протеин X удружен са Bcl-2

BCC - енгл. *Basal Cell Carcinoma*; базоцелуларни карцином коже

Bcl-2 – енгл. *B-cell Lymphoma 2*, Б-ћелијски лимфом 2

Г - пауза (енгл. *gap*)

ДАБ - диамино-бензидин

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

DPI - енгл. *Dots Per Inch*; тачака по инчу

ИХХ – имунохистохемијско

Ки-67 – маркер пролиферације (Ки – од *Kiel*, град у Немачкој)

М – митоза

МЦМ - енгл. *MiniChromosome Maintenance*; одржавање минихромозома

PTCH - енгл. *patched*; уметнути

PCNA - енгл. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*; једарни антиген пролиферишућих ћелија

pH – енгл. *potential of Hydrogen*; потенцијал водоникових јона

С - синтеза (ДНК)

СД - стандардна девијација

SMO - енгл. *smoothened*; заглаћени

SPSS - енгл. *Statistical Package for Social Sciences*

SCC - енгл. *Squamous Cell Carcinoma*; сквамоцелуларни карцином

SHH - енгл. *sonic hedgehog*; звучни јеж

TIFF – енгл. *Tagged Image File Format*; означени формат слике

ТМН - ткивни микрониз

ТНМ – Тумор Нодус (лимфни чвор) Метастаза

TP53 – енгл. *Tumor Protein p53*, туморски протеин *p53*

UICC - енгл. *Union for International Cancer Control*; Унија за интернационалну контролу канцера

УВ - ултравиолетно

ХЕ - хематоксилин-еозин

HPV - енгл. *Human Papilloma Virus*; хумани папилома вирус

CD – енгл. *Cluster of Designation*; кластер означавања

WHO - енгл. *World Health Organization*; Светска здравствена организација

ОСНОВНИ БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ, СТРУЧНА БИОГРАФИЈА, ДИПЛОМЕ И ЗВАЊА ДОКТОРАНДА

Др Дејан (Миленко) Рашић рођен је 14. II 1969. године у Београду. Основну и средњу школу (гимназију) завршио је у Земуну са одличним успехом. Одслужио је војни рок. Ожењен, отац двоје деце.

Др Рашић је стално запослен на Клиници за очне болести Клиничког центра Србије од 07. V 2003. године. Ради као лекар VI одељења Клинике – Одељења за туморе ока и аднекса ока, сузне путеве и болести орбите од 2003. године, начелник је Кабинета за офталмопатологију Клинике од октобра 2009. године, а од јануара 2018. године именован је за директора Службе за патохистологију Клиничког центра Србије.

Др Дејан М. Рашић је магистар медицинских наука из области из цитологије, хистохемије, електронске микроскопије и ембриологије.

Дејан М. Рашић уписао је Медицински факултет Универзитета у Београду школске 1988/89. године.

Дипломирао је 14. VII 1995. године просечном оценом 8,10 одбраном дипломског рада под насловом: „Инфекције ока изазване хламидијама” (ментор доц. др Наталија Косановић-Јаковић), за који је добио оцену 10.

Обавио је обавезан лекарски стаж у трајању од годину дана и положио стручни испит 1996. године.

Последипломске студије из Цитологије, хистохемије, електронске микроскопије и ембриологије уписао школске 1995/96. године, а усмени магистарски испит положио 24. X 1997. године оценом 10.

Одбранио је магистарску тезу под насловом: „Рани постнатални развој ока пацова – од рођења до отварања ока” (ментор проф. др Зоран Латковић), 24. IV 2002. године.

Специјалистички стаж из офталмологије започео је, као волонтер, 11. VI 1997. године, а специјалистички испит положио 15. I 2003. године са одличним успехом.

Специјалистички стаж из Патолошке анатомије започео 01. XI 2003. године, а специјалистички испит положио 08. VII 2009. године са врлодобрим успехом.

Као стипендиста Европског удружења офталмолога (*Societas Ophthalmologica Europea*) провео 4 недеље на усавршавању (*fellowship*) из офталмо-онкологије и офталмо-патологије у Универзитетској очној болници у Хелсинкију, код проф. др Терио Кивеле (*Tero Kivelä*), новембра 2005. године.

Учесник је петодневног курса из педијатријске офталмологије (*3rd LECOP Paediatric Ophthalmology Course*) у Прагу, априла 2006. године.

Од 2010. године ради и на скринингу ретинопатије превремено рођених у ГАК „Народни фронт”.

Учесник и излагач на тродневном међународном Симпозујуму/радионици о ретинопатији превремено рођених (*Workshop on Retinopathy of Prematurity*) у Новом Саду, октобра 2007. године.

Учесник тродневног Интернационалног напредног курса из хирургије катаракте у организацији Чешког друштва за рефракциону и хирургију катаракте (*International Cataract Course ČSRKCH*) у Прагу, новембра 2007. године.

Изабран је за асистента на Катедри офталмологије маја 2008. године и у том звању је био следећих 8 година.

Изабран (једногласно!) за редовног члана Европског офталмо-патолошког друштва (*EOPS*) јуна 2008. године.

Изабран за учесника седмодневног Семинара из офталмологије у организацији Америчко-Аустријске фондације (*American-Austrian foundation, AAF*) одржаном априла 2012. године у Салцбургу.

Власник је лиценце број 109449 (издате 01. I 2009. која важи до 31. XII 2022.).

Члан је Српског лекарског друштва, Удружења офталмолога Србије, као и Удружења за хирургију катаракте и рефракциону хирургију Србије.

Др Дејан М. Рашић има 21 годину искуства бављења офталмологијом (од тога 15 као лекар специјалиста) и преко 20.000 урађених хируршких интервенција из најразличитијих области офталмохирургије, и 15 година искуства бављења офталмопатологијом (од тога 9 као специјалиста) са око 1500-2000 биопсија годишње.

До сада, **аутор је и коаутор 117 радова и поглавља у књигама и практикумима** из области офталмологије и офталмопатологије, као и једне монографије. Од тога, **посебно треба истаћи коауторство у 13 поглавља последње (из 2018. године) класификације тумора ока Светске здравствене организације.**

Цитираност (јун 2018.) према *Research Gate*-у је 85 (RG скор 18,53; *h*-индекс 5), а према *SCOPUS*-у је 72.

ПРИЛОГ 1

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписани Дејан М. Рашић

Број уписа: _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај експресије протеина одржавања минихромозома 2, 5 и 7 у базоцелуларном карциному коже периокуларне регије

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



У Београду, 29. III 2018.

Потпис докторанда

ПРИЛОГ 2

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора Дејан М. Рашић

Број уписа: _____

Наслов рада: „Значај експресије протеина одржавања минихромозома 2, 5 и 7 у базоцелуларном карциному коже периокуларне регије”

Ментор: Проф. др Димитрије Брашанац

Потписани



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

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

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.



У Београду, 29. III 2018.

Потпис докторанда

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Значај експресије протеина одржавања минихромозома 2, 5 и 7 у базоцелуларном карциному коже периокуларне регије”

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полећини листа).



У Београду, 29. III 2018.

Потпис докторанда

1. Ауторство – Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.