



## Središnja medicinska knjižnica

**Pavić, Ivana (2015) *Značenje imunohistokemijske izraženosti FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u bolesnika s oralnim lihenom planusom [The significance of immunohistochemical expression of FHIT, EGFR and Bcl-2 in patients with oral lichen planus]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.***

<http://medlib.mef.hr/2238>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Pavić**

**Značenje imunohistokemijske izraženosti  
FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u bolesnika s  
oralnim lihenom planusom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Pavić**

**Značenje imunohistokemijske izraženosti  
FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u bolesnika s  
oralnim lihenom planusom**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena na Kliničkom zavodu za patologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu

Voditelj rada : doc.dr.sc. Drinko Baličević

Hvala svim djelatnicima Zavoda za patologiju na čelu s Predstojnikom zavoda prof.dr.sc.Boži Krušlinu što su mi izišli u susret prilikom izrade doktorske disertacije, a mom mentoru doc.dr.sc.Drinku Baličeviću na povjerenju, podršci i konstruktivnim kritikama prilikom izrade ovog rada.

Mojoj obitelji i prijateljima hvala na moralnoj i financijskoj podršci, a kćeri posebno hvala na razumijevanju zbog uskraćenog vremena u njezinu odrastanju koje sam utrošila u izradu doktorske disertacije.

# SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. LIHEN PLANUS I ORALNI LIHEN PLANUS	1
1.1.1. Epidemiologija oralnog lihen planusa	2
1.1.2. Etiologija i patogeneza oralnog lihen planusa	3
1.1.2.1. Autoimunost	3
1.1.2.2. Infekcije	4
1.1.2.3. Psihološki faktori	4
1.1.3. Promjene oralne sluznice i klinička slika oralnog lihen planusa	4
1.2. MORFOLOŠKE PROMJENE I HISTOPATOLOŠKA OBILJEŽJA ORALNOG LIHEN PLANUSA	7
1.2.1. Diferencijalna dijagnoza	9
1.2.2. Prekancerozne lezije i stanja u usnoj šupljini	11
1.3. ORALNA KARCINOGENEZA I ORALNI KARCINOM	15
1.3.1. Oralna karcinogeneza-pregled istraživanja	16
1.3.2. Oralni karcinom	21
1.3.3. Maligna transformacija i problematika u definiranju oralnog lihen planusa kao prekanceroze	23
1.4. KLINIKA, DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE ORALNOG LIHEN PLANUSA	25
1.5. FRAGILNA HISTIDINSKA TRIJADA	26
1.6. RECEPTOR ZA EPIDERMALNI FAKTOR RASTA	30
1.7. Bcl-2	36
2. HIPOTEZA	39
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	40
3.1. Ciljevi rada	40
3.2. Svrha rada	40
4. MATERIJALI I METODE	41
4.1. Materijali	41
4.2. Metode	41
4.3. Statistička analiza	43
5. REZULTATI	44
5.1. OPIS I ANALIZA DEMOGRAFSKIH KARAKTERISTIKA ISPITANIKA I LOKALIZACIJA LEZIJE	44
5.2. OPIS I ANALIZA REZULTATA IMUNOHISTOKEMIJSKIH METODA	47
5.2.1. Karakteristike izraženosti FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u pokrovnom epitelu u odnosu na gustoću subepitelnog upalnog infiltrata	47

5.2.2.	Karakteristike izraženosti FHIT-a u epitelu u oralnom lihen planusu, karcinomu pločastih stanica i zdravoj oralnoj sluznici	50
5.2.3.	Karakteristike izraženosti EGFR-a u epitelu u oralnom lihen planusu, karcinomu pločastih stanica i zdravoj oralnoj sluznici	52
5.2.4.	Karakteristike izraženosti Bcl-2 u epitelu u oralnom lihen planusu, karcinomu pločastih stanica i zdravoj oralnoj sluznici	55
5.2.5.	Karakteristike izraženosti Bcl-2 u subepitelnom upalnom infiltratu u oralnom lihen planusu, karcinomu pločastih stanica i zdravoj oralnoj sluznici	58
5.2.6.	Karakteristike izraženosti FHIT-a u subepitelnom upalnom infiltratu u oralnom lihen planusu, karcinomu pločastih stanica i zdravoj oralnoj sluznici	60
5.2.7.	Korelacije izraženosti FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u epitelu i FHIT-a i Bcl-2 u subepitelnom upalnom infiltratu u odnosu na dob i gustoću upalnog infiltrata u skupinama bolesnika s oralnim lihen planusom i karcinomom pločastih stanica	61
5.2.8.	Korelacije izraženosti FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u epitelu i Bcl-2 i FHIT-a u subepitelnom upalnom infiltratu u skupinama bolesnika s oralnim lihen planusom i karcinomom pločastih stanica	63
6.	RASPRAVA	65
7.	ZAKLJUČAK	72
8.	SAŽETAK	74
9.	SUMMARY	76
10.	LITERATURA	77
11.	ŽIVOTOPIS	92

## POPIS OZNAKA I KRATICA

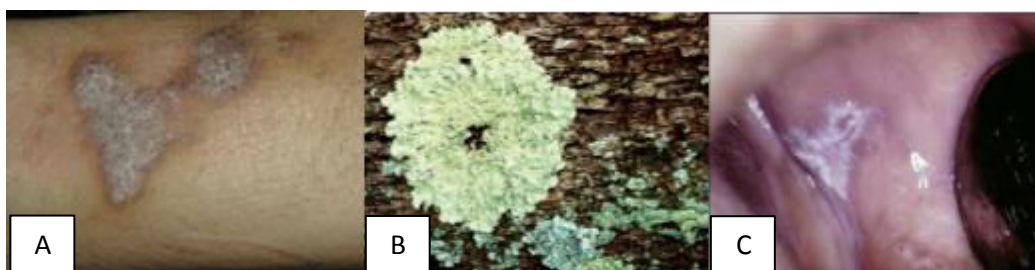
LP	lihen planus
OLP	oralni lihen planus
OM	oralna mukoza
WHO	World Health Organization (Svjetska zdravstvena organizacija)
HPV	humani papiloma virus
MHC	major histocompatibility complex (glavni kompleks histokompatibilnosti)
HLA	human leukocyte antigen (humani leukocitni antigen)
HCV	hepatitis C virus
OLL	oralna lihenoidna lezija
GvHD	Graft versus Host Disease (reakcija presatka na domaćina)
LE	lupus erythematosus
DLE	diskoidni lupus erythematosus
IARC	International Agency on Cancer Research (Međunarodna agencija za istraživanje raka)
OSCC	oral squamous cell carcinoma (oralni karcinom, karcinom pločastih stanica usne šupljine)
CIS	karcinom in situ
SCC	squamous cell carcinoma (karcinom pločastih stanica)
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma (pločasti karcinom glave i vrata)
LOH	Loss of heterozygosity (gubitak heterozigotnosti)
EGFR	epidermal growth factor receptor (receptor za epidermalni faktor rasta)
MYC	regulatorni gen koji kodira transkripcijski faktor
ERBB2	HER2 (od engl. human epidermal growth factor receptor 2) (receptor za humani epidermalni faktor rasta 2)
Mycmax	myc-om posredovan faktor X protein kodiran <i>MAX</i> genom (od engl. myc-associated factor X protein)
Maxmad	grupa transkripcijskih faktora koji aktiviraju ili zaustavljaju transkripciju
FHIT	fragilna histidinska trijada
CSF	common fragile sites (uobičajena ranjiva regija)

## 1. UVOD

Kriteriji WHO-a uvrštavaju oralni lihen planus u prekanceroznu leziju usne šupljine. Raznolikost kliničkih oblika, minimalna simptomatologija i sličnost s drugim bolestima dodatno otežava prepoznavanje bolesti, a moguća maligna transformacija, upućuju na to da je rani histopatološki nalaz nužan dijagnostički postupak. Epidemiološki podaci koji upozoravaju da je oralni karcinom jedan od deset najčešćih uzroka smrti naglašavaju potrebu poznavanja svih faza razvoja oralnog lihen planusa kao prekanceroze. Statistički značajne razlike u testiranju navedenih imunohistokemijskih biljega u oralnom lihen planusu će doprinijeti boljem razumijevanju razine stupnja izloženosti riziku za nastanak oralnog karcinoma.

### 1.1. LIHEN PLANUS I ORALNI LIHEN PLANUS

Lihen planus (LP) je bolest čije bjelkaste pruge podsjećaju na simbiotski mikroorganizam mahovine i gljiva (lichen) koje rastu u obliku plosnatih nodularnih formacija koje čine bijela tanka vlakna (1, 2). LP je neinfektivna, pruritička, kronična mukokutana bolest čija je etiologija još uvijek nedovoljno razjašnjena iako je autoimuna geneza ove bolesti najvjerojatnija (3, 4). Česta je bolest srednje životne dobi s medijanom pojavljivanja oko 40 godina, i to češće u žena (3, 4). Kožne promjene u LP-u se opisuju kao ljubičaste, poligonalne, planarne, pruritičke papule te plakovi najčešće na površini pregibnih područja nogu i ruku, posebice oko ručnih zglobova (5). Mogu se javiti i na ležištu noktiju, u obliku stanjivanja i subungualne keratoze, praćene pruganjem noktiju, a rjeđe i na drugim lokalizacijama kao što su sluznica genitalne regije i jednjaka (4). Opisane promjene ponekad se mogu javiti i na vlasištu, kada zbog neadekvatnog ili izostalog liječenja, ova promjena može dovesti do ožiljkavanja te trajnog gubitka kose (5).



*Slika 1. Lihen; A: koža, B: mahovina, C: usna šupljina (4).*



## **Oralni lihen planus**

Oralni lihen planus (OLP) prvi je opisao 1869. godine Wilson kao kroničnu upalnu bolest oralne sluznice (oralna mukoza; OM) koja za razliku od lihena kože ima tendenciju spontane regresije (2, 6). U usnoj šupljini najčešće višestruko i simetrično zahvaća obje strane obrazne sluznice (2, 6). Značaj sveobuhvatnog poznavanja ove promjene proizlazi iz činjenice da ju je Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organization; WHO) 1978. godine uvrstila u skupinu prekanceroznih lezija usne šupljine skupa s leukoplakijom, eritroplakijom, nepčanom lezijom nastalom pušenjem cigareta i cigara, oralnom submukoznom fibrozom, diskoidnim lupusom eritematozusom, uz nasljedne poremećaje kao što su nasljedna diskeratoza i bulozna epidermoliza (7-9). Nejasna etiologija, eventualna povezanost s faktorima rizika iz grupe navika i ovisnosti, različitost morfološkog izgleda, problemi dijagnostike i terapije, te ustanovljeni maligni potencijal, naglašavaju potrebu i značaj poznavanja svih aspekata ove bolesti (7, 10).

### **1.1.1. Epidemiologija oralnog lihena planusa**

Oralni karcinom prema epidemiološkim podacima predstavlja 3% ukupnog broja svih karcinoma u populaciji pri čemu se nešto češće javlja u muškaraca dok je u djece vrlo rijedak (8, 11). Na povezanost OLP-a kao prekanceroze i karcinoma usne šupljine upućuju epidemiološki podaci o visokom postotku pojavljivanja ove prekanceroze u zemljama s visokom incidencijom oralnog karcinoma kao što su neke zemlje Jugoistočne Azije (posebno Indija) u kojima oralni karcinom čini gotovo 40% svih zloćudnih bolesti (12). Na čvrstu povezanost prekanceroznih lezija i karcinoma usne šupljine upućuje podatak da se OLP znatno češće javlja u područjima gdje je incidencija oralnog karcinoma visoka (7). Iako je usna šupljina značajan rezervoar humanog papiloma virusa (HPV), brojni istraživači smatraju da tek interakcijom s ostalim faktorima (na primjer duhan i alkohol) rizik ove infekcije ima ulogu u razvoju oralnih prekanceroza i konačno karcinoma (13). Prevalencija OLP-a varira od 0,1%-4% ovisno o veličini promatrane populacije te demografskim karakteristikama, češći je u žena dok se u djece javlja vrlo rijetko (3, 14-17). OLP je jedan od najčešćih oralnih bolesti čija je incidencija gotovo podjednako rasprostranjena u cijelom svijetu, te varira od 1,27% (kao što je u Europi) do gotovo 6,5% (zemlje Jugoistočne Azije; posebno Indija, Malezija i Tajland) (13-15, 18, 19). U istraživanju incidencije OLP-a u Hrvatskoj, Lončar Brzak i sur. na uzorku od 12 508 pacijenata utvrdili su incidenciju od 4,3%, češću u žena starije srednje životne dobi pri čemu je retikularni oblik ove bolesti bio najčešće dijagnosticiran (18).

### 1.1.2. Etiologija i patogeneza oralnog lihen planusa

Točna etiopatogeneza OLP-a je nepoznata, no prevladava mišljenje da se radi o posljedici autoimunog poremećaja pri čemu se kao promotori navode virusi, lijekovi, zubni materijal, lokalna trauma, hipersenzitivna reakcija nakon transplantacije, a čini se kako psihogeni čimbenici imaju određeni utjecaj na nastanak ove bolesti.

#### 1.1.2.1. Autoimunost

Kao i u mnogih drugih prekanceroza, etiologija i patogeneza OLP-a, i dalje su nepoznate (10). U današnje vrijeme najšire se prihvaća prethodno spomenuta etiopatogenetska hipoteza; da je OLP stanicama posredovana autoimunološka bolest čiji je nastanak potaknut antigenskom transformacijom površine stanica bazalnog sloja epitela (3, 20, 21). Hipoteza sugerira da se u OLP-u radi o T-stanicama posredovanoj autoimunoj bolesti u kojoj su autocitotoksične CD8+T stanice okidač („trigger“) koji započinje apoptozu oralnih epitelih stanica (20, 22). T stanice (limfociti) i makrofazi čine gusti subepitelni upalni infiltrat u OLP-u uz nalaz i povećanog broja intraepitelih T limfocita. Većina intraepitelih T limfocita u blizini oštećenih bazalnih keratinocita su aktivirani CD8+T (citotoksični) limfociti koji u ranim fazama formiranja lezija OLP-a mogu prepoznati antigen povezan s glavnim kompleksom histokompatibilnosti (MHC) klase I na keratinocite (22). To zapravo znači da se u ranoj fazi formiranja OLP lezija, CD8+T limfociti mogu prepoznati antigenom povezanim s glavnim kompleksom histokompatibilnosti klase I na keratinocite (22). Nakon antigenskog prepoznavanja i aktivacije, CD8+ citotoksični T limfociti mogu izazvati apoptozu keratinocita. Aktivirane CD8+ T stanice (eventualno i keratinociti) mogu osloboditi citokine koji privlače dodatne limfocite unutar nastajuće lezije (20). Čini se kako bolesnici s OLP-om imaju više serumske koncentracije protutijela usmjerenih prema dezmozogleinu (porodica kadherina) u usporedbi sa zdravom populacijom što može objasniti utjecaj autoimune bolesti na patogenezu OLP-a (23).

Dosadašnja saznanja sugeriraju mnoge moguće čimbenike koji djeluju kao promotori nastanka OLP-a mehanizmom indukcije strukturnih promjena površine keratinocita, a dijele se u obiteljske i neobiteljske slučajeve (8, 24).

Bakterije, gljive, virusi, lijekovi i zubni materijali najčešće se spominju u neobiteljskih slučajeva (8, 24-29). OLP se također može javiti i u nekim autoimunim bolestima kao što su alopecia areata, Myasthenia gravis, ulcerozni kolitis i vitiligo (20). U obiteljskih slučajeva važni

su humani leukocitni antigeni (HLA) koji pokazuju da postoji određena genska nasljedna veza u pojavljivanju OLP-a u obiteljskih slučajeva (pogotovo antigeni HLA: A3, A8, B5, B7, B8).

Nadalje, lijekovi koji blagotvorno djeluju na OLP, također mogu sudjelovati u nastanku istoimenih lezija, a pojedine komponente dentalnih materijala mogu biti mogući etiološki faktor koji izaziva alergijsku ili toksičnu reakciju koja uzrokuje lihenoidnu reakciju čije lezije histološki i klinički nalikuju na OLP (26-29).

#### 1.1.2.2. Infekcije

Povezanost OLP-a i infekcije virusom hepatitisa C (HCV) predmet je mnogih kontroverzi počevši od 1991. godine kada se prvi puta opisuje (30, 31). Lodi i suradnici ustanovili su da je u 20 od 25 provedenih studija broj pozitivnih HCV pojedinaca unutar grupe OLP bolesnika bio veći nego u kontrolnoj grupi, naglašavajući da je proporcija HCV pozitivnih pojedinaca s OLP-om viša nego u uspoređujućim kontrolnim skupinama (32).

#### 1.1.2.3. Psihološki faktori

Danas je neprijeporna uloga stresa u nastanku brojnih bolesti, a kako je OM-a vrlo kompleksna i osjetljiva regija, ne iznenađuje podatak o uočenom drugačijem psihološkom statusu oboljelih od ove bolesti u odnosu na zdrave (33, 34). Ivanovski i suradnici utvrdili su određeni nivo povezanosti stresa sa psihosomatizacijom i indukcijom bolesti (35). Lundqvist i suradnici istražili su povećanu depresivnost i anksioznost u OLP bolesnika pri čemu napominju da uočene psihološke reakcije mogu biti rezultat straha od prognoze bolesti te je direktna povezanost s indukcijom bolesti nesigurna (36).

Stoga psihološke promjene povezane s OLP-om brojni autori smatraju faktorom od sekundarnog značaja, kako u nastanku, tako i u ispoljavanju bolesti.

### **1.1.3. Promjene oralne sluznice i klinička slika oralnog lihen planusa**

Klinička slika OLP-a varira, a u mnogih bolesnika ne pravi nikakve subjektivne smetnje, pa tako niti sami bolesnici nisu svjesni svoga stanja (17). OLP se može pojaviti na bilo kojem dijelu sluznice usne šupljine, no po redoslijedu učestalosti najčešće se javlja obostrano na obraznoj sluznici (u do 90% slučajeva), zatim postraničnoj strani jezika i na sluznici desni (3, 19). Neuobičajeno mjesto na kojem je opisan OLP je sluznica nepca, a izuzetno rijetko se javlja na dnu usne šupljine (3, 19). Dijagnoza OLP-a temelji se na kliničkom nalazu promjena sluznice

usne šupljine, anamnestičkim podacima, laboratorijskim nalazima te biopsiji i patohistološkoj verifikaciji lezije (3, 19). Najčešće promjene sluznice koje klinički pobuđuju sumnju na OLP su bjelkasta zadebljanja koja mogu imati mrežolik izgled koji se radijarno širi od centra lezije i nazivaju se Wickhamovim strijama. Na dijagnozu OLP-a upućuju i anamnestički podaci o simetričnosti lezije, recidivu pojavnosti promjena povezanih ponekad s periodima stresa i anksioznosti, promjene na koži trupa, te prisustvo nekih sistemskih bolesti.

Laboratorijske analize kao što su razina jetrenih transaminaza, probavnih fermenta gušterače, lipidi i razina glukoze u krvi su od sekundarnog značaja ali mogu poduprijeti dijagnozu (3, 19).

Biopsijom opisanih promjena usne šupljine i nalazom patohistoloških promjena karakterističnih za OLP, dijagnoza se smatra definitivno potvrđenom.

Klinički se opisuje 6 osnovnih formi OLP-a koje se makroskopski pojavljuju u obliku bijelih promjena (retikularni, papularni i plak oblik) odnosno crvenih promjena (erozivni/ulcerirani, atrofični/eritematozni i bulozni oblik) u usnoj šupljini (Slika 2) (17). U novije vrijeme se sve više spominje OLP koji se naziva deskvamativni gingivitis koji ne predstavlja novi oblik već samo definira smještaj lezije (na sluznici desni), a koja nije povezana s lokalnom traumom niti infekcijom, i može se pojaviti u već opisanih oblika (17).



*Slika 2. Makroskopski izgled i različite lokalizacije OLP-a u usnoj šupljini (37).*

Potrebno je napomenuti da su subjektivni simptomi bolesnika izravno povezani s kliničkim izgledom lezija kao što je prikazano u Tablici 1, a različiti oblici mogu se istodobno naći u istog pacijenta (3, 37-39).

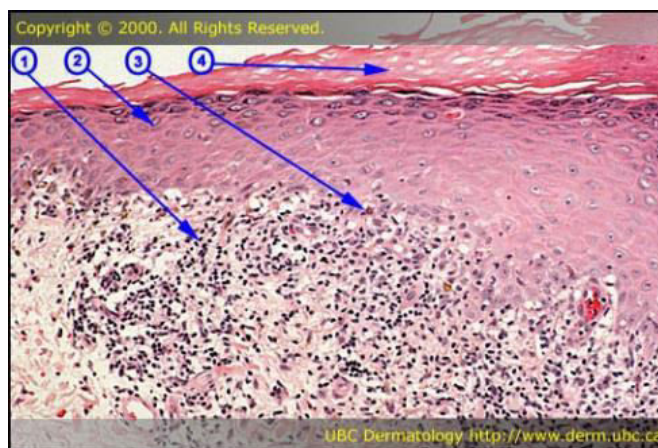
**Tablica 1.** Oblici OLP-a, izgled, lokalizacija, simptomi i učestalost

Klinički tip	Izgled	Najčešća lokalizacija	Simetričnost	Simptomi	Učestalost
Retikularni oblik	Mreža bijelih pruga	Obrazna sluznica, jezik	Obostrano	Obično bez simptoma	75-86%
Papularni oblik (anularni oblik)	Sitne konfluirajuće papule promjera 0,5mm, formiraju plak s erozivnom bazom i uzdignutim rubovima	Obrazna sluznica	Obostrano	Obično bez simptoma	Oko 5%
Plak oblik	Plosnata lezija, nepravilnih oblika (u razini oralne sluznice)	Dorzalna strana jezika, obrazna sluznica	Multifokalna lezija, često i solitaran	Obično bez simptoma	Oko 5%
Atrofični oblik/eritematozni	Eritematozna atrofična sluznica, nejasna granica prema periferiji (u razini oralne sluznice)	Difuzno	Dorzalna strana jezika	Osjetljivost, bol, peckanje	Do 10%
Ulcero/erozivni oblik	Pseudo-membrana (ispod razine oralne sluznice)	Multiple lezije, obrazna sluznica, desni	Obostrano	Bol, peckanje, metalni okus u ustima	7-20%
Bulozni oblik	Bula od nekoliko milimetara do nekoliko centimetara koje pucaju s formiranjem erozivnih lezija (iznad razine oralne sluznice)	Obrazna sluznica	Obostrano	Zatezanje sluznice, bolovi nakon pucanja bula	2%
Deskvamativni gingivitis	Plosnata lezija u obliku eritema, erozija ili ulceracija (u razini i ispod oralne sluznice)	Multicentrične lezije i ponekad solitarne	Desni u neposrednom kontaktu s alveolarnom sluznicom	Peckanje, bolovi	8,6%

## 1.2. MORFOLOŠKE PROMJENE I HISTOPATOLOŠKA OBILJEŽJA ORALNOG LIHEN PLANUSA

OLP je lezija za koju su definirani kompleksni klinički i histopatološki dijagnostički kriteriji (17, 40, 41). Biopsija promjena sluznice usne šupljine i detaljna obrada specijaliste indicirana je u slučajevima kada se nađu izolirana područja jače naglašene bjeline, crvenila, točkaste promjene (žarišta crvenila i bjeline) i izolirana ulceracija koja se ne može povezati s lokalnom traumom (25, 42).

Histološka slika OLP-a u kojoj se nađe hiperkeratotični i akantotični višeslojni pločasti epitel uz nazubljenost i likvefakcijsku degeneraciju bazalnih keratinocita te subepitelni trakasti infiltrat mononukleara, gotovo je identična histološkoj slici kožnog lihen planusa kojeg je prvi opisao Dubreuil 1906. godine, a Shklar i Pindborg su je detaljnije opisali proširivanjem histološko morfoloških kriterija u koje su uključili i koloidna tjelešca (17). Eisenberg potom definira osnovne morfološke kriterije koji moraju biti prisutni u patohistološkom nalazu za potvrdu OLP-a, no za definitivnu potvrdu potrebno je uključiti i makroskopski izgled (kliničku sliku) promjene u usnoj šupljini kako je opisano u Tablici 2 (Slika 3) (8, 38-42).



**Slika 3.** Histološki izgled OLP-a: subepitelni trakasti infiltrat limfocita (strelica 1), hipergranuloza (strelica 2), nekrotični bazalni keratinociti (koloidna tjelešca) (strelica 3) i hiperkeratoza (strelica 4) (40).

Isključujući kriteriji za OLP su odsustvo bazalne likvefakcijske degeneracije, heterogena populacija u upalnom infiltratu (prisustvo neutrofila ili eozinofila), atipična citomorfologija, uvećanje jezgara, povećan broj mitozna, izravnati epidermalni produljci, odsustvo koloidnih tjelešaca i abnormalna keratinizacija (Tablica 2) (10, 25, 40, 43).

**Tablica 2.** Dijagnostički kriteriji za OLP i OLL (17, 44).

<b>Klinički kriteriji*:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Prisustvo obostranih simetričnih lezija.</li><li>• Prisustvo bijelo sivih trakastih retikularnih papula (retikularni izgled).</li><li>• Erozivno-ulcerativni, atrofični, bulozni, u obliku plaka lezije (prihvaćaju se samo uz postojanje retikularno papularnog izgleda na bilo kojoj lokaciji sluznice).</li></ul>
<b>Histopatološki kriteriji†:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Prisustvo dobro formiranog upalnog infiltrata u obliku tračaka, u površinskom dijelu lamine proprije sastavljen ponajprije od limfocita.</li><li>• Znakovi „likvefakcijske degeneracije“ epitelnog bazalnog sloja stanica.</li><li>• Odsutnost epitelne displazije.</li></ul>
<b>Konačna dijagnoza:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Klinički i patohistološki kriteriji moraju se uključiti u konačnu dijagnozu.</li><li>• OLP dijagnoza mora uključivati oba kriterija, klinički i patohistološki</li><li>• OLL dijagnoza upotrebljava se kada:<ol style="list-style-type: none"><li>1. Klinički kompatibilno s OLP, ali histološki nije kompatibilno s OLP.</li><li>2. Histološki kompatibilno s OLP, ali klinički nije kompatibilno s OLP.</li><li>3. Klinički i histološki nije kompatibilan s OLP.</li></ol></li></ul>
*u lezijama koje su slične OLP-u, ali ne ispunjavaju sve kriterije, treba koristiti termin „klinički kompatibilno s“. †kada su histološki kriteriji manje očiti, potrebno je koristiti termin „histološki kompatibilno s“. OLP-oralni lihen planus, OLL-oralna lihenoidna lezija

Potrebno je imati na umu da histopatološke promjene vidljive u OLP-u, iako karakteristične, mogu se naći i u drugim promjenama kao što su lihenoidna reakcija (najčešće na lijekove ili zubni materijal), u reakciji presatka na domaćina (Graft versus Host Disease, GvHD) i mnoge druge (uključujući lupus i kandidijazu) ili pak oponašati ostale prekancerozne lezije i stanja u usnoj šupljini (leukoplakiju, eritroplakiju, oralnu submukoznu fibrozu).

Od ostalih lezija koje se moraju uključiti u diferencijalnu dijagnozu su i lezije u usnoj šupljini koje nalikuju OLP-u no pokazuju određene citomorfološke atipije i mitoze te

predstavljaju dodatni dijagnostički problem, a zajedničkim se imenom opisuju kao lihenoidna displazija (OLP s displazijom) (17, 40-42). OLP s displazijom je termin koji su Krutchkoff i Eisenberg uveli 1985. godine za lezije koje imaju izgled OLP-a ali su displastične (citološka atipija, povećanje jezgara, abnormalna keratinizacija i mitotska aktivnost) (17).

Kako bi se izbjegla konfuzija, napustio se predloženi termin OLP s displazijom, a prihvaćeno je da se displazija epitela s lihenoidnim upalnim infiltratom kategorizira kao druga displastična stanja epitela u usnoj šupljini prema WHO kriterijima za displaziju pločastog epitela (displazija niskog odnosno visokog gradusa) (17).

Varijabilan nalaz u OLP-u uključuje parakeratozu, akantozu uz izduljene i nazubljene produljke bazalnih slojeva epitela nalik „zupcima pile“ i nalazom rascjepa, takozvanih Max-Josephovih prostora koji nastaju degeneracijom bazalnih keratinocita, poremećajem sidrenih vlakana epitela bazalne membrane i bazalnih keratinocita slabeći epitelno vezivni odnos (sučelje, interface) ponekad stvaranjem i mjehurića na OM-i (bulozni OLP) (20, 25, 43).

B limfociti, plazma stanice, imunoglobulini i depoziti komplementa nisu uobičajeni nalaz i stalna promjena u OLP-u, no fibrinogen i fibrin su ponekad linearno raspoređeni u zoni bazalne membrane (20).

Osnovne komponente koloidnih tjelešaca su fibrin, imunoglobulini M, C3, C4 i keratin (20). U žarištima s opsežnim odlaganjem fibrinskih depozita i formiranja koloidnih tjelešaca, imunohistokemijsko bojenje s lamininom i fibronektinom može biti odsutno, označavajući oštećenje bazalne membrane (20).

U dodatne metode detektiranja OLP-a ubraja se i elektronska mikroskopija koja se koristi isključivo u istraživačke svrhe. Ultrastruktura koloidnih tjelešaca utvrđena elektronskim mikroskopom sugerira da se radi o apoptotičkim keratinocitima, a bazalna membrana djeluje izlomljeno, razgranato ili duplicirano (20). U nedavnim istraživanjima detektirano je i fragmentiranje DNA u OLP-u (end labeling metodama) (20).

### **1.2.1. Diferencijalna dijagnoza**

Detaljna dijagnostička obrada bolesnika s dijagnozom OLP-a vrlo je bitna. Dijagnoza se postavlja temeljem anamneze, kliničke slike i patohistološke obrade, a sigurnije se može postaviti kada su prisutne i karakteristične promjene na koži. Osim retikularnog OLP-a kod kojeg su pojave bijelih strija obostrano prisutne na obraznoj sluznici, u mnogim je slučajevima patohistološka pretraga tkiva lezije neophodna za postavljanje konačne dijagnoze.

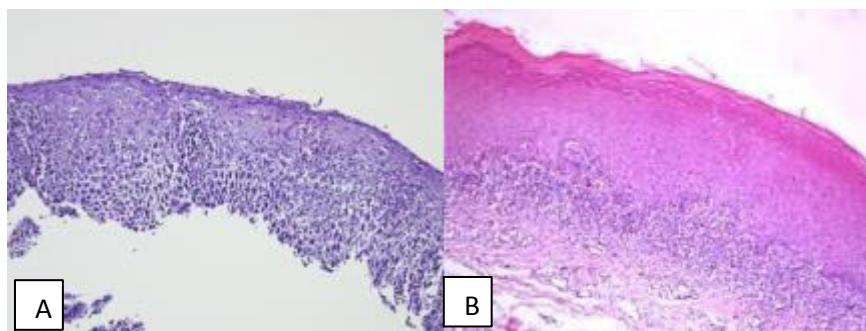


OLP ima kliničke sličnosti s drugim bolestima u usnoj šupljini kao što su lupus erythematosus (LE), oralna kandidijaza, lihenoidna displazija, lihenoidna reakcija (OLL) te leukoplakija.

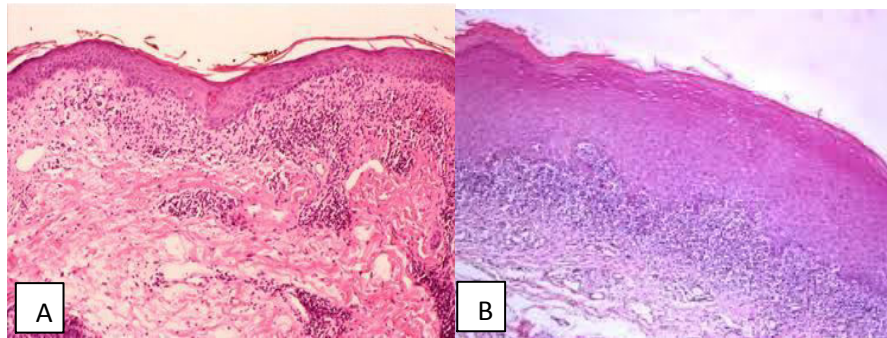
Zbog opsežnosti diferencijalne dijagnoze, OLP dijagnoza ponekad je predmetom i metode isključivanja ostalih bolesti. Na primjer, u diferencijalnoj dijagnozi erozivnog OLP-a potrebno je isključiti i karcinom pločastog epitela, reakciju organa protiv primatelja (ako o tome postoje podaci), diskoidni lupus erythematosus (DLE), kroničnu kandidijazu, benigni pemfigoid mukozne membrane, pemphigus vulgaris, kroničnu iritaciju griženja obraza, eritema multiforme te lihenoidnu reakciju na dentalne amalgamske nadomjestke i lijekove (17). Za bulozni lihen planus pak s druge strane diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze i druge vezikulobulozne bolesti u usnoj šupljini poput pemfigusa vulgarisa i pemfigoida mukozne membrane (17, 44-53).

Najveća važnost ipak pridaje se diferencijalnoj dijagnozi usmjerenoj prema drugim prekanceroznim lezijama i stanjima koje je važno prepoznati i liječiti na vrijeme u svrhu sprečavanja maligne transformacije.

Na Slikama 4-7. prikazana je sličnost OLP-a s drugim lezijama u usnoj šupljini bilo klinički ili histološki (45-53).



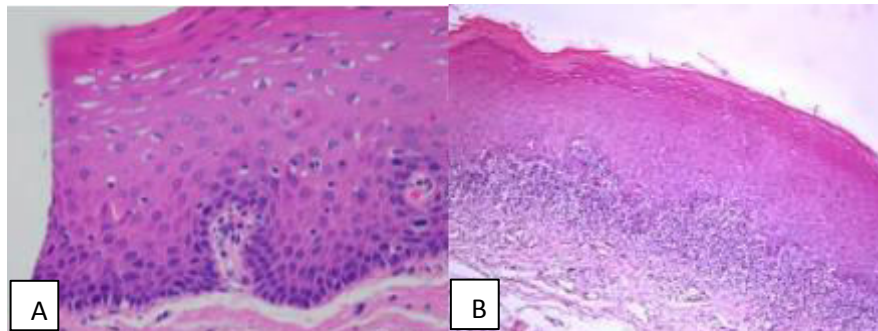
**Slika 4.** Histološke promjene u “graft-versus-host-disease”i oralnom lihen planusu; A: GvHD; B: OLP (46).



**Slika 5.** Histološke promjene u lupusu erythematosusu i oralnom lihen planusu; A: LE, B: OLP (HEx100) (51).



**Slika 6.** Usporedba gljivične infekcije u usnoj šupljini i oralnog lihen planusa; A: kandidijaza; B: OLP (52).



**Slika 7.** Usporedba leukoplakije i oralnog lihen planusa u usnoj šupljini; A: leukoplakija; B: OLP.

### 1.2.2. Prekancerozne lezije i stanja u usnoj šupljini

Prekanceroznim lezijama i stanjima smatraju se leukoplakija, eritroplakija, nepčana lezija nastala pušenjem cigareta i cigara, oralni lihen planus, oralna submukozna fibroza, diskoidni lupus eritematosus, nasljedni poremećaji kao što su nasljedna diskeratoza i bulozna epidermoliza (7).

Klinički prepoznatljive prekancerozne lezije uobičajene su u područjima gdje je incidencija oralnog karcinoma visoka, a upravo 70% oralnih karcinoma se i razvija iz prekanceroznih lezija što je posebice vidljivo u zemljama visoke incidencije oralnog karcinoma (7).

Zbog velikog broja raznih lezija koje makroskopski i vizualno mogu izgledati potpuno jednake, Međunarodna agencija za istraživanje raka (International Agency on Cancer Research; IARC), osmislila je brojne pomoćne orijentacijske tablice kako bi olakšala kliničku dijagnostiku i odluku o postupku biopsije lezija u usnoj šupljini te slanja materijala na patohistološku analizu (Slika 8 A i B).



Homogena leukoplakija smještena na desnom prednjem rubu jezika: dobro formirani plak koji se ne može odljuštiti



Homogena leukoplakija s centralnom fisurom sluznice lijevog obraza



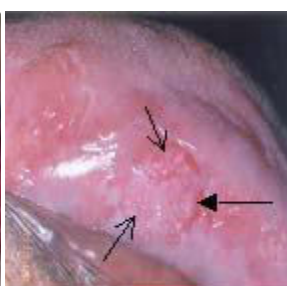
Homogena leukoplakija sluznica desnog obraza: difuzni bijeli plak nalik na otisak prsta



Nehomogena leukoplakija (ulcerozna leukoplakija) desne komisure: bijela lezija s ulceracijom lezijom



Nehomogena leukoplakija (eritroplakija) sluznice desnog obraza s crveno prosijavajućom bijelom na eritematoznoj bazi



Nehomogena leukoplakija (nodularna): desni rub jezika, bijeli noduli (tanke strelice)



Nehomogena leukoplakija (verukozna): izdignuti debeli bijeli plak na desnoj strani dorzuma jezika



Nehomogena leukoplakija (verukozna) tvrdo nepce: difuzni bijeli plak koji zauzima lijevi i središnji dio tvrdog nepca s bradavičastim projekcijama



Eritroplakija: sluznica desnog obraza: crvena baršunasta ovalna lezija

**Slika 8. A:** *Orijentacijska tablica za brzu vizualnu kliničku inspekciju usne šupljine u detekciji prekanceroznih lezija i invazivnih karcinoma; (preuzeto sa IARC <http://screening.iarc.fr/index.php>).*



Oralna submukozna fibroza: bijeljenje sluznice donje usne

Oralna submukozna fibroza: brojne točkaste petehije i generalizirana depapilizacija jezika

Oralna submukozna fibroza koja zahvaća cijelu prednju stranu uz leukoplakiju (debele strelice)



Lihen planus sluznice desnog obraza: prstenasti krugovi (tanka strelica) s uzdignutim bijelim Wickhamovim strijama (debela strelica)

Invazivni karcinom lijeve komisure s uzdignutim rožnatim projekcijama

Maligna transformacija homogene leukoplakije naznačena čvrstim induriranim nodulima (strelice)



Egzofitična proliferacija lijevog ruba jezika: uz prisutnu depapilizaciju jezika

Uznapredovali ulcero-proliferativni oralni karcinom desnog ruba jezika uz prisutnu submukoznu fibrozu

Melanom sluznice lijevog obraza: hiperpigmentacija plaka s nodularnim područjima

**Slika 8. B:** Orijentacijska tablica za brzu vizualnu kliničku inspekciju usne šupljine u detekciji prekanceroznih lezija i invazivnih karcinoma; (preuzeto sa IARC <http://screening.iarc.fr/index.php>).

Najčešće prekanceroze su leukoplakija, eritroplakija, oralna submukozna fibroza i OLP (54).

WHO definira leukoplakiju kao „bjelkasto područje koje klinički i patohistološki nije uzrokom niti jedne bolesti i nije nastalo pod utjecajem bilo fizičkog ili kemijskog agensa, osim uživanja duhana“. Pretpostavlja se da globalna incidencija leukoplakije iznosi oko 2,6%, a da godišnja incidencija na bazi leukoplakije iznosi 6,2 do 29,1 na 100 000 stanovnika (Slika 8 A) (7, 54-58).

Eritroplakija je pak crveno promijenjena sluznica usne šupljine za koju ne postoje druge definicije i karakterizira ju visoka frekvencija maligne transformacije u usnoj šupljini pri čemu se najčešće nalazi u dnu usne šupljine u muškaraca, a u žena se najčešće nalazi na sluznici desni (25, 43).

Oralna submukozna fibroza je ireverzibilno prekancerozno stanje koje je najčešće povezano s navikom žvakanja areka oraščića, a manifestira se u obliku pekućih senzacija, blijedom sluznicom s nalazom palpabilnih fibroznih tračaka obrazne sluznice, mekog nepca i usnica. Rizik maligne transformacije iznosi do 15% unutar 7 godina od dijagnoze (25, 43, 59).

U ovu skupinu prekanceroza ubraja se i OLP u kojem maligna transformacija po nekim istraživanjima iznosi od 0% do 5,3% (Slika 7 B) (11).

### **1.3. ORALNA KARCINOGENEZA I ORALNI KARCINOM**

Povezanost kronične upale i karcinoma poznata je još od 1863. godine kada je Rudolf Virchow pronašao leukocite unutar tumorskog tkiva (60). Kako kronična upala može pogodovati rastu karcinoma još do danas nije razjašnjeno, no postoje dokazi da kronična upala daje poticaj za nastanak nekih tipova karcinoma (60). Dugotrajna infekcija inducira nastanak kroničnog upalnog infiltrata. Leukociti, fagociti i druge upalne stanice produciraju reaktivne oksigenirane i nitrogenizirane radikale koji se normalno bore protiv upalnog infiltrata, ali također mogu potaknuti oštećenje DNA u proliferirajućim stanicama (61). Ponovljena oštećenja i regeneracija u vrlo reaktivnom okolišu prepunom radikala reagira s DNA u proliferirajućem epitelu što na kraju može rezultirati trajnim genomskim promjenama kao što su mutacije, delecije i rearanžiranje (61, 62).

### 1.3.1. Oralna karcinogeneza-pregled istraživanja

Prema međunarodnoj klasifikaciji bolesti i srodnih zdravstvenih problema, oralni karcinom odnosi se na grupu malignih tumora glave i vrata koji nastaju na usnama, jeziku, u žlijezdama slinovnicama, desnima, dnu usne šupljine, orofarinksu, obraznoj sluznici i drugim intraoralnim lokacijama (63, 64).

Termin oralnog karcinoma vezan je za karcinom pločastih stanica nastalog u sluznici usne šupljine i predstavlja više od 90% maligniteta u usnoj šupljini te je osmi karcinom po učestalosti u svijetu iako njegova incidencija varira u nekim područjima svijeta, posebice Indija i azijske zemlje gdje čini gotovo polovinu svih malignih bolesti u usnoj šupljini (64). Oralni karcinom najčešće nastaje iz prekanceroznog stadija koji može biti klinički prepoznatljiv, kao što je leukoplakija, ili može biti klinički okultan; nastankom preraštanja klonalne populacije stanica koje su akumulirale genske promjene i fenotipski se promijenile u oblik invazivnog tumora (64). Ovaj oblik karcinogeneze je proces u kojem se nalazi nekoliko stupnjeva i stadija (tzv. multi-step i multi-stage process) (65).

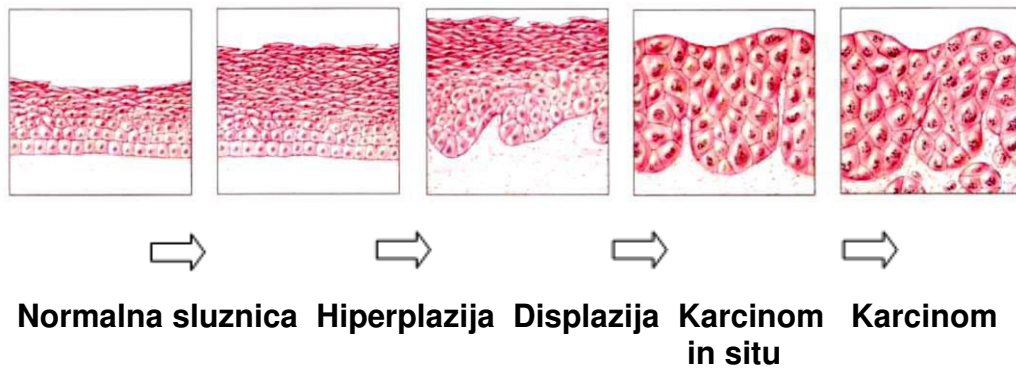
#### **Više stupanjska karcinogeneza (Multi-step Carcinogenesis)**

Nastanak karcinoma je proces koji se odvija u nekoliko stupnjeva u kojima izloženost karcinogenima (npr. cigaretni dim) rezultira oštećenjem i popravkom sve dok se ne akumulira dovoljna količina oštećenja koja će biti okidač za transformaciju od normalnih do premalignih stanica (npr. normalne stanice u displastične stanice) i na kraju u karcinom (65). Normalne stanice nisu neoplastično transformirane samo jednim onkogenom već češće zahtijevaju dva ili više onkogeni koji međusobno reagiraju uz inaktivaciju brojnih tumor supresorskih gena koji podupiru stupnjeviti nastanak karcinoma (model karcinogeneze s više udaraca) (tzv. multi-hit model) (65).

Nedavna istraživanja podupiru hipotezu da je u ljudi potrebno 3-10 somatskih mutacija kako bi se normalne stanice transformirale u maligne stanice (66). Analiza više stupnjevite karcinogeneze na molekularnoj razini, sugerira da je proces neoplastične evolucije značajnije kompliciraniji od relativno jednostavnog dvo-stupanjskog (inicijacija i promocija) ili čak kompliciranijeg tro-stupanjskog (inicijacija, promocija i progresija) modela karcinogeneze.

Primjer više stupanjskog modela karcinogeneze na molekularnoj razini opisali su 1990. godine Fearon i Vogelstein na karcinomu kolona (66). Taj model pokazuje da se moraju dogoditi više stupanjske genetske promjene nakon promocije klonalnog rasta iniciranih stanica. Zbog toga, progresivna faza karcinogeneze predstavljena je brojnim stupnjevima u kojima kemijski

agensi mogu utjecati na neoplastični proces. Postoje tri osnovna mehanizma kojim određene tvari mogu utjecati na proces više stupanjke karcinogeneze; i) inducirajući naslijeđene mutacije u kritičnim genima, ii) inducirajući naslijeđene epigenetičke promjene u kritičnim genima, iii) povećanjem klonalne populacije stanica s nasljednim promjenama u kritičnim genima, povećavajući vjerojatnost drugih događaja (Slika 9) (66, 67).



**Slika 9:** Model histološke progresije oralnog karcinoma (karcinom pločastih stanica)(67).

Model histološke progresije oralnog karcinoma pločastih stanica (OSCC) dobro je istražen. Općenito, vjeruje se da se nastanak OSCC-a odvija tijekom nekoliko stadija od premaligne/preinvazivne lezije: hiperplazija, blaga, umjerena, teška displazija, karcinom *in situ* (CIS), i konačno invazivni karcinom pločastog epitela (SCC).

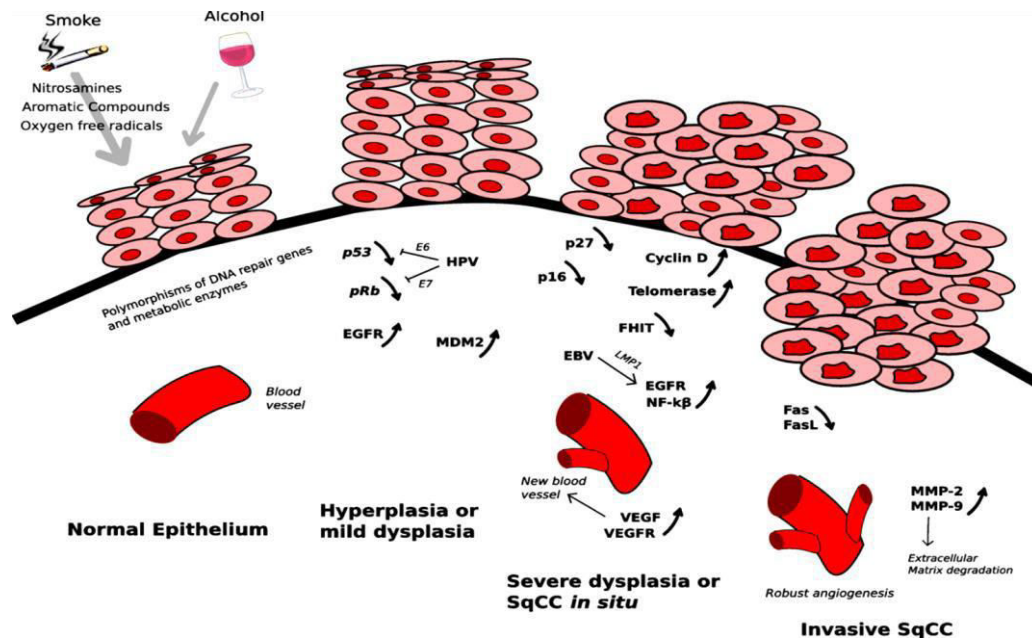
Califano i sur. prvi su načinili model molekularne progresije oralne karcinogeneze, analizirajući mikrosatelitnu nestabilnost arhivskog tkiva (67). Testirali su 87 invazivnih, preinvazivnih i dobroćudnih lezija glave i vrata, koje su bile izložene karcinogenima, na gubitak alela na 10 glavnih kromosomalnih lokusa -9p21, 3p21, 17q13, 11q13, 13q21, 14q31-32.1, 6p, 8q, 8p, 4q26-28 koji su ranije identificirani. U svom modelu, gubitak alela koristili su kao molekularni marker za inaktivaciju tumor supresorskog gena. Nejednakost alela također može nastati amplifikacijom onkogeni (n.pr. cyclin D1 na 11q13).

U slučaju pločastog karcinoma glave i vrata, gubitak kromosoma i amplifikacija na 10 lokusa potvrđena je komplementarnim metodama.

Ovaj model podupire inicijalna opažanja u modelu molekularne progresije karcinoma kolona koji su predložili Fearon i Vogelstein u tome što; a) oba; onkogeni i tumor supresorski geni uključeni su u progresiju tumora; b) specifični događaji u nastanku karcinoma glave i vrata općenito se pojavljuju određenim redosljedom progresije; gubitkom na 9p21 ili 3p koji se događaju kao najraniji detektabilni događaji i c) akumulacija genetskih promjena je, i ne nužno



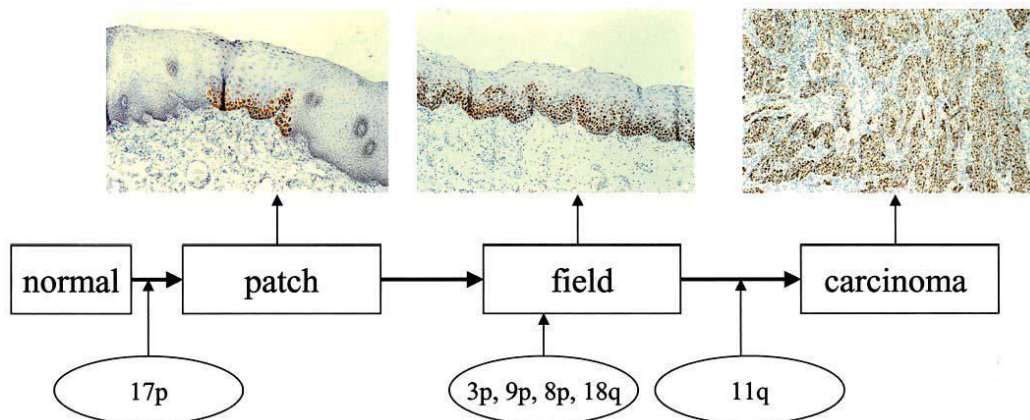
redosljed genetskih događaja, ona koja određuje progresiju. Sugerira se da je akumulacija genetskih promjena (broj promjena ili udaraca) ona koja je najčvršće povezana s rizikom za progresiju u karcinom, određujući više stupanjski proces karcinogeneze (Slika 10) (67).



**Slika 10.** Teorijski model karcinogeneze u usnoj šupljini temeljen na tzv. „multiple hit“ hipotezi. Većina molekularnih/genetskih lezija koje obuhvaćaju prijelaz od normalnog do karcinomskog epitela traje i tijekom kasnijih stadija, no na slici su prikazani u stadiju pojavljivanja (67).

### Područna zloćudna transformacija (Field Cancerisation)

Bolesnici s karcinomima glave i vrata obično se prezentiraju premalignim lezijama i multiplim primarnim tumorima u gornjem aerodigestivnom traktu. To je i navelo Slaughtera i sur. 1953. godine da postave koncept područne zloćudne transformacije (field cancerisation) (65). Pločasti karcinom glave i vrata nastaje procesom više stupanjske karcinogeneze, koji se pojavljuje na velikoj površini pokrovnog epitela gornjeg aerodigestivnog trakta izložen kancerogenima. Ova izložena sluznica sadrži brojne transformirane klonove koji se u 30 % slučajeva mogu transformirati u primarne tumore unutar pet godina. Taj proces naziva se područna kancerizacija (65, 67). Ona može biti rezultat ili neovisnih molekularnih događaja koji pogađaju odvojeno brojne stanice ili kao molekularna promjena pojedinog progenitorskog klona koji nastaje fenomenom mehanizama klonalne ekspanzije ili alternativnim putem koristeći se lateralnim širenjem kroz sluznicu gornjeg aerodigestivnog trakta (Slika 11) (68).



**Slika 11:** Genetsko objašnjenje Slaughterovog koncepta područne kancerizacije (68).

U početku se razvija „komadić“ („patch“), klonalne jedinice mutiranih stanica (matične stanice i stanice kćeri) koji se kasnije transformira u „područje“ („field“) – epitelnu leziju koja se sastoji od stanica koje sadrže karcinomu slične promijenjene gene koji se šire na račun normalnog tkiva (Slika 11) (67, 68). Tijekom područne progresije, događa se i određen broj genskih promjena. Tri mehanizma predložena su za nastanak lateralnog širenja „patch-a“ u „field“: a) lateralno širenje transformiranih stanica uzduž bazalne membrane; b) implantiranje transformiranih stanica na udaljena područja unutar oralne šupljine; c) nastanak novog klona na udaljenom mjestu od primarnog mjesta transformacije. Temeljem tih mehanizama, klonovi unutar područja mogu biti isti (koristeći mehanizme *a*) i *b*) ili drugačiji (koristeći mehanizam *c*) (67, 68).

Za nastanak oralnog karcinoma karakteristične su genetske promjene, gubitak heterozigotnosti, onkogeni aktivacija, inaktivacija tumor supresorskog gena, uključujući i druge gene poput matriks metaloproteinaza te ne malo važne egzogene čimbenike od kojih su najvažniji virusi (virus hepatitisa C, Epstein-Barr virus, i humani papiloma virus) i navike (kao što je uživanje duhana i alkohola) (68-87).

Genetske promjene obuhvaćaju amplifikaciju gena, prekomjernu ekspresiju onkogeni kao što su MYC, ERB-2, EGFR, RB, RASSF1A, FHIT, CCND1 i mutacije, delecije te hipermetilaciju vodeći do inaktivacije *p16* i *p53* tumor supresorskih gena (TSG) (64, 68). Pravi vremenski slijed događaja genetskih promjena tijekom nastanka i progresije HNSCC-a još uvijek nije do kraja identificiran, a dijagnostička i prognostička vrijednost tih promjena je kontroverzna.

S druge pak strane, gubitak heterozigotnosti (LOH) u nekoliko kromosomskih regija (kao na primjer 3p, 9p, 13q, 17p) koje se uobičajeno detektiraju, sugeriraju da drugi tumor supresorski geni još nisu niti identificirani, a mogli bi biti uključeni u proces tumorogeneze karcinoma glave

i vrata (HNSCC) (64, 69, 70). Delecija specifičnih kromosomskih regija jedna je od najčešćih genetskih događaja koji se mogu detektirati u solidnih tumora, i pretpostavlja se kako delecija u promatranim regijama posjeduje potencijalne tumor supresorske gene. LOH se definira kao gubitak genetskog materijala (od nekoliko tisuća parova baza do kompletnog kromosoma) u jednom od parova kromosoma (69). On predstavlja pojedinačni nasljedni materijal jednog od roditelja cjelokupnog staničnog genoma.

LOH može nastati na dva načina: i) delecija jedne regije kromosoma, rezultirajući ostatkom samo jedne kopije; ili kao ii) genska rekombinacija koja ostavlja u stanici dvije kopije kromosomske regije, ali obje potječu od jednog od roditelja. LOH se najčešće može naći na krakovima kromosoma 3p, 9p, 17p, koji može prethoditi nastanku nepoznatog i kloniranog tumor supresorskog gena, kao što je *VHL* (3p), *p16* (9p) i *TP53* (17p) (69).

Pretpostavlja se da LOH na 9p predstavlja najraniji događaj koji je povezan s tranzicijom normalnih stanica u benignu hiperplaziju; gdje se gubitak alela na 9p21 regiji povezuje i s genima koji kodiraju p16 i p14 cyclin ovisni kinazni inhibitor, oboje prisutni u premalignim lezijama i oralnom karcinomu (69). LOH na 3p i 17p najčešće se povezuju s displazijom dok su karcinom *in situ* (CIS) i pločasti karcinom (SCC) obilježeni dodatnim delecijama na 4q, 6p, 8, 11q, 13q i 14q (69, 70). Analizom progresivnih lezija zaključilo se da 97% njih imaju LOH na 3p i/ili 9p, sugerirajući da je gubitak na tim krakovima neophodan za daljnju progresiju, iako je takav gubitak vjerojatno nedovoljan za malignu transformaciju. Dodatni gubici na drugim krakovima kromosoma dodatno povećavaju rizik za nastanak karcinoma. Temeljem ovih podataka, definirane su tri grupe rizika: niski rizik LOH obrasca (retencija 3p i 9p); intermedijarni rizik (LOH na 3p i/ili 9p) i visoki rizik (LOH na 3p i 9p uz gubitak 4q, 8p, 11q, 13q ili 17p). Lezije sa visokim rizikom LOH-a imaju 33 puta veći rizik za nastanak karcinoma ako se uspoređuju s onim lezijama s niskim LOH-om (70, 71).

Onkogeni aktivacija koja se odnosi na mutaciju *H-ras* onkogeni nije uobičajena za zapadne zemlje, no u Indiji je detektirana u 35% slučajeva oralnog karcinoma te se smatra da je za tu aktivaciju zaslužno žvakanje areka oraščića i pušenje duhana (72-75).

S druge pak strane, amplifikacija 11q13 regije koja se obično opisuje u tumorima glave i vrata odgovorna je za amplifikaciju nekih onkogeni (76). Nekoliko jednostavnih onkogeni identificirano je na 11q13, uključujući *bcl-2*, *int-2*, *hst-1*, *EMS-1* i cyclin D1/*PRAD-1*. Amplifikacija i ko-amplifikacija *bcl-2*, *int-2* i *hst-1* nađena je u 30-52% tumorima glave i vrata (76). Za cyclin D1 otkriveno je da u 39-64% slučajeva postoji prekomjerna ekspresija u

primarnim karcinoma glave i vrata te izravno korelira s prisutnim metastazama u regionalne limfne čvorove, odnosno korelira s lošijom prognozom (75-79).

Amplifikacija i pretjerana ekspresija *MYC*, *ERBB-2* i receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) promatrana u karcinomima glave i vrata također su korelirale s lošom prognozom (80).

Prekomjerna ekspresija *MYC*-a dovodi nizvodno do povećanog broja *mycmax* heterodimera i snižava *maxmad* heterodimere, mijenjajući regulaciju brojnih gena doprinoseći malignoj transformaciji. Frekvencija *c-myc* amplifikacije i njegova pretjerana ekspresija varira od 9 do 48% (80). Porter i sur. objavili su kako je prognoza lošija u bolesnika s *c-myc* amplifikacijom (81).

*ERBB-2* gen (također nazivan i *NEU* ili *HER-2*) kodira 185-kDa protein s tirozin kinaznom aktivnošću, homolognim *EGFR* (82). U karcinomima glave i vrata učestalost *ERBB-2* amplifikacije i pretjerana ekspresija varira od 0 do 41% (83).

Prognostička vrijednost tih genskih poremećaja nađenih na *ERBB-2* onkogenu i dalje je kontroverzna. EGFR je transmembranski tirozin kinazni receptor erB-obitelji čija ekspresija u normalnim stanicama na površini je vrlo niska. Pretjerana ekspresija EGFR-a nađena u karcinomima glave i vrata povezuje se s agresivnijim kliničkim tijekom bolesti, otpornošću na terapiju i lošiju prognozu (82). Istraživanja su pokazala da je pretjerana ekspresija EGFR-a neovisan prognostički marker preživljenja u žvakača betela i komponenta je prognostičkog molekularnog profila (83). Signalna transdukcija od aktiviranih transmembranskih receptora kao što su EGFR ovisi o brojnim nizvodnim medijatorima koji su često eksprimirani u različitim vrstama karcinoma.

### **1.3.2. Oralni karcinom**

Epidemiološki, oralni karcinom čini 3% svih karcinoma čovjeka (4% u muškaraca i 2% u žena) i jedan je od deset najučestalijih uzroka smrti (8, 11). Od ukupnog broja smrtnih slučajeva uzrokovanih karcinomom, u muškaraca 2% otpada na oralni karcinom, a u žena ta brojka iznosi 1% (8, 11).

Oralni karcinom je bolest srednje i starije životne dobi, u do 95% slučajeva javlja se nakon 40.-te godine života pri čemu prosječna dob u trenutku postavljanja dijagnoze iznosi 60 godina (8). U posljednjih 20 godina primjećuje se porast incidencije oralnog karcinoma u osoba mlađih od 40 godina s 0,4% na 4%, a posebice se to odnosi na žene, čime se i promijenio omjer muškaraca i žena oboljelih od karcinoma s 10:1 na 3:1 u populaciji mlađoj od 40 godina (88).

U nekim zemljama Jugoistočne Azije (posebno Indija) oralni karcinom čini gotovo 40% svih zloćudnih bolesti (12). Najvažniji etiološki faktor za razvoj oralnog karcinoma je upotreba duhana budući da on sadrži brojne kancerogene od kojih su najpoznatiji policiklički aromatski ugljikohidrati i nitrozamini (89). Poznato je da oko 80% oboljelih od oralnog karcinoma puše ili na neki drugi način upotrebljavaju duhan.

Konzumacija alkohola također igra ulogu u nastanku oralnog karcinoma budući da alkohol djeluje sinergistički s duhanom povećavajući propusnost sluznice za kancerogene komponente duhanskog dima, a propusnost sluznice se proporcionalno povećava s koncentracijom alkohola.

Uloga HPV-a kao uzročnika karcinoma, za razliku karcinoma vrata maternice, u nastanku oralnog karcinoma još uvijek nije do kraja razjašnjena. Brojni istraživači smatraju kako je usna šupljina rezervoar HPV-a i da infekcija HPV-om u malog broja pacijenata tek u kombinaciji sa ostalim čimbenicima rizika može dovesti do razvoja prekanceroznih stanja i oralnog karcinoma (13).

Početni oralni karcinom uglavnom je asimptomatski, a simptomi počinju biti izraženi tek u uznapredovalom stadiju. Simptomatologiju prati neugoda i peckanje u ustima, a rjeđe otežano gutanje i govor, pomičnost zuba i krvarenje iz usne šupljine, te još rjeđe pojava jednog ili više čvorova na vratu. U oko 50% pacijenata prilikom postavljanja dijagnoze bolest je u uznapredovalom stadiju (12).

Makroskopski se javlja se kao crvenkasto područje oštro ograničeno od okolne sluznice, a u kasnijim stadijima razvija se ulkus s uzdignutim rubovima ili se može manifestirati kao egzofitična masa. Ovakve promjene najčešće se javljaju na rubovima jezika, dnu usne šupljine, nepčanim lukovima, retromolarnom području i desnima gornje i donje čeljusti (12, 89).

Metastaze se najčešće javljaju u vratnim limfnim čvorovima (submandibularni, digastrični i gornji cervikalni limfni čvorovi s iste strane vrata kao i tumor) dok su udaljene metastaze rijetke. Ako se tumor nalazi više straga ili bliže medijalnoj liniji, veća je vjerojatnost kontralateralnih i bilateralnih metastaza (12, 89).

Klasifikacija oralnog karcinoma izrazito je važna za odabir terapije pri čemu se najviše upotrebljava TNM klasifikacija koja za kriterije uzima veličinu tumora u centimetrima (T), prisutnost regionalnih metastaza u limfnim čvorovima (N) i prisutnost udaljenih metastaza (M). Temeljem navedenih kriterija vrši se stupnjevanje oralnog karcinoma u stadije (stadij 1-4) koji je jedan od najvažnijih prognostičkih faktora u trenutku postavljanja dijagnoze. Petogodišnje preživljenje za tumore u ranom stadiju (1 ili 2) iznosi oko 80%, za razliku od uznapredovalih stadija (3 ili 4) gdje iznosi oko 30% (90).

Oralni karcinom uglavnom se liječi kirurški i/ili zračenjem. Odabir terapije ovisi o prije spomenutom stadiju bolesti. Rani stadiji liječe se uglavnom kirurškim putem dok se uznapređovali stadiji liječe kombinacijom kirurškog zahvata i zračenja. (12, 89). Kirurški zahvat indiciran je kod infiltracije koštanih masa, u slučaju očekivanih nuspojava zračenja, ili kod tumora koji nisu radiosenzitivni i u slučaju recidivirajućih tumora u područjima koja su primila maksimalnu dozu zračenja.

Glavni neuspjesi kirurških zahvata su recidivi tumora zbog nedovoljno širokih rubova ekscizije, a sam kirurški zahvat deformira usnu šupljinu što dovodi do narušene funkcije i estetike rezultirajući smanjenjem kvalitete bolesnikovog života (12, 89). Kemoterapija je indicirana samo u onih uznapređovanih slučajeva ili recidivirajućih tumora za koje je malo vjerojatno da će se izliječiti kirurškim zahvatom i/ili zračenjem. Najčešće se ordiniraju metotreksat, bleomicin, 5-fluorouracil i cisplatin, no iako mogu utjecati na smanjenje veličine tumora, nemaju većeg učinka na povećanje preživljenja, kontrolu primarnog tumora i smanjenja učestalosti metastaza (89).

### **1.3.3. Maligna transformacija i problematika u definiranju oralnog lihen planusa kao prekanceroze**

Pretpostavlja se da OLP lezije imaju višu razinu proliferacije bazalnih stanica nego normalno tkivo (91). WHO klasificira OLP kao premaligno generalizirano stanje s povećanim rizikom za nastanak karcinoma (8, 17). U prilog ove definicije WHO-a idu brojne prospektivne i retrospektivne studije u posljednjih nekoliko desetljeća u kojima je incidencija maligne transformacije OLP-a bila od 0% do 5,3% pri čemu se maligna transformacija najviše detektirala u eritematoznim i erozivnim oblicima OLP-a (11, 17).

Osnovni problem u proučavanju malignog potencijala OLP-a je u tome što unatoč definiranim kriterijima za OLP (koje prihvaća WHO), oni još uvijek nisu općeprihvaćeni. Neke studije baziraju se na dijagnozi OLP-a samo temeljem kliničkog izgleda lezije bez patohistološke potvrde, dok druge studije uključuju i kliničke i histopatološke kriterije, a osnovni nedostatak gotovo u svim studijama odnosi se na nedovoljno dobro dokumentiranu upotrebu duhanskih proizvoda i količinu konzumiranih alkoholnih pića (17).

Mehanizam koji inicira pretvorbu OLP-a u pločasti karcinom još uvijek nije razjašnjen, iako je dobro poznato da postoji jasna povezanost između kroničnog upalnog infiltrata i brojnih karcinoma kako je spomenuto ranije (62, 91).

U svakoj leziji s potencijalno malignim karakterom postoji velika potreba za pronalaženjem objektivnih biljega koji bi mogli selekcionirati bolesnike s rizikom, no do sada takav biljeg nije dostupan, pa tako niti za OLP. Potencijalni prognostički biljezi za povećani rizik za nastanak karcinoma mogle bi biti genetske i molekularne promjene koje se javljaju tijekom karcinogeneze (89, 92-95).

Izazov u polju oralnih prekanceroza je predvidjeti koja lezija će se razviti u karcinom, odnosno izdvojiti grupu pacijenata koji će imati koristi od češćeg kliničkog praćenja. Konvencionalna klinička i histopatološka gledišta nisu optimalna u odlučivanju i praćenju prekanceroznih lezija (17). Izvor dobrog upravljanja u postupanju s prekanceroznim lezijama mogao bi se upotpuniti i poboljšati ako bi se na razuman način s dobrom vjerojatnošću mogao predvidjeti nastanak karcinoma (7).

Uz to, terminologija i definicije u polju oralnih prekanceroza i dalje su predmetom opsežnih rasprava. Upotreba termina „oralna prekanceroza“ i „oralni premalignitet“ stvaraju probleme budući da oni sami po sebi označavaju nepromjenjivi put nastanka karcinoma. Nadalje, uporaba termina „potencijalno maligni“ pobliže niti ne označava što to zapravo znači (96).

Ono što je nepromjenljivo, bez obzira na stalne diskusije je da se termini „prekanceroza“, „premaligno“, „pretkarcinom“ i „prekursori“ zapravo više-manje koriste kao sinonimi za oboljenja koja imaju maligni potencijal. U nekoliko navrata uloženi su naponi kojima bi se na međunarodnoj razini stvorili termini i definicije (7). WHO je 1978. godine prihvatio zadnji međunarodni pokušaj stvaranja termina i definicija dijeleći oralne prekanceroze u prekancerozne lezije i prekancerozna stanja (7).

Općenito se prihvatilo da je prekancerozna lezija „morfološki promijenjeno tkivo u kojem će vrlo vjerojatno nastati karcinom nego na nasuprotnim dijelovima tkiva normalnog izgleda“ (7).

S druge strane, „prekancerozno stanje“ definirano je kao „generalizirano stanje povezano sa značajno povećanim rizikom od nastanka karcinoma“ (7). Posljednja definicija stoga označava da karcinom može nastati u bilo kojem dijelu usne šupljine i ne nužno u već postojećoj leziji. Primjeri za to su prekancerozna stanja kao što su oralna submukozna fibroza i oralni lihen planus (7).

Nadalje, koncept područne kancerizacije (field cancerization) na neki način može i oslabjeti ove definicije budući da se terminom područne kancerizacije podrazumijeva nastanak i sekundarnih primarnih tumora, no kriteriji u ovoj lokalizaciji su nejasni iako je sam koncept područne kancerizacije u nekoliko navrata analiziran temeljem doprinosa novih otkrića na polju

molekularnih tehnika, i naravno genske analize (7, 97, 98). Zbog toga je i predložena nova klasifikacija, ona koja obuhvaća i sekundarne primarne tumore, lokalne recidive i tumore nastale na drugim lokalizacijama u usnoj šupljini (7).

#### **1.4. KLINIKA, DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE ORALNOG LIHEN PLANUSA**

Dijagnoza OLP-a postavlja se na temelju makroskopskih kliničkih i patohistoloških parametara pri čemu izrazitu pažnju treba posvetiti uzimanju anamnestičkih podataka (40-42). Biopsija tkiva i patohistološki nalaz, važni su u dijagnostici OLP-a. U patohistološkoj dijagnostici koriste se Eisenbergovi kriteriji za OLP, a za displaziju kriteriji Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organization; WHO-a) (10, 40). Prilikom dijagnosticiranja OLP-a posebna pažnja usmjerena je histološkim kriterijima, odnosno elementima koji nedostaju (17).

Za OLP do danas nije pronađen niti jedan specifičan lijek. Liječenje se svodi na ublažavanje simptoma, no to ne zaustavlja progresiju bolesti. U današnje doba ne preporučuje se liječenje lijekovima ako nema simptoma. Osobama s OLP-om preporučuje se prestanak pušenja i konzumiranje alkohola u većim količinama. Osobito je važno informirati pacijente s OLP-om o stalnom dobrom održavanju oralne higijene (52).

U nedavnim Cochrane istraživanjima terapije OLP-a zaključilo se da ne postoje čvrsti dokazi koji bi podupirali bilo koje liječenje lijekovima. Oralne lezije mogu dobro reagirati na potentne topičke kortikosteroide kao što su clobetazol, beclomethasone ili budenoside (52). S druge strane, ove lezije su gotovo u pravilu sekundarno inficirane kandidom pa je također potrebna i terapija antimikoticima. U slučajevima u kojima nema poboljšanja na topičku primjenu kortikosteroida, može se primijeniti sistemska terapija kortikosteroidima. U topičku promjenu lijekova također se ubrajaju i drugi imunosupresivi kao što su *tacrolimus* i *cyclosporine* (52). Kao alternativna terapija koriste se vitamin A i retinoidi koji su bitni u procesu epitelizacije patološki promijenjene sluznice (17). Često se retinoidi daju zajedno sa kortikosteroidima koji se ordiniraju topikalno kao dodatna terapija. Retinoidi se mogu davati sistemski ili topikalno, a topikalno nanošenje kreme ili gela pomaže kod velikog broja pacijenata s retikularnim i plak oblikom OLP-a. Njihovo sistemsko davanje može djelovati teratogeno i uzrokovati disfunkciju jetre i cheilitis. Neke studije su pokazale da korištenje određenih



antibakterijskih otopina za ispiranje usta prije uzimanja steroida mogu pomoći da ne dođe do nastanka gljivične infekcije(52).

Oralni lihen planus kronična je bolest koja ima svoje faze remisije i recidiva i zbog toga su potrebne redovite kontrole osnovne sustavne bolesti. Uz to, potrebno je održavati stanje u usnoj šupljini primjenom odgovarajućih sredstava koja potiču keratinizaciju i na taj način produžavaju vrijeme remisije. Svrha postojeće terapije je eliminirati mukozni eritem i ulceracije, olakšati simptome i reducirati rizik od nastanka oralnog karcinoma u bolesnika sa OLP-om.

Ako postoje sistemski faktori u bolesnika sa lihenom kao što su dijabetes, hipertenzija, stres, gastrointestinalni i hepatobilijarni problemi, potrebno ih je staviti pod kontrolu (17).

Citokinska i anticitokinska terapija je pokazala dobre rezultate u liječenju kroničnih autoimunih bolesti, a s obzirom da je OLP kronična bolest s karakteristikama autoimunog poremećaja i da TNF- $\alpha$  ima veoma bitnu ulogu u patogenezi same bolesti takva bi se terapija mogla koristiti u budućnosti u tretiranju ove bolesti. Jedino pitanje na koje još ne postoji adekvatan odgovor je kada i koju terapiju primijeniti i hoće li terapija izliječiti bolesnika, ili samo djelomično smanjiti simptome, odnosno produljiti vrijeme remisije.

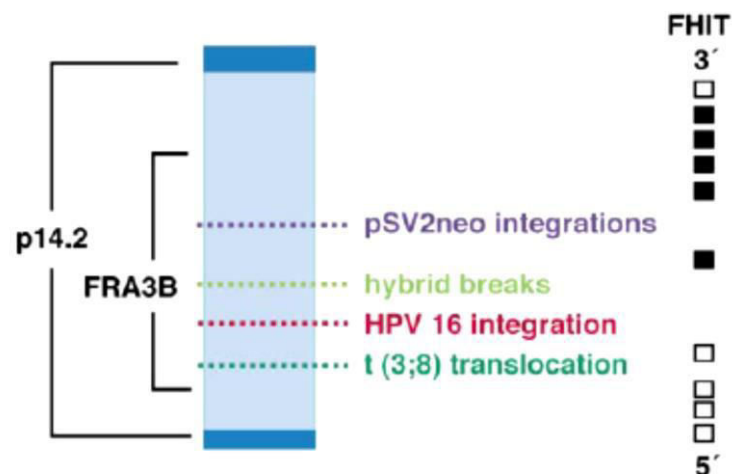
Ono na što još treba odgovoriti je gdje je točka s koje više nema povratka u kojoj OLP nezaustavljivo napreduje prema displaziji, odnosno oralnom karcinomu.

## **1.5. FRAGILNA HISTIDINSKA TRIJADA**

Složeni obrazac kromosomskih aberacija karakterističan je u zloćudnih tumora. Gen FHIT (od engl. Fragile Histidine Triad) zaposjeda najlomljivije mjesto u genomu čovjeka (99-101). Otkriven je 1996. godine i od tada je opisano mnoštvo delecija u prekanceroznim lezijama i malignim tumorima koje su se manifestirale u obliku izgubljene ili reducirane ekspresije (99-101). Kromosomske abnormalnosti; uključujući homozigotne delecije i gubitak heterozigotnosti, najčešće su uobičajene karakteristike ljudskih tumora. Kratki krak ljudskog kromosoma 3, odnosno njegova regija 3p14.2 gdje se nalazi FHIT, glavno je mjesto takvih promjena. Regija 3p14.2 obuhvaća uobičajenu ranjivu regiju (od engl. The common fragile sites, CFSs) (101). CFSs je regija duboke genomske nestabilnosti koja se nalazi u genomu čovjeka. Do sada je opisano 90 takvih nestabilnih regija u genomu čovjeka, a one se razlikuju prema frekvenciji ekspresije. Suprotno od rijetkih ranjivih regija koje nalazimo u oko 5% populacije, CFSs se nalaze kod svih ljudi (101). Regija 3p14.2 obuhvaća najaktivnije uobičajeno ranjivo mjesto

ljudskog genoma sadržavajući u sebi ključnu točku povezanu s obiteljskim karcinomom bubrega i mjesto je integracije papiloma virusa (101, 102).

Maligna transformacija stanica je kompleksan proces koji uključuje gubitak funkcije tumorskog supresorskog gena, aktivaciju onkogeni i promjenu funkcije promijenjenih gena. Genske promjene utječu na razna svojstva stanica; proliferaciju, genetičku stabilnost i preživljenje (103, 104). Prvobitne genetske analize pokazale su da je FHIT gen vrlo velik gen koji obuhvaća oko 2 MB ljudskog genoma. Sastoji se od deset malih egzona odvojenim velikim intronima (Slika 12) (102). Egzoni 5 do 9 kodiraju FHIT protein. Suprotno genu FHIT, mRNA je samo 1.1 kB dugačka i kodira samo 146 aminokiselinskih lanaca koji formiraju protein od 16.8 kDa (101).



*Slika 12. FHIT gen, egzoni koji kodiraju protein prezentirani su crnim kvadratićima (102).*

Brojni znanstvenici potvrđuju da je FHIT gen inaktiviran u značajnom udjelu karcinoma i u znatnom broju prekanceroznih lezija (99,105). Do sada je u literaturi objavljeno nekoliko studija koje su pokazale da je funkcija FHIT gena izgubljena u karcinomu pluća (106). Preko dvije trećine karcinoma pluća velikih stanica nije pokazalo ekspresiju FHIT gena. Također, oko 85% slučajeva bronhalne displazije (prekancerozne lezije) nije pokazalo FHIT ekspresiju, što bi upućivalo na to da je gubitak FHIT funkcije zapravo rani događaj u plućnoj karcinogenezi (107). Promjene u FHIT ekspresiji u plućnom karcinomu bile su učestalije i pojavljivale su se prije p53 mutacija i deregulacije EGFR-a. FHIT inaktivacija bila je skoro dvostruko učestalija u tumorima pušača (75%) nego u tumorima nepušača (39%) (108).

FHIT je inaktiviran u velikom broju prekanceroznih lezija (bronhalnih, lezijama kolona, cerviksa, jednjaka) (103, 104, 107, 109-111). Zbog učestale inaktivacije FHIT gena u mnogim ljudskim tumorima i u nekoliko prekanceroznih lezija, zatim zbog činjenice da u sebi sadrži ključnu točku translokacije hereditarnog bubrežnog karcinoma, razumno je zaključiti da je FHIT tumorski supresorski gen. Godine 1997. Siprashvili i suradnici otkrili su da reekspresija FHIT-a u FHIT negativnim linijama stanica, smanjuje njihovu tumorogenost *in vivo* (105). Naime, stanice kojima je predočen FHIT gen i kontrolne stanice bez FHIT-a inokulirane su u imunosuprimiranog miša, u kojem su se za tri tjedna kontrolne stanice razvile u tumore, dok su stanice s FHIT genom jedva pokazivale nekakav razvoj tumora. Nakon ove studije efekt FHIT gena istraživan je i na drugim linijama stanica. Također je učinjena i adenovirusna transdukcija FHIT gena u promatrane stanice tumora, gdje je zapažena značajna inhibicija rasta tumorskih stanica i povećana apoptoza (112). U tijeku su intenzivna istraživanja molekularne osnove inhibicije rasta i apoptoze koju kontrolira FHIT gen. Već su objavljeni rezultati istraživanja po kojima FHIT preko sekvencijalne aktivacije na apoptotički signalni put posredovan receptorima smrti (DR) dovodi do apoptoze, a isto tako postoje istraživanja koja su usmjerena na izraženost FHIT-a u upalnom infiltratu koji u pojedinim tumorima ima negativan učinak (113, 114). Objavljena su istraživanja koja su proučavala aberacije dvaju gena, FHIT i p53, u ljudskim tumorskim stanicama *in vitro*. Dodavanjem produkata oba gena istovremeno dobivena je sinergistička inhibicija rasta tumora, što se može objasniti utjecajem FHIT-a na stabilizaciju p53 preko inhibicije određenih produkata u stanici tumora (115). Interesantno je da se sve linije stanica ne mogu suprimirati FHIT-om. Godine 2001. objavljene su još dvije velike studije. U prvoj studiji Ishii i suradnici istraživali su linije stanica karcinoma jednjaka te su dobili rezultate u kojima je FHIT gen ubačen adenovirusnom transdukcijom bio tumorski supresor u oko 40% linija stanica (116). Drugom se studijom testirao efekt reekspresije FHIT gena u FHIT negativnih linija stanica (karcinom pankreasa). Dobiveni rezultati već su poznati: FHIT inhibira rast i pojačava apoptozu stanica (117, 118). Stvaranje animalnog modela važan je iskorak u određivanju funkcionalnih karakteristika genskog produkta. Grupa znanstvenika uspjela je 2000. godine uzgojiti miša kojem nedostaje FHIT ekspresija. Da bi se rasvijetlila uloga FHIT gena, izvršen je pokus u kojem su heterozigotni knockout miševi (+/-) i oni divljeg tipa kroz deset tjedana tretirani poznatim kancerogenom, N-nitrozometil-benzilaminom. U svih heterozigotnih miševa nastali su gastrični tumori dok je tek u 25% divljih miševa nađen tumor (119). Zanimljiviji rezultati dobiveni su istraživanjem nastanka spontanih tumora u homozigotnih miševa (-/-). Unutar dvije godine testiranja, u 53% homozigotnih i 53% heterozigotnih knockout

miševa nastali su tumori, a tek u 8% miševa divljeg soja (119). Interesantna je činjenica da su udjeli miševa homozigota i heterozigota u kojih je nastao tumor vrlo slični. Ovi rezultati upozoravaju na to da FHIT gen može biti takozvani “one-hit tumor supresor”, odnosno da inaktivacija samo jednog alela dovodi do nastanka tumora (119). Za razliku od miševa, u ljudskim karcinomima inaktivirana su uglavnom oba alela. Međutim, može se pretpostaviti da bi eventualna inaktivacija samo jednog alela dovela do razvoja dobroćudnih tumora, dok bi inaktivacija i drugog alela dovodila do maligne transformacije i razvoja karcinoma (118). Administracija egzogenog FHIT gena kao preventivnog agensa rezultirala je redukcijom učestalosti tumora za oko 50% u miševa (119). FHIT protein ima  $Ap_3A3$   $Ap4A$  hidrolaza aktivnost (112). Zanimljiva je činjenica da sama ta aktivnost nije potrebna za tumorsku supresorsku aktivnost. Naime, mutirani FHIT protein koji na sebe veže, ali ne hidrolizira  $Ap_3A3$  jednako je efikasan kao i divlji tip proteina (105, 120).

Preklinička istraživanja pokazala su moguću primjenu FHIT genske terapije u karcinoma, a isto tako i u prevenciji nastanka karcinoma što zapravo sugerira racionalizaciju u daljnjem istraživanju (120). Imunohistokemijske studije primarnih tumora i premalignih lezija pokazuju da je ekspresija Fhit proteina odsutna ili značajno smanjena u usporedbi s normalnim zdravim tkivom (121, 122). Ovi nalazi sugeriraju korist od detekcije gubitka Fhita kao ranog markera i *FHIT* alteracije kao moguće rane genske terapije budući da su studije potvrdile inhibiciju rasta tumora in vitro nakon inokulacije FHIT-a (121). Virusni vektori pokazuju se kao dobri kandidati za prijenos gena (121). Jedina zamjerka ovakvom prijenosu gena u čovjeka je mogućnost imunog odgovora nakon ponovljene terapije no preklinička istraživanja na miševima su obećavajuća iako se pokazala potreba da su istraživanja potrebna i na većim životinjama kako bi se gen mogao prenijeti na točno određeno mjesto, a nuspojave svele na najmanju moguću mjeru (121).

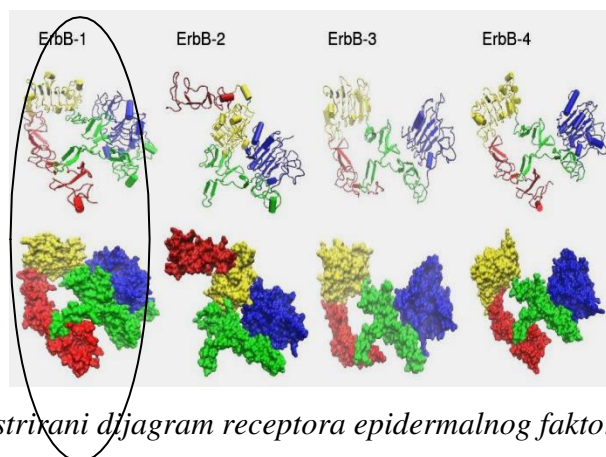
### **FHIT i oralna sluznica**

Ekspresija FHIT-a u zdravoj oralnoj sluznici ne bi smjela biti manja od 10 % promatranih stanica pokrovnog epitela, a gubitak ekspresije FHIT-a pogotovo u karcinomima u usnoj šupljini, govori u prilog loše prognoze (121). Može se zaključiti kako se prekancerozne lezije u rasponu pravilne ekspresije i gubitka ekspresije FHIT-a nalaze negdje između ovih vrijednosti, a gubitak FHIT-a može se smatrati potencijalnim dobrim markerom za ranu karcinogenezu, i u budućnosti kao potencijalna ciljana terapija (122).

## 1.6. RECEPTOR ZA EPIDERMALNI FAKTOR RASTA

Receptor je stanična komponenta koja nadzire status ekstracelularnog okoliša. Stupanjem u interakciju s uobičajenim ekstracelularnim molekulama prenose stanicama biokemijski signal u unutrašnjost stanice (123).

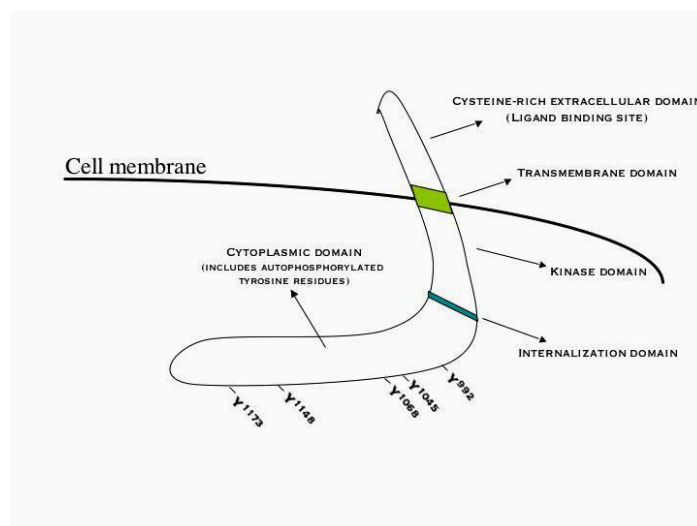
Receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) je uključen u brojne esencijalne stanične funkcije uključujući diferencijaciju i proliferaciju (Slika 13). Ekspresija strukturalno promijenjenog receptora, odnosno prekomjerna ekspresija normalnih receptora, će doprinijeti nekontroliranoj staničnoj proliferaciji i diferencijaciji (124, 125). Raznoliki broj metaboličkih procesa koji su koordinirani faktorima rasta (aktiviranim kinazama unutar stanice) sudjeluje u rastu i dijeljenju stanice. U ciljnim stanicama faktor rasta i hormoni imaju mogućnost pokretanja kompleksa „pleiotropskog odgovora na rast”. Pokazalo se da je EGFR uključen u normalnu i abnormalnu proliferaciju epitelnog tkiva (126). Mitogenom aktivirane protein kinaze mogu se ponašati kao konvergencijske točke u mehanizmu staničnog rasta i diferencijacije (127, 128). Determiniranje funkcijske uloge receptorom posredovanih kinaza u modulaciji funkcije receptora u procesu mitogene transdukcijske signalizacije moglo bi imati veliki utjecaj na molekularnu bazu tumorogeneze tumora glave i vrata (128, 129).



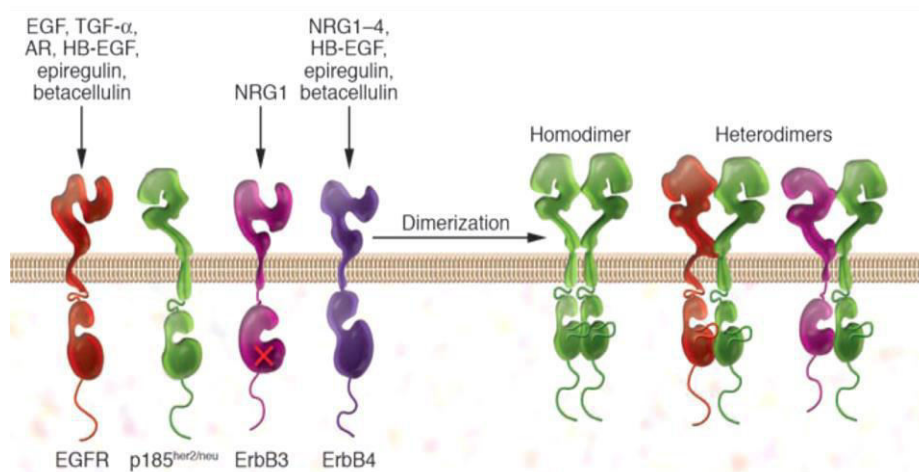
*Slika 13. Ilustrirani dijagram receptora epidermalnog faktora rasta (134).*

EGFR je od otkrića 1962. godine prepoznat kao kritični protein u nastanku i održanju epitelnog tkiva (130). Ekspresija EGFR-a nađena je u brojnim humanim epitelnim karcinomima uključujući i HNSCC, a njegova prekomjerna ekspresija može se tumačiti kao marker u HNSCC karcinogenezi (131). Prekomjerna ekspresija povećava se paralelno s histološkom abnormalnošću od hiperplazije do invazivnog karcinoma, preko displazije i in situ karcinoma (132).

Prekomjerna ekspresija EGFR-a korelira s progresijom bolesti, lošijim preživljenjem, slabijim odgovorom na terapiju i rezistencijom na citotoksične agense (133). Receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR; ErbB-1; HER1 u ljudi) je površinsko stanični receptor za članove obitelji epidermalnog faktora rasta (EGFR-obitelj) koji imaju ekstracelularne proteinske ligande (Slika 14). EGFR član je ErbB obitelji receptora, podobitelj četiri vrlo bliska tirozin kinazna receptora: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) i Her 4 (ErbB-4) (Slika 15) (134). EGFR se nalazi na površini stanice i aktiviran je vezanjem specifičnih liganada, uključujući epidermalni faktor rasta i transformirajući faktor rasta (TGF $\alpha$ ) (ima više liganada koji mogu aktivirati EGFR) (Slika 15) (134). ErbB2 nema poznatog direktnog aktivatorskog liganada, no može biti aktiviran heterodimerizacijom s drugim članovima obitelji kao što je EGFR.

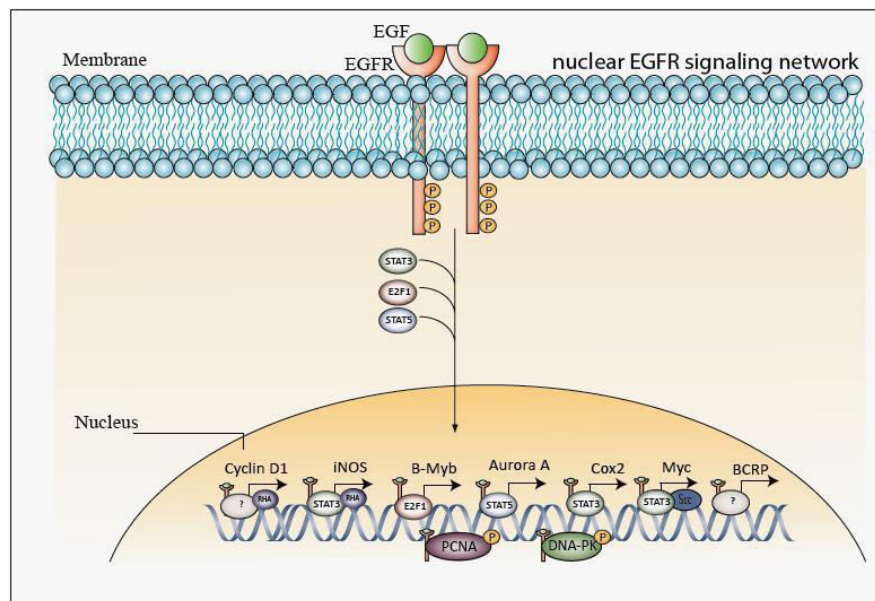


*Slika 14. Membranska pozicija EGFR-a (134).*



*Slika 15. ErbB receptori i njihovi ligandi (134).*

Dimerizacija stimulira unutarstaničnu protein kinaznu aktivnost te rezultira autofosforilacijom tirozinskih rezidua u katalitičkoj domeni EGFR-a (134). Nizvodno, autofosforilacija signalizira DNA sintezu, proliferaciju stanica, pojačanu migraciju i adheziju (134, 135). Pretjerana ekspresija ili pretjerana aktivnost EGFR-a, nađena u do 30% epitelnih tumora i 30-90% HNSCC, povezana s invazijom i metastazama, lošom prognozom i otpornošću na terapiju, te se općenito smatra lošim prognostičkim znakom (136-143). Blokiranje EGFR-a tirozin kinaznim inhibitorima polučilo je uspjeha u 10-20% HNSCC (144, 145). Ovi nalazi sugeriraju da EGFR može doprinijeti progresiji karcinoma mehanizmom koji ne ovisi o tirozin kinaznoj aktivnosti. Na primjer, EGFR u suradnji s Na/glukožnim kotransporterom1 (SGLT1), kojeg ujedno i stabilizira, ubrzava transport glukoze u stanice (146). Vjeruje se da interakcija EGFR-a i SGLT1 koordinira stanični rast i dijeljenje ovisno o unosu nutrijenata. Razdor tog kompleksa može utjecati na unutarstaničnu razinu glukoze i može utjecati na tumorske stanice da postanu osjetljive na kemo- ili radioterapiju (Slika 16) (147).



**Slika 16.** Signalna mreža EGFR-a u jezgri. EGFR se kontinuirano može detektirati u jezgri tumorskih stanica i tkivima s visokom proliferacijom, a veže se za nekoliko transkripcijskih faktora koji reguliraju transkripciju cyclina D1, INOS-a, B-Myb, Aurora Kinase A, COX2, Myc i BCRP. Dodatno, dokazano je da EGFR unutar jezgre fosforilira i aktivira PCNA i DNA-PK (148, 149).

Dokazano je da se EGFR translocira u jezgru nakon aktivacije receptora. U jezgri EGFR je uključen u brojne stanične procese, kao što su DNA sinteza, DNA popravak i transkripcija gena uključenih u staničnu proliferaciju, rast tumora i metastaziranje (148, 149). Poznati induktori

EGFR-a u jezgri su ionizirajuće zračenje i cisplatin. Jezgri EGFR povezan je s povećanom aktivnošću DNA ovisne protein kinaze, enzima koji sudjeluje u DNA DSB popravku. Mutacija signalne regije EGFR-a u nuklearnoj lokalizaciji će prouzrokovati EGFR-om induciranu rezistenciju na cisplatinu. Reintrodukcija EGFR signala u jezgri lokalizaciji omogućava ponovni ulazak EGFR-a u jezgru i uspostavu rezistencije na cisplatinu, uslijed naknadne aktivnosti DNA popravka (150). Aktivacija EGFR-a započinje vezanjem liganda, nakon čega započinje kaskada staničnih događaja potičući citoplazmatsku tirozin kinaznu aktivnost nakon čega se povećava razina citoplazmatskog kalcija (Slika 16) (134, 151-157). Sva četiri člana ErbB receptora obitelji dijele visoku homologiju na ekstracelularnoj domeni i kinaznoj domeni iako, ErbB3 nije kinazno aktivan (155-157). Vezivanje EGF-a, TGF- $\alpha$  i drugih liganda na EGFR, aktivira tirozin-protein kinaznu aktivnost receptora rezultirajući fosforilacijom receptora i drugih supstrata koji se nalaze u blizini receptora (158-161). Aktivacijom kinaznog sustava općenito se internalizira EGFR (127, 162). To može biti jedan od mehanizama koji reguliraju EGFR-om induciranu proliferaciju ciljnih tkiva (163, 164). Čini se da internalizacija i degradacija receptora razgranava čitav niz akcija te se čini kako u odsutnosti kontrolnog prigušivačkog mehanizma, čak i male količine liganda, mogu rezultirati nekontroliranom proliferacijom (126, 154, 164, 165). Pretpostavlja se da je prekomjerna ekspresija receptora nastala temeljem amplifikacije gena (*c-erb-B-1*; na kromosomu 7) kao što je vidljivo u istraživanjima provedenim na A-431 karcinomskim stanicama ili životinjskim modelima, te oralnim karcinomima *in vivo* (166-171). Amplificirani onkogeni općenito sadrže veći broj transkripata ili pokazuju prekomjernu ekspresiju onkoproteina zajedno s ko-amplifikacijom drugih onkogenih (172). Ko-ekspresija drugih onkogenih kao što su *c-myc* i *H-ras* također može rezultirati malignom transformacijom (sinergijska akcija). Primarni razlog pretjerane ekspresije EGFR-a može se možda pripisati pretjeranom produkcijom samog proteina ili pretjeranom ekspresijom glasničkih RNA (170, 173, 174).

### **EGFR i oralna sluznica**

Izraženost EGFR-a provedena je brojnim istraživanjima u normalnih, displastičnih i neoplastičnih lezija oralne sluznice (karcinomu pločastih stanica). EGFR izraženost u normalnom epitelu oralne sluznice rezervirana je uglavnom za bazalni sloj stanica (175). Prekomjerna izraženost EGFR-a u karcinomu pločastih stanica detektirala se u većini studija (175). U serijskim istraživanjima Kearsleya i sur. 1991.godine, u 24/42 (57%) slučajeva oralnog karcinoma dokazala se prekomjerna izraženost proteinskog receptora (174). Iako neka istraživanja nisu mogla dokazati prisutnost EGFR amplifikacije u tumorima glave i vrata,



amplifikacija EGFR-a nađena je u 4-29% istraživanih slučajeva (176-178). Amplifikacija onkogeni može nastati i prilikom normalnih razina transkriptata za onkoprotein ili pretjeranom izraženošću proteina samoga za sebe (179). Prekomjerna izraženost EGFR-a vjerojatno pokazuje direktan odnos sa stupnjem diferencijacije i agresivnosti pločastog karcinoma (174, 177, 180-182). U normalnom epitelu EGFR se može detektirati uglavnom u stanicama bazalnog sloja kao membranski pozitivitet koji se gubi u suprabazalnom sloju (183, 184). U područjima kao što su lateralna strana jezika, svi slojevi epitela imaju tendenciju izraženosti receptora (185). Imunoreaktivnost EGFR-a također se može detektirati u prvih 2 do 3 sloja bazalnih odnosno suprabazalnih epidermalnih keratinocita i u uvjetima kao što su psorijaza u kojoj je proliferacijska aktivnost i izmjena stanica relativno velika (186, 187). Membranski pozitivitet EGFR-a nađen je i u premalignim lezijama (188). U oralnoj keratozi, gdje je akantoza naglašena, spinozni sloj pokazuje umjerenu pozitivnost, no ne takvu kakva se nađe u karcinomu pločastih stanica koji ima tendenciju pozitivnosti u svim slojevima epitela (184, 189).

### **Klinička primjena**

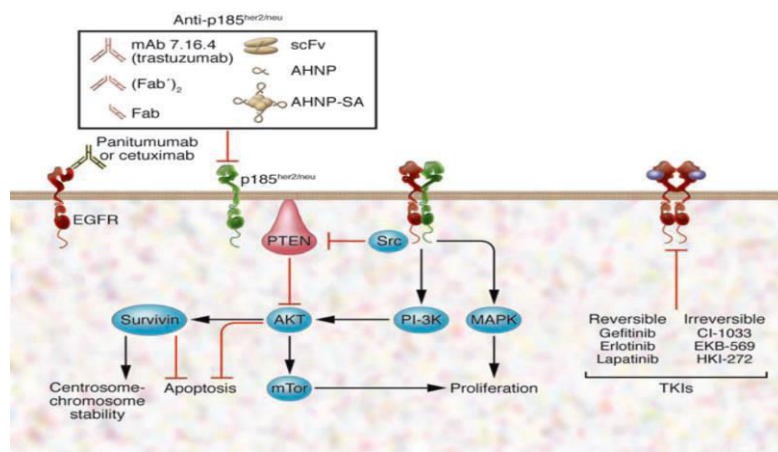
Mutacije koje dovode do prekomjerne izraženosti EGFR-a (poznate kao “upregulation”) ili pretjerana aktivnost, nalaze se u karcinomima, uključujući karcinom pluća, karcinom analnog kanala i glioblastoma multiforme (190). Mutacije EGFR-a mogu dovesti do trajne aktivacije koja dovodi do nekontrolirane diobe stanica – stanja koje prethodi karcinomu. Identifikacija EGFR-a kao onkogeni omogućila je razvoj lijekova koji direktno djeluju protiv EGFR-a, uključujući gefitinib i erlotinib za karcinom pluća, i cetuximab za karcinom kolona (190). Mnogi terapijski pristupi ističu se kod EGFR-a. Cetuximab (IgG1 tip) i panitumumab (IgG2 tip) su primjeri monoklonalnih inhibitora protutijela, pri čemu posljedica djelovanja protutijelom ovisne citotoksičnosti može u ovim slučajevima biti različita. Ostala monoklonalna protutijela u kliničkom razvoju su zalutumumab, nimotuzumab, i matuzumab. Gefitinib, erlotinib, i lapatinib (miješani EGFR i ERBB2 inhibitor) primjeri su malih molekula kinaznih inhibitora (190). Monoklonalna protutijela blokiraju ekstracelularnu ligand vezujuću domenu. Blokiranjem vezujućeg mjesta, signalne molekule više se ne mogu vezati i poticati aktivnost tirozin kinaze. Druga metoda je korištenje malih molekula koje inhibiraju EGFR tirozin kinazu, koja se nalazi na citoplazmatskoj strani receptora. Bez kinazne aktivnosti, EGFR se ne može aktivirati, što je zapravo prethodnica nizvodne adaptacije proteina. Na taj način vezujući se na kaskadni signalni put u stanicama, djeluju na put koji kontrolira rast, proliferaciju tumora i migraciju stanica te ih na taj način umanjuje (190). Postoji nekoliko kvantitativnih metoda u upotrebi kojima se detektira fosforilacija proteina kojima se identificira obitelj EGFR inhibitora. Efikasnija

konverzija dobije se apsorpcijom svjetla preko tzv. plazmonijskih zlatnih nanopartikla koje akumuliraju energiju, a njihova lakša konjugacija sugerira mogućnost upotrebe tih agenasa kao selektivne fototermalne agense u ciljanoj terapiji karcinoma (190).

Nađene su dvije linije pločastog karcinoma usne šupljine (HSC 313 i HOC 3 Clone 8) i jedna epitelna linija benigna (HaCaT) koje su nakon inkubacije s anti-EGFR konjugiranim sa zlatnim nanopartiklima izložene kontinuiranom argonskom laseru na 514 nm. Dokazalo se da je malignim stanicama trebalo manje od polovice vremena odumrijeti nego benignim stanicama nakon istog postupka. Ako nije bilo nanopartikla, bilo je potrebno četiri puta dulje vrijeme ekspozicije kako bi maligne stanice odumrle tretiranjem s anti-EGFR/Au. Zlatne nanopartikle u ovom slučaju su novi način selekcije stanica kod upotrebe lasera niskih snaga. Najčešće se koriste kod karcinoma dojke, kolona, pankreasa, GIST-a i karcinoma pluća (lijek kao Tarceva: EGFR pozitivni karcinomi pluća pokazuju do 60% bolji odgovor nego ordiniranjem konvencionalne kemoterapije) (190).

### Budućnost ErbB receptor –ciljane terapije

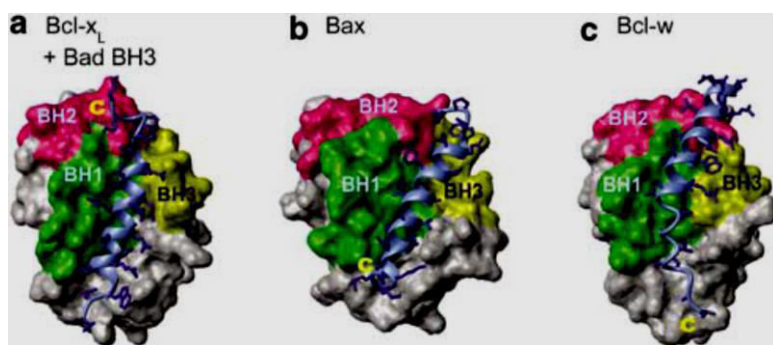
Današnji klinički terapijski reagensi ErbB obitelji mogu se podijeliti u 2 kategorije: mAbs i male molekule; koje su usmjereni prema ekstracelularnoj domeni te male molekule usmjerene prema kinaznoj domeni u citoplazmatskoj regiji. Uglavnom se radi o ciljanoj terapiji prema faktorima rasta ili njihovim nizvodnim signalnim faktorima. Cetuximab je monoklono protutijelo usmjereno prema EGFR-u i prvi je molekularni ciljani terapeutik koji je pokazao pozitivne pomake u preživljenju u HNSCC tumora. Bonner i suradnici pokazali su da radioterapija u kombinaciji s cetuximabom omogućava dulje preživljenje (s 29 na 49 mjeseci) u usporedbi s radioterapijom (191). Kada se veže za EGFR, cetuximab inhibira vezanje liganda, nizvodno signaliziranje i ometa EGFR dimernu ekspresiju (Slika 17) (192, 193).



**Slika 17.** Molekule u ErbB signalnom putu kao ciljevi za terapiju karcinoma (190).

## 1.7. BCL-2

Bcl-2 otkriven je kod staničnog B limfoma s t(14,18) translokacijom i po tome je i dobio ime, a bio je prvi gen povezan s regulacijom apoptoze (194). Bcl-2 pripada velikoj obitelji gena koji reguliraju apoptozu i do sada je poznato više od 25 članova obitelji Bcl-2 proteina (195). Oni djeluju antiapoptotički i time zaustavljaju apoptozu ili proapoptotičkim djelovanjem potiču apoptozu. Programirana stanična smrt naziva se apoptoza koju može potaknuti oštećena stanica koja se više ne može popraviti, virusna infekcija ili u stanjima stresa kao što je gladovanje (196-201). Inicijator apoptoze još je uvijek nepoznat, no poznato je da T stanice koje napadaju bazalne epitelne stanice započinju kompleksni molekularni mehanizam koji stavlja stanicu u mirovanje zbog popravka DNA ili inducira mehanizam za apoptozu koji eliminira stanice s jako oštećenom DNA (201). Genomom se nasljeđuju i u genomu se nalaze geni odgovorni za programiranu staničnu smrt. Svi članovi obitelji imaju najmanje jednu od četiri homologne domene, odnosno područja (BH1, BH2, BH3 ili BH4) (Slika 18). Članovi obitelji Bcl-2 koji djeluju antiapoptotički sadržavaju sve 4 domene (196, 197). Najpoznatiji geni u regulaciji apoptoze su Bcl-2, Bcl-xs, Bax, Bag i Bad. Obitelj gena Bcl-2 odgovorna je za poticanje (npr. Bax. i Bcl-xs) ili zaustavljanje apoptoze (npr. Bcl-2, Bcl-w i Bcl-xl) (198-201).



**Slika 18.** Trodimenzionalna struktura Bcl-2 proteina. a) Bcl-x s BH3 peptidom s Bad (plavo) koji je vezan za površinu i koji tvori rezidue s BH1, BH2 i BH3 domenama; b) Bax s C-terminalnim završetkom (plavo) umetnut u površinu, ali suprotne orijentacije od BH3; c) Bcl-w s C-terminalnim završetkom smješten na površini (plavo), ali drugačijeg djelovanja od Bax-a (198).

Praćenjem izraženosti pojedinih proteina obitelji Bcl-2 može se nadzirati osjetljivost stanica na apoptotičke poticaje (202). Pokretanje apoptotičke smrti pod negativnom je regulacijom gena Bcl-2 smještenom na 18. kromosomu koji kodira najveći (24 kDa) do sada poznat antiapoptotički protein. Bcl-2 protein smješten je u mitohondrijima, membranama endoplazmatskog retikuluma i jezgri. Bcl-2 poznat je kao zaštitnik mitohondrija koji na

molekularnoj razini sprečava otpuštanje citokroma c i zaustavlja apoptozu u samom začetku zaustavljajući aktivaciju prokaspaza (199, 200, 203). Gen Bax djeluje u suprotnom smjeru od Bcl-2 ubrzavajući staničnu smrt, no čini se da je apsolutna razina Bcl-2 manje bitna od relativnog odnosa Bcl-2 i Bax-a čime se ravnoteža između članova obitelji Bcl-2 gena u regulaciji apoptoze pokazuje ključnom (202).

### **Uloga Bcl-2 u onkogenezi i nastanku nekih bolesti**

Karcinomi nastaju kao rezultat poremećaja ravnoteže između rasta i smrti stanica. Prekomjerna ekspresija antiapoptotičkih gena, i smanjena ekspresija proapoptotičkih gena može rezultirati nepostojanjem stanične smrti kako je karakteristično u karcinoma (201). Oštećenje Bcl-2 gena uzrokuje mnoge maligne tumore od kojih su najpoznatiji melanom, karcinom dojke, prostate, kronična limfocitna leukemija i karcinom pluća, a pretpostavlja se da sudjeluje u nastanku shizofrenije i autoimunih bolesti te isto tako uzrokuje i nastanak rezistencije karcinoma na terapiju budući da produžuje preživljenje stanice i time omogućava daljnju mutaciju gena (201). Funkcionalna apoptoza ne reagira na vlastite antigene bilo centralnim ili perifernim putem tolerancije. Defektna apoptoza može etiološki doprinijeti nastanku autoimunih bolesti, a najčešće se spominje dijabetes tipa 1. U tijeku su istraživanja koja nastoje upotpuniti ulogu Bcl-2 i njihov međusobnu interakciju koja promovira ili inhibira apoptozu. Razumijevanje ovog mehanizma unaprijedit će liječenje pronalaženjem novih terapija u liječenju malignih bolesti, autoimunih stanja i neuroloških bolesti.

### **Bcl-2 i oralna sluznica**

Istraživanja su pokazala da je razina ekspresije Bcl-2 u oralnim displastičnim lezijama veća u epitelu nego što se to može naći u lezijama u kojima je prisutna hiperplazija oralnog epitela (204). Dakle, kod povećane ekspresije Bcl-2 u oralnih lezija, postoji veća mogućnost histopatološkog nalaza displazije ili invazije. Budući da je Bcl-2 ekspresija povezana s promjenama na p53, smatra se kako pretjeranoj ekspresiji prethodi promjena ekspresija p53 i kako se ove promjene događaju u vrlo ranim fazama karcinogeneze rezultirajući defektom apoptoze i posljedičnom nastanku tumora (201, 204). Nedavna istraživanja stanične proliferacije u OLP-u pokazala su da je proliferacija veća nego u normalne oralne mukoze, no niža je nego je to u epitelih displazija i oralnom karcinomu (201). Povećana ekspresija Bcl-2 nije samo esencijalna za oralnu karcinogenezu, već ima utjecaj i na progresiju bolesti putem produljenja života neoplastične stanice, omogućavajući nove genske mutacije koje u konačnici postaju rezistentne na terapiju. Ta saznanja možda i objašnjavaju stav WHO-a da je maligna transformacija u OLP-u niža nego u leukoplakije (s displazijom) i eritroplakije (201).

Pojednostavljeno; ova istraživanja upućuju na to da niža razina proliferacije, smanjuje mogućnost stanice da doživi nove mutacije (201).

### **Terapija s inhibitorima Bcl-2**

Mnogi ciljni agensi identificirani su za Bcl-2 obitelj na razini mRNA ili proteina (205). Oni mogu djelovati na gen ili na ekspresiju proteina. Farmakološki i stanični aspekti ciljne terapije Bcl-2 uzimaju se u obzir prilikom potencijalne aplikacije u obliku kemoterapije. Identificirano je 6 antiapoptotičkih Bcl-2 članova obitelji, a za neke se sumnja da su i odgovorni za rezistenciju na terapiju sugerirajući da optimalni efekt terapije ovisi o inhibiciji više članova Bcl-2 obitelji (205). Do danas, jedan Bcl-2 antisense (Oblimersen sodium (G3139, Genasense)) i 3 male molekule inhibitora proteina Bcl-2 (koji su zapravo inhibitori histonske deacetilaze; Sodium butyrate, depsipeptide) podvrgnuti su kliničkim ispitivanjima budući da su pretklinička ispitivanja bila obećavajuća, pogotovo u kombinaciji s dodatnim kemoterapeutskim agensima (201, 205).

## **2. HIPOTEZA**

Izraženost FHIT-a smanjena je, a EGFR-a i Bcl-2 povećana u stanicama pokrovnog epitela bolesnika s oralnim lihen planusom te korelira s gustoćom upalnog subepitelnog infiltrata.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. Ciljevi rada**

##### **OPĆI CILJ:**

Odrediti izraženost FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u oralnom lihen planusu, karcinomu pločastih stanica usne šupljine i zdravoj oralnoj sluznici.

##### **SPECIFIČNI CILJEVI:**

1. Usporediti izraženost FHIT-a u pokrovnom epitelu između bolesnika s oralnim lihen planusom i karcinomom pločastih stanica usne šupljine i zdrave oralne sluznice.
2. Usporediti izraženost EGFR-a u pokrovnom epitelu između bolesnika s oralnim lihen planusom i karcinomom pločastih stanica usne šupljine i zdrave oralne sluznice.
3. Usporediti izraženost Bcl-2 u pokrovnom epitelu između bolesnika s oralnim lihen planusom i karcinomom pločastih stanica usne šupljine i zdrave oralne sluznice.
4. Usporediti izraženost Bcl-2 u subepitelnom upalnom infiltratu u bolesnika s oralnim lihen planusom i karcinomom pločastih stanica usne šupljine i zdrave oralne sluznice.

#### **3.2. Svrha rada**

Razlika izraženosti FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 unutar skupine bolesnika s oralnim lihen planusom mogla bi izdvojiti podgrupu s većom vjerojatnosti nastanka oralnog karcinoma koji bi imali koristi od intenzivnijeg bolničkog praćenja i agresivnijeg terapijskog pristupa koja bi u budućnosti mogla uključivati i sadašnja saznanja o djelovanju dostupnih lijekova čija primjena za sada je rezervirana samo za maligne tumore, no ne i za prekancerozne lezije i stanja.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Materijali**

Ovo istraživanje je retrospektivnog karaktera.

Uzorci oralne sluznice s oralnim lihen planusom predstavljaju arhivski materijal Kliničkog zavoda za patologiju KBC Sestre milosrdnice, dobiven od bolesnika kojima je u periodu od 1999. do 2007. godine učinjena biopsija zbog promjene oralne sluznice, a u anamnestičkim podacima bile su zabilježene navike pušenja cigareta ili nepušenja. Uzorci oralne sluznice s karcinomom pločastih stanica dobiveni su od pacijenata kojima je u tijekom 2008. godine učinjena biopsija ili opsežan kirurški zahvat zbog karcinoma pločastih stanica usne šupljine i također čine arhivski materijal Zavoda. Uzorci oralne sluznice bez patohistoloških promjena predstavljaju arhivski materijal kojima je u periodu od 2007. do 2009. godine učinjena biopsija zbog promjene oralne sluznice bez dijagnosticiranog oralnog lihen planusa i karcinoma. Analizirano je: 50 uzoraka oralne sluznice s dijagnozom oralnog lihen planusa, 20 uzoraka oralne sluznice s dijagnozom karcinoma pločastih stanica, 20 uzoraka oralne sluznice bez patohistoloških promjena.

### **4.2. Metode**

Materijal je obrađen standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju materijala (tkiva) u 10% puferiranom formalinu koji se nakon procesuiranja tkiva uklapa u parafinske blokove te reže na debljinu rezova 5  $\mu$ m, deparafinira se i boji standardnom metodom hemalaun eozin (HE). Za imunohistokemijsku analizu korišteni su rezovi iz prethodno opisanih parafinskih blokova i primarna monoklonalna protutijela EGFR (code No. M723901, razrjeđenje 1:50, Dako, Danska), Bcl-2 (code No. M0887, razrjeđenje 1:50, Dako, Danska) te FHIT (code No. 71-9000, razrjeđenje 1:200, Zymed Laboratories Inc, SAD).

#### **Morfološka analiza**

Morfološka analiza za OLP uključivala je histološke kriterije opisane u odjeljku 1.2., za karcinom morfološke promjene koje odgovaraju karcinomu, a za zdravu oralnu sluznicu niti jedan od kriterija nije smio biti zadovoljen.



## **Imunohistokemijska analiza**

Imunohistokemijska analiza za protutijela vodila se LSAB metodom kao vizualizacijskim sistemom na Dako TechMate TM Horizon (Dako, Copenhagen, Danska) automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaza MSIP protokola za Bcl-2 i FHIT te MSIPE za EGFR. Preparate je analizirala pristupnica uz kontrolu iskusnog patologa. Pozitivan test za Bcl-2 bilo je tkivo tonzile, za EGFR tkivo posteljice, a za FHIT duktalni karcinom dojke. U negativnoj kontroli je primarno protutijelo zamijenjeno izotipskim imunoglobulinom.

Imunohistokemijska reakcija na Bcl-2 određivana je semikvantitativno u četiri kategorije prema metodi koju su opisali Ravi i sur. prema sljedećem:

0- bez pozitivne reakcije te manje od 10% reakcije u pokrovnom epitelu; odnosno i u upalnom infiltratu u podliježećoj stromi;

1+ - slaba reakcija; jednako i više od 10% do 30% pozitivne reakcije u pokrovnom epitelu; i u upalnom infiltratu u podliježećoj stromi;

2+ - umjereno jaka reakcija; više od 30% do 60% pozitivne reakcije u pokrovnom epitelu; i u upalnom infiltratu u podliježećoj stromi;

3+ - jaka reakcija; više od 60% pozitivna reakcija u pokrovnom epitelu; i u upalnom infiltratu u podliježećoj stromi (203).

Imunohistokemijska reakcija na EGFR u pokrovnom epitelu određivala se semikvantitativno u pet kategorija prema metodi koju su opisali Sarkis i sur. prema sljedećem:

0- bez pozitivne reakcije;

1+ - za manje od 10% pozitivnih stanica;

2+ - za pozitivne stanice jednako i više od 10% do 50%;

3+ - za pozitivne stanice više od 50% do 80%;

4+ - za više od 80% pozitivnih stanica (174).

Imunohistokemijska reakcija na FHIT u pokrovnom epitelu određivala se semikvantitativno u dvije kategorije prema metodi koju su opisali Kujani i sur. prema sljedećem:

„negativna“ ili „slaba ekspresija“ koja se nađe u manje od 10% stanica pločastog epitela;

odnosno „pozitivna“ reakcija koja se nađe u jednako ili više od 10% stanica (121).

Područje pregledavanja odredilo se pregledavanjem cijelog uzorka na malom povećanju (x40). Izraženost biljega očitavala se u reprezentativnom području pod velikim povećanjem (x400).

### 4.3. Statistička analiza

Podaci su prikazani tablično i grafički.

Kolmogorov-Smirnovljevim testom se provjerila raspodjela kontinuiranih podataka te su se shodno dobivenim podacima koristili neparametrijski testovi u većini prikaza (izuzev dobi koja je bila normalno raspodijeljena).

Hi kvadrat testom analizirane su razlike u kategorijskim vrijednostima između ispitivanih skupina (oralni lihen planus, karcinom pločastih stanica i zdrava oralna sluznica). Jednosmjernom analizom varijance (One-Way ANOVA) analizirane su razlike u dobi između ispitivanih skupina.

Kako bi se utvrdila značajna međusobna povezanost pojedinih kliničkih parametara s razinom upale i dobi, odnosno pojedinim parametrima u upalnom infiltratu, izračunati su Spearmanovi korelacijski koeficijenti. Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnima. U analizi se koristila programska podrška StatsDirect verzija 3.0.86 ([www.statsdirect.com](http://www.statsdirect.com)).

Dobiveni rezultati su prikazani koristeći tabele, dijagrame i slike karakterističnih patohistoloških preparata, koji su od značaja za razumijevanje postupka, vodeći brigu o anonimnosti bolesnika.

## 5. REZULTATI

### 5.1. OPIS I ANALIZA DEMOGRAFSKIH KARAKTERISTIKA ISPITANIKA I LOKALIZACIJA LEZIJE

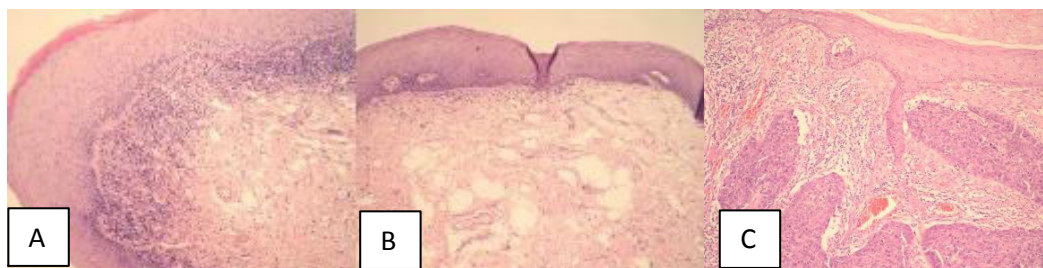
U istraživanju je uključeno 90 ispitanika podijeljenih u 3 skupine:

Prvu skupinu činilo je 50 bolesnika s OLP-om za koje su bili poznati podaci o navici pušenja cigareta (29 žena i 21 muškarac). Svi ispitanici u prvoj skupini imali su patohistološki potvrđenu dijagnozu OLP-a (kod svih retikularni oblik), u 94% slučajeva obostrane bukalne lokalizacije.

Jednosmjernom analizom varijance (One-way ANOVA) izračunate su vrijednosti srednje životne dobi ispitanika za svaku pojedinu skupinu. Ispitanici s OLP-om su bili u dobi od 19 do 75 godina, srednje životne dobi  $49,1 \pm 14,3$  godina. 15 ispitanika (7 žena i 8 muškaraca) su aktivni pušači u dobi od 26-70 godina, srednje životne dobi  $45,2 \pm 12,1$  godina. 35 ispitanika su nepušači (22 žene i 13 muškaraca), srednje životne dobi  $50,7 \pm 14,9$  godina.

Drugu skupinu ispitanika činilo je 20 bolesnika (6 žena i 14 muškaraca) s novo dijagnosticiranim i histološki potvrđenim karcinom pločastih stanica. U 55% slučajeva (11 bolesnika) lokalizacija je bila baza jezika. Dobna raspodjela ispitanika bila je u rasponu od 48 do 72 godine, srednje životne dobi  $62,7 \pm 8,1$  godina. Veličina tumora određivala se putem važeće TNM klasifikacije, pri čemu je srednji promjer tumora iznosio  $2,5 \pm 5,2$  cm, a tri četvrtine tumora pokazivalo je srednji stupanj diferencijacije (G2) i samo u 4 slučaja opisani tumor je metastazirao u regionalne limfne čvorove.

Treća skupina sadržavala je 20 ispitanika (9 žena i 11 muškaraca) s urednim nalazom sluznice usne šupljine u rasponu od 28 do 54 godine, srednje životne dobi  $46,4 \pm 7,3$  godina.



**Slika 19.** A: OLP; B: zdrava oralna sluznica; C: karcinom pločastih stanica (HEx100).

Raspodjela po dobi i spolu za ispitne skupine prikazana je u Tablici 3, lokalizacija lezija ispitnih skupina u Tablici 4, a navike pušenja za ispitnu skupinu OLP-a u Tablici 5. Među skupinama nije bilo značajnih razlika što se tiče dobi, spola i lokalizacije lezija. U skupini OLP-a

naviku uživanja duhana (pušenje cigareta) potvrdio je manji broj ispitanika, a većina ispitanika (70%) bila su nepušači. Ne nađe se značajna razlika u srednjoj životnoj dobi, u OLP pušača i nepušača, iako je srednja životna dob u OLP pušača u oba spola bila niža u odnosu na nepušače u trenutku dijagnosticiranja OLP-a (Tablica 5).

**Tablica 3.** Raspodjela po dobi i spolu za ispitne skupine

Skupina	OLP	Karcinom	Normalna sluznica
Muškarci N (%)	21 (42)	14 (70)	11 (55)
Žene N (%)	29 (58)	6 (30)	9 (45)
Total N (m i ž)*	50	20	20
Medijan godine (m i ž)*	48,5	63,5	48
Min.** dob godine (m i ž)*	19	48	28
Maks.*** dob godine (m i ž)*	75	72	54

\*ukupno muškarci i žene; \*\* minimalna; \*\*\*maksimalna.

**Tablica 4.** Raspodjela po lokalizaciji lezije za ispitne skupine

Lokalizacija	OLP* N (%)	Karcinom N (%)	Normalna sluznica N (%)
Obraz	47 (94)	1 (5)	8 (40)
Jezik baza	2 (4)	11 (55)	0
Podjezično	1 (2)	0	0
Jezik postranično	0	2 (10)	5 (25)
Jezik ventralno	0	1 (5)	6 (30)
Meko nepce	0	2 (10)	1 (5)
Usnica	0	2 (10)	0

\*OLP-oralni lihen planus.

**Tablica 5.** Raspodjela navika pušenja u OLP skupini

OLP skupina	Pušači/m	Pušači/ž	Nepušači/m	Nepušači/ž
N (%)	8 (16)	7 (14)	13 (26)	22 (44)
Total N (%)	15 (30)		35 (70)	
Srednja dob $\pm$ SD $\ddagger$	45,8 $\pm$ 13,4	44,6 $\pm$ 11,5	47,2 $\pm$ 16,1	52,9 $\pm$ 14,1
Medijan	45	46	44	52,5
Min.* dob godine	28	26	21	19
Maks.**dob godine	70	62	71	75

\*minimalna; \*\*maksimalna; pušači/m- pušači muški; pušači/ž- pušači žene; nepušači/m- nepušači muški; nepušači/ž- nepušači žene;  $\ddagger$  Jednosmjerna analiza varijance (One-way ANOVA)

**Tablica 6.** Razlike u ostalim promatranim kliničkim parametrima (spol, dob, pušenje i upala)

		Skupine						Rezultati testiranja*	Rezultati testiranja**	Rezultati testiranja***
		Oralni lihen planus		Karcinom pločastih stanica		Zdrava oralna sluznica				
		N	%	N	%	N	%			
Spol	Muški	21	42,0%	14	70,0%	11	55,0%	$X^2=4,480$ df=1 P=0,034	$X^2=0,973$ df=1 P=0,324	$X^2=0,960$ df=1 P=0,327
	Ženski	29	58,0%	6	30,0%	9	45,0%			
Pušač	Ne	35	70,0%	NA		NA		NA	NA	NA
	Da	15	30,0%							
Upala	Blaga	3	6,0%	NA		NA		NA	NA	NA
	Umjerena	15	30,0%							
	Gusta	32	64,0%							
Dob (godine): aritmetička sredina $\pm$ SD $\ddagger$		49,1 $\pm$ 14,3		62,7 $\pm$ 8,1		46,4 $\pm$ 7,3		P<0,001	P=0,391	P<0,001

\* Razlike između oralnog lihen planusa i karcinoma pločastih stanica;\*\*Razlike između oralnog lihen planusa i zdrave oralne sluznice; \*\*\*Razlike između karcinoma pločastih stanica i zdrave oralne sluznice;  $\ddagger$  Jednosmjerna analiza varijance (One-way ANOVA)

Lihen planus (u odnosu na karcinom pločastih stanica) dijagnosticiran je češće u ispitanika ženskog spola (P=0,034). Ispitanici s karcinomom bili su značajnije stariji od ispitanika s lihen planusom (P<0,001) i od ispitanika s zdravom oralnom sluznicom (P<0,001) i najčešće su bili muškog spola (Tablica 6).

## **5.2. OPIS I ANALIZA REZULTATA IMUNOHISTOKEMIJSKIH METODA**

Razlike u kategorijskim vrijednostima imunohistokemijske izraženosti FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u pokrovnom epitelu zdrave oralne sluznice, OLP-a i karcinoma pločastih stanica, i izraženosti Bcl-2 i FHIT-a u subepitelnom upalnom infiltratu su analizirane hi kvadrat testom. Spearmanovim korelacijskim koeficijentom izražena je međusobna korelacija FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u epitelu i u upalnom infiltratu s dobi i upalom.

### **5.2.1. Karakteristike izraženosti FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u pokrovnom epitelu u odnosu na gustoću subepitelnog upalnog infiltrata**

Hi kvadrat testom ne nađe se značajna razlika u stupnju izraženosti pojedinih biljega u oralnom lihen planusu u odnosu na gustoću subepitelnog upalnog infiltrata niti se nađe značajna razlika u stupnju izraženosti pojedinih biljega u odnosu na navike (pušenje) u bolesnika s OLP-om (Tablica 7 i 8).

**Tablica 7.** Razlike u stupnju izraženosti pojedinih biljega u odnosu na stupanj upale u bolesnika s oralnim lihen planusom: hi kvadrat test

		Upala						Rezultati testiranja
		Blaga		Umjerena		Gusta		
		N	%	N	%	N	%	
EGFR	Negativno	1	33,3%	0	,0%	1	3,1%	X <sup>2</sup> =11,425 df=8 P=0,179
	Manje od 10%	0	0,0%	2	13,3%	9	28,1%	
	Jednako i više od 10% do 50%	2	66,7%	6	40,0%	10	31,3%	
	Više od 50% do 80%	0	0,0%	4	26,7%	6	18,8%	
	Više od 80%	0	0,0%	3	20,0%	6	18,8%	
Bcl-2 epitel	Bez pozitivne reakcije i manje od 10%	0	0,0%	2	13,3%	2	6,3%	X <sup>2</sup> =5,073 df=6 P=0,534
	Jednako i više od 10% do 30%	3	100,0%	10	66,7%	17	53,1%	
	Više od 30% do 60%	0	0,0%	3	20,0%	10	31,3%	
	Više od 60%	0	0,0%	0	0,0%	3	9,4%	
Bcl-2 upala	Bez pozitivne reakcije i manje od 10%	0	0,0%	4	26,7%	3	9,4%	X <sup>2</sup> =6,462 df=6 P=0,373
	Jednako i više od 10% do 30%	3	100,0%	8	53,3%	16	50,0%	
	Više od 30% do 60%	0	0,0%	3	20,0%	12	37,5%	
	Više od 60%	0	0,0%	0	0,0%	1	3,1%	
FHIT epitel	Manje od 10%	1	33,3%	10	66,7%	19	59,4%	X <sup>2</sup> =1,172 df=2 P=0,557
	Jednako i više od 10%	2	66,7%	5	33,3%	13	40,6%	
FHIT upala	Manje od 10%	1	33,3%	7	46,7%	9	28,1%	X <sup>2</sup> =1,565 df=2 P=0,457
	Jednako i više od 10%	2	66,7%	8	53,3%	23	71,9%	

**Tablica 8.** Razlike u izraženosti pojedinih biljega u bolesnika s oralnim lihen planusom koji puše i koji ne puše: hi kvadrat test

		Pušač				Rezultati testiranja
		Ne N=35		Da N=15		
		N	%	N	%	
EGFR	Negativno	2	5,7%	0	,0%	X <sup>2</sup> =5,055 df=4 P=0,282
	Manje od 10%	5	14,3%	6	40,0%	
	Jednako i više od 10% do 50%	14	40,0%	4	26,7%	
	Više od 50% do 80%	8	22,9%	2	13,3%	
	Više od 80%	6	17,1%	3	20,0%	
Bcl-2 epitel	Bez pozitivne reakcije i manje od 10%	3	8,6%	1	6,7%	X <sup>2</sup> =2,314 df=3 P=0,510
	Jednako i više od 10% do 30%	23	65,7%	7	46,7%	
	Više od 30% do 60%	7	20,0%	6	40,0%	
	Više od 60%	2	5,7%	1	6,7%	
Bcl-2 upala	Bez pozitivne reakcije i manje od 10%	5	14,3%	2	13,3%	X <sup>2</sup> =3,197 df=3 P=0,362
	Jednako i više od 10% do 30%	21	60,0%	6	40,0%	
	Više od 30% do 60%	8	22,9%	7	46,7%	
	Više od 60%	1	2,9%	0	,0%	
FHIT epitel	Manje od 10%	19	54,3%	11	73,3%	X <sup>2</sup> =1,587 df=1 P=0,208
	Jednako i više od 10%	16	45,7%	4	26,7%	
FHIT upala	Manje od 10%	14	40,0%	3	20,0%	X <sup>2</sup> =1,872 df=1 P=0,171
	Jednako i više od 10%	21	60,0%	12	80,0%	

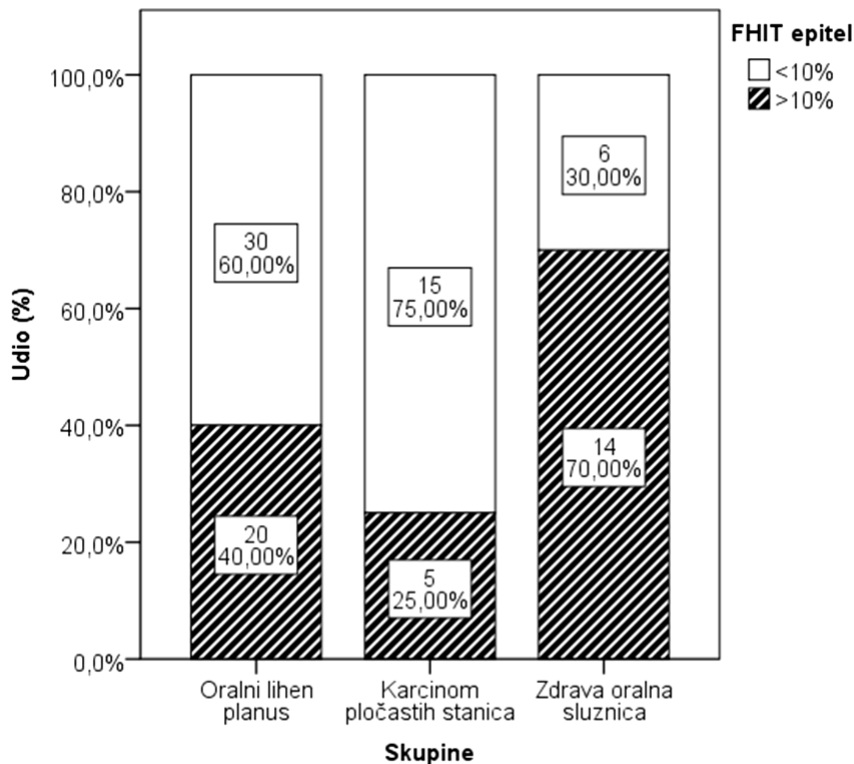


## 5.2.2. Karakteristike izraženosti FHIT-a u epitelu u oralnom lihen planusu, karcinomu pločastih stanica i zdravoj oralnoj sluznici

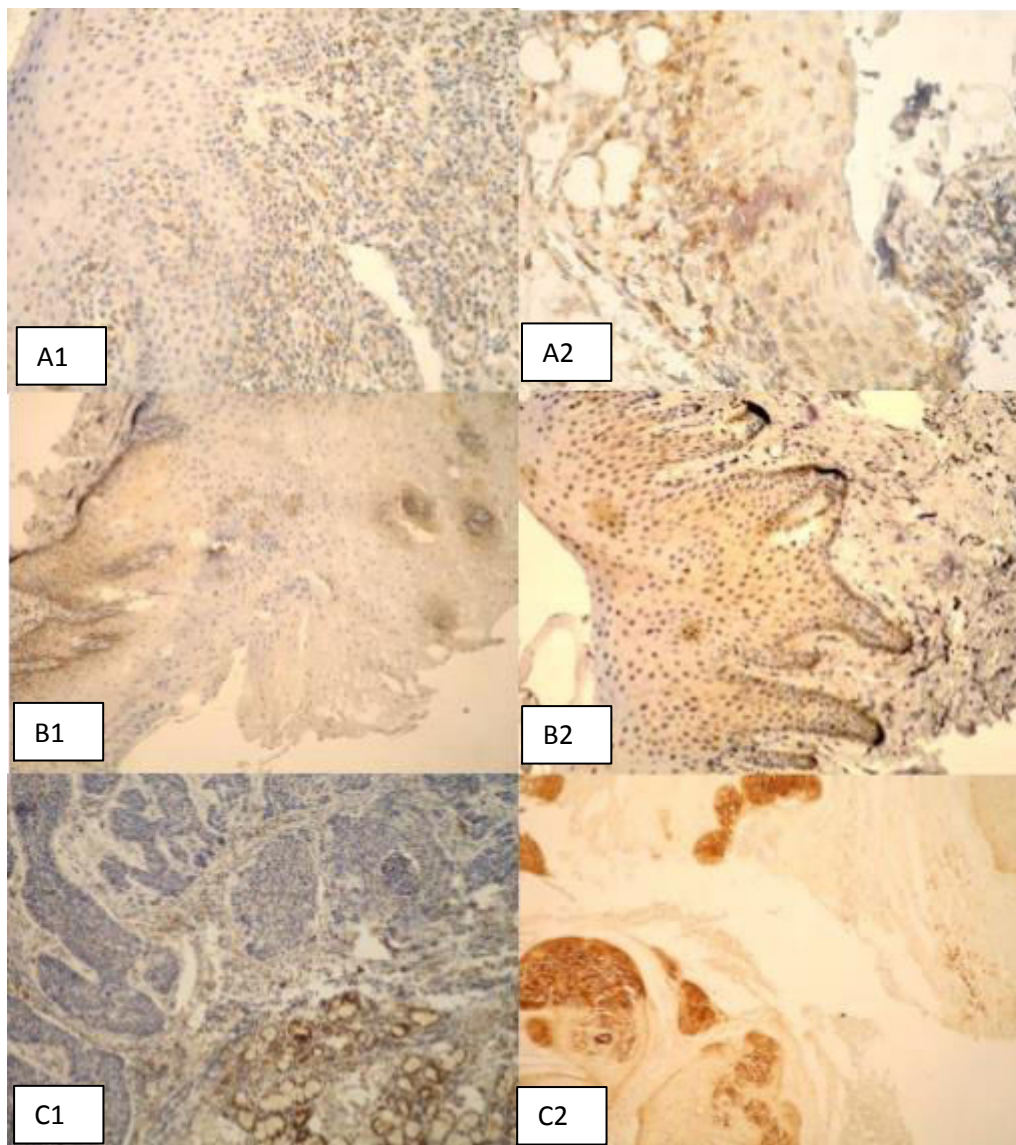
Rezultati analize pokazali su da je izraženost FHIT-a jednaka ili veća od 10% u pokrovnom epitelu značajno prisutna u epitelu zdrave sluznice u odnosu na OLP (P=0,023) i karcinom pločastih stanica (P=0,004) dok razlika izraženosti FHIT-a u epitelu OLP-a i karcinomu nije bila značajna (P=0,237) kao što je vidljivo u Tablici 9 i Slici 20 i 21.

**Tablica 9.** Razlike izraženosti FHIT-a u pokrovnom epitelu između bolesnika s oralnim lihen planusom, karcinomom pločastih stanica usne šupljine i zdrave oralne sluznice: hi kvadrat test

		Skupine						Rezultati testiranja*	Rezultati testiranja**	Rezultati testiranja***
		Oralni lihen planus		Karcinom pločastih stanica		Zdrava oralna sluznica				
		N	%	N	%	N	%			
FHIT epitel	Manje od 10%	30	60,0%	15	75,0%	6	30,0%	X <sup>2</sup> =1,400 df=1 P=0,237	X <sup>2</sup> =5,147 df=1 P=0,023	X <sup>2</sup> =8,120 df=1 P=0,004
	Jednako ili više od 10%	20	40,0%	5	25,0%	14	70,0%			



**Slika 20.** Razlike izraženosti FHIT-a u pokrovnom epitelu između bolesnika s oralnim lihen planusom, karcinomom pločastih stanica i zdrave oralne sluznice.



**Slika 21:** Izraženost FHIT-a; A: OLP; B: zdrava oralna sluznica; C: karcinom pločastih stanica (1 manje od 10%; 2 jednako ili više od 10%) (FHITx200).

### 5.2.3. Karakteristike izraženosti EGFR-a u epitelu u oralnom lihen planusu, karcinomu pločastih stanica i zdravoj oralnoj sluznici

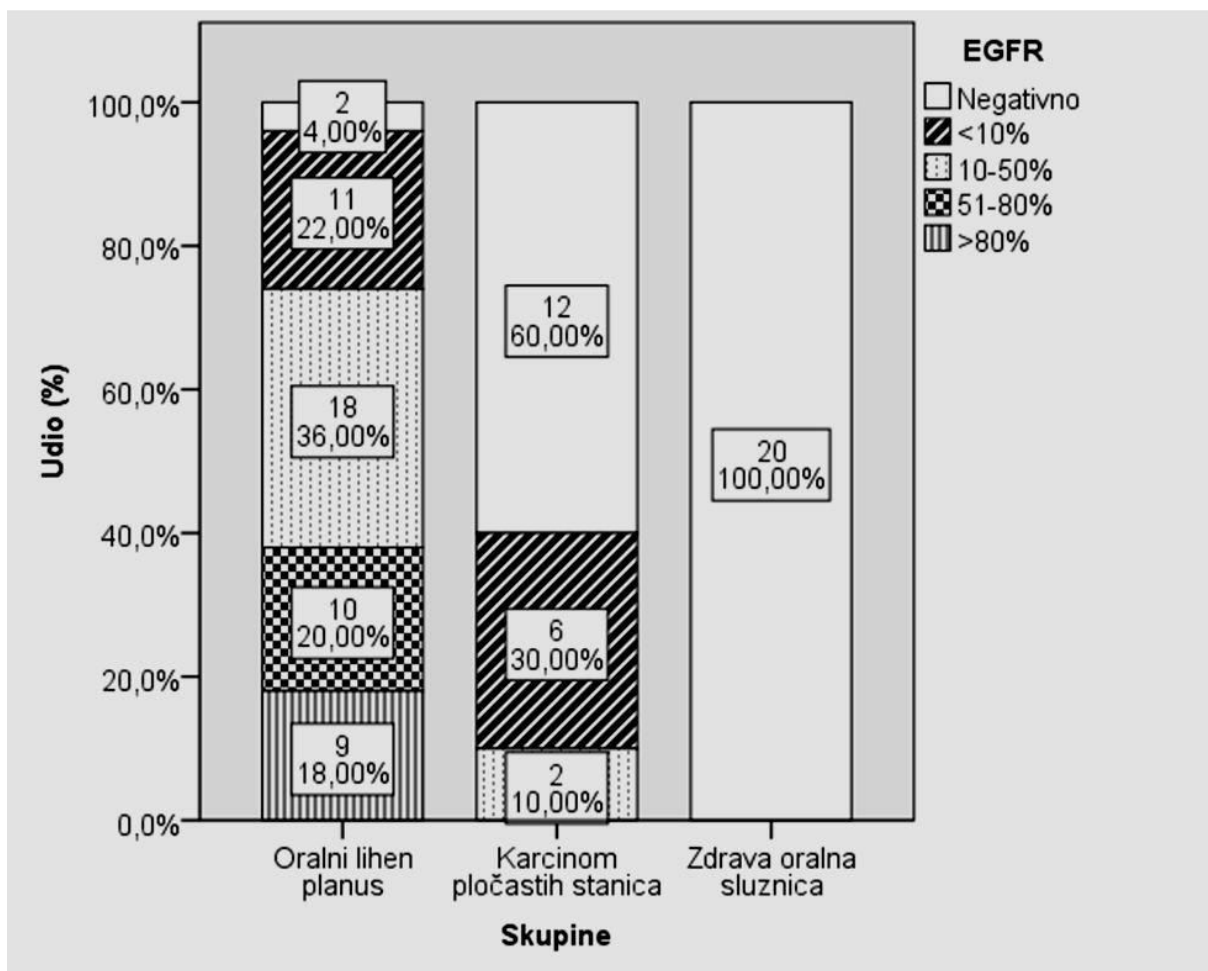
Razlike izraženosti EGFR-a i pokrovom epitelu između bolesnika s OLP-om, karcinoma pločastih stanica i zdrave oralne sluznice prikazane su u Tablici 10 te Slikama 22 i 23 u kojima se vidi da je izraženost EGFR-a u OLP-u i karcinomu pločastih stanica značajno veća u odnosu na zdravu oralnu sluznicu.

Usporedbom međusobnih odnosa karcinoma pločastih stanica i OLP-a nađu se značajno veće vrijednosti izraženosti EGFR-a u OLP-u ( $P < 0,001$ ).

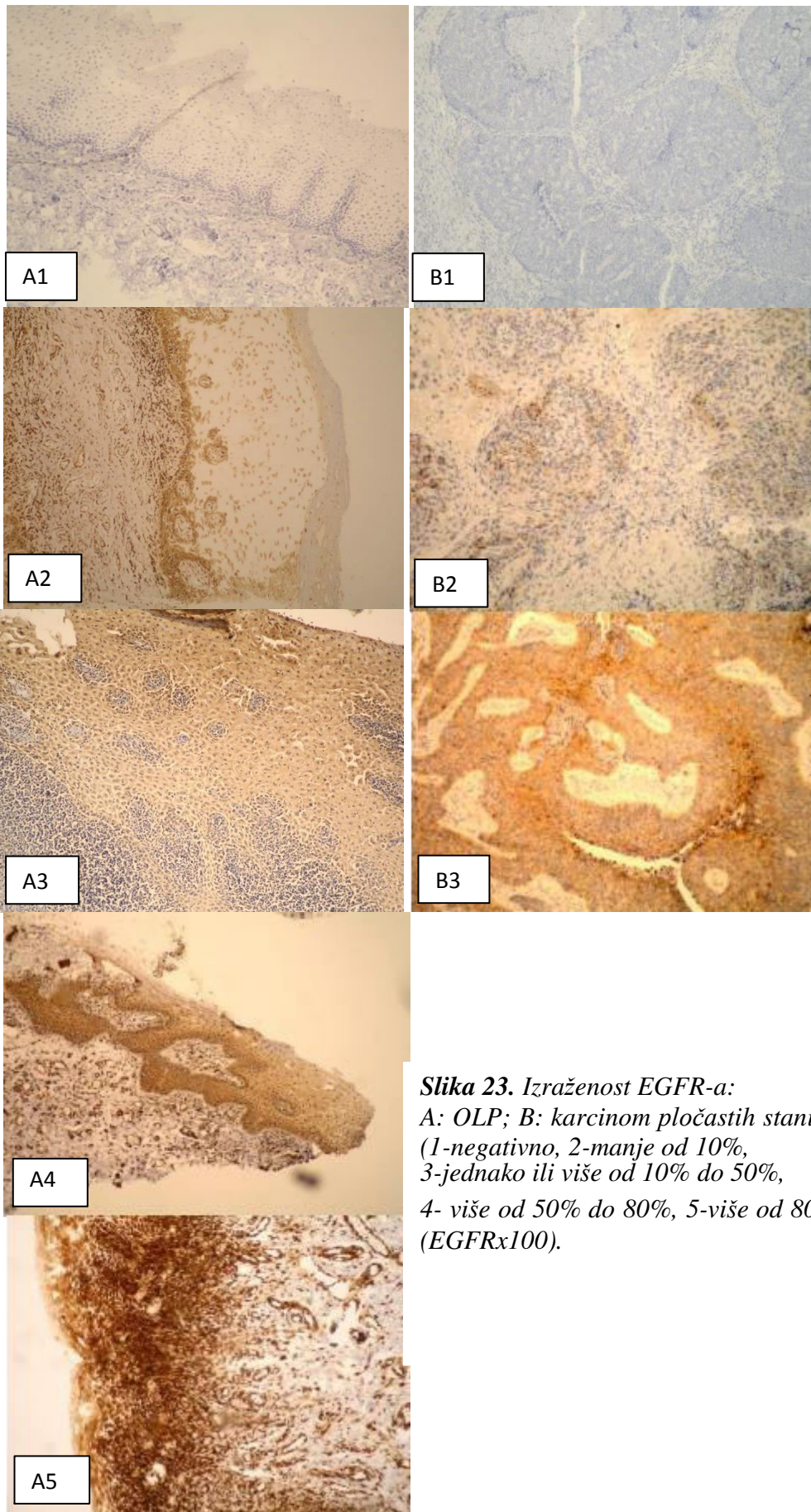
**Tablica 10.** Razlike izraženosti EGFR-a u pokrovnom epitelu između bolesnika s oralnim lihen planusom, karcinomom pločastih stanica i zdrave oralne sluznice: hi kvadrat test

		Skupine						Rezultati testiranja*	Rezultati testiranja**	Rezultati testiranja***
		Oralni lihen planus		Karcinom pločastih stanica		Zdrava oralna sluznica				
		N	%	N	%	N	%			
EGFR	Negativno	2	4,0%	12	60,0%	20	100,0%	$X^2=33,756$ df=4 $P < 0,001$	$X^2=61,091$ df=4 $P < 0,001$	$X^2=10,00$ df=4 $P=0,007$
	Manje od 10%	11	22,0%	6	30,0%	0	,0%			
	Jednako ili više od 10% do 50%	18	36,0%	2	10,0%	0	,0%			
	Više od 50% do 80%	10	20,0%	0	,0%	0	,0%			
	Više od 80%	9	18,0%	0	,0%	0	,0%			

\* Razlike između oralnog lihen planusa i karcinoma pločastih stanica; \*\* Razlike između oralnog lihen planusa i zdrave oralne sluznice; \*\*\* Razlike između karcinoma pločastih stanica i zdrave oralne sluznice.



*Slika 22. Razlike izraženosti EGFR-a u pokrovnom epitelu između bolesnika s oralnim lihen planusom, karcinomom pločastih stanica i zdrave oralne sluznice: hi kvadrat test.*



**Slika 23. Izraženost EGFR-a:**  
*A: OLP; B: karcinom pločastih stanica;*  
*(1-negativno, 2-manje od 10%,*  
*3-jednako ili više od 10% do 50%,*  
*4- više od 50% do 80%, 5-više od 80%)*  
*(EGFRx100).*

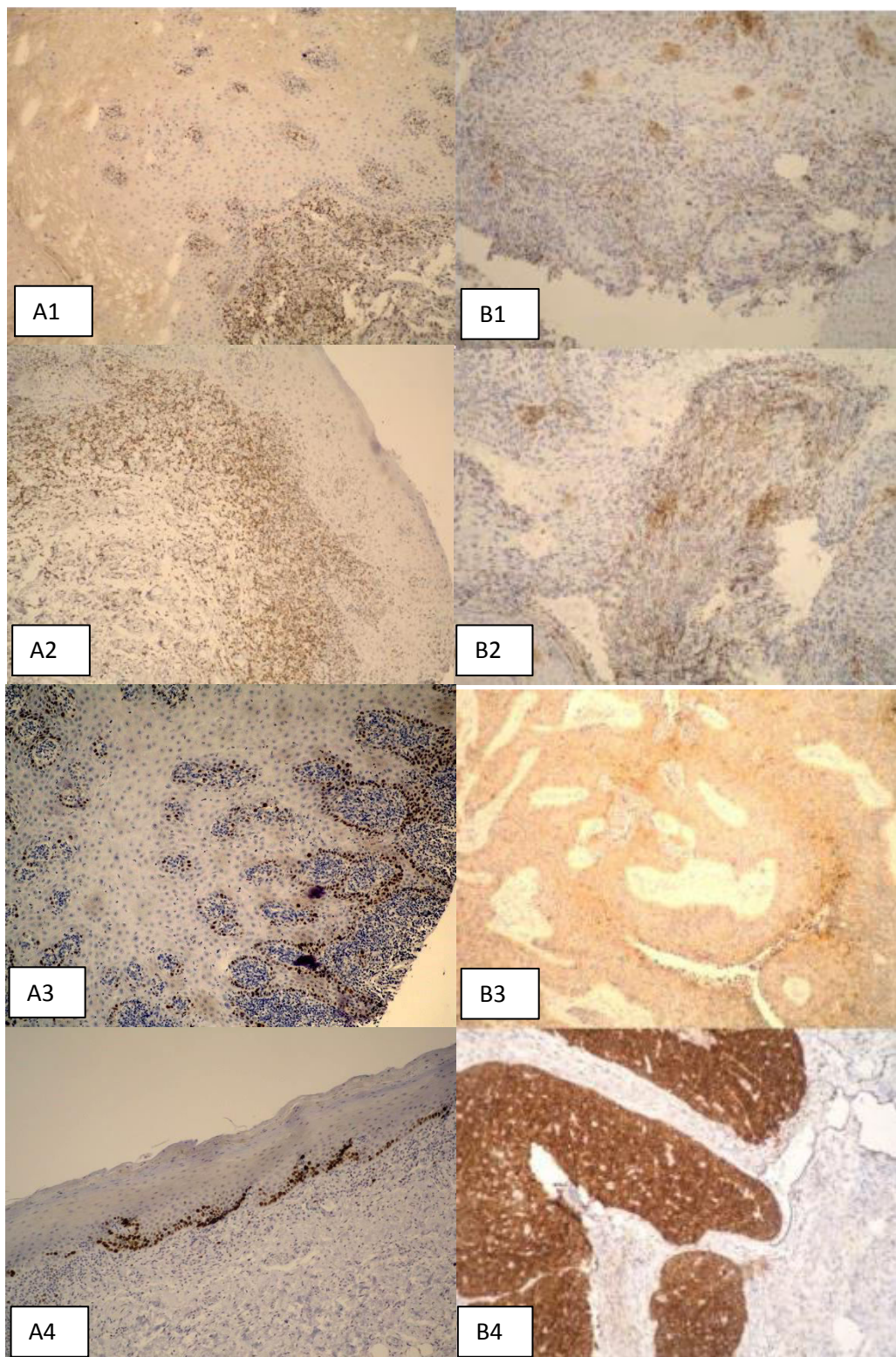
#### 5.2.4. Karakteristike izraženosti Bcl-2 u epitelu u oralnom lihen planusu, karcinomu pločastih stanica i zdravoj oralnoj sluznici

U Tablici 11 i na Slikama 24 i 25 prikazana je izraženost Bcl-2 u pokrovnom epitelu bolesnika s oralnim lihen planusom, karcinomom pločastih stanica i zdrave oralne sluznice. Izraženost Bcl-2 bila je značajno veća u epitelu bolesnika s OLP-om ( $P < 0,001$ ) i karcinomu pločastih stanica ( $P = 0,009$ ) u odnosu na zdravu oralnu sluznicu.

**Tablica 11.** Razlike izraženosti Bcl-2 u pokrovnom epitelu između bolesnika s oralnim lihen planusom, karcinomom pločastih stanica i zdrave oralne sluznice: hi kvadrat test

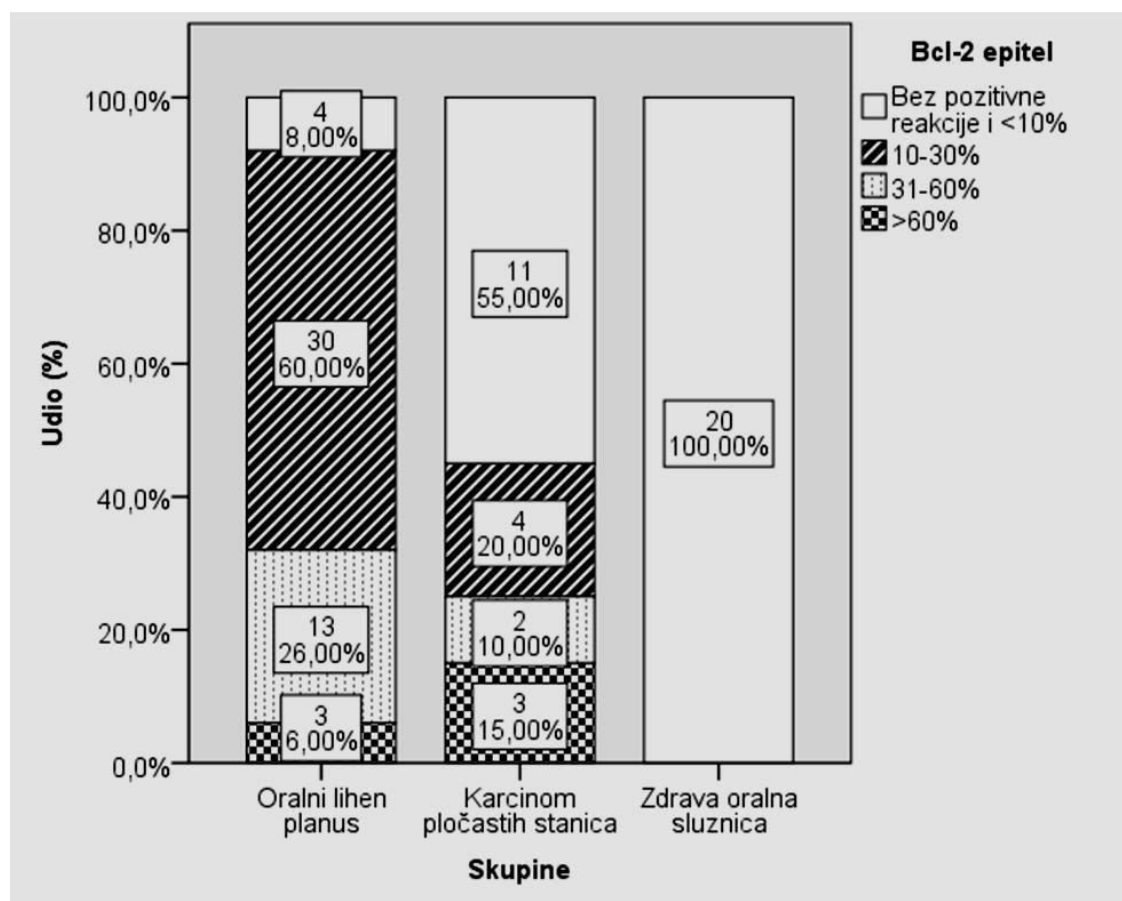
	Skupine							Rezultati testiranja*	Rezultati testiranja**	Rezultati testiranja***
	Oralni lihen planus		Karcinom pločastih stanica		Zdrava oralna sluznica					
	N	%	N	%	N	%				
Bez pozitivne reakcije i manje 10 %	4	8,0%	11	55,0%	20	100,0%	$X^2=22,489$ df=3 $P < 0,001$	$X^2=53,667$ df=3 $P < 0,001$	$X^2=11,613$ df=3 $P = 0,009$	
Jednako ili više od 10% do do 30%	30	60,0%	4	20,0%	0	,0%				
Više od 30% do 60%	13	26,0%	2	10,0%	0	,0%				
Više od 60%	3	6,0%	3	15,0%	0	,0%				

\* Razlike između oralnog lihen planusa i karcinoma pločastih stanica; \*\* Razlike između oralnog lihen planusa i zdrave oralne sluznice; \*\*\*Razlike između karcinoma pločastih stanica i zdrave oralne sluznice.



**Slika 24.** Izraženost Bcl-2; A-OLP; B-karcinom pločastih stanica; (1-manje od 10%, 2-jednako ili više od 10% do 30%, 3-više od 30% do 60%, 4-više od 60%) (Bcl-2x100).

Međuodnosi karcinoma pločastih stanica i OLP-a pokazuju značajno veće vrijednosti izraženosti Bcl-2 u epitelu u oralnom lihen planusu ( $P < 0,001$ ), a posebno je vidljivo u kategoriji izraženosti Bcl-2 u OLP-u jednakom ili više od 10% do 30%.



*Slika 25. Razlike izraženosti Bcl-2 u pokrovnom epitelu između bolesnika s oralnim lihen planusom, karcinomom pločastih stanica i zdrave oralne sluznice:hi kvadrat test.*



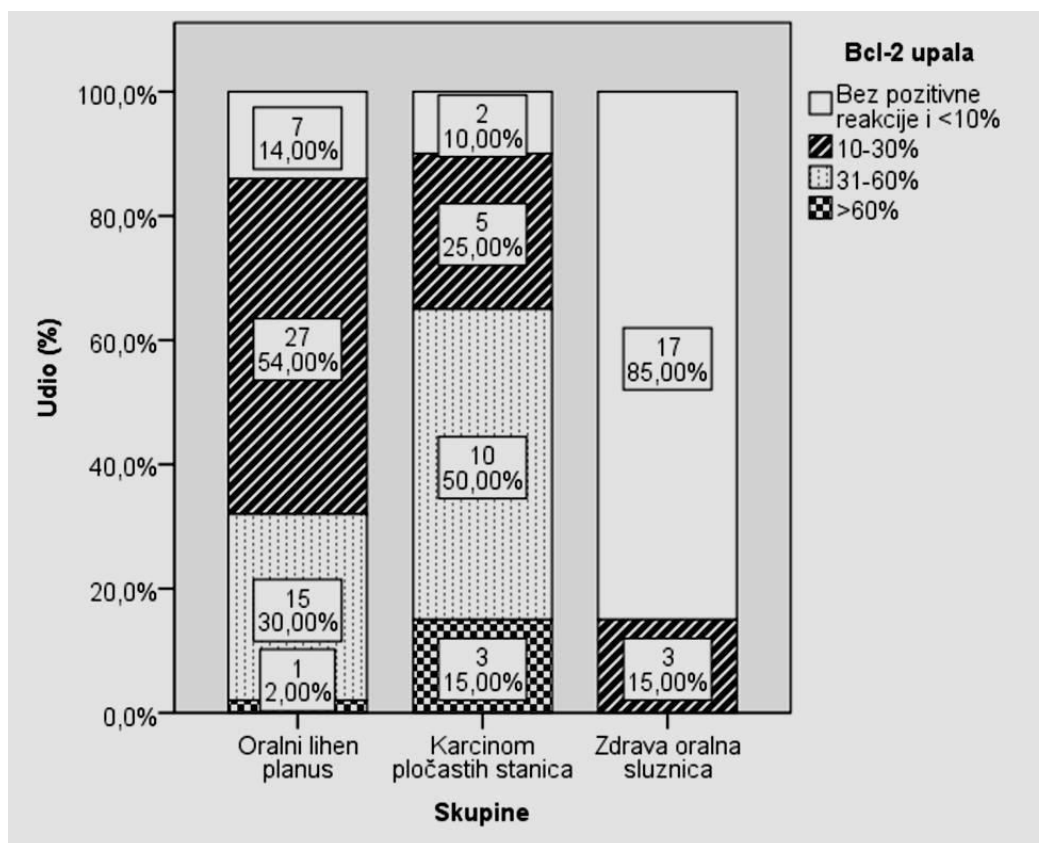
### 5.2.5. Karakteristike izraženosti Bcl-2 u subepitelnom upalnom infiltratu u oralnom lihen planusu, karcinomu pločastog epitela i zdravoj oralnoj sluznici

Hi kvadrat testom prikazane su razlike izraženosti Bcl-2 u subepitelnom upalnom infiltratu između bolesnika s OLP-om, karcinomom pločastih stanica i zdrave oralne sluznice. Tablica 12 i Slika 26 prikazuju razlike izraženosti u kojima je vidljivo da je izraženost Bcl-2 značajno veća u upalnom infiltratu bolesnika s oralnim lihen planusom ( $P < 0,001$ ) i karcinomom pločastih stanica ( $P < 0,001$ ) u odnosu na zdravu oralnu sluznicu.

**Tablica 12.** Razlike izraženosti Bcl-2 u subepitelnom upalnom infiltratu između bolesnika s oralnim lihen planusom, karcinomom pločasti stanica i zdrave oralne sluznice: hi kvadrat test

	Skupine						Rezultati testiranja*	Rezultati testiranja**	Rezultati testiranja***	
	Oralni lihen planus		Karcinom pločastih stanica		Zdrava oralna sluznica					
	N	%	N	%	N	%				
Bcl-2 upala	Bez pozitivne reakcije i manje od 10%	7	14,0%	2	10,0%	17	85,0%	$X^2=8,631$ df=3 $P=0,035$	$X^2=32,474$ df=3 $P<0,001$	$X^2=25,342$ df=3 $P<0,001$
	Jednako ili više od 10% do 30%	27	54,0%	5	25,0%	3	15,0%			
	Više od 3% do 60%	15	30,0%	10	50,0%	0	,0%			
	Više od 60%	1	2,0%	3	15,0%	0	,0%			

\* Razlike između oralnog lihen planusa i karcinoma pločastih stanica; \*\*Razlike između oralnog lihen planusa i zdrave oralne sluznice; \*\*\*Razlike između karcinoma pločastih stanica i zdrave oralne sluznice.



*Slika 26. Razlike izraženosti Bcl-2 u subepitelnom upalnom infiltratu između bolesnika s oralnim lihen planusom, karcinomom pločastih stanica i zdrave oralne sluznice:hi kvadrat test.*

Gledajući međudnose karcinoma pločastih stanica i oralnog lihen planusa (Tablica 12, Slika 26), značajno veće izraženosti Bcl-2 u subepitelnom upalnom infiltratu nađene su u karcinomu pločastih stanica ( $P=0,035$ ).

## 5.2.6. Karakteristike izraženosti FHIT-a u subepitelnom upalnom infiltratu u oralnom lihen planusu, karcinomu pločastih stanica i zdravoj oralnoj sluznici

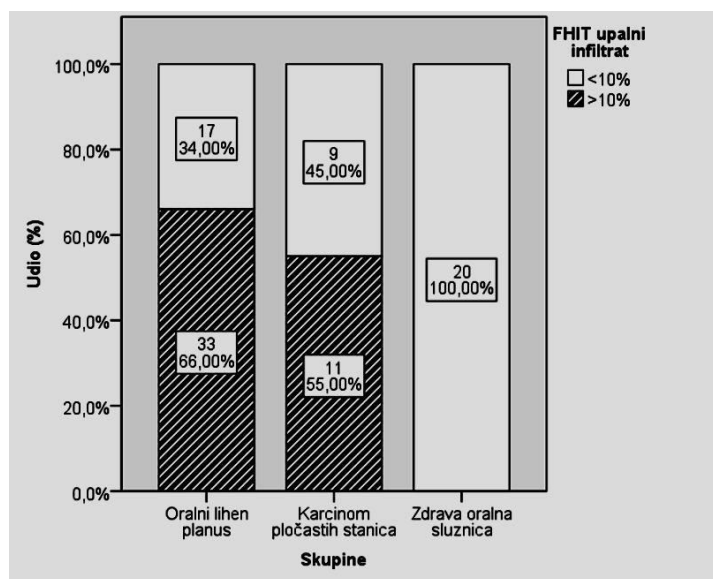
Dodatno je hi kvadrat testom analizirana izraženost FHIT-a u upalnom infiltratu (Tablica 13, Slika 27).

**Tablica 13.** Razlike izraženosti FHIT-a u upalnom infiltratu između bolesnika s oralnim lihenom planusom, karcinomom pločastih stanica i zdrave oralne sluznice: hi kvadrat test

	Skupine						Rezultati testiranja*	Rezultati testiranja**	Rezultati testiranja***	
	Oralni lihen planus		Karcinom pločastih stanica		Zdrava oralna sluznica					
	N	%	N	%	N	%				
FHIT upala	Manje od 10%	17	34	9	45	20	100	$X^2=0,740$ df=1 P=0,390	$X^2=24,973$ df=1 P<0,001	$X^2=15,172$ df=1 P<0,001
	Više od 10%	33	66	11	55	0	,0			

\* Razlike između oralnog lihen planusa i karcinoma pločastih stanica; \*\*Razlike između oralnog lihen planusa i zdrave oralne sluznice; \*\*\*Razlike između karcinoma pločastih stanica i zdrave oralne sluznice.

Tablica 13 prikazuje da je izraženost FHIT-a manja od 10% značajnije bila prisutna u upalnom infiltratu zdrave oralne sluznice u odnosu na oralni lihen planus (P<0,001) i karcinom pločastih stanica (P<0,001) dok razlika izraženosti FHIT-a između upalnog infiltrata oralnog lihen planusa i karcinoma pločastih stanica nije bila značajna (P=0,390) što je grafički prikazano i na Slici 27.



**Slika 27.** Razlike izraženosti FHIT-a u upalnom infiltratu između bolesnika s oralnim lihen planusom i karcinomom pločastih stanica usne šupljine i zdrave oralne sluznice.

**5.2.7. Korelacije izraženosti FHIT-a, EGFR-a, Bcl-2 u epitelu i FHIT-a i Bcl-2 u subepitelnom upalnom infiltratu u odnosu na dob i gustoću upalnog infiltrata u skupinama bolesnika s OLP-om i karcinomom pločastih stanica**

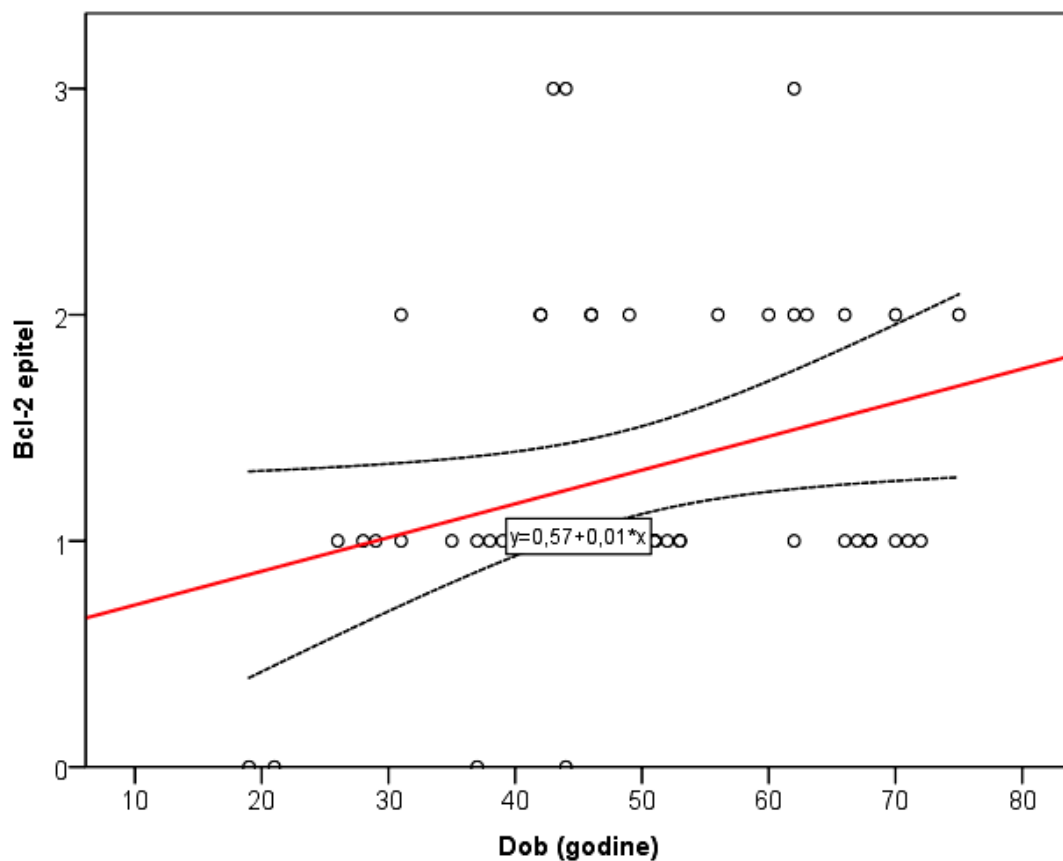
Spearmanovim korelacijskim koeficijentom izražena je korelacija FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u epitelu i upalnom infiltratu u odnosu na dob i gustoću upalnog infiltrata u skupinama bolesnika s OLP-om u odnosu na skupinu bolesnika s karcinomom pločastih stanica (Tablica 14, Slika 28).

**Tablica 14.** Korelacija EGFR, Bcl-2 i FHIT-a u epitelu i u upalnom infiltratu s dobi i upalom: Spearmanov korelacijski koeficijent

		Lihen planus		Ca pločastih stanica	
		Dob (godine)	Upala	Dob (godine)	Upala
EGFR	Korelacijski koeficijent	0,108	-0,031	-0,099	
	P	0,457	0,833	0,677	NA
	N	50	50	20	
Bcl-2 epitel	Korelacijski koeficijent	0,288	0,258	0,114	
	P	0,042	0,070	0,632	NA
	N	50	50	20	
Bcl-2 upala	Korelacijski koeficijent	0,234	0,271	0,046	
	P	0,101	0,057	0,848	NA
	N	50	50	20	
FHIT epitel	Korelacijski koeficijent	-0,133	-0,008	0,311	
	P	0,357	0,954	0,182	NA
	N	50	50	20	
FHIT upala	Korelacijski koeficijent	0,019	0,153	-0,236	
	P	0,896	0,290	0,317	NA
	N	50	50	20	

NA: nema podataka

Jedina značajna korelacija je pozitivna korelacija dobi s izraženošću Bcl-2 u epitelu ( $\rho=0,288$ ,  $P=0,042$ ), što znači da stariji ispitanici s oralnim lihen planusom imaju veću izraženost Bcl-2 u epitelu (Slika 28).



*Slika 28. Grafički prikaz pozitivne korelacije Bcl-2 u epitelu s dobi kod bolesnika s oralnim lihen planusom.*

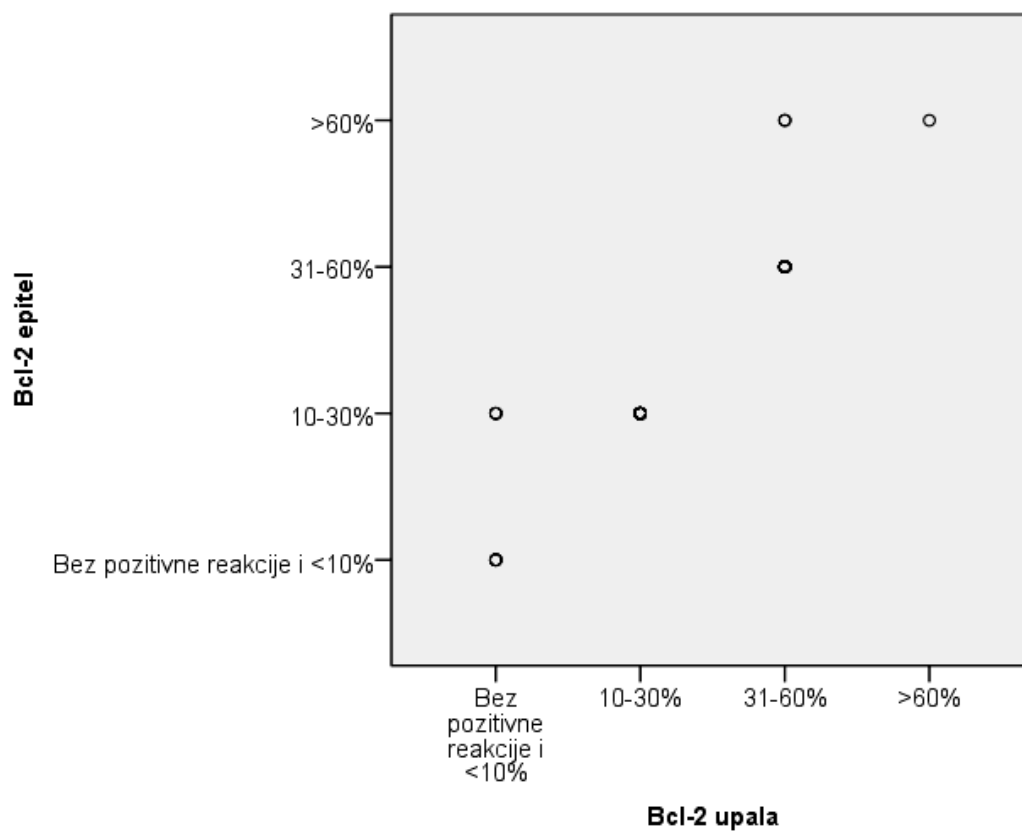
### 5.2.8. Korelacije izraženosti FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u epitelu i Bcl-2 i FHIT-a u subepitelnom upalnom infiltratu u skupinama bolesnika s OLP-om i karcinomom pločastih stanica

Spearmanovim korelacijskim koeficijentom prikaže se izrazito jaka i značajna pozitivna korelacija izraženosti Bcl-2 u epitelu s izraženošću Bcl-2 u upalnom infiltratu u bolesnika s oralnim lihen planusom ( $\rho=0,946$ ,  $P<0,001$ ) pri čemu ti odnosi nisu bili značajni u bolesnika s karcinomom pločastih stanica (Tablica 15, Slika 29).

**Tablica 15.** Korelacije Bcl-2 i FHIT-a u upalnom infiltratu s izraženošću EGFR-a, Bcl-2 i FHIT-a u epitelu: Spearmanov korelacijski koeficijent

		Lihen planus		Ca pločastih stanica	
		Bcl-2 upalni infiltrat	FHIT upalni infiltrat	Bcl-2 upalni infiltrat	FHIT upalni infiltrat
EGFR	Korelacijski koeficijent	0,063	0,024	-0,205	-0,080
	P	0,664	0,867	0,385	0,737
	N	50	50	20	20
Bcl-2 epitel	Korelacijski koeficijent	<b>0,946</b>	<b>0,440</b>	-0,256	0,038
	P	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>	0,277	0,872
	N	<b>50</b>	<b>50</b>	20	20
FHIT epitel	Korelacijski koeficijent	-0,245	<b>0,327</b>	0,097	0,058
	P	0,087	<b>0,020</b>	0,683	0,808
	N	50	<b>50</b>	20	20

Značajne pozitivne korelacije, kao što je vidljivo u Tablici 15, ali nešto slabijeg koeficijenta pronađene su između izraženosti Bcl-2 u epitelu te FHIT-a u upalnom infiltratu ( $\rho=0,440$ ,  $P=0,001$ ), kao i između FHIT-a u epitelu i FHIT-a u upalnom infiltratu ( $\rho=0,327$ ,  $P=0,020$ ). U skupini ispitanika s karcinomom pločastih stanica nije bilo značajnih korelacija.



*Slika 29. Pozitivna korelacija Bcl-2 u epitelu s Bcl-2 u upalnom infiltratu u ispitanika s oralnim lihen planusom.*

## 6. RASPRAVA

Epidemiološki podaci koji upozoravaju da je oralni karcinom jedan od deset najčešćih uzroka smrti naglašavaju potrebu poznavanja svih faza razvoja oralnog karcinoma uključujući i razvojne faze prekanceroznih lezija usne šupljine. Oralni lihen planus se prema WHO-u od 1978. godine ubraja u prekancerozne lezije usne šupljine i definira kao premaligno generalizirano stanje s povećanim rizikom za nastanak karcinoma, no koliki je taj rizik za sada nije dovoljno poznato (7-9, 11, 13-15, 17). U prilog tome idu i brojne prospektivne i retrospektivne studije u posljednjih nekoliko desetljeća u kojima je incidencija maligne transformacije bila od 0% do 5,3%, pri čemu se ukupna incidencija maligne transformacije prema nedavnim analizama procjenjuje od 0,5% do 1,2% (7, 17, 205-207).

Pretpostavlja se da OLP lezije imaju višu razinu proliferacije bazalnih stanica nego zdrava oralna sluznica pa prema tome i sposobnost nagomilavanja nepopravljivih oštećenja DNA koja doprinose malignoj transformaciji (8, 10, 11, 17, 205). Osnovni problemi u proučavanju malignog potencijala OLP-a nalaze se u činjenici da i unatoč dobro definiranim kriterijima za OLP, oni još uvijek nisu općeprihvaćeni (17, 19, 206, 207). Nadalje, makroskopska i histološka slika može oponašati druge bolesti, a faze remisije i recidiva, te nedovoljno dugo i neredovito praćenje bolesnika ne doprinose rasvjetljavanju problematike malignog potencijala OLP-a (17, 19, 37, 40-44).

Kao i za sve prekanceroze, osnovno pitanje prilikom dijagnosticiranja OLP-a bolesniku je hoće li se i može li se ova lezija transformirati u karcinom, odnosno postoji li određena promjena u samoj leziji koja bi upućivala na to da su se unutar lezije dogodile promjene koje će neizostavno dovesti do nastanka malignog tumora (u ovom slučaju karcinoma pločastih stanica) (7, 11, 25, 54, 207). Najveći naglasak pri postavljanju dijagnoze OLP-a je u individualnom pristupu, odnosno stvaranjem plana kako i koliko će se bolesnik pratiti odnosno kojim metodama (biljezima) detektirati da OLP lezija više nije reverzibilna te se mora tretirati poput maligne lezije (11, 60-62, 64-67).

Svrha ovog istraživanja bila je imunohistokemijski analizirati izraženost FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u zdravoj oralnoj sluznici, OLP-u i karcinomu pločastih stanica usne šupljine pri čemu bi razlike izraženosti u epitelu u odnosu na gustoću upalnog infiltrata mogle upućivati na odgovor mogu li se oni koristiti kao biljezi koji bi pomogli u izdvajanju podgrupe bolesnika s OLP-om u većem riziku za malignu transformaciju (69, 70, 76, 80, 82, 89, 92-95, 207, 208). Intenzivnijim praćenjem tih bolesnika na vrijeme bi se otkrila maligna transformacija i terapijski pristup bio bi



uspješniji (91, 208). Rezultati ovog istraživanja u budućnosti mogli bi se koristiti sa sadašnjim saznanjima o djelovanju dostupnih lijekova čija primjena za sada je rezervirana samo za maligne tumore, no ne i za prekancerozne lezije i stanja (91, 105, 116, 118, 120, 190, 193, 208, 209).

Čini se kako u procesu maligne transformacije OLP-a sudjeluje više faktora u koje su osim histološke potvrde OLP-a u usnoj šupljini uključene i demografske karakteristike samog OLP bolesnika. Ove tvrdnje potkrepljuju demografske studije o OLP bolesnicima u kojima se pokušala utvrditi patogeneza OLP-a, odnosno rizik maligne transformacije te definirati pokazatelje kojima bi se izdvojila podgrupa bolesnika s OLP-om koji su u većem riziku od maligne transformacije nego drugi oboljeli od OLP-a (7, 14, 205, 207-211). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s brojnim istraživanjima demografskih karakteristika OLP bolesnika u kojima je dominantan udio bolesnika bio ženskog spola obostrane lokalizacije na obraznoj sluznici i većina su bili nepušači (7, 14, 98, 205, 207).

Nadalje, najveći udio svih OLP lezija, pa tako i u našem istraživanju, odnosio se na retikularni oblik OLP-a, no potrebno je napomenuti da neki manje učestali oblici poput eritematoznog i erozivnog oblika, kao što je objavljeno u nekim studijama, čini se imaju i veći maligni potencijal (2, 3, 6, 17, 19, 208). Ovim istraživanjem ova činjenica nije mogla biti analizirana zbog toga što su svi bolesnici imali histološki potvrđeni retikularni oblik OLP-a.

U ovom istraživanju usporedbom analize dobi i lokalizacije lezija u skupinama bolesnika s OLP-om, karcinomom pločastih stanica i skupini sa zdravom oralnom sluznicom primijećeno je da su OLP bolesnici bili statistički značajno niže srednje životne dobi u odnosu na bolesnike s novodijagnosticiranim karcinomom pločastih stanica. Najčešća lokalizacija OLP-a bila je obrazna sluznica, dok je najčešća lokalizacija malignog tumora bilo područje jezika (baza, postranična strana jezika). Dob i lokalizacija promjena u skupini sa zdravom oralnom sluznicom nije se bitno razlikovala od OLP skupine. Usporedbom dobi u OLP skupini u pušača i nepušača nije nađena značajna razlika iako je u pušača srednja životna dob bila nešto niža nego u nepušača. Ova činjenica bila je posebno vidljiva u skupini pušača ženskog spola, no zbog nepostojanja informacija o duljini i količini pušenja, te eventualnoj konzumaciji alkoholnih pića rezultate ove analize potrebno je oprezno interpretirati. Pojedina istraživanja, uključujući i izvješće WHO-a, o uživanju duhana zapravo ne mogu uspostaviti vezu između uživanja duhana i nastanka karcinoma pločastih stanica koji je nastao iz OLP-a budući da se takav oblik tumora češće dijagnosticirao u nepušača te se čini kako su u malignoj transformaciji OLP-a ipak zaslužni drugi etiološki čimbenici i drugačija patogeneza, a da pušenje nije najvažniji rizični čimbenik u malignoj transformaciji OLP-a (9, 205-207).

Reibel u svom istraživanju primjećuje da bijele lezije dna usne šupljine i jezika imaju veći maligni potencijal nego bijele lezije drugih lokalizacija u usnoj šupljini (7). Fitzpatrick i sur. su istražujući demografske karakteristike i maligni potencijal OLP lezija, dodatno potkrijepili Reibelovo istraživanje (205). Utvrdili su da je maligna transformacija u OLP-u iznosila 1,09% s blagom prevalencijom u ženskog spola, pri čemu je najčešća lokalizacija bila jezik (205). Istim istraživanjem pokazalo se da je životna dob u promatrane OLP populacije bila je gotovo ista srednjoj životnoj dobi dijagnosticiranja karcinoma pločastih stanica u usnoj šupljini koji nije nastao iz OLP-a (205).

Temeljem dostupnih studija demografskih karakteristika bolesnika s OLP-om, uz dobivene rezultate ovog istraživanja, može se zaključiti da se u podgrupu bolesnika s OLP-om koji su u povišenom riziku za malignu transformaciju mogu uvrstiti bolesnici starije životne dobi, posebno ženskog spola i uobičajene lokalizacije OLP lezije (205, 207, 209). Takvi OLP bolesnici sukladno i ovom istraživanju zahtijevaju intenzivnije kliničko praćenje OLP-a, a čini se kako lokalizacija u području jezika ima i nešto veći rizik. S oprezom bi se trebao uzeti u obzir podatak pojedinih studija i ovog istraživanja u kojima nije nađena značajna povezanost između OLP-a i uživanja duhana (9, 205-207). Dodatno bi se uz obaveznu histološku potvrdu OLP-a, sukladno i ovom istraživanju, bolesnice nepušači više životne dobi i neuobičajene lokalizacije OLP-a trebale uvrstiti u podgrupu bolesnika s većim rizikom za nastanak maligne transformacije.

Temeljem objavljenog istraživanja u kojem su Fitzpatrick i sur. utvrdili su da je prosječno vrijeme nastanka karcinoma u novodijagnosticiranih OLP bolesnika 51,4 mjesec uz nalaz niže srednje životne dobi OLP pušača, moglo bi se zaključiti da je ta podgrupa bolesnika u povišenom riziku za nastanak karcinoma iz OLP lezija. Nastanak tumora bi se prema tome u toj skupini mogao očekivati u nižoj životnoj dobi nego je to u karcinoma pločastih stanica koji nije nastao iz OLP-a (205). Analiza srednje životne dobi OLP bolesnika i skupine sa zdravom oralnom sluznicom nije pokazala značajnu razliku. Moguće je za pretpostaviti da se i u toj grupi ispitanika sa zdravom oralnom sluznicom također nalaze neotkriveni OLP bolesnici koji su u povećanom riziku za malignu transformaciju, ponajprije što se OLP uglavnom ne manifestira subjektivnim simptomima (208, 209).

U svakoj leziji s potencijalno malignim karakterom postoji velika potreba za pronalaženjem objektivnih biljega koji bi izdvojili bolesnike s rizikom maligne transformacije, no do sada takav biljeg nije dostupan, pa tako niti za OLP (208). Potencijalni prognostički biljezi za povećani rizik za nastanak karcinoma mogle bi biti genetske i molekularne promjene koje se javljaju tijekom karcinogeneze (89, 90, 92-95, 207, 208). Izazov u polju oralnih prekanceroza je

predvidjeti koja lezija će se razviti u karcinom. Tim postupkom izdvojila bi se podgrupa bolesnika kojima će se češćim kliničkim praćenjem, odnosno agresivnijim terapijskim pristupom, spriječiti, odgoditi i na vrijeme prepoznati maligna transformacija.

Osnovni problem u izdvajanju podgrupe bolesnika s oralnim lezijama koji imaju povišeni rizik od maligne transformacije je u tome što ne postoje općeprihvaćena klinička i histopatološka gledišta u postupcima i načinima praćenja prekanceroznih oralnih lezija (17, 120, 121, 207, 208). Brojnim imunohistokemijskim studijama pokušala se pronaći veza između izraženosti proučavanih biljega i maligne transformacije OLP-a (201, 204).

U ovom istraživanju se semikvantitativno određivala izraženost FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u epitelu OLP-a, karcinoma pločastih stanica te epitelu zdrave oralne sluznice, uz analizu izraženosti FHIT-a i Bcl-2 u subepitelnom upalnom infiltratu. Analizom se ne nađe značajna razlika izraženosti pojedinih biljega u epitelu i upalnom infiltratu u odnosu na gustoću subepitelnog upalnog infiltrata, iako je za očekivati sukladno i drugim istraživanjima da je upalni infiltrat neophodan u mogućoj malignoj transformaciji (205-211). Odnos izraženosti istraživanih biljega i gustoće subepitelnog upalnog infiltrata u OLP skupini upućuje na zaključak da su i u upalnom infiltratu i u epitelu osim razine izraženosti biljega, potrebni i drugi čimbenici koji bi potaknuli malignu transformaciju epitela (7, 65-67, 124, 125, 205-211).

Poznato je da se tijekom kronične upalne reakcije luče brojne biološki aktivne tvari koje izlučuju prvenstveno aktivirani makrofagi, trombociti, limfociti, fibroblasti te glatkomišićne stanice i endotelne stanice (114). Biološki aktivne tvari na mnogo načina sudjeluju u mehanizmu upale od kojih neki djeluju kemotaktično na neutrofile, makrofage, fibroblaste i glatkomišićne stanice, stimulirajući i angiogenezu (114, 210). Veza između kronične upale i karcinoma poznata je još od 1863. godine kada je Rudolf Virchow pronašao leukocite unutar tumorskog tkiva no do danas nije objašnjeno kako kronični upalni infiltrat pogoduje nastanku karcinoma iako postoje dokazi da kronična upala daje poticaj za nastanak nekih tipova karcinoma (60). Dugotrajna infekcija inducira nastanak kroničnog upalnog infiltrata. Leukociti, fagociti i druge upalne stanice produciraju reaktivne oksigenirane i nitrogenizirane radikale koji se normalno bore protiv upalnog infiltrata, ali također mogu potaknuti oštećenje DNA u proliferirajućim stanicama (61, 210, 211). Ponovljena oštećenja tkiva i regeneracija u vrlo reaktivnom okolišu prepunom nestabilnih radikala reagira s DNA u proliferirajućem epitelu što može na kraju rezultirati trajnim genomskim promjenama kao što su mutacije, delecije i rearanžiranje (61, 62, 210, 211).

Pokretanjem procesa apoptoze može se zaustaviti nagomilavanje DNA oštećenja u staničnoj populaciji. Smatra se da epitelne stanice u OLP bolesnika ne preferiraju apoptozu već

radije stanično mirovanje (od engl. cycle arrest) ili kreću u povišenu fazu proliferacije koja na kraju može biti pogodna za malignu transformaciju (207, 208). Ključnu ulogu u nagomilavanju oštećenja DNA ima Bcl-2 obitelj (207, 208, 211). Obitelj Bcl-2 proteina ima važnu ulogu u regulaciji apoptoze koju mogu zaustavljati ili poticati. Anti-apoptotički članovi obitelji su sastavni dio membrane mitohondrija dok se proapoptotički članovi obitelji nalaze se u citosolu ili citoskeletonu (208, 211). Ravnoteža te dvije populacije determinira podložnost stanice za apoptozu. Bcl-2 normalno blokira aktivaciju caspase 3 i ne pokreće se apoptotički put. Ako je Bcl-2 blokiran, stanica neizostavno putem Bax aktivacije caspase 3 kreće prema apoptotičkom procesu (208). Očekivalo bi se da se OLP prema tome, ako je utišana apoptoza, i u nekim slučajevima povišena faza proliferacije, uvijek ponaša kao prekanceroza, što brojnim studijama i ovim istraživanjem nije moglo biti dokazano za svaki pojedini OLP (206, 208, 210, 211).

Značajna razlika izraženosti FHIT-a u epitelu OLP-a u odnosu na epitel zdrave oralne sluznice, i nepostojanje značajne razlike u odnosu na karcinom pločastih stanica dovode do zaključka da se OLP samo u nekim situacijama ponaša kao prava prekanceroza (205-211). Analizirani rezultati u skladu su s nedavno objavljenim rezultatima studija u kojima se detektirao LOH pri čemu se u nekim slučajevima nije našlo razlike u odnosu na običnu iritaciju oralne sluznice (benignu upalu) (208). Autori međutim nisu mogli isključiti mogući maligni potencijal OLP-a putem nekog drugog genskog puta (208, 209). Isti autori su dodatnim analizama pokazali da u nekim OLP lezijama čak i s blagom displazijom postoji gubitak LOH-a te autori naglašavaju nužnost pažljive histološke procjene uzoraka (120, 121, 208). Temeljem rezultata našeg istraživanja, uključujući i rezultate molekularnih istraživanja može se zaključiti da je dijagnostika OLP-a izrazito kompleksna, a detekcija maligne transformacije u OLP-u iziskuje dodatne napore (209, 210). Dodatne probleme u patohistološkoj procjeni moguće maligne transformacije OLP-a stvaraju samo djelomične studije LOH analiza kojima su obuhvaćeni samo kromosomi 3, 9 i 17 (208).

Dakle, bez široke kohortne genomske analize, pojedinačne analize LOH-a samo su od informativnog karaktera (208, 209). Ipak, temeljem ovog istraživanja, značajna razlika izraženosti FHIT-a u OLP-u u odnosu na zdravu sluznicu navodi nas na zaključak da su se u bolesnika s OLP-om u epitelu već dogodile određene promjene, te da se u odnosu na karcinom pločastih stanica OLP u nekim slučajevima zaista ponaša kao prekanceroza. Rezultati ovog istraživanja uz nedavne analize maligne transformacije u OLP-u u kojima je opisan nizak rizik maligne transformacije (do 0,7%) upućuju na to da i unatoč niskom riziku maligne transformacije u OLP-u, redovito praćenje OLP bolesnika je neophodno (210).

Temeljem analize rezultata ovog istraživanja, može se zaključiti da razina izraženosti FHIT-a u epitelu bolesnika s OLP-om nije dovoljan biljeg čijom analizom bi se mogla izdvojiti skupina bolesnika s povećanim rizikom od maligne transformacije, a da izraženost Bcl-2 u epitelu i upalnom infiltratu, kako je prikazano najnovijim istraživanjima, može imati dvostruku ulogu; u malignoj transformaciji i progresiji (208). Usporedba izraženosti EGFR-a u sve tri skupine pokazala je značajno veću izraženost u skupinama s OLP-om i karcinomom pločastih stanica u odnosu na zdravu oralnu sluznicu uz značajno veću izraženost EGFR-a u OLP bolesnika u odnosu na karcinom pločastih stanica. Ovi pokazatelji navode na zaključak da je OLP, s obzirom na razlike izraženosti EGFR-a, moguća potencijalna biološka meta anti-EGFR terapije. OLP bolesnici kojima je analizom nađena značajno veća izraženost Bcl-2 u epitelu u odnosu na karcinom pločastih stanica predstavljaju skupinu OLP bolesnika koji bi se mogli uvrstiti u podgrupu s povišenim rizikom od maligne transformacije i koji zahtijevaju češće kliničko praćenje. Budući da se najveći broj OLP bolesnika grupirao u kategoriji izraženosti Bcl-2 jednakoj ili većoj od 10% do 30% moglo bi se pretpostaviti da je upravo ta skupina bolesnika najugroženija, i kako bi oni imali najveću praktičnu korist od intenzivnijeg praćenja i mogućeg agresivnijeg terapijskog pristupa što bi u konačnici utjecalo i na prognozu bolesti te moguću ranu detekciju maligne transformacije (208, 210, 211).

Našim istraživanjem ova pretpostavka nije mogla biti izravno dokazana budući da je ovo istraživanje retrospektivnog karaktera. Veće prospektivne studije s točno definiranim parametrima mogle bi pravilno odgovoriti na ova pitanja. Ako se dobivenim rezultatima pridoda i značajna razlika izraženosti Bcl-2, uz nepostojanje značajne razlike FHIT-a u subepitelnom upalnom infiltratu u OLP bolesnika u odnosu na karcinom pločastih stanica može se zaključiti da su i drugi mehanizmi, osim promjena u samom epitelu potrebni pri malignoj transformaciji OLP-a u karcinom. OLP se prema tome mora proučavati kao stečena prekanceroza u kojem veliki utjecaj na malignu transformaciju ima upalno promijenjeni okoliš (208, 210).

OLP prema tome predstavlja idealan model u kojem se može istraživati utjecaj upale na nastanak karcinoma, pri čemu, temeljem prethodnih rezultata i rezultata ovog istraživanja, čini se kako pojedinačna izraženost istraživanih biljega nije sama po sebi presudna već njihova međusobna interakcija (11, 60, 208-210). Za pretpostaviti je, da se osim upalnog infiltrata, koji je neophodan za pokretanje cjelokupnog procesa nastanka OLP-a, odnosno i maligne transformacije u OLP-u, potrebni i drugi faktori koji nisu samo vezani za epitel već se određene promjene moraju dogoditi i u upalnom infiltratu, odnosno stromi (208-211). Temeljem analize rezultata izraženosti FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 u ovom istraživanju, prethodno spomenute

promjene, čini se, ne ovise direktno o gustoći upalnog infiltrata, nego ponajprije o njegovim svojstvima, reaktivnosti i sposobnosti lučenja određenih medijatora upale. Medijatori upale u vrlo reaktivnom okolišu nepovoljno djeluju na epitel uzrokujući nepopravljiva oštećenja DNA koja se u vremenskom periodu recidiva i remisija nagomilavaju i konačno utječu na malignu transformaciju stanice. Daljnja prospektivna istraživanja veće skupine OLP bolesnika mogla bi potvrditi analizom dobivene rezultate da u skupinu OLP bolesnika koji imaju povećan rizik maligne transformacije pripadaju žene srednje životne dobi, nepušači kojima je imunohistokemijski utvrđena izraženost FHIT-a manja od 10% u epitelu uz izraženost Bcl-2 u epitelu i upalnom infiltratu jednakom ili većem od 10%, a da izravna korelacija više životne dobi s izraženošću Bcl-2 u epitelu indirektno potvrđuje da je Bcl-2 osim u nastanku tumora nužan i u daljnjoj progresiji.

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Izraženost FHIT-a u epitelu oralnog lihen planusa i karcinoma pločastih stanica značajno je snižena u odnosu na epitel zdrave oralne sluznice ( $P=0,023$ ), no ne nađe se značajne razlike izraženosti FHIT-a u OLP-u i karcinomu pločastog epitela ( $P=0,237$ ).
2. Utvrđeno je da je izraženost EGFR-a u ispitanika s OLP-om i karcinomom pločastih stanica značajno veća u odnosu na ispitanike sa zdravom oralnom sluznicom ( $P<0,007$ ), pri čemu je značajno veća vrijednost izraženosti EGFR-a u OLP ispitanika u odnosu na ispitanike s karcinomom pločastih stanica ( $P<0,001$ ).
3. OLP ispitanici ( $P<0,001$ ) i ispitanici s karcinomom pločastog epitela ( $P=0,009$ ) imaju značajno veće vrijednosti izraženosti Bcl-2 u epitelu u odnosu na epitel ispitanika zdrave oralne sluznice, a izraženost Bcl-2 u epitelu OLP ispitanika značajno je veća u odnosu na ispitanike s karcinomom pločastog epitela ( $P<0,001$ ). Moglo bi se pretpostaviti da nagomilana oštećenja u karcinomu pločastih stanica za svoje daljnje širenje više ne trebaju mehanizam koji ovisi o Bcl-2, vjerojatno koristeći i druge mehanizme, dok se u OLP-u zbog nedovoljno nagomilanih oštećenja mora prolongirati preživljenje stanice i zaustaviti moguća apoptoza.
4. Subepitelni upalni infiltrat u OLP ispitanika ( $P<0,001$ ) i ispitanika s karcinomom pločastog epitela ( $P<0,001$ ) pokazuje značajno veće vrijednosti izraženosti Bcl-2 nego u upalnom infiltratu ispitanika sa zdravom oralnom sluznicom, a pri čemu izraženost Bcl-2 u upalnom infiltratu značajno je veća u ispitanika s karcinomom nego u OLP ispitanika ( $P=0,035$ ).
5. Izraženost Bcl-2 u epitelu OLP ispitanika pozitivno korelira s dobi bolesnika ( $\rho=0,288$ ,  $P=0,042$ ).
6. Spearmanov korelacijski faktor pokazuje izrazito jaku i značajnu pozitivnu izraženosti Bcl-2 u epitelu i subepitelnom upalnom infiltratu u OLP ispitanika ( $\rho=0,946$ ,  $P<0,001$ ). Ovo je direktan pokazatelj da se promjene u epitelu ne događaju neovisno o upalnom infiltratu, ali vrlo vjerojatno ne ovise o gustoći već ponajprije svojstvima upalnog infiltrata.
7. Pozitivan Spearmanov korelacijski faktor nešto slabijeg koeficijenta Bcl-2 u epitelu i FHIT-a u upalnom infiltratu ( $\rho=0,440$ ,  $P=0,001$ ), te FHIT-a u epitelu i upalnom infiltratu ( $\rho=0,327$ ,  $P=0,020$ ) u OLP ispitanika, potvrđuje činjenicu da se OLP u određenih OLP bolesnika ponaša kao prekanceroza, odnosno da je gubitak izraženosti FHIT-a u epitelu nužan no ne dovoljan za malignu transformaciju, a da se za daljnju progresiju u karcinom trebaju dogoditi i druge molekularne promjene u epitelu.

8. OLP ispitanici su značajno niže srednje životne dobi ( $49,1 \pm 14,3$ ) u odnosu na dob ispitanika s karcinomom pločastih stanica ( $62,7 \pm 8,1$ ) ( $P < 0,001$ ). Indirektno se može zaključiti da bi se karcinom u OLP ispitanika mogao detektirati u nižoj životnoj dobi od uobičajene. Obzirom da ne postoji značajno niža životna dob OLP ispitanika pušača muškaraca ( $45,8 \pm 13,4$ ) i žena ( $44,6 \pm 11,5$ ) u odnosu na životnu dob OLP ispitanika nepušača muškaraca ( $47,2 \pm 16,1$ ) i žena ( $52,9 \pm 14,1$ ), može se zaključiti da uživanje duhana ne igra direktnu ulogu u nastanku OLP-a i moguće maligne transformacije kao što je karakteristično za leukoplakiju, eritroplakiju i oralnu submukoznu fibrozu te da je autoimuna geneza OLP zaista najvjerojatnija, no uživanje duhana svakako ima određenu ulogu u prolongiranju lezija u OLP-u.

Iako rezultati istraživanja nisu pokazali da smanjena izraženost FHIT-a, odnosno povećana izraženost EGFR-a i Bcl-2 u epitelu OLP ispitanika ovisi o gustoći subepitelnog upalnog infiltrata, može se zaključiti da testirani biljezi temeljem opsežne analize mogu imati praktičnu kliničku vrijednost u selekciji OLP bolesnika koji su u riziku od maligne transformacije. Sveobuhvatna analiza podataka sugerira da se u podgrupu OLP bolesnika s većim rizikom od maligne transformacije mogu uvrstiti bolesnici više životne dobi, posebice ženskog spola, kojima se imunohistokemijski potvrdi povišena izraženost Bcl-2 u epitelu i subepitelnom upalnom infiltratu uz značajno sniženu izraženost FHIT-a u epitelu. Intenzivnije kliničko praćenje ove podgrupe bolesnika te obavezna patohistološka i imunohistokemijska verifikacija nastalih promjena, omogućila bi otkrivanje maligne transformacije u ranom stadiju, a time bi se povećala uspješnost liječenja odnosno kvaliteta bolesnikovog života. Iako se rezultati ovog istraživanja ne mogu interpretirati kao definitivni dokaz da povećana izraženost FHIT-a, EGFR-a i Bcl-2 direktno sudjeluje u malignoj transformaciji OLP-a u karcinom pločastih stanica, značajne razlike izraženosti testiranih biljega u OLP-u u odnosu na karcinom pločastih stanica trebale bi se interpretirati kao nužne rane promjene koje se moraju dogoditi u OLP-u i koje sudjeluju malignoj transformaciji OLP-a.

Nadalje, pojedinačne značajne izraženosti analiziranih biljega, posebno EGFR-a u OLP-u, u budućnosti bi intenzivnijim praćenjem mogle poduprijeti pronalazak novih lijekova koji bi odgodili ili čak prevenirali malignu transformaciju u OLP-u, a time bi se i omogućila racionalizacija u daljnjim istraživanjima.



## 8. SAŽETAK

Oralni lihen planus je kronična upalna bolest nepoznatog uzroka u kojem autoimuni mehanizam najvjerojatnije ima glavnu ulogu. Maligna transformacija u OLP lezijama može biti potaknuta ekspresijom proteina koji reguliraju staničnu proliferaciju i apoptozu. Izazov u polju oralnih prekanceroza je predvidjeti koja lezija se može transformirati u karcinom. Konvencionalne kliničke i histopatološke smjernice su nedostatne i neprecizne u analiziranju OLP lezija.

Hipoteza je istraživanja da snižena izraženost FHIT-a i povišena izraženost EGFR i Bcl-2 u epitelu ovise o gustoći subepitelnog upalnog infiltrata. Cilj je bio odrediti podgrupu OLP bolesnika koji su u većem riziku od maligne transformacije. U istraživanje je retrospektivno uključeno 90 ispitanika; OLP bolesnici (n=50), bolesnici s karcinomom pločastih stanica usne šupljine (n=20) i ispitanici sa zdravom oralnom sluznicom usne šupljine (n=20).

Imunohistokemijska analiza pokazala je da pojedinačna izraženost istraživanih biljega u epitelu u OLP-u ne ovisi o razini gustoće subepitelnog upalnog infiltrata ( $P > 0,05$ ). Utvrđena je izrazito značajna pozitivna korelacija izraženosti Bcl-2 u epitelu i upalnom infiltratu ( $\rho = 0,946$ ,  $P < 0,001$ ), poglavito u starijih OLP bolesnika iako je njihova srednja životna dob ( $49,1 \pm 14,3$ ) značajnije niža u odnosu na bolesnike s oralnim karcinomom ( $62,7 \pm 8,1$ ) ( $P < 0,001$ ) izdvajajući ih tako u potencijalnu podgrupu OLP bolesnika s povišenim rizikom maligne transformacije. Pozitivne korelacije nešto slabijeg intenziteta između Bcl-2 u epitelu i FHIT-a u upalnom infiltratu ( $\rho = 0,440$ ,  $P = 0,001$ ) te FHIT-a u epitelu i upalnom infiltratu ( $\rho = 0,327$ ,  $P = 0,020$ ) izdvajaju ih kao potencijalne biljege za koje bi se većim prospektivnim studijama mogle odrediti granične vrijednosti ("cut off") s kojima bi se s još većom vjerojatnošću mogao izdvojiti pojedini OLP bolesnik u riziku od maligne transformacije. Češćim kliničkim praćenjem uz redovitu analizu patohistološkog materijala te uočavanjem nepopravljivih oštećenja sluznice usne šupljine u obliku displazije ili ranog karcinoma, doprinijelo bi se uspješnijem liječenju, uključujući i kirurške zahvate. Značajno veća izraženost EGFR-a u OLP-u u odnosu na karcinom pločastih stanica ( $P < 0,001$ ) mogla bi u većim prospektivnim studijama dati odgovor na pitanje; predstavlja li EGFR u OLP bolesnika potencijalnu biološku metu u istraživanju novih terapijskih postupaka što bi doprinijelo i racionalizaciji daljnjih istraživanja.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da histološka analiza oralnog lihen planusa nije dostatna u procjeni malignog potencijala. Može se zaključiti da stariji OLP bolesnici nepušači, poglavito ženskog spola, s dugotrajnim i sporo regredirajućim OLP lezijama mogu imati koristi

od pomnijeg praćenja u svrhu ranog otkrivanja maligne transformacije. U procjeni i odlučivanju pri prepoznavanju malignog potencijala OLP lezija, imunohistokemijska analiza navedenim biljezima u pojedinačnim slučajevima mogla bi biti od velike koristi, a OLP bolesnicima bi se omogućilo češće praćenje, rano otkrivanje i promptno reagiranje u smislu kirurškog zahvata koji bi s obzirom na rano otkriveni karcinom usne šupljine bio pošteniji, a preživljenje ukoliko se otkrije u ranim stadijima, dulje.

## 9. SUMMARY

### **The significance of immunohistochemical expression of FHIT, EGFR and Bcl-2 in patients with oral lichen planus**

Oral lichen planus is a chronic inflammatory disease of unknown cause in which autoimmune mechanisms are most likely involved. Malignant transformation in OLP lesions may be favoured by changes in the expression of proteins that regulate cell proliferation and apoptosis. Conventional clinic and histopathologic guidelines are not sufficient enough.

This study aimed to investigate these issues by immunohistochemical staining for FHIT, EGFR and Bcl-2 and by correlating histopathological finding in samples from lesions of OLP, oral carcinoma and health oral mucosa. The study samples represented 90 subjects with OLP (n=50), oral carcinoma (n=20), and normal buccal mucosa (controls, n=20). New sections were subjected to histological examination and immunohistochemistry for FHIT, EGFR and Bcl-2 in the whole epithelial thickness layer and FHIT and Bcl-2 in inflammatory infiltrate, respectively.

The analysis showed that individual expression of FHIT, EGFR and Bcl-2 did not correlate to the density of inflammatory infiltrate ( $P > 0.05$ ). Bcl-2 significant positive correlation ( $\rho = 0.946$ ,  $P < 0.001$ ) between epithelial layer and inflammatory infiltrate especially in older OLP subjects select them in potential subgroup of OLP subjects that are in increased risk of malignant potential, more over if we include their average age ( $49.1 \pm 14.3$ ) that is significantly lower than subjects with oral carcinoma ( $62.7 \pm 8.1$ ) ( $P < 0.001$ ).

Positive correlation somewhat lower intensity of Bcl-2 in epithelium and FHIT in inflammatory infiltrate ( $\rho = 0.440$ ,  $P = 0.001$ ) and FHIT in epithelium and inflammatory infiltrate ( $\rho = 0.327$ ,  $P = 0.020$ ) sort out these markers as potential markers for larger and prospective studies in which their dual role in tumor development and progression could be tested. These findings could determinate cut off for every single marker that could help in early detection and potential malignant transformation in OLP.

Long term follow up of these OLP patient could extract OLP individual at risk of malignant transformation who will have the most benefit of often clinical screening contributed in successful treatment. Significant higher expression of EGFR in OLP subjects ( $P < 0.001$ ) in comparison to subjects with oral cancer could in further prospective studies answer does EGFR represents as potential biological target for novel therapeutic investigation of OLP treatment.

This study underline that histological evaluation in OLP lesion is not sufficient for malignant transformation estimation.

In conclusion, OLP subjects, non smokers, especially female, with long standing disease that is not responding to any therapy could have benefit of regular and frequent monitoring. Immunohistochemical analysis in OLP could be helpful in the estimation of malignant potential and in individual cases obtain the most benefit. The prognostic value of FHIT, EGFR and Bcl-2 under these results in the evaluation of precancerous oral lesions requires further investigation.

**Ivana Pavić, dr. med.**

## 10. LITERATURA

1. Staubach P. Lichen planus. *CME Dermatol* 2009; 4:68-79.
2. Wilson E. On lichen planus. *J Cutan Med Dis Skin* 1869; 3:117-32.
3. Jungell P. Oral lichen planus. A review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1991; 20(3):129-35.
4. Eisen D. The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88(4):431-6.
5. Katta R. Lichen planus. *Am Fam Physician* 2000; 61(11):3319-24, 3327-8.
6. Dissemond J. Oral lichen planus: an overview. *J Dermatolog Treat* 2004; 15(3):136-40.
7. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(1):47-62.
8. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ i sur. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. U: World Health Organization international histological classification of tumors. 1997, 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag.
9. World Health Organization. Tobacco or health: a global overview. In *Tobacco or health: a global status report*. WHO, Geneve, 1997; 5-65.
10. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ i sur. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46(4):518-39.
11. van der Meij EH, Schepman KP, Smeele LE i sur. A review of the recent literature regarding malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88(3):307-10.
12. Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc* 2007; 82(7):878-87.
13. Terai M, Hashimoto K, Yoda K i sur. Presence of human papillomavirus in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14:201-5.
14. Bouquot JE, Gorlin RJ. Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986; 61(4):373-81.
15. Pindborg JJ i sur. Prevalence of lichen planus among 7639 Indian villagers in Kerala, South India. *Acta Dermvenerolog* 1972; 52:216-355. Axell T, Rundquist L. Oral lichen planus- a demographic study. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15(1):52-6.
16. Axell T, Zain RB, Siwamogstham P i sur. Prevalence of oral soft tissue lesions in out-patients at two Malaysian and Thai dental schools. *Community Dent Oral Epidemiol* 1990; 18(2):95-9.

17. Ismail SB, Kumar SKS, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci* 2007; 49:89-106.
18. Lončar Brzak B, Mravak Stipetić M, Canjuga I i sur. The Frequency and Malignant Transformation Rate of Oral Lichen Planus and Leukoplakia- A Retrospective Study. *Coll Antropol* 2012; 36(3): 733-6.
19. de Moura Casto Jacques JC, Cardoso Pereira AL, Cabral MG i sur. Oral lichen planus part I: epidemiology, clinics, etiology, immunopathogeny, and diagnosis. *Skinmed* 2003; 2(6):342-7; quiz 348-9.
20. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ i sur. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(4):350-65.
21. Silverman S Jr, Bahl S. Oral lichen planus update: clinical characteristics, treatment responses, and malignant transformation. *Am J Dent* 1997; 10:259-63.
22. Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M. Autocytotoxic T-cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* 2000; 142(3):449-56.
23. Lukač J, Brozović S, Vučićević-Boras V i sur. Serum autoantibodies to desmogleins 1 and 3 in patients with oral lichen planus. *Croat Med J* 2006; 47(1):53-8.
24. Rhodus NL, Myers S, Kamal S. Diagnosis and management of oral lichen planus. *Northwest Dent* 2003; 82 (2):17-9, 22-5.
25. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. *Oral pathology: clinical pathologic correlations*. 4<sup>th</sup> ed. Saunders, Elsevier Science, USA; 2003.
26. Scully C, el-Kom M. Lichen planus: review and update on pathogenesis. *J Oral Pathol* 1985; 14(6):431-58.
27. Chainani-Wu N, Silverman S Jr, Lozada-Nur F. i sur. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc* 2001; 132:901-9.
28. Porter Sr, Kirby A, Olesn I. i sur. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Edon* 1997; 83:358-66.
29. Edwards PC, Kelsch R. Oral lichen planus: clinical presentation and management. *J Can Dent Assoc* 2002; 68:494-9.
30. Mokni M, Rybojad M, Puppini D. i sur. Lichen planus and hepatitis C virus. *J Am Acad Dermatol* 1991;24(5 Pt1):792.

31. Lodi G, Scully C, Carrozzo M i sur. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100(2):164-78.
32. Lodi G, Giuliani M, Majorana A i sur. Lichen planus and hepatitis C virus: a multicentre study of patients with oral lesions and systemic review. *Br J Dermatol* 2004; 151(6):1172-81.
33. Preda EG, Pasetti P, Caggiula S i sur. Oral Pathology of psychosomatic origin. Review of literature. *Dent Cadmos* 1990; 58(1):66-72.
34. Hampf BG, Malmstrom MJ, Aalberg VA i sur. Psychiatric disturbance in patients with oral lichen plnaus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987; 63(4):429-32.
35. Ivanovski K, Nakova M, Wartburton G i sur. Psychological profile in oral lichen planus. *J Clin Peridontol* 2005; 32(10):1034-40.
36. Lundquist EN, Wahlin YB, Bergdahl M i sur. Psychological health in patients with genital and oral erosive lichen planus. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2006; 20(6):661-6.
37. Andreasen JO. Oral lichen planus.1. A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968; 25(1):31-42.
38. Thorn JJ, Holmstrup P, Rindum J i sur. Course of various clinical forms of oral lichen planus. A prospective follow-up study of 611 patients. *J Oral Pathol* 1988; 17(5):213-8.
39. Bricker SL. Oral lichen planus: a review. *Semin Dermatol* 1994; 13(2):87-90.
40. Eisenberg E. Oral lichen planus: a benign lesion. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58:1278-85.
41. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and pharyngeal mucosa: terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 2009; 45 (4-5):317-23.
42. Edwards PC, Kelsch R. Oral lichen planus: clinical presentation and management. *J Can Dent Assoc* 2002; 68:494-9.
43. Cawson RA, Odell EW, Porter S. *Oral pathology and oral medicine*. 7<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, Elsevier Limited, UK; 2005.
44. van der Meij EH, van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestion for modifications. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(9):507-12.
45. Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB i sur. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; Suppl: 103:S25 e1-12.

46. Fujii H, Ohashi M, Nagura H. Immunohistochemical analysis of oral lichen-planus-like eruption in graft-versus-host disease after allogenic bone marrow transplantation. *Am J Clin Pathol* 1988; 89(2):177-86.
47. Mattsson T, Sundqvist KG, Heimdahl A i sur. A comparative immunological analysis of the oral mucosa in chronic graft-versus-host disease and oral lichen planus. *Arch Oral Biol* 1992; 37(7):539-47.
48. Hasseus B, Jontell M, Brune M i sur. Langerhans cells and T cells in oral graft versus host disease and oral lichen planus. *Scand J Immunol* 2001; 54(5): 516-24.
49. Woo SB, Lee SJ, Schubert MM. Graft-versus-host disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8(2):201-16.
50. Demarosi F, Soligo D, Lodi G i sur. Squamous cell carcinoma of the oral cavity associated with graft versus host disease: report of a case and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100(1):63-9.
51. Pindborg JJ. Atlas of diseases of the Oral mucosa. Copenhagen, Denmark: Munksgaard, 1992.
52. Neville BW, Damm D.D., Allen CM i sur. Oral and Maxillofacial Pathology. W.B.Saunders Company, 2002.
53. Huber MA. Oral lichen planus. *Quintessence Int* 2004; 35(9):731-52.
54. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol* 2003; 39(8):770-80.
55. Silverman, S Jr, Gorski M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984; 53 (3):563-8.
56. Lind PO. Malignant transformation in oral leukoplakia. *Scand J Dent Res* 1987;95(6):449-55.
57. Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE i sur. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow up study of hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from the Netherlands. *Oral Oncol* 1998; 34(4):270-5.
58. van der Waal I, Schepman KP, ven der Meij EH i sur. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol* 1997; 33(5):291-301.
59. Murti PR, Bhonsle RB, Pindborg JJ i sur. Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. *Community Dental Oral Epidemiol* 1985; 13(6):340-1.

60. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357(9255):539-45.
61. Maeda H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation and cancer. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 63(7):854-65.
62. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917):860-7.
63. Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema. Deseta revizija, Svezak 1. Medicinska naklada, Zagreb, 1994.
64. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD i sur. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncology* 2007; 23:523-34.
65. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 5:963-8.
66. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759-67.
67. Califano J, van der Riet P, Westra W i sur. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56(11):2488-92.
68. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA i sur. A Genetic Explanation of Slaughter's Concept of Field Cancerization: Evidence and Clinical Implications. *Cancer Res* 2003; 63:1727-30.
69. Maestro R, Gasparotto D, Vukosavljević T i sur. Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers. *Cancer Res* 1993; 53(23):5775-9.
70. Ah-See KW, Cooke TG, Pickford IK i sur. An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res* 1994; 54(7):1617-21.
71. Mao L. Microsatellite analysis: Applications and pitfalls. *Ann NY Acad Sci* 2000; 906: 55-62.
72. Rosin MP, Cheng X, Poh C I sur. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2):357-62.
73. Yarbrough WG, Shores C, Witsell DL i sur. Ras mutations and expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 1994; 104(11 Pt 1):1337-47.
74. Saranath D, Chang SE, Bhoite LT i sur. High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. *Br J Cancer* 1991; 63(4):573-8.
75. Field JK, Spandidos DA, Stelll PM. Overexpression of p53 gene in head-and-neck cancer, linked with heavy smoking and drinking. *Lancet* 1992; 339(8791):502-3.



76. Sathyan KM, Nalinakamari KR, Abraham T i sur. Influence of single nucleotide polymorphisms in H-ras and cyclin D1 genes on oral cancer susceptibility. *Oral Oncol* 2006; 42(6):607-13.
77. Berenson JR, Yang J, Mickel RA. Frequent amplification of the bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 1989; 4(9):1111-6.
78. Fracchiolla NS, Pruneri G, Pignataro L i sur. Molecular and immunohistochemical analysis of the bcl-1/cyclin D1 gene in laryngeal squamous cell carcinomas: correlation of protein expression with lymph node metastasis and advanced clinical stage. *Cancer* 1997; 79(6):1114-21.
79. Michalides RJ, van Veelen NM, Kristel PM i sur. Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123(5):497-502.
80. Rodrigo JP, Lazo PS, Ramos S i sur. MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122(5):504-7.
81. Porter MJ, Field JK, Leung SF i sur. The detection of the c-myc and ras oncogenes in nasopharyngeal carcinoma by immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol* 1994; 114(1):105-9.
82. Miyaguchi M, Olofsson J, Hellquist HB. Expression of epidermal growth factor receptor in laryngeal dysplasia and carcinoma. *Acta Otolaryngol* 1990; 110(3-4):309-13.
83. Chen X, Yeung TK, Wang Z. Enhanced drug resistance in cells coexpressing ErbB2 with EGF receptor or ErbB3. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277(3):757-63.
84. Chen YW, Kao SY, Yang MH. Analysis of p16(INK4A) expression of oral squamous cell carcinomas in Taiwan: prognostic correlation without relevance to betel quid consumption. *J Surg Oncol* 2012; 106(2):149-54.
85. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD i sur. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265(5170):346-55.
86. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Windsor LJ i sur. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(2):197-250.
87. Lodi G, Scully C, Carrozzo M. i sur. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part1. Viral infections and pathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005b; 100:40-51.
88. Llewellyn CD, Johnson NW, Waranakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people-a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001; 37(5):401-18.

89. Greenberg D, Glick M. *Burket's oral medicine*. 10th ed. Hamilton ON: B.C.Decker, 2003.
90. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. *TNM classification of malignant tumors*. 7th ed. At head of titl: UICC International Union Against Cancer, Wiley-Blackwell, USA, 2009.
91. Epstein JB, Wan LS, Gorsky M i sur. Oral lichen planus: Progress in understanding its malignant potential and the implications for clinical management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96:32-7.
92. Reis LAG, Harkins D, Krapcho M i sur. Eds *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003*. Bethesda, Md: National Cancer Institute, 2003.
93. Miller CS, Johnstone BM. Human papilloma virus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91(6):622-35.
94. Terai M, Hashimoto K, Yoda K i sur. Presence of human papilloma virus in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:201-5.
95. Vissnik A, Jansama J, Spijkvert FKI i sur. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(3):199-212.
96. Johnson NW, Ranasinghe AW, Warnakulasuriya KA. Potentially malignant lesions and conditions of the mouth and oropharynx: natural history-cellular and molecular markers of risk. *Eur J Cancer Prev* 1993; Suppl 2:31-51.
97. Patel V, Ieethanakul C, Gutkind JS. New Approaches To the understanding of the Molecular Basis of Oral Cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12(1):55-63.
98. de Sousa FACC, Paradella TC, Carvalho YR i sur. Comparative analysis of cell proliferation in oral lichen planus, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009 Nov 1; 14 (11):e563-7.
99. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 2008; 87(1):14-32.
100. Keles N, Erdamar B, Kaur A i sur. P21, p53, and p27 Kip1 alterations in benign and malignant tumors of sinonasal epithelium. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129(1):77-84.
101. Smith DI, McAvoy S, Zhu Y I sur. Large common fragile sites and cancer. *Semin Cancer Biol* 2007; 17(1): 31-41.
102. Croce CM, Sozzi G, Huebner K. Role of FHIT in human cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(5):1618-24.

103. Conolly DC, Greenspan DL, Wu R i sur. Loss of FHIT expression in invasive cervical carcinomas and intraepithelial lesions associated with invasive disease. *Clin Cancer Res* 2000; 60:3505-10.
104. Mori M, Mimori K, Shiarishi T i sur. Altered expression of FHIT in carcinoma and precarcinomatous lesions of the esophagus. *Cancer Res* 2000; 60:1177-82.
105. Siprashvili Z, Sozzi G, Barnes LD i sur. Replacement of Fhit in cancer cells suppress tumorigenecity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13771-76.
106. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M i sur. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 1996; 85:17-26.
107. Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L i sur. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res* 1998; 58:5032-37.
108. Mao L, Lee JS, Kuire JM i sur. Clonal genetic alterations in the lung of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:857-62.
109. Morikawa H, Nakagawa Y, Hashimoto K i sur. Frequent altered expression of fragile histidine triad protein in human colorectal adenomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278:205-10.
110. Hao XP, Willis JE, Pretlow TG i sur. Loss of fragile histidine triad protein in colorectal carcinomas and premalignant lesions. *Cancer Res* 2000; 60:18-21.
111. Birrer MJ, Hendricks D, Farley J i sur. Abnormal FHIT expression in malignant and premalignant lesions of the cervix. *Cancer Res* 1999; 59:5270-74.
112. Ji L, Fang B, Yen N i sur. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res* 1999; 59(14):3333-9.
113. Deng WG, Nishizaki M, Fang B i sur. Induction of apoptosis by tumor suppressor FHIT via death receptor signaling pathway in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355(4):993-4.
114. Zhao P, Hou N, Lu Y. Fhit protein is preferentially expressed in the nucleus of the monocyte-derived cells and its possible biological significance. *Histol Histopathol* 2006; 21:915-23.
115. Nishizaki M, Sasaki J, Fang B i sur. Synergistic tumor suppression by coexpression of FHIT and p53 coincides with FHIT-mediated MDM2 inactivation and p53 stabilization in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(16):5745-52.

116. Ishii H, Dumon KR, Vecchione A i sur. Effect of adenoviral transduction of the fragile histidine triad gene into esophageal cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61(4):1578-84.
117. Dumon KR, Ishii H, Vecchione A i sur. Fragile histidine triad expression delays tumor development and induces apoptosis in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 2001; 61(12):4827-36.
118. Pekarsky Y, Zanese N, Palamarchul A i sur. FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *The Lancet Oncology* 2002; 3:748-54.
119. Pace HC, Garrison PN, Robinson AK i sur. Genetic, biochemical and crystallographic characterization of the Fhit-substrate complexes as the active signaling from of Fhit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:5484-89.
120. Ishii H, Dumon KR, Vecchione A i sur. Potential Cancer Therapy with the Fragile Histidine Triad Gene. *JAMA* 2001; 286(19):2441-49.
121. Kujan O, Oliver R, Roz L i sur. Fragile Histidine Triad Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma and Precursors Lesions. *Clin Cancer Res* 2006; 12(22):6723-29.
122. Scully C. Oncogenes, onco-supressor genes, carcinogenesis and oral cancer. *Br Dent J* 1992; 172:53-9.
123. Downward J, Yarden Y, Mayes E i sur. Close similarity of EGF receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984; 307:521-27.
124. Seemeyer TA, Cavenee WK. Molecular mechanisms of oncogenesis. *Lab Invest* 1989; 60:349-53.
125. Carpenter G, Cohen S. Epidermal Growth Factor: A Review. *J Biol Chem* 1990; 265:7709-12.
126. Michelle RH. Post-receptor signaling pathway. *Lancet* 1989:366-68.
127. Pelech SL. Networking with protein kinases. *Curr Biol* 1993; 3:513-5.
128. William JLI. Oral cancer and precancer: Clinical features. *Br Dent J* 1990; 168:13-7.
129. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 1962; 237:1555-62.
130. Matheney KE, Barbieri CE, Sniezek JC i sur. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling decreases p63 expression in head and neck squamous carcinoma cells. *Laryngoscope* 2003; 113(6):936-9.
131. Rubin GJ, Tweardy DJ, Melhem MF. Asynchronous modulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor protein expression in progression of

- pre-malignant lesions to head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4(1):13-20.
132. Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* 2002; 7 Suppl 4:2-8.
133. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A i sur. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 2005; 1:2005.0010.
134. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31:637-43.
135. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D i sur. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371:1695-1709.
136. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 4:S9-15.
137. Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:83-96.
138. Bettendorf O, Piffko J, Bankfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cancer: important tools for planing individual therapy? *Oral Oncol* 2004; 40:110-9.
139. Ang KK, Berkey BA, Tu X i sur. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62:7350-6.
140. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53:3579-84.
141. Hitt R, Ciruelos E, Amador ML i sur. Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer* 2005; 41:453-60.
142. Shin DM, Donato NJ, Perez-Soler R i sur. Epidermal growth factor receptor-target therapy with C225 and cisplatin in patients with head ad neck cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1204-13.
143. Cohen EE, Rosen F, Stadler WM i sur. Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2003; 21:1980-7.
144. Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 2002; 7 Suppl 4:31-9.
145. Weihua Z, Tsan R, Huang WC i sur. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer Cell* 2008; 13:385-93.

146. Engelman JA, Cantley LC. A sweet new role for EGFR in cancer. *Cancer Cell* 2008; 13:375-6.
147. Wang SC, Nakajama Y, Yu YL i sur. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat Cell Biol* 2006; 8:1359-68.
148. Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M i sur. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 2005; 7:575-89.
149. Hsu SC, Miller SA, Wang Y i sur. Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *Am J Transl Res* 2009; 1:249-58.
150. Carpenter C. Properties of the receptor for epidermal growth factor receptor. *Cell* 1984; 37:357-8.
151. Carpenter G. Receptor for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Ann Rev Biochem* 1987; 56:881-914.
152. Chen WS, Lazar CS, Poenie M i sur. Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor. *Nature* 1987; 328:820-3.
153. Wells A, Welsh JB, Lazar CS i sur. Ligand-induced transformation by a non-internalizing epidermal growth factor receptor. *Science* 1990; 248:76-8.
154. Burges AW. Epidermal growth factor and transforming growth factors. *Br Med Bullet* 1989; 45:317-604.
155. Salomon DS, Kim N, Saeki T i sur. Transforming growth factor- $\alpha$ : An oncodevelopmental growth factor. *Cancer Cell* 1990; 2:389-97.
156. Shrestha P, Yamada K, Higashiyama M i sur. EGF receptor in odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med* 1992; 21:185-7.
157. Ushiro H, Cohen S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cells. *J Biol Chem* 1990; 255:8363-7.
158. Carlin CR, Phillips PD, Knowles BB i sur. Diminished in vitro tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor of senescent human fibroblasts. *Nature* 1983; 306:317-9.
159. James R, Bradshaw RA. Polypeptide growth factors. *Ann Rev Biochem* 1984; 53:259-92.
160. Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* 1988; 332:217-9.

161. Beguinot L, Hanover JA, Ito S i sur. Phorbol esters induce transient internalization without degradation of unoccupied epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:2774-7.
162. Damjanov I, Mildner B, Knowles BB. Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. *Lab Invest* 1986; 55:588-92.
163. Schlessinger J. Epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. *Biochemistry* 1988; 27:31119-23.
164. Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Ann Rev Biochem* 1993; 62:453-81.
165. Wong DTW, Biswas DK. Activation of c-erb-B-1 oncogene during DMBA-induced carcinogenesis in hamster pouch. *J Dent Res* 1986; 65:221-7.
166. Shin DM, Gimenez-Conti IB, Lee JS i sur. Expression of epidermal growth factor, ornithine decarboxylase activity, micronuclei, and transglutaminase DMBA-induced carcinogenesis in hamster cheek pouch. *Cancer Res* 1990; 90:2505-10.
167. Cowley JP, Smith JA, Gusterson B i sur. The amount of EGF receptor is elevated in squamous cell carcinomas. *U: Carcinoma Cells 1: The Transformed Phenotype*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory 1984; 5-10.
168. Yamamoto T, Kamata N, Kawano H i sur. High incidence of amplification of epidermal growth factor receptor gene in human squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1986; 46:414-16.
169. Yamada T, Takagi M, Shioda S. Evaluation of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Surg Med Pathol* 1992; 73:67-70.
170. Saranath D, Panchal RG, Nair R i sur. Oncogene Amplification in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Jpn J Cancer* 1989; 80:430-7.
171. Lee NK. Oncogenes. *Head Neck* 1992; 13:235-42.
172. Kawamoto T, Takahashi K, Nishi T i sur. Quantitative assay of epidermal growth factor receptor in human squamous cell carcinomas of the oral and pharyngeal region by an avidin-biotin method. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82:403-10.
173. Kearsley JH, Leonard JH, Walsh MD i sur. A comparison of EGF receptor and c-erbB-2 oncogene expression in head and neck SCCs. *Pathology* 1991; 23:189-94.
174. Sarkis SA, Abdullah BH, Majeed BAA i sur. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma in relation to proliferation, apoptosis, angiogenesis and lymphangiogenesis. *Head Neck Oncol* 2010; 2:13.

175. Eisbruch A, Blick M, Lee JS i sur. Analysis of EGF receptor in fresh human head and neck tumors. *Cancer Res* 1987; 47:3603-5.
176. Ishitoya J, Moriyama M, Oguchi N i sur. Gene amplification and over-expression of EGF receptor in SCCs of head and neck. *Br J Cancer* 1989; 59:559-62.
177. Saranath D, Panchal RG, Nair R i sur. Amplification and over-expression of EGF receptor in human oropharyngeal cancer. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1992; 28B:139-43.
178. Saranath D, Bhotie LT, Deo MG. Molecular lesions in Human Oral Cancer: The Indian Scene. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1993; 29B:107-12.
179. Christensen ME, Therkildsen MH, Hansen BL i sur. Immunoreactive transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in oral squamous cell carcinomas. *J Pathol* 1993; 169:323-8.
180. Kunikata M, Yamada K, Yamada T i sur. Epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinomas and the lesions of squamous origin. *Acta Hystochem Cytochem* 1992; 25:387-94.
181. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53:3579-84.
182. Patridge M, Gullick WJ, Langdon JD i sur. Expression of EGFr in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988; 26:381-9.
183. Shirasuna K, Hayashido Y, Sugiyama M i sur. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human oral mucosa and its malignancy. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991; 418:449-53.
184. Whitcomb SS, Eversole LR, Lindermann RA. Immunohistochemical mapping of epidermal growth-factor receptors in normal human oral soft tissue. *Arch Oral Biol* 1993; 38:823-6.
185. Nanney LB, Magid M, Stoschek CM i sur. Epidermal growth factor receptor binding and receptor distribution in normal human skin and appendages. *J Invest Dermatol* 1984; 83:385-93.
186. Nanney LB, Stoschek CM, Magid M i sur. Altered [<sup>125</sup>] epidermal growth factor and receptor distribution in psoriasis. *J Invest Dermatol* 1986; 86:260-5.
187. Groves RW, Allen MH, McDonald DM. Abnormal expression of epidermal growth factor receptor in cutaneous epithelial tumors. *J Cutan Pathol* 1992; 19:66-72.



188. Christensen ME, Therkildsen MH, Hansen BL i sur. Epidermal growth factor receptor expression in normal oral mucosa, dysplastic epithelium and squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992; 249:243-7.
189. Zhang H, Berezov A, Wang Q i sur. ErbB receptors: from oncogenes to target cancer therapies. *J Clin Invest* 2007; 8:2051-8.
190. Bonner JA, Harari PM, Giralt I i sur. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 354:567-8.
191. Jaramilo ML, Leon Z, Grothe S i sur. Effect of the anti-receptor ligand-blocking 225 monoclonal antibody on EGF receptor endocytosis and sorting. *Exp Cell Res* 2006; 312:2778-90.
192. Li S, Kussie P, Ferguson KM. Structural basis for EGF receptor by the therapeutic antibody IMC-11F8. *Structure* 2008; 16:216-27.
193. Sigismund S, Woelk T, Puri C i sur. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:2760-5.
194. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J i sur. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cell with the t(14,18) chromosome translocation. *Science* 1984; 29:1097.
195. Susnow N, Zeng L, Margineantu D i sur. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Semin Cancer Biol* 2009; 19:42-9.
196. Thomadaki H, Scorilas A. Bcl-2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006; 43:1-67.
197. Agostinis P, Buytaert E, Breysens H i sur. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3:721-9.
198. Ortel B, Shea CR, Calzavara-Pinton P. Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Front Biosci* 2009; 14:4157-72.
199. Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Ann Rev Med* 1997; 48:267-81.
200. Nafarzadeh S, Jafari S, Bijani A. Assessment of Bax and Bcl-2 Immunoeexpression in Patients with Oral Lichen Planus and Oral Squamous Cell Carcinoma. *IJMCM* 2013; 7(2): 136-42.
201. Chao DT, Korsmeyer SR. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Ann Rev Immunol* 1998; 16:395-419.
202. Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P i sur. Cell death in the skin. *Apoptosis* 2009; 14:549-69.

- 203.Ravi D, Nalinakumari KR, Rajaram RS i sur. Expression of programmed cell death regulatory p53 and bcl-2 proteins in oral lesion. *Cancer Letters* 1996; 105:139-46.
- 204.Kang MH, Reynolds P. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15:1126-32.
- 205.Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions. A systematic review. *J Am Dent Assoc* 2014; 145 (1):45-56.
- 206.Casparis S, Borm JM, Tektas S I sur. Oral lichen planus (OLP), oral lichenoid lesions (OLL), oral dysplasia, and oral cancer: retrospective analysis of clinicopathological data from 2002-2011. *Oral Maxillofac Surg*. DOI 10.1007/s10006-014-0469-y.
- 207.Gorsky M. Epstein JB, Hasson-Kanfi H i sur. Smoking Habits Among Patients Diagnosed with Oral Lichen Planus. *Tob Induc Dis* 2004; 15(2):103-8.
- 208.van der Waal I. Oral potentially malignant disorders: Is malignant transformation predictable and preventable? *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* 2014; 19(4):e386-90.
- 209.Gonzalez-Moles MA, Bascones-Ilundain C, Gil Montoya JA i sur. Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus: Molecular bases in epithelium predisposed to malignant transformation. *Arch Oral Biol* 2006; 51(12):1093-103.
- 210.Georgakopoulou EA, Achtari MD, Achtaris M i sur. Oral Lichen Planus as a Preneoplastic Inflammatory Model. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:759626.
- 211.Pigatti FM, Taveira LA, Soares CT. Immunohistochemical expression of Bcl-2 and Ki67 in oral lichen planus and leukoplakia with different degrees of dysplasia. *Int J Dermatol* 2014. DOI: 10.1111/ijd.12279.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30. srpnja 1974. godine u Osijeku, gdje sam pohađala osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisujem 1993. Godine i diplomiram 2002. godine. U 2001.-voj, nakon dvije godine edukacije temeljem stipendije Nizozemskih sportskih udruga s invaliditetom, diplomiram Sportski management u Nizozemskoj, a potom nastavljam Medicinski studij. Pripravnički staž kao doktor medicine obavljam u KB "Sestre milosrdnice" u Zagrebu, gdje sam 2006. godine započela specijalizaciju iz patološke anatomije.

Specijalistički ispit polažem 2010. godine. i od tada radim kao patolog na Kliničkom zavodu za patologiju KBC „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu. Tijekom specijalizacije završila sam stručni poslijediplomski studij iz patološke anatomije, od 2008. do 2013. polažem sve ispite na doktorskom poslijediplomskom studiju na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. 2012. godine prihvaćena mi je tema doktorske disertacije. Polaznik sam nekoliko domaćih stručnih i međunarodnih tečajeva iz područja izolacije DNA i RNA, patologije probavnog sustava, kože i oralnih manifestacija kožnih bolesti, patologije mokraćnog i muškog spolnog sustava, karcinoma glave i vrata i kože. Autor sam i suautor nekoliko članaka u indeksiranim časopisima, dobitnik nagrade Hrvatskog Paralimpijskog odbora za stručan rad u području razvoja invalidskog sporta, posebno za razvoj sjedeće odbojke u Hrvatskoj i organizaciju Euro kupa u muškoj sjedećoj odbojci 1998. godine. Aktivno sam sudjelovala na više od 20 međunarodnih kongresa i simpozija iz područja medicine te aktivan sudionik mnogih međunarodnih natjecanja invalidske odbojke u organizaciji ili kao međunarodni sudac s brojnim međunarodnim nastupima na europskom, svjetskom i olimpijskom nivou.