

# Imunohistokemijska analiza izraženosti antigena MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 u metastatskom karcinomu pločastih stanica jednjaka

---

**Bujas, Tatjana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2009**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:748793>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





**Središnja medicinska knjižnica**

***Bujas Tatjana (2009) Imunohistokemijska analiza izraženosti antigena  
MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 u metastatskom karcinomu pločastih stanica  
jednjaka. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.***

<http://medlib.mef.hr/1685>

University of Zagreb Medical School Repository

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

## 1. UVOD

Rak pločastih stanica najčešći je zloćudni tumor jednjaka i čini oko 6% svih zloćudnih novotvorenina probavnog trakta, međutim ima vrlo nepovoljnu prognozu i visoki postotak smrtnosti. Češći je u muškaraca, javlja se u prosječnoj dobi oko 65-e godine života. Petogodišnje preživljenje bolesnika s karcinomom pločastih stanica jednjaka iznosi oko 10%. Terapija obuhvaća endoskopske operacije za površinski tip bez metastaza, te kirurško liječenje, zračenje, kemoterapiju i kombinaciju sve tri navedene metode i samo palijativne postupke za uznapredovali karcinom. Uspješnost terapije je niska, što se vidi i u postotku preživljenja kroz pet godina. To je jedan od osnovnih razloga zašto se pokušava s novim vrstama terapije, a vodeća tema niza istraživanja je upravo imunoterapija.

Prije dva desetljeća postojala je ozbiljna sumnja u postojanje ljudskih tumorskih antigena i imunog odgovora na stanice karcinoma. Otkriće humanih tumorskih antigena, mogućnost mjerenja i kvantifikacije imunoreakcije na tumor, te ukupni napredak u molekularnoj onkologiji, dali su snažan poticaj reaktivaciji ideje o imunoterapiji tumora.

Postoji više podjela tumorskih antigena, a jedna od skupina su tzv. karcinom/testis pridruženi tumorski antigeni (engl. Cancer/Testis Tumor Associated Antigens, C/T TAA). Zbog njihove relativno visoke selektivne izraženosti u tumorskim stanicama brojnih tumora, a ne u normalnim stanicama, oni su privlačne mete za imunoterapiju.

U ovom radu istražena je imunohistokemijskom (engl. Immunohistochemistry, IHC) metodom izraženost proteina: MAGE-A3/4 (engl. Melanoma Associated Antigen-A3/4) i NY-ESO-1 (engl. New York-Esophageal-1 Cancer Antigen) u

stanicama raka pločastih stanica jednjaka i u njegovim metastazama u limfne čvorove.

Uspoređivana je izraženost oba proteina u tumoru, izraženost pojedinog proteina u tumoru i metastazi u limfnom čvoru, te povezanost izraženosti svakog proteina s patohistološkim parametrima (TNM, histološki gradus, veličina tumora, lokalizacija tumora), dobi i spolom bolesnika, koji su važni za prognozu i terapiju karcinoma.

## 1.1. RAK PLOČASTIH STANICA JEDNJAKA

### 1.1.1. Epidemiologija

Karcinom pločastih stanica najčešći je zloćudni tumor jednjaka i čini oko 6% svih zloćudnih novotvorenina probavnog trakta, međutim ima vrlo nepovoljnu prognozu i visoki postotak smrtnosti.<sup>1,2,3,4,5</sup> Češći je u muškaraca, javlja se iznad 50. godine života, prosječno oko 65. i rijetko prije 40. godine života.<sup>1,5</sup> U većem dijelu svijeta incidencija se kreće od 2,5 do 5 na 100 000 stanovnika kod muškaraca, te 1,5 do 2,5 kod žena.<sup>2</sup> U visoko rizičnim područjima koja uključuju sjevernu Kinu, Južnu Ameriku, južnu Afriku, Iran, ona raste i do 100 do 700 oboljelih na 100 000 stanovnika u muškaraca i 50 kod žena.<sup>5</sup> U Francuskoj, te u sjevernoj Italiji broj oboljelih je visok do 30 na 100 000 stanovnika u muškaraca.<sup>2</sup>

U Africi češći je u Bantu crnaca, a u SAD češći je kod afroameričkog stanovništva.<sup>1,2</sup> Udio novo otkrivenih karcinoma je 4 do 6%, od toga 85% u zemljama u razvoju.<sup>5</sup>

Na petom je mjestu u svijetu kao uzrok smrti od karcinoma i osmi je najčešći karcinom.<sup>5</sup>

Incidencija i mortalitet karcinoma pločastih stanica jednjaka u Hrvatskoj u 2005. godini bila je 4,8 i 5,2 na 100 000 stanovnika.<sup>6</sup>

## 1.1.2. Etiologija

### ČIMBENICI RIZIKA

#### Alkohol i duhan

U zemljama zapada konzumiranje alkohola i pušenje cigareta povećava rizik nastanka karcinoma pločastih stanica jednjaka, čak do u 90% slučajeva.<sup>7</sup> Umjereno pušenje kroz duži vremenski period i veća količina konzumiranog alkohola u kraćem periodu, povećava rizik nastanka karcinoma.<sup>8</sup> To objašnjava zašto je područje sjeverne Italije i Francuske područje većeg rizika, zbog veće konzumacije alkohola.<sup>2</sup> Više od 600 grama etanola tjedno je kancerogeno, a ako osoba prestane konzumirati alkohol, rizik se smanjuje nakon 5 do 9 godina.<sup>5</sup>

U pojedinim istraživanjima utvrđeno je da alkohol sadrži kancerogene tvari. Alkohol djeluje kao otapalo za kancerogene tvari iz cigareta, kao što je i moguće da je acetaldehid, metabolit etanola, primarno kancerogen.<sup>9</sup> U istraživanjima u Japanu, pleomorfizam u ALDH 2 genu koji očitava protein aldehid dehidrogenazu pokazuje značajnu povezanost s karcinomom pločastih stanica gornjeg probavnog trakta.<sup>10</sup> To istraživanje ukazuje na to da acetaldehid ima jednu od glavnih uloga u nastanku karcinoma pločastih stanica jednjaka.<sup>11,12</sup> Pušenje i broj godina pušenja povezano je s karcinomom jednjaka kako pločastim tako i adenokarcinomom. Za sve vrste karcinoma jednjaka proteklo vrijeme od prestanka pušenja je povezano s 15 do 19%-tnim padom rizika za desetljeće.<sup>13</sup> Duhan sadrži nitrozamine koji mogu dovesti do oštećenja sluznice.<sup>5</sup>

## Prehrana

U visoko rizičnim područjima Kine koja su ruralna područja, gdje je prehrana siromašna hranjivim tvarima, posebice  $\beta$ -karotenom, selenom i  $\alpha$ -tokoferolom, povećava se incidencija i na 700 oboljelih na 100 000 stanovnika.<sup>5</sup> Više se jede ukiseljeno povrće i dimljene mesne prerađevine koje su bogate nitrozaminima, a gljivice u cerealijama i sjemenju kataliziraju redukciju nitrita. Životinjske masti, maslac i linolinska kiselina u cerealijama predstavljaju prekursore sinteze prostaglandina u želucu, a oni smanjuju tonus donjeg sfinketra jednjaka, pa češće nastaje refluks.<sup>2,5,14</sup> Vruća hrana i tekućine kao npr. Mate čaj u Južnoj Americi, jedan je od čestih rizika nastanka kroničnog ezofagitisa, pa tako i prekanceroznih lezija koje mogu dovesti do nastanka karcinoma.<sup>15,16</sup>

## Ahalazija

Ahalazija (achalasia-kardiospazam, megaezofagus) je poremećaj ezofagealne peristaltike i relaksacije donjeg sfinktera jednjaka koji nastaje zbog nedostatka ganglija Auerbachovog mijenteričkog plexusa.<sup>17</sup>

Od ove bolesti oboli godišnje 1 na 1.000.000 stanovnika.

Bolest je poznata već stotinjak godina. Nastaje zbog gubitka ganglijskih stanica mijenteričnog spleta stijenke jednjaka, degenerativnih promjena vagusa, promjena u dorzalnim motoričkim jezgrama vagusa, sitnih intramuskularnih živčanih vlakana ili intracitoplazmatskih inkluzija (Lewyjeva tjelešca) u dorzalnim motoričkim jezgrama vagusa. U patološkom nalazu vidljiva je hiperplazija bazalnih stanica epitela i izduženje papilarnog sloja, te orožnjavanje epitela.<sup>1,17</sup> Sekundarne promjene

uključuju kronični upalni odgovor unutar mijenteričkih živaca, a upalne stanice su uglavnom CD3+ T limfociti.<sup>18</sup> Karcinom pločastih stanica povezan s dugotrajnim promjenama u ahalaziji (upala, ulceracije, strikture) javlja se rijetko, međutim rizik je 33 puta veći nego u općoj populaciji.<sup>19</sup> Ahalazija se dijagnosticira u bolesnika nekih 28 godina prije pojave karcinoma. Ti karcinomi smješteni su najčešće u srednjoj trećini jednjaka.<sup>20</sup>

### **Striktore**

Striktore nastaju ingestijom korozivnih tvari (kiseline, lužine). Na mjestu oštećenja karcinom se može razviti nakon četrdesetak godina, a kako nehotična ingestija korozivnih tvari često bude u dječjoj dobi, karcinom se javlja nekih 10 do 20 godina prije nego u općoj populaciji.<sup>3,4</sup> Što je ingestija korozivnih tvari kasnije u životu, latentni period do nastanka karcinoma se skraćuje. Tumor najčešće nastaje na razini račvišta dušnika.<sup>5,21</sup>

### **Plummer-Vinson sindrom**

Plummer-Vinson sindrom (PVS) je naziv za skup slijedećih simptoma: teška anemija zbog manjka željeza, otežano gutanje zbog opni ili tzv. obruča stijenke jednjaka, atrofične promjene sluznice usta, jezika, ždrijela i jednjaka, koilonihija (nokti oblikovani poput žlice). Ovaj sindrom se u Engleskoj naziva Patterson-Brown Kelly sindrom.<sup>3</sup>

Tipično se javlja u dobi od 40 do 70 godina.



Nabori sluznice koji nastaju u lumenu jednjaka, rijetko su deblji od 2 mm. Samo manji dio sadrži mišićna vlakna. Opna je ograničena na jednu stranu stijenke jednjaka, dok je obruč obuhvaća. Opne i obruči prilično se često pronalaze u radiološkim snimanjima, s time da su opne učestalije u gornjem dijelu jednjaka, dok su obruči brojniji u donjem dijelu jednjaka.<sup>1,2,3</sup> Ove promjene jedan su od uzročnika nastanka karcinoma pločastih stanica gornjeg probavnog sustava, a 3 do 15 % bolesnika s tim sindromom, poglavito žene u dobi između 15 do 50 godina obole od karcinoma.<sup>22</sup>

### **Tylosis palmaris**

Bolest je nasljedna, autosomno dominantna i obilježava ju hiperkeratoza kože dlanova i tabana, bijele mrlje u ustima (leukoplakia) i vrlo visoka opasnost od nastanka raka jednjaka.<sup>23</sup> U 95 % oboljelih razvije se karcinom pločastih stanica jednjaka do 70. godine života. Sindrom se naziva i engl. „Nonepidermolytic palmoplantar keratoderma“.<sup>1,5,23</sup>

### **Humani papiloma virus - HPV**

Pojedina istraživanja dovode u vezu infekciju humanim papiloma virusom (HPV) s pojavom tumora. HPV-e je izoliran iz tumora u prevalenciji od 0 do 66%, odnosno 14 do 72%,<sup>2,5</sup> no uloga mu je još uvijek upitna.<sup>24</sup> Najčešće izolirani tipovi HPV-a su 16 i 18, a virus je češće prisutan u tumoru bolesnika iz rizičnih područja, poglavito u Kini.<sup>1,2,3,4,25</sup> Koekspresija HPV 16 i 18 transformirajućeg onkoproteina i mutanta p53 nosi visoki rizik nastanka karcinoma pločastih stanica jednjaka. Istraživanja ukazuju na interakciju između gena p53, p73 i HPV-a u etiologiji bolesti.<sup>26</sup>

Hipotetski mehanizam koji je predložen je tzv. „hit and run“ fenomen, u kojem nakon infekcije HPV virusom dolazi do oštećenja DNA stanice, no nakon tog oštećenja nestaje i HPV iz tumora.<sup>27</sup> Istraživanja DNA sekvence HPV virusa dala su različite rezultate s nižom prevalencijom u Sjevernoj Americi, gdje neka upućuju na važnost infekcije tim virusom.<sup>28,29</sup>

### **Infekcija s *Helicobacter pylori***

U radovima u kojima se istraživala povezanost *Helicobacter pylori* s karcinomima jednjaka, nađena je povezanost s adenokarcinomom i Barrettovim jednjakom, no nije utvrđena povezanost s karcinomom pločastih stanica jednjaka.<sup>30</sup>

### **Ostali čimbenici rizika**

Kao mogući čimbenici rizika spominju su netropska sprue–celijakija,<sup>1</sup> odnosno gluteinska enteropatija, povećana incidencija kod ezofagitisa,<sup>31,32</sup> nastanak karcinoma nakon parcijalne gastrektomije u 0,7 do 10,4 % bolesnika nakon 22 godine poslije operacije<sup>5</sup> i pojava karcinoma 6 do 30 mjeseci nakon električne sklerozacije tj. nakon liječenja zračenjem varikoziteta jednjaka.<sup>5,33</sup> Objavljeno je nekoliko slučajeva pojave karcinoma povezano s humoralanom hiperkalcijemijom.<sup>34</sup>

## 1.2. DIJAGNOZA RAKA PLOČASTIH STANICA JEDNJAKA

### 1.2.1. Lokalizacija

Karcinom pločastih stanica jednjaka može se pojaviti u bilo kojem dijelu jednjaka. Najčešće je smješten u donjoj trećini jednjaka na mjestu normalnog anatomskog suženja,<sup>1,2,3,4</sup> a samo 10 do 15% tumora nalazi se u gornjoj trećini jednjaka.<sup>35</sup>

Tumor se u najvećem broju slučajeva nalazi u donjoj trećini (50%), zatim u srednjoj (25-30%) te gornjoj trećini jednjaka (15-20%),<sup>1,2,3,4</sup> što je prikazano u Tablica broj 1.

**Tablica 1. Učestalost lokalizacije karcinoma pločastih stanica jednjaka**

Udaljenost od zuba u cm	Učestalost %	Smrtnost %	Lokalizacija u jednjaku
Aortalni luk 24-26	16%	3%	vratni dio
Račvište bronha 25-27	25%	50%	gornji torakalni dio
Hiatus 35-36	9%	25%	donji torakalni dio
Kardija 37-40	50%	7%	abdominalni dio

## 1.2.2. Klinička slika

### Simptomi i znakovi bolesti

Klinički simptomi karcinoma jednjaka se u 50 do 70% slučajeva javljaju tek u uznapredovaloj fazi bolesti, te je rana dijagnoza otežana.<sup>1</sup>

Najčešći klinički simptomi su: disfagija (poteškoće gutanja), tupi bol retrosternalno u prsima ili epigastrično koja se širi prema kralježnici, gubitak težine, opća slabost i regurgitacija uzrokovana suženjem lumena jednjaka tumorskom masom.<sup>1,2,3,4,36</sup> Uz disfagiju može se javiti i odinofagija, odnosno bolno gutanje i kronični kašalj zbog nastanka traheozofagealne fistule u 5 do 10% bolesnika, hematemeza i promuklost zbog zahvaćenosti rekurentnog laringealnog živca tumorom.<sup>37</sup>

U ranom stadiju bolesti, površinski karcinom pločastih stanica nema simptoma ili se osjeća kao peckanje ili utrnulost i često se otkrije tijekom gastrokopije.<sup>38</sup>

## 1.2.3 Dijagnostičke metode

### Endoskopija i vitalna bojenja

Površinski karcinom može se vidjeti kao lagano uzdignuće ili uleknuće sluznice, dok se nešto veći rani karcinom vidi kao polipoidna masa, ulceracija ili ravno zadebljanje sluznice crvenkaste boje.<sup>1,2,5</sup> Uznapredovali karcinom vidi se kao gljivasta, polipoidna, ulcerirana ili stenozirajuća tumorska masa.<sup>1,2,39, 40</sup>

Kromoendoskopija otopinom joda (Lugol) ili toluidinskim plavilom od velike je važnosti jer pomaže u uočavanju promjena sluznice pri gastroskopiji.<sup>41,42,43</sup> Pomoću Lugola boje se područja zdrave sluznice koja je bogata glikogenom, dok područja u kome se nalazi tumor ostaju nebojena zbog toga što neoplastične stanice imaju malo glikogena u citoplazmi. Suprotno od toga toluidinskim plavilom boje se tumorske stanice, jer taj preparat ima jači afinitet vezanja s DNA i RNA stanice koja se brzo dijeli, dok zdravo tkivo ostaje nebojeno.<sup>5</sup>

### **Endoskopska ultrasonografija**

Navedena metoda koristi se za utvrđivanje dubine invazije primarnog tumora kao i za otkrivanje metastaza u limfnim čvorovima uz jednjak, u ranoj fazi bolesti.<sup>44</sup> Tom se metodom otkriva 90% tumora i 85% tumora N stadija, te dopušta uzimanje citoloških uzoraka iz limfnih čvorova. Manje je uspješna za udaljene metastaze.<sup>5</sup> Općenito, karcinom se vidi kao cirkumskriptna masa ili difuzno zadebljanje stijenke sa slabim i inhomogenim odjekom.<sup>45</sup>

### **Kompjuterizirana tomografija (CT) i magnetska rezonancija (MR)**

Metode se koristi kod uznapredovalih karcinoma za utvrđivanje lokalnog procesa ili sistemske proširenosti bolesti. Trodimenzionalne slike CT ili MR dobro prikazuju T<sub>2</sub>-T<sub>4</sub> stadij bolesti, ali ne i T<sub>1</sub> lezije.<sup>46</sup> Ove metode se upotrebljavaju u procjeni proširenosti tumora, invazija aorte, otkrivanje jetrenih metastaza, no ta tehnika je manje točna za procjenu zahvaćenosti limfnih čvorova.<sup>5</sup>

## **Laboratorijski nalazi**

Zbog krvarenja javlja se anemija, a pothranjenost uzrokuje niske serumske albumine, kolesterol i pad broja leukocita. Povišen je bilirubin, alkalna fosfataza i moguća je hiperkalcijemija zbog nastanka metastaza u kosti i jetru. Povišen je tumorski marker CA 19-9 u serumu.<sup>5</sup>

## **Bronhoskopija, laparoskopija i torakoskopija**

Bronhoskopija je korisna pretraga kod prikazivanja invazije u dišne putove, dok se laparo i torakoskopija koriste kod sumnje na prisutnost metastaza koje su manje od 1 cm.<sup>5</sup>

## 1.3. PATOHISTOLOGIJA RAKA PLOČASTIH STANICA JEDNJAKA

### 1.3.1. Makroskopski izgled

Makroskopski, pločasti karcinom jednjaka najčešće raste kao gljivasti ili karfiolasti tumor (60%)<sup>3,4</sup> koji se izbočuje u lumen jednjaka, no može imati i infiltrativni, polipoidni, poput plaka ili ulcerirajući oblik rasta.<sup>2,47</sup> Za makroskopsku klasifikaciju uznapredovalih karcinoma Ming<sup>48</sup> je predložio tri glavna oblika: gljivasti, ulcerozni i infiltrativni. Gljivasti je karakteriziran egzofitičnim rastom, ulcerozni tumor raste predominantno intramuralno, karakteriziran je vrijedom, uzdignutih rubova. Infiltrativni rast je najrjeđi i karakteriziran je intramuralnim rastom s tek manjim vidljivim defektom sluznice. Slična podjela predložena je od Japanskog udruženja za bolesti jednjaka.<sup>49</sup> Na reznoj plohi tumori su sive ili bijele boje i može se okom vidjeti invazija u stijenku jednjaka i okolna tkiva (meko tkivo oko jednjaka, dušnik, aorta, želudac). Tumor koji raste u lumen može u potpunosti zatvoriti prolaz kroz jednjak.<sup>1,3,4</sup>

Obzirom na dubinu invazije stijenke jednjaka, karcinom pločastih stanica dijeli se na površinski (intramukozni, termin se koristi za karcinome koji prožimaju laminu propriju sluznice, te superficijalne i mikroinvazivne karcinome koji prodiru i preko podsluznice, površinsko šireće koji se šire sa strane u sluznicu najmanje 2 cm od glavne tumorske mase) i uznapredovali karcinom.<sup>50,51,52,53</sup> U Kini i Japanu termin površinskog karcinoma koristi se za one karcinome koji nisu proželi stijenku dublje od podsluznice i nemaju metastaze u limfne čvorove.<sup>47,48</sup> U Japanu je 10 do 20% dijagnosticiranih karcinoma površinskog tipa, dok se u zapadnim zemljama on javlja

rjeđe.<sup>53</sup> Površinski karcinom javlja se u obliku pločastih uzdignuća, rjeđe ulceracije ili polipoidne mase i u oko 20% slučajeva je multicentričan.<sup>54,55</sup>

Oko 5% površinskih karcinoma koji prožimaju laminu propriju sluznice imaju rizik za nastanak metastaza u limfne čvorove, a u onih koji zahvate i podsluznicu rizik je oko 35%.<sup>36</sup> Karakterističan nalaz kod površinskih karcinoma su tzv. „intramuralne metastaze“ koje se nađu u 11 do 16% karcinoma nakon operacijskog odstranjenja tumora jednjaka, gdje se karcinom širi putem intramuralnih limfnih putova stijenke jednjaka i stvara intramuralne depozite tumora.<sup>56,57</sup>

Uznapredovali karcinom karakteriziran je prodorom tumorskih stanica u dublje slojeve stijenke jednjaka (slojevi stijenke ispod podsluznice) te u okolne strukture.

### **1.3.2. Mikroskopski izgled i histološki nalaz**

Histološki je rak pločastih stanica jednjaka definiran prodorom tumorskih stanica kroz bazalnu membranu epitela i širenjem u laminu propriju sluznice i dalje u dublje slojeve stijenke jednjaka. Invazija obično počinje iz karcinoma in situ (CIS) s proliferacijom izdanaka epitela koji se guraju u podležeću stromu i stvaraju gnijezda, solidne nakupine i tračke atipičnih epitelnih pločastih tumorskih stanica. Zajedno s tim okomitim širenjem tumora u dublje slojeve stijenke, javlja se i horizontalno širenje u periferiju tumora. Učestalost invazije limfnih i krvnih žila povećava se s dubinom prožimanja stijenke.<sup>58</sup> Za tumorske stanice specifičan je nalaz međustaničnih mostića i centara orožnjavanja tzv. „squamous pearls“ u slučajevima kada se radi o dobro do umjereno dobro diferenciranim tumorima.<sup>1,2,3,4</sup> Tumor može infiltrirati sve slojeve stijenke jednjaka, zahvatiti adventiciju i prodrijeti kroz nju pa zahvatiti i okolne strukture i organe.<sup>1,2</sup>



Karcinom pločastih stanica pokazuje različiti mikroskopski oblik invazije, koji može biti šireći (engl. expansive) ili prožimajući (engl. infiltrative). U prvom je širenje u vidu glatkih granica tumora s malo razdvajanja tumorske mase, dok drugi ima nejasnu granicu s mnogo raspršenih tumorskih gnijezda i tračaka.<sup>1,2,3,4</sup> Stupanj dezmodoplazije strome tumora, upalna reakcija u stromi, pleomorfizam jezgara i količina orožnjavanja izrazito je različita.<sup>1,3,4,5,7</sup>

Uz uobičajeni tip karcinoma pločastih stanica u jednjaku se javljaju još i dva podtipa karcinoma pločastih stanica, verukozni i bazaloidni karcinom.

Verukozni tip karcinoma pločastih stanica je rijedak tip<sup>2,59</sup> koji je karakteriziran egzofitičnim, bradavičastim načinom rasta i histološki je građen od dobro diferenciranih atipičnih epitelnih pločastih stanica s malo atipija, obilne eozinofilne citoplazme s većim centrima orožnjavanja, koje oblažu papilarne formacije i imaju tzv "gurajuće" granice.<sup>1,2</sup> Iako su histološki dobro diferencirani i sporo rastu, metastaze se javljaju jednako često kao u uobičajenom obliku i stopa smrtnosti je podjednaka.<sup>1</sup>

Bazaloidni tip karcinoma pločastih stanica je vrlo rijedak tip karcinoma gornjeg dišnog i probavnog sustava.<sup>60</sup> Histološki je karakteriziran tijesno priljubljenim kompaktnim gnijezdima ili jezerima sličnim žarištima s komedo nekrozom koje čine atipične epitelne stanice, oskudne bazofilne citoplazme i hiperkromatskih jezgara uz nalaz brojnih mitozna i apoptotičkih tjelešaca.<sup>61, 62</sup>

Uz to postoji i tzv. „vretenasti tip“ ili sarkomatoidni tip karcinoma koji je zapravo karcinosarkom i smatra se da nastaje od dva klona stanica.<sup>63</sup> Epitelna komponenta je oskudna i može se naći tek nekoliko žarišta površinskog karcinoma.<sup>2,4,35</sup> Stroma tumora je nalik sarkomu, najčešće je to maligni fibrozni histiocitom, ponekad se vidi diferencijacija prema hrskavici, kosti ili poprečno-prugastom mišićju.<sup>64</sup> Metastaze u limfnim čvorovima obično imaju epitelnu komponentu.<sup>1</sup>

**Histološko stupnjevanje** (histološki gradus) dijeli karcinom pločastih stanica jednaka na:

1. dobro diferencirani; tumorska gnijezda čine poligonalne epitelne tumorske stanice, eozinofilnih citoplazmi, jasno prepoznatljivih međustaničnih mostića i prisustvo obilne keratinizacije.<sup>1,2</sup>

2. umjereno diferencirani; gdje 2/3 tumora čine iste stanice kao u dobro diferenciranom tumoru, dok preostalu trećinu čine primitivnije stanice bazaloidnog tipa. Te stanice čine nepravilna gnijezda i stupce. Žarišta keratinizacije su oskudnija.<sup>2,3,4</sup>

3. slabo diferencirani tumor; čine ga solidne nakupine i tračci uglavnom epitelnih tumorskih stanica bazaloidnog tipa, od kojih neke mogu biti velike, bizarne i pleomorfne. Keratinizacija se ne nalazi.<sup>3,4,35</sup>

4. nediferencirani tumor; građen je od polimorfnih stanica s jezgrama različite veličine i oblika i svjetlosnim je mikroskopom teško otkriti podrijetlo iz pločastih stanica, što je moguće postići imunohistokemijskom metodom.<sup>3,4,65</sup>

### 1.3.3. Određivanje proširenosti tumora

Za ocjenu proširenosti (stadija) karcinoma pločastih stanica jednjaka u uporabi je TNM klasifikacija (bazira se na American Joint Committee on Cancer, AJCC) <sup>2</sup>:

#### **Primarni tumor (T)**

- Tx tumor se ne može procijeniti
- T0 nema dokaza primarnog tumora
- Tis karcinom „in situ“
- T1 invazija tumora u subepitelno tkivo (lamina proprija ili submukoza)
- T2 invazija tumora u mišićni sloj
- T3 invazija adventicije tumorom
- T4 tumor zahvaća okolne strukture

#### **Regionalni limfni čvorovi (N)**

- Nx regionalni limfni čvorovi nisu izolirani
- N0 u regionalnim limfnim čvorovima nije nađena infiltracija primarnim tumorom
- N1 u jednom ili više regionalnih limfnih čvorova nađe se infiltracija primarnim tumorom

#### **Metastaze (M)**

- MX metastaze se ne mogu procijeniti
- M0 metastaze nisu nađene
- M1 udaljene metastaze

Donja trećina jednjaka : M1a-metastaze u celijačnim limfnim čvorovima

M1b-ostale udaljene metastaze

Gornja trećina jednjaka: M1a-metastaze u cervikalnim limfnim čvorovima

M1b-ostale udaljene metastaze

Srednja trećina jednjaka: M1a-nisu prikladne

M1b-neregionalne i ostale udaljene metastaze

#### **1.3.4. Prethodne (prekursorske) lezije**

Smatra se da je nastanak karcinoma pločastih stanica jednaka proces koji nastaje preko više stepenica, od promjene normalnog epitela preko hiperplazije bazalnih stanica epitela, intraepitelne neoplazije (displazija, carcinoma in situ) i konačno do invazivnog karcinoma.<sup>31, 66</sup>

##### **Intraepitelna neoplazija**

Lezija je otprilike osam puta češća u zemljama s visokim rizikom nego u onim s nižim rizikom. Često se nađe u kirurškom uzorku zajedno s invazivnim karcinomom.<sup>67</sup> Morfološki intraepitelna neoplazija uključuje citološke nepravilnosti kao i nepravilnosti u građi lezije. Strukturne promjene su poremećaj stratifikacije i gubitak polarnosti, a citološke su nepravilna i hiperkromatska jezgra i povećan omjer jezgra:citoplazma, te povećan broj mitozna. Displazija se mjeri od niske do visoke. U nižoj poremećaj zauzima donju trećinu epitela, dok u visokoj zauzima gotovo cijelu debljinu presjeka epitela s vidljivim atipijama stanica.<sup>67</sup> Epidemiološke studije upućuju na povećani rizik nastanka invazivnog karcinoma u bolesnika s hiperplazijom bazalnih stanica (relativni rizik, RR 2,1), blagi stupanj displazije (RR 2,2), umjereni stupanj displazije (RR 15,8) i teški stupanj displazije (RR 62,5).<sup>66</sup>

##### **Hiperplazija bazalnih stanica**

Histološki se nalazi pravilan epitel sa zadebljanjem bazalnog sloja stanica bez izduženja produljaka epitela.<sup>66</sup> U velikom broju slučajeva hiperplazija je odgovor na ezofagitis, koji je čest u visoko rizičnim područjima svijeta.<sup>67</sup>

## **Papilom pločastih stanica (Squamous cell papilloma)**

Rijedak je benigni tumor koji je građen od hiperplastičnog pravilno slojevitog višeslojnog pločastog epitela koji prekriva papilarne formacije nastale iz lamine proprije sluznice s vezivnom i krvožilnom stromom. Polipoidni produljci su glatki, dobro ograničeni i obično manji od 5 mm.<sup>68, 69</sup> Tumor je uglavnom smješten u srednjoj trećini jednjaka.<sup>69</sup>

### **1.3.5. Metastaze**

Bogata opskrba jednjaka limfom odgovorna je za visoki postotak metastaza u limfne čvorove periezofagealne regije, te limfne čvorove iznad i ispod ošita. Metastaze se javljaju rano u tijeku bolesti i jedan su od razloga neuspješnog liječenja karcinoma.<sup>1</sup> U serijama od četrdesetak bolesnika bez metastaza vidljivih konvencionalnim tehnikama, u kirurški odstranjenim limfnim čvorovima nađene su metastaze u 40 % histološki pregledanih limfnih čvorova.<sup>1</sup> Najčešće mjesto metastaziranja su regionalni limfni čvorovi, a metastaze se nađu u 12% resekcijskih uzoraka.<sup>1</sup> Rizik nastanka metastaza je 5% za karcinome koji se nalaze samo u sluznici, više od 30% za one koji se nalaze i u podsluznici i preko 80% za one koji zahvaćaju i okolne strukture.<sup>70</sup> Tumori iz gornje trećine jednjaka najčešće metastaziraju u cervikalne i gornje medijastinalne limfne čvorove, a tumori iz srednje trećine u cervikalne i medijastinalne, dok tumori donje trećine jednjaka metastaziraju u donje medijastinalne i perigastrične limfne čvorove.<sup>71,72,73</sup> Metastaze u udaljene organe su česte, hematogenim putem posebice u jetru,<sup>74,75</sup> te u želudac najvjerojatnije preko podsluzničkog limfatičkog plexusa.<sup>1</sup> Rjeđe metastazira u nadbubrežne žlijezde, mozak i kosti.<sup>76</sup>

### 1.3.6. Genetska osjetljivost i genetika raka

Obiteljska sklonost karcinomu pločastih stanica jednjaka malo je istraživana osim u povezanosti s Tylosis palmaris.<sup>77,78</sup> Kod te nasljedne autosomno dominantne bolesti nađen je lokus koji se naziva engl. Tylosis esophageal cancer (TOC) gen i mapiran je na 17q25 kromosomu. Smatra se da je taj gen na neki način uključen i odgovoran za strukturu, odnosno stratifikaciju višeslojnog pločastog epitela, pa ako izgubi svoju ulogu, cjelovitost epitela jednjaka osjetljivija je na vanjske mutagene.<sup>79</sup> Nekoliko kandidata strukturnih gena kao što su envoplakin (EVPL), integrin  $\beta 4$  (ITGB4) i plakoglobin bili su isključeni kao TOC geni, no važnost tih gena je povezanost sa sporadičnim slučajevima karcinoma, nevezano sa Tylosis palmaris.<sup>80,81</sup>

Promjena gena koji kodiraju proteine koji sudjeluju u staničnom ciklusu od G1 prema S fazi, česte su u karcinomu pločastih stanica jednjaka. Smatra se da je mutacija Tp53 gena (17p13) rani događaj, koji se ponekad može otkriti već i u intraepitelnoj neoplaziji. Učestalost i tip mutacije razlikuje se ovisno o zemljopisnom području, što upućuje da neke mutacije nastaju djelovanjem vanjskih uzročnika tog područja.<sup>82,83</sup>

Amplifikacija ciklina D1(11q13) javlja se u 20 do 40% karcinoma pločastih stanica i učestalo je otkrivena u karcinomima koji podržavaju ekspresiju proteina retinoblastoma (Rb), jer su oba dio iste signalne kaskade.<sup>83,84</sup> U 50% tumorskih stanica nalazi se porast ciklina D1 DNA, a petogodišnje preživljenje s povećanom ekspresijom ciklina je 7%, za razliku od onih bez nje gdje ono iznosi 59%.<sup>5</sup> Inaktivacija ciklin ovisne kinaze inhibitora 2A, CDKN 2A (engl. Cyclin-dependent

kinase inhibitor 2A) nastaje delecijom kod homozigota ili novom metilacijom i povezana je s uznapredovalim karcinomom.<sup>2</sup>

Druga istraživanja navode inaktivaciju FGHT gena (engl. fragile histidine triad, tumor supresor gen) metilacijom i delecijom na TOC genu.<sup>82</sup>

LOH (engl. loss of heterozygosity), gubitak heterozigotnosti se javlja u karcinomima pločastih stanica jednjaka, gubitak heterozigotnosti na 9q u 81% karcinoma i 3p u 34% karcinoma.<sup>5</sup>

Nedavno otkriven DLC1 gen (engl. deleted in lung and oesophageal cancer-1) nađen je u 33% primarnih karcinoma pluća i jednjaka.<sup>85</sup>

Molekulski biljezi otkriveni u različitim istraživanjima, koristeći se tehnologijom molekulske biologije, nalaze se u karcinomu pločastih stanica jednjaka, kao što su angiogeni čimbenici (VEGF, TGF- $\alpha$ ) i p21<sup>86</sup>, čija izraženost korelira s nađenim pozitivnim limfnim čvorovima. U nekima se nalazi smanjenje izraženosti beta-katenina,<sup>87</sup> što je povezano s lošijom prognozom, zatim manja izraženost e-kadherina,<sup>88</sup> koji negativno korelira s histološkim gradusom tumora i kliničkim stadijem, smanjenje regulacije alfa-katenina,<sup>89</sup> što je opet povezano s lošijom prognozom. Protein mTOR (engl. mammalian target of rapamycin) važan je regulator translacije proteina i njegova aktivirana forma nađena je u 1/4 karcinoma pločastih stanica jednjaka.<sup>90</sup> Metilacija tumor supresor gena DCC (engl. deleted in colorectal carcinoma)<sup>91</sup> često je nađena u karcinomu jednjaka. Metaloproteinaze supresorski geni kao što su RECK (engl. reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) i protein CD 105 (engl. endoglin),<sup>92</sup> igraju važnu ulogu u metastaziranju i karcinogenezi karcinoma jednjaka, a karcinom pokazuje i povećanu ekspresiju Fas liganda - FasL (engl. Serum soluble Fas ligand) koji cirkulirajući štiti od Fas potaknute apoptoze.<sup>93</sup> Kako razni kancerogeni uključujući duhan i alkohol djeluju na

stanice jednjaka, tako uzrokuju i oštećenje DNA. Geni koji sudjeluju u popravku DNA stanice omogućuju apoptozu oštećenih stanica, no dođe li do oštećenja tog sistema, počinje kaskadni proces nastanka karcinoma,<sup>94</sup> kao što se nakon DNA metilacije nalazi depresija kancer testis antigena.<sup>95</sup> Brojna su i druga istraživanja u kojim je nađena povećana izraženost kortaktina, fascina i survivina u pločastom karcinomu jednjaka,<sup>96</sup> promjene strukturnih proteina ribosoma, kalcij vezujućih iona, proteina mikrotubula, regulatora transkriptaze i drugih koji su posebice izraženi s porastom patološkog i kliničkog stadija bolesti,<sup>97</sup> a navodi se i skraćenje telomera kromosoma, čime oni postaju nestabilniji i podložni raznim promjenama.<sup>98</sup>

Iste genetske promjene ujedno su i prognostički čimbenici jer su izraženiji u uznapređovalom stadiju bolesti i s pojavom metastaza.

### **1.3.7. Prognoza i prognostički čimbenici**

Prognoza je loša, prosječno preživljenje nakon postavljene dijagnoze je manje od jedne godine.<sup>1</sup> Petogodišnje preživljenje bolesnika s karcinomom pločastih stanica jednjaka je oko 10%.<sup>2</sup>

Najvažniji prognostički čimbenici karcinoma jednjaka su:

#### **Stadij bolesti (TNM klasifikacija)**

Prognoza ovisi o dubini invazije,<sup>99</sup> zahvaćenosti limfnih čvorova i prisutnosti metastaza, te prisutnosti intramuralnih metastaza koji su nezavisni prognostički čimbenici.<sup>70,100</sup> Zahvaćenost limfnih čvorova, bez obzira na proširenost primarnog tumora znači slabiju prognozu.<sup>101,102</sup> Prema istraživanjima Rizk-a i sur.<sup>103</sup> te Li-a i



sur.<sup>104</sup> naročito je važno koliko je limfnih čvorova zahvaćeno, što do sada nije uključeno u TNM klasifikaciju. Isto tako širenje izvan kapsule limfnog čvora utječe na preživljenje, a i češći je recidiv karcinoma.<sup>105</sup> Važnost imunohistokemijski utvrđenih mikrometastaza još je nedorečena.<sup>106,107,108</sup>

### **Histološko stupnjevanje (histološki gradus) i histološki podtip karcinoma (uobičajeni, verukozni, bazaloidni)**

Što je histološki gradus viši, odnosno stanice postaju slabije diferencirane u odnosu na pravilne epitelne pločaste stanice i što su manja područja keratinizacije, prognoza je lošija. Neke od studija visoko cijene histološko stupnjevanje kao prognostički čimbenik,<sup>70,109</sup> dok druge studije ukazuju na činjenicu da diferencijacija nema značaja kao prognostički čimbenik.<sup>110,111,112</sup>

### **Infiltracija limfocitima**

Opaženo je da tumori s izraženijom infiltracijom limfocitima u samom tumoru te na granici između tumora i okolnog tkiva imaju bolju prognozu od onih sa slabijom limfocitnom reakcijom.<sup>1,2,111</sup> Uz limfocitnu infiltraciju, vaskularna i limfo invazija, te područja nekroze ukazuju na lošiju prognozu.<sup>113</sup> Značenje limfne invazije utvrđeno je istraživanjima Brucher-a i sur.<sup>113</sup> i Torres-a i sur,<sup>114</sup> a vaskularne invazije radovima Tanigawe i sur.<sup>115</sup> koji ukazuju na njihovu veliku ulogu u proširenju primarne lezije.

### **Proliferacijski indeks**

Proliferacijski indeks može se imunohistokemijski odrediti pomoću Ki-67, no nije nezavisan prognostički čimbenik.<sup>116</sup>

## **DNA ploidiya**

Aneuploidija određena protočnom citometrijom nađe se u 55 do 95% karcinoma pločastih stanica jednjaka.<sup>117</sup> Bolesnici s diploidnim tumorima imaju bolju prognozu obzirom na preživljenje. Povezanost aneuploidije i preživljenja nađena je u više studija,<sup>118,119,120</sup> no u drugima je dokazano da nema prognostičku značajnost.<sup>113</sup>

## **Stanje resekcijskih rubova**

Učestalost povratka karcinoma negativno korelira s udaljenosti primarnog tumora od proksimalnog resekcijskog ruba, koji bi trebao biti 3 do 5 cm od tumora.<sup>121</sup> Zahvaćenost unutar 1 mm u kružnim resekcijskim rubovima (stijenka, adventicija, okolne strukture) loš je prognostički čimbenik uz jasnu mogućnost recidiva i širenja.<sup>121,122,123</sup>

## **Određeni molekularni čimbenici**

U istraživanjima proučavana je mutacija Tp53<sup>124</sup> (35 do 80% slučajeva), te promjene drugih potencijalnih prognostičkih čimbenika kao što su receptori čimbenika rasta, EGFR (engl. epidermal grow factor receptors),<sup>124</sup> proteini int-2,<sup>2,84</sup> metaloproteinaze,<sup>92</sup> regulatora staničnog ciklusa i proteina koji sudjeluju u popravku DNA.<sup>124</sup> Neke od studija ukazuju na Tp53 kao negativni prognostički čimbenik,<sup>125</sup> dok druge nisu našle prognostički značaj Tp53 mutacije.<sup>126,127</sup>

Novijim istraživanjima ukazano je na eventualnu ulogu gena p21,<sup>128</sup> ulogu VEGF-a,<sup>86</sup> E-cadherina,<sup>88,89</sup> beta-atenina,<sup>87</sup> metaloproteinaza<sup>92</sup> i drugih supresorskih gena kao i regulatora staničnog ciklusa u razvoju karcinoma pločastih stanica jednjaka.<sup>95,96,97</sup>

## 1.4. TERAPIJA RAKA PLOČASTIH STANICA JEDNJAKA

### 1.4.1. Kirurška terapija

#### Palijativna terapija

Primjenjuje se u bolesnika s neoperabilnim karcinomom kako bi se spriječilo zatvaranje lumena jednjaka, a tumor ostaje u tijelu. Palijativna terapija može biti potpomognuta s dobro isplaniranim zračenjem.<sup>129</sup>

Palijativna terapija:

- a) gastrostoma
- b) Celestinov tubus, gotovo zaboravljena metoda, kod koje se uz pomoć ezofagoskopa stavi fini metalni tubus u području tumora i spriječi zatvaranje lumena
- c) zaobilazna ezofagofundoanastomoza koja se radi kod raka kardije i prsnog dijela jednjaka, a koristi se zaobilaznica s vaskulariziranom vijugom crijeva.<sup>5</sup>

#### Radikalni zahvat

Kirurškim torakalnim ili transhijatalnim pristupom radi se resekcija jednjaka.

Postupak prilikom resekcije može biti:

##### 1. totalna ezofagektomija

Radi se o totalnoj ekstirpaciji jednjaka s tumorskom masom. Vratni dio se izvede poput fistule na vratu, a pristup želucu se osigura gastrostomom.<sup>5</sup> Medijastinum se očisti od medijastinalnih metastaza u limfne čvorove (nastaje doživotna invalidnost).<sup>5</sup>

## 2. ezofagektomija s limitiranom gastrektomijom i ezofagogastričnom anastomozom

Transtorakalnim i transhijatalnim putem izvodi se operacija kada je proces u donjoj i srednjoj trećini. Područje kardije se slijepo zatvori. Tako modeliran želudac povuče se u toraks pa i u vrat, te se napravi spoj s ostatkom jednjaka.<sup>5,123</sup>

Osim odstranjenja tumora, odstrane se i lokalni limfni čvorovi, a gdje je potrebna radi se i proširena limfadenektomija u 2 ili 3 etaže.<sup>130,131</sup>

Operativni mortalitet u prošlosti bio je 20 do 30%, danas je 5 do 10%.<sup>5,130</sup>

Za premoštenje reseciranog jednjaka može se koristiti i ileum ili kolon, koji se povuku retrosternalno ili subkutanim putem sve do vrata, gdje se načini spoj s vratnim dijelom jednjaka.<sup>5,123</sup>

Samo 15 % karcinoma otkriva se u stadiju T<sub>is</sub> i T<sub>1</sub> N<sub>0</sub> i kod njih je moguća kurativna radikalna kirurška resekcija s regionalnom limfadenektomijom. Kod ostalih 85% radi se palijativna kirurška terapija i kemoterapija ili endoskopske metode koje rješavaju disfagiju.<sup>5</sup>

### 1.4.2. Neoadjuvantna-multimodalitetna terapija

Obuhvaća prijeoperacijsko zračenje (radioterapija), kemoterapiju i njihovu kombinaciju, poslijeoperacijsko zračenje, kemoterapiju i njihovu kombinaciju, te hipertermoradijaciju.<sup>5</sup>

#### **Prije operacije**

Koristi se zračenje u jačini od 30 do 40 Gy, koje smanjuje primarni tumor, te povećava vjerojatnost bolje resekcije.<sup>5</sup>

Kemoterapija prije provodi se cisplatinom, arabinozidom i 5-fluorouracilom ili kombinacijom cisplatine s drugim kemoterapeutima.<sup>132</sup>

Kombinacija navedenih terapija, kemoradioterapija smanjuje sistemske mikrometastaze. Tri tjedna prije operacije provodi se zračenje s 45 Gy uz cisplatinu u kombinaciji s ostalima (5-fluorouracil, mitomicin itd.), iza toga se radi kirurški zahvat. Pojedine studije su pokazale da se u uznapredovalim slučajevima, u trećine bolesnika javlja recidiv, pa kemoterapije nije terapija izbora<sup>133,134</sup> i one ukazuju na važnost kirurške terapije nakon neuspješne kemoradioterapije.<sup>135</sup> Druge studije ističu važnost prijeoperacijske neoadjuvantne terapije.<sup>132</sup>

Hipertermoradijacija je postupak kod kojeg se primjenjuje hipertermija s kemoradijacijom, pri čemu se smanjuje rizik nastanka recidiva i mikrometastaze. Danas se očitavaju početni rezultati nakon 3 godine, gdje je preživljenje 50 do 76%.<sup>5</sup>

### **Nakon operacije**

Zračenje je korisno kod karcinoma pločastih stanica i kod neoperabilnih karcinoma. Bolji su rezultati u žena, kod proksimalno smještenih tumora i kod tumora manjih od 5 cm.<sup>5</sup> Komplikacije su strikture u 67% bolesnika.<sup>136</sup>

Tradicionalan terapija zračenjem je najčešći oblik liječenja karcinoma gornje trećine jednjaka i uz kirurški zahvat za karcinome donje trećine jednjaka.<sup>136,137</sup>

Danas se uglavnom koristi kombinacija postupaka prijeoperacijskog zračenja (intrakavitalno ili vanjski snop) iza kojeg slijedi kirurški zahvat<sup>138</sup> ili kombinacija kemo i radioterapije.<sup>139</sup>

Liječenje kemoterapijom provodi se kod uznapredovalih karcinoma i kod udaljenih metastaza. Bolji je učinak kod karcinoma pločastih stanica, a koristi se 5-fluorouracil, vindezin, mitomicin, paklitaksel, interferon  $\alpha$ -2A, epirubicin, bleomicin.<sup>140</sup>

Različite studije ukazuju na slabi terapijski odgovor liječenjem kemoterapijom,<sup>141</sup> druge imaju rezultat uspješne kemo i kemoradioterapije čak i nakon invazije dišnih putova.<sup>142</sup>

### **1.4.3. Endoskopska terapija**

Uglavnom se koristi za liječenje površinskih karcinoma.<sup>143,144</sup> Bilo je pokušaja liječenja karcinom u T<sub>1</sub> stadiju, no rezultati su pokazali da to nije pravi odabir terapije.<sup>145</sup>

#### **1. Endoskopska mukozetomija**

Radikalna je kurativna metoda za liječenje ranih karcinoma, gdje se injicira fiziološka otopina u submukozu, čime se tumor odigne. Mogu se staviti i gumeni prstenovi ispod tumora pa se napravi pseudopolip i odstrani se dijatermijskom omčom.

Petogodišnje preživljenje kod tog postupka je 92 do 95 %, a komplikacije su krvarenje i perforacije.<sup>5</sup>

#### **2. Laserska evaporizacija**

Metoda je kojom se rješavaju maligne opstrukcije pomoću lasera nd-yA 6 (neodimijum-itrijum-aluminijum-granat-laser) snage 120 W. Može biti kontaktna i nekontaktna metoda.

Prohodnost, odnosno lumen jednjaka uspostavlja nakon 2 do 4 terapije u 90% bolesnika.<sup>5</sup>

### **3. Fotodinamička terapija**

Metoda je kod koje se intravenskim putem daju derivati hematoporfirina ili porfirina koji se nakupljaju u tumorskim stanicama, oni se zatim aktiviraju laserom male snage, a rezultat je fluorescencija, citotoksična reakcija i nekroza tumora. Dobro reagira 87% bolesnika i tumor nestaje, no velika je vjerojatnost nastanka recidiva 18 mjeseci nakon terapije (29% pločastih i 75% adenokarcinoma).<sup>5</sup>

### **4. Bipolarna elektrokoagulacija**

Koristi se za odstranjenje cirkumferentnih egzofitičnih tumora, a komplikacija je bol u prsima.<sup>5</sup>

### **5. Endoskopska dilatacija**

Metoda je kojom se smanjuje disfagija u 90% bolesnika, no ne odstranjuje se tumor.<sup>5,146</sup>

### **6. Endoskopska injekcijska terapija**

Tom metodom se injicira apsolutni alkohol unutar tumora, čime u tumoru nastaje nekroza. Postupak se mora ponoviti nakon mjesec dana.<sup>5</sup>

### **7. Endoskopsko postavljanje proteze**

Koristi se kod neoperabilnih karcinoma i bolesnika u terminalnoj fazi za uspostavljanje lumena jednjaka.<sup>146</sup>

## 1.5. IMUNOLOGIJA TUMORA

### 1.5.1. Imunološki sustav i tumor

Polovicom prošlog stoljeća Lewis Thomas i MacFarlan Burnet postavili su teoriju tumorskog imunonadzora (engl. Cancer immunosurveillance) po kojoj limfociti štite imunokompetentog domaćina od tumora.<sup>147,148</sup> Smatralo se da imunološki sustav mehanizmom imunonadzora eliminira većinu novonastalih tumora, a samo se oni tumori koji nemaju tumorske antigene zbog imunoselekcije razvijaju i rastu, jer kao takvi ostaju neprepoznati od strane imunskog sustava.<sup>147,148</sup> Ova teorija postala je upitna, jer nisu nađeni čvrsti dokazi koji bi je poduprli. Nije ustanovljena razlika u nastanku karcinogenom 3 metilkantren-om (engl. 3-methylchlanthren) induciranih tumora između normalnih miševa i onih koji urođeno nisu imali timus (engl. Athymic nude mice).<sup>148,149</sup> Također nije nađena razlika kod spontanih nevirusom induciranih tumora u ove dvije skupine životinja.<sup>150</sup>

Međutim, daljnja istraživanja su pokazala da kod miševa bez timusa T stanice nisu potpuno odsutne.<sup>150</sup> Otkrivene su nove populacije T limfocita, stanice prirodne ubojice (engl. Natular Killer; NK) koje nisu ovisne o timusu, te  $\gamma\delta$ T limfociti koji se mogu razviti izvan timusa.<sup>151</sup> Prateći bolesnike koji su imunosuprimirani zbog transplantacije, te oni koji imaju primarne ili sekundarne imunodeficijencije, ustanovljeno je da oni imaju veći rizik nastanka raka.<sup>152,153</sup>

Značajna uloga T limfocita je dokazana i otkrićem antitumorskih T limfocita koji su izolirani kod nekih bolesnika s melanomom,<sup>154</sup> karcinomom kolona,<sup>155</sup> bubrega,<sup>156</sup> te ostalim vrstama tumora. Citotoksični T limfociti (CD8+), prepoznaju 8 do 10 aminokiselina, velike peptidne fragmente nastale uglavnom od staničnih proteina.



Proteini se razgrađuju u citoplazmi uz pomoć proteosoma u kratke peptide koji se onda transportiraju u endoplazmatski retikulum gdje tvore komplekse zajedno s novo sintetiziranim molekulama I razreda kompleksa tkivne podudarnosti (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC). U ljudi se molekule MHC nazivaju ljudski leukocitni antigeni (engl. Human Leukocyte Antigens, HLA). Nastali kompleks peptida i velikog  $\alpha$  lanca te manjeg beta 2-mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) jedinice MHC klase I antigena se transportira na površinu stanice gdje se prezentira CD8+ T limfocitima, koji razaraju tumorske stanice.<sup>157</sup> Iako je prisutnost tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) dobar prognostički znak, broj tih stanica je razmjerno malen. Tumori koji su se uspješno povukli nakon imunoterapije, bili su opsežno infiltrirani limfocitima i drugim imunim stanicama, što ukazuje na potrebnu visoku koncentraciju ovih stanica za uspješnu borbu protiv tumora.<sup>158,159</sup>

Tumor se prilagođava tijekom svog rasta, opstaju oni tumori koji su manje imunogenični, odnosno oni koji su razvili mehanizme pomoću kojih mogu izbjeći imunski sustav.<sup>160</sup> Moguća su barem četiri mehanizma kojima tumor izbjegava djelovanje citotoksičnih T limfocita (CTL). Prvi je taj da neadekvatnom prezentacijom antigena, tumorska stanica slabo senzibilizira CTL. Postoji odnos između izraženosti tumorskih antigena na ciljnoj stanici i prepoznavanja od strane CTL.<sup>161</sup> Tumori mogu izbjeći CTL tako da nastanu varijante koje više ne stvaraju tumorske antigene. Drugi mehanizam čine inhibitorni signali koje šalje tumor odnosno njegova mikrookolina.<sup>161</sup> Treći mehanizam je blokiranje lokalizacije CTL u područje tumora, a četvrti nemogućnost tumorskog okoliša da osigura funkciju T limfocita in vivo. U tumorima dolazi i do promjene izraženosti MHC klase I antigena.<sup>161,162</sup> Gubitak, odnosno smanjenje ovih antigena omogućava rast tumorskih stanica.<sup>163</sup> Ove promjene prisutne su u velikom broju humanih tumora i smatraju se najčešćim mehanizmom

pomoću kojeg izbjegavaju T limfocite.<sup>164,165</sup> Promjena HLA klase I antigena nastaje i zbog gubitka funkcije  $\beta_2m$  uzrokovane mutacijom njegovog gena.<sup>166</sup>

### 1.5.2. Tumorski antigeni

Otkriće humanih tumorskih antigena, mogućnost mjerenja i kvantifikacije imune reakcije na tumor, te ukupni napredak u molekularnoj onkologiji, dali su zamah povratku ideje o imunoterapiji tumora.<sup>167</sup> Tumorskim antigenom može se smatrati bilo koja molekula iz tumorske stanice koju imunološki sustav može prepoznati kao stranu, odnosno protiv koje može nastati protutumorska imunološka reakcija. Kao i na ostale antigene, imunološka reakcija na tumor može biti stanična i/ili humoralna, nadalje stanična reakcija može biti specifična i nespecifična.<sup>167,168,169,170</sup>

Preduvjet za specifičnu imunološku reakciju je aktivacija T limfocita koja nastaje prepoznavanjem antigena na površini stanice u sklopu molekule MCH. Nakon prepoznavanja dolazi do aktivacije, proliferacije i sazrijevanja CD4+ i citotoksičnih CD8+ limfocita. NK stanice čine nespecifičnu imunost, one mogu prepoznati tumorske stanice bez izraženosti HLA i nije im potreban raniji kontakt s tumorskom stanicom. Humoralni odgovor najvjerojatnije ima važnu ulogu u obrani organizma od solidnih tumora.<sup>170</sup>

Tumoru pridruženi antigeni, (engl. Tumor Associated Antigens-TAA), su specifični antigeni koje prepoznaju citotoksični T limfociti u okviru glavnog sustava gena tkivne snošljivosti (Major Human Leukocyte Antigens-HLA) tipa I. Unazad desetak godina kod ljudi su otkriveni brojni tumorski antigeni koje prepoznaju T citotoksični limfociti (CTL).<sup>171,172,173,174</sup>

Izraženi su u različitim vrstama tumora, a u normalnom tkivu nalaze se samo u stanicama testisa, spermatogonijama i spermatocitima, (engl. cancer/testis antigens;C/T) i na stanicama tkiva posteljice (trofoblasti), pa se zbog toga nazivaju i onkofetalnim antigenima.<sup>175</sup> Oni su ipak visoko specifični za tumore, jer spomenute normalne stanice ne eksprimiraju MHC molekule i zbog toga nisu sposobne prezentirati antigen T limfocitima.<sup>176,177,178,179</sup>

## **ANTIGENI MAGE**

Najviše istraživanu i značajnu skupinu antigena čija je izraženost vezana uz tumore zametnih stanica pa se i nazivaju karcinom/testis tumor specifični antigeni (CT/TAA) čine tzv. „melanoma-associated antigens“ (MAGE) koji se nalaze na X kromosomu i dijele se u dvije skupine.<sup>174</sup> Geni MAGE kodiraju tumorske antigene koje mogu prepoznati tumor specifični citotoksični autologni T limfociti, originalno dobiveni restimulacijom in vitro limfocita iz krvi bolesnika s malignim tumorima. Prezentacijom antigenskih (tumorskih) proteina uz pomoć HLA skupine I dolazi do aktivacije citotoksičnih T limfocita te ubijanja tumorske stanice.<sup>178,179</sup>

MAGE- 1 koji je kasnije preimenovan u MAGE-A1 bio je prvi C/T TAA i otkriven je u stanicama melanoma 1991. godine.<sup>180</sup> Kasnije su uslijedili i drugi članovi MAGE-A skupine (MAGE-A2, -A3, -A4, -A6, -A10 i -A12).

Proteini i peptidi nastali iz tih antigena koriste se u kliničkim istraživanjima imunoterapije karcinoma različitih sijela kao što su melanom kože,<sup>180</sup> karcinom jednjaka,<sup>181,182,183</sup> karcinom pluća,<sup>184,185</sup> karcinomi predjela vrata i glave,<sup>186,187</sup> karcinom cerviksa<sup>188,189</sup> i penisa.<sup>190</sup>

Dvije su osnovne skupine antigena MAGE.

U skupinu jedan antigena MAGE svrstavaju se podskupine: MAGE-A, MAGE-B i MAGE-C.<sup>174,191,192</sup>

U drugu skupinu antigena MAGE uvršten je MAGE-D, novootkriveni antigen.<sup>193,194</sup>

Antigeni MAGE pokazuju izraženost u različitim tumorima; karcinom maksilarnog sinusa,<sup>195</sup> karcinom štitne žlijezde,<sup>196</sup> karcinom dojke,<sup>197,198</sup> karcinom prostate,<sup>199</sup> karcinomi područja glave i vrata<sup>200</sup> i karcinom pluća.<sup>201,202</sup> Samom sintezom monoklonskih protutijela postala je moguća imunohistokemijska analiza i kvantifikacija izraženosti C/T TAA, pa se u zadnjih 10 godina provode brojna istraživanja.<sup>202,203,204</sup>

Opisano je više monoklonskih protutijela koje prepoznaju CT TAA npr. protutijelo „77B2“ prepoznaje MAGE-A1 antigen u tumorskim stanicama i stanicama spermatogonija.<sup>194,205</sup> Za dokazivanje MAGE-A3/4 antigena može se koristiti monoklonsko protutijelo nazvano “57B”<sup>206</sup> koje prepoznaje više genskih produkata MAGE-A skupine na svježim smrznutim preparatima (MAGE-A3, -A4, -A6 i -A12) odnosno MAGE-A3/4 u deparafiniranim preparatima.<sup>207</sup>

## **ANTIGENI NY-ESO**

Antigen NY-ESO-1 je također član skupine karcinom/testis antigena, (C/T TAA) koji je u posljednje vrijeme uključen u različita istraživanja, među ostalima i u istraživanja karcinoma jednjaka,<sup>208, 209, 210, 211</sup> Antigen NY-ESO-1 je posebno zanimljiv jer je jedan od najimunogenijih danas poznatih antigena i značajan je čimbenik u imunoterapiji tumora te mogućoj antitumorskoj vakcinaciji. On inducira i humoralni odgovor i specifične CD 8 citotoksične T limfocite u oko 40 do 50%<sup>212,213</sup> bolesnika čiji tumori imaju izražen antigen NY-ESO-1. Radi se o proteinu od 180 aminokiselina

koji je originalno otkriven upotrebom tzv. SEREX metode (engl. Serological Analysis of Recombinant Tumor cDNA Expression Libraries with Autologous Serum) u bolesnika s rakom pločastih stanica jednjaka.<sup>214</sup>

Gen koji učitava NY-ESO nalazi se na Xq28 kromosomu.<sup>214</sup> Određeni broj bolesnika s tumorima koji imaju izražen ovaj antigen imaju prisutna ista protutijela i u serumu (hepatocelularni karcinom,<sup>215</sup> karcinom mokraćnog mjehura,<sup>216,217</sup> karcinom pluća,<sup>218</sup> karcinom dojke<sup>219</sup>).

Zanimljivo je da se titar NY-ESO-1 protutijela povećava s progresijom bolesti i smanjuje njezinom regresijom.<sup>220</sup>

Za imunohistokemijsko dokazivanje ekspresije antigena NY-ESO-1 može se koristiti monoklonsko protutijelo nazvano „D8.38“.<sup>220</sup>

Još jednom treba naglasiti, sintezom monoklonskih protutijela omogućena je kvantifikacijska imunohistokemijska analiza izraženosti karcinom/testis tumoru pridruženih antigena (C/T TAA) u pojedinim tumorima, te je na taj način moguće odrediti bolesnike koji bi mogli biti pogodni za imunoterapiju.<sup>221,222,223,224,225,226</sup>

## **2. HIPOTEZA**

Hipoteza istraživanja je da su proteini MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 izraženi u primarnom karcinomu pločastih stanica jednjaka i u metastazama unutar limfnih čvorova, te bi njihovo istovremeno određivanje u primarnim tumorima i metastazama moglo izdvojiti skupinu bolesnika pogodnu za ciljanu imunoterapiju.

## **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Imunohistokemijskom analizom odrediti izraženost antigena MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 u karcinomu pločastih stanica jednjaka sa i bez metastaza u limfne čvorove te usporediti izraženost navedenih antigena u dvije istraživane skupine.
2. Imunohistokemijskom analizom odrediti izraženost antigena MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 u metastazama karcinoma pločastih stanica jednjaka u limfne čvorove, te usporediti izraženost navedenih antigena u primarnom tumoru i metastazi.
3. Odrediti postoji li povezanost između izraženosti antigena MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 u tumoru s histološkim stupnjem, TNM klasifikacijom, smještajem tumora u jednjaku, veličinom tumora te dobi i spolom bolesnika.
4. Temeljem dobivenih rezultata pokušat će se izdvojiti skupina bolesnika koja je pogodna za liječenje ciljanom imunoterapijom.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Bolesnici**

U istraživanju je korišten arhivski materijal dobiven nakon resekcije jednjaka te histološki potvrđene dijagnoze karcinoma pločastih stanica jednjaka u Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničke bolnice „Sestre milosrdnice“ i Kliničkog zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u vremenskom periodu od 01.01.1997. do 31.12. 2006. godine. Svim bolesnicima uključenim u ovu studiju kirurški je odstranjen tumor i potvrđena je dijagnoza karcinoma pločastih stanica jednjaka (Carcinoma planocellulare) s utvrđenim histološkim gradusom (mitotska aktivnost, anizonukleoza, stupanj diferenciranosti) i TNM klasifikacijom prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije, WHO (engl. World Health Organization classification). Analizirano je 55 karcinoma pločastih stanica jednjaka, od kojih je 28 s metastazama u limfne čvorove. Podaci o dobi i spolu bolesnika te o smještaju i veličini tumora dobiveni su iz baze podataka dvaju navedenih Zavoda za patologiju.

### **4.2. Metode**

#### **4.2.1. Patohistološki postupak**

Materijal je obrađen standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje

na debljinu 5 µm, deparafiniziranje i bojenje standardnom metodom hemalaun eozin (HE). Tumorsko tkivo je pregledano svjetlosnim mikroskopom kako bi se provjerila prethodno postavljena patohistološka dijagnoza, odredio histološki gradus tumora i provjerila TNM klasifikacija.

#### **4.2.2. Imunohistokemijski postupak**

Za imunohistokemijsku analizu je izabran preparat tumora s mjestom najdublje invazije.

Izraženost analiziranih proteina u primarnom karcinomu pločastih stanica određivana je na dva dodatna reza iz primarnog tumora kao i u metastazama u limfne čvorove pomoću dva monoklonska protutijela:

1. nerazrijeđeni supernatant hibridoma koji stvara mišje monoklonsko protutijelo mAb57B MAGE-A3/4 (Department of Surgery and Research, University of Basel, Switzerland, dr. G. Spagnoli)

2. mišje monoklonsko protutijelo D8.38 za NY-ESO-1 (Department of Surgery and Research, University of Basel, Switzerland, dr. G. Spagnoli)

Hibridomi koji stvaraju ta protutijela su uzgojeni od strane dr. Giulia Cesarea Spagnolija iz Sveučilišne bolnice u Baselu, Švicarska.

Imunohistokemijski postupak učinjen je u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kao pozitivna vanjska kontrola upotrijebljen je tumor (melanom), kao negativna kontrola koristilo se normalno tkivo bez dokazane ekspresije tih protina (jednjak). Kako tumori sadrže i dijelove normalnog tkiva i stanice koje se ne boje, ti dijelovi su poslužili kao negativna unutarnja kontrola.



### **Imunohistokemijski protokol:**

1. iz parafinskih blokova tumora jednjaka narezani su rezovi debljine 5 mikrometara i nanijeti su na silanizirana mikroskopska stakalca (DAKO, Danska)
2. predmetna stakalca sušena su u termostatu kroz 20 minuta na 60°C
3. zatim su preparati deparafinirani i tretirani u mikrovalnoj pećnici na 800 W kroz 3x5 minuta u 10 mmol/l citratnom puferu uz pH 6,0
4. nakon toga su predmetna stakalca isprana u puferu PBS (Phosphate-Buffered Saline) pH 7,2 i tretirana s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dako-No.S 2023) kroz 5 minuta, radi inaktivacije endogene peroksidaze
5. predmetna stakalca isprana su u puferu PBS, te slijedi upotreba primarnih protutijela (anti-MAGE-A3/4 ili anti-NY-ESO-1) u nerazrijeđenoj formi i inkubirana na sobnoj temperaturi kroz 90 minuta
6. slijedi ispiranje u puferu PBS, nakon čega se nakapa biotinizirano sekundarno protutijelo (Dako-No.K 0690) kroz 30 minuta
7. stakalca se ponovo ispiru u puferu PBS, a zatim tretiraju sa streptavidin «horseradish» peroksidazom (Dako-No.K 0690) kroz 30 minuta, slijedi ispiranje u puferu PBS i dodaje se kromogen K-DAB (Dako-No.K 3468) kroz 5 minuta, nakon čega ide ispiranje u destiliranoj vodi s dodavanjem Hemalauna (Dako-No.S 2020) kroz 1 minutu
8. preparati su isprani u tekućoj vodi i dehidrirani (96% alkohol, apsolutni alkohol)
9. predmetna stakalca izbistre su u ksilolu i uklapaju u Kanada balzam-u, te prekrivaju pokrovnim stakalcem.

#### 4. 2 .3. Analiza imunohistokemijskog bojanja:

Rezultati imunohistokemijskog bojanja za proteine MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 izraženi su semikvantitativno, određivanjem imunohistokemijskog indeksa bojanja (IIB) uzimajući u obzir intenzitet reakcije, te određujući postotak neprijeporno imunoreaktivnih stanica. Intenzitet reakcije i postotak imunoreaktivnih stanica određivan je na cijelom odabranom rezu kroz tumor.

Intenzitet reakcije (bojenja) označen je kao: 0 za odsutnost reakcije; 1 za slabo izraženu reakciju; 2 za umjereno izraženu reakciju; 3 za izrazito pozitivnu reakciju.

Postotak imunoreaktivnih stanica određen je kao: 0 za odsutnost reakcije; 1 za slabo izraženu reakciju, do 10% pozitivnih tumorskih stanica; 2 za umjereno izraženu reakciju, od 10% do 50% pozitivnih tumorskih stanica; 3 za jako izraženu reakciju, preko 50% pozitivnih tumorskih stanica.

Imunohistokemijski indeks bojenja (IIB) dobio se kao umnožak intenziteta reakcije (IR) i postotka reaktivnih stanica (PRS):  $IIB = IR \times PRS$ . Skupine dobivene određivanjem imunohistokemijskog indeksa bojenja utvrđene su u skladu s naputcima iz literature, temeljem kojih se rezultati dijele u četiri skupine.<sup>227</sup>

0–odsustvo reakcije

I–slabo izražena reakcija (IIB umnožak iznosi 1, 2 ili 3)

II–umjereno jaka reakcija (IIB umnožak iznosi 4 ili 6)

III–izrazito jaka reakcija (IIB umnožak iznosi 9)

#### 4.2.4. Statistička obrada podataka

U statističkoj analizi se koristila programska podrška SPSS 15, Statistical Package (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Napravljena je deskriptivna statistika izraženosti proteina MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 obzirom na histološki stupanj tumora, TNM klasifikaciju, smještaj tumora u jednjaku, veličinu tumora te dob i spol bolesnika.

Primjenom Smirnov-Kolmogorovljevog testa analizirana je distribucija podataka.

Razlike u distribuciji kvalitativnih varijabli utvrdile su se  $\chi^2$  testom (P), dok se za korelacijski međuodnos, s obzirom na distribuciju, koristio Pearsonov test korelacije (r) i Spearmanov faktor korelacije (rho).

P vrijednosti < 0.05 su smatrane značajnima.

## 5. REZULTATI

U istraživanju je analizirano 55 uzoraka primarnih karcinoma pločastih stanica jednjaka, od kojih je 28 imalo metastazu u limfni čvor.

Od ukupnog broja bolesnika bilo je 8 (14,54%) žena i 47 (85,46%) muškaraca, starosti od 38 do 73 godine (prosječno 57,2 godine).

Veličina tumora varirala je od 1,0 to 9,8 cm (prosječno 4,4 cm).

U gornjoj trećini jednjaka bilo je smješteno 18 (32,72%) tumora, u srednjoj trećini 30 (54,56%) tumora i u donjoj trećini jednjaka 7 (12,72%) tumora.

U svim uzorcima pregledani su i izolirani limfni čvorovi. Broj izoliranih limfnih čvorova kretao se od 3 do 24 (prosječno 10,5). U 27 tumora koji nisu imali metastazu izolirano je od 3 do 22 limfna čvora (prosječno 9,8), a u 28 tumora kod kojih je nađena metastaza u limfne čvorove izolirano je 4 do 22 limfna čvora (prosječno 11,1 limfni čvor). U tumorima s metastazom bilo je zahvaćeno 1 do 12 limfnih čvorova (prosječno 3,2 limfna čvora).

Osnovni klinički podaci o bolesnicima prikazani su u Tablici broj 2.

**Tablica 2. Klinički podaci bolesnika s pločastim karcinomom jednjaka (n=55)**

<b>Bolesnik</b>	<b>Dob</b>	<b>Spol</b>	<b>Veličina tumora (cm)</b>	<b>Smještaj tumora</b>	<b>Histološki gradus</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
1	56	M	3,0	C	3	2	1	X
2	47	M	8,0	B	3	3	1	X
3	62	M	4,5	B	3	4	1	X
4	52	M	3,0	A	2	3	1	X
5	61	M	7,0	B	2	3	1	X
6	70	Ž	3,0	B	2	3	1	X
7	58	M	2,5	B	3	3	1	X
8	56	Ž	6,5	A	2	3	1	X
9	45	M	3,0	B	2	3	1	X
10	55	M	4,0	B	2	3	1	X
11	55	M	3,0	B	2	3	1	X
12	52	M	9,0	B	2	2	1	X
13	70	M	1,0	A	3	2	1	X
14	49	M	2,5	A	3	3	1	X
15	36	Ž	2,5	A	2	2	1	X
16	48	M	8,0	B	2	3	1	X
17	63	M	5,0	B	2	3	1	X
18	70	M	3,5	B	3	3	1	X
19	51	M	5,0	C	2	3	1	X
20	56	Ž	4,0	B	2	3	1	X
21	53	M	3,0	C	2	3	1	1
22	62	M	5,5	C	3	4	1	X
23	51	M	3,0	B	2	2	1	X
24	54	M	3,0	B	3	3	1	X
25	67	M	6,0	A	2	2	1	X
26	61	M	6,0	B	2	2	1	X
27	57	M	4,0	B	2	3	1	X
28	70	M	4,0	A	3	2	1	X
29	65	M	1,5	A	2	3	0	X
30	72	M	1,5	A	2	1	0	X
31	41	M	7,0	B	2	3	0	1

32	63	M	1,5	C	3	1	0	X
33	72	M	3,5	C	2	2	0	X
34	72	M	1,0	A	1	3	0	X
35	67	M	2,5	B	2	2	0	X
36	52	M	4,0	B	2	2	0	X
37	63	M	2,0	B	3	2	0	X
38	49	M	8,0	B	2	2	0	X
39	38	M	5,5	B	3	2	0	1
40	51	M	2,5	B	2	3	0	X
41	73	M	6,0	B	2	3	0	X
42	49	Ž	5,5	A	1	2	0	X
43	61	M	4,5	B	1	4	0	X
44	48	Ž	3,8	B	2	2	0	X
45	61	M	2,7	A	3	3	0	1
46	39	M	9,8	B	1	2	0	X
47	68	M	2,5	B	1	2	0	X
48	69	Ž	5,5	B	2	2	0	X
49	58	M	4,0	A	2	2	0	X
50	45	M	5,0	C	3	2	0	X
51	64	M	4,0	A	2	1	0	X
52	54	M	1,5	A	2	1	0	X
53	43	M	2,0	A	1	2	0	X
54	60	M	3,5	A	3	3	0	X
55	57	Ž	2,0	A	1	2	0	X

M-spol muški

Ž-spol ženski

A-smještaj tumora u gornjoj trećini jednjaka

B-smještaj tumora u srednjoj trećini jednjaka

C-smještaj tumora u donjoj trećini jednjaka

Rezultati imunohistokemijskom analizom određene izraženosti proteina MAGE-A3/4 u karcinomu pločastih stanica jednjaka sa i bez metastaza u limfne čvorove prikazani su u Tablici broj 3.

**Tablica 3. Izraženost proteina MAGE-A3/4 u tumoru sa i bez metastaze (n=55)**

	Jačina izraženosti proteina MAGE-A3/4 (tm)				Ukupno
	0	I	II	III	
<b>Skupina s metastazama u limfni čvor</b>	3 (11,1%)	2 (7,4%)	7 (25,9%)	15 (55,6%)	27 (100,0%)
<b>Skupina bez metastaza u limfni čvor</b>	2 (7,1%)	5 (17,9%)	6 (21,4%)	15 (53,6%)	28 (100,0%)
<b>Ukupno unutar skupina</b>	<b>5 (9,1%)</b>	<b>7 (12,7%)</b>	<b>13 (23,6%)</b>	<b>30 (54,5%)</b>	<b>55 (100,0%)</b>

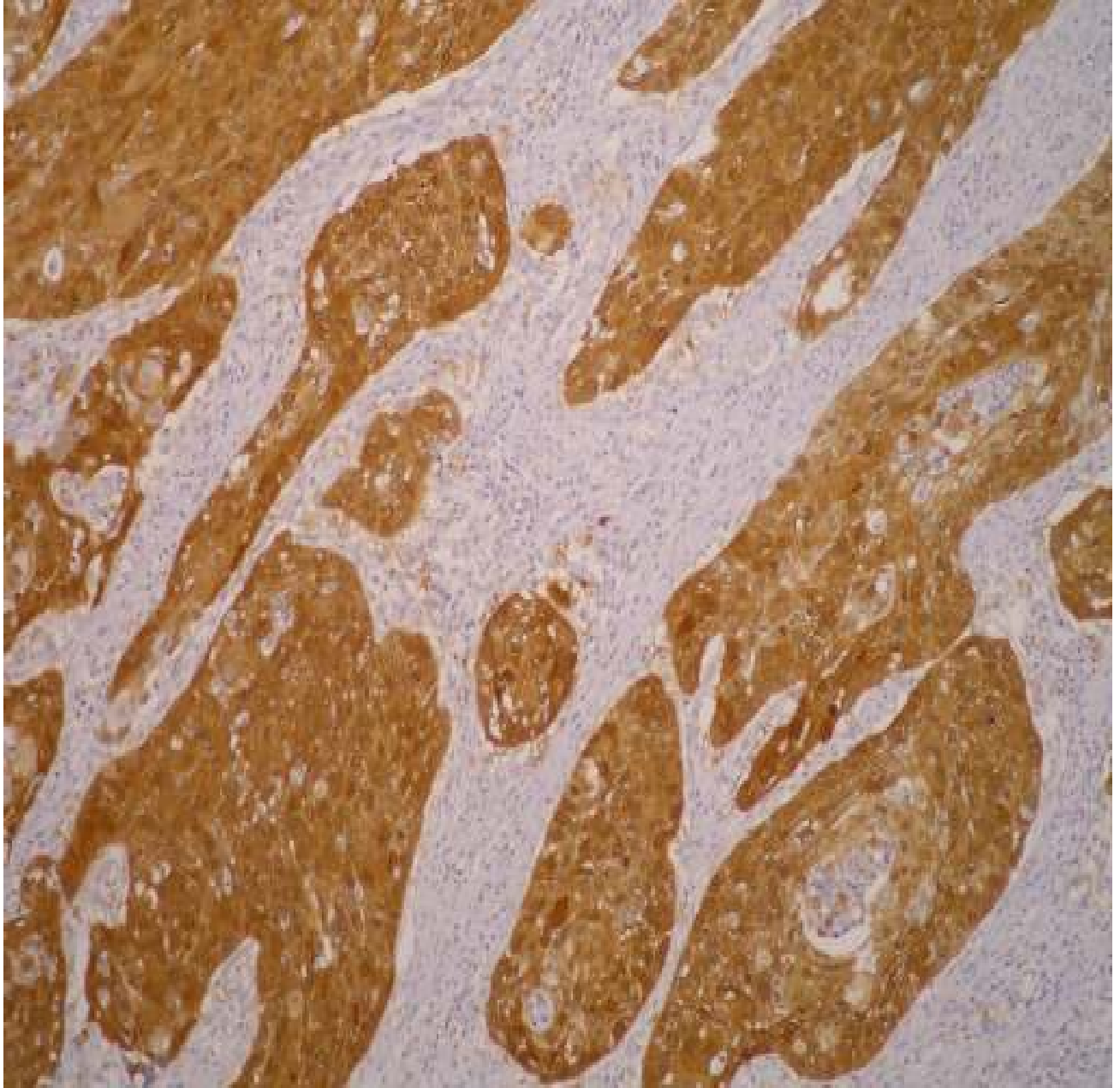
0–odsustvo reakcije

I–slabo izražena reakcija (IIB umnožak iznosi 1, 2 ili 3)

II–umjereno jaka reakcija (IIB umnožak iznosi 4 ili 6)

III–izrazito jaka reakcija (IIB umnožak iznosi 9)

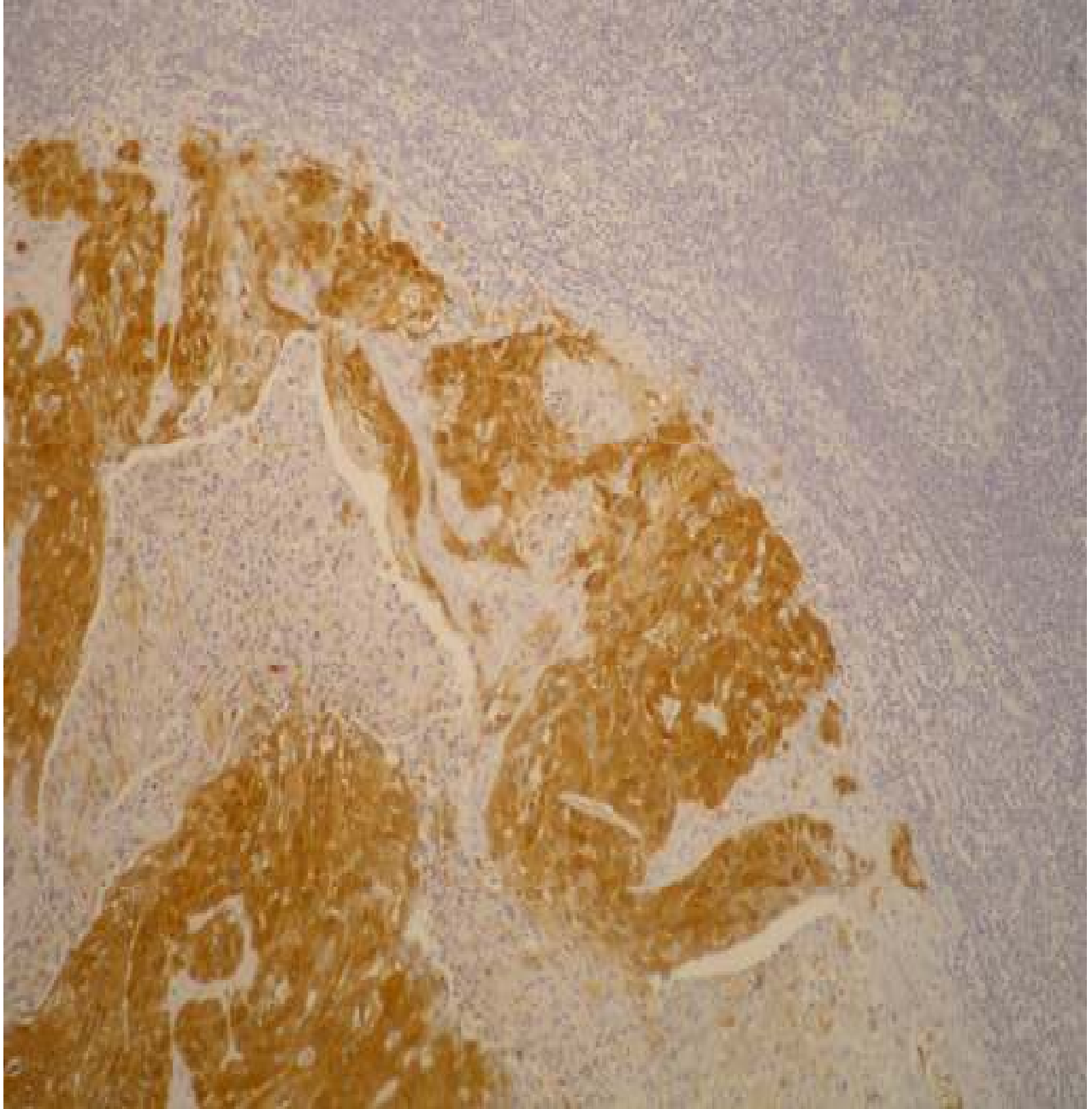
Primjeri imunohistokemijske reakcije izrazite jakosti na protein MAGE-A3/4 u tumoru i limfnom čvoru, prikazani su na slikama 1, 2 i 3.



Slika 1.

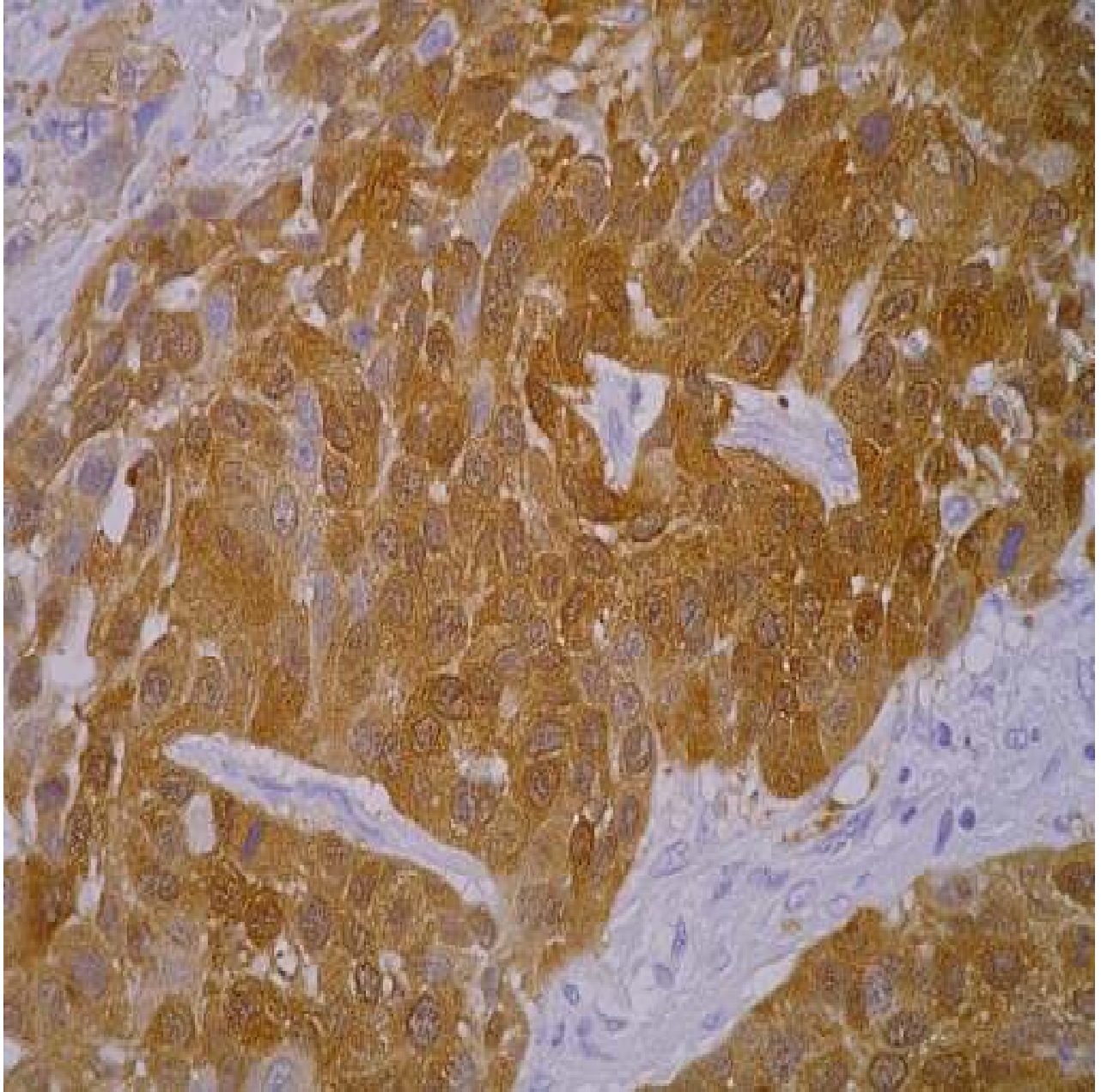
Izrazito jaka citoplazmatska reakcija na protein MAGE-A3/4 u primarnom karcinomu pločastih stanica jednjaka (IMH 100x)





Slika 2.

Izrazito jaka reakcija na protein MAGE-A3/4 u metastazi karcinoma pločastih stanica jednjaka u limfni čvor (IMH 100x)



Slika 3.

Vidljivo je jako citoplazmatsko obojenje na protein MAGE-A3/4 u metastazi karcinoma pločastih stanica jednjaka u limfni čvor (IMH 400x)

Rezultati imunohistokemijskom analizom određene izraženosti proteina NY-ESO-1 u primarnom karcinomu pločastih stanica jednaka sa i bez metastaza u limfne čvorove prikazani su u Tablici broj 4.

**Tablica 4. Izraženost proteina NY-ESO-1 u tumoru sa i bez metastaze (n=55)**

	<b>Jačina izraženosti proteina NY-ESO-1 (tm)</b>				<b>Ukupno</b>
	<b>0</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	
<b>Skupina s metastazama u limfni čvor</b>	0 (0,0%)	11 (40,7%)	8 (29,6%)	8 (29,6%)	<b>27</b> <b>(100,0%)</b>
<b>Skupina bez metastaza u limfni čvor</b>	2 (7,1%)	8 (28,6%)	8 (28,6%)	10 (35,7%)	<b>28</b> <b>(100,0%)</b>
<b>Ukupno unutar skupina</b>	<b>2 (3,7%)</b>	<b>19 (34,5%)</b>	<b>16 (29,1%)</b>	<b>18 (32,7%)</b>	<b>55</b> <b>(100,0%)</b>

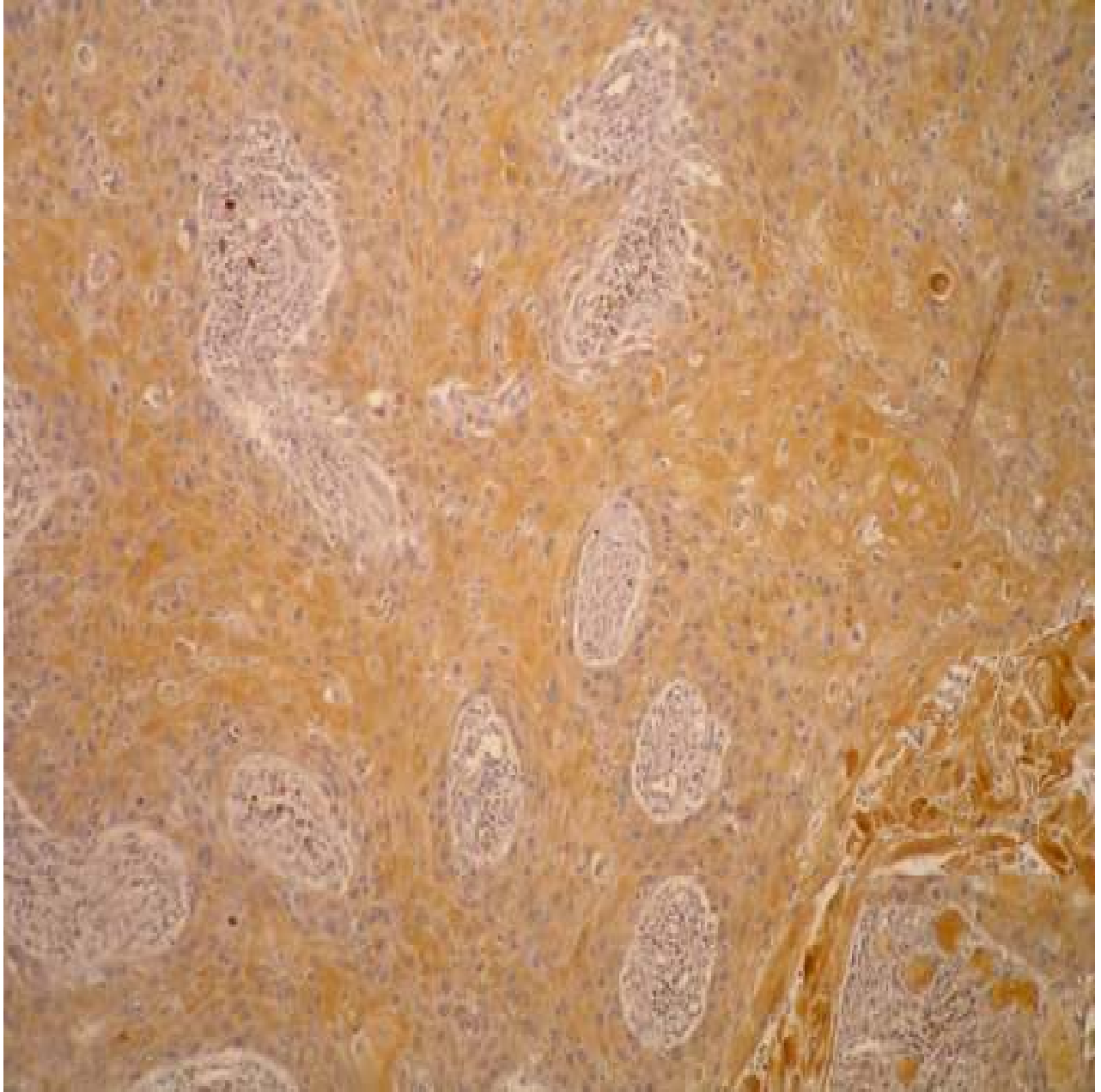
0–odsustvo reakcije

I–slabo izražena reakcija (IIB umnožak iznosi 1, 2 ili 3)

II–umjereno jaka reakcija (IIB umnožak iznosi 4 ili 6)

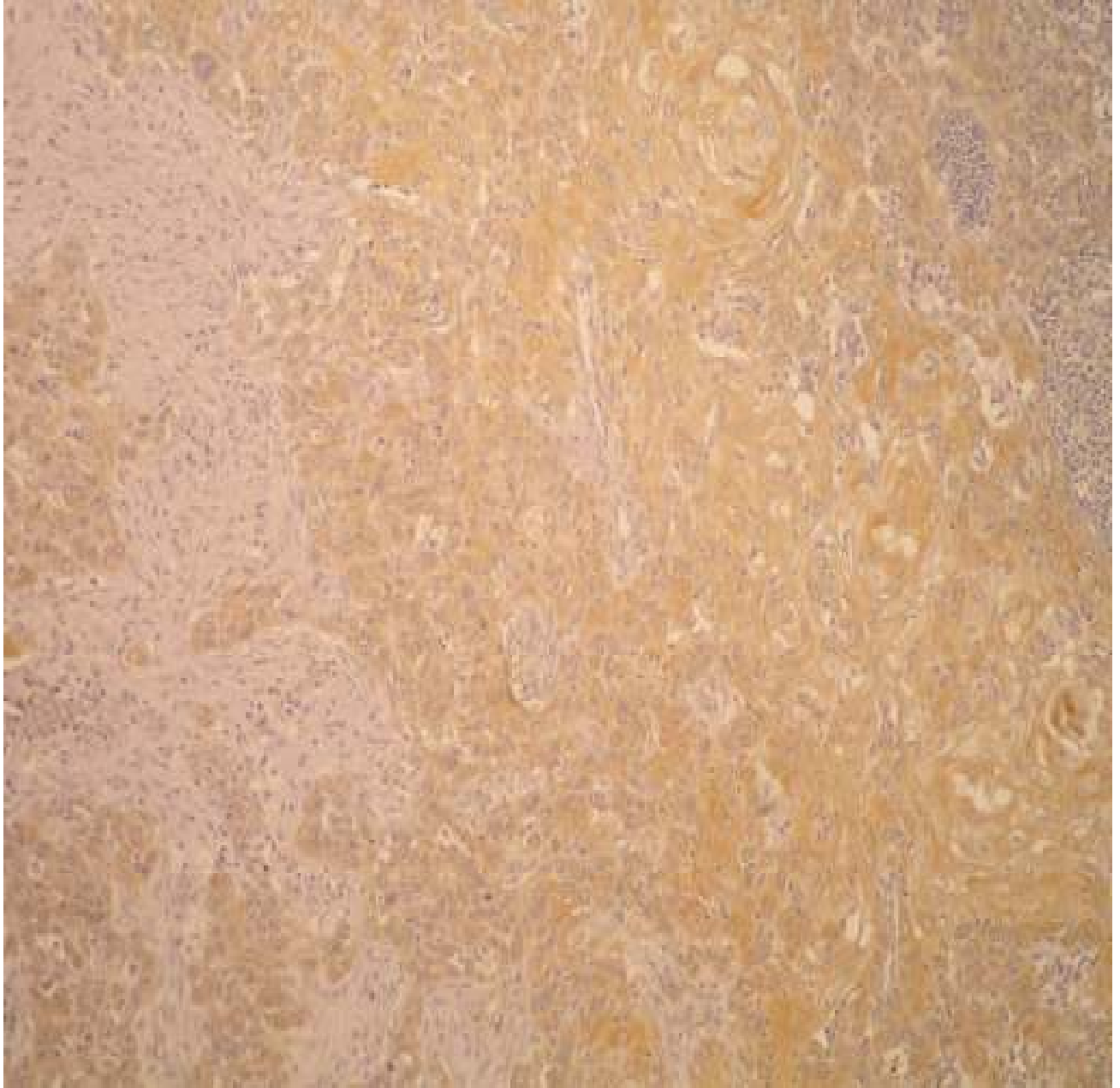
III–izrazito jaka reakcija (IIB umnožak iznosi 9)

Primjeri imunohistokemijske reakcije izrazite jakosti na protein NY-ESO-1, u tumoru i limfnom čvoru, prikazani su na slikama 4, 5 i 6.



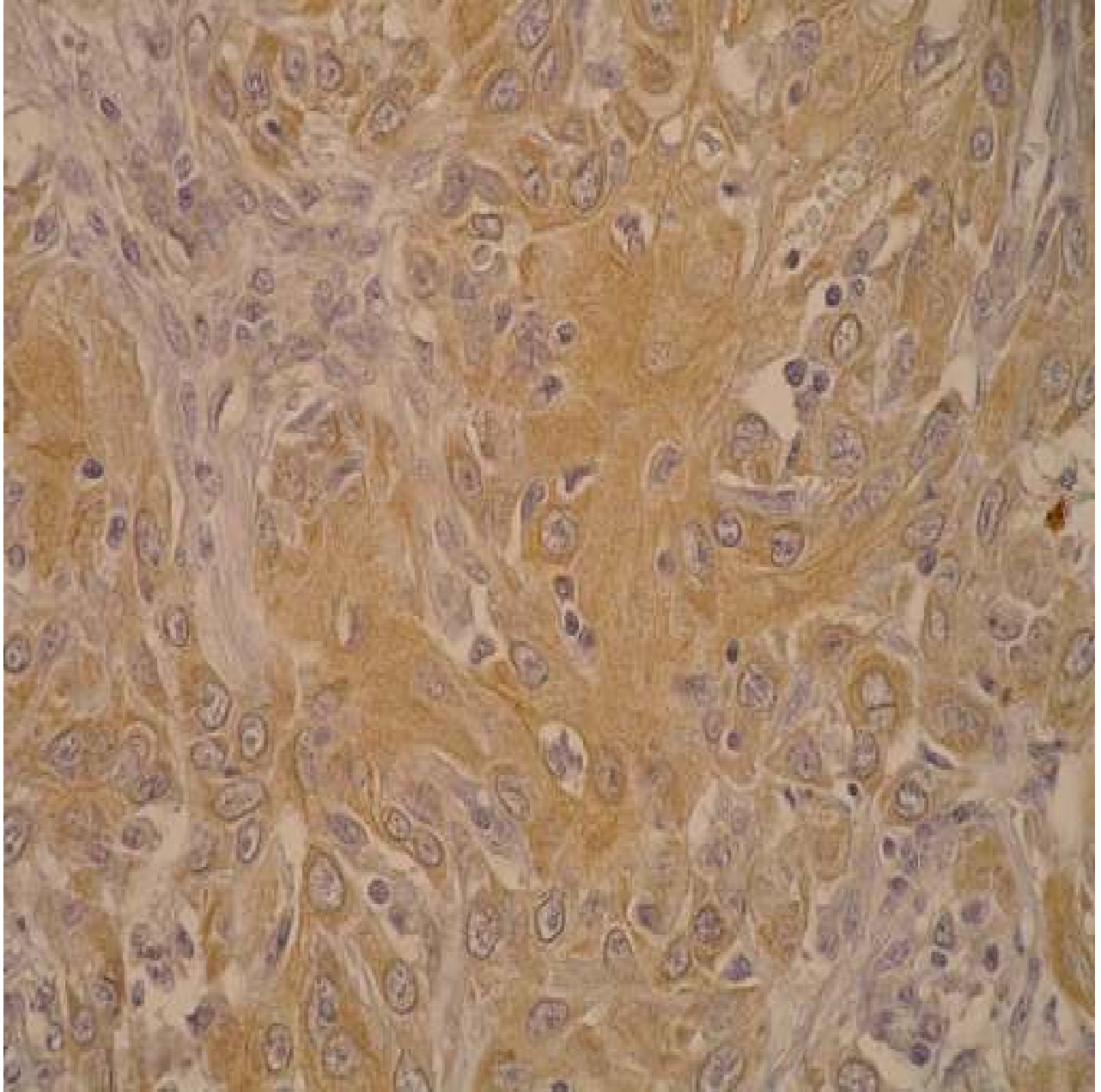
Slika 4.

Izrazito jaka citoplazmatska reakcija na protein NY-ESO-1 u primarnom karcinomu pločastih stanica jednjaka (IMH 100x)



Slika 5.

Izrazito jaka reakcija na protein NY-ESO-1 u metastazi karcinoma pločastih stanica jednjaka u limfni čvor (IMH 100x)



Slika 6.

Vidljivo je jako citoplazmatsko obojenje na protein NY-ESO-1 u metastazi karcinoma pločastih stanica jednjaka u limfni čvor (IMH 400x)

Rezultati imunohistokemijskom analizom određene izraženosti antigena MAGE-A3/4 u metastazi karcinoma pločastih stanica jednjaka u limfni čvor i u primarnom tumoru prikazani su u Tablici pod brojem 5.

**Tablica 5. Usporedba izraženosti proteina MAGE-A 3/4 u tumoru i u metastazi u limfnom čvoru (n=28)**

<b>Jačina izraženosti proteina MAGE-A 3/4</b>					
	<b>0</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>Ukupno</b>
<b>MAGE-A 3/4 (tumor)</b>	2 (7,1%)	5,(17,9%)	6 (21,4%)	15 (53,6%)	28 (100,0%)
<b>MAGE-A 3/4 (limfni čvor)</b>	0 (0,0%)	8 (28,6.%)	8 (28,6%)	12 (42,9%)	28 (100,0%)
<b>Ukupno</b>	2 (3,6%)	13 (23,2%)	14 (25,0%)	27 (48,2.7%)	

0–odsustvo reakcije

I–slabo izražena reakcija (IIB umnožak iznosi 1, 2 ili 3)

II-umjereno jaka reakcija (IIB umnožak iznosi 4 ili 6)

III–izrazito jaka reakcija (IIB umnožak iznosi 9)

Rezultati imunohistokemijskom analizom određene izraženosti proteina NY-ESO-1 u metastazi karcinoma pločastih stanica jednjaka u limfni čvor i u primarnom tumoru prikazani su u Tablici pod brojem 6.

**Tablica 6. Usporedba izraženosti proteina NY-ESO-1 u tumoru i u metastazi u limfnom čvoru (n=28)**

<b>Jačina izraženosti proteina NY-ESO-1</b>					
	0	I	II	III	Ukupno
<b>NY-ESO-1 (tumor)</b>	2 (7,1%)	8 (28,6%)	8 (28,6%)	10 (35,7%)	28 (100,0%)
<b>NY-ESO-1 (limfni čvor)</b>	2 (7,1%)	8 (28,6%)	13 (46,4%)	5 (17,9%)	28 (100,0%)
<b>Ukupno</b>	7 (7,1%)	16 (28,6%)	21 (37,5%)	15 (26,8%)	

0–odsustvo reakcije

I–slabo izražena reakcija (IIB umnožak iznosi 1, 2 ili 3)

II–umjereno jaka reakcija (IIB umnožak iznosi 4 ili 6)

III–izrazito jaka reakcija (IIB umnožak iznosi 9)



## 5.1. Statistička analiza rezultata

Podaci o dobi, spolu bolesnika te lokalizaciji, veličini, histološkom gradusu i proširenosti tumora (TNM klasifikacija) prikazani su tablici broj 2.

Statističkom analizom dobivenih rezultata za izraženost proteina MAGE-A3/4 u primarnom tumoru sa i bez metastaze u limfni čvor,  $\chi^2$  testom, (prikazano u tablici broj 3) te Pearsonovim testom korelacije i Spearmanovim faktorom korelacije (prikazano u tablicama broj 7 i 8) nisu utvrđene statistički značajne razlike ( $P=0,672$ ;  $r=1,00$ ;  $\rho=1,000$ ).

Statističkom analizom dobivenih rezultata za izraženost proteina NY-ESO-1 u primarnom tumoru sa i bez metastaze u limfni čvor,  $\chi^2$  testom, (prikazano u tablici broj 4) te Pearsonovim testom korelacije i Spearmanovim faktorom korelacije (prikazano u tablicama broj 7 i 8) nisu utvrđene statistički značajne razlike ( $P=0,444$ ;  $r=1,00$ ;  $\rho=1,000$ ).

Rezultati dobiveni statističkom analizom  $\chi^2$  testom (prikazano u tablici broj 5) Pearsonovim testom korelacije i Spearmanovim faktorom korelacije (prikazano u tablicama broj 7 i 8) nisu dali statistički značajnu razliku između izraženosti proteina MAGE-A3/4 u primarnom tumoru i u metastazi tog tumora u limfni čvor ( $P=0,46$ ;  $r=0,314$ ;  $\rho=0,365$ ).

Rezultati dobiveni statističkom analizom  $\chi^2$  testom (prikazano u tablici broj 6) nisu dali statistički značajnu razliku između izraženosti proteina NY-ESO-1 u primarnom tumoru i u metastazi tog tumora u limfni čvor ( $P=0,414$ ), dok je Pearsonov test korelacije i Spearmanov faktor korelacije (prikazano u tablicama broj 7 i 8) pokazao da izraženost navedenog proteina u tumoru pozitivno korelira s izraženosti istog u metastazi u limfnom čvoru. ( $r=0,605$ ;  $\rho=0,588$ ).

Statističkom obradom dobivenih podataka, obzirom na distribuciju (spol, dob, lokalizacija tumora, veličina tumora, histološki gradus i proširenost tumora-TNM) nisu

nađene statistički značajne razlike ni  $\chi^2$  testom, ni Pearsonovim testom korelacije, ni Spearmanovim faktorom korelacije:

A) Histološki gradus tumora: MAGE-A3/4, P=0,745, rho= - 0,009; NY-ESO-1, P=0,964, rho= - 0,007

B) Lokalizacija tumora: MAGE-A3/4 (tumor), P=0,341; MAGE-A3/4 (limfni čvor), P=0,448; NY-ESO-1 (tumor), P=0,852; NY-ESO-1 (limfni čvor), P=0,837

C) Veličina tumora: MAGE-A3/4 (tumor), P=0,267; MAGE-A3/4 (limfni čvor), P=0,112; NY-ESO-1 (tumor), P=0,345; NY-ESO-1 (limfni čvor), P=0,963

D) Dob bolesnika: MAGE-A3/4 (tumor), P=0,615, r= - 0,078, rho=0,017; MAGE-A3/4 (limfni čvor), P=0,281, r=0,242, rho=0,186; NY-ESO-1 (tumor), **P=0,004**, r= - **0,516**, rho= - **0.515**; NY-ESO-1 (limfni čvor), P=0,194, r= - 0,201, rho= - 0,226

E) T klasifikacija: MAGE-A3/4, P=0,899, rho= - 0,074; NY-ESO-1, P=0,279, rho=0,036

F) N klasifikacija: MAGE-A3/4, P=0,561; NY-ESO-1, P=0,701)

Od svih uspoređivanih podataka jedino je dob značajno negativno povezana s izraženosti proteina NY-ESO-1 u primarnom tumoru (<sup>prikazano u tablicama broj 7 i 8</sup>), mlađe osobe imaju jaču izraženost proteina NY-ESO-1 u tumoru (r= - 0,516; rho= - 0,515).

Statistička analiza istih podataka  $\chi^2$  test potvrdila je statističku značajnu povezanost izraženosti proteina NY-ESO-1 u tumoru i dobi bolesnika (P=0,004).

Statističkom analizom podataka Pearsonovim testom korelacije (<sup>prikazano u tablici broj 7</sup>) nađena je pozitivna korelacija izraženosti proteina MAGE-A 3/4 i NY-ESO-1 u primarnom tumoru (r=0,310).

U tablici broj 7 prikazan je korelacijski međuodnos, izraženosti oba proteina i dobi bolesnika (Pearsonov test korelacije, r).

**Tablica 7. Pearsonov test korelacije**

	MAGE-A 3/4 (tumor)	MAGE-A 3/4 (l.č.)	NY-ESO-1 (tumor)	NY-ESO-1 (l.č.)	DOB
MAGE-A 3/4 (tumor) Ukupan broj	1 55	0,314 0,104 28	<b>0,310*</b> 0,021 55	0,243 0,214 28	-0,078 0,571 55
MAGE-A 3/4 (l.č.) Ukupan broj	0,314 0,104 28	1 28	-0,121 0,539 28	-0,103 0,600 28	0,242 0,214 28
NY-ESO-1 (tumor) Ukupan broj	<b>0,310*</b> 0,021 55	-0,121 0,539 28	1 55	<b>0,605**</b> 0,001 28	<b>-0,516**</b> 0,000 55
NY-ESO-1 (l.č.) Ukupan broj	0,243 0,214 28	-0,103 0,600 28	<b>0,605**</b> 0,001 28	1 28	-0,201 0,305 28
DOB Ukupan broj	-0,708 0,571 55	0,242 0,214 28	<b>-0,516**</b> 0,000 55	-0,201 0,305 28	1 55

Korelacija je značajna uz r vrijednost od 0,05 (2-tailed)\*

Korelacija je značajna uz r vrijednost od 0,01 (2-tailed)\*\*

U tablici broj 8 prikazan je korelacijski međuodnos, obzirom na distribuciju dobivenih podataka (spol, dob, histološki gradus i proširenost tumora (TNM klasifikacija)).

**Tablica 8. Spearmanov faktor korelacije, rho**

<b>Spearman's rho</b>	NY-ESO-1 (tumor)	NY-ESO-1 (l.č.)	MAGE-A 3/4 (tumor)	MAGE-A 3/4 (l.č.)	Dob	Spol	Gradus	T
NY-ESO-1 (tumor) Ukupan broj	1,000 55	<b>0,588**</b> 0,001 28	0,186 0,175 55	-0,021 0,917 28	- <b>0,515**</b> 0,000 55	-0,118 0,390 55	0,007 0,962 55	0,036 0,796 55
NY-ESO-1 (l.č.) Ukupan broj	<b>0,588**</b> 0,001 28	1,000 55	-0,005 0,978 28	-0,288 0,137 28	-0,226 0,248 28	-0,291 0,133 28	-0,128 0,515 28	0,178 0,365 28
MAGE-A 3/4 (tumor) Ukupan broj	0,186 0,175 55	-0,005 0,978 28	1,000 55	0,365 0,056 28	0,017 0,904 55	0,093 0,499 55	-0,009 0,945 55	-0,074 0,589 55
MAGE-A 3/4 (l.č.) Ukupan broj	-0,021 0,917 28	-0,288 0,137 28	0,365 0,056 28	1,000 28	0,186 0,342 28	0,258 0,185 28	0,306 0,113 28	0,023 0,907 28
Dob Ukupan broj	<b>-0,515**</b> 0,000 55	-0,226 0,248 28	0,017 0,904 55	0,186 0,342 28	1,000 55	-0,080 0,563 55	0,078 0,569 55	-0,012 0,932 55
Spol Ukupan broj	0,118 0,390 55	-0,291 0,133 28	0,093 0,499 55	0,258 0,185 28	-0,080 0,563 55	1,000 55	<b>-0,276*</b> 0,041 55	-0,085 0,535 55
Gradus Ukupan broj	0,007 0,962 55	-0,128 0,515 28	-0,009 0,945 55	0,306 0,113 28	0,078 0,569 55	<b>-0,276*</b> 0,041 55	1,000 55	0,121 0,377 55
T Ukupan broj	0,036 0,796 55	0,178 0,365 28	0,074 0,589 55	0,023 0,907 28	-0,012 0,932 55	-0,085 0,535 55	0,121 0,377 55	1,000 55

Korelacija je značajna uz r vrijednost od 0,01 (2-tailed)\*\*

Korelacija je značajna uz r vrijednost od 0,05 (2-tailed)\*

## 6. RASPRAVA

Novija istraživanja ukazuju na značaj izraženosti karcinom/testis tumoru pridruženih antigena, C/T TAA u različitim karcinomima, pa tako i u karcinomu pločastih stanica jednaka kao potencijalno mogućeg čimbenika u imunoterapiji i antitumorskoj vakcinaciji.<sup>210,211</sup>

Dokazana je uloga demetilacije u ekspresiji C/T TAA. Transkripcija ovih antigena nastaje nakon demetilacije njihova promotora, a to se događa u muškim spolnim stanicama i često kod karcinoma.<sup>228,229</sup> Postoje određene sličnosti između gameta i tumorskih stanica kao što su besmrtnost, invazivnost, gubitak adhezije, angiogeneza, demetilacija, te smanjenje ili gubitak ekspresije MHC molekula.<sup>230</sup> Neki autori ukazuju na izraženiju ekspresiju C/T TAA u metastatskoj leziji od one u primarnom tumoru, kao što postoji i izraženija razina demetilacije gena u metastatskoj u odnosu na primarnu bolest.<sup>231</sup> Upotreba demetilirajućih agensa kao što je 5-azo-2-deoksicitidin (5DC) može inducirati ekspresiju antigena MAGE i drugih tumorskih antigena u kulturama stanica različitih tumora i na taj način potaknuti prepoznavanje od strane citotoksičnih limfocita, no taj agens ne može potaknuti ekspresiju istih u normalnim stanicama.<sup>178,197,232,233</sup>

Za određivanje izraženosti ovih antigena uglavnom se koristi metoda lančane reakcije polimeraze (engl. reverse transcriptase-polymerase chain reaction-RT-PCR). Podaci dobiveni tom metodom ne omogućavaju kvantifikaciju karcinomskih stanica koje su C/T TAA pozitivne, a takvi su podaci važni za potencijalne imunoterapijske kliničke studije.<sup>170</sup> Tako bi imunizacija na C/T TAA koji su izraženi u manjem postotku imala manji terapijski odgovor.

Prednosti imunohistokemijske metode su jednostavnost i niža cijena, te mogućnost uporabe na parafinskom arhivskom tumorskom materijalu.

Pokazano je da su rezultati dobiveni imunohistokemijskom metodom u korelaciji s mRNA ekspresijom istih antigena.<sup>175,178,234</sup> Neki autori su pokazali da tumori kod kojih je ekspresija ovih antigena bila negativna metodom PT-PCR, imaju pozitivnu reakciju imunohistokemijskom metodom.<sup>235</sup>

U ovom se istraživanju, imunohistokemijskom metodom odredila izraženost proteina MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 u primarnom karcinomu pločastih stanica jednjaka, te u metastazama u limfni čvor.

Uspoređivana je izraženost navedenih proteina u primarnom tumoru sa i bez metastaza, te izraženost proteina u metastazama i primarnom tumoru.

U isto vrijeme određivala se i njihova povezanost s histološkim stupnjem, stadijem proširenosti (TNM klasifikacija), smještajem tumora u jednjaku te veličinom tumora, dobi i spolom bolesnika.

U dosadašnjim istraživanjima nije određivana i uspoređivana jačina izraženosti proteina MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 istodobno u primarnom karcinomu pločastih stanica jednjaka i u njegovoj metastazi u limfne čvorove i nije utvrđeno postoji li veza između njihove izraženosti u primarnom tumoru i metastazi.

Rezultati izraženosti antigena MAGE-A 3/4 u ovom istraživanju u uzorcima karcinoma pločastih stanica jednjaka bili su: 5 (9,1%) karcinoma nije pokazivalo izraženost antigena, 50 (90,1%) je pozitivnih tumora, od čega je 7 (12,7%) sa slabo izraženom reakcijom, 13 (23,6%) s umjereno jako izraženom reakcijom i 30 (54,5%) s jako izraženom reakcijom.

Određivanje izraženosti istog proteina u metastazi unutar limfnog čvora pokazalo je da 8 (28,6%) metastaza karcinoma u limfne čvorove ima slabo izraženu

reakciju, 8 (28,6%) umjereno jako izraženu reakciju i 12 (42,9%) jako izraženu reakciju ispitivanog proteina.

Veliki postotak primarnog tumora (90,1%) i metastaza u limfni čvor (100%) pokazivao je izraženost proteina MAGE-A3/4, no nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji antigena MAGE-A3/4 u tumoru bez metastaza u odnosu na tumore s metastazom ( $P=0,672$ ).

Rezultati izraženosti proteina NY-ESO-1 u uzorcima karcinoma pločastih stanica jednaka bili su: 2 (3,6%) karcinoma nije pokazivalo izraženost proteina, 53 (96,4%) je pozitivnih tumora, od čega je 19 (34,5%) sa slabo izraženom reakcijom, 16 (29,1%) s umjereno jako izraženom reakcijom i 18 (32,7%) s jako izraženom reakcijom.

Istovremeno određivana izraženost istog proteina u metastazama unutar limfnog čvora pokazalo je da: 2 (7,1%) metastaza karcinoma u limfne čvorove nema izraženost proteina, dok je 8 (28,6%) pokazalo slabo izraženu reakciju, 13 (46,4%) umjereno jako izraženu reakciju i 5 (17,9%) jako izraženu reakciju.

Isto kao i kod izraženosti proteina MAGE-A3/4 veliki postotak primarnog tumora (96,4%) i metastaza u limfne čvorove (92,9%) pokazivao je izraženost proteina NY-ESO-1, no nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji ispitivanog proteina u tumoru bez metastaza u odnosu na tumore s metastazom ( $P=0,444$ ).

Statističkom obradom dobivenih rezultata, Pearsonovim testom korelacije nađeno je da ekspresija proteina MAGE-A3/4 pozitivno korelira s ekspresijom proteina NY-ESO-1 u tumoru ( $r=0,310$ ).

Rezultati izraženosti proteina MAGE-A3/4 u uzorcima karcinoma pločastih stanica jednaka ovog istraživanja (90,1% pozitivnih stanica) slični su podacima iz

literature, gdje se izraženost proteina MAGE-A u pločastom karcinomu jednjaka kreće od 50%,<sup>181</sup> 67%,<sup>182</sup> do 72%.<sup>183</sup>

Učestalost ekspresije mRNA i imunohistokemijskom metodom određene izraženosti proteina NY-ESO-1 je različita ovisno o vrsti tumora i za solidne tumore ona se kreće od 20 do 40% uzoraka, gdje postotak izraženosti varira od 17%,<sup>221</sup> 84,8%,<sup>198</sup> do 97%.<sup>190</sup>

U brojim istraživanjima izraženosti jednog ili oba proteina dobiveni su slični rezultati koji se podudaraju s rezultatima ovog istraživanja.

Tako je u radu Haiera i sur.<sup>181</sup> nađena izraženost antigena MAGE-A u 50% karcinoma pločastih stanica jednjaka, u radu Figueiredoa i sur.<sup>186</sup> nađen je postotak od 50 do 100% pločastih karcinoma glave i vrata, ovisno o stadiju bolesti. Quillien i sur.<sup>183</sup> su utvrdili da više od 70% pločastih karcinoma jednjaka daje pozitivnu imunoreakciju na antigene skupine MAGE.

U istraživanjima Hudolina i sur.<sup>190</sup> dokazana je izraženost antigena MAGE-A skupine i antigena NY-ESO-1 podjednako u 97% pločastih karcinoma penisa i slično velik postotak, 85,9% za MAGE-A i 84,8 za NY-ESO-1 u karcinomu prostate. Istraživanjem mRNA MAGE-A1, -A2, -A3 i -A4 nađena je ekspresija istraživane mRNA u 16%, 41%, 36% i 115% primarnih i 48%, 70% ,76% i 22% metastatskih melanoma.<sup>236</sup>

U istraživanju Bandića i sur.<sup>198</sup> nađena je povezanost izraženosti antigena MAGE-A4 i antigena NY-ESO-1 sa statističkom značajnosti od  $P=0,006$ , što odgovara rezultatima u vlastitom istraživanju, gdje je statističkom analizom s Pearsonovim testom korelacije, nađena statistički značajna povezanost izraženosti proteina MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 u tumoru ( $r=0,310$ ).



Neka istraživanja nisu pokazala podjednaku izraženost navedenih antigena, što je vidljivo u radu Kienstra i sur.<sup>200</sup> u kome je izraženost antigena MAGE-A3 nađena u 40% karcinoma područja glave i vrata, dok je samo 1 od 45 tumora pokazao izraženost antigena NY-ESO-1.

U vlastitom istraživanju utvrđeno je da izraženost proteina NY-ESO-1 u tumoru pozitivno korelira s izraženosti istog protein u metastazi u limfnom čvoru: Pearsonov test korelacije ( $r=0,605$ ), Spearmanov faktor korelacije ( $\rho=0,588$ ), što bi se moglo iskoristiti kao povoljan podatak u procjeni uspješnosti potencijalne terapije.

Do sada nije bilo istraživanja koje bi određivalo jakost izraženosti istog proteina u primarnom tumoru karcinoma pločastih stanica jednjaka i u metastazi u limfni čvor. Samo je Figueiredo i sur.<sup>186</sup> određivao metodom RT-PCR izraženost antigena MAGE-A i NY-ESO-1 u pločastom karcinomu područja glave i vrata i u njihovim metastazama u limfni čvor.

Provedena su samo istraživanja u kojima se određivala izraženost pojedinog antigena obzirom na stadij i proširenost bolesti.<sup>181,182,196,197</sup>

Izraženost proteina MAGE-A 3/4 i NY-ESO-1 u tumoru i u metastazama karcinoma u limfne čvorove u ovom istraživanju izraženi su u različitim frekvencijama i intenzitetom, no oba proteina su u većini uzoraka (osim u 2 slučaja za antigen NY-ESO-1) pozitivna u metastazama u limfne čvorove.

Takvi rezultati ukazuju na mogućnost primjene potencijalne imunoterapije tumora i bez i s metastaza s peptidima MAGE-A3/4 i proteinom NY-ESO-1 zbog vidljive izraženosti oba proteina, kako u tumoru, tako i u metastazama, što ukazuje na jasan imunološki odgovor. Zbog toga bi imunoterapija bila pogodna i za karcinome u početnom stadiju, kao i za one u uznapredovalom stadiju bolesti.

U ovom istraživanju izraženost oba proteina nije korelirala s progresijom bolesti (histološki stupanj, TNM klasifikacija), smještajem tj. lokalizacijom tumora u jednjaku, veličinom tumora niti spolom bolesnika.

Nađeno je da je dob značajno negativno povezana s reakcijom na proteinn NY-ESO-1 u tumoru: Pearsonov test korelacije ( $r = -0,516$ ), Spearmanov faktor korelacije ( $\rho = -0,515$ ),  $\chi^2$  test ( $P=0,001$ ), što znači da mlađe osobe imaju jaču ekspresiju proteina NY-ESO-1 u tumoru.

Ovakvi rezultati mogli bi ponajprije ukazivati na bolji imunološki odgovor organizma na općeniti rast malignih tumora u mlađoj životnoj dobi, te se iskoristiti u potencijalnoj terapiji tumora sa i bez metastaza gdje bi se na osnovi izraženosti proteina NY-ESO-1 moglo u početnom stadiju terapije približno procijeniti odgovor na terapiju i pri tome i bolje preživljenje. Dobiveni rezultati ukazuju da bi se imunoterapija mogla podjednako primjenjivati u skupini bolesnika u dobi do 55 godina bez obzira na radi li se od primarnom tumoru sa metastazama ili bez metastaza, budući da ekspresija proteina NY-ESO-1 u tumoru pozitivno korelira s ekspresijom istog proteina u metastazama u regionalne limfne čvorove.

U nekim istraživanjima izraženost proteina povećavala se s većim gradusom tumora, primjerice kod karcinoma dojke<sup>197</sup> i pluća,<sup>201</sup> odnosno s povećanjem stadija bolesti,<sup>237</sup> što nije bio slučaj u našem istraživanju.

U radu Fujite i sur.<sup>168</sup> nađena je veća izraženost antigena NY-ESO-1 putem PCR metode u bolje histološki diferenciranih karcinoma pločastih stanica jednjaka.

U drugim istraživanjima izraženosti antigena MAGE-A mRNA u pločastom karcinomu jednjaka nije dokazana statistička značajnost u usporedbi izraženosti obzirom na histološki stupanj tumora, TNM klasifikaciju, odnosno progresiju bolesti kao i ovom istraživanju. U istraživanju Akcakanata i sur.<sup>210</sup> nije nađena povezanost

izraženosti antigena MAGE-a skupine i antigena NY-ESO-1 s progresijom bolesti ni TNM stadijem, kao i u istraživanju Haiera i sur.<sup>181</sup> te Bandića i sur.<sup>198</sup> što odgovara dobivenim rezultatima ovog istraživanja.

U svim provedenim istraživanjima izraženost oba proteina je smještena u citoplazmi tumorskih stanica,<sup>200,206,238</sup> kao što je to slučaj i u ovom istraživanju. Stanice zdravog tkiva jednjaka koje nije zahvaćeno tumorom nisu pokazivale izraženost proteina.

Najvjerojatnije, zbog prikazivanja vrijednosti izraženosti istraživanih proteina u tri veličine kao i zbog manje osjetljivosti statističkih testova za kvalitativne podatke (ekspresija antigena) od osjetljivosti statističkih testova za kvantitativne podatke na relativno malom uzorku u našem istraživanju nema statističke značajnosti. Tako  $\chi^2$  test nije pokazao statističku značajnost u izraženosti proteina MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 u tumoru sa i bez metastaza u limfni čvor, kao ni statistički značajnu povezanost proteina međusobno, tek Pearsonovim testom korelacije dobivena je statistička značajna povezanost od  $r=0,310$ , između izraženosti tih dvaju proteina.

U raznim studijama pokušano je stvoriti djelotvornu vakcinaciju s proteinima MAGE-A skupine i NY-ESO-1. Jedno od istraživanja navodi da su bolesnici i njihov imunološki odgovor sposobni stvoriti T limfocite koji spontano djeluju protiv TAA, no još uvijek se ne zna samo djelovanje tih T limfocita in vivo.<sup>225</sup> Postoje T limfociti s velikom potražnjom i produktivnošću prema C/T TAA i T limfociti gdje je ona vrlo niska. Tako je velik broj T stanica s visokom produktivnošću na antigene NY-ESO-1, a nastaju vakcinacijom peptida istog antigena i mogu se prikazati, no isto tako je velik broj T limfocita gdje je ta sposobnost niska. Iz toga slijedi da specifični T stanični odgovor može biti aktiviran i pojačan s tumorskom vakcinacijom ili adaptivnom T staničnom terapijom.<sup>215,222,225</sup> Većina T staničnog odgovora bila je u bolesnika s

uznapredovalom bolesti.<sup>178</sup> Postoji i nekoliko studija koje prikazuju uspješnu indukciju HLA klase I antitumorski citotoksičnih T limfocita koristeći MAGE peptide, poglavito kod melanoma.<sup>167</sup> Slične studije rađene su i za gastrointestinalne karcinome. Korištene su dendritičke stanice koje su stvorene in vivo i pulsirane su s peptidima MAGE.<sup>222</sup> Bolesnici s uznapredovalim karcinomom želuca, jednjaka i debelog crijeva imunizirani su s takvim stanicama svaka 3 tjedana četiri puta. Citotoksični T limfocitni imuni odgovor bio je vidljiv u 4 od osam bolesnika, a koji su ujedno imali i poboljšanje općeg stanja.<sup>222</sup>

Izuzetno je važno da imuni odgovor na protein NY-ESO nije samo celularnog tipa već se stvaraju i antitijela u serumu, pa nastaje humoralni tip imunoreackije,<sup>239</sup> što postavlja bolji temelj imunoterapiji karcinoma pločastih stanica jednjaka.

Vlastitim istraživanjem pokazana je visoka razina izraženosti za oba proteina u oko 90% ispitivanih uzoraka primarnih karcinoma, kao i u metastazama istog tumora u limfne čvorove, pa je time postavljena osnova za moguću primjenu imunoterapije.

Posebno je važno još jednom istaknuti da je u skupini bolesnika mlađih od 55 godina nađena statistička značajnost u korelaciji između izraženosti proteina NY-ESO-1 u tumoru i dobi bolesnika pa bi ti bolesnici mogli biti izuzetno pogodni za imunoterapiju.

## 7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja možemo zaključiti:

1. Proteini MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 izraženi su u većini primarnih karcinoma pločastih stanica jednaka i njihovim metastazama u limfne čvorove.

Statističkom analizom dobivenih rezultata za izraženost proteina MAGE-A3/4 u tumoru sa i bez metastaze u limfni čvor,  $\chi^2$  testom, Pearsonovim testom korelacije i Spearmanovim faktorom korelacije nisu utvrđene statistički značajne razlike ( $P=0,672$ ;  $r=1,00$ ;  $\rho=1,000$ ).

Statističkom analizom dobivenih rezultata za izraženost proteina NY-ESO-1 u tumoru sa i bez metastaze u limfni čvor,  $\chi^2$  testom, Pearsonovim testom korelacije i Spearmanovim faktorom korelacije nisu utvrđene statistički značajne razlike ( $P=0,444$ ;  $r=1,00$ ;  $\rho=1,000$ ).

Statističkom analizom podataka Pearsonovim testom korelacije nađena je pozitivna korelacija izraženosti proteina MAGE-A 3/4 i NY-ESO-1 u tumoru ( $r=0,310$ ).

2. Rezultati dobiveni statističkom analizom  $\chi^2$  testom, Pearsonovim testom korelacije i Spearmanovim faktorom korelacije nisu dali statistički značajnu razliku između izraženosti proteina MAGE-A3/4 u primarnom tumoru i u metastazi u limfnom čvoru ( $P=0,346$ ;  $r=0,314$ ;  $\rho=0,365$ ).

Rezultati dobiveni statističkom analizom  $\chi^2$  testom nisu dali statistički značajnu razliku između izraženosti proteina NY-ESO-1 u primarnom tumoru i u metastazi u limfnom čvoru ( $P=0,414$ ), dok je Pearsonov test korelacije i Spearmanovim faktorom

korelacije pokazao da izraženost navedenog proteina u tumoru pozitivno korelira s izraženosti istog u metastazi u limfni čvor. ( $r=0,605$ ;  $\rho=0,588$ ).

3. Statističkom obradom dobivenih podataka, obzirom na distribuciju (spol, dob, lokalizacija tumora, veličina tumora, histološki gradus i proširenost tumora-TNM) nisu nađene statistički značajne razlike ni  $\chi^2$  testom ni, Pearsonovim testom korelacije ni Spearmanovim faktorom korelacije.

Od svih uspoređivanih podataka jedino je dob statistički značajno negativno povezana s izraženosti proteina NY-ESO-1 u primarnom tumoru, mlađe osobe imaju jaču reakciju odnosno izraženost proteina NY-ESO-1 u tumoru ( $r= - 0,516$ ;  $\rho= - 0,5151$ ).

Statistička analiza istih podataka  $\chi^2$  test potvrdila je statističku značajnu povezanost izraženosti proteina NY-ESO-1 u tumoru i dobi bolesnika ( $P=0,004$ ).

4. Dobiveni rezultati pokazuju da bi skupina bolesnika mlađa od 55 godina bila izuzetno pogodna za imunoterapiju karcinoma pločastih stanica jednjaka. Ovakvi rezultati mogli bi se ponajprije protumačiti boljim imunološkim odgovorom organizma na općeniti rast malignih tumora u mlađoj životnoj dobi, te se iskoristiti u potencijalnoj terapiji tumora sa i bez metastaza gdje bi se na osnovi ekspresije proteina NY-ESO-1 moglo u početnom stadiju terapije približno procijeniti odgovor na terapiju i pri tome i bolje preživljenje.

## 8. SAŽETAK

Karcinom pločastih stanica najčešći je zloćudni tumor jednjaka i čini oko 6% svih zloćudnih novotvorevina probavnog trakta, međutim ima vrlo nepovoljnu prognozu i visoki postotak smrtnosti, a petogodišnje preživljenje je manje od 10%. Češći je u muškaraca, javlja se u prosječnoj dobi oko 65-te godine života. U većem dijelu svijeta incidencija se kreće od 2,5 do 5 na 100 000 kod muškaraca te 1,5 do 2,5 kod žena. Postoji niz čimbenika rizika od kojih su najvažniji konzumiranje alkohola, pušenje cigareta, urođene greške (ahalazija), autosomno dominantne nasljedne bolesti (Tylosis palmaris), Plummer-Vinsonov sindrom, netropska sprue, strikture koje nastaju nakon ingestije lužina i kiselina, nedostatak vitamina, prethodno zračenje tog područja te u rizičnim područjima hrana koja je bogata nitritima i nitrozaminima, humani papiloma virus (HPV). Klinički simptomi karcinoma jednjaka se u 50 do 70% slučajeva javljaju tek u uznapredovaloj fazi bolesti, a najčešći su: disfagija (poteškoće gutanja), tupi bol u prsištu koja se širi prema kralježnici, gubitak težine i opća slabost.

Kako je terapija (kirurška, zračenje, kemoterapija i endoskopske metode) do sada pokazala prilično loše i porazne rezultate, traži se u brojnim istraživanjima nova metoda liječenja.

Tumorskim antigenom može se smatrati bilo koja molekula iz tumorske stanice koju imunološki sustav prepoznaje kao stranu, odnosno na koju može nastati protutumorska imunološka reakcija. Tumoru pridruženi antigeni, tzv. (Tumor Associated Antigens-TAA), su specifični antigeni koje prepoznaju citotoksični T limfociti u okviru glavnog sustava gena tkivne snošljivosti (Major Human Leukocyte Antigens-HLA) tipa I. Najznačajniji među njima su antigeni koji čine tzv. „melanoma-

associated antigens“ (MAGE) i antigen NY-ESO-1. Otkriće tih antigena dalo je novi zamah u pokušaju imunoterapije tumora.

U ovom istraživanju imunohistokemijskom metodom analizirana je izraženost proteina MAGE-3/4 i NY-ESO-1 u uzorcima karcinoma pločastih stanica jednjaka i u njihovim metastazama u limfni čvor kod 55 bolesnika, kako bi se ustanovilo postoji li povezanost izraženosti tih proteina u tumoru s metastazom u limfni čvor i bez metastaze, kako bi se ustanovilo postoji li povezanost izraženosti pojedinog proteina u primarnom tumoru i u metastazi u limfnom čvoru, te kako bi se ustanovilo postoji li povezanost izraženosti svakog od proteina s histološkim gradusom tumora, TNM klasifikacijom, lokalizacijom tumora, veličinom, te dobi i spolom bolesnika.

Dokazana je izraženost proteina MAGE-A3/4 u 90,1% karcinoma i u 100% metastaza u limfne čvorove, proteina NY-ESO-1 u 96,4 karcinoma i 92,9 % metastaza. Pozitivna reakcija je nađena samo u citoplazmi tumorskih stanica. Ustanovljeno je da izraženost proteina MAGE-A3/4 pozitivno korelira s izraženosti NY-ESO-1 u istom tumor (Pearsonov test korelacije  $r=0,310$ ), da izraženost proteina NY-ESO-1 u tumoru pozitivno korelira s izraženosti istog u metastazi u limfnom čvoru (Pearsonov koeficijent korelacije  $r=0,605$ , Spearmanov faktor korelacije,  $\rho=0,588$ ). Ustanovljeno je da dob negativno korelira s izraženosti proteina NY-ESO-1 u tumoru ( $\chi^2$  test  $P=0,001$ , Pearsonov test korelacije  $r= - 0,516$ , Spearmanov faktor korelacije,  $\rho= - 0,515$ ).

U tijeku su istraživanja imunoterapije vakcinacijom kod bolesnika s melanomom, koji imaju ekspresiju tumorskih antigena, no isto tako napravljeni su i prvi koraci u pokušaju imunoterapije karcinoma pločastih stanica jednjaka. Zbog visoke izraženosti proteina MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 u oko 90 % uzoraka karcinoma jednjaka, postavljena je osnova za moguću primjenu imunoterapije.



## 9. SUMMARY

Squamous cell cancer is the most recent malignant esophageal cancer and makes up approximately 6% of all malignant cancers of gastrointestinal system, however it has a highly unfavorable prognosis and five year survival rate is less than 10%. As the therapy (surgery, radiotherapy, chemotherapy) up till now has given poor and actually overwhelming results, numerous researches are under way with the scope of detecting new methods of treatment. Antigens associated to tumour, so called tumour associated antigens-TAA, are specific antigens able to recognize cytotoxic T lymphocyte within the main system of the gene tissue tolerance (Major Human Leukocyte Antigens-HLA) type I. The most important among antigens are „melanoma-associated antigens“(MAGE) and antigen NY-ESO-1 which discovery gave necessary momentum to the attempts of applying immunotherapy.

In this study immunohistochemical method was used for analyzing the expression of the tumour antigens MAGE-3/4 and NY-ESO-1 in the samples of esophageal squamous cells cancer and their spreading to the lymph nodes, in order to determine the link between expression of individual antigens in primary lesion and in spreading to the lymph node, and compare the expression link of each antigen with hystological tumour grade, TNM classification, site and size of tumour, age and sex of the patient. It has been established that the antigen MAGE-A3/4 expression positively correlates with NY-ESO-1 expression in the same tumour ( $r=0.310$ ), and antigen NY-ESO-1 expression positively correlates with the same in lymph node metastases ( $r=0.605$ ,  $\rho= 0.588$ ). Finally it has been established that the only parameter displaying serious statistic importance in comparison to the antigen NY-ESO-1 expression is the age of a patient, negatively correlating with antigen expression in tumour ( $P=0.001$ ,  $r= - 0.516$ ,  $\rho= - 0.515$ ).

## 10. LITERATURA

1. Rosai J. Ackerman's Surgical pathology. 9 izd. St.Louis: Moesby, 2004;615-48.
2. Stanley RH, Aaltonen LA. Tumors of the digestive system, World health organization classification of tumors. Lyon: IARC Press, 2000;11-20.
3. Moskaluk C. Gastrointestinal tract. U: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weis LM. (ur.) Modern surgical pathology. 1 izd. Philadelphia: Elsevier science, 2003;636-42.
4. Gickman JN, Odze RD. Epithelial neoplasm of esophagus. U: Odze RD, Oldblum JR, Crawford JM. (ur.) Surgical pathology of gastrointestinal tract. liver, biliary tract and pancreas. 1 izd. Philadelphia: Elsevier science, 2004;386-96.
5. Pulanić R. Tumori jednjaka. U: Vucelić B i sur. (ur.) Gastroenterologija i hepatologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2002;425-442.
6. Strnad M (ur.) Cancer incidence in Croatia 2005. U: National Cancer Registry. Bulletin No.30. Zagreb: Croatian National Institute of Public Health, 2007.
7. Franceschi S, Bidoli E, Negri E, Barbone F, La-vecchia C. Alcohol and cancers of the upper aero digestive tract in men and women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994;3:299-394.
8. Launoy G, Milan CH, Faivre J, Pienkowski P, Milan CI, Gignoux M. Alcohol, tobacco and oesophageal cancer, effects of the duration of consumption, mean intake and current and former consumption. Br J Cancer 1997;75:1389-96.

9. Pandeya N, Williams G, Green AC, Webb PM, Whiteman DC. Alcohol consumption and the risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Gastroenterology* 2008;136:1215-24.
10. Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D i sur. Evidence for an important role of alcohol-and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aero digestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:696-703.
11. Sugimachi K, Sumiyoshi K, Nozoe T i sur. Carcinogenesis and histogenesis of esophageal carcinoma. *Cancer* 1995;75:1440-45.
12. Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T i sur. Alcohol-related cancers and aldehyde deshydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis* 1998;19:1383-87.
13. Pandey N, Williams GM, Sadhegi S, Green AC, Webb PM, Whiteman DC. Associations of duration, intensity, and quantity of smoking with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Epidemiol* 2008;168:105-14.
14. Blot WJ. The Liuxan trials: mortality rates by vitamin-mineral intervention group. *Am J Clin Nutr* 1995;62:14-24.
15. De-Stefani E, Munoz N, Esteve J, Vasallo A, Victora CG, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* 1990;50: 426-31.
16. Yu Y, Taylor PR, Li JY i sur. Retrospective cohort study of risk-factors for esophageal cancer in LiXian, People's Republics of China. *Cancer Causes Control* 1993;4:195-202.
17. Sandler RS. The risk of esophageal cancer in patients with achalasia: a population-based study. *JAMA*1995;247:1359.

18. Clark SB, Rice TW, Tubbs RR, Richter JE, Goldblum JR. The nature of the myenteric infiltrate in achalasia: an immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1153-58.
19. Meijssen MA, Tilanus HW, van Blankestein M, Hop WC, Ong GL. Achalasia complicated by esophageal squamous cell carcinoma. A prospective study in 195 patients. *Gut* 1992;33:155-58.
20. Proctor DD, Fraser JL, Mangano MM, Calkins DR, Rosenberg SJ. A small carcinoma of the esophagus in patient with longstanding primary achalasia. *Am J Gastroenterol* 1992;87:664-67.
21. Appelqvist P, Salmo M. Lye corrosion carcinoma of esophagus. A review of 63 cases. *Cancer* 1980;45:2655-58.
22. Novacek G. Review: Plummer-Vinson syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2006;1:6.
23. Ashwort MT, Nash JR, Ellis A, Day DW. Abnormalities of differentiation and maturation in the esophageal squamous epithelium of patients with tylosis. *Histopatholgy* 1991;19:303-10.
24. Kok TC, Nooter K, Tjong AH-S, Smits HL, Ter-Schegget JT. No evidence of known types of human papillomavirus in squamous cell cancer of oesophagus in low-risk area. Rotterdam Oesophageal Tumor Study group. *Eur J Cancer* 1997;33:1865-68.
25. He D, Zhang DK, Lam KY i sur. Prevalence of HPV infection in esophageal squamous cell carcinoma in Chinese patients and relationship to the p53 gene mutation. *Int J Cancer* 1997;72:959-64.

26. Matsha T, Donniger H, Erasmus RT, Hendricks D, Stepien A, Parker MI. Expression of p53 and its homolog, p73, in HPV DNA positive oesophageal squamous cell carcinoma. *Virology* 2007;369:182-90.
27. Farhadi M, Tahmasebi Z, Merat S, Kamangar F, Naseollahzadeh D, Malekzadeh R. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of esophagus in a high-risk population. *World J Gastroenterol* 2005;11:1200-203.
28. Poljak M, Cerar A, Seme K. Human papillomavirus infection in esophageal carcinomas: a study of 121 lesions using multiple broad-spectrum polymerase chain reactions and literature review. *Hum Pathol* 1998;29:266-71.
29. Turner JR, Shen LH, Crum CP, Dean PJ, Odze RD. Low prevalence of human papillomavirus infection in esophageal squamous cell carcinoma from North America: analysis by a highly sensitive and specific polymerase chain reaction-based approach. *Hum Pathol* 1997;28:174-78.
30. Rokkas T, Pistiolas D, Sechopoulos P, Robotis I, Margantins G. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and esophageal neoplasia: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:1413-17.
31. Crespi M, Munoz N, Grassi A, Qiong S, Kuo Jing W, Jing Jien L. Precursor lesion of esophageal cancer in a low-risk population in China. *Int J Cancer* 1984;34:599-602.
32. Kuylentierna R, Munck-Wikland E. Esophagitis and cancer of the esophagus. *Cancer* 1985;56:837-39.
33. Meata M, Koga S, Andachi H, Yoshioka H, Wakatsuki T. Esophageal cancer developed after gastrectomy. *Surgery* 1996;95:87.

34. Stephens RL. Hypercalcemia in epidermoid tumors of head and neck and esophagus. *Cancer* 1978;31:1487-91.
35. Levin KJ, Appelman HD. Tumors of the oesophagus and stomach. U: Atlas of Tumors Pathology. Washington DC: AFIP, 1996.
36. Goodnight J, Venook A, Ames M, Taylor C, Gilden R, Figlin RA. Practice guidelines for esophageal cancer. *Cancer J Scie Am* 2 1996;37-43.
37. Roth A. Tumori jednjaka i želuca. U: Interna medicina. Vrhovec B. i sur. (ur.), Zagreb: Naprijed, 1997;93.
38. Tachibana M, Yoshimura H, Kinugasa S i sur. Clinicopathological features of superficial squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Surg* 1997;174:49-53.
39. Lambert R. The role of endoscopy of esophago-gastric cancer. *Endoscopy* 1999;31:180.
40. Kido M. Endoscopic tumor diagnosis and treatment. *Endoscopy* 2000;30:836.
41. Endo M, Takeshita K, Kawano T. Analysis of 1125 cases of early esophageal carcinoma in Japan. *Dis Esophagus* 1991; 2:71-76.
42. Fagundes RB, de-Barros SG, Putten AC i sur. Occult dysplasia in disclosed by Lugol chromoendoscopy in alcoholics at high risk squamous cell carcinoma of the esophagus. *Endoscopy* 1999;31:281-85.
43. Yoshida S. Endoscopic diagnosis and treatment of early cancer in the alimentary tract. *Digestion* 1998;59:502-508.
44. Peters JH, Hoefft SF, Heimbucher J i sur. Selection of patients for curative or palliative resection of esophageal cancer based on preoperative endoscopic ultrasonography. *Arch Surg* 1994;129:534-39.

45. Murata Y, Suzuki S, Ohta M i sur. Small ultrasonic probes for determination of the depth of superficial esophageal cancer. *Gastrointest Endosc* 1996;44:23-28.
46. Picus D, Balfe DM, Koehler RE Roper CL, Owen JW. Computed tomography in the staging of esophageal carcinoma. *Radiology* 1983;146:433-38.
47. Bogomoletz WW, Molas G, Gayet B, Potet F. Superficial squamous cell carcinoma of the esophagus: a report of 76 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1989;13:535-46.
48. Ming SC. Tumors of esophagus and stomach. U: Atlas of tumor pathology. 1 izd. Washington DC: AFIP, 1973.
49. Japanese Society for Esophageal Diseases. Guidelines for the clinical and pathologic studies on carcinoma of the esophagus. *Jpn J Surg* 1976;6:69-78.
50. Rubio CA, Lie F-S, Zhao H-Z. Histological classification of intraepithelial neoclassic and microinvasive squamous carcinoma of the esophagus. *Am J Surg Pathol* 1989;13:685-690.
51. Soga J, Tanak O, Sasaki K, Kawaguchi M, Muto T. Superficial spreading carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1982;50:1641-45.
52. Yoshinaka H, Shimatzu H, Fukumoto T, Baba M. Superficial esophageal carcinoma. A clinicopathologic review of 59 cases. *Am J Gastroenterol* 1991;86:1413-18.
53. Froelicher P, Miller G. The European experience with esophageal cancer limited to mucosa and sub mucosa. *Gastrointest Endosc* 1986;32:88-90.
54. Anani PA, Gardiol D, Savary M, Monnier P. An extensive morphologic and comparative study of clinically early and obvious squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Res Pract* 1991;187:214-19.

55. Pesko P, Rakic S, Milicevic M, Bulajic P, Gerzic Z. Prevalence and clinicopathologic features of multiple squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1994;73:2687-690.
56. Kato H, Tachimori Y, Watanabe H i sur. Intramural metastasis of thoracic esophageal carcinoma. *Int J Cancer* 1992;50:49-52.
57. Kuwano H. Peculiar histopathologic features of esophageal cancer. *Surg Today* 1998;28:573-75.
58. Sarbia M, Porschen R, Borchard F, Hortsman O, Willers R. Gabbert HE. Incidence and prognostic significance of vascular and neural invasion in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Int J Cancer* 1995;61:333-36.
59. Agha FP, Weatherbee L, Sams JS. Verrucous carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 1984;79:844-49.
60. Tsang WY, Chan JK, Lee KC, Leung AK, Fu YT. Basaloid-squamous carcinoma of the upper aero digestive tract and so-called adenoid cystic carcinoma of the oesophagus: the same tumor type? *Histopathology* 1991;19:35-46.
61. Wain SL, Kier R, Vollmer RT, Bossen EH. Basaloid-squamous carcinoma of the tongue, hypopharinks, and larynks report of 10 cases. *Hum Pathol* 1986;17:1158-66.
62. Sarbia M, Verreet P, Bittinger F i sur. Basaloid squamous cell carcinoma of the esophagus: diagnosis and prognosis. *Cancer* 1997;79:1871-78.
63. Iwaya T, Maesawa C, Ogasawara S, Tamura G. Tylosis esophageal cancer locus on chromosome 17q25.1 is commonly deleted in sporadic human esophageal cancer. *Gastroenterology* 1998;114:1206-210.



64. Hanada M, Nakano K, Li Y, Yamashita H. Carcinosarcoma of the esophagus with osseous and cartilaginous production. A combined study of keratin immunohistochemistry and electron microscopy. *Acta Pathol Jpn* 1984;34:669-78.
65. Takahashi H, Shikata N, Senzaki H, Shintaku M, Tsbura A. Immunohistochemical staining patterns of keratin sin normal esophageal epithelium and carcinoma of the oesophagus. *Histopathology* 1995;26:45-50.
66. Dawsey SM, Lewin KJ, Wang GO i sur. Squamous esophageal histology and subsequent risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. A prospective follow-up study from Linxian, China. *Cancer* 1994;74:1686-92.
67. Qui SL, Yang GR. Precursor lesions of esophageal cancer in high-risk populations in Henan Province, China. *Cancer* 1988;62:155-57.
68. Carr NJ, Monihan Jm, Sobin LH. Squamous cell papilloma of the esophagus: a clinicopathologic and follow-up study of 25 cases. *Am J Gastroenterol* 1994;89:245-48.
69. Orłowska J, Jarosz, Gugulski A, Pachlewski J, Butruk E. Squamous cell papillomas of the esophagus report of 20 cases and literature review. *Am J Gastroentrol* 1994;89:434-37.
70. Ide H, Nakamura T, Hayashi K i sur. Esophageal squamous cell carcinoma: pathology and prognosis. *World J Surg* 1994;16: 321-330.
71. Akiyama H, Tsumaru M, Udagawa H, Kajiyama Y. Radical lymph node dissection for cancer of the thoracic esophagus. *An Surg* 1994;220:364-372.
72. Tomita N, Matsumoto T, Hayashi T i sur. Lymphatic invasion according to D2-40 immunostaining is a strong predictor of nodal metastasis in superficial

- squamous cell carcinoma of the esophagus. Algorithm for risk of nodal metastasis based on lymphatic invasion. *Pathol Int* 2008;58:282-87.
73. Tachibana M, Kinugasa S, Hirahara N, Yoshimura H. Lymph node classification of esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; 34:427-31.
  74. Mandard AM, Chasle J, Marnay J, Villedieu JC. Autopsy findings in 111 cases of esophageal cancer. *Cancer* 1981;8:329-335.
  75. Sons HU, Borchard F. Esophageal cancer: Autopsy findings in 171 cases. *Arch Pathol Lab Med* 1984;108:983-88.
  76. Quint LE, Hepburn LM, Francis IR, Whyte RI, Orringer MB. Incidence and distribution of distant metastases from newly diagnosed esophageal carcinoma. *Cancer* 1995;76:1120-25.
  77. Morita M, Kuwano H, Ohno S i sur. Multiple occurrence of carcinoma in the upper aero digestive tract associated with esophageal cancer: reference to smoking, drinking and family history. *Int J Cancer* 1994;58:207-10.
  78. Morita M, Kuwano H, Nakashima T i sur. Family aggregation of carcinoma of the hypopharynx and cervical esophagus: special reference to multiplicity of cancer in upper aero digestive tract. *Int J Cancer* 1998;76:468-71.
  79. Kelsell DP, Risk JM, Leigh IM i sur. Close mapping of the focal nonepidermolytic palmoplantar keratoderma (PPK locus associated with oesophageal cancer (TOC). *Hum Mol Gen* 1996;5:857-69.
  80. Iwaya T, Maesawa C, Ogasawara S, Tamura G. Tylosis esophageal cancer locus on chromosome 17q25.1 is commonly deleted in sporadic human esophageal cancer. *Gastroenterology* 1997;114:1206-210.

81. Von Brevern M, Hollstein MC, Risk JM i sur. Loss of heterozygotis in sporadic oesophageal tumor sin the tylosis oesophageal cancer (TOC) gene region of chromosome 17q. *Oncogene* 1998;17:2101-2105.
82. Vallbohmer D, Lentz HJ. Predictive and prognostic molecular markers in outcome of esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2006;19:425-32.
83. Sengpiel C, Köning IR, Rades D i sur. p53 Mutations in carcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Cancer Invest* 2009;27:96-104.
84. Jing W, Zhang YJ, Kahn SM, Harris CC, Nontesano R, Weinstein IB. Altereted expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer. *Proc Ntl Aced Sci USA* 1993;90:9026-30.
85. Diago Y, Nisgiwaki T, KawasoeT, Tamari M, Tsuchiya E, Nakamura Y. Molecular cloning of a candidate tumor suppressor gene, DLC1, form chromosome 3p21.3 *Cancer Res* 1999;59:1966-72.
86. Han U, Can OI, Kayhan B, Onal BU. Expression of p53, VEGF C, p21: could they be used in preoperative evaluation of lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma? *Dis Esophagus* 2007;20:379-85.
87. Hsu PK, Li AF, Wang YC i sur. Reduced membranous beta-catenin protein expression is associated with metastasis and poor prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135:1029-35.
88. Zhao XJ, Li H, Chen H i sur. Expression of e-cadherin and beta-catenin in human esophageal squamous cell carcinoma: relationships with prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:225-32.
89. Nakanishi Y, Ochiai A, Akimoto S i sur. Expression of E-cadherin, alpha-catenin and plakoglobin in esophageal carcinomas and its prognostic

- significance: immunohistochemical analysis of 96 lesions. *Oncology* 1997;54:158-65.
90. Boone J, Ten Kate FJ, Offerhaus GJ, van Diest PJ, Borel Rinkers IH, van Hillegersberg R. mTOR in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential target for molecular therapy. *J Clin Pathol* 2008;61:909-13.
  91. Park HL, Kim MS, Yamashita K i sur. DCC promoter hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2008;122:2498-502.
  92. Li SL, Gao DL, Zhao ZH i sur. Correlation of matrix metalloproteinase suppressor genes RECKs, VEGF and CD 105 with angiogenesis and biological behavior in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007;13:6076-81.
  93. Kozłowski M, Kowalczyk O, Sulewska A i sur. Serum soluble Fas ligand (sFasL) in patients with primary squamous cell carcinoma of the esophagus. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45:199-204.
  94. Hall J, Hashibe M, Boffeta P i sur. The association of sequence variants in DNA repair and cell cycle genes with cancers of upper aero digestive tract. *Carcinogenesis* 2007; 28: 665-71.
  95. Schrupp DS, Fischette MR, Nguyen DM i sur. Phase I study of decitabine-mediated gene expression in patients with cancers involving the lungs, esophagus, or pleura. *Clin Cancer Res* 2006;12:5777-85.
  96. Hsu KF, Lin CK, Yu CP i sur. Cortactin, fascin, and survivin expression associated with clinicopathological parameters in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2009;PMID:19207554

97. Sato T, Iizuka N, Hamamoto Y i sur. Esophageal squamous cell carcinoma with distinct invasive depth show different gene expression profiles associated with lymph node metastasis. *Int. J Oncol* 2006;28:1043-55.
98. Kammori M, Poon SS, Nakamura K i sur. Squamous cell carcinomas of the esophagus arise from a telomere-shortened epithelial field. *Int J Mol Med* 2007;20:793-99.
99. Tachibana M, Hirahara N, Kinugasa S, Yoshimura H. Clinicopathologic features of superficial esophageal cancer: results of consecutive 100 patients. *Ann Surg Oncol* 2008;15:104-16.
100. Lu SL, Li YM, Gu YZ. Cancer of esophagus junction: analysis of results of 1,025 resections after 5-20 years. *Ann Thorac Surg* 1987;43:176-81.
101. Killinger WA, Rice TW, Aldenstein DJ i sur. Stage II esophageal carcinoma: the significance of T and N. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:935-940.
102. Tachibana M, Kinugasa S, Dhar DK i sur. Prognostic factors in T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> squamous cell carcinoma of the esophagus. *Arch Surg* 1999;134:50-54.
103. Rizk N, Venkatraman E, Park B, Florens R, Bain SM, Rusch V. The prognostic importance of the number of involved lymph nodes in esophageal cancer: implications for revisions of the American Joint Committee on cancer staging system. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:1374-81.
104. Li H, Zhang Q, Xu L, Chen Y, Wei Y, Zhou G. Factors predictive of prognosis after esophagectomy for squamous cell cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:55-59.
105. Tanabe T, Kanda T, Kosugi S i sur. Extranodal spreading of esophageal squamous cell carcinoma: clinicopathological characteristic and prognostic impact. *World J Surg* 2007;31:2192-28.

106. Glickman JN, Torres C, Wang HH i sur. The prognostic significance of lymph node micrometastasis in patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1999;85:769-78.
107. Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U i sur. Prognostic value of immunohistochemically identified tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N Engl J Med* 1997;337:1188-94.
108. Natsugoe S, Mueller J, Stein HJ, Feith M, Hofler H, Siewert JR. Micrometastasis and tumor cell microinvolment of lymph nodes from esophageal squamous cell carcinoma: frequency, associated tumor characteristic, and impact of prognosis. *Cancer* 1998;83:858-66.
109. Ooki A, Yamashita K, Kobayashi N i sur. Lymph node metastasis density and growth pattern as independent prognostic factors in advanced esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg* 2007;31:2184-91.
110. Robey-Cafferty SS, el-Naggar AK, Sahin AA, Bruner JM, Ro J, Cleary KR. Prognostic factors in esophageal squamous carcinoma. A study of histologic features, blood group expression and DNA ploidy. *Am J Clin Pathol* 1991;95:844-49.
111. Serbia M, Bittinger F, Porschen R, Dutkowski P, Willers R, Gabbert HE. Prognostic value of histopathologic parameters of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1995;76:922-27.
112. Edwards JM, Hillier VF, Lawson RA, Moussalli H, Haselton PS. Squamous carcinoma of the esophagus. Histological criteria and their prognostic significance. *Br J Cancer* 1989;59:429-33.

113. Brucher BL, Stein HJ, Werner M, Siewert JR. Lymphatic vessel invasion is an independent prognostic factor in patients with primary resected tumor with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001;92:2228-33.
114. Torres CM, Wang HH, Turner JR i sur. Pathologic prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma: a follow-up study of 74 patients with or without preoperative chemo radiation therapy. *Mod Pathol* 1999;12:961-68.
115. Tanigawa N, Matsumura M, Amaya H i sur. Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997;79:220-25.
116. Lam KY, Law SJ, So MK, Fok M, Ma LT, Wong J. Prognostic implication of proliferative markers MIB-1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1996;7:7-13.
117. Klimstra DS. Pathologic prognostic factors in esophageal carcinoma *Semin Oncol* 1994;21:425-30.
118. Bottger T, Storkel S, Stockle M i sur. DNA image cytometry. A prognostic tool in squamous cell carcinoma of the esophagus? *Cancer* 1991;67:2290-94.
119. Doki Y, Shiozaki H, Thara H i sur. Prognostic value of DNA ploidy in squamous cell carcinoma of esophagus. Analyzed with improved flow cytometric measurement. *Cancer* 1993;72:1813-18.
120. Marsuura H, Sugimachi K, Ueo H, Kuwano H, Koga Y, Okamura T. Malignant potentiality of squamous cell carcinoma of the esophagus predictable by DNA analysis. *Cancer* 1986;57: 810-14.

121. Tam PC, Sui KF, Cheung HC, Ma L, Wong J. Local recurrence after subtotal esophagectomy for squamous cell carcinoma. *Ann Surg* 1987;295:189-94.
122. Sarger PM, Johnston D, McMahon MJ, Dixon MF, Quirke P. Significance of circumferential resection margin involvement after oesophagectomy for cancer. *Br J Surg* 1993;80:1386-88.
123. Allum WH, Griffin SM, Watson A, Colin-Jones D on behalf of the Association of Upper Gastrointestinal Surgeons of Great Britain and Ireland, the British Society of Gastroenterology, and the British Association on Surgical Oncology. *Gut* 2002;50:1-23.
124. Serbia M, Otto N, Pühringer-Oppermann F, Brücher BL. The predictive value of molecular markers (p53, EGFR, ATM, CHK2) in multimodality treated squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Cancer* 2007;97:1404-8.
125. Shimaya K, Shiozaki H, Inoue M i sur. Significance of p53 expression as a prognostic factor in oesophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arc Pathol Anat Histopathol* 1993;422:271-76.
126. Serbia M, Porschen R, Borchard F, Horstmann O, Willwers R, Gabbert HE. P53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1994;74:2218-23.
127. Ikeguchi M, Saito H, Katano K, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Clinicopathologic significance of the expression of mutated p53 protein and the proliferative activity of cancer cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Am Coll Surg* 1997;185:398-403.
128. Ishida M, Morita M, Saeki H i sur. Expression of p53 and p21 and the clinical response for hyperthermochemoradiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Anticancer Res* 2007;27:3501-6.



129. Hancock SL, Glatstein E. Radiation therapy of esophageal cancer. *Semin Oncol* 1984;11:144.
130. Kato H, Tachimori Y, Mizobuchi S, Igaki H, Ochiai A. Cervical, mediastinal, and abdominal lymph node dissection (three-field dissection) for superficial carcinoma of the thoracic esophagus. *Cancer* 1993;72:2879-82.
131. Igaki H, Tachimori Y, Kato H. Improved survival for patients with upper and /or middle mediastinal lymph node metastasis of squamous cell carcinoma of the lower thoracic esophagus treated with 3-field dissection. *Ann Surg* 2004;239:483-90.
132. Medical Research Council Oesophageal Cancer Working Group. Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer: a randomized controlled trial. *Lancet* 2002;359:1727-33.
133. Chao YK, Chan SC, Liu YH i sur. Pretreatment T3-4 stage is an adverse prognostic factor in patients with esophageal squamous cell carcinoma who achieve pathological complete response following preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg* 2009;249:392-96.
134. Ott K, Lordick F, Molls M, Bartels H, Biemer E, Siewert JR. Limited resection and free jejunal graft interposition for squamous cell carcinoma of the cervical oesophagus. *Br J Surg* 2009;96:258-66.
135. Chao YK, Chan SC, Chang HK i sur. Salvage surgery after failed chemoradiotherapy in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Eur J Surg Oncol* 2009;35:289-94.
136. Ellias FH Jr. Treatment of carcinoma of the esophagus or cardia. *Mayo Clin Proc* 1989;64:945-55.

137. Roth JA, Putnam JB Jr. Surgery for cancer of esophagus. *Semin Oncol* 1994;21:453-61.
138. Hambraseus GM, Mercke CE, Hammar E, Landberg TG, Wang-Anderson W. Surgery alone or combined with radiation therapy in esophageal carcinoma. *Cancer* 1981;48:63-68.
139. Donahue JM, Nichols FC, Li Z i sur. Complete pathologic response after neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal cancer is associated with enhanced survival. *Ann Thorac Surg* 2009;87:392-98.
140. Ilson DH, Kelson DP. Chemotherapy in esophageal cancer. *Anticancer Drugs* 1993;4:287-299.
141. Yamazaki K, Hironaka S, Boku N i sur. A retrospective study of second-line chemotherapy for unresectable or recurrent squamous cell carcinoma of the esophagus refractory to chemotherapy with 5-fluorouracil plus platinum. *Int J Clin Oncol* 2008;13:150-55.
142. Ku GY, Goodmen KA, Rusch VW, Ilson DH. Successful treatment of esophageal cancer with airway invasion with induction chemotherapy and concurrent chemoradiotherapy. *J Thorac Oncol* 2009;4:32-24.
143. Rampado S, Bocus P, Battaglia G, Ruol A, Portale G, Ancona E. Endoscopic ultrasound: accuracy in staging superficial carcinomas of the esophagus. *Ann Thorac Surg* 2008;85:251-56.
144. Tachibana M, Kinugasa S, Shibakita M i sur. Surgical treatment of superficial esophageal cancer. *Langebecks Arch Surg* 2006;391:304-21.
145. Altorki NK, Lee PC, Liss Y i sur. Multifocal neoplasia and nodal metastases in T<sub>1</sub> esophageal carcinoma: implications for endoscopic treatment. *Ann Surg* 2008;247:434-49.

146. Yambe T, Sato F, Matsuki F, Shiraishi Y, Miynata G, Satomi S. Swallow stent with hyperthermia function. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2008;2008:731-34.
147. Burnet FM. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1967;1:1171-74.
148. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic nude mice. *Science* 1974;183:534-36.
149. Stutman O. Chemical carcinogenesis in nude mice, comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst* 1979;62:353-58.
150. Hunig T, Bevan MJ. Specificity of cytotoxic T cells from athymic mice. *J Exp Med* 1980;152:688-702.
151. Hayday AC.  $\Gamma\beta$  cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 2000;18:975-1026.
152. Gatti RA, Good RA. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 1971;28:89-98.
153. Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nature Rev Cancer* 2002;2:373-82.
154. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collin P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996;77:1303-10.
155. Naito Y, Saito M, Shiiba K i sur. CD8+ t cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:3491-94.

156. Nakano O, Sato M, Naito Y i sur. Proliferative activity of intratumoral CD8+ T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 2001;61:5132-36.
157. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000,74:181-274.
158. Marchand M, van Baren N, Weynants P i sur. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 1999;80:219-30.
159. Thurner B, Haendle I, Röder C i sur. Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999;190:1669-78.
160. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 2002;3:991-98.
161. Hellstrom KE. Studies on isoantigenic variation in mouse lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1960;25:237-69.
162. Moller E, Moller G. Quantitative studies of the sensitivity of normal and neoplastic mouse cells to the cytotoxic action of isoantibodies. *J Exp Med* 1962;15:527-53.

163. Hui KM. Re-expression of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on malignant tumor cells and its effect on host-tumor interaction. *Bioessays* 1989;11:22-26.
164. Rivoltini L, Barracchini KC, Viggiano i sur. Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 1995;55:3149-57.
165. Coulie PG, Ikeda H, Baurain JF, Chiari R. Antitumor immunity at work in a melanoma patient. *Adv Cancer Res* 1999;76:213-42.
166. D'Urso CM, Wang ZG, Cao Y i sur. Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest* 1991;87:284-92.
167. Xiao J, Chen HS. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol* 2004;10:1849-53.
168. Fujita S, Wada H, Jungbluth AA i sur. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:6551-8.
169. Zambon A, Mandruzzato S, Parenti A i sur. MAGE, BAGE, and GAGE gene expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2001;91:1882-8.
170. Juretić A, Spagnoli GC, Schultz TE, Sarcevic B. Cancer/testis tumor associated antigens: Immunohistochemical detection with monoclonal antibodies. *Lancet Oncol* 2003;4:104-9.
171. Ottaviani S, Colau D, van der Bruggen P, van-der Bruggen P. A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytotoxic T lymphocyte on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunother* 2006;55:867-72.

172. Fleischhauer K, Gattinoni L, Lietti G, Zino E, Bordignon C, Traversari C. Identification of tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes cross-recognizing allogenic major histocompatibility class I molecules. *Tissue Antigens* 2000;56:19-29.
173. Nakao M, Shichijo S, Imaizumi T i sur. Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL. *J Immunol* 2000;164:2565-74.
174. I Chen YT, Scanlan MJ, Obata Y, Old LJ. Identification of human tumor antigens by serological expression cloning. U: Rosenberg SA. (ur.) Principles and practice of the biologic therapy of cancer. 3izd, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2000;557-70.
175. Zendman AJ, Ruiter DJ, Van Muijen GN. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *J Cell Physiology* 2003;194:272-88.
176. Jassim A, Ollier W, Payne A, Biro A, Oliver RT, Festenstein H. Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur J Immunol* 1989;19:1215-20.
177. Chen YT, Scanlan MJ, Shin U i sur. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Immunology* 1997;94:1914-18.
178. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, OldLJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 2002;188:22-23.
179. Nagorsen D, Scheibenbogen, Marincola FM, Letsch A, Keilholz U. Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9.4296-303.

180. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P i sur. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes of a human melanoma. *Science* 1991;254:1643-47.
181. Haier J, Owzcareck M, Guller U i sur. Expression of MAGE-A cancer/testis antigens in esophageal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 2006;26:2281-87.
182. Nagashima H, Sadanaga N, Mashino K i sur. Expression of MAGE-B genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:167-73.
183. Quillien V, Raul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F. Expression of MAGE genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1997;17:387-91.
184. Fischer C, Gudat F, Stulz P i sur. High expression of MAGE-3 protein in squamous cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 1997;71:1119-21.
185. Ito S, Kawano Y, Katakura H i sur. Expression of MAGE-D4, a novel MAGE family antigen, is correlated with tumor-cell proliferation of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006;51:79-88
186. Figueiredo DL, Mamede RC, Proto-Siqueira R, Neder L, Silva WA Jr, Zago MA. Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2006;28: 614-19.
187. Eura M, Ogi K, Chikamatsu K i sur. Expression of the MAGE gene family in human head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1995;64:304-8.
188. Chang HK, Park J, Kim W i sur. The expression of MAGE and GAGE genes in uterine cervical carcinoma of Korea by RT-PCR with common primers. *Gynecol Oncol* 2005;97:342-7.

189. Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L i sur. Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 2003;64:443-49.
190. Hudolin T, Juretic A, Pasini J i sur. Immunohistochemical expression of tumor antigens MAGE-A1, MAGE-A3/4, and NY-ESO in squamous cell carcinoma of the penis. *Urology* 2006;68:205-7.
191. Muscatelli F, Walker AP, De Plaen E, Stafford AN, Monaco AP. Isolation and characterization of a MAGE gene family in the Xp21.3 region. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:4987-91.
192. Lurquin C, De Smet C, Brasseur F i sur. Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins. *Genomics* 1997;46:397-408.
193. De Plaen E, De Backer O, Arnaud D i sur. A new family of mouse gene homologues to the human MAGE genes. *Genomics* 1999;55:176-84.
194. Chen YT, Stockert E, Chen Y, Garin-Chesa P, Retting WJ, van der Bruggen P. Identification of the MAGE-1 gene product by monoclonal and polyclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:1004-8.
195. Eura M, Chikamatsu K, Ogi K, Nakano K, Masuyama K, Ishikawa T. Expression of genes MAGE-1,-2 and-3 by human maxillary carcinoma cells. *Anticancer Res* 1995;15:55-9.
196. Milkovic M, Sarcevic B, Glavan E. Expression of MAGE tumor-associated antigen in thyroid carcinomas. *Endocr Pathol* 2006;17:45-52.
197. Kavalari R, Sarcevic B, Spagnoli GC i sur. Expression of MAGE tumor-associated antigens is inversely correlated with tumor differentiation in



- invasive ductal breast cancers: an immunohistochemical study. *Virchows Arch* 2001;439:127-31.
198. Bandic D, Juretic A, Sarcević B i sur. Expression and possible prognostic role of MAGE-A4, NY-ESO-1 and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: retrospective immunohistochemical study. *Croat Med J* 2006;47:32-41.
199. Hudolin T, Juretić A, Spagnoli GC i sur. Immunohistochemical expression of tumor antigens MAGE-A1, MAGE A3/4, and NY-ESO-1 in cancers and benign prostatic tissue. *Prostate* 2006;66:13-8.
200. Kienstra MA, Neel HB, Strome SE, Roche P. Identification of NY-ESO-1, MAGE-1 and MAGE-3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2003;25:457-63.
201. Yoshida N, Abe H, Ohkuri T i sur. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *Int J Oncol* 2006;28:1089-98.
202. Gure AO, Chua R, Williamson B i sur. Cancer-testis genes are co-coordinately expressed and markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:8055-062.
203. Ficher C, Guadt F, Stulz P i sur. High expression of MAGE-3 protein in squamous-cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 1997;71:1119-21.
204. Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N i sur. Cancer testis expression in primary vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur J Cancer* 2007;43:2621-27.
205. Schultz-Thater E, Juretic A, Dellabone P i sur. MAGE-1 gene product is a cytoplasmic protein. *Int J Cancer* 1994;59:435-39.

206. Kocher T, Schultz-Thater E, Gudat F i sur. Identification and intracellular location of MAGE-3 gene product. *Cancer Res* 1995;55:2236-39.
207. Rimoldi D, Salvi S, Schultz-Thater E i sur. Monoclonal antibody 57B stains tumor tissue that express gene MAGE-A4. *Int J Cancer* 2000;86:835-41.
208. Inoue H, Mori M, Li J i sur. Human esophageal carcinomas frequently express the tumor-rejection antigens of MAGE genes. *Int J Cancer* 1995;63:523-26.
209. Zeng G, Aldridge ME, Wang Y i sur. Dominant B cell epitope from NY-ESO-1 recognized by sera from a wide spectrum of cancer patients: implications as a potential biomarker. *Int J Cancer* 2005;114: 268-73.
210. Akcakanat A, Kanda T, Tanabe T i sur. Heterogeneous expression of GAGE, NY-ESO-1, MAGE-A and SSX proteins in esophageal cancer: implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 2006;118:123-8.
211. Akcakanat A, Kanda T, Koyama Y i sur. NY-ESO expression and its serum immunoreactivity in esophageal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54:95-100.
212. Stockert E, Jager E, Chen YT i sur. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 1998;187:1349-54.
213. Jager E, Nagata Y, Gnjatic S i sur. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:4760-65.
214. Chen YT, Boyer AD, Viars CS, Tsane S, Old LJ, Arden KC. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an auto immunogenic cancer-

- testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenet Cell Genet* 1997;79:237-40.
215. Korangy F, Ormandy LA, Bleck JS i sur. Spontaneous tumor-specific humoral and cellular immune response to NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;1:4332-41.
216. Sharma P, Gnjatic S, Jungbluth AA i sur. Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 t cell epitope in a patient with bladder cancer. *Cancer Immun* 2003;3:19.
217. Kurashiga T, Noguchi Y, Saika T i sur. NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with grade. *Cancer Res* 2001;61:4671-4.
218. Türeci O, Mack U, Luxemburger U i sur. Humoral immune responses of lung cancer patients against tumor antigen NY-ESO-1. *Cancer Lett* 2006;236:64-71.
219. Theurillat JP, Ingold F, Frei C i sur. H. NY-ESO-1 protein expression in primary breast carcinoma and metastases: correlation with CD8+ t-cell and CD79a+ plasmacytic/B-cell infiltration. *Int J Cancer* 2007;120:2411-17.
220. Jager E, Chen YT, Drijfhout JW i sur. Simultaneous humoral et cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding epitopes. *J Exp Med* 1998;187:265-70.
221. Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res* 2003;9:6453-60.

222. Sadanaga N, Nagashima H, Mashino K i sur. Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001;7:2277-84
223. Lee L, Wang RF, Wang X i sur. NY-ESO-1 may be a potential target for lung cancer immunotherapy. *Cancer J Sci Am* 1999;5:20-5.
224. Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J. Investigation of the expression of melanoma antigen encoding genes (MAGE-A1 to-A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int J Oncol* 2005;26:817-24.
225. Atanackovic DJ, Altorki NK, Cao Y i sur. Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1650-55.
226. Karanikas V, Tsochas S, Boukaus K i sur. Co-expression of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: implications for immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2008,7:345-52.
227. Remmele W, Schickentanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract* 1993;189:862-6.
228. De Smet C, Courtois SJ, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of human gene MAGE-1 gene *Immunogenetics* 1995;42:282-90.
229. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7149-53.

230. del Mazo J, Prantera G, Torres M, Ferraro M. DNA methylation changes during mouse spermatogenesis. *Chromosome Res* 1994;2:147-52.
231. Liteplo RG, Kerbel RS. Reduced levels of DNA 5-methylcytosin in metastatic variants of the human melanoma cells line MeWo. *Cancer Res* 1987;47:2264-67.
232. Honda T, Tamura G, Waki T i sur. Demethylation of MAGE promoters during gastric cancer progression. *Br J Cancer* 2004; 90:838-43.
233. Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -2, -3 i -12 in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 2006;4:339-49.
234. Bolli M, Kocher T, Adamina M i sur. Tissue microarray evaluation of melanoma antigen (MAGE) tumor-associated antigen expression. *Ann Surg* 2002;6.785-93.
235. Landry C, Brasseur F, Spagnoli GC i sur. Monoclonal antibody 57B stains tumor tissue that express gene MAGE-A4. *Int J Cancer* 2000;86:835-41.
236. Brasseur F, Rimoldi D, Liénard D i sur. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1995;63:375-80.
237. van Baren N, Brasseur F, Godelaine D i sur. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood* 1999;84:1156-64.
238. Busam KJ, Iversen K, Berwick M, Spagnoli GC, Old LJ, Jungbluth AA. Immonoreactivity with the anti-MAGE antibody 57B in malignant melanoma: frequency of expression and correlation with prognostic parameters. *Mod Pathol* 2000;13:459-65.
239. Maraskovsky E, Sjölander S, Drane DP i sur. A. NY-ESO-1 protein formulated in ISOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing

both humoral and CD8+ T-cell mediated immunity and protection against NY-ESO-1<sup>+</sup> tumors. Clin Cancer Res 2004;10:2879-90.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 14.06.1963. godine u Zagrebu.

Osnovnu i srednju školu završila sam u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1982. godine. Diplomirala sam 1989 godine. Obavezni liječnički staž odradila sam za KBC Šalata. Od 1991. do 1992. godine radila sam u Domu zdravlja u Radeču, Slovenija. Nakon toga zaposlila sam se u Internacionalnom Crvenom križu (ICRC), gdje sam radila na terenu do 1995. godine. Od prosinca 1995. godine radla sam u ambulanti Barilović, Dom zdravlja Duga Resa. Godine 2003. dobila sam specijalizaciju iz patološke anatomije u OB Karlovac, koji sam većim dijelom obavila u KB „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu, a u srpnju 2007. godine položila sam specijalistički ispit te nastavila raditi na radnom mjestu specijalista patološke anatomije u OB Karlovac na Odjelu za patologiju i sudsku medicinu, gdje sam zadužena za biopsije i bolničke obdukcije.

U travnju 2005. godine upisala sam Stručni poslijediplomski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji sam završila u listopadu 2006. godine, a 2006. upisala sam Znanstveni poslijediplomski studij u području biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Naziv doktorske disertacije je „Imunohistokemijska analiza izraženosti antigena MAGE-A3/4 i NY-ESO-1 u metastatskom karcinomu pločastih stanica jednjaka“ koja je prihvaćena 2008. godine, a mentor mi je dr.sc. Davor Tomas, dr.med.

Autor sam 3 članka koji su objavljeni u indeksiranim časopisima od kojih su 2 indeksirana u Current Contentsu, te autor više kongresnih priopćenja.

Član sam Hrvatskog društva patologa.

Govorim engleski i slovenski jezik, udata sam i majka dvije kćeri.