

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Nataša V. Milošević

**POLIMORFIZMI U MTHFR, GSTM1,
GSTT1, MMP9 GENIMA KAO FAKTORI
PREDISPOZICIJE ZA POJAVU
TEMPOROMANDIBULARNIH
DISFUNKCIJA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Nataša V. Milošević

**POLYMORPHISMS IN MTHFR, GSTM1,
GSTT1, MMP9 GENES AS PREDISPOSING
FACTORS OF TEMPOROMANDIBULAR
DISORDERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentori:

Prof. dr Jelena Milašin

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Institut za humanu genetiku

Prof. dr Vojkan Lazić

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za stomatološku protetiku

Članovi komisije:

Prof. dr Ljiljana Tihacek Šojić

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za stomatološku protetiku

Doc. dr Aleksandra Špadijer Gostović

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za stomatološku protetiku

Prof. dr Ivana Novaković

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
Institut za humanu genetiku

Datum odbrane: _____

SADRŽAJ:

1.	UVOD	1
1.1	Kliničke karakteristike TMD.....	2
1.1.1	Zglobni poremećaji.....	6
1.1.2	Mišićni poremećaji	13
1.2	Etiologija TMD	16
1.3	Genetika i TMD	18
1.3.1	Genetički polimorfizmi.....	18
1.3.2	Pregled literature	21
1.3.3	Polimorfizam u genu za <i>MTHFR</i> C677T (rs1801133)	25
1.3.4	Polimorfizmi u genima za glutation S transferaze (<i>GSTM</i> , <i>GSTT</i>).....	27
1.3.5	Polimorfizam u genu za <i>MMP9</i> -1562 C/T (rs3918242)	30
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	35
3.	MATERIJAL I METODE	37
3.1	Kriterijumi za odabir pacijenata	38
3.2	Klinička ispitivanja	39
3.3	Molekularno-genetička ispitivanja	46
3.3.1	Izolacija DNK iz brisa obrazne sluzokože	47
3.3.2	Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	48
3.3.3	PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za <i>MTHFR</i>	52
3.3.4	Restrikciona digestija PCR produkata u analizi polimorfizma gena za <i>MTHFR</i> 53	
3.3.5	PCR/real time PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za <i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i> 55	
3.3.6	PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za <i>MMP9</i>	59
3.3.7	Restrikciona digestija PCR produkata u analizi polimorfizma gena za <i>MMP9</i> 61	
3.4	Statistička analiza.....	61

4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	62
4.1	Analiza kliničkih rezultata.....	63
4.1.1	Distribucija ispitanika prema polu i starosti.....	63
4.1.2	Distribucija podgrupa TMD i simptoma u TMD grupi.....	64
4.1.3	Podgrupe TMD i simptomi TMD kroz poređenje sa drugim parametrima (TMD grupa) 67	
4.2	Analiza genetičkih rezultata	75
4.2.1	Polimorfizam u genu za <i>MTHFR</i>	76
4.2.2	Polimorfizam u genu za <i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i>	79
4.2.3	Polimorfizam u genu za <i>MMP9</i>	83
4.3	Genotip – fenotip	87
4.4	Multivarijantna logistička regresija	109
5.	DISKUSIJA.....	111
5.1	Diskusija rezultata kliničkih ispitivanja	114
5.2	Diskusija rezultata molekularno-genetičkih ispitivanja	116
5.2.1	<i>MTHFR</i> polimorfizam (rs1801133).....	118
5.2.2	<i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i> polimorfizmi.....	119
5.2.3	<i>MMP9</i> polimorfizam (rs3918242)	121
6.	ZAKLJUČAK.....	124
7.	LITERATURA	127
	Prilog	146
	Biografija autora	154

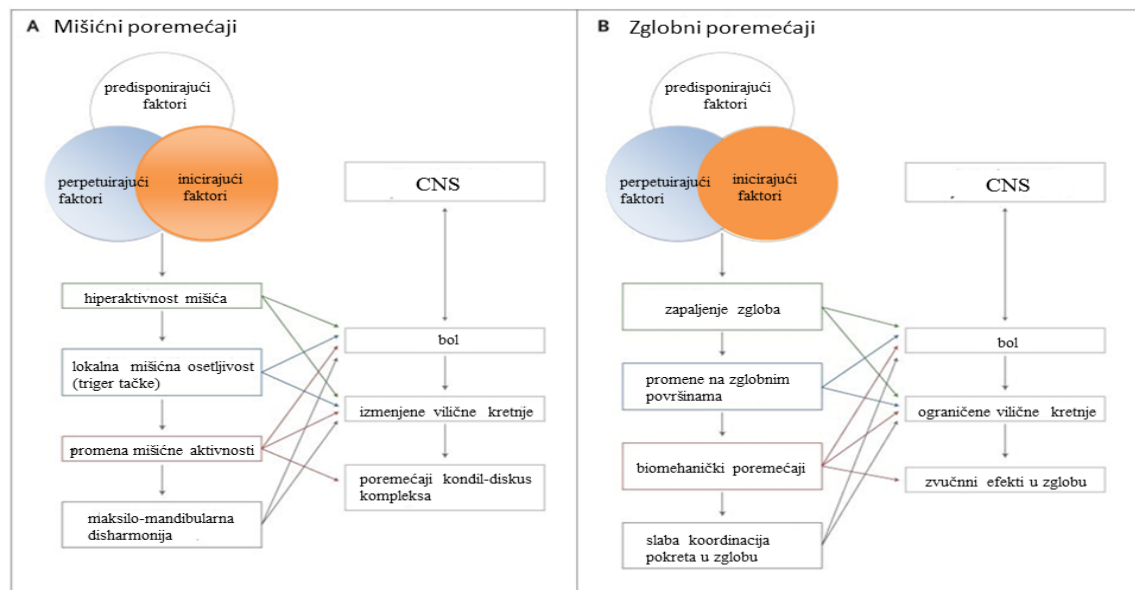
1. UVOD

1.1 Kliničke karakteristike TMD

Temporomandibularne disfunkcije (TMD) pripadaju podgrupi bolnih stanja kraniofacijalne regije, koju čine temporomandibularni zglob, mastikatorni mišići i okolne mišićno-skeletne strukture glave i vrata. Pojam TMD je tokom godina u literaturi opisivani različitim terminologijom. Bell je prvi predložio naziv temporomandibularni poremećaji, kojim su obuhvaćeni strukturni i funkcijski poremećaji viličnih zglobova različite etiologije, kao i svi mišićni i drugi poremećaji povezani sa funkcijom stomatognatog sistema (Bell 1982). TMD su dugo vremena predstavljale široko neotkriveno polje u stomatologiji i dijagnostički problem koji se ticao niza poremećaja u oblasti orofacijalne regije. Prema nekim saznanjima priroda ovih disfunkcija je takva da su se kod oko 40% obolelih simptomi ublažavali spontano (Laskin and American Dental 1983, Levitt and McKinney 1994). Ono što izdvaja ovu grupu poremećaja jeste da oni naglo nastaju ali se povlače vrlo postepeno. Pacijenti opisuju trenutak kojim su isprovocirali nastalu smetnju u TM zglobu i mišićima. Za oporavak je potreban duži vremenski period i primena različitih terapijskih modaliteta koji imaju efekta tek nakon par meseci. Poznavanje patologije regije viličnog zgloba i žvačnih mišića koji čine nerazdvojivu celinu, sve više se upotpunjavalo u praksi, u nameri da se otklone tegobe koje prate ovaj poremećaj, čija je učestalost poslednjih godina značajno porasla. Mnogo toga se promenilo tokom proteklih decenija u načinu posmatranja etiologije, patogeneze, dijagnostike i terapije TMD (Guralnick, Kaban, and Merrill 1978, Laskin 2008) .

Tek '80 tih godina ove disfunkcije su postale pravi izazov za istraživače, jer su u potpunosti počeli da prepoznaju složenost ovog oboljenja. Poznato je da simptomatologija povezana sa ovim poremećajima nastaje ukoliko provokativni faktori pređu granicu kako fiziološke tolerancije pojedinca, tako i specifične tolerancije pomenutih kraniofacijalnih struktura. Ukoliko se na vreme ne otkriju to potencijalno vodi ka nastanku autoimunih oboljenja i hroničnih bolnih sindroma. Razlog da oboleli zatraže pomoć lekara je na prvom mestu bol. Bol se definiše kao kompleksno

multidimenzionalno iskustvo koje nastaje delovanjem štetnih toksina i prenosi se nociceptivnim nervnim putevima do centralnog nervnog sistema (Slika 1). Kao rezultat toga, nastaje oštećenje mišića, viličnih zglobova, parodontijuma zuba i samih zuba, što pacijenti prijavljuju ili ne, u zavisnosti od toga koliko su svesni smetnje i u kojoj meri je ona izražena. Orofacijalni bol se izdvaja kao najčešći znak i simptom TMD. TMD se inače smatra glavnim uzrokom hroničnog bola u orofacijalnoj regiji (Oakley and Vieira 2008). Bol može biti oštrog ili tupog karaktera, promenljivog intenziteta u zavisnosti od doba dana, akutnog ili hroničnog toka, sa ili bez pogoršanja pri žvačnim aktivnostima. Što je vreme trajanja bola duže to su i njegove kliničke karakteristike izraženije i često su praćene psihološkim simptomima kao što su gubitak apetita, poremećaj spavanja, zamor, gubitak libida. Pojava bola bitno utiče na obavljanje svakodnevnih aktivnosti kao i na socijalni život pojedinca. Neretko pacijenti prijavljuju osećaj beznada, anksioznost i neraspoloženje bilo da se radi o akutnom bolu koji je prolazan, protektivan, oštar po karakteru i kratkotrajan ili hroničnom koji traje dugo i značajnije utiče na kvalitet života.



Slika 1 Šematski prikaz prenosa bola do CNS-a

Preuzeto: Steven J. Scrivani, D.D.S., D.Med.Sc., David A. Keith, B.D.S., D.M.D., and Leonard B. Kaban, D.M.D., M.D., Temporomandibular Disorders

Primarno mesto gde se bol lokalizuje su mastikatorni mišići. Bol u mišićima (mijalgija) pacijenti uglavnom opisuju kao napetost i zamor mišića i vrlo često je praćen glavoboljom. Postoji čak i podatak da TMD pripadaju grupi oboljenja sa sekundarnom glavoboljom (International Headache Society) u Internacionalnoj klasifikaciji II oboljenja sa glavoboljama (Olesen and Steiner 2004). Ponekad se bol širi prema uhu, slepoočnoj i periorbitalnoj regiji, regiji viličnog ugla i vrata. Ovi pacijenti uglavnom navode i da imaju problem sa snom i da se teško uspavljaju. S tim u vezi, vrlo je specifičan i faktor karaktera ličnosti. Ovo potvrđuje i činjenica da su TMD učestalije kod osoba koje su po prirodi odgovorne, savesne, pedantne i perfekcionista tj. konstantno napete osobe češće prijavljuju zamor muskulature lica i vilica. Poremećaji mastikatornih mišića se prepoznaju po zaštitnoj kokontrakciji, lokalnoj mišićnoj osetljivosti, miofascijalnom bolu, miospazmu ili hroničnoj mijalgiji. Pacijenti sa problemima u viličnom zglobu uglavnom prijavljuju ograničene i neregularne kretnje donje vilice i bolove u temporomandibularnom (TM) zglobu (artralgija) (Okeson 2005, Dworkin and Burgess 1987). Bol u zglobu potiče iz receptora mekotkivnih struktura zgloba u koje spadaju ligamenti diska, ligament zglobne kapsule i retrodiskalna tkiva. Nadraženi nociceptori u zglobu dalje inhibitorno deluju na mišiće, samim tim i na kretnje donje vilice, koje postaju ograničene. U nekim slučajevima, početak je akutan i simptomi blagi, dok je kod pacijenata sa hroničnim temporomandibularnim disfunkcijama, prisutan dugotrajan bol sličnog karaktera i intenziteta kao kod pacijenata sa sindromom hroničnog bola u drugim delovima tela (arthritis, bol u leđima, fibromijalgija, hronične glavobolje i dr.) (Fordyce 1988, Parker, Holmes, and Terezhalmay 1993). Pri pokušajima da se pokrene donja vilica, kao što su žvakanje, govor, zevanje, smejanje, bol se pojačava. Pacijenti navode da im se vilica „zaključala“ bilo da je u poziciji zatvorenih usta kada iz tog položaja ne mogu da otvore ili kada iz položaja otvorenih usta, ne mogu da zatvore. Ovi simptomi su najizraženiji u jutarnjim satima, naročito kod pacijenata koji škripe i stežu zubima u toku spavanja. Pored ograničenih pokreta, uočava se i defleksija donje vilice tj. kontinuirano pomeranje sredine donje vilice ka oboleloj strani od početne do završne faze otvaranja uz prisustvo zvučnih efekata u zglobu kao posledica narušenih normalnih diskus-kondil kretnji. Defleksija kod bolnih mišićnih poremećaja nije prisutna tokom protruzijske

kretnje mandibule ali će biti prisutna tokom otvaranja usta i to na ipsilateralnu stranu ukoliko je bolni mišić sa kontrakturom lociran lateralno od TM zgloba (*m. masseter*, *m. temporalis*), odnosno na kontralateralnu stranu ukoliko je mišić lociran medijalno od viličnog zgloba (*m. pter. lateralis*). Kod intrakapsularnog poremećaja, bez obzira na prisustvo bola, donja vilica uvek skreće na stranu zahvaćenog zgloba. Odstupanje od pravolinijskog puta otvaranja usta do maksimalnog opsega može biti i u vidu devijacije, odnosno otklona sredine mandibule od pravolinijskog puta otvaranja koji nestaje pri kontinuiranom otvaranju do maksimalnog opsega.

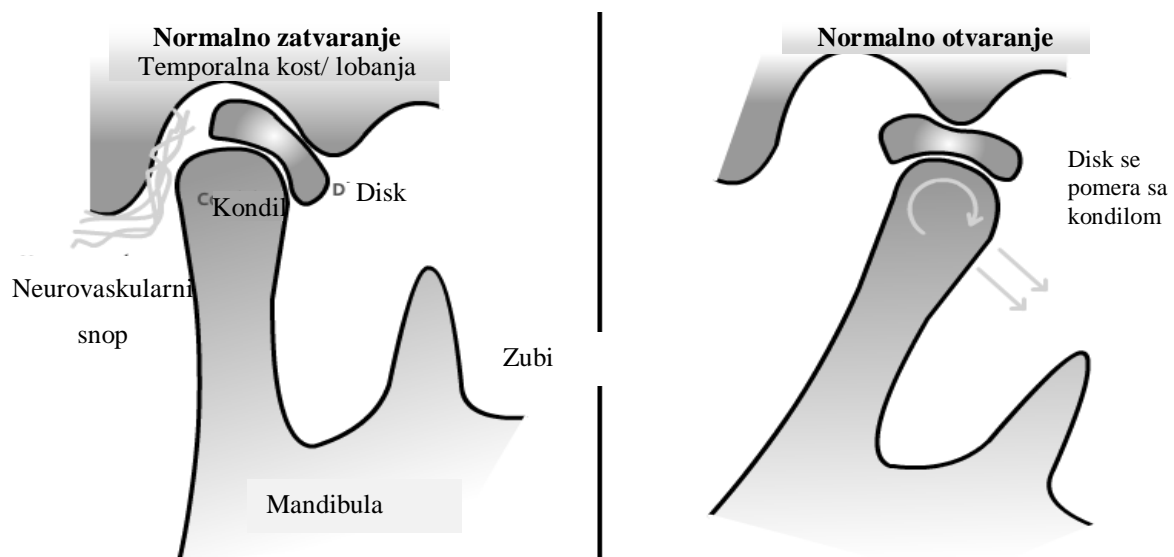
Kao što je napomenuto poremećaji mogu biti u samim strukturama TM zgloba (intrakapsularni poremećaji) i orofacijalnoj muskulaturi (ekstrakapsularni poremećaji) pa klasifikacija TMD olakšava diferencijalnu dijagnostiku ovih disfunkcija koje se najčešće međusobno uslovljavaju (de Leeuw 2008) (Tabela 1).

Tabela 1 Klasifikacija TMD

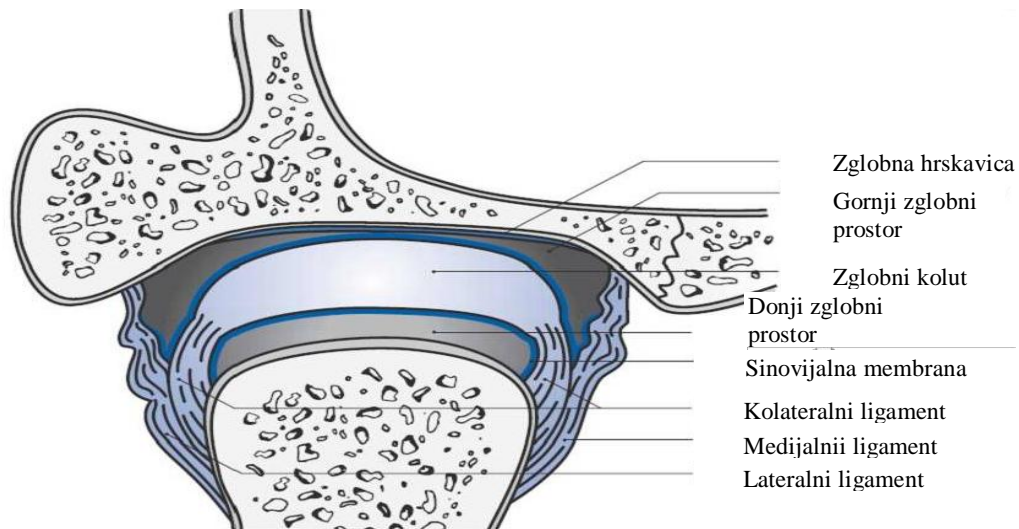
Zglobne disfunkcije	Disfunkcije mastikatornih mišića
Poremećaji kondil-diskus kompleksa	Miofascijalni bol
Degenerativne promene u zglobu	Lokalna mijalgija
Povrede TM zgloba	Miozitis
Hipermobilnost TM zgloba	Miospazam
Hipomobilnost TM zgloba	Mišićna kontraktura
Zapaljenski poremećaji	Neoplazme
Neoplazme	

1.1.1 Zglobni poremećaji

U okviru zglobnih disfunkcija najčešće se izdvajaju kao funkcijski poremećaji poremećaji kondil-diskus kompleksa. Fiziološka kretnja koja je normalno prisutna između kondila i diskusa je rotacija, a između kondil diskusnog kompleksa i zglobne jamice translacija (Slika 2), s obzirom da je diskus povezan za kondil lateralno i medijalno ligamentima (Slika 3).



Slika 2 Kretnja kondil diskusnog kompleksa



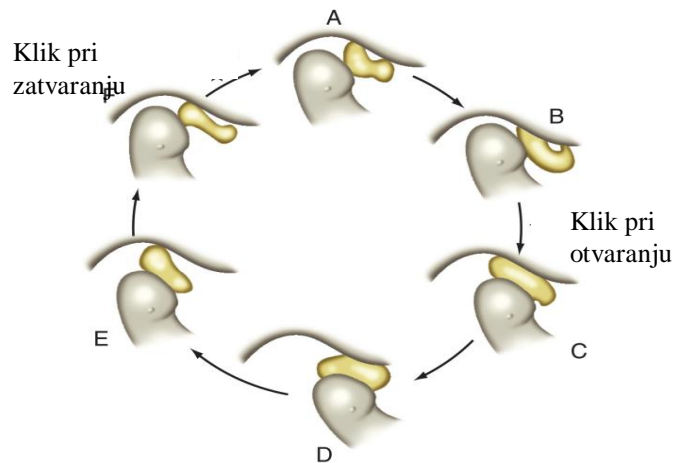
Slika 3 Ligamenti diskus artikularisa

Preuzeto: TMJ-NORMAL ANATOMY PPT Dentist BD

U toku kretnji diskus održava svoj položaj na kondilu zahvaljujući svom obliku i interartikularnom pritisku.

Kolateralni ligamenti diskusa onemogućavaju translatornu kretnju diskusa preko zglobne površine kondila i važno je napomenuti da takva kretnja nije prisutna u zdravom zglobu. Usled anteriorne dislokacije diskusa on je pomeren u prednji položaj između kondila i eminencije artikularis što pacijenti osećaju kao da je zglob zakočen jer su zglobne površine razdvojene.

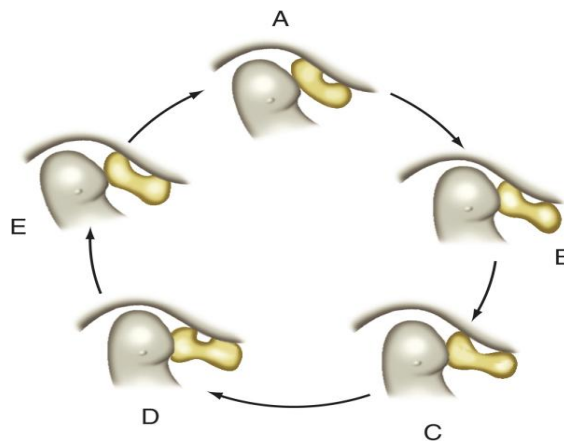
Pacijenti često mogu nesmetano da izvode lateralne i protruzijske kretnje i da vremenom prestane stanje zakočenosti, tako što prilagode kretnju kondila preko zadnjeg ruba diskusa. Tokom otvaranja usta kondil prelazi do intermedijarne zone diskusa i na taj način vraća dislocirani diskus ali u završnoj fazi zatvaranja diskus se ponovo dislocira anteriornomedijalno (Slika 4).



Slika 4 Dislokacija diskusa sa redukcijom

Ovaj stadijum poremećaja registruje se kao “recipročni klik” tj. predstavlja dislokaciju diskusa sa vraćanjem (redukcijom).

S druge strane, dislokaciju diskusa bez redukcije karakteriše nemogućnost vraćanja dislociranog diskusa u normalan položaj što pacijent prijavljuje kao da ne može maksimalno da otvori usta. U ovom slučaju klinički se uočava skretanje mandibule ka zakočenoj strani i bolna i ograničena kretanja na kontralateralnoj strani. Dislokacija bez redukcije je u literaturi poznata i kao ograničeno otvaranje usta (closed lock) (Farrar and McCarty 1979) (Slika 5).



Slika 5 Dislokacija diskusa bez redukcije

Pored toga, diskus artikularis može biti dislociran iz svoje normalne pozicije anteriorno, medijalno ili lateralno a da pri tome pacijent ima optimalan opseg otvaranja usta.

Povrede TM zgloba su ne tako retke i mogu uzrokovati poremećene odnose u strukturama zgloba. Bilo koje direktno ili indirektno dejstvo iznenadne sile smatra se makrotraumom koja najčešće rezultuje izduživanjem ligamenata diskusa. Labavljenje ligamenata dalje može prouzrokovati dislokaciju diskusa sa simptomima ukočenosti donje vilice i pojave zvukova u zglobu.

Mikrotrauma takođe nije beznačajna kada je reč o oštećenjima zglobnih površina iako je u pitanju dejstvo male sile. Imajući u vidu da se takva sila ponavlja duži vremenski period pojačava se trenje i smanjuje lubrikacija u zglobnom prostoru. Uglavnom nastaje zapinjanje zglobnih površina i promene u kretnji kondil-diskus kompleksa.

Kada govorimo o zglobnim disfunkcijama subluksacije (hipermobilnost) su takođe jedan od razloga zbog kojih pacijenti traže pomoć. Oni navode da pri maksimalnom otvaranju usta nisu u stanju da vrata vilicu u prvobitni položaj što se klinički uočava kao preaurikularno udubljenje usled pozicioniranih lateralnih polova kondila prema napred. Ova pojava je vrlo često praćena kratkotrajnom pauzom zbog naglog preskakanja kondila do maksimalno otvorenog položaja donje vilice. Zvuk koji se pri tome registruje je tup.

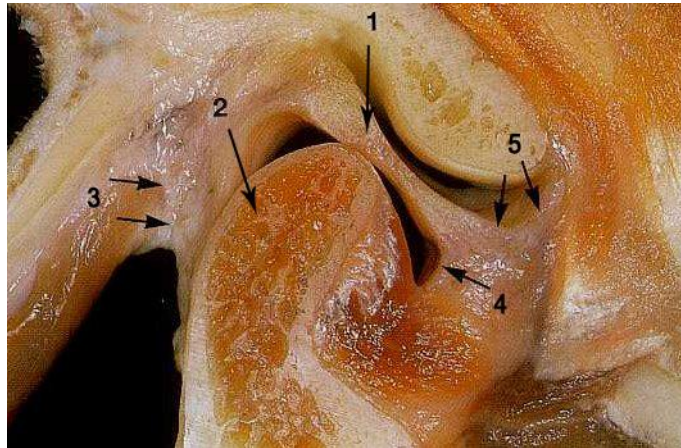
U grupu zapaljenskih promena TM zgloba spadaju sinovitis, kapsulitis, retrodiscitis i artritis u zavisnosti od toga koje tkivo zgloba je zahvaćeno inflamacijom. Klinički je teško razlikovati ih jer daju vrlo slične simptome. Takav primer su upala sinovijalnih tkiva unutrašnjosti zgloba i upala kapsule. Nešto prepoznatljivije za diferenciranje kapsulitisa jeste palpatorna osetljivost. Bolna faza u oba slučaja traje čak i kada zglob miruje. Retrodiscitis se javlja kada sile opterećenja na retrodiskalna tkiva koja su vrlo

prokrvljena i inervisana, prekorače prag podnošenja datog pritiska. Pojava artritisa takođe nije zanemarljiva s obzirom da su pri destruktivnim procesima značajno zahvaćene koštane strukture kondila i zglobne jame. Uglavnom sva ova oštećenja nastaju kao posledica traume i odlikuje ih prisustvo tupog konstantnog bola koji se pri kretanjama zgloba pojačava. To ih zapravo i razlikuje od dislokacije diskusa gde je simptomatologija blaža u vidu kratkotrajnog bola koji je povezan sa kretanjama zgloba.

Degenerativne promene u TM zglobu pripadaju grupi zglobnih poremećaja koje se ispoljavaju promenom oblika i strukture tvrdih tkiva zgloba. One nastaju usled narušene ravnoteže između anaboličkih i kataboličkih procesa u koje je uključena inicijacija, proliferacija i diferencijacija hondrocita odnosno sinteza i degradacija ekstracelularnog matriksa (ECM). Kada procesi razgradnje komponenti ECM nadvladaju sintezu obično su praćeni pojačanim oslobađanjem medijatora zapaljenja. Poznato je da su glavni inicirajući faktori: mehaničko opterećenje, polni hormoni i promene u sastavu ECM. Poslednja istraživanja govore u prilog uticaju estrogena i relaksina koji indukuju pojačano oslobađanje enzima matriksnih metaloproteinaza (MMP) iz fibrozne hrskavice TM zgloba (Nekora-Azak 2004). MMP razgrađuju kako velike molekule matriksa kao što su kolagen i proteoglikani, tako i manje tkivne molekule. Važno je napomenuti da su proteoglikani supstrati MMP3 i MMP9, a kolagen tip I i II za MMP1 i MMP13. Sve ovo govori u prilog tome da nikako ne treba zanemariti povećanu ekspresiju enzima iz grupe matriksnih metaloproteinaza u ekstracelularni matriks, koja posledično izaziva degenerativne promene u zglobu.

Jedinstvenost TM zgloba

TM zglob se po svom sastavu i razvoju razlikuje od ostalih zglobova u telu (Slika 6).



Slika 6 Građa TM zgloba

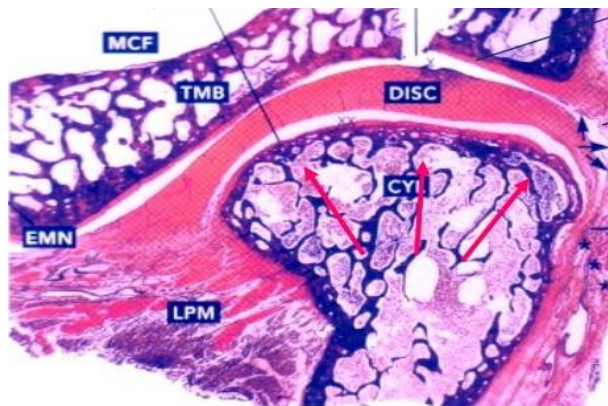
1. diskus artikularis
2. kondil
3. retrodiskalna tkiva
4. pripoj gornjeg snopa spoljašnjeg krilastog mišića
5. anteriorni kapsularni ligament

Simultanom aktivnošću oba TM zgloba učestvuju u izvođenju mandibularnih kretnji i stoga je neodvojiv međusobni uticaj jednog na drugi s obzirom da je parni i da se njihove funkcije prepliću.

Na ovaj način donja vilica artikulira sa lobanjom, jer kao što je poznato, kondil uzglobljen u jamicu slepoočne kosti sa pravilno interponiranim zglobnim kolutom između predstavlja celinu TM zgloba. Samim tim se ovaj zglob iako ima dve, može svrstati u one koje poseduju tri koštane površine. Zglobni kolut (discus articularis) balansira zahvaljujući svojoj fibrokartilaginoznoj strukturi i ne dozvoljava da ove dve zglobne površine dođu direktno u kontakt. Ovim preuzima ulogu treće koštane površine koja

omogućava složene pokrete zgloba. U toku kretnji diskus se prilagođava funkcionalnim zahtevima zglobnih površina, a ukoliko se pojave strukturne promene u samom zglobu i njegova morfologija se znatno menja. U zdravom zglobu kondil je pozicioniran u najtanjoj intermedijarnoj zoni, koja je napred i pozadi poduprta debljom zonom vezivnog tkiva. Diskus je superiorno i posteriorno omeđen retrodiskalnom laminom. Na donjoj granici retrodiskalnog tkiva nalazi se inferiorna retrodiskalna lamina koja je za razliku od superiorne bogatija kolagenim nego elastičnim vlaknima. Diskus je povezan sa kapsularnim ligamentom kako anteriorno i posteriorno tako i medijalno i lateralno. Na ovaj način je zglobni prostor podeljen na donju i gornju šupljinu (Slika 3).

Interesantan je podatak da postoje oboljenja koja zahvataju sve zglobove u telu osim TM zgloba. Jedna od glavnih različitosti u poređenju sa ostalim sinovijalnim zgobovima jeste prisustvo fibrozne a ne hijaline hrskavice u TM zglobu. Nju pre svega odlikuje prisustvo kolagena tip I i II, što nije slučaj sa hijalinom hrskavicom zglobova koja sadrži samo kolagen tip II (Mizoguchi et al. 1992). Prednost fibrozne hrskavice je što odoleva silama opterećenja znatno više nego hijalina (Milam 2005) (Slika 7).



Slika 7 Hrskavica TM zgloba

Preuzeto: www.slideshare.net

Vlakna fibrozne hrskavice su gusto raspoređena, čime se objašnjava i dobra otpornost TM zgloba na različite sile koje nastaju u toku kretnji donje vilice. Takođe,

manje podležu starenju u funkciji vremena i imaju sposobnost brze reparacije. S druge strane, nepovoljnost specifične građe TM zgloba je što predstavlja ciljno tkivo za brojne biomolekule kao npr. polne hormone, što vodi pomenutim patološkim procesima u zglobu. Treba spomenuti i specifičnost hrskavice kondila, koja kao sekundarna hrskavica nastaje iz nediferentovanih ćelija mezenhimalnog tkiva nakon što je koštano formirano intramembranoznom osifikacijom. Dakle, ne nastaje od progenitornih ćelija hrskavice mitozom što je slučaj sa hijalinom hrskavicom. Zato je kod osoba koje imaju neke tipove ahondroplazije prisutna tačkasta mutacija za arginin ili glicin, u genu za *FRF 3* receptor (fibroblastni faktor rasta), koja posledično dovodi do njegove konstantne aktivacije čime se značajno smanjuje proliferacija hrskavice. Hrskavicu kondila TM zgloba ne pogađa ova tačkasta mutacija upravo zbog specifičnosti njegovog sastava kao što je navedeno (Meikle 2007).

1.1.2 Mišićni poremećaji

Mišićne poremećaje pre svega karakteriše bol u mišićima koji pacijenti opisuju od blage nelagode do stanja neizdrživog bola. Simptomi su često povezani sa napetošću i zamorom mišića. Ranije teorije su čak opisivale povezanost stresa sa nastankom mišićnog bola i pojačanom mišićnom aktivnošću (Laskin 1969). U studiji Ohrbacha i saradnika navodi se da brojne terapijske tehnike koje se koriste u redukciji stresa (relaksacija, biofeedback terapija, savetovanje) značajno redukuju i intenzitet bola u mišićima (Ohrbach et al. 1998). Nastanak bola je posledica vazokonstrukcije nutritivnih arterijskih sudova i nakupljanja produkata metabolizma u tkivu mišića. U ishemičnom području otpuštaju se algogene supstance (prostaglandini, bradikinin) koje dovode do mišićnog bola (Layzer 1994, Okeson 1995).

Vrlo često se bol pojačava kao posledica istezanja ili kontrakcije mišića čija je funkcija već narušena. Takođe kao posledica se javlja i akutna malokluzija usled skraćanja radne dužine glavnih mišića stabilizatora donje vilice. Sa funkcionalnim

skraćanjem mišića zatvarača pacijent se obično žali na nemogućnost postizanja habitualne okluzije. Stoga je važno uskladiti uklanjanje mišićnog poremećaja i ispravljanje malokluzije.

Miofascijalni bol je vrsta mišićnog poremećaja koja se opisuje pojavom lokalnih područja pojačano osjetljivih snopova mišićnog tkiva poznatih kao "trigger" tačke. One pri palpaciji izazivaju bol. Razlikuje se od miospazma jer mišić nije u potpunosti skraćen s obzirom da je samo određeni broj motornih jedinica kontrahovan. Najčešći provokativni faktori koji mogu narušiti normalnu mišićnu funkciju su dugotrajne stomatološke intervencije, izrada neadekvatnih ispuna, unilateralno žvakanje i žvakanje tvrde hrane, preterano zevanje, dnevne i noćne parafunkcijske aktivnosti i sl. Tako se kao još jedna mišićna disfunkcija može javiti i zaštitna mišićna kokontrakcija, pri kojoj se antagonistička grupa žvačnih mišića aktivira iz protektivnih razloga. Smatra se da je protektivna mišićna imobilizacija odgovor CNS-a na bol (Bell 1990). Zapravo, regija mišićnog tkiva koja je isprovocirana i zahvaćena bolom, pri određenoj kretnji neće biti angažovana. Ovo se opisuje kao odbrambeni mehanizam mišića i ne spada u patološko stanje ali svakako daje početak kliničke slike disfunkcije mišića. Ukoliko je kokontrakcija dugotrajna, nastaje lokalna mišićna osjetljivost tzv. miogeni bolni poremećaj. Kada se mišićni bol javi kao posledica produžene kokontrakcije, tada i mišić postaje izvor dubokog bola koji stvara dodatne kokontrakcije. Samoobnavljajući bol postaje potpuno nezavistan od originalnog izvora bola, čak i kada se primarni uzrok bola ukloni. Takvo stanje naziva se ciklični mišićni bol. Vrlo je važno da kliničar prepozna ovu promenu, prema palpatornoj osjetljivosti mišića i povećanja intenziteta bola tokom funkcije. Pacijent ima poteškoće pri jakom otvaranju usta i izražena je umerena mišićna slabost. U ovom slučaju je najbitnije smanjiti mišićnu osjetljivost u cilju vraćanja snage mišića. Grupisanje zglobnih i mišićnih poremećaja je od velikog značaja za prepoznavanje disfunkcije i pronalaženje adekvatnog terapijskog rešenja.

Anamneza pomaže u razlikovanju zglobne i mišićne disfunkcije (Isacsson, Linde, and Isberg 1989, Bush, Whitehill, and Martelli 1989). Zglobni poremećaji najčešće imaju

početak u traumi, konstantni su i ne pogoršavaju se tokom vremena. Mišićni poremećaji, pa time i bol, vezani su za promenu nivoa emocionalnog stresa, bez vidljivog su uzroka i promenljivog su toka i intenziteta.

Međutim, i mišićni i zglobovi poremećaji mogu kao rezultat da daju ograničeno otvaranje usta i redukciju opsega ekscentričnih kretnji. Kod intrakapsularnih poremećaja ograničenje se javlja na 25-30 mm mereno interincizalno, uz tvrdi end-feel test primenom blage pasivne sile. Kada se radi o ekstrakapsularnom poremećaju, ograničenje otvaranja može biti na bilo kom nivou interincizalnog razmaka (često 8-10 mm) što je praćeno mekanim osećajem pri pasivnom otvaranju usta (meki end-feel test). Za ekstrakapsularne poremećaje karakteristične su neometane ekscentrične kretnje, dok je kod zglobnog poremećaja kretanja ka kontralateralnoj strani od bolnog i disfunkcionalnog TM zgloba ograničena.

Pored toga što je važno da kliničar prepozna koja je disfunkcija u pitanju, postavljanje prave dijagnoze i uspešno lečenje postižu se i razumevanjem etiologije, koja je multifaktorska i složena. Uzročni faktori su podeljeni na one koji povećavaju rizik za nastanak TMD - **predisponirajuće**, one koji uzrokuju početak - **inicirajuće**, i faktore koji imaju uticaj na oporavak ili pospešuju progresiju oboljenja - **perpetuirajuće**. Stoga, različita stanja i pridruženi simptomi koji se odnose na mastikatorne mišiće i temporomandibularne zglobove zahtevaju multidisciplinarni pristup u terapiji. U dosadašnjoj literaturi se u skladu sa prethodnom podelom kao uzročni faktori najčešće izdvajaju: kongenitalni poremećaji i razvojne anomalije, okluzalni faktori, trauma različitog porekla, psihogeni i patofiziološki faktori, odnosno različita sistemska i lokalna oboljenja koja mogu dovesti do degenerativnih promena na tkivima zgloba ili bolnih spazama orofacijalnih mišića kao i nedovoljna prilagodljivost neuromuskularnog sistema (Stanišić-Sinobad and Vukov 2001).

1.2 Etiologija TMD

Ako se osvrnemo na prve studije koje su se bavile etiologijom TMD, faktor okluzija se smatrao najodgovornijim za pojavu strukturnih i funkcionalnih poremećaja u TM zglobu i mastikatornim mišićima. James Costen je smatrao da je gubitak zuba jedan od glavnih faktora koji utiču na pojavu simptoma kao što su vrtoglavica, oštećenje sluha, zujanje u uhu, tupi bol u orofacijalnim mišićima i viličnim zglobovima (Costen 1997). On je ukazao na prolaznost i smanjenje problema u TM zglobu nakon nadoknade nedostajućih zuba i uspostavljanja adekvatne vertikalne dimenzije okluzije. Verovao je da je malokluzija i nepravilna pozicija donje vilice glavni razlog narušene funkcije TM zgloba i pojave facijalnog bola.

Okluzalne interference tipa prevremenih kontakata i mediotruzijskih smetnji navođene su kao uzrok nastanka mišićnoskeletnog bola. Ovakav koncept bazirao se na kliničkim ispitivanjima značajne redukcije mišićnoskeletnog bola nakon eliminacije štetnih kontakata. Pa ipak, epidemiološka istraživanja su pokazala da značajan postotak populacije ima interferentne kontakte ali bez prisustva mišićnoskeletnog bola (Seligman and Pullinger 1991).

Uloga neuravnotežene okluzije u etiologiji TMD do danas nije potpuno zanemarena, jer je poznato da fiziološki neoptimalna okluzija svakako dovodi do nesklada specifičnog kontaktnog odnosa zuba, neuromišićnog sistema i viličnih zglobova. Poznato je da okluzalne smetnje onemogućavaju normalno kliženje donje vilice iz centralnog položaja u ekscentrične položaje i nazad u centralni položaj i samim tim iniciraju nefiziološku aktivnost orofacijalnih mišića. U studijama Pullinger i saradnika je pokazano kako skeletna klasa II sa otvorenim zagrižajem, razlika između retrudovanog kontaktnog položaja (RKP) i IKP veća od 2mm, preklop zuba veći od 4 mm i nedostatak više od 5 zuba u bočnoj regiji mogu biti vrlo česta pojava kod pacijenata sa TMD. Pa ipak, zaključeno je da okluzalni faktori nisu najznačajniji u etiologiji TMD (Pullinger,

Seligman, and Gornbein 1993, Pullinger and Seligman 2000). S druge strane, neki autori su i dalje ukazivali da prisustvo okluzalnih smetnji kod osoba sa TMD može biti primarni uzrok degenerativnih promena i/ili remodelovanja TM zgloba (De Boever, Carlsson, and Klineberg 2000).

Veliki broj ranih studija je imao za cilj da ispita uspešnost primenjivanja ireverzibilne okluzalne terapije. To svakako potvrđuje da je okluzalni faktor u istoriji razmatranja patogeneze TMD dugo bio primaran (Forssell et al. 1999, Clark et al. 1999, Forssell and Kalso 2004, Koh and Robinson 2004).

Nešto kasnije, bolje razumevanje biomehanike u zglobu, neuromišićne fiziologije, različitih mehanizama bola definisalo je etiologiju TMD kao multifaktorsku.

Mnogi autori su isticali psihogene faktore kao značajne i da su upravo emotivna uznemirenost pacijenata, nepovoljni uslovi života, poremećaji ponašanja i bruksomanija sa stiskanjem i škrgutanjem zuba u velikoj meri povezani sa pojavom temporomandibularnih disfunkcija (Ash and Ramfjord 1995). Istraživanja su pokazala da emocionalna stanja poput anksioznosti i depresije mogu biti uzroci tenzije u maseteričnim mišićima (Rao and Glaros 1979). Stezanje vilica pri teškim fizičkim aktivnostima, grickanje olovke u toku učenja ili pisanja, zatim unilateralno žvakanje koje počinje zbog izbegavanja bola na jednoj strani zubnog luka, podupiranje donje vilice rukom za vreme čitanja ili gledanja televizije ili izvođenje specijalnih kretnji donje vilice prilikom sviranja nekih instrumenata spadaju u najčešće dnevne parafunkcije bihevioralne prirode. Neke od ovih štetnih navika mogu postati hronične i dovesti do pojave bolnih mišićnih i zglobnih disfunkcija (Carlsson and Magnusson 2000). U nekim istraživanjima se položaj tela, odnosno vratnog dela kičme razmatrao kao potencijalni predisponirajući faktor za TMD. Pa ipak, klinički posmatrano razlika između pacijenata sa mišićnim disfunkcijama i zdravih kontrola je bila isuviše mala i nije ukazivala na veću značajnost (Armijo-Olivo et al. 2011). S tim u vezi, bol u žvačnim mišićima je indirektno uslovljavao i

odgovarajući položaj tela, pre svega okolnih struktura TM zgloba. U literaturi se navodi i da neka degenerativna oboljenja poput juvenilnih idiopatskih artritisa, koja se manifestuju u fazi rasta i razvoja, značajno doprinose pojavi teških mandibularnih disfunkcija (Ahmed et al. 2004, Savioli et al. 2004).

Etiologija TMD se dugi niz godina istražuje sa osnovnim ciljem da se pronade adekvatan obrazac za što jednostavnije terapijsko rešenje koje bi bilo u skladu sa simptomatologijom.

1.3 Genetika i TMD

Godinama se smatralo da je udruženo delovanje različitih faktora sredine glavni uzročnik pojave TMD, a ne genetika (Eggleston 1980). Međutim, tokom poslednje dekade naučnici sve više ukazuju na uticaj nasledne osnove na pojavu oboljenja i na činjenicu da pojedinci nisu podjednako osetljivi. Stohler SC i saradnici smatraju da simptomi oboljenja TM zgloba treba da se sagledavaju kao kompleksna osobina koja je manje ili više uslovljena jedinstvenom genetičkom konstitucijom svakog pojedinca (Stohler 2004).

1.3.1 Genetički polimorfizmi

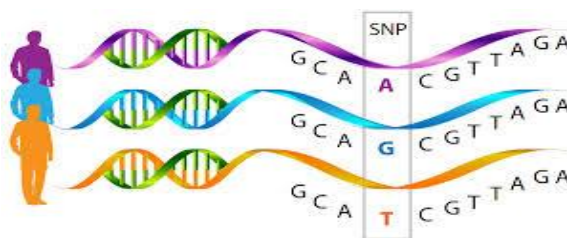
Jedarni genom čoveka sadrži oko 3,2 milijarde baznih parova po haploidnom setu i 25 000 – 30 000 gena. Varijabilnost (raznovrsnost) među jedinkama ili grupama jedinki u populaciji može se posmatrati na fenotipskom (morfološkom), citogenetičkom (hromozomskom), genskom nivou, nivou proteina. Genetička varijabilnost predstavlja svaku naslednu promenu u sekvenci molekula DNK. U zavisnosti od veličine sekvence DNK koju obuhvata, mogu biti tačkaste mutacije odnosno bazne supstitucije male insercije i delecije, velike insercije i delecije i hromozomski rearanžmani. Razlike u sekvenci DNK koje normalno postoje između individua jedne vrste sa učestalošću većom

od 1% su poznate kao polimorfizmi sekvence DNK. Različite forme postojanja jednog lokusa DNK su označene kao aleli. Neki lokus (gen) se smatra polimorfnim ukoliko u populaciji postoje bar dve njegove varijante (alela) a da je pri tome učestalost ređeg (ili najređeg alela) bar 1%. Iz ovoga proizilazi da učestalost zastupljenijeg alela ne iznosi više od 99%.

Postoji više različitih genetičkih, DNK polimorfizama:

- SNP (polimorfizmi pojedinačnih nukleotida, engl „single nucleotide polymorphism“)
- VNTR (varijabilni broj tandemskih ponovaka, engl „variable number of tandem repeats“)
- Del/Ins polimorfizmi-nastaju kao rezultat insercije ili delecije određenog segmenta DNK

Smatra se da je zastupljenost SNP čak 90% u odnosu na ostale polimorfizme (Collins i sar, 1997). SNP mogu biti lokalizovani u molekulu DNK u kodirajućem regionu (egzonu) ili nekodirajućem regionu (intronu) i u oba slučaja se obeležava predznakom “+”. Kada su lokalizovani unutar promotorskog regiona obeležavaju se predznakom “-“. Polimorfizam nukleotidne sekvence se javlja kao posledica tačkaste mutacije (Slika 8).



Slika 8 Polimorfizam nukleotidne sekvence (SNP)

Na osnovu sekvence humanog genoma procenjeno je da on sadrži više miliona tačkastih polimorfizama, tako da se genomi dve nasumično izabrane osobe razlikuju za 1 bp na svakih 1,25 kb. Ukoliko mutacija dovodi do promene aminokiseline u polipeptidu označava se kao nesinonimna. Ako se nalazi u intronu, 5' regulatornom regionu, 3' regionu koji se ne prevodi ili na onim nukleotidnim pozicijama unutar kodona (uglavnom treća pozicija) čija zamena ne utiče na strukturu proteina to su tzv. tihe ili sinonimne mutacije. Ukoliko usled supstitucije dođe do zamene kodona za jednu aminokiselinu kodonom za drugu i dođe do promene aminokiseline u odgovarajućem proteinu tada se govori o mutaciji sa pogrešnim kodirajućim značenjem (missense). Besmislene (nonsense) mutacije nastaju kada se kodon za jednu aminokiselinu zameni jednim od tri stop-kodona i dovode do prekida sinteze polipeptidnog lanca. Bilo koji tip tačkastih mutacija u promotorskom regionu može za posledicu imati promenu interakcije sa transkripcionim faktorom i dovesti ili do smanjene ili do prekomerne ekspresije polipeptida. Inserciono-delecione polimorfizme karakteriše insercija ili delecija određenog niza nukleotida. Ovi polimorfizmi mogu obuhvatiti jedan bazni par ili mikrosatelitne i/ili minisatelitne ponavljajuće sekvence. Delecije i insercije baza mogu biti sa promenom okvira čitanja (frameshift mutacije) a sreću se i delecije i duplikacije čitavih gena.

Polimorfizmi dužina sekvence su predstavljeni različitim brojem ponovaka u lokusima sa tandemski ponovljenim sekvencama. U proseku, na svake 2 kb humanog genoma se nalazi po jedan mikrosatelit u kojem broj ponovaka varira između različitih jedinki. Genetička različitost između jedinki potiče od postojanja mnogobrojnih lokusa sa različitim alelima.

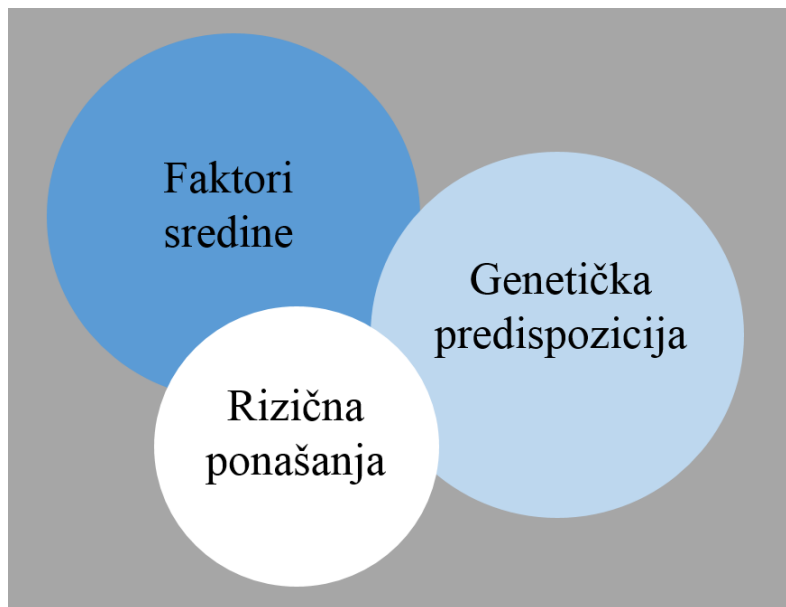
Pokazano je da polimorfizmi u genima mogu da utiču na aktivnost njihovih produkata-proteina (tzv. funkcionalni polimorfizmi) i da daju specifičnost bioloških karakteristika svakog pojedinca. Prisustvo određenih polimorfizama može da ukaže na smanjenu ili povećanu predispoziciju pojedinca za nastanak različitih oboljenja kao i na specifičan odgovor na terapiju. Naime, nosioci određenog genotipa imaju veći/manji rizik

za nastanak oboljenja, pa čak i da kod njih bude izražen neki od karakterističnih simptoma za dato oboljenje. Ovim se objašnjava kako razlike u genotipovima mogu značajno da utiču i na fenotip, odnosno težinu kliničke slike.

1.3.2 Pregled literature

Prve studije asocijacije otkrivaju genetičke faktore koji igraju ulogu u etiologiji TMD, među kojima se izdvajaju gen za glukokortikoidni receptor (*NR3C1*), gen za kalcijum/kalmodulin zavisnu protein kinazu 4 (*CAMK4*), gen za muskarinsko-holinergički receptor 2 (*CHRM2*), gen za interferon vezani regulator razvića 1 (*IFRD1*), gen za G protein-vezan receptor kinaze 5 (*GRK5*), gen za serotonin 2A receptor (*HTR2A*) i gen za katehol-O-metiltransferazu (*COMT*) (Smith et al. 2011).

Postoje značajne individualne razlike kada je reč o pojavi osetljivosti u vidu hroničnog orofacijalnog bola i njegovih karakteristika, što ukazuje na to da su TMD pod uticajem alela određenih polimorfnih gena koji su u interakciji sa faktorima sredine (Diatchenko et al. 2006) (Slika 9).



Slika 9 TMD – kompleksno oboljenje

Ovo objašnjava i činjenica da izlaganje eksperimentalnom bolu, primenjenom na mastikatornim mišićima nije izazvalo podjednaku percepciju bola, već je zavisilo od individualne aktivnosti μ -opioidnog sistema (Zubieta et al. 2001). To je dalje navelo istraživače da dokažu da je aktivacija μ -opioidnog sistema pod značajnim uticajem genotipova *COMT* koji određuju različitu percepciju bola i aktivnost mozga (Zubieta et al. 2003). Pokazali su da smanjena aktivnost *COMT* izaziva sporije metabolisanje kateholamina u poređenju sa genotipovima val/val, što uzrokuje veću osetljivost na bol, zbog smanjene aktivnosti analgezije posredovane opioidima. Slično su zaključili i drugi autori kako zamena valina metioninom usled prisustva polimorfizma menja termostabilnost proteina i izaziva smanjenje enzimske aktivnosti čak tri do četiri puta (Strous et al. 1997, Lachman et al. 1996). Diatchenko i saradnici takođe opisuju gen koji kodira *COMT* enzim, odgovoran za metabolizam kateholamina i estrogena, koji je umešan u početak nastanka TMD.

Isti autori su opisali najčešće gene odgovorne za bolne disfunkcije idiopatskog tipa (IPDs):

- *COMT*
- *Adrenergički receptor $\beta 2$*
- *Serotonin transporter 5 HT2A*
- *Monoamin oksidaza A*
- *Interleukin 1 β i α*
- i dr.

I druga istraživanja na temu TMD su sve više i više bila posvećena ulozi gena kao faktora predispozicije za pojavu TMD. Ulogu 5-HT transporter gena (*SLC6A4*) u predispoziciji za oboljevanje od TMD objasnile su prve studije koje su se bavile ovim polimorfizmom. (Mutlu et al. 2004, Von Korff, Le Resche, and Dworkin 1993). Druge studije opisuju kako polimorfizmi nekih gena kao što je promotorski region serotonin transportera (*SLC6A4*), mogu da se svrstaju u faktore predispozicije za više od jedne bolne disfunkcije kao što je FMS, sindrom hroničnog zamora i TMD (Ablin, Cohen, and Buskila 2006, Herken et al. 2001, De Vries et al. 2006).

Na značaj genetike u etiologiji TMD ukazali su i Kim i saradnici koji su opisali da bilo pozitivni ili negativni dizbalans u funkciji *ADRB2* povećava predispoziciju za oboljevanje od TMD za nosioce jednog haplotipa koji izaziva visoku ili nisku aktivnost adrenergičkog B2 receptora (*ADRB2*) (Kim, Neubert, Rowan, et al. 2004).

Neki autori su takođe uočili primetne razlike u incidenci TMD u zavisnosti od pola. Uloga hormona kod žena se navodi kao faktor rizika, pri čemu je polimorfizam gena koji kodiraju enzime uključene u metabolizam estrogena jedan od kandidata za nastanak TMD. Među njima se *COMT* pokazao kao najuticajniji. Prisustvo makar i jednog haplotipa sa visokom aktivnošću *COMT* vodi ka smanjenju rizika od nastanka TMD i do 2,3 puta (Oakley and Vieira 2008).

Razlike u modulaciji bola kod TMD između muškaraca i žena, pokazuju da je smanjen prag bola kod osoba ženskog pola na spoljašnje stimulanse. U literaturi se navodi podatak da je zastupljenost ovog oboljenja znatno veća kod žena nego kod muškaraca. U prilog ovome govore mnoge studije koje opisuju pojačanu komponentu bola kod žena u smanjenoj estrogen fazi menstrualnog ciklusa (Bhalang et al. 2005, Diatchenko et al. 2005, Bragdon et al. 2002, de Leeuw et al. 2006).

Utvrđeno je da estrogen bitno utiče na razvoj, remodelovanje i metaboličke procese u TM zglobu, a takođe i na njegove strukture kao što su kost, hrskavica i zglobni disk. Smanjenje koštane gustine dovodi se u vezu sa degenerativnim promenama TM zgloba. Poznato je da estrogen utiče na diferencijaciju osteoblasta, smanjenjem ćelijske proliferacije i regulacijom ekspresije ekstracelularnog matriksa, čime se takođe objašnjava molekularni mehanizam kojim ovaj hormon reguliše rast i remodelaciju koštanog tkiva (Robinson et al. 1997).

Istraživanja ukazuju i na to da estrogen i relaksin doprinose degenerativnim promenama u zglobu povećanom ekspresijom tkivnih degradacionih enzima koji pripadaju grupi matriksnih metaloproteinaza. MMPs razgrađuju glavne molekule matriksa: kolagen i proteoglikane, kao i većinu manjih proteina u matriksu. Studije pokazuju da MMP1-kolagenaza 1, MMP3-stromelizin 1, MMP9-92kDa želatinaza, MMP13-kolagenaza 3 imaju glavnu ulogu u hormonima posredovanoj degeneraciji zgloba kod miša i zeca (Kapila and Xie 1998).

Vežu između polimorfizma gena za α receptor estrogena i temporomandibularnih disfunkcija, uključujući bol u zglobu, mastikatornim mišićima, ograničene pokrete donje vilice kao i promene u koštanom tkivu kondila definisali su i Bum-Soo Kim i saradnici u svom istraživanju. Autori su prikazali relativno veću zastupljenost Px haplotipa (24%) kod osoba sa ograničenim otvaranjem usta, a PX (53,3%) kod osoba sa promenama na kondilu (Kim et al. 2010). Neki autori su smatrali da je TM zglob ciljno tkivo estrogena,

s obzirom da sinovijalna membrana u TM zglobu sadrži makrofage tipa A i fibroblaste tipa B, a estrogen receptori α mogu biti pronađeni u ćelijama fibroblasta tipa B (Nozawa-Inoue et al. 2003). Lee i saradnici su pronašli da polimorfizam ER α izaziva promene u dimenzijama donje vilice kod pacijenata sa simptomima osteoartritisa TM zgloba, pa se izvodi zaključak da estrogen može da utiče i na remodelaciju koštane komponente TM zgloba (Lee et al. 2006).

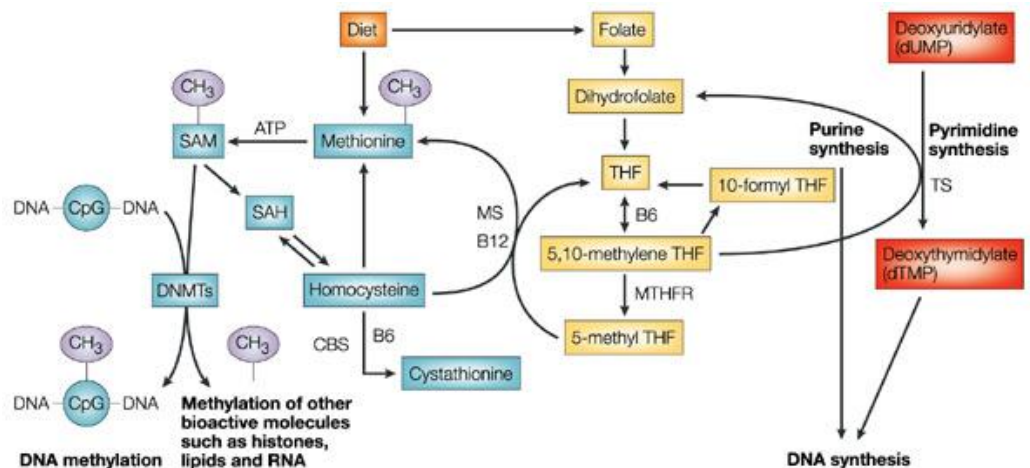
Prema najnovijim istraživanjima, individualne razlike u pogledu sklonosti ka razvijanju TMD pripisuju se u izvesnoj meri i polimorfizmima enzima uključenih u procese metilacije DNK i proteina (metilentetrahidrofolat reduktaza-MTHFR), zatim enzima zaduženih za oslobađanje organizma od produkata oksidativnog stresa (glutation S transferaze-GST) (Aneiros-Guerrero et al. 2011), kao i enzima uključenih u remodelaciju ekstraćelijskog matriksa (matriksne metaloproteinaze-MMP) (Planello et al. 2011). Različite alelne forme gena ovih enzima utiču na nivo ekspresije i stabilnost njihovih produkata (enzima), pa je razumno pretpostaviti da prisustvo genetičkih polimorfizama može predstavljati predisponirajući faktor za razvoj TMD.

1.3.3 Polimorfizam u genu za *MTHFR* C677T (rs1801133)

Literaturni podaci potvrđuju da genski polimorfizmi koji su u vezi sa metabolizmom folata značajno utiču na nastanak TMD. Metabolizam folata ima ulogu u završnoj fazi rasta ćelija i tkiva, preko sinteze nukleinskih kiselina i regulacije metilacije DNK i proteina. Nedostatak nutritivnih faktora, kao što su Vitamini B1, B6, B12 i/ili folne kiseline mogu sigurno da indukuju bol i mišićne disfunkcije, što potvrđuje i činjenica da je nedostatak ovih metaboličkih faktora česta pojava kod osoba sa TMD (Mehra and Wolford 2008).

Folna kiselina ima esencijalni značaj u procesima metilacije nukleinskih kiselina i proteina kao i u metabolizmu aminokiselina (Slika 10).

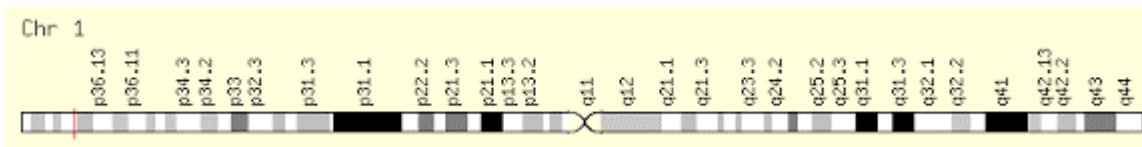
Unos vitamina B grupe takođe ima vrlo važnu ulogu u ciklusu folata. Vitamin B₁₂ je odgovoran za održavanje stalnog folatnog puta. B₆ i B₁₂ su ključni kofaktori metabolizma folne kiseline, poznatog pod nazivom metabolizam C1–ostatka, koji uključuje grupu enzima od kojih je jedan metilentetrahydrofolat reduktaza (MTHFR). Enzim metilentetrahydrofolat reduktaza katalizuje prevođenje 5,10–metilentetrahydrofolata u 5–metiltetrahydrofolat, koji je donor metil grupe u različitim procesima i ima esencijalnu ulogu u procesu metilacije i reparacije DNK molekula, preko uključenja u metabolizam folne kiseline i ciklus folata u organizmu. MTHFR usmerava ciklus u pravcu obnavljanja folatnog pula (katalizujući sintezu 5,10–metil–THF) na račun DNK i RNK biosinteze i ima ključnu ulogu u raspodeli folata između dva glavna puta, biološke metilacije i nukleotidne sinteze. Depoi folne kiseline se stalno obnavljaju i nalaze se u jetri, bubrezima i intestinalnoj mukozi. 5,10 MTHFR je enzim iz grupe flavoproteina, sastoji se iz dve identične subjedinice veličine od oko 70 kDa. N terminalni domen proteina ima katalitičku ulogu a u okviru tog domena se nalazi mesto za vezivanje kofaktora flavin adenin dinukleotid (FADAH) i nikotin amid-adenin di nukleotid (NADPH).



Nature Reviews | Cancer

Slika 10 Metabolički put folata i uloga MTHFR

U strukturi gena za *MTHFR* (Slika 11) otkriveno je više polimorfnih mesta, a najčešće su zastupljene bazne supstitucije na 677. i 1298. baznoj poziciji.



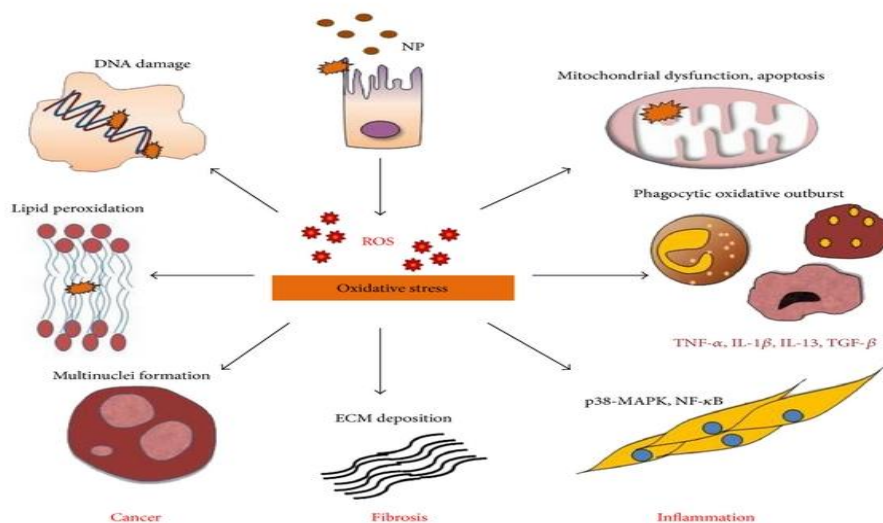
Slika 11 Gen za *MTHFR*

Supstitucija C>T u 4 egzonu na poziciji 677 u genu za *MTHFR* predstavlja polimorfizam nukleotidne sekvence (SNP) i dovodi do ugradnje valina umesto alanina na 222. poziciji u polipeptidnom lancu usled prelaska kodona GCT u kodon GTT. Ovo dalje vodi izmenjenoj enzimskoj aktivnosti proteinskog produkta, čija je forma termolabilna. Osobe sa *MTHFR* 677 TT genotipom, tj. homozigoti za ovu alelsku varijantu, imaju enzimsku aktivnost smanjenu na 30% u odnosu na normalnu, dok osobe heterozigoti, sa CT genotipom, imaju enzimsku aktivnost koja iznosi 60% normalne aktivnosti. U zavisnosti od genotipa ravnoteža u procesima metilacije/sinteze DNK može da varira. Samim tim je razumljivo zašto mnoge studije danas usmeravaju pažnju na uticaj ovog polimorfizma na povećanu predispoziciju za nastanak brojnih poremećaja.

1.3.4 Polimorfizmi u genima za glutation S transferaze (*GSTM*, *GSTT*)

Mnoga današnja istraživanja su bazirana i na ispitivanju količine određenih biomarkera u pljuvački i serumu, čije različite koncentracije ukazuju na prisustvo inflamacije i bola. Tako su neki autori zaključili da je koncentracija salivarnih i serumskih biomarkera oksidativnog stresa značajan prediktor jačine bola kod osoba sa TMD (Rodríguez de Sotillo et al. 2011).

Oksidativni stres predstavlja stanje, koje nastaje kada pojačana produkcija slobodnih radikala nadvlada sposobnost organizma da ih eliminiše (Slika 12).

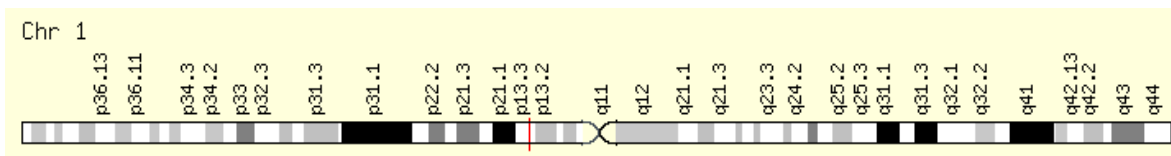
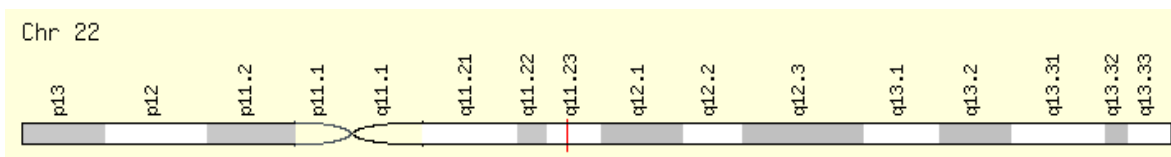


Slika 12 Oksidativni stres

Preuzeto: www.hindawi.com

Kao vrlo bitan faktor takođe odgovaran za narušavanje ove ravnoteže jeste i antioksidativni odbrambeni sistem svakog pojedinca. Postoje enzimi koji pripadaju grupi glutation S transferaza (**GSTM1** i **GSTT1**) i imaju važnu ulogu u procesima detoksikacije organizma. Ovi enzimi su članovi dve superfamilije glutation transferaza. Manju superfamiliju čine mikrozomalni enzimi koji su uključeni u metabolizam arahnoidonske kiseline. Veća superfamilija je predstavljena citosolnim glutation transferazama (veći broj izoenzima) koje učestvuju u reakcijama biotransformacije toksičnih materija endogenog i egzogenog porekla (Hayes JD i Strange, 2000) kojima su živi organizmi konstantno izloženi. Iz ograničenog broja gena nastaje veći broj enzima karakterističnih po binarnim kombinacijama homo i heterodimernih subjedinica. Svaka subjedinica ima aktivno mesto sa dva funkcionalna regiona (G i H). G mesto služi za vezivanje glutationa i vrlo je specifično prema glutationu i slično je kod svih izoenzima GST. H-hidrofobno mesto služi za vezivanje elektrofilnog supstrata, nije usko specifično prema supstratima i veoma se razlikuje kod različitih subjedinica GST. Subjedinice GST ispoljavaju nezavisnu katalitičku aktivnost. Superfamilija ovih enzima posreduje u reakciji konjugacije elektrofilnih jedinjenja sa glutationom (GSH) u fazi II biotransformacije. Konjugacija sa glutationom smanjuje toksičnost elektrofilnih

jedinjenja čineći ih manje reaktivnim prema nukleofilnim grupama u važnim biološkim makromolekulima, kao što su nukleinske kiseline, proteini i lipidi. GST-aze katalizuju i reakciju konjugacije GSH sa endogenim produktima oksidativnog oštećenja lipida, DNK, kateholamina. Takođe se kao ligandi nekatalitički mogu vezati za veliki broj molekula. Zbog svega navedenog, ovi enzimi učestvuju u modulaciji ćelijskog odgovora na endogene ili egzogene elektrofile, inflamaciju, oksidativni stres na veliki broj lekova, ali mogu uticati i na ćelijski ciklus. GSTM (Mu) i GSTT (Teta) pripadaju grupi citosolnih tj. solubilnih GST-aza i najčešće se ispituje uticaj polimorfizama u njihovim genima na pojavu raznih oboljenja kod ljudi. Gen za *GSTM1* se nalazi na 1p13 i kao i drugi geni za GST-aze iz ove klase, ima 8 egzona, a gen za *GSTT1* se nalazi na 22q11 i poseduje 5 egzona (Slika 13, Slika 14).

Slika 13 *GSTM1* genSlika 14 *GSTT1* gen

Produkti ekspresije *GST* gena su različiti izoenzimi glutation S-transferaze, koji se razlikuju po svojim strukturnim, fizičko-hemijskim i imunološkim osobinama. Ekspresija različitih izoenzima varira u zavisnosti od vrsta ćelija i uslovljava kapacitet određenog tkiva za detoksikaciju.

Polimorfizmi u oba gena (i za *GSTM1* i za *GSTT1*) su delecionog tipa, odnosno nedostaje celi gen, a deletirani aleli se nazivaju nulti aleli. Značajan je podatak koji se

navodi u literaturi da je delecija *GSTM1* (*GSTM1*0* ili *-/-*) gena zastupljenija kod osoba sa TMD u poređenju sa kontrolnom grupom (Aneiros-Guerrero et al. 2011). Potvrđeno je i da je kod homozigota za nulti alel *GSTT1* gena odsutna ekspresija izoenzima.

1.3.5 Polimorfizam u genu za *MMP9* -1562 C/T (rs3918242)

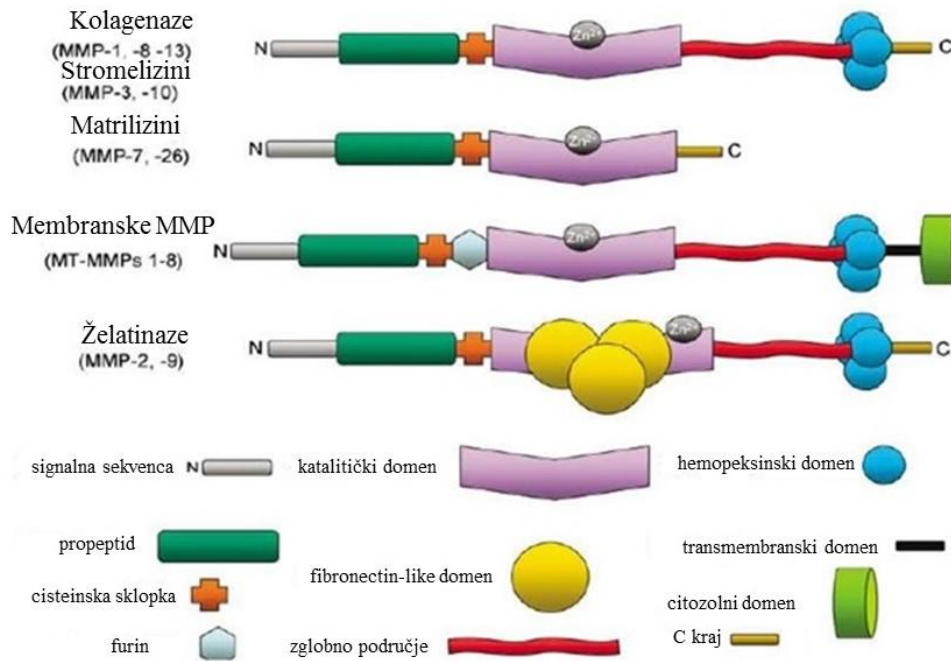
Neke studije navode da je u 80% obolelih od TMD prisutna dislokacija diskusa, bolovi u zglobovima, osteoartritis i osteoartritis (Plesh et al. 2005, Manfredini, Chiappe, and Bosco 2006). Literaturni podaci govore u prilog tome da je vrlo česta posledica hroničnog bruksizma upravo remodelovanje artikulirajućih površina zgloba i perforacije diskusa articularisa (Attanasio 1991, Guichet 1982, Hatcher, Blom, and Baker 1986).

Degenerativne promene u viličnom zglobovima nastaju usled progresivnog gubitka ekstracelularnog matriksa, posredovanog hondrocitima i fibrohondrocitima poreklom iz fibrozne hrskavice zgloba, koji se u znatnoj meri oslobađaju kad se naruši ravnoteža između sinteze i degradacije matriksa. Pa ipak, malo se zna o predisponirajućim faktorima za degenerativna oboljenja zgloba. Imajući u vidu da je građa viličnog zgloba nešto drugačija nego što je u ostalih zglobova u telu, određene specifičnosti otkrivaju nam mogući uticaj nekih faktora za ove promene u zglobovima. Poznato je da TM zglob čini kondil smešten u mandibularnoj jami slepoočne kosti. Između ove dve koštane strukture nalazi se zglobni kolica sačinjen od gustog fibroznog vezivnog tkiva bez prisutnih krvnih sudova i nervnih vlakana.

Zona hrskavice je smeštena kao najpovršniji sloj vilične glavice (kondila) i odgovorna je za preraspodelu opterećenja u funkciji žvakanja. Histološka građa ove zone podrazumeva 4 sloja. Protein superficijalne zone kondila i diskusa (SZP) spada u grupu velikih proteoglikana koji se sintetišu i oslobađaju u sinovijalni fluid zgloba, koji je vrlo važan lubrikant i smanjuje trenje između zglobnih površina. Jedna studija je razjasnila i uticaj ćelijskih medijatora na njegovu ekspresiju, a koji takođe mogu da doprinose i

reparaciji kondila (Ohno et al. 2006). Proliferativna zona (II sloj) je ispunjena ćelijama nediferentovanog mezenhimalnog tkiva čija je glavna uloga stvaranje zglobne hrskavice. Treću zonu čine zrele ćelije hrskavice, mada neki autori smatraju da ove ćelije ipak imaju sposobnost dalje proliferacije. Ova zona je bogata kolagenim vlaknima tipa I i II i zahvaljujući njoj zglob odoleva silama pritiska i lateralnim silama (Suda et al. 1999). IV najdublje lokalizovana zona odgovorna je i za remodelaciju tkiva i naziva se hipertrofična zona hondrocita koji učestvuju u stvaranju koštanog tkiva kalcifikacijom hrskavičavih spikula sa kristalima hidroksiapatita.

Uloga enzima koji iniciraju remodelovanje ECM postaje sve interesantnija istraživačima, jer se modifikovanjem njihove funkcije znatno povećava zastupljenost raznih degenerativnih oboljenja. **Matriksne metaloproteinaze** (MMP) pripadaju grupi proteolitičkih Ca i Zn zavisnih enzima, koju čine 23 strukturno slične endopeptidaze koje regulišu interakciju ćelija sa ekstraćelijskim matriksom. Ovi enzimi su odgovorni za razgradnju različitih molekula ekstraćelijskog matriksa (kolagena, proteoglikana, manjih proteina u matriksu), kao i kontrolu signala matriksnih molekula koji regulišu rast i razvoj ćelija. Oni postaju aktivni tek nakon uklanjanja 10 kDa amino-terminalnog propeptida tj. prodomena (interakcija SH (Cys) u pro i Zn^{2+}) jer su početno sintetisani kao transmembranski ili pro-enzimi (Slika 15). Mogu se aktivirati različitim agensima, članovima MMP familije ili raznim drugim proteazama a dalje kao takve mogu učestvovati u aktivaciji drugih MMPaza.



Slika 15 Matriksne metaloproteinaze (MMP)

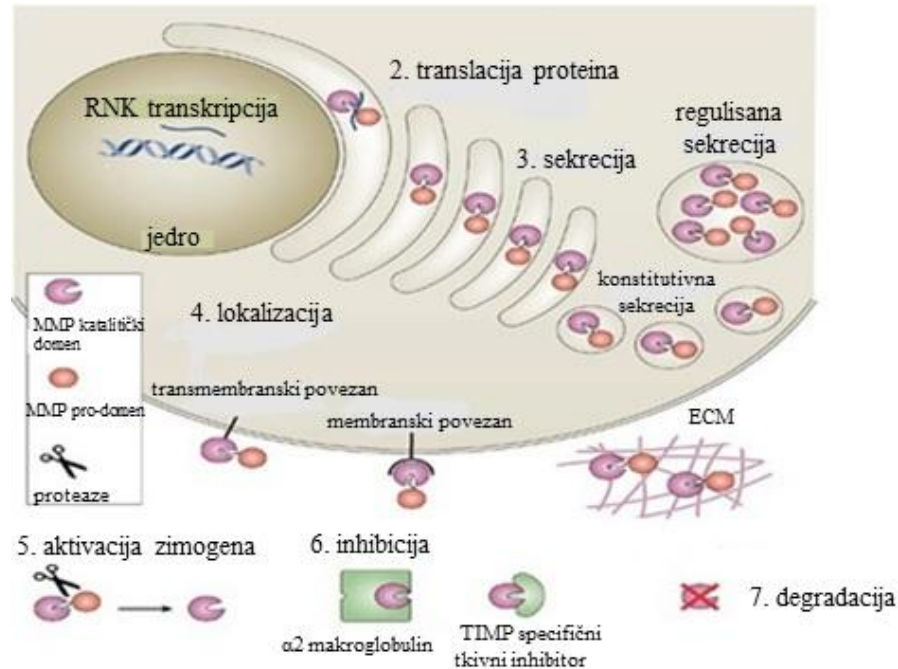
Matriksne metaloproteinaze se uglavnom sastoje od:

- Propeptida ili pro-domena (pro)
- Katalitičkog domena (cat)
- Peptida koji povezuje (cat sa Hpx) ili zglobnog područja (L1)

Na osnovu supstrata koji razgrađuju mogu se svrstati u 6 podgrupa kao: kolagenaze, želatinaze, stromelizini, matrilizini, membranske MMP i ostale MMP. Zajedničke strukturne karakteristike MMP-a su motivi koji vezuju Zn^{2+} unutar katalitičkog domena (HEXXHXXGXXH) i motiv cisteinske „sklopke“ unutar propeptida (PRCXXPD).

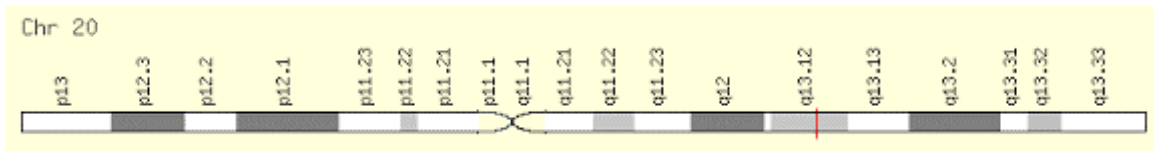
Količina tkivnih MMP se drastično povećava u toku remodelovanja ECM. Neravnoteža između aktivnosti MMP i njihovih kako tkivnih inhibitora tako i

nespecifičnih endogenih inhibitora kao što je $\alpha 2$ makroglobulin podstiče pojačanu razgradnju ECM (Slika 16).



Slika 16 Aktivacija matriksnih metaloproteinaza

MMP-9 (želatinaza B) je inducibilan enzim koji se aktivira uklanjanjem prodomena (~10 kD) koji biva odvojen delovanjem MMP-2,-3,-13 ili plazmina, mada se MMP-3 izdvaja kao najčešći aktivator (Goldberg i sar., 1992.). Glavni supstrati enzima MMP9 su kolagen IV i želatin, pa je poznat u literaturi i pod nazivom 92kDa tip IV kolagenaza ili želatinaza B. MMP9 sadrži fibronectin-like domen ugrađen unutar katalitičkog domena, verovatno radi boljeg vezivanja za supstrat. MMP-9 takođe sadrži i kolagen-V-like domen, koji povećava specifičnost i jače vezivanje za supstrat. Gen za želatinazu B (MMP-9) nalazi se na hromozomu 20q11.2-q13.1 i ima 13 egzona (Huhtala i sar., 1991) (Slika 17).

Slika 17 Gen za *MMP-9*

Polimorfizam u promotoru gena za *MMP-9*, na poziciji -1562 je SNP (C>T) a ova bazna supstitucija utiče na nivo ekspresije enzima. Pored nekoliko polimorfnihih promena u regulatornom regionu gena -1562 C/T polimorfizam dovodi do povećanja promotorske aktivnosti ovog gena (Zhang i sar., 1999) i do izmenjene transkripcije. Upravo je ovaj polimorfizam doveden u vezu sa sklonošću ka različitim oboljenjima među kojima se u literaturi navode ateroskleroza (Zhang i sar., 1999), reumatoidni artritis (Jackson i sar., 2001) i brojne neurodegenerativne bolesti (Ilzecka i sar., 2001).

Mnoge studije su ispitivale povezanost polimorfizama u promotoru gena za *MMP*, ukazujući na promenu u njegovoj ekspresiji, koja ima značajan uticaj na degenerativna oboljenja (Barlas et al. 2009, Astolfi et al. 2006, Ye et al. 1996). Narušava se ravnoteža u sintezi i degradaciji ekstracelularnog matriksa TM zgloba usled nagomilavanja različitih katabolita matriksnih metaloproteinaza, pre svega zapaljenskih modulatora, u sinovijalnoj tečnosti (Dijkgraaf et al. 1995, Srinivas et al. 2001, Kubota et al. 1998). Stoga se *MMP* smatraju glavnim proteolitičkim enzimima, koji dovode do destrukcije ECM TM zgloba (Wadhwa and Kapila 2008). U studiji Planella i sar. ukazuje se na ulogu *MMP-1* polimorfizma u degenerativnim promenama TM zgloba (Planello et al. 2011). Isti autori nisu pronašli da polimorfizam *MMP-3* i *MMP-9* gena utiče na degenerativne promene u zglobovima. I drugi autori su došli na ideju da ispituju *MMP-1* polimorfizam, ali nasuprot prethodnim rezultatima, nisu pronašli povezanost *MMP-1* polimorfizma sa progresijom reumatoidnog artritisa i drugih degenerativnih oboljenja zglobova uključujući TM zglob (Taskin et al. 2011).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Radna hipoteza

Polimorfizmi gena za metilentetrahidrofolat reduktazu (*MTHFR*), glutation S-transferaze (*GSTM1*, *GSTT1*), matriksnu metaloproteinazu (*MMP9*) mogu da utiču na nastanak temporomandibularnih disfunkcija i njihove karakteristike.

Cilj istraživanja

Osnovni ciljevi ove disertacije su da se ispita povezanost polimorfizama u genima uključenim u kontrolu sinteze DNK i metabolizam folata (*MTHFR*), detoksikacije (*GSTM1*, *GSTT1*) i remodelacije ekstraćelijskog matriksa (*MMP9*) sa nastankom temporomandibularnih disfunkcija, kao i da se ustanovi eventualna asocijacija između genotipova različitih polimorfizama i kliničkih karakteristika pacijenata sa TMD.

U okviru ciljeva istraživanja doktorske disertacije definisani su sledeći zadaci:

1. Utvrđivanje osnovnih epidemioloških i kliničkih parametara u grupi sa TMD.
2. Utvrđivanje učestalosti alela i genotipova za polimorfizam pojedinačnog nukleotida *MTHFR* 677C>T, delecioni polimorfizam u *GSTM1* i *GSTT1* genima i promotorski polimorfizam pojedinačnog nukleotida *MMP9* -1562 C>T u grupi pacijenata sa temporomandibularnim disfunkcijama i u kontrolnoj grupi.
3. Ispitivanje asocijacije polimorfizama navedenih gena i rizika za nastanak temporomandibularnih disfunkcija, na osnovu razlike u distribuciji učestalosti alela i genotipova između TMD grupe i kontrolne grupe.
4. Utvrđivanje povezanosti genotipova sa kliničkim fenotipom u okviru TMD grupe.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Kriterijumi za odabir pacijenata

Istraživanje je sprovedeno kao prospektivna klinička studija u koju su bile uključene dve grupe ispitanika. Studijsku grupu činilo je 100 pacijenata, koji su došli na Kliniku za stomatološku protetiku i Kliniku za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, sa nekim od simptoma temporomandibularnih disfunkcija, kod kojih je utvrđen ovaj poremećaj. Kontrolnu grupu činila su 182 zdrava ispitanika, heterogena po polu i starosti, kod kojih nije prisutan nijedan znak ni simptom TMD.

Pacijenti

Kriterijumi uključenja u studiju bili su:

Pacijenti kod kojih je prisutan neki od simptoma i znakova TMD:

- bol u preaurikularnom predelu
- bol ili osetljivost pri palpaciji mastikatornih mišića
- ograničeni i/ili bolni pokreti donje vilice
- defleksija donje vilice tokom otvaranja usta
- prisustvo zvučnih efekata pri pokretu otvaranja usta
- ukočenost donje vilice
- i dr.

Kriterijumi isključenja iz studije:

- Pacijenti koji su imali traumatske povrede glave i vrata, anomalije kranijuma poznate ili nepoznate etiologije
- Pacijenti kod kojih se kliničkim pregledom utvrdilo da je bol dentogenog porekla, neurogenog, vaskularnog, inflamatornog ili u vezi sa tumorskim promenama iz okolnih struktura (uvo, grlo, oko, nos, sinusi).
- Pacijenti koji su imali neko drugo hronično oboljenje, koje narušava opšte stanje ispitanika i daje lažnu sliku disfunkcija
- Pacijenti sa mentalnom retardacijom, bolestima zavisnosti

3.2 Klinička ispitivanja

Ispitanicima obe grupe izvršen je detaljan klinički pregled orofacijalnog sistema kako bi se utvrdilo eventualno postojanje znakova i simptoma temporomandibularnih disfunkcija. Pacijenti s prisutnim simptomima i znacima temporomandibularne disfunkcije su bili uključeni u studiju, pošto su ispunjavali postavljene kriterijume. Svi ispitanici su bili detaljno informisani o protokolu istraživanja. Kliničkim pregledom i funkcijskom analizom orofacijalnog sistema ispitanika na osnovu protokola **RDC/TMD** evidentirao se jedan ili više simptoma mišićne i/ili zglobne bolne disfunkcije (Dworkin and LeResche 1992). Istraživanje je podrazumevalo uzimanje anamneze, klinički pregled pomoću uputstava datih standardnim dijagnostičkim protokolom za temporomandibularne disfunkcije (*Research Diagnostic Criteria, RDC/TMD*) predloženog od strane *Dworkin-a* i *LeResche-a* (1992), kao i pomoćne dijagnostičke rendgen procedure ukoliko je bilo neophodno (lateralni snimak TM zgloba pri otvorenim i zatvorenim ustima, snimak po Šileru). Standardizovani protokol za temporomandibularne disfunkcije, *Research Diagnostic Criteria* (RDC/TMD) primenjen je u okviru dijagnostičkog postupka podeljenog u dva dela. Prvi deo je obuhvatao kliničku sliku TMD (*Axis I*), dok se drugi deo odnosio na bol i psihosocijalni status ispitanika (*Axis II*). Svaki ispitanik se

pridržiavao opštih uputstava za popunjavanje obrasca RDC/TMD i u skladu sa tim je bio dužan da da samo jedan odgovor. Ispoštovani su svi principi za pravilna merenja u cilju postavljanja dijagnoze TMD. Meren je opseg kretnje donje vilice u vertikali u toku aktivnog otvaranja usta bez bola, maksimalno aktivnog otvaranja usta, maksimalno pasivnog otvaranja usta. Takođe je zabeležen vertikalni preklop sekutića u položaju maksimalne interkuspacije. Posmatrane su i kretnje donje vilice u desnu, levu stranu i napred. Otvaranje usta je registrovano kao pravo (bez skretanja donje vilice), sa defleksijom/ devijacijom u desno ili u levo.

Pri kliničkom pregledu su takođe praćena standardna uputstva za palpiranje mišića i viličnih zglobova. Pregled mišića podrazumevao je uobičajenu metodu za utvrđivanje osetljivosti, lokalizacije i stepena bola digitalnom palpacijom tela i pripoja mišića (Burch 1977).

Ekstraoralna palpacija mišića vrši se laganim pritiskom jagodicama kažiprsta i srednjeg prsta na određena mesta. Donja vilica je u položaju fiziološkog mirovanja. Mišići se palpiraju prstima jedne ruke dok se drugom rukom daje potpora i održava stabilnost glave. Ispitanik bi trebalo da napravi razliku između palpatorno provociranog bola i pritiska. Ukoliko je bol prisutan ispitanik ga klasifikuje kao blagi, umereni ili jaki bol.

- M.temporalis (prednja vlakna) – palpiraju se neposredno iznad zigomatičnog luka.
- M.temporalis (srednja vlakna) – palpiraju se oko 2 cm iza zadnje ivice obrve.
- M.temporalis (zadnja vlakna) – palpacija se vrši pomerajući prste od pozadi iza uha ka prednjoj granici uha.
- M.maseter (gornji pripoj) – palpacija gornjeg pripoja maseteričnog mišića započinje 1 cm ispred TM zgloba, neposredno ispod zigomatičnog luka, idući napred ka prednjoj granici mišića.
- M.maseter (telo mišića) – palpacija se izvodi od prednje ivice mišića ispod zigomatične kosti prema dole i nazad u pravcu ugla donje vilice.

- M.maseter (donji pripoj) – palpira se područje oko 1 cm iznad i ispred ugla donje vilice.
- Zadnji mandibularni region (m.stylohyoideus/m.digastricus posterior) – Glava ispitanika treba da bude blago zabačena unazad. Palpira se područje između zadnje ivice mandibule i prednje ivice m. sternocleidomastoideus-a, medijalno i nazad od ugla donje vilice. Prsti bi trebalo da budu usmereni unutra i gore.
- Submandibularna regija (m.pterygoideus medialis, mm.suprahyoidi, m.digastricus anterior) – palpacija započinje 2 cm ispred ugla mandibule, a prsti su usmereni unutra i gore. U slučaju provociranog bola odredi se da li bol potiče od mišića ili inflamiranih regionalnih limfnih čvorova.

Intraoralna palpacija mišića

- M.pterygoideus lateralis – ispitanik pomera donju vilicu na stranu koja se ispituje. Kažiprst desne ruke terapeut pozicionira na alveolarni greben, paratubarno i lagano pomera gore i unutra, iza gornjih molara.
- M.temporalis (tetiva) – nakon palpiranja spoljašnjeg krilastog mišića rotira se kažiprst u ustima upolje, a ispitanik dodatno, koliko može, otvori usta kako bi se palpirao najviši aspekt prednje ivice koronoidnog nastavka.

Prisutan bol pri normalnoj funkciji ili palpaciji ukazivao je na mišićnu disfunkciju. Najčešći uzrok tome uglavnom je bila hiperaktivnost mišića ili trauma. Uz palpaciju i testove funkcijske manipulacije, primenjeno je prethodno pomenuto merenje opsega otvaranja usta u kombinaciji sa „end-feel“ testom i merenje opsega ekscentričnih kretnji, kao i praćenje puta srednje linije mandibule tokom otvaranja (defleksija i devijacija) (McCarroll et al. 1987). Osobe koje su prijavljivale bol u mišićima elevatorima nesmetano su mogle da izvode ekscentrične kretnje sa umerenim opsegom.

Bol ili osetljivost viličnog zgloba ispituje se digitalnom palpacijom (lateralni pol) ispred tragusa ušne školjke u predelu TM zgloba tako što se ispitanik zamoli da lagano otvara usta dok se ne oseti na jagodici kažiprsta kretnja lateralnog pola kondila donje vilice unapred.

Zadnji pripoj zglobne kapsule palpiran je kroz spoljne ušne kanale. Jagodice malih prstiju treba da budu okrenute ka napred i uvučene u oba ušna kanala. Ispitanik lagano otvara usta kako bi se osetio pokret u TM zglobovima. Izvrši se pritisak ka napred, naizmenično levo pa desno dok su zubi u maksimalnom kontaktu kroz spoljašnji ušni kanal u mirovanju i pri kretnjama mandibule. Disfunkcija TM zgloba se može ispoljiti kao zvuk u zglobu i kao ograničenje zgloba (raspon otvaranja usta i ekscentričnih kretnji, putanja otvaranja). Prisustvo ili odsustvo zvukova nam je ukazivalo na položaj zglobnog diska.

Prisustvo zvučnih efekata u TM zglobu prilikom otvaranja i zatvaranja usta

Jagodice levog i desnog kažiprsta terapeut prisloni u predeo levog i desnog TM zgloba i pritom pacijentu kaže da lagano otvara usta maksimalno koliko može bez obzira na moguće prisustvo bola pri ovoj kretnji, a da zatim lagano zatvara usta do položaja maksimalne interkuspacije. Svako ispitivanje se ponovi tri puta. Nalaz se može potvrditi i upotrebom stetoskopa sa otvorenim zvonom.

Kao rezultat ispitivanja može se dobiti:

- zvučni efekti nisu prisutni
- klik, kratkog, ograničenog trajanja sa jasnim početkom i završetkom; potvrđuje se kao rezultat ispitivanja samo ako se uočio dva puta od moguća tri ponavljanja kretnje.
- grube kreptacije, ispoljavaju se zvukom koji traje duže vreme pri pokretu donje vilice. Zvuk nije prigušen i posledica je kliženja kosti preko druge kosti.
- fine kreptacije, kao zvukovi u vidu škripanja koje traje duže vreme pri otvaranju ili zatvaranju usta ali su prigušeniji od prethodno navedenog. Opisuje se vrlo često kao zvuk trenja po hrapavoj površini.

Zvuk se potvrđuje pri otvaranju usta ako se registruje u dva od moguća tri ponavljanja pokreta otvaranja iz položaja maksimalne interkuspacije do položaja maksimalno otvorenih usta.

Zvuk se potvrđuje pri zatvaranju usta ako se registruje u dva od moguća tri ponavljanja pokreta zatvaranja iz položaja maksimalno otvorenih usta do položaja maksimalne interkuspacije.

Recipročni klik javlja se i pri otvaranju i pri zatvaranju usta i za njega je karakteristično da nestaje prilikom otvaranja usta iz protruzionog položaja donje vilice.

Prisustvo zvučnih efekata pri lateralnim i protruzionoj kretnji donje vilice

Ispitanik donjom vilicom izvodi pokrete levo-nazad, desno-nazad, napred-nazad, kao i tokom prethodnog ispitivanja, pri čemu su jagodice levog i desnog kažiprsta oslonjene preaurikularno, u predeo levog i desnog viličnog zgloba. Registruje se prisustvo zvučnih efekata u toku kretnji. Svaki pokret se ponavlja tri puta.

Dislokacija diskusa je mogla da bude prisutna čak i u odsustvu zvukova u zglobu. (Westesson, Eriksson, and Kurita 1989). Različiti zvukovi u zglobu mogu da se manifestuju u vidu pojedinačnog škljocaja (*klik*), glasnog pojedinačnog škljocaja (*pop*) i složenog zvuka struganja, drobljenja (*krepitacija*).

Odvojene studije opisuju da se zvukovi u zglobu mogu identifikovati metodom digitalne palpacije ili pogodnim instrumentima kao što su konvencionalni stetoskop sa otvorenim zvonom i modifikovani stetoskop kojim se prate zvuci u oba TM zgloba (Isberg 2001). Postoje i elektronski uređaji sa mikrofonom koji se postavlja u spoljašnji ušni kanal ili na kožu lica u projekciji TM zgloba, koji konvertuju zvuk u vizuelni signal –*sonograf* (Widmalm et al. 2002, Widmalm, Djurdjanovic, and McKay 2003, Widmalm et al. 2003). Pojava zvukova u TM zglobu objašnjava se remećenjem normalnog protoka sinovijalne tečnosti usled abnormalnog odnosa zglobnih struktura (Yavelow and Arnold 1971), nastanku negativnog pritiska (Unsworth, Dowson, and Wright 1971) i kontaktom

kondil-temporalna kost nakon savladavanja mehaničke prepreke, što je potvrđeno sineradiografijom i sinematografijom viličnog zgloba (Isberg 2001).

Dislokaciju diskusa articularisa sa redukcijom dijagnostikovali smo na osnovu:

- prisustva recipročnog klika u TM zglobu (klik pri otvaranju i zatvaranju usta i njegovo nestajanje ako se otvaranje i zatvaranje odvija iz protruzionog položaja donje vilice)
- prisustva recipročnog klika u TM zglobu pri otvaranju i zatvaranju usta kao i prisustvo klika pri protruziji i/ili nekoj od laterotruzionih kretnji donje vilice

Za potvrdu dijagnoze dislokacije diskusa articularisa bez redukcije uočavali smo ograničen opseg otvaranja usta a poremećaj je praćen i sledećim promenama:

- maksimalno aktivno otvaranje usta manje od 35 mm.
- maksimalno pasivno otvaranje usta je za 4 mm ili manje većeg opsega u odnosu na maksimalno aktivno otvaranje usta.
- kretanja donje vilice na kontralateralnu stranu manja je od 7 mm.
- defleksija sredine donje vilice na ipsilateralnu stranu.
- odsustvo zvučnih efekata u TM zglobu ili prisustvo zvukova koji nisu karakteristični za dislokaciju diskusa sa redukcijom.

Kod diskokacije diskusa articularisa bez redukcije a sa optimalnim opsegom otvaranja usta anamnestički se utvrđuje:

- povremeno ograničenje opsega otvaranja usta.
- maksimalno aktivno otvaranje usta veće od 35 mm.
- maksimalno pasivno otvaranje usta je za 5 mm ili više većeg opsega u odnosu na maksimalno aktivno otvaranje usta.
- kretanja donje vilice na kontralateralnu stranu veća je od 7 mm.

- defleksija sredine donje vilice na ipsilateralnu stranu.
- prisustvo zvučnih efekata u TM zglobu koji nisu karakteristični za dislokaciju diskusa sa redukcijom.

Pacijenti koji su prijavljivali bol u predelu TM zgloba pri maksimalnom aktivnom otvaranju usta i maksimalnom pasivnom otvaranju, kao i pri lateralnim kretnjama donje vilice svrstavani su pod dijagnozu kapsulitisa. Ovaj poremećaj praćen je palpatornom osetljivošću lateralnih polova jednog ili oba TM zgloba kao i zadnjeg pripoja kapsule. U ovom slučaju grube krepitacije nisu bile prisutne, što je dodatno ukazivalo na zapaljenje zglobne kapsule.

Vrlo sličnu kliničku sliku je imao i osteoartritis s tim da je pored prethodno navedenih kliničkih znakova i simptoma bilo neophodno uočiti i prisustvo jednog ili oba znaka dole navedena:

- a. grube krepitacije u TM zglobu.
- b. na tomografskom radiogramu uočava se erozija zdrave kosti, skleroza dela ili celog kondila i artikularne eminencije, zaravnjenje zglobnih struktura, prisustvo osteofita.

Kao glavni anamnestički i klinički parametri za utvrđivanje degenerativnih promena u TM zglobu izdvajale su se grube krepitacije u TM zglobu i/ili na tomografskom radiogramu erozija zdrave kosti, skleroza dela ili celog kondila i artikularne eminencije, zaravnjenje zglobnih struktura, prisustvo osteofita. Zatim odsustvo bola sa ili bez palpatorne provokacije kao i pri maksimalnom aktivnom otvaranju usta, maksimalnom pasivnom otvaranju i pri lateralnim kretnjama donje vilice.

Pri postavljanju dijagnoze koja se odnosila na mišićne disfunkcije protokol RDC/TMD isključuje retka stanja kao što su mišićni spazam, miozitis i kontrakture mišića. Miofascijalni bol je registrovan kod pacijenata sa palpatorno osetljivom

preaurikularnom regijom, regijom lica, vilica, slepoočnica. Bol je bio prisutan kako u funkciji tako i u miru. Ovi pacijenti su pokazivali bolnu reakciju na palpaciju 3 ili više lokacija od palpiranih 20 mesta pri čemu se leva i desna strana posmatraju odvojeno. Karakteristični znaci i simptomi koji su potvrđivali dijagnozu miofascijalnog bola sa ograničenim otvaranjem usta bili su sledeći:

- prisustvo miofascijalnog bola kako je prethodno definisano
- aktivno otvaranje usta manje od 40 mm.
- maksimalno pasivno otvaranje usta za 5 mm ili veći iznos od aktivnog otvaranja usta.

Psihosocijalni status ispitanika zabeležen je kao stanje umerene, izražene ili izuzetno izražene depresije i dodatno vrednovan 0-4 psihološkim promenama koje utiču na kvalitet života. Pacijentima je ponuđena lista određenih funkcija orofacijalnog sistema koje se otežano odvijaju usled prisustva TMD, a intenzitet bola smo vrednovali na skali od 0-10, pri čemu je 0 odgovarala stanju bez bola a 10 stanju neizdrživog bola. Takođe nam je bio važan podatak izmenjenosti socijalnih kontakata i radne sposobnosti zbog bola koja je na isti način vrednovana kao skala bola. Pacijenti su navodili i vreme kada se bol prvi put pojavio, vrednost najjače doživljenog bola u proteklih 6 meseci kao i prosečnu vrednost bola u proteklih 6 meseci.

Na osnovu svih prikupljenih podataka dobijenih anamnezom i kliničkim pregledom (uključujući i eventualna dopunska ispitivanja) imali smo detaljne informacije o znacima i simptomima temporomandibularnih poremećaja.

3.3 Molekularno-genetička ispitivanja

U okviru eksperimentalnih ispitivanja korišćeni su uzorci genomske DNK u vidu brisa sa obrazne sluzokože. Bris sluzokože sa obe unutrašnje strane obraza uziman je pomoću sterilnih štapića za uzimanje brisa, kod obe grupe ispitanika. Svaki uzorak brisa bio je dobro prosušen pre zatvaranja ependorfe i čuvan na -20°C do izolacije. Izolacija

DNK je rađena prema uputstvima proizvođača komercijalnim kitom (Kapa Express Extract DNA Extraction Kit, KapaBiosystems).

3.3.1 Izolacija DNK iz brisa obrazne sluzokože

Vatice sa štapića zajedno sa reakcionom smešom za izolaciju stavljanje su u tubice zapremine 500 μ l. Smeša za izolaciju DNK se sastojala iz 285 μ l vode, 15 μ l pufera i 2 μ l enzima. (10xkapa express extract buffer, 1 μ / μ l kapa express extract enzyme, PCR grade water, sample). Posle vorteksovanja sledilo je inkubiranje na temperaturi od 75°C u trajanju od 10 minuta kako bi se postigla liza ćelije, a zatim na temperaturi od 95°C 5 minuta inaktiviranje enzima proteaze.

Ponovljeno je vorteksovanje par sekundi, pa centrifugiranje 1 minut na 13000 o/min. Dobijeni supernatant je čuvan u sterilnim tubicama na temperaturi +4°C pripremljen za dalju analizu. Koncentracija i čistoća genomske DNK na osnovu kojih se određuje količina uzorka DNK koji se stavlja u PCR reakciju, određeni su direktnim očitavanjem sa spektrofotometra (BioPhotometer, Eppendorf), a kvalitet izolovane DNK je proveren puštanjem uzoraka (5 μ L izolovane DNK + 1 μ L boje) na 1,5% agaroznom gelu. Uzorci koji nisu pokazali jasno definisanu traku na gelu, već razmaz, nisu rađeni, jer su fragmentisani. Nakon izolacije DNK primenjivali smo PCR/RFLP analizu (lančana reakcija polimeraze i restrikciona analiza) u cilju genotipizacije obe grupe ispitanika za polimorfizme u *MTHFR* i *MMP9* genima, a za polimorfizme delecionog tipa kod *GSTMI* i *GSTTI* korišćena su dva pristupa: multipleks PCR i real time PCR metode. Kod PCR/RFLP pristupa, prvo su lančanom reakcijom polimeraze (PCR) dobijene amplifikovane specifične DNK sekvence, a zatim je restrikcionom analizom koja se zasniva na korišćenju restrikcionih endonukleaza postignuto isecanje u okviru tih specifičnih sekvenci. Analizom specifičnih obrazaca traka, dobijeni su rezultati o genotipskim distribucijama, koji su obrađeni primenom Hi kvadrat (χ^2) testa radi utvrđivanja razlika u distribuciji različitih alela i genotipova među grupama ispitanika,

testova senzitivnosti i specifičnosti kao i logističkom regresionom analizom za utvrđivanje rizika od oboljevanja.

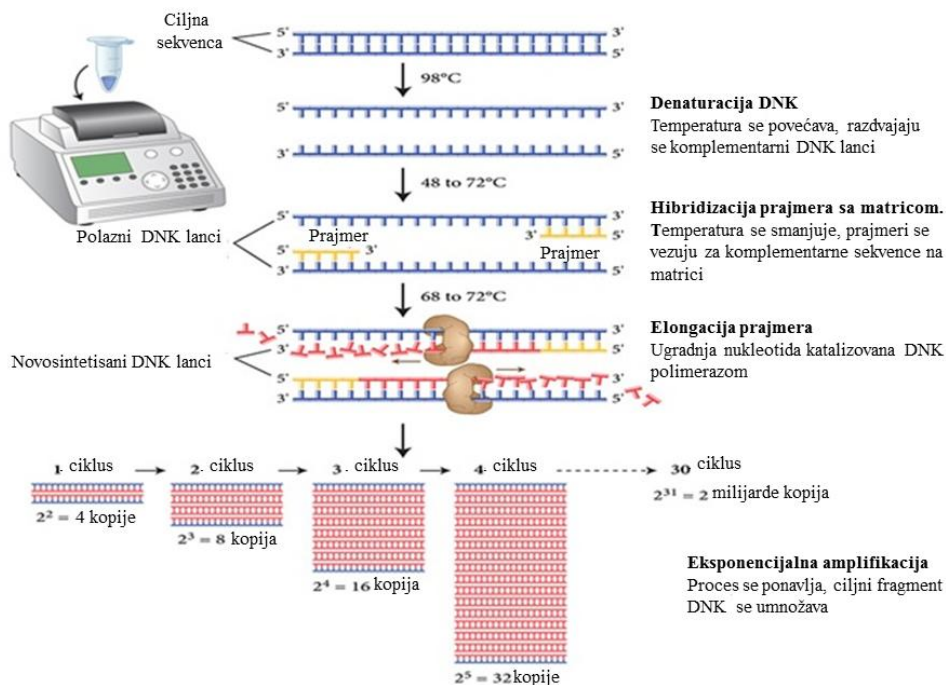
3.3.2 Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze je in vitro umnožavanje određene sekvence DNK molekula koja u suštini imitira sintezu (replikaciju) DNK. Za odvijanje ove reakcije potrebni su prajmeri u vidu dva oligonukleotida koji su komplementarni krajevima sekvence koja se umnožava. Specifični DNK fragment se eksponencijalno amplifikuje i ovu sintezu katalizuje termostabilna DNK polimeraza. Svaki ciklus podrazumeva denaturaciju DNK, hibridizaciju prajmera i elongaciju hibridizovanih prajmera. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihovu veličinu određuje rastojanje između sekvenci koje prajmeri prepoznaju. Za in vitro sintezu DNK potrebne su sledeće komponente PCR reakcione smeše koja je volumena od 5 do 100 µl:

- uzorak DNK koja se kopira;
- prajmeri, oligonukleotidi za otpočinjanje sinteze DNK, komplementarni krajevima sekvence koja se kopira;
- nukleotidi, gradivni elementi DNK;
- Taq polimeraza, termostabilna DNK polimeraza koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa DNK matricom. Optimalna temperatura za rad ovog enzima je 72°C, na kojoj ugrađuje 150 nukleotida u sekundi;
- joni Mg (Mg^{2+}) čije prisustvo aktivira rad Taq polimeraze koja je metaloprotein. Joni Mg takođe grade komplekse sa dNTP ovima i dodatno ih stabilizuju, a kao takvi predstavljaju supstrate za DNK polimerazu;
- pufer, neophodan za optimalnu aktivnost Taq polimeraze;

Za izvođenje PCR metoda (Slika 18) potrebna je mikrotuba zapremine 0,2-0,5ml koja podleže preciznim cikličnim promenama temperature u PCR aparatima. DNK sinteza

se odvija u 25-40 ponovljenih ciklusa. Svaki novosintetisani lanac predstavljaće matricu za dalje umnožavanje i na taj način se broj amplifikovanih sekvenci povećava. Reakcija traje oko 2 sata i dobija se 10⁶-10⁹ kopija određenog DNK fragmenta.



Slika 18 Šematski prikaz lančane reakcije polimeraze (PCR)

Svaki PCR ciklus sastoji se iz tri postupka:

1. Termalna denaturacija DNK, raskidanje vodoničnih veza između dva komplementarna lanca DNK, kako bi došlo do hibridizacije prajmera. Izvodi se inkubacijom PCR reakcione smeše na 95°C;
2. Hibridizacija prajmera sa matricom, uspostavljanje vodoničnih veza između prajmera i komplementarne sekvence na matrici. Izvodi se na temperaturi od 42°C do 65°C u zavisnosti od dužine i nukleotidne sekvence prajmera;

3. Elongacija prajmera, ugradnja nukleotida na 3' krajevima prajmera (sinteza DNK) katalizovana termostabilnom DNK polimerazom. Odvija se na temperaturi od 72°C (optimalna temperatura za rad Taq polimeraze);

Veoma često se pre temperaturnih ciklusa u reakciju uvodi i inicijalna denaturacija, 5-10min na 94°-95°C radi kompletne denaturacije DNK matrice, a po završetku temperaturnih ciklusa i finalna elongacija na 72°C u trajanju 5-15 minuta pri čemu dolazi do kompletiranja parcijalno sintetisanih PCR produkata.

Amplifikacija je proveravana elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu. Dokaz uspešne amplifikacije je bilo postojanje diskretne trake na gelu, koja je odgovarala dužini željenog fragmenta. Gel elektroforeza je eksperimentalna tehnika kojom se molekuli proteina, DNK i RNK mogu međusobno razdvojiti na osnovu razlika u veličini, tipu i količini naelektrisanja i specifičnoj konformaciji. Na ovaj način se postiže različita pokretljivost ovih molekula u električnom polju. Molekuli DNK su negativno naelektrisani zahvaljujući fosfatnim grupama tako da se uvek kreću od negativne elektrode (katode) ka pozitivnoj (anodi).

Poliakrilamidni gel koji smo koristili za elektroforezu u svom sastavu sadrži sledeće komponente:

Tabela 2 Poliakrilamidni gel

ddH₂O	3,6 ml
5x TBE pufer	1,2 ml
Akrlamid (AppliChem)/Bisakrlamid (AppliChem)	1,2 ml
APS 10%	42 µl
N, N', N'-tetrametilendiamina-TEMED (AppliChem)	7,8 µl

Bojeno u vodenom rastvoru etidijum bromide (1% rastvor, 10 mg/ml, AppliChem);

Pre nalivanja u bunariće uzorci se mešaju sa bojom za nalivanje (6X DNA Loading Dye: 10mM Tris-HCL (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60mM EDTA, Fermentas); U jedan od bunarića se naliva DNK marker, služi za potvrdu dužine PCR produkta (100bp DNA Ladder, Fermentas).

Priprema i izvođenje PAA gel elektroforeze se sastoje od:

1. Pripreme gela određene koncentracije zavisno od dužine fragmenata koje je potrebno razdvojiti/vizuelizovati;
2. Pripreme ploča i nalivanja gela;
3. Postavljanja ploča u aparaturu nakon vremena potrebnog za polimerizaciju gela (oko 30 min);
4. Nalivanja uzoraka u bunare u gelu (uz predhodno mešanje sa bojom), nalivanja DNK markera i „puštanja” elektroforeze na određenoj voltaži (230V);
5. Bojenja gela etidijum-bromidom nakon završene elektroforeze i vizuelizacije razdvojenih fragmenata u transiluminatoru;

3.3.3 PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za *MTHFR*

MTHFR C677T polimorfizam

Za pripremu PCR smeše korišćeni su sastojci koji su detaljno prikazani u tabeli (Tabela 3).

Tabela 3 Komponente PCR smeše

Pufer	2,5µl
dNTP	0,5µl
Forward prajmer	0,5µl
Reverse prajmer	0,5µl
Taq polimeraza	0,2µl
Voda	17µl
DNK	2µl
MgCl ₂	2µl

Tabela 4 Sekvence prajmera i PCR reakcija *MTHFR*

Gen	Sekvence prajmera				Veličina PCR produkta
MTHFR 677C > T	5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGCA-3'				198bp
	5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'				
inicijalna denaturacija	denaturacija	hibridizacija	elongacija	finalna ekstenzija	
5 minuta 95° C	1 minut 94° C	1 minut 60° C	1 minut 72° C	5 minuta 72° C	
35 CIKLUSA					

Ovi prajmeri ograničavaju segment DNK dužine 198 bp. Uspešnost reakcije potvrđivalo je prisustvo diskretne trake na 8% PAA gelu.

3.3.4 Restrikciona digestija PCR produkata u analizi polimorfizma gena za *MTHFR*

Ovako dobijeni PCR produkt veličine 198 bp je podvrgnut restrikcionalnoj digestiji u kojoj je korišćen restrikcioni enzim Hinf I. Restrikcionalna analiza podrazumeva amplifikaciju specifične sekvence u kojoj se odigrala mutacija tipa nukleotidne zamene, tj. supstitucije C>T na poziciji 677, restrikcionalnu digestiju amplifikovanog fragmenta i proveru veličine produkata digestije elektroforezom na PAA gelu (Slika 19).

Restrikcionalna digestija se odvijala sa komponentama u određenoj zapremini što je prikazano u tabeli (Tabela 5).

Tabela 5 Komponente za RFLP reakcionu smešu

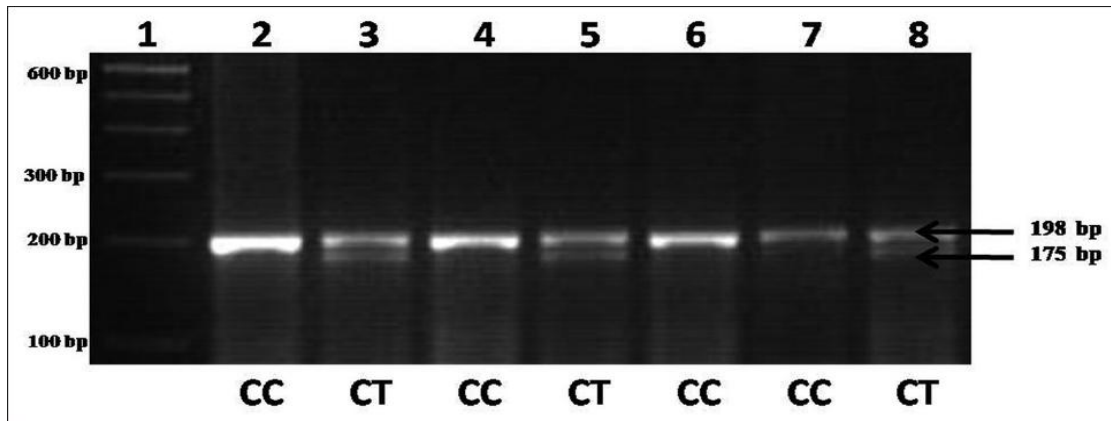
Enzim Hinf I	1 μ l
Green buffer	2 μ l
Voda	17 μ l
PCR produkt	po proceni

Ukupna količina smeše za restrikcionalnu digestiju iznosila je 20 μ l zapremine. Urađena je restrikcija u PCR aparatu na temperaturi od 37°C u trajanju od 10 minuta. HinfI seče produkt PCR reakcije ukoliko umnoženi segment DNK sadrži T na poziciji 677 i kao rezultat se dobijaju fragmenti dužine 175bp i 23bp. U umnoženom segmentu DNK koji na poziciji 677 sadrži C HinfI nema restrikcionalno mesto. Dužina dobijenih fragmenta detektovana je na 10% PAAgelu. Analiza genotipova vršena je na sledeći način:

Homozigot genotipa C/C (bez mutacije) poseduje jedan fragment od 198 bp i predstavlja wild type.

Heterozigot za mutaciju C/T poseduje 3 fragmenta od 198bp, 175bp i 23bp, s tim da se na gelu uočavaju samo dve trake jer najkraći fragment ne može da se uoči na gelu.

Heterozigot za mutaciju T/T poseduje dva fragmenta od 175bp i 23 bp ali takođe najkraći fagment iščezne pa se na gelu vidi samo jedna traka.



Slika 19 Prikaz RFLP produkata na PAA gelu za *MTHFR*

Preuzeto: www.ijhg.com

3.3.5 PCR/real time PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za *GSTM1* i *GSTT1*

***GSTM1*, *GSTT1* (*GSTM1**0, *GSTT1**0) polimorfizmi**

Za određivanje polimorfizama delecionog tipa kod *GSTM1* i *GSTT1* korišćena su dva pristupa: PCR i real time PCR metode. Real time PCR metodu smo koristili kada nije bilo moguće amplifikovati željene regione kod ovih gena konvencionalnim PCR-om. Za amplifikaciju radili smo multipleks reakciju, a koristili smo prajmere za *GSTM1* i *GSTT1* koje su opisali Voso i sar. (Voso i sar., 2002), a kao kontrolu uspešnosti PCR reakcije koristili smo prajmere za β -globin gen (Saiki i sar., 1988). PCR reakciona smeša je sadržala 2X PCR Master Mix (Taq DNA polimeraza, reakcioni pufer, $MgCl_2$ i dNTP, Thermo Fisher Scientific, Inc) uz dodatak 0.2 μ M svakog prajmera (Metabion) i 0.2 μ g DNK uzorka. Ukupna količina iznosila je 25 μ .

Prisustvo/odsustvo gena utvrđeno je preko različitih temperatura topljenja produkata amplifikacije na real-time PCR aparatu, ili u slučaju multipleks PCRa prisustvo/odsustvo traka na gelu. Tom prilikom, posmatrali smo amplifikovani *β -globin* genski fragment (110bp) u svim PCR reakcijama koji je predstavljao indikator uspešnosti reakcije.

Tabela 6 Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (Real-time PCR)

Polimorfizam	Prajmeri	PCR fragment (bp)	Reference
GSTM1	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'	215	Voso i sar., 2002
GSTT1	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCT-3' 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	480	Voso i sar., 2002
β-globin	5'-ACACAACACTGTGTTCAACTAGC-3' 5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3'	110	Saiki i sar., 1988

Real time PCR metoda se sastoji od konvencionalne PCR amplifikacije i fluorimetrije. Ovu metodu karakteriše detekcija PCR amplifikacije tokom rane faze reakcije, za razliku od konvencionalnog PCR-a, gde se detekcija produkata vrši na gelu, u poslednjoj fazi. Razlikuju se 3 faze ove metode:

- Eksponencijalna faza-tokom ove faze količina DNK se uvećava. Amplifikacija je najbrža, a reakcija je visoko specifična i precizna, detekcija amplifikacije se dešava u ovoj fazi.
- Linearna faza-tokom ove faze amplifikacija se usporava;
- Plato-tokom ove faze reakcija se zaustavlja, nema amplifikacije, a degradacija produkata je sve veća.

Detekcija amplifikata se vrši detekcijom fluorescence koju emituje fluorescentna proba. 'Threshold' je vrednost koja se zadaje aparatu kao nivo fluorescencije koju treba da detektuje. Ct vrednost predstavlja broj ciklusa reakcije koji je potreban da bi se dostigla zadata vrednost tj threshold. Što je više DNK u uzorku, to će trebati kraće vreme da se threshold dostigne, tj. Ct vrednost je manja.

Za real time kvantifikaciju koriste se dva pristupa:

1. boje koje se specifično vezuju za dvolančanu DNK i
2. specifične, fluorescentnim bojama obeležene probe

Boje koje se specifično vezuju za dvolančanu DNK (najčešće SYBR Green) se dodaju u reakcionu mikrotubu, zajedno sa ostalim komponentama reakcije. Vezivanjem za dvolančanu DNK emituje se fluorescenca, dok u fazi kada je molekul denaturisan, signala nema. Na početku reakcije se očitava bazalna fluorescenca-fluorescenca poreklom od boje koja se nalazi u rastvoru ali se nije vezala za ds DNK. Nivo fluorescence se očitava posle svakog ciklusa, a praćenje tih vrednosti vrši se na monitoru računara, odnosno u realnom vremenu. Usled povećavanja dvolančanih produkata tokom reakcije, nagomilana fluorescenca u jednom trenutku dostiže kritični nivo i fluorescenca počinje eksponencijalno da raste. Ove boje se vezuju i za nespecifične produkte kao što su dimeri prajmera. Da bi se isključili nespecifični produkti analiziraju se krive topljenja produkata reakcije. Svaki gen ima karakterističnu temperaturu topljenja koja se definiše kao temperatura na kojoj je denaturisalo 50% molekula. Oblik i pozicija krive topljenja su određeni veličinom DNK fragmenta i brojem GC odnosno AT baznih parova.

PCR program za multipleks (M1/T1/ β -globin) reakciju

1. inicijalna denaturacija 94°C/5'
2. denaturacija 94°C/30",
3. aniling 69°C/30",
4. ekstenzija 72°C/30",
5. finalna ekstenzija na 72°C/5'. 30 ciklusa, od koraka 2 do 4.

PCR reakcija je atenuirana snižavanjem temperature na 4°C u trajanju od 10 minuta

Tabela 7 Real time PCR reakciona smeša za multipleks reakciju

Voda	8.5 μ l
Real time PCR Master Mix (2x)*	12.5 μ l
Prajmer 1 (5 μ M)	1 μ l
Prajmer 2 (5 μ M)	1 μ l
DNK uzorak (0.1 μ g/ μ l)	2 μ l

*2xMaxim SYBR Green/ROX qPCR Master Mix

Real time PCR program za multipleks (M1/T1/ β -globin) reakciju

1. inicijalna denaturacija 94°C/5'
2. denaturacija 94°C/2'
3. aniling 59°C/1',
4. ekstenzija 72°C/1',
5. finalna ekstenzija na 72°C/3'. 35 ciklusa, od koraka 2 do 4.

Genotipovi M1-/- i T1 -/- nisu pokazali amplifikaciju fragmenata od 215bp i 480bp. Posmatrali smo amplifikovani β -globin gene fragment (110bp) u svim PCR reakcijama koji je predstavljao indikator uspešnosti reakcije.

3.3.6 PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za *MMP9*

MMP-9 C-1562T (rs3918242) polimorfizam

PCR smeša sadržala je komponente u zapremini prikazanoj u tabeli (Tabela 8). Ukupna zapremina iznosila je 50 μ l.

Tabela 8 Komponente PCR smeše

dATP	200 μ M
dCTP	200 μ M
dGTP	200 μ M
dTTP	200 μ M
Forward prajmer	1 μ M
Reverse prajmer	1 μ M
Taq polimeraza	2.5 U
DNK	500 ng
MgCl ₂	1.5 mM
Tris-HCl	10 mM
KCl	50 mM

Tabela 9 Sekvence prajmera i PCR reakcija za *MMP9*

Gen	Sekvence prajmera			Veličina PCR produkta
MMP9	5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3'			151bp
C – 1562T	5'-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC -3'			
inicijalna denaturacija	denaturacija	hibridizacija	elongacija	finalna ekstenzija
4 minuta	45 sec	45 sec	1 minut	10 minuta
95° C	95° C	60° C	72° C	72° C

35 CIKLUSA

Početnu denaturaciju DNK 3min na 95°C sledilo je 35 ciklusa koji su se sastojali iz denaturacije DNK (1 min 95°C), hibridizacije prajmera (45 s 65°C) i elongacije (45s 72°C). Završna elongacija je trajala 7 minuta na 72°C.

PCR produkt dužine 442bp podvrgnut je digestiji u kojoj je korišćen SphI restrikcioni enzim.

Reakciona smeša za restrikcionu analizu sadržala je sledeće komponente:

Tabela 10 Komponente reakcione smeše za RFLP

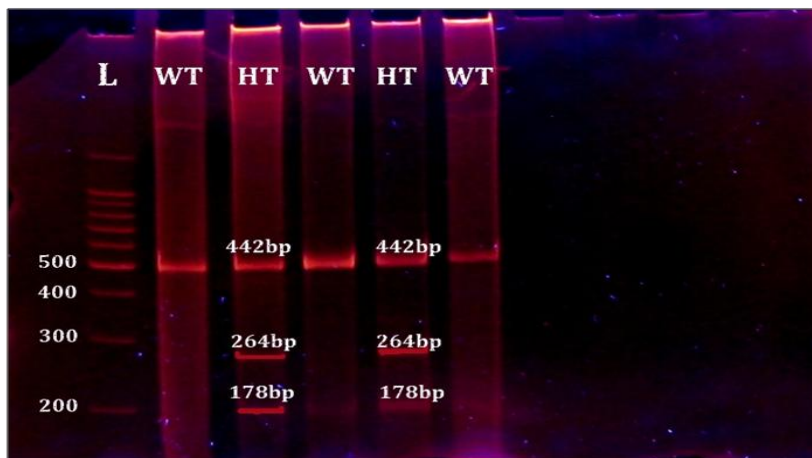
pufer	2 µl
enzim SphI	0.5 µl
PCR produkt	10 µl

Inkubacija je trajala 1,5 h na temperaturi 37°C.

Dobijeni fragmenti su analizirani elektroforezom na 8%PAA gelu, nakon bojenja gela etidijum bromidom.

3.3.7 Restrikciona digestija PCR produkata u analizi polimorfizma gena za *MMP9*

Nakon digestije homozigot genotipa CC (wild type) je pokazao jednu traku veličine 442 bp, homozigot za mutaciju TT dve trake veličine 264 i 178 bp i heterozigot za mutaciju CT tri trake od 442, 264 i 178 bp (Slika 20).



Slika 20 Prikaz RFLP produkata na PAA gelu za *MMP-9*

3.4 Statistička analiza

Statistička obrada podataka je urađena uz pomoć χ^2 kvadrat testa i Fišerovog testa za utvrđivanje razlika u distribuciji različitih alela i genotipova u grupi TMD i zdravoj kontroli. Logističkom regresionom analizom smo utvrđivali povezanost genskih varijacija sa rizikom za nastanak TMD. Korišćen je statistički program SPSS 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1 Analiza kliničkih rezultata

4.1.1 Distribucija ispitanika prema polu i starosti

Kliničko-laboratorijsko istraživanje je završeno nakon perioda od godinu dana. Analizom je obuhvaćeno 100 pacijenata koji su imali temporomandibularne disfunkcije i 182 zdravih osoba bez ijednog simptoma ili znaka TMD, a koji su prema polu i starosti odgovarali eksperimentalnoj grupi. Distribucija svih ispitanika prema polu i starosti prikazana je u tabeli (Tabela 11).

Tabela 11 Distribucija ispitanika prema polu i starosti (TMD vs kontrolna grupa)

Opšte karakteristike	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa	p vrednost
Broj ispitanika N	100	182	
Starost (X±SD (Med, min-max))	37,1±14,6 (34; 15-76)	34,9±14 (32;14-71)	^a p=0,163 [†]
Pol n (%)	Muškarci	20 (20%)	^b p=0,001*
	Žene	80 (80%)	

*Statistički značajna razlika; [†]Bez statistički značajne razlike; ^aMann-Whitney U test; ^bHi kvadrat test;

Hi kvadrat testom je pokazano da je značajno veća učestalost TMD bila kod osoba ženskog pola u TMD grupi pri poređenju sa kontrolnom grupom, što je utvrđeno i logističkom regresionom analizom (Tabela 12).

Tabela 12 Univarijantna logistička regresiona analiza (TMD vs kontrolna grupa)

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
Pol	2,618 (1,476-4,644)	0,001*
Starost	0,989 (0,972-1,006)	0,198 [†]

*Statistički značajna razlika; [†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95% CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

4.1.2 Distribucija podgrupa TMD i simptoma u TMD grupi

Na osnovu anamnestičkih podataka i detaljnog kliničkog pregleda svih 100 ispitanika eksperimentalne grupe svrstavali smo u jednu od tri dijagnostičke grupe:

I GRUPA: MIŠIĆNE DISFUNKCIJE

- a. miofascijalni bol
- b. miofascijalni bol sa ograničenim otvaranjem usta

II GRUPA: ZGLOBNE DISFUNKCIJE

IIa. DISLOKACIJA DISKUSA ARTIKULARISA

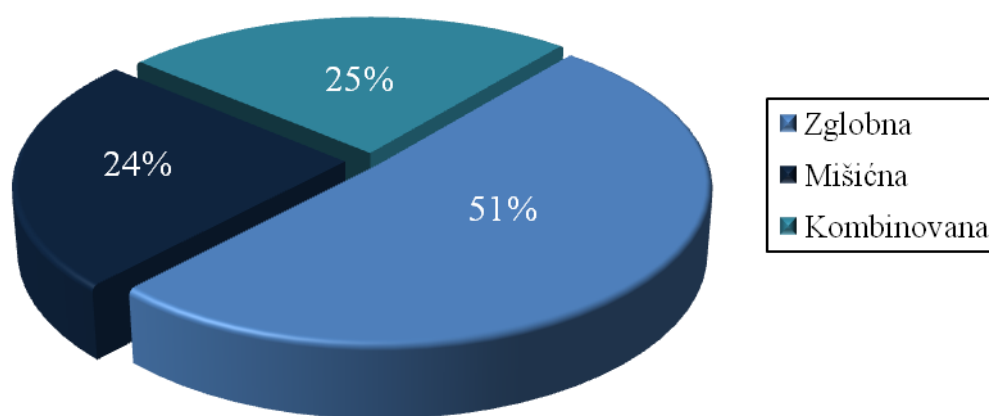
- a. dislokacija diskusa sa redukcijom
- b. dislokacija diskusa bez redukcije sa ograničenim otvaranjem usta
- c. dislokacija diskusa bez redukcije bez ograničenog otvaranja usta

IIb. OSTALI POREMEĆAJI TM ZGLOBOVA

- a. artralgija
- b. osteoartritis TM zgloba
- c. osteoartroza TM zgloba

III GRUPA: KOMBINOVANA (ZGLOBNA I MIŠIĆNA DISFUNKCIJA)

Učestalost pacijenata sa kliničkim manifestacijama zglobne disfunkcije u TMD grupi je bila 51% dok je učestalost obolelih od mišićne disfunkcije iznosila 24%. Kombinovanu disfunkciju je imalo 25% pacijenata (Slika 21).



Slika 21 Učestalost disfunkcija u TMD grupi.

Takođe je utvrđena statistički značajna razlika između osoba sa i bez određene vrste temporomandibularne disfunkcije u TMD grupi, tj. značajno više je bilo osoba kod kojih je bila prisutna zglobna disfunkcija u poređenju sa onima kod kojih nije i značajno više onih kod kojih nije bila prisutna kombinovana u poređenju sa onima kod kojih jeste. (Tabela 13).

Tabela 13 Učestalost TMD podgrupa u TMD grupi

Anamnestički podaci		TMD N (%)	p
Zglobna disfunkcija	nema	24 (24%)	0,000*
	ima	76 (76%)	
Mišićna disfunkcija	nema	51 (51%)	0,841 [†]
	ima	49 (49%)	
Kombinovana disfunkcija	nema	75 (75%)	0,000*
	ima	25 (25%)	

*Statistički značajna razlika; [†]Bez statistički značajne razlike; N-broj ispitanika; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Pokazana je i statistički značajna razlika u učestalosti karakterističnih simptoma temporomandibularnih disfunkcija kao što su bol, devijacija/defleksija, ograničeno otvaranje usta i zvučni efekti u zglobo, u eksperimentalnoj grupi, tj. osobe sa pojavom sva četiri karakteristična simptoma su bile zastupljenije u poređenju sa onima kod kojih simptomi nisu bili prisutni (Tabela 14).

Tabela 14 Učestalost simptoma TMD u TMD grupi

Klinički simptomi		TMD N (%)	p
Bol	nema	5 (5%)	0,000*
	ima	95 (95%)	
Devijacija/ Defleksija	nema	36 (36%)	0,005*
	ima	64 (64%)	
Ograničeno otvaranje usta	nema	29 (29%)	0,000*
	ima	71 (71%)	
Zvuk	nema	30 (30%)	0,000*
	ima	70 (70%)	

*Statistički značajna razlika; N-broj ispitanika; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

4.1.3 Podgrupe TMD i simptomi TMD kroz poređenje sa drugim parametrima (TMD grupa)

Posmatrali smo da li prisustvo određene disfunkcije (mišićna, zglobna, kombinovana) ima različitu učestalost među polovima i osobama različite starosne dobi. Utvrdili smo da postoji statistički značajna razlika u učestalosti mišićne i zglobne disfunkcije u odnosu na godine (Tabela 15, Tabela 17, Tabela 19, Tabela 21) što je potvrdila i logistička regresiona analiza (Tabela 16, Tabela 18, Tabela 20, Tabela 22), dok pri poređenju pola sa različitim podgrupama TMD nije pronađena statistički značajna razlika. Logističkom regresionom analizom je pokazano da osobe mlađe od 30

godina imaju 2,5 puta manji rizik za nastanak mišićne disfunkcije a 3 puta veći za nastanak zglobne disfunkcije u poređenju sa starijima.

Mišićna disfunkcija

Tabela 15 Distribucija ispitanika sa i bez mišićne disfunkcije prema polu i starosti

Posmatrani parametri	Mišićna disfunkcija		p vrednost
	DA	NE	
Starost (X±SD (Med, min-max))	40,37±13,50 38; (19-68)	34,00±15,02 27; (15-76)	^a p=0,007*
Pol n (%)	Muškarci	9 (18,4%)	^b p=0,689 [†]
	Žene	40 (81,6%)	

*Statistički značajna razlika; [†]Bez statistički značajne razlike; ^aMann-Whitney U test; ^bHi kvadrat test;

Tabela 16 Univarijantna logistička regresiona analiza kod osoba sa i bez mišićne disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
Pol	1,222 (0,457-3,269)	0,689 [†]
Starost	0,969 (0,942-0,997)	0,032*

*Statistički značajna razlika; [†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95% CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 17 Distribucija ispitanika mladih/starijih od 30 godina sa i bez mišićne disfunkcije

Parametri	Mišićna DA	Mišićna NE	p vrednost
Mladi od 30 godina	16 (32,7%)	28 (54,9%)	0,025*
Stariji od 30 godina	33 (67,3%)	23 (45,10%)	

*Statistički značajna razlika; Hi kvadrat test;

Tabela 18 Univarijantna logistička regresiona analiza kod osoba mladih od 30 godina sa i bez mišićne disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
Starost (mladi od 30 godina)	0,398 (0,177-0,898)	0,026*

*Statistički značajna razlika; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Zglobna disfunkcija

Tabela 19 Distribucija ispitanika sa i bez zglobne disfunkcije prema polu i starosti

Posmatrani parametri	Zglobna disfunkcija		p vrednost
	DA	NE	
Starost (X±SD (Med, min-max))	34,82±13,93 31,5; (15-76)	44,42±14,46 39,5; (25-68)	^ap=0,003*
Pol n (%)	Muškarci	13 (17,1%) 7 (29,2%)	^bp=0,198[‡]
	Žene	63 (82,9%) 17 (70,8%)	

*Statistički značajna razlika; [‡]Bez statistički značajne razlike; ^aMann-Whitney U test; ^bHi kvadrat test;

Tabela 20 Univarijantna logistička regresiona analiza kod osoba sa i bez zglobne disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
Pol	1,995 (0,689-5,780)	0,203 [‡]
Starost	1,045 (1,012-1,079)	0,007*

*Statistički značajna razlika; [‡]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95% CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 21 Distribucija ispitanika mlađih/starijih od 30 godina sa i bez zglobne disfunkcije

Parametri	Zglobna DA	Zglobna NE	p
Mladi od 30 godina	38 (50,0%)	6 (25,0%)	0,031*
Stariji od 30 godina	38 (50,0%)	18 (75,0%)	

*Statistički značajna razlika; Hi kvadrat test;

Tabela 22 Univarijantna logistička regresiona analiza kod osoba mlađih od 30 godina sa i bez zglobne disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
Starost (mladi od 30 godina)	3,000 (1,074-8,383)	0,036*

*Statistički značajna razlika; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Kombinovana disfunkcija**Tabela 23** Distribucija ispitanika sa i bez kombinovane disfunkcije prema polu i starosti

Posmatrani parametri	Kombinovana disfunkcija		p vrednost
	DA	NE	
Starost (X±SD (Med, min-max))	36,48±11,49 34,0; (19-60)	37,33±15,54 34,0; (15-76)	^a p=0,873 [‡]
Pol n (%)	Muškarci	2 (8,0%)	^b p=0,083 [‡]
	Žene	23 (92,0%)	

[‡]Bez statistički značajne razlike; ^aMann-Whitney U test; ^bHi kvadrat test;

Tabela 24 Univarijantna logistička regresiona analiza kod osoba sa i bez kombinovane disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
Pol	3,632 (0,779-16,923)	0,101 [‡]
Starost	0,804 (0,320-2,018)	0,642 [‡]

[‡]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Poređenjem prisustva različitih simptoma među polovima i osobama različite starosne dobi u okviru TMD grupe nije uočena statistički značajna razlika između osoba muškog i ženskog pola Hi kvadrat testom. Poređenjem prisustva različitih simptoma među pacijentima različite starosne dobi u okviru TMD grupe dobijena je statistički značajna razlika između osoba sa prisutnim zvučnim efektima u zglobovima i onih kod kojih taj simptom nije bio prisutan što je potvrđeno i logističkom regresijom analize (Tabela

31, Tabela 32). Pokazano je da osobe mlađe od 30 godina imaju 3 puta veći rizik za prisustvo zvučnih efekata u zglobovima u odnosu na starije.

Bol

Tabela 25 Distribucija ispitanika sa i bez bola prema polu i starosti

Posmatrani parametri	Bol		p vrednost
	DA	NE	
Starost (X±SD (Med, min-max))	37,59±14,71 34; (15-76)	28,20±8,28 25; (19-40)	^a p=0,150 [‡]
Pol n (%)	Muškarci	19 (20,0%)	^b p=1,000 [‡]
	Žene	76 (80,0%)	

[‡]Bez statistički značajne razlike; ^aMann-Whitney U test; ^bHi kvadrat test;

Tabela 26 Univarijantna logistička regresiona analiza kod osoba sa i bez bola

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
Pol	1,000 (0,106-9,471)	1,000 [‡]
Starost	0,506 (0,081-3,170)	0,467 [‡]

[‡]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće ; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Devijacija/defleksija**Tabela 27** Distribucija ispitanika sa i bez devijacije/defleksije prema polu i starosti

Posmatrani parametri	Devijacija/defleksija		p vrednost
	DA	NE	
Starost (X±SD (Med, min-max))	35,17±13,38 32,5; (15-76)	40,58±16,11 38; (17-68)	^a p=0,108 [‡]
Pol n (%)	Muškarci	11 (17,2%)	^b p=0,349 [‡]
	Žene	53 (82,8%)	
		9 (25,0%)	
		27 (75,0%)	

[‡]Bez statistički značajne razlike; ^aMann-Whitney U test; ^bHi kvadrat test;

Tabela 28 Univarijantna logistička regresiona analiza kod osoba sa i bez devijacije/defleksije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
Pol	1,606 (0,594-4,346)	0,351 [‡]
Starost	1,662 (0,719-3,843)	0,235 [‡]

[‡]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće ; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Ograničene kretnje**Tabela 29** Distribucija ispitanika sa i bez ograničenih kretnji prema polu i starosti

Posmatrani parametri	Ograničene kretnje		p vrednost
	DA	NE	
Starost (X±SD (Med, min-max))	37,39 ±15,27 34; (15-76)	36,45±12,95 34; (19-68)	^a p=0,933 [‡]
Pol n (%)	Muškarci	14 (19,7%)	^b p=0,912 [‡]
	Žene	57 (80,3%)	

[‡]Bez statistički značajne razlike; ^aMann-Whitney U test; ^bHi kvadrat test;

Tabela 30 Univarijantna logistička regresiona analiza kod osoba sa i bez ograničenih kretnji

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
Pol	1,062 (0,364-3,102)	0,912 [‡]
Starost	1,162 (0,485-2,787)	0,736 [‡]

[‡]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Zvuk**Tabela 31** Distribucija ispitanika sa i bez zvučnih efekata u zglobu prema polu i starosti

Posmatrani parametri	Zvuk		p vrednost
	DA	NE	
Starost (X±SD (Med, min-max))	34,51 ±13,72 31; (15-76)	43,20±14,93 39,50; (20-68)	^a p=0,006*
Pol n (%)	Muškarci	12 (17,1%)	^b p=0,275 [‡]
	Žene	58 (82,9%)	

[‡]Bez statistički značajne razlike; ^aMann-Whitney U test; ^bHi kvadrat test;

Tabela 32 Univarijantna logistička regresiona analiza kod osoba sa i bez zvučnih efekata u zglobu

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
Pol	1,758 (0,634-4,876)	0,279 [‡]
Starost (mlađi od 30 godina)	2,912 (1,143-7,418)	0,025*

*Statistički značajna razlika; [‡]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95% CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

4.2 Analiza genetičkih rezultata

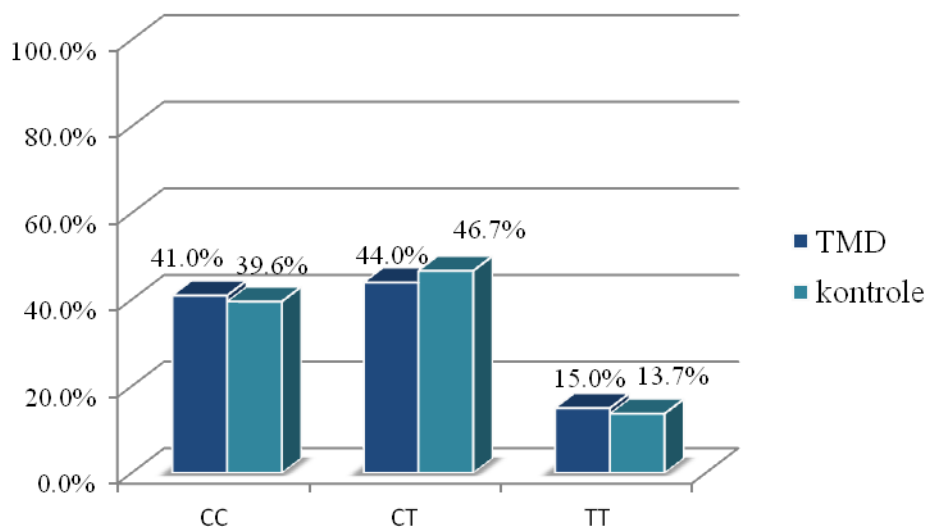
Genetičko ispitivanje je obuhvatilo ukupno 282 ispitanika, od kojih je 100 pripadalo eksperimentalnoj (**TMD grupa**) a 182 kontrolnoj grupi (**K grupa**). Kod svih ispitanika uspešno je urađena amplifikacija sekvence DNK koja nam je bila značajna.

Nakon tumačenja karakterističnog obrasca traka na gelu pri PCR/RFLP analizi na PAGE posle digestije odgovarajućim restrikcionim enzimima ili putem analize krive topljena metodom real-time PCR-a, dobijena je distribucija genotipova za polimorfizme u *MTHFR*, *GSTM* i *GSTT*, *MMP9* genima u obe grupe.

4.2.1 Polimorfizam u genu za *MTHFR*

Supstitucija citozina (C) timinom (T) u 4 egzonu na poziciji 677 u DNK molekulu uslovljava polimorfizam 677 C>T i produkciju termolabilne forme enzima sa smanjenom efikasnošću.

U TMD grupi od ukupno 100 ispitanika, 41 ima wild type homozigot CC (41%), 44 ima heterozigot CT genotip (44%) i 15 ima mutirani genotip TT (15%). U kontrolnoj grupi od ukupno 182 ispitanika 72 ima wild type homozigot CC (39,6%), 85 ima heterozigot CT (46,7%) i 25 ima mutirani TT genotip (13,7%) (Slika 22).



Slika 22 Učestalost *MTHFR* genotipova u grupama

Hi-kvadrat testom je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipova među grupama (Tabela 33).

Tabela 33 Učestalost genotipova za *MTHFR* gen u okviru grupa

Genotipovi (<i>MTHFR</i>)	TMD N (%)	K grupa N (%)	p vrednost
CC	41 (41%)	72 (39,6%)	0,901 [‡]
CT	44 (44%)	85 (46,7%)	
TT	15 (15%)	25 (13,7%)	
CC	41 (41%)	72 (39,6%)	0,813 [‡]
CT+TT	59 (58%)	110 (60,4%)	
CT	44 (44%)	85 (46,7%)	0,663 [‡]
CC+TT	56 (56%)	97 (53,3%)	
TT	15 (15%)	25 (13,7%)	0,771 [‡]
CC+CT	85 (85%)	157 (86,3%)	

[‡]Bez statistički značajne razlike; Hi kvadrat test

Rezultati logističke regresione analize pokazuju da različite varijante *MTHFR* gena ne utiču na predispoziciju za nastanak TMD (Tabela 34, Tabela 35).

Tabela 34 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MTHFR* (TMD vs kontrolna grupa)

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MTHFRCC	1,062 (0,646-1,745)	0,813 [†]
MTHFRCT	0,897 (0,549-1,464)	0,663 [†]
MTHFR TT	1,108 (0,555-2,215)	0,771 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

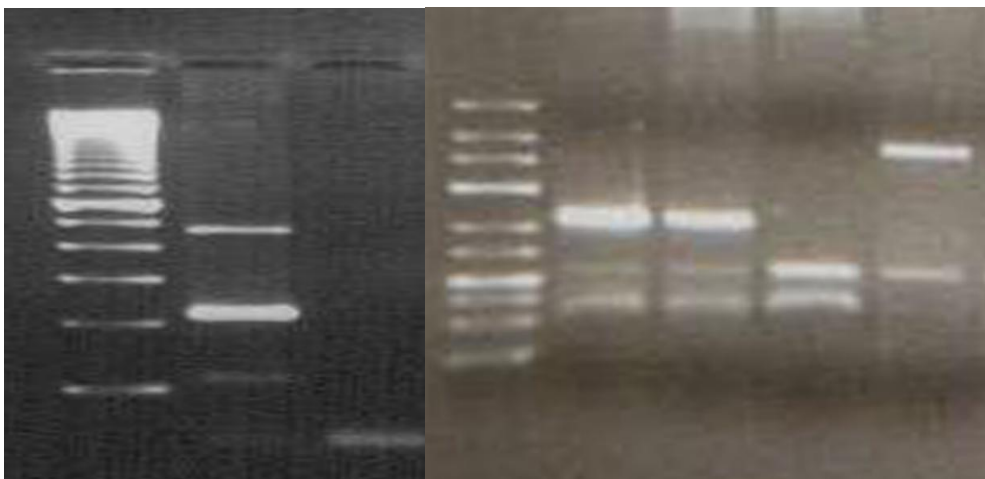
Tabela 35 Polimorfizam gena za *MTHFR* i rizik za nastanak TMD, logistička regresiona analiza

Genotipovi	TMD (100) N (%)	Kontrolna (182) N (%)	OR	95% CI	p
CC	41 (41)	72 (40)	1.00	Reference	
CT	44 (44)	85 (46)	0.91	0.54 – 1.54	0.41 [†]
TT	15 (15)	25 (14)	1.01	0.50 – 2.22	0.52 [†]
CT + TT	59 (59)	110 (60)	0.94	0.57 – 1.55	0.46 [†]
C	0.63	0.63	1.00	Reference	
T	0.37	0.37	1.00	0.56 – 1.78	0.56 [†]

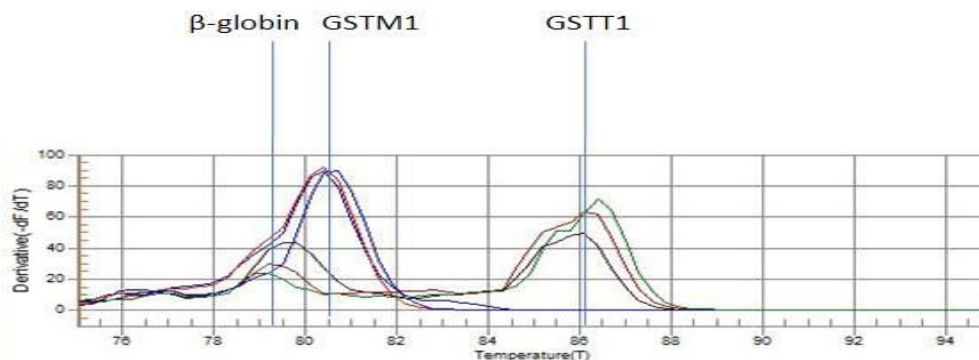
[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

4.2.2 Polimorfizam u genu za *GSTM1* i *GSTT1*

Polimorfizam u genu za *GSTM1* smo analizirali primenom klasičnog i real-time PCR-a u multipleks reakciji zajedno sa graničnicima za *GSTT1* i β -globinski gen koji je poslužio kao kontrola PCR reakcije (Slika 23, Slika 24). Nulti (delecioni) genotip ($M1^*0/M1^*0$ ili $-/-$) karakteriše odsustvo PCR produkta dužine 215 bp.

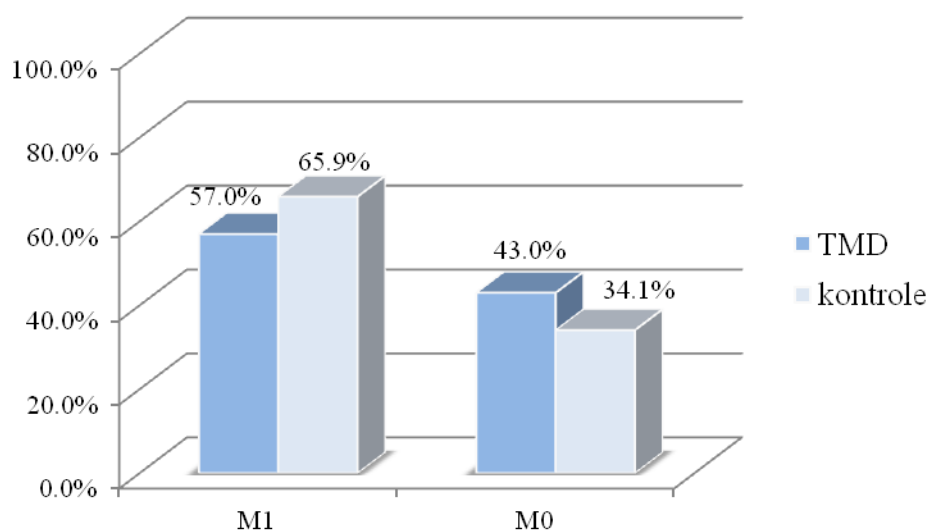


Slika 23 Genotipizacija *GSTM1* i *GSTT1* polimorfizama. A-1-DNK marker (100bp), 2- *GSTT1* (480bp), *GSTM1* (215bp) i β -globin (110bp); B-1-DNK marker (25-150bp), 2,3-*GSTM1* (215bp) i β -globin (110bp); 4- β -globin (110bp); 5-*GSTT1* (480bp) i β -globin (110bp).



Slika 24 Genotipizacija *GSTM1* i *GSTT1* polimorfizama primenom real-time PCR i analizom krive topljenja

+/+ (homozigot) ili +/- (heterozigot) su pokazivali prisustvo produkta bez mogućnosti da se među njima napravi razlika. Poređenjem genotipova (M1,M0) u TMD i kontrolnoj grupi pokazano je sledeće: U TMD grupi M1 genotip ima 57 ispitanika (57%), a M0 43 ispitanika (43%), dok u kontrolnoj grupi M1 genotip ima 120 (65,9%), a M0 62 (34,1%) (Slika 25). Hi-kvadrat testom nije dobijena statistička značajnost (Tabela 36).



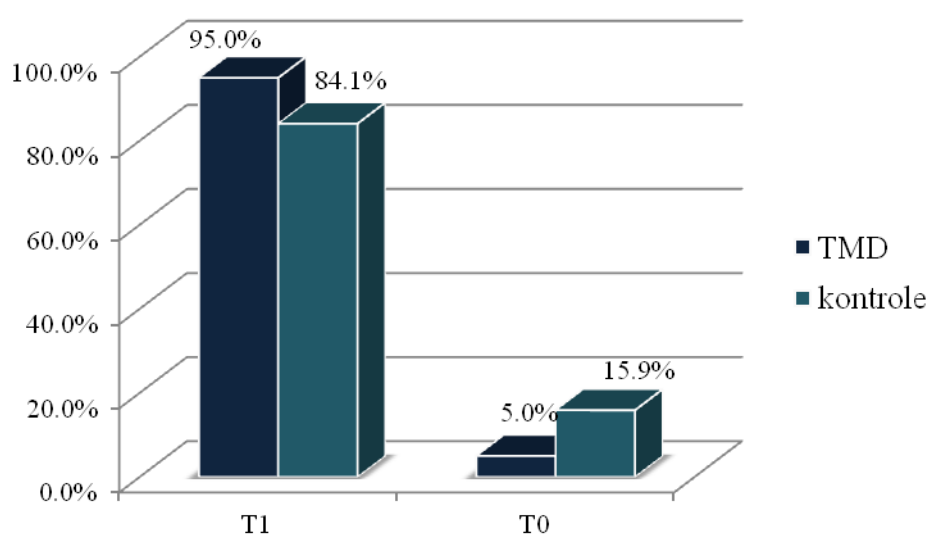
Slika 25 Učestalost *GSTM1* genotipova u grupama

Tabela 36 Učestalost genotipova za *GSTM1* gen u okviru grupa

Genotipovi	TMD N (%)	K grupa N (%)	p
M1	57 (57,0%)	120 (65,9%)	0,138 [‡]
M0	43 (43,0%)	62 (34,1%)	

[‡]Bez statistički značajne razlike; Hi kvadrat test

Polimorfizam u *GSTT1* genu analiziran je primenom klasičnog i real-time PCR-a u multipleks reakciji. Nulti (delecioni) genotip (T1*0/T1*0 ili -/-) u *GSTT1* se utvrđuje odsustvom PCR produkta dužine 480bp. Ukoliko postoji produkt predstavljeno je ili+/+ (homozigot) ili o +/- (heterozigot) genotipovima, bez mogućnosti pravljenja razlike. Distribucija genotipova za *GSTT1* gen je bila: U TMD grupi T1 genotip ima 95 ispitanika (95%), a T0 5 ispitanika (5%), dok u kontrolnoj grupi T1 genotip ima 153 (84,1%) ispitanika, a T0 29 (15,9%) (Slika 26).



Slika 26 Učestalost *GSTT1* genotipova u grupama

Rezultati prikazani u tabeli ukazuju na to da postoji statistički značajna razlika u raspodeli genotipova T1 i T0 između TMD i kontrolne grupe na osnovu Hi-kvadrat testa (Tabela 37).

Tabela 37 Učestalost genotipova za *GSTT1* gen u okviru grupa

Genotipovi	TMD N (%)	K grupa N (%)	p
T1	95 (95,0%)	153 (84,1%)	0,007*
T0	5 (5,0%)	29 (15,9%)	

*Statistički značajna razlika; Hi kvadrat test

Logističkom regresionom analizom je utvrđeno da osobe nosioci T0 genotipa imaju manji rizik za pojavu TMD (Tabela 38).

Tabela 38 *GSTM1* i *GSTT1* distribucija genotipova u TMD i kontrolnoj grupi

Genotipovi	TMD (100) N (%)	K (182) N (%)	OR	95%CI	p	
GSTM1	non-null (+/, +/-)	57 (57)	120 (65.9)	1.00	Reference	0.09
	null (-/-)	43 (43)	62 (34.1)	1.46	0.88-2.41	
GSTT1	non-null (+/, +/-)	95 (95)	153 (84.1)	1.00	Reference	0.004*
	null (-/-)	5 (5)	29 (15.9)	0.28	0.10-0.74	

*Statistički značajna razlika; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Zanimljiv podatak je i to da nosioci M1 i T0 genotipa imaju znatno smanjen rizik (6 puta) za oboljevanje poređenjem TMD i kontrolne grupe (Tabela 39).

Tabela 39 Logistička regresiona analiza kombinovanih *GSTM1/GSTT1* genotipova u TMD i kontrolnoj (K) grupi

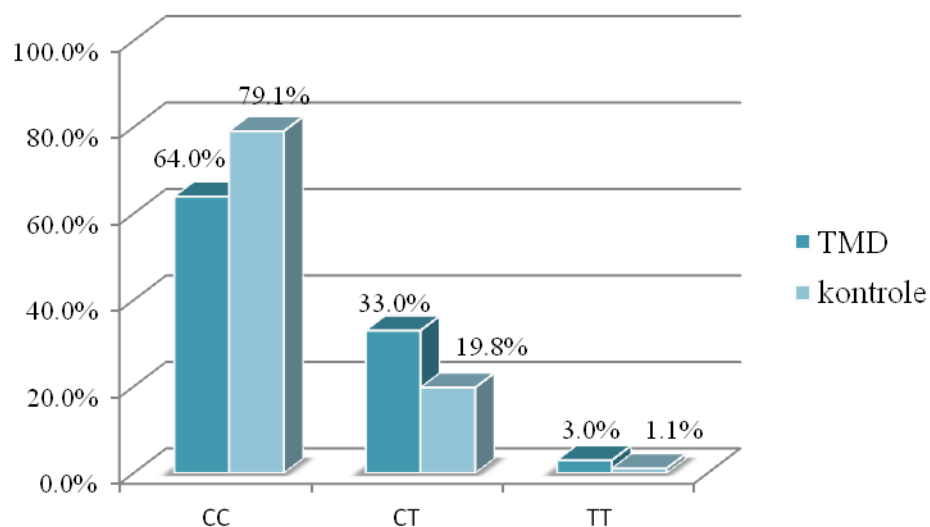
GSTM1/GSTT1 genotipovi	TMD (100) N (%)	K (182) N (%)	OR	95%CI	p
M1 non-null/ T1 non-null (+/+)	55 (55)	94 (51.7)	1.00	Reference	
M1 non-null/ T1 null (+/-)	2 (2)	26 (14.3)	0.16	0.03-0.58	<.001*
M1 null/ T1 non-null (-/+)	40 (40)	59 (32.4)	1.16	0.69-1.95	0.34
M1 null/ T1 null (-/-)	3 (3)	3 (1.6)	1.71	0.33-8.76	0.40

*Statistički značajna razlika; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

4.2.3 Polimorfizam u genu za *MMP9*

C-1562T polimorfizam je posledica supstitucije C/T na poziciji 1562 promotorskog regiona gena za *MMP9*. Zastupljenost genotipova (CC, CT, TT) u obe ispitivane grupe je sledeća:

u eksperimentalnoj grupi (TMD) od ukupno 100 ispitanika 64 ima wild type homozigot CC (64%), 33 ima heterozigot CT genotip (33%) i 3 ima mutirani genotip TT (3%); u kontrolnoj grupi (K) od ukupno 182 ispitanika 144 ima wild type homozigot CC genotip (79,1%), 36 ima heterozigot CT genotip (19,8%) i 2 imaju mutirani TT genotip (1,1%) (Slika 27).



Slika 27 Učestalost *MMP9* genotipova u grupama

Hi-kvadrat testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između TMD i kontrolne grupe. Učestalost heterozigota (CT) je znatno veća u TMD (33%) u poređenju sa kontrolnom grupom (19,8%) (Tabela 40). Univarijantnom logističkom regresionom analizom su se nosioci genotipa CC i CT izdvojili sa većom predispozicijom za pojavu TMD (Tabela 41).

Tabela 40 Učestalost genotipova za *MMP9* gen u okviru grupa

Genotipovi (<i>MMP9</i>)	TMD N (%)	K grupa N (%)	p vrednost
CC	64 (64%)	144 (79,1%)	0,019*
CT	33 (33%)	36 (19,8%)	
TT	3 (3%)	2 (1,1%)	
CC	64 (64%)	144 (79,1%)	0,006*
CT+TT	36 (36%)	38 (20,9%)	
CT	33 (33%)	36 (19,8%)	0,013*
CC+TT	67 (67%)	146 (80,2%)	
TT	3 (3%)	2 (1,1%)	0,247 [†]
CC+CT	97 (97%)	180 (98,9%)	

*Statistički značajna razlika; [†]Bez statistički značajne razlike; Hi kvadrat test

Tabela 41 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MMP9* (TMD vs kontrolna grupa)

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MMP9CC	0,469 (0,273-0,807)	0,006*
MMP9CT	1,998 (1,148-3,476)	0,014*
MMP9TT	2,784 (0,457-16,943)	0,267 [†]

*Statistički značajna razlika; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Prikazane učestalosti alela izračunate su na osnovu učestalosti genotipova (Tabela 42). Ispitivanje učestalosti alela pokazuje da nosioci T alela imaju 2 puta veći rizik za nastanak TMD u poređenju sa wild type homozigotima CC (OR=2.02, 95%CI=0.91-4.48) ali da ta vrednost nije statistički značajna. Takođe je uočeno da se kod heterozigota CT ispoljava 2 puta veći rizik za pojavu TMD (OR=2.06, 95%CI=1.18-3.60) što se pokazalo i kao statistički značajno ($p < 0.05$).

Tabela 42 Polimorfizam gena za *MMP9* i rizik za nastanak TMD, logistička regresiona analiza

Genotipovi	TMD (100) N (%)	Kontrolna (182) N (%)	OR	95%CI	p
CC	64 (64)	144 (79)	1.00	Reference	
CT	33 (33)	36 (20)	2.06	1.18-3.60	0.008*
TT	3 (3)	2 (1)	3.37	0.55-20.69	0.18 [‡]
CT + TT	36 (36)	38 (21)	2.13	1.24-3.67	0.005*
C	0.80	0.89	1.00	Reference	
T	0.20	0.11	2.02	0.91-4.48	0.058

*Statistički značajna razlika; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

4.3 Genotip – fenotip

Analizom učestalosti pojave različitih simptoma (*bol, devijacija/defleksija, ograničene kretnje, zvuk*) kod različitih genotipova za gen za *MTHFR* u okviru TMD grupe Hi kvadrat testom nije uočena statistički značajna razlika što je prikazano u tabelama (Tabela 43, Tabela 45, Tabela 47, Tabela 49) a potvrđeno i univarijantnom logističkom regresionom analizom (Tabela 44, Tabela 46, Tabela 48, Tabela 50).

Tabela 43 Učestalost pojave bola kod različitih genotipova za *MTHFR*

Gen	Bol		p
	DA	NE	
MTHFR	CC	39 (41,1%) 2 (40,0%)	0,947 [†]
	CT	42 (44,2%) 2 (40,0%)	
	TT	14 (14,7%) 1 (20,0%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 44 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MTHFR* kod osoba sa i bez bola

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MTHFRCC	1,045 (0,167-6,547)	0,963 [†]
MTHFRCT	1,189 (0,190-7,443)	0,853 [†]
MTHFR TT	0,691 (0,072-6,649)	0,749 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 45 Učestalost pojave devijacije/defleksije kod različitih genotipova za *MTHFR*

Gen	Dev/Def		p
	DA	NE	
MTHFR CC	24 (37,5%)	17 (47,2%)	0,558 [†]
CT	29 (45,3%)	15 (41,7%)	
TT	11 (17,2%)	4 (11,1%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 46 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MTHFR* kod osoba sa i bez devijacije/defleksije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MTHFRCC	0,671 (0,293-1,534)	0,344 [†]
MTHFRCT	1,160 (0,508-2,648)	0,725 [†]
MTHFRTT	1,660 (0,487-5,656)	0,417 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 47 Učestalost pojave ograničenih kretnji kod različitih genotipova za *MTHFR*

Gen	Ograničene kretnje		p
	DA	NE	
MTHFR CC	27 (38,0%)	14 (48,3%)	0,635 [†]
CT	33 (46,5%)	11 (37,9%)	
TT	11 (15,5%)	4 (13,8%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 48 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MTHFR* kod osoba sa i bez ograničenih kretnji

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MTHFR CC	0,657 (0,275-1,572)	0,346 [†]
MTHFR CT	1,421 (0,588-3,437)	0,436 [†]
MTHFR TT	1,146 (0,333-3,943)	0,829 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 49 Učestalost pojave zvuka kod različitih genotipova za *MTHFR*

Gen	Zvuk		p
	DA	NE	
CC	28 (40,0%)	13 (43,3%)	
MTHFR CT	31 (44,3%)	13 (43,3%)	0,932 [†]
TT	11 (15,7%)	4 (13,3%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 50 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MTHFR* kod osoba sa i bez zvučnih efekata u zglobu

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MTHFRCC	0,872 (0,367-2,073)	0,756 [†]
MTHFRCT	1,039 (0,439-2,462)	0,930 [†]
MTHFRTT	1,212 (0,353-4,162)	0,760 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Nije pokazana statistička značajnost ni pri poređenju isith genotipova sa pojavom različitih disfunkcija što je prikazano u tabelama (Tabela 51, Tabela 53, Tabela 55) i potvrđeno logističkom regresionom analizom (Tabela 52, Tabela 54, Tabela 56).

Tabela 51 Učestalost pojave mišićne disfunkcije kod različitih genotipova za *MTHFR*

Gen	Mišićna disfunkcija		p	
	DA	NE		
MTHFR	CC	21 (42,9%)	20 (39,2%)	0,931 [†]
	CT	21 (42,9%)	23 (45,1%)	
	TT	7 (14,3%)	8 (15,7%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 52 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MTHFR* kod osoba sa i bez mišićne disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MTHFRCC	1,162 (0,524-2,581)	0,711 [†]
MTHFRCT	0,913 (0,414-2,012)	0,821 [†]
MTHFRTT	0,896 (0,298-2,691)	0,845 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 53 Učestalost pojave zglobne disfunkcije kod različitih genotipova za *MTHFR*

Gen	Zglobna disfunkcija		p	
	DA	NE		
MTHFR	CC	29 (38,2%)	12 (50,0%)	0,589 [†]
	CT	35 (46,1%)	9 (37,5%)	
	TT	12 (15,8%)	3 (12,5%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 54 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MTHFR* kod osoba sa i bez zglobne disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MTHFRCC	0,617 (0,245-1,555)	0,306 [†]
MTHFRCT	1,423 (0,555-3,648)	0,463 [†]
MTHFRTT	1,312 (0,338-5,102)	0,695 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 55 Učestalost pojave kombinovane disfunkcije kod različitih genotipova za *MTHFR*

Gen	Kombinovana disfunkcija		p	
	DA	NE		
MTHFR	CC	9 (36,0%)	32 (42,7%)	0,866 [†]
	CT	12 (48,0%)	32 (42,7%)	
	TT	4 (16,0%)	11 (14,7%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 56 Univarijantna logistička regresija analize različitih genotipova *MTHFR* kod osoba sa i bez kombinovane disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MTHFRCC	0,756 (0,296-1,927)	0,558 [†]
MTHFRCT	1,240 (0,500-3,076)	0,642 [†]
MTHFRTT	1,108 (0,319-3,853)	0,872 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Analizom učestalosti pojave različitih simptoma (*bol, devijacija/defleksija, ograničene kretnje, zvuk*) kod različitih genotipova za *GSTM1/GSTT1* u okviru TMD grupe Hi kvadrat testom uočena je statistički značajna razlika između nosilaca M1 i M0 genotipa sa i bez prisutnom devijacijom/defleksijom (Tabela 60). Kod ostalih simptoma istim poređenjem nije uočena statistička značajnost (Tabela 57, Tabela 58, Tabela 61, Tabela 63, Tabela 64, Tabela 66, Tabela 67).

Tabela 57 Učestalost pojave bola kod različitih genotipova za *GSTM1*

Gen	Bol		p	
	DA	NE		
GSTM1	M1	55 (57,9%)	2 (40,0%)	0,431 [†]
	M0	40 (42,1%)	3 (60,0%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 58 Učestalost pojave bola kod različitih genotipova za *GSTT1*

Gen	Bol		p	
	DA	NE		
GSTT1	T1	90 (94,7%)	5 (100,0%)	0,599 [†]
	T0	5 (5,3%)	0 (0,0%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 59 Univarijantna logistička regresija analize različitih genotipova *GSTM1/GSTT1* kod osoba sa i bez bola

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
GSTM1	2,062 (0,329-12,921)	0,439 [†]
GSTT1	0,000 (0,000)	0,999 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 60 Učestalost pojave devijacije/defleksije kod različitih genotipova za *GSTM1*

	Gen	Dev/Def		p
		DA	NE	
GSTM1	M1	42 (65,6%)	15 (41,7%)	0,020*
	M0	22 (34,4%)	21 (58,3%)	

*Statistički značajna razlika; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 61 Učestalost pojave devijacije/defleksije kod različitih genotipova za *GSTT1*

	Gen	Dev/Def		p
		DA	NE	
GSTT1	T1	59 (92,2%)	36 (100,0%)	0,085 [†]
	T0	5 (7,8%)	0 (0,0%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 62 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *GSTM1/GSTT1* kod osoba sa i bez devijacije/defleksije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
GSTM1	2,673 (1,154-6,189)	0,022*
GSTT1	0,000 (0,000)	0,999 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; *Statistički značajna razlika; OR-količnik verovatnoće; 95% CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 63 Učestalost pojave ograničenih kretnji kod različitih genotipova za *GSTM1*

Gen	Ograničene kretnje		p	
	DA	NE		
GSTM1	M1	43 (60,6%)	14 (48,3%)	0,260 [†]
	M0	28 (39,4%)	15 (51,7%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 64 Učestalost pojave ograničenih kretnji kod različitih genotipova za *GSTT1*

Gen	Ograničene kretnje		p	
	DA	NE		
GSTT1	T1	67 (94,4%)	28 (96,6%)	0,649 [†]
	T0	4 (5,6%)	1 (3,4%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 65 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *GSTM1/GSTT1* kod osoba sa i bez ograničenih kretnji

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
GSTM1	1,645 (0,689-3,928)	0,262 [†]
GSTT1	0,598 (0,064-5,593)	0,652 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 66 Učestalost pojave zvuka kod različitih genotipova za *GSTM1*

Gen	Zvuk		p	
	DA	NE		
GSTM1	M1	43 (61,4%)	14 (46,7%)	0,172 [†]
	M0	27 (38,6%)	16 (53,3%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 67 Učestalost pojave zvuka kod različitih genotipova za *GSTT1*

Gen	Zvuk		p	
	DA	NE		
GSTT1	T1	66 (94,3%)	29 (96,7%)	0,617 [†]
	T0	4 (5,7%)	1 (3,3%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 68 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *GSTM1/GSTT1* kod osoba sa i bez zvučnih efekata u zglobu

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
GSTM1	1,820 (0,767-4,317)	0,174 [†]
GSTT1	0,569 (0,061-5,315)	0,621 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Kada smo poredili povezanost navedenih genotipova oba gena sa pojavom TMD disfunkcija nismo dobili statističku značajnost Hi kvadrat testom (Tabela 69, Tabela 70, Tabela 72, Tabela 73, Tabela 75, Tabela 76), što se potvrdilo i logističkom regresionom analizom (Tabela 71, Tabela 74, Tabela 77).

Tabela 69 Učestalost pojave mišićne disfunkcije kod različitih genotipova za *GSTM1*

Gen	Mišićna disfunkcija		p	
	DA	NE		
GSTM1	M1	28 (57,1%)	29 (56,9%)	0,977 [†]
	M0	21 (42,9%)	22 (43,1%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 70 Učestalost pojave mišićne disfunkcije kod različitih genotipova za *GSTT1*

Gen	Mišićna disfunkcija		p	
	DA	NE		
GSTT1	T1	47 (95,9%)	48 (94,1%)	0,680 [†]
	T0	2 (4,1%)	3 (5,9%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 71 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *GSTM1/GSTT1* kod osoba sa i bez mišićne disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
GSTM1	1,011 (0,458-2,233)	0,977 [†]
GSTT1	1,469 (0,235-9,191)	0,681 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 72 Učestalost pojave zglobne disfunkcije kod različitih genotipova za *GSTM1*

Gen	Zglobna disfunkcija		p	
	DA	NE		
GSTM1	M1	46 (60,5%)	11 (45,8%)	0,205 [†]
	M0	30 (39,5%)	13 (54,2%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 73 Učestalost pojave zglobne disfunkcije kod različitih genotipova za *GSTT1*

	Gen	Zglobna disfunkcija		p
		DA	NE	
GSTT1	T1	71 (93,4%)	24 (100,0%)	0,197 [†]
	T0	5 (6,6%)	0 (0,0%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 74 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *GSTM1/GSTT1* kod osoba sa i bez zglobne disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
GSTM1	1,812 (0,718-4,572)	0,208 [†]
GSTT1	0,000 (0,000)	0,999 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 75 Učestalost pojave kombinovane disfunkcije kod različitih genotipova za *GSTM1*

	Gen	Kombinovana disfunkcija		p
		DA	NE	
GSTM1	M1	17 (68,0%)	40 (53,3%)	0,200 [†]
	M0	8 (32,0%)	35 (46,7%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 76 Učestalost pojave kombinovane disfunkcije kod različitih genotipova za *GSTT1*

Gen	Kombinovana disfunkcija		p	
	DA	NE		
GSTT1	T1	23 (92,0%)	72 (96,0%)	0,427 [†]
	T0	2 (8,0%)	3 (4,0%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 77 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *GSTM1/GSTT1* kod osoba sa i bez kombinovane disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
GSTM1	1,859 (0,716-4,832)	0,203 [†]
GSTT1	0,479 (0,075-3,047)	0,436 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Analizom učestalosti pojave različitih simptoma (*bol, devijacija/defleksija, ograničene kretnje, zvuk*) kod različitih genotipova za MMP9 u okviru TMD grupe Hi kvadrat testom nije uočena statistički značajna razlika što je prikazano u tabelama, Tabela 80, Tabela 82, Tabela 84) i potvrđeno logističkom regresionom analizom (Tabela 79, Tabela 81, Tabela 83, Tabela 85).

Tabela 78 Učestalost pojave bola kod različitih genotipova za *MMP9*

Gen	Bol		p
	DA	NE	
CC	61 (64,2%)	3 (60,0%)	0,883 [†]
MMP9 CT	31 (32,6%)	2 (40,0%)	
TT	3 (3,2%)	0 (0,0%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 79 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MMP9* kod osoba sa i bez bola

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MMP9CC	1,196 (0,190-7,514)	0,849 [†]
MMP9CT	0,727 (0,115-4,574)	0,734 [†]
MMP9TT	87797525,253 (0,000)	0,999 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 80 Učestalost pojave devijacije/defleksije kod različitih genotipova za *MMP9*

Gen	Dev/Def		p
	DA	NE	
CC	39 (60,9%)	25 (69,4%)	0,276 [†]
MMP9 CT	24 (37,5%)	9 (25,0%)	
TT	1 (1,6%)	2 (5,6%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 81 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MMP9* kod osoba sa i bez devijacije/defleksije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MMP9CC	0,686 (0,288-1,637)	0,396 [†]
MMP9CT	1,800 (0,726-4,465)	0,205 [†]
MMP9TT	0,270 (0,024-3,085)	0,292 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 82 Učestalost pojave ograničenih kretnji kod različitih genotipova za *MMP9*

Gen	Ograničene kretnje		p
	DA	NE	
CC	45 (63,4%)	19 (65,5%)	0,956 [†]
CT	24 (33,8%)	9 (31,0%)	
TT	2 (2,8%)	1 (3,4%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 83 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MMP9* kod osoba sa i bez ograničenih kretnji

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MMP9CC	0,911 (0,368-2,252)	0,840 [†]
MMP9CT	1,135 (0,449-2,870)	0,789 [†]
MMP9TT	0,812 (0,071-9,314)	0,867 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 84 Učestalost pojave zvuka kod različitih genotipova za *MMP9*

Gen	Zvuk		p
	DA	NE	
CC	45 (64,3%)	19 (63,3%)	
MMP9 CT	24 (34,3%)	9 (30,0%)	0,361 [†]
TT	1 (1,4%)	2 (6,7%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 85 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MMP9* kod osoba sa i bez zvučnih efekata u zglobu

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MMP9CC	1,042 (0,428-2,535)	0,928 [†]
MMP9CT	1,217 (0,483-3,066)	0,676 [†]
MMP9TT	0,203 (0,018-2,329)	0,200 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Nije pokazana statistička značajnost ni pri poređenju isith genotipova sa pojavom različitih disfunkcija što je prikazano u tabelama (Tabela 86, Tabela 88, Tabela 90) i potvrđeno logističkom regresionom analizom (Tabela 87, Tabela 89, Tabela 91).

Tabela 86 Učestalost pojave mišićne disfunkcije kod različitih genotipova za *MMP9*

Gen	Mišićna disfunkcija		p
	DA	NE	
CC	30 (61,2%)	34 (66,7%)	0,198 [†]
MMP9 CT	16 (32,7%)	17 (33,3%)	
TT	3 (6,1%)	0 (0,0%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 87 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MMP9* kod osoba sa i bez mišićne disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MMP9CC	0,789 (0,348-1,789)	0,571 [†]
MMP9CT	0,970 (0,421-2,233)	0,942 [†]
MMP9TT	1791071080,33 (0,000)	0,999 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 88 Učestalost pojave zglobne disfunkcije kod različitih genotipova za *MMP9*

Gen	Zglobna disfunkcija		p
	DA	NE	
CC	47 (61,8%)	17 (70,8%)	0,098 [†]
MMP9 CT	28 (36,8%)	5 (20,8%)	
TT	1 (1,3%)	2 (8,3%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 89 Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova *MMP9* kod osoba sa i bez zglobne disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MMP9CC	0,667 (0,247-1,804)	0,425 [†]
MMP9CT	2,217 (0,745-6,592)	0,152 [†]
MMP9TT	0,147 (0,013-1,695)	0,124 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

Tabela 90 Učestalost pojave kombinovane disfunkcije kod različitih genotipova za *MMP9*

Gen	Kombinovana disfunkcija		p	
	DA	NE		
MMP9	CC	13 (52,0%)	51 (68,0%)	0,353 [†]
	CT	11 (44,0%)	22 (29,3%)	
	TT	1 (4,0%)	2 (2,7%)	

[†]Bez statistički značajne razlike; p-verovatnoća grupe; Hi kvadrat test

Tabela 91 Univarijantna logistička regresija analize različitih genotipova *MMP9* kod osoba sa i bez kombinovane disfunkcije

Univarijantna logistička regresiona analiza		
Posmatrani parametri	expB (95%CI)	p
MMP9CC	0,510 (0,203-1,282)	0,152 [†]
MMP9CT	1,893 (0,745-4,812)	0,180 [†]
MMP9TT	1,521 (0,132-17,525)	0,737 [†]

[†]Bez statistički značajne razlike; OR-količnik verovatnoće; 95%CI-95% interval poverenja; p-verovatnoća grupe

4.4 Multivarijantna logistička regresija

Logističkom regresionom analizom izdvajani su prediktori pojave TMD. Cilj ove analize je bio da se definišu parametri razlika između ispitanika sa i bez TMD, odnosno da se definišu oni parametri koji bi ukazali na visok rizik mogućeg pojavljivanja TMD.

Prvi deo logističke regresione analize jeste univarijantna logistička regresija kojom se ispituje moguća razlika između ispitanika sa i bez TMD u svakom od posmatranih faktora ponaosob. Faktori koji su se univarijantnom analizom pokazali kao značajni ulaze u multivarijantni regresioni model, gde se ispituje nezavisnost uticaja svakog faktora koji se pokazao kao značajan, u prethodnom modelu. Statistički značajan uticaj faktora dobijen univarijantnom analizom objašnjava uticaj tog faktora na pojavu posmatranog poremećaja, ali u prisustvu svih ostalih faktora. Multivarijantnom (višestrukom) logističkom regresionom analizom izdvajaju se faktori koji su sa nezavisnim uticajem na pojavu TMD.

Univarijantnom i multivarijantnom regresionom analizom izračunava se i relativni rizik koji ima najviše značaja kao “mera povezanosti mogućeg uzroka i očekivane posledice” ($\exp(B)$) i on nam pokazuje koliko puta su ispitanici sa posmatranim faktorima rizika pod većom verovatnoćom pojave TMD.

Faktori rizika posmatrani kod pojave TMD bili su: pol, starost, polimorfizmi u MTHFR, GSTM1, GSTT1 i MMP9 genima.

Univarijantnom regresionom analizom kao statistički značajni izdvojili su se: pol, GSTT1 i MMP9 (CC i CT). Svi ovi faktori su ušli u multivarijantni regresioni model.

Multivarijantnom logističkom regresijom kao prediktori razlike između ispitanika sa i bez TMD izdvojili su se: pol i polimorfizam GSTT1 (Tabela 92). Ovo konkretno

znači da su žene bile pod tri puta većim rizikom za pojavu TMD kao i ispitanici sa GSTT1 T1 genotipom, koji su bili pod pet puta većim rizikom za pojavu ovog poremećaja.

Tabela 92 Multivarijantna logistička regresija analize

parametri	Exp (B)	CI	p
pol	2.748	1.522- 4.961	0.001*
MMP9 CC	0.926	0.046-1.928	0.203
MMP9 CT	0.639	0.094-4.342	0.647
GSTT1	4.515	1.625-12.541	0.004*

*Statistički značajna razlika; Exp(B) relativni količnik verovatnoće; CI interval poverenja; p-verovatnoća grupe

5. DISKUSIJA

Stomatološka nauka i praksa su saglasne da temporomandibularne disfunkcije imaju kompleksnu etiologiju i simptomatologiju, ali i dalje se vodi polemika oko toga koji su glavni uzročnici TMD i faktori rizika za njegov nastanak. S obzirom da ovo oboljenje uključuje blisko povezane strukture orofacijalne regije, udružena simptomatologija vrlo često otežava povoljan terapijski ishod (Pertes and Heir 1991). Ovo se odnosi naročito na bol kao jedan od najistaknutijih simptoma, a koji se neretko javlja i sekundarno kao posledica poremećaja okolnih struktura (American Academy of Orofacial Pain, McNeill, and American Academy of Craniomandibular Disorders 1993). Do nedavno su u literaturi, kao najčešći uzroci nastanka TMD, pominjani okluzija, trauma, infekcija, autoimune bolesti, hormonalni poremećaji i psihološki status (Wang et al. 2008, Seligman and Pullinger 1991, Rugh and Solberg 1976, Eversole et al. 1985, Smythe 2005, Suma and Veerendra Kumar 2012, Durham et al. 2010). Međutim, sve su češće studije koje se bave predisponirajućim faktorima za nastanak TMD, a to su pre svega nasledni faktori. Ovo se može objasniti time da je intenzitet bola, lokalizovanost i vreme trajanja bolnih epizoda kao i uticaj bola na kvalitet života i obavljanje dnevnih aktivnosti nešto što je veoma varijabilno od pojedinca do pojedinca. Nova genetička saznanja bi mogla da pomognu u boljoj klasifikaciji sindroma sa orofacijalnim bolom na osnovu prepoznatih genetičkih determinanti u kombinaciji sa faktorima sredine. Čak se predviđa da će nastupiti era genske terapije kada će biti moguće “nepovoljne gene“ zameniti genima koji će sprečiti pojavu hroničnog bola ili poboljšati stanje pacijenata kod kojih je već prisutan hronični orofacijani bol (Seltzer and Dorfman 2004). Trenutno, terapijski postupak podrazumeva kombinaciju reverzibilne okluzalne terapije (splintovi), savetovanja, fizikalne terapije, farmakoterapije, promene navika ponašanja i na kraju hirurgiju. Dugo je bio prihvaćen stav da je diskrepanca u anteroposteriornoj poziciji donje vilice, poznata kao “loš zagrižaj”, morala da bude eliminisana kako bi se uspostavila fiziološki optimalna okluzija i funkcija mišića. U hirurške procedure kojima se pokušava lečiti TMD spadaju artrocenteza, artroskopija, otvorena artrotomija i kombinovane rekonstruktivne metode za zglob i donju vilicu. Prednost se svakako daje neinvazivnim metodama saniranja TMD (u

proseku u 85% do 90% slučajaja) bilo da se radi o mišićnim, bilo o zglobnim poremećajima (McCain et al. 1992, Israel 1999, de Leeuw 2008).

Poslednjih godina sve je više studija posvećenih ulozi genetike u etiologiji TMD i njenim manifestacijama. Ovakvi pristupi etiopatogenezi TMD koji zadiru u polje genetike, sa fokusom na precizno definisanje genotipova odgovornih za predispoziciju za nastanak oboljenja i efikasnijih terapijskih strategija, čine se sasvim opravdanim.

Brojne studije koje su bile bazirane na imunohistohemiji pokazale su da je poremećaj regulacije određenih klasa gena uključen u nastanak TMD. U studiji Leonarda i saradnika je pokazano da “alfa smooth protein” (α SMA) i “heat shock protein 27” (HSP27) imaju pojačanu funkciju kod osoba sa dislokacijom diskusa TM zgloba (Leonardi, Caltabiano, et al. 2002, Leonardi, Villari, et al. 2002). Nedavno je ista grupa autora objasnila vezu ekspresije “TRAIL”-a sa degenerativnim promenama u zglobu i pokazala da MMP7 i MMP9 zauzimaju važno mesto u razvoju destruktivnih procesa u zglobu. I pojedine studije na animalnim modelima ističu važnost gena u nastanku TMD. Mutacije na *Col2a1* genu su uzrokovale osteoartritis kod miševa dok je kod ank mutanta dolazilo do pojave fibrozne ankiloze TM zgloba (Ricks et al. 2013, Huang et al. 2011). Ipak treba istaći da genske mutacije kao neposredni uzročnici pojave TMD kod ljudi još uvek nisu opisane.

U jednoj prospektivnoj kohortnoj studiji gde su ispitivali preko 300 gena pronađeno je nekoliko genskih polimorfizama koji utiču na TMD rizik, prvenstveno SNP u serotonin receptor genu (*HTR2A*), *COMT* i opioid receptor delta 1 genu (*OPRD1*). Skorija studija u okviru OPERRA projekta opisuje povezanost polimorfizama u *SCN1A*, *PTGS1*, *ACE2* sa kliničkim, psihološkim i senzornim TMD fenotipovima. Nekoliko studija je opisalo važnost *COMT* u nastanku TMD. U studiji Michelotti i sar. je pokazano da rs165656 i rs4646310 polimorfizmi imaju važnu ulogu u predispoziciji za pojavu TMD (Michelotti et al. 2014), dok su Schwahn i sar. dokazali da postoji povezanost polimorfizma

rs5993882 sa bolom kod TMD (Schwahn et al. 2012). Polimorfizmi u genu za serotoninški transporter i genu za estrogenski receptor su pokazali uticaj na bol kod TMD, dok je *ANKH'OR* polimorfizam doveden u vezu sa dislokacijom diskusa bez redukcije (Huang et al. 2011, Mutlu et al. 2004, Kang et al. 2007).

Ova studija je imala za cilj da upotpuni saznanja o uticaju nekih gena čiji produkti imaju važne metaboličke ili zaštitne uloge u organizmu na razvoj TMD i simptomatologiju ovog oboljenja.

5.1 Diskusija rezultata kliničkih ispitivanja

Distribucija ispitanika prema polu

U našem istraživanju je pokazano da osobe ženskog pola u poređenju sa osobama muškog pola imaju veću predispoziciju za pojavu TMD. Već pri anketiranju ispitanika, primetna je bila razlika među polovima. Većina žena koje su prijavljivale simptome TMD, su ambiciozne, pedantne i odgovorne osobe. Takođe, u pitanju su uglavnom hipersenzibilne osobe sličnog psihosocijalnog i kulturološkog statusa. Odnos muškog i ženskog pola među pacijentima sa TMD varira od 3:1 do 9:1 u zavisnosti od studije (Huber and Hall 1990). Osim što je učestalost TMD kod osoba ženskog pola značajno veća u odnosu na muški pol i bol i palpatorna osetljivost mišića su izraženiji. Neki radovi nalaze čak i do 5 puta veću zastupljenost žena (Gray, Davies, and Quayle 1994, Dworkin et al. 1990). Zabeležen je i podatak u literaturi da žene imaju izraženiju osetljivost u odnosu na muškarce na stimuluse toplo-hladno u zavisnosti i od područja u kome žive (Kim, Neubert, San Miguel, et al. 2004). Autori jedne rane studije došli su do zaključka da je visoka zastupljenost TMD kod žena posledica činjenice da su žene odgovornije prema sopstvenom zdravlju pa su tako češće posećivale lekara i samim tim im je češće dijagnostikovana TMD (Friction 1991). Druge studije prvenstveno dovode u vezu hormonalni status kod osoba ženskog pola sa pojavom TMD. Ranije je napomenuto

da polimorfizmi gena koji kodiraju enzime uključene u metabolizam estrogena mogu uticati na nastanak TMD. Kao najčešći enzim navodi se katehol O metil transferaza (COMT). Kao drugi gen koji je u korelaciji sa estrogenom je aromataza (*CYP19A1*) za koji je pronađeno da ima izraženu ekspresiju u hrskavici (studija na pacovima) što ukazuje na njegovu potencijalnu ulogu u patofiziološkim procesima koji se odvijaju u hrskavici kondila (Yu et al. 2006). U našoj studiji nije pokazana razlika između osoba ženskog i osoba muškog pola u okviru TMD grupe pri poređenju prisustva simptoma kao i podtipova temporomandibularnih disfunkcija. Međutim, pol se izdvojio kao prediktor razlike između osoba sa i bez TMD. Utvrđeno je da osobe ženskog pola imaju tri puta veću predispoziciju za pojavu TMD u poređenju sa osobama muškog pola.

Distribucija disfunkcija u okviru TMD grupe

U okviru kliničkog ispitivanja protokol RDC/TMD je poslužio da se TMD svrstaju u tri podgrupe radi preciznijeg postavljanja dijagnoze. Svakom pacijentu je postavljena biološka dijagnoza (*Axis I*), a nakon toga definisan psihološko-emosivni i bihejvioralni status koji se menja pod uticajem bola (*Axis II*). Zabeležen je psihosocijalni status i eventualni poremećaj obavljanja svakodnevnih aktivnosti (Dworkin and LeResche 1992). Dworkin i sar. (1992) navode da se protokol može primeniti kako na opštu tako i na kliničku populaciju kojoj bi u ovom slučaju pripadale osobe sa simptomima i znacima TMD (Dworkin, Von Korff, and LeResche 1992). Rezultati naše studije su pokazali da je u grupi od 100 ispitanika koji su imali dijagnostikovan TMD 51% imalo zglobnu disfunkciju, 24% mišićnu a 25% kombinovanu mišićno-zglobnu disfunkciju. Druge studije u kojima je analizirana distribucija podtipova pokazuju veliku heterogenost rezultata. I pored primenjene iste dijagnostičke metode u studiji Sipila i saradnika zastupljenost podgrupa je drugačija od naše (Sipilä 2002). Razlike u distribuciji podgrupa TMD mogu biti posledica različitog definisanja kriterijuma ispitivane populacije i različitih dijagnostičkih metoda. Pored toga važna je i starost i vrsta ispitivane populacije (klinička ili opšta). De Leeuw i saradnici su na osnovu dijagnoze postavljene drugačijim metodom nego što je u našoj studiji, utvrdili gotovo podjednaku zastupljenost zglobnih i

mišićnih disfunkcija, oko 33%, dok je 16% ispitanika imalo znake i simptome kombinovane disfunkcije (de Leeuw et al. 1994).

Uticao godina na pojavu simptoma i učestalost disfunkcija

Starosna dob svakako može biti jedan od činilaca koji utiču na pojavu nekih od simptoma TMD. Naša studija je pokazala da u grupi obolelih od TMD godine predstavljaju faktor razlike između onih sa klikovima i onih bez prisutnih zvučnih efekata u zglobovima kao i u grupi osoba sa i bez mišićne odnosno zglobne disfunkcije. Utvrđeno je naime da osobe mlađe od 30 godina imaju dva i po puta manju verovatnoću za pojavu mišićne a tri puta veću verovatnoću za pojavu zglobne disfunkcije i zvučnih efekata u zglobovima. Slične rezultate, u smislu uticaja godina na pojavu simptoma, su dobili i Karibe i sar. koji su poredili učestalost simptoma TMD u grupi mladih pacijenata sa TMD. Rezultati ove studije ističu da kasni adolescenti iz grupe 16-18 godina imaju izraženiju bolnu osetljivost u orofacijalnoj regiji i veće poteškoće pri obavljanju dnevnih aktivnosti u odnosu na grupu mlađih pacijenata (6-12; 13-15 godina). Nasuprot našim rezultatima, nisu pronašli statistički značajnu razliku u pojavi TMD između osoba muškog i ženskog pola (Karibe et al. 2012).

Carra i saradnici su u svojoj studiji poredili razliku učestalosti pojave noćnog bruksizma kod dece do 12 godina i adolescenata (mean±SD; 12.0 ± 2.3) (Carra et al. 2011). Interesantno je to da je pokazana znatno veća učestalost bruksizma kod dece (67.3%). Naši rezultati su pokazali da su godine prediktor razlike za pojavu mišićne i zglobne disfunkcije kao i zvučnih efekata u zglobovima.

5.2 Diskusija rezultata molekularno-genetičkih ispitivanja

Uticao genetike u današnje vreme dobija na značaju u ispitivanju mnogih oboljenja. Istraživači su usmerili svoja razmišljanja u pravcu genetičkih faktora koji predstavljaju

faktore susceptibilnosti za nastanak bolesti. Dosadašnje studije koje su se bavile genetikom TMD su bile ograničenog dometa zbog izrazite heterogenosti simptoma ovog oboljenja. Stoga je neophodno da se ulože dodatni napor da bi se otkrili geni koji doprinose nastanku TMD.

Postoje brojni molekularni mehanizmi genetski kontrolisani koji su odgovorni za nastanak TMD a mogu se svrstati u više različitih kategorija (Oakley and Vieira 2008). Ako se uzme u obzir značajna interindividualna varijabilnost simptomatologije, pre svega osetljivosti u vidu hroničnog orofacijalnog bola i njegovih karakteristika, razumno je smatrati da je ovaj sindrom kompleksna nasledna osobina, pod uticajem većeg broja alela određenih polimorfni gena koji su u interakciji sa faktorima sredine (Seltzer and Dorfman 2004) što je dokazala i naša studija. Postoje studije koje su se bavile regionom hromozoma gde su lokalizovani geni za bol (Mailis and Wade 1994, Kemler et al. 1999, van de Beek et al. 2003, Sato et al. 2002), pa čak i neke koje su uspele da povežu genske polimorfizme sa nivoima bola (Cohen et al. 2002, Foster, Sazenski, and Stodgell 2004). Nekoliko studija je ukazalo na postojanje povezanosti određenih SNP sa TMD i postavilo dobre temelje za dalja istraživanja na polju genetike. Ovom studijom obuhvaćeni su geni koji kontrolišu važne metaboličke procese koji se odvijaju u organizmu. Funkcionalni polimorfizmi u genima koji igraju ulogu u razgradnji ekstraćelijskog matriksa, oksidativnom metabolizmu i metabolizmu folata mogu da utiču na razvoj TMD, što je bila ideja i nekih prethodnih studija, ali su pouzdani, nedvosmisleni zaključci izostali. S obzirom da produkti ovih gena imaju važne metaboličke uloge i mogu potencijalno da doprinesu patogenezi TMD, smatrali smo da ovi geni i njihovi polimorfizmi zavređuju dalja istraživanja. Kroz studiju asocijacije, poređenjem kontrolne i TMD grupe, razmatrali smo koji su genotipovi odgovorni za veću tendenciju ka oboljevanju.

5.2.1 MTHFR polimorfizam (rs1801133)

MTHFR C677T polimorfizam sve više dobija na značaju kao faktor rizika za pojavu različitih oboljenja, posebno malignih. Isto tako, smatra se da je u osnovi molekularnog mehanizma na kom počiva zaštitna uloga folata. Vršena su brojna ispitivanja uticaja ovog polimorfizma na nastanak limfoproliferativnih bolesti pa se u literaturi sreću rezultati koji povezuju genotipove sa smanjenim, odnosno povećanim rizikom ili su bez korelacije sa nastankom oboljenja (Li et al. 2015, Timuragaoglu et al. 2006, Damnjanovic et al. 2010). Neke studije su pokazale zaštitnu ulogu varijantnog alela T, odnosno da deca sa MTHFR TT genotipom imaju smanjeni rizik od oboljevanja od akutne limfoblastne leukemije (ALL), dok je u drugima povezivan sa povećanim rizikom od pojave bolesti. Pokazano je da MTHFR TT genotip smanjuje svojim nosiocima rizik oboljevanja do 50% u odnosu na nosioce CT i CC genotipa u slučaju visokog statusa folata u organizmu, dok u populaciji sa niskim unosom folata, nosioci TT genotipa imaju nepromenjen ili povećan rizik oboljevanja od maligniteta u odnosu na “wild type“ homozigote i heterozigotne nosioce (Chen, Giovannucci, and Hunter 1999, Robien and Ulrich 2003, Krajinovic et al. 2004).

Neki podaci iz literature ukazuju na CC genotip kao potencijalni predisponirajući faktor za nastanak osteoartritisa (Inanir et al. 2013). Imajući u vidu da se radi o degenerativnom oboljenju zgloba sa destruktivnim procesima zglobne hrskavice, više autora je smatralo da ovaj gen može da se svrsta u grupu faktora rizika za nastanak i drugih degenerativnih bolesti.

Poznato je da metabolizam folata bitno utiče na završnu fazu rasta tkiva ne samo putem sinteze nukleinskih kiselina već i kroz regulaciju procesa metilacije DNK i proteina (Friso and Choi 2005, Ho, Massey, and King 2013, Blom and Smulders 2011). Nedostatak nutritivnih materija kao što je smanjenje nivoa vitamina B1, B6 i B12 i/ili folne kiseline može da indukuje pojavu miofascijalnog bola i disfunkcije i ovi nedostaci

su vrlo česta pojava kod osoba sa TMD (Mehra and Wolford 2008). Abnormalno niske vrednosti ovih nutritijenata konstantno pogoršavaju stanje u predelu miofacijalnih trigger zona i mogu da uzrokuju hronični bol (Simons, Travell, and Simons 1999).

Deficijencija folata može da utiče i na genomsku i hromozomsku stabilnost kao i na regulaciju genske ekspresije (Duthie 1999). Povezanost vitamina i genetičkih faktora u etiologiji oboljenja je relativno kontroverzna (Mäder et al. 1988). Aneiros i grupa autora objašnjavaju da folat – metionin ciklus ima uticaja na oba pomenuta faktora. Pojedine polimorfne varijante enzima koji su uključeni u folatni ciklus utiču na proliferaciju putem metilacije DNK i proteina. Isti autori ukazuju na dva načina na koji su folati povezani sa TMD, jedan definišu kao genetički zbog genskih polimorfizama a drugi kao epigenetski preko nutritivnih navika i uticaja folata. Poznato je da je deficit folata jedan od glavnih vitaminskih deficita u organizmu. Saglasno sa prethodno pomenutim činjenicama, funkcionalni polimorfizmi u genima koji kontrolišu metabolizam folata mogu da budu modifikatori osetljivosti na TMD. Rezultati ove doktorske disertacije nisu pokazali povezanost između MTHFR C677T polimorfizma i TMD. Nije uočena statistički značajna razlika između kontrolne i TMD grupe što je u saglasnosti sa rezultatima studije Aneirosa i sar. Zanimljivo je da je ista grupa autora dobila korelaciju između 3 druga gena uključena u regulaciju metabolizma folata (serin hidroksimetil transferaza (SHMT1), metilentetrahidrofolat dehidrogenaza (MTHFD1), metioninska sintaza reduktaza (MTRR)) i TMD (Aneiros-Guerrero et al. 2011).

5.2.2 GSTM1 i GSTT1 polimorfizmi

Oksidativni stres i njegova uloga u patologiji TM zgloba se dugo već razmatra. Glutation je neenzimski antioksidant koji ima esencijalnu ulogu u uklanjanju slobodnih radikala kao što su hidrogen peroksid, superoksid radikali i membranski nosači. Nagomilavanje ovih molekula može dovesti do promena u zglobu i mnogi to objašnjavaju

time da postoji direktna veza između zapaljenskih reakcija u zglobu i povećanog oslobađanja slobodnih radikala (Ahmed et al. 2013).

GST su antioksidativni enzimi, sa visokom ekspresijom i kompleksnom transkripcionom i posttranskripcionom regulacijom. Osobe pokazuju manju ili veću podložnost različitim bolestima kada su izložene uticaju egzogenih i endogenih faktora, između ostalog i oksidativnom stresu. Polimorfna ekspresija gena GST je opisana još u ranim '80 tim godinama (Scott and Wright 1980, Warholm et al. 1980). Poslednjih 10 godina vlada veliko interesovanje za biološke posledice GST polimorfizama. Razumno je bilo pretpostaviti da odsustvo gena u slučaju delecionog polimorfizma ili polimorfizmi tipa SNP koji dovode do smanjene aktivnosti GST aza mogu uticati i na rizik od nastanka TMD. Nivo ekspresije GST je ključni faktor u određivanju osetljivosti ćelija na dejstvo toksičnih materija u organizmu. Literatura opisuje ulogu GSTM1 i GSTT1 u oboljenjima povezanim sa oksidativnim stresom kao što su dijabetes melitus, Alchajmerova bolest, kancer i dr. (Tang et al. 2013, Piacentini et al. 2012, Wang et al. 2014, Santl Letonja et al. 2012). Nekoliko studija je pokazalo uticaj slobodnih radikala, oksidativnog stresa, koncentracije antioksidanasa u serumu itd. na grupu bolnih sindroma koji imaju sličnosti u simptomatologiji sa TMD, kao što su fibromijalgija (FM), reumatska oboljenja koja karakteriše iradirajući bol u mišićima, ukočenost i bolne zone (Bennett 1997, De Luca et al. 2011). Pojava slobodnih radikala kao rezultat oksidativnog stresa i dizbalans redoks biomarkera su registrovani i u slučajevima traume, mehaničkog stresa, dislokacije diskusa TM zgloba i degenerativnih promena u zglobu (Gremillion 2002). Ono što je u našem istraživanju bila zamisao jeste da se utvrdi da li smanjenje enzimske aktivnosti, u ovom slučaju usled kompletne delecije gena, može biti razlog nastanka TMD. Delecioni polimorfizam GSTT1*0 (-/-) je najčešće izučavani polimorfizam kod GSTT1 gena. Iznenadjuće je da naša studija pokazuje da GSTT1 nulti alel ima protektivnu ulogu i da nosioci homozigotne delecije imaju manji rizik za nastanak TMD (OR=0,28, 95% CI=0,10-0,74). Ulogu GSTM1 nultog genotipa u razvoju TMD dokazala je samo jedna studija i definisala ga kao faktor susceptibilnosti za TMD (Aneiros-Guerrero et al. 2011). GSTM1 gen može dati ili funkcionalni protein (homozigoti za nedeletirani alel ili

heterozigoti) ili dovesti do potpunog odsustva enzima (homozigoti za deletirani alel ili tzv nulti genotip) (Eaton and Bammler 1999). Pokazano je da nulta varijanta GSTM1 gena ima uticaj na pojavu kancera, muškog steriliteta, dijabetes melitusa tip I i dr. (Dhillon, Shahid, and Husain 2007, Strange et al. 1991, Bekris et al. 2005). Zaštitna uloga GST nultog genotipa je prethodno opisana u nekim od studija koje su se bavile akutnim infarktom miokarda (GSTT1 nulti genotip) i dijabetes melitus tip I (GSTM1 nulti genotip) (Bekris et al. 2005, Singh et al. 2011). Naša studija je takođe logističkom regresionom analizom pokazala da prisustvo M1 a odsustvo T1 nosi smanjen rizik za pojavu TMD (OR=0,16, 95% CI= 0,03-0,58). Kao jedan od zanimljivih rezultata jeste i češća pojava devijacije/defleksije donje vilice kod osoba nosilaca M1 genotipa, što smo dobili poređenjem svih genotipova sa definisanim simptomima TMD. Nisu još uvek pronađeni slični rezultati u literaturi što bi moglo da predstavlja i ideju za buduće istraživače koji bi eventualno neke druge polimorfizme gena mogli da svrstaju u potencijalne faktore rizika za pojavu simptoma TMD.

5.2.3 MMP9 polimorfizam (rs3918242)

Matriksne metaloproteinaze su cink zavisne endopeptidaze koje učestvuju u razgradnji skoro svih komponenti ekstracelularnog matriksa uključujući i intersticijalne i membranske kolagene, fibronektin, laminin i proteoglikane (Kontogiorgis, Papaioannou, and Hadjipavlou-Litina 2005). Poznato je i da modulišu deobu ćelija, migraciju, angiogenezu i tumorsku invaziju (Cotignola et al. 2007). Ovi enzimi su uključeni u remodelovanje i razgradnju vezivnog tkiva i imaju važnu ulogu u degenerativnim promenama u TM zglobu (Taskin et al. 2011). Matriksna metaloproteinaza 9 se smatra najkompleksnijom iz grupe metaloproteinaza kada je u pitanju proteinska struktura i regulacija aktivnosti (Opdenakker, Van den Steen, and Van Damme 2001). Aktivnost ovog enzima je kontrolisana na nivou transkripcije s obzirom da promotor gena za *MMP9* reaguje na signalne molekule poput citokina i faktora rasta (Huhtala et al. 1991, Kondapaka, Fridman, and Reddy 1997). Prema ranijim podacima iz literature zna se da polimorfizam u promotoru gena za *MMP9* ima značajnu ulogu u razvoju degenerativnih

oboljenja kao što su artritis i arteroskleroza (Clegg and Carter 1999). Naša studija je prva koja je pronašla povezanost između polimorfizma u promotoru gena za *MMP9* i povećanog rizika za nastanak TMD. Pošto T alel ima veću transkripcionu aktivnost iz ovoga proizilazi da se postiže viši nivo produkcije metaloproteinaze *MMP9* što može neposredno da utiče na degenerativne promene u TM zglobu kod nosilaca T alela. U našoj studiji je utvrđeno da nosioci T alela imaju 2 puta veći rizik za nastanak TMD (OR=2.13, 95% CI=1.24–3.67, p=.005). Do sličnog rezultata su došli i Loreto i sar. u jednoj skorijoj studiji koja je dovela u vezu povećanu ekspresiju *MMP9* enzima i dislokaciju diskusa u TM zglobu koristeći imunohistohemijski pristup (Loreto et al. 2013). U skladu sa našim rezultatima, i studija o degenerativnim promenama lumbalnog diska (LDD) je takođe potvrdila da osobe sa CT/TT genotipovima imaju veći rizik da obole od LDD u poređenju sa nosiocima CC genotipa (Sun et al. 2009). Suprotno našim rezultatima, Planello i saradnici nisu pronašli bilo kakvu povezanost između povećanog rizika za pojavu TMD i polimorfizama u genima za *MMP3* i *MMP9*, ali su dokazali da *MMP1* polimorfizam predstavlja faktor rizika za TMD u italijanskoj populaciji (Planello et al. 2011). Povezanost *MMP1* polimorfizma i degenerativnih promena u TM zglobu potkrepljuju i neke studije koje su zabeležile povećan nivo *MMP1* u sinovijalnoj tečnosti u zglobnom prostoru (Kanyama et al. 2000, Srinivas et al. 2001), dok je u drugoj studiji konstatovan povećan nivo *MMP9* (Yoshida et al. 2006). Grupa turskih autora je takođe proučavala *MMP1* i *MMP3* polimorfizam i TMD ali nije pronašla bilo kakvu korelaciju (Taskin et al. 2011). Polimorfizam u promotoru gena za *MMP3* je odgovoran za destruktivne promene u zglobu sa reumatoidnim artritismom sa izraženijom kliničkom slikom kod nosilaca 6A/6A genotipa što potvrđuju rezultati jedne britanske studije (Mattey et al. 2004). U studiji Luo i sar. je pronađena asocijacija između pojave anteriorne dislokacije diskusa (zvučni efekti u zglobu) i polimorfizma u promotoru gena za *MMP1* -1607 1G/2G (Luo et al.). Naša studija nije pokazala značajne rezultate ispitivanjem povezanosti najčešćih simptoma TMD sa različitim *MMP9* genotipovima. Sigurno da bi dalja istraživanja na temu korelacije genotip-klinički fenotip dodatno rasvetlila etiologiju TMD i rešila dilemu pravovremene dijagnoze i terapije ovog kompleksnog oboljenja.

Nova otkrića patofiziologije TM zgloba vode ka poboljšanju terapijskog pristupa identifikovanjem osoba sa većim rizikom za nastanak TMD. Ovo bi moglo da vodi i pronalaženju specifičnih medikamenata sa inhibitornim dejstvom na ekspresiju onih gena koji povećavaju rizik.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu prethodno prikazanih rezultata, a u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima izvedeni su zaključci ove doktorske disertacije :

Epidemiološki i klinički parametri:

- ❖ TMD su značajno zastupljenije kod osoba ženskog pola u odnosu na osobe muškog pola.
- ❖ Zglobne disfunkcije su znatno učestalije u odnosu na mišićne i kombinovane.
- ❖ U TMD grupi značajno više je bilo osoba sa prisutnim različitim simptomima nego osoba bez simptoma.
- ❖ Starosna dob utiče na pojavu zvučnih efekata u zglobu kao i mišićne i zglobne disfunkcije kod pacijanata sa temporomandibularnim disfunkcijama. Osobe mlađe od 30 godine imaju **tri puta veću** verovatnoću za pojavu zvučnih efekata u zglobu i zglobne disfunkcije od osoba starijih od 30 godina.
- ❖ Osobe mlađe od 30 godina imaju **dva i po puta manju** verovatnoću za pojavu mišićne disfunkcije. Iz ovoga proizilazi da je pojava zglobnih disfunkcija i zvučnih efekata karakteristika mladih, a da stariji imaju značajno veću predispoziciju za pojavu mišićnih disfunkcija.

Genetički parametri

- ❖ Polimorfizam u genu za MTHFR nije se pokazao kao faktor predispozicije za nastanak TMD.
- ❖ Delecioni polimorfizam u genu za GSTM1 i GSTT1 igra ulogu modifikatora predispozicije za nastanak TMD, tačnije ima protektivni efekat. Nosioци nultog GSTT1 genotipa i kombinacije GSTM1 M1 i GSTT1 T0 genotipova imaju umanjeni rizik za pojavu TMD.
- ❖ Nosioци GSTM1 M1 genotipa su pokazali češću pojavu devijacije/defleksije u poređenju sa nosiocima M0 genotipa, tj. imaju tri puta veću verovatnoću za pojavu ovog simptoma.
- ❖ Polimorfizam u genu za MMP9 se pokazao kao modulator rizika za nastanak TMD. Nosioци CT genotipa ispoljavaju dva puta veći rizik za nastanak TMD u odnosu na osobe divljeg genotipa (CC homozigoti).
- ❖ Multivarijantnom logističkom regresionom analizom utvrđeno je da su glavni faktori rizika za nastanak TMD:
 - ženski pol (tri puta veći rizik za pojavu TMD)
 - GSTT1 T1 genotip (pet puta veći rizik za pojavu ovog poremećaja).

7. LITERATURA

-
-
- Ablin, J. N., H. Cohen, and D. Buskila. 2006. "Mechanisms of Disease: genetics of fibromyalgia." *Nat Clin Pract Rheumatol* 2 (12):671-8. doi: 10.1038/ncprheum0349.
- Ahmed, A. Z., H. A. El-Shahaly, A. S. Omar, and M. H. Ghattas. 2013. "Patterns of angiotensin converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism among an Egyptian cohort of patients with rheumatoid arthritis." *Int J Rheum Dis* 16 (3):284-90. doi: 10.1111/j.1756-185X.2012.01820.x.
- Ahmed, N., A. Bloch-Zupan, K. J. Murray, M. Calvert, G. J. Roberts, and V. S. Lucas. 2004. "Oral health of children with juvenile idiopathic arthritis." *J Rheumatol* 31 (8):1639-43.
- American Academy of Orofacial, Pain, C. McNeill, and Disorders American Academy of Craniomandibular. 1993. *Temporomandibular disorders: guidelines for classification, assessment, and management, Quintessence books: Quintessence Books.*
- Aneiros-Guerrero, A., A. M. Lendinez, A. R. Palomares, B. Perez-Nevot, L. Aguado, A. Mayor-Olea, M. Ruiz-Galdon, and A. Reyes-Engel. 2011. "Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes, DRD4 and GSTM1 are related to temporomandibular disorder." *BMC Med Genet* 12:75. doi: 10.1186/1471-2350-12-75.
- Armijo-Olivo, S., K. Rappoport, J. Fuentes, I. C. Gadotti, P. W. Major, S. Warren, N. M. Thie, and D. J. Magee. 2011. "Head and cervical posture in patients with temporomandibular disorders." *J Orofac Pain* 25 (3):199-209.
- Ash, Major M., and Sigurd Peder Ramfjord. 1995. *Occlusion*. 4th ed. ed. Philadelphia, Pa.: W.B. Saunders.
- Astolfi, C. M., A. L. Shinohara, R. A. da Silva, M. C. Santos, S. R. Line, and A. P. de Souza. 2006. "Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a Brazilian population." *J Clin Periodontol* 33 (10):699-703. doi: 10.1111/j.1600-051X.2006.00979.x.
- Attanasio, R. 1991. "Nocturnal bruxism and its clinical management." *Dent Clin North Am* 35 (1):245-52.

-
-
- Barlas, I. O., M. Sezgin, M. E. Erdal, G. Sahin, H. C. Ankarali, Z. M. Altintas, and E. Türkmen. 2009. "Association of (-1,607) 1G/2G polymorphism of matrix metalloproteinase-1 gene with knee osteoarthritis in the Turkish population (knee osteoarthritis and MMPs gene polymorphisms)." *Rheumatol Int* 29 (4):383-8. doi: 10.1007/s00296-008-0705-6.
- Bekris, L. M., C. Shephard, M. Peterson, J. Hoehna, B. Van Yserloo, E. Rutledge, F. Farin, T. J. Kavanagh, and A. Lernmark. 2005. "Glutathione-s-transferase M1 and T1 polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset." *Autoimmunity* 38 (8):567-75. doi: 10.1080/08916930500407238.
- Bell, W. E. 1982. *Clinical Management of Temporomandibular Disorders: Year Book Medical Publishers.*
- Bell, W. E. 1990. *Temporomandibular disorders 3 Ed: Classification, diagnosis, management: Year Book Medical Publishers.*
- Bennett, R M. 1997. "The fibromyalgia syndrome." In *Textbook of rheumatology*, edited by W N Kelley, E D Haris, S Ruddy and C B Sledge, 511-519. Philadelphia: Saunders.
- Bhalang, K., A. Sigurdsson, G. D. Slade, and W. Maixner. 2005. "Associations among four modalities of experimental pain in women." *J Pain* 6 (9):604-11. doi: 10.1016/j.jpain.2005.04.006.
- Blom, H. J., and Y. Smulders. 2011. "Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects." *J Inherit Metab Dis* 34 (1):75-81. doi: 10.1007/s10545-010-9177-4.
- Bragdon, E. E., K. C. Light, N. L. Costello, A. Sigurdsson, S. Bunting, K. Bhalang, and W. Maixner. 2002. "Group differences in pain modulation: pain-free women compared to pain-free men and to women with TMD." *Pain* 96 (3):227-37.
- Burch, J G. 1977. "Occlusion related to craniofacial pain." In *Facial pain*, edited by C C Alling and P E Mahan, 165-80. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Bush, F. M., J. M. Whitehill, and M. F. Martelli. 1989. "Pain assessment in temporomandibular disorders." *Cranio* 7 (2):137-43.
-
-

-
-
- Carlsson, G. E., and T. Magnusson. 2000. *Behandlung Temporomandibulärer Funktionsstörungen in der Praxis*. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH.
- Carra, M. C., N. Huynh, P. Morton, P. H. Rompré, A. Papadakis, C. Remise, and G. J. Lavigne. 2011. "Prevalence and risk factors of sleep bruxism and wake-time tooth clenching in a 7- to 17-yr-old population." *Eur J Oral Sci* 119 (5):386-94. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00846.x.
- Chen, J., E. L. Giovannucci, and D. J. Hunter. 1999. "MTHFR polymorphism, methyl-replete diets and the risk of colorectal carcinoma and adenoma among U.S. men and women: an example of gene-environment interactions in colorectal tumorigenesis." *J Nutr* 129 (2S Suppl):560S-564S.
- Clark, G. T., Y. Tsukiyama, K. Baba, and T. Watanabe. 1999. "Sixty-eight years of experimental occlusal interference studies: what have we learned?" *J Prosthet Dent* 82 (6):704-13.
- Clegg, P. D., and S. D. Carter. 1999. "Matrix metalloproteinase-2 and -9 are activated in joint diseases." *Equine Vet J* 31 (4):324-30.
- Cohen, H., D. Buskila, L. Neumann, and R. P. Ebsstein. 2002. "Confirmation of an association between fibromyalgia and serotonin transporter promoter region (5-HTTLPR) polymorphism, and relationship to anxiety-related personality traits." *Arthritis Rheum* 46 (3):845-7.
- Costen, J. B. 1997. "A syndrome of ear and sinus symptoms dependent upon disturbed function of the temporomandibular joint. 1934." *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106 (10 Pt 1):805-19.
- Cotignola, J., B. Reva, N. Mitra, N. Ishill, S. Chuai, A. Patel, S. Shah, G. Vanderbeek, D. Coit, K. Busam, A. Halpern, A. Houghton, C. Sander, M. Berwick, and I. Orlow. 2007. "Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma." *BMC Med Genet* 8:10. doi: 10.1186/1471-2350-8-10.
- Damnjanovic, T., R. Milicevic, T. Novkovic, O. Jovicic, V. Bunjevacki, B. Jekic, L. Lukovic, I. Novakovic, D. Redzic, and J. Milasin. 2010. "Association between the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia in Serbian children." *J Pediatr Hematol Oncol* 32 (4):e148-50. doi: 10.1097/MPH.0b013e3181cbd252.

-
-
- De Boever, J. A., G. E. Carlsson, and I. J. Klineberg. 2000. "Need for occlusal therapy and prosthodontic treatment in the management of temporomandibular disorders. Part II: Tooth loss and prosthodontic treatment." *J Oral Rehabil* 27 (8):647-59.
- de Leeuw, J. R., W. J. Ros, M. H. Steenks, A. M. Lobbezoo-Scholte, F. Bosman, and J. A. Winnubst. 1994. "Cranio-mandibular dysfunction: patient characteristics related to treatment outcome." *J Oral Rehabil* 21 (6):667-78.
- de Leeuw, R., R. J. Albuquerque, A. H. Andersen, and C. R. Carlson. 2006. "Influence of estrogen on brain activation during stimulation with painful heat." *J Oral Maxillofac Surg* 64 (2):158-66. doi: 10.1016/j.joms.2005.10.006.
- de Leeuw, Reny. 2008. *Orofacial Pain: Guidelines for Assessment, Diagnosis, and Management*. Chicago: Quintessence Pub Co.
- De Luca, C., D. Raskovic, V. Pacifico, J. C. Thai, and L. Korkina. 2011. "The search for reliable biomarkers of disease in multiple chemical sensitivity and other environmental intolerances." *Int J Environ Res Public Health* 8 (7):2770-97. doi: 10.3390/ijerph8072770.
- De Vries, B., J. Haan, R. R. Frants, A. M. Van den Maagdenberg, and M. D. Ferrari. 2006. "Genetic biomarkers for migraine." *Headache* 46 (7):1059-68. doi: 10.1111/j.1526-4610.2006.00499.x.
- Dhillon, V. S., M. Shahid, and S. A. Husain. 2007. "Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men." *Mol Hum Reprod* 13 (4):213-22. doi: 10.1093/molehr/gal118.
- Diatchenko, L., A. G. Nackley, G. D. Slade, R. B. Fillingim, and W. Maixner. 2006. "Idiopathic pain disorders--pathways of vulnerability." *Pain* 123 (3):226-30. doi: 10.1016/j.pain.2006.04.015.
- Diatchenko, L., G. D. Slade, A. G. Nackley, K. Bhalang, A. Sigurdsson, I. Belfer, D. Goldman, K. Xu, S. A. Shabalina, D. Shagin, M. B. Max, S. S. Makarov, and W. Maixner. 2005. "Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition." *Hum Mol Genet* 14 (1):135-43. doi: 10.1093/hmg/ddi013.

-
-
- Dijkgraaf, L. C., L. G. de Bont, G. Boering, and R. S. Liem. 1995. "The structure, biochemistry, and metabolism of osteoarthritic cartilage: a review of the literature." *J Oral Maxillofac Surg* 53 (10):1182-92.
- Durham, J., J. G. Steele, R. W. Wassell, and C. Exley. 2010. "Living with uncertainty: temporomandibular disorders." *J Dent Res* 89 (8):827-30. doi: 10.1177/0022034510368648.
- Duthie, S. J. 1999. "Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability." *Br Med Bull* 55 (3):578-92.
- Dworkin, S. F., and J. A. Burgess. 1987. "Orofacial pain of psychogenic origin: current concepts and classification." *J Am Dent Assoc* 115 (4):565-71.
- Dworkin, S. F., K. H. Huggins, L. LeResche, M. Von Korff, J. Howard, E. Truelove, and E. Sommers. 1990. "Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls." *J Am Dent Assoc* 120 (3):273-81.
- Dworkin, S. F., and L. LeResche. 1992. "Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: review, criteria, examinations and specifications, critique." *J Craniomandib Disord* 6 (4):301-55.
- Dworkin, SF, M Von Korff, and L LeResche. 1992. "Epidemiologic studies of chronic pain:a dynamic – ecologic perspective." *Ann Behav Med* 14:3-11.
- Eaton, D. L., and T. K. Bammler. 1999. "Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology." *Toxicol Sci* 49 (2):156-64.
- Eggleston, D. W. 1980. "The interrelationship of stress and degenerative diseases." *J Prosthet Dent* 44 (5):541-4.
- Eversole, L. R., C. E. Stone, D. Matheson, and H. Kaplan. 1985. "Psychometric profiles and facial pain." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 60 (3):269-74.
- Farrar, W. B., and W. L. McCarty. 1979. "The TMJ dilemma." *J Ala Dent Assoc* 63 (1):19-26.
- Fordyce, W. E. 1988. "Pain and suffering. A reappraisal." *Am Psychol* 43 (4):276-83.

-
-
- Forssell, H., and E. Kalso. 2004. "Application of principles of evidence-based medicine to occlusal treatment for temporomandibular disorders: are there lessons to be learned?" *J Orofac Pain* 18 (1):9-22; discussion 23-32.
- Forssell, H., E. Kalso, P. Koskela, R. Vehmanen, P. Puukka, and P. Alanen. 1999. "Occlusal treatments in temporomandibular disorders: a qualitative systematic review of randomized controlled trials." *Pain* 83 (3):549-60.
- Foster, D. C., T. M. Sazenski, and C. J. Stodgell. 2004. "Impact of genetic variation in interleukin-1 receptor antagonist and melanocortin-1 receptor genes on vulvar vestibulitis syndrome." *J Reprod Med* 49 (7):503-9.
- Friction, J. R. 1991. "Recent advances in temporomandibular disorders and orofacial pain." *J Am Dent Assoc* 122 (10):24-32.
- Friso, S., and S. W. Choi. 2005. "Gene-nutrient interactions in one-carbon metabolism." *Curr Drug Metab* 6 (1):37-46.
- Gray, R. J., S. J. Davies, and A. A. Quayle. 1994. "A clinical approach to temporomandibular disorders. 3. Examination of the articulatory system: the muscles." *Br Dent J* 177 (1):25-8.
- Gremillion, H. A. 2002. "Multidisciplinary diagnosis and management of orofacial pain." *Gen Dent* 50 (2):178-86; quiz 187-8.
- Guichet, N. F. 1982. *An Introduction to Clinical Management of Orofacial Pain TMJ Dysfunction: Etiology, Diagnosis, Protocol for Treatment ; a Position Paper*: Niles Guichet Associates.
- Guralnick, W., L. B. Kaban, and R. G. Merrill. 1978. "Temporomandibular-joint afflictions." *N Engl J Med* 299 (3):123-9. doi: 10.1056/NEJM197807202990304.
- Hatcher, D. C., R. J. Blom, and C. G. Baker. 1986. "Temporomandibular joint spatial relationships: osseous and soft tissues." *J Prosthet Dent* 56 (3):344-53.
- Herken, H., E. Erdal, N. Mutlu, Barlas O, O. Cataloluk, F. Oz, and E. Güray. 2001. "Possible association of temporomandibular joint pain and dysfunction with a polymorphism in the serotonin transporter gene." *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 120 (3):308-13.
-
-

-
-
- Ho, V., T. E. Massey, and W. D. King. 2013. "Effects of methionine synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on markers of one-carbon metabolism." *Genes Nutr* 8 (6):571-80. doi: 10.1007/s12263-013-0358-2.
- Huang, B., K. Takahashi, T. Sakata, H. Kiso, M. Sugai, K. Fujimura, A. Shimizu, S. Kosugi, T. Sato, and K. Bessho. 2011. "Increased risk of temporomandibular joint closed lock: a case-control study of ANKH polymorphisms." *PLoS One* 6 (10):e25503. doi: 10.1371/journal.pone.0025503.
- Huber, M. A., and E. H. Hall. 1990. "A comparison of the signs of temporomandibular joint dysfunction and occlusal discrepancies in a symptom-free population of men and women." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 70 (2):180-3.
- Huhtala, P., A. Tuuttila, L. T. Chow, J. Lohi, J. Keski-Oja, and K. Tryggvason. 1991. "Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells." *J Biol Chem* 266 (25):16485-90.
- Inanir, A., S. Yigit, S. Tural, O. Cecen, and E. Yildirim. 2013. "MTHFR gene C677T mutation and ACE gene I/D polymorphism in Turkish patients with osteoarthritis." *Dis Markers* 34 (1):17-22. doi: 10.3233/dma-2012-00939.
- Isacsson, G., C. Linde, and A. Isberg. 1989. "Subjective symptoms in patients with temporomandibular joint disk displacement versus patients with myogenic craniomandibular disorders." *J Prosthet Dent* 61 (1):70-7.
- Isberg, A. 2001. *Temporomandibular Joint Dysfunction: A Practitioner's Guide*: Taylor & Francis.
- Israel, H. A. 1999. "Part I: The use of arthroscopic surgery for treatment of temporomandibular joint disorders." *J Oral Maxillofac Surg* 57 (5):579-82.
- Kang, S. C., D. G. Lee, J. H. Choi, S. T. Kim, Y. K. Kim, and H. J. Ahn. 2007. "Association between estrogen receptor polymorphism and pain susceptibility in female temporomandibular joint osteoarthritis patients." *Int J Oral Maxillofac Surg* 36 (5):391-4. doi: 10.1016/j.ijom.2006.12.004.
- Kanyama, M., T. Kuboki, S. Kojima, T. Fujisawa, T. Hattori, M. Takigawa, and A. Yamashita. 2000. "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids of patients with temporomandibular joint osteoarthritis." *J Orofac Pain* 14 (1):20-30.
-
-

-
-
- Kapila, S., and Y. Xie. 1998. "Targeted induction of collagenase and stromelysin by relaxin in unprimed and beta-estradiol-primed diarthrodial joint fibrocartilaginous cells but not in synoviocytes." *Lab Invest* 78 (8):925-38.
- Karibe, H., G. Goddard, K. Aoyagi, T. Kawakami, S. Warita, K. Shimazu, P. A. Rudd, and C. McNeill. 2012. "Comparison of subjective symptoms of temporomandibular disorders in young patients by age and gender." *Cranio* 30 (2):114-20. doi: 10.1179/crn.2012.017.
- Kemler, M. A., A. C. van de Vusse, E. M. van den Berg-Loonen, G. A. Barendse, M. van Kleef, and W. E. Weber. 1999. "HLA-DQ1 associated with reflex sympathetic dystrophy." *Neurology* 53 (6):1350-1.
- Kim, B. S., Y. K. Kim, P. Y. Yun, E. Lee, and J. Bae. 2010. "The effects of estrogen receptor α polymorphism on the prevalence of symptomatic temporomandibular disorders." *J Oral Maxillofac Surg* 68 (12):2975-9. doi: 10.1016/j.joms.2010.02.023.
- Kim, H., J. K. Neubert, J. S. Rowan, J. S. Brahim, M. J. Iadarola, and R. A. Dionne. 2004. "Comparison of experimental and acute clinical pain responses in humans as pain phenotypes." *J Pain* 5 (7):377-84. doi: 10.1016/j.jpain.2004.06.003.
- Kim, H., J. K. Neubert, A. San Miguel, K. Xu, R. K. Krishnaraju, M. J. Iadarola, D. Goldman, and R. A. Dionne. 2004. "Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament." *Pain* 109 (3):488-96. doi: 10.1016/j.pain.2004.02.027.
- Koh, H., and P. G. Robinson. 2004. "Occlusal adjustment for treating and preventing temporomandibular joint disorders." *J Oral Rehabil* 31 (4):287-92. doi: 10.1046/j.1365-2842.2003.01257.x.
- Kondapaka, S. B., R. Fridman, and K. B. Reddy. 1997. "Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells." *Int J Cancer* 70 (6):722-6.
- Kontogiorgis, C. A., P. Papaioannou, and D. J. Hadjipavlou-Litina. 2005. "Matrix metalloproteinase inhibitors: a review on pharmacophore mapping and (Q)SARs results." *Curr Med Chem* 12 (3):339-55.

-
-
- Krajinovic, M., S. Lamothe, D. Labuda, E. Lemieux-Blanchard, Y. Theoret, A. Moghrabi, and D. Sinnett. 2004. "Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia." *Blood* 103 (1):252-7. doi: 10.1182/blood-2003-06-1794.
- Kubota, E., T. Kubota, J. Matsumoto, T. Shibata, and K. I. Murakami. 1998. "Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease." *J Oral Maxillofac Surg* 56 (2):192-8.
- Lachman, H. M., D. F. Papolos, T. Saito, Y. M. Yu, C. L. Szumlanski, and R. M. Weinshilboum. 1996. "Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders." *Pharmacogenetics* 6 (3):243-50.
- Laskin, D. M. 1969. "Etiology of the pain-dysfunction syndrome." *J Am Dent Assoc* 79 (1):147-53.
- Laskin, D. M. 2008. "Temporomandibular disorders: a term past its time?" *J Am Dent Assoc* 139 (2):124-8.
- Laskin, D. M., and Association American Dental. 1983. *The President's Conference on the Examination, Diagnosis, and Management of Temporomandibular Disorders: Convened by Robert H. Griffiths, President (1982) American Dental Association, in Chicago, June 1-4, 1982: ADA.*
- Layzer, R. B. 1994. "The origin of muscle fasciculations and cramps." *Muscle Nerve* 17 (11):1243-9. doi: 10.1002/mus.880171102.
- Lee, D. G., T. W. Kim, S. C. Kang, and S. T. Kim. 2006. "Estrogen receptor gene polymorphism and craniofacial morphology in female TMJ osteoarthritis patients." *Int J Oral Maxillofac Surg* 35 (2):165-9. doi: 10.1016/j.ijom.2005.06.009.
- Leonardi, R., M. Caltabiano, P. Cascone, and C. Loreto. 2002. "Expression of heat shock protein 27 (HSP27) in human temporomandibular joint discs of patients with internal derangement." *J Craniofac Surg* 13 (5):713-7; discussion 718-20.
- Leonardi, R., L. Villari, C. Piacentini, G. Bernasconi, S. Travali, and C. Caltabiano. 2002. "Immunolocalization of vimentin and alpha-smooth muscle actin in dysfunctional human temporomandibular joint disc samples." *J Oral Rehabil* 29 (3):282-6.
-
-

-
-
- Levitt, S. R., and M. W. McKinney. 1994. "Validating the TMJ scale in a national sample of 10,000 patients: demographic and epidemiologic characteristics." *J Orofac Pain* 8 (1):25-35.
- Li, S. Y., J. Y. Ye, E. Y. Liang, L. X. Zhou, and M. Yang. 2015. "Association between MTHFR C677T polymorphism and risk of acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis based on 51 case-control studies." *Med Sci Monit* 21:740-8. doi: 10.12659/MSM.892835.
- Loreto, C., R. Leonardi, G. Musumeci, G. Pannone, and S. Castorina. 2013. "An ex vivo study on immunohistochemical localization of MMP-7 and MMP-9 in temporomandibular joint discs with internal derangement." *Eur J Histochem* 57 (2):e12. doi: 10.4081/ejh.2013.e12.
- Luo, Shufang, Mohong Deng, Xing Long, Jian Li, Liqin Xu, and Wei Fang. "Association between polymorphism of MMP-1 promoter and the susceptibility to anterior disc displacement and temporomandibular joint osteoarthritis." *Archives of Oral Biology* 60 (11):1675-1680. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.08.001.
- Mailis, A., and J. Wade. 1994. "Profile of Caucasian women with possible genetic predisposition to reflex sympathetic dystrophy: a pilot study." *Clin J Pain* 10 (3):210-7.
- Manfredini, D., G. Chiappe, and M. Bosco. 2006. "Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders (RDC/TMD) axis I diagnoses in an Italian patient population." *J Oral Rehabil* 33 (8):551-8. doi: 10.1111/j.1365-2842.2006.01600.x.
- Mattey, D. L., N. B. Nixon, P. T. Dawes, W. E. Ollier, and A. H. Hajeer. 2004. "Association of matrix metalloproteinase 3 promoter genotype with disease outcome in rheumatoid arthritis." *Genes Immun* 5 (2):147-9. doi: 10.1038/sj.gene.6364050.
- McCain, J. P., B. Sanders, M. G. Koslin, J. H. Quinn, P. B. Peters, A. T. Indresano, and J. D. Quinn. 1992. "Temporomandibular joint arthroscopy: a 6-year multicenter retrospective study of 4,831 joints." *J Oral Maxillofac Surg* 50 (9):926-30.
- McCarroll, R. S., J. R. Hesse, M. Naeije, C. K. Yoon, and T. L. Hansson. 1987. "Mandibular border positions and their relationships with peripheral joint mobility." *J Oral Rehabil* 14 (2):125-31.
-
-

-
-
- Mehra, P., and L. M. Wolford. 2008. "Serum nutrient deficiencies in the patient with complex temporomandibular joint problems." *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 21 (3):243-7.
- Meikle, M. C. 2007. "Remodeling the dentofacial skeleton: the biological basis of orthodontics and dentofacial orthopedics." *J Dent Res* 86 (1):12-24.
- Michelotti, A., R. Liguori, M. Toriello, V. D'Antò, D. Vitale, G. Castaldo, and L. Sacchetti. 2014. "Catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphisms as risk factor in temporomandibular disorders patients from Southern Italy." *Clin J Pain* 30 (2):129-33. doi: 10.1097/AJP.0b013e318287a358.
- Milam, S. B. 2005. "Pathogenesis of degenerative temporomandibular joint arthritides." *Odontology* 93 (1):7-15. doi: 10.1007/s10266-005-0056-7.
- Mizoguchi, I., M. Nakamura, I. Takahashi, M. Kagayama, and H. Mitani. 1992. "A comparison of the immunohistochemical localization of type I and type II collagens in craniofacial cartilages of the rat." *Acta Anat (Basel)* 144 (1):59-64.
- Mutlu, N., M. E. Erdal, H. Herken, G. Oz, and Y. A. Bayazit. 2004. "T102C polymorphism of the 5-HT2A receptor gene may be associated with temporomandibular dysfunction." *Oral Dis* 10 (6):349-52. doi: 10.1111/j.1601-0825.2004.01037.x.
- Mäder, R., H. Deutsch, G. K. Siebert, H. U. Gerbershagen, E. Grünh, M. Behl, and W. Kübler. 1988. "Vitamin status of inpatients with chronic cephalgia and dysfunction pain syndrome and effects of a vitamin supplementation." *Int J Vitam Nutr Res* 58 (4):436-41.
- Nekora-Azak, A. 2004. "Temporomandibular disorders in relation to female reproductive hormones: a literature review." *J Prosthet Dent* 91 (5):491-3. doi: 10.1016/S0022391304001258.
- Nozawa-Inoue, K., N. Amizuka, N. Ikeda, A. Suzuki, Y. Kawano, and T. Maeda. 2003. "Synovial membrane in the temporomandibular joint--its morphology, function and development." *Arch Histol Cytol* 66 (4):289-306.
- Oakley, M., and A. R. Vieira. 2008. "The many faces of the genetics contribution to temporomandibular joint disorder." *Orthod Craniofac Res* 11 (3):125-35. doi: 10.1111/j.1601-6343.2008.00426.x.

-
-
- Ohno, S., T. Schmid, Y. Tanne, T. Kamiya, K. Honda, M. Ohno-Nakahara, N. Swentko, T. A. Desai, K. Tanne, C. B. Knudson, and W. Knudson. 2006. "Expression of superficial zone protein in mandibular condyle cartilage." *Osteoarthritis Cartilage* 14 (8):807-13. doi: 10.1016/j.joca.2006.02.002.
- Ohrbach, R., J. Blascovich, E. N. Gale, W. D. McCall, and S. F. Dworkin. 1998. "Psychophysiological assessment of stress in chronic pain: comparisons of stressful stimuli and of response systems." *J Dent Res* 77 (10):1840-50.
- Okeson, J. P. 2005. *Bell's Orofacial Pains: The Clinical Management of Orofacial Pain*, Quintessence books: Quintessence Publishing Company.
- Okeson, Jeffrey P. 1995. "Bell's Orofacial Pains." In, 259-294. Chicago: Quintessence Publishing (IL).
- Olesen, J., and T. J. Steiner. 2004. "The international classification of headache disorders, 2nd edn (ICDH-II)." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 75 (6):808-811. doi: 10.1136/jnnp.2003.031286.
- Opdenakker, G., P. E. Van den Steen, and J. Van Damme. 2001. "Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions." *Trends Immunol* 22 (10):571-9.
- Parker, M. W., E. K. Holmes, and G. T. Terezhalmly. 1993. "Personality characteristics of patients with temporomandibular disorders: diagnostic and therapeutic implications." *J Orofac Pain* 7 (4):337-44.
- Pertes, R. A., and G. M. Heir. 1991. "Chronic orofacial pain. A practical approach to differential diagnosis." *Dent Clin North Am* 35 (1):123-40.
- Piacentini, S., R. Polimanti, R. Squitti, M. Ventriglia, E. Cassetta, F. Vernieri, P. M. Rossini, D. Manfellotto, and M. Fuciarelli. 2012. "GSTM1 null genotype as risk factor for late-onset Alzheimer's disease in Italian patients." *J Neurol Sci* 317 (1-2):137-40. doi: 10.1016/j.jns.2012.01.026.
- Planello, A. C., M. I. Campos, C. B. Meloto, R. Secolin, C. M. Rizatti-Barbosa, S. R. Line, and A. P. de Souza. 2011. "Association of matrix metalloproteinase gene polymorphism with temporomandibular joint degeneration." *Eur J Oral Sci* 119 (1):1-6. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00803.x.
-
-

-
-
- Plesh, O., S. E. Sinisi, P. B. Crawford, and S. A. Gansky. 2005. "Diagnoses based on the Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders in a biracial population of young women." *J Orofac Pain* 19 (1):65-75.
- Pullinger, A. G., and D. A. Seligman. 2000. "Quantification and validation of predictive values of occlusal variables in temporomandibular disorders using a multifactorial analysis." *J Prosthet Dent* 83 (1):66-75.
- Pullinger, A. G., D. A. Seligman, and J. A. Gornbein. 1993. "A multiple logistic regression analysis of the risk and relative odds of temporomandibular disorders as a function of common occlusal features." *J Dent Res* 72 (6):968-79.
- Rao, S. M., and A. G. Glaros. 1979. "Electromyographic correlates of experimentally induced stress in diurnal bruxists and normals." *J Dent Res* 58 (9):1872-8.
- Ricks, M. L., J. T. Farrell, D. J. Falk, D. W. Holt, M. Rees, J. Carr, T. Williams, B. A. Nichols, L. C. Bridgewater, P. R. Reynolds, D. L. Kooyman, and R. E. Seegmiller. 2013. "Osteoarthritis in temporomandibular joint of Col2a1 mutant mice." *Arch Oral Biol* 58 (9):1092-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.02.008.
- Robien, K., and C. M. Ulrich. 2003. "5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview." *Am J Epidemiol* 157 (7):571-82.
- Robinson, J. A., S. A. Harris, B. L. Riggs, and T. C. Spelsberg. 1997. "Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation." *Endocrinology* 138 (7):2919-27. doi: 10.1210/endo.138.7.5277.
- Rodríguez de Sotillo, D., A. M. Velly, M. Hadley, and J. R. Friction. 2011. "Evidence of oxidative stress in temporomandibular disorders: a pilot study." *J Oral Rehabil* 38 (10):722-8. doi: 10.1111/j.1365-2842.2011.02216.x.
- Rugh, J. D., and W. K. Solberg. 1976. "Psychological implications in temporomandibular pain and dysfunction." *Oral Sci Rev* 7:3-30.
- Santl Letonja, M., M. Letonja, J. N. Ikolajević-Starcević, and D. Petrovic. 2012. "Association of manganese superoxide dismutase and glutathione S-transferases genotypes with carotid atherosclerosis in patients with diabetes mellitus type 2." *Int Angiol* 31 (1):33-41.
-
-

-
-
- Sato, M., J. Ohashi, N. Tsuchiya, K. Kashiwase, Y. Ishikawa, H. Arita, K. Hanaoka, K. Tokunaga, and T. Yabe. 2002. "Association of HLA-A*3303-B*4403-DRB1*1302 haplotype, but not of TNFA promoter and NKp30 polymorphism, with postherpetic neuralgia (PHN) in the Japanese population." *Genes Immun* 3 (8):477-81. doi: 10.1038/sj.gene.6363890.
- Savioli, C., C. A. Silva, L. H. Ching, L. M. Campos, E. F. Prado, and J. T. Siqueira. 2004. "Dental and facial characteristics of patients with juvenile idiopathic arthritis." *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 59 (3):93-8. doi: /S0041-87812004000300001.
- Schwahn, C., H. J. Grabe, H. Meyer zu Schwabedissen, A. Teumer, C. O. Schmidt, C. Brinkman, T. Kocher, M. Nauck, H. Völzke, R. Biffar, and O. Bernhardt. 2012. "The effect of catechol-O-methyltransferase polymorphisms on pain is modified by depressive symptoms." *Eur J Pain* 16 (6):878-89. doi: 10.1002/j.1532-2149.2011.00067.x.
- Scott, E. M., and R. C. Wright. 1980. "Variability of glutathione S-transferase of human erythrocytes." *Am J Hum Genet* 32 (1):115-7.
- Seligman, D. A., and A. G. Pullinger. 1991. "The role of functional occlusal relationships in temporomandibular disorders: a review." *J Craniomandib Disord* 5 (4):265-79.
- Seltzer, Z., and R. Dorfman. 2004. "Identifying genetic and environmental risk factors for chronic orofacial pain syndromes: human models." *J Orofac Pain* 18 (4):311-7.
- Simons, D G, J G Travell, and L S Simons. 1999. *Myofascial Pain and Dysfunction: The Trigger Point Manual: Volume 1: Upper Half of Body*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Singh, N., N. Sinha, S. Kumar, C. M. Pandey, and S. Agrawal. 2011. "Glutathione S-transferase gene polymorphism as a susceptibility factor for acute myocardial infarction and smoking in the North Indian population." *Cardiology* 118 (1):16-21. doi: 10.1159/000324066.
- Sipilä, Kirsi. 2002. "Facial Pain and Temporomandibular Disorders." Academic Dissertation, Oulu.
- Smith, S. B., D. W. Maixner, J. D. Greenspan, R. Dubner, R. B. Fillingim, R. Ohrbach, C. Knott, G. D. Slade, E. Bair, D. G. Gibson, D. V. Zaykin, B. S.

-
-
- Weir, W. Maixner, and L. Diatchenko. 2011. "Potential genetic risk factors for chronic TMD: genetic associations from the OPPERA case control study." *J Pain* 12 (11 Suppl):T92-101. doi: 10.1016/j.jpain.2011.08.005.
- Smythe, H. A. 2005. "Temporomandibular joint disorder and other medically unexplained symptoms in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and fibromyalgia." *J Rheumatol* 32 (12):2288-90.
- Srinivas, R., T. Sorsa, L. Tjäderhane, E. Niemi, A. Raustia, H. Pernu, O. Teronen, and T. Salo. 2001. "Matrix metalloproteinases in mild and severe temporomandibular joint internal derangement synovial fluid." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91 (5):517-25. doi: 10.1067/moe.2001.115136.
- Stanišić-Sinobad, D., and B. Vukov. 2001. *Zglobna veza mandibule sa kranijumom: normalna funkcija i poremećaji, Biblioteka Udžbenici / BMG: BMG.*
- Stohler, C. S. 2004. "Taking stock: from chasing occlusal contacts to vulnerability alleles." *Orthod Craniofac Res* 7 (3):157-61.
- Strange, R. C., B. Matharoo, G. C. Faulder, P. Jones, W. Cotton, J. B. Elder, and M. Deakin. 1991. "The human glutathione S-transferases: a case-control study of the incidence of the GST1 0 phenotype in patients with adenocarcinoma." *Carcinogenesis* 12 (1):25-8.
- Strous, R. D., N. Bark, S. S. Parsia, J. Volavka, and H. M. Lachman. 1997. "Analysis of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia: evidence for association with aggressive and antisocial behavior." *Psychiatry Res* 69 (2-3):71-7.
- Suda, N., S. Shibata, K. Yamazaki, T. Kuroda, P. V. Senior, F. Beck, and V. E. Hammond. 1999. "Parathyroid hormone-related protein regulates proliferation of condylar hypertrophic chondrocytes." *J Bone Miner Res* 14 (11):1838-47. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.11.1838.
- Suma, S., and B. Veerendra Kumar. 2012. "Temporomandibular disorders and functional somatic syndromes: deliberations for the dentist." *Indian J Dent Res* 23 (4):529-36. doi: 10.4103/0970-9290.104965.
- Sun, Z. M., L. Miao, Y. G. Zhang, and L. Ming. 2009. "Association between the -1562 C/T polymorphism of matrix metalloproteinase-9 gene and lumbar disc
-
-

-
-
- disease in the young adult population in North China." *Connect Tissue Res* 50 (3):181-5. doi: 10.1080/03008200802585630.
- Tang, S. T., C. J. Wang, H. Q. Tang, Q. Zhang, and Y. Wang. 2013. "Evaluation of glutathione S-transferase genetic variants affecting type 2 diabetes susceptibility: a meta-analysis." *Gene* 530 (2):301-8. doi: 10.1016/j.gene.2013.08.043.
- Taskin, Necati, Korkut Ulucan, Guhan Degin, Arzu Akcay, Berfin Karatas, and Teoman Akcay. 2011. "Investigation of the MMP1 and MMP3 promoter polymorphisms in temporomandibular joint disorder." *Temporomandibular baglanti bozukluklarinda MMP1 ve MMP3 promotor polimorfizmlerinin incelenmesi*. 9 (1):63-68.
- Timuragaoglu, A., S. Dizlek, N. Uysalgil, O. Tosun, and K. Yamac. 2006. "Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in adult patients with lymphoproliferative disorders and its effect on chemotherapy." *Ann Hematol* 85 (12):863-8. doi: 10.1007/s00277-006-0175-4.
- Unsworth, A., D. Dowson, and V. Wright. 1971. "'Cracking joints'. A bioengineering study of cavitation in the metacarpophalangeal joint." *Ann Rheum Dis* 30 (4):348-58.
- van de Beek, W. J., B. O. Roep, A. R. van der Slik, M. J. Giphart, and B. J. van Hilten. 2003. "Susceptibility loci for complex regional pain syndrome." *Pain* 103 (1-2):93-7.
- Von Korff, M., L. Le Resche, and S. F. Dworkin. 1993. "First onset of common pain symptoms: a prospective study of depression as a risk factor." *Pain* 55 (2):251-8.
- Wadhwa, S., and S. Kapila. 2008. "TMJ disorders: future innovations in diagnostics and therapeutics." *J Dent Educ* 72 (8):930-47.
- Wang, J., Y. Chao, Q. Wan, and Z. Zhu. 2008. "The possible role of estrogen in the incidence of temporomandibular disorders." *Med Hypotheses* 71 (4):564-7. doi: 10.1016/j.mehy.2008.05.011.
- Wang, X., W. Li, W. Liu, B. Cai, T. Cheng, C. Gao, L. Mo, H. Yang, and L. Chang. 2014. "GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms as major risk factors for bronchopulmonary dysplasia in a Chinese Han population." *Gene* 533 (1):48-51. doi: 10.1016/j.gene.2013.10.004.
-
-

-
-
- Warholm, M., C. Guthenberg, B. Mannervik, C. von Bahr, and H. Glaumann. 1980. "Identification of a new glutathione S-transferase in human liver." *Acta Chem Scand B* 34 (8):607-21.
- Westesson, P. L., L. Eriksson, and K. Kurita. 1989. "Reliability of a negative clinical temporomandibular joint examination: prevalence of disk displacement in asymptomatic temporomandibular joints." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 68 (5):551-4.
- Widmalm, S. E., D. Djurdjanovic, and D. C. McKay. 2003. "The dynamic range of TMJ sounds." *J Oral Rehabil* 30 (5):495-500.
- Widmalm, S. E., W. J. Williams, B. K. Ang, and D. C. McKay. 2002. "Localization of TMJ sounds to side." *J Oral Rehabil* 29 (10):911-7.
- Widmalm, S. E., W. J. Williams, D. Djurdjanovic, and D. C. McKay. 2003. "The frequency range of TMJ sounds." *J Oral Rehabil* 30 (4):335-46.
- Yavelow, I., and G. S. Arnold. 1971. "Temporomandibular joint clicking." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 32 (5):708-15.
- Ye, S., P. Eriksson, A. Hamsten, M. Kurkinen, S. E. Humphries, and A. M. Henney. 1996. "Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression." *J Biol Chem* 271 (22):13055-60.
- Yoshida, K., S. Takatsuka, E. Hatada, H. Nakamura, A. Tanaka, K. Ueki, K. Nakagawa, Y. Okada, E. Yamamoto, and R. Fukuda. 2006. "Expression of matrix metalloproteinases and aggrecanase in the synovial fluids of patients with symptomatic temporomandibular disorders." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102 (1):22-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.013.
- Yu, S. B., M. Q. Wang, W. Zhao, H. T. Cao, and Y. L. Liu. 2006. "The effects of age and sex on the expression of aromatase in the rat temporomandibular joint." *J Orofac Pain* 20 (2):156-65.
- Zubieta, J. K., M. M. Heitzeg, Y. R. Smith, J. A. Bueller, K. Xu, Y. Xu, R. A. Koeppe, C. S. Stohler, and D. Goldman. 2003. "COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor." *Science* 299 (5610):1240-3. doi: 10.1126/science.1078546.
-
-

Zubieta, J. K., Y. R. Smith, J. A. Bueller, Y. Xu, M. R. Kilbourn, D. M. Jewett, C. R. Meyer, R. A. Koeppe, and C. S. Stohler. 2001. "Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain." *Science* 293 (5528):311-5. doi: 10.1126/science.1060952.

Prilog

USTANOVA..... BR. PACIJENTA..... IME I
PREZIME..... POL..... GODINA
ROĐENJA..... ZANIMANJE..... TEL.....

SVAKO PITANJE PROČITATI PAŽLJIVO I ZAOKRUŽITI SAMO JEDAN ODGOVOR.

1. Kako biste ocenili Vaše opšte stanje zdravlja: odlično, vrlo dobro, dobro, zadovoljavajuće ili loše?

odlično.....1
vrlo dobro.....2
dobro.....3
zadovoljavajuće.....4
loše.....5

2. Kako biste ocenili stanje Vaše usne duplje: odlično, vrlo dobro, dobro, zadovoljavajuće ili loše?

odlično.....1
vrlo dobro.....2
dobro.....3
zadovoljavajuće.....4
loše.....5

3. Da li ste u poslednjih 6 meseci osećali bol u predelu lica, vilica, slepoočnica, ispred uha ili u samom uhu?

Ne.....0
Da.....1

(ako niste osećali bol u poslednjih 6 meseci pređite na pitanje br. 14)

4a. Pre koliko godina ste po prvi put osetili takav bol?

..... godina

(ako se bol javio po prvi put u periodu kraćem od godinu dana preskočite prethodno pitanje i odgovorite na sledeće)

4b. Pre koliko meseci ste osetili taj bol po prvi put?

..... meseci

5. Da li je bol stalan, povremen, ili se pojavi samo jedanput?

Stalan.....1

Povremen.....2

Samo jednom se pojavio.....3

6. Da li ste zbog toga ikada potražili pomoć lekara?

Ne.....1

Da, u proteklih 6 meseci.....2

Da, pre više od 6 meseci.....3

7. Kako biste skalom 0-10 ocenili Vaš trenutni bol, gde vrednost 0 odgovara stanju bez bola, a vrednost 10 stanju neizdrživog bola?

(bez bola) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (neizdrživ bol)

8. U poslednjih 6 meseci, kog intenziteta na skali 0-10 je bio Vaš najjači doživljeni bol?

(bez bola) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (neizdrživ bol)

9. U proteklih 6 meseci koja je prosečna vrednost intenziteta doživljenog bola na skali 0-10?
(bez bola) (neizdrživ bol)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
10. U poslednjih 6 meseci koliko dana ste izostali sa posla ili škole zbog bola u predelu lica?
.....dana
11. U proteklih 6 meseci koliko Vam je bol pricinjavao smetnje u obavljanju svakodnevnih aktivnosti, izraženo na skali 0-10?
(bez smetnji) (nemogućnost obavljanja aktivnosti)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
12. Koliko su u poslednjih 6 meseci izmenjene Vaše mogućnosti učestvovanja u društvenom i porodičnom životu zbog bola, izraženo skalom 0-10?
(bez promena) (velike promene)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
13. Koliko je prisustvo bola uticalo na izmenu Vaše radne sposobnosti u poslednjih 6 meseci (uključujući i kućne poslove), izraženo skalom 0-10?
(bez promena) (velike promene)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
- 14a. Da li Vam se ikada desilo da ne možete otvoriti usta do kraja tj. da li ste imali osećaj da se Vaša vilica „zaključala“ u nekom položaju?
Ne.....0
Da.....1
- b. Da li je ograničenje otvaranja usta bilo tako izraženo da vas je onemogućavalo da jedete?
Ne.....0
Da.....1
- 15a. Da li čujete pucketanje prilikom otvaranja ili zatvaranja usta ili kada zevate?
Ne.....0
Da.....1
- b. Čujete li škripanje prilikom otvaranja, zatvaranja usta ili zevanja?
Ne.....0
Da.....1
- c. Da li Vam je rečeno ili ste primetili da škripite zubima ili stežete vilicu tokom sna?
Ne.....0
Da.....1
- d. Da li škripite zubima ili stežete vilicu tokom dana?
Ne.....0
Da.....1
- e. Da li osećate bolove ili imate osećaj ukočenosti ujutru nakon buđenja?
Ne.....0
Da.....1
- f. Da li imate „zvonjenje“ ili neke šumove u ušima?
Ne.....0
Da.....1
- g. Da li ste primetili promenu u zagrizađu?
Ne.....0
Da.....1
- 16a. Da li ste imali reumatoidni artritis, lupus, ili neka druga oboljenja zglobova?
Ne.....0
Da.....1
- b. Da li je neko u Vašoj porodici imao slična oboljenja?
Ne.....0
Da.....1
- c. Da li ste imali ili imate otok i bolove u predelu viličnih zglobova?
Ne.....0
Da.....1
- d. Da li bol koji osećate traje duže od godinu dana?
Ne.....0
Da.....1
- 17a. Da li ste u skorije vreme imali povredu u predelu lica i vilica?
Ne.....0
Da.....1

- b. Da li ste imali bol i pre povrede?
 Ne.....0
 Da.....1
18. Da li ste imali glavobolju u proteklih 6 meseci?
 Ne.....0
 Da.....1
19. Koju vrstu aktivnosti postojeći problem ograničava ili onemogućava?
- | | Ne | Da |
|--------------------------------|----|----|
| a. žvakanje | 0 | 1 |
| b. ispijanje tečnosti | 0 | 1 |
| c. konzumiranje tvrde hrane | 0 | 1 |
| d. konzumiranje mekane hrane | 0 | 1 |
| e. smejanje | 0 | 1 |
| f. pranje zuba i umivanje lica | 0 | 1 |
| g. zevanje | 0 | 1 |
| h. gutanje | 0 | 1 |
| i. govor | 0 | 1 |
| j. izgled lica | 0 | 1 |
- 20a. Da li koristite neke lekove?
 Ne.....0
 Da.....1
- b. Od kada ih koristite?.....
 c. Koju vrstu?.....
 d. Koja doza?.....
 e. Da li redovno pijete lekove?
 Ne.....0
 Da.....1

21. AXIS II

U poslednjih nekoliko meseci, koliko često ste bili uznemireni zbog:

- | | | |
|--------------------------------------------------------|------------|-----------|
| 0..... | nikako | |
| 1..... | veoma malo | |
| 2..... | umereno | |
| 3..... | izraženo | |
| 4..... | izuzetno | |
| a. glavobolje | | 0 1 2 3 4 |
| b. gubitka interesovanja za seks ili seksualnog užitka | | 0 1 2 3 4 |
| c. nesvestice ili vrtoglavice | | 0 1 2 3 4 |
| d. bola u predelu srca i grudi | | 0 1 2 3 4 |
| e. osećaja gubitka energije ili zastoja, usporenosti | | 0 1 2 3 4 |
| f. razmišljanja o smrti ili umiranju | | 0 1 2 3 4 |
| g. gubitka apetita | | 0 1 2 3 4 |
| h. plačljivosti | | 0 1 2 3 4 |
| i. samoopuživanja zbog nekih događaja | | 0 1 2 3 4 |

j. bolova u leđima	0 1 2 3 4
k. osećaja usamljenosti	0 1 2 3 4
l. ravnodušnosti (melanholije)	0 1 2 3 4
m. preterane brigeoko nečega	0 1 2 3 4
n. nezainteresovanosti za okolinu	0 1 2 3 4
o. osećaja muke i gađenja u stomaku	0 1 2 3 4
p. bola u mišićima	0 1 2 3 4
q. teškoća da zaspite (dugo vam treba da zaspite)	0 1 2 3 4
r. teškoća pri disanju (teško dolazite do daha)	0 1 2 3 4
s. smene toplo-hladno	0 1 2 3 4
t. ukočenosti ili osećaja "žmaraca" u nekom delu tela	0 1 2 3 4
u. prisustva „knedle“ u grlu	0 1 2 3 4
v. osećaja beznađa	0 1 2 3 4
w. osećaja slabosti u nekom delu tela	0 1 2 3 4
x. osećaja težine u rukama i nogama	0 1 2 3 4
y. razmišljanja o završetku Vašeg života (da je došao kraj)	0 1 2 3 4
z. preteranog uzimanja hrane	0 1 2 3 4
aa. buđenja rano ujutro	0 1 2 3 4
bb. nemirnog i isprekidanog sna	0 1 2 3 4
cc. osećaja da je sve „naporno“	0 1 2 3 4
dd. osećaja „uhtaćenosti u klipku“	0 1 2 3 4
ff. osećaja krivice	0 1 2 3 4

KLINIČKI PREGLED

1. Da li osećate bolove na levoj ili desnoj strani lica ili obostrano?

- Ne.....0
- Desno.....1
- Levo.....2
- Obostrano.....3

2. Možete li odrediti mesto bola koji osećate?

DESNO

- Ne.....0
- Vilični zglob.....1
- Mišići.....2
- V. zglob i mišići.....3

LEVO

- Ne.....0
- Vilični zglob.....1
- Mišići.....2
- V. zglob i mišići.....3

3. Otvaranje usta

- Pravo..... 0
- Defleksija u desno.....1
- Devijacija u desno.....2
- Defleksija u levo.....3
- Devijacija u levo.....4
- Ostalo.....5

4. Vrednosti vertikalnih pokreta

naznačiti zube na kojima se meri

- a. aktivno otvaranje bez bola mm
- b. maksimalno aktivno otvaranje..... mm
- c. maksimalno pasivno otvaranje..... mm
- d. vertikalni preklap sekutića..... mm

BOL

ZGLOB

Ne	Desno	Levo	Obostrano	Da	Ne
0	1	2	3	1	0
0	1	2	3	1	0

5. Zvuci u zglobu

a. pri otvaranju usta	desno	levo
ne	0	0
pucketanje	1	1
grube krepitacije	2	2
fine krepitacije	3	3
b. pri zatvaranju usta	desno	levo
ne	0	0
pucketanje	1	1
grube krepitacije	2	2
fine krepitacije	3	3

c. recipročan klik eliminisan otvaranjem usta u propulziji

	desno	levo
Ne.....	0	0
Da.....	1	1

6. Kretnje donje vilice

- a. Lateralna kretnja u desno.....mm
- b. Lateralna kretnja u levo.....mm
- c. Protruzija.....mm

BOL

ZGLOB

Ne	Desno	Levo	Obostrano	Da	Ne
0	1	2	3	1	0
0	1	2	3	1	0
0	1	2	3	1	0

d. Devijacija medijalne linije.....mm

desno	levo
1	2

7. Zvuci u zglobu pri kretnjama donje vilice

Desni zglob

	Ne	Pucketanje	Grube krepitacije	Fine krepitacije
Kretnja udesno	0	1	2	3
Kretnja ulevo	0	1	2	3
Protruzija	0	1	2	3

Levi zglob

	Ne	Pucketanje	Grube krepitacije	Fine krepitacije
Kretnja udesno	0	1	2	3
Kretnja ulevo	0	1	2	3
Protruzija	0	1	2	3

PALPACIJA MIŠIĆA I VILIČNIH ZGLOBOVA

- 0- nema bola
- 1- blagi bol
- 2- umereni bol
- 3- jaki bol

8. Mišićni bol pri ekstraoralnoj palpaciji	desno	levo
a. m.temporalis (zadnja vlakna-zadnji deo slepoočnice)	0 1 2 3	0 1 2 3
b. m.temporalis (srednja vlakna-srednji deo slepoočnice)	0 1 2 3	0 1 2 3
c. m.temporalis (prednja vlakna-prednji deo slepoočnice)	0 1 2 3	0 1 2 3
d.m.maseter (gornji pripoj ispod zigomatičnog luka)	0 1 2 3	0 1 2 3
e.m.maseter (telo mišića-sredina obraza)	0 1 2 3	0 1 2 3
f.m.maseter (pripoj na donjoj vilici)	0 1 2 3	0 1 2 3
g.zadnji donjovilični region (vilično-vratni region)	0 1 2 3	0 1 2 3
h.submandibularni region	0 1 2 3	0 1 2 3
9. Osetljivost viličnog zgloba na palpaciju	desno	levo
a. lateralni pol	0 1 2 3	0 1 2 3
b. zadnji pripoj (palpacija kroz spoljni ušni kanal)	0 1 2 3	0 1 2 3
10. Intraoralna palpacija mišića	desno	levo
a. regija m.pterygoideus lateralis (iza gornjih kutnjaka)	0 1 2 3	0 1 2 3
b. tetiva m.temporalis	0 1 2 3	0 1 2 3

IME I PREZIME.....

GRUPA I

MIŠIĆNE DISFUNKCIJE

(zaokružiti samo jednu mogućnost)

- A. Miofascijalni bol
- B. Miofascijalni bol sa ograničenim otvaranjem usta
- C. Dg ne pripada ovoj grupi

GRUPA II

DISLOKACIJA DISKUSA ARTIKULARISA

(zaokružiti samo jednu mogućnost za svaki zglob)

Desni zglob

- A. Dislokacija diskusa sa redukcijom
- B. Dislokacija diskusa bez redukcije sa ograničenim otvaranjem usta
- C. Dislokacija diskusa bez redukcije bez ograničenog otvaranja usta
- D. Dg se ne odnosi na ovaj zglob

Levi zglob

- A. Dislokacija diskusa sa redukcijom
- B. Dislokacija diskusa bez redukcije sa ograničenim otvaranjem usta
- C. Dislokacija diskusa bez redukcije bez ograničenog otvaranja usta
- D. Dg se ne odnosi na ovaj zglob

GRUPA III

DRUGA STANJA VILIČNOG ZGLOBA

(zaokružiti samo jednu mogućnost za svaki zglob)

Desni zglob

- A. Artralgija
- B. Osteoartritis
- C. Osteoartroza
- D. Dg se ne odnosi na ovaj zglob

Levi zglob

- A. Artralgija
- B. Osteoartritis
- C. Osteoartroza
- D. Dg se ne odnosi na ovaj zglob

1. Stepen hroničnog bola(0-4).....

2. Ograničenja mandibularnih funkcija
(Broj pozitivnih odgovora/ukupan broj pitanja)

3. Depresija: Ne Umerena Izražena

Potpis pacijenta

Biografija autora

Doktor stomatologije Nataša Milošević rođena je 30.12.1983. godine u Tuzli. Osnovnu školu i XIII Gimnaziju u Beogradu, završila je sa odličnim uspehom. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2002. godine, a diplomirala 2008. godine sa prosečnom ocenom 8,88. U toku akademske godine 2007/2008 učestvovala je u izvođenju praktične nastave kao demonstrator na predmetu Bolesti zuba – pretklinika i klinika, kao i u studentskim naučno- istraživačkim radovima. Pripravnički staž obavila je na Vojnomedicinskoj akademiji (VMA), nakon čega je 2010. godine položila stručni ispit za doktora stomatologije.

Doktorske studije iz naučne oblasti Stomatološka protetika, upisala je školske 2009/2010. godine i položila sve ispite predviđene nastavnim planom i programom doktorskih studija, sa prosečnom ocenom 9,75. Od 2011. godine, angažovana je na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, pod nazivom “ Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije, rukovodioca prof.dr Jelene Milašin (broj projekta 175075). Na klinici za stomatološku protetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu od 2013. godine obavlja i zdravstvene specijalističke studije.

Dr Nataša Milošević je autor i koautor 21og rada, u naučnim i stručnim časopisima i naučnim skupovima, od kojih je jedan rad objavljen u naučnom časopisu indeksiranom u bazi SCI (M23) (*Vojkan Lazić, Aleksandra Špadijer Gostović, Nebojša Romčević, Igor Đođević, Ana Todorović, Nataša Milošević, Rebeka Rudolf; MECHANICAL PROPERTIES OF THE MATERIALS FOR BRUXOGUARDS; Materials and technology 48 (2014) 6, 811–816*), jedan je objavljen u naučnom časopisu indeksiranom u bazi SCI (M21) (*Nataša Milošević, Nađa Nikolić, Igor Đorđević, Ana Todorović, Vojkan Lazić, Jelena Milašin; ASSOCIATION BETWEEN MMP-9 AND GSTT1 POLYMORPHISMS AND SUSCEPTIBILITY TO TEMPOROMANDIBULAR DISORDER; Journal of Oral and Facial Pain and*

Headache 2014), pet je saopšteno na međunarodnim naučnim i stručnim skupovima (M34) i četrnaest je saopšteno na skupovima od nacionalnog značaja (M64).