

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Ilić B.Branislav

**ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA GENA
ZA METILENTETRAHIDROFOLAT
REDUKTAZU,
GLUTATION TRANSFERAZU,
FAKTOR NEKROZE TUMORA α I
NJEGOVE RECEPTORE U
EPITELNIM TUMORIMA USNE DUPLJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Ilić B.Branislav

**POLYMORPHISMS IN
METHYLENETETRAHYDROFOLATE
REDUCTASE, GLUTATHIONE
TRANSFERASE, TUMOR NECROSIS
FACTOR α AND ITS RECEPTORS IN
ORAL EPITHELIAL TUMORS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentori:

Prof. dr Jelena Milašin

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Institut za humanu genetiku

Prof. dr Aleksa Marković

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za oralnu hirurgiju

Članovi komisije:

Prof. dr Snježana Čolić

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za oralnu hirurgiju

Prof. dr Miroslav Vukadinović

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za maksilofacijalnu hirurgiju

Prof. dr Ivana Novaković

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
Institut za humanu genetiku

Datum odbrane: _____

NASLOV: Ispitivanje polimorfizama gena za metilentetrahidrofolat reduktazu, glutation transferazu, faktor nekroze tumora α i njegove receptore u epitelnim tumorima usne duplje.

REZIME:

Uvod:

Odontogeni keratocistični tumor (OKT) i oralni planocelularni karcinom (OPK) pripadaju grupi oralnih epitelnih tumora. Iako je prvi benignog, a drugi malignog karaktera, odlikuje ih agresivan rast, složena patogeneza i relativno visok stepen recidiva nakon hirurške intervencije. Nasledne (germinativne) promene koje su deo genetičke konstitucije svakog pojedinca, a koje uključuju i polimorfizme gena, imaju značajnu ulogu u etiologiji ovih tumora.

Cilj:

Utvrđiti da li polimorfizmi gena odgovornog za sintezu i metilaciju DNK (MTHFR - 677C>T), gena odgovornog za detoksifikaciju (GSTM1/T1) i gena odgovornog za imunomodulaciju (TNF- α -308G>A; TNF- α R1 -36A>G; TNF- α R2 -676T>G) predstavljaju faktore rizika za nastanak epitelnih tumora usne duplje.

Materijal i metode:

Ispitivanja su rađena na uzorku od 71 pacijenta lečenog zbog OKT i 78 pacijenata lečenih zbog OPK. Kontrolnu grupu sačinjavalo je 182 zdravih osoba kod kojih je DNK dobijena brisom bukalne sluzokože. Genotipizacija je vršena pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR) i analize restrikcionih fragmenata (RFLP). Chi kvadrat i Fišerov test su korišćeni kako bi se utvrdile eventualne razlike u genotipovima i alelnim učestalostima. Povezanost različitih genetskih oblika sa rizikom za nastanak ova dva epitelna tumora vršena je upotrebom logističke regresione analize izračunavanjem odnos šansi (odds ratios) i 95% intervala pouzdanosti (confidence intervals). P vrednosti manje od 0.05 smatrane su za statistički značajne.

Rezultati:

U okviru grupe ispitanika obolelih od OKT, postojala je visoka statistička značajnost između genotipova i alelnih učestalosti (kod obolelih i zdravih ispitanika), za analizirani TNF alfa ($p=0.00$) i TNF alfa receptor 1 polimorfizam ($p=0.00$). Nosioi alela A za TNF alfa, imali su izrazito visok rizik za nastanak OKT (OR 4.41, CI 2.66-7.27, $p=0.00$). Ostali ispitivani polimorfizmi nisu pokazali statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa. U okviru grupe ispitanika obolelih od OPK, postojala je visoka statistička značajnost između genotipova i alelnih učestalosti (kod obolelih i zdravih ispitanika), za analizirani GST1 polimorfizam ($p=0.00$). Ispitanici kod kojih je bila ispoljena delecija gena, imali su izrazito visok rizik za nastanak OKT (OR 3.56, CI 1.94-6.50, $p=0.00$). Ostali ispitivani polimorfizmi nisu pokazali statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa.

Zaključak:

Polimorfizam jednog nukleotida u promotornoj regiji TNF alfa i TNF alfa receptor 1 gena predstavlja rizik za nastanak odontogenog keratocističnog tumora. Polimorfizam jednog nukleotida u promotornoj regiji GSTT1 gena predstavlja rizik za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma.

KLJUČNE REČI: epitelni tumori usne duplje, OKT, OPK, polimorfizam, MTHFR, GST, TNF α , TNF α R1, TNF α R2

NAUČNA OBLAST: oralna hirurgija

UŽA NAUČNA OBLAST: onkogenetika

UDK: 575.22:616.31-006(043.3)

PhD THESIS: Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase, glutathione transferase, tumor necrosis factor α and its receptors in oral epithelial tumors

ABSTRACT:

Background:

Keratocystic Odontogenic Tumour (KCOT) and Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) are classified as oral epithelial tumours. Although, the first one has benign and the second one malignant characteristics, they both have aggressive growth, sophisticated pathology and high tendency for recurrence following surgical treatment. Genetic factors including the polymorphism of the genes are thought to play an important role in their ethology.

Aims:

Polymorphisms in several gene classes, involved in DNA methylation and synthesis (MTHFR-677C>T), detoxification (GSTM1/T1) and immunomodulation (TNF- α -308G>A; TNF- α R1 -36A>G; TNF- α R2 -676T>G) were studied with the aim of identifying potential risk factors for oral epithelial tumour development.

Materials and Methods:

Genotyping was performed on DNA obtained from 71 biopsy specimens of KCOTs, 78 of OSCCs and from 182 buccal swabs of healthy individuals, using PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. Chi square test and Fisher exact test were used to determine possible differences in the genotype and allele frequencies. The association of gene variants with risk of disease was examined by use of unconditional logistic regression analysis to calculate odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI). P values of <0.05 were considered statistically significant.

Results:

Among the KCOT group, there was a highly significant difference in genotype and allele frequencies between the patients and controls for the TNF-alpha and TNF-alpha receptor one polymorphism (p=0.00). Carriers of the allele A had a remarkably increased risk of developing KCOT (OR 4.41, CI 2.66-7.27, p=0.00). The other analysed polymorphisms did not show statistically significant association with KCOT. Among the OSCC group, there was a highly significant difference in genotype and allele frequencies between the patients and controls for the GSTT1 polymorphism (p=0.00). The subjects with the deletion of gene had a remarkably increased risk of developing OSCC (OR 3.56, CI 1.94-6.50, p=0.00). The other analysed polymorphisms did not show statistically significant association with OSCC.

Conclusion:

The single nucleotide polymorphism in the promoter region of TNF-alpha and TNF-alpha receptor one gene appeared as an important modulator of the risk for the development of keratocystic odontogenic tumours. The single nucleotide polymorphism in the promoter region of GSTT1 gene appeared as an important modulator of the risk for the development of oral squamous cell carcinoma.

KEY WORDS:

oral epithelial tumors, KCOT, OSCC, gene polymorphisms, MTHFR, GST, TNF α , TNF α R1, TNF α R2

SCIENTIFIC FIELD:

oral surgery

NARROWER SCIENTIFIC FIELD:

oncogenetic

UDK:

575.22:616.31-006(043.3)

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1 Odontogeni keratocistični tumor	3
Naziv i istorijat	3
Učestalost, lokalizacija i patogeneza	4
Klinička slika	5
Rendgen dijagnostika	6
Rast tumora	7
Nevoid basal cell carcinoma syndrome	7
Terapija	8
Recidivi	9
1.2 Oralni planocelularni karcinom	10
Klinička slika i dijagnostika tumora	11
Epidemiologija	13
Etiologija	14
Prevenција	17
Terapija	17
Preživljavanje i rehabilitacija	18
1.3 Genetska osnova neoplazmi	19
Somatske promene u epitelnim tumorima usne duplje	19
Genetički polimorfizam	22
1.4 Gen za Metilentetrahidrofolat-reduktazu	24
1.5 Gen za Glutation-S-transferazu	28
1.6 Gen za Faktor nekroze tumora alfa	32
1.7 Gen za TNF-α receptore	35
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	37
3. MATERIJAL I METODE	39
3.1 Pacijenti i biološki material	40
3.2 Izolacija genomske DNK	42

3.3	Amplifikacija DNK fragmenata	43
3.4	Analiza restrikcionih fragmenata PCR produkta	45
3.5	Gel elektroforeza	45
3.6	PCR amplifikacija - MTHFR 677	47
3.7	Restrikcioni postupak - MTHFR 677	48
3.8	PCR amplifikacija - GSTM1	49
3.9	PCR amplifikacija - TNF alfa	50
3.10	Restrikcioni postupak - TNF alfa	51
3.11	PCR amplifikacija – TNF α - R1	52
3.12	Restrikcioni postupak - TNF α - R1	53
3.13	PCR amplifikacija - TNF α - R2	54
3.14	Restrikcioni postupak - TNF α - R2	55
4.	REZULTATI	56
4.1	Odontogeni keratocistični tumori – genotipizacija	57
4.2	Planocelularni karcinomi - anamnestički podaci, stadijum bolesti i petogodišnje preživljavanje	64
4.3	Planocelularni karcinomi – genotipizacija	71
5.	DISKUSIJA	80
	OKT	81
	OPK – epidemiološko-klinički rezultati	82
	OPK – molekularno-genetički rezultati	84
6.	ZAKLJUČAK	94
7.	LITERATURA	96
8.	PRILOZI	111
9.	BIOGRAFIJA	116

1. UVOD

Usna duplja se često naziva ogledalom zdravlja. Prekrivena je mukoznim pokrivačem koji se sastoji iz oralnog epitela i vezivnog tkiva (lamina propria). Promene koje se mogu videti u usnoj duplji često su indikativne za neka sistemska oboljenja (hipovitaminoze, dermatoze, metabolički poremećaji i dr.) ili su rezultat lokalnih, hroničnih iritacija (duvan, alkohol, oštre ivice zuba i dr.). Oralni epitel se sastoji od pločasto slojevitih ćelija i može biti sa orožavanjem ili bez orožavanja. Ima višestruku ulogu (protektivnu, senzornu, sekretornu, gustativnu), a delovanjem štetnih noksi moguće su alteracije epitelne strukture. S obzirom na izrazitu izloženost usne duplje dejstvu različitih štetnih faktora, ona je mesto nastanka brojnih benignih i malignih tumora. Benigne tumore karakteriše sporiji rast kojim se potiskuju okolna tkiva ali ne daju metastaze. Maligni tumori imaju agresivniji rast, infiltrišu susedna tkiva i često daju metastaze.

Tumori usne duplje predstavljaju podgrupu neoplazmi glave i vrata koji mogu biti lokalizovani na usnama, jeziku, pljuvačnim žlezdama, desnima, podu usne duplje, orofarinksu, obraznim površinama sluzokože, kostima gornje, kostima donje vilice i drugim mestima unutar usne duplje.

U grupu benignih epitelnih tumora usne duplje svrstava se keratocistični odontogeni tumor (engl. keratocystic odontogenic tumor), ranije klasifikovan kao odontogena keratocista.

Od malignih tumora usne duplje najzastupljeniji su planocelularni karcinomi (oko 90%). Sinonim ovog termina je skvamocelularni karcinom (engl. squamous cell carcinoma), zbog toga što tumor vodi poreklo od skvamocelularnog (pločastoslojevitog) epitela.

Neoplastična transformacija je višefazni proces u okviru kojeg se postepeno akumuliraju promene u strukturi i funkciji ćelija sve do njenog potpunog poprimanja transformisanog fenotipa. Ovo se događa kao posledica genetičkih i epigenetičkih promena u somatskim ćelija, pre svega na nivou gena odgovornih za kontrolu ćelijske proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Grupa abnormalnih ćelija (poreklom od jedne ćelije) evoluirala kroz sukcesivne cikluse mutacija i selekcije. Posle svake deobe, u ovoj početnoj grupi ćelija, jedna ćelija se karakteriše većim potencijalom rasta u nepristupačnoj sredini unutar tumora (mala količina kiseonika i hranljivih materija). Ta

ćelija postaje dominantna u tumoru, a za nastanak visoko malignih ćelija nizom ovakvih ciklusa, uglavnom je potreban duži vremenski interval.

Najnovija istraživanja pokazala su da osim ključnih „kancerskih gena” kao što su onkogeni i tumorsupresorski geni, bitnu ulogu igraju i druge klase gena, koje, iako nisu neposredno uključene u tumorigenezu mogu u znatnoj meri da modifikuju rizik od nastanka neoplazije. Shodno tome u poslednje vreme se ulažu veliki naponi kako bi se pored molekularno-genetičkih markera progresije, biološkog ponašanja tumora i odgovora na terapiju, pronašli i markeri predispozicije za nastanak različitih tipova tumora.

Razvijene su brojne eksperimentalne tehnike koje omogućavaju bolje razumevanje etiologije neoplastičnih oboljenja i pouzdaniju dijagnostiku. One će u budućnosti voditi ka uspešnijoj prevenciji i efikasnijoj, individualizovanoj terapiji.

1.1. ODONTOGENI KERATOCISTIČNI TUMOR (OKT)

Naziv i istorijat

U literaturi su se upotrebljavali različiti termini kojima je nazivan odontogeni keratocistični tumor. Prvobitno, ovaj epitelni tumor opisivan je kao holesteatom (Hauer, 1926, Kostečka, 1929). Kasnije je korišćen termin primordijalna cista (Soskolne and Shear, 1967), dok je naziv odontogena keratocista počeo da se upotrebljava od 1956.godine (Philipsen, 1956). Pindburg i Hansen su definisali keratocistu kao viličnu cistu kod koje dolazi do obimnog stvaranja keratinskog sadržaja unutar cističnog lumena (PINDBORG and HANSEN, 1963). Tek 2005.godine, na kongresu Svetske zdravstvene organizacije održanom u Lionu, Asocijacija oralnih patologa izvršila je reklasifikaciju ove ciste i dodelila joj naziv odontogeni keratocistični tumor (Barnes, et al., 2005). Stručna javnost se složila da ovaj benigni, uni/multicistični tumor epitelnog porekla ima histopatološku sliku koja pokazuje regularni, keratinizovani, pločasto-slojeviti sloj epitela. Ćelije su palisadno raspoređene u 5 do 8 redova, kuboidnog oblika i retko metaplaziraju. U 85% slučajeva epitel pokazuje znakove parakeratizacije, mada može biti i ortokeratitične građe. Novije molekularne studije i ispitivanja govore u

prilog novoj klasifikaciji i upotrebi termina odontogeni keratocistični tumor (Andric, et al., 2012, Neville, 2007).

OKT pobuđuje posebno interesovanje zbog svojih kliničkih i patohistoloških osobenosti. Može da dostigne velike dimenzije pre nego što se klinički manifestuje, može da formira satelitske tumore i za razliku od ostalih viličnih cisti, ima relativno visok procenat recidiva.

Učestalost, lokalizacija i patogeneza

Odontogeni keratocistični tumor je relativno čest tumor. U okviru viličnih cisti, njegova učestalost se kreće od 1.5% do 11.1% (Hoffmeister and Härle, 1985, Stoelinga, 1971), dok u okviru odontogenih cista iznosi od 2.8% do 21.8% (Reff-Eberwein, et al., 1985).

OKT se češće razvija kod muškaraca nego kod žena (60:40), dok kod obolelih u okviru Sindroma karcinom nevoid bazalnih ćelija (engl.Naevoid basal cell carcinoma syndrome – NBCCS), taj odnos je približno isti (Woolgar, et al., 1987). Nije zabeležena razlika u distribuciji tumora između bele i crne populacione rase.

Od OKT najčešće oboljevaju osobe starosne dobi od 15 do 30 godina. Gotovo 60% obolelih pripada ovoj starosnoj grupaciji (Meara, et al., 1996), dok je drugi „pik“ pojave tumora od 50 do 60 godina (Jones, et al., 2006). Interesantno je to, da pacijenti koji oboljevaju od ovog tumora ali u okviru NBCCS, pripadaju mlađoj starosnoj dobi (Woolgar, et al., 1987).

Odontogeni keratocistični tumor je najčešće lokalizovan u donjoj vilici (73% - (Morgan, et al., 2005), 71% - (Jones, et al., 2006)), dok se u gornjoj vilici sreće uglavnom kod starijih osoba. Najčešća lokalizacija (preko 60% slučajeva) je predeo ugla donje vilice, odakle se „širi“ ka ramusu ili telu mandibule.

Postoje dve teorije koje objašnjavaju patogenezu OKT. Po prvoj teoriji, on vodi poreklo od odontogenog epitela dentalne lamine ili njenih ostataka. Po drugoj, nastaje ekstenzijom bazalnih ćelija oralnog epitela.

Klinička slika

U najvećem broju slučajeva, OKT se dijagnostikuje slučajno, tokom redovnog radiografskog/stomatološkog pregleda. Ipak, u ne tako malom broju slučajeva, tumor se dijagnostikuje tek nakon pacijentovih žalbi na bol, otok, sekreciju ili utrnutost kože u predelu donje usne. Razlog za kasnu dijagnostiku tumora leži u brzom i ekspanzivnom širenju tumora kroz spongiozni deo kosti. U donjoj vilici u oko 50% slučajeva dolazi do ekspanzije bukalnog korteksa, odnosno deformacije kompaktne kosti. U gornjoj vilici, OKT znatno ređe dovodi do narušavanja spoljašnjih koštanih lamela (u približno 30% slučajeva). OKT gornje vilice se najčešće rano dijagnostikuje zbog toga što tumor prolazi kroz brojne inflamatorne faze koje su klinički manifestne. Dokumentovani su i brojni slučajevi ekstremno velikih tumora kada on svojim rastom može izazvati patološke frakture kostiju, infiltraciju mekih tkiva infratemporalne regije, maksilarnog sinusa ili orbite (Slika 1).



Slika 1 - OKT lokalizovan u gornjoj vilici

Rendgen dijagnostika

Odontogeni keratocistični tumor se dijagnostikuje na ortopantomografskom radigramu kao jasno ograničeno, ovalno rasvetljenje. Kada dostigne veće dimenzije, može se videti sklerotična zona kosti na periferiji tumora. Najčešće je to unilokularno rasvetljenje, mada može imati „valovitu“ granicu koja se pogrešno tumači kao multilokularna cista. Razlog za valovitu periferiju tumora leži u različitom i nejednakom potencijalu rasta i aktivnosti tumora, kao i različitoj „otpornosti“ zahvaćenih tkiva. Ovakva multilokularna cistična rasvetljenja često se pogrešno dijagnostikuju kao ameloblastom (Slika 2).



Slika 2 - OKT lokalizovan u predelu tela i ugla donje vilice sa leve strane

OKT može da potisne mandibularni kanal ili da dovede do perforacije koštanog korteksa. Ponekad, može da obuhvata zub ili da ga potiskuje, što se pogrešno tumači kao radikularna ili folikularna cista. Primena kompjuterizovane tomografije (CT – computerized tomography) ili kompjuterizovane tomografije konusnih zraka (CBCT – cone beam computerized tomography) veoma je važna zbog preciznije procene odnosa sa susednim anatomskim strukturama, evaluacije transverznog promera ciste, destrukcije spoljašnjih korteksa i planiranja operativnog zahvata.

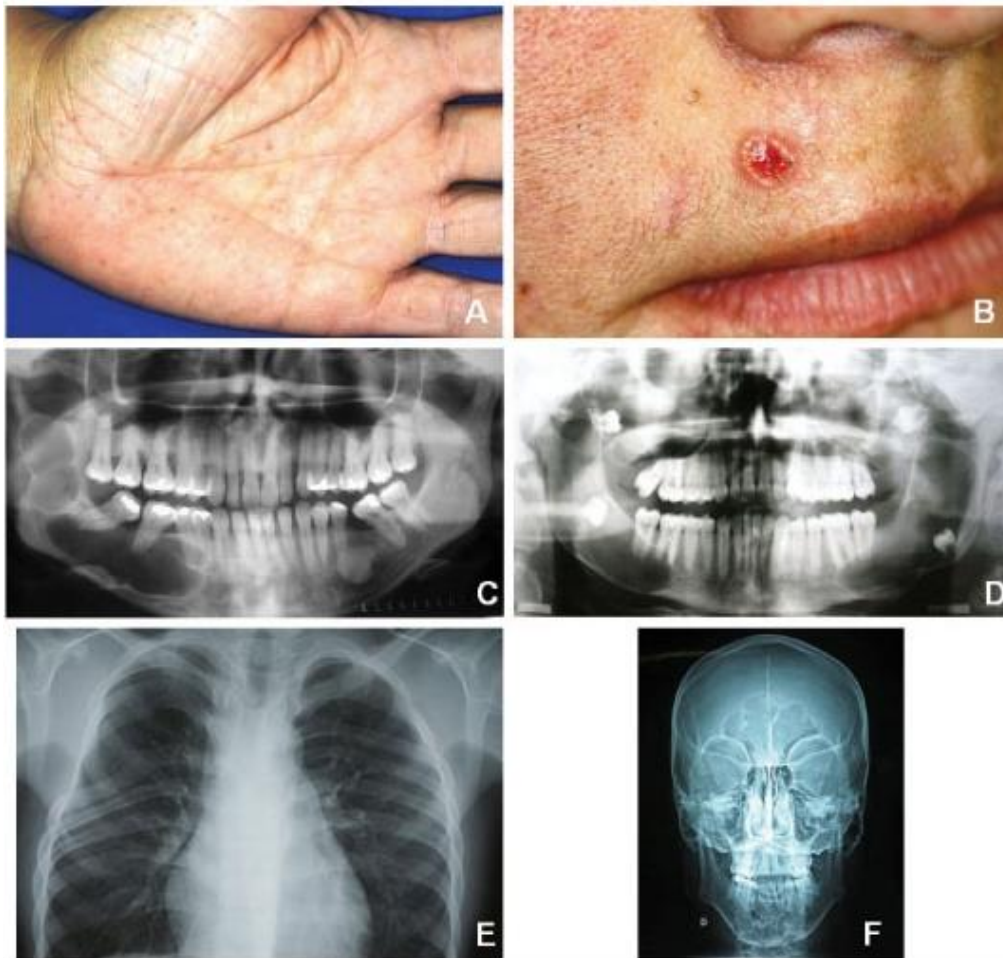
Rast tumora

Odontogeni keratocistični tumor ne pokazuje razlike u brzini i ekspanziji rasta u zavisnosti od starosti i pola obolelih osoba. Studije su pokazale da je brzina rasta ovog tumora ista kao i brzina rasta drugih odontogenih cista. U proseku, brzina rasta OKT iznosi oko 7 mm godišnje (Forsell, 1980). Postoje brojne teorije koje objašnjavaju rast i uvećavanje OKT i zasnivaju se na specifičnom osmolalitetu cistične tečnosti (Toller, 1970), uvećanju i proliferaciji cističnog epitela (Main, 1970), ulozi glikozaminoglikana i proteoglikana cistične tečnosti (Slabbert, et al., 1995), delovanju inflamatornog, albuminskog, cističnog eksudata (Hayashi, et al., 2008) i dr.

Resorpcija okolne kosti posledica je delovanja i aktivnosti kolagenaza unutar ciste. Interleukin-1 (IL-1) i tumor nekrosis faktor (TNF) su citokini koji se najčešće dovode u vezu sa hroničnim infiltrativnim lezijama. Oni su produkti mononuklearnih leukocita i jedni od ključnih faktora koji aktiviraju osteoklaste. U ovim procesima aktivne su i matriks metaloproteinaze (MMP) i prostaglandini. Nivo IL-1 alfa u cističnoj tečnosti je veoma povišen, dok je nivo IL-6 i TNF u cističnoj tečnosti nizak (Ninomiya, et al., 2002). Rast i ekspanzija ciste posledica su udruženih faktora kao što su intracistični pritisak, elastičnost cističnog zida, permeabilnost i kapilarni krvni pritisak cističnog zida, limfna i venska drenaža.

Nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)

Ovaj sindrom prvi put je dokumentovan 1951 godine (BINKLEY and JOHNSON, 1951). Tek kasnije su Gorlin i Goltz (GORLIN and GOLTZ, 1960) objasnili povezanost multiplih bazalnih epitelioma, viličnih cista (keratocista) i skeletnih defekata (bifidna rebra, ektopične kalcifikacije, okularni hipertelorizam). Osobe obolele od ovog sindroma u 70% slučajeva oboljevaju i od odontogenog keratocističnog tumora. S obzirom na autozomno-dominantno nasleđivanje, za dijagnostiku NBCCS potrebna je pozitivna porodična anamneza, oralne/kožne promene, rendgen dijagnostika (OPT, Ro grudi i glave), magnetna rezonanca i ultrazvuk. Gen odgovoran za nastanak ovog sindroma lokalizovan je na 9q22.3 hromozomskom lokusu, a bolest je najčešće uzrokovana delecijom celog genskog segmenta (Slika 3).



Slika 3 - Klinička i radiografska slika NBCCS
 (preuzeto od L.Bomfin, M. Vivas et al. Keratocystic odontogenic tumor related to nevoid basal cell carcinoma syndrome: clinicopathological study. Braz. J. Oral. Sci. Vol.12, No.1, 2013)

Terapija

Terapija odontogenog keratocističnog tumora mora biti dobro isplanirana i hirurški precizno sprovedena. Autori Ghali i Connor (Ghali and Connor, 2003) savetuju individualnu procenu i planiranje terapijskog postupka u skladu sa veličinom i lokalizacijom tumora, perforacijom koštanog korteksa, infiltracijom mekih tkiva, starošću pacijenta, udruženošću sa NBCCS, kao i činjenicom da li je u pitanju primarna lezija ili recidiv.

Marsupijalizacija je zbog čestih recidiva neadekvatna terapijska procedura i predlaže se samo kao „priprema“ pred hiruršku enukleaciju. Dekompresija je prihvaćena i sa hirurškog i sa histološkog aspekta. Ima za cilj pre svega redukciju volumena ciste. Takođe dovodi do promene u histološkoj strukturi cističnog omotača

koji zadebljava, poprima oblike oralnog epitela što kasnije olakšava hiruršku ekstirpaciju. Problem uklanjanja „čerki cisti“ i mikrosatelita ipak ostaje prisutan, pa neki autori savetuju dodatnu perifernu ostektomiju (rotirajućim instrumentom u zdravu kost), „en bloc“ resekciju, marginalnu ili segmentalnu resekciju kosti. Tretiranje postekstirpacionog defekta Carnoy rastvorom je i dalje kontroverzno pitanje s obzirom na to da je jedan od njegovih sastojaka (hloroform) zabranjen za humanu upotrebu zbog kancerogenog dejstva. Schmidt i Pogrel (Schmidt and Pogrel, 2001) predlažu upotrebu tečnog azota u cilju smanjivanja stope recidiva i tretiranja rezidualnih delova cističnog omotača. Nedostatak ove metode je sve teža dostupnost/pristupačnost tečnog azota, kao i moguće komplikacije u vidu oštećenja susednih mekotkivnih struktura prilikom manipulacije azotom (što može dovesti do dehiscencije i produženog zarastanja rane). Stoelinga (Stoelinga, 2003) predlaže da se sve unicistične promene u gornjoj i donjoj vilici (osim u regiji ugla mandibule) tretiraju hirurškom ekstirpacijom tumora i upotrebom Carnoy rastvora. Kod većih tumora lokalizovanih u predelu tubera maksile, ovaj autor predlaže i eksciziju mekih tkiva nad OKT. Međutim, delotvornost Carnoy rastvora u izmenjenoj formuli (ferohlorid rastvoren u apsolutnom alkoholu i trihlor-sirćetna kiselina bez hloroforma) dovodi se u pitanje i biće potrebno vreme kako bi se utvrdila njegova efikasnost u sprečavanju pojave recidiva. Zbog toga Pogrel savetuje upotrebu metilen plavog za tretiranje postekstirpacionog defekta. Ono ima sposobnost da prolazi kroz 0,5 mm debljine koštane kompakte i prodire od 1 do 1,5mm u spongiozu prebojavajući i markirajući rezidualne cistične ćelije. Nakon ispiranja metilen plavog fiziološkim rastvorom, autor savetuje tretiranje obojenih mesta hirurškom frezom - periferna ostektomija. Predloženi terapijski postupak: dekompresija, enukleacija, periferna ostektomija, autor je primenio tretirajući 29 OKT i do sada, u petogodišnjem periodu praćenja, nije zabeležio prisustvo recidiva (Pogrel, 2015).

Recidivi

Autori su još 1963. godine primetili visoku stopu recidiva odontogenog keratocističnog tumora (PINDBORG and HANSEN, 1963). Novije studije i dalje upozoravaju na visoku učestalost recidiva koja u velikoj meri zavisi od samog terapijskog postupka. Kod pacijenata lečenih enukleacijom tumora, učestalost recidiva

ide do 18%, dok kod onih kod kojih je uz enukleaciju vršena i ekscizija mukoze nad tumorom, a postekstirpacioni defekt tretiran Carnoy rastvorom, učestalost recidiva iznosi oko 6% (Stoelinga, 2001). Nije primećena povezanost lokalizacije i veličine tumora sa pojavom recidiva. Oboleli od NBCCS češće imaju recidive OKT, dok je učestalost recidiva manja kod ortokeratotičnih tumora (Woolgar, et al., 1987).

Objašnjenje za visoku učestalost recidiva OKT leži u više razloga. Prvi i osnovni razlog nastanka recidiva je nedovoljno i nepotpuno uklanjanje cističnog omotača. Ovo se najčešće dešava kod većih lezija, kod kojih se tokom hirurške intervencije nastoji očuvati vitalitet susednih zuba i mekotkivnih struktura (krvnih sudova i nerava). Takođe, OKT ima tanak i vulnerabilan zid koji nije jednostavno ukloniti u komadu, a kod promena kod kojih je prethodno dolazilo do egzacerbacija infekcije, fibrozno srastanje cističnog zida otežava potpunu enukleaciju.

Drugi razlog za učestale recidive nalazi se u tome što se tokom hirurške procedure ne uklone „ćerke ciste“ (mikrociste), odnosno epitelna ostrvca koja vode poreklo od zida tumora, a koja urastaju u okolno zdravo tkivo. Zbog ovog razloga, brojni autori predlažu da se uz potpunu ekstirpaciju ciste, načini i ekscizija mekih tkiva nad cistom, kako bi se uklonila mogućnost zaostajanja izmenjenih ćelija.

Treći razlog čestih recidiva je pojava „de novo“ odontogenog keratocističnog tumora koji vodi poreklo od epitelnih ćelija bazalnog sloja oralnog epitela.

Recidivi su najčešći tokom prvih pet godina od uklanjanja tumora, mada je moguća i pojava kasnih recidiva koji se razvijaju i nekoliko desetina godina nakon prvobitne operacije. Kontinuirana edukacija oralnih hirurga, ukazivanje na visoku recidivantnost i promenjeni hirurški protokoli doveli su do toga da je poslednjih decenija učestalost recidiva u padu.

1.2. ORALNI PLANOCELULARNI KARCINOM (OPK)

Na skali incidencije malignih tumora čoveka, tumori glave i vrata nalaze se na šestoj poziciji. Oni predstavljaju veliki sociomedicinski problem i poslednjih decenija su predmet brojnih kliničkih, histopatoloških i molekularno-genetičkih istraživanja. Smatraju se pogodnim, "in vivo" modelom za utvrđivanje uloge različitih kancerogenih agenasa u procesu nastanka i evolucije tumora.

Osim domaćin zavisnih faktora koji povećavaju rizik za nastanak i razvoj tumora, postoje i spoljašnji faktori rizika. Većina studija koje su se bavile ovim problemom beleže povezanost konzumiranja žestokih alkoholnih pića i duvana, kao spoljašnjih faktora rizika, sa nastankom tumora usne duplje.

Planocelularni karcinomi nastaju malignom transformacijom i proliferacijom epidermalnih keratinocita. Histološki, sastoje se od gnezda i čvorova atipičnih skvamoznih ćelija koje iz epiderma prodiru u derm.

Dijagnoza se postavlja na osnovu anamneze, kliničkog pregleda, dopunskih dijagnostičkih metoda (ultrazvučni pregled, kompjuterizovana tomografija, magnetna rezonanca) i definitivno histopatološkom verifikacijom tumora (Chhabra, et al., 2015).

Klinička slika i dijagnostika tumora

Anamnestička procedura započinje utvrđivanjem vremena kada je oboleli prvi put primetio promenu, a zatim daljim praćenjem lokalizacije i evolucije iste. Podatak o postojanju dugotrajnih rana u ustima koje nikako ne zarastaju treba da pobudi sumnju na oralni karcinom. Pacijenti se često žale na neprijatan zadah, krvarenje prilikom konzumiranja hrane, žuljanje proteze, nemogućnost postavljanja proteze na svoje ležište, na labavljenje i ispadanje zuba (Perry, et al., 2015). U odmaklom stadijumu razvoja karcinoma pacijenti primećuju utrnulost određenih regija lica, ograničenost u otvaranju usta, kao i prisustvo izraslina na koži glave i vrata. Navode gubitak apetita i telesne težine. Pozitivna porodična anamneza može da ukaže na postojanje genetičke predispozicije za nastanak oralnog karcinoma.

Klinički pregled obuhvata detaljan ekstraoralni i intraoralni pregled. Ekstraoralno se mogu uočiti asimetrije i tumorozni otoci u donjoj trećini lica, poremećaj motorike ili senzibiliteta. Planocelularni karcinom usne duplje manifestuje se kao bezbolna, nejasno ograničena, eritematozna, nodularna promena, izdignutih ivica (egzofitična forma). Može biti prisutan i u obliku ulceracije, nepravilnog oblika, nejasnih granica, bedemastih ivica, beličaste ili crvenkaste prebojenosti (endofitična forma). Karcinom jezika ima karakteristiku da klinička slika nije proporcionalna stepenu razvoja tumora. Makroskopski izgleda kao otvrdnuće, ovalnog oblika, nepromenjene sluzokože jezika nad promenom, iako ne tako retko stepen destrukcije

tkiva u dubljim strukturama može biti mnogo veći nego što to klinički izgleda (fenomen „ledenog brega“). Palpatorno planocelularni karcinom usne duplje je umereno bolan, tvrdo-elastične konzistencije, slabo pokretan, odaje utisak fiksiranosti za dublje strukture i lako krvari na dodir. Pošto prolazi barijeru bazalne membrane, svojim infiltrativno-destruktivnim rastom može zahvatati dublje strukture tkiva (derma, hipoderma, mišića, pa i kosti). Limfogeno brzo metastazira u regionalne limfne čvorove, a zatim i u duboke limfne čvorove vrata. Kada je tumor metastazirao, stopa petogodišnje preživljavanja značajno opada i iznosi oko 35%. Da li će karcinom metastazirati ili ne, zavisi i od same lokalizacije tumora. Veću sklonost ka metastaziranju imaju oni lokalizovani na usnama, jeziku i podu usta (Jarungroongruangchai, et al., 2014). Planocelularni karcinomi prednjih partija usne duplje imaju tendenciju metastaziranja u submentalne i submandibularne limfne čvorove, dok oni posteriorno lokalizovani metastaziraju u limfne čvorove jugulo-digastričnog lanca (Bernstein, et al., 1996) (Slika 4).



Slika 4 - Planocelularni karcinom sluzokože gornje vilice i tvrdog nepca

U okviru dodatnih dijagnostičkih procedura, koristi se ultrazvučni pregled vrata (procena metastatskog širenja u limfne čvorove), ortopantomografski i CBCT snimak vilica (procena infiltracije koštanog tkiva), kompjuterizovana tomografija i magnetna rezonanca (precizna lokalizacija tumora) i druge radiografske metode (pozitron emisiona tomografija, scintigrafija...) (Trotta, et al., 2011).

Osobe obolele od planocelularnog karcinoma usne duplje su u većini slučajeva nižeg socijalnog statusa koje dugo godina, svakodnevno, konzumiraju žestoka alkoholna pića. Uz to, uglavnom su pušači koji ne vode računa o oralnom zdravlju i ličnoj higijeni (Perry, et al., 2015). Stanje usne duplje je takvo da se u ustima mogu videti gangrenozni korenovi, odlomljeni delovi nesaniranih parodontopatičnih zuba sa oštrim ivicama i naslagama kamenca koji iritiraju oralnu mukozu.

Definitivna potvrda planocelularnog karcinoma usne duplje je isključivo histopatološka. Empirijski, promene „manjih dimenzija“ uklanjaju se u potpunosti, a potom šalju na histopatološku verifikaciju. Kod promena „većih dimenzija“, koje imaju maligni karakter, veću površinu i dubinu infiltracije, kod kojih su prisutni regionalno uvećani limfni čvorovi, znakovi infiltracije okolnog nervnog ili koštanog tkiva, prvo se načini biopsija, a nakon toga kompletna hiruška procedura po unapred determinisanom protokolu.

Hiruški pristup karcinomu, kao i margine ekscizije određene su histološkim gradusom, stepenom diferencijacije, dubinom prodora, lokalizacijom, perineuralnom infiltracijom, kao i veličinom same promene (Omura, 2014). Tumori dublje infiltracije i većih razmera imaju lošiju prognozu i veći rizik metastatskog širenja. Karcinomi koji se razvijaju iz ožiljaka i hroničnih povreda takođe imaju agresivniji rast i učestalije metastaziraju (18% do 38%) (Novick, et al., 1977).

Epidemiologija

Od svih neoplazmi usne duplje, oralni planocelularni karcinomi su najučestaliji (od 85% do 95%). Mnogo ređe se javljaju sarkomi, tumori malih pljuvačnih žlezda, mukozni melanomi, limfomi ili metastatske neoplazme poreklom iz udaljenih organa (Moulin, et al., 1985).

OPK je zastupljeniji kod muškaraca što se objašnjava učestalijim konzumiranjem duvana i alkoholnih pića. Odnos učestalosti javljanja karcinoma u odnosu na pol je takođe „u korist“ muškog pola 3:1, iako je poslednjih decenija ova tendencija u opadanju. Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije, kod muškaraca planocelularni karcinom je (posle karcinoma pluća, prostate, kolorektalnog karcinoma, karcinoma slezine i jetre) na šestom mestu po učestalosti, dok je kod žena na

desetom mestu (posle karcinoma dojke, kolorektalnog karcinoma, karcinoma pluća, želuca, materice, grlića materice, jajnika, slezine i jetre) (Pires, et al., 2013).

Zemlje u kojima je zastupljenost planocelularnih karcinoma usne duplje na visokom nivou su Indija (zbog žvakanja duvana), Francuska, SAD, Singapur, Mađarska, kao i zemlje jugoistočne Azije. Globalna učestalost karcinoma usne duplje, farinksa i larinksa je oko 500.000 obolelih godišnje, sa smrtnošću od oko 270.000 pacijenata godišnje. U SAD-u se svake godine dijagnostikuje 21.500 oralnih karcinoma, dok godišnje, zbog te bolesti, umre približno 6.000 ljudi. Incidenca oralnog planocelularnog karcinoma pokazuje izrazitu tendenciju rasta u zemljama u razvoju (Blot, et al., 1994, Franceschi, et al., 2000). Takođe, zabrinjava podatak sve učestalije pojave OPK kod osoba mlađih od trideset godina.

Etiologija

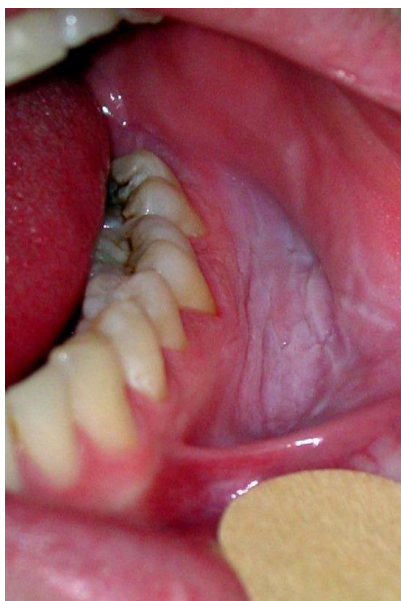
Etiologija planocelularnog karcinoma usne duplje je multifaktorska i može biti vezana za domaćin-zavisne faktore i/ili za faktore spoljašnje sredine (Bagan and Scully, 2009).

Domaćin-zavisni faktori su imunološki deficiti, prisustvo sindroma i nasledna predispozicija koja počiva u genskim polimorfizmima i koja čini da svako poseduje svoj individualni genotip. Spoljašnji faktori podrazumevaju izloženost štetnim agensima koji hemijskim i/ili fizičkim dejstvom utiču na nastanak i razvoj karcinoma.

Osim dobro poznatih spoljašnjih faktora (konzumiranje duvana i žestokih alkoholnih pića), dugo se tragalo za endogenim faktorima koji „olakšavaju” nastanak i razvoj tumora. Odgovor je delimično nađen u genetskoj predispoziciji, odnosno brojnim polimorfizmima (varijantama) gena koji čine da je neko manje ili više podložan nastanku tumora (Ribeiro, et al., 2014). Poznate su brojne familije enzima koje učestvuju u bitnim ćelijskim procesima, kao što su procesi sinteze DNK i njene metilacije, zatim enzimi uključeni u detoksikaciju, u degradaciju ekstraćelijskog matriksa i dr. To su enzimi iz grupa citohrom peroksidaza (CYP), metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR), glutation-s-transferaza (GST), matriks-metaloproteinaza (MMP) i drugih. Osim mutacija na genima odgovornim za sintezu

ovih enzima, moguće su i mutacije na genima koji kodiraju medijatore koji omogućavaju dejstvo pomenutih enzima (interleukini, tumor nekroza faktor i drugi).

U evoluciji planocelularnog karcinoma posebna pažnja se posvećuje prekancerozama (leukoplakija i eritroplakija). Leukoplakija se manifestuje kao asimptomatska, beličasta, plakozna lezija, glatke ili nabrane površine, blago izdignuta u odnosu na okolnu sluzokožu. Etiologija nije u potpunosti razjašnjena i najčešće se dovodi u vezu sa konzumiranjem duvana, lokalno-iritativnim i traumatskim faktorima. Eritroplakija je prekancerozna lezija slična leukoplakiji, crvenkaste prebojenosti. Ove prekanceroze se moraju ozbiljno shvatiti i adekvatno tretirati. S obzirom na to da im je etiologija još uvek nejasna, pacijentu se savetuje sanacija usne duplje (zamena starih amalgamskih ispuna, uklanjanje kamenca i mekih naslaga), eliminacija iritativnih, štetnih faktora (pušenje, alkohol), kao i redovni kontrolni pregledi. U slučajevima da su lezije poprimile „nekarakterističan” izgled i imaju tendenciju širenja, preporuka je da se uradi ekscizionna biopsija (Reichart, 2001) (Slika 5).



Slika 5 - Leukoplakija sluzokože levog obraza

Hemijski i fizički agensi, kao i različita oštećenja sluzokože usne duplje mogu takođe uticati na nastanak oralnog karcinoma.

Upotreba duvana je glavni i najvažniji spoljašnji faktor u etiologiji planocelularnog karcinoma (Morse, et al., 1996). Do sada je u sastojcima cigareta potvrđeno prisustvo 32 kancerogena. Rizik za nastanak karcinoma usne duplje kod

pušača je 7 puta veći nego kod nepušača. Kod obolelih muškaraca pušenje se kao faktor rizika u nastanku karcinoma pripisuje u skoro 90% obolelih, dok je kod žena taj procenat znatno manji (oko 54%) (Castellsagué, et al., 2004). Konzumiranje alkohola doprinosi i povećava rizik za nastanak OPK (6 puta veći rizik nego kod osoba koje ne konzumiraju alkohol), ali u kombinaciji sa upotrebom duvana taj rizik se uvećava za oko 40 puta. Ovo se objašnjava time što alkohol štetne produkte duvana čini solubilnijim i time omogućava prodor štetnih agenasa u dublje strukture usne duplje. Duvanski dim je naročito potentan kancerogen jer benzopiren i brojni nitrozoamini u njegovom sastavu mogu uzrokovati pogrešnu ugradnju nukleotida. Smatra se takođe da i način konzumiranja duvana može uticati na nastanak tumora. Žvakanje duvana koje je naročito rasprostranjeno na Azijskom kontinentu potencira štetan efekat duvana. Sa druge strane, pušenje cigareta sa filterom ima delimično protektivnu ulogu jer eliminiše i sprečava unos nekih štetnih materija. Hronična izloženost ovim kancerogenima vodi nastanku niza genetičkih abnormalnosti (Maier and Weidauer, 1995).

U faktore sredine koji povećavaju rizik za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma spadaju i lokalni iritativni faktori. To su oštre ivice zuba, velike nesanirane karijesne lezije, zaostali korenovi zuba, kamenac, konkrementi, neadekvatni rubovi ispuna, neadekvatni protetski radovi i slično. Oni kontinuiranim iritativno-mehaničkim dejstvom oštećuju oralnu sluzokožu, neprekidno izazivajući nove mitoze i stalnu reparaciju tkiva (Perry, et al., 2015) (Slika 6).



Slika 6 - „Nesanirana“ usta i oštre ivice zuba kao lokalno-iritativni faktori

Dokazano je i da prisustvo nekih virusa može uticati na nastanak OPK. Humani papiloma virus (HPV) povećava rizik za nastanak planocelularnog karcinoma usne duplje. Naročito veliki onkogeni potencijal imaju HPV 16 i HPV 18, koji su odgovorni za nastanak karcinoma grlića materice, karcinoma kože i karcinoma sluzokože usne duplje. Od ostalih virusa, u vezu sa nastankom OKT dovode se humani virus imunodeficijencije (HIV), Herpes Simplex virusi (HSV), kao i Epštajn-Bar virus (EBV) (Sand and Jalouli, 2014).

Prevenција

U prevenciji oralnog karcinoma ključnu ulogu ima sistem primarne stomatološke zaštite. Neophodna je kontinuirana edukacija pacijenata od strane stomatologa. Ona obuhvata motivaciju pacijenata i njihovo obučavanje kako da pravilno održavaju oralnu higijenu, kao i rad na povećanju svesti pacijenata o značaju oralnog zdravlja za opšte zdravlje. Redovni kontrolni pregledi, skrining, prosvjećenost i informisanost populacije su ključni elementi u borbi protiv oralnog karcinoma. Osobe visokog rizika treba identifikovati i redovno kontrolisati kako bi se u slučaju nastanka tumora pravovremeno intervenisalo.

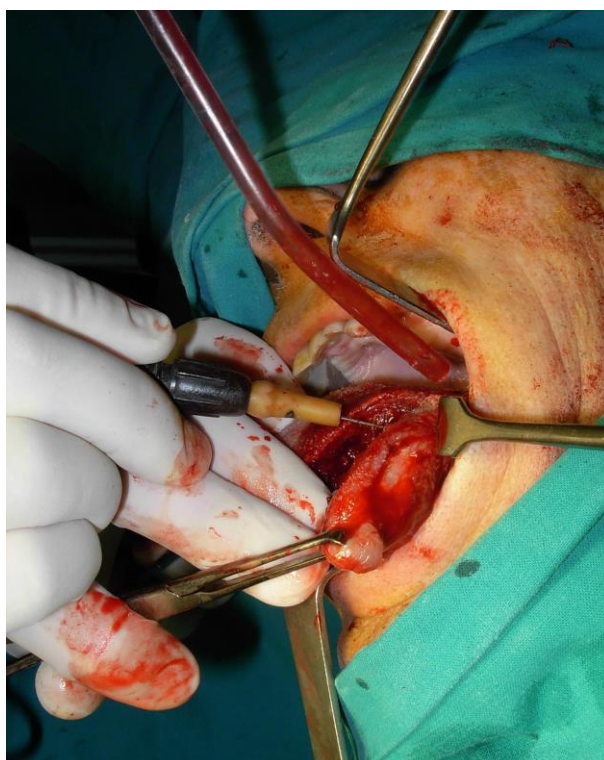
Edukacija pacijenata o štetnosti duvanskog dima i alkohola je ključna. U razgovoru sa pacijentima neophodno je istaći neophodnost sanacije usne duplje, eliminisanja lokalno-iritativnih štetnih faktora (oštre ivice zuba, neadekvatni protetički radovi, pearcing jezika), kao i loših navika pacijenata (grickanje usne i sluzokože obraza). Posebnu pažnju trebalo bi da obrate na svaku leziju u ustima koja traje duže od 14 dana.

Terapija

Doktrina struke je da se bez obzira na kliničku sliku i prisustvo karcinoma, u cilju plana terapije, a pre radikalnog hirušskog zahvata, uvek izvrši histopatološka verifikacija promene. Od histološke karakteristike zavisi sklonost maligniteta ka recidivima i metastatski potencijal. Plan terapije se sprovodi zavisno od starosti (opšte

stanje, komorbiditet), anamnestičkih podataka, socijalnog habitusa, želje za ozdravljenjem i očekivanjima pacijenata.

Nakon uspešnog hiruškog tretmana pacijenta (Slika 7), neophodni su redovni kontrolni pregledi. Pacijent se konzilijarno upućuje i na zračnu terapiju u cilju povećanja verovatnoće za izlečenje. Kontrolni pregledi se u prvoj postoperativnoj godini obavljaju jednom mesečno. Tokom druge godine, kontrole se vrše na dva, a tokom treće na tri meseca. Nakon toga, kontrole se obavljaju na 6 meseci, odnosno jednom godišnje pet godina nakon hirurške intervencije. Na kontrolnim pregledima se osim lokalnog nalaza proverava i status regionalnih limfnih čvorova u cilju rane detekcije eventualnih metastatskih promena (Amit, et al., 2013).



Slika 7 - Hirurška ekscizija tumora

Preživljavanje i rehabilitacija

Stopa petogodišnjeg preživljavanja osoba lečenih od oralnog planocelularnog karcinoma se razlikuje i zavisi od stadijuma bolesti, odnosno zahvaćenosti okolnog tkiva.

Kod pacijenata kod kojih je tumor tretiran u ranom stadijumu (bez metastatskih promena), stopa petogodišnjeg preživljavanja se kreće od 85% do 90%. Kod pacijenata kod kojih je tumor metastazirao u regionalne limfne čvorove vrata, stopa petogodišnjeg preživljavanja je znatno niža (od 30% do 58%) (Zhang, et al., 2013).

Rehabilitacija orofacijalnih funkcija je izuzetno važan element u efikasnoj hirurškoj terapiji OPK. Njen cilj je obavljanje svakodnevnih životnih aktivnosti i integracija pacijenta u društvo. Zahteva složeni i koordiniran pristup različitih stomatoloških disciplina, odnosno efikasan tim koji se sastoji od maksilofacijalnog hirurga, maksilofacijalnog protetičara, stomatologa, zubnog tehničara i medicinske sestre.

1.3. GENETSKA OSNOVA NEOPLAZMI

Somatske promene u epitelnim tumorima usne duplje

Nastanak neoplastične ćelije je višefazni proces. Izmenjena ćelija prolazi kroz morfološke promene, promene metabolizma, dobija sposobnost autonomne proliferacije, neograničen životni vek (besmrtnost), poremećaj diferencijacije i kontrole ćelijskog ciklusa.

U najvećem broju slučajeva sve ćelije tumora potiču od jedne jedine ćelije. U osnovi tumora leže genetičke i epigenetičke promene u regulatornim genima odgovornim za kontrolu ćelijske proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Ključni „kancerski geni” su protoonkogeni i tumor supresorski geni.

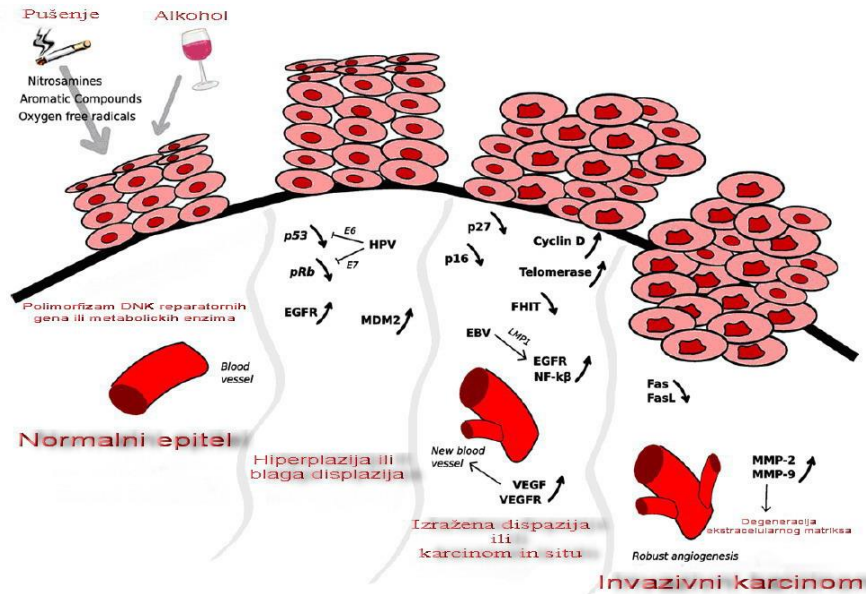
Razvoj odontogenog keratocističnog tumora povezuje se sa aktivacijom nekolicine protoonkogeni kao i sa inaktivacijom više tumor supresorskih gena. Na primer, ustanovljeno je da PTCH1 gen koji se nalazi na 9q22.3-q31 hromozomu i ima ulogu tumor supresora, zauzima značajno mesto u patogenezi OKT. Njegov proteinski produkt je ključan molekul u tzv. jež signalnom putu (”Hedgehog“) (Li, 2011). On obrazuje receptorski kompleks sa onkogenom SMO (”smoothened“) čineći ga SHH ligandom (”sonic hedgehog“) (Madras and Lapointe, 2008). Brojne studije ukazuju na povezanost mutacija PTCH gena i OKT, odnosno NBCCS (Barreto, et al., 2000, Diniz, et al., 2011, Gu, et al., 2006, Honma, et al., 2008, Lindström, et al., 2006).

Kod OKT povećana je takođe i ekspresija PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Ki-67 i IPO-38 antigena. Geni koji se još mogu dovesti u vezu sa nastankom ovog tumora su i PTCH2, SUFU, p16, MCC, TSLC1, LTAS2 i drugi (Li, 2011). Usled opisanih složenih molekularno-genetičkih promena koje se često sreću u malignitetima, sa pravom se može reći da odontogeni keratocistični tumor pripada grupi cističnih, epitelnih neoplazmi.

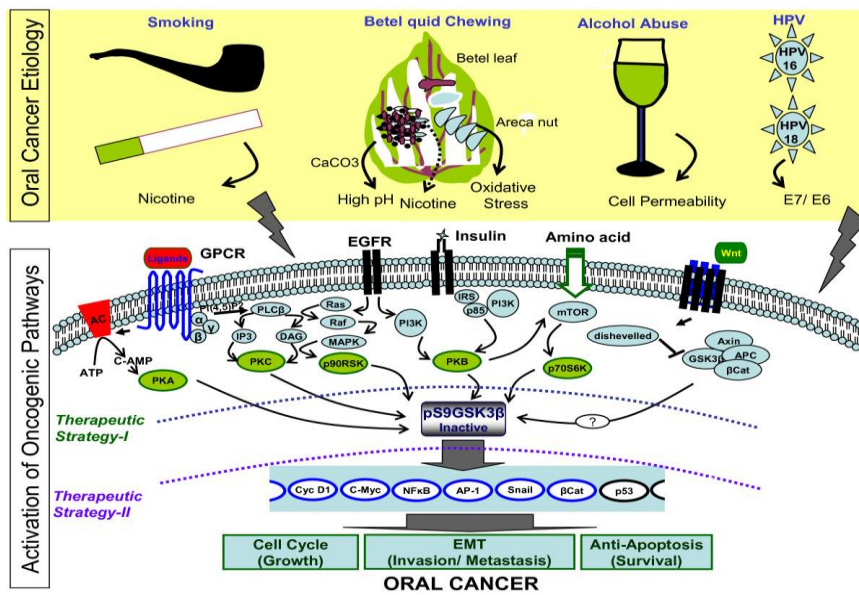
U molekularnoj biologiji tumora široko je prihvaćen tzv. višestepeni model tumorigeneze. Različite genske alteracije se akumuliraju i vode ka višem stepenu malignosti (Hanahan and Weinberg, 2000). Takva progresija je pokazana i kod oralnog karcinoma (Califano, et al., 1996). Transformacija benigne hiperplazije, preko displazije do karcinoma in situ i uznapredovalog karcinoma javlja se kao rezultat sve brojnijih genomskih alteracija. Nakupljanje genomskih alteracija u toku fenotipske progresije karcinoma odigrava se u širokoj populaciji ćelija koje su obuhvaćene terminom „polje genetski izmenjenih ćelija“. Ova teorija je predložena još sredinom prošlog veka od strane Slaughter-a (Slaughter, et al., 1953) i pokušava da objasni čestu pojavu recidiva nakon hirurškog uklanjanja tumora u potpunosti. Prema skorašnjoj adaptaciji ovog koncepta (Braakhuis, et al., 2003), genetski izmenjene ćelije će postepeno proliferisati i proširiti se u jedno neinvazivno polje koje je podložno daljim genomskim oštećenjima. Ovo polje ćelija, iako nije makroskopski vidljivo, predstavlja pogodan teren za evoluciju premalignih lezija i razvoj invazivnog karcinoma. Iako se karcinom može kompletno ukloniti ekscizijom, polje izmenjenih ćelija će ostati, zbog čega je pacijent izložen riziku nastanka sekundarnih tumora. Precizne molekularne karakteristike genetski izmenjenog polja ćelija nisu jasno definisane, ali se smatra da su već u ranim stadijumima kompromitovani ključni tumorsupresori (p53, CDKN2, pRb) (Tabor, et al., 2002).

U uprošćenom modelu nastanka planocelularnog karcinoma usne duplje, početne promene se dešavaju u bazalnom ćelijskom sloju pod uticajem duvanskog dima, alkohola ili drugih kancerogena. One mogu podrazumevati inaktivaciju proteina p53, pRb, p16 i drugih tumor supresora. Prelaz od normalnog epitela ka invazivnom karcinomu je najčešće progresivan i praćen „multiplim koracima“ koji promovišu različite procese preko različitih gena. Pored inaktivacije tumor supresorskih gena, podjednako važnu ulogu u nastanku OPK ima aktivacija i izmenjena ekspresija

različitih protoonkogenih, kao što su H-ras, c-Myc, c-Erb, Notch i dr. (Krishna, et al., 2015, Murugan, et al., 2012, Pérez-Sayáns, et al., 2014, Vora, et al., 2003) (Slika 8 i 9).



Slika 8 - Teoretski model karcinogeneze u usnoj duplji



Slika 9 - Teoretski model karcinogeneze usled delovanja štetnih noksija (preuzeto od Mishra, 2010)

Odavno je jasno da se kod ne tako malog broja osoba koje su dugi niz godina izložene spoljašnjim faktorima rizika, pre svega različitim mutagenima i kancerogenima, ne razvije tumor usne duplje. Isto tako je uočeno da tumor može da se razvije i kod osoba koje nisu nikada bile izložene delovanju kancerogena i drugih

sredinskih faktora rizika. Loše životne navike očigledno nisu jedini i bezuslovan uzrok nastanka ovih neoplazija. Ovo ukazuje na to da su i drugi faktori rizika, pre svega genetski, uključeni u patogenezu tumora.

Pored somatskih mutacija koje pogađaju „kancerske“ gene ciljnog tkiva (oralni epitel) i koje su neposredno odgovorne za proces neoplastične transformacije ćelije, pažnju istraživača sve više zaokupljaju i nasledne (germinativne) promene koje su deo genetičke konstitucije svakog pojedinca i predstavljaju manje ili više pogodno tlo za delovanje sredinskih faktora. U pitanju su DNK polimorfizmi koji se sreću u svim genima ljudskog genoma, a čije prisustvo u genotipu može da determiniše veću ili manju sklonost ka razvijanju neoplastičnih oboljenja.

Genetički polimorfizam

DNK polimorfizmi su varijacije nasledne osnove koje postoje u populaciji zdravih ljudi, a njihov uticaj na krajnji proteinski produkt pa time i fenotip jedinke još uvek nije u potpunosti rasvetljen. Danas se široko proučava uloga DNK polimorfizama kao markera eventualne genetičke predispozicije za razvoj različitih oboljenja.

Nasledna osnova čoveka - genom se sastoji od oko 3 milijarde baznih parova po haploidnom setu i sadrži približno 20.000 do 25.000 gena smeštenih na 23 hromozomska para. Geni čine svega oko 10 do 15% genoma i u 90% slučajeva imaju ulogu u kodiranju proteina i RNK. Ostatak čine sekvence čija funkcija nije u potpunosti razjašnjena.

Varijabilnost nasledne osnove se označava i kao nukleotidna raznolikost. Definiše se kao odnos broja različitih baza prema ukupnom broju baznih parova genoma koji se porede. Parametrom heterozigotnosti π može se odrediti verovatnoća kojom će se nukleotidi na određenoj poziciji naći u heterozigotnoj formi (poredjenjem dva hromozoma odabrana po principu slučajnosti u ciljanoj populacionoj grupi). Procenjeno je da je heterozigotnost u humanom genomu oko 7.51×10^{-4} , što odgovara pojavi 7.51 različitosti na 10.000 baza. Varijabilnost za autozome se kreće od 5.19-8.79 različitosti na 10.000 baza. Heterozigotnost za polne hromozome je znatno nižeg stepena. Za X hromozom iznosi oko 4.69, dok za Y hromozom iznosi 1.51 različitosti na 10.000 baza.

Kao što je već napomenuto, varijacije u naslednoj osnovi koje se normalno sreću u humanoj populaciji nazivaju se polimorfizmi. Da bi se određena varijacija proglasila polimorfizmom neophodno je da se alelna forma javlja sa frekvencijom većom od 1%, odnosno da je učestalost heterozigota veća od 2%. Alelne forme sa učestalošću manjom od 1% predstavljaju retke varijante (Soni, et al., 2005), dok one sa učestalošću preko 10% čine uobičajene varijante.

Prisustvo polimorfizma može ostati bez efekta (polimorfizam pritajenog tipa) ili može imati funkcionalne posledice. One se manifestuju u vidu izmenjene katalitičke funkcije, stabilnosti ili nivoa ekspresije kodiranog proteina. Polimorfizmi se mogu javiti u kodirajućim sekvencama ali i u regulatornim regionima gena gde, po pravilu utiču na količinu eksprimiranog proteina. Polimorfizmi u nekodirajućim regionima mogu uticati na stabilnost ili iskrajanje iRNK. Glavni tipovi polimorfizama su:

1. SNP- polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism);
2. Del/ins - delecije ili insercije celih gena ili delova gena;
3. VNTR - varijabilni broj tandemskih ponovaka (eng. variable number of tandem repeats);

Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP) je najčešći oblik varijacije u naslednoj osnovi. Ovakve varijacije čine 90% svih polimorfizama (Braakhuis, et al., 2004) i do sada ih je otkriveno nekoliko miliona. Najviše pažnje pobuđuju SNP-ovi koji menjaju funkciju ili ekspresiju gena. .

Polimorfizmi se najčešće ispituju pomoću asocijacionih studija čiji je zadatak da utvrde vezu između polimorfizma i podložnosti za nastanak ili progresiju bolesti. Da bi se identifikovao genski lokus koji utiče na podložnost za nastanak bolesti, asocijacione studije ispituju polimorfizme između pacijenata u grupi nesrodnih zdravih, kontrolnih individua koje pripadaju istom etničkom uzorku. Ispitivani polimorfizam se dovodi u vezu sa pojavom bolesti ukoliko se određeni alel i genotip javljaju sa značajno većom učestalošću među obolelim slučajevima nego u uzorku zdrave populacije. Ukoliko se ispituje veza između polimorfizma i progresije bolesti, umesto upoređivanja obolelih individua sa zdravim kontrolama, istraživači porede individue ekstremnih fenotipova.

Broj polimorfizama koji imaju ulogu u razvoju bolesti eksponencijalno raste iz dana u dan. Njihovo poznavanje je izuzetno važno a glavni cilj ovih ispitivanja je da se

bolje definišu patofiziološki mehanizmi u osnovi multifaktorskih oboljenja (uključujući i neoplazme). Polimorfizmi takođe mogu da ukažu i na nove pravce u farmakoterapiji, odnosno lečenju u širem smislu.

Polimorfizmi različitih klasa gena mogu značajno da doprinesu povećanju (ili smanjenju) rizika za nastanak tumora usne duplje. Do sada je posebna pažnja bila posvećena polimorfizmima u genima koji kontrolišu sintezu enzima uključenih u procese detoksikacije odnosno eliminacije ksenobiotika, zatim enzima uključenih u procese sinteze i metilacije DNK, degradacije ekstracelularnog matriksa i dr. Ispitivani su i polimorfizmi u genima koji kontrolišu sintezu medijatora i regulatora inflamacije, invazivnosti i drugih procesa bitnih sa stanovišta neoplastične transformacije. Međutim, u naučnoj literaturi prisutne su brojne kontroverze u pogledu značaja i uloge koji određeni polimorfizmi mogu da imaju u razvoju tumora glave i vrata, a posebno epitelnih tumora usne duplje. Zbog toga se nameće potreba za daljim istraživanjima ovih polimorfizama.

1.4. GEN ZA MTHFR – POLIMORFIZAM C677T (rs1801133)

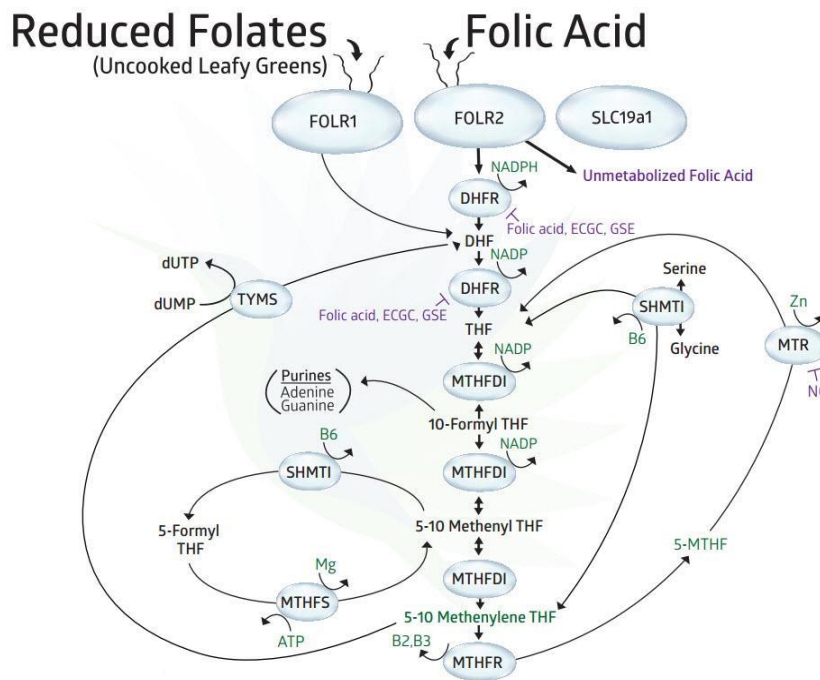
Metilentetrahidrofolat-reduktaza je enzim iz grupe flavoproteina koji se sastoji iz dve identične subjedinice. N-terminalni domen ima katalitičku ulogu i u okviru njega se nalazi mesto za vezivanje supstrata. C-terminalni domen je regulatorni region enzima za koji se vezuje inhibitor, a oba domena su premošćena jednim hidrofobnim delom (Goyette, et al., 1998).

U naslednoj osnovi čoveka, gen za MTHFR je lokalizovan na kratkom kraku prvog hromozoma, u regionu 1p36.3. Interesantno je da humani i mišji gen za ovaj enzim imaju čak 90% homologije. Ova konstantnost strukture gena kod nesrodnih vrsta svedoči o konzerviranosti MTHFR enzima, kao i o značaju njegove funkcije. Ukupna dužina kodirajućeg regiona je 1980 baznih parova (bp). Sastoji se iz 11 egzona čije se dužine kreću od 102 bp do 432 bp. U tkivima su identifikovane tri različite iRNK dužine 2.8, 7.2 i 9.8 hiljada baznih parova. . U strukturi gena za MTHFR otkriveno je i više polimorfnih mesta, pri čemu su najispitanije bazne supstitucije na 677. i 1298. nukleotidnoj poziciji.

Zamena citozina timinom na poziciji 677 nukleotida prevodi kodon GCT u kodon GTT, pa se u polipeptidnom lancu na 222. poziciji proteina, umesto alanina ugrađuje valin. Ova supstitucija je lokalizovana u egzonu 4 i uslovljava nastanak funkcionalne ali i termolabilne forme enzima čija je efikasnost umanjena. Kod osoba sa MTHFR 677 TT genotipom, tj. kod homozigota za ovu mutaciju, enzimaska aktivnost je smanjena na 30% normalne. Kod osoba sa heterozigotnim CT genotipom enzimaska aktivnost iznosi 60% normalne enzimске aktivnosti. Pokazano je i da postoji zajednički, interaktivni efekat polimorfizama 677 i polimorfizma 1298 na enzimsku aktivnost (Morelli, et al., 2002, van der Put, et al., 1997).

Učestalost C667T polimorfizma pokazuje heterogenu distribuciju među različitim etničkim grupama. U Evropi frekvencija MTHFR 677 TT genotipa iznosi od 24% do 40%; u Japanskoj populaciji od 26% do 37%; oko 11% u Afričkoj i Američkoj populaciji (9% kod Afro-Amerikanaca i 2% kod crnaca van Afrike) (Arruda, et al., 1998, Li, et al., 2002, Lin, et al., 2004, Lu, et al., 2002, Schwartz, et al., 1997, Sohda, et al., 1997, Stevenson, et al., 1997).

Folati su glavni izvor metil grupa. Oni vode poreklo iz ingestirane hrane i imaju značaj za procese biološke metilacije (metilacije DNK, RNK, proteina). Depoi folne kiseline se neprestano obnavljaju i nalaze se u jetri, bubrezima i intestinalnoj mukozi. U okviru ciklusa folata, MTHFR učestvuje u formiranju metil-tetrahidrofolata, koji je predominantna cirkulatorna forma folata. On je glavni donator metil grupe u procesu remetilacije homocisteina u metionin. Na taj način MTHFR je aktivan u najvažnijoj tački ciklusa folata, esencijalnoj za obnavljanje folatnog nivoa na račun DNK i RNK biosinteze. On je ključan u raspodeli folata između dva glavna puta: biološke metilacije i nukleotidne sinteze (Backlund and Smith, 1981, Giovannetti, et al., 2008) (Slika 10).



Slika 10 - Ciklus folata i MTHFR
(Preuzeto sa www.seekinghealth.org)

Rastući je broj dokaza u prilog činjenici da je nizak folatni status, bilo kao rezultat nedovoljnog unošenja putem hrane ili kao rezultat izmenjenog folatnog metabolizma, jedan od bitnih faktora kancerogeneze.

Postoje dva mehanizma kojima folatni deficit može povećati rizik za nastanak maligniteta:

1. uzrokujući DNK hipometilaciju i time aktivaciju protoonkogeni;
2. pogrešno indukujući ugradnju uracila tokom DNK sinteze što dalje vodi prekidu DNK lanaca i velikim hromozomskim oštećenjima (Duthie, 1999).

Alteracija DNK metilacionog ciklusa je ključna komponenta u nastanku i razvoju ne samo različitih bolesti već i u procesima starenja (Teng, et al., 2013). DNK hipometilacija je povezana sa nastankom tumora i bila je fokus brojnih istraživanja iz oblasti onkogenetike (Friso, et al., 2002). Globalna hipometilacija i gen-specifična demetilacija mogu voditi aberantnoj ekspresiji i aktivaciji gena što može dovesti do nastanka tumora (Worm and Guldborg, 2002).

Korišćenjem različitih direktnih i indirektnih metoda za određivanje nivoa DNK metilacije, došlo se do sledećih opažanja :

1. Ukupni nivo metilacije varira između različitih tipova karcinoma, sa značajnim nivoom globalne hipometilacije u poređenju sa zdravim tkivom. U nekim karcinomima uloga hipometilacije značajna je za početne stadijume kancerogeneze, dok je u drugim, poremećaj metilacije značajniji za napredovanje bolesti (Kondo and Issa, 2004, Lin, et al., 2001, Suter, et al., 2004).
2. Uobičajeno je da se globalni gubitak metilacije povezuje sa razvojem malignih oboljenja ili progresijom karcinoma. Ono što je značajno za razvoj određene bolesti je mesto u genomu u kome dolazi do hipometilacije kao i geni koji su zahvaćeni ovim procesom. Veliki broj gena čija je aberantna ekspresija usled hipometilacije vezana za pojavu ili progresiju kancera uključuje gene regulatore rasta, gene karakteristične za određene faze razvića, tkivno specifične gene i onkogene (Nishigaki, et al., 2005).
3. Efekat globalne hipometilacije se velikim delom ostvaruje kroz aktivaciju normalno „utišanih” repetitivnih sekvenci, transpozona i endogenih retrovirusa prisutnih u genomu. Reaktivacija jakih promotora vezanih za ove elemente može dovesti do promene nivoa transkripcionih faktora i promene ekspresije gena ključnih za regulaciju rasta (Whitelaw and Martin, 2001).

Rezultati merenja količine metilovanog citozina u genomskoj DNK pokazali su da osobe koje su homozigotni nosioci 677T alela imaju duplo manje metilovane DNK nego nosioci 677CC alela. Do sada je izvršen veliki broj studija asocijacije i analiza potencijalne uloge MTHFR C677T polimorfizma u etiologiji različitih vrsta tumora (kolorektalni kancer, kancer dojke, akutne i hronične leukemije, cervikalna neoplazma, endometrijalni, ezofagealni i gastrični kancer), uključujući i tumore orofacijalne regije (Bănescu, et al., 2015, Jeon, et al., 2015, Lin, et al., 2014, Niu, et al., 2015, Tang, et al., 2014, Zhuo, et al., 2012, Zhuo, et al., 2015).

1.5. GEN ZA GST – DELECIONI POLIMORFIZAM

Transferaze su enzimi koji katalizuju transfer funkcionalne grupe sa jednog molekula (donora) na drugi (akceptor). Glutation-S-transferaze pripadaju kompleksnoj grupi enzima koji katalizuju konjugaciju elektrofilnih supstrata sa molekulom glutaciona. Identifikovani su 60-ih godina prošlog veka kada je pokazano da citosolni ekstrakti jetre pacova imaju svojstvo da katalizuju konjugaciju glutaciona za arilhalogenidom (Booth, et al., 1961, Combes and Stakelum, 1961).

Konjugacija sa molekulom glutaciona smatra se prirodnim, zaštitnim mehanizmom koji je zadužen da štiti ćelijske komponente od reaktivnih i potencijalno štetnih elektrofilnih jedinjenja (ksenobiotika). Ova jedinjenja mogu biti endogena ili nastala kao rezultat metaboličkih reakcija faze I metabolizma ksenobiotika. Konjugacija odnosno vezivanje glutaciona za ksenobiotike je samo jedna od funkcija GST-aza. One imaju i druge esencijalne uloge kao što su redukovanje elektrofilnih kiseoničnih, azotnih i sumpornih radikala nastalih u oksidativnom stresu, u intracelularnom transportu endogenih lipofilnih molekula. GST-aze su takođe uključene i u biosintezu leukotriena, prostaglandina, testosterona i u degradaciji tirozina.

Sa hemijske tačke gledišta supstrat za GST enzim je bilo koje jedinjenje koje može reagovati sa tiolnim ostatkom glutaciona. To su elektrofilna jedinjenja koja sadrže hemijske grupe kao npr. epoksidi, alfa-beta nezasićeni ketoni, halogeni ugljovodoni, sulfoksidi, estri, peroksidi, ozonidi i drugi (Hayes and McLellan, 1999).

GST-aze se nalaze u gotovo svim vrstama organizama (bakterije, gljive, biljke, insekti, parazitski crvi, sisari). Sa izuzetkom male grupe mikrozomalnih GST-aza, ovi enzimi su solubilni, kod ljudi ubikvitarni i čine do 10% solubilnih proteina jetre.

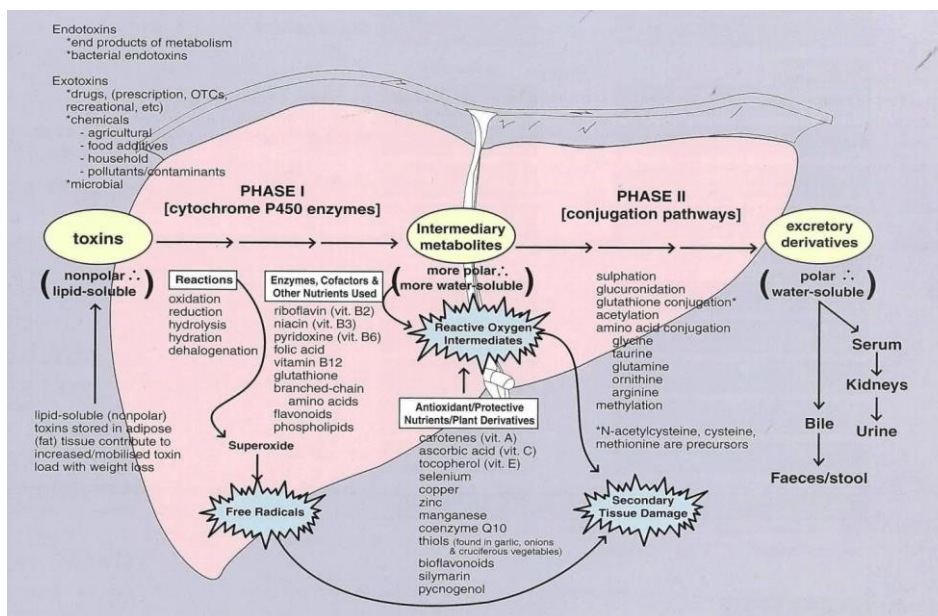
Ljudski organizam je konstantno izložen dejstvu spoljašnjih, štetnih, hemijskih jedinjenja poznatih kao ksenobiotici. Ova jedinjenja mogu da deluju pogubno na organizam, uzrokujući toksične a ponekad i kancerogene efekte. Iako je pretnja koju ova jedinjenja predstavljaju značajno porasla u XX i XXI veku usled niza novih hemikalija koje je čovek uneo u svoje životno okruženje, ksenobiotici postoje od kada i sam život. U prirodi srećemo mnoga toksična jedinjenja kao što su biljni i gljivični toksini ili reaktivne forme kiseonika koji se konstantno endogeno proizvode u ćelijama.

Epidemiološke studije pokazuju da je 80 do 90% svih karcinoma povezano sa spoljašnjim faktorima kao što su pušenje, ishrana i dejstvo različitih hemijskih agenasa (Doll and Peto, 1981). Zbog ovoga je biotransformacija toksičnih u netoksične ksenobiotike, prva linije odbrane od oštećenja izazvanih ovim supstancama. Sposobnost ćelije da se odupre pretnji koju predstavljaju toksična endogeno proizvedena i ksenobiotika jedinjenja verovatno je nastala kao rezultat biološke adaptacije i od fundamentalnog je značaja za opstanak organizma (Hayes and McLellan, 1999, Sheehan, et al., 2001).

Ćelija poseduje impresivan skup enzima koji mogu da izvrše biotransformaciju ksenobiotika i eliminaciju iz organizma (Lewis, et al., 1998). Proces enzimske detoksifikacije podeljen je u tri zasebne faze koje funkcionišu prema precizno koordinisanom mehanizmu i redosledu. Odvija se u većini tkiva i organa, a najveći deo u jetri s obzirom na to da ona ima 500 puta veći kapacitet u odnosu na druga tkiva.

Faze I i II detoksifikacije podrazumevaju konverziju lipofilnog, nepolarnog ksenobiotika u metabolit rastvorljiv u vodi, koji je manje toksičan i može se eliminisati iz ćelije (kroz fazu III detoksifikacije). Enzimi faze I uvode, odnosno modifikuju postojeće funkcionalne grupe ksenobiotika katalizom zasnovanom na dejstvu citohroma P450 enzima, oksidaza, reduktaza i dehidrogenaza. Prvobitno najčešće nereaktivni ksenobiotici sada postaju reaktivni i potencijalno kancerogeni intermedijeri, sposobni da reaguju sa mnogim ćelijskim komponentama (uključujući i DNK molekul). U toku faze II detoksifikacije, reaktivni intermedijeri se prevode u manje reaktivna hidrofilna jedinjenja, konjugacijom sa raznim endogenim ligandima, glutationom (GSH), UDP-glukuronskom kiselinom ili glicinom. Enzimi koji katalizuju reakcije u fazi II su glutation-S-transferaze (GST), N-acetiltransferaze (NAT), UDP-glukuroniltransferaze i dr. Enzimi koji katalizuju reakcije I i II faze poznati su kao enzimi metabolizma ksenobiotika i najviše se nalaze u jetri (Kelada, et al., 2003). Da bi se ćelije zaštitile od oštećenja i obezbedile efikasnu detoksifikaciju mora postojati ravnoteža između enzima I i II faze. U fazi III detoksifikacije, ksenobiotici se iz ćelija ekskretuju u žuč ili u krv posredstvom različitih transportera, odnosno ATP zavisnih pumpi.

Faza I se odigrava u endoplazmatičnom retikulumu ćelija, dok se faza II odvija u citoplazmi (Gonzalez and Yu, 2006) (Slika 11).



Slika 11 - Metabolizam ksenobiotika (preuzeto od Murray & Pizzorno, 2012)

Dosadašnja istraživanja ukazuju na prisustvo polimorfizama u velikom broju enzima (CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, GST, NAT), koji su u osnovi individualno različitih odgovora na iste ksenobiotike i koji su asocirani sa manjom ili većom sklonošću ka razvoju tumora (Pasanen, et al., 1995).

Funkcionalni polimorfizmi enzima za detoksifikaciju ksenobiotika mogu uticati na balans metaboličkih intermedijera produkovanih u toku biotransformacije. Neki od ovih intermedijera mogu se vezati za DNK i indukovati strukturne promene ovog molekula ili drugih kritičnih makromolekula.

U najvećem broju slučajeva, polimorfizmi gena za detoksifikaciju ksenobiotika imaju malu penetrabilnost tj. ne uzrokuju direktno nastanak bolesti. Razlog leži u tome što su ovi enzimi kodirani od strane multigenskih familija koje sadrže brojne članove i koji se po mehanizmu delovanja međusobno preklapaju.

Hipoteza većine istraživača je da kod polimorfizama koji menjaju odgovor ćelije na dejstvo ksenobiotika, genetske promene ne dovode do kvalitativno drugačijeg odgovora, već do promene u dozno-zavisnom odgovoru. Tako na primer, polimorfizam enzima za detoksifikaciju ksenobiotika koji smanjuje katalitičku efikasnost u detoksifikaciji određenog leka, može dovesti do toga da standardna doza ovog leka bude

toksična. Ovaj koncept je proširen ne samo na akutne efekte lekova, već potencijalno i na hronično izlaganje hemikalijama u radnom ili životnom okruženju.

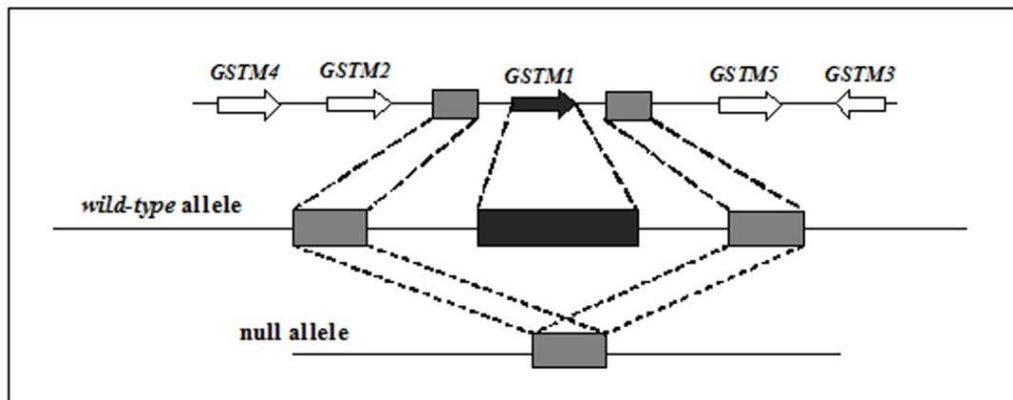
Do danas je kod sisara otkriveno osam klasa GST-aza i one se označavaju grčkim slovima: alfa, mi, pi, kapa, teta, omega, zeta i sigma. Subjedinice unutar klasa označavaju se arapskim ciframa po redosledu njihovog otkrića.

Regulacija ekspresije GST-aza u tkivima je različita i zavisi od tipa ćelije. GSTM1 je uglavnom eksprimiran u jetri, mozgu, testisima, bubrezima i plućima.

Aktivnost GST-aza indukovana je širokim spektrom strukturno raznovrsnih ksenobiotika (prirodnih ili sintetičkih). Do danas je identifikovano više stotina hemikalija koje mogu indukovati GST-aze a neke od ovih materija su barbiturati, policiklični ugljovodonici, antioksidanti ili prirodni proizvodi. Indukcija ovih agenasa odvija se u jetri, jednjaku, želucu i crevima. Ekstrakti iz zrna kafe i lišća čaja takođe mogu izazvati indukciju pa je zbog toga povećan interes za ova pića u cilju očuvanja zdravlja ili u smislu njihove upotrebe kao antikancerogenih sredstava. Mnoga jedinjenja koja indukuju GST-aze su istovremeno i supstrati za ove enzime ili se metabolišu u supstrate GST-aza što ukazuje na to da indukcija GST-aza predstavlja deo adaptivnog odgovora na hemijski stres izazvan elektrofilnim jedinjenjima.

Opisano je nekoliko genskih polimorfizama humanih GST-aza: homozigotne delecije za gene GSTM1 i GSTT1, specifične mutacije u egzonima gena za GSTM1, GSTP1, GSTT2 i GSTA1, a u slučaju GSTM3, wt alel GSTM3*A i mutirani GSTM3*B alel. Poslednja mutacija rezultuje stvaranjem sekvence koju prepoznaje transkripcioni faktor YY1, čime je izmenjena ne samo regulacija GSTM3 gena nego i GSTM1 gena (Rowe, et al., 1997). U slučaju tačkaste mutacije u egzonu 7 GSTM1 gena, utvrđeno je da je u pitanju pojedinačna nukleotidna promena "missens" tipa (534 G→C, odnosno 173 Lys→Asn), koja odgovara alelnim formama GSTM1*A i GSTM1*B i koja ne utiče na funkciju enzima (Widersten, et al., 1991).

GSTM1 gen je deo GST genske grupe klase M na poziciji 1p13.3. Sastoji se od 8 egzona, veličine od 36 do 112 baznih parova. GSTM1 se nalazi u regionu koji sadrži visoko homologne sekvence i ograničen je sa dva skoro identična regiona od po 4.200 baznih parova. Nulti alel nastaje homologom rekombinacijom levih i desnih ponovaka što rezultuje delecijom 16.000 baznih parova koja sadrži čitav GSTM1 gen (Slika 12).



Slika 12 - Strukturna lokalizacija GSTM suprefamilije

(preuzeto od Parl FF. Glutathione S-transferase and cancer risk. Cancer Letters. 221 123-129; 2005.)

GSTM1 gen biva precizno isečen ostavljajući susedne GSTM2 i GSTM5 gene intaktnim. Ovaj genotip se analizira upotrebom različitih PCR eseja dizajniranih za identifikaciju GSTM1 alela (Hamed, et al., 1992). GSTM1 $-/-$ genotip se utvrđuje na osnovu odsustva PCR produkta (od 215 baznih parova). Takvi ispitanici se označavaju kao individue sa nultim genotipom ("null type"), dok oni sa GSTM1 $+/+$ genotipom kao divljim tipom ("wild type"). Nedostatak ovakvog pristupa u analizi GSTM1 genotipa jeste u tome što nije moguće razlikovati homozigotne GSTM1 $+/+$ od heterozigotnih GSTM1 $+/-$ individua.

GSTT1 pripada teta klasi GST-aza, ima pet egzona i zajedno sa GSTM1 ima značajnu ulogu u humanoju karcinogenezi. Zavisno od etničke pripadnosti individua, delecioni polimorfizam GSTT1 subtipa ima populacionu učestalost od 10 do 52%. Ipak kod pripadnika bele populacije, učestalost polimorfizma je reda u odnosu na azijsku populaciju i iznosi od 13 do 26% (Garte, et al., 2001).

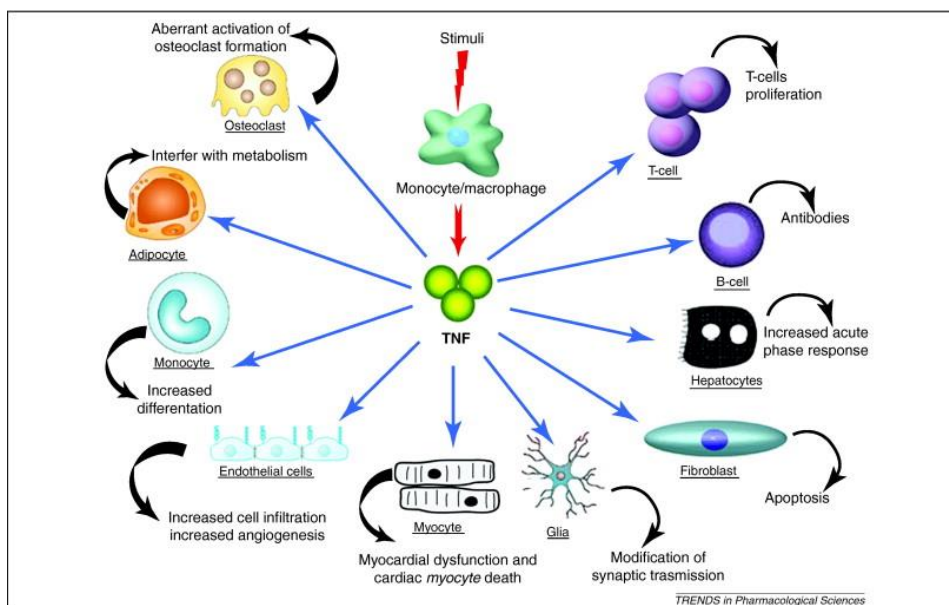
1.6. GEN ZA TNF- α – POLIMORFIZAM G308A (rs1800629)

Faktor nekroze tumora (eng. Tumor Necrosis Factor, TNF-alpha) ili kahektin je solubilni, multifunkcionalni protein koga izlučuju makrofagi, aktivirani T-limfociti, keratinociti i Langerhansove ćelije. Zbog mnogobrojnih bioloških uloga smatra se jednim od najvažnijih lokalnih humoralnih faktora u posredovanju i regulaciji imunoloških i upalnih reakcija (Jacob, 1992). Gen koji kodira TNF-alpha nalazi se na hromozomu 6p21.3. Sadrži oko 3.000 baznih parova i ima 4 egzona (Müller, et al., 1987). U ovom delu hromozoma nalazi se region glavnog kompleksa

histokompatibilnosti (eng. Major Histocompatibility Complex, MHC) koji odlikuje najveća gustina lokusa odgovornih za individualni imuni odgovor. Istovremeno, to je i region sa najvećim brojem polimorfizama u genomu (Hajeer and Hutchinson, 2000).

TNF se sintetiše u formi propeptida (pro-TNF), veličine 26 kilodaltona, a oslobađa se delovanjem TNF-konvertujućeg enzima (eng. TNF-Converting Enzyme, TACE). TACE takođe može da uklanja receptore za TNF sa površine ćelije. Na taj način, regulacijom broja membranskih receptornih proteina, vrši se kontrola biološke aktivnosti faktora nekroze tumora (po principu negativne povratne sprege). Po strukturi, faktor nekroze tumora je heterotrimerni protein molekulske mase od 17 kilodaltona, a ekspresija TNF-alpha podrazumeva regulaciju na nivou transkripcije, translacije i posttranslacione produkcije proteina (Kriegler, et al., 1988).

TNF igra važnu ulogu u regulaciji rasta i ćelijske diferencijacije, kao i u odgovoru na virusne, bakterijske, gljivične ili parazitske infekcije. Povećana ekspresija TNF gena ima ulogu u patogenezi mnogih poremećaja: autoimunih (multipla skleroza, reumatoidni artritis), alergijskih, rezistencije na insulin i drugih (Oppenheim, 2001). Iako je dokazan njegov antineoplastični efekat, TNF takođe može indukovati malignu transformaciju. Njega mogu proizvoditi tumor - infiltrirani makrofagi ili neki tipovi tumora (ovarijuma, kolorektalni, ezofagalni, karcinom prostate, mokraćne bešike i bubrega, melanoma, hematološki maligniteti) (Slika 13).



Slika 13 - Uloga TNF-alfa
(preuzeto od (Esposito and Cuzzocrea, 2011))

U in vitro modelima, niska doza TNF-alpha može dovesti do proliferacije maligno transformisanih ćelijskih linija. TNF-alpha takođe može da deluje kao autokrini faktor rasta tumora indukujući ćelijsko preživljavanje aktivacijom NF-kB, PI3K-PKB/Atk- i MAPK-zavisnih anti-apoptotskih, proliferativnih, odnosno puteva koji vode preživljavanju ćelije (Mocellin, et al., 2005).

U eksperimentima sa životinjama kojima je inaktiviran određeni gen (tzv. nokaut životinje), utvrđena je povećana incidenca razvoja karcinoma kod TNF^{+/+} životinja u odnosu na one koje su imale TNF^{-/-} genotip (Körner, et al., 2000). Ova rezistencija TNF^{-/-} životinja na hemijski indukovanu kancerogenezu može se povezati sa privremenim kašnjenjem aktivacije protein kinaze C (PKC) i transkripcionog faktora AP-1. Ovo kašnjenje utiče na ekspresiju gena za koje se zna da su uključeni u procese tumorigeneze.

Postoji i model po kome TNF može da dovede do oštećenja DNK i inhibicije DNK reparacije povećanom produkcijom genotoksičnih agenasa od strane ćelija kancera ili okolnih makrofaga. Studije na pacijentima obolelim od solidnih tumora ili hematoloških maligniteta pokazale su postojanje asocijacije između povišenog nivoa TNF-alfa u plazmi i lošeg kliničkog ishoda bolesti (Ferrajoli, et al., 2002, Michalaki, et al., 2004, Warzocha, et al., 1998).

Polimorfizmi u genu za TNF-alfa imaju veliki uticaj na produkciju ovog citokina (Hajeer i Hutchinson, 2000). U TNF genskom lokusu, pronađen je veliki broj SNP-ova i polimorfizama sa manjim brojem ponovaka. Njih ima kako u 5' regulatornim sekvencama, tako i u 3' nekodirajućim/kodirajućim sekvencama. Veliki broj studija pokazao je asocijaciju između polimorfizma jednog nukleotida u TNF-alfa genu i povišenom riziku za nastanak i razvoj različitih vrsta oboljenja. Jedan od češćih polimorfizama lokalizovan je na poziciji -308 G/A (u okviru promotorskog regiona) i dovodi se u vezu sa povećanim nivoom TNF-alfa kao i sa povećanim rizikom za oboljevanje od različitih karcinoma. .

Međutim, postoje i suprotni naučni stavovi koji ne nalaze vezu između -308 TNF-alfa polimorfizmom i rizikom od kancerogeneze i što objašnjavaju protektivnom ulogom druga dva polimorfizma (-238A i +857T).

1.7 GEN ZA TNF- α RECEPTORE – POLIMORFIZAM

TNF α -R1 A36G (rs767455) I TNF α -R2 T676G (rs1061622)

TNF-alfa ostvaruje biološke efekte u ćelijama preko molekula svrstanih u porodicu receptora za TNF. Najznačajniji receptori za TNF-alfa su:

1. TNF-R1 - CD120a ili p55/60 (veliĉine 55 kiloDaltona);
2. TNF-R2 - CD120b ili p75/80 (veliĉine 75 kiloDaltona).

Oni su deo grupe od preko 20 ĉlanova tzv.superfamilije TNF receptornih proteina. Imaju ulogu da prenose signale u ćeliju i mogu se svrstati u tri grupe. Jedna grupa receptora na svom citoplazmatskom repu sadrži takozvane domene smrti (engl. death domain-DD). Ovoj grupi receptora pripada TNF-R1 receptor.

TNF-R1 receptor prisutan je u većini tkiva (osim u eritrocitima i nestimulisanim limfocitima). Može biti aktiviran sa obe forme TNF-alfa (sa membranski vezanom ili sa solubilnom formom). TNF-R2 receptor se nalazi samo u ćelijama imunog sistema i aktivira ga membranski vezana forma TNF-alfa. Ova dva receptora ne poseduju enzimsku aktivnost, već signal prenose „regrutovanjem” drugih signalnih proteina. Na taj naĉin iniciraju signalizacione kaskade koje za cilj imaju zapoĉinjanje inflamatornog, proliferativnog ili antiapoptotskog odgovora ćelije.

TNF-alfa u najvećem broju sluĉajeva prenosi signal u ćeliju preko TNF-R1. U heterotrimernoj (aktivnoj) formi vezuje se za ekstracelularni domen receptora, inicirajući njegovu trimerizaciju. Na taj naĉin, sa intracelularnog DD receptora oslobađa se inhibitorni protein SODD (eng. Silencer Of Death Domains). Kada je oslobođen inhibitornog uticaja, dolazi do „regrutovanja” intracelularnih adaptornih proteina kao što su FADD (eng. Fas-Associated DD) i TRADD (eng. TNF-R Associated DD). Nakon TRADD vezivanja, tri signalna puta mogu biti inicirana (Gaur and Aggarwal, 2003):

1. Aktivacija NF- κ B: NF- κ B je heterodimerni transkripcioni faktor koji se translocira u nukleus i posreduje u sintezi velikog broja proteina koji imaju udela u ćelijskom preživljavanju, proliferaciji, inflamatornom odgovoru i stvaranju anti-apoptoznih faktora.

2. Indukcija signala smrti: TRADD vezuje FADD, koji onda regrutuje cistein proteazu kaspazu-8. Visoka koncentracija kaspaze-8 indukuje njegovu autoproteolitiĉku aktivaciju i naknadno cepanje efektorskih kaspaza, što vodi ćelijskoj apoptozi.

3. Aktivacija MAPK puta: Od tri glavne MAPK (eng. Mitogen Activated Protein Kinase) kaskade, TNF indukuje jaku aktivaciju stres-vezane JNK grupe. JNK se translocira u nukleus i aktivira transkripcione faktore kao što su c-Jun i ATF2. Ovaj signalni put učestvuje u ćelijskoj diferencijaciji, proliferaciji, i generalno ima proapoptotsko delovanje.

TNF-R1 dovodi do programirane ćelijske smrti samo pod određenim uslovima (npr. kada je blokirana sinteza proteina). Kod već razvijenih organizama, TNF-R1 mnogo češće dovodi do indukcije transkripcije i samim tim aktivacije inflamatornih gena (Locksley, et al., 2001). Genetički izmenjeni miševi, bez gena za TNF-R1, ispoljavaju veći poremećaj u proinflamatornom odgovoru u odnosu na one bez gena za TNF-R2. Time je pokazano da receptor TNF-R1 ima veći značaj za funkcionisanje TNF-alfa.

Kod zdravih osoba nivo serumskih receptora je stabilan i genetički regulisan. Porast nivoa cirkulišućih receptora zapažen je kod starijih osoba, što je povezano sa smanjenim antitumorskim i antiinfektivnim efektima TNF-alfa. Slična pojava uočena je i kod pacijenata sa autoimunim, infektivnim i malignim oboljenjima (Krajcik, et al., 2003).

Gen koji kodira sintezu TNF-R1 nalazi se na kratkom kraku hromozoma 12 (12p13.2), a gen za TNF-R2 na hromozomu 1, poziciji 1p36.2 (Baker, et al., 1991). U ovim genima identifikovani su brojni polimorfizmi koji su dovedeni u vezu sa pojavom različitih oboljenja. U promotoru gena za TNF-R1 identifikovano je nekoliko polimorfizama pojedinačnog nukleotida; kako u egzonu 1 (tiha supstitucija), tako i u intronima 2, 4, 6, 7 i 8 (Aksentijevich, et al., 2001). Gen za TNF-R2 u svom sastavu ima 10 egzona i 9 introna, a polimorfizmi su nađeni u egzonima 4, 6, 9 i 10 (Pantelidis, et al., 1999). Posebno su istraženi polimorfizmi na +36 A/G egzonu 1 za TNF-R1 i na +676 T/G egzonu 6 za TNF-R2. Ovi polimorfizmi se dovode u vezu sa različitim oboljenjima kao što su reumatoidni artritis, autoimune i infektivne bolesti (Buchs, et al., 2001, Dieudé, et al., 2004, Fabris, et al., 2002, Sashio, et al., 2002). Nađena je veza između specifičnih varijanti u TNF-R1 i R2 genima i prevremenih porođaja u crnačkoj populaciji SAD-a (Menon, et al., 2006), a povećana koncentracija TNF-R1 i R2 u makrofagima ustanovljena je kod obolelih od kancera jajnika i nekih hematopoetskih tumora (Warzocha, et al., 2000).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Utvrđiti da li polimorfizmi u genima MTHFR, GSTM1, TNF alfa, TNF alfa receptor 1 i TNF alfa receptor 2 predstavljaju faktore rizika za nastanak epitelnih tumora usne duplje.

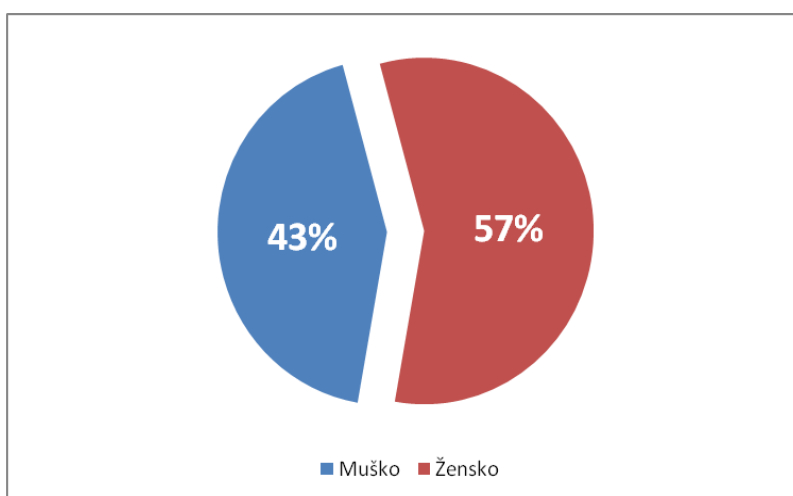
Da bi se ostvario postavljeni cilj, formulisani su sledeći zadaci:

- Odrediti kliničko-epidemiološke parametre pacijenata obolelih od epitelnih tumora usne duplje;
- Odrediti učestalosti alela i genotipova za polimorfizme pojedinačnog nukleotida (SNP) u sledećim genima: MTHFR (C677T), TNF α (G308A), TNF α - R1 (A36G), TNF α - R2 (T676G) u uzorku obolelih od odontogenog keratocističnog tumora i u zdravoj populaciji. Na osnovu logističke regresione analize utvrditi da li neki od pomenutih polimorfizama predstavlja faktor rizika za nastanak OKT.
- Odrediti učestalost GSTM1 i GSTM0 genotipa kod delecionog polimorfizma u GSTM genu u grupi obolelih od OKT i kontrolnoj grupi. Logističkom regresionom analizom utvrditi da li ovaj polimorfizam predstavlja faktor rizika za nastanak OKT.
- Odrediti učestalosti alela i genotipova za polimorfizme pojedinačnog nukleotida (SNP) u sledećim genima: MTHFR (C677T), TNF alfa (G308A), TNF α -R1(A36G), TNF α -R2 (T676G) u uzorku obolelih od planocelularnog karcinoma i u zdravoj populaciji. Na osnovu logističke regresione analize utvrditi da li neki od pomenutih polimorfizama predstavlja faktor rizika za nastanak OPK.
- Odrediti učestalost GSTM1/ GSTM0 i GSTT1/GSTT0 genotipa za delecioni polimorfizam u GSTM i GSTT genu u grupi obolelih od OPK i kontrolnoj grupi. Logističkom regresionom analizom utvrditi da li ovi polimorfizmi predstavljaju faktor rizika za nastanak OPK.

3. MATERIJAL I METODE

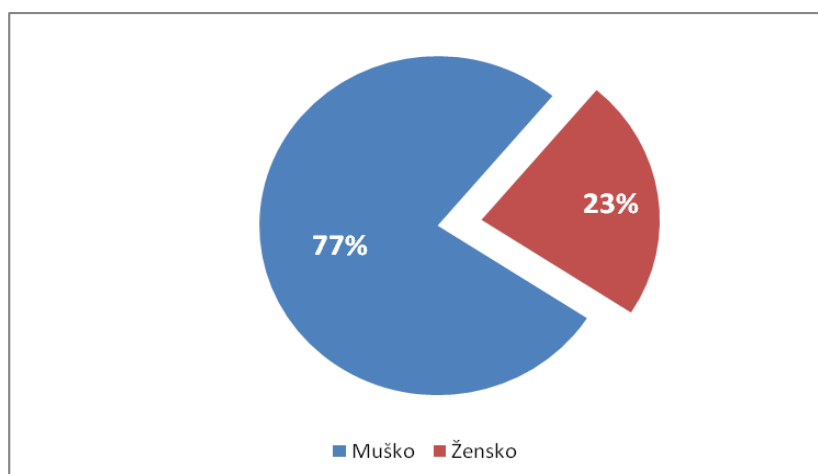
3.1. PACIJENTI I BIOLOŠKI MATERIJAL

Klinički deo istraživanja obavljen je na Klinici za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu u periodu od 2010. do 2014.godine. Prospektivnom studijom obuhvaćena je 71 osoba sa histopatološki verifikovanim odontogenim keratocističnim tumorom. Osoba muškog pola bilo je 43%, a ženskog pola 57% (Slika 14).



Slika 14 - Distribucija ispitanika po polu (OKT)

Drugi deo kliničkog istraživanja obavljen je na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu u periodu od 2007. do 2012.godine. Prospektivnom studijom obuhvaćeno je 78 ispitanika. Osoba muškog pola bilo je 60 (77%), a ženskog pola 18 (23%) (Slika 15).



Slika 15 - Distribucija ispitanika po polu (planocelularni karcinomi)

Studijom su obuhvaćeni samo pacijenti kod kojih je tumor bio primarno lokalizovan u usnoj duplji. Pacijenti kod kojih je tumor bio recidivantan, nisu uključivani u studiju. Kontrolnu grupu sačinjavao je uzorak od 182 zdrava ispitanika. Kriterijum za uključivanje u istraživanje bio je histopatološki verifikovan planocelularni karcinom usne duplje i histopatološka potvrda odsustva malignih ćelija u graničnom tkivu.

Tokom hiruškog zahvata ekscizije tumora, obaveza je da se, osim tumorskog tkiva, na histopatološku analizu šalje i granično tkivo sa ciljem procene radikalnosti zahvata.

Ovo makroskopski zdravo tkivo, nalazi se perifernije od linije resekcije tumora i obaveza je da se na uputnici za analizu tačno naznači lokalizacija uzetog tkiva. Kod većih neoplastičnih promena (T3 i T4), uobičajeno je da se granično tkivo uzima sa dve ili više lokalizacije. Dobra prognoza bolesti podrazumeva da je tumor uklonjen u celosti, a granična tkiva koju su poslata na histopatološku analizu zdrava. Za potrebe molekularno-genetičkog istraživanja ovog doktorata, isecan je deo makroskopski zdravog graničnog tkiva lokalizovan perifernije u odnosu na liniju resekcije.

Na početku studije, pacijentima - ispitanicima detaljno je objašnjen istraživački protokol, odobren od strane Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta u Beogradu (prilog 1). Po dobijanju pisane saglasnosti pacijenata (prilog 2), u istraživački karton ispitanika (prilog 3) unošeni su anamnestički podaci pacijenata. Podaci od značaja vezani za štetne navike pacijenta bili su konzumiranje duvana i žestokih alkoholnih pića. Od podataka koji su se odnosili na kliničke parametre posmatrana je lokalizacija tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stadijum bolesti. Nakon laboratorijskog istraživanja, u isti istraživački karton pacijenata unošeni su podaci vezani za dobijene rezultate genetičkog ispitivanja.

Obolelim ali i zdravim (kontrolnim) ispitanicima uziman je bris bukalne sluzokože pomoću koga je izolovana DNK. Molekularno-genetičko istraživanje sprovedeno je u Laboratoriji za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta. Osim izolacije totalne genomske DNK, vršena je i analiza polimorfizama gena za GSTM, MTHFR, TNF alfa i njegove receptore (TNF alfa R1 i TNF alfa R2) primenom PCR i RFLPs tehnika (engl.polymerase chain reaction; engl.restriction fragment length polymorphisms).

Statistička obrada podataka je urađena uz pomoć χ^2 kvadrat testa i Fisherovog testa za utvrđivanje razlika u distribuciji različitih alela i genotipova u grupi obolelih od odontogenog keratocističnog tumora/planocelularnog karcinoma usne duplje i zdravoj kontroli. Logističkom regresionom analizom utvrđena je povezanost genskih varijacija sa rizikom za nastanak epitelnih tumora usne duplje. Korišćen je statistički program SPSS 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

3.2. IZOLACIJA GENOMSKE DNK

Izolacija DNK iz tumorskog tkiva pacijenata sa OKT i planocelularnim karcinomima vršena je metodom isoljavanja (engl.salting out). Osnovne karakteristike ove metode su hemijska liza ćelija, prevođenje DNK u vodenu fazu, kao i hemijsko uklanjanje proteina i RNK molekula iz izolata.

Uzorci tkiva su postoperativno čuvani u zamrzivaču na -20°C . Nakon odmrzavanja, 0,2 do 1,0g tumorskog tkiva seckano je i drobljeno na ledu u avanu kako bi se tkivo prevelo u stanje finog pudera. Puferizovanoj smeši dodavana je odgovarajuća količina (na 100mg tkiva se doda 1,2 ml) digestivnog pufera (100mM NaCl, 100mM Tris-Cl pH=8.0, 25mM EDTA pH=8.0), 10% SDS (Na-dodecilsulfat) do koncentracije 0,5% i proteinaza K (1 mg/ml) do konačne koncentracije od 0,1mg/ml. Ovaj postupak ima za cilj oslobađanje DNK materijala iz nukleoproteinskog kompleksa, denaturaciju proteina, kao i inaktivaciju DNK-aza.

Ovako pripremljen uzorak je u dobro zatvorenoj plastičnoj epruveti inkubiran 12 časova, u vodenom kupatilu, na temperaturi od 50°C . Nakon 24 časa, uzorku je dodavana ista količina proteinaze K, a uzorak ponovo uveden u vodeno kupatilo, na temperaturu od 50°C , u trajanju od 60 minuta.

Posle obavljene digestije, DNK je ekstrahovana dodavanjem iste zapremine, ranije pripremljene mešavine, ekvilibrisanog fenola/hloroforma/izoamilalkohola (25:24:1) i centrifugiranjem 10 minuta na 10.000 obrtaja u minuti. Ekstrahovanje DNK sa mešavinom fenol/hloroform/izomilalkohol ponavljano je nekoliko puta sve do iščezavanja belog proteinskog precipitata u interfazi. Uklanjanje suvišnog fenola postizano je dodavanjem mešavine hloroforma i izoamilalkohola (24:1; u istoj zapremini) i centrifugiranjem na 10.000 obrtaja u minuti (10 minuta). Iz dobijenog

vodenog rastvora DNK je precipitirana dodavanjem 1/10V 7.5M amonijum acetata i 2.5-3.0 zapremine hladnog 96% etanola. Nataložena DNK namotavana je na zatopljenu pipetu, dobro isprana u hladnom 70% etanolu i rastvarana u odgovarajućoj zapremini TE pufera pH vrednosti 8.0 (0.1M Tris-Cl pH =8.0 i 0,01 M EDTA pH = 8.0).

Izolacija DNK zdravih ispitanika kontrolne grupe vršena je ekstrakcijom iz brisa bukalne sluzokože. U tu svrhu korišćen je QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) set po uputstvu i preporuci proizvođača.

3.3. AMPLIFIKACIJA DNK FRAGMENTA (PCR - LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE)

Osnovni princip lančane reakcije polimeraze (engl.Polymerase chain reaction – PCR) je amplifikacija (umnožavanje) segmenata DNK molekula. Suštinski ovaj proces predstavlja imitaciju replikacije koji se normalno odigrava u živim organizmima. Da bi se ostvarila selektivna amplifikacija neophodno je prethodno poznavati ciljanu DNK sekvencu, jer je neophodno konstruisati dva oligonukleotidna fragmenta (dužine oko 15-20 nukleotida) koji će ograničiti region ciljane DNK. Ovi nukleotidi nazivaju se prajmeri i dodaju se denaturisanoj DNK. Nakon ostvarivanja uslova za specifičnu hibridizaciju, vezuju se za komplementarne sekvence. Prajmeri su konstruisani tako da u uslovima neophodnim za sintezu DNK i u prisustvu termostabilne DNK polimeraze, iniciraju sintezu novih DNK lanaca. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina je određena rastojanjem između sekvenci koje prajmeri „prepoznaju”. Nesumljivo je da je otkriće termostabilnih DNK polimeraza bilo presudno za rutinsku upotrebu PCR metode koja je danas nezamenljiva u molekularnoj biologiji.

PCR se odvija u mikrotubama (0,2 – 0,5ml) kroz precizne, kontrolisane ciklične promene temperature. Ovo za posledicu ima umnožavanje tačno određenog segmenta DNK (gena ili dela gena), milion ili milijardu puta, nakon 30-45 odigranih ciklusa. Svaki ciklus u PCR proceduri se sastoji od tri koraka:

1. denaturacija DNK matrice – raskidanje vodoničnih veza između dva komplementarna lanca DNK (obično na 93-95°C za humanu genomsku DNK).

2. hibridizacija – uspostavljanje vodoničnih veza između prajmera i matrice (na temperaturama oko 50-70°C), pod uslovima visoke selektivnosti.
3. elongacija prajmera (sinteza DNK) – ugradnja nukleotida na 3' krajevima prajmera, katalizovana termostabilnom DNK polimerazom.

Odgovarajuće termostabilne DNK polimeraze izolovane su iz mikroorganizama koji su prilagođeni visokim temperaturama svog prirodnog okruženja. Najčešće korišćena termostabilna DNK polimeraza je Taq polimeraza poreklom iz bakterije *Thermus aquaticus*. Odlikuje se enzimskom stabilnošću na 94 °C, a optimalna radna temperatura joj je 80°C.

PCR je lančana reakcija zato što svaki novosintetisani lanac DNK postaje matrica za sintezu novih DNK lanaca u narednom ciklusu. Zahvaljujući ovome, za približno 2 sata dobija se $10^6 - 10^9$ kopija određenog DNK fragmenta. Ovako velika količina umnoženog amplifikata može se vizuelizovati nakon elektroforeze kao traka definisane dužine (Slika 16).



Slika 16 - Aparat za PCR (marke: peqSTAR 2X Thermocycler; peqLab)

3.4. ANALIZA RESTRIKCIONIH FRAGMENTA PCR PRODUKTA

Mnogobrojna svojstva enzima restrikcioni endonukleaza doprinela su njihovoj univerzalnoj upotrebi u genetičkim istraživanjima. Tu primarno spada sposobnost enzima da prepoznaju DNK sekvencu i da sa visokom specifičnošću u tačno definisanim tačkama unutar ili blizu date sekvence iseku molekula DNK. Navedene osobine, kao i njihova stabilnost i visoka aktivnost u "in vitro" uslovima, uticali su da se ulože veliki napor u otkrivanju novih enzima. Restrikciona analiza, jedna od brojnih tehnika zasnovanih na korišćenju ovih enzima, ima primenu u detekciji polimorfizama restrikcioni mesta (engl. Restriction Fragment Length Polymorphisms - RFLP), kao genetičkih markera u istraživanjima. Savremeni pristup u restrikcioni analizi podrazumeva amplifikaciju specifične sekvence (PCR) u kojoj se očekuje prisustvo mutacije, a potom digestiju PCR amplifikovanih DNK fragmenata (RFLP). Nakon obavljene restrikcije vrši se provera veličine produkata digestije na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu.

3.5. GEL ELEKTROFOREZA

Za analizu PCR produkata koristi se gel elektroforeza. Biomolekuli (proteini, DNK, RNK) međusobno se razlikuju po svojoj specifičnoj konformaciji, veličini, količini i tipu naelektrisanja. Ove karakteristike su uzrok različite pokretljivosti polunukleotidnih fragmenata pod dejstvom električne struje. Zahvaljujući različitoj pokretljivosti moguće je njihovo razdvajanje na gelu. Fosfatne grupe sa spoljašnje okosnice DNK nosioci su negativnog naelektrisanja pa se zato, u električnom polju, DNK fragmenti kreću od katode ka anodi.

Uspešnost PCR reakcije proverava se primenom kontinualne elektroforeze na malom 8% poliakrilamidnom gelu. Elektroforeza se izvodi u 1x TBE puferu, pri naponu od 220V u trajanju od 90 minuta.

Osmopostotni poliakrilamidni gel se sastoji od 36ml vode; 1,2 μ l TBE; 1,2 μ l AA; 42 μ l APS i 7,8 μ l TEMED. Nastaje polimerizacijom akrilamida i bis-akrilamida. Inicijaciju polimerizacije vrši TEMED (tetrametiletildiamin), ulogu katalizatora ima APS (amonijum-persulfat), dok TBE (Tris, borna kiselina i EDTA) deluje kao pufer.

Prisustvo specifičnih traka, koje odgovaraju PCR produktima, utvrđeno je bojenjem etidijum-bromidom i posmatranjem na transluminatoru.

Laboratorijski postupci u izvođenju akrilamidne elektroforeze imaju sledeći redosled:

1. Priprema gela određene koncentracije (zavisno od dužine fragmenata koje je potrebno razdvojiti/vizuelizovati);
2. Priprema ploča i nalivanje gela;
3. Nakon vezivanja gela, ploče se postavljaju u aparaturu za elektroforezu (Slika 17);
4. Nalivanje uzoraka u bunare u gelu;
5. Aktivacija aparata za elektroforezu;
6. Bojenje gela etidijum-bromidom nakon završene elektroforeze;
7. Vizuelizacija razdvojenih fragmenata u transiluminatoru (Slika 18).



Slika 17 - Oprema za gel elektroforezu



Slika 18 - Transiluminator

3.6. PCR AMPLIFIKACIJA MTHFR GENA OKO POZICIJE +677

U PCR reakciji korišćeni su prajmeri koji ograničavaju region od 198 baznih parova zajedno sa 677 C>T polimorfnim mestom MTHFR gena. Reakcionu smešu od 25 µl činili su:

- Voda – 17 µl;
- 10 x PCR pufer – 2.5 µl;
- MgCl₂ katalizator (25 mM) – 2 µl;
- dNTP (10mM) – 1 µl
- Prajmer1: 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' – 0.5 µl;
- Prajmer 2 : 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' – 0.5 µl;
- Taq polimeraza – 0.2 µl;
- DNK uzorak – 3 µl.

Uslovi PCR reakcije bili su sledeći:

- Početna denaturacija DNK na 94 °C, 5 min ;
- 40 ciklusa od tri koraka: 1.denaturacija DNK na 94 °C, 1min;
2.vezivanje prajmera na 60 °C, 1min;
3.elongacija prajmera na 72 °C, 1min;
- Završna ekstenzija na 72 °C, 5 min.

Uspešnost amplifikacije proveravana je na sledeći način: Nakon nalivanja po 8 µl od svakog ispitivanog uzorka u bunariće 8% poliakrilamidnog gela, urađena je elektroforeza pri naponu od 220V. Po završenoj elektroforezi, gelovi su bojani rastvorom etidijum-bromida u trajanju od 5 minuta, a zatim posmatrani na transiluminatoru. Amplifikati dužine 198 bp vizuelizovani su kao specifične trake na gelu.

3.7. RESTRIKCIONI POSTUPAK U ANALIZI POLIMORFIZMA MTHFR GENA NA POZICIJI +677

Restrikcija PCR produkata vršena je enzimom Hinf I. On prepoznaje niz nukleotida C T n A G i vrši zasecanje DNK lanca na mestu T. U slučaju postojanja mutacije, dobijaju se dva nukleotidna fragmenta dužine 175 bp i 23 bp. Restrikcija enzimom Hinf I odvija se u restrikcionalnoj smeši koja sadrži:

- PCR produkt – 4 - 7 μ l ;
- Enzim Hinf I (15 U) – 1.5 μ l ;
- 10 x pufer R+ = 1.5 μ l ;
- Voda – do 15 μ l .

Inkubacija restrikcione smeše trajala je 12 sati na 37 °C. Analiza produkata digestije usledila je nakon elektroforeze u 8% poliakrilamidnom gelu imajući u vidu da:

- Homozigoti genotipa MTHFR 677 CC (bez mutacije, odnosno divlji tipovi gena) poseduju fragment dužine 198 bp;
- Heterozigoti genotipa MTHFR 677 CT poseduju tri fragmenta – 198 bp, 175 bp i 23 bp. Najkraći fragment dužine 23 bp tokom elektroforeze „izade“ sa gela, tako da se ne uočava na transiluminatoru;
- Homozigoti genotipa MTHFR 677 TT (mutirani homozigoti) poseduju fragmente dužine 175 bp i 23 bp, ali se kao i kod heterozigota kraći fragmenti ne uočavaju na gelu.

Na osnovu ovih determinanti, posmatranjem na transiluminatoru, lako su se definisali genotipovi za MTHFR C677T polimorfizam.

3.8. PCR AMPLIFIKACIJA GSTM1 GENA

Amplifikacija željenog GSTM1 gena je rađena u 25 μ l reakcione smeše upotrebom PCR aparata. Reakcionu smešu činili su:

- Voda – 13 μ l;
- 10 x PCR pufer – 2.5 μ l;
- MgCl₂ katalizator (25 mM) – 2 μ l;
- dNTP (10mM) – 0.5 μ l;
- Prajmer 1 (GSTM1):5' GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C 3'–0.5 μ l;
- Prajmer 2 (GSTM1):5' GTT GGC CTC AAA TAT ACG GTG G 3'–0.5 μ l;
- Prajmer 3 (GSTT1) – 0.5 μ l;
- Prajmer 4 (GSTT1) – 0.5 μ l;
- Taq polimeraza – 0.2 μ l;
- DNK uzorak – 5 μ l.

Uslovi PCR reakcije bili su sledeći:

- Početna denaturacija DNK na 94 °C, 5 min ;
- 35 ciklusa od tri koraka: 1.denaturacija DNK na 94 °C, 2 min;
 2.vezivanje prajmera na 59 °C, 1min;
 3.elongacija prajmera na 72 °C, 1min;
- Završna ekstenzija na 72 °C, 3 min.

Uspešnost amplifikacije proveravana je na sledeći način: Nakon nalivanja ispitivanih uzoraka u bunariće 8% poliakrilamidnog gela, urađena je elektroforeza pri naponu od 220V. Po završenoj elektroforezi, gelovi su bojeni rastvorom etidijum-bromida u trajanju od 5 minuta, a zatim posmatrani na transiluminatoru.

Analizom dobijenih produkata bilo je moguće konstatovati prisustvo ili odsustvo delecije GSTM1 gena. Prisustvo GSTM1 trake od 215 bp ukazivalo je na postojanje divljeg tipa gena (nemutiranog tipa, GSTM +/+, ili +/-), dok je odsustvo ukazivalo na deleciju (GSTM -/-, odnosno nulti genotip GSTM0). U cilju diferencijacije delecije GSTM1 gena od neuspeha PCR reakcije, simultano je vršena i analiza kontrolnog gena.

3.9. PCR AMPLIFIKACIJA TNF ALFA GENA NA POZICIJI +308

U PCR reakciji korišćeni su prajmeri koji ograničavaju region od 117 baznih parova zajedno sa +308 G>A polimorfnim mestom TNF alfa gena. Reakcionu smešu od 25 µl činili su:

- Voda – 18 µl;
- 10 x PCR pufer – 2.5 µl;
- MgCl₂ katalizator (25 mM) – 2 µl;
- dNTP (10mM) – 1 µl;
- Prajmer1: 5' - AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT -3' – 0.25 µl;
- Prajmer 2 : 5' - ACA CTC CCC ATC CTCCT GCT -3' – 0.25 µl;
- Taq polimeraza – 0.2 µl;
- DNK uzorak – 3 µl.

Uslovi PCR reakcije bili su sledeći:

- Početna denaturacija DNK na 94 °C, 3 min ;
- 40 ciklusa od tri koraka: 1.denaturacija DNK na 94 °C, 1min;
 2.vezivanje prajmera na 59 °C, 1min;
 3.elongacija prajmera na 72 °C, 1min;
- Završna ekstenzija na 72 °C, 7 min.

Uspešnost amplifikacije proveravana je na sledeći način: Nakon nalivanja po 8 µl od svakog ispitivanog uzorka u bunariće 8% poliakrilamidnog gela, izvršena je elektroforeza pri naponu od 220V. Po završenoj elektroforezi, gelovi su bojani rastvorom etidijum-bromida u trajanju od 5 minuta, a zatim postmatrani na transiluminatoru. Amplifikati dužine 117 bp vizuelizovani su kao specifične trake na gelu.

3.10. RESTRIKCIONI POSTUPAK U ANALIZI POLIMORFIZMA TNF ALFA GENA NA POZICIJI +308

Restrikcija PCR produkata vršena je enzimom Nco I (Fermentas®). On prepoznaje niz nukleotida 5'...C ↓ CATG G...3' i u slučaju ne postojanja mutacije vrši zasecanje DNK lanca čime se dobijaju dva fragmenta dužine 97 bp i 20 bp. Restrikcija enzimom Nco I odvija se u restrikcionalnoj smeši koja sadrži:

- PCR produkt – 13 µl ;
- Enzim Nco I – 0.2 µl ;
- Pufer – 2 µl ;
- Voda – 5 µl .

Inkubacija restrikcione smeše trajala je 12 sati na 37 °C. Analiza produkata digestije usledila je nakon elektroforeze u 8% poliakrilamidnom gelu imajući u vidu da:

- Homozigoti genotipa TNF ALFA 308 GG (bez mutacije, odnosno divlji tipovi gena) poseduju fragment dužine 99 bp i fragment dužine 20 bp. Kraći fragmenti dužine 20 bp tokom elektroforeze „izlaze“ iz gela, tako da se ne uočavaju na transiluminatoru;
- Heterozigoti genotipa TNF ALFA 308 GA (heterozigoti) poseduju tri fragmenta – 117 bp, 97 bp i 20 bp. Najkraći fragment dužine 20 bp tokom elektroforeze „izade“ iz gela, tako da se ne uočava na transiluminatoru;
- Homozigoti genotipa TNF ALFA 308 AA (mutirani homozigoti) poseduju fragment dužine 117 bp.

Na osnovu ovih determinanti, posmatranjem na transiluminatoru, lako su se definisali genotipovi za +308 TNF alfa polimorfizam.

3.11. PCR AMPLIFIKACIJA TNF α RECEPTORA 1 NA POZICIJI +36

U PCR reakciji korišćeni su prajmeri koji ograničavaju region od 183 baznih parova zajedno sa 36 A>G polimorfnim mestom TNF receptor 1 gena. Reakcionu smešu od 25 μ l činili su:

- Voda – 20 μ l;
- 10 x PCR pufer – 2.5 μ l;
- MgCl₂ katalizator (25 mM) – 2 μ l;
- dNTP (10mM) – 0.5 μ l;
- Prajmer1: 5'-GAC CCC AAA TGG GGG AGT GAG AGG -3' – 0.15 μ l;
- Prajmer 2 : 5'- ACC AGG CCC GGG CAG GAG AG - 3' – 0.15 μ l;
- Taq polimeraza – 0.1 μ l;
- DNK uzorak – 3 μ l.

Uslovi PCR reakcije bili su sledeći:

- Početna denaturacija DNK na 95 °C, 3 min ;
- 35 ciklusa od tri koraka: 1.denaturacija DNK na 94 °C, 1min;
 2.vezivanje prajmera na 65 °C, 1min;
 3.elongacija prajmera na 72 °C, 1min;
- Završna ekstenzija na 72 °C, 7 min.

Uspešnost amplifikacije proveravana je na sledeći način: Nakon nalivanja po 8 μ l od svakog ispitivanog uzorka u bunariće 8% poliakrilamidnog gela, aktiviran je aparat za elektroforezu pri naponu od 220V. Po završenoj elektroforezi, gelovi su bojani rastvorom etidijum-bromida u trajanju od 5 minuta, a zatim postmatrani u transiluminatoru. Amplifikati dužine 183 bp vizuelizovani su kao specifične trake na gelu.

3.12. RESTRIKCIONI POSTUPAK U ANALIZI POLIMORFIZMA TNF RECEPTOR 1 GENA NA POZICIJI +36

Restrikcija PCR produkata vršena je enzimom MspA 1I. On prepoznaje niz nukleotida 5'...CACG↓ CGTG...3' i u slučaju postojanja mutacije vrši zasecanje DNK lanca čime se dobijaju dva fragmenta dužine 97 bp i 20 bp. Restrikcija enzimom MspA 1I odvija se u restrikcionalnoj smeši koja sadrži:

- PCR produkt – 13 μ l ;
- Enzim MspA 1I – 0.2 μ l ;
- Pufer (multicor) – 2 μ l ;
- BSA – 0.2 μ l ;
- Voda – 5 μ l .

Inkubacija restrikcione smeše trajala je 3 sata na 37 °C. Analiza produkata digestije usledila je nakon elektroforeze u 8% poliakrilamidnom gelu imajući u vidu da:

- Homozigoti genotipa TNF α -R1 36 AA (bez mutacije, odnosno divlji tipovi gena) poseduju fragment dužine 183 bp;
- Heterozigoti genotipa TNF α -R1 36 AG (heterozigoti) poseduju tri fragmenta – 183 bp, 108 bp i 75 bp;
- Homozigoti genotipa TNF α -R1 36 GG (mutirani homozigoti) poseduju fragmente dužine 108 bp i 75 bp.

Na osnovu ovih determinanti, posmatranjem na transiluminatoru, lako su se definisali genotipovi za +36 TNF α -R1 polimorfizam.

3.13. PCR AMPLIFIKACIJA TNF α RECEPTORA 2 NA POZICIJI +676

U PCR reakciji korišćeni su prajmeri koji ograničavaju region od 242 baznih parova zajedno sa 676 T>G polimorfnim mestom TNF receptor 2 gena. Reakcionu smesu od 25 μ l činili su:

- Voda – 16 μ l;
- 10 x PCR pufer – 2.5 μ l;
- MgCl₂ katalizator (25 mM) – 3.5 μ l;
- dNTP (10mM) – 1 μ l;
- Prajmer1: 5' - TTC TGG AGT TGG CTG CGT GT - 3' – 0.25 μ l;
- Prajmer 2 : 5' - ACT CTC CTA TCC TGC CTG CT -3' – 0.25 μ l;
- Taq polimeraza – 0.15 μ l;
- DNK uzorak – 3 μ l.

Uslovi PCR reakcije bili su sledeći:

- Početna denaturacija DNK na 95 °C, 3 min ;
- 35 ciklusa od tri koraka: 1.denaturacija DNK na 94 °C, 1min;
 2.vezivanje prajmera na 58 °C, 1min;
 3.elongacija prajmera na 72 °C, 1min;
- Završna ekstenzija na 72 °C, 7 min.

Uspešnost amplifikacije proveravana je na sledeći način: Nakon nalivanja po 8 μ l od svakog ispitivanog uzorka u bunariće 8% poliakrilamidnog gela, urađena je elektroforeza pri naponu od 220V. Po završenoj elektroforezi, gelovi su bojeni rastvorom etidijum-bromida u trajanju od 5 minuta, a zatim postmatrani na transiluminatoru. Amplifikati dužine 242 bp vizuelizovani su kao specifične trake na gelu.

3.14. RESTRIKCIONI POSTUPAK U ANALIZI POLIMORFIZMA TNF RECEPTOR 2 GENA NA POZICIJI +676

Restrikcija PCR produkata vršena je enzimom Hin 1II. On prepoznaje niz nukleotida 5'...CATG↓...3' i u slučaju ne postojanja mutacije vrši zasecanje DNK lanca čime se dobijaju dva fragmenta dužine 134 bp i 108 bp. Restrikcija enzimom Hin 1II odvija se u restrikcionalnoj smeši koja sadrži:

- PCR produkt – 15 μ l ;
- Enzim Hin 1II – 0.3 μ l ;
- Pufer (multicor) – 2 μ l ;
- Voda – 3 μ l .

Inkubacija restrikcione smeše trajala je 12 sati na 37 °C. Analiza produkata digestije usledila je nakon elektroforeze u 8% poliakrilamidnom gelu imajući u vidu da:

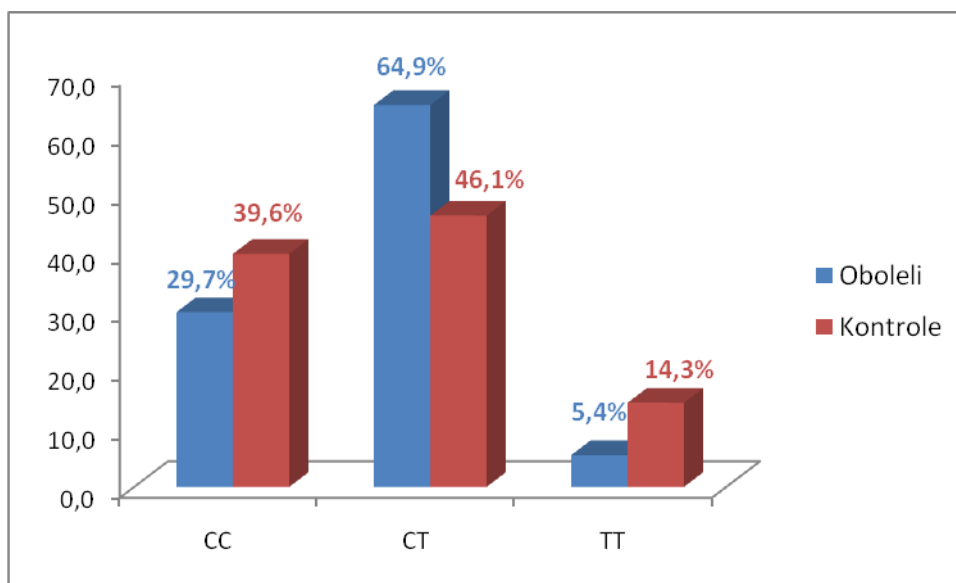
- Homozigoti genotipa TNF α -R2 676 TT (bez mutacije, odnosno divlji tipovi gena) poseduju fragmente dužine 134 bp i 108 bp;
- Heterozigoti genotipa TNF α -R2 676 TG (heterozigoti) poseduju tri fragmenta – 242 bp, 134 bp i 108 bp;
- Homozigoti genotipa TNF α -R2 676 GG (mutirani homozigoti) poseduju fragment dužine 242 bp.

Na osnovu ovih determinanti, posmatranjem u transiluminatoru, lako su se definisali genotipovi za +676 TNF α -R2 polimorfizam.

4. REZULTATI

4.1. ODONTOGENI KERATOCISTIČKI TUMOR – GENOTIPIZACIJA

Rezultati genotipizacije pacijenata obolelih od OKT usne duplje za MTHFR poziciju 677 prikazani su na slici broj 19.



Slika 19 – Učestalost MTHFR genotipova u grupama

Divlji, nemutirani, tip gena (CC) bio je prisutan kod samo 5% obolelih ispitanika, dok je mutaciju gena u homozigotnom ili heterozigotnom obliku imalo oko 95% obolelih. Slična distribucija mutiranih alela primećena je i u grupi zdravih ispitanika. Hi-kvadrat testom je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipova među grupama (Tabela 1).

Tabela 1 - Učestalost genotipova za MTHFR 677 gen u okviru grupa

MTHFR 677	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	p
CC	11 (29.7%)	163 (39.6%)	0.693
CT	24 (64.9%)	190 (46.1%)	
TT	2 (5.4%)	59 (14.3%)	

*Statistički značajna razlika; p - Hi kvadrat test

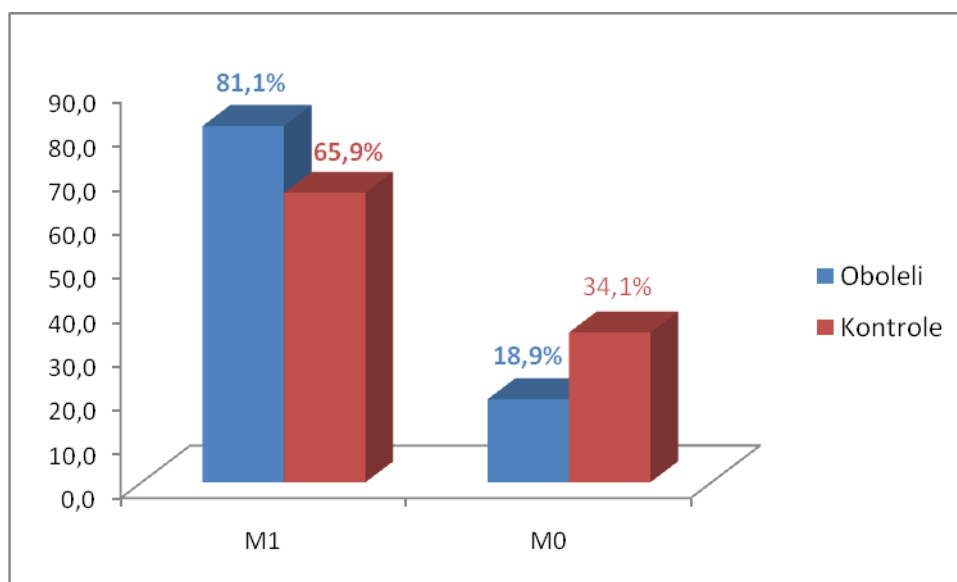
Rezultati logističke regresione analize pokazuju da različite varijante MTHFR gena ne utiču na predispoziciju za nastanak OKT (Tabela 2).

Tabela 2 - Polimorfizam gena za MTHFR 677 i rizik za nastanak OKT, logistička regresiona analiza

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	OR	95% CI	p
C	46 (62.2%)	516 (62.6%)	1.00	Reference	-
T	28 (37.8%)	308 (37.4%)	1.02	0.62-1.67	0.515
CC	11 (29.7%)	163 (39.6%)	1.00	Reference	-
CT	24 (64.9%)	190 (46.1%)	1.87	0.89-3.94	0.07
TT	2 (5.4%)	59 (14.3%)	0.50	0.108-2.33	0.297
CT+TT	26 (74.3%)	249 (60.4%)	1.50	0.74-3.21	0.158

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

Rezultati genotipizacije pacijenata obolelih od OKT usne duplje za GSTM1 gen prikazani su na slici broj 20.



Slika 20 - Učestalost GSTM1 genotipova u grupama

Divlji, nemutirani, tip gena bio je prisutan kod 81% obolelih ispitanika, dok je mutaciju gena ispoljenu u vidu delecije imalo 19% obolelih. U grupi zdravih ispitanika,

34% individua imalo je mutaciju genu. Hi-kvadrat testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipova među grupama (Tabela 3).

Tabela 3 - Učestalost genotipova za GSTM1 gen u okviru grupa

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	p
M1	30 (81.1%)	120 (65.9%)	*0.049
M0	7 (18.9%)	62 (34.1%)	

*Statistički značajna razlika; p - Hi kvadrat test

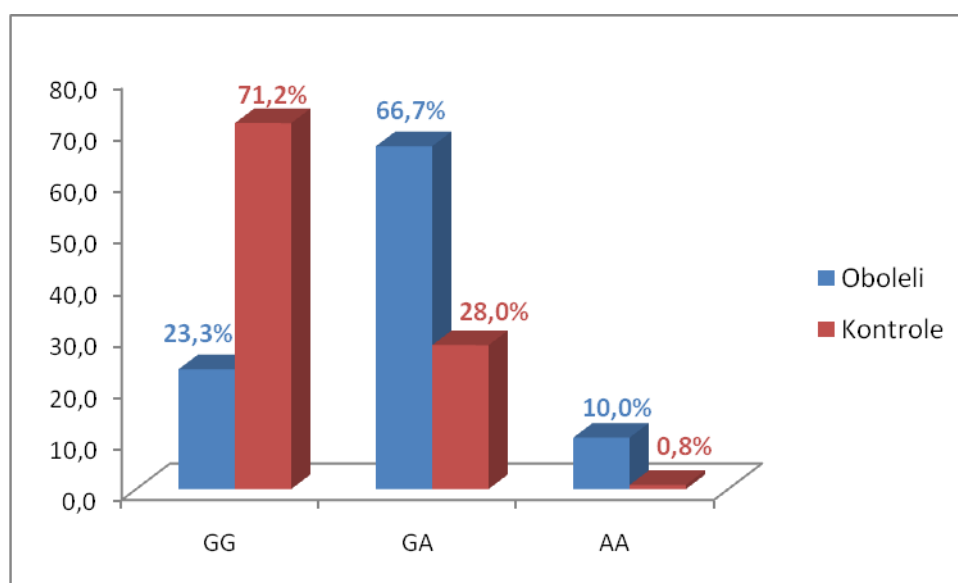
Rezultati logističke regresione analize pokazuju da različite varijante GSTM1 gena utiču na predispoziciju za nastanak OKT. GSTM0 genotip ima protektivni efekat za nastanak ovog epitelnog tumora. (Tabela 4).

Tabela 4 - GSTM1 distribucija genotipova u oboleloj i kontrolnoj grupi

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	OR	95% CI	p
M1 (+/+, +/-)	30 (81.1%)	120 (65.9%)	1.00	Reference	*0.049
M0 (-/-)	7 (18.9%)	62 (34.1%)	0.45	0.18-1.08	

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

Rezultati genotipizacije pacijenata obolelih od OKT usne duplje za TNF alfa gen prikazani su na slici broj 21.



Slika 21 - Učestalost TNF alfa genotipova u grupama

Divlji, nemutirani, tip gena (GG) bio je prisutan kod samo 23% ispitanika, dok je mutaciju gena u homo ili heterozigotnom obliku imalo 77% obolelih. U kontrolnoj grupi, mutiran alel bio je prisutan kod 29% ispitanika. Hi-kvadrat testom utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u zastupljenosti genotipova među grupama (tabela 5).

Tabela 5 - Učestalost genotipova za TNF alfa gen u okviru grupa

TNF alfa	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	p
GG	14 (23.3%)	89 (71.2%)	<0.001*
GA	40 (66.7%)	35 (28%)	
AA	6 (10%)	1 (0.8%)	
GA+AA	46 (76.7%)	36 (28.8%)	<0.001*

*Statistički značajna razlika; p - Hi kvadrat test

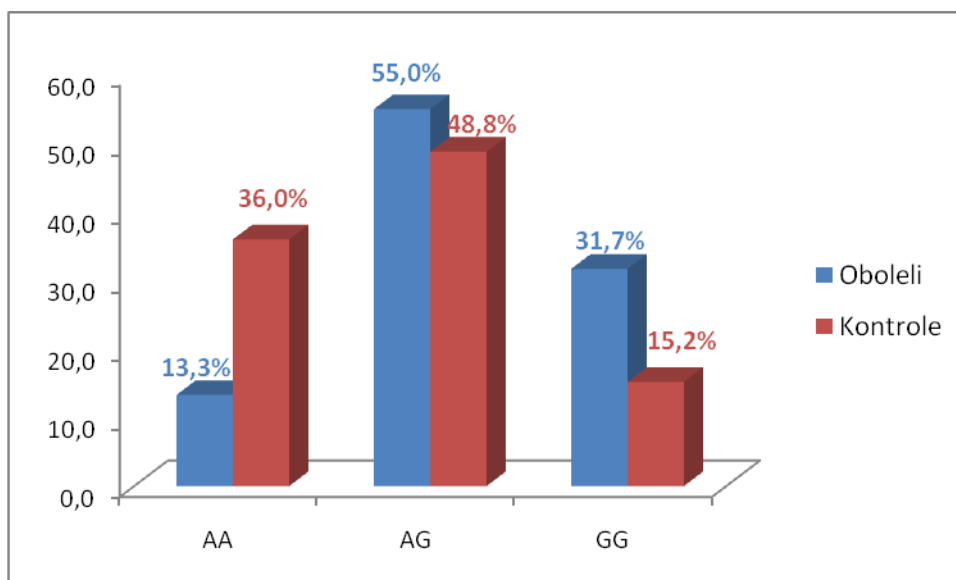
Rezultati logističke regresione analize pokazuju da različite varijante TNF alfa gena značajno utiču na predispoziciju za nastanak OKT (Tabela 6). Nosioци mutiranog A alela imaju 4,4 puta veći rizik za oboljevanje od OKT. Kod mutiranih homozigota (AA), rizik za oboljevanje od ove oralne neoplazme je 38 puta veći što se pokazalo kao statistički značajno.

Tabela 6 - Polimorfizam gena za TNF alfa i rizik za nastanak OKT, logistička regresiona analiza

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	OR	95% CI	p
G	68 (57%)	213 (85%)	1.00	Reference	-
A	52 (43%)	37 (15%)	4.40	2.66-7.27	<0.001*
GG	14 (23.3%)	89 (71.2%)	1.00	Reference	-
GA	40 (66.7%)	35 (28%)	7.27	3.52-14.98	<0.001*
AA	6 (10%)	1 (0.8%)	38.14	4.27-341.0	0.001*
GA+AA	46 (76.7%)	36 (28.8%)	4.70	0.54-40.78	<0.001*

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

Rezultati genotipizacije pacijenata obolelih od OKT usne duplje za TNF alfa R1 gen prikazani su na slici broj 22.



Slika 22 - Učestalost TNF alfa R1 genotipova u grupama

Divlji, nemutirani, tip gena (AA) bio je prisutan kod 13% obolelih ispitanika, dok je mutaciju gena u homo ili heterozigotnom obliku imalo 87% obolelih. U kontrolnoj grupi, mutirani alel bio je prisutan kod 65% ispitanika. Hi-kvadrat testom utvrđeno je postojanje visoke statistički značajne razlike u zastupljenosti genotipova među grupama ispitanika (tabela 7).

Tabela 7 - Učestalost genotipova za TNF alfa R1 gen u okviru grupa

TNF alfa R1	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	p
AA	8 (13.3%)	45 (36%)	0.001*
AG	33 (55%)	61 (48.8%)	
GG	19 (31.7%)	19 (15.2%)	
AG+GG	52 (86.7%)	80 (64.0%)	0.001*

*Statistički značajna razlika; p - Hi kvadrat test

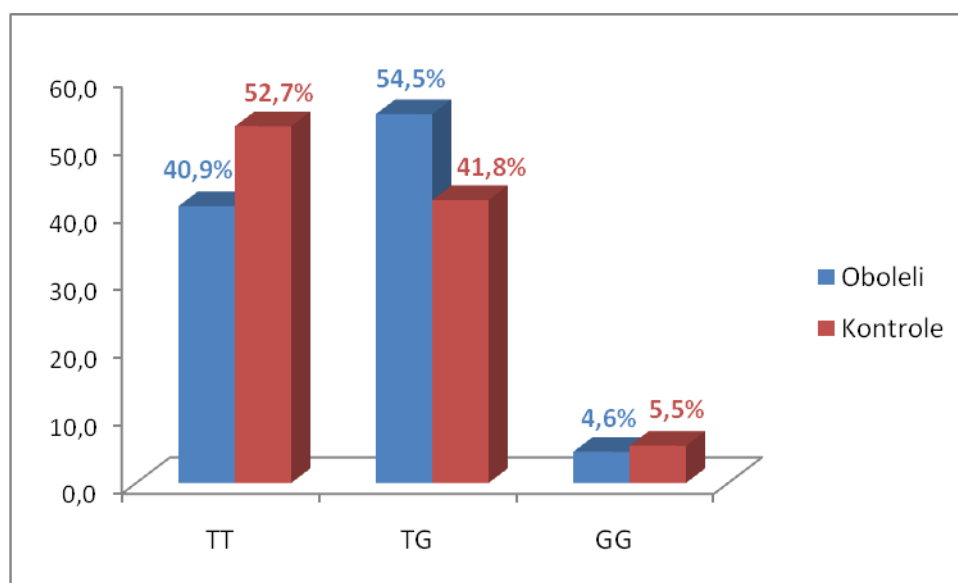
Rezultati logističke regresione analize pokazuju da različite varijante TNF alfa R1 gena izrazito utiču na predispoziciju za nastanak OKT (Tabela 8). Nosioci mutiranog G alela imaju duplo veći rizik za oboljevanje. U homozigotnoj mutiranoj alelnoj formi, rizik je 5,6 puta veći što se pokazalo kao statistički značajno ($p=0.002$).

Tabela 8 - Polimorfizam gena za TNF alfa R1 i rizik za nastanak OKT, logistička regresiona analiza

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	OR	95% CI	p
A	49 (41%)	150 (60%)	1.00	Reference	-
G	71 (59%)	100 (40%)	2.17	1.40-3.39	<0.001*
AA	8 (13.3%)	45 (36%)	1.00	Reference	-
AG	33 (55%)	61 (48.8%)	3.04	1.28-7.20	0.011*
GG	19 (31.7%)	19 (15.2%)	5.62	2.10-15.15	0.002*
AG+GG	52 (86.7%)	80 (64.0%)	3.65	1.60-8.40	0.001*

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

Rezultati genotipizacije pacijenata obolelih od OKT usne duplje za TNF alfa R2 gen prikazani su na slici broj 23.



Slika 23 - Učestalost TNF alfa R2 genotipova u grupama

Mutacija gena za TNF-alfa receptor 2 bila je gotovo podjednako zastupljena kod obolelih kao i kod zdravih ispitanika. Hi-kvadrat testom nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u zastupljenosti genotipova među grupama (tabela 9).

Tabela 9 - Učestalost genotipova za TNF alfa R2 gen u okviru grupa

TNF alfa R2	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	p
TT	9 (40.9%)	29 (52.7%)	0.596
TG	12 (54.5%)	23 (41.8%)	
GG	1 (4.6%)	3 (5.5%)	

*Statistički značajna razlika; p - Hi kvadrat test

Rezultati logističke regresione analize pokazuju da različite varijante TNF alfa R2 gena ne utiču na predispoziciju za nastanak OKT (Tabela 10).

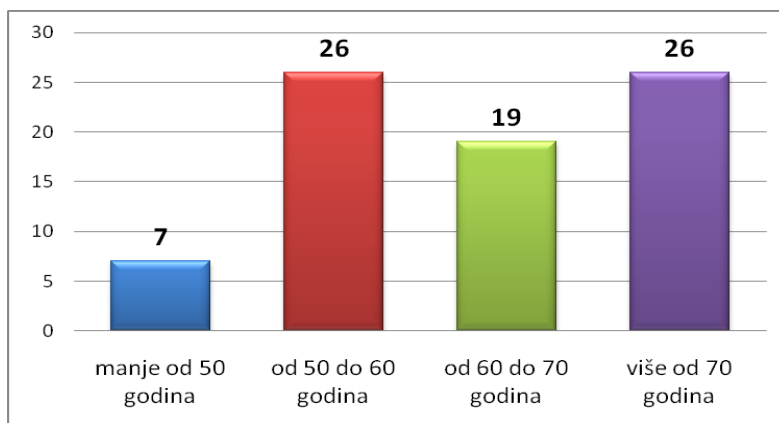
Tabela 10 - Polimorfizam gena za TNF alfa R2 i rizik za nastanak OKT, logistička regresiona analiza

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	OR	95% CI	p
T	30 (68.2%)	81 (73.6%)	1.00	Reference	0.311
G	14 (31.8%)	29 (26.4%)	1.30	0.61-2.80	
TT	9 (40.9%)	29 (52.7%)	1.00	Reference	-
TG	12 (54.5%)	23 (41.8%)	1.68	0.62-4.52	0.229
GG	1 (4.6%)	3 (5.5%)	0.83	0.08-8.39	0.871
TG+GG	13 (59.1%)	26 (47.3%)	0.62	0.23-1.69	0.351

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

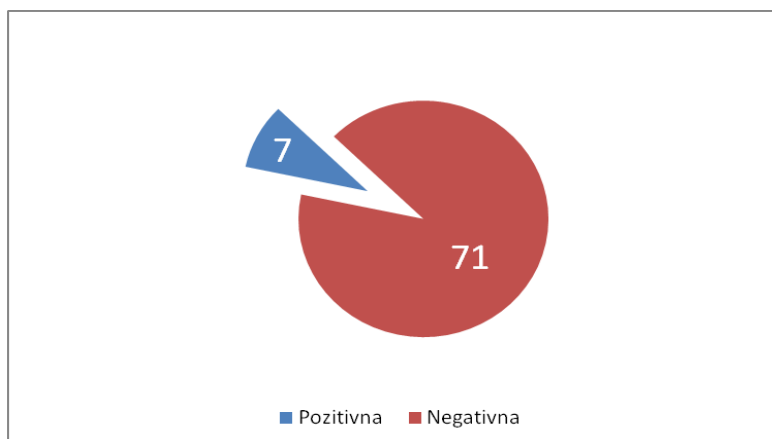
4.2. PLANOCELULARNI KARCINOM – ANAMNESTIČKI PODACI, STADIJUM BOLESTI I PETOGODIŠNJE PREŽIVALJAVANJE

Starost ispitanika obolelih od planocelularnog karcinoma kretala se od 46 do 83 godina. Najviše je bilo ispitanika starosne dobi između 50 i 60 godina (33%) i starosne dobi preko 70 godina (33%) (Slika 24).



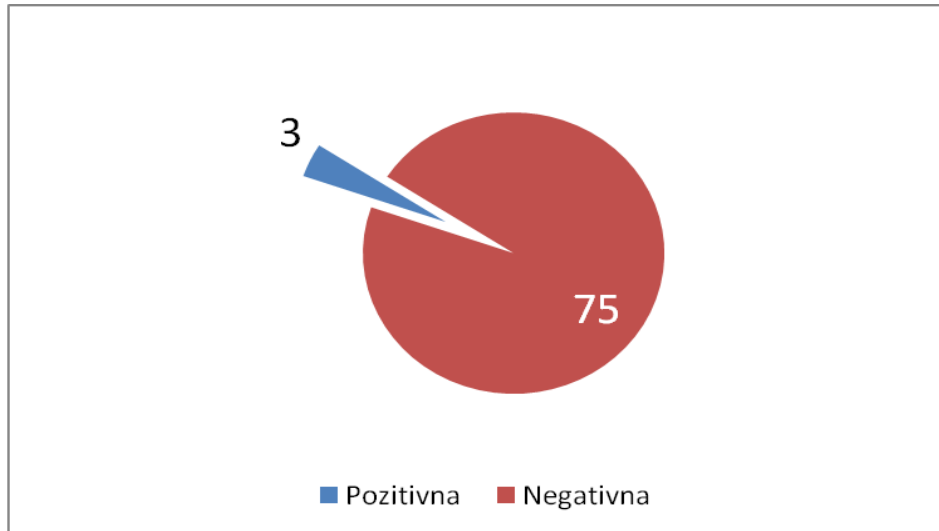
Slika 24 - Starosna struktura pacijenata obolelih od planocelularnog karcinoma

Pozitivnu porodičnu anamnezu (sa istorijom onkoloških oboljenja u porodici) prijavilo je 7 obolelih, odnosno 9% ispitanika (Slika 25).



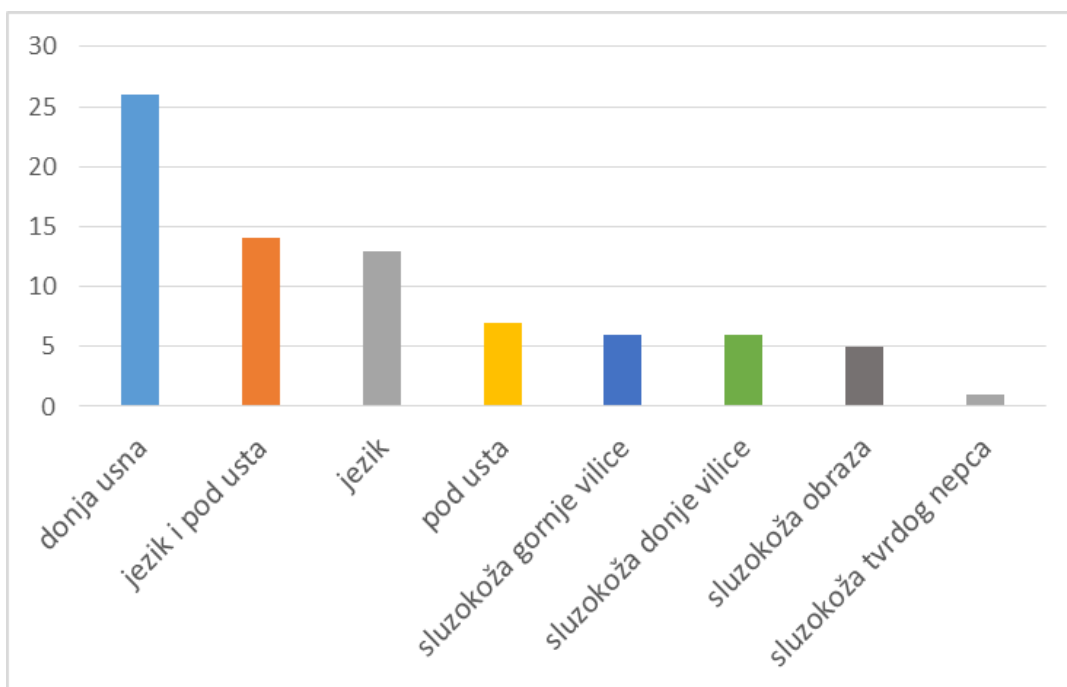
Slika 25 - Porodična anamneza

Najveći broj ispitanika je negirao ranija oboljenja od karcinoma i drugih malignoma (75 ispitanika, odnosno 96%) (Slika 26).



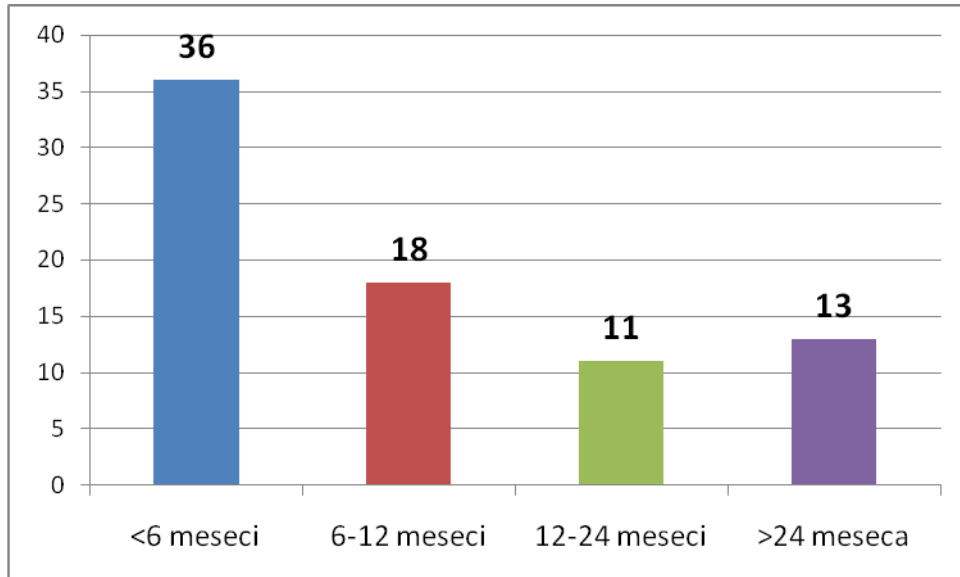
Slika 26 - Lična anamneza

Najučestalija lokalizacija karcinoma usne duplje je donja usna (33.3%), jezik i pod usta (17.9%), jezik (16.7%) i pod usta (9%). Ostale lokalizacije su bile ređe zastupljene (Slika 27).



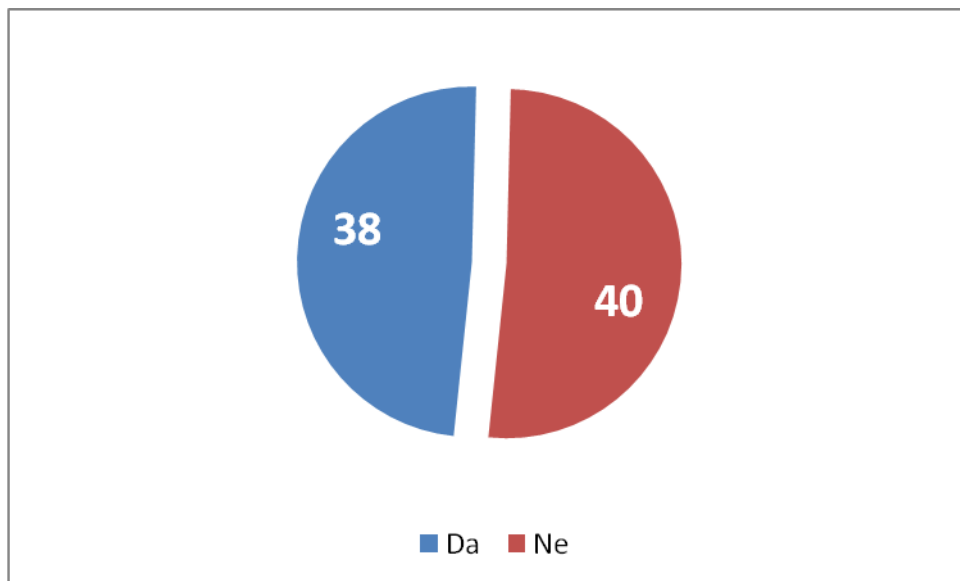
Slika 27 - Distribucija lokalizacije planocelularnog karcinoma

Najveći broj pacijenata zatražio je lekarsku pomoć tokom prvih 6 meseci u odnosu na pojavu tegoba (46.2%). Ipak ne tako mali broj pacijenata (13 pacijenata, 16.7%) se obratio lekaru tek 2 godine nakon pojave simptoma maligniteta (Slika 28).



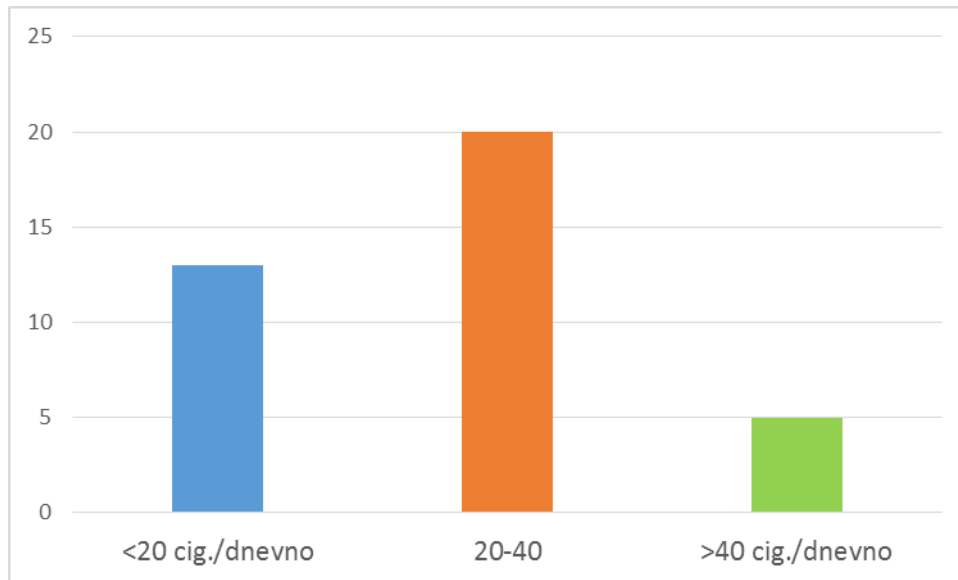
Slika 28 - Vreme od pojave prvih tegoba do operacije

U ispitivanom uzorku bio je približno jednak broj pušača i nepušača (Slika 29).



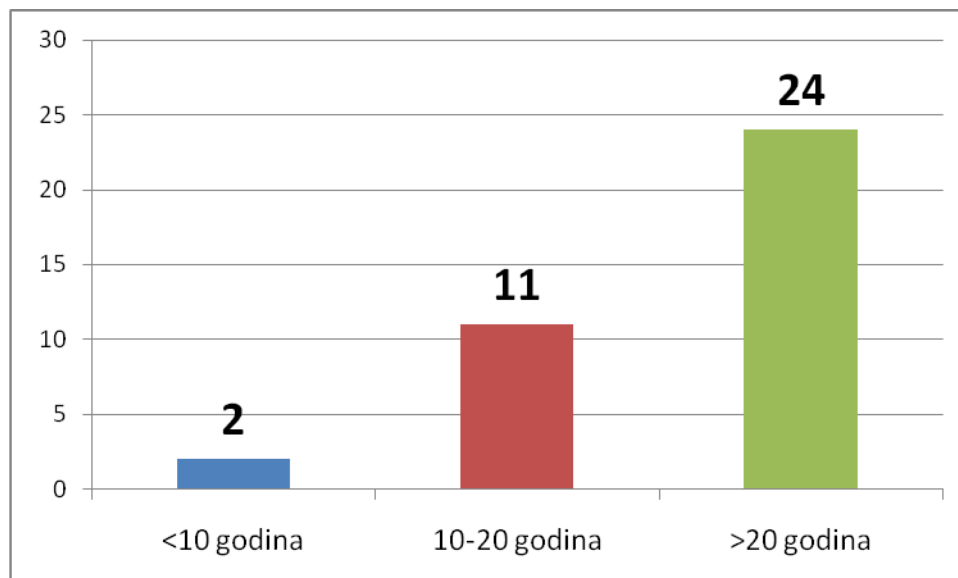
Slika 29 - Loše navike (pušenje)

Najveći broj pušača, dnevno je konzumirao 30 do 40 cigareta (Slika 30).



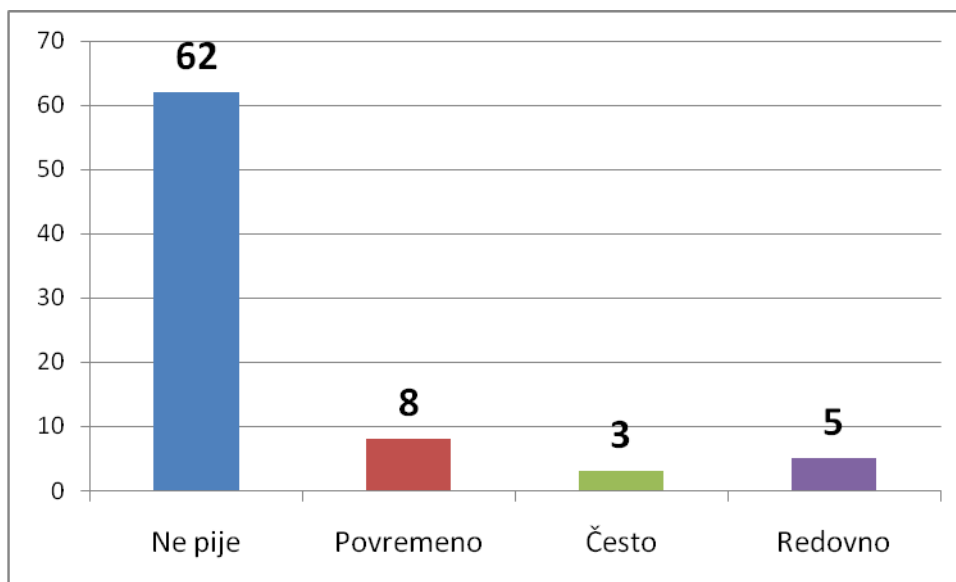
Slika 30 - Pušači (broj dnevno popušenih cigareta)

Najveći broj pušača bili su „dugogodišnji pušači” (Slika 31).



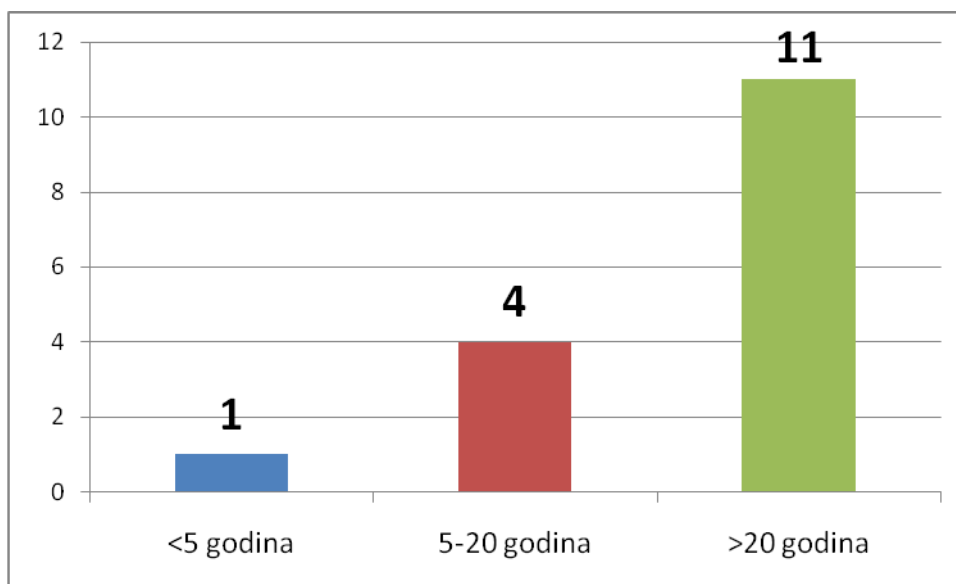
Slika 31 - Pušači (dužina „pušačkog staža”)

Najveći broj ispitanika izjasnio se kao „anti-alkoholičari“. Skoro 80% ispitanika obolelih od planocelularnog tumora usne duplje izjavilo je da uopšte ne konzumira alkohol (Slika 32).



Slika 32 - Loše navike (upotreba alkohola)

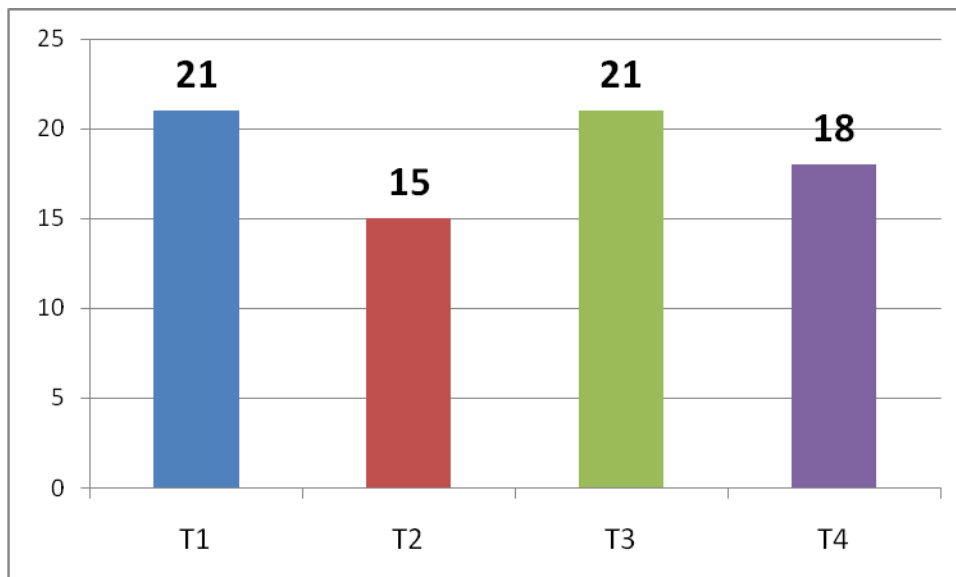
Od ispitanika koji su naveli da svakodnevno uživaju u alkoholu, čak 68.8% je izjavilo da piju alkohol duže od 20 godina (Slika 33).



Slika 33 - Alkoholici (dužina upotrebe)

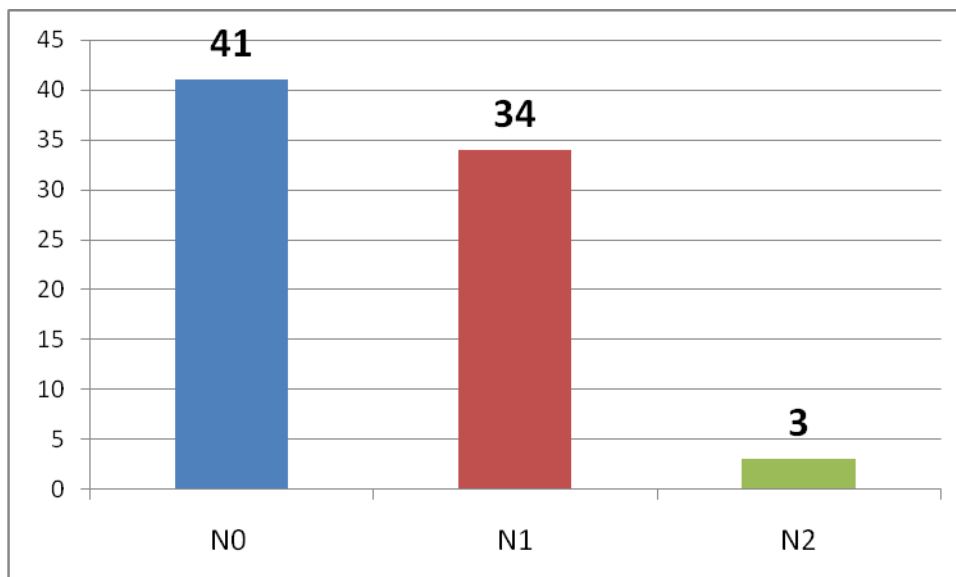
Analizirajući TNM klasifikaciju, dobijeni su sledeći rezultati:

Najviše obolelih pacijenata pripadalo je T1 i T3 grupi (Slika 34).



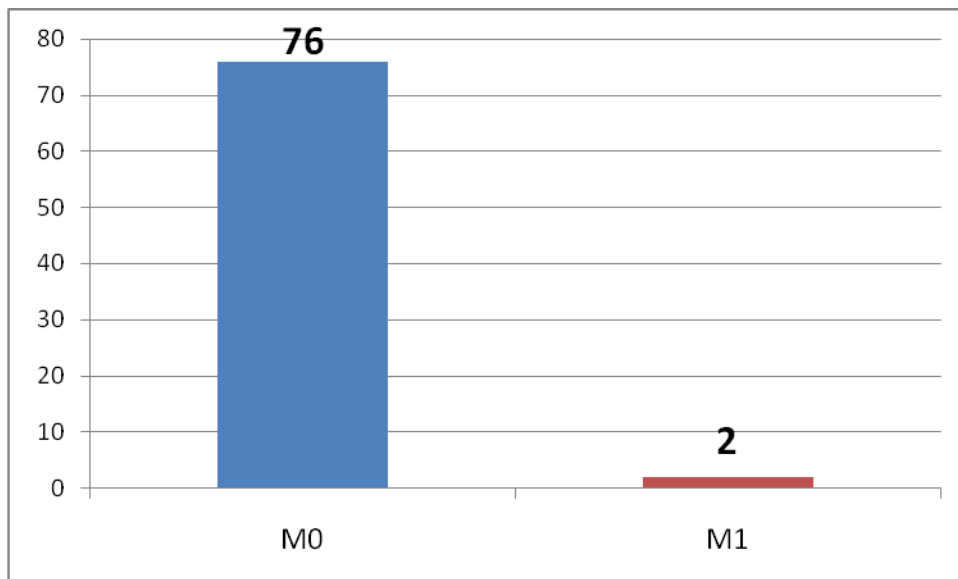
Slika 34 - T klasifikacija (TNM sistema klasifikacije)

Kod više od pola obolelih ispitanika nisu detektovane metastaze tumora u regionalnim limfnim čvorovima (41 ispitanik, 52.6%) (Slika 35).



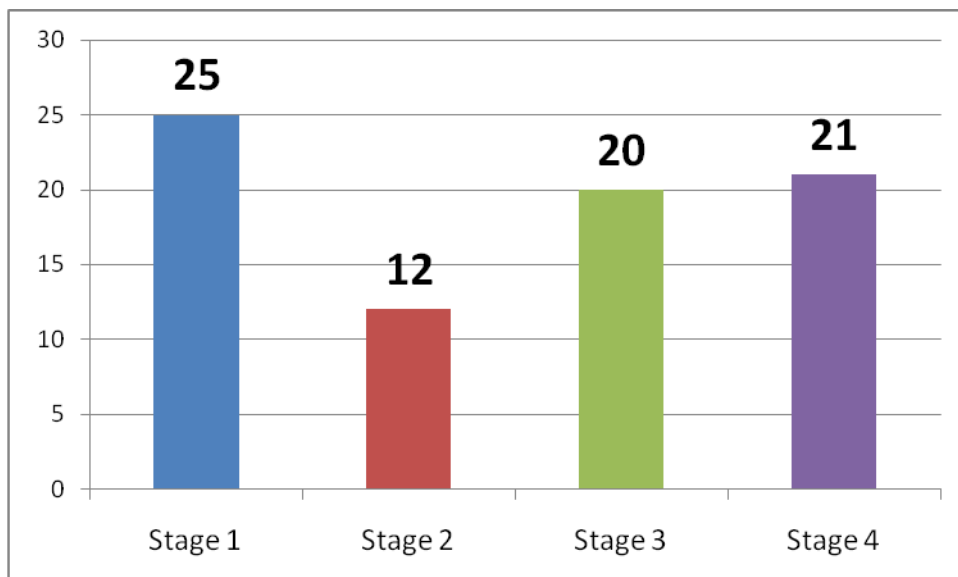
Slika 35 - N klasifikacija (TNM sistema klasifikacije)

Udaljene metastaze tumora primećene su kod samo 2 obolela pacijenta (Slika 36).



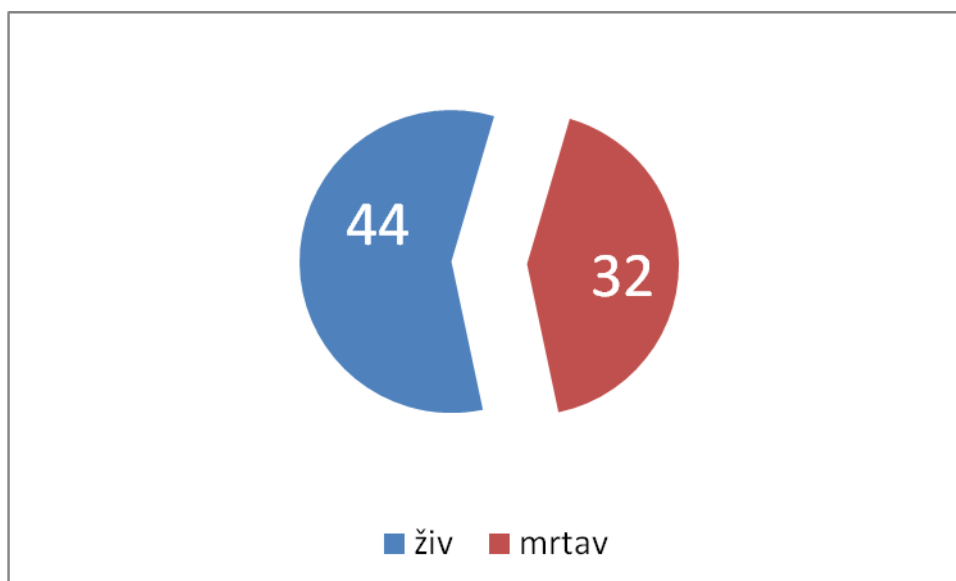
Slika 36 - M klasifikacija (TNM sistema klasifikacije)

Unutar STAGE sistema klasifikacije, najveći broj ispitanika bio je klasifikovan u STAGE 1 kategoriju (25 obolelih, 32.1%) (Slika 37).



Slika 37 - STAGE sistem klasifikacije

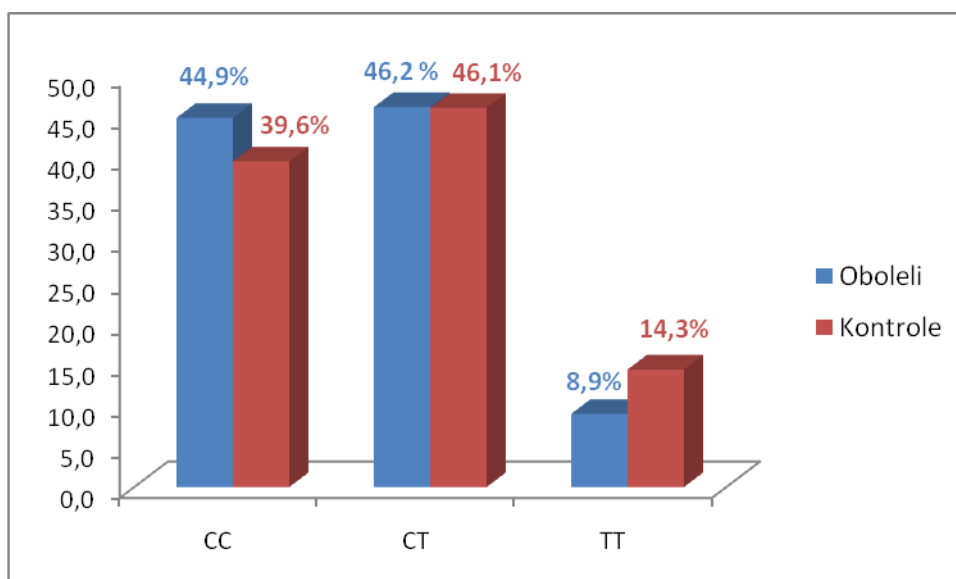
Pet godina nakon hirurške terapije 44 operisanih pacijenata bilo je živo, dok je 32 pacijenata u međuvremenu egitiralo (Slika 38).



Slika 38 - Petogodišnje preživljavanje

4.3. PLANOCELULARNI KARCINOMI –GENOTIPIZACIJA

Rezultati genotipizacije pacijenata obolelih od planocelularnog karcinoma usne duplje za MTHFR poziciju 677 prikazani su na slici broj 39.



Slika 39 – Učestalost MTHFR genotipova u grupama

Divlji, nemutirani, tip gena (CC) bio je prisutan kod 45% obolelih ispitanika, dok je mutaciju gena u homozigotnom ili heterozigotnom obliku imalo 55% obolelih. Približno slična distribucija alela primećena je i u grupi zdravih ispitanika. Hi-kvadrat testom je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipova među grupama (Tabela 11).

Tabela 11 - Učestalost genotipova za MTHFR 677 gen u okviru grupa

MTHFR 677	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	p
CC	35 (44.9%)	163 (39.6%)	0.397
CT	36 (46.2%)	190 (46.1%)	
TT	7 (9.1%)	59 (14.3%)	

*Statistički značajna razlika; p - Hi kvadrat test

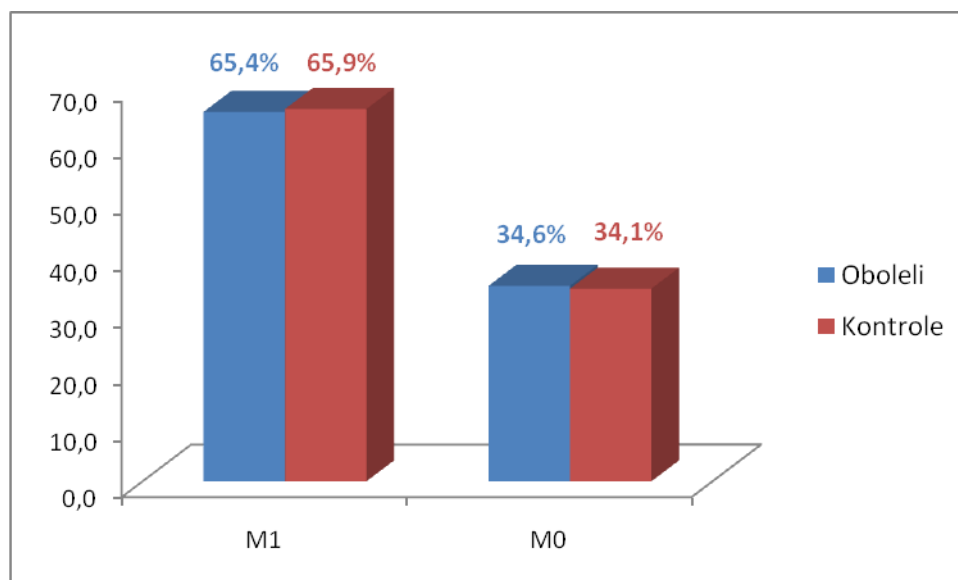
Rezultati logističke regresione analize pokazuju da različite varijante MTHFR gena ne utiču na predispoziciju za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma (Tabela 12).

Tabela 12 - Polimorfizam gena za MTHFR 677 i rizik za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma, logistička regresiona analiza

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	OR	95% CI	p
C	106 (68%)	516 (62.6%)	1.00	Reference	0.119
T	50 (32%)	308 (37.4%)	0.79	0.55-1.14	
CC	35 (44.9%)	163 (39.6%)	1.00	Reference	-
CT	36 (46.2%)	190 (46.1%)	1.24	0.76-2.03	0.382
TT	7 (9.1%)	59 (14.3%)	1.69	0.74-3.86	0.209
CT+TT	43 (55.3%)	249 (60.4%)	0.80	0.49-1.31	0.226

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

Rezultati genotipizacije pacijenata obolelih od planocelularnog karcinoma usne duplje za GSTM1 gen prikazani su na slici broj 40.



Slika 40 - Učestalost GSTM1 genotipova u grupama

Divlji, nemutirani, tip gena bio je prisutan kod 65% obolelih ispitanika, dok je mutaciju gena ispoljenu u vidu delecije imalo 35% obolelih. Približno slična distribucija alela primećena je i u grupi zdravih ispitanika. Hi-kvadrat testom je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipova među grupama (Tabela 13).

Tabela 13 - Učestalost genotipova za GSTM1 gen u okviru grupa

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	p
M1	51 (65.4%)	120 (65.9%)	0.932
M0	27 (34.6%)	62 (34.1%)	

*Statistički značajna razlika; p - Hi kvadrat test

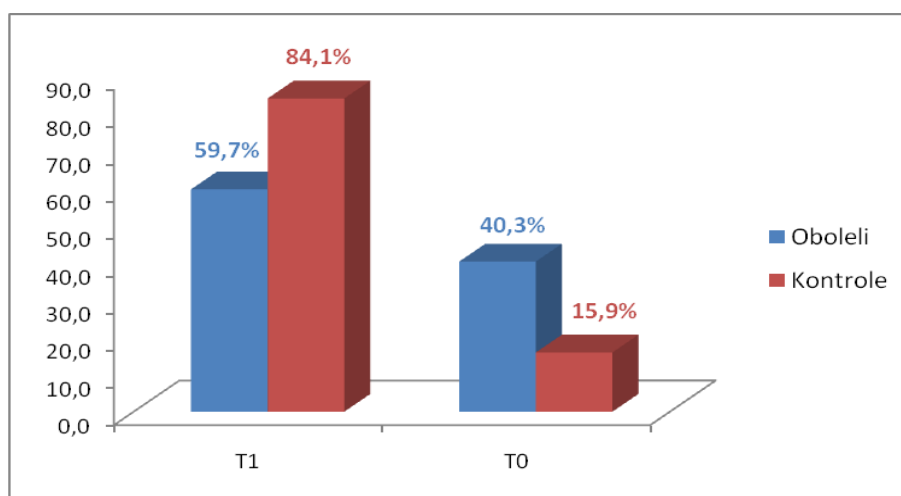
Rezultati logističke regresione analize pokazuju da različite varijante GSTM1 gena ne utiču na predispoziciju za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma (Tabela 14).

Tabela 14 - GSTM1 distribucija genotipova u oboleloj i kontrolnoj grupi

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	OR	95% CI	p
M1 (+/+, +/-)	51 (65.4%)	120 (65.9%)	1.00	reference	0.52
M0 (-/-)	27 (34.6%)	62 (34.1%)	1.025	0.59-1.79	

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

Rezultati genotipizacije pacijenata obolelih od planocelularnog karcinoma usne duplje za GSTT1 gen prikazani su na slici broj 41.



Slika 41 - Učestalost GSTT1 genotipova u grupama

Divlji, nemutirani, tip gena bio je prisutan kod 60% obolelih ispitanika, dok je mutaciju gena ispoljenu u vidu delecije imalo 40% obolelih. U kontrolnoj grupi, delecije su bile prisutne kod samo 16% ispitanika. Hi-kvadrat testom je utvrđeno postojanje visoke statistički značajne razlike u zastupljenosti genotipova među grupama (Tabela 15).

Tabela 15 - Učestalost genotipova za GSTT1 gen u okviru grupa

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	p
T1	46 (59.7%)	153 (84.1%)	<0.001*
T0	31 (40.3%)	29 (15.9%)	

*Statistički značajna razlika; p - Hi kvadrat test

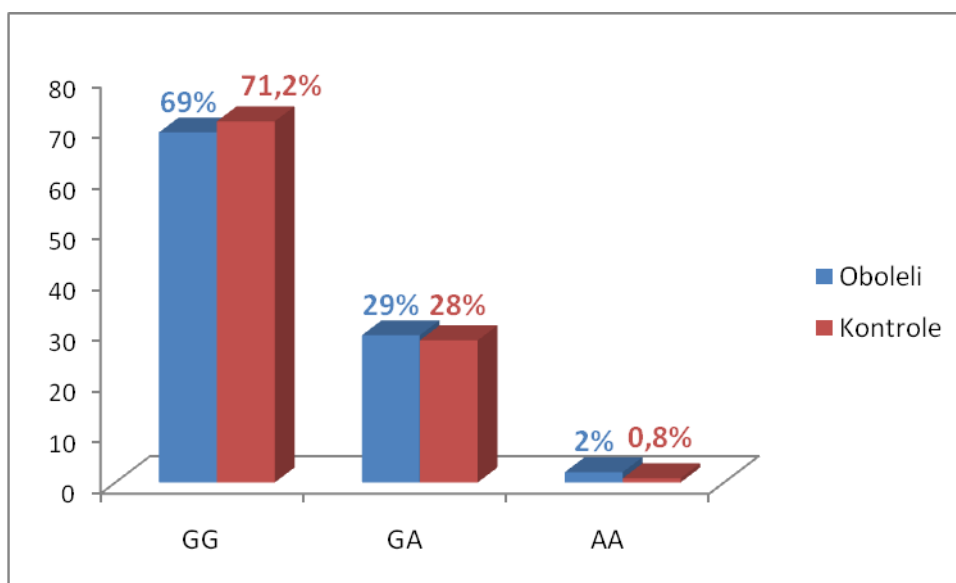
Rezultati logističke regresione analize pokazuju da različite varijante GSTT1 gena utiču na predispoziciju za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma (Tabela 16). Delecioni polimorfizam GSTT1 gena 3,6 puta povećava rizik za oboljevanje od ovog epitelnog tumora.

Tabela 16 - GSTT1 distribucija genotipova u oboleloj i kontrolnoj grupi

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	OR	95% CI	p
T1 (+/+, +/-)	46 (59.7%)	153 (84.1%)	1	Reference	<0.001*
T0 (-/-)	31 (40.3%)	29 (15.9%)	3.56	1.94-6.51	

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

Rezultati genotipizacije pacijenata obolelih od planocelularnog karcinoma usne duplje za TNF alfa gen prikazani su na slici broj 42.



Slika 42 - Učestalost TNF alfa genotipova u grupama

Divlji, nemutirani, tip gena (GG) bio je prisutan kod 69% ispitanika, dok je mutaciju gena u heterozigotnom obliku imalo 29% obolelih. Homozigotni alelni oblik mutiranog gena nađen je kod po samo jednog ispitanika u obe ispitivane grupe. Hi-

kvadrat testom nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u zastupljenosti genotipova među grupama (tabela 17).

Tabela 17 - Učestalost genotipova za TNF alfa gen u okviru grupa

TNF alfa	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	p
GG	35 (69%)	89 (71.2%)	0.796
GA	14 (29%)	35 (28%)	
AA	1 (2%)	1 (0.8%)	

*Statistički značajna razlika; p - Hi kvadrat test

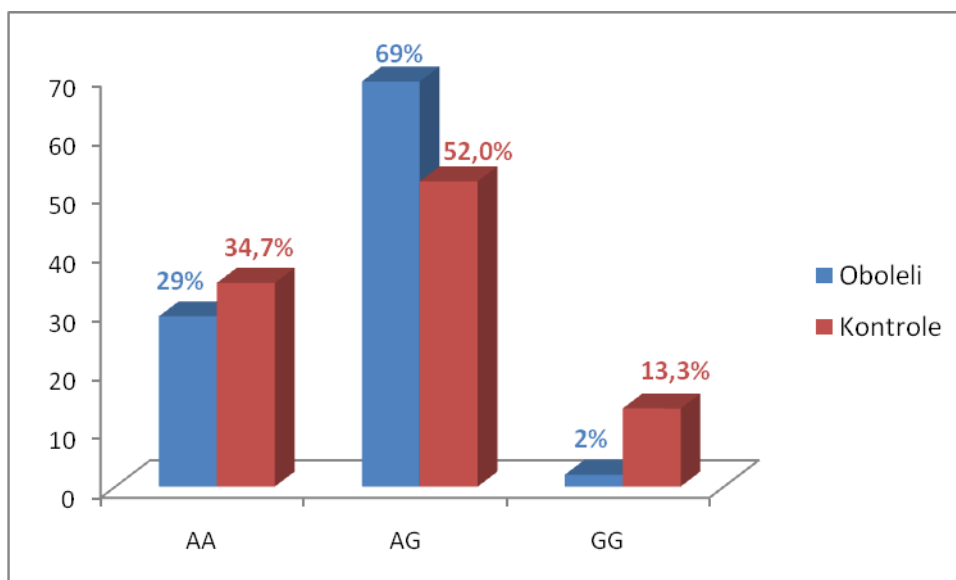
Rezultati logističke regresione analize pokazuju da različite varijante TNF alfa gena ne utiču na predispoziciju za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma (Tabela 18).

Tabela 18 - Polimorfizam gena za TNF alfa i rizik za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma, logistička regresiona analiza

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	OR	95% CI	p
G	84 (84%)	213 (85%)	1.00	Reference	0.447
A	16 (16%)	37 (15%)	1.09	0.58-2.08	
GG	35 (69%)	89 (71.2%)	1.00	Reference	-
GA	14 (29%)	35 (28%)	1.02	0.49-2.12	0.552
AA	1 (2%)	1 (0.8%)	2.5	0.15-41.8	0.491
GA+AA	15 (31%)	36 (29.0%)	1.06	0.52-2.17	0.506

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

Rezultati genotipizacije pacijenata obolelih od planocelularnog karcinoma usne duplje za TNF alfa R1 gen prikazani su na slici broj 43.



Slika 43 - Učestalost TNF alfa R1 genotipova u grupama

Divlji, nemutirani, tip gena (AA) bio je prisutan kod 29% obolelih ispitanika, dok je mutaciju gena u heterozigotnom obliku imalo 69% obolelih. Homozigotni alelni oblici mutiranog gena bili su najređe zastupljeni unutar obe ispitivane grupe. Hi-kvadrat testom utvrđeno je postojanje granične statistički značajne razlike u zastupljenosti genotipova među grupama (tabela 19).

Tabela 19 - Učestalost genotipova za TNF alfa R1 gen u okviru grupa

TNF alfa R1	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	P
AA	14 (29%)	26 (34.7%)	*0.04
AG	35 (69%)	39 (52.0%)	
GG	1 (2%)	10 (13.3%)	

*Statistički značajna razlika; p - Hi kvadrat test

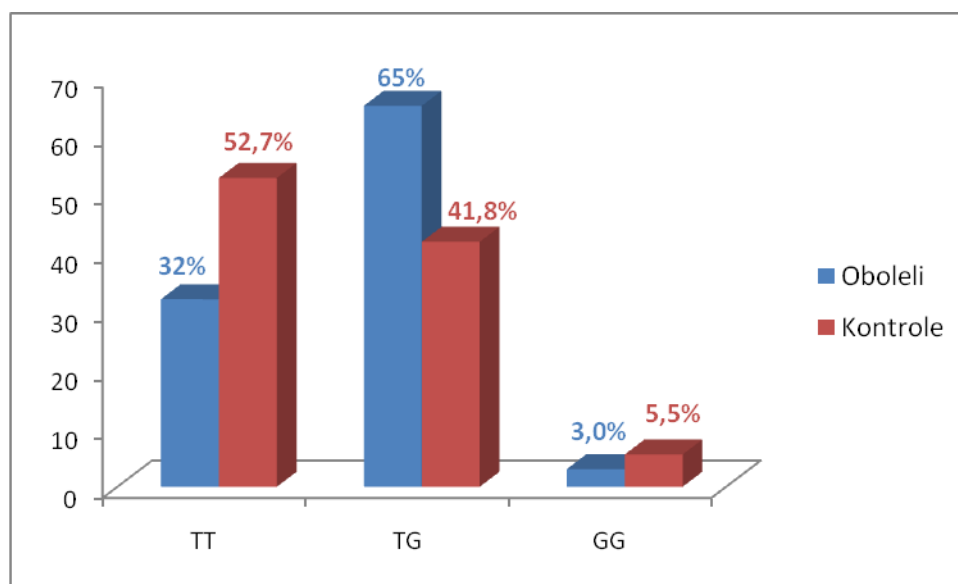
Rezultati logističke regresione analize pokazuju da različite varijante TNF alfa R1 gena ne utiču na predispoziciju za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma (Tabela 20).

Tabela 20 - Polimorfizam gena za TNF alfa R1 i rizik za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma, logistička regresiona analiza

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	OR	95% CI	p
A	63 (63%)	91 (68.9%)	1.00	Reference	0.209
G	37 (37%)	41 (31.1%)	1.30	0.75-2.26	
AA	14 (29%)	26 (34.7%)	1.00	Reference	-
AG	35 (69%)	39 (52.0%)	1.67	0.75-3.69	0.143
GG	1 (2%)	10 (13.3%)	0.19	0.02-1.60	0.093
AG+GG	36 (71%)	49 (65.3%)	1.36	0.63-2.97	0.280

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

Rezultati genotipizacije pacijenata obolelih od planocelularnog karcinoma usne duplje za TNF alfa R2 gen prikazani su na slici broj 44.



Slika 44 - Učestalost TNF alfa R2 genotipova u grupama

Divlji, nemutirani, tip gena (TT) bio je prisutan kod 32% ispitanika, dok je mutaciju gena u heterozigotnom ili homozigotnom obliku imalo 65% obolelih. Hi-kvadrat testom utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u zastupljenosti genotipova među grupama (tabela 21).

Tabela 21 - Učestalost genotipova za TNF alfa R2 gen u okviru grupa

TNF alfa R2	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	p
TT	16 (32%)	29 (52.7%)	*0.042
TG	33 (65%)	23 (41.8%)	
GG	1 (3%)	3 (5.5%)	

*Statistički značajna razlika; p - Hi kvadrat test

Rezultati logistične regresione analize pokazuju da različite varijante TNF alfa R2 gena mogu da utiču na predispoziciju za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma. Heterozigotni oblik ovog polimorfizma povećava rizik za obljevanje (Tabela 22).

Tabela 22 - Polimorfizam gena za TNF alfa R2 i rizik za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma, logistička regresiona analiza

Genotipovi	Oboleli N (%)	Kontrole N (%)	OR	95% CI	p
T	65 (65%)	74 (74%)	1.0	Reference	0.110
G	35 (35%)	26 (26%)	1.53	0.84-2.81	
TT	16 (32%)	32 (53%)	1.00	Reference	-
TG	33 (65%)	25 (42%)	2.64	1.19-5.84	*0.013
GG	1 (3%)	3 (5%)	0.67	0.06-6.93	0.604
TG+GG	34 (68%)	28 (47%)	2.43	1.11-5.30	*0.020

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

5. DISKUSIJA

Odontogeni keratocistični tumor

Tokom protekle dve decenije molekularno-genetička istraživanja su zauzela značajno mesto u medicini i stomatologiji. Ova istraživanja dala su veliki doprinos sagledavanju mehanizama patogeneze brojnih oboljenja. Nakon duge dominacije ispitivanja somatskih promena u obolelom tkivu/organu, u novije vreme se pažnja naučnika okreće i ispitivanjima germinativnih mutacija. U njih spadaju i genski polimorfizmi koje svaki pojedinac nosi u naslednoj konstituciji, a koji nekada mogu da stvore manje ili više pogodno tlo za nastanak bolesti. Iako je u naučnoj literaturi zabeležen eksponencijalni rast broja studija asocijacije, odnosno studija koje se bave ispitivanjem povezanosti prisustva različitih alelnih varijanti u ljudskom genomu i rizika za pojavu specifične patologije, mali je broj radova koji su se bavili faktorima predispozicije za nastanak OKT. Među malobrojne studije na ovu temu spada i istraživanje Andrića i saradnika, na srpskoj populaciji, u kojoj je pronađena veza između promotorskog polimorfizama u genu za survivin i povećanog rizika za razvoj OKT (Andric, et al., 2012). Ispitivanje na tajlandskoj populaciji ustanovilo je da je polimorfizam na 72. kodonu TP53 gena takođe faktor rizika za OKT (Yanatatsaneejit, et al., 2015), dok recimo u studiji polimorfizama gena za interleukin-1 alfa i interleukin beta nije pronađena asocijacija sa ovim epitelnim tumorom (Eshghyar, et al., 2012, Sengüven and Oygür, 2011) . U dostupnoj literaturi nisu nađeni radovi koji su se bavili ispitivanjem povezanosti polimorfizama u genima za MTFHR, GST i TNF alfa sa rizikom za oboljevanje od odontogenog keratocističnog tumora.

Analizirajući dobijene rezultate ovog istraživanja, došli smo do interesantnih saznanja. Polimorfizam gena za tumor nekroza faktor alfa predstavlja značajan faktor rizika za nastanak i razvoj odontogenog keratocističnog tumora. Osobe koje su nosioci genske varijante u heterozigotnom stanju (GA) imaju sedam puta veći rizik da obole od OKT u odnosu na osobe sa genotipom GG (homozigoti za divlji tip alela). Mutirana homozigotna forma tumor nekroza faktora alfa (AA) uvećava rizik čak 38 puta. Zanimljivo je da je ovaj polimorfizam povezan sa non-Hoćkinovim limfomom, u našoj populaciji (Jevtovic-Stoimenov, et al., 2008) i non-Hoćkinovim limfomom i akutnom limfoblastnom leukemijom u iranskoj populaciji (Nasiri, et al., 2013).

Polimorfizam u receptoru 1 za TNF alfa takođe značajno povećava rizik za oboljevanje od OKT (tri puta je povećan kod heterozigota, a skoro šest puta kod mutantnih homozigota). Polimorfizam u TNF alfa R1 receptoru (rs767455) prethodno je doveden u vezu sa povećanim rizikom za razvoj sporadičnog tumora dojke (Madeleine, et al., 2011) i inflamatornih demijelinirajućih bolesti (Park, et al., 2013). Međutim, kao i u slučaju TNF alfa polimorfizma, naše rezultate nismo mogli da uporedimo sa literaturno dostupnim podacima jer se do sada niko nije bavio asocijacijom ovog SNP sa rizikom za nastanak OKT.

Oralni planocelularni karcinom - epidemiološko-klinički rezultati

U ispitivanom uzorku pacijenata obolelih od planocelularnog karcinoma usne duplje, osoba muškog pola bilo je izrazito više nego osoba ženskog pola. Veći broj obolelih muškaraca (77%) objašnjava se time što osobe muškog pola u većem broju slučajeva upražnjavaju štetne navike koje doprinose nastanku oralnog karcinoma. Literaturni podaci potvrđuju ove tvrdnje i ukazuju na porast incidence oralnog karcinoma kod osoba muškog pola u zemljama „u razvoju“, odnosno zemljama u kojima je upotreba duvana u porastu. Naročito se ističe porast incidence oralnog karcinoma u zemljama jugoistočne Evrope i južne Amerike. (Rettig and D'Souza, 2015, Simard, et al., 2014, Weatherspoon, et al., 2015).

Oboleli ispitanici su uglavnom bili starije životne dobi. Najmlađi ispitanik imao je 46 godina, a najstariji 83 godine. Najmanje ispitanika bilo je u grupi mlađih od 50 godina (8.9%). Ipak ohrabruje podatak da u ispitivanom periodu, unutar uzorka, na Klinici nije bilo obolelih osoba mlađih od 40 godina. Međutim treba podsetiti da određeni maligniteti od kojih su u prošlosti bolovali ljudi isključivo starije životne dobi (stariji od 60 godina), danas se javljaju i kod osoba mlađih od 30 godina (Bodner, et al., 2014). Ovo se objašnjava činjenicom da su se uslovi života početkom XXI veka drastično promenili. „Životni tempo“ i svakodnevno izlaganje sve većem broju kancerogena i ksenobiotika utiče na povećanje broja maligniteta širom sveta. U našoj grupi ispitanika najviše obolelih osoba bilo je starosne dobi između 50 i 60 godina, kao i onih starijih od 70 godina (po 26 pacijenata, odnosno 33.3%). Ovakva distribucija

učestalosti oralnog planocelularnog karcinoma po starosnoj strukturi pacijenata odgovara rezultatima brojnih međunarodnih studija (Landis, et al., 1999, Troeltzsch, et al., 2014). Usled dugoročnog konzumiranja duvana i žestokih alkoholnih pića, kao i kumulativnog dejstva ovih štetnih agenasa, posledice se najčešće manifestuju u kasnijoj životnoj dobi (posle 50.godine).

Bez obzira na navedeno, ostaje problem etiologije karcinoma kod mlađih osoba koje „žive zdravo“ i koje imaju saniranu usnu duplju (bez karijesnih zuba, neadekvatnih protetičkih radova, oštih ivica zuba i drugih lokalno iritativnih faktora).

Najčešća lokalizacija planocelularnog karcinoma u području donje usne, jezika i poda usta u našoj studiji objašnjava se time što je sluzokoža poda usna najgracilnija i najpropustljivija za kancerogene u odnosu na druge regije. Ispitivani uzorak domaće populacije u visokom procentu konzumira duvan i alkoholna pića, što čini da ksenobiotici „kupaju“ sublingvalni predeo i retromolarnu regiju, (tzv. „drenažno područje“ u kome se hrana i tečnost najviše zadržavaju i ostvaruju najduži kontakt sa sluzokožom). Donja usna je sa druge strane dodatno izložena štetnom delovanju sunčevih zraka, kao i hemijsko-termičkim oštećenjima cigareta. Ovakva distribucija lokalizacije karakteristična je i za druge evropske zemlje, dok je u Indiji npr. zbog navike žvakanja duvana, najčešća lokalizacija tumora usne duplje na obraznoj sluzokoži.

Posmatrajući vreme proteklo od pojave prvih tegoba pa do dana operacije, konstatovali smo da se većina pacijenata javila lekaru tokom prvih 6 meseci (46%). Ipak, ne tako mali broj pacijenata se obratio lekaru tek u podmaklom stadijumu bolesti (13 ispitanika se obratilo lekaru za pomoć tek dve godine nakon što su приметili promenu u usnoj duplji). S obzirom na zloćudnost i tok malignog procesa, neophodno je da se pacijenti obrate lekaru u što ranijem periodu bolesti. Svaka promena u usnoj duplji koja perzistira duže od dve nedelje trebalo bi da bude alarm kako za pacijente, tako i za doktore. Ranom identifikacijom potencijalne onkogene pretnje omogućava se bolja prognoza bolesti, smanjuje period lečenja, oporavka i ukupnih troškova.

U ispitivanom uzorku bio je približno jednak broj pušača i nepušača. Grupa ispitanika koja se deklarirala kao pušači, konzumirala je najčešće jednu do dve paklice cigareta dnevno, unazad više od 20 godina. Procentualni odnosi „teških“ pušača su u skladu sa brojem obolelih osoba koji su bili predmet istraživanja sličnih studija (Kao, et al., 2015, Macek and Yellowitz, 2013).

Iako se alkohol ne svrstava u kancerogene, on može biti rastvarač koji omogućava povećanu ćelijsku propustljivost drugih kancerogena. Isto tako i neki nealkoholni sastojci alkoholnih pića mogu imati kancerogene efekte. Interesantno je to da je 80% obolelih navelo da uopšte ne konzumira žestoka alkoholna pića. Ovaj podatak se mora prihvatiti sa dozom sumnje, s obzirom na to da je tokom anketiranja pacijenata često primećen iskaz ispitanika koji nije bio podudaran sa psiho-fizičkim habitusom. Ovo može da znači da se obolele osobe ne žele da priznaju konzumaciju žestokih alkoholnih pića ili pak da svakodnevno ispijanje alkohola potcenjuju i smatraju da ta navika nije zabrinjavajuća i opasna po zdravlje. Možda je kod nekih prisutan i strah od toga da bi se kao deklarirani alkoholičari, odnos doktora prema pacijentu mogao promeniti.

Pacijenti lečeni na Klinici bili su različitog TNM statusa. Skoro 48% obolelih imalo je već razvijene metastatske promene u regionalnim limfnim čvorovima, dok su udaljene metastaze primećene kod dva obolela pacijenta.

Na petogodišnjem preseku, 42% obolelih nije bilo živo, odnosno 32 pacijenata je umrlo u prvih 5 godina od operacije. Nažalost, dostupni podaci nisu govorili o primarnom uzroku smrti, tako da nismo mogli da utvrdimo da li su operisani pacijenti preminuli zbog posledica širenja tumora ili usled nekog drugog uzroka (komorbiditeta).

Oralni planocelularni karcinom – molekularno-genetički rezultati

Polimorfizmi u genu za MTHFR spadaju u red najispitivanijih polimorfizama u ljudskom genomu, a SNP C677T u MTHFR genu se dovodi u vezu sa rizikom za nastanak velikog broja oboljenja. Međutim, ne postoji veliki broj naučnih radova koji su

pokušali da utvrde povezanost C677T polimorfizma i povišenog rizika za oboljevanje od oralnog planocelularnog karcinoma.

U našoj studiji nije ustanovljena asocijacija između polimorfizma pojedinačnog nukleotida na poziciji 677 MTHFR gena i pojave OPK. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa nekoliko ranijih studija. Npr., Weinstein i saradnici (Weinstein, et al., 2002) su došli do zaključka da polimorfizam C677T polimorfizam ne predstavlja faktor rizika za oboljevanje od oralnog planocelularnog karcinoma. Slično tome, u studiji Solomona i sar. (Solomon, et al., 2008) sprovedenoj na uzorku od 126 obolelih osoba Indijskog porekla došlo se do zaključka da C677T polimorfizam nije faktor rizika za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma. Vairaktaris i sar. (Vairaktaris, et al., 2006), pozivajući se na literaturne podatke da 35% Evropljana ima T mutirani alel (u homo ili heterozigotnom obliku), zaključili su da MTHFR 677T forma predstavlja „minoran rizik za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma“.

Zanimljivo je da je studija Galbiattija i saradnika (Galbiatti, et al., 2012) sprovedena na 256 pacijenata obolelih od karcinoma glave i vrata našla povezanost između ovog SNP i tumora glave i vrata. U ispitivanom uzorku obrađivani su podaci vezani za pol i starost ispitanika, TNM status, upotrebu duvana i alkohola, stopu preživljavanja. Autori su na osnovu rezultata zaključili da C677T polimorfizam ima uticaja na povišeni rizik za oboljevanje od karcinoma glave i vrata kod osoba muškog pola, starije starosne dobi i onih koji konzumiraju duvan i alkohol. Takođe su zaključili da isti polimorfizam često prati lošiji TNM status, kao i goru prognozu bolesti. Do sličnih zaključaka došli su Rodrigues i sar. (Rodrigues, et al., 2010) analizirajući 100 obolelih osoba latino-američkog porekla.

Slično prethodnoj, i studija Kalkana i saradnika (Kalkan, et al., 2014) ukazuje na značaj C677T polimorfizma kao faktora rizika za pojavu rekurentnih oralnih ulceracija. Autori su takođe predložili povećanje unosa folata putem hrane kod osoba koji boluju od ovih lezija. S druge strane, Kawakita i saradnici (Kawakita, et al., 2012) koji su radili sličnu studiju kod obolelih od karcinoma glave i vrata smatraju da povećanje unosa folata nema uticaja na ishod i prognozu bolesti kod ovih pacijenata.

Studija Sailasree (Sailasree, et al., 2011) koja je obuhvatila 101 osobu obolelu od oralnog planocelularnog karcinoma, prosečne starosti od oko 58 godina pokazala je znatno češću zastupljenost T alelna forme unutar grupe ispitanika obolelih od ovog tumora. Na osnovu toga autori su zaključili da C677T polimorfizam može da predstavlja faktor rizika za oboljevanje.

Studija Šupić i saradnika (Supic, et al., 2011) je posebno interesantna, s obzirom na to da je sprovedena na uzorku srpske populacije. Ispitivano je 96 osoba obolelih od oralnog planocelularnog karcinoma, dok su kontrolnu grupu sačinjavale 162 zdrave osobe. Ispitanika muškog pola bilo je približno tri puta više, što je slično našim rezultatima (72 muškaraca i 24 žene). Trećina obolelih ispitanika se deklarirala kao alkoholičari, dok je oko 70% ispitanika navelo da su višegodišnji pušači. Analizirajući genotipove obolelih i osoba kontrolne grupe, utvrđena je slična zastupljenost genotipova. Ipak, kada su autori posmatrali distribuciju genotipova unutar grupa ispitanika u zavisnosti da li konzumiraju žestoka alkoholna pića ili ne, autori su zaključili da „MTHFR 677T alel predstavlja faktor rizika za oboljevanje od oralnog karcinoma kod osoba koje svakodnevno upotrebljavaju alkoholna pića“.

Najnovija studija iz 2015. godine, obradila je uzorak Iranske populacije, odnosno 57 osoba obolelih od oralnog planocelularnog karcinoma (Miri-Moghaddam, et al., 2015). Zanimljivo je da su u ispitivanom uzorku imali 60% osoba ženskog i 40% osoba muškog pola, pri čemu je blizu 60% obolelih bilo mlađe od 60 godina. Na osnovu rezultata genotipizacije, autori su istakli značaj C677T polimorfizma na povećani rizik za oboljevanje od ovog tumora (OR=2.2, 95% CI:1-5, P = 0.04).

Meta-analiza Zhuo i saradnika (Zhuo, et al., 2012), koja je obuhvatila pregled 6 publikovanih radova (od 2002. do 2012.godine), zaključila je da C677T polimorfizam „nije značajan faktor rizika za oboljevanje od oralnog karcinoma“, ali da MTHFR 677TT alelna forma može imati „diskretan značaj u riziku za oboljevanje kod osoba koje zloupotrebljavaju alkoholna pića“.

Meta-analiza Jia i saradnika (Jia, et al., 2014), koja je obuhvatila pregled 7 publikovanih radova (od 2002. do 2013.godine), zaključila je da postoji „marginalan

uticaj C677T polimorfizma na rizik za oboljevanje od oralnog karcinoma”. Ipak, kada su analizirali polimorfizam ovog gena samo kod pacijenata Azijskog kontinenta i onih koji svakodnevno konzumiraju velike količine alkoholnih pića, zaključili su da postoji povećani rizik za oboljevanje. Na osnovu sagledanog, uočavamo da rezultati genotipizacije našeg uzorka i polimorfizam MTHFR gena kao faktora rizika za oboljevanje od oralnog karcinoma, odgovaraju literaturnim podacima i istraživanjima sprovedenim na ostalim Evropskim populacijama.

U tabeli 23 dat je uporedni prikaz učestalosti genotipova za MTHFR 677 polimorfizam za neke od svetskih populacija i jasno se može uočiti velika šarolikost rezultata (Tabela 23).

Tabela 23 – Uporedna analiza genotipova za MTHFR 677 polimorfizam

	Srpska populacija (Ilić)		Iranska populacija (Miri-Moghaddam, et al., 2015)		Indijska populacija (Sailasree, et al., 2011)		Srpska populacija (Supic, et al., 2011)		Indijska populacija (Solomon, et al., 2008)		Evropska populacija (Vairaktaris, et al., 2006)		Latino-američka populacija (Weinstein, et al., 2002)	
	Oboleli (n=78)	Kontrole (n=412)	Oboleli (n=57)	Kontrole (n=62)	Oboleli (n=101)	Kontrole (n=131)	Oboleli (n=96)	Kontrole (n=162)	Oboleli (n=126)	Kontrole (n=100)	Oboleli (n=110)	Kontrole (n=120)	Oboleli (n=135)	Kontrole (n=146)
CC	35 (50%)	163 (40%)	34 (60%)	47 (76%)	92 (91%)	108 (78%)	50 (52%)	80 (49%)	48 (38%)	48 (48%)	28 (25%)	45 (38%)	67 (50%)	69 (47%)
CT	36 (43%)	190 (46%)	21 (37%)	14 (22%)	8 (8%)	29 (21%)	32 (33%)	66 (40%)	55 (44%)	42 (42%)	76 (69%)	65 (54%)	53 (39%)	62 (42%)
TT	7 (7%)	59 (14%)	2 (3%)	1 (2%)	1 (1%)	1 (1%)	14 (15%)	16 (11%)	23 (18%)	10 (10%)	6 (6%)	10 (8%)	15 (11%)	15 (11%)

U našoj studiji nije nađena veza između GSTM1 polimorfizma i OPK, dok je ustanovljeno da je GSTT1 polimorfizam faktor rizika za pojavu oralnog kancera. Naime, osobe sa delecijom GSTT gena imaju 3 puta veći rizik da obole od OPK, u odnosu na one koje poseduju gen. GSTM1 i GSTT1 polimorfizmi se dovode u vezu sa

rizikom za nastanak velikog broja oboljenja. U literaturi se može naći značajan broj naučnih radova koji su ispitivali uticaj delecije ovih genskih lokusa na povišen rizik za nastanak i oboljevanje od orofaringealnih karcinoma (Amador, et al., 2002, Sreelekha, et al., 2001).

Zanimljivo je da većina studija smatra da je delecija GSTM faktor rizika za pojavu tumora glave i vrata. Istraživanje Varela-Lema i sar. je posebno značajno s obzirom da je njihova meta-analiza obuhvatila 3177 obolelih osoba i 4606 zdravih individua (Varela-Lema, et al., 2008). Njihov zaključak da upotreba duvana i genetički polimorfizmi imaju značajnu ulogu u nastanku orofaringealnog karcinoma u saglasnosti je i sa studijom Masooda i saradnika (Masood, et al., 2011), koji su potvrdili značaj delecionog GSTM1 polimorfizma u kancerogenezi tumora glave i vrata kao i nekih drugih udruženih polimorfizama (CYP1A1, GSTT1, GSTP1). Do sličnih rezultata o značaju GSTM1 i CYP1A1 polimorfizama u riziku za nastanak karcinoma glave i vrata došlo se i u studiji Gattasa i saradnika (Gattás, et al., 2006).

Istraživanje Singha i saradnika urađeno na uzorku od 175 osoba obolelih od karcinoma glave i vrata pokazalo je visok rizik oboljevanja kod osoba sa GSTM1 i GSTT1 delecijom (OR: 2.49 i OR: 2.75) (Singh, et al., 2008). Autori su takođe ukazali na štetan uticaj žvakanja duvana koji kod osoba sa ovim delecijama dodatno povećavaju rizik za oboljevanje (GSTM1 - OR: 3.5 i GSTT1 - OR: 2.2). Kod osoba koje svakodnevno koriste alkoholna pića, rizik za oboljevanje se kod GSTM1 delecije uvećava 4, a GSTT1 delecije 3 puta. Iste zaključke su izneli Tanwar i saradnici (Tanwar, et al., 2015). Oni su objasnili da nedostatak GSTM1 aktivnosti povećava vulnerabilnost oralne mukoze, potencirajući štetno dejstvo duvanskih karcinogena što dalje vodi displaziji tkiva, nastanku leukoplakija i oralnih karcinoma.

Jedini literaturno dostupan rad koji nije uočio povezanost GSTM1/GSTT1 polimorfizama i rizika za nastanak karcinoma glave i vrata kod pušača je studija Bisellija i saradnika (Biselli, et al., 2006). Ovo istraživanje je sprovedeno na uzorku Brazilske populacije, a obuhvatilo je 45 obolelih i 45 zdravih individua.

Ispitivanja Kocha i saradnika, pokazala su da delecija GSTM1, ne samo da nosi povećani rizik za oboljevanje od oralnog karcinoma, već i da ima direktan uticaj na veličinu tumora i pojavu ranih metastaza (Koch, et al., 2010). Studija Shukla je takođe ukazala na prognostički značaj GST polimorfizama, zaključivši da delecija GSTM1 nosi kraće preživljavanje u odnosu na GSTT1 deleciju (Shukla, et al., 2013).

Meta-analiza Penga i saradnika (Peng, et al., 2014) nije uočila povezanost GSTM1 (OR=1.35, 95%CI=0.68-2.68, P=0.39) i GSTT1 delecije (OR=1.41, 95%CI=0.72-2.77, P=0.31) i rizika za oboljevanje od oralnog planocelularnog karcinoma na uzorku kineske populacije, dok je meta-analiza Liu-a i saradnika, na istoj populaciji našla povezanost GSTM1 delecije i rizika za oboljevanje od oralnog planocelularnog karcinoma (OR 1.23, 95% CI 1.12-1.34). Na uzorku Indijske populacije takođe je utvrđena povezanost između povišenog rizika za OPK i GSTM1 delecije (OR=1.59, 95%CI=1.20-2.11, P=0.001). Studija Zhanga i saradnika (Zhang, et al., 2011) obuhvatila je uzorak Evropske i Azijske populacije. Zaključili su da GSTM1 nulti genotip može biti u vezi sa povišenim rizikom za oboljevanje kod Azijske ali ne i kod Evropske populacije. Ipak ovaj uticaj nije striktan i može biti u vezi sa „pušačkim” navikama Evropskih ispitanika. Takođe, zaključili su da GSTT1 nulti genotip „ne mora” biti u vezi sa rizikom za oboljevanje od oralnog karcinoma. Slično mišljenje iznela je i grupa autora predvođena Zhaom (Zhao, et al., 2014) zaključivši da GSTM1 delecija nosi rizik za oboljevanje kod Azijske (OR = 1.39, 95% CI=1.27-1.53; P=0.000) ali ne i kod Evropske populacije (OR=0.99, 95% CI=0.83-1.18; P=0.677).

Analizirajući distribuciju GST genotipova kod različitih etničkih grupa primetne su velike varijacije u učestalosti. Što se tiče GSTM1/GSTT1 polimorfizama i rizika za nastanak i oboljevanje od oralnog planocelularnog karcinoma, veliki broj radova govori u prilog njihovoj povezanosti (Buch, et al., 2002, Krüger, et al., 2015) (tabela 24 i 25).

Tabela 24 – Komparativna distribucija GSTM1 alela različitih etničkih pripadnosti

	Srpska populacija (Ilić)		Indijska populacija (Buch, et al., 2002)		Nemačka populacija (Krüger, et al., 2015)	
	Oboleli (n=78)	Kontrole (n=182)	Oboleli (n=29)	Kontrole (n=450)	Oboleli (n=100)	Kontrole (n=93)
GSTM1+	51 (65%)	120 (66%)	151 (51%)	339 (76%)	43 (43%)	40 (43%)
GSTM1-	27 (35%)	62 (34%)	146 (49%)	111 (24%)	57 (57%)	53 (57%)

Tabela 25 – Komparativna distribucija GSTT1 alela različitih etničkih pripadnosti

	Srpska populacija (Ilić)		Indijska populacija (Buch, et al., 2002)		Nemačka populacija (Krüger, et al., 2015)	
	Oboleli (n=77)	Kontrole (n=182)	Oboleli (n=297)	Kontrole (n=450)	Oboleli (n=100)	Kontrole (n=93)
GSTT1+	46 (60%)	153 (84%)	243 (82%)	395 (88%)	78 (78%)	76 (82%)
GSTT1-	31 (40%)	29 (16%)	54 (18%)	55 (12%)	22 (22%)	17 (18%)

Polimorfizmi unutar TNF gena su poslednjih godina predmet interesovanja brojnih naučnih studija. Samo u poslednje 3 godine publikovan je veći broj meta-analiza koje su pokazale povezanost TNF-alfa G308A polimorfizma (rs 1800628) sa povišenim rizikom za pojavu različitih bolesti. Osim oboljenja kao što su dermatomiozitis (Chen, et al., 2014), acne vulgaris (Yang, et al., 2014), ishemična bolest srca (Wang, et al., 2015), Alchajmerova bolest (Lee, et al., 2015, Wang, 2015), reumatoidni artritis (Song, et al., 2014) i dijabetes (Meng, et al., 2014, Sefri, et al., 2014), postoje i studije u kojima je utvrđena povezanost TNF-alfa polimorfizma sa razvojem onkogenih oboljenja kao što su tumori digestivnog sistema (Chen, et al., 2013, Guo, et al., 2013, Yang, et al., 2014), kostne srži (Chen, et al., 2015) i pluća (Xie, et al., 2014). Analizirajući uzorak od 176 osoba obolelih od bazocelularnog karcinoma kože poljske etničke pripadnosti, autori su zaključili da TNF-alfa G>A polimorfizam ne utiče na nastanak i razvoj

bazocelularnog karcinoma kože. Međutim, daljim ispitivanjem, utvrdili su da ova alelna varijanta (bilo u homozigotnom, bilo u heterozigotnom stanju) značajno povećava rizik od ponovne pojave tumora (OR = 4.8, 95% CI: 1.6-13.9, p = 0.004) (Sobjanek, et al., 2015).

U našoj studiji nije ustanovljena povezanost između promotorskog polimorfizma na poziciji -308 u TNF alfa genu i pojave OPK, što je u suprotnosti sa rezultatima studije Gupta i sar. koji su našli značajnu asocijaciju između alela A i povećanog rizika od OPK u indijskoj populaciji (Gupta, et al., 2008).

U radu Liu i i saradnika (Liu, et al., 2005) genotipizirana su 192 pacijenta obolela od oralnog karcinoma, dok je kontrolnu grupu činio uzorak od 146 zdravih individua. Rezultati ispitivanja pokazali su veću učestalost GG genotipa kod obolelih u odnosu na zdrave individue (91.2% - oboleli prema 82.2% - zdravi; p=0.02), što je upućivalo na protektivni efekat alela A u tajvanskoj populaciji. Međutim, autori u svom radu nisu prikazali logističnu regresionu analizu i izračunavanje rizika. Učestalosti alela i genotipova na uzorku tajvanske populacije poredili su sa rezultatima drugih studija koje su ispitivale osobe obolele od različitih oboljenja (pankreatis, kolorektalni karcinom i dr.) i ustanovili da je procentualna distribucija genotipova slična. Kada te podatke uporedimo sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji vidimo da su naši rezultati generalno podudarni sa literaturnom statistikom. Ipak, u našoj populaciji primetna je diskretno veća učestalost mutacija na -308. genskom lokusu, u heterozigotnom stanju, kako kod zdravih tako i kod obolelih osoba (Tabele 26, 27).

Tabela 26 – Distribucija genotipova obolelih osoba Srpske i Tajvanske populacije

Genotipovi	Oralni planocelularni karcinom	
	Srpska populacija (n=50) (Ilić)	Tajvanska populacija (n=192) (Liu, et al., 2005)
GG	35 (69%)	175 (91.2%)
GA	14 (29%)	16 (8.3%)
AA	1 (2%)	1 (0.5%)

Tabela 27 – Distribucija genotipova zdravih osoba različitih etničkih pripadnosti

Genotipovi	Zdrave osobe					
	Srpska populacija (n=125) (Ilić)	Tajvanska populacija (n=146) (Liu, et al., 2005)	Kineska populacija (n=220) (Wu, et al., 2003)	Korejska populacija (n=92) (Jang, et al., 2001)	Španska populacija (n=102) (Corbalán, et al., 2004)	Nemačka populacija (n=200) (Beranek, et al., 2003)
GG	89 (71%)	120 (82.2%)	180 (81.8%)	85 (92.4%)	84 (82.2%)	142 (71%)
GA	35 (29%)	24 (16.4%)	27 (12.3%)	7 (7.6%)	16 (15.7%)	57 (28%)
AA	1 (0.8%)	2 (1.4%)	13 (5.8%)	0	2 (1.9%)	1 (0.5%)

Ispitivanja polimorfizama u genima za TNF alfa receptore su nešto manje rađena nego u samom TNF alfa genu. Postoje studije koje su pokušale da povežu polimorfizme TNF-alfa receptora sa koncentracijom i pokretljivošću spermatozoida (Lazaros, et al., 2012), endometriozom (Chae, et al., 2008), reumatoidnim artitisom (Li, et al., 2014, Morales-Lara, et al., 2012, Swierkot, et al., 2015), spondilitisom (Chatzikyriakidou, et al., 2009), alkoholnim hepatitisom (Nguyen-Khac, et al., 2010) i drugim oboljenjima. Samo nekolicina studija se bavila ispitivanjem ovih SNP-ova u malignitetima. Tako su Lee i sar. povezali +676 SNP sa lošijim preživljavanjem pacijenata sa ne-sitnoćelijskim kancerom pluća, dok su Xu i saradnici, sasvim suprotno, utvrdili da mutirani alel G i genotip GT smanjuju mogućnost za nastanak kancera dojke (Lee, et al., 2013, Xu, et al., 2014). Yu i sar. su ustanovili da prisustvo drugog polimorfizma u TNF alfa R2 (rs1061624) utiče na nastanak kolorektalnog karcinoma (Yu, et al., 2014). U našoj studiji prisustvo alelnih formi gena u slučaju TNF alfa R1 nije pokazalo asocijaciju sa pojavom OPK, dok je SNP u genu za TNF alfa R2 faktor rizika za pojavu OPK (OR: 2.4) (Kostic, et al., 2013). Gupta i sar. su, sem ranije pomenute veze između TNF alfa i OPK, našli asocijaciju i između nekoliko polimorfizama u genima za TNF alfa receptore i OPK. Međutim, u tim ispitivanjima analizirani su različiti polimorfizmi TNF alfa receptora u odnosu na one ispitivane u ovoj studiji (Gupta, et al., 2008).

I polimorfizmi u genima za TNF alfa receptore pokazuju izrazitu varijabilnost u odnosu na geografsko poreklo i etničku pripadnost ispitanika različitih studija asocijacije. Ova činjenica jasno ukazuje na potrebu da svaka populacija mora da formira sopstvene baze podataka sa distribucijama alela i genotipova za najčešće funkcionalne polimorfizme u ključnim klasama gena.

Da bi se bolje sagledali uloga i značaj polimorfizama kao predisponirajućih naslednih faktora za nastanak epitelnih tumora usne duplje, neophodno je nastaviti sa ovom vrstom istraživanja na novim genima i na većem uzorku. Značaj ove studije ogleda se u činjenici da je u velikoj meri pionirska, kako iz ugla odabranih tumora, tako i iz ugla odabranih gena.

6. ZAKLJUČAK

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da:

- Polimorfizmi u genu za TNF α i TNF α -R1 predstavljaju izrazit faktor rizika za pojavu odontogenog keratocističnog tumora.
- Polimorfizmi u genu za MTHFR, GSTM1, TNF α -R2 ne predstavljaju faktor rizika za nastanak odontogenog keratocističnog tumora.
- Od planocelularnog karcinoma usne duplje najčešće oboljevaju osobe muškog pola, starije životne dobi (preko 50 godina). Najčešća lokalizacija tumora je na donjoj usni, jeziku ili podu usta.
- Delecioni polimorfizam u genu za GSTT1 predstavlja značajan faktor rizika za razvoj oralnog planocelularnog karcinoma.
- Polimorfizam u genu za TNF α R2 je značajan faktor rizika za oboljevanje od oralnog planocelularnog karcinoma.
- Polimorfizmi u genima za MTHFR, GSTM1, TNF α , TNF α R1 nisu modulatori rizika za nastanak oralnog planocelularnog karcinoma.

7. LITERATURA

Aksentijevich, I., J. Galon, M. Soares, E. Mansfield, K. Hull, H. H. Oh, R. Goldbach-Mansky, J. Dean, B. Athreya, A. J. Reginato, M. Henrickson, B. Pons-Estel, J. J. O'Shea, and D. L. Kastner. 'The Tumor-Necrosis-Factor Receptor-Associated Periodic Syndrome: New Mutations in *Tnfrsf1a*, Ancestral Origins, Genotype-Phenotype Studies, and Evidence for Further Genetic Heterogeneity of Periodic Fevers', *Am J Hum Genet* Vol. 69, No. 2, 301-14, 2001.

Amador, A. G., P. D. Righi, S. Radpour, E. T. Everett, E. Weisberger, M. Langer, G. J. Eckert, A. G. Christen, S. Campbell, D. J. Summerlin, N. Reynolds, and J. K. Hartsfield. 'Polymorphisms of Xenobiotic Metabolizing Genes in Oropharyngeal Carcinoma', *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* Vol. 93, No. 4, 440-5, 2002.

Amit, M., T. C. Yen, C. T. Liao, P. Chaturvedi, J. P. Agarwal, L. P. Kowalski, A. Ebrahimi, J. R. Clark, M. Kreppel, J. Zöllner, E. Fridman, V. A. Bolzoni, J. P. Shah, Y. Binenbaum, S. G. Patel, Z. Gil, and International Consortium for Outcome Research (ICOR) in Head and Neck Cancer. 'Improvement in Survival of Patients with Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: An International Collaborative Study', *Cancer* Vol. 119, No. 24, 4242-8, 2013.

Andric, M., N. Nikolic, M. Boskovic, B. Milicic, S. Skodric, G. Basta Jovanovic, and J. Milasin. 'Survivin Gene Promoter Polymorphism -31g/C as a Risk Factor for Keratocystic Odontogenic Tumor Development', *Eur J Oral Sci* Vol. 120, No. 1, 9-13, 2012.

Arruda, V. R., L. H. Siqueira, M. S. Gonçalves, P. M. von Zuben, M. C. Soares, R. Menezes, J. M. Annichino-Bizzacchi, and F. F. Costa. 'Prevalence of the Mutation C677 --> T in the Methylene Tetrahydrofolate Reductase Gene among Distinct Ethnic Groups in Brazil', *Am J Med Genet* Vol. 78, No. 4, 332-5, 1998.

Backlund, P. S., and R. A. Smith. 'Methionine Synthesis from 5'-Methylthioadenosine in Rat Liver', *J Biol Chem* Vol. 256, No. 4, 1533-5, 1981.

Bagan, J. V., and C. Scully. 'Recent Advances in Oral Oncology 2008; Squamous Cell Carcinoma Aetiopathogenesis and Experimental Studies', *Oral Oncol* Vol. 45, No. 7, e45-8, 2009.

Baker, E., L. Z. Chen, C. A. Smith, D. F. Callen, R. Goodwin, and G. R. Sutherland. 'Chromosomal Location of the Human Tumor Necrosis Factor Receptor Genes', *Cytogenet Cell Genet* Vol. 57, No. 2-3, 117-8, 1991.

Barreto, D. C., R. S. Gomez, A. E. Bale, W. L. Boson, and L. De Marco. 'Ptch Gene Mutations in Odontogenic Keratocysts', *J Dent Res* Vol. 79, No. 6, 1418-22, 2000.

Beranek, H., N. Teich, H. Witt, H. U. Schulz, J. Mössner, and V. Keim. 'Analysis of Tumour Necrosis Factor Alpha and Interleukin 10 Promotor Variants in Patients with Chronic Pancreatitis', *Eur J Gastroenterol Hepatol* Vol. 15, No. 11, 1223-7, 2003.

Bernstein, S. C., K. K. Lim, D. G. Brodland, and K. A. Heidelberg. 'The Many Faces of Squamous Cell Carcinoma', *Dermatol Surg* Vol. 22, No. 3, 243-54, 1996.

BINKLEY, G. W., and H. H. JOHNSON. 'Epithelioma Adenoides Cysticum; Basal Cell Nevi, Agenesis of the Corpus Callosum and Dental Cysts; a Clinical and Autopsy Study', *AMA Arch Derm Syphilol* Vol. 63, No. 1, 73-84, 1951.

Biselli, J. M., R. C. de Angelo Calsaverini Leal, M. T. Ruiz, E. M. Goloni-Bertollo, J. V. Maníglia, A. R. Rossit, and E. C. Pavarino-Bertelli. 'Gstt1 and Gstm1 Polymorphism in Cigarette Smokers with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *Braz J Otorhinolaryngol* Vol. 72, No. 5, 654-8, 2006.

Blot, W. J., S. S. Devesa, J. K. McLaughlin, and J. F. Fraumeni. 'Oral and Pharyngeal Cancers', *Cancer Surv* Vol. 19-20, 23-42, 1994.

Bodner, L., E. Manor, M. D. Friger, and I. van der Waal. 'Oral Squamous Cell Carcinoma in Patients Twenty Years of Age or Younger--Review and Analysis of 186 Reported Cases', *Oral Oncol* Vol. 50, No. 2, 84-9, 2014.

Booth, J., E. Boyland, and P. Sims. 'An Enzyme from Rat Liver Catalysing Conjugations with Glutathione', *Biochem J* Vol. 79, No. 3, 516-24, 1961.

Braakhuis, B. J., C. R. Leemans, and R. H. Brakenhoff. 'A Genetic Progression Model of Oral Cancer: Current Evidence and Clinical Implications', *J Oral Pathol Med* Vol. 33, No. 6, 317-22, 2004.

Braakhuis, B. J., M. P. Tabor, J. A. Kummer, C. R. Leemans, and R. H. Brakenhoff. 'A Genetic Explanation of Slaughter's Concept of Field Cancerization: Evidence and Clinical Implications', *Cancer Res* Vol. 63, No. 8, 1727-30, 2003.

Buch, S. C., P. N. Notani, and R. A. Bhisey. 'Polymorphism at Gstm1, Gstm3 and Gstm4 Gene Loci and Susceptibility to Oral Cancer in an Indian Population', *Carcinogenesis* Vol. 23, No. 5, 803-7, 2002.

Buchs, N., F. S. di Giovine, T. Silvestri, E. Vannier, G. W. Duff, and P. Miossec. 'IL-1b and IL-1ra Gene Polymorphisms and Disease Severity in Rheumatoid Arthritis: Interaction with Their Plasma Levels', *Genes Immun* Vol. 2, No. 4, 222-8, 2001.

Bănescu, C., M. Iancu, A. P. Trifa, I. Macarie, D. Dima, and M. Dobreanu. 'The Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr) 677 C>T Polymorphism Increases the Risk of Developing Chronic Myeloid Leukemia-a Case-Control Study', *Tumour Biol* Vol. 36, No. 4, 3101-7, 2015.

Califano, J., P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi, R. Corio, D. Lee, B. Greenberg, W. Koch, and D. Sidransky. 'Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization', *Cancer Res* Vol. 56, No. 11, 2488-92, 1996.

Castellsagué, X., M. J. Quintana, M. C. Martínez, A. Nieto, M. J. Sánchez, A. Juan, A. Monner, M. Carrera, A. Agudo, M. Quer, N. Muñoz, R. Herrero, S. Franceschi, and F. X. Bosch. 'The Role of Type of Tobacco and Type of Alcoholic Beverage in Oral Carcinogenesis', *Int J Cancer* Vol. 108, No. 5, 741-9, 2004.

Chae, S. J., H. Kim, B. C. Jee, C. S. Suh, S. H. Kim, and J. G. Kim. 'Tumor Necrosis Factor (Tnf)-Tnf Receptor Gene Polymorphisms and Their Serum Levels in Korean Women with Endometriosis', *Am J Reprod Immunol* Vol. 60, No. 5, 432-9, 2008.

Chatzikiyriakidou, A., I. Georgiou, P. V. Voulgari, and A. A. Drosos. 'The Role of Tumor Necrosis Factor (Tnf)-Alpha and Tnf Receptor Polymorphisms in Susceptibility to Ankylosing Spondylitis', *Clin Exp Rheumatol* Vol. 27, No. 4, 645-8, 2009.

Chen, S., Q. Wang, Z. Wu, Q. Wu, P. Li, Y. Li, J. Li, C. Deng, C. Wu, L. Gao, and F. Zhang. 'Associations between Tnf-A-308a/G Polymorphism and Susceptibility with Dermatomyositis: A Meta-Analysis', *PLoS One* Vol. 9, No. 8, e102841, 2014.

Chen, W., H. Zhu, L. Yu, Z. Lu, Z. Yao, and Y. Xiao. 'Tnf-A -308 G>a Polymorphism and Risk of Bone Marrow Failure Syndrome: A Meta-Analysis', *Gene* Vol. 565, No. 1, 1-8, 2015.

Chen, Z., L. Zhu, J. Zhang, H. Xu, X. Chen, J. Li, and Y. Shu. 'Tnf-A-308 G>a Polymorphism and Colorectal Cancer Risk: A Meta-Analysis', *Int J Colorectal Dis* Vol. 28, No. 3, 431-2, 2013.

Chhabra, N., S. Chhabra, and N. Sapra. 'Diagnostic Modalities for Squamous Cell Carcinoma: An Extensive Review of Literature-Considering Toluidine Blue as a Useful Adjunct', *J Maxillofac Oral Surg* Vol. 14, No. 2, 188-200, 2015.

COMBES, B., and G. S. STAKELUM. 'A Liver Enzyme That Conjugates Sulfobromophthalein Sodium with Glutathione', *J Clin Invest* Vol. 40, 981-8, 1961.

Corbalán, M. S., A. Marti, L. Forga, A. Patiño, M. A. Martínez-Gonzalez, and J. A. Martínez. 'Influence of Two Polymorphisms of the Tumoral Necrosis Factor-Alpha Gene on the Obesity Phenotype', *Diabetes Nutr Metab* Vol. 17, No. 1, 17-22, 2004.

Dieudé, P., J. Osorio, E. Petit-Teixeira, S. Moreno, S. Garnier, S. Cailleau-Moindrault, C. Stalens, S. Lasbleiz, T. Bardin, B. Prum, F. Cornélis, and European Consortium on Rheumatoid Arthritis Families. 'A Tnfr1 Genotype with a Protective Role in Familial Rheumatoid Arthritis', *Arthritis Rheum* Vol. 50, No. 2, 413-9, 2004.

Diniz, M. G., C. F. Galvão, P. S. Macedo, C. C. Gomes, and R. S. Gomez. 'Evidence of Loss of Heterozygosity of the Ptch Gene in Orthokeratinized Odontogenic Cyst', *J Oral Pathol Med* Vol. 40, No. 3, 277-80, 2011.

Doll, R., and R. Peto. 'The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today', *J Natl Cancer Inst* Vol. 66, No. 6, 1191-308, 1981.

Duthie, S. J. 'Folic Acid Deficiency and Cancer: Mechanisms of Dna Instability', *Br Med Bull* Vol. 55, No. 3, 578-92, 1999.

Eshghyar, N., B. Nikbin, A. Amirzargar, A. Dehghani Nazhvani, and Y. Shakiba. 'Gene Polymorphism of Interleukin-1 Alpha and Beta in Keratocystic Odontogenic Tumors', *J Oral Pathol Med* Vol. 41, No. 9, 697-701, 2012.

Esposito, E., and S. Cuzzocrea. 'Anti-Tnf Therapy in the Injured Spinal Cord', *Trends Pharmacol Sci* Vol. 32, No. 2, 107-15, 2011.

Fabris, M., B. Tolusso, E. Di Poi, R. Assaloni, L. Sinigaglia, and G. Ferraccioli. 'Tumor Necrosis Factor-Alpha Receptor Ii Polymorphism in Patients from Southern Europe with Mild-Moderate and Severe Rheumatoid Arthritis', *J Rheumatol* Vol. 29, No. 9, 1847-50, 2002.

Ferrajoli, A., M. J. Keating, T. Manshour, F. J. Giles, A. Dey, Z. Estrov, C. A. Koller, R. Kurzrock, D. A. Thomas, S. Faderl, S. Lerner, S. O'Brien, and M. Albitar. 'The Clinical Significance of Tumor Necrosis Factor-Alpha Plasma Level in Patients Having Chronic Lymphocytic Leukemia', *Blood* Vol. 100, No. 4, 1215-9, 2002.

Forsell, K. 'The Primordial Cyst. A Clinical and Radiographic Study', *Proc Finn Dent Soc* Vol. 76, No. 3, 129-74, 1980.

Franceschi, S., E. Bidoli, R. Herrero, and N. Muñoz. 'Comparison of Cancers of the Oral Cavity and Pharynx Worldwide: Etiological Clues', *Oral Oncol* Vol. 36, No. 1, 106-15, 2000.

Friso, S., S. W. Choi, D. Girelli, J. B. Mason, G. G. Dolnikowski, P. J. Bagley, O. Olivieri, P. F. Jacques, I. H. Rosenberg, R. Corrocher, and J. Selhub. 'A Common Mutation in the 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Affects Genomic Dna Methylation through an Interaction with Folate Status', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 99, No. 8, 5606-11, 2002.

Galbiatti, A. L., L. M. da Silva, M. T. Ruiz-Cintra, L. S. Raposo, J. V. Maníglia, E. C. Pavarino, and E. M. Goloni-Bertollo. 'Association between 11 Genetic Polymorphisms in Folate-Metabolising Genes and Head and Neck Cancer Risk', *Eur J Cancer* Vol. 48, No. 10, 1525-31, 2012.

Garte, S., L. Gaspari, A. K. Alexandrie, C. Ambrosone, H. Autrup, J. L. Autrup, H. Baranova, L. Bathum, S. Benhamou, P. Boffetta, C. Bouchardy, K. Breskvar, J. Brockmoller, I. Cascorbi, M. L. Clapper, C. Coutelle, A. Daly, M. Dell'Omo, V. Dolzan, C. M. Dresler, A. Fryer, A. Haugen, D. W. Hein, A. Hildesheim, A. Hirvonen, L. L. Hsieh, M. Ingelman-Sundberg, I. Kalina, D. Kang, M. Kihara, C. Kiyohara, P. Kremers, P. Lazarus, L. Le Marchand, M. C. Lechner, E. M. van Lieshout, S. London, J. J. Manni, C. M. Maugard, S. Morita, V. Nazar-Stewart, K. Noda, Y. Oda, F. F. Parl, R. Pastorelli, I. Persson, W. H. Peters, A. Rannug, T. Rebbeck, A. Risch, L. Roelandt, M. Romkes, D. Ryberg, J. Salagovic, B. Schoket, J. Seidegard, P. G. Shields, E. Sim, D. Sinnet, R. C. Strange, I. Stücker, H. Sugimura, J. To-Figueras, P. Vineis, M. C. Yu, and E. Taioli. 'Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* Vol. 10, No. 12, 1239-48, 2001.

Gattás, G. J., M. B. de Carvalho, M. S. Siraque, O. A. Curioni, P. Kohler, J. Eluf-Neto, and V. Wünsch-Filho. 'Genetic Polymorphisms of Cyp1a1, Cyp2e1, Gstm1, and Gstm1 Associated with Head and Neck Cancer', *Head Neck* Vol. 28, No. 9, 819-26, 2006.

Gaur, U., and B. B. Aggarwal. 'Regulation of Proliferation, Survival and Apoptosis by Members of the Tnf Superfamily', *Biochem Pharmacol* Vol. 66, No. 8, 1403-8, 2003.

Ghali, G. E., and M. S. Connor. 'Surgical Management of the Odontogenic Keratocyst', *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* Vol. 15, No. 3, 383-92, 2003.

Giovannetti, E., D. G. Ugrasena, E. Supriyadi, L. Vroiling, A. Azzarello, D. de Lange, G. J. Peters, A. J. Veerman, and J. Cloos. 'Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr) C677t and Thymidylate Synthase Promoter (Tser) Polymorphisms in Indonesian Children with and without Leukemia', *Leuk Res* Vol. 32, No. 1, 19-24, 2008.

Gonzalez, F. J., and A. M. Yu. 'Cytochrome P450 and Xenobiotic Receptor Humanized Mice', *Annu Rev Pharmacol Toxicol* Vol. 46, 41-64, 2006.

GORLIN, R. J., and R. W. GOLTZ. 'Multiple Nevoid Basal-Cell Epithelioma, Jaw Cysts and Bifid Rib. A Syndrome', *N Engl J Med* Vol. 262, 908-12, 1960.

Goyette, P., A. Pai, R. Milos, P. Frosst, P. Tran, Z. Chen, M. Chan, and R. Rozen. 'Gene Structure of Human and Mouse Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr)', *Mamm Genome* Vol. 9, No. 8, 652-6, 1998.

Gu, X. M., H. S. Zhao, L. S. Sun, and T. J. Li. 'Ptch Mutations in Sporadic and Gorlin-Syndrome-Related Odontogenic Keratocysts', *J Dent Res* Vol. 85, No. 9, 859-63, 2006.

Guo, X. F., J. Wang, S. J. Yu, J. Song, M. Y. Ji, Z. Cao, J. X. Zhang, and W. G. Dong. 'Tnf-A-308 Polymorphism and Risk of Digestive System Cancers: A Meta-Analysis', *World J Gastroenterol* Vol. 19, No. 48, 9461-71, 2013.

Gupta, R., S. C. Sharma, and S. N. Das. 'Association of Tnf-Alpha and Tnfr1 Promoters and 3' Utr Region of Tnfr2 Gene Polymorphisms with Genetic Susceptibility to Tobacco-Related Oral Carcinoma in Asian Indians', *Oral Oncol* Vol. 44, No. 5, 455-63, 2008.

Hajeer, A. H., and I. V. Hutchinson. 'Tnf-Alpha Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications', *Microsc Res Tech* Vol. 50, No. 3, 216-28, 2000.

Hamed, L. M., D. T. Tse, J. S. Glaser, S. F. Byrne, and N. J. Schatz. 'Neuroimaging of the Optic Nerve after Fenestration for Management of Pseudotumor Cerebri', *Arch Ophthalmol* Vol. 110, No. 5, 636-9, 1992.

Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 'The Hallmarks of Cancer', *Cell* Vol. 100, No. 1, 57-70, 2000.

Hayashi, M., T. Ohshima, M. Ohshima, Y. Yamaguchi, H. Miyata, O. Takeichi, B. Ogiso, K. Ito, A. Ostman, and K. Otsuka. 'Profiling of Radicular Cyst and Odontogenic Keratocyst Cytokine Production Suggests Common Growth Mechanisms', *J Endod* Vol. 34, No. 1, 14-21, 2008.

Hayes, J. D., and L. I. McLellan. 'Glutathione and Glutathione-Dependent Enzymes Represent a Co-Ordinately Regulated Defence against Oxidative Stress', *Free Radic Res* Vol. 31, No. 4, 273-300, 1999.

Hoffmeister, B., and F. Härle. '[Cysts in the Maxillofacial Region--a Catamnestic Study on 3353 Cysts]', *Dtsch Zahnarztl Z* Vol. 40, No. 6, 610-4, 1985.

Honma, M., Y. Ohishi, J. Uehara, M. Ibe, M. Kinouchi, A. Ishida-Yamamoto, and H. Iizuka. 'A Novel Ptch1 Mutation in a Patient of Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome', *J Dermatol Sci* Vol. 50, No. 1, 73-5, 2008.

Jacob, C. O. 'Tumor Necrosis Factor Alpha in Autoimmunity: Pretty Girl or Old Witch?', *Immunol Today* Vol. 13, No. 4, 122-5, 1992.

Jang, W. H., Y. I. Yang, S. S. Yea, Y. J. Lee, J. H. Chun, H. I. Kim, M. S. Kim, and K. H. Paik. 'The -238 Tumor Necrosis Factor-Alpha Promoter Polymorphism Is Associated with Decreased Susceptibility to Cancers', *Cancer Lett* Vol. 166, No. 1, 41-6, 2001.

Jarungrongruangchai, W., M. Charoenpitakchai, T. Silpeeyodom, C. Pruksapong, and C. Burusapat. 'Size of Cervical Lymph Node and Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue and Floor of Mouth', *J Med Assoc Thai* Vol. 97 Suppl 2, S101-6, 2014.

Jeon, Y. J., J. W. Kim, H. M. Park, J. O. Kim, H. G. Jang, J. Oh, S. G. Hwang, S. W. Kwon, D. Oh, and N. K. Kim. 'Genetic Variants in 3'-Utrs of Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr) Predict Colorectal Cancer Susceptibility in Koreans', *Sci Rep* Vol. 5, 11006, 2015.

Jevtovic-Stoimenov, T., G. Kocic, D. Pavlovic, L. Macukanovic-Golubovic, G. Marjanovic, V. Djordjevic, N. Tosić, and S. Pavlović. 'Polymorphisms of Tumor-Necrosis Factor-Alpha - 308 and Lymphotoxin-Alpha + 250: Possible Modulation of Susceptibility to Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia and Non-Hodgkin Lymphoma Mononuclear Cells', *Leuk Lymphoma* Vol. 49, No. 11, 2163-9, 2008.

Jia, J., Z. Ma, and S. Wu. 'Positive Association between Mthfr C677t Polymorphism and Oral Cancer Risk: A Meta-Analysis', *Tumour Biol* Vol. 35, No. 5, 4943-8, 2014.

Jones, A. V., G. T. Craig, and C. D. Franklin. 'Range and Demographics of Odontogenic Cysts Diagnosed in a Uk Population over a 30-Year Period', *J Oral Pathol Med* Vol. 35, No. 8, 500-7, 2006.

Kalkan, G., N. Karakus, and S. Yigit. 'Association of Mthfr Gene C677t Mutation with Recurrent Aphthous Stomatitis and Number of Oral Ulcers', *Clin Oral Investig* Vol. 18, No. 2, 437-41, 2014.

Kao, S. Y., L. Mao, X. C. Jian, G. Rajan, and G. Y. Yu. 'Expert Consensus on the Detection and Screening of Oral Cancer and Precancer', *Chin J Dent Res* Vol. 18, No. 2, 79-83, 2015.

Kawakita, D., K. Matsuo, F. Sato, I. Oze, S. Hosono, H. Ito, M. Watanabe, Y. Yatabe, N. Hanai, Y. Hasegawa, K. Tajima, S. Murakami, and H. Tanaka. 'Association

between Dietary Folate Intake and Clinical Outcome in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *Ann Oncol* Vol. 23, No. 1, 186-92, 2012.

Kelada, S. N., D. L. Eaton, S. S. Wang, N. R. Rothman, and M. J. Khoury. 'The Role of Genetic Polymorphisms in Environmental Health', *Environ Health Perspect* Vol. 111, No. 8, 1055-64, 2003.

Koch, F. P., P. W. Kämmerer, P. Kämmerer, B. Al-Nawas, and J. Brieger. 'Influence of Class M1 Glutathione S-Transferase (Gst Mu) Polymorphism on Gst M1 Gene Expression Level and Tumor Size in Oral Squamous Cell Carcinoma', *Oral Oncol* Vol. 46, No. 2, 128-33, 2010.

Kondo, Y., and J. P. Issa. 'Epigenetic Changes in Colorectal Cancer', *Cancer Metastasis Rev* Vol. 23, No. 1-2, 29-39, 2004.

Kostic, M., N. Nikolic, B. Ilic, D. Jelovac, S. Trakilovic, M. Bozovic, and J. Milasin. 'Association of Tnf-R2 (676T>G) Single Nucleotide Polymorphism with Head and Neck Cancer Risk in the Serbian Population', (Ed.)^(Eds.), *Arch.Biol.Sci.*, 2013.

Krajcik, R. A., S. Massardo, and N. Orentreich. 'No Association between Serum Levels of Tumor Necrosis Factor-Alpha (Tnf-Alpha) or the Soluble Receptors Stnfr1 and Stnfr2 and Breast Cancer Risk', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* Vol. 12, No. 9, 945-6, 2003.

Kriegler, M., C. Perez, K. DeFay, I. Albert, and S. D. Lu. 'A Novel Form of Tnf/Cachectin Is a Cell Surface Cytotoxic Transmembrane Protein: Ramifications for the Complex Physiology of Tnf', *Cell* Vol. 53, No. 1, 45-53, 1988.

Krishna, A., S. Singh, V. Kumar, and U. S. Pal. 'Molecular Concept in Human Oral Cancer', *Natl J Maxillofac Surg* Vol. 6, No. 1, 9-15, 2015.

Krüger, M., A. M. Pabst, B. Mahmoodi, B. Becker, P. W. Kämmerer, and F. P. Koch. 'The Impact of Gstm1/Gstt1 Polymorphism for the Risk of Oral Cancer', *Clin Oral Investig* Vol. 19, No. 8, 1791-7, 2015.

Körner, H., E. Cretney, P. Wilhelm, J. M. Kelly, M. Röllinghoff, J. D. Sedgwick, and M. J. Smyth. 'Tumor Necrosis Factor Sustains the Generalized Lymphoproliferative Disorder (Gld) Phenotype', *J Exp Med* Vol. 191, No. 1, 89-96, 2000.

Landis, S. H., T. Murray, S. Bolden, and P. A. Wingo. 'Cancer Statistics, 1999', *CA Cancer J Clin* Vol. 49, No. 1, 8-31, 1999.

Lazaros, L. A., N. V. Xita, A. L. Chatzikiyriakidou, A. I. Kaponis, N. G. Grigoriadis, E. G. Hatzi, I. G. Grigoriadis, N. V. Sofikitis, K. A. Zikopoulos, and I. A. Georgiou. 'Association of Tnf α , Tnfr1, and Tnfr2 Polymorphisms with Sperm Concentration and Motility', *J Androl* Vol. 33, No. 1, 74-80, 2012.

Lee, S. Y., H. G. Kang, S. S. Yoo, Y. R. Kang, Y. Y. Choi, W. K. Lee, J. E. Choi, H. S. Jeon, K. M. Shin, I. J. Oh, K. S. Kim, J. Lee, S. I. Cha, C. H. Kim, Y. C. Kim, and J. Y. Park. 'Polymorphisms in Dna Repair and Apoptosis-Related Genes and Clinical Outcomes of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Treated with First-Line Paclitaxel-Cisplatin Chemotherapy', *Lung Cancer* Vol. 82, No. 2, 330-9, 2013.

Lee, Y. H., S. J. Choi, J. D. Ji, and G. G. Song. 'Association between Tnf-A Promoter -308 a/G Polymorphism and Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis', *Neurol Sci* Vol. 36, No. 6, 825-32, 2015.

Lewis, D. F., C. Ioannides, and D. V. Parke. 'Cytochromes P450 and Species Differences in Xenobiotic Metabolism and Activation of Carcinogen', *Environ Health Perspect* Vol. 106, No. 10, 633-41, 1998.

Li, F., J. Gao, J. Sokolove, J. Xu, J. Zheng, K. Zhu, and Z. Pan. 'Polymorphisms in the Tnf-A, Tnfr1 Gene and Risk of Rheumatoid Arthritis in Chinese Han Population', *Int J Immunogenet* Vol. 41, No. 6, 499-502, 2014.

Li, T. J. 'The Odontogenic Keratocyst: A Cyst, or a Cystic Neoplasm?', *J Dent Res* Vol. 90, No. 2, 133-42, 2011.

Li, X. M., Y. F. Wei, H. L. Hao, Y. B. Hao, L. S. He, J. D. Li, B. Mei, S. Y. Wang, C. Wang, J. X. Wang, J. Z. Zhu, and J. Q. Liang. 'Hyperhomocysteinemia and the Mthfr C677t Mutation in Budd-Chiari Syndrome', *Am J Hematol* Vol. 71, No. 1, 11-4, 2002.

Lin, C. H., S. Y. Hsieh, I. S. Sheen, W. C. Lee, T. C. Chen, W. C. Shyu, and Y. F. Liaw. 'Genome-Wide Hypomethylation in Hepatocellular Carcinogenesis', *Cancer Res* Vol. 61, No. 10, 4238-43, 2001.

Lin, J., M. R. Spitz, Y. Wang, M. B. Schabath, I. P. Gorlov, L. M. Hernandez, P. C. Pillow, H. B. Grossman, and X. Wu. 'Polymorphisms of Folate Metabolic Genes and Susceptibility to Bladder Cancer: A Case-Control Study', *Carcinogenesis* Vol. 25, No. 9, 1639-47, 2004.

Lin, J., R. M. Zeng, R. N. Li, and W. H. Cao. 'Aberrant Dna Methylation of the P16, Mgmt, and Hmlh1 Genes in Combination with the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677t Genetic Polymorphism and Folate Intake in Gastric Cancer', *Genet Mol Res* Vol. 13, No. 1, 2060-8, 2014.

Lindström, E., T. Shimokawa, R. Toftgård, and P. G. Zaphiropoulos. 'Ptch Mutations: Distribution and Analyses', *Hum Mutat* Vol. 27, No. 3, 215-9, 2006.

Liu, C. J., Y. K. Wong, K. W. Chang, H. C. Chang, H. F. Liu, and Y. J. Lee. 'Tumor Necrosis Factor-Alpha Promoter Polymorphism Is Associated with Susceptibility to Oral Squamous Cell Carcinoma', *J Oral Pathol Med* Vol. 34, No. 10, 608-12, 2005.

Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 'The Tnf and Tnf Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology', *Cell* Vol. 104, No. 4, 487-501, 2001.

Lu, Y., Y. Zhao, G. Liu, X. Wang, Z. Liu, B. Chen, and R. Hui. 'Factor V Gene G1691a Mutation, Prothrombin Gene G20210a Mutation, and Mthfr Gene C677t Mutation Are Not Risk Factors for Pulmonary Thromboembolism in Chinese Population', *Thromb Res* Vol. 106, No. 1, 7-12, 2002.

Macek, M. D., and J. A. Yellowitz. 'Oral Cancer Examinations among Smokers and Moderate-Heavy Drinkers, United States, 2008', *J Public Health Dent* Vol. 73, No. 4, 280-8, 2013.

Madeleine, M. M., L. G. Johnson, M. Malkki, A. J. Resler, E. W. Petersdorf, B. McKnight, and K. E. Malone. 'Genetic Variation in Proinflammatory Cytokines Il6, Il6r, Tnf-Region, and Tnfrsf1a and Risk of Breast Cancer', *Breast Cancer Res Treat* Vol. 129, No. 3, 887-99, 2011.

Madras, J., and H. Lapointe. 'Keratocystic Odontogenic Tumour: Reclassification of the Odontogenic Keratocyst from Cyst to Tumour', *J Can Dent Assoc* Vol. 74, No. 2, 165-165h, 2008.

Maier, H., and H. Weidauer. '[Alcohol Drinking and Tobacco Smoking Are the Chief Risk Factors for Ent Tumors. Increased Incidence of Mouth Cavity, Pharyngeal and Laryngeal Carcinomas]', *Fortschr Med* Vol. 113, No. 11, 157-60, 1995.

Main, D. M. 'The Enlargement of Epithelial Jaw Cysts', *Odontol Revy* Vol. 21, No. 1, 29-49, 1970.

Masood, N., F. A. Malik, and M. A. Kayani. 'Expression of Xenobiotic Metabolizing Genes in Head and Neck Cancer Tissues', *Asian Pac J Cancer Prev* Vol. 12, No. 2, 377-82, 2011.

Meara, J. G., K. K. Li, S. S. Shah, and M. J. Cunningham. 'Odontogenic Keratocysts in the Pediatric Population', *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* Vol. 122, No. 7, 725-8, 1996.

Meng, N., Y. Zhang, H. Li, J. Ma, and Y. Qu. 'Association of Tumor Necrosis Factor Alpha Promoter Polymorphism (Tnf-A 238 G/a and Tnf-A 308 G/a) with Diabetic Mellitus, Diabetic Retinopathy and Diabetic Nephropathy: A Meta-Analysis', *Curr Eye Res* Vol. 39, No. 2, 194-203, 2014.

Menon, R., D. R. Velez, P. Thorsen, I. Vogel, B. Jacobsson, S. M. Williams, and S. J. Fortunato. 'Ethnic Differences in Key Candidate Genes for Spontaneous Preterm Birth: Tnf-Alpha and Its Receptors', *Hum Hered* Vol. 62, No. 2, 107-18, 2006.

Michalaki, V., K. Syrigos, P. Charles, and J. Waxman. 'Serum Levels of Il-6 and Tnf-Alpha Correlate with Clinicopathological Features and Patient Survival in Patients with Prostate Cancer', *Br J Cancer* Vol. 90, No. 12, 2312-6, 2004.

Miri-Moghaddam, E., S. Saravani, Y. Garame, A. Khosravi, A. Bazi, and J. Motazedian. 'Methylenetetrahydrofolate Reductase C677t and A1298c Gene Polymorphisms in Oral Squamous Cell Carcinoma In south-East Iran', *J Oral Pathol Med*, 2015.

Mishra, R. 'Glycogen Synthase Kinase 3 Beta: Can It Be a Target for Oral Cancer', *Mol Cancer* Vol. 9, 144, 2010.

Mocellin, S., C. R. Rossi, P. Pilati, and D. Nitti. 'Tumor Necrosis Factor, Cancer and Anticancer Therapy', *Cytokine Growth Factor Rev* Vol. 16, No. 1, 35-53, 2005.

Morales-Lara, M. J., J. D. Cañete, D. Torres-Moreno, M. V. Hernández, F. Pedrero, R. Celis, M. S. García-Simón, and P. Conesa-Zamora. 'Effects of Polymorphisms in Trailr1 and Tnfr1a on the Response to Anti-Tnf Therapies in Patients with Rheumatoid and Psoriatic Arthritis', *Joint Bone Spine* Vol. 79, No. 6, 591-6, 2012.

Morelli, V. M., D. M. Lourenço, V. D'Almeida, R. F. Franco, F. Miranda, M. A. Zago, M. A. Noguti, E. Cruz, and J. Kerbauy. 'Hyperhomocysteinemia Increases the Risk of Venous Thrombosis Independent of the C677t Mutation of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Selected Brazilian Patients', *Blood Coagul Fibrinolysis* Vol. 13, No. 3, 271-5, 2002.

Morgan, T. A., C. C. Burton, and F. Qian. 'A Retrospective Review of Treatment of the Odontogenic Keratocyst', *J Oral Maxillofac Surg* Vol. 63, No. 5, 635-9, 2005.

Morse, D. E., R. V. Katz, D. G. Pendrys, T. R. Holford, D. J. Krutchkoff, E. Eisenberg, D. Kosis, and S. T. Mayne. 'Smoking and Drinking in Relation to Oral Epithelial Dysplasia', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* Vol. 5, No. 10, 769-77, 1996.

Moulin, J. J., J. M. Mur, and C. Cavelier. '[Comparative Epidemiology, in Europe, of Cancers Related to Tobacco (Lung, Larynx, Pharynx, Oral Cavity)]', *Bull Cancer* Vol. 72, No. 2, 155-8, 1985.

Murugan, A. K., A. K. Munirajan, and N. Tsuchida. 'Ras Oncogenes in Oral Cancer: The Past 20 Years', *Oral Oncol* Vol. 48, No. 5, 383-92, 2012.

Müller, U., C. V. Jongeneel, S. A. Nedospasov, K. F. Lindahl, and M. Steinmetz. 'Tumour Necrosis Factor and Lymphotoxin Genes Map Close to H-2d in the Mouse Major Histocompatibility Complex', *Nature* Vol. 325, No. 6101, 265-7, 1987.

Nasiri, H., S. Farajnia, A. Rezamand, A. A. Movassaghpour, H. A. Esmaeili, A. Monfaredan, N. Mobarra, N. Rahimifar, L. Sahebi, and M. Farshdousti Hagh. 'Genetic

Variations of Tumor Necrosis Factor -A-308 and Lymphotoxin-A+252 in Non-Hodgkin Lymphoma and Acute Lymphoblastic Leukemia Patients', *Iran J Basic Med Sci* Vol. 16, No. 9, 990-5, 2013.

Neville, B. W. 'Update on Current Trends in Oral and Maxillofacial Pathology', *Head Neck Pathol* Vol. 1, No. 1, 75-80, 2007.

Nguyen-Khac, E., H. Houchi, M. Daoust, J. L. Dupas, and M. Naassila. 'Lack of Association between Tumour Necrosis Factor Receptor Types 1 and 2 Gene Polymorphism and Severe Acute Alcoholic Hepatitis', *Eur J Gastroenterol Hepatol* Vol. 22, No. 7, 794-800, 2010.

Ninomiya, T., Y. Kubota, T. Koji, and K. Shirasuna. 'Marsupialization Inhibits Interleukin-1alpha Expression and Epithelial Cell Proliferation in Odontogenic Keratocysts', *J Oral Pathol Med* Vol. 31, No. 9, 526-33, 2002.

Nishigaki, M., K. Aoyagi, I. Danjoh, M. Fukaya, K. Yanagihara, H. Sakamoto, T. Yoshida, and H. Sasaki. 'Discovery of Aberrant Expression of R-Ras by Cancer-Linked Dna Hypomethylation in Gastric Cancer Using Microarrays', *Cancer Res* Vol. 65, No. 6, 2115-24, 2005.

Niu, Y. M., M. H. Deng, W. Chen, X. T. Zeng, and J. Luo. 'Mthfr C677t Gene Polymorphism and Head and Neck Cancer Risk: A Meta-Analysis Based on 23 Publications', *Dis Markers* Vol. 2015, 681313, 2015.

Novick, M., D. A. Gard, S. B. Hardy, and M. Spira. 'Burn Scar Carcinoma: A Review and Analysis of 46 Cases', *J Trauma* Vol. 17, No. 10, 809-17, 1977.

Omura, K. 'Current Status of Oral Cancer Treatment Strategies: Surgical Treatments for Oral Squamous Cell Carcinoma', *Int J Clin Oncol* Vol. 19, No. 3, 423-30, 2014.

Oppenheim, J. J. 'Cytokines: Past, Present, and Future', *Int J Hematol* Vol. 74, No. 1, 3-8, 2001.

Pantelidis, P., P. A. Lympny, P. J. Foley, G. C. Fanning, K. I. Welsh, and R. M. du Bois. 'Polymorphic Analysis of the High-Affinity Tumor Necrosis Factor Receptor 2', *Tissue Antigens* Vol. 54, No. 6, 585-91, 1999.

Park, T. J., H. J. Kim, J. H. Kim, J. S. Bae, H. S. Cheong, B. L. Park, and H. D. Shin. 'Associations of Cd6, Tnfrsf1a and Irf8 Polymorphisms with Risk of Inflammatory Demyelinating Diseases', *Neuropathol Appl Neurobiol* Vol. 39, No. 5, 519-30, 2013.

Pasanen, M., P. Pellinen, F. Stenbäck, R. O. Juvonen, H. Raunio, and O. Pelkonen. 'The Role of Cyp Enzymes in Cocaine-Induced Liver Damage', *Arch Toxicol* Vol. 69, No. 5, 287-90, 1995.

Peng, J., H. Z. Liu, and Y. J. Zhu. 'Null Glutathione S-Transferase T1 and M1 Genotypes and Oral Cancer Susceptibility in China and India--a Meta-Analysis', *Asian Pac J Cancer Prev* Vol. 15, No. 1, 287-90, 2014.

Perry, B. J., A. P. Zammit, A. W. Lewandowski, J. J. Bashford, A. S. Dragovic, E. J. Perry, R. Hayatbakhsh, and C. F. Perry. 'Sites of Origin of Oral Cavity Cancer in Nonsmokers Vs Smokers: Possible Evidence of Dental Trauma Carcinogenesis and Its Importance Compared with Human Papillomavirus', *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* Vol. 141, No. 1, 5-11, 2015.

PINDBORG, J. J., and J. HANSEN. 'Studies on Odontogenic Cyst Epithelium. 2. Clinical and Roentgenologic Aspects of Odontogenic Keratocysts', *Acta Pathol Microbiol Scand* Vol. 58, 283-94, 1963.

- Pires, F. R., A. B. Ramos, J. B. Oliveira, A. S. Tavares, P. S. Luz, and T. C. Santos. 'Oral Squamous Cell Carcinoma: Clinicopathological Features from 346 Cases from a Single Oral Pathology Service During an 8-Year Period', *J Appl Oral Sci* Vol. 21, No. 5, 460-7, 2013.
- Pogrel, M. A. 'The Keratocystic Odontogenic Tumour (Kcot)-an Odyssey', *Int J Oral Maxillofac Surg* Vol. 44, No. 12, 1565-8, 2015.
- Pérez-Sayáns, M., J. M. Suárez-Peñaranda, E. Padín-Iruegas, P. Gayoso-Diz, M. Reis-De Almeida, F. Barros-Angueira, P. Gándara-Vila, A. Blanco-Carrión, and A. García-García. 'Quantitative Determination of C-Myc Facilitates the Assessment of Prognosis of Ossc Patients', *Oncol Rep* Vol. 31, No. 4, 1677-82, 2014.
- Reff-Eberwein, G., K. Donath, and R. Schmitz. '[Odontogenic Keratocysts (Okc). Histologic and Clinical Follow-up Studies]', *Dtsch Zahnarztl Z* Vol. 40, No. 6, 514-20 passim, 1985.
- Reichart, P. A. 'Identification of Risk Groups for Oral Precancer and Cancer and Preventive Measures', *Clin Oral Investig* Vol. 5, No. 4, 207-13, 2001.
- Rettig, E. M., and G. D'Souza. 'Epidemiology of Head and Neck Cancer', *Surg Oncol Clin N Am* Vol. 24, No. 3, 379-96, 2015.
- Ribeiro, I. P., F. Marques, F. Caramelo, J. Pereira, M. Patrício, H. Prazeres, J. Ferrão, M. J. Julião, M. Castelo-Branco, J. B. de Melo, I. P. Baptista, and I. M. Carreira. 'Genetic Gains and Losses in Oral Squamous Cell Carcinoma: Impact on Clinical Management', *Cell Oncol (Dordr)* Vol. 37, No. 1, 29-39, 2014.
- Rodrigues, J. O., A. L. Galbiatti, M. T. Ruiz, L. S. Raposo, J. V. Maniglia, E. C. Pavarino-Bertelli, and E. M. Goloni-Bertollo. 'Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr) Gene and Risk of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *Braz J Otorhinolaryngol* Vol. 76, No. 6, 776-82, 2010.
- Rowe, J. D., E. Nieves, and I. Listowsky. 'Subunit Diversity and Tissue Distribution of Human Glutathione S-Transferases: Interpretations Based on Electrospray Ionization-Ms and Peptide Sequence-Specific Antisera', *Biochem J* Vol. 325 (Pt 2), 481-6, 1997.
- Sailasree, R., K. R. Nalinakumari, P. Sebastian, and S. Kannan. 'Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms in Oral Cancer Patients', *J Oral Pathol Med* Vol. 40, No. 1, 61-6, 2011.
- Sand, L., and J. Jalouli. 'Viruses and Oral Cancer. Is There a Link?', *Microbes Infect* Vol. 16, No. 5, 371-8, 2014.
- Sashio, H., K. Tamura, R. Ito, Y. Yamamoto, H. Bamba, T. Kosaka, S. Fukui, K. Sawada, Y. Fukuda, M. Satomi, T. Shimoyama, and J. Furuyama. 'Polymorphisms of the Tnf Gene and the Tnf Receptor Superfamily Member 1b Gene Are Associated with Susceptibility to Ulcerative Colitis and Crohn's Disease, Respectively', *Immunogenetics* Vol. 53, No. 12, 1020-7, 2002.
- Schmidt, B. L., and M. A. Pogrel. 'The Use of Enucleation and Liquid Nitrogen Cryotherapy in the Management of Odontogenic Keratocysts', *J Oral Maxillofac Surg* Vol. 59, No. 7, 720-5; discussion 726-7, 2001.
- Schwartz, S. M., D. S. Siscovick, M. R. Malinow, F. R. Rosendaal, R. K. Beverly, D. L. Hess, B. M. Psaty, W. T. Longstreth, T. D. Koepsell, T. E. Raghunathan, and P. H. Reitsma. 'Myocardial Infarction in Young Women in Relation to Plasma Total Homocysteine, Folate, and a Common Variant in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene', *Circulation* Vol. 96, No. 2, 412-7, 1997.

Sefri, H., H. Benrahma, H. Charoute, F. Lakbakbi el Yaagoubi, H. Rouba, B. Lyoussi, J. Nourlil, O. Abidi, and A. Barakat. 'Tnf a -308g>a Polymorphism in Moroccan Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Case-Control Study and Meta-Analysis', *Mol Biol Rep* Vol. 41, No. 9, 5805-11, 2014.

Sengüven, B., and T. Oygür. 'Investigation of Interleukin-1 Alpha and Interleukin-6 Expression and Interleukin-1 Alpha Gene Polymorphism in Keratocystic Odontogenic Tumors and Ameloblastomas', *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* Vol. 16, No. 4, e467-72, 2011.

Sheehan, D., G. Meade, V. M. Foley, and C. A. Dowd. 'Structure, Function and Evolution of Glutathione Transferases: Implications for Classification of Non-Mammalian Members of an Ancient Enzyme Superfamily', *Biochem J* Vol. 360, No. Pt 1, 1-16, 2001.

Shukla, D., A. Dinesh Kale, S. Hallikerimath, V. Yerramalla, V. Subbiah, and S. Mishra. 'Association between Gstm1 and Cyp1a1 Polymorphisms and Survival in Oral Cancer Patients', *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* Vol. 157, No. 4, 304-10, 2013.

Simard, E. P., L. A. Torre, and A. Jemal. 'International Trends in Head and Neck Cancer Incidence Rates: Differences by Country, Sex and Anatomic Site', *Oral Oncol* Vol. 50, No. 5, 387-403, 2014.

Singh, M., P. P. Shah, A. P. Singh, M. Ruwali, N. Mathur, M. C. Pant, and D. Parmar. 'Association of Genetic Polymorphisms in Glutathione S-Transferases and Susceptibility to Head and Neck Cancer', *Mutat Res* Vol. 638, No. 1-2, 184-94, 2008.

Slabbert, H., M. Shear, and M. Altini. 'Vacuolated Cells and Mucous Metaplasia in the Epithelial Linings of Radicular and Residual Cysts', *J Oral Pathol Med* Vol. 24, No. 7, 309-12, 1995.

SLAUGHTER, D. P., H. W. SOUTHWICK, and W. SMEJKAL. 'Field Cancerization in Oral Stratified Squamous Epithelium; Clinical Implications of Multicentric Origin', *Cancer* Vol. 6, No. 5, 963-8, 1953.

Sobjanek, M., M. Zabłotna, I. Michajłowski, B. Nedoszytko, A. Lesiak, and R. Nowicki. '-308 G/a Tnf-A Gene Polymorphism Influences the Course of Basal Cell Carcinoma in a Polish Population', *Arch Med Sci* Vol. 11, No. 3, 599-604, 2015.

Sohda, S., T. Arinami, H. Hamada, N. Yamada, H. Hamaguchi, and T. Kubo. 'Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism and Pre-Eclampsia', *J Med Genet* Vol. 34, No. 6, 525-6, 1997.

Solomon, P. R., G. S. Selvam, and G. Shanmugam. 'Polymorphism in Adh and Mthfr Genes in Oral Squamous Cell Carcinoma of Indians', *Oral Dis* Vol. 14, No. 7, 633-9, 2008.

Song, G. G., S. C. Bae, J. H. Kim, and Y. H. Lee. 'Association between Tnf-A Promoter -308 a/G Polymorphism and Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis', *Rheumatol Int* Vol. 34, No. 4, 465-71, 2014.

Soni, S., J. Kaur, A. Kumar, N. Chakravarti, M. Mathur, S. Bahadur, N. K. Shukla, S. V. Deo, and R. Ralhan. 'Alterations of Rb Pathway Components Are Frequent Events in Patients with Oral Epithelial Dysplasia and Predict Clinical Outcome in Patients with Squamous Cell Carcinoma', *Oncology* Vol. 68, No. 4-6, 314-25, 2005.

Soskolne, W. A., and M. Shear. 'Observations on the Pathogenesis of Primordial Cysts', *Br Dent J* Vol. 123, No. 7, 321-6, 1967.

Sreelekha, T. T., K. Ramadas, M. Pandey, G. Thomas, K. R. Nalinakumari, and M. R. Pillai. 'Genetic Polymorphism of Cyp11a1, Gstm1 and Gstt1 Genes in Indian Oral Cancer', *Oral Oncol* Vol. 37, No. 7, 593-8, 2001.

Stevenson, R. E., C. E. Schwartz, Y. Z. Du, and M. J. Adams. 'Differences in Methylenetetrahydrofolate Reductase Genotype Frequencies, between Whites and Blacks', *Am J Hum Genet* Vol. 60, No. 1, 229-30, 1997.

Stoelinga, P. J. '[Lateral Developmental Cysts of the Maxilla]', *Ned Tijdschr Tandheelkd* Vol. 78, No. 7, 258-64, 1971.

———. 'Long-Term Follow-up on Keratocysts Treated According to a Defined Protocol', *Int J Oral Maxillofac Surg* Vol. 30, No. 1, 14-25, 2001.

———. 'Excision of the Overlying, Attached Mucosa, in Conjunction with Cyst Enucleation and Treatment of the Bony Defect with Carnoy Solution', *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* Vol. 15, No. 3, 407-14, 2003.

Supic, G., N. Jovic, R. Kozomara, K. Zeljic, and Z. Magic. 'Interaction between the Mthfr C677t Polymorphism and Alcohol--Impact on Oral Cancer Risk and Multiple Dna Methylation of Tumor-Related Genes', *J Dent Res* Vol. 90, No. 1, 65-70, 2011.

Suter, C. M., D. I. Martin, and R. L. Ward. 'Hypomethylation of L1 Retrotransposons in Colorectal Cancer and Adjacent Normal Tissue', *Int J Colorectal Dis* Vol. 19, No. 2, 95-101, 2004.

Swierkot, J., K. Bogunia-Kubik, B. Nowak, K. Bialowas, L. Korman, K. Gebura, K. Kolossa, S. Jeka, and P. Wiland. 'Analysis of Associations between Polymorphisms within Genes Coding for Tumour Necrosis Factor (Tnf)-Alpha and Tnf Receptors and Responsiveness to Tnf-Alpha Blockers in Patients with Rheumatoid Arthritis', *Joint Bone Spine* Vol. 82, No. 2, 94-9, 2015.

Tabor, M. P., R. H. Brakenhoff, H. J. Ruijter-Schippers, J. E. Van Der Wal, G. B. Snow, C. R. Leemans, and B. J. Braakhuis. 'Multiple Head and Neck Tumors Frequently Originate from a Single Preneoplastic Lesion', *Am J Pathol* Vol. 161, No. 3, 1051-60, 2002.

Tang, M., S. Q. Wang, B. J. Liu, Q. Cao, B. J. Li, P. C. Li, Y. F. Li, C. Qin, and W. Zhang. 'The Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr) C677t Polymorphism and Tumor Risk: Evidence from 134 Case-Control Studies', *Mol Biol Rep* Vol. 41, No. 7, 4659-73, 2014.

Tanwar, R., A. R. Iyengar, K. S. Nagesh, S. Patil, and B. V. Subhash. 'Prevalence of Glutathione S-Transferase M1 Null Polymorphism in Tobacco Users, Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma Patients in South Indian Population: A Polymerase Chain Reaction Study', *Contemp Clin Dent* Vol. 6, No. Suppl 1, S59-64, 2015.

Teng, Z., L. Wang, S. Cai, P. Yu, J. Wang, J. Gong, and Y. Liu. 'The 677c>T (Rs1801133) Polymorphism in the Mthfr Gene Contributes to Colorectal Cancer Risk: A Meta-Analysis Based on 71 Research Studies', *PLoS One* Vol. 8, No. 2, e55332, 2013.

Toller, P. A. 'The Osmolality of Fluids from Cysts of the Jaws', *Br Dent J* Vol. 129, No. 6, 275-8, 1970.

Troeltzsch, M., T. Knösel, C. Eichinger, F. Probst, T. Woodlock, G. Mast, M. Ehrenfeld, and S. Otto. 'Clinicopathologic Features of Oral Squamous Cell Carcinoma: Do They Vary in Different Age Groups?', *J Oral Maxillofac Surg* Vol. 72, No. 7, 1291-300, 2014.

Trotta, B. M., C. S. Pease, J. J. Rasamny, P. Raghavan, and S. Mukherjee. 'Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Cancer: Key Imaging Findings for Staging and Treatment Planning', *Radiographics* Vol. 31, No. 2, 339-54, 2011.

Vairaktaris, E., C. Yapijakis, P. Kessler, A. Vylliotis, J. Ries, J. Wiltfang, S. Vassiliou, S. Derka, and F. W. Neukam. 'Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism and Minor Increase of Risk for Oral Cancer', *J Cancer Res Clin Oncol* Vol. 132, No. 4, 219-22, 2006.

van der Put, N. M., T. K. Eskes, and H. J. Blom. 'Is the Common 677c-->T Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene a Risk Factor for Neural Tube Defects? A Meta-Analysis', *QJM* Vol. 90, No. 2, 111-5, 1997.

Varela-Lema, L., E. Taioli, A. Ruano-Ravina, J. M. Barros-Dios, D. Anantharaman, S. Benhamou, S. Boccia, R. A. Bhisey, G. Cadoni, E. Capoluongo, C. J. Chen, W. Foulkes, E. M. Goloni-Bertollo, A. Hatagima, R. B. Hayes, T. Katoh, S. Koifman, P. Lazarus, J. J. Manni, M. Mahimkar, S. Morita, J. Park, K. K. Park, E. C. Pavarino Bertelli, E. M. de Souza Fonseca Ribeiro, B. Roy, M. R. Spitz, R. C. Strange, Q. Wei, and C. C. Ragin. 'Meta-Analysis and Pooled Analysis of Gstm1 and Cyp1a1 Polymorphisms and Oral and Pharyngeal Cancers: A Huge-Gsec Review', *Genet Med* Vol. 10, No. 6, 369-84, 2008.

Vora, H. H., N. G. Shah, D. D. Patel, T. I. Trivedi, and P. R. Chikhlikar. 'Prognostic Significance of Biomarkers in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue: Multivariate Analysis', *J Surg Oncol* Vol. 82, No. 1, 34-50, 2003.

Wang, J., Y. He, Y. Yang, T. Song, N. Chen, and Y. Zhou. 'Association between the Tnf-A G-308a Polymorphism and Risk of Ischemic Heart Disease: A Meta-Analysis', *Int J Clin Exp Med* Vol. 8, No. 6, 8880-92, 2015.

Wang, T. 'Tnf-Alpha G308a Polymorphism and the Susceptibility to Alzheimer's Disease: An Updated Meta-Analysis', *Arch Med Res* Vol. 46, No. 1, 24-30.e1, 2015.

Warzocha, K., J. Bienvenu, P. Ribeiro, I. Moullet, C. Dumontet, E. M. Neidhardt-Berard, B. Coiffier, and G. Salles. 'Plasma Levels of Tumour Necrosis Factor and Its Soluble Receptors Correlate with Clinical Features and Outcome of Hodgkin's Disease Patients', *Br J Cancer* Vol. 77, No. 12, 2357-62, 1998.

Warzocha, K., P. Ribeiro, N. Renard, J. Bienvenu, C. Charlot, B. Coiffier, and G. Salles. 'Expression of Genes Coding for the Tumor Necrosis Factor and Lymphotoxin Ligand-Receptor System in Non-Hodgkin's Lymphomas', *Cancer Immunol Immunother* Vol. 49, No. 9, 469-75, 2000.

Weatherspoon, D. J., A. Chattopadhyay, S. Boroumand, and I. Garcia. 'Oral Cavity and Oropharyngeal Cancer Incidence Trends and Disparities in the United States: 2000-2010', *Cancer Epidemiol* Vol. 39, No. 4, 497-504, 2015.

Weinstein, S. J., G. Gridley, L. C. Harty, S. R. Diehl, L. M. Brown, D. M. Winn, E. Bravo-Otero, and R. B. Hayes. 'Folate Intake, Serum Homocysteine and Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr) C677t Genotype Are Not Associated with Oral Cancer Risk in Puerto Rico', *J Nutr* Vol. 132, No. 4, 762-7, 2002.

Whitelaw, E., and D. I. Martin. 'Retrotransposons as Epigenetic Mediators of Phenotypic Variation in Mammals', *Nat Genet* Vol. 27, No. 4, 361-5, 2001.

Widersten, M., W. R. Pearson, A. Engström, and B. Mannervik. 'Heterologous Expression of the Allelic Variant Mu-Class Glutathione Transferases Mu and Psi', *Biochem J* Vol. 276 (Pt 2), 519-24, 1991.

Woolgar, J. A., J. W. Rippin, and R. M. Browne. 'The Odontogenic Keratocyst and Its Occurrence in the Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome', *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* Vol. 64, No. 6, 727-30, 1987.

Worm, J., and P. Guldberg. 'Dna Methylation: An Epigenetic Pathway to Cancer and a Promising Target for Anticancer Therapy', *J Oral Pathol Med* Vol. 31, No. 8, 443-9, 2002.

Wu, M. S., C. Y. Wu, C. J. Chen, M. T. Lin, C. T. Shun, and J. T. Lin. 'Interleukin-10 Genotypes Associate with the Risk of Gastric Carcinoma in Taiwanese Chinese', *Int J Cancer* Vol. 104, No. 5, 617-23, 2003.

Xie, H., H. Yao, Y. Huo, N. Li, and Y. Cheng. 'Association between Tnf-A Gene 308g>a Polymorphism and Lung Cancer Risk: A Meta-Analysis', *Tumour Biol* Vol. 35, No. 10, 9693-9, 2014.

Xu, F., G. Zhou, S. Han, W. Yuan, S. Chen, Z. Fu, D. Li, H. Zhang, and D. Pang. 'Association of Tnf-A, Tnfrsf1a and Tnfrsf1b Gene Polymorphisms with the Risk of Sporadic Breast Cancer in Northeast Chinese Han Women', *PLoS One* Vol. 9, No. 7, e101138, 2014.

Yanatatsaneejit, P., A. Boonsrang, A. Mutirangura, V. Patel, and N. Kitkumthorn. 'P53 Polymorphism at Codon 72 Is Associated with Keratocystic Odontogenic Tumors in the Thai Population', *Asian Pac J Cancer Prev* Vol. 16, No. 5, 1997-2001, 2015.

Yang, J. K., W. J. Wu, J. Qi, L. He, and Y. P. Zhang. 'Tnf-308 G/a Polymorphism and Risk of Acne Vulgaris: A Meta-Analysis', *PLoS One* Vol. 9, No. 2, e87806, 2014.

Yang, J. P., M. H. Hyun, J. M. Yoon, M. J. Park, D. Kim, and S. Park. 'Association between Tnf-A-308 G/a Gene Polymorphism and Gastric Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Cytokine* Vol. 70, No. 2, 104-14, 2014.

Yu, Y., S. Zheng, S. Zhang, W. Jin, H. Liu, M. Jin, Z. Chen, Z. Ding, L. Wang, and K. Chen. 'Polymorphisms of Inflammation-Related Genes and Colorectal Cancer Risk: A Population-Based Case-Control Study in China', *Int J Immunogenet* Vol. 41, No. 4, 289-97, 2014.

Zhang, H., P. T. Dziegielewski, V. L. Biron, J. Szudek, K. H. Al-Qahatani, D. A. O'Connell, J. R. Harris, and H. Seikaly. 'Survival Outcomes of Patients with Advanced Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma Treated with Multimodal Therapy: A Multi-Institutional Analysis', *J Otolaryngol Head Neck Surg* Vol. 42, 30, 2013.

Zhang, Z. J., K. Hao, R. Shi, G. Zhao, G. X. Jiang, Y. Song, X. Xu, and J. Ma. 'Glutathione S-Transferase M1 (Gstm1) and Glutathione S-Transferase T1 (Gstt1) Null Polymorphisms, Smoking, and Their Interaction in Oral Cancer: A Huge Review and Meta-Analysis', *Am J Epidemiol* Vol. 173, No. 8, 847-57, 2011.

Zhao, S. F., X. D. Yang, M. X. Lu, G. W. Sun, Y. X. Wang, Y. K. Zhang, Y. M. Pu, and E. Y. Tang. 'Gstm1 Null Polymorphisms and Oral Cancer Risk: A Meta-Analysis', *Tumour Biol* Vol. 35, No. 1, 287-93, 2014.

Zhuo, X., J. Ling, Y. Zhou, H. Zhao, Y. Song, and Y. Tan. 'Polymorphisms of Mthfr C677t and A1298c Association with Oral Carcinoma Risk: A Meta-Analysis', *Cancer Invest* Vol. 30, No. 6, 447-52, 2012.

Zhuo, X., J. Song, D. Li, Y. Wu, and Q. Zhou. 'Mthfr C677t Polymorphism Interaction with Heavy Alcohol Consumption Increases Head and Neck Carcinoma Risk', *Sci Rep* Vol. 5, 10671, 2015.

8. PRILOZI

Prilog br.1 – informator za pacijente

Klinika za maksilofacijalnu hirurgiju
Stomatološki fakultet
Univerzitet u Beogradu
ul. Dr Subotića br. 4
tel: 011/2685-064

INFORMATOR ZA PACIJENTE

Naslov istraživanja

**„ ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA GENA ZA GLUTATION
TRANSFERAZU, METILEN TETRAHIDROFOLAT REDUKTAZU,
FAKTOR NEKROZE TUMORA I NJEGOVE RECEPTORE U
EPITELNIM TUMORIMA USNE DUPLJE “**

Predlog i svrha istraživanja

Ovo je kliničko istraživanje Klinike za Oralnu hirurgiju i Klinike za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Njen cilj je uporedna analiza kliničkih i molekularno-genetičkih markera kod histopatološki verifikovanih epitelnih tumora usne duplje, kao i traženje eventualne povezanosti između pomenutih parametara.

Procedura ispitivanja

Studijom će biti obuhvaćeni pacijenti koji boluju od epitelnih tumora usne duplje. Indikaciju za operativni zahvat postavljaju ordinirajući lekari sa višegodišnjim kliničkim iskustvom, iskusni hirurzi Klinika za oralnu i maksilofacijalnu hirurgiju. Tokom operativnog zahvata uzimaće se deo graničnog (zdravog) tkiva, perifernije od tumora, koje se šalje na histopatološku analizu zbog provere radikalnosti operativnog zahvata. U slučaju kada histopatološka verifikacija potvrdi da u graničnom tkivu nema prodora malignih ćelija, pristupiće se daljoj molekularno-genetičkoj analizi. Kod pacijenata obolelih od odontogenog keratocističnog tumora, u cilju DNK analize, uzimaće se bris bukalne sluzokože.

Rizici po pacijenta i ograničenje istraživanja

Učestvovanje u studiji ne nosi nikakav rizik po pacijente. Rizik se odnosi isključivo na operativni zahvat i anesteziološku proceduru i prisutan je bez obzira na studiju.

Očekivana korist od istraživanja

Epitelni tumori usne duplje predstavljaju veliki sociomedicinski problem. Njihov nastanak još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Studija će molekularno-genetičkom analizom tkiva nastojati da otkrije prisustvo genetičkih markera koji bi mogli da budu pokazatelji manje ili veće sklonosti osobe ka nastanku ovih tumora.

Učestvovanje u studiji je dobrovoljno

Učestvovanje u studiji je dobrovoljno i ne podrazumeva materijalnu nadoknadu i materijalne troškove pacijenta. Pacijent u svakom trenutku može da ne prihvati ili da odustane od studije.

Dokumentacija o pacijentu

Dokumentacija o pacijentu je poverljiva. Uvid u medicinsku dokumentaciju, osim ordinirajućeg lekara, mogu imati samo članovi istraživačkog tima. Ako nove informacije u nauci i praksi postanu dostupne, pacijent će na vreme biti obavešten. Istraživači su dužni da ispitanicima (na njihov zahtev) daju sve informacije vezane za studiju.

Okolnosti i uslovi pod kojima će istraživanje biti izvedeno

Okolnosti i uslovi se neće razlikovati od uobičajenih uslova pod kojim se izvodi hirurška intervencija uklanjanja tumora usne duplje u uslovima lokalne ili opšte endotrahealne anestezije.

Približan broj učesnika u studiji

Približan broj učesnika u studiji će biti oko 100 pacijenata.

Prilog br.2 – pisana saglasnost pacijenta

Formular koji se odnosi na saglasnost pacijenta

Naslov studije:

**„ ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA GENA ZA GLUTATION
TRANSFERAZU, METILEN TETRAHIDROFOLAT REDUKTAZU,
FAKTOR NEKROZE TUMORA I NJEGOVE RECEPTORE U
EPITELNIM TUMORIMA USNE DUPLJE“**

Broj pacijenta: _____

Ja, _____, informisan sam o prirodi i ciljevima ove studije za koju sam pitan da učestvujem, uključujući detalje i procedure koje su potrebne da se ista sprovede.

Svestan sam i slažem se da će lične informacije vezane za medicinske izveštaje biti pregledane od strane kompetentnih institucija. Svaka informacija vezana za mene biće poverljiva. Samo će anonimni studijski podaci biti korišćeni za objavljivanje.

Razumeo sam da nisam obavezan da učestvujem u studiji i da mogu da se povučem u bilo koje vreme bez predrasuda prema mom daljem tretmanu.

Ja dobrovoljno prihvatom da učestvujem u studiji i da sakupljene i procesuirane lične i informacije koje se tiču moga zdravlja, neće biti ograničenje za moj eventualni izlazak iz studije.

Slažem se da informacije vezane za mene mogu biti poslate u druge evropske zemlje. Pristajem da se informacije mogu preneti u druge zemlje unutar i izvan Evropske unije.

Ime pacijenta

Potpis

Datum (dan, mesec, godina)

Ime istraživača

Potpis

Datum (dan, mesec, godina)

Prilog br.3 – istraživački karton

ISTRAŽIVAČKI KARTON

Evidencioni broj ispitanika: _____

Broj protokola: _____

Ime i prezime pacijenta: _____

Pol: _____

Godina rođenja: _____

Porodična anamneza: _____

Lična anamneza: _____

Klinička dijagnoza bolesti: _____

Histopatološka dijagnoza bolesti: _____

TNM klasifikacija: _____

Socio-epidemiološki status:

- Pušenje
 - 1. ne puši
 - 2. do 20 cigareta dnevno
 - 3. 20-40 cigareta dnevno
 - 4. više od 40 cigareta dnevno
- Konzumiranje žestokih alkoholnih pića
 - 1. unazad 5 godina
 - 2. unazad 5 do 10 godina
 - 3. unazad 10 do 20 godina
 - 4. unazad više od 20 godina
- Konzumiranje umjerenih alkoholnih pića
 - 1. ne pije
 - 2. povremeno
 - 3. često
 - 4. redovno
- Konzumiranje umjerenih alkoholnih pića
 - 1. unazad 5 godina
 - 2. unazad 5 do 10 godina
 - 3. unazad 10 do 20 godina
 - 4. unazad više od 20 godina

PRISTANAK PACIJENTA:

U Beogradu, _____

Potpis ispitanika

Potpis istraživača

9. BIOGRAFIJA AUTORA

Doktor stomatologije Branislav Ilić rođen je 25.10.1981. godine u Beogradu. Osnovnu školu i X gimnaziju u Beogradu završio je sa odličnim uspehom kao nosilac Diplome Vuk Karadžić. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2000. godine, a diplomirao 2005. godine sa prosečnom ocenom 9,45. Državni ispit položio je 2006. godine.

Magistarsku tezu iz oblasti maksilofacijalne hirurgije pod nazivom „Ispitivanje polimorfizama gena za MTHFR i GST kao faktora rizika za nastanak planocelularnih karcinoma usne duplje“ uspešno je odbranio 2009. godine. 2011. godine položio je specijalistički ispit i stekao zvanje specijaliste oralne hirurgije.

Tokom školovanja bio je stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije, Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka, Ambasade kraljevine Norveške, Vlade grada Beograda, Ministarstva za nauku Vlade Republike Srbije.

Kao naučni israživač – saradnik, bio je angažovan na tri projekta Ministarstva nauke Republike Srbije (evid.broj 145042, 156039, 175075). Doktor Branislav Ilić je autor i koautor 31 rada, u naučnim i stručnim časopisima i skupovima, od kojih su četiri objavljena u naučnim časopisima indeksiranim u bazi SCI.

Od 2012. godine, dr Branislav Ilić je kao asistent zaposlen na Klinici za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Kontinuirano se stručno usavršava u oblasti naučnih disciplina kojima se bavi, neprestano unapređujući svoja znanja i veštine.

Doktor Branislav Ilić je oženjen, otac Milice i Marka.

Изјава о ауторству

Потписани

Илић Бранислав

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање полиморфизма гена за метилентетрахидрофолат редуктазу, глутатион трансферазу, фактор некрозе тумора α и његове рецепторе у епителним туморима усне дупље.

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора

Илић Бранислав

Број индекса

Студијски програм

орална хирургија

Наслов рада

Испитивање полиморфизма

**гена за метилентетрахидрофолат редуктазу, глутатион трансферазу, фактор
некрозе тумора α и његове рецепторе у епителним туморима усне дупље**

Ментор

проф.др Јелена Милашин

проф.др Алекса Марковић

Потписани/а _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Испитивање полиморфизма гена за метилентетрахидрофолат редуктазу, глутатион трансферазу, фактор некрозе тумора α и његове рецепторе у епителним туморима усне дупље

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.