

**UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET**

Marija Antunović

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ KORELACIJE P53, SURVIVINA I
HUMANOG PAPILOMA VIRUSA TIP 16 (HPV-16) KOD
ORALNOG KARCINOMA**

Doktorska disertacija

Podgorica, 2014.

PODACI I INFORMACIJE O DOKTORANTU

Ime i prezime: Marija Antunović

Datum i mjesto rođenja: 21.12.1973., Nikšić

Naziv studija: postdiplomske doktorske studije

INFORMACIJE O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Naslov rada: **Prognostički značaj korelacije p53, survivina i humanog papiloma virusa tip 16**

(HPV-16) kod oralnog karcinoma

Fakultet: Medicinski fakultet, Podgorica

UDK OCJENA: 616.31-006(043.3)

Komisija za ocjenu podobnosti teze i kandidata:

Prof. dr Ljubomir Todorović, Stomatološki fakultet, Beograd

Doc. dr Branka Popović, Stomatološki fakultet, Beograd

Doc. dr Miroslav Andrić, Stomatološki fakultet, Beograd

Prof. dr Vladimir Todorović, Medicinski fakultet, Podgorica

Mentor: Doc. dr Miroslav Andrić, Stomatološki fakultet, Beograd

Komisija za ocjenu/odbranu teze :

Prof. dr Ljubomir Todorović, Stomatološki fakultet, Beograd

Prof.dr Jelena Milašin, Stomatološki fakultet, Beograd

Doc. dr Branka Popović, Stomatološki fakultet, Beograd

Doc. dr Miroslav Andrić, Stomatološki fakultet, Beograd

Prof. dr Vladimir Todorović, Medicinski fakultet, Podgorica

Datum odbrane: 12.12.2014.

Predgovor

Oralna kancerogeneza je predmet mog interesovanja još od ranih studentskih dana kada sam, 1996.godine, kao student IV godine Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, učestvovala na 38-om Jugoslovenskom kongresu studenata medicine i stomatologije. Tada nijesam ni slutila da će prezentovan naučni rad, iz oblasti oralne i maksilofacijalne patologije, pod nazivom „Epidemiologija i uspešna lokalna imunska reakcija na planocelularne karcinome sluzokože usta“, biti uvod u priču pred Vama.

Tokom rada u Kliničkom Centru Crne Gore, kao specijalista oralne hirurgije, proteklih godina sam imala priliku da se uvjerim u zastupljenost oralnog karcinoma u našoj populaciji. Imajući u vidu činjenicu da je izražen dramatičan porast oboljevanja poslednjih godina, da je ženski dio populacije sve više zastupljen u morbiditetu, kao i to da je najčešća lokalizacija ovog oboljenja donja usna, predmet interesovanja se time, samo potvrdio.

Ovaj rad predstavlja mali doprinos rasvetljavanju složenog i kontroverznog naučnog problema oralne kancerogeneze.

Posebno se zahvaljujem prof. dr Jeleni Milašin i doc. dr Branki Popović, koje su me uvele u svijet genetike tumora i svojom nesebičnom podrškom omogućile da realizujem kompleksna istraživanja.

Prof. dr Ljubomiru Todoroviću, inicijatoru i koordinatoru mog cjelokupnog naučnog rada, od studentskih dana, specijalističkog staža, pa do danas, neizmjereno zahvaljujem.

Takođe, svom mentoru, doc. dr Miroslavu Andriću, zahvaljujem na pruženoj pomoći i razumijevanju tokom izrade rada.

Prof. dr Vladimiru Todoroviću, sa Klinike za onkologiju i radioterapiju Kliničkog Centra Crne Gore, zahvaljujem na korisnim savjetima i sugestijama.

Zahvaljujem se svom kolegi i prijatelju, mr dr Dragu Jelovcu, sa Klinike za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu, bez čije pomoći ovaj rad, a i mnogi drugi, ne bi bio kompletiran.

Nađi Nikolić, dr Jeleni Čarkić i dr Bošku Toljiću, zahvaljujem na razumijevanju i nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom dijelu istraživanja.

Mojoj porodici, prije svega roditeljima, zahvaljujem na podršci i razumijevanju tokom svih godina izrade ovog rada, kojeg posvećujem upravo Njima.

PROGNOŠTIČKI ZNAČAJ KORELACIJE P53, SURVIVINA I HUMANOG PAPILOMA VIRUSA TIP 16 (HPV-16) KOD ORALNOG KARCINOMA

UVOD I CILJ. Oralni karcinom nastaje kao krajnji stadijum višestepenog procesa kancerogeneze. U ovom procesu ključnu ulogu imaju tri klase gena: protoonkogeni, tumor-supresorni geni i geni za popravak grešaka DNK, koji su neophodni za kontrolu procesa proliferacije, diferencijacije, smrti ćelije i popravak DNK. TP53 gen je najčešće mutirani tumor supresorni gen u humanim tumorima. TP53 gen funkcionira kao „čuvar genoma” otkrivajući oštećenja koja već postoje ili potencijalna oštećenja DNK, obezbjeđujući protektivni odgovor, bilo blokirajući ćelijski ciklus ili izazivajući apoptozu (programirana ćelijska smrt) pogođene ćelije. Apoptoza je proces koji je genski regulisan. Odvija se zahvaljujući ravnoteži između antiapoptotskih i proapoptotskih gena, odnosno njihovih produkata-proteina. Survivin je jedan od članova IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) porodice proteina i regulator je ćelijskog ciklusa. Polimorfizmi gena koji su uključeni u proapoptotske (TP53) i antiapoptotske (survivin) mehanizme kancerogeneze se danas sve više izučavaju kao potencijalni markeri rizika za nastanak OSCC. Među insercionim polimorfizmima TP53 gena, najviše podataka je dostupno o PIN3 Ins16bp polimorfizmu, koji podrazumijeva inserciju nukleotidne sekvence dužine 16 baznih parova u intronu 3 TP53 gena. Polimorfizmi jednog nukleotida (eng. *Single nucleotide polymorphisms*) predstavljaju varijabilnost tipa bazne zamjene, a jedan od takvih je funkcionalni polimorfizam na poziciji -31 promotora gena za survivin. Papiloma virusi su važni etiološki agensi malignih tumora kod čovjeka. O prognostičkom značaju HPV infekcije u karcinomima glave i vrata mišljenja su različita. Osnovni ciljevi ovog istraživanja su bili da se ispita imunohistohemijska ekspresija proapoptotskih (p53) i antiapoptotskih proteina (survivina) u tkivu OSCC, kao i njihova korelacija sa prisutnom HPV16 infekcijom, da se utvrdi značaj polimorfizama -31C/G gena za survivin i PIN3 Ins16bp TP53 gena u patogenezi OSCC, kao i značaj prisutne HPV16 infekcije u patogenezi i progresiji OSCC.

MATERIJAL I METODE. U kombinovanoj retrospektivnoj i prospektivnoj studiji, analizirani su uzorci 60 bolesnika kod kojih je operativno odstranjen oralni skvamocelularni karcinom (OSCC), lokalizovan na donjoj usni, jeziku ili podu usta. Podaci o lokalizaciji neoplazmi, starosti i polu bolesnika, kao i o mikroskopskim karakteristikama neoplazmi prikupljeni su iz uputnica za histopatološki pregled. Svi bolesnici su klinički praćeni tri godine, a neki od njih i duže. Za imunohistohemijska istraživanja korišćeni su uzorci tumorskog tkiva fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafin. Imunohistohemijska identifikacija p53 onkoproteina i survivina vršena je primjenom streptavidin-biotin-peroksidaza tehnike, prema standardnoj LSAB+ proceduri (DAKO, Danska). Za molekularno-genetičke analize korišćeni su uzorci DNK izolovani iz 60 parafinskih blokova OSCC, dok su kontrolnu grupu činili uzorci DNK izolovani iz periferne krvi 71-og zdravog pojedinca (za p53) i 127 zdravih pojedinaca (za survivin). Za detekciju ispitivanih polimorfizama, -31C/G i PIN3 Ins16bp, korišćena je PCR-RFLP analiza. Detekcija genoma HPV16 vršena je standardnom PCR-metodom.

ZAKLJUČCI. Imunohistohemijska ekspresija p53 proteina i survivina u tkivu OSCC korelira sa veličinom tumora, a u tkivu OSCC postoji statistički značajna povezanost između nivoa ekspresije p53 i survivina. Nije utvrđen značajan uticaj genotipova polimorfizama -31C/G gena za survivin i PIN3 Ins16bp TP53 gena za nastanak OSCC. Vremenski interval bez ponovnog javljanja bolesti značajno je kraći kod HPV16 pozitivnih pacijenata ženskog pola u odnosu na HPV16 pozitivne pacijente muškog pola. U analiziranom uzorku OSCC dominira HPV16 nezavisni mehanizam onkogeneze (p53+; survivin+/-; HPV16+ i p53+; survivin+/-; HPV16-).

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE P53, SURVIVIN AND HUMAN PAPILLOMA VIRUS TYPE 16 (HPV-16) CORRELATION IN ORAL CANCER

BACKGROUND/AIM. Oral cancer occurs as the final stage of the multistage process of carcinogenesis. Three classes of genes have the main role in this process: protooncogenes, tumour suppressor genes and genes for DNA repair necessary to control the process of proliferation, differentiation, cell death and DNA repair. TP53 gene is commonly mutated tumour suppressor gene in human tumours. TP53 gene functions as a "guardian of the genome", discovering the existing defects or potential damage of DNA, providing a protective response, either by blocking the cell cycle or causing apoptosis (programmed cell death) of affected cells. Apoptosis is a genetically regulated process. It takes place due to the balance between antiapoptotic and proapoptotic genes i.e. their products-proteins. Survivin is a member of the IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) family of proteins and it is the cell cycle regulator. Polymorphisms in genes involved in proapoptotic (TP53) and antiapoptotic (survivin) mechanisms of carcinogenesis has been increasingly studied as potential markers of risk for OSCC development. Among insertion polymorphisms of TP53 gene, most data are available for Ins16bp PIN3 polymorphism, which include the insertion of the nucleotide sequences containing 16 base pairs in intron 3 of TP53 gene. Single nucleotide polymorphisms present the variability by the base substitution, and one of them is a functional polymorphism at position -31 promoter of survivin gene. Papilloma viruses are important etiological agents of malignant tumors in humans. There are different opinions about prognostic significance of HPV infection in head and neck cancers. The main aims of this study were to investigate the immunohistochemical expression of proapoptotic (p53) and antiapoptotic proteins (survivin) in OSCC tissue, as well as their correlation with HPV16 infection, to determine the importance of survivin gene -31C/G and TP53 PIN3 Ins16bp polymorphisms in the pathogenesis of OSCC, and the importance of HPV16 infection in the pathogenesis and progression of OSCC.

METHODS. This study is based on samples retrospectively and prospectively collected from 60 patients with surgically removed oral squamous cell carcinoma (OSCC), localized in the lower lip, tongue or floor of the mouth. Data of each case, including the localization of neoplasms, age and sex of patients, as well as the microscopic characteristics of neoplasms were obtained from the patients files. The patients were being followed up in three years period, some of them even longer. Immunohistochemistry was performed on formalin fixed and paraffin embedded tissue samples. Immunohistochemical identification of p53 and survivin oncoproteins was performed using the streptavidin-biotin-peroxidase technique according to standard LSAB + procedure (DAKO, Denmark). It was used DNA isolated from 60 paraffin block samples of OSCC for molecular-genetic analysis, while the control group was consisted of DNA samples isolated from peripheral blood of 71 healthy individuals (for p53) and 127 healthy individuals (for survivin). It was used PCR-RFLP analysis for detection of -31C/G and PIN3 Ins16bp polymorphisms. Standard PCR method was performed for HPV16 genomes detection.

CONCLUSIONS. Immunohistochemical expression of p53 and survivin in OSCC tissues correlates with tumor size and there was a statistically significant correlation between the expression levels of p53 and survivin in OSCC tissue. There was no significant influence of -31C/G and PIN3 Ins16bp polymorphisms for the OSCC development. The time interval without disease recurrence was significantly shorter in HPV16 positive female patients compared to HPV16 positive males. There is a dominated HPV16 independent mechanism of oncogenesis (p53+; survivin +/-; HPV16+ and p53+; survivin +/-; HPV16-) in the analyzed samples of OSCC.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	2
1.1. Kliničko-patološke odlike oralnog karcinoma	3
1.2. Hirurška anatomija usne duplje	5
1.3. Genetske osnove OSCC.....	7
1.3.1. Apoptoza - programirana ćelijska smrt	8
1.3.2. Proapoptotski mehanizmi u patogenezi OSCC - TP53 gen.....	9
1.3.3. Polimorfizmi TP53 gena	12
1.3.4. Antiapoptotski mehanizmi u patogenezi OSCC – survivin	13
1.3.5. Polimorfizmi gena za survivin	14
1.4. Humani papiloma virusi (HPV).....	15
1.5. Liječenje OSCC i mjere prevencije	16
2. ISTRAŽIVAČKI PROBLEM I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	18
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	21
4. MATERIJAL I METODE.....	23
4.1. Uzorak ispitanika.....	24
4.2. Imunohistohemijska istraživanja.....	24
4.3. Genetička istraživanja	29
4.3.1. Izolacija DNK iz tumorskog tkiva OSCC.....	29
4.3.2. Izolacija DNK iz periferne krvi	29
4.3.3. Analiza polimorfizama gena za survivin i TP53	30
4.3.3.1. Lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction – PCR).....	30
4.3.3.2. Gel elektroforeza.....	31
4.3.3.3. Restrikciona analiza.....	33
4.4. Detekcija prisustva HPV-16 u tumorskom tkivu.....	33
4.5. Statistička obrada podataka	34

5. REZULTATI	35
5.1. Opšte karakteristike pacijenata u uzorku	36
5.2. Karakteristike tumora	37
5.2.1. Imunohistohemijska ekspresija p53 i survivina	38
5.3. Povezanost ekspresije p53 i survivina sa kliničkim i histopatološkim parametrima OSCC	40
5.4. Korelacija kliničkih, histopatoloških, molekularno-genetičkih i virusoloških parametara OSCC	42
5.5. Analiza polimorfizama gena za survivin i p53	45
5.5.1. Analiza polimorfizma -31C/G gena za survivin	46
5.5.2. Analiza polimorfizma -31C/G gena za survivin kod HPV16+ u odnosu na HPV16- pacijente	48
5.5.3. Analiza polimorfizma PIN3 Ins16bp TP53 gena	50
5.6. Analiza prisustva HPV16 infekcije u tkivu OSCC i njen uticaj na progresiju bolesti	51
5.7. HPV16 zavisna onkogeneza u odnosu na HPV16 nezavisnu onkogenezu	54
6. DISKUSIJA	56
6.1. Klinički i histopatološki parametri OSCC	57
6.2. Ekspresija p53	58
6.3. Ekspresija survivina	61
6.4. Korelacija polimorfizma gena i patogeneze OSCC	63
6.5. HPV16 infekcija	66
7. ZAKLJUČCI	70
8. LITERATURA	73
9. PRILOG 1.	86
ISTRAŽIVAČKI KARTON	86

1. UVOD

Karcinomi su maligni epitelni tumori ektodermalnog ili endodermalnog porijekla. Čine oko 90% svih malignih tumora čovjeka. Učestalost primarne lokalizacije karcinoma glave i vrata u usnoj duplji jeste oko 40%¹.

Skvamocelularni (planocelularni) karcinom oralne sluzokože (OSCC) obuhvata 85-95% svih malignih tumora usne duplje². Epidemiološka ispitivanja mnogobrojnih autora pokazuju da se OSCC najčešće javlja kod osoba muškog pola, u šestoj i sedmoj deceniji života, a da je najčešće lokalizovan na jeziku, podu usta i donjoj usni³.

Karcinom usne duplje se nalazi po učestalosti na šestom mjestu u svijetu³. Učestalost ovog oboljenja varira u zavisnosti od geografskog područja, tako da su regioni sa najvećom zastupljenošću oralnog karcinoma Melanesia (Papua, Nova Gvineja sa pripadajućim ostrvima), Zapadna Evropa i Južna i Centralna Azija (Indija i Centralno Azijske republike bivšeg Sovjetskog Saveza)^{4,5}.

Studija sprovedena na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore⁶ pokazala je da su, u periodu 2003.-2008. godine, u Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Kliničkog centra Crne Gore, liječena ukupno 194 pacijenta sa dijagnozom OSCC. Rezultati ove studije pokazuju da je u populaciji Crne Gore OSCC najčešće lokalizovan na donjoj usni, jeziku i podu usta. Najčešće se javlja u 7. deceniji života, a 3 puta je češći kod osoba muškog pola. Ova studija, međutim, pokazuje i značajan porast oboljevanja u ženskom dijelu populacije, naročito u periodu 2007.-2008. godina.

Etiologija OSCC nije u potpunosti poznata. Smatra se da više faktora ima određeni uticaj na nastanak ove bolesti, a među najvažnijim su pušenje i redovno konzumiranje žestokih alkoholnih pića. Oralni karcinom se deset puta češće javlja kod pušača u odnosu na nepušače i šest puta češće kod ljudi koji često konzumiraju žestoka alkoholna pića⁷. Rizik za razvoj OSCC kod osoba koje konzumiraju alkohol i duvan zajedno 38 puta je veći u poređenju sa osobama koje ih ne konzumiraju⁸. Ipak, pokazano je da kod nekih ljudi postoji predispozicija za oboljevanje od OSCC uzrokovana polimorfizmom određenih gena koji su podložni mutacijama pod uticajem alkohola i kancerogenih materija iz duvanskog dima⁹.

I drugi faktori doprinose nastanku oralnog karcinoma, ali je njihov uticaj nedovoljno poznat. Značajnu ulogu u nastanku OSCC imaju biološki faktori, naročito virusi (humani papiloma virusi-HPV, Epstein-Barr virus-EBV, virus humane imunodeficijencije-HIV), gljivice (candida), spirohete (treponema palidum)¹⁰. Poseban uticaj na nastanak i razvoj OSCC imaju genetski faktori, poremećaj imunskog sistema organizma, loša oralna higijena, hronična inflamacija gingive, hronične iritacije proteznih radova na okolna meka tkiva^{11,12}.

Uprkos napretku koji je ostvaren poslednjih decenija u programima prevencije i terapije OSCC, nije ostvaren veliki napredak u pogledu stope petogodišnjeg preživljavanja, koja i dalje iznosi oko 50%¹³. Ovako nepoželjan ishod nije zapažen ni kod češćih karcinoma, kao što su kolorektalni, cervikalni ili karcinom dojke. Pri tom, mjere koje treba da spriječe pojavu bolesti i poboljšaju ishod liječenja upravo su prevencija i rana dijagnostika OSCC.

OSCC mogu biti lokalizovani u različitim djelovima usne duplje. Pri tom, tumori koji su lokalizovani u prednjim djelovima usne duplje, generalno, bolje su histološki diferentovani od tumora koji su lokalizovani u zadnjim djelovima usne duplje. Lokalizacija tumora znatno utiče na hirurški tretman i rekonstrukciju postekscizionog defekta.

1.1. Kliničko-patološke odlike oralnog karcinoma

OSCC se klinički najčešće manifestuje ulceracijom sluzokože, perzistirajućim otokom, ograničenom pokretljivošću jezika, recidivirajućim krvavljenjima bez jasnog uzroka, poremećajem čula ukusa, neprijatnim zadahom iz usta, što sve zavisi od stadijuma i lokalizacije tumora.

OSCC se može razviti iz premalignih lezija kao što su leukoplakija ili eritroplakija. Premaligne promjene su lezije koje pokazuju strukturne i morfološke promjene u tkivu. Ove lezije imaju tendenciju ka malignoj transformaciji i predstavljaju stadijum koji prethodi karcinomu.

OSCC može biti manifestovan u dvije kliničke forme: pečurkasto - egzofitičnoj (Slika 1.1) i ulceroznoj - endofitičnoj (Slika 1.2). Egzofitični oblik karcinoma se karakteriše papilomatoznim rastom tumora. Spoljna površina tumora ima, usled izraženog orožavanja, bjeličastu prebojenost. Tumorski izraštaj ima karfiolast izgled, tvrde je konzistencije i infiltriše okolne strukture. Endofitični oblik karcinoma karakteriše ulceracija koju ograničava režnjevita, tvrda i izdignuta ivična zona. Ovaj oblik karcinoma skoro uvijek prati superinfekcija.

Potpun i detaljan palpatorni pregled glave i vrata je neophodan da bi se precizno utvrdila lokalizacija i stadijum primarnog tumora, kao i eventualno prisustvo uvećanih limfnih čvorova (suspektnih regionalnih metastaza). Uopšteno, „početni“ karcinomi mogu biti prisutni kao neulcerisana bijela ili crvena polja, a u punoj kliničkoj formi se manifestuju kao lezije sluzokože; međutim, rijetko neki OSCC mogu biti lokalizovani predominantno u podsluzokožnom sloju a da, pri tome, ne zahvataju ili veoma malo zahvataju sluzokožu. Čvrste podsluzokožne lezije su mnogo češće tumori porijekla malih pljuvačnih žlijezda.



Slika 1.1 Egzofitični skvamocelularni karcinom jezika i poda usta



Slika 1.2 Ulcerativna forma skvamocelularnog karcinoma donje usne

Kada su dostupni svi podaci iz istorije bolesti, izvršenog kliničkog pregleda i pomoćne dijagnostike, može se, na osnovu kriterijuma Američkog udruženja za borbu protiv karcinoma iz 2002. godine, odrediti TNM klasifikacija tumora (Tabela 1.1)¹⁴.

Tabela 1.1 TNM klasifikacija tumora usne duplje

T - Primarni tumor	N - Regionalni limfni čvorovi	M - Udaljene metastaze
T_x - primarni tumor se ne može ustanoviti	N_x - regionalne metastaze se ne mogu ustanoviti	M_x - udaljene metastaze se ne mogu ustanoviti
T0 - nema znakova primarnog tumora	N0 - nema regionalnih metastaza	M0 - nema udaljenih metastaza
Tis - <i>Carcinoma in situ</i>	N1 - metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru čiji je dijametar do 3 cm	M1 - postoje udaljene metastaze
T1 - tumor veličine do 2 cm	N2a - metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru koji je dijametra 3-6 cm	
T2 - tumor veličine 2-4 cm	N2b - metastaze u više ipsilateralnih limfnih čvorova čiji je dijametar do 6 cm	
T3 - tumor veličine preko 4 cm	N2c - metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima koje ne prelaze promjer od 6 cm	
T4a - koštani tumor infiltriše mišiće jezika, maksilarni sinus ili kožu lica		
T4b - tumor infiltriše prostore koje ograničavaju mastikatorni mišići, pterigoidni nastavci ili baza lobanje; unutrašnja karotidna arterija		

Na osnovu TNM klasifikacije određuje se stadijum bolesti za svaki pojedinačni slučaj (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 Određivanje stadijuma bolesti na osnovu TNM vrijednosti za karcinome usne duplje

Stadijum bolesti	TNM vrijednost		
Stadijum 0	Tis	N0	M0
Stadijum I	T1	N0	M0
Stadijum II	T2	N0	M0
Stadijum III	T1-2	N1	M0
	T3	N0,N1	M0
Stadijum IV A	T1-3	N2	M0
Stadijum IV B	T1-4	N3	M0
	T4b	N1-3	M0
Stadijum IV C	T1-4	N1-3	M1

Patohistološka slika OSCC se karakteriše različitim stepenom keratinizacije i skvamozne diferencijacije, kao i invazivnim rastom. Invazivni rast se manifestuje rupturom bazalne membrane i prodorom u dublje slojeve tkiva. Invazija krvnih i limfnih sudova, kao i perineuralna infiltracija, takođe su znaci maligniteta.

Stepen diferencijacije tumorskih ćelija i broj mitozu u skladu su sa tumorskom agresivnošću i označavaju se kao histološki gradus. Histološki gradus je podijeljen na: Gx - ne može da se procijeni gradus, G1 - dobro diferentovan tumor, G2 - umjereno (srednje) diferentovan, G3 - slabo (loše) diferentovan, G4 - nediferentovan tumor.

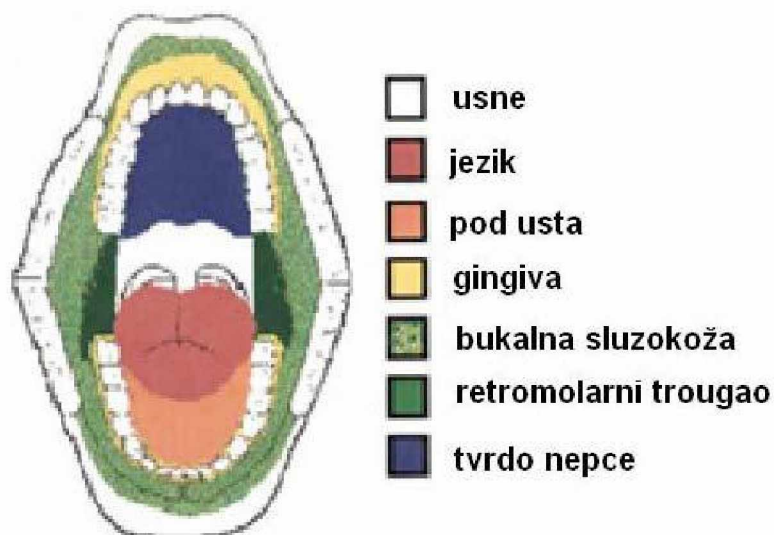
Dobro diferentovan OSCC (gradus I) se karakteriše skoro normalnim pločasto-slojevitim epitelom. Srednje diferentovan OSCC (gradus II) se karakteriše različitim stepenom jedarnog polimorfizma, uključujući abnormalne mitoze i slabiji stepen keratinizacije. Osobine slabo diferentovanih OSCC (gradus III) su mlade, nezrele ćelije, sa velikom brojem atipičnih mitozu i minimalnom keratinizacijom. Iako se keratinizacija javlja i kod srednje i dobro diferentovanih OSCC, stepen keratinizacije se ne smatra važnim histološkim kriterijumom u histološkom rangiranju tumora.

Nuklearni gradus je još jedan parametar koji ukazuje na stepen ćelijske malignosti, a zasniva se na određivanju morfološke izmijenjenosti jedra (nukleusa) maligne ćelije u odnosu na nepromijenjenu ćeliju. Definiše se kao Ng1 - nizak, Ng2 - srednji, Ng3 - visok. Tumor Ng1 karakteriše minimalna ćelijska atipija i spor rast tumora, uz povoljan ishod liječenja. Nasuprot njemu, tumor Ng3 patohistološki pokazuje da mu je jedro veće od normalnog i promijenjenog oblika, uz nagomilavanje genetskog materijala. Tumor ovog nuklearnog gradusa ima atipičan i relativno brz rast, a uspjeh liječenja je znatno lošiji.

1.2. Hirurška anatomija usne duplje

Usna duplja čini početni dio digestivnog trakta i služi za uzimanje hrane, žvakanje i pripremanje hrane za varenje, kao i za gutanje, govor i disanje.

Usna duplja je naprijed, preko usnog otvora (*rima oris*), otvorena prema spoljašnjoj sredini, a nazad je otvorena, preko ždrelnog suženja (*isthmus faucium*), prema orofarinksu. Dijeli se na predvorje usne duplje (*vestibulum oris*) i usnu duplju u užem smislu (*cavum oris proprium*). Granicu između njih čine zubni nastavci gornje i donje vilice sa gornjim i donjim zubnim lukovima. Zidove usne duplje grade: naprijed usne, sa strane obrazi, gore tvrdo i meko nepce, dolje mišići poda usne duplje sa jezikom i podjezičnim predjelom. Naprijed je okružena kožom i ivicom rumenog dijela gornje i donje usne (Slika 1.3). Nazad se prostire do opšančenih papila jezika, veze između tvrdog i mekog nepca, kao i prednjeg nepčanog luka, tj. nepčano-jezičnog luka¹⁵. Sluzokoža obraza čini bočni zid usne duplje.



Slika 1.3 Podjela usne duplje prema regionima

Gornja (dorzalna) površina jezika prekrivena je pločasto-slojevitim epitelom u kome se nalaze papile. Tu su lokalizovani brojni receptori za ukus, limfni sudovi, kao i male - Von Ebnerove pljuvačne žlijezde. Donja (ventralna) strana jezika prekrivena je tankim, nekeratinizirajućim pločasto-slojevitim epitelom, koji se nastavlja sluzokožom poda usta.

Retromolarni predio je dio keratinizovane sluzokože koja prekriva dio zubnog nastavka iza trećeg molara donje vilice.

Tvrdo nepce se nalazi na alveolarnom nastavku gornje vilice i u obliku je potkovice. Keratinizovana sluzokoža prekriva palatinalnu kost. Pod usta je polumjesečastog oblika i nalazi se iznad milohioidnog i hioglosnog mišića. Prostire se od unutrašnje površine zubnog nastavka donje vilice do ventralne strane jezika. Podijeljen je jezičnom resicom na dva dijela. U njemu se nalaze otvori izvodnih kanala submandibularnih i sublingvalnih pljuvačnih žlijezda. Pokriven je glatkom, pokretljivom sluzokožom, koja naprijed i bočno prelazi u sluzokožu desni, a pozadi se prebacuje na donju stranu tijela jezika.

Oko 75% OSCC razvija se u predjelu koji obuhvata sluzokožu poda usta i okolnu sluzokožu ventralne strane jezika, sublingvalnog žljeba kao i retromolarnog predjela¹⁶, a ovaj region čini samo oko 20% ukupne površine oralne sluzokože. Ova zona sluzokože se često naziva „drenažna zona“ i smatra se da se bilo koja kancerogena materija koja se nađe u usnoj šupljini skuplja u ovom predjelu prije nego što se proguta¹⁶.

1.3. Genetske osnove OSCC

Savremena istraživanja mehanizama maligne transformacije ćelija fokusirana su na definisanje promjena na molekularnom nivou. U normalnim humanim ćelijama postoji više sigurnosnih mehanizama za sprečavanje nagomilavanja genetskih grešaka koje se javljaju tokom ćelijske diobe. Oštećenje jedne ili više ključnih tačaka ćelijskog ciklusa, vjerovatno, čini pozadinu genske nestabilnosti, koja rezultira klonskom evolucijom ćelija koje posjeduju maligniji fenotip¹⁷.

U ovom procesu ključnu ulogu imaju tri klase gena: protoonkogeni, tumor-supresorni geni i geni za popravak grešaka DNK, koji su neophodni za kontrolu procesa proliferacije, diferencijacije, smrti ćelije i popravak DNK.

Protoonkogeni su normalni ćelijski geni čiji proteinski produkti regulišu bazične ćelijske procese, kao što su proliferacija i diferencijacija, putem pokretanja signalnog transduccionog mehanizma. Aktiviranje ove signalizacione kaskade strogo je regulisano u pogledu vremena i mjesta, a svaki abnormalno iniciran signal može da dovede do transformacije ćelija. Osnovni mehanizmi aktivacije protoonkogeni jesu tačkaste mutacije, amplifikacije i hromozomski rearanžmani, što sve dovodi do izmijenjene ekspresije onkoproteina.

Tumor-supresorni geni, antionkogeni, za razliku od protoonkogeni, onemogućavaju diobe ćelija ukoliko dođe do oštećenja naslednog materijala. Proteinski produkti ovih gena uključeni su u regulaciju ćelijskog ciklusa na više kontrolnih punktova, tako što sprečavaju napredovanje kroz ciklus, dok se lezije na naslednom materijalu ne repariraju, a ako su oštećenja suviše velika dolazi do aktivacije apoptoze - programirane ćelijske smrti. Odsustvo ili nefunkcionalnost proteinskih produkata antionkogeni oslobađa ćeliju od kontrolnih mehanizama, tako da se akumuliraju i propagiraju brojne lezije iz ciklusa u ciklus, odnosno dolazi do opšte genomske nestabilnosti, što je osnovna karakteristika tumorskih ćelija.

Nasuprot dominantnom efektu mutacije jednog alela onkogeni, tumor-supresorni geni stiču transformišući potencijal funkcionalnom inaktivacijom oba alela, tj. mutacijama recesivnog karaktera. U najvećem broju slučajeva jedan alel se inaktivira tačkastom mutacijom, a drugi biva deletiran, tako da je gubitak funkcije kompletan. Izuzetak su određene mutirane forme p53 proteina koje, ne samo da gube svoju normalnu funkciju, već stiču i sposobnost vezivanja i inaktivacije normalnih p53 proteina. Novija istraživanja pokazuju da su tumor-supresorni geni vrlo često inaktivirani i epigenetskim mehanizmom hipermetilacije promotora, kao što je p16 tumor-supresorni gen.

Kancerogeneza je višestepeni proces u okviru kojeg se karcinom javlja poslije šest do deset nezavisnih genetskih promjena, koje vode aktiviranju protoonkogeni ili inaktiviranju tumor-supresornih gena. OSCC nastaje kao krajnji stadijum višestepenog procesa kancerogeneze, koji je vođen genetskim i epigenetskim oštećenjima uzrokovanim, uglavnom, djelovanjem kancerogenih agenasa. Aktiviranje protoonkogeni je posledica promjene u strukturi gena (što rezultuje sintezom strukturno i funkcionalno izmijenjenog proteina), ili promjene u regulaciji genske ekspresije (koja dovodi do povećane produkcije strukturno normalnih proteina).

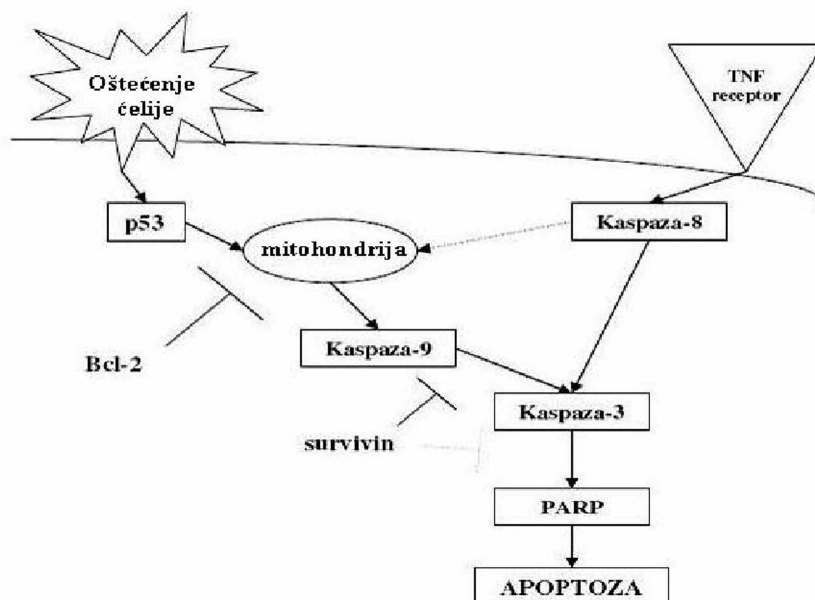
O uzrocima nastanka OSCC, o njihovoj kliničkoj slici, kao i o prognozi zasnovanoj na stadijumu bolesti i histopatološkom gradusu, danas se mnogo zna. To, međutim, nije dovelo do značajnijeg poboljšanja u liječenju bolesnika sa OSCC, što je pažnju istraživača usmjerilo ka rasvjetljavanju molekularnih mehanizama, koji leže u genezi ovog tipa karcinoma. Osnovni cilj ovih istraživanja je utvrđivanje biomarkera za ranu detekciju tumora, kao i prognostičkih i prediktivnih markera, radi donošenja odluke o izboru najefikasnijih terapijskih modaliteta liječenja.

Krajnji cilj istraživanja je pronalaženje načina za potpuno izlječenje različitih tipova malignih tumora, a aspekt koji privlači posebnu pažnju je mogućnost da status ključnih faza ćelijskog ciklusa bude iskorišćen kao presudno mjesto djelovanja terapije¹⁷.

Metode molekularne biologije kojima se detektuju promjene na nivou gena, primarno korišćene u bazičnim istraživanjima, danas postaju sve korisnije oruđe u kliničkom radu za potrebe rane dijagnostike, preciznije određivanje stadijuma bolesti, kao i predikciju odgovora na terapijske modalitete liječenja. Najrasprostranjenija je njihova primjena u ranom otkrivanju bolesti, ali sve više i u liječenju karcinoma (genska terapija). Identifikacija specifičnih molekularnih defekata koji utiču na biološko ponašanje tumora će obezbijediti nove pravce za razvoj farmakoterapije oralnog karcinoma. Ove metode bi mogle da posluže kao dopuna standardnim citološkim i patohistološkim metodama dijagnostike malignih tumora zbog veće specifičnosti i osjetljivosti, na šta ukazuju radovi u kojima je pokazana mogućnost detekcije "mikrofokusa" - izmjene gena u samo jednoj malignoj ćeliji koja se nalazi u populaciji od 10.000 normalnih ćelija¹⁸.

1.3.1. Apoptoza - programirana ćelijska smrt

Apoptoza igra važnu ulogu u razvoju tkiva (organa) i u ćelijskoj i tkivnoj homeostazi¹⁹. Programirana smrt ćelije se odvija aktiviranjem kaskade enzima koji se nazivaju kaspaze²⁰. Opisana su dva različita, ali konvergentna puta za aktivaciju kaspaza: spoljašnji, posredovan receptorima i unutrašnji ili mitohondrijski put. Spoljašnji (receptorski) put apoptoze se odvija putem spoljašnjih receptora koji pripadaju porodici TNF (*tumor necrosis factor*) i aktivacijom kaspaze-8. Unutrašnji put apoptoze odvija se preko mitohondrija i kaspaze-9. Na kraju, oba puta dovode do aktivacije kaspaze-3, što aktivira PARP (poli-ADP-riboza polimeraza) i nukleozomsku DNK fragmentaciju (Slika 1.4).



Slika 1.4 Šema spoljašnjeg i unutrašnjeg puta apoptoze. Unutrašnji put apoptoze se odvija aktivacijom p53 i mitohondrija što vodi aktivaciji kaspaze-9. Spoljašnji put apoptoze se odvija preko „death“ receptora iz familije TNF koji aktiviraju kaspazu-8. Oba puta aktiviraju kaspazu-3 i apoptozu. Bcl-2 blokira unutrašnji put apoptoze. Survivin (uz ostale proteine iz grupe IAP) blokira završni dio unutrašnjeg apoptotskog puta (kaspazu-9), a po nekima i kaspazu-3 (modifikovano po Mitroviću, 2009)²¹

Apoptoza je proces koji je genski regulisan. Odvija se zahvaljujući ravnoteži između antiapoptotskih i proapoptotskih gena, odnosno njihovih produkata - proteina. Jedna grupa molekula koja blokira apoptozu tako što se direktno vezuje za kaspaze jeste IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*)²². IAP je familija antiapoptotskih proteina koji inhibiraju inicijatora (kaspazu-9) i efektorske kaspaze (kaspazu-3 i kaspazu-7) i na taj način sprečavaju apoptozu²³.

Do danas je identifikovano 8 članova IAP familije proteina: XIAP, cIAP1, cIAP2, melanoma IAP (livin), IAP-like protein 2, neuronal apoptosis inhibitor protein, apollon (BRUCE) i survivin^{24,25}.

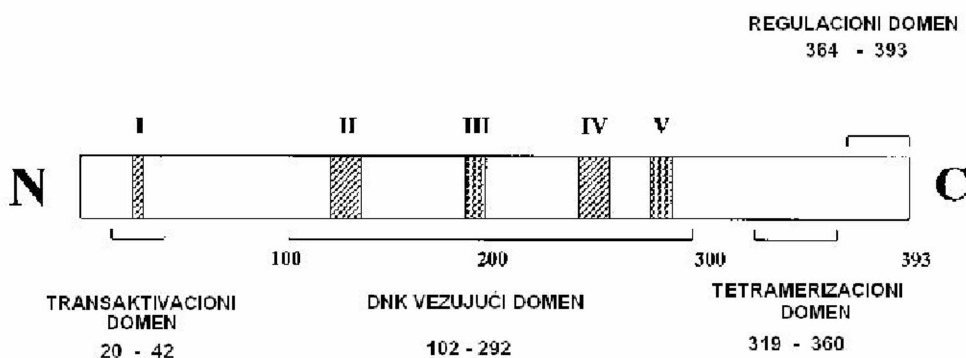
1.3.2. Proapoptotski mehanizmi u patogenezi OSCC - TP53 gen

Savremeni napredak u oblasti molekularne genetike omogućio je razumijevanje molekularnog mehanizma karcinogeneze u čovjeka. S tim u vezi, široko je prihvaćen stav da tumor-supresorni geni veoma često igraju centralnu ulogu u genezi i napredovanju različitih neoplazmi u čoveka²⁶. Tumor-supresorni geni su definisani kao geni čiji gubitak funkcije, uzrokovan mutacijama, ima onkogeni efekat. Prema tome, „divlji tip“ (nemutirani) alela ovih gena funkcioniše tako što prevenira ili suprimira tumorogenezu²⁷.

TP53 gen je najčešće mutirani tumor-supresorni gen u tumorima čoveka. Stoga su TP53 gen i njegovi proteinski produkti postali centar intenzivnog izučavanja, pogotovu od momenta kada je otkriveno da više od 50% neoplazmi čovjeka posjeduje mutaciju na ovom genu²⁸. Tokom

posljednje dekade otkrivene su tumor-supresorne aktivnosti TP53 gena, kao i način regulacije ovih aktivnosti. Objašnjenje mehanizama koji aktiviraju i regulišu TP53 trebalo bi da doprinese rasvetljavanju mehanizma razvitka kancera i otkriću novih terapijskih mogućnosti u borbi protiv karcinoma.

TP53 tumor-supresorni gen (otkriven 1979. godine) lociran je na kratkom kraku (p) hromozoma 17. P53 je protein koji je kodiran od strane ovog gena. Kada se govori o genu TP53, on se sastoji od 11 egzona, od kojih je prvi nekodirajući. Proteinski produkt ovog gena - p53 protein se sastoji od 393 aminokiseline i obuhvata četiri regiona sa različitim funkcijama. Pripada grupi DNK vezujućih fosfoproteina. Na slici 1.5 šematski je prikazana struktura p53 proteina sa definisanim regionima.



Slika 1.5 Šematski prikaz strukture p53 proteina

P53 ima dva oblika: jedan je udružen sa mogućnošću blokiranja progresije ćelijskog ciklusa i jedinstven je za „divlji tip” (*wild type*) nemutiranog proteina, a drugi je udružen sa mogućnošću podsticaja ćelijske proliferacije i uobičajen je za mutiranu formu p53 proteina, koja je slična „divljem tipu” p53 proteina²⁹.

U fiziološkim uslovima, p53 ima kratak poluživot (20 minuta), vjerovatno zbog osobine da utiče na ubikvitarne proteolitičke procese, zbog čega se on u normalnom ćelijskom ciklusu nalazi u stanju mirovanja. TP53 biva hitno aktiviran onog momenta kada se desi oštećenje DNK dejstvom jonizujućeg zračenja, UV zraka, hemijskih supstanci ili drugih agenasa koji mogu izazvati mutacije. Poslije jednog takvog ataka na genetski materijal, dešavaju se dramatične promjene na „uspavanom” TP53 genu³⁰. Pokretanjem do danas nerazjašnjenih mehanizama kao odgovor na pomenute agense koji interaguju sa DNK molekulom, ćelularni nivo p53 proteina sa produženim poluživotom se povećava 5-60 puta^{26,31}. Mogući mehanizmi akumulacije p53 proteina jesu *de novo* transkripcija gena, alternativna obrada primarnog transkripta, translaciona kontrola i stabilizacija proteinskog produkta³². Imunohistohemijski se može identifikovati samo proteinski produkt mutiranog TP53 gena zbog dužeg poluživota proteina.

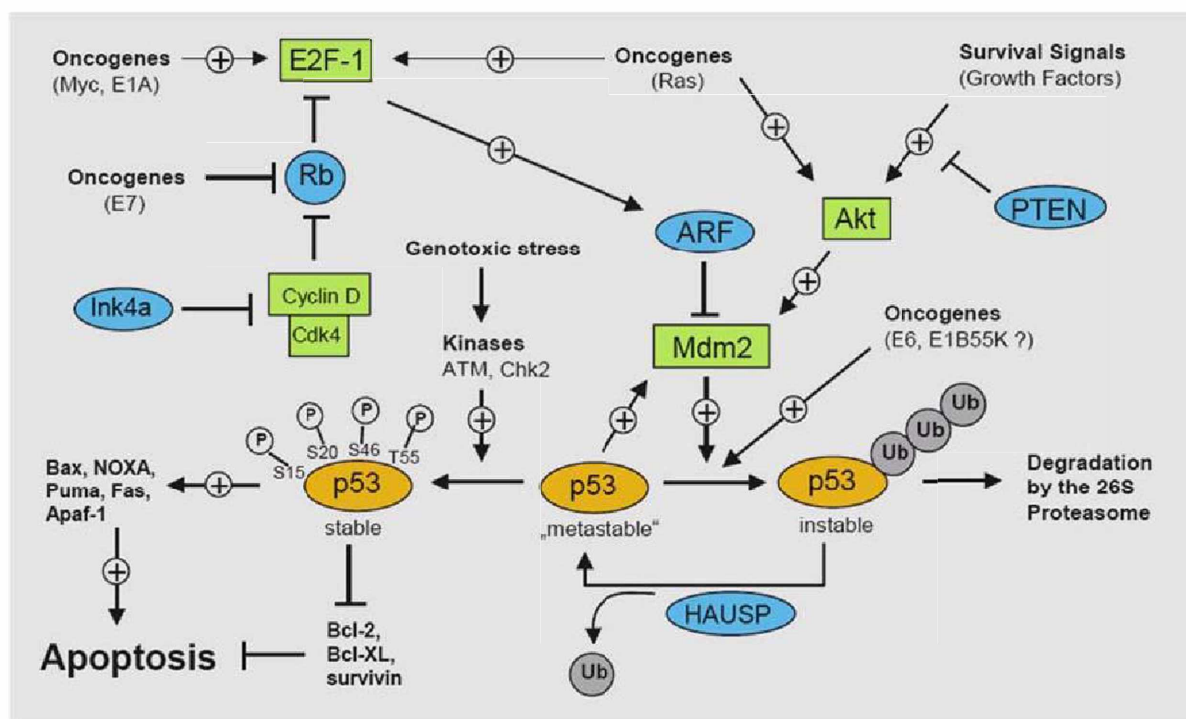
Istraživanja su pokazala da proteinski produkt nemutiranog TP53 gena može da djeluje kao:

- transkripcioni faktor-represor;

- transkripcioni faktor-aktivator;
- netranskripcioni aktivator apoptoze;
- signalni transduktor;
- replikacioni faktor;
- gen koji ima autoproteaznu aktivnost, što još uvijek nije dokazano i
- gen koji ima nukleaznu aktivnost, što takođe još uvijek nije definitivno potvrđeno³³.

Proteinski produkt TP53, kao transkripcioni aktivator, reguliše transkripciju najmanje 6 gena (p21 WAF/CIP1, MDM, GADD45, Cyclin G, BAX, IGF-PB3) koji učestvuju u procesima zaustavljanja ćelijskog ciklusa, inaktivaciji procesa transkripcije u DNK ekscizionom „repair” procesu, koji je p53 zavisan, aktivaciji procesa apoptoze ili blokadi prenošenja signala mitogenih faktora rasta³⁴.

Nemutirani p53 reguliše p21/waf1 protein koji inaktivira kompleks ciklin/ciklin-zavisne kinaze što, između ostalog, rezultira blokadom progresije ćelijskog ciklusa iz G1 u S fazu³⁵. Pored toga, p21/waf protein blokira djelovanje proliferišućeg celularnog nuklearnog antigena (PCNA - *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), što prethodi DNK replikaciji³⁶. Tim putem, inaktivacija p21 može da rezultira abnormalnom kontrolom DNK replikacije ili gubitkom koordinacije između DNK replikacije i progresije ćelijskog ciklusa³⁵ (slika 1.6).



Slika 1.6 Uloga p53 u kontroli ćelijskog ciklusa

Stabilizacija molekula p53 je najvjerovatniji mehanizam kojim se ovaj protein akumulira u ćelijama poslije dejstva stresa. Molekularna osnova ove stabilizacije nije sasvim jasna. Usled oštećenja DNK i uvećane količine stabilisanog p53 proteina, dolazi do zaustavljanja ćelijskog

ciklusa, zaustavljanja rasta i procesa apoptoze. P53 indukuje zaustavljanje ćelijskog ciklusa na prelazu iz G1 u S fazu, dajući ćeliji dovoljno vremena za reparaciju, čime se sprečava dupliranje grešaka^{37,38}. U neizmijenjenim ćelijama, ovo vrijeme je dovoljno za ispravljanje većeg dijela oštećenja i, poslije G1 zastoja, ćelija normalno nastavlja svoj ćelijski ciklus. Međutim, neoplastično transformisana ćelija sadrži toliku količinu oštećene DNK da mehanizmi oporavka nisu u mogućnosti da dovedu do popravke oštećenja. U prisustvu neizmijenjenog p53 proteina, ovakve ćelije umiru procesom programirane ćelijske smrti – apoptoze²⁶.

Prema savremenom modelu, p53 funkcioniše kao „čuvar genoma” otkrivajući oštećenja koja već postoje ili potencijalna oštećenja DNK, obezbjeđujući protektivni odgovor, bilo blokirajući ćelijski ciklus ili izazivajući apoptozu pogođene ćelije. Gubitak ove genetske funkcije dozvoljava razmnožavanje ćelija sa genetskim oštećenjem, a to je ključni korak u razvoju neoplazije³⁹. Studije su pokazale da gubitak protektivnog ćelijskog mehanizma TP53 gena dozvoljava evoluciju klonalne populacije ćelija sa selektivnom sklonošću da nekontrolisano rastu, što može rezultirati progresijom karcinoma⁴⁰.

Mutirani p53, zajedno sa izmijenjenom ekspresijom drugih gena koji utiču na ćelijski ciklus, dovodi do nekontrolisane patološke diobe i ćelijske proliferacije, a time i do ekspanzije malignog klona ćelija²⁶. Mutacija oba alela ili gubitak jednog i mutacija na drugom alelu p53 gena, neophodni su za razvoj tumora jer jedino gubitak oba „divlja” tipa alela mogu rezultirati nekontrolisanom ćelijskom diobom. Heterozigotno stanje sa jednim normalnim i jednim inaktivnim alelom može doprinijeti nastanku predispozicije za razvitak tumora⁴¹.

Zbog svoje ključne uloge u kontroli ćelijskog ciklusa, ni malo ne čudi činjenica da je TP53 gen mutiran u preko 50% tipova malignih tumora.

Sposobnost TP53 da kontroliše apoptozu u slučaju oštećenja DNK mogao bi imati praktični terapijski značaj. Zračenje i hemioterapija, dva uobičajena pristupa u tretmanu kancera, djeluju tako što indukuju oštećenje DNK, što za posledicu ima apoptozu. Iz ovoga slijedi da će tumori koji sadrže normalan TP53 gen, vjerovatno, bolje reagovati na pomenutu terapiju nego tumori koji su nosioci mutacije na TP53 genu³⁰.

1.3.3. Polimorfizmi TP53 gena

Razlike u sekvenci DNK koje postoje između individua jedne vrste sa učestalošću većom od 1% označene su kao polimorfizmi sekvence DNK. Polimorfizam sekvence DNK se može javiti kao polimorfizam nukleotidne sekvence i kao polimorfizam različitih dužina sekvenci. Polimorfizmi nukleotidne sekvence obuhvataju tačkaste i inserciono-delecione polimorfizme. Tačkasti polimorfizmi, ili polimorfizmi jednog nukleotida (eng. *Single nucleotide polymorphisms*, SNPs) predstavljaju varijabilnost tipa bazne zamjene. Na osnovu sekvence humanog genoma, procijenjeno je da on sadrži približno 1-2 miliona tačkastih polimorfizama, tako da se genomi dvije nasumično izabrane osobe razlikuju za 1 bp na svakih 1,25 kb. Inserciono-delecioni polimorfizmi su vezani za inserciju ili deleciju određenog niza nukleotida. Polimorfizmi različite dužine sekvence (eng. *Variable Number of Tandem Repeats*, VNTRs ili *Short Tandem Repeats*, STRs) predstavljeni su različitim brojem ponovaka u lokusima sa tandemski ponovljenim sekvencama. U prosjeku, na svake 2 kb humanog genoma nalazi se po jedan mikrosatelit u kojem broj ponovaka varira između različitih jedinki.

Veoma je bitno što ove promjene, iako diskretne, mogu uticati na sintezu i funkciju odgovarajućeg proteina. Ako se to ima u vidu, razumljivo je zašto se polimorfizmi gena dovode u vezu sa predispozicijom jedinice za nastanak pojedinih oboljenja ili stanja. Postojanje takve veze obično se utvrđuje u tzv. studijama asocijacije, kada se analizira frekvencija različitih alela ispitivanog gena u opštoj populaciji i kod oboljelih osoba.

Među insercionim polimorfizmima TP53 gena, najviše podataka je dostupno o PIN3 Ins16bp polimorfizmu, koji podrazumijeva inserciju nukleotidne sekvence dužine 16 baznih parova (bp) u intronu 3 TP53 gena. U većem broju studija, pokazano je da je PIN3 Ins16bp polimorfizam povezan sa povećanim rizikom od nastanka različitih malignih tumora, najčešće karcinoma dojke, kolona i pluća^{42,43,44}. Do danas, ovaj polimorfizam nije identifikovan kao faktor rizika za nastanak OSCC. Za sada ne postoji jasno objašnjenje kako ovaj polimorfizam doprinosi tumorogenezi. Iako je moguće da insercija 16bp u intronu 3 uslovljava alternativnu obradu transkripta p53 proteina i mijenja njegovu funkciju, dosadašnja istraživanja nisu uspjela da potvrde takvu mogućnost.

1.3.4. Antiapoptotski mehanizmi u patogenezi OSCC – survivin

Survivin je jedan od članova IAP porodice proteina i regulator je ćelijskog ciklusa⁴⁵. To je najmanji član IAP, sastavljen od 142 aminokiseline, kodiran genom na 17q25 hromozomu. Glavna funkcija survivina jeste regulacija ćelijske diobe i inhibicija apoptoze. Survivin posreduje u vezivanju hromozomskih proteina za kinetohore i stabilizuje mikrotubule, doprinoseći bipolarnom formiranju diobnog vretena⁴⁶. Svoju antiapoptotsku funkciju survivin obavlja inhibirajući kaspaze 3, 7 i 9.

Regulacija funkcije i ekspresije survivina je kompleksna, odvija se na različitim nivoima, uključujući transkripciju, degradaciju proteina i intracelularnu sekvencijaciju preko različitih liganada. Ekspresija survivina je povećana na transkripcionom nivou putem nuklearnog faktora kapa B⁴⁷. Faktori rasta, kao insulinu sličan faktor rasta-I/mTOR, povećavaju ekspresiju survivina preko brzih promjena u iRNK translokaciji⁴⁸. Drugi faktori koji su uključeni u povećanu ekspresiju survivina jesu članovi Ras familije onkogen^{49,50}.

Sa druge strane, survivin je jedan od gena koji je suprimiran na transkripcionom nivou putem divljeg tipa p53 i p75^{51,52}.

Survivin se eksprimira u plućima embriona i raznim organima fetusa u razvoju (fetalnoj jetri, bubregu, plućima i GIT-u)²², ali se ne može detektovati u normalnom adultnom tkivu, osim u tkivu timusa, CD34+ stem ćelijama, placenti, bazalnim epitelnim ćelijama kolona, hepatocitima, endotelnim ćelijama, epitelnim ćelijama debelog crijeva, endometrijumu i limfocitima^{53,54,55,56}. Izražena ekspresija u fetalnim tkivima ukazuje na važnu ulogu survivina u razvoju tkiva⁵⁷.

Ispitivanja genoma su pokazala poremećenu ekspresiju survivina u tumorima, za razliku od ekspresije u normalnim tkivima⁵⁷. Ekspresija survivina u tumorima može biti poremećena putem nekoliko mehanizama, uključujući amplifikaciju lokusa na hromozomu 17q25⁵⁷, demetilaciju⁵⁸, kao i povećanu aktivnost promotora⁵⁹. Povećana ekspresija survivina u ćelijama tumora najvjerovatnije je nezavisna od ćelijskog ciklusa, što ukazuje na povećanje njegove antiapoptotske uloge u poređenju sa normalnim ćelijama, u kojima je funkcija regulacije mitoze dominantna. Najzad, promjenljiva intracelularna lokalizacija survivina u tumorima (u odnosu na

citoplazmu i jedro) može biti indikator aktivnosti survivina i može biti prognostički marker za nekoliko tipova tumora, uključujući karcinom nazofarinksa i astroцитom^{60,61}.

Pokazano je da do povećane ekspresije survivina dolazi u ranoj fazi kancerogeneze, budući da je takav fenomen uočen u različitim prekanceroznim lezijama, pa i displazijama epitela debelog crijeva i leukoplakijama oralne sluzokože^{62,63}.

Istraživanja ekspresije survivina u oralnim OSCC⁶⁴ su pokazala da je povećana ekspresija ovog proteina izražena u slabo diferentovanim tumorima; zapaženo je da pacijenti sa niskom ekspresijom survivina imaju bolje stope preživljavanja u odnosu na pacijente sa visokom ekspresijom.

Osim u malignim tumorima usne duplje, survivin je detektovan i u odontogenom epitelu i u benignim odontogenim lezijama. Pokazano je da je nivo ekspresije iRNK za survivin znatno veći u ameloblastomima nego u zubnim zamecima. Stoga je zaključeno⁶⁵ da je moguće da survivin učestvuje u onkogenezi odontogenog epitela. Takođe, survivin je eksprimiran i u epitelnim ćelijama perikoronarnih folikula, u folikularnim cistama i u bazalnom⁶⁶, a naročito u suprabazalnom epitelnom sloju keratocističnih odontogenih tumora⁶⁷. Najzad, interesantna je činjenica da je survivin detektovan i u ćelijama unutrašnjeg gleđnog epitela zubnih zametaka, kao i u epitelnim ćelijama ameloblastoma⁶⁵.

1.3.5. Polimorfizmi gena za survivin

Regulacija ekspresije survivina je vrlo kompleksna. Ona može biti zavisna od faze ćelijskog ciklusa, i to na nivou transkripcije (često), što uključuje tzv. CDE/CHR regulatorne elemente (*Cell cycle-dependent elements/cell cycle-homology regions*) u promotorskom regionu i na posttranskripcionom nivou (rijetko). Takođe, može biti i nezavisna od faze ćelijskog ciklusa (fosforilacija, određeni citokini).

CDE/CHR predstavlja dio promotora gena za survivin, važan za regulaciju njegove ekspresije. Zato se danas sve više ispituju različiti polimorfizmi upravo u ovom regionu. Jedan od takvih je i funkcionalni polimorfizam na poziciji -31 promotora za survivin (-31 u odnosu na prvi nukleotid startnog kodona ATG)^{68,69}. Ovaj polimorfizam je lokalizovan na CDE/CHR veznom mjestu i potencijalno mijenja transkripciju survivina zavisnu od faze ćelijskog ciklusa. Mutacija na tom mjestu dovodi do prekomjerne ekspresije survivina na nivou iRNK i na nivou proteina⁷¹. Polimorfizam na poziciji -31 je povezan sa povećanim rizikom od razvoja brojnih malignih tumora, kao što su karcinom želuca⁷¹, karcinom kolona⁷², adenokarcinom pluća⁷³.

Pored ovog polimorfizma, postoje još tri polimorfizma: -644T/C, -625G/C i -241T/C⁷⁴. Ove genetske varijante survivina mogu izmijeniti aktivnost promotora. Tako su Yang i sar. pokazali vezu između polimorfizma -625G/C i razvoja skvamoznog karcinoma jednjaka u kineskoj populaciji⁷⁴.

Nedavno je pokazano da visoki nivoi survivina u nekim malignim tumorima mogu biti posledica -31G/C mutacije. Stoga se funkcionalni polimorfizmi koji utiču na ekspresiju survivina mogu smatrati faktorima rizika za kancerogenezu, što i pokazuju brojne studije u kojima je, u najvećem broju slučajeva, CC genotip na ovom lokusu povezan sa povećanim rizikom od oboljevanja od malignih tumora. Analizirajući ovaj polimorfizam kod pacijenata oboljelih od kolorektalnog karcinoma, Gazouli i saradnici⁷² su utvrdili da su C alel, kao i CC genotip, značajno zastupljeniji kod ovih pacijenata u odnosu na zdravu populaciju. Kod 250 pacijenata sa karcinomom jednjaka, CC genotip je bio značajno češći nego kod zdravih kontrola⁷⁵, a pacijenti

sa ovim genotipom bili su podložniji metastazama u regionalnim limfnim čvorovima, mada nije utvrđen prognostički značaj ovog polimorfizma za petogodišnje preživljavanje pacijenata⁷⁵.

1.4. Humani papiloma virusi (HPV)

Papiloma virusi su važni etiološki agensi malignih tumora kod čovjeka. Do sada je identifikovano preko 100 tipova humanih papiloma virusa (HPV). Infekcija HPV nastaje prodorom virusa kroz oštećenja na koži i sluzokoži (trauma, hronična iritacija). HPV izaziva proliferaciju bazalnih ćelija i nastanak tumora. Virus se razmnožava u jedru, dovodeći do povećanja jedra, njegove hiperhromatičnosti i degeneracije, što je praćeno vakuolizacijom citoplazme. Sve ćelije tumora sadrže virusni genom. Za razvoj HPV infekcije značajna je depresija celularnog imuniteta⁷⁶.

Virus prodire u ćelijsko jedro, u njemu se linearizuje i ugrađuje u genom domaćina ili ostaje kao cirkularni ekstrahromozomski replikon (epizom). Epizomska virusna DNK je karakteristika kožnih i sluzokožnih prekancerskih lezija, dok invazivni karcinomi skoro uvijek sadrže integrisane virusne DNK. Mjesto integracije u genom inficirane ćelije je nasumično, mada se virus može integrisati i blizu ćelijskih protoonkogen⁷⁷. Nakon infekcije ćelije, virus koristi ćelijsku „mašineriju” za replikaciju, transkripciju i translaciju.

Na osnovu potencijala da izazovu invazivne lezije, humani papiloma virusi su podijeljeni na nisko-rizične (nekancerogene), kojima pripadaju tipovi 6, 11, 42, 43 i drugi, i visoko-rizične (kancerogene), kojima pripadaju tipovi 16, 18, 31, 33, 35, 45 i drugi. HPV niskog rizika izazivaju benigne tumore, koji se manifestuju kao: kožne bradavice (*verrucae vulgaris*), papilomi respiratorne i oralne sluzokože i genitalni kondilomi. Na sluzokoži usne duplje, HPV infekcija se manifestuje kao fokalna epitelna hiperplazija, rjeđe kao skvamozni papilom, a uzročnici ovih promjena su najčešće HPV13 i 32.

Genom humanog papiloma virusa čini 9 gena i to: 7 tzv. rano-faznih gena (E1-E7) i 2 kasno-fazna gena (L1-L2). E geni kodiraju proteine regulatore replikacije virusne DNK, kao i proteine koji indukuju kolaps citokeratinske mreže u humanim keratinocitima. L geni kodiraju proteine kapsida virusa.

E1 gen kodira dva različita proteina uključena u inicijaciju replikacije virusa, dok E2 gen kodira aktivacione i represorske proteine koji regulišu transkripciju virusnih gena i replikaciju virusne DNK. Takođe, E2 kodira dva DNK vezujuća proteina, koji se vezuju za specifične nukleotidne sekvence u promotorima E6 i E7 gena. U interakciju sa E2 uključeni su DNK-vezujući domen i tetramerizacioni domen p53 proteina, što je prikazano i na slici 1.5, tako da mutacije u ovim domenima TP53 gena dovode do nemogućnosti vezivanja p53 za E2 i posledične nemogućnosti inhibicije replikacije DNK virusa, koja je pod kontrolom E2⁷⁸.

Uloga E6 proteina je da blokira p53 protein vezivanjem za njegov transaktivacioni domen. Inaktivirani p53 protein biva prepoznat od strane ubikvitinskih molekula i podvrgnut proteolitičkoj degradaciji. Sličnu funkciju ima i E7 protein, koji se vezuje za Rb protein, dovodeći do njegove ubikvitinske degradacije i, samim tim, inaktivacije ovog važnog tumorsupresornog proteina^{79,80}. Na ovaj način, inaktivacijom p53 i/ili Rb proteina, virusni onkoproteini uvode ćeliju u nekontrolisanu diobu.

U većini premalignih lezija oralne sluzokože, HPV DNK egzistira u epizomskom obliku (zatvoren cirkularni molekul, koji se replicira nezavisno od genoma ćelije domaćina). Nezavisno od tipa HPV, produkcija viriona zavisi od diferencijacije skvamoznih epitelih ćelija. U ovom

obliku, E2 gen/protein je intaktan i transkripcija E6 i E7 je strogo regulisana. Međutim, u većini malignih lezija, HPV genom je integrisan u hromozom ćelije domaćina i to u gotovo svim HPV18 i u oko 75% HPV16 pozitivnih karcinoma⁸¹. Iako se smatra da je integracija važan korak u prelasku premaligne u malignu ćeliju, ona ipak, nije jedini potrebni korak, pošto neki invazivni karcinomi sadrže samo epizomske HPV DNK sekvence.

Učestalosti HPV infekcije, zabilježene u svjetskoj literaturi, variraju od 0-100%, u zavisnosti od analizirane populacije, metode koja se koristi za detekciju HPV i vrste uzoraka koji se koriste za analizu (bris, pljuvačka, biopsija, aspirat)⁸². Od svih metoda detekcije DNK HPV, najosjetljivija je PCR metoda pod optimalnim eksperimentalnim uslovima. Postoje radovi o učestalosti kancerogenih tipova HPV u premalignim lezijama i cervikalnom karcinomu, ali nema podataka o učestalosti kancerogenih tipova HPV kod OSCC u našoj populaciji. Rezultati istraživanja prisustva HPV infekcije u tumorskom tkivu operisanih od OSCC pokazuju da je infekcija HPV16 detektovana kod 20%, a HPV18 kod 54% bolesnika sa OSCC⁸¹.

Danas se smatra da je HPV infekcija nezavisan faktor rizika za nastanak skvamocelularnih karcinoma glave i vrata, prvenstveno karcinoma orofarinksa⁸³. HPV+ tumori su poseban kliničko-patološki entitet, koji karakteriše izražena p16 reaktivnost, niska ili negativna p53 ekspresija, kao i visoka Ki67 imunoreaktivnost⁸⁴.

O prognostičkom značaju HPV infekcije u karcinomima glave i vrata mišljenja su različita, zavisno od lokalizacije tumora. Dok pojedini autori smatraju da je HPV infekcija (87% HPV16) prediktor bolje prognoze kod pacijenata sa karcinomom orofarinksa⁸⁵, drugi smatraju da je HPV16 infekcija kod OSCC prediktor pojave udaljenih metastaza i lošije prognoze, bez obzira na primijenjeni terapijski protokol⁸⁶.

Kada se ovo sagleda, jasno je da se nameće potreba za daljim istraživanjima usmjerenim na pronalaženje metoda rane detekcije i hemioprevencije premalignih lezija s ciljem da se smanji morbiditet i mortalitet od ove bolesti. Metode rane dijagnostike premalignih lezija usne duplje usmjerena su na otkrivanje prokancerogenih faktora koji imaju uticaj na nastanak ovih promjena, a koji se mogu detektovati iz pljuvačke i krvi. S tim u vezi, istraživanja su usmjerena na pronalaženje metoda brze i jednostavne detekcije prisustva kancerogenih tipova HPV virusa u pljuvački zdravih ljudi i onih kod kojih postoji visok rizik za oboljevanje od OSCC (pušači, alkoholičari) i u ranim fazama premalignih lezija (skrining studije). Kod osoba kod kojih se identifikuje neki od kancerogenih tipova HPV u pljuvački, istraživanja se dalje usmjeravaju na analizu prisustva autoantitijela na p53 u krvi i pljuvački ovih pojedinaca⁸⁷, sve u cilju rane detekcije malignih lezija usne duplje.

1.5. Liječenje OSCC i mjere prevencije

U liječenju OSCC primjenjuje se hirurška terapija, radioterapija i polihemioterapija.

Osnovni cilj hirurškog liječenja je široka, potpuna ekscizija tumora do klinički - makroskopski zdravog tkiva, uklanjanje regionalnih limfnih čvorova, ako su zahvaćeni metastazama, i rekonstrukcija resektiranog dijela tkiva ili organa. Uklanjanje regionalnih limfnih čvorova je od izuzetne važnosti za liječenje OSCC i izvodi se ako postoji i najmanja klinička sumnja da su limfni čvorovi na vratu metastatski izmijenjeni. Naziva se disekcija vrata i najčešće prethodi uklanjanju primarnog tumora.

Hirurški pristup oralnim karcinomima može biti intraoralni ili ekstraoralni⁸⁸. Intraoralnim pristupom moguće je adekvatno ekscidirati samo manje tumore (T1 i T2). U pojedinim slučajevima, kada je donja vilica bezuba, intraoralni pristup je dovoljan i za eksciziju većih

tumora (T3 i T4), pogotovu ako su locirani u prednje dvije trećine jezika ili poda usta. Ukoliko ovakav pristup ne omogućava hirurgu dobru preglednost, tumorima usne duplje pristupa se ekstraoralno.

U savremenom liječenju oralnog karcinoma, terapija izbora je hirurška. U najvećem broju slučajeva primjenjuje se i postoperativna radioterapija.

Radioterapija ili zračna terapija predstavlja korišćenje jonizujućeg zračenja u liječenju malignih oboljenja. Ona je neselektivna i zaustavlja ćelijski rast i diobu malignih, ali i zdravih ćelija, što dovodi do njihovog odumiranja. Protokol za sprovođenje postoperativne radioterapije se sprovodi: kada su histološke margine operisanog tumora pozitivne ili su veoma blizu tumora; kod ekstrapodalnog širenja tumora; višestrukih metastaza u limfnim čvorovima; slabo diferentovanih histoloških gradusa sa perineuralnom i perivaskularnom infiltracijom. Terapija se sprovodi na predio primarnog tumora i limfnih čvorova vrata obostrano sa 40 Gy, i dodatnim zračenjem od 20 Gy samo na poziciji primarnog tumora, ukoliko limfni čvorovi vrata nijesu metastatski izmijenjeni. U slučaju da postoje metastaze u regionalnim limfnim čvorovima vrata, sprovodi se postoperativna radioterapija u predjelu tih čvorova od 60 Gy.

U liječenju oralnog karcinoma danas se primjenjuju i citostatici. Istraživanja su pokazala da primjena simultane hemio/radioterapije u liječenju OSCC kod pacijenata sa lokalno uznapređovalom bolešću (T₄, N₂₋₃, M₀) daje zadovoljavajuće rezultate, s ciljem da se redukuje tumorska masa i pacijent prevede u niži stadijum bolesti koji je operabilan⁸⁹.

S kliničkog aspekta, na prognozu i tok bolesti značajan uticaj imaju veličina i broj uvećanih limfnih čvorova vrata, kao i ekstrakapsularni proboj, ali i nivo na vratu gdje se oni nalaze. S hirurškog aspekta posebno je značajna intraoperativna patohistološka verifikacija metastatski izmijenjenog (najdistalnijeg) jugulo-karotidnog limfnog čvora (III nivo), koja predstavlja značajan kriterijum za odluku da li da se radi radikalna disekcija vrata. Od izuzetnog značaja za praćenje toka bolesti jeste da se patohistološki odredi broj, veličina i očuvanost kapsule metastatski izmijenjenih limfnih čvorova u svakom nivou disektata vrata.

Rehabilitacija orofacijalnih funkcija nakon obimnih hirurških ekscizija izuzetno je važan element u efikasnoj hirurškoj terapiji oralnog karcinoma. Za ovaj proces je neophodan multidisciplinarni pristup, koji uključuje maksilofacijalnog hirurga, specijalistu plastične i rekonstruktivne hirurgije, logopede, stomatologe, protetičare, medicinske sestre.

Mjere prevencije OSCC obuhvataju mjere **primarne prevencije**, kao što su prestanak pušenja, umjerenije konzumiranje alkohola i dijagnostikovanje karcinoma u početnim kliničkim stadijumima. Veliku ulogu u blagovremenom prepoznavanju potencijalno malignih lezija u početnom stadijumu imaju stomatolozi u toku rutinskih pregleda. Bitna je rana dijagnostika oralnih prekanцерoznih lezija kao što su leukoplakija, eritroplakija, lihen planus i dr. Kod ovih pacijenata, neophodno je sprovoditi češće kliničke kontrole, kako bi se u što ranijem stadijumu otkrila eventualna maligna transformacija postojeće promjene.

U cilju prevencije sprovode se redovne postoperativne kontrole. Princip sprovođenja postoperativnih kliničkih kontrola je sledeći: jednom mjesečno u prvoj godini nakon operacije; jednom u dva mjeseca u drugoj godini od operacije; jednom u tri mjeseca sve do pet godina proteklih od operacije.

2. ISTRAŽIVAČKI PROBLEM I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Na osnovu danas raspoloživih prognostičkih parametara, koji uključuju patohistološke parametre tumora (histološki tip, nuklearni gradus, veličina tumora) i TNM klasifikaciju malignih bolesti, nije uvek moguće sa sigurnošću objasniti pojavu recidiva bolesti kod bolesnika sa istim histološkim tipom, gradusom i veličinom tumora, koji su na iste načine liječeni (hirurška i radioterapija) i kod kojih je patohistološki potvrđeno da su margine resekcije tumora bile bez tumorskog tkiva. Sve navedeno ukazuje na potrebu pronalaženja dodatnih faktora kojima bi se bolje definisalo biološko ponašanje tumora. Stoga se danas, na osnovu postojećih dostignuća molekularne biologije, sprovode mnoga istraživanja sa ciljem da se ispita potencijalni značaj genetskih markera za etiopatogenezu OSCC, kao i za tok i prognozu već uspostavljene maligne bolesti.

Saznanje da većina DNK oštećujućih agenasa djeluje mehanizmom indukcije ili supresije ćelijske apoptoze, otvorilo je mogućnost ispitivanja potencijalne prediktivne uloge onih gena čiji proteinski produkti učestvuju u regulaciji apoptoze. S tim u vezi, jedno od osnovnih pitanja jeste u kojoj mjeri na ove procese utiču geni koji stimulišu apoptozu, tj. djeluju proapoptotski, u odnosu na gene koji sprečavaju ćelijsku apoptozu, tj. djeluju antiapoptotski.

Poznato je da je za homeostazu ćelija i tkiva od izuzetnog značaja balans između proapoptotskih i antiapoptotskih mehanizama. Svaki poremećaj ove ravnoteže može da oslobodi ćeliju od zaštitnih mehanizama i izazove njenu nekontrolisanu proliferaciju. Zbog toga bi bilo značajno ustanoviti koji mehanizmi, apoptotski ili antiapoptotski, imaju dominantniju ulogu u procesu kancerogeneze OSCC. Molekularno profilisanje tumora bi omogućilo individualizaciju terapijskih protokola, čime bi se doprinijelo poboljšanju uspješnosti liječenja.

Među genima koji deluju proapoptotski, posebno je interesantan TP53 gen, za koji je utvrđeno da je najčešće mutirani tumor-supresorni gen u tumorima čoveka²⁸. Ovaj tumor-supresorni gen je lociran na kratkom kraku (p) hromozoma 17 i funkcioniše kao „čuvar genoma”, otkrivajući oštećenja koja već postoje ili potencijalna oštećenja u DNK. Gubitak ove genetske funkcije dozvoljava razmnožavanje ćelija sa genetskim oštećenjem, što je ključni korak u razvoju neoplazije²⁰. Kontroverzno je pitanje moguće korelacije između prisustva TP53 mutacija i loše prognoze kod pacijenata sa dijagnostikovanim skvamocelularnim karcinomima glave i vrata. Dok je u pojedinim studijama^{90,91,92} pokazana veza između prisustva mutacija, tj. prekomjerne ekspresije p53 i loše prognoze, u mnogim studijama ovakva veza nije nađena^{93,94,95}. Međutim, ukazano je na bitnu povezanost povećane ekspresije p53 kod bolesnika sa OSCC jezika u odnosu na veličinu primarnog tumora, stadijum bolesti i metastatski izmijenjene limfne čvorove, a povećana ekspresija p53 proteina je direktno proporcionalna agresivnosti karcinoma (određenom pojavom regionalnih i udaljenih metastaza)⁹⁵.

Među genima koji deluju antiapoptotski, posebno je interesantan survivin koji funkcioniše kao inhibitor apoptoze i regulator ćelijske diobe i angiogeneze. Gen za survivin lociran je na 17. hromozomu (17q25). Prekomjerna ekspresija survivina uočena je u velikom broju malignih tumora, uključujući i tumore pluća, dojke, jednjaka i debelog crijeva⁵⁶, ali i OSCC^{64,96}. Budući da djeluje kao inhibitor apoptoze, ali i stimulišući diobu ćelija i angiogenezu, očekivano je da survivin ima važnu ulogu u nastanku i rastu tumora. Međutim, njegova tačna uloga u ovim procesima je još uvijek nejasna. Pokazano je da do povećane ekspresije survivina dolazi u ranoj fazi karcinogeneze, uključujući i displazije epitela debelog crijeva i leukoplakije oralne sluzokože^{62,63}.

Istraživanja ekspresije survivina u OSCC su pokazala da visok nivo ekspresije ovog proteina predstavlja negativan prognostički faktor, koji može biti od koristi u identifikaciji slučajeva koji pokazuju agresivniji i invazivniji fenotip^{96,97}.

U složenom procesu regulacije ćelijskog ciklusa, promjene u strukturi ili funkciji TP53 odražavaju se na ekspresiju survivina i modifikuju njegovu aktivnost. Pokazano je da je p53 u stanju da dovede do transkripcione represije gena za survivin⁵¹, ali i da mutacije TP53 gena doprinose povećanoj ekspresiji survivina⁹⁸. Polimorfizmi gena za survivin i p53 imaju uticaja na funkciju ovih proteina. Pokazano je da -31C/G polimorfizam u promotorskom regionu gena za survivin dovodi do povećane ekspresije kako samog proteina tako i iRNK za survivin⁷⁰. U većem broju kliničkih studija uočena je korelacija između pojedinih varijanti ovog polimorfizma i pojave malignih tumora jednjaka⁷⁵ i debelog crijeva^{72,99}, ali promjene polimorfizama ovih gena kod pacijenata sa OSCC nisu još uvijek jasne, što pruža dovoljno prostora za dalja istraživanja.

Danas se smatra da i prisustvo HPV infekcije pojedinim tipovima ovog virusa predstavlja nezavisan faktor rizika za nastanak skvamocelularnih karcinoma glave i vrata, prvenstveno karcinoma orofarinksa⁸³. HPV+ tumori su poseban kliničko-patološki entitet, koga karakteriše izražena p16 reaktivnost, niska ili negativna p53 ekspresija kao i visoka Ki67 imunoreaktivnost⁸⁴. O prognostičkom značaju HPV infekcije u karcinomima glave i vrata mišljenja su različita^{85,86}, zavisno od lokalizacije tumora. Dok pojedini autori smatraju da je HPV infekcija prediktor bolje prognoze kod pacijenata sa karcinomom orofarinksa⁸⁵, drugi ne dijele to mišljenje; štaviše, smatraju da je HPV16 infekcija kod OSCC prediktor pojave udaljenih metastaza i lošije prognoze⁸⁶, bez obzira na primijenjeni terapijski protokol.

Na osnovu dosadašnjih, kontroverznih saznanja o ulozi p53 antionkogenog, survivina i kancerogenog tipa HPV16 u molekularnoj patogenezi OSCC, postavili smo radne hipoteze istraživanja prema kojima bi bolesnici oboljeli od OSCC, bez obzira na stadijum bolesti, imali:

- lošiju prognozu u smislu pojave lokalnog i regionalnog recidiva bolesti ukoliko se kod njih ustanovi poremećena produkcija p53 proteina (povećana/smanjena), ili poremećena ekspresija survivina (povećana/smanjena), kao i prisustvo infekcije HPV16, u odnosu na bolesnike u čijim tumorima nije detektovana promjena ekspresije onkoproteina ili prisustvo HPV16 infekcije;
- znatno lošiju prognozu ukoliko se otkrije udružena pojava poremećaja produkcije p53 proteina (povećana/smanjena), ekspresije survivina (povećana/smanjena) i prisustva infekcije HPV16, u odnosu na bolesnike kod kojih postoji samo infekcija HPV16 virusom ili samo promijenjena ekspresija p53 ili survivina, što će se manifestovati kraćim vremenom do pojave lokalnog i regionalnog recidiva bolesti (DFI - *disease free interval*).

3.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu postavljenih istraživačkih hipoteza, osnovni ciljevi ovog istraživanja bi bili da se, u uzorcima tumora operisanih pacijenata:

- ispita ekspresija p53 i survivina, kao i stepen njene povezanosti sa
 - kliničkim parametrima (lokalizacija tumora, pol, godine starosti),
 - histopatološkim parametrima (T, Hg, Ng, pTNM) i
 - pokazateljima progresije bolesti (lokalni i regionalni recidiv bolesti);
- utvrdi da li postoji međusobna veza između ekspresije p53 proteina i survivina;
- utvrdi frekvencija različitih alela i genotipova polimorfizma -31C/G gena za survivin, kao i PIN3 Ins16bp gena p53 kod pacijenata sa OSCC, te da se dobijeni rezultati uporede sa rezultatima kod zdravih pojedinaca;
- utvrdi eventualno postojanje korelacije između ekspresije survivina i p53 sa pojedinim genotipovima ispitivanih polimorfizama;
- ispita učestalost HPV16 infekcije u uzorcima tumorskog tkiva OSCC;
- utvrdi korelacija između ekspresije p53 i survivina sa prisutnom HPV16 infekcijom, kao i korelacija različitih genotipova polimorfizama gena za survivin i p53 sa prisutnom HPV16 infekcijom (HPV16 - zavisna onkogeneza u odnosu na HPV16 - nezavisnu onkogenezu);
- utvrdi značaj prisutne HPV16 infekcije u progresiji OSCC.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Uzorak ispitanika

U kombinovanoj retrospektivnoj i prospektivnoj studiji, analizirani su uzorci 60 bolesnika kod kojih je u Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Kliničkog Centra Crne Gore, u periodu od januara 2003. do septembra 2009. godine, operativno odstranjen oralni skvamocelularni karcinom (OSCC), lokalizovan na donjoj usni, jeziku ili podu usta. Podaci o lokalizaciji neoplazmi, starosti i polu bolesnika, kao i o mikroskopskim karakteristikama neoplazmi (histološki gradus - Hg, nuklearni gradus - Ng, veličina tumora - T, pTNM klasifikacija) prikupljeni su iz uputnica za histopatološki pregled.

Svi bolesnici su klinički praćeni tri godine, a neki od njih i duže. Na redovne postoperativne kliničke kontrolne preglede radi praćenja pojave lokalnog recidiva i/ili metastatske bolesti, bolesnici su dolazili po završetku hirurškog liječenja (i eventualne radioterapije) jednom mjesečno prve godine, svaka dva mjeseca u toku druge godine i svaka tri mjeseca u toku treće godine. Za evidenciju podataka prikupljenih u toku istraživanja korišćen je posebno dizajnirani istraživački karton (prilog 1).

Tkivni isječki su, u Centru za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog Centra Crne Gore, rezani iz parafinskih kalupa i bojeni hematoksilin-eozin (H/E) metodom, nakon čega se definisao histološki tip oralnog karcinoma, kao i relevantni histopatološki parametri. Na osnovu H/E preparata odabran je po jedan reprezentativan uzorak tkiva (kalup) za imunohistohemijska ispitivanja i molekularno-genetičke analize.

4.2. Imunohistohemijska istraživanja

Imunohistohemijska obrada je obavljena u Laboratoriji za imunohistohemiju Centra za patologiju Kliničkog Centra Crne Gore. Imunohistohemijska analiza u parafinu ukalupljenih uzoraka obuhvatila je sledeće postupke:

- deparafinizaciju;
- proteolitičku digestiju (demaskiranje antigena);
- blokiranje endogene peroksidaze;
- imunohistohemijsko bojenje primjenom streptavidin-biotin tehnike.

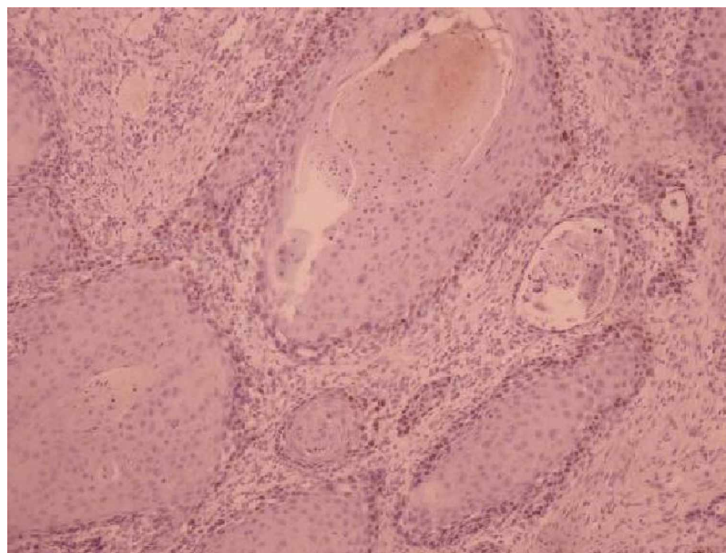
Za ovu vrstu analize korišćeni su uzorci tumorskog tkiva fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafin, koji su sječeni na rezove debljine 3 μ m i koji su zatim prošli kroz proces deparafinizacije - kroz seriju alkoholnih "kupki" (10-20 minuta ksilol, 2 minuta 100% alkohol, 2 minuta 96% alkohol, 2 minuta 70% alkohol i na kraju 5 minuta ispiranje u destilovanoj vodi). U cilju sprečavanja pojave nespecifičnog bojenja usled prisustva tkivne peroksidaze, endogena peroksidaza je blokirana 3% rastvorom vodonik peroksida (H₂O₂) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi, poslije čega su isječki isprani u destilovanoj vodi. Isječki su, zatim, zbog demaskiranja antigena, tretirani u 10 mM natrijum citratnom puferu (0,1 M limunska kisjelina, 0,1 M natrijum citrat C₆H₅Na₃O₇, pH 6,0) u mikrotalasnoj rerni prvo 9 minuta, a zatim 7 minuta na 500W, nakon čega su isprani dejonizovanom vodom.

Imunohistohemijska identifikacija p53 onkoproteina vršena je primjenom Streptavidin-biotin-peroksidaza tehnike, prema standardnoj LSAB+ proceduri (DAKO). Isječki 60 OSCC su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi primarnim antimišijim monoklonalnim antitijelom p53 (DO-7) kompanije DAKO u razblaženju 1:100, poslije čega su isprani u TRIS pufersanom rastvoru (TBS 0,05 M, pH 7,6) 2 puta u trajanju od po 5 minuta ukupno. Na isječke je, zatim, nanoseno sekundarno antitijelo (fabrički određen reagens kompanije DAKO), čija je inkubacija trajala 25 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su isprani TRIS pufersanim rastvorom (kao i poslije inkubacije sa primarnim antitijelom). Zatim su inkubirani streptavidin-peroksidaza kompleksom na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta, nakon čega je slijedilo ispiranje TRIS rastvorom. Kao hromogeni supstrat korišćen je diaminobenzidin (DAB) u razblaženju 50 μ l DAB koncentrata na 1ml supstrata. Kontrastno bojenje isječaka je izvedeno uranjanjem uzoraka u hematoksilin u trajanju od 4 sekunde, poslije čega su isječki ispirani u tekućoj vodi 5 minuta. Isječki su pokriveni vodenim medijumom. Imunohistohemijska analiza je vršena svjetlosnim mikroskopom marke Olympus-diaplan® (Olympus, Japan).

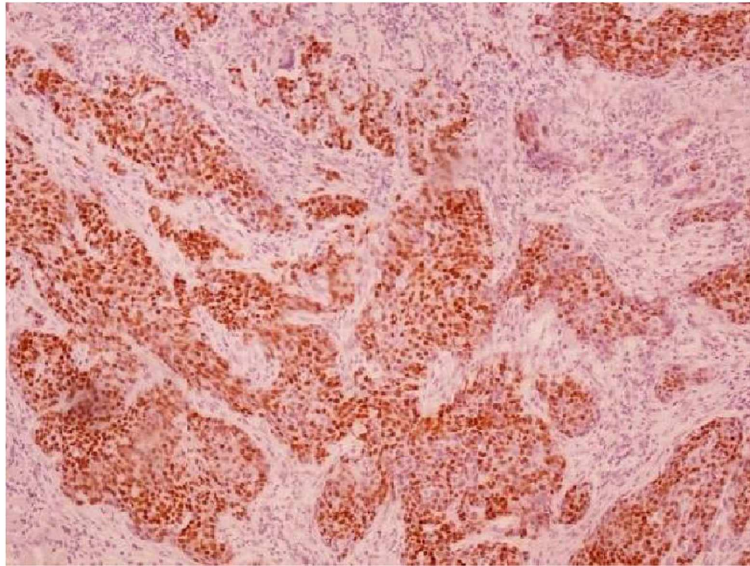
Pozitivna imunohistohemijska reakcija na p53 onkoprotein ograničena je na maligna jedra jer primijenjeno antitijelo daje specifičnu jedarnu reakciju vezujući se za epitope na NH2 kraju nemutiranog i mutiranog p53 onkoproteina. Na osnovu toga je izvršena semikvantitativna analiza, izražena kao procenat pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija u 10 reprezentativnih vidnih polja velikog uvećanja mikroskopa. Prema procentu pozitivnih tumorskih ćelija, uzorci su podijeljeni u sledeće grupe:

- skor 0 - nema reaktivnosti tumorskih ćelija (-);
- skor 1 - jednako ili manje od 10% pozitivnih jedara tumorskih ćelija (+);
- skor 2 - od 11 do 40% pozitivnih jedara tumorskih ćelija (++) - Slika 4.1;
- skor 3 - jednako ili više od 40% pozitivnih jedara tumorskih ćelija (+++).

Pozitivnu kontrolu za detekciju p53 onkoproteina predstavljalo je tkivo OSCC sa visokim nivoom jedarne p53 pozitivnosti (Slika 4.2).



Slika 4.1 Ekspresija p53 u skvamocelularnom karcinomu, 100x
(umjerena jedarna pozitivnost u 15% tumorskih ćelija)



Slika 4.2 Ekspresija p53 u skvamocelularnom karcinomu, 100x
(izražena jedarna pozitivnost u oko 85% tumorskih ćelija)

Za imunohistohemijsko bojenje survivinom, na uzorcima 45 OSCC, primjenom streptavidin-biotin tehnike, korišćen je komercijalni kit (Labelled streptavidin-biotin - LSAB+ metoda, DAKO, Danska). Bojenje je sprovedeno po proceduri koja je navedena u instrukcijama proizvođača:

I FAZA - primarno antitijelo (Clone 12C4, DAKO) u razblaženju 1:50

- odliven je višak pufera, pokriven isječak minimalnom količinom (20-30 μ l) primarnog antitijela, inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi, ispran u TRiS-u, preliven svježim puferom;

II FAZA - biotinizovano vezno antitijelo

- odliven je višak pufera, pokriven isječak minimalnom količinom (20-30 μ l) LINK antitijela, inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi, ispran u TRiS-u, preliven svježim puferom;

III FAZA - streptavidin-peroksidaza

- odliven je višak pufera, pokriven isječak minimalnom količinom (20-30 μ l) streptavidin-peroksidaze, inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi, ispran u TRiS-u, preliven svježim puferom;

IV FAZA - supstrat hromogen

- odliven je višak pufera, pokriven isječak minimalnom količinom (20-30 μ l) hromogena diaminobenzidina (DAB), inkubiran 10 minuta na sobnoj temperaturi, ispran destilovanom vodom;

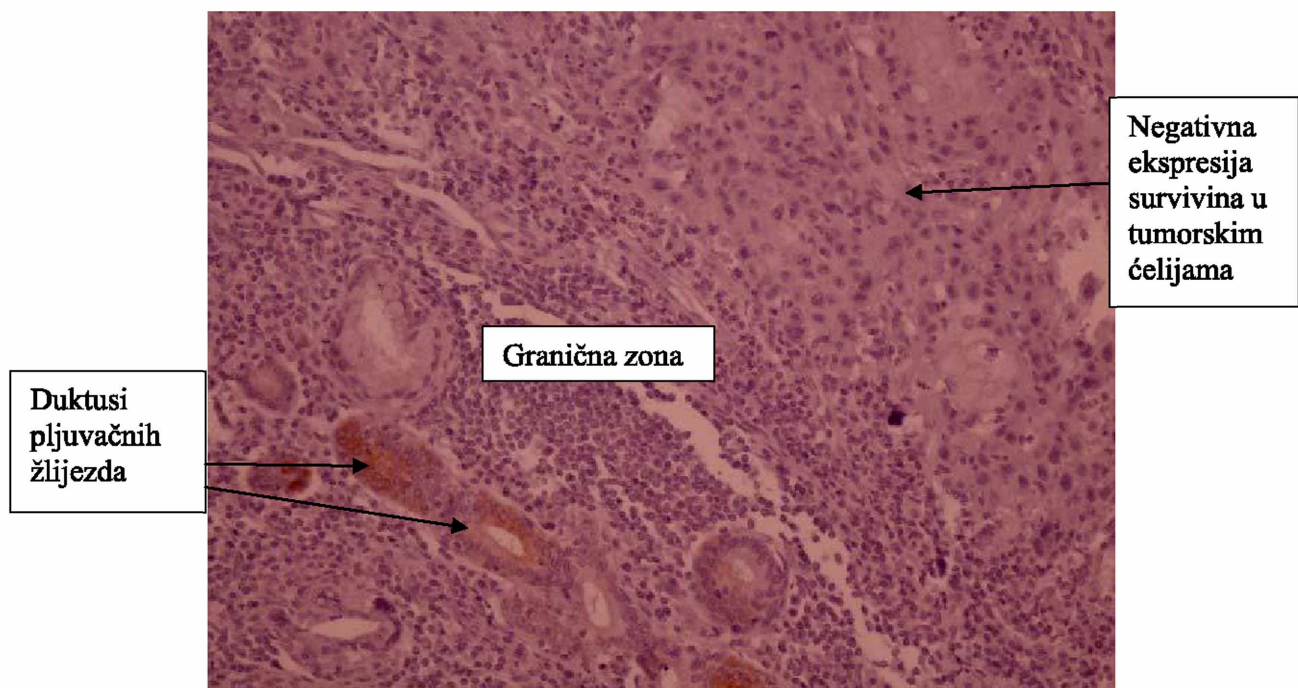
V FAZA - kontrastiranje

- djelovao je Mayer-ov hematoksilin 5-10 minuta, ispran destilovanom vodom, uronjen 10 puta u kivetu sa 0,037mol/L amonijačne vode, ispran destilovanom vodom 2-5 minuta. Sve je pokriveno vodenim medijumom.

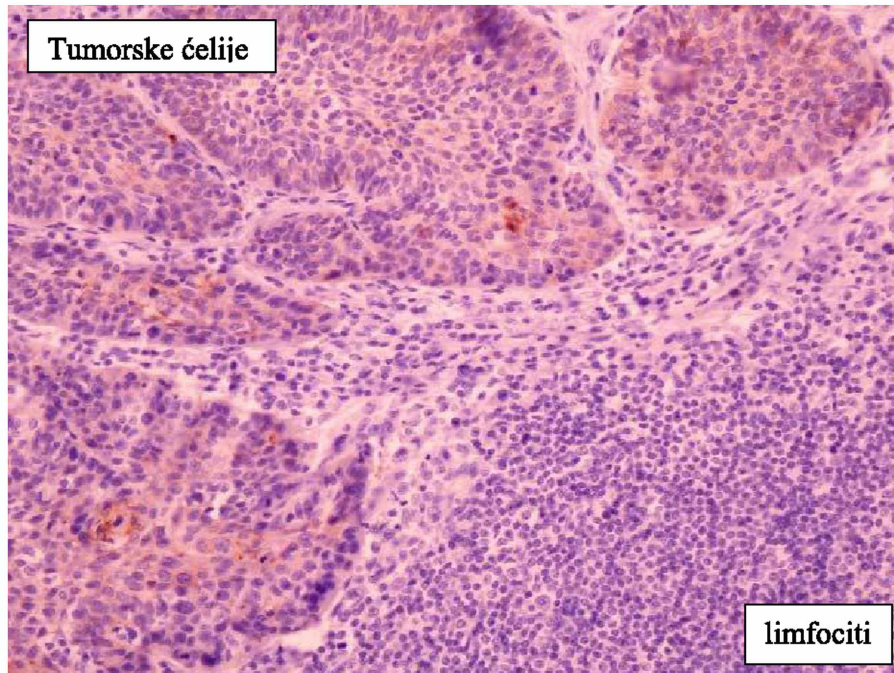
Prema procentu survivin-pozitivnih tumorskih ćelija, uzorci su podijeljeni u sledeće grupe:

- skor 0 - nema reaktivnosti tumorskih ćelija, slika 4.3;
- skor 1 - manje od 5% pozitivnih tumorskih ćelija (+) *fokalna ekspresija*;
- skor 2 - 5 - 10% pozitivnih tumorskih ćelija (++) *umjerena ekspresija*;
- skor 3 - 10% i više pozitivnih tumorskih ćelija (+++) *difuzna ekspresija*, slika 4.4.

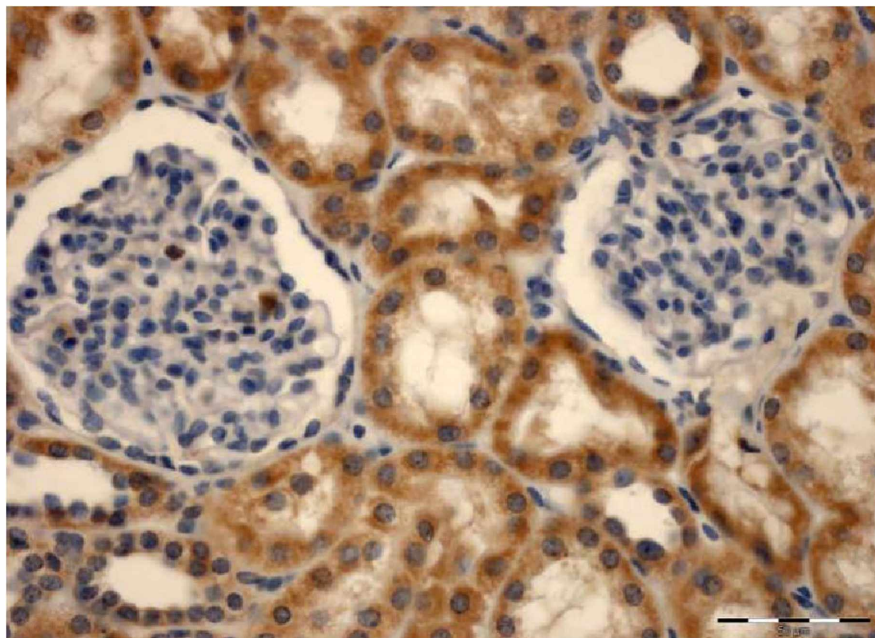
Positivnu eksternu kontrolu za detekciju ekspresije survivina predstavljalo je tkivo bubrega. U normalnom tkivu bubrega prisutna je difuzna citoplazmatska ekspresija survivina u epitelnim ćelijama proksimalnih i distalnih kanalića (Slika 4.5). Jedarna ekspresija je prisutna samo fokalno u endotelnim ćelijama glomerula, dok je u epitelnim ćelijama kanalića odsutna. Internu kontrolu je predstavljalo tkivo malih pljuvačnih žlijezda sluzokože usne duplje, iz neposredne okoline ekscidiranog tumora, u kome je prisutna citoplazmatska ekspresija survivina u epitelnim ćelijama izvodnih kanalića (duktusa), slika 4.3.



Slika 4.3 Negativna ekspresija survivina u skvamocelularnom karcinomu, 200x (nema reakcije u tumorskim ćelijama, pozitivna citoplazmatska pozitivnost u duktusima)



Slika 4.4. Difuzna ekspresija survivina u skvamocelularnom karcinomu, pozitivnost u 25% tumorskih ćelija, 200x



Slika 4.5 Ekspresija survivina u bubrežnom tkivu

4.3. Genetička istraživanja

Molekularno-genetičko istraživanje je obavljeno u Laboratoriji za molekularnu genetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Cilj ovih istraživanja bio je da se ispita učestalost alela i odgovarajućih genotipova za polimorfizam pojedinačnih nukleotida, tzv. SNP (*single nucleotide polymorphism*) u promotoru gena za survivin na poziciji -31 (C>G). U genu za p53 analiziran je insercioni polimorfizam u 3. intronu (16 baznih parova). Rezultati dobijeni na uzorku OSCC upoređeni su sa rezultatima u grupi zdravih pojedinaca. Za ovu vrstu istraživanja korišćeni su uzorci DNK izolovani iz 60 parafinskih blokova OSCC, dok su kontrolnu grupu činili uzorci DNK izolovani iz periferne krvi 71-og zdravog pojedinca, dobrovoljna davaoca krvi (za p53) i 127 zdravih pojedinaca, dobrovoljnih davalaca krvi (za survivin).

4.3.1. Izolacija DNK iz tumorskog tkiva OSCC

Za deparafinizaciju tumorskog tkiva korišćen je komercijalni KAPA EXPRESS EXTRACT kit (www.kappa.biosystems.com). Izolovanje DNK iz parafinskih uzoraka OSCC pomoću ovog kita obuhvatilo je, prvo, postupak pripreme smješe koja se sastojala od: 10µm isječka (1mm³ uzorka), 10 µl pufera, 2 µl enzima i 88 µl dejonizovane vode.

Ependorf-epruvete sa uzorcima su, zatim, vorteksovane (miješanje na vibrirajućem aparatu) 10 sekundi (1000 o/min), da bi se smješa homogenizovala. Inkubiranje smješe je obavljeno na 75⁰C tokom 10 minuta, da bi došlo do lize ćelija. Smješa je ponovo inkubirana na 95⁰C u trajanju od 5 minuta, u cilju inaktiviranja proteaza. Nakon laganog vorteksovanja tokom 2-3 sekunde, smješa je centrifugirana u trajanju od 1 minuta (13 000 o/min). Ovim postupkom obezbeđivana je hemijska degradacija proteina, kao i izolacija DNK i njeno prevođenje u vodenu fazu, nakon čega je vodena faza, u kojoj se nalazila DNK, odvajana u novu ependorf-epruvetu. Materijal je, nakon toga, čuvan na -20⁰C. Koncentracija DNK je određivana spektrofotometrijski.

4.3.2. Izolacija DNK iz periferne krvi

Uzorcima od po 5 ml citrirane venske krvi dodavana je ista količina pufera za lizu (0,32 M saharoza; 10 mM TRIS HCl; pH 7,5; 1% TRITON x 100 i 5 mM MgCl₂) tokom 15 minuta, na temperaturi od 4°C. Potom su uzorci centrifugirani na 2000 o/min, nakon čega je supernatant odbacivan, a talog rastvaran u 3 ml pufera A (10mM TRIS HCl - pH 8,0; 400 ml NaCl; 2 mM EDTA) uz dodatak 200 µl 10% SDS (Na-dodecilsulfat) i 20 µl proteinaze K. Uzorci su inkubirani preko noći, na temperaturi od 37°C.

Nakon inkubacije, uzorcima je dodavan saturisani 6M NaCl, u cilju povećanja rastvorljivosti DNK. Precipitirani denaturisani proteini taloženi su centrifugiranjem na 3000 o/min tokom 15 minuta, posle čega je odvajanje supernatant u kome se nalazila rastvorena DNK. Supernatant je odlivan u graduisanu epruvetu u koju je dodata ista zapremina izopropanola, čime je postizana precipitacija DNK. Izdvojena DNK je potapana u 70% etanol, a zatim sušena na vazduhu i rastvarana u 100 µl TE-pufera (10 mM TRIS HCl; 1 mM EDTA). Kao i prilikom izolacije DNK iz uzoraka OSCC, koncentracija DNK je određivana spektrofotometrijski.

4.3.3. Analiza polimorfizama gena za survivin i p53

Za detekciju ispitivanih polimorfizama, -31C/G i PIN3 Ins16bp, korišćena je PCR-RFLP analiza. Ova metoda zasniva se na upotrebi enzima bakterijskog porijekla - restrikcionih endonukleaza, koje prepoznaju specifičnu sekvencu dvolančane DNK, dužine od četiri do šest baznih parova (bp) i sijeku molekule DNK u okviru te sekvence. Prema tome, ova metoda je pogodna za detekciju polimorfizama koji nastaju tačkastom mutacijom ili malom insercijom/delecijom u okviru sekvence koju prepoznaje odgovarajući restrikcioni enzim. Ovakvi polimorfizmi označavaju se kao polimorfizmi za restrikciono mjesto (*Restriction Site Polymorphisms - RSP*). Pošto se mutacijom ukida ili kreira određeno restrikciono mjesto, ovakvi polimorfizmi se detektuju na osnovu promjena u dužini restrikcionih fragmenata.

Ova analiza podrazumijeva tri sukcesivna koraka: amplifikaciju PCR tehnikom sekvence DNK u kojoj se ispitivani polimorfizam nalazi, restrikcionu digestiju amplifikovanog fragmenta i provjeru veličine produkata digestije elektroforezom na PAA (poliakrilamidnom) gelu.

4.3.3.1. Lančana reakcija polimeraze (*Polymerase Chain Reaction – PCR*)

Lančana reakcija polimeraze (PCR) podrazumijeva *in vitro* amplifikaciju određene, unaprijed poznate, sekvence DNK. Reakcija se zasniva na primjeni tzv. *prajmera*, koji zapravo predstavljaju dva oligonukleotida koji odgovaraju krajevima sekvence koju je potrebno amplifikovati. Zahvaljujući tome, PCR tehnika je visoko specifična u odnosu na traženi segment DNK, a kako se radi o lančanoj reakciji u kojoj se data sekvenca umnožava više miliona puta, ova metoda je i veoma osjetljiva, pa omogućava detekciju i minimalnih količina DNK.

Reakcija se odigrava kroz više ciklusa, na precizno definisanoj temperaturi, a sinteza DNK u ovim uslovima moguća je zahvaljujući dejstvu termostabilne DNK polimeraze (*Taq* polimeraze). Svaki ciklus se sastoji iz tri koraka:

- termičke denaturacije DNK, čime se razdvajaju komplementarni lanci DNK i omogućava vezivanje *prajmera*, što se postiže inkubacijom reakcione smješe na 95°C;
- hibridizacije *prajmera* sa matricom, koja se izvodi na temperaturi od 42°C do 65°C, u zavisnosti od dužine i sekvence *prajmera*;
- elongacije (ekstenzije) *prajmera*, što podrazumijeva ugradnju slobodnih nukleotida na njihovim 3' krajevima, pod dejstvom *Taq* polimeraze, na temperaturi od 72°C.

Ovaj slijed reakcija je ponavljan kroz 25 do 40 ciklusa, čime je broj sintetisanih fragmenata DNK eksponencijalno umnožavan, budući da je svaki novosintetisani fragment služio kao matrica za nastavak reakcije.

Za potrebe ovog istraživanja, reakciona smeša ukupne zapremine 25 µl, sadržala je 2,5 µl 10X PCR pufera (MBI Fermentas, Litvanija), 1,5 µl MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,375 µM *prajmera*, 200 ng DNK izolovane iz uzoraka OSCC, odnosno periferne krvi zdravih pojedinaca i 1 jedinicu *Taq* DNK polimeraze (MBI Fermentas, Litvanija).

Za detekciju polimorfizma -31C/G gena za survivin korišćeni su prajmeri 5'- AAG AGG GCG TGC GCT CCC GAC A-3' i 5'-GAG ATG CGG TGG TCC TTGAGA AA-3'. Ovi prajmeri ograničavaju fragment DNK dužine 151 bp, koji se nalazi u okviru promotorskog regiona gena za survivin. PCR reakcija je izvođena kroz tri faze, a uslovi PCR reakcije su bili:

- početna denaturacija DNK na 94°C, 5 min;
- 35 ciklusa od 3 koraka (denaturacija DNK na 94°C, 45 sec; vezivanje prajmera na 60°C, 45 sec; ekstenzija prajmera na 72°C, 1 min)
- finalna ekstenzija na 72°C, 5 min.

Za detekciju polimorfizma PIN3 Ins16bp gena TP53 korišćeni su prajmeri 5'-CTG GTA AGG ACA AGG GTT GG-3' i 5'-TCA TCT GGA CCT GGG TCT TC-3', koji amplifikuju sekvencu dužine 185 bp, odnosno 201 bp u slučaju insercije 16 bp u intronu 3 (PIN3 Ins16bp polimorfizam). PCR reakcija je izvođena kroz tri faze, a uslovi PCR reakcije bili su sledeći:

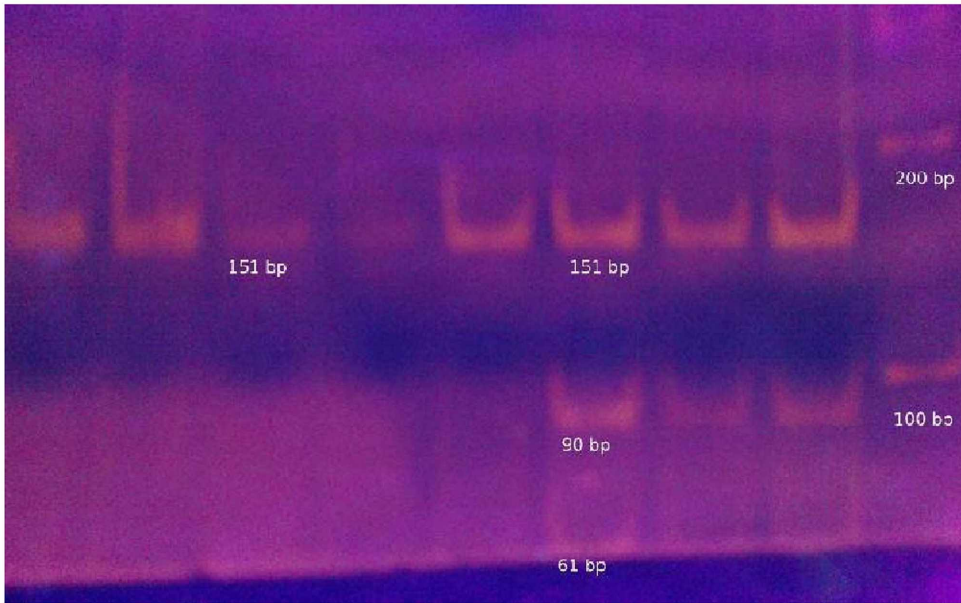
- početna denaturacija DNK na 94°C, 5 min;
- 35 ciklusa od 2 koraka (ekstenzija kao zaseban korak je isključena) - denaturacija DNK na 94°C, 30 sec i vezivanje prajmera na 60°C, 30 sec;
- finalna ekstenzija na 72°C, 5 min.

Amplifikacija je proveravana elektroforezom na poliakrilamidnom gelu.

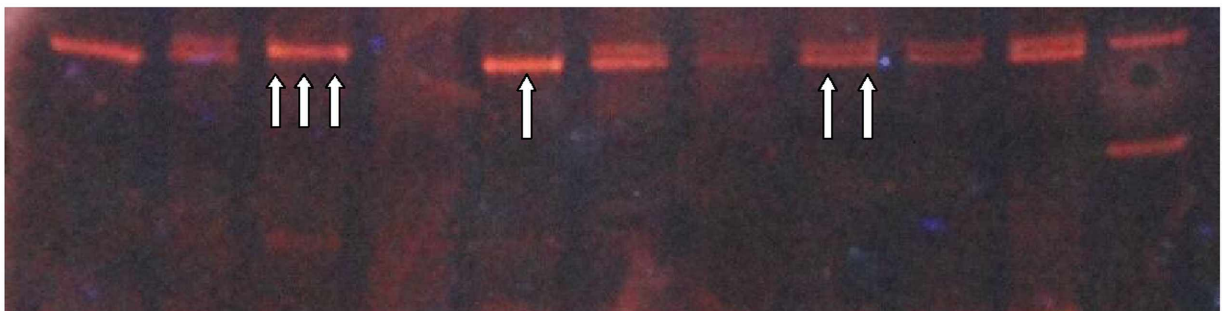
4.3.3.2. Gel elektroforeza

Gel elektroforeza omogućava razdvajanje molekula DNK, RNK i proteina na osnovu razlika u veličini, konformaciji i količini naelektrisanja. Ovakve razlike uslovljavaju njihovu različitu pokretljivost na gelu pod uticajem električnog polja, pri čemu manji molekuli putuju brže. Kako su pri fiziološkim vrednostima pH molekuli DNK negativno naelektrisani, oni se u električnom polju kreću od katode ka anodi.

U našim istraživanjima, separacija je vršena elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu (20 V/cm u Tris borat EDTA puferu). Nakon elektroforeze, gelovi su bojeni u etidijum-bromidu. Amplifikovani fragmenti vizuelizovani su pomoću ultraljubičastog transiluminatora na talasnoj dužini od 300 nm. U slučaju amplifikacije fragmenta gena za survivin, prisustvo trake dužine 151 bp predstavlja dokaz da je amplifikacija uspjela (Slika 4.6). Prilikom provjere amplifikacije TP53 gena, dobijane su trake dužine 185, odnosno 201 bp, zavisno od odsustva/prisustva insercionog polimorfizma (Slika 4.7).



Slika 4.6 Vizuelizacija restrikcionih fragmenata za polimorfizam -31C/G gena za survivin. Mutant homozigot (GG) ima jednu traku od 151 bp; heterozigot (CG) ima 3 trake – od 151, 90 i 61 bp; „wild type” homozigot CC ima 2 trake, od 90 i 61bp



Slika 4.7 Vizuelizacija restrikcionih fragmenata za polimorfizam TP53 gena

<u>STRELICE OZNAČAVAJU PRISUSTVO PCR PRODUKATA</u>	<u>GENOTIPOVI POLIMORFIZMA TP53 PIN3 Ins16bp</u>
jedna strelica - 185 bp (bez insercije).....	homozigot (wild-type) A1A1*
dvije strelice - 185 bp i 201 bp (oba produkta).....	heterozigot A1A2*
tri strelice - 201 bp (sa insercijom).....	homozigot (sa mutacijom) A2A2

*A1 – alel bez insercije 16 bp, *A2 – alel sa insercijom 16 bp

4.3.3.3. Restrikciona analiza

Restrikcija PCR produkata je vršena restrikcionim enzimom MspI (MBI Fermentas, Litvanija). Ovaj enzim siječe DNK na mjestu C. Prilikom analize polimorfizma -31C/G gena za survivin, transverzija C>G ukida restrikciono mjesto za enzim MspI.

Restrikciona smješa, ukupne zapremine 20 µl, sadržavala je 7 µl vode, 2 µl pufera, 1 µl enzima Msp I i 10 µl PCR produkta. Ovako pripremljena smješa inkubirana je na 37°C, tokom tri sata, da bi nakon toga, produkti digestije bili analizirani na PAA gelu.

Nakon završene inkubacije, 15 µl produkta restrikcione digestije podvrgnuto je separaciji elektroforezom, kao što je prethodno opisano (8% PAA gel, 20 V/cm u Tris borat EDTA puferu). Nakon elektroforeze, vršeno je bojenje gela u etidijum-bromidu. Amplifikovani fragmenti vizuelizovani su pomoću ultraljubičastog transiluminatora, na talasnoj dužini od 300 nm (Slike 4.6 i 4.7). Na osnovu veličine i broja traka uočenih na gelu nakon restrikcije i elektroforeze određeni su genotipovi za analizirane polimorfizme (Tabela 4.1).

SURVIVIN -31C/G	BAZNI PAROVI (bp)
Homozigoti bez mutacije (wild-type), genotip CC	90, 61
Heterozigoti za mutaciju, genotip CG	151, 90, 61
Homozigoti za mutaciju, genotip GG	151

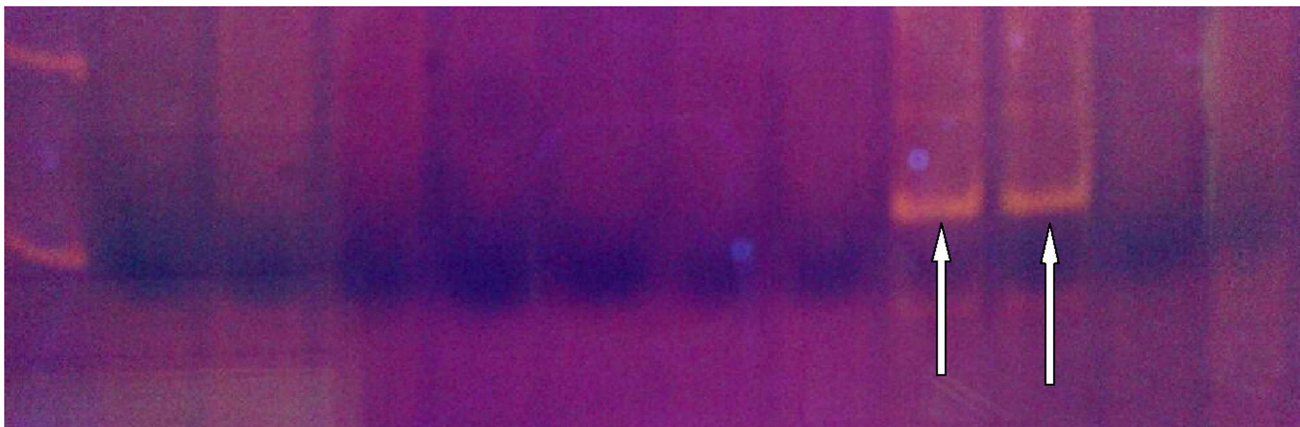
Tabela 4.1 Dužine restrikcionih fragmenata za genotipove polimorfizma -31C/G gena za survivin

4.4. Detekcija prisustva HPV-16 u tumorskom tkivu

Za detekciju genoma HPV virusa korišćeni su prajmeri za detekciju E6 gena kod haplotipa HPV16 (5'-TCAAAAGCCACTGTGTCCTG-3' i 5'-CGTGTTCTTGATGATCTGCA-3'), koji amplifikuju sekvencu dužine 120 bp (Slika 4.8). PCR reakcija je izvođena kroz tri faze, a uslovi PCR reakcije bili su sledeći:

- početna denaturacija DNK na 94°C, 1 min;
- 35 ciklusa od 2 koraka (denaturacija DNK na 94°C, 1 min; vezivanje prajmera na 55°C, 1 min);
- finalna ekstenzija na 72°C, 1 min.

Amplifikacija je proveravana elektroforezom na PAA gelu.



Slika 4.8 Vizuelizacija prisustva HPV infekcije u tumorskom tkivu: strelice pokazuju produkte PCR reakcije (120 bp)

4.5. Statistička obrada podataka

U cilju izvođenja neophodnih statističkih testiranja, korišćen je statistički programski paket IBM Statistics for Windows (20.0).

Na početku istraživanja, sva obilježja opisana su klasičnim deskriptivnim metodama statistike. Numerička obilježja opisana su klasičnim mjerama centralne tendencije i mjerama disperzije: aritmetičkom sredinom, standardnom devijacijom i medijanom. Prikaz dobijenih rezultata dat je tabelarno ili grafički.

Takođe, podaci su analizirani i primjenom sledećih statističkih metoda:

- Mann-Whitney test - neparametarski metod za ispitivanje značajnosti razlika dva nezavisna uzorka;
- Pearsonov χ^2 (hi kvadrat) test - neparametarski metod za ispitivanje značajnosti razlika nezavisnih uzoraka;
- Fisherov test tačne vjerovatnoće - neparametarski metod za procjenu značajnosti razlika dva mala nezavisna uzorka;
- Log rank test za upoređivanje dvije funkcije preživljavanja.

Za upoređivanje dužine intervala bez ponovnog javljanja bolesti korišćene su ocjene funkcije preživljavanja. Funkcija preživljavanja $S(t)$ definiše se kao $P(T>t)$, gdje sa P označena vjerovatnoća događaja.

Za ispitivanje statističke značajnosti učestalosti korišćene su tabele kontigencije i χ^2 test. Logistička regresija je korišćena za izračunavanje relativnog rizika.

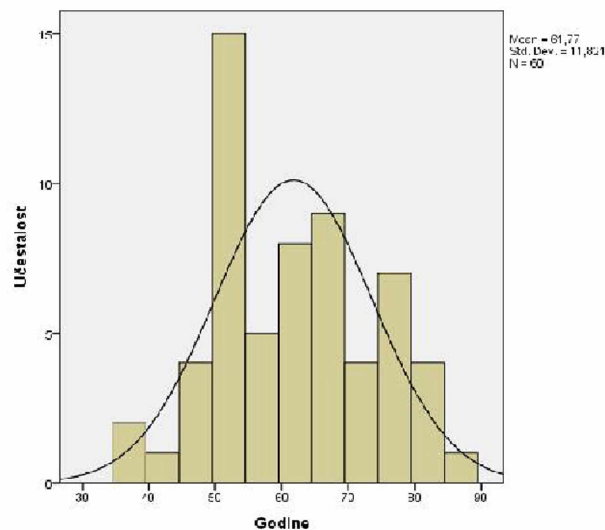
Višestrukom regresionom analizom ispitivana je povezanost između ekspresije survivina i p53 sa ostalim histopatološkim parametrima kao i sa opštim karakteristikama pacijenata.

Kao statistički značajne smatrane su vrijednosti $p<0,05$.

5. REZULTATI

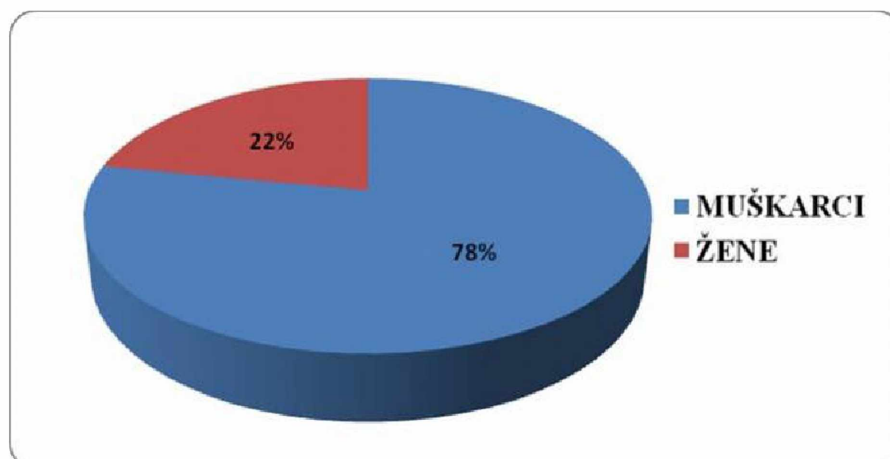
5.1. Opšte karakteristike pacijenata u uzorku

Istraživanjem je obuhvaćeno 60 pacijenata, od kojih je 13 osoba bilo ženskog, a 47 muškog pola. Minimalna starost je iznosila 37, a maksimalna 86 godina. Prosječna starost bila je 61,77±11,82 godina, samedijanom od 62 godine, grafikon 5.1. Nije utvrđena statistički značajna razlika u starosti između pacijenata ženskog i muškog pola (Mann Whitney, p=0,151).



Grafikon 5.1 Prosječna starost pacijenata u uzorku

Učestalost ispitanika različitog pola statistički se značajno razlikovala (χ^2 test; p<0,001), tako da su značajno više bili zastupljeni ispitanici muškog pola (grafikon 5.2).



Grafikon 5.2 Distribucija pacijenata po polu

5.2. Karakteristike tumora

Učestalost pacijenata sa tumorom lokalizovanim na usni i pacijenata sa tumorom drugih lokalizacija (jezik, pod usta, jezik i pod usta) nije se statistički značajno razlikovala (χ^2 test; $p=0,605$), tabela 5.1. U razmatranoj grupi pacijenata 46,7% je imalo tumor na usni, dok je preostalih 53,3% imalo tumor na jeziku, podu usta ili u kombinaciji ove dvije lokalizacije.

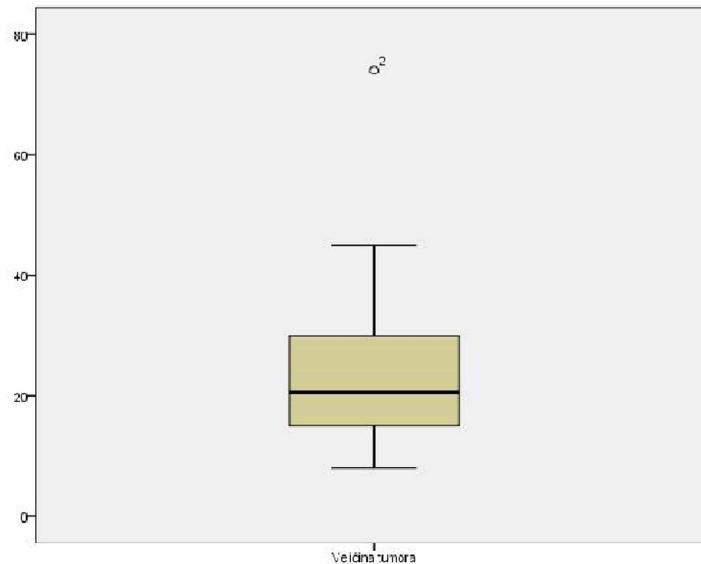
Tabela 5.1 Karakteristike tumora

Posmatrane karakteristike	Dobijene vrijednosti	Značajnost
Lokalizacija N(%)	Usna	28 (46,7%)
	Ostale lokalizacije	32 (53,3%)
Histološki gradus N(%)	Dobro diferentovan OSCC	35 (58,3%)
	Srednje diferentovan OSCC	23 (38,3%)
	Loše diferentovan OSCC	2 (3,4%)
Nuklearni gradus N(%)	Nizak	20 (30,3%)
	Srednji	36 (60%)
	Visok	4 (6,7%)
Veličina tumora X \pm SD, (MED)	24,1mm \pm 11,8mm (20,5mm)	/
Prisustvo metastaza N(%)	Da	22 (36,7%)
	Ne	38 (63,3%)
Prisustvo recidiva N(%)	Da	16 (26,7%)
	Ne	44 (73,3%)

Statistički značajna razlika uočena je u zastupljenosti pacijenata sa različitim histološkim gradusom tumora (χ^2 test; $p<0,001$), tabela 5.1. Statistički značajno više je bilo pacijenata sa dobro diferentovanim OSCC, dok je najmanje pacijenata bilo sa loše diferentovanim OSCC.

Učestalost pacijenata sa različitim nuklearnim gradusom tumora statistički značajno se razlikovala (χ^2 test; $p<0,001$), tabela 5.1. Od ukupnog broja pacijenata, njih 60% imalo je srednji nuklearni gradus, 6,7% visoki, a 30,3% nizak nuklearni gradus tumora.

Minimalna veličina tumora iznosila je 8 mm, dok je maksimalna bila 74mm. Srednja vrijednost veličine tumora je bila 24,1mm sa standardnom devijacijom od 11,8mm. Medijana veličine tumora je iznosila 20,5 mm (tabela 5.1, grafikon 5.3).



Grafikon 5.3 Veličina tumora

Učestalost pacijenata sa metastazama i bez metastaza statistički značajno se razlikovala (χ^2 test; $p=0,038$), tabela 5.1.

Takođe, uočena je statistički značajna razlika u učestalosti pacijenata sa pojavom recidiva i bez recidiva bolesti (χ^2 test; $p<0,001$), tabela 5.1.

5.2.1. Imunohistohemijaska ekspresija p53 i survivina

U grupi analiziranih tumora nije bilo statistički značajnih razlika u nivoima imunohistohemijske ekspresije p53 proteina (χ^2 test; $p=0,062$), tabela 5.2. Statistički značajno najviše je bilo uzoraka bez reaktivnosti tumorskih ćelija (skor 0) i sa više ili jednako 40% pozitivnih jedara tumorskih ćelija (skor 3), dok je najmanje uzoraka bilo sa manje ili jednako od 10% pozitivnih jedara tumorskih ćelija (skor 1).

Tabela 5.2 Ekspresija p53 proteina

Posmatrane karakteristike	Dobijene vrijednosti	Značajnost
Nema reaktivnosti tumorskih ćelija (0)	22 (36,7%)	$p=0,062$
$\leq 10\%$ pozitivnih jedara tumorskih ćelija (1)	9 (15%)	
11-40 % pozitivnih jedara tumorskih ćelija (2)	11 (18,3%)	
$\geq 40\%$ pozitivnih jedara tumorskih ćelija (3)	18 (30%)	

U grupi analiziranih tumora nije bilo statistički značajnih razlika u nivoima imunohistohemijske ekspresije survivina (χ^2 test; $p=0,057$), tabela 5.3. Najzastupljeniji su bili uzorci sa manje od 5% pozitivnih tumorskih ćelija (skor 1), dok je najmanje njih bilo sa više ili jednako od 10% pozitivnih tumorskih ćelija (skor 3). Kao što pokazuje tabela 5.4, u 2/3 uzoraka ekspresija survivina je bila niska, tj. bez reaktivnosti tumorskih ćelija ili sa reaktivnošću manjom od 5% pozitivnih tumorskih ćelija (skor 0 i 1), što je na granici statističke značajnosti u odnosu na zastupljenost uzoraka sa višim nivoima ekspresije survivina (skor 2 i 3).

Tabela 5.3 Ekspresija survivina

Posmatrane karakteristike	Dobijene vrijednosti	Značajnost
Ekspresija survivina N(%)	Nema reaktivnosti tumorskih ćelija (0)	10 (22,2%)
	manje od 5% pozitivnih tumorskih ćelija (1)	19 (42,2%)
	5-10% pozitivnih tumorskih ćelija (2)	9 (20%)
	\geq od 10 % pozitivnih tumorskih ćelija (3)	7 (15,6%)
		$p=0,057$

Tabela 5.4 Zastupljenost uzoraka OSCC sa različitim nivoima ekspresije survivina

Ekspresija survivina	Uzorci OSCC	Značajnost
0 i 1	29 (64,4%)	$p=0,052$
2 i 3	16 (35,6%)	

5.3. Povezanost ekspresije p53 i survivina sa kliničkim i histopatološkim parametrima OSCC

Regresionom analizom nije nađena statistički značajna povezanost između ekspresije p53 i opštih karakteristika pacijenata, odnosno pojave veće ili manje ekspresije p53 proteina u odnosu na pol, starost pacijenata i lokalizaciju tumora (tabela 5.5).

Nađen je statistički značajan uticaj ekspresije p53 proteina na veličinu tumora ($a=0,127$; $p=0,049$), dok između ostalih karakteristika tumora i ekspresije p53 proteina nije uočena statistički značajna povezanost (za dobijeni model koeficijent determinacije je iznosio 0,3971, tabela 5.5).

Analizom dobijene povezanosti ekspresije p53 proteina i veličine tumora, zapaža se značajno veća dimenzija tumora kod pacijenata sa većom ekspresijom p53 proteina, bez obzira na ostale prisutne karakteristike kako samog tumora, tako i opštih karakteristika pacijenata (za dobijeni model $F=5,471$; $p=0,024$). Budući da je vrijednost konstante 1,015, a regresioni koeficijent pozitivan ($a=0,127$), odnos ekspresije p53 i veličine tumora bi se mogao predstaviti sledećom jednačinom:

$$\text{Ekspresija p53} = 1,015 + 0,127 * T.$$

Tabela 5.5 Rezultati višestruke regresione analize povezanosti ekspresije p53 sa kliničkim i histopatološkim parametrima OSCC

		Standardna greška	Značajnost	Koeficijent determinacije R ²
Konstanta=1,015	Regresioni koeficijenti (a)	0,458	0,045	0,3971
Lokalizacija tumora	-0,307	0,471	0,984	
Pol	0,281	0,358	0,752	
Godine starosti	-0,012	0,047	0,725	
T	0,127	0,301	0,049	
Hg	0,387	0,471	0,224	
Ng	-0,357	0,321	0,147	
pTNM	0,027	0,222	0,358	
Lokalni recidiv	0,981	0,142	0,427	
Regionalni recidiv	-0,247	0,52	0,748	

Tabela 5.6 Rezultati višestruke regresione analize povezanosti ekspresije survivina sa kliničkim i histopatološkim parametrima OSCC

		Standardna greška	Značajnost	Koeficijent determinacije R ²
Konstanta=2,058	Regresioni koeficijenti (a)	0,976	0,043	0,3798
Lokalizacija tumora	0,298	0,309	0,340	
Pol	-0,215	0,383	0,578	
Godine starosti	-0,015	0,013	0,252	
T	-0,018	0,012	0,042	
Hg	-0,424	0,297	0,161	
Ng	0,247	0,292	0,402	
pTNM	-0,015	0,014	0,118	
Lokalni recidiv	0,356	0,309	0,257	
Regionalni recidiv	-0,180	0,365	0,624	

Regresionom analizom je utvrđen statistički značajan uticaj ekspresije survivina na veličinu tumora ($a = -0,018$; $p = 0,042$), dok između ekspresije survivina i ostalih karakteristika tumora, kao i opštih karakteristika pacijenata, nije uočena statistički značajna povezanost (za dobijeni model, koeficijent determinacije je iznosio 0,3798), tabela 5.6.

Analizom dobijene povezanosti ekspresije survivina i veličine tumora, zapaža se značajno veća dimenzija tumora kod pacijenata sa manjom ekspresijom survivina, bez obzira na ostale prisutne karakteristike kako samog tumora, tako i opšte karakteristike pacijenata (za dobijeni model $F = 5,979$; $p = 0,013$). Budući da je ustanovljena vrijednost konstante 2,058, a regresioni koeficijent negativan ($a = -0,018$), odnos ekspresije survivina i veličine tumora bi se mogao predstaviti sledećom jednačinom:

Ekspresija survivina = 2,058 - 0,018 * T.

5.4. Korelacija kliničkih, histopatoloških, molekularno-genetičkih i virusoloških parametara OSCC

Međusobnu povezanost ispitivanih kliničkih, histopatoloških, molekularno-genetičkih i virusoloških parametara OSCC prikazuje tabela 5.7.

1) Utvrđena je statistički značajna povezanost između ekspresije p53 i survivina u tkivu OSCC ($r = -0,307$; $p = 0,04$). Regresionom analizom je potvrđeno da, sa povećanjem vrijednosti ekspresije survivina opada vrijednost ekspresije p53 proteina i obratno ($F = 4,825$; $p = 0,006$; koeficijent determinacije $0,307$). Budući da je vrijednost konstante $1,787$, a regresioni koeficijent negativan ($a = -0,404$), odnos ekspresije p53 i survivina bi se mogao predstaviti sledećom jednačinom:

Ekspresija p53 = 1,787 - 0,404 * ekspresija survivina.

2) Takođe, utvrđena je statistički značajna povezanost između genotipova za survivin i pola pacijenata ($r = -0,307$; $p = 0,017$), tabele 5.7 i 5.8. Analizom dobijenih podataka uočava se da su pacijentkinje bile dominantni nosioci GG genotipa (10/13), a da CC genotip kod njih nije utvrđen, dok je kod pacijenata muškog pola približno jednako zastupljen CG i GG genotip, a utvrđen je i CC genotip.

3) Takođe, utvrđena je statistički značajna povezanost između prisustva HPV16 infekcije i pola pacijenata ($r = -0,284$; $p = 0,038$), tabela 5.7. Na osnovu χ^2 testa ($p = 0,038$) zaključeno je da prisustvo HPV16 infekcije u tkivu OSCC zavisi od pola pacijenta, tj. HPV16 infekcija je statistički značajno češća kod osoba ženskog pola (grafikon 5.4). Ispitivanjem distribucije HPV16 pozitivnih pacijenata po polu, utvrđeno je prisustvo HPV16 infekcije kod 46,2% žena, dok je taj udio kod muškaraca svega 17% (tabela 5.9, grafikon 5.4).

4) Rezultati imunohistohemijske ekspresije p53 proteina u tkivu OSCC u odnosu na TP53 genotip su pokazali graničnu statističku značajnost (F test, $p = 0,053$) – tabela 5.7, v. tabelu 5.20.

5) Nije utvrđena statistički značajna povezanost između stadijuma bolesti i TP53 genotipa (tabela 5.7). Međutim, grupisanjem pacijenata na grupe nižeg (I i II) i višeg stadijuma bolesti (III i IV), utvrđena je visoko statistički značajna povezanost TP53 genotipa sa ovim parametrom (Fišerov test, $p = 0,006$, v. tabelu 5.10).

Tabela 5.7 Međusobna korelacija kliničkih, histopatoloških, molekularno-genetičkih i virusoloških parametara OSCC

PARAMETRI	Ekspresija p53	Ekspresija survivina	Survivin genotip	TP53 genotip	HPV16	Pol
Ekspresija p53	1	r = -0,307 p=0,04	r=0,072 p=0,585	p=0,053	r= -0,068 p=0,606	r=0,051 p=0,699
Ekspresija survivina	r = -0,307 p=0,04	1	r= -0,016 p=0,916	r=0,234 p=0,122	r=0,009 p=0,951	r= -0,147 p=0,334
Survivin genotip	r=0,072 p=0,585	r= -0,016 p=0,916	1	r= -0,152 p=0,248	r=0,097 p=0,459	r= -0,307 p=0,017
TP53 genotip	p=0,053	r=0,234 p=0,122	r= -0,152 p=0,248	1	r=0,066 p=0,618	r=0,022 p=0,867
HPV16	r= -0,068 p=0,606	r=0,009 p=0,951	r=0,097 p=0,459	r=0,066 p=0,618	1	r= -0,284 p=0,038
Pol	r=0,051 p=0,699	r= -0,147 p=0,334	r= -0,307 p=0,017	r=0,022 p=0,867	r= -0,284 p=0,038	1
Starost	r= -0,010 p=0,937	r= -0,258 p=0,087	r= -0,220 p=0,091	r=0,042 p=0,752	r= -0,135 p=0,302	r=0,186 p=0,154
Lokalizacija	r= -0,115 p=0,380	r=0,206 p=0,175	r=0,013 p=0,919	r= -0,004 p=0,977	r= -0,200 p=0,125	r=0,005 p=0,967
Hg	r=0,112 p=0,392	r= -0,224 p=0,139	r= -0,029 p=0,824	r= -0,085 p=0,520	r= -0,120 p=0,363	r=0,011 p=0,935
Ng	r= -0,031 p=0,815	r=0,025 p=0,870	r= -0,094 p=0,476	r= -0,174 p=0,184	r= -0,050 p=0,702	r= -0,038 p=0,775
pTNM	r=0,198 p=0,129	r= -0,224 p=0,139	r=0,016 p=0,905	r= -0,023 p=0,861	r= -0,001 p=0,995	r= -0,054 p=0,682
Recidiv	r=0,200 p=0,125	r= -0,115 p=0,451	r= -0,122 p=0,354	r=0,165 p=0,209	r= 0,202 p=0,122	r= -0,140 p=0,285
Metastaza	r= -0,161 p=0,220	r=0,194 p=0,201	r= -0,075 p=0,569	r=0,014 p=0,916	r= -0,011 p=0,934	r=0,064 p=0,625

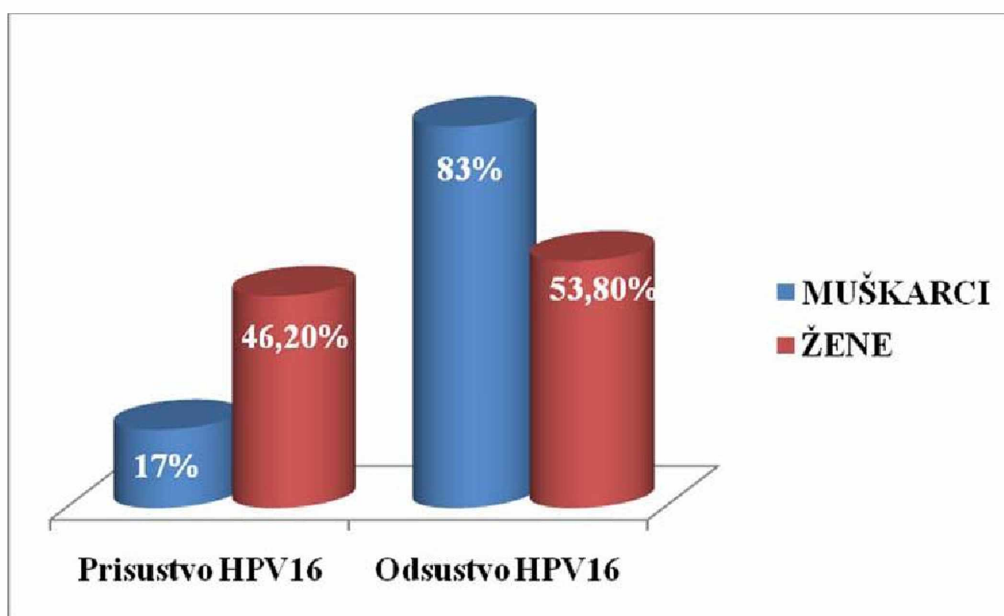
r - Pearson-ov koeficijent korelacije; p - značajnost

Tabela 5.8 Distribucija genotipova polimorfizma -31C/G po polu

Pol	GG	CG	CC	Značajnost
Muški (47)	19 (40%)	22 (47%)	6 (13%)	p=0,017
Ženski (13)	10 (77%)	3 (23%)	0 (0%)	
Ukupno (60)	29	25	6	

Tabela 5.9 Pol i prisustvo HPV16

		Prisustvo HPV16		Ukupno	Značajnost
		DA	NE		
POL	Muški	8 (17%)	39 (83%)	47(100%)	p=0,038
	Ženski	6 (46,2%)	7 (53,8%)	13 (100%)	
	Ukupno	14 (23,3%)	46(76,7%)	60(100%)	



Grafikon 5.4 Prisustvo HPV16 u odnosu na pol

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 5.7, postoje statistički značajne korelacije između ekspresije p53 i survivina, zatim između genotipova survivina i pola, kao i prisutne HPV16 infekcije i pola pacijenata. Na granici statističke značajnosti se pokazala povezanost između ekspresije p53 i genotipa polimorfizma PIN3 Ins16bp gena za p53 (v. tabelu 5.20, poglavlje 5.5.3.). Svi ostali analizirani parametri OSCC (starost, lokalizacija tumora, histološki gradus, nuklearni gradus, stadijum bolesti pTNM, prisustvo recidiva bolesti, pojava metastatske bolesti) nijesu pokazali međusobnu povezanost od statističkog značaja (tabela 5.7).

Međutim, grupisanjem pacijenata na grupe nižeg (I i II) i višeg stadijuma bolesti (III i IV), utvrđena je visoko statistički značajna povezanost TP53 genotipa sa ovim parametrom (Fišerov test, $p=0,006$, tabela 5.10).

Tabela 5.10 Korelacija TP53 genotipova i stadijuma bolesti

Stadijum bolesti (pTNM)	TP53 GENOTIP			Značajnost
	A1A1	A1A2	A2A2	
I i II	26 (55%)	9 (100%)	1 (25%)	p=0,006
III i IV	21 (45%)	0 (0%)	3 (75%)	
Ukupno (60)	47	9	4	

Analizom tabele 5.10 uočeno je da su nosioci A2A2 genotipa bili statistički značajno češće zastupljeni u grupi pacijenata u višim stadijumima bolesti (III i IV).

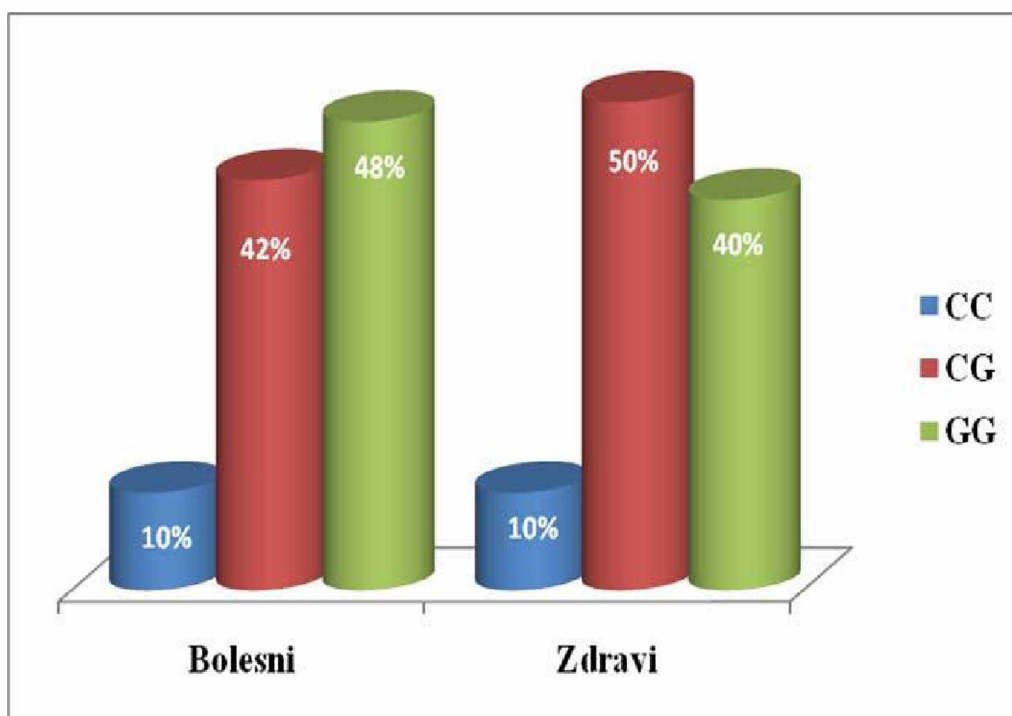
5.5. Analiza polimorfizama gena za survivin i p53

Kako bi se utvrdilo da li postoje razlike u distribuciji pojedinih genotipova polimorfizama gena za survivin i p53 između pacijenata sa OSCC i zdravih pojedinaca, analizirana je DNK izolovana iz uzoraka 60 OSCC (za analizu polimorfizma -31C/G gena za survivin i PIN3 Ins16bp gena TP53), kao i uzorci DNK izolovani iz periferne krvi 127 zdravih pojedinaca za analizu polimorfizma -31C/G gena za survivin, odnosno 71 zdravog pojedinca za analizu polimorfizma gena za p53.

5.5.1. Analiza polimorfizma -31C/G gena za survivin

Distribucija različitih genotipova ovog polimorfizma kod pacijenata sa OSCC i zdravih pojedinaca prikazana je grafikonom 5.5.

Uočava se da su grupu pacijenata sa OSCC činili homozigoti za GG genotip u skoro 50% slučajeva, dok je u kontrolnoj grupi to bio slučaj sa CG heterozigotima. Takođe, nosioci CC genotipa bili su procentualno jednako zastupljeni u grupi pacijenata sa OSCC i zdravih pojedinaca. Kada su analizirane χ^2 testom, ove razlike nisu bile statistički značajne ($p=0,553$).



Grafikon 5.5 Distribucija genotipova polimorfizma -31C/G

Pošto su nosioci CC genotipa bili procentualno jednako zastupljeni u grupi pacijenata sa OSCC i zdravih pojedinaca, logističkom regresionom analizom potvrđeno je da nosioci CC genotipa nemaju statistički značajan rizik za razvoj oralnog karcinoma u odnosu na ostale varijante genotipova (zbir CG heterozigota i GG homozigota), odds ratio 1,026; 95% interval povjerenja 0,37-2,85.

Učestalost CG heterozigota u odnosu na ostale varijante genotipova (zbir CC i GG homozigota), nije se pokazala statistički značajnom (χ^2 test, $p=0,310$), kao što je prikazano u tabeli 5.11.

Tabela 5.11 Učestalost CG heterozigota u ispitivanim grupama

Genotip	Pacijenti sa OSCC	Kontrole	Značajnost
CC+GG	35 (58%)	64 (50%)	p=0,310
CG	25 (42%)	63 (50%)	
Ukupno	60 (100%)	127 (100%)	

Rezultati logističke regresione analize pokazali su da nosioci CG genotipa nemaju statistički značajan rizik za razvoj oralnog karcinoma u odnosu na ostale varijante genotipova (odds ratio 0,72; 95% interval povjerenja 0,39-1,34).

Tabela 5.12 Učestalost GG homozigota u ispitivanim grupama

Genotip	Pacijenti sa OSCC	Kontrola	Značajnost
CC+CG	31 (52%)	76 (60%)	p=0,291
GG	29 (48%)	51 (40%)	
Ukupno	60 (100%)	127 (100%)	

Iz tabele 5.12 se vidi da ne postoji statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,291$) u frekvenciji GG homozigota u odnosu na ostale varijante genotipova (zbir CC homozigota i GG heterozigota). Rezultati logističke regresione analize pokazali su da nosioci GG genotipa nemaju statistički značajan rizik za razvoj oralnog karcinoma u odnosu na ostale varijante genotipova (odds ratio 1.39; 95% interval povjerenja 0.75-2.58).

Takođe, kada je analizirana učestalost C i G alela ovog polimorfizma, nije uočena statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,422$) između pacijenata sa OSCC, kod kojih je G alel bio neznatno zastupljeniji (odnos G:C=2,2), i zdravih pojedinaca (odnos G:C=1,85), što se vidi u tabeli 5.13.

Tabela 5.13. Učestalost C i G alela kod pacijenata sa OSCC i kontrola

Aleli	Pacijenti sa OSCC	Kontrole	Značajnost
C	37 (31%)	89 (35%)	p=0,422
G	83 (69%)	165 (65%)	
Ukupno	120 (100%)	254 (100%)	

Rezultati logističke regresione analize pokazali su da nosioci G alela nemaju statistički značajan rizik za razvoj oralnog karcinoma u odnosu na nosioce C alela (odds ratio 1,21; 95% interval povjerenja 0,75-1,92).

Imunohistohemijska ekspresija survivina je bila manja u uzorcima OSCC kod pacijenata sa CG genotipom, ali bez statističke značajnosti (χ^2 test, $p=0,370$), tabela 5.14. Pokazalo se da je u grupi OSCC koji su bili negativni ili slabo pozitivni za ekspresiju survivina skoro 80% uzoraka pripadalo pacijentima sa CG genotipom, dok je u grupi umjereno i izraženo pozitivnih OSCC to bio slučaj sa oko 20% pacijenata. Takođe, u grupi pacijenata sa višim nivoima ekspresije survivina, nosioci GG genotipa su bili dvostruko učestaliji (40%) u odnosu na nosioce CG genotipa (21%), tabela 5.14.

Tabela 5.14 Imunohistohemijska ekspresija survivina u odnosu na -31C/G genotip

Ekspresija survivina	Genotip			Značajnost
	CG	GG	CC	
0 i 1	11 (79%)	15 (60%)	3 (50%)	p=0,370
2 i 3	3 (21%)	10 (40%)	3 (50%)	
Ukupno (45)	14 (31%)	25 (55,5%)	6 (13,5%)	

5.5.2. Analiza polimorfizma -31C/G gena za survivin kod HPV16+ u odnosu na HPV16- pacijente

Distribucija različitih genotipova -31C/G polimorfizma gena za survivin kod pacijenata sa HPV16 infekcijom i onih bez HPV16 infekcije prikazana je u tabeli 5.15. Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova između ove dvije grupe (Fisher test 1,764; $p=0,920$). Interesantna je činjenica da CC genotip (wild-type) nije bio zastupljen u grupi HPV16+ pacijenata, tj. svi HPV16+ pacijenti su bili homozigotni ili heterozigotni za mutaciju na poziciji -31 gena za survivin.

Tabela 5.15 Distribucija različitih genotipova -31C/G polimorfizma gena za survivin kod HPV16- i HPV16+ pacijenata

Genotip survivina	HPV16 -	HPV16 +	Ukupno	Značajnost
CC	6 (13%)	0 (0%)	6	p=0,920
CG	18 (39%)	7 (50%)	25	
GG	22 (48%)	7 (50%)	29	
Ukupno	46 (100%)	14 (100%)	60 (100%)	

Razlike u frekvenciji genotipova nisu se pokazale značajnim (χ^2 test, $p=0,470$) kada je analizirana frekvencija CG heterozigota u odnosu na ostale varijante genotipova (zbir CC i GG homozigota), što je prikazano u tabeli 5.16.

Tabela 5.16 Učestalost CG heterozigota u ispitivanim grupama

Genotip survivina	HPV16+	HPV16-	Značajnost
CC+GG	28 (61%)	7 (50%)	p=0,470
CG	18 (39%)	7 (50%)	
Ukupno (60)	46 (100%)	14 (100%)	

Logističkom regresionom analizom utvrđeno je da nosioci CG genotipa kod HPV16+ osoba nemaju statistički značajan rizik od nastanka OSCC u odnosu na ostale varijante genotipova (odds ratio 0,64; 95% interval povjerenja 0,19-2,14).

Takođe, nije utvrđena statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,887$) u frekvenciji GG homozigota u odnosu na ostale varijante genotipova (zbir CC homozigota i CG heterozigota), između analiziranih grupa (tabela 5.17).

Tabela 5.17 Učestalost GG heterozigota u ispitivanim grupama

Genotip survivina	HPV16+	HPV16-	Značajnost
CC+CG	7 (50%)	24 (52%)	p=0,887
GG	7 (50%)	22 (48%)	
Ukupno (60)	14 (100%)	46 (100%)	

Logističkom regresionom analizom pokazano je da nosioci GG genotipa kod HPV16+ osoba nemaju statistički značajan rizik od nastanka OSCC u odnosu na ostale varijante genotipova (odds ratio 1,09; 95% interval povjerenja 0,33-3,61).

Takođe, kada je analizirana učestalost C i G alela -31C/G polimorfizma gena za survivin, nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti C i G alela (χ^2 test, $p=0,445$) između HPV16+ osoba, kod kojih je G alel bio neznatno zastupljeniji (odnos G:C=3), i HPV16- poedinaca (odnos G:C=2,1), što se vidi i u tabeli 5.18.

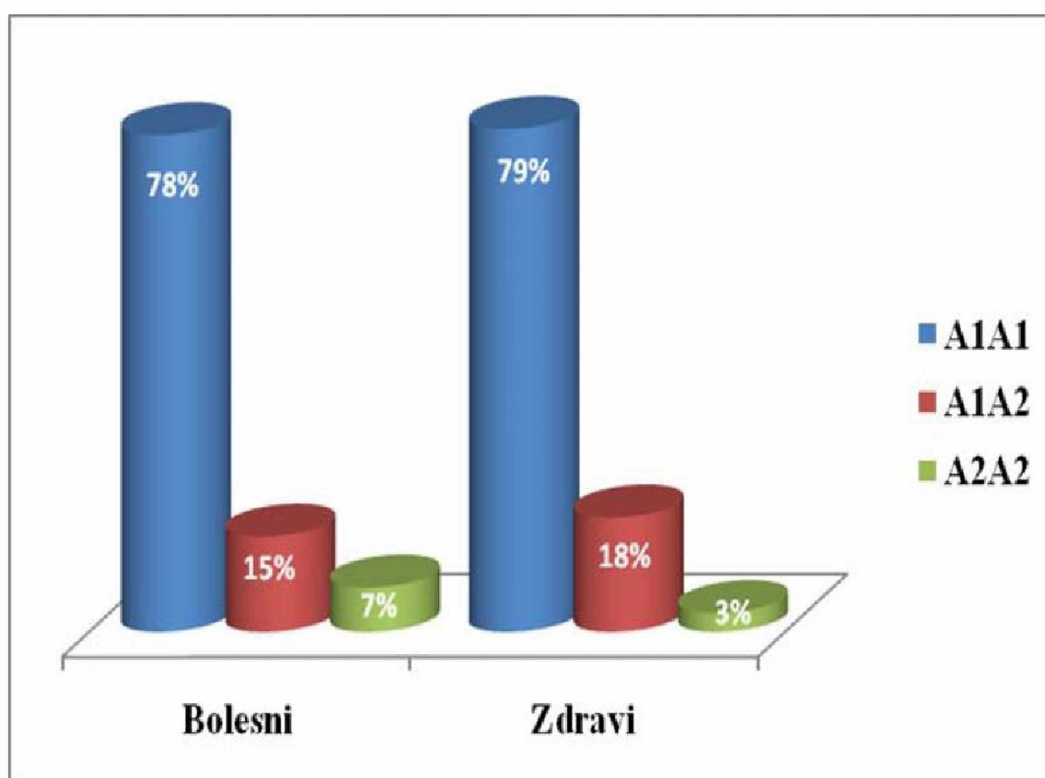
Tabela 5.18 Učestalost C i G alela kod HPV16+ u odnosu na HPV16- pacijente

Aleli	HPV16+	HPV16-	Značajnost
C	7 (25%)	30 (33%)	p=0,445
G	21 (75%)	62 (67%)	
Ukupno (120)	28 (100%)	92 (100%)	

5.5.3. Analiza polimorfizma PIN3 Ins16bp TP53 gena

Distribucija genotipova polimorfizma PIN3 Ins16bp gena za p53 kod pacijenata sa OSCC i zdravih pojedinaca prikazana je grafikonom 5.6.

Analizom polimorfizma PIN3 Ins16bp gena za p53, uočeno je da su nosioci A2A2 genotipa (homozigoti sa mutacijom-insercijom 16 baznih parova u intronu 3) bili češće zastupljeni u grupi pacijenata sa OSCC, ali ove razlike nisu bile statistički značajne ($p=0,8001$).



Grafikon 5.6 Distribucija genotipova polimorfizma PIN3 Ins16bp TP53 gena

Nije utvrđena statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,598$) u učestalosti alela A1 i A2 kod pacijenata sa OSCC i zdravih pojedinaca (tabela 5.19).

Tabela 5.19 Učestalost A1 i A2 alela kod pacijenata sa OSCC i kontrola

Aleli	Pacijenti sa OSCC	Kontrole	Značajnost
A1	103 (86%)	125 (88%)	p=0,598
A2	17 (14%)	17 (12%)	
Ukupno	120 (100%)	142 (100%)	

Logističkom regresionom analizom utvrđeno je da različiti genotipovi polimorfizma PIN3 Ins16bp gena za p53 nemaju statistički značajan rizik za nastanak oralnog karcinoma.

Dobijeni rezultati imunohistohemijske ekspresije p53 proteina u tkivu OSCC u odnosu na TP53 genotip su pokazali graničnu statističku značajnost (F test, $p=0,053$) - tabela 5.20. Analizom odnosa polimorfizma PIN3 Ins16bp gena za p53 i p53 ekspresije, uočeno je da su nosioci A1A2 genotipa (heterozigoti za inserciju 16 baznih parova u intronu 3), u 2/3 slučajeva, imali najviše vrijednosti ekspresije p53 proteina (skor 2 ili 3). Takođe, nosioci A1A1 genotipa (bez insercije 16 baznih parova u intronu 3) su u više od polovine slučajeva imali najniže vrijednosti ekspresije p53 proteina (skor 0 ili 1).

Tabela 5.20 Imunohistohemijska ekspresija p53 proteina u odnosu na TP53 genotip

Genotip	Ekspresija p53 proteina				Ukupno	Značajnost
	0	1	2	3		
TP53						
A1A1	18 (38,4%)	8 (17%)	5 (10,6%)	16 (34%)	47 (100%)	p=0,053
A1A2	3 (33%)	0 (0%)	5 (56%)	1 (11%)	9 (100%)	
A2A2	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	4 (100%)	

5.6. Analiza prisustva HPV16 infekcije u tkivu OSCC i njen uticaj na progresiju bolesti

Učestalost pacijenata sa HPV16 infekcijom u tkivu OSCC se statistički značajno razlikovala (χ^2 test, $p<0,001$) u odnosu na pacijente bez prisutne HPV16 infekcije. Od ukupnog broja pacijenata, kod njih 23,3% utvrđeno je prisustvo infekcije HPV16 (Tabela 5.21).

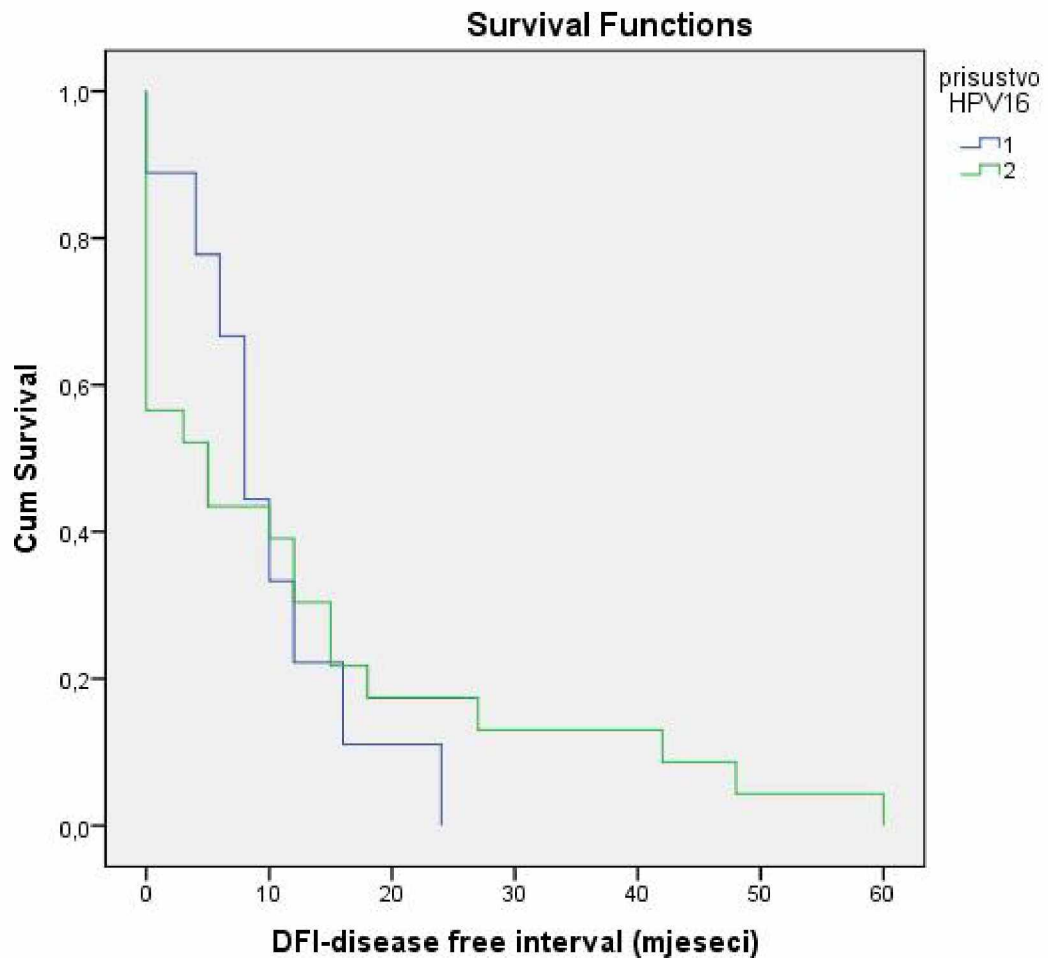
Tabela 5.21 Učestalost HPV-16 u tkivu OSCC

Prisustvo HPV-16	N (%)	Značajnost
Da	14 (23,3%)	p<0,001
Ne	46 (76,7%)	

Rezultati korelacione analize uticaja HPV16 infekcije na pojavu recidiva bolesti ($r=0,202$; $p=0,122$) i/ili metastaza ($r= -0,011$; $0,934$) pokazali su da ne možemo tvrditi, u analiziranom uzorku, postojanje povezanosti pojave recidiva i metastaza sa prisustvom HPV16 infekcije u tkivu OSCC (v. tabelu 5.7, poglavlje 5.4.).

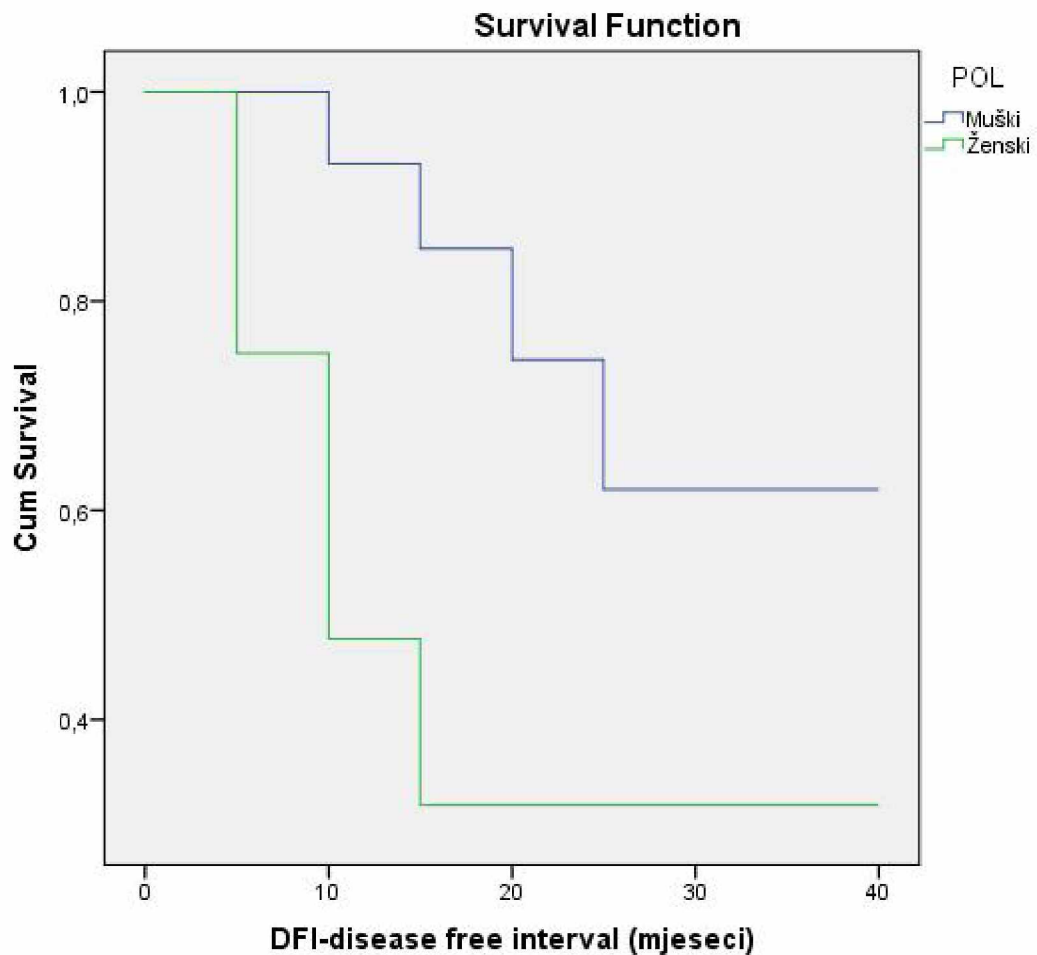
Dužina vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti nije bila statistički značajno kraća (Log Rank test, $p=0,427$) kod pacijenata kod kojih je detektovano prisustvo HPV16 infekcije u odnosu na pacijente koji su bili HPV16 negativni (grafikon 5.7).

- 1- HPV16+
- 2- HPV16-



Grafikon 5.7 Vremenski interval bez bolesti (DFI) kod pacijenata sa HPV16 infekcijom (n=14) i bez HPV16 infekcije (n=46). Između ispitivanih grupa nije registrovana statistički značajna razlika u dužini DFI ($p=0,427$)

Međutim, dužina vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti bila je značajno kraća (Log Rank test, $p=0,003$) kod pacijenata ženskog pola kod kojih je detektovano prisustvo HPV16 infekcije u odnosu na pacijente muškog pola koji su bili HPV16 pozitivni (grafikon 5.8).



Grafikon 5.8 Poređenje vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti (DFI) kod HPV16+ pacijenata ženskog pola (n=6) u odnosu na HPV16+ pacijente muškog pola (n=8). Registrovana je statistički značajna razlika u dužini DFI između ispitivanih grupa ($p=0,003$)

Dužina perioda bez bolesti (DFI) je jedan od važnih kliničkih prognostičkih parametara, pa je, stoga, pored analize uticaja HPV16 na dužinu perioda bez bolesti (DFI), od značaja bilo ispitati i eventualnu povezanost ekspresije p53 i survivina sa ovim parametrom. Rezultati ovih analiza prikazani su u tabelama 5.22 i 5.23.

Tabela 5.22 Odnos ekspresije p53 i dužine perioda bez bolesti

	Ekspresija p53 (0 i 1)	Ekspresija p53 (2 i 3)	Značajnost
DFI (srednja vrijednost u mjesecima)	15	13	p=0,079

Tabela 5.23 Odnos ekspresije survivina i dužine perioda bez bolesti

	Ekspresija survivina (0 i 1)	Ekspresija survivina (2 i 3)	Značajnost
DFI (srednja vrijednost u mjesecima)	18	12	p=0,065

Dobijeni rezultati upućuju na činjenicu da postoji tendencija ka kraćem periodu bez bolesti kod pacijenata sa višim nivoima ekspresije survivina (Mann Whitney; p=0,065), a i p53 proteina (Mann Whitney; p=0,079) u tkivu OSCC (tabele 5.22 i 5.23).

5.7. HPV16 zavisna onkogeneza u odnosu na HPV16 nezavisnu onkogenezu

Mnoga istraživanja danas pokušavaju da utvrde značaj HPV infekcije u višestepenoj oralnoj kancerogenezi. Da li je HPV infekcija nezavisan faktor rizika za nastanak OSCC ili je samo sekundarni događaj u složenom procesu kancerogeneze?

Pokušavajući da, u granicama ovog istraživačkog projekta, damo odgovor na postavljeno pitanje analizirana je i upoređena ekspresija proapoptotskog proteina (p53) i antiapoptotskog onkoproteina (survivina) između grupa HPV16+ i HPV16- pacijenata. Rezultati korelacione analize dati su u tabeli 5.24.

Tabela 5.24 Korelacija ekspresije p53 i survivina kod HPV16+ i HPV16- pacijenata

Ekspresija p53 i			
survivina*	HPV16 +	HPV16 -	Značajnost (p)
P53 + Survivin +	1 (9%)	3 (9%)	0,6171
P53 + Survivin -	6 (55%)	9 (27%)	0,6056
P53 - Survivin +	2 (18%)	10 (29%)	0,0433
P53 - Survivin -	2 (18%)	12 (35%)	0,0162
Ukupno (45)	11 (100%)	34 (100%)	

*Ekspresija „-“ : za vrijednosti 0 i 1; Ekspresija „+“ : za vrijednosti 2 i 3

Analizirajući podatke iz tabele 5.24 utvrđeno je da je u grupi HPV16 pozitivnih tumora skoro dvije trećine uzoraka pokazalo povećanu ekspresiju p53 proteina, dok su, nasuprot tome, u grupi HPV16 negativnih tumora dominirali uzorci bez ekspresije p53.

Kod trećine uzoraka koji su HPV16+, nije detektovana prekomjerna ekspresija p53 proteina, dok je kod trećine uzoraka koji su HPV16- eksprimiran p53 protein.

Takođe, od ukupnog broja analiziranih uzorka OSCC koji su HPV16- , njih 22 (64%) nisu pokazali ekspresiju p53. Ovi tumori mogli bi da predstavljaju poseban entitet kod kojih neki drugi mutacioni događaji (npr. povećana/smanjena ekspresija citoplazmatskog survivina) dovode do kancerogeneze.

6. DISKUSIJA

6.1. Klinički i histopatološki parametri OSCC

Većina skvamocelularnih karcinoma glave i vrata se javlja kod muškaraca starijih od 50 godina¹⁰⁰. U našoj studiji, prosječno životno doba bolesnika iznosilo je 61,7 godina, što je u skladu sa analizama drugih autora¹⁰¹⁻¹⁰⁵. Prije četrdesete godine života bolest se javlja samo sporadično, a to je potvrđeno i ovom studijom u kojoj su samo dva pacijenta (oba muškog pola) bila mlađa od 40 godina. Treba ipak, napomenuti da je to značajno drugačije u odnosu na neke djelove svijeta gdje je incidencija oboljevanja od oralnog karcinoma u populaciji mlađoj od 40 godina veća (ide do 40%)^{106,107}.

Incidencija skvamocelularnog karcinoma sluzokože usne duplje je značajno veća kod bolesnika muškog pola (skoro 80%), a odnos polova u našoj grupi bolesnika bio je 3,6:1, što je u skladu sa nalazima i većih epidemioloških studija^{108,109}. Slični rezultati dobijeni su i u studiji na bolesnicima populacije Srbije, u kojoj je od ukupno 403 bolesnika njih 360 (78%) bilo muškog pola¹¹⁰. Podaci iz studije Vukadinovića i saradnika¹¹¹, takođe sprovedene na grupi ispitanika Srbije od 1991. do 2000. godine, pokazuju da je od 223 bolesnika njih 83,4% (186) bilo muškog pola.

Ovim istraživanjem je obuhvaćeno 60 pacijenta sa OSCC, lokalizovanim na usni (46,7%), zatim na jeziku, podu usta ili jeziku i podu usta (53,3%). Ovakva distribucija OSCC po lokalizaciji je posledica velike učestalosti OSCC usne u našoj populaciji¹¹², gdje je skoro polovina tj. 45% od svih OSCC dijagnostikovanih u periodu 2003-2008. godine, bilo lokalizovano na donjoj i gornjoj usni.

Iako mnogi autori predio usana smatraju entitetom izdvojenim iz oralne šupljine, zbog svog embrionalnog porijekla i histološke građe (kao oralni epitel), karcinomi usana su svrstani među oralne karcinome¹¹³.

Prema kliničkim podacima, na 20% ukupne površine usne duplje u obliku slova U, koja obuhvata lateralne ivice jezika, pod usta i donju usnu, razvija se oko 70% svih oralnih karcinoma, što je takođe u skladu sa rezultatima ove studije. Ovakva distribucija može se objasniti većom osjetljivošću pločastoslojevitog epitela bez keratinizacije i njegovom direktnom izlaganju kancerogenim agensima (duvanski dim, alkohol...), koji se koncentrišu u donjim regionima usne duplje prije fiziološkog ispiranja pljuvačkom prilikom gutanja. Nasuprot ovim lokalitetima, pločastoslojeviti epitel sa orožavanjem, koji se nalazi na tvrdom nepcu, dorzalnoj površini jezika, gingivi, maksili i mandibuli, čini ove regione otpornijim na kancerogene. Zbog toga se oralni karcinom na ovim lokalitetima ređe razvija.

Osnovne histopatološke karakteristike analiziranih OSCC uglavnom su u skladu sa podacima iz literature¹⁰¹. Kod 58,3% pacijenata OSCC je bio dobro diferentovan karcinom, u svega 3,4% slučajeva loše diferentovan, a najčešće je bio srednjeg nuklearnog gradusa (60%). Određivanje histološkog i nuklearnog gradusa je prilično subjektivno, a i kriterijumi za procjenu stepena diferencijacije su različiti, što objašnjava velike razlike u histopatološkoj interpretaciji među pojedinim autorima^{114,115}.

Kliničko praćenje bolesnika naše studije podrazumijevalo je praćenje pojave metastatske bolesti i/ili recidiva.

Metastaze u regionalnim limfnim čvorovima nijesu nađene kod 63,3% pacijenata, što je u skladu sa rezultatima drugih autora^{114,115}. Nalazi brojnih autora iz različitih geografskih regiona opisuju da je učestalost lokalnih metastaza kod OSCC oko 30%¹¹⁶. Prema sadašnjim stavovima

Međunarodnog udruženja protiv karcinoma¹¹⁷ - UICC iz 2002 godine, rest OSCC je pojava tumora istog histološkog tipa u dijelu prethodno hirurški odstranjenog tumora do šest mjeseci nakon operacije. Pojava tumora istog histološkog tipa, od šest mjeseci do tri godine nakon operacije, na udaljenosti do 2cm od primarne lokalizacije, smatra se recidivom bolesti.

U našoj grupi bolesnika uočen je recidiv bolesti kod 16 pacijenata (26,7%).

Pokazano je da je pojava lokalnog recidiva bolesti i regionalne metastaze bitno povezana sa veličinom i lokalizacijom primarnog tumora, kao i načinom invazije okolnih struktura⁷, tako da Vermorken⁷ zapaža pojavu lokalnog recidiva bolesti u čak 80% slučajeva kod bolesnika sa tumorom korjena jezika i poda usta. Ispitivanje pacijenata populacije Srbije je pokazalo različite rezultate, s obzirom na lokalizaciju tumora, tako da je Kozomara¹¹³ utvrdila učestalost recidiva karcinoma jezika i poda usta od 46%, a Petrović i Jelovac¹¹⁰ učestalost recidiva karcinoma usne od 11,7%.

Klinička zapažanja pokazuju da se stepen maligniteta OSCC povećava idući od ventralnih prema dorzalnim i od kranijalnih prema kaudalnim djelovima usne duplje¹¹⁸.

Imajući u vidu činjenicu da je u ovoj studiji dominantno bio zastupljen karcinom usne, koji se, s obzirom na lokalizaciju, relativno lako i rano dijagnostikuje, razloge za nisku učestalost recidiva trebalo bi tražiti, između ostalog, i u toj činjenici.

6.2. Ekspresija p53

Prema intenzitetu ekspresije p53 proteina, ispitivana grupa pacijenata je podijeljena u četiri grupe: pacijenti bez reaktivnosti tumorskih ćelija, manje ili jednako 10% pozitivnih jedara tumorskih ćelija, 11-40% pozitivnih jedara i više od 40% pozitivnih jedara tumorskih ćelija. U mnogim istraživanjima prognostičkog značaja ovog proteina, smatra se da vrijednost od 10% pozitivnih jedara tumorskih ćelija predstavlja granicu pozitivnosti ekspresije^{119,120}.

U ovom istraživanju, statistički značajno najviše je bilo ispitanika bez reaktivnosti tumorskih ćelija (36,7%) i ispitanika sa više ili jednako 40% pozitivnih jedara tumorskih ćelija (30%). Ovakva distribucija imunohistohemijske ekspresije p53 proteina u tkivu OSCC je u skladu sa nalazima drugih autora¹¹⁹. Quon i saradnici¹²¹ navode da je povećana ekspresija TP53 supresornog gena u karcinomima glave i vrata, u zavisnosti od studije, prisutna u 37-71% slučajeva.

U ovom istraživanju, nije uočena statistički značajna razlika ekspresije p53 proteina u odnosu na histološki i nuklearni gradus tumora. Dobijeni podaci su u skladu sa rezultatima mnogih autora^{101,102,122-125}, koji su ukazali da ne postoji korelacija između stepena diferencijacije skvamocelularnih karcinoma usne duplje i povećane ekspresije p53 proteina u ovim tumorima. Nishioka i saradnici¹²⁴ su u svojoj studiji našli neznatan porast povećane ekspresije p53 proteina u loše diferentovanim tumorima (66%) u odnosu na dobro diferentovane karcinome (53%). Nasuprot ovim rezultatima, Gonzales-Moles i saradnici⁹³ su utvrdili statistički značajnu povezanost povećane ekspresije p53 u odnosu na histološki gradus ($p < 0.05$) i nuklearni gradus ($p < 0.01$).

Shahnavaz i saradnici¹²⁶ su detektovali TP53 mutacije u prekanceroznim lezijama i oralnom karcinomu (8% u ćelijama displastičnog oralnog epitela, 66% kod karcinoma *in situ* i 75% kod OSCC). Ovi autori su istakli da se povećanjem stepena displazije povećava ekspresija

p53 proteina. Ovakav rezultat učestalosti mutacija u TP53 genu u premalignim oralnim lezijama ukazuje na rani gubitak njegove tumor-supresorske funkcije u procesu nastanka OSCC, te su autori¹²⁶ zaključili da je alteracija u TP53 genu rani događaj u kancerogenezi oralnog epitela.

U zavisnosti od analizirane populacije, učestalost mutacija u TP53 genu varira od 43% do preko 90%¹²⁷. Prekomjerna ekspresija p53 proteina detektovana je u preko 50% ćelija tumorskog tkiva, u 29% displastičnih ćelija, u 51% oralnih verukoznih leukoplakija i čak u 72% invazivnih OSCC¹²⁷. Ovakvi i slični rezultati učestalosti mutacija i izmijenjene ekspresije p53 u premalignim oralnim lezijama potvrđuju rani gubitak njegove tumor-supresorske funkcije u procesu nastanka OSCC.

Druge studije sugerišu da je mutacija u TP53 genu kasni događaj u kancerogenezi OSCC, jer je poznato da kancerogeneza može da se razvija različitim putevima. Razlog diskrepance u rezultatima ovih autora leži u tome što su koristili različite metode detekcije alteracija u TP53 genu ili p53 proteinu i zbog toga što su analizirali lezije sa anatomski različitih regiona usne duplje¹²⁸.

U ovoj studiji, analizom korelacije kliničko-patoloških karakteristika ispitivanih neoplazmi i ekspresije p53 proteina uočen je statistički značajan uticaj ekspresije ovog proteina na veličinu tumora, što znači da je uvijek veća dimenzija tumora kod pacijenata sa većom ekspresijom p53, bez obzira na ostale prisutne histopatološke karakteristike tumora, kao i kliničke karakteristike pacijenata. Povećana ekspresija p53 proteina u tumorima većih dimenzija, dobijena u ovoj studiji, u saglasnosti je sa nalazima drugih autora^{101,129}, koji statistički značajno povećanje ekspresije p53 proteina dovode u vezu sa uznapredovalim stadijumom bolesti. Tako je Nylander¹²⁹ utvrdio povećanu ekspresiju p53 proteina za tumore T3 i T4 u 86%, a kod pacijenata sa primarnim tumorom T1 i T2 u 33% slučajeva.

Proširenost bolesti, tj. prisustvo metastaza i/ili recidiva, značajan je parametar za praćenje toka bolesti, ali i za ukupno preživljavanje bolesnika sa OSCC. Danas se mnoge studije bave proučavanjem povezanosti diseminacije bolesti sa biološkim karakteristikama tumora, odnosno koliko su zaista klinički i histopatološki parametri pouzdani pokazatelji stepena maligniteta i da li histopatološka definisanost tumora odgovara osobinama tumora. Pošto je genetska nestabilnost jedna od karakteristika maligne ćelije, moglo bi se reći da svaki tumor predstavlja genetski heterogenu populaciju ćelija. Upravo iz tog razloga i ne iznenađuje činjenica da se vrlo često, mutacije u TP53 genu, detektovane kod primarnog tumora, ne mogu naći u limfnom čvoru ili udaljenoj metastatskoj leziji.

Analiza naših rezultata je pokazala da ne postoji statistički značajna korelacija između ekspresije p53 proteina i većine kliničko-patoloških karakteristika OSCC u ispitanoj populaciji (pojava recidiva bolesti i metastaza u regionalnim limfnim čvorovima), što se podudara sa nalazima većine drugih autora^{101,102,122-125}. Takođe, Leedy i sar.¹³⁰ nijesu našli statistički značajnu povezanost povećane ekspresije p53 u odnosu na metastaziranje u regionalne limfne čvorove.

Mnogi onkološki centri u Evropi i Americi pokušavaju da usaglase koncept kategorisanja pacijenata koji pripadaju nisko i visoko rizičnoj grupi za nastanak lokalnog recidiva bolesti i/ili regionalnih metastaza^{131,132}. Usaglašen je stav da visoko rizičnoj grupi pripadaju pacijenti sa pozitivnim marginama hirurški resecciranog tumorskog tkiva, sa dva ili više metastatski izmijenjenih limfonodusa i/ili ekstrakapsularnom diseminacijom metastatski izmijenjenih limfonodusa.

Mnogi kineski autori^{133,134} nijesu našli statistički značajnu povezanost povećane ekspresije p53 u odnosu na histološki gradus tumora, recidiv, metastaziranje u regionalne limfne

čvorove i ukupno preživljavanje pacijenata sa karcinomom jezika. Nasuprot ovim rezultatima, Unal i sar.¹³⁵ su našli statistički značajnu povezanost povećane ekspresije p53 kod bolesnika sa OSCC jezika u odnosu na veličinu primarnog tumora, stadijum bolesti i metastatski izmijenjene limfne čvorove. Osaki i sar.⁹⁵ su našli statistički značajnu povezanost između povećane ekspresije p53 proteina i agresivnosti karcinoma (određivanoj pojavom regionalnih i udaljenih metastaza), kao i kraćeg preživljavanja pacijenata sa T3 i T4 tumorima u odnosu na T1 i T2 veličinu tumora u trogodišnjem praćenju toka bolesti.

U današnjoj praksi, veoma je važna histopatološka procjena limfnih čvorova, jer se na osnovu nje određuje međunarodna TNM klasifikacija bolesti. Pojedini autori^{136,137} su vršili i molekularnu procjenu limfnih čvorova i ukazali su da se, u limfnim čvorovima koji su nakon HP verifikacije smatrani benignim, molekularnom analizom mogu detektovati mutacije. Zbog toga je primjena molekularnih tehnika, kao dodatnih analiza, nedvosmisleno indikovana u procjeni statusa limfnih čvorova kod pacijenata sa skvamocelularnim karcinomom glave i vrata. Ovim bi bila omogućena još preciznija klasifikacija pacijenata, tj. prekvalifikacija stadijuma tumora.

Korelacija između prisustva TP53 mutacija i loše prognoze kod pacijenata sa dijagnostikovanim skvamocelularnim karcinomom glave i vrata i dalje je kontroverzna. Dok je u pojedinim studijama^{90,91} pokazana veza između prisustva mutacija, tj. prekomjerne ekspresije p53 i loše prognoze, u mnogim studijama nije nađena veza između ova dva parametra^{92,93,94}. Smatra se da razlog izuzetno male stope petogodišnjeg preživljavanja, udaljenih metastaza ili sekundarnih primarnih tumora, koji nije otkriven dosadašnjim metodama, može ležati u hirurškim marginama ili limfnim čvorovima¹³⁸, tim prije što je, na primjer, ustanovljena veća incidenca okultnih metastaza kod pacijenata kod kojih je dubina invazije karcinoma jezika veća od 5mm¹³⁹.

Do sada su urađene mnoge studije o učestalosti mutacija u p53 onkogenu i o akumulaciji p53 proteina u citoplazmi ili jedru tumorskih ćelija. Rezultati dosadašnjih istraživanja ovog problema uglavnom su dobijeni imunohistohemijskim metodama, koje nijesu dovoljno specifične. Metode detekcije mutacija u TP53 genu su pouzdanije, preciznije i objašnjavaju da prekomjerna ekspresija p53 proteina ne mora da bude posledica mutacija u genu za p53, nego posledica drugih promjena u genskoj osnovi ili ekspresiji drugih proteina na nivou transkripcije ili translacije.

U tumorskim ćelijama u kojima se imunohistohemijski ne detektuje prekomjerna ekspresija p53 proteina moguće je da je TP53 gen nepromijenjen (wt-p53), da je došlo do gubitka oba alela ili da je određenim monoklonskim antitijelom nemoguće detektovati mutaciono izmijenjeni p53 protein. Nasuprot imunohistohemijskim, molekularne metode analize su preciznije, iako se TP53 mutacija detektuje, u prosjeku, kod polovine pacijenata sa karcinomom glave i vrata^{140,141}. Preciznije rečeno, učestalost mutacija TP53 gena u skvamocelularnim karcinomima glave i vrata varira od 30-70%, u zavisnosti od metodologije koja se koristi za procjenu statusa TP53 gena u tumorskom tkivu, tipa tumorskog materijala, kao i od heterogenosti tumorskog materijala^{40,142}. Smatra se da je glavni razlog variranja učestalosti TP53 mutacija izloženost različitim faktorima rizika u posmatranim populacionim grupama¹⁴³.

Novija istraživanja su pokazala da postoji značajna povezanost između prekomjerne ekspresije p53 proteina u samom tumorskom tkivu OSCC i prisustva autoantitijela na p53 u krvi i pljuvački ovih bolesnika⁸⁷. Autoantitijela na p53 u serumu se produkuju u imunskom odgovoru domaćina na stabilisani vjerovatno mutirani p53 protein, koji se akumulira u nukleusu ćelija OSCC. Analizom više od 1000 zdravih ispitanika na prisustvo antitijela na p53 pokazano je da su antitijela na p53 vrlo rijetko prisutna (manje od 0,5%). U istraživanjima¹⁴⁴ u kojima je ispitivano

prisustvo p53 autoantitijela u krvi bolesnika sa premalignim lezijama i razvijenim OSCC pokazano je da su kod 69,2% bolesnika sa prekanceroznim oralnim lezijama bila prisutna autoantitijela. Na osnovu ovih nalaza je zaključeno da je mutacija u TP53 genu rani i ireverzibilni događaj u kancerogenezi OSCC.

Detekcija antitijela u serumu i pljuvački može biti koristan dopunski marker za detekciju OSCC. Prije uvođenja ove metode u kliničku primjenu potrebno je ispitati mnogo veći broj oboljelih od OSCC, onih sa premalignim lezijama u usnoj duplji i zdravih pacijenata koji imaju visok rizik za nastanak OSCC (pušači, alkoholičari). Detekcija ovih autoantitijela može biti korisna za dijagnostički skrining premalignih lezija, a može se vršiti komercijalnim Elisa kitom¹⁴⁴.

6.3. Ekspresija survivina

Literaturni podaci ukazuju da se survivin normalno eksprimira samo tokom embrionalnog razvoja i u fetalnom tkivu, dok ga u normalnim i diferentovanim ćelijama nema ili je slabo eksprimiran^{145,146}. Prisustvo survivina u nezrelom tkivu je važno za rast i održavanje normalnih embriona¹⁴⁷. Međutim, novije studije ukazuju na značajnu ekspresiju survivina u zrelih tkivima odraslih kao što je tkivo timusa, CD34+ stem ćelije, placenta, bazalne epitelne ćelije kolona, hepatociti, endotelne ćelije, epitelne ćelije debelog crijeva, endometrijum i limfociti^{53,59,145,146,148}.

Smatra se da je survivin lokalizovan u jedru, citoplazmi i mitohondrijama¹⁴⁹. U dostupnoj literaturi sugerisano je da survivin lokalizovan u različitim djelovima ćelije može imati i različite efekte u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze. Postoji mišljenje da je citoplazmatski survivin odgovoran za preživljavanje ćelija tumora, odnosno da funkcioniše kao inhibitor apoptoze, dok survivin lokalizovan u jedru tumorskih ćelija doprinosi njihovoj proliferaciji, budući da učestvuje u očuvanju integriteta mitotičkog vretena. Prema tome, visoka ekspresija jedarnog survivina može da predstavlja odraz ubrzanih mitotičkih procesa, što bi objasnilo zašto ovaj parametar ima negativnu prognostičku vrijednost u pojedinim vrstama tumora¹⁵⁰.

U našoj studiji, u 2/3 slučajeva ekspresija survivina je bila niska tj. bez reaktivnosti tumorskih ćelija ili sa reaktivnošću manjom od 5% pozitivnih tumorskih ćelija. Takođe, u uzorku OSCC ove studije, ekspresija survivina je bila isključivo citoplazmatska, bez detektovane jedarne ekspresije. Odsustvo ili slaba ekspresija survivina (manja od 5%) karakteristika je mnogih normalnih, diferentovanih ćelija čovjeka^{145,146} (i prema DAKO protokolu, koji je u radu korišćen za imunohistohemijsku detekciju survivina). Iz tog razloga, smatrali smo povećanom ekspresijom survivina sve slučajeve gdje je ona imala vrijednost veću od 5%. Ovakva, povećana citoplazmatska ekspresija survivina detektovana je kod trećine (35,6%) pacijenata iz našeg uzorka. U ovom radu, moramo uzeti u obzir i to da polovinu uzorka čine pacijenti sa karcinomom usne, koji je, za razliku od oralnih karcinoma drugih lokalizacija, najčešće dobro diferentovan i ima dobru prognozu (zbog rane dijagnostike). To bi, između ostalog, mogao da bude jedan od razloga niske ekspresije survivina.

U skladu sa ovim nalazom, u sitnoćelijskom karcinomu pluća je pokazano smanjenje ekspresije survivina¹⁵¹. Suprotno tome, u većini malignih tumora, kao što su nesitnoćelijski karcinom pluća¹⁵², karcinomi pankreasa i kolona^{153,154}, mekotiivni sarkomi¹⁵⁵, melanomi¹⁵⁶, neuroblastom^{57,148}, opisana je povećana citoplazmatska ekspresija survivina. U većem broju studija pokazano je da upravo ekspresija survivina u citoplazmi tumorskih ćelija predstavlja

negativan prognostički faktor, i to u malignim tumorima pljuvačnih žlijezda¹⁵⁷, debelog crijeva¹⁵⁸ kao i u skvamocelularnim karcinomima usne duplje⁶⁴.

U studiji Engelsa i saradnika analiziran je međusobni odnos citoplazmatskog i jedarnog survivina i njegov uticaj na prognozu kod pacijenata oboljelih od skvamocelularnih karcinoma usne duplje⁶⁰. Uočeno je da je promjena ovog odnosa u korist jedarnog survivina pozitivan prognostički faktor u pogledu dužine perioda od završetka liječenja do ponovne pojave bolesti (relapse-free survival). U *in vitro* uslovima, pokazano je da u regulaciji unutarćelijske lokalizacije survivina važnu ulogu ima aktivan transport ovog proteina iz jedra u citoplazmu, koji je regulisan preko specifičnog receptora Crm1 i odgovarajuće sekvence aminokiselina u okviru samog proteina, poznate kao NES (*nuclear export signal*). Takođe, pokazalo se da je ovakav mehanizam značajan za citoprotektivnu funkciju survivina, budući da izlaganje tumorskih ćelija dejstvu cisplatina ili zračenja dovodi do transporta survivina iz jedra u citoplazmu, što smanjuje osjetljivost ćelija na hemioterapiju i radioterapiju⁶⁰.

U ovom istraživanju, analizom povezanosti ekspresije survivina i veličine tumora, utvrđena je značajno veća dimenzija tumora kod pacijenata sa manjom ekspresijom survivina, tj. veća dimenzija tumora je bila povezana sa manjom ekspresijom survivina, bez obzira na ostale prisutne parametre, kako samog tumora tako i opštih karakteristika pacijenata. Međutim, većina literaturnih podataka ukazuje na to da je citoplazmatska ekspresija survivina odraz ćelijskog preživljavanja, a ne ćelijske proliferacije⁵³. S obzirom na to, razloge ovakvog odnosa veličine tumora i ekspresije survivina možemo objasniti dejstvom p53 onkoproteina i njegovom interakcijom sa survivinom^{159,160,161}.

Naime, u ovom istraživanju je utvrđena statistički značajna korelacija između ekspresije survivina i p53 onkoproteina. Ovakav odnos je dokazan u eksperimentalnim i kliničkim studijama i to i na nivou gena i na nivou odgovarajućih proteina. Ukazano je da „wild-type“ p53 može da dovede do transkripcione represije gena za survivin, vezivanjem za njegov promotorski region⁵¹, a u *in vitro* uslovima takav efekat je potvrđen i smanjenom ekspresijom kako iRNK za survivin, tako i samog proteina⁵². Značajno je što mutirani p53 nije imao uticaja na ekspresiju niti iRNK niti samog survivina. Analizom 162 uzorka karcinoma dojke⁹⁸, utvrđeno je da postoji korelacija između mutacija TP53 gena i povećane ekspresije survivina, i to posebno njegovih antiapoptotskih varijanti (Δ Ex3 i 3B). Nasuprot tome, te mutacije nisu imale efekta na ekspresiju proapoptotskih varijanti survivina (2B i 2a).

Poznato je da je u fiziološkim uslovima ekspresija p53 veoma slaba, što je rezultat funkcionisanja preciznih regulatornih mehanizama kojima se obezbjeđuje održavanje niskog nivoa p53, sve dok se ne ukaže potreba za njegovom pojačanom aktivnošću. Ključnu ulogu u tom smislu ima protein Mdm2 (*murine double minute 2*), koji funkcioniše kao ubikvitin ligaza, vezuje ubikvitin za p53 i obezbjeđuje njegovu razgradnju od strane proteozoma^{26,29,30}. Pošto su p53 ekspresija i funkcija regulisane, između ostalog, dejstvom Mdm2, koji je supstrat kaspazne aktivnosti, a survivin inhibira dejstvo kaspaza, američki autori¹⁵⁹ su istraživali moguću funkcionalnu vezu između ovih procesa, tj. da li survivin reguliše p53? Utvrđeno je¹⁵⁹ da survivin reguliše p53 ekspresiju posredno, putem kaspaza3/Mdm2 interakcije, regulišući Mdm2 na post-translacionom nivou. Naime, u apoptotskoj kaskadi, kaspaze mogu modifikovati funkciju Mdm2, vezujući se za ovaj protein. Ovakvu degradaciju Mdm2 onemogućava survivin, tako da zahvaljujući tome – poboljšanoj p53 degradaciji postoji redukcija p53 proteina u ćelijama koje eksprimiraju survivin.

Veliki broj istraživanja se bavio ispitivanjem mehanizma regulacije genske ekspresije survivina, kako bi se otkrio način na koji dolazi do derepresije transkripcije survivina u ćelijama tumora. Od ranije je poznato da je opšta karakteristika većine tumora prekomjerna ekspresija survivina, kao i potpuni gubitak nemutiranog (wild type) p53. Eksperimenti koje su izveli Mirza i sar. ukazuju na postojanje veze između survivina i p53, kojom bi se mogao objasniti kritičan događaj koji dovodi do transformacije normalne ćelije u ćeliju tumora⁵². Wagner i sar.¹⁶² su ispitivali mogući molekularni mehanizam odgovoran za prekomjernu ekspresiju survivina kod pacijenata oboljelih od akutne mijeloidne leukemije. Uzimajući u obzir mogućnost epigenetičkog mehanizma regulacije genske ekspresije survivina, ovi autori su mjerili stepen metilacije promotorskog regiona survivina kod pacijenata obolelih od akutne mijeloidne leukemije. Mjeren je i stepen metilacije promotora survivina kod mononuklearnih ćelija periferne krvi, za koje je pokazano da ne ekspimiraju survivin. U obje grupe su pronađeni nemetilovani promotori što ukazuje na izostanak uticaja metilacije na regulaciju reekspresije survivina tokom razvoja leukemije¹⁶². Još jedan mehanizam regulacije ekspresije survivina je identifikovan na post-transkripcionom nivou, koji podrazumijeva fosforilaciju survivina na poziciji Thr (34), što dovodi do povećane stabilnosti proteina. O'Connor i sar. su pokazali da je survivin Thr (34) fosforilisan p34 ciklin zavisnom kinazom (cdc2), kao i da je ta fosforilacija poželjna kako bi se održala vitalnost ćelije i proces ćelijske diobe¹⁶³.

6.4. Korelacija polimorfizma gena i patogeneze OSCC

Polimorfizam lociran u promotorskom regionu -31C/G gena za survivin, može da utiče na ekspresiju i funkciju ovog proteina. U eksperimentalnoj studiji⁷⁰, koja je obuhvatila 22 ćelijske linije različitih malignih tumora, uočeno je da je transverzija C (citozina) u G (guanin) na poziciji -31 česta mutacija u tumorskim ćelijama u odnosu na kontrolnu grupu normalnih ćelija. Pokazano je da je 68% linija tumorskih ćelija bilo homozigotno za GG genotip, dok su u kontrolnoj grupi bili zastupljeni CC i CG genotipovi. Takođe, GG genotip je bio povezan sa naglašenom ekspresijom survivina i iRNK za ovaj protein. Kako je ovaj polimorfizam lociran u CDE/CHR regionu, zaduženom za transkripcionu represiju gena, sugerisano je da je povećana ekspresija survivina posledica derepresije njegovog gena zbog modifikacije veznih mjesta u CDE/CHR represorskom regionu⁷⁰.

U ovom istraživanju pokazano je da je većina pacijenata sa OSCC bila homozigotna za GG genotip, dok je u kontrolnoj grupi to bio slučaj sa CG heterozigotima. Takođe, kod pacijenata sa OSCC, G alel je bio neznatno zastupljeniji u odnosu na kontrolnu grupu. Genotipovi polimorfizma -31C/G gena za survivin nijesu identifikovani kao faktori povećanog rizika za nastanak OSCC.

Međutim, različite kliničke studije su pokazale kontradiktorne rezultate, pri čemu su u većem broju istraživanja C alel i CC genotip identifikovani kao faktori rizika za nastanak pojedinih tumora, kao što su adenokarcinom pluća⁷³, karcinom kolona^{72,99} i karcinom jednjaka⁷⁵. Istraživanja Gazouli-a i saradnika⁷² su potvrdila da su -31C/C genotip i -31C alel povezani sa

povećanim rizikom za nastanak kolorektalnog karcinoma. Ovi autori su utvrdili i značajnu povezanost između -31C/C genotipa i viših stadijuma (III and IV), kao i nepovoljne prognoze bolesti.

Nasuprot tome, druge studije ukazuju na povezanost G alela i GG genotipa ovog polimorfizma sa razvojem ili prognozom tumora, kao na primjer kod keratocističnih odontogenih tumora^{67,164}. U jednoj studiji koja se odnosi na karcinom želuca nisu uočene razlike u zastupljenosti pojedinih varijanti i alela ovog polimorfizma između ispitivanih grupa. Međutim, G alel je bio povezan sa povećanim rizikom od nastanka difuznih tumora, kao i sa oboljevanjem u mlađem životnom dobu tj. ispod 50-te godine života¹⁶⁵. U drugoj studiji¹⁶⁶ pokazano je da su GG i GC genotipovi bili češće zastupljeni kod pacijenata sa distalnim i dobro diferentovanim karcinomima želuca. Kod karcinoma jednjaka nije bilo razlike u distribuciji pojedinih genotipova polimorfizma -31C/G između oboljelih i zdravih pojedinaca, ali se pokazalo da različite kombinacije haplotipova polimorfizama gena za survivin pokazuju različite efekte u odnosu na ovu vrstu tumora. Tako je pokazano da -644T--625C--31C haplotip povećava rizik od karcinoma jednjaka, dok je -644T--625G--31C imao protektivno dejstvo¹⁶⁷. Ovakvi rezultati ukazuju da efekti -31C/G polimorfizma mogu biti modifikovani promjenama na nivou drugih gena, a isto važi i za druge djelove gena za survivin.

Najzad, u pojedinim istraživanjima, kao i u našoj studiji, nije uspostavljena veza između -31C/G polimorfizma i nastanka pojedinih tumora. Tako Wagner i sar. nisu mogli da potvrde ulogu ovog polimorfizma u nastanku akutne mijeloidne leukemije¹⁶², a sličan rezultat je dobijen i kod hepatocelularnog¹⁶⁸ i cervikalnog karcinoma¹⁶⁹.

Ove razlike se objašnjavaju dejstvom faktora spoljašnje sredine, ali i mogućim uticajem drugih genetskih promjena koje, očigledno, uključuju više gena. Ako već nastao OSCC pretrpi još neki od genetskih događaja, nezavisno od genetske promjene koja je dovela do njegovog nastanka, kao na primjer mutacija TP53 ili gubitak heterozigotnosti na 16q ili 1p, dolazi do izmjene biološke prirode tumora što se odražava na odgovor na primijenjenu hemio/radioterapiju i konačan ishod bolesti. Osim toga, u interpretaciji ovih rezultata molekularno-genetičkih istraživanja treba uzeti u obzir i etničke, odnosno geografske razlike između ispitivanih populacija, a poznato je da je incidenca OSCC najveća kod azijske populacije, dok je u Evropi na srednjem nivou. U skladu sa tim, meta-analiza Srivastava-e i saradnika¹⁷⁰ je nedavno potvrdila, da je -31C/G polimorfizam jedino relevantan faktor rizika za nastanak karcinoma u azijskoj populaciji.

Ispitujući korelaciju alelnih varijanti na poziciji -31C/G gena za survivin i kliničkih parametara ispitivanih neoplazmi, u ovom radu je utvrđena statistički značajna povezanost između genotipova za survivin i pola pacijenata. Pacijentkinje su bile dominantni nosioci GG genotipa, a CC genotip kod njih nije utvrđen, dok je kod pacijenata muškog pola približno jednako zastupljen CG i GG genotip, a utvrđen je i CC genotip. Ovakav nalaz može biti posledica karaktera analiziranog uzorka, u kome su pacijentkinje bile značajno manje zastupljene (22%) u odnosu na muškarce (78%). Preostaje pitanje da li su žene, kao dominantni nosioci GG genotipa, pod većim rizikom za nastanak OSCC, bez obzira što GG genotip, generalno posmatrano, nije identifikovan kao faktor povećanog rizika za nastanak ove bolesti? Ova dilema, između ostalog, nameće potrebu istraživanja na većem uzorku oboljelih od OSCC.

U našem istraživanju je uočeno, mada bez statističke značajnosti, da je imunohistohemijska ekspresija survivina manja u uzorcima OSCC pacijenata sa CG genotipom, u odnosu na nosioce GG genotipa. Ovakav rezultat je u skladu sa podacima dobijenim u *in vitro* istraživanjima, koji sugeriraju da je GG genotip povezan sa izraženijom ekspresijom survivina, kako na nivou iRNK tako i na nivou samog proteina⁷⁰.

Međutim, u većem broju studija uočeno je da upravo C alel i CC genotip doprinose naglašenoj ekspresiji ovog proteina. Tako su, kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, CC homozigoti imali 1,6 puta više nivoe iRNK za survivin u poređenju sa drugim varijantama ovog polimorfizma⁷². Analizirajući uzorke kolorektalnih karcinoma, Antonacopoulou i saradnici su pokazali da nije bilo korelacije između nivoa ekspresije iRNK za survivin (analizirane RT-PCR tehnikom) i nivoa ekspresije samog survivina u tumorskim ćelijama (analizirane imunohistohemijskim metodama), što ukazuje da su, osim transkripcione kontrole gena, za ekspresiju survivina važni i drugi regulatorni mehanizmi, pa je interpretacija ovih rezultata utoliko složenija⁹⁹.

Za razliku od polimorfizma -31C/G, naši rezultati ne govore u prilog ulozi PIN3 Ins16bp polimorfizma TP53 gena u patogenezi OSCC.

Sa druge strane, iako su nosioci A2A2 genotipa (homozigoti sa mutacijom - insercijom 16 baznih parova u intronu 3) bili češći kod pacijenata sa OSCC nego kod zdravih pojedinaca, statistička analiza nije potvrdila značajnost ovakvog rezultata. Mada su dosadašnja istraživanja ukazala da je kod A2A2 (Ins/Ins) homozigota povećan rizik od oboljevanja od malignih bolesti, posebno karcinoma dojke¹⁷¹, naši rezultati ukazuju da to nije slučaj sa OSCC. Ipak, ne može se isključiti mogućnost da bi rezultati na većem uzorku bili drugačiji.

Analizom odnosa polimorfizma PIN3 Ins16bp TP53 gena i p53 ekspresije, uočeno je da se nosioci A1A2 genotipa (heterozigoti za inserciju 16 baznih parova u intronu 3) mogu povezati sa višim, a nosioci A1A1 genotipa (bez insercije 16 baznih parova u intronu 3) sa nižim nivoima ekspresije p53 proteina. To bi, indirektno, značilo da prisustvo bar jednog A2 alela - alela sa insercijom 16bp u intronu 3 TP53 gena dovodi do povećanja nivoa mutiranog p53 proteina u jedru tumorskih ćelija. Eventualnu statističku značajnost ovakvog nalaza pokazaće studije na većem uzorku oboljelih od OSCC.

Pozitivnu korelaciju između mutacionog statusa TP53 gena i ekspresionog statusa p53 proteina potvrdile su mnoge studije^{129,172,173}. U skladu sa tim, mutacije u TP53 genu praćene su prisustvom izmijenjenog p53 proteina, koji se imunohistohemijski detektuje zbog dužeg poluživota (oko 6 sati) u odnosu na poluživot normalnog p53 proteina (nekoliko minuta).

Međutim, neka istraživanja ne pokazuju korelaciju između stepena mutacija u TP53 genu i ekspresije p53 proteina. Tako, na primjer, Schildt i sar¹⁷⁴ utvrđuju 63% oralnih karcinoma sa eksprimiranim p53 proteinom, dok svega 36% istih pokazuje mutaciju TP53 gena. Objašnjenje je u neselektivnosti primijenjenih antitijela kada su u pitanju mutirane i "wild-type" forme p53 proteina. Naime, imunohistohemijski se detektuju kako mutirani p53 proteini, tako i divlje forme ovog proteina, koje su nefunkcionalne zbog interakcije sa viralnim onkoproteinom E6 ili zbog interakcije sa defektnim mdm2 onkoproteinom^{175,176}.

Interesantna je činjenica da je utvrđena korelacija između genotipa polimorfizma PIN3 Ins16bp TP53 gena i stadijuma bolesti, tako da su nosioci A2A2 genotipa bili u višim stadijumima bolesti (III i IV). Ovakav nalaz korelira sa rezultatima molekularno-genetičkih istraživanja 106 uzoraka karcinoma želuca¹⁷⁷, u kojima je utvrđena statistički značajna povezanost A2A2 genotipa i uznapredovalog stadijuma bolesti (III i IV). Između ostalog, ispitujući povezanost polimorfizama (Pro72Arg i PIN3 Ins16bp) gena TP53 i mutacionog statusa

TP53 gena u domenu 5-og, 6-og i 7-og egzona, autori¹⁷⁷ su utvrdili pozitivnu korelaciju jedino između Pro/Pro genotipa i mutacija u 7-om egzonu TP53 gena. Generalno, mogli bismo zaključiti da prisustvo A2A2 genotipa ukazuje na agresivnije biološko ponašanje tumora.

6.5. HPV16 infekcija

U ovom istraživanju je prvi put u našoj zemlji za detekciju kancerogenih tipova HPV korišćena PCR metoda. PCR metodom detektovali smo prisustvo DNK HPV16 kod 14/60 (23,3%) pacijenata operisanih od OSCC.

DNK HPV virusa se identifikuje kod 10-20% skvamocelularnih karcinoma glave i vrata, pri čemu se u 90-95% svih HPV pozitivnih karcinoma detektuje haplotip HPV16^{178,179}. Zastupljenost genoma HPV virusa u tumorskom tkivu zavisi od lokacije samog tumora u usnoj duplji, tako da se HPV virus najčešće detektuje u tonzilama (45-67%), a znatno ređe na drugim lokalitetima u usnoj duplji (12-18%)¹⁸⁰. Prevalenca HPV infekcije je statistički značajno veća kod karcinoma orofarinksa (korjen jezika i tonzile) u odnosu na oralni i laringealni skvamocelularni karcinom¹⁸¹.

Rezultati ispitivanja pokazuju da učestalost HPV infekcije kod oralnih karcinoma varira od 10-100%^{82,182,183}. Ovakve razlike u učestalosti mogu se objasniti specifičnostima pojedinih populacionih grupa. Tako je HPV, generalno, zastupljeniji u sjevernoj Americi nego u Evropi i Aziji, što potvrđuje metastudija Kreimer-a i sar.¹⁸¹, koja objedinjuje podatke iz 60 studija sa različitih geografskih lokaliteta. Zatim, razlike u učestalosti HPV infekcije mogu biti uzrokovane metodama koje se koriste za detekciju HPV (*in situ* hibridizacija - ISH, PCR metoda) i vrstama uzoraka koji se koriste za analizu (bris, biopsija, aspirat)⁸². Pokazano je da postoji razlika u tačnosti rezultata u zavisnosti od toga da li se učestalost HPV infekcije određuje u svježem tumorskom tkivu ili je to tkivo iz parafinskog kalupa¹⁸⁴.

U istraživanjima populacije Srbije, na uzorku od 50 karcinoma jezika i poda usta detektovano je prisustvo HPV infekcije kod 64% bolesnika¹¹³, a analiza tipizacije HPV je pokazala sledeću distribuciju: HPV16 kod 31,2%, HPV18 i HPV31 kod po 18,7%, a udružena pozitivnost HPV16+31 je bila prisutna kod 9,3%, odnosno HPV18+31 kod 21% HPV pozitivnih bolesnika. S druge strane, pojedini autori¹⁸² su, na uzorku iste populacije, dobili učestalost HPV16 infekcije u oralnom karcinomu različitih lokaliteta usne duplje od svega 10%. Razlike u dobijenim podacima se mogu tumačiti različitom vrstom materijala koji je korišćen za analizu (svježe tumorsko tkivo¹¹³ ili tkivo iz parafinskog kalupa¹⁸²).

Učestalost oralne infekcije kancerogenim tipovima HPV (a najčešći je tip HPV16) kod zdravih ljudi sa nepromijenjenom sluzokožom veoma je niska (1,3%)^{184,185}. Pošto je HPV16 infekcija jedna od najčešćih seksualno prenosivih infekcija detektovanih u anogenitalnoj regiji, postavlja se pitanje zašto je oralna HPV infekcija rijetkost, posebno uzimajući u obzir sličnosti epitela sluzokože oralne i anogenitalne regije? Autori¹⁸⁵ kao moguće objašnjenje, pored različitih tehničkih uslova uzimanja uzoraka za analizu, navode da je oralna sluzokoža možda otpornija na

ovu infekciju. Za sada, povezanost HPV infekcije sa OSCC nije tako jasno objašnjena kao što je to pokazano za genitalne infekcije ovim virusom i nastanak karcinoma cerviksa¹⁸⁶.

Rezultati naše studije pokazuju da je 46,2% žena oboljelih od OSCC bilo HPV16 pozitivno, a svega 17% oboljelih muškaraca. Ovaj rezultat ukazuje na statistički značajnu povezanost prisustva HPV16 u odnosu na pol pacijenta. Ovakva distribucija HPV16 infekcije po polu, u ispitivanoj populaciji, može se objasniti specifičnostima geografske regije, prije svega faktorima okruženja, životnim i bihevioralnim navikama (seksualno rizično ponašanje). Sve epidemiološke studije koje se bave oralnim karcinomom pušenje smatraju glavnim etiološkim faktorom za nastanak HPV infekcije, ali ne treba zanemariti ni značaj genetske predispozicije određenih populacija.

Nalaz o zastupljenosti HPV+ oralnih karcinoma dominantno kod osoba ženskog pola, dobijen u ovoj studiji, značajno se razlikuje u odnosu na rezultate drugih istraživanja¹⁸⁷, koja su pokazala da je incidenca HPV+ karcinoma glave i vrata veća među osobama muškog pola. Studije u Evropi i Americi pokazuju porast seksualno rizičnog ponašanja u poslednjih nekoliko decenija, što uzrokuje i porast izloženosti usne duplje HPV infekciji. Kako je potrebno više od 10 godina da HPV infekcija progredira u malignitet, upravo te promjene ponašanja mogu objasniti porast incidence HPV+ karcinoma poslednjih decenija. Međutim, ostaje dilema ko su „vektori” transmisije HPV infekcije u usnu duplju/orofarinks i da li se ova infekcija može prenositi i na neki drugi način? S tim u vezi, interesantna je činjenica da je oralna HPV infekcija majki povezana sa povećanim rizikom za oralnu HPV infekciju njihove djece, što govori u prilog drugih načina transmisije HPV infekcije¹⁸⁸.

Danas se u Sjedinjenim Američkim Državama koriste HPV vakcine i to Gardasil® (protiv infekcije tipovima 6, 11, 16 i 18) i Cervarix® (protiv infekcije tipovima 16 i 18) isključivo za prevenciju ano-genitalnih karcinoma. Međutim, u toku je intenzivna klinička evaluacija efekata HPV vakcina, sa ciljem da se u budućnosti uspješno primijene i u prevenciji ostalih, pa i karcinoma glave i vrata¹⁸⁷. Profilaksa se sprovodi kod osoba ženskog pola 15-26 godina starosti, a takođe se preporučuje i muškarcima u ranom (adolescentnom) periodu¹⁸⁹.

Smatra se da postoje dva etiopatološka mehanizma koja dovode do razvoja skvamocelularnih karcinoma glave i vrata, a to su HPV+ i HPV- put. U karcinomima glave i vrata, kod kojih je nađen HPV, rijetka je mutacija tumor supresornih gena, kao što su TP53, p16 ili Rb gen. Gubitak funkcije produkata ovih gena nije posledica uobičajenih mehanizama genske alteracije, kao što su tačkaste mutacije i delecije, već je najčešće posledica interakcije „wild-type” proteina sa virusnim proteinima. Ovu tezu potvrđuju niski procenti detektovanih mutacija, kao i rijetki LOH-ovi u regionima u kojima su locirani pomenuti geni¹⁹⁰.

Kod HPV+ karcinoma, E6 viralni onkoprotein inaktivira divlji tip p53 proteina, tako što se vezuje za njega i stabilizuje ga u nukleusu. Time, sa jedne strane, onemogućava njegovu normalnu transkripcionu aktivnost, a sa druge strane sprečava njegovo normalno eksportovanje u citoplazmu radi ubikvitinske degradacije. Takav divlji tip p53 proteina (tzv. metastabilni p53), inaktivisan i akumuliran u jedru ćelije, ne može da se detektuje raspoloživim imunohistohemijskim metodama (p53-; HPV16+). Stoga, inaktivacija TP53 gena dovodi do povećane proliferacije i preživljavanja ćelija sa oštećenom DNK. Međutim, sam gubitak p53 funkcije nije dovoljan za malignu transformaciju ćelije već i druge citogenetske alteracije koje uzrokuje E6 onkoprotein, kao što su degradacija PDZ-domena epitelnih ćelija (lokalizovanog u zoni međućelijskih kontakata) ili aktivacija enzima telomeraze (koji sprečava skraćenje telomera hromozoma u procesu ćelijske diobe, dovodeći do preživljavanja HPV inficiranih ćelija)¹⁹¹. Na

ovaj način, poremećaji u organizaciji, diferencijaciji i hromozomskom integritetu HPV inficiranih keratinocita indukuju epitelnu hiperplaziju¹⁹².

Za razliku od E6, koji svoju ulogu ostvaruje preko TP53 gena, E7 onkoprotein kancerogenih tipova HPV inaktivira Rb tumor-supresor gen i Rb familiju proteina, što dovodi do povećane ekspresije E2F transkripcionog faktora, sa sledećim porastom ćelijske proliferacije. Takođe, E7 može da interaguje i sa drugim faktorima koji kontrolišu ćelijski ciklus kao što su: AP-1 transkripcioni kompleks, CDK inhibitori, p21 i p27. Takođe, E7, preko MHC molekula - glavnog histokompatibilnog kompleksa, dovodi do depresije celularnog imunskog odgovora i, samim tim, perzistiranja HPV u inficiranim ćelijama¹⁹¹. Pored ovih, genetskih, i akumulacija epigenetskih promjena kod HPV+ kancerogeneze (npr. hipermetilacija promotora tumor supresor gena) može uzrokovati malignu transformaciju¹⁹³.

Međutim, HPV+ karcinomi ne posjeduju uvijek eksprimiran E6/E7 gen, tako da svaka virusna infekcija ne mora da ima za posledicu uključivanje HPV genoma u patogenezu karcinoma glave i vrata¹⁹⁰.

HPV- mehanizam kancerogeneze se aktivira kao posledica izlaganja hemijskim kancerogenima, što za posledicu ima povećanu frekvenciju mutacija, kako u onkogenima tako i u tumor supresornim genima^{194,195}.

Različiti HPV+ u odnosu na HPV- mehanizam kancerogeneze, uslovljava i različite molekularno-genetičke karakteristike ovih karcinoma. HPV- karcinomi usne duplje i orofarinksa¹⁹⁰ često pokazuju mutacije TP53 gena, gubitak heterozigotnosti na lokusima 3p, 9p i 17p, normalan ili povećan nivo Rb proteina i snižene nivoe p16^{INK4A}. Suprotno tome, HPV+ tumori orofarinksa imaju nemutirani TP53 gen, snižen nivo Rb proteina, povećanu ekspresiju p16^{INK4A}. Na molekularnom nivou, HPV+ karcinomi orofarinksa pokazuju aktivnu transkripcionu ekspresiju E6/E7 mRNA i visok titar virusne DNK, što nije karakteristika HPV+ karcinoma usne duplje¹⁹⁰. Ovako različit molekularni profil karcinoma orofarinksa u odnosu na karcinome usne duplje dovodi do zaključka da HPV infekcija ima limitiran biološki značaj u procesu epitelne neoplastične proliferacije u procesu oralne kancerogeneze¹⁹⁰. Ovakav zaključak potvrđuje i meta analiza podataka iz 17 studija, koja je pokazala značajnu uzročnu vezu između HPV16 i karcinoma orofarinksa, ali samo neznatnu u slučaju OSCC¹⁹⁶.

Ovakav stav potvrđuje i ova studija na uzorku oralnih skvamocelularnih karcinoma usne, jezika i/ili poda usta. Naime, pokušavajući da, u granicama ovog istraživačkog projekta, utvrdimo značaj prisutne HPV16 infekcije u složenom procesu kancerogeneze, analizirali smo i uporedili ekspresije proapoptotskih (p53) i antiapoptotskih onkoproteina (survivin) između grupa HPV16+ i HPV16- pacijenata. Dobijeni podaci ukazuju da prisustvo/odsustvo HPV16 infekcije može dovesti do povećane ili smanjene imunohistohemijske ekspresije p53 proteina, dok je ekspresija antiapoptotskog onkoproteina-survivina u oba slučaja ili povećana ili smanjena. Drugim riječima, statistički značajna razlika između HPV16+ i HPV16- pacijenata je dokazana samo u slučajevima odsustva ekspresije p53 proteina. Ovakav odnos proapoptotskih i antiapoptotskih onkoproteina u analiziranom uzorku OSCC govori u prilog ***dominantno HPV16 nezavisnog mehanizma oralne kancerogeneze tako da izgleda da HPV16 infekcija ima indirektan uticaj na oralnu kancerogenezu.***

HPV16 zavisni mehanizam oralne kancerogeneze je detektovan, ali u znatno manjem procentu slučajeva.

O prognostičkom značaju HPV infekcije u karcinomima glave i vrata mišljenja su različita, zavisno od lokalizacije tumora. Pojedini autori⁸⁶ smatraju da je HPV16 infekcija kod OSCC prediktor pojave udaljenih metastaza i lošije prognoze, bez obzira na primijenjeni

terapijski protokol. Ovi autori su pokazali da se kod pacijenata sa OSCC stadijuma III i IV, kod kojih je detektovana samo HPV16 infekcija (bez infekcije HPV18 ili drugim tipovima HPV), tri puta češće razvijaju udaljene metastaze. Takođe, pacijenti sa HPV16 infekcijom su imali značajno kraće vrijednosti DSS (disease specific survival) i OS (overall survival), ali ne i vrijednosti DFS (disease free survival) u odnosu na HPV16- pacijente. Po ovim rezultatima, solitarna HPV-16 infekcija je nezavisni faktor u predikciji pojave udaljenih metastaza u petogodišnjem periodu⁸⁶. Nasuprot ovim rezultatima, drugi autori^{197,198,199} su pokazali pozitivan uticaj HPV infekcije na vrijednosti DSS i OS.

Ovakve razlike u procjeni prognostičkog značaja HPV infekcije u OSCC mogu se objasniti time da neke studije imaju niske vrijednosti detektovane HPV infekcije (ispod 10%), mali uzorak ispitanika ili pak, uključuju pacijente sa karcinomima različitih regija (npr. usna duplja i orofarinks)^{200,201,202}. Iz tog razloga, različiti modaliteti liječenja koji se primjenjuju (hirurška terapija, radioterapija ili hemioterapija) neminovno uzrokuju različite stope preživljavanja. Drugo moguće objašnjenje za ovakve diskrepance u rezultatima može se naći u činjenici da ispitivani pacijenti potiču iz različitih regiona i da su izloženi različitim kancerogenima, imaju različite norme (seksualnog) ponašanja, kao i različitu genetsku predispoziciju²⁰³.

Imajući u vidu sve navedeno, nameće se pitanje mogućih mehanizama kojima HPV-16 infekcija doprinosi negativnom ishodu bolesti. Stoga, u budućim istraživanjima postoji potreba, između ostalog, ispitivanja i E6/E7 genske ekspresije.

U ovom istraživanju nismo našli statistički značajnu razliku u dužini vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti kod pacijenata kod kojih je detektovano prisustvo HPV16 infekcije u odnosu na pacijente koji su bili HPV16 negativni. Međutim, vremenski interval bez ponovnog javljanja bolesti bio je značajno kraći kod pacijenata ženskog pola kod kojih je detektovano prisustvo HPV16 infekcije u odnosu na pacijente muškog pola koji su bili HPV16 pozitivni. Objašnjenje za ovakve rezultate možemo potražiti u dobijenim vrijednostima ostalih ispitivanih histopatoloških i genetičkih parametara. Naime, u ovoj studiji je pokazano da su žene dominantni nosioci GG genotipa na poziciji -31 gena za survivin, a takođe, postoji trend većih vrijednosti ekspresije survivina kod nosilaca GG genotipa u odnosu na nosioce CG genotipa na poziciji -31 gena za survivin. Ove činjenice nas indirektno dovode do zaključka da je upravo povećana ekspresija survivina u tkivu OSCC faktor koji doprinosi kraćem trajanju perioda bez bolesti kod HPV16+ osoba ženskog pola.

S obzirom na literaturne podatke^{149,150} o odgovornosti citoplazmatskog survivina za preživljavanje ćelija tumora, odnosno o njegovom funkcionisanju kao inhibitora apoptoze (dok survivin lokalizovan u jedru tumorskih ćelija doprinosi njihovoj proliferaciji), možemo zaključiti da svojim antiapoptotskim djelovanjem survivin doprinosi kraćem periodu bez bolesti. Pošto prisutni HPV16 (u ovoj studiji značajno češći kod pacijenata ženskog pola) inhibira apoptotsku funkciju TP53, očigledno je da postoji sinergističko djelovanje survivina i HPV16, čime se potencira njihov negativni prognostički značaj kod OSCC (u pogledu dužine perioda od završetka liječenja do ponovne pojave bolesti).

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata sprovedenih istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Imunohistohemijska ekspresija p53 proteina i survivina u tkivu OSCC korelira sa veličinom tumora (T), bez obzira na ostale njegove kliničke i histopatološke karakteristike;
2. U tkivu OSCC postoji povezanost između nivoa ekspresije p53 i survivina i ta povezanost pokazuje statističku značajnost;
3. Nema razlika u distribuciji pojedinih genotipova polimorfizama -31C/G gena za survivin i PIN3 Ins16bp TP53 gena kod pacijenata sa OSCC i zdravih pojedinaca, kao ni u frekvenciji pojedinačnih alela ovih polimorfizama;
4. Polimorfizam pojedinačnog nukleotida u genu za survivin i insercioni polimorfizam u TP53 genu ne predstavljaju faktore rizika za nastanak OSCC;
5. Utvrđeno je da HPV16 infekcija ne predstavlja dodatni faktor rizika za nastanak OSCC kod nosilaca CG i GG genotipa na poziciji -31 gena za survivin;
6. Utvrđena je statistički značajna povezanost genotipa na poziciji -31 gena za survivin i pola, tako da su pacijenti ženskog pola dominantni nosioci GG genotipa;
7. Uočeno je da je imunohistohemijska ekspresija p53 proteina u tkivu OSCC vjerovatno povezana sa TP53 genotipom, tako da nosioci A1A2 genotipa imaju najviše nivoe ekspresije p53 proteina
8. Utvrđena je povezanost TP53 genotipa i stadijuma bolesti, pri čemu je A2A2 genotip statistički značajno češći kod pacijenata u višim stadijumima bolesti (III i IV);
9. HPV-16 infekcija je statistički značajno češća kod osoba ženskog pola;
10. Učestalost HPV-16 infekcije u analiziranoj grupi pacijenata je 23,3%. Da li je ova incidenca HPV-16 infekcije karakteristična za našu populaciju pokazaće dalje studije, na većem broju pacijenata;

11. Nije utvrđen statistički značajan uticaj HPV16 infekcije na pojavu lokalnog i regionalnog recidiva OSCC, kao ni na dužinu vremenskog intervala bez ponovne pojave bolesti (DFI);
12. Interval bez ponovnog javljanja bolesti (DFI) statistički je značajno kraći kod HPV16 pozitivnih pacijenata ženskog pola u odnosu na HPV16 pozitivne pacijente muškog pola.

Generalni zaključak je da rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da:

- a) U analiziranom uzorku OSCC **dominiraju HPV16 nezavisni mehanizmi onkogeneze p53+; survivin+/-; HPV16+ i p53+; survivin+/-; HPV16-** ;
- b) U manjem procentu analiziranih uzoraka dokazano je i prisustvo HPV16 zavisnog mehanizma onkogeneze (HPV16+; P53-; survivin+/-), kao i mehanizam onkogeneze koji je posledica prisustva drugih mutacionih događaja (HPV16-; P53-; survivin+/-).

8. LITERATURA

1. Fonseca RJ. Oral and Maxillofacial surgery. Surgical pathology. 2001; Vol.52-62.
2. Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, et al. Presentation, treatment and outcome of oral cavity cancer: a national cancer data base report. *Head Neck* 2002; 24:165-80.
3. Jatin P. Shah et al. Atlas of Clinical Oncology, Cancer of Head and Neck, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York; 2001: p.102.
4. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49:33-64.
5. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51:15-36.
6. Golubović M, Antunović M. Maligni epitelni tumori oralne sluzokože u Crnoj Gori. Projekat Ministarstva prosvjete i nauke Crne Gore br. 52, 2008.
7. Vermorken JB. Adjuvant chemotherapy for advance squamous cell carcinoma of the head and neck. In Snow GB, Clark JR (eds): Multimodality therapy for head and neck cancer. New York: Georg Thieme Verlag. 2002: pp.112-26.
8. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988; 48:3282-7.
9. Davidson BJ, Hsu TC, Schantz SP. The genetics of tobacco-induced malignancy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119(11):1198-205.
10. Steinberg BM. Viral etiology of head and neck cancer. In: Harrison LB, Sessions RB, Hong WK, editors. Head and neck cancer: a multidisciplinary approach. Philadelphia (PA): Lippincott-Raven; 1999, p. 35-47.
11. Maier H, Zoller J, Herrmann A, et al. Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 108:655-61.
12. Velly AM, Franco EL, Schlecht N, et al. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 1998; 34:284-91.
13. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50(1):7-33.
14. Sobin LH, Wittekind C (2002). TNM: Classification of Malignant Tumours. 6th ed. John Wiley & Sons: New York.
15. Mc Gregor I.A., McGregor F.M., Cancer of the face and mounth. Pathology and management for surgeons, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1986, p. 470-493.
16. Moore C, Catlin D. Anatomic origins and locations of oral cancer. *Am J Surg* 1967; 114: 510-513.
17. Bartek J, Lukas J, Bartkova J. Perspective: defects in cell cycle control and cancer. *J Pathol* 1999; 187(1):95-9.
18. Hartig G, Zhang J, Voytovich GM, Newton M, Chen A, Collins SP, Wu SQ. Fluorescent in situ hybridizatton evaluation of p53 gene deletions at a tumor interface of lingual carcinoma. *Laryngoscope* 2000; 110:1474-8.

19. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407(6805):796-801.
20. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22(8): 299-306.
21. Mitrović Z. Utjecaj genetskih polimorfizama FcyRIIIa i FcyRIIa receptora te izražaja survivina i kaspaze-3 na prognozu bolesnika s difuznim B-velikostaničnim limfomom liječenih kombinacijom rituksimaba i kemoterapije po shemi CHOP. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2009.
22. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 2004; 64:7183-7190.
23. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
24. Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, Lee J, Nomoto K, Schrantz N, Deveraux QL, Ulevitch RJ. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/ JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol* 2002; 22(6):1754-1766.
25. Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC. Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol* 1999; 19:388-398.
26. Bergh J, Norberg T, Sjögren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med.* 1995; 1(10):1029-34.
27. Chen PL, Chen YM, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990; 250(4987):1576-80.
28. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88(3):323-31.
29. Ullrich SJ, Anderson CW, Mercer WE, Appella E. The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J Biol Chem* 1992; 267:15259-15262.
30. Robbins R, Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Pathologic Basis of Disease*, ed. 6th W.B. Saunders Company Philadelphia, p. 290-292, 1999.
31. Prokocimer M, Rotter V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projections on the hematologic cell lineages. *Blood* 1994; 84:2391-2411.
32. Brajušković G. Indukcija apoptoze hemioterapijom u hematološkim neoplazmama. Magistarski rad, Biološki fakultet, Beograd, 1997.
33. Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W, Große F. P53 protein exhibits 3'-to 5' exonuclease activity. *Cell* 1996; 85:1089-1099.
34. AJ Levine, ME Perry, A Chang, A. Silver, D Dittmer, M Wu, D Welsh. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994; 69(3): 409-416
35. Kanavaros P, Stefanaki K, Valassiadou K, et al. Expression of p53, p21/waf, bcl-2, bax, Rb and Ki67 proteins in colorectal adenocarcinoma. *Medical Oncology* 1999; 16(1):23-30.
36. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 cyclin dependent kinase inhibitor directly controls DNA replication via interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369:574-578.
37. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70:523-526.
38. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998; 12:2973-2983.
39. Save V, Nylander K, Hall PA. Why is p53 protein stabilized in neoplasia? Some answers but many more questions! *J Pathol* 1998; 184:348-350.

40. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332: 712-717.
41. Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88(2):174-86.
42. Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, Schmitt F. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer* 2008; 8:32.
43. Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutierrez-Enriquez S et al. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene*. 2004; 23(10):1954-1956.
44. Hu Z, Li X, Qu X, He Y, Ring BZ, Song E, Su L. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of TP53 contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2010; 31(4):643-7.
45. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396(6711):580-4.
46. Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18:609-15.
47. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappaB. *Trends Cell Biol* 1998; 8:107-111.
48. Vaira V, Lee CW, Goel HL, Bosari S, Languino LR, Altieri DC. Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene* 2007; 26(19):2678-84.
49. Sommer KW, Schamberger CJ, Schmidt GE, Sasgary S, Cerni C. Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras. *Oncogene* 2003; 22:4266-4280.
50. Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood* 2003; 101:1535-1542.
51. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002; 277(5):3247-57.
52. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002; 21(17):2613-22.
53. Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000, 31(5):1080-5.
54. Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito KM, Sato S, Yajima A. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:529-534.
55. Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, Shroyer KR. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol* 2001; 32(1):119-25.
56. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:46-54.

57. Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A. High expression of survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000; 19:617-623.
58. Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T. DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett* 2001; 169:155-164.
59. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; 22:8581-8589.
60. Engels K, Knauer SK, Metzler D, Simf C, Struschka O, Bier C, Mann W, Kovács AF, Stauber RH. Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. *J Pathol* 2007; 211(5):532-40.
61. Saito T, Arifin MT, Hama S, Kajiwara Y, Sugiyama K, Yamasaki F, Hidaka T, Arita K, Kurisu K. Survivin subcellular localization in high-grade astrocytomas: simultaneous expression in both nucleus and cytoplasm is negative prognostic marker. *J Neurooncol* 2007; 82(2):193-8.
62. Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001; 91(11):2026-2032.
63. Lodi G, Franchini R, Bez C, Sardella A, Moneghini L, Pellegrini C et al. Detection of survivin mRNA in healthy oral mucosa, oral leucoplakia and oral cancer. *Oral Dis* 2010; 16(1):61-7.
64. Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Rubini C, Mariggio MA et al. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89(12):2244-2248.
65. Kumamoto H, Ooya K. Expression of survivin and X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in ameloblastomas. *Virchows Arch* 2004; 444(2):164-170.
66. de Oliveira MG, Lauxen Ida S, Chaves AC, Rados PV, Sant'ana Filho M. Odontogenic epithelium: Immunolabeling of Ki-67, EGFR and survivin in pericoronal follicles, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Head Neck Pathol* 2011; 5(1):1-7.
67. Andric M, Dozic B, Popovic B, Stefanovic D, Basta-Jovanovic G, Djogo N, Andjus P, Milasin J. Survivin expression in odontogenic keratocysts and correlation with cytomegalovirus infection. *Oral Dis*. 2010; 16(2):156-159.
68. Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, Bennett CF, Pober JS, Sessa WC, Altieri DC. Suppression of vascular endothelial growth factor mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am J Pathol* 2001; 158(5):1757-65.
69. Wagner M, Schmelz K, Dorken B, Tamm I. Epigenetic and genetic analysis of the survivin promoter in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2008; 32:1054-1060.
70. Xu Y, Fang F, Ludewig G, Jones G, Jones D. A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA Cell Biol* 2004; 23:527-537.
71. Cheng ZJ, Hu LH, Huang SJ. Correlation of -31G/C polymorphisms of survivin promoter to tumorigenesis of gastric carcinoma. *Ai Zheng* 2008; 27:258-263.

72. Gazouli M, Tzanakis N, Rallis G, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Kostakis A, Anagnostou NP, Nikiteas N. Survivin -31G/C promoter polymorphism and sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24(2):145-50.
73. Jang JS, Kim KM, Kang KH, Choi JE, Lee WK, Kim CH, Kang YM, Kam S, Kim IS, Jun JE, Jung TH, Park JY. Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 60(1):31-9.
74. Yang X, Xiong G, Chen X, Xu X, Wang K, Fu Y, Yang K, Bai Y. Survivin expression in esophageal cancer: correlation with p53 mutations and promoter polymorphism. *Dis Esophagus* 2009; 22:223-230.
75. Upadhyay R, Khurana R, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. Role of survivin gene promoter polymorphism (-31G>C) in susceptibility and survival of esophageal cancer in Northern India. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(3):880-887.
76. Pillai MR, Nair MK. Development of a condemned mucosa syndrome and pathogenesis of human papillomavirus-associated upper aerodigestive tract and uterine cervical tumors. *Exp Mol Pathol* 2000; 69(3):233-41.
77. Pillai MR, Phanidhara A, Kesari L, Nair P, Nair MK. Cellular manifestation of human papilloma infection in the oral mucosa. *J Surg Oncol* 1999; 71:10-15.
78. Massimi P, Pim D, Bertoli C, Bouvard V, Banks L. Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* 1999; 18(54):7748-54.
79. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248:76-79.
80. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
81. Shima K, Kobayashi I, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, et al. Incidence of human papillomavirus 16 and 18 infection and p53 mutation in patients with oral squamous cell carcinoma in Japan. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 38:445-50.
82. Uobe K, Masuno K, Fang YR, et al. Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR. *Oral Oncol*, 2001; 37:146-152.
83. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res*, 2009; 88:300-306.
84. El-Mofty SK. Human papillomavirus (HPV) related carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Head and Neck Pathol* 2007; 1:181-185.
85. Hong AM, Dobbins TA, Lee CS, Jones D, Harnett GB, Armstrong BK, Clark JR, Milross CG, Kim J, O'Brien CJ, Rose BR. Human papillomavirus predicts outcome in oropharyngeal cancer in patients treated primarily with surgery or radiation therapy. *Br J Cancer* 2010; 103(10):1510-1517.
86. Lee LA, Huang CG, Liao CT, Lee LY, Hsueh C. et al. Human papillomavirus-16 infection in advanced oral cavity cancer patients is related to an increased risk of distant metastases and poor survival. *PLoS ONE* 2012; 7(7):e40767. doi:10.1371/journal.pone.004076
87. Warnakulasuriya S, Soussi T, Maher R, Johnson N, Tavassoli M. Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients. *J Pathol* 2000; 192(1):52-7.

88. Shah JP, Shemen LJ, Strong EW. Buccal mucosa, alveolus, retromolar trigone, floor of the mouth, hard palate, and tongue tumors. In : Thawley SE, Panje WR, Batsakis JG, Lindberg RD, (editors): Comprehensive management of head and neck tumors. WB Saunders Company, p. 551-563, 1987.
89. Calais G, Alfonsi M, Bardet E, et al. Randomised trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:2081-6.
90. Jin YT, Kayser S, Kemp BL, Ordonez NG, Tucker SL, Clayman GL, Goepfert H, Luna MA, Batsakis JG, El-Naggar AK: The prognostic significance of the biomarkers p21^{WAF1/CIP1}, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1998; 82(11):2159-2165.
91. Shin DM, Mao L, Papadimitrakopoulou VM, Clayman G, El-Naggar A, Shin HJ, Lee JJ, Lee JS, Gillenwater A, Myers J, Lippman SM, Hittelman WN, Hong WK: Biochemopreventive therapy for patients with premalignant lesions of the head and neck and p53 gene expression. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:69-73.
92. Georgiou A, Gomatos IP, Ferekidis E, Syrigos K, Bistola V, Giotakis J, Adamopoulos G, Androulakis G: Prognostic significance of p53, bax and bcl-2 gene expression in patients with laryngeal carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27(6):574-80.
93. Gonzalez-Moles MA, Galindo P, Gutierrez-Fernandez J, Sanchez-Fernandez E, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Bravo M. P53 protein expression in oral squamous cell carcinoma - survival analysis. *Anticancer Res* 2001; 21:2889-2894.
94. Jeannon JP, Soames J, Lunec J, Awwad S, Ashton V, Wilson JA: Expression of cyclin – dependent kinase inhibitor p21 (WAF1) and p53 tumour suppressor gene in laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2000 Feb;25(1):23-7. Erratum in: *Clin Otolaryngol* 2000 Oct;25(5):431.
95. Osaki T, Kimura T, Tatemoto Y, Dapeng L, Yoneda K, Yamamoto T. Diffuse mode of tumor cell invasion and expression of mutant p53 protein but not of p21 protein are correlated with treatment failure in oral carcinomas and their metastatic foci. *Oncology* 2000; 59(1):36-43.
96. Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Pezzetti F, Stabellini G, Laino G et al. Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett* 2005; 225(1):27-33.
97. Preuss SF, Weinell A, Molitor M, Semrau R, Stenner M, Drebber U et al. Survivin and epidermal growth factor receptor expression in surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 2008; 30(10):1318-1324.
98. Végran F, Boidot R, Oudin C, Defrain C, Rebucci M, Lizard-Nacol S. Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. *Oncogene* 2007; 26(2):290-7.
99. Antonacopoulou AG, Floratou K, Bravou V, Kottorou A, Dimitrakopoulos FI, Marousi S et al. The survivin -31 snp in human colorectal cancer correlates with survivin splice variant expression and improved overall survival. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2010; 33(5):177-89.
100. Forastiere AA. Head and Neck. *Curr Opin Oncol* 1995; 7:227-228.

101. Lavieille JP, Righini C, Reyt E, Brambilla C, Riva C. Implications of p53 alterations and anti-p53 antibody response in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1998; 34(2):84-92.
102. Stoll C, Baretton G, Lohrs U. The influence of p53 and associated factors on outcome of patients with oral squamous cell carcinoma. *Virch Arch* 1998; 433:427-433.
103. Busquets JM, García HA, Trinidad-Pinedo J, Baez A. Clinicopathologic characteristics of head and neck squamous cell carcinoma in Puerto Ricans. *PR Health Sci J*. 2003; 22(3):259-64.
104. Andisheh-Tadbir A, Mehrabani D, Heydari ST. Epidemiology of squamous cell carcinoma of the oral cavity in Iran. *J Craniofac Surg*. 2008; 19(6):1699-702.
105. Ariyoshi Y, Shimahara M, Omura K, Yamamoto E, Mizuki H, Chiba H, et al. Epidemiological study of malignant tumors in the oral and maxillofacial region: survey of member institutions of the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. *Int J Clin Oncol*. 2008 Jun; 13(3):220-8.
106. Effiom OA, Adeyemo WL, Omitola OG, Ajayi OF, Emmanuel MM, Gbotolorun OM. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathologic review of 233 cases in Lagos, Nigeria. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Aug; 66(8):1595-9.
107. Durazzo MD, de Araujo CE, Brandão Neto Jde S, Potenza Ade S, Takeda F et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. *Clinics (Sao Paulo)*. 2005 Aug; 60(4):293-8.
108. Gervásio OL, Dutra RA, Tartaglia SM, Vasconcellos WA, Barbosa AA, Aguiar MC. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. *Braz Dent J*. 2001; 12(1):57-61.
109. Rivera H, Nikitakis NG, Correnti M, Maissi S, Ponce JG. Oral and oropharyngeal cancer in a Venezuelan population. *Acta Odontol Latinoam*. 2008; 21(2):175-80.
110. Petrovic M, Jelovac D. The frequency and outcome of lip cancer in Serbian population. *Balkan Journal of stomatology* 2008; 12:34-37.
111. M. Vukadinovic, Z. Jezdic, M. Petrovic, L. Medenica, M. Lens. Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: analysis of a 10-year experience in 223 patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2007; 65(4):675-79.
112. Golubović M, Ašanin B, Jelovac D, Petrovic M, Antunović M. Odnos progresije bolesti i histopatoloških osobina karcinoma usne. *Vojnosanitetski pregled* 2010; 67(1):19-24.
113. Kozomara R. Importance of p53 antioncogene and human papilloma virus for radioresistance of oral squamous cell carcinoma of tongue and floor of the mouth [PhD Thesis]. Belgrade: Military Medical Academy 2003. (in Serbian).
114. Homma A, Furuta Y, Oridate N, et al. Prognostic significance of clinical parameters and biological markers in patients with squamous cell carcinoma of head and neck

- treated with concurrent chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 1999; 5:801-806.
115. Ibrahim SO, Lillehaug JR, Johannessen AC, et al. Expression of biomarkers in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncology* 1999; 35:302-313.
 116. Muzio LL, Mignogna MD, Pannone G, Rubini C, Geassi R, Nocini PF, Ferrari F, Serpico R, Favia G, Rosa GD, Maiorano E. Expression of bcl-2 in oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study of 90 cases with clinico-pathological correlations. *Oncol Rep* 2003; 10(2):285-91.
 117. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG et al. American Joint Committee on Cancer. *Cancer Staging Manual*. Springer: New York, 2002.
 118. McKenna RJ, Murphy GP (editors) *Cancer surgery*. Philadelphia, Lippincott. 1994; 515-26.
 119. Juan Carlos de Vicente, Luis Manuel Junquera Gutierrez, et al. Prognostic significance of p53 expression in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. *Head & Neck* 2003; 26(1):22-30.
 120. Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol* 1999; 35(6):583-9.
 121. Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head & Neck* 2001; 23(2):147-9.
 122. Lavielle JP, Brambilla E, Riva-Lavielle C, et al. Immunohistochemical detection of p53 protein in preneoplastic lesions and squamous cell carcinoma of head and neck. *Acta Otolaryngol* 1995; 115:334-339.
 123. Ahomadegbe JC, Barrois M, Fogel S, et al. High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. *Oncogene* 1995; 10(6):1217-27.
 124. Nishioka H, Hiasa Y, Hayashi I, et al. Immunohistochemical detection of p53 oncoprotein in human oral squamous cell carcinomas and leukoplakias: comparison with proliferating cell nuclear antigen staining and correlation with clinicopathological findings. *Oncology* 1993; 50(6):426-429.
 125. Shintani S, Yoshihama Y, Emilio AR et al. Overexpression of p53 is an early event in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 1995; 15:305-308.
 126. Shahnava SA, Regezi JA, Bradley G, Dube ID, Jordan RC. p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *J Pathol* 2000; 190(4):417-22.
 127. Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Zhao M, Sato S, Takekoshi T, et al. Reduced expression of p27 (Kip1) correlates with an early stage of cancer invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2000; 151(2):217-22.
 128. Li YQ, Pavelic ZP, Wang LJ, McDonald JS, Gleich L, Munck-Wikland E, et al. Altered p53 in microdissected, metachronous, premalignant and malignant oral lesions from the same

- patients. *Clin Mol Pathol* 1995; 48(5):M269-72.
129. Nylander K, Stenling R, Gustafsson H, et al. P53 expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer* 1995; 75:87-93.
 130. Leedy DA, Trune DR, Kronz JD et al. Tumor angiogenesis, p53 antigen and cervical metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111(4):417-22.
 131. Bernier J, Domenge C, Ozsahin, M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 2004;350:1945–52.
 132. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, et al. Precisely defining high-risk operable head and neck tumors based on RTOG #85-03 and #88-24: targets for postoperative radiochemiotherapy? *Head Neck* 1998; 20:588-94.
 133. Yao L, Iwai M, Furuta I. Correlations of bcl-2 and p53 expression with the Clinicopathological features in tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999; 35(1):56-62.
 134. Yuen PW, Chow V, Choy J, Lam KY, Ho WK, Wei WI. The clinicopathological significance of p53 and p21 expression in the surgical management of lingual squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2001; 116(2):240-5.
 135. Unal OF, Ayhan A, Hosal AC. Prognostic value of p53 expression and histopathological parameters in squamous cell carcinoma of oral tongue. *J Laryngol Otol* 1999; 113:446-50.
 136. Feinmesser R, Freeman JL, Feinmesser M, Noyek A, Mullen JB. Role of modern imaging in decision-making for elective neck dissection. *Head Neck* 1992; 14(3):173-6.
 137. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, Goodman SN, Sidransky D. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332:429-35.
 138. Partridge M, Li SR, Pateromichelakis S, Francis R, Phillips E, uang XH, Tesfa-Selase F, Langdon JD: Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. *Clinical Cancer Res* 2000; 6(7):2718-25.
 139. Fukano H, Matsuura H, Hasegawa Y, Nakamura S. Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Head Neck* 1997; 19(3):205–10.
 140. Boyle JO, Hakim J, Koch W et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53:4477–80.
 141. Maestro R, Dolcetti R, Gasparotto D, et al. High frequency of p53 gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene* 1992; 7(6):1159-66.
 142. Temam S, Flahault A, Perie S, Monceaux G, Coulet F, Callard P, Bernaudin JF, St Guily JL, Fouret P: p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol* 2000; 18(2):385-94.

143. Blons H, Laurent-Puig P: TP53 and head and neck neoplasms. *Hum Mutat* 2003; 21(3):252-257.
144. Castelli M, Cinafriglia F, Manieri A, Palma L, Pezzuto RW, Falasca G, et al. Anti-p53 anti-heat shock protein antibodies in patients with malignant or pre-neoplastic lesions of the oral cavity. *Anticancer Res* 2001; 21:753-8.
145. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3(8):917-21.
146. Fukuda S, Pelus LM. Regulation of the inhibitor of apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood* 2001; 98(7):2091-100.
147. Uren AG, Wong L, Pakusch M, Fowler KJ, Burrows FJ, Vaux DL, Choo KH. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* 2000; 10(21):1319-28.
148. Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene survivin and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998; 351(9106):882-3.
149. Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett* 2007; 249(1):49-60.
150. Ko YH, Roh SY, Won HS, Jeon EK, Hong SH, Lee MA et al. Prognostic significance of nuclear survivin expression in resected adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck Oncol* 2010; 2:30.
151. Halasova E, Adamkov M, Kavcová E, Matáková T, Musák L, Vyubohová M, Mistuna D, Singliar A. Expression of anti-apoptotic protein survivin and tumor suppressor p53 protein in patients with pulmonary carcinoma. *Eur J Med Res* 2009; 14(4):97-100.
152. Monzó M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sánchez JJ, Maestre J, Martín C, Font A, Barnadas A, Abad A. A novel antiapoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999; 17(7):2100-4.
153. Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand and its receptor expression and the pathway of apoptosis in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2001; 23:251-8.
154. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58(22):5071-4.
155. Kappler M, Bache M, Bartel F, Kotzsch M, Panian M, Würfl P, Blümke K, Schmidt H, Meye A, Taubert H. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53. *Cancer Gene Ther* 2004; 11(3):186-93.
156. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999; 113(6):1076-81.
157. Stenner M, Weinell A, Ponert T, Hardt A, Hahn M, Preuss SF et al. Cytoplasmic expression of survivin is an independent predictor of poor prognosis in patients with salivary gland cancer. *Histopathology*. 2010; 57:699-706.

158. Qi G, Tuncel H, Aoki E, Tanaka S, Oka S, Kaneko I et al. Intracellular localization of survivin determines biological behavior in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2009; 22(3):557-62.
159. Wang Zhanxiang, Fukuda Seiji, Pelus M Louis. Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. *Oncogene* 2004; 23:8146-8153.
160. Deepak Raj, Tong Liu, George Samadashwily, Fengzhi Li, Douglas Grossman. Survivin repression by p53, Rb and E2F2 in normal human melanocytes. *Carcinogenesis* 2008; 29(1):194-201.
161. Muxiang Zhou, Lubing Gu, Fengzhi Li, Yerun Zhu, William G. Woods, Harry W. Findley. DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 303:124-131.
162. Wagner M, Schmelz K, Dorken B, Tamm I. Epigenetic and genetic analysis of the surviving promoter in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2008; 32(7):1054-60.
163. O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, Altieri DC. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2(1):43-54.
164. Andrić M. Proapoptotski i antiapoptotski mehanizmi u patogenezi keratocističnih odontogenih tumora. Doktorska disertacija. Stomatološki fakultet, Beograd; 2011.
165. Borges Bdo N, Burbano RR, Harada ML. Survivin -31C/G polymorphism and gastric cancer risk in a Brazilian population. *Clin Exp Med* 2011; 11(3):189-193.
166. Yang L, Zhu H, Zhou B, Gu H, Yan H, Tang N, Dong H, Sun Q, Cong R, Chen G, Wang B. The association between the survivin C-31G polymorphism and gastric cancer risk in a Chinese population. *Dig Dis Sci* 2009; 54(5):1021-8.
167. Yang X, Xiong G, Chen X, Xu X, Wang K, Fu Y, Yang K, Bai Y. Polymorphisms of survivin promoter are associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135(10):1341-9.
168. Bayram S, Akkiz H, Bekar A, Akgolly E. The association between the survivin -31G/C promoter polymorphism and hepatocellular carcinoma risk in a Turkish population. *Cancer Epidemiol.* 2011; 35(6):555-9.
169. Borbely AA, Murvai M, Szarka K, Konya J, Gergely L, Hernadi Z et al. Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 2007; 60(3):303-6.
170. Srivastava K, Srivastava A, Mittal B. Survivin promoter -31G/C (rs9904341) polymorphism and cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39(2):1509-16.
171. Hu Z, Li X, Qu X, He Y, Ring BZ, Song E, Su L. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of TP53 contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis. *Carcinogenesis.* 2010; 31(4):643-647.
172. Nagler RM, Kerner H, Laufer D, Ben-Eliezer S, Minkov I, Ben-Itzhak O. Squamous cell carcinoma of the tongue: the prevalence and prognostic roles of p53, Bcl-2, c-erbB2 and apoptotic rate as related to clinical and pathological characteristic in retrospective study. *Cancer Letters* 2002; 186(2):137-150.
173. Chaves A, Cherubini K, Herter N, Furian R, Santos D, Squier C, Domann F. Characterization of p53 gene mutation in Brazilian population with oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 2004; 24:295-303.
174. Schildt EB, Nylander K, Eriksson M, Hardell L, Magnusson A, Ross G. Expression of p53, PCNA, Ki-67 and bcl-2 in relation to risk factors in oral cancer a molecular epidemiological study. *Int J Oncol* 2003; 22(4):861-8.

175. Costa A, Marasca R, Valentinis B, Savarino M, Faranda A, Silvestrini R, Torelli G. p53 gene point mutations in relation to p53 nuclear protein accumulation in colorectal cancers. *J Pathol* 1995; 176(1):45-53.
176. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335(8691):675-9.
177. Neves Filho EH, Cordeiro DE, Vieira AP, Rabenhorst SH. TP53 codon 72 and intron 3 polymorphisms and mutational status in gastric cancer: an association with tumor onset and prognosis. *Pathobiology*. 2012;79(6):323-8. doi: 10.1159/000338436. Epub 2012 Jun 9
178. Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002; 8:3187-92.
179. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004; 108(5):766-72.
180. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsilla ring. *Cancer* 1997; 79:595-604.
181. Aimee R. Kreimer, Gary M. Clifford, Peter Boyle, Silvia Franceschi. Human papillomavirus types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14:467.
182. Popović B. Molekularno-genetička i imunohistohemijska analiza planocelularnog karcinoma usne regije. Doktorska disertacija, Stomatološki fakultet Beograd, 2007.
183. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as risk for oral squamous cell carcinoma: A meta analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 91(6):622-35.
184. Ostwald C, Muller P, Barten M et al. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *J Oral Pathol Med*. 1994; 23:220-5.
185. Aimee R. Kreimer, Alessandro Villa, Alan G. Nyitray, Martha Abrahamsen, et al. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011; 20(1):172-182.
186. Giovannelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, et al. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis*. 2002; 185(6):833-6.
187. Gypsyamber D'Souza, Amanda Dempsey. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev Med*. 2011; 53(1):S5-S11.
188. Rintala MA, Grenman SE, Jarvenkyla ME, et al. High-risk types of human papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV Family Study. *Clin Infect Dis*. 2005; 41:1728-1733.
189. Liviu Feller, Neil H Wood, Razia AG Khammissa, Johan Lemmer. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head & Face Medicine* 2010; 6:15.
190. Boudewijn JM Braakhuis, Peter JF Snijders, Keune WH, Meijer CL, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:998-1006.

191. Liviu Feller, Neil H Wood, Razia AG Khammissa, Johan Lemmer. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: Human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head & Face Medicine* 2010; 6:14.
192. Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE, Lambert PF. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol* 2003; 77:6957-64.
193. Palefsky J. Biology of HPV in HIV infection. *Adv Dent Res* 2006; 19:99-105.
194. Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A et al. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16^{INK4A} and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* 2003; 107(3):394-400.
195. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002; 21(10):1510-17.
196. Hobbs CG, Stern JA, Baily M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ: Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006; 31(4):259-66.
197. Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 125(1):1-9.
198. Sugiyama M, Bhawal UK, Kawamura M, Ishioka Y, Shigeishi H, et al. Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: clinical correlates and 5-year survival. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2007; 45(2):116-122.
199. Zhao D, Xu QG, Chen XM, Fan MW. Human papillomavirus as an independent predictor in oral squamous cell cancer. *Int J Oral Sci* 2009; 1(3):119-125.
200. Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, Högmö A, Björnestal L, et al. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 112(6):1015-1019.
201. Na II, Kang HJ, Cho SY, Koh JS, Lee JK, et al. EGFR mutations and human papillomavirus in squamous cell carcinoma of tongue and tonsil. *Eur J Cancer* 2007; 43(3):520-526.
202. Joo YH, Jung CK, Sun DI, Park JO, Cho KJ, et al. High-risk human papillomavirus and cervical lymph node metastasis in patients with oropharyngeal cancer. *Head Neck* 2012; 34(1):10-14.
203. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska, Kee F, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the international agency for research on cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(23):1772-1783.

9. PRILOG 1.

ISTRAŽIVAČKI KARTON

Broj protokola: _____

Evidencioni broj ispitanika: _____

Ime i prezime pacijenta: _____

Pol pacijenta: _____

Godina rođenja: _____

Klinička dijagnoza bolesti: _____

Lokalizacija promjene: _____

Datum intervencije: _____

Histopatološka dijagnoza bolesti: _____

pTNM klasifikacija: _____

Kontrolni pregledi:

Broj pregleda	Datum pregleda	<u>Klinički nalaz</u>	<u>Histopatološki nalaz</u>
		Recidiv (R+, R-) Metastaze (M+, M-)	Recidiv (R+, R-) Metastaze (M+, M-)
1.			
2.			

3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			
11.			

IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani/a Dr stom. Marija Antunović

Broj upisa 7/07

IZJAVLJUJEM

da je doktorska disertacija pod naslovom:

"Prognostički značaj korelacije p53, survivina i humanog papiloma virusa tip-16 (HPV-16)
kod oralnog karcinoma"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija ni u cjelini, ni u djelovima nije bila predložena za sticanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova i
- da nijesam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda



u Podgorici

03/12/2014

**IZJAVA O ISTOVJETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE
VERZIJE DOKTORSKE DISERTACIJE**

Ime i prezime autora **Dr stom. Marija Antunović**

Broj upisa **7/07**

Studijski program **Stomatologija**

Naslov disertacije

**"Prognostički značaj korelacije p53, survivina i humanog papiloma virusa tip-16 (HPV-16)
kod oralnog karcinoma"**

Mentor **Doc. dr Miroslav Andrić**

Potpisani/a **Dr stom. Marija Antunović**

Izjavljujem da je štampana verzija doktorske disertacije istovjetna elektronskoj verziji, koju sam predao/la radi pohranjivanja u **Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore**.

Istovremeno izjavljujem da dozvoljavam objavljivanje ličnih podataka u vezi sa sticanjem akademskog zvanja doktora nauka (ime i prezime, godina i mjesto rođenja, naslov disertacije i datum odbrane) na mrežnim stranicama i u publikacijama Univerziteta Crne Gore.

Potpis doktoranda



u Podgorici

03/12/2014

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u **Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore** unese doktorsku disertaciju pod naslovom

"Prognostički značaj korelacije p53, survivina i humanog papiloma virusa tip-16 (HPV-16) kod oralnog karcinoma"

koja je moj autorski rad.

Doktorska disertacija, pohranjena u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore, može se koristiti pod uslovima definisanim licencom Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučio/la¹.

Autorstvo

Autorstvo – bez prerada

Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

Autorstvo – nekomercijalno

Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada

Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda



u Podgorici

03/12/2014

¹ Odabrati (čekirati) jednu od šest ponuđenih licenci (kratak opis licenci dat je na poledini ovog priloga)

Autorstvo

Licenca sa najširim obimom prava korišćenja. Dozvoljavaju se prerade, umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio).

Djelo se može koristiti i u komercijalne svrhe.

Autorstvo – bez prerada

Dozvoljava se umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio). Djelo se ne može mijenjati, preoblikovati ili koristiti u drugom djelu.

Licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu djela.

Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

Dozvoljava se umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio). Ukoliko se djelo mijenja, preoblikuje ili koristi u drugom djelu, prerade se moraju distribuirati pod istom ili sličnom licencom.

Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu djela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.

Autorstvo – nekomercijalno

Dozvoljavaju se prerade, umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio).

Komercijalna upotreba djela nije dozvoljena.

Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada

Licenca kojom se u najvećoj mjeri ograničavaju prava korišćenja djela. Dozvoljava se umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio). Djelo se ne može mijenjati, preoblikovati ili koristiti u drugom djelu.

Komercijalna upotreba djela nije dozvoljena.

Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima

Dozvoljava se umnožavanje, distribucija, javno saopštavanje i prerada djela, pod uslovom da se navede ime izvornog autora (onako kako je izvorni autor ili davalac licence odredio). Ukoliko se djelo mijenja, preoblikuje ili koristi u drugom djelu, prerada se mora distribuirati pod istom ili sličnom licencom.

Djelo i prerade se ne mogu koristiti u komercijalne svrhe.