

Univerzitet odbrane
Vojnomedicinska akademija u Beogradu
Medicinski fakultet

Irena Mladenović

„Povezanost varijanti gena za katehol-O-metil-transferazu sa
temporomandibularnim disfunkcijama i postoperativnim
temporomandibularnim bolom“

Doktorska teza predložena Veću Medicinskog fakulteta Univerziteta odbrane u Beogradu za sticanje
akadenskog stepena doktora medicinskih nauka

Beograd, februar 2016.

Sadržaj

Sažetak	5
Abstract	6
1. PREDMET ISTRAŽIVANJA	7
1.1. <i>Temporomandibularne disfunkcije (TMD)</i>	7
1.2. <i>Temporomandibularni bol</i>	9
1.2.1. Patofiziologija temporomandibularnog bola.....	10
1.2.1.1. Putevi bola	10
1.2.1.2. Uloga kateholamina u pojavi bola	11
1.2.1.3. Patofiziologija temporomandibularnog bola	12
1.2.1.3.1. Patofiziologija zglobnog temporomandibularnog bola.....	12
1.2.1.3.3. Patofiziologija mišićnog temporomandibularnog bola	13
1.2.1.3.4. Ostali patofiziološki mehanizmi	14
1.3. <i>Psihosocijalni poremećaji i TMD</i>	15
1.4. <i>Uloga gena u nastanku simptoma TMD</i>	17
1.4.1. Uloga gena u nastanku temporomandibularnog bola.....	18
1.4.1.1. Polimorfizam gena za katehol-O-metil transferazu (COMT).....	19
1.4.1.1.1. Polimorfizam gena za COMT i bol	21
1.4.1.1.2. Polimorfizam gena za COMT, depresija i somatizacija.....	23
1.5. <i>Oralnohirurške intervencije i nastanak TMD</i>	25
1.5.1. Postoperativni bol i polimorfizam gena.....	27
2. HIPOTEZA	28

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	29
4. MATERIJAL I METODOLOGIJA.....	30
4.1. <i>Studija slučaj-kontrola.....</i>	30
4.1.1. Ispitanici.....	30
4.1.2. Klinički parametri - Utvrđivanje dijagnoze TMD i stepena temporomandibularnog bola, depresije, somatizacije i udaljenog bola	31
4.2. <i>Prospektivna studija</i>	33
4.2.1. Ispitanici.....	33
4.2.2. Hirurška intervencija.....	33
4.2.3. Klinički parametri.....	33
4.3. <i>Genotipizacija.....</i>	34
4.4. <i>Statistička analiza.....</i>	35
5. REZULTATI	37
5.1. <i>Studija preseka</i>	37
5.1.1. Odabir ispitanika i formiranje istraživačkih grupa	37
5.1.2. Klinički parametri.....	37
.....	41
5.1.3. Klinički parametri i polimorfizmi gena za COMT.....	42
5.2. <i>Prospektivna studija</i>	50
5.2.1. Odabir ispitanika i formiranje istraživačkih grupa	50
5.2.2. Klinički podaci	50
6. DISKUSIJA.....	55
6.1. <i>Metodološki aspekti studije.....</i>	55
6.2. <i>Polimorfizmi gena za COMT kod pacijenata sa TMD i kontrolnih ispitanika.....</i>	57
6.2.1. Zastupljenost genotipova i alela ispitivanih polimorfizama gena za COMT	57

6.2.2. Polimorfizmi gena za COMT i TMD	58
6.2.3. Polimorfizmi gena za COMT i psihosocijalni parametri	60
6.3. Polimorfizmi gena za COMT i postoperativni bol	62
7. ZAKLJUČCI	64
8. LITERATURA	66
9. LISTA SKRAĆENICA.....	81

Sažetak

Katechol-O-metil-transferaza (engl. catechol-O-methyltransferase (COMT)) je enzim koji igra važnu ulogu u metabolizmu kateholamina. Polimorfizmi gena za COMT regulišu termostabilnost i aktivnost enzima i na taj način utiču na razgradnju kateholamina. Poremećaj u nivou kateholamina dovodi se u vezu sa pojavom bola, kao i sa nekim afektivnim poremećajima. Temporomandibularne disfunkcije (TMD) predstavljaju skup poremećaja koji zahvataju mastikatorne mišiće i temporomandibularni zglobovi, a predstavljaju najčešća neodontogena bolna stanja u orofacijalnoj regiji. Polimorfizmi nukleotidne sekvence (SNP) gena za COMT su proučavani sa aspekta pojave TMD, postoperativnog bola i psiholoških poremećaja koji prate TMD, a dobijeni su različiti rezultati. Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita uticaj varijanti gena za COMT na pojavu TMD, temporomandibularnog bola, simptoma depresije i somatizacije i razvoj postoperativnog bola nakon ekstrakcije. Studija je pobuhvatila 90 pacijenata sa TMD i 92 zdrava ispitanika. Od toga, kod 40 ispitanika kod kojih je bila indikovana ekstrakcija barem jednog donjeg impaktiranog umnjaka praćena je pojava postoperativnog temporomandibularnog bola 7 dana i 3 meseca nakon intervencije. U svrhu utvrđivanja postojanja TMD, temporomandibularnog bola, depresije i somatizacije korišćen je RDC/TMD upitnik (Research Diagnostic Criteria for TMD). DNK je ekstrahovana iz periferne krvi, a određivanje genotipa je obuhvatilo tri polimorfizma gena za COMT (rs4680, rs6269 i rs165774) real time PCR metodom, korišćenjem predizajniranih esejaja. Rezultati su ukazali na postojanje značajne razlike u distribuciji alela i genotipova za rs165774 između studijskih grupa. Povećan rizik od TMD uočen je kod homozigota sa mutiranim (AA) genotipom (OR=9,448; p=0,006), kao i kod nosioca genotipa sa A alelom (AG/AA) (OR=2,089; p=0,017) u poređenju sa homozigotima sa izvornim (GG) genotipom. Genotip AA je bio povezan sa povećanim rizikom za pojavu artralgijske (OR=4,448; p=0,011), miofascijalnog bola (OR=3,543; p=0,035) i hroničnog temporomandibularnog bola (OR=6.173, p=0.006) u odnosu na homozigote sa GG genotipom. AA genotip polimorfizma rs6269 bio je povezan sa manjom prevalencom postoperativnog hroničnog temporomandibularnog bola (p=0,025), kao i sa manjim intenzitetom akutnog bola u regiji postekstrakcione rane (p=0,030). Nije utvrđena razlika u distribuciji haplotipova (za haploblok rs165774-rs4680) između pacijenata sa TMD i zdravih ispitanika. Također, nije uočena povezanost ispitivanih polimorfizama sa pojavom simptoma depresije i somatizacije. U zaključku, AA genotip polimorfizma rs165774 može igrati ulogu faktora rizika za nastanak TMD i hroničnog temporomandibularnog bola, dok je AA genotip polimorfizma rs6269 povezan sa manjom prevalencom hroničnog temporomandibularnog bola i akutnog lokalnog bola postoperativno.

Ključne reči: COMT; polimorfizam gena; bol; temporomandibularne disfunkcije; ekstrakcija impaktiranog trećeg molara

Abstract

Catechol-O-methyltransferase (COMT) is an important enzyme involved in catecholamine metabolism. COMT gene polymorphisms may affect thermostability and activity, and thus influence catecholamine degradation. Disturbance in levels of catecholamines participates in development of pain and affective disorders. TMD are a set of conditions affecting the masticatory muscles or joints and present the main cause of pain of non-dental origin in the orofacial region. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in COMT gene have been previously investigated in relation to temporomandibular disorders (TMD), post-operative pain, and related psychological disturbances yielding diverging results. The study was aimed to evaluate the association of COMT gene polymorphisms with temporomandibular disorders (TMD), TMD pain, symptoms of depression and somatization, and post-operative pain. In the present study 90 patients with pain-related TMD diagnosis and 92 matched controls were investigated for the presence of TMD, TMD pain, and psychosocial variables by Research Diagnostic Criteria for TMD. In a prospective cohort study a sample of 40 subjects having extracted at least one fully impacted mandibular third molar, subjects had 3 months post-surgery follow-up of post-operative pain. DNA extracted from peripheral blood was genotyped for three COMT SNPs (rs4680, rs6269, and rs165774) by Real-time Taq-Man method. According to the obtained results, the rs165774 polymorphism showed significant difference in the distribution of the variant A allele and A allele carrier genotypes (AG/AA) in TMD patients, comparing to healthy controls ($p=0.006$, $p=0.015$, respectively). Homozygous genotype AA and variant A allele carriers (AG/AA) for rs165774 polymorphism were associated with increased risk of TMD compared to wt genotype (OR=9.448, $p=0.006$; OR=2.089, $p=0.017$, respectively). In addition, AA genotype was associated with increased risk of arthralgia (OR=4.448, $p=0.011$), myofascial pain (OR=3.543, $p=0.035$), and chronic TMD pain (OR=6.173, $p=0.006$), compared to wt genotype. AA genotype of rs6269 was related to less chronic TMD pain ($p=0.025$) and lower acute pain at the extraction site ($p=0.030$) postoperatively. Differences in haplotype distribution between TMD cases and controls were not significant. No associations with depression and somatization were observed. In conclusion, AA genotype of rs165774 could be a significant risk factor for the development of TMD and TMD pain, while AA genotype of rs6269 presents less post-operative chronic TMD pain and acute pain at the extraction site.

Key words: COMT; genetic polymorphisms; pain; temporomandibular disorders; third molar surgery

1. PREDMET ISTRAŽIVANJA

1.1. Temporomandibularne disfunkcije (TMD)

Složeni funkcionalni poremećaji ranije poznati kao «Costen-ov sindrom», «(funkcionalni) poremećaji temporomandibularnog zgloba», «okluzomandibularni poremećaji», «temporomandibularni bolno-disfunkcioni sindrom», poslednje tri decenije označavaju se kao kranioandibularne disfunkcije (CMD) ili temporomandibularne disfunkcije (TMD) (Okeson, 1997). Naziv TMD je 1982. godine uveo Bell (Bell, 1982), a predstavlja «grupni pojam koji obuhvata brojna klinička stanja koja zahvataju mastikatorne mišiće, temporomandibularni zglob (TMZ) i/ili okolne strukture». Tipičnu kliničku sliku TMD karakteriše prisutvo dva ili više sledećih znakova i simptoma: bola ili nelagodnosti u predelu vilica, najčešće u TMZ i/ili mastikatornim mišićima, ograničenost funkcija stomatognatnog sistema i zvukova u TMZ (Okeson, 1996).

Prema rezultatima epidemioloških studija, učestalost TMD u opštoj populaciji iznosi 50-75% za znakove, a 20-33% za simptome disfunkcije (Gray i sar., 1994, McNeill, 1997a). Prema rezultatima istraživanja Janković i sar. (2007) kod oko 45% ispitanika u Istočnom regionu Republike Srpske dijagnostikovana je disfunkcija praćena bolom, a kod čak 56% pacijenata bol je imao hroničan karakter. Uprkos relativno visokoj zastupljenosti, svega 3-7% osoba u opštoj populaciji se javlja na lečenje zbog TMD (Poveda Roda i sar., 2007). Znaci i simptomi disfunkcije su češći i izraženiji u starosnoj grupi od 20. do 40. godine života (Izveštaj Nacionalnog instituta zdravlja, engl. National Institute of Health (NIH), 1996) kao i kod žena (Dworkin i sar., 1990). U kliničkim populacijama odnos među polovima se kreće od 3:1 do čak 9:1 u korist ženskog pola (De Leeuw i sar., 2008).

Nastanak TMD tradicionalno je povezivan sa poremećajima okluzije i skletnih odnosa (Poveda Roda i sar., 2007). Danas, bez obzira na neslaganja o ulozi pojedinih faktora u nastanku TMD, je opšte prihvaćeno da je etiologija TMD multifaktorijalna (Oral i sar., 2009). Savremeni biopsihosocijalni etiološki koncept TMD temelji se na zaključcima Koncezusne konferencije američkog Nacionalnog instituta zdravlja, a u sebi integriše tri dimenzije TMD: biomedicinsku (fizičku), psihološku i psihosocijalnu (Suvinen i sar., 2005; Svensson i Graven-Nielsen, 2001). Biomedicinski koncept odnosi se na uticaj strukturalnih komponenti stomatognatnog sistema (mastikatornih mišića, TMZ i okluzalnog kompleksa) i osnovnih fizioloških procesa. Psihološki koncept obuhvata više teorija o ulozi različitih psiholoških komponenata u nastanka TMD. Psihosocijalna dimenzija odnosi se na uticaj socijalnih faktora i faktora sredine na osećaj bola i ostale simptome TMD (Suvinen i sar., 2005). Faktori uključeni u etiologiju TMD mogu delovati kao predisponirajući (stukturalni, metabolički i psihološki), inicirajući (makro i mikro trauma) i precipitirajući, odnosno otežavajući (parafunkcije, hormonalni i psihosocijalni faktori) (McNeill, 1997b; Svensson i

Graven-Nielsen, 2001). Iako je nasledna komponenta TMD do skoro osporavana, u novije vreme među etiološkim faktorima za nastanak TMD navode se i genetički faktori (Oakley i Viera, 2008; Meloto i sar., 2011; Melis i Giosia, 2014).

Imajući u vidu raznolikost znakova i simptoma temporomandibularnih disfunkcija, kao i multifaktorijelnu etiologiju ovih oboljenja, prilikom postavljanja dijagnoze TMD potrebno je postojeće promene klasifikovati u odgovarajuće dijagnostičke grupe (Manfredini i sar., 2007). Generalno se poremećaji dele na zglobne, koji obuhvataju strukture TMZ, i mišićne koji zahvataju mastikatorne i druge mišiće u orofacijalnoj regiji (Romero-Reyes i Uyanik, 2014). Do sada je dato više predloga da se različite kliničke manifestacije TMD klasifikuju u odgovarajuće dijagnostičke grupe (Poveda Roda i sar., 2007). Savremena sistematizacija TMD svrstava postojeće promene u odnosu na kliničku sliku i etiologiju disfunkcije, a obuhvata 4 grupe oboljenja, 13 osnovnih podtipova i ukupno 37 dijagnoza (Peck i sar., 2014). Bilo je više pokušaja da se i za epidemiološke i istraživačke potrebe ujednače kriterijumi za postavljanje dijagnoze TMD. Naime, ranija istraživanja bila su uglavnom bazirana na verifikovanju pojedinačnih znakova i simptoma disfunkcije, što je za posledicu imalo velike varijacije u rezultatima (Poveda Roda i sar., 2007) Prvi šire korišćen dijagnostički kriterijum, Helkimov indeks (Helkimo, 1974) obuhvatao je utvrđivanje stepena subjektivnih tegoba (anamnestički indeks) i objektivnih promena u kretnjama mandibule (disfunkcionalni indeks). Imajući u vidu da je okluzija smatrana centralnim etiološkim faktorom u nastanku TMD, integralni deo kriterijuma je i okluzalni indeks u okviru koga se analiziraju okluzalni parametri, odnosno stepen njihovog odstupanja od fiziološki optimalne okluzije. Studije rađene poslednjih dvadesetak godina uglavnom su bazirane na Istraživačkom dijagnostičkom kriterijumu za temporomandibularne funkcije (engl. Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (RDC/TMD)) kojeg su 1992. godine predložili Dworkin i LeResche. RDC/TMD sadrži precizne kriterijume za postavljanje dijagnoze TMD u vidu različitih podtipova disfunkcije. Na osnovu prisustva određenih kombinacija znakova i simptoma postavlja se dijagnoza: bez TMD, miofascijalni bol (sa ograničenim otvaranjem usta ili bez ograničenog otvaranja usta), dislokacija diska (sa redukcijom, bez redukcije bez ograničenog otvaranja usta ili bez redukcije sa ograničenim otvaranjem usta) i ostala oboljenja zgloba (artralgija, artroza ili artritis). Pacijent sa disfunkcijom može imati jednu ili više navedenih dijagnoza, a kriterijum uzima u obzir samo samo najčešće tipove TMD. Pored toga, RDC/TMD procenjuje i psihosocijalne parametre koji mogu biti povezani sa TMD: stepen nesposobnosti vezane za hronični bol, somatizacije i depresije. Kategorije Ose I i Ose II RDC/TMD kriterijuma prikazane su na shemi 1. U cilju korekcija kriterijuma za procenu TMD i psihosocijalnih parametara, 2014. godine je objavljena novija verzija ovog upitnika, Dijagnostički kriterijum za temporomandibularne funkcije (engl. Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (DC/TMD)) (Schiffman i sar., 2014). Osnovna razlika odnosi se na kriterijume za postavljanje dijagnoza za pojedine podtipove TMD, uvrštavanje kriterijuma za još nekoliko TMD dijagnoza, kao i uvođenje skala za procenu anksioznosti i stresa. Prevod i validacija DC/TMD upitnika na bilo kojem od jezika u regionu još uvek nisu sprovedene.

1.2. Temporomandibularni bol

TMD predstavljaju najčešća bolna stanja orofacijalne regije neodontogenog porekla (de Leeuw i sar., 2008). Bolni simptomi su glavni uzrok zbog kojeg pacijenti sa TMD traže lekarsku pomoć, što na nivou opšte populacije iznosi 5-6% (Svensson i Graven-Nielsen, 2001). Prema rezultatima velike epidemiološke studije (Dworkin i sar., 1990) temporomandibularni bol je bio prisutan kod čak 97% ispitanika u kliničkoj populaciji. Učestalost temporomandibularnog bola je veća kod žena nego kod muškaraca, a ova razlika se povećava u reproduktivnom dobu (LeResche, 1999).

Za klasifikaciju orofacijalnog bola danas se koriste četiri kriterijuma: klasifikacije Međunarodnog udruženja za ispitivanje bola i Američke akademije za orofacijalni bol, Međunarodna klasifikacija poremećaja praćenih glavoboljom i RDC/TMD upitnik (Dworkin i LeResche, 1992). Dok su prva tri fokusirana na biomedicinski aspekt orofacijalnog bola, RDC/TMD klasifikacija analizira temporomandibularni bol sa psihosocijalnog aspekta (Renton i sar., 2012).

Međunarodno udruženje za istraživanje bola (engl. International Association for the Study of Pain (IASP)) definiše bol kao neprijatno čulno i emocionalno iskustvo povezano sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (Merskey i Bogduk, 1994). U okviru kliničke slike TMD, pacijenti opisuju prisustvo bola u preaurikularnom predelu, temporomandibularnom zglobovu i/ili mastikatornim mišićima koji se obično pojačavaju pri manipulaciji ili funkciji (McNeill, 1997b). Prisustvo bola može se uvrđiti i prilikom kliničkog pregleda, palpacijom mišića i TMZ ili funkcionalnim probama (Okeson, 2003).

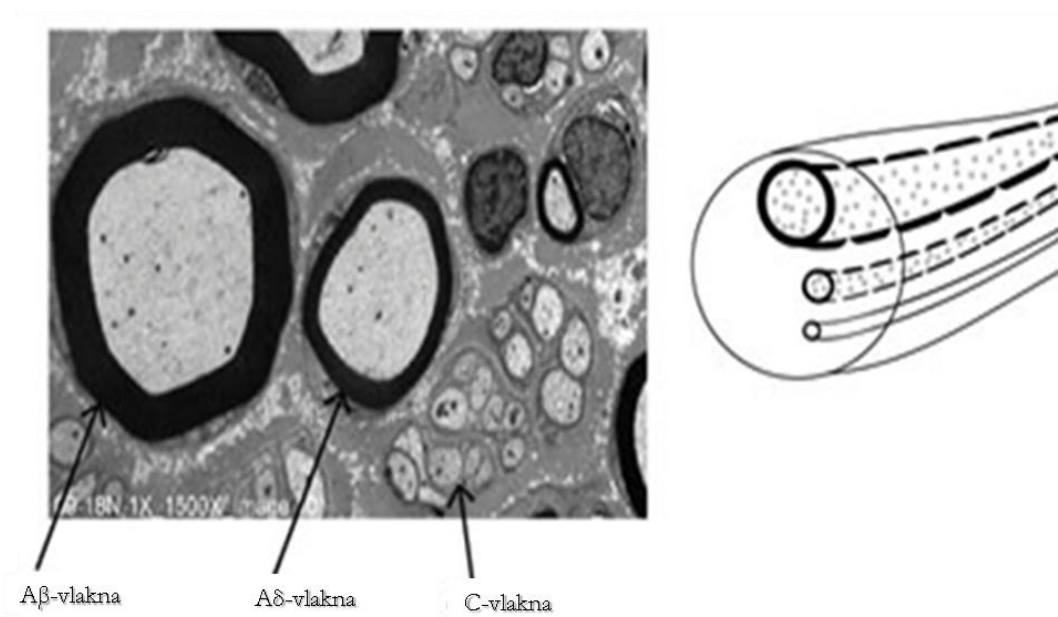
Pacijenti sa temporomandibularnim bolom se često žale na prisustvo bola i u drugim delovima tela: glavobolju, bol u vratu, grudima, donjem delu leđa, zglobovima i sl (Plesh i sar., 2011). Veliki procenat pacijenata sa TMD također ima neko od obolenja praćenih bolom kao što su migrena, fibromialgija, sindrom iritabilnog kolona i pokazuje povećanu osetljivost na bolne nadražaje (Aaron i sar., 2000).

Kod izvesnog procenta pacijenata temporomandibularni bol putem nedovoljno rasvetljenih mehanizama poprima hronični karakter. Hronični bol se definiše kao bol koji traje duže od vremena potrebnog za fiziološko zarastanje, a najčešće se uzima da je to period od tri meseca (IASP, 1986). Hronični temporomandibularni bol predstavlja poseban zdravstveni i društveni problem zbog otežane terapije, te dokazanog uticaja na psihološki status, izmenu radnih aktivnosti i društveni život obolelih (Dworkin i LeResche 1992).

1.2.1. Patofiziologija temporomandibularnog bola

1.2.1.1. Putevi bola

Bolni nadražaj nastaje stimulacijom receptora za bol (nociceptora) mehaničkim, termičkim ili hemijskim nadražajima dovoljnog intenziteta ili medijatorima zapaljenja oslobođenim iz oštećenih tkiva. Nociceptori predstavljaju slobodne nervne završetke primarnih aferentnih neurona, u vidu slabo mijelinizovanih A δ vlakna, odgovornih za oštar lokalizovan bol i inicijalni refleksni odgovor na akutni bol, ili tankih i nemijelinizovanih C vlakana čijom aktivacijom nastaje kontinuirani, tupi bol (Slika 1) (Serpell, 2006; Albrecht i Rice, 2010).



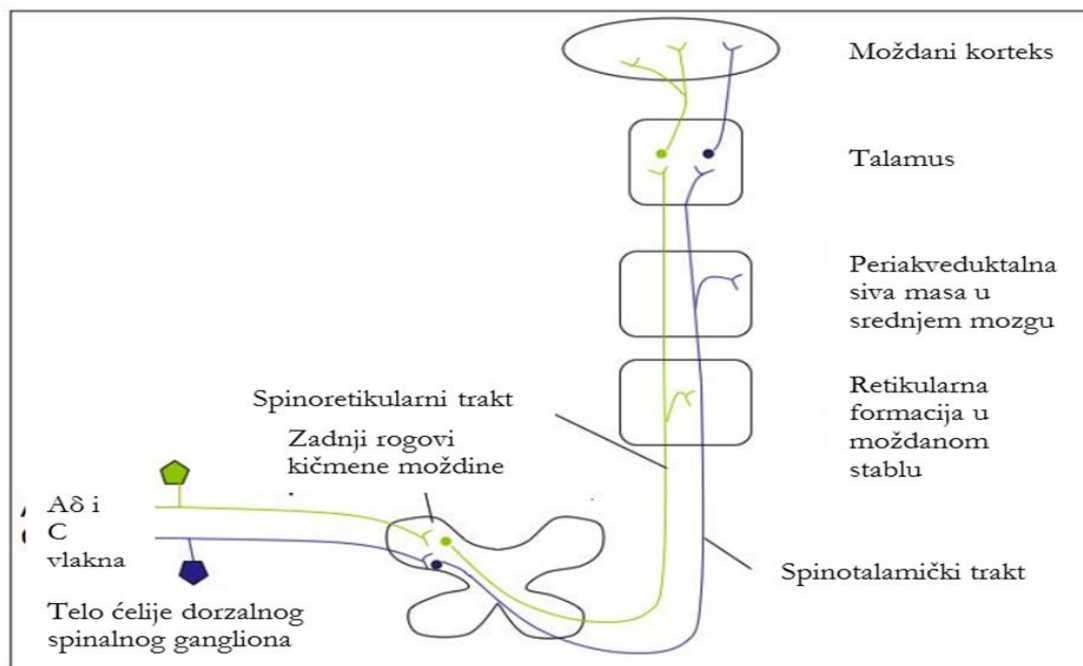
Slika 1. Nociceptivna vlakna (preuzeto sa <https://www.ucl.ac.uk/anaesthesia/StudentsandTrainees/IntrotoPainPathwaysandMechanisms>)

Nociceptori pretvaraju stimulus u električni signal koji se prenosi do zadnjih rogova kičmene moždine ili trigeminalnog gangliona u ponsu gde su smeštena tela primarnih neurona (Kambur, 2013). U kičmenoj moždini primarni neuroni ostvaruju sinapse sa aferentnim nervima koji prenose impulse do različitih centara u mozgu, silaznim vlaknima koji moduliraju prenošenje nociceptivnih impulsa na spinalnom nivou, inhibitornim i ekscitatornim interneuronima, drugim primarnim neuronima koji prenose nociceptivne podatke do kičmene moždine, kao i sa vegetativnim i motornim neuronima. U prenosu nadražaja na nivou ovih sinapsi učestvuje veliki broj različitih neurotransmitera (Kambur, 2013).

Od kičmene moždine se impulsi prenose do viših centara u mozgu formirajući više puteva: spinotalamički, spinobulbarni, spinohipotalamički, spinoretikularni i druge. Impulsi se dalje procesuiraju u mreži centara,

koju čine somatosenzorni, inzularni, prefrontalni korteks, talamus i drugi centri i integrišu sa drugim informacijama, što kao rezultat ima subjektivni doživljaj bola (Chen i sar., 2008) (Slika 2).

Silazna kontrola bola je osnovni mehanizam regulacije nociceptivnih impulsa, a može ići u pravcu inhibicije ili stimulacije (Tracey i Mantyh, 2007). Odvija se segmentno, preko puteva koji počinju u korteksu, talamusu ili moždanom stablu (Stamford, 1995; Kambur, 2013), a najvećim delom posredstvom noradrenalina i serotonina. Ovi mehanizmi, menjajući karakteristike električnog impulsa, moduliraju transmisiju i obradu nociceptivnih informacija na njihovom putu od periferije ka centrima, te do centara u mozgu dolaze izmenjene nociceptivne informacije (Kambur, 2013). Poremećaj na nivou ovih puteva može dovesti do pojave različitih bolnih stanja ili do smanjenja efikasnosti analgetika (Tracey i Mantyh, 2007).



Slika 2. Ascendentni putevi bola (preuzeto sa <https://www.ucl.ac.uk/anaesthesia/StudentsandTrainees/IntrotoPainPathwaysandMechanisms>)

1.2.1.2. Uloga kateholamina u pojavi bola

Kateholamini deluju kao neurotransmiteri u simpatičkom nervnom sistemu i igraju važnu ulogu u prenošenju i modulaciji bolnih impulsa u ascendentnim i descendentnim putevima bola (Tammimäki i Männistö, 2012). Noradrenalin i serotonin su medijatori u perifernim nociceptivnim neuronima i ekscitatornim putevima (Oliveira i sar., 2007), ali i u inhibitornim putevima za bol u moždanom stablu (Diatchenko i sar., 2005) i zadnjim rogovima kičmene moždine (Sánchez i Hyttel, 1999), dok dopamin učestvuje u modulaciji bola na supraspinalnom nivou (Magnusson i Field, 2000).

Periferno, u zdravim tkivima kateholaminini ne dovode do nadražaja nociceptora i do pojave bola, dok u oštećenim tkivima pokazuje različite efekte, uključujući pogoršanje bola (Michaelis 2002; Pertovaara, 2006). Kao posledica delovanja štetnog nadražaja, npr. traume, endogeno oslobođen serotonin ili adrenalin smanjuju mehanički prag nadražaja nociceptora (Berberich i sar., 1988). Usled nastale senzitivizacije perifernih receptora, čak i slabi stimuli dovode do njihovog nadražaja i izazivaju bol. U slučaju oštećenja samih perifernih nerava, veliki broj aferentnih vlakana postaje ekscitabilan na dejstvo kateholamina (Michaelis 2002). Ovaj mehanizam bi mogao biti odgovoran za održavanje bolnih simptoma kod neuropatskog bola.

Noradrenalin, adrenalin i dopamin također predstavljaju ključne medijatore endogenog mehanizma analgezije. Noradrenalin ove efekte ostvaruje putem opioda ili centralnom stimulacijom, kao i preko silaznih puteva bola (Stamford, 1995). Na nivou kičmene moždine, noradrenalin (Stamford, 1995; Pertovaara, 2006) i adrenalin (Peng i sar., 1992) izlučeni iz neurona silaznih puteva bola suprimiraju bol. Na supraspinalnim nivoima, noradrenalin (Pertovaara, 2006) i dopamin (Magnusson i Field, 2000) učestvuju u modulaciji bola. U bazalnim ganglijama dopamin ostvaruje antinociceptivno dejstvo kod akutnog bola i vrši modulaciju hroničnog bola (Magnusson i Field, 2000). Efekti noradrenalina zavise od supraspinalnog nivoa, tipa adrenergičkog receptora, trajanja bola i patofiziološkog stanja. Dok na samom početku pojave bola noradrenalin ima malog uticaja, kod dugotrajnog bola indukuje noradrenergičku povratnu inhibiciju bola (Pertovaara, 2006) Pretpostavlja se da disbalans noradrenalina i drugih neurotransmitera na nivou endogenih puteva za inhibiciju bola može doprineti pojavi hroničnog bola (Fields i sar., 1991).

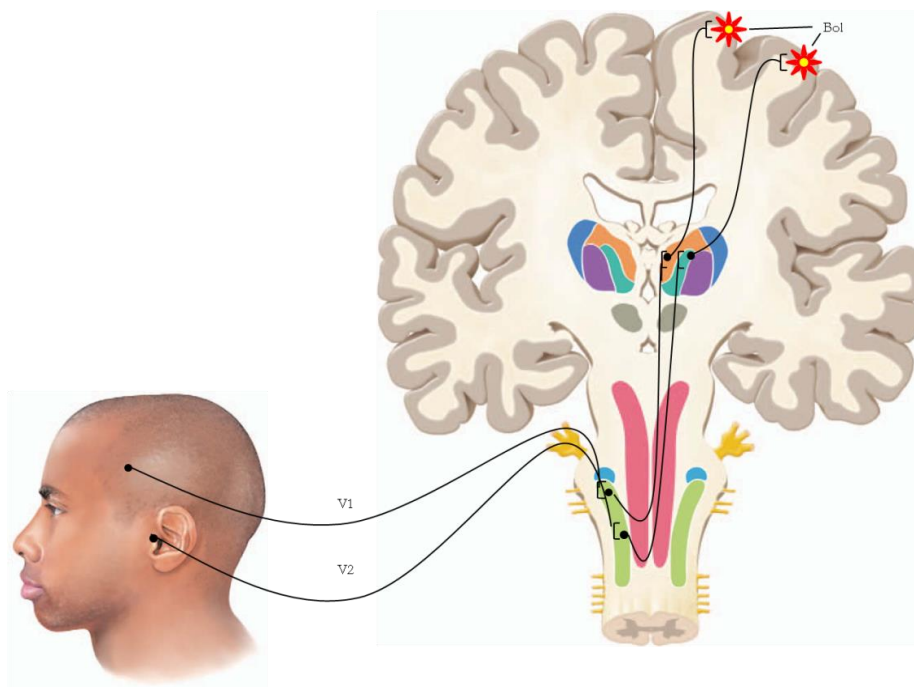
1.2.1.3. Patofiziologija temporomandibularnog bola

Mehanizmi koji dovode do pojave bolnih simptoma u okviru kliničke slike TMD nisu u potpunosti rasvetljeni. Pored toga, izraženost temporomandibularnog bola često nije povezana sa stepenom promena na zahvaćenim strukturama (Cairns, 2010; Sessle, 2005). Čitav spektar morfoloških i funkcionalnih promena može dovesti do pojave bolnih simptoma u okviru TMD (Slika 3).

1.2.1.3.1. Patofiziologija zglobnog temporomandibularnog bola

Smatra se da u nastanku bola u temporomandibularnom zglobu učestvuju periferni mehanizmi i centralna senzitivizacija (Cairns, 2010). Periferni mehanizmi koji dovode do pojave zglobnog bola odnose se na mehaničku stimulaciju nociceptora smeštenih u zglobnoj kapsuli, sinovijalnoj membrani i diskusu, oslobađanje neuropeptida ili medijatora inflamacije, odnosno pojavu hipoksije (Sessle, 2005; Cairns, 2006).

Do mehaničke stimulacije nociceptora dolazi prilikom ekstremnih pokreta u TMZ (Cairns, 2006), preopterećenja zglobnih struktura (Gallo, 2005) ili povećanja intraartikularnog pritiska zbog prisutne inflamacije (Cairns, 2010). Neuropeptidi (peptid vezan za kalcitoninski gen i supstanca P) se oslobađaju iz slobodnih nervnih završetaka pod uticajem mehaničkih nadražaja ili lokalne hipoksije nastale usled oštećenja tkiva. U okviru degenerativnih stanja TMZ (artritisa ili artroze) oslobađaju se proinflamatorni citokini, u prvom redu faktor nekroze tumora alfa ($TNF\alpha$) i interleukini (Vernal i sar., 2008). Oni dalje olakšavaju oslobađanje pronociceptivnih supstanci, što dovodi do nadražaja nociceptora u TMZ (Takeuchi i sar., 2004). Pored perifernih mehanizama, nociceptivni impulsi u TMZ indukuju produženu senzitivaciju neurona u centralnom nervnom sistemu. Nociceptivni impulsi se iz TMZ preko trigeminalnog gangliona prenose u subnucleus caudalis (Cairns, 2006), a odatle u više centre (Sessle, 2005). Dugotrajna centralna senzitivacija doprinosi sniženju praga bola, pojavi bola na udaljenim mestima i nastanku generalizovane bolne osetljivosti.



Slika 3. Ascedentni putevi bola u TMZ i mastikatornim mišićima preko trigeminalnog jedra (prema Okeson,1995)

1.2.1.3.3. Patofiziologija mišićnog temporomandibularnog bola

Patofiziološki faktori koji bi mogli biti odgovorni za nastanak bola u temporomandibularnom zglobu donekle su bolje razjašnjeni od mehanizama koji dovode do pojave bola u mastikatornim mišićima. Pretpostavlja se da u njegovom nastanku učestvuju povećan tonus mišića, hronična trauma mišićnih struktura i centralna senzitivacija (Cairns, 2010). Na osnovu rezultata studija na eksperimentalnim

životinjama, pretpostavlja se da bol u TMZ može indukovati protektivne reflekse mastikatornih mišića (Cairns i sar.; 1998). Refleksna aktivacija mastikatornih mišića dovodi do povećanja mišićnog tonusa i pojave bola. Bol u mišićima dalje uzrokuje pojavu mišićnog spazma koji pojačava bol (Murray i Peck, 2007). Oštećenje mišićnih struktura koje nastaje usled hronične hiperaktivnosti mastikatorne muskulature također može biti uzrok mišićnog bola. Do nadražaja mišićnih nociceptora dolazi zbog nastanka lokalne ishemije tkiva, zamora mišića i/ili usled oslobađanja algogenih supstanci kao što su serotonin ili glutamat. Eksperimentalni modeli ukazuju da akumulacija metabolita kao što su laktati i kalijum, odnosno izostanak oksidacije metabolita (Newham i sar., 1994) ili hipoksija, oslobađanje faktora inflamacije (bradikinina, prostaglandina E2) i neuropeptida u kombinaciji sa smanjenjem pH vrednosti (Mense, 1993) pri kontrakciji mišića dovode do nadražaja mišićnih nociceptora. Za razliku od centralne kontrakcije izazvane stiskanjem zuba koja dovodi do trenutnog i kratkotrajnog mišićnog bola, ekscentrične kontrakcije pri škripanju zubima dovode do odgođene bolne reakcije (Svensson i Graven-Nielsen 2001). Pretpostavlja se da je za ovu vrstu reakcije odgovorno oštećenje mišićnog vezivnog tkiva (Brown i sar., 1997). Centralna senzitivizacija može doprineti pojačanju mišićnog bola kod pacijenata sa već prisutnim miofascijalnim bolom, a mehanizmi su identični onima uključenim u razvoj bola u zglobnim strukturama (Cairns, 2010). Eksperimentalni modeli su pokazali da je mišićni bol odgovoran za somatosenzorne manifestacije kao što su pojačana osetljivost cele regije i pojava udaljenog bola, te za inhibiciju kraniofacijalne motorne funkcije (Svensson i Graven-Nielsen, 2001). Pretpostavlja se da je za ove promene odgovorno sadejstvo više mehanizama: senzitivizacija perifernih aferentnih vlakana, hiperekscitabilnosti centralnih vlakana i disbalansa u silaznim putevima za modulaciju bola. Kada je u pitanju inhibicija motornih funkcija, postoje čvrsti dokazi o inhibitornom dejstvu aferentnih nociceptivnih mišićnih vlakana na aktivnost α -mornih neurona, verovatno preko niza interneurona u moždanom stablu.

1.2.1.3.4. Ostali patofiziološki mehanizmi

Pored navedenih mehanizama, smatra se da pojavi temporomandibularnog bola doprinose i izmene u regulaciji bola, psihogeni faktori, polni hormoni i genetički faktori (Cairns, 2010). Promene u regulatornim mehanizmima koje bi mogle imati uticaja na manifestaciju temporomandibularnog bola odnose se na povećanu nadražljivost centralnih nociceptivnih puteva i smanjenu funkciju endogenih mehanizama za kontrolu bola. Hiperekscitabilnost centralnih puteva za prenos bola izazvana je postojanjem hroničnog bola, a manifestuje se sniženjem praga bola (Sarlan i sar., 2004) i pojavom bolnih stanja van orofacijalne regije (npr. fibromialgija, sindrom iritabilnog kolona, intersticijalni cistitis) (Balasubramaniam i sar, 2007). Smanjen kapacitet endogenih mehanizama za kontrolu bola povećava bolnu osetljivost kod pacijenata sa TMD (King i sar., 2009). Među psihološkim faktorima, u vezu sa pojavom temporomandibularnog bola dovode se stres (Cairns, 2010), anksioznost (Rollman i Gillespie, 2000; Kafas i Leeson, 2006) depresija

(Sherman i sar., 2004; Kafas i Leeson, 2006) i somatizacija (Dworkin i sar., 2002). Kada je u pitanju TMD, najispitivaniji među polnim hormonima je estrogen, kome se pripisuje značajna uloga u pojavi TMD i temporomandibularnog bola kod žena u reproduktivnom periodu, kao i fluktuaciji bolnih simptoma u toku menstrualnog ciklusa (Dao i LeResche 2000; Cimino i sar., 2000; Cairns, 2010). Pored uticaja ženskih hormona znatno veća zastupljenost temporomandibularnog bola među ženama pripisivana je regulaciji centralne obrade nociceptivnih impulsa (Sarhani i sar., 2007), a u kliničkoj populaciji i razlici u reagovanju na pojavu disfunkcije između polova (Gray i sar., 1994). Za veliki broj gena se pretpostavlja da bi mogli imati uticaja na individualnu sklonost ka nastanku i razvoju znakova i simptoma TMD. Iz nove perspektive, pojava temporomandibularnog bola bi se mogla shvatiti kao složeni odgovor pojedinca, pri čemu bolni simptomi mogu biti izraženi ili ublaženi u zavisnosti od genske strukture i/ili uticaja drugih etioloških faktora (Stohler, 2004).

1.3. Psihosocijalni poremećaji i TMD

Literaturni podaci potvrđuju povezanost između psihosocijalnih faktora i poremećaja praćenih bolom, uključujući i temporomandibularne disfunkcije. Psihosocijalni faktori imaju važan uticaj na percepciju i procenu bola od strane pacijenta, ponašanje uslovljeno bolom, (Suvinen i sar., 2005) kao i na ishod terapije (Dworkin, 2006) Postoji više koncepata koji na različite načine tumače povezanost TMD sa pojedinim psihološkim faktorima. Psihodinamski se temelji na psihoanalizi, a obolenja kao što su TMD tumači kao način za oslobađanje od podsvesnih emocionalnih konflikata (Grzesiak, 1991). Koncept ličnosti ukazuje na pojedine osobine ličnosti koje predisponiraju pojedinca za nastanak različitih bolnih stanja (Mongini i sar., 2000). Prema bihejvioralnom konceptu, postoje različiti tipovi ponašanja, odnosno načini na koje se bol može doživjeti, proceniti i na njega reagovati (Suvinen i Reade, 1995). Koncept koji se odnosi na emocionalna i afektivna stanja, povezuje TMD sa depresijom i anksioznošću (Rollman i Gillespie, 2000; Sherman i sar., 2004; Kafas i Leeson, 2006). Autori koji zastupaju kognitivni koncept navode da doživljaj temporomandibularnog bola zavisi od mogućnosti kontrole bola, odnosno od načina suočavanja sa bolom (Jones i sar., 2003). Za samo neke od navedenih psiholoških i psihosocijalnih elemenata postoje dokazi o njihovoj povezanosti sa TMD, te se mogu smatrati važnim za procenu i terapiju TMD. Ovo se pre svega odnosi na afektivne poremećaje (depresiju i anksioznost), somatizaciju i psihosocijalnu disfunkciju (Suvinen i sar., 2005). U okviru istraživačkog modela velike prospektivne studije za procenu pojave orofacijalnog bola i utvrđivanje faktora rizika data je pretpostavka da psihološki poremećaji i intenziviranje bolnih simptoma predstavljaju dva osnovna fenotipa koji dovode do nastanka i održanja TMD (Maixner i sar., 2011).

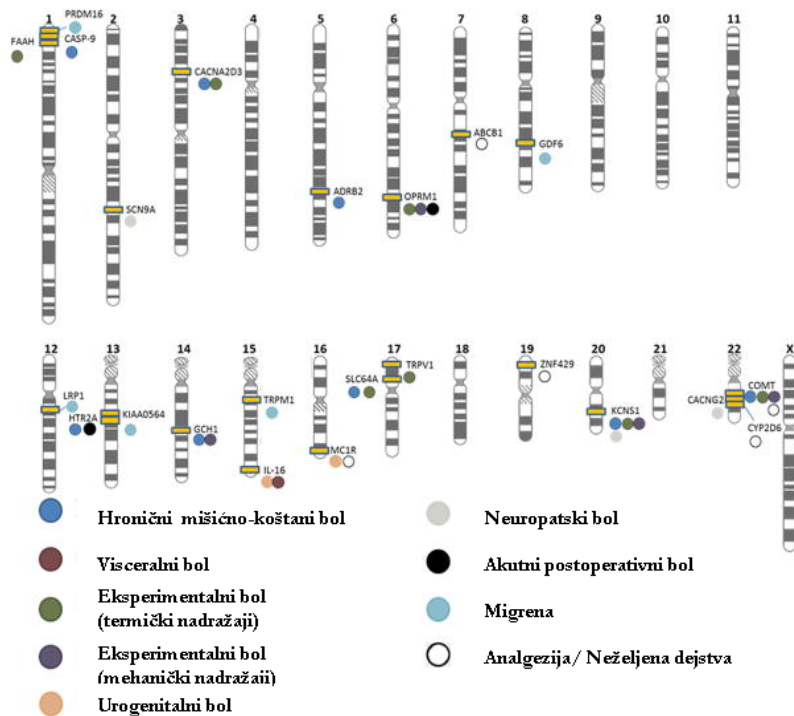
Depresija predstavlja često psihijatrijsko obolenje, sa celoživotnom učestalošću i do 20% (Haenisch i sar., 2008). Depresivni simptomi prate hronična bolna stanja, a uočeni su kod 45% (u zavisnosti od populacije, 38-53%) obolelih od TMD (Manfredini i sar., 2010b). Prisustvo depresije kod pacijenata sa TMD se tumači kao uzrok disfunkcije (Sherman i sar., 2004; Kafas i Leeson, 2006) ili kao posledica temporomandibularnog bola (Kafas i Leeson, 2006). Prema klasičnoj hipotezi, depresija nastaje kao posledica smanjenja moždane neurotransmisije koja se odvija preko monoamina (serotonina, noradrenalina i dopamina) (Ruhe i sar., 2007; Haenisch i sar., 2008) Snižen nivo noradrenalina i dopamina u sinaptičkim pukotinama dovodi se u vezu sa pojavom depresije (Massat i sar., 2005; Haenisch i sar., 2008). Sa druge strane, pojedini simptomi depresije nastaju prevashodno kao posledica poremećaja dopaminergičke neurotransmisije (Drago i sar., 2011). Faktori koji dovode do potrošnje dopamina ili deluju kao njegovi antagonisti smanjuju motivaciju, pogoršavaju raspoloženje i dovode do depresivnog stanja (Verhoeff i sar., 2003).

Somatizaciju odlikuje sklonost pacijenta da se žali na različite nespecifične fizičke simptome, uz nedostatak objektivnih promena (Sherman i sar., 2004). Ovde spadaju pojava bola u različitim delovima tela, osećaj umora i slabosti, konstipacija i srčane tegobe (Klengel i sar., 2011). Prisustvo simptoma somatizacije uočeno je kod velikog procenta (82%) ispitanika u opštoj populaciji, ali su tek kod četvrtine ovi simptomi imali klinički značaj (Hiller i sar., 2006). Somatizacija prati hronična bolna stanja, a u zavisnosti od populacije, uočena je kod 41-74% pacijenata sa TMD (Manfredini i sar., 2010a; 2010b) Somatizacija se povezuje sa pojavom temporomandibularnog bola, (Dworkin i sar., 2002) stepenom hroničnog temporomandibularnog bola (Manfredini i sar., 2010a, 2010b) i palpatornom bolnom osetljivošću mastikatornih mišića (Dworkin i sar., 2002; Sherman i sar., 2004). Ovi pacijenti pokazuju generalizovanu povećanu perceptivnu reaktivnost, a pretpostavlja se da na neki način pojačavaju telesne signale i doživljavaju ih kao intenzivnije (Barsky, 1992). Danas se smatra da je u pozadini simptoma somatizacije neurofiziološki proces centralna senzitivizacija, centralno kontrolisana hipersenzitivnost na bolne stimulse (Bourke i sar., 2015). Žene generalno pokazuju viši nivo somatizacije, ali uloga pola u pojavi ovih simptoma nije razjašnjena (Ladwig i sar., 2001). Prisustvo nespecifičnih simptoma je karakteristična za grupu obolenja koja zahvataju različite sisteme, a gde se pored TMD ubrajaju i sindrom iritabilnog kolona, fibromialgija, idiopatski lumbalni sindrom, glavobolja tenzionog tipa, intersticijalni cistitis i dr. (Wessely i sar., 1999; Bourke i sar., 2015).

Obolenja koja se karakterišu prisustvom somatizacije često su praćena depresijom (Rief i sar., 1992). Sa druge strane, veliki procenat pacijenata sa depresijom žali se na neki od simptoma somatizacije (Klengel i sar., 2011) Pretpostavlja se da su za komorbiditet depresije i somatizacije odgovorni zajednički patofiziološki mehanizmi: poremećaj serotoninergičkih puteva, aktivacija imunog odgovora, izmena aktivnosti hipotalamusno-hipofizno-adrenalne (HPA) ose i poremećaj metabolizma omega-3 masnih kiselina (Rief i sar., 2010) Svi navedeni biološki sistemi mogu biti genski determinisani.

1.4. Uloga gena u nastanku simptoma TMD

Do početka poslednje decenije studije nisu uspele da dokažu naslednost TMD (Heiberg i sar., 1980., Raphael i sar., 1999, Michalowicz i sar., 2000). Stoga genetički faktori do skoro nisu navođeni u multifaktorijalnoj etiologiji ovih obolenja (Oakley i Vieira, 2008). Ipak, činjenica da pojedine skupine unutar populacija pokazuju veću osetljivost za nastanak znakova i simptoma TMD dovela je do povećanog interesovanja za moguću genetičku komponentu TMD. Novi pristup ispitivanju uloge gena u pojavi TMD ne bazira se na tradicionalnom modelu nasleđivanja, već na ulozi velikog broja polimorfnih gena (Meloto i sar., 2011). Multifaktorijalna priroda TMD ukazuje na činjenicu da mnogo različitih gena može biti odgovorno za pojavu disfunkcije, pri čemu svaki od gena ispoljava određeni efekat, što u kombinaciji sa spoljnjim faktorima određuje vrstu promena i tip disfunkcije (Diatchenko i sar., 2006; Meloto i sar., 2011)



Slika 4. Mapirani geni na humanim hromozomima koji se povezuju sa uticajem na varijabilnost bola (preuzeto iz Young i sar., 2012)

Različitost u genetičkom materijalu bazira se na velikom broju gena sa velikom učestalošću polimorfizama (Meloto i sar., 2011). Genski polimorfizam je genetska varijacija koja postoji stabilno u zdravoj humanoju populaciji sa učestalošću koja je veća od 1% (Brookes 1999). Najčešći oblik genskog polimorfizma, polimorfizam nukleotidne sekvence (engl. single nucleotide polymorphism (SNP)) je mala promena ili

varijacija u sekvenci DNK koja nastaje zamenom jednog od četiri nukleotida u genomu, koji se razlikuje između jedinki iste vrste ili parova hromozoma iste jedinke (Genetics Home Reference Glossary). Zamene se mogu desiti u kodirajućem segmentu gena (egzonu), nekodirajućem segmentu (intronu) i u drugim nekodirajućim delovima. Polimorfizmi u kodirajućem segmentu imaju različite funkcionalne efekte na ekspresiju gena, sintezu proteina ili funkciju proteina, enzima ili receptora. Zamene u nekodirajućem regionu gena utiču na vezivanje transkripcionih faktora, a time na promenu nivoa transkripcije i naposljetku na sintezu proteina. Jedan od *različitih* oblika DNK sekvence označava se kao alel. Neki od alela su zapravo funkcionalne varijante koje mogu povećati rizik za nastanak nekog obolenja. Haplotip predstavlja kombinaciju SNP na susednim lokusima na jednom hromozomu hromozomskog para koji su statistički asocirani. Haplotipovi se pojavljuju u blokovima, u jednom segmentu hromozoma, a veličina blokova se kreće od 3 do 150 kb. Polimorfizmi unutar istog bloka pokazuju veliku međusobnu povezanost i malu povezanost sa ostalim polimorfizmima (<http://www.genome.gov/10001665>). Pojam neravnoteža vezanosti (engl. linkage disequilibrium (LD)) označava vezano nasleđivanje polimorfizama u haplotipskim ili LD blokovima (Wall i Pritchard, 2003).

Proučavani geni koji bi mogli imati uticaja na individualnu sklonost ka nastanku TMD vezani su za individualni doživljaj bola, pol, inflamatorni odgovor, oštećenje ekstracelularnog matriksa i izmene struktura mastikatornog sistema u okviru pojedinih sindroma (Oakley i Vieira, 2008; Vernal i sar., 2008; Meloto i sar., 2011; Planello i sar., 2011) Na nove potencijalne kandidate među genima koji bi mogli biti odgovorni za pojavu TMD ukazuju rezultati studija na eksperimentalnim životinjama, kao i humanih studija u kojima su ispitivana druga obolenja sa sličnom kliničkom slikom (Oakley i Vieira, 2008; Kim i sar., 2009). Ovde pre svega treba spomenuti različita bolna stanja kao što su hronični bolni sindrom, fibromialgija, lumbalni sindrom, idiopatska migrena, sindrom pelvičnog bola itd., te inflamatorna i degenerativna obolenja zglobova. Prema današnjim saznanjima postoji bar 20 gena povezanih sa eksperimentalnim i kliničkim bolom, ali su za samo mali broj njih rezultati potvrđeni u više studija (LaCroix-Fralish i Mogil 2009) (Slika 4)

1.4.1. Uloga gena u nastanku temporomandibularnog bola

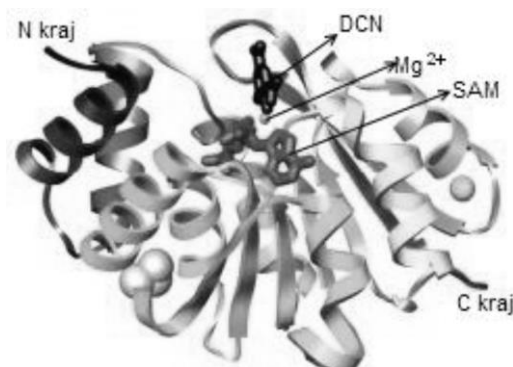
Genetika bola je relativno novo polje istraživanja (Katz i Seltzer 2009) a geni se dovode u vezu sa različitim hroničnim bolnim stanjima, pa i sa temporomandibularnim disfunkcijama. Prema rezultatima prethodnih studija, procenjuje se da se učešće gena u pojavi bolne osetljivosti kreće 28-76% na eksperimentalnom modelu kod miševa i u rasponu 39-58% za različita obolenja praćena bolom kod ljudi (Mogil, 1999). Genski determinisana razlika u bolnoj osetljivosti zasnovana je na ulozi gena koji kontrolišu neurotransmiterske sisteme, jonske kanale ili čine bazu za neka obolenja (Young i sar 2012).

Uloga gena u etiologiji hroničnih bolnih stanja je daleko složenija, a odvija se preko regulacije bolne osetljivosti, psihološkog statusa, te inflamatornog i vegetativnog odgovora (Smith i sar., 2011). U preglednom članku o naslednosti temporomandibularnog bola, Visscher i Lobbezzo (2015) iznose zaključak da je rizik za transformaciju akutnog bola u hronični verovatno vezan za individualnu genetički određenu sklonost ka nastanku bola.

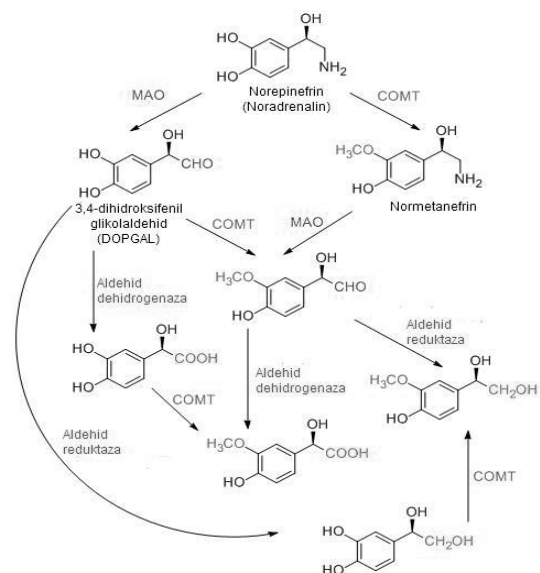
Najčešće proučavani geni koji se povezuju sa temporomandibularnim bolom kodiraju različite komponente serotoninergičkog sistema (transporter serotoninina, serotoniniski receptori) (Visscher i Lobbezzo, 2015), adrenergičkog sistema (adrenergičke receptore i enzim katechol-O-metil-transferazu) (Tammimäki i Männistö, 2012; Visscher i Lobbezzo, 2015), puteva regulacije bola (opioidni i glutamatni receptori) (Smith i sar., 2011), hipotalamusno-hipofizno-adrenalne ose (glikokortikoidni receptori) (Smith i sar, 2011) i receptore vezane za dejstvo gonadalnih hormona (Ribeiro-Dasilva i sar, 2009). Ostali ređe opisani geni vezani su za muskarinske holinergičke receptore i regulatorne proteine (CAMK4, IFRD1, GRK5) (Smith i sar., 2011).

1.4.1.1. Polimorfizam gena za katechol-O-metil transferazu (COMT)

Jedan od najviše proučavanih gena kada je u pitanju pojava bola je gen koji kodira katechol-O-metil transferazu (COMT). Ovaj katabolički enzim je odgovoran za inaktivaciju derivata katehola, uključujući kateholamine (adrenalin, noradrenalin i dopamin), kateholne estrogene, L-dopa i druge (Kambur, 2013; Männistö i Kaakkola, 1999). (Slike 5 i 6).

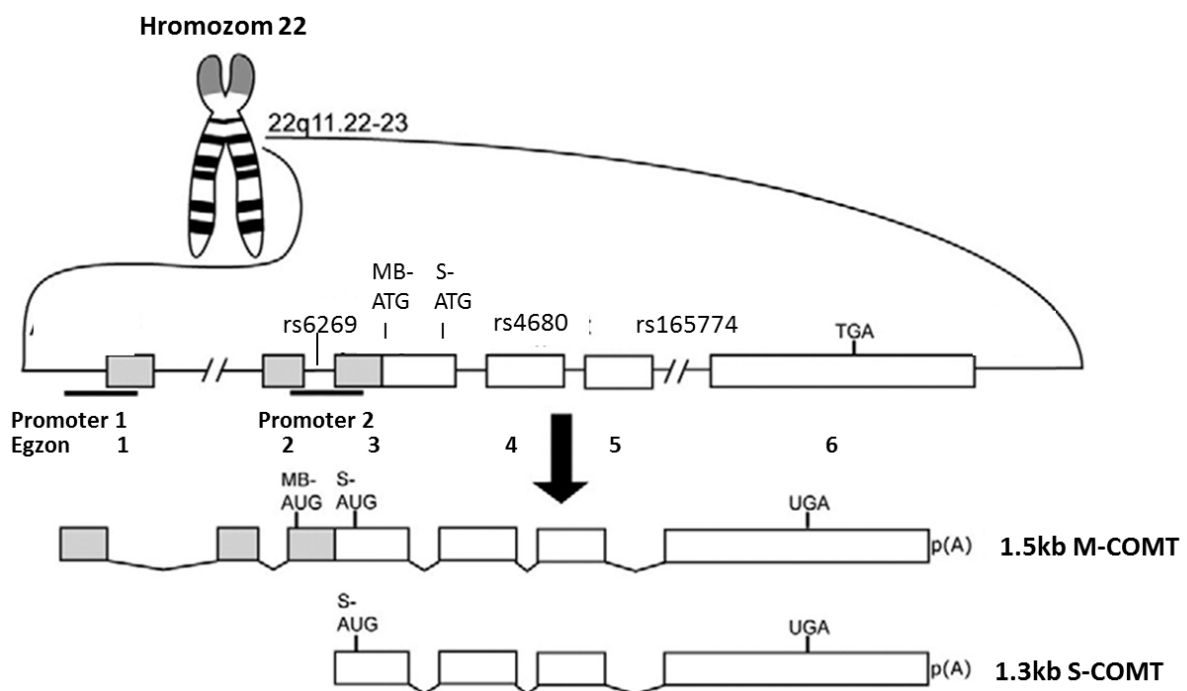


Slika 5. Kristalna struktura proteina COMT čoveka. Preuzeto iz Rutherford i sar., 2008.



Slika 6. Shematski prikaz metaboličkog puta kateholamina na primeru noradrenalina. Preuzeto sa: <http://pharmaxchange.info/press/>

Gen za COMT lociran je na 22. hromozomu, u regiji q11.21 i obuhvata 27 221 bazu Bækken i sar., 2008). Sadrži šest egzona (od čega su prva dva nekodirajuća) i dva zasebna promotora koji kontrolišu ekspresiju a nalaze se u 3. egzonu (Tunbridge i sar., 2006; Kambur, 2013) (Slika 7). Ovaj gen kodira dva poznata oblika enzima, solubilni COMT (S-COMT) i COMT vezan za membranu (MB-COMT) (Tenhunen i sar., 1994) kao i 8 drugih izoformi (Tunbridge i sar., 2007). S-COMT preovlađuje u većini tkiva, osim u mozgu (Hong i sar. 1998). Promotor 2 nadzire sintezu mRNA dužine 1,5 kb čijom translacijom mogu nastati oba oblika enzima. Promotor 1 je odgovoran za sintezu mRNA od 1,3 kb (Tenhunen i sar., 1994). Ova mRNA ne sadrži početni kodon za MB-COMT i stoga se može prevesti samo u S-COMT (Tenhunen i sar., 1994).



Slika 7. Gen za COMT sa lokacijama ispitivanih polimorfizama (rs6269, rs4680 i rs165774) na hromozomu 22 i transkripti. Sekvence u sivoj boji odgovaraju 1.5kb transkriptu. (MB-/S- ATG/AUG - početni kodoni; TGA/UGA – terminirajući kodon) (Tunderbridge i sar., 2006)

Na nivou nociceptivnih puteva, COMT je prisutan u perifernim strukturama, kao što su ganglije perifernih senzornih neurona, površnim laminama zadnjih rogova kičmene moždine, (Karhunen i sar., 1996) kao i u nekim supraspinalnim regijama, najviše u prefrontalnom korteksu i corpus striatum (Myöhänen i sar., 2010). Generalno, zastupljenost i aktivnost COMT je daleko veća u perifernim nego u moždanim strukturama (Myöhänen i sar., 2010). Pored razlike u distribuciji S-COMT i MB-COMT, dva oblika enzima se i funkcionalno razlikuju. U moždanom tkivu, COMT pomaže eliminaciji kateholamina intracelularno, u postinaptičkim neuronima (Männistö i sar. 1992) ili ekstracelularno (Chen i sar., 2011).

MB-COMT poseduje veći afinitet za vezivanje derivata katehola nego S-COMT, ali S-COMT ima veći enzimski kapacitet (Lotta i sar., 1995). MB-COMT je funkcionalno važniji, jer u slučaju nedostatka S-COMT, MB-COMT je u stanju da kompenzira oko 50% funkcije enzima, čak i u perifernim tkivima. O drugim izoformama COMT enzima se malo zna.

Polimorfizmi gena za COMT utiču na aktivnost enzima i povezuju se sa različitostima u percepciji bola, kao i u raspoloženju, kognitivnim sposobnostima i odgovorom na fizički ili emocionalni stres (Belfer i sar., 2013).

1.4.1.1.1. Polimorfizam gena za COMT i bol

Još 1976. Marbach i Levitt su uočili povezanost hroničnog facijalnog bola sa smanjenom aktivnošću eritrocitne COMT i povećanjem nivoa metabolita kateholamina u urinu. Zubieta i sar. (2003) su pre više od decenije ukazali na povezanost jednog polimorfizma ovog gena, Val¹⁵⁸Met, sa percepcijom bola i bolnim reakcijama kod zdravih ispitanika. Kasnija istraživanja su utvrdila da se gen za COMT odlikuje velikim brojem funkcionalnih polimorfizama koji mogu doprineti interindividualnoj varijabilnosti u bolnoj osetljivosti (Belfer i sar., 2013). Fenotipske varijacije uključuju osetljivost na bolne stimuluse, intenzitet, hronicitet bola i odgovor na analgetike (Diatchenko i sar., 2005). Mehanizmi preko kojih polimorfizmi gena dovode do smanjenja aktivnosti COMT i povećanja bolne osetljivosti nisu sasvim razjašnjeni. Pretpostavlja se da genske varijacije za posledicu imaju izmenu u sekundarnoj strukturi mRNK, što utiče na efikasnost translacije proteina i dovodi do različite aktivnosti enzima (Diatchenko i sar., 2005). Jedan od predloženih mehanizama preko kojih snižena aktivnost COMT dovodi do pojave bola odnosi se na povećanje ekstracelularnog nivoa kateholamina (Meloto i sar., 2011; Tammimäki i Männistö, 2012) koji dovodi do stimulacije β_2 receptora (Meloto i sar., 2011). Dok se na periferiji pojava bola povezuje sa sniženom aktivnošću COMT i povišenim nivoom kateholamina, u kičmenoj moždini i mozgu snižena enzimaska aktivnost COMT, te visok nivo dopamina ima antinociceptivno dejstvo (Tammimäki i Männistö, 2012). Drugi mogući mehanizam vezan je za aktivaciju dopaminergičkog prenosa, što za posledicu ima smanjenje nivoa enkefalina (endogenih opioidnih peptida) (Zubieta i sar., 2003; Diatchenko i sar., 2005). Smatra se da bolna osetljivost u zavisnosti od funkcionalnih polimorfizama gena za COMT može biti vezana za određene tipove bola (Belfer i sar., 2013). Segall i sar. (2012) su izneli pretpostavku da COMT ispoljava suprotne efekte kada su u pitanju nociceptivni i neuropatski bol. Prema ovim autorima nociceptivni, inflamatorni, kao i i muskuloskeletni bol kod čovjeka izazvani su stimulacijom perifernih adrenergičkih receptora. Sa druge strane, neuropatski bol se smanjuje povećanjem stimulacije adrenergičkih receptora kateholaminima.

Iako je aktivnost COMT regulisana velikim brojem SNP, samo se neki od polimorfizama dovode u vezu sa pojavom TMD (Tammimäki i Männistö, 2012, Michelotti i sar., 2014). Varijabilnost gena za COMT

povezuje se sa rizikom za nastanak TMD (Oakley i Vieira, 2008), regulacijom bolne osetljivosti (Diatchenko i sar., 2005; Allegri i sar 2010), pojavom hroničnog temporomandibularnog bola (Diatchenko i sar., 2005; Tammimäki i Männistö, 2012), a pretpostavlja se da igraju ulogu i u polno vezanoj razlici u pojavi TMD (Oakley i Vieira, 2008)

Aleli sa učestalošću polimorfizma <0,15% sa malom verovatnoćom mogu imati značajan uticaj na pojavu obolenja sa visokom prevalencom u opštoj populaciji, kao što je TMD (Risch 2000). Samo 6 polimorfizama gena za COMT javlja se sa učestalošću >40% (rs2097903, rs6269, rs4633, rs4818, rs4680 i rs165599) (Diatchenko i sar., 2005). Stoga su ovi SNP najčešće ispitivani u kliničkim studijama sa različitim bolnim stanjima (Tammimäki i Männistö, 2012). SNP rs6269 se nalazi u promotorskom regionu gena koji kodira S-COMT. Prema rezultatima studije Diatchenko i sar. (2005), doprinos polimorfizma rs6269 nastanku bolne osetljivosti iznosi oko 6%. Ovaj polimorfizam se također dovodi u vezu i sa povećanim rizikom za fibromialgiju i većim intenzitetom bola (Vargas-Alarcón i sar., 2007) i postoperativnim bolom (Lee i sar., 2011). SNP rs4633, rs4818 i rs4680 su smešteni u kodirajućem regionu gena za S- i MB-COMT (Diatchenko i sar., 2005). SNP rs4680 je najizučavaniji COMT polimorfizam, a kodira zamenu G-u-A, odnosno valina (Val) metioninom (Met) na poziciji 158 (za MB-COMT), odnosno 108 (za S-COMT) (Lotta i sar., 1995) (Val^{108/158}Met). Ova zamena stvara termolabilnu formu enzima koja ima 3-4 puta smanjenu aktivnost (Lotta i sar., 1995). Nosioци Met/Met genotipa pokazuju veću bolnu osetljivost od homozigota sa Val/Val genotipom (Diatchenko i sar., 2005). Aleli su kodominantni, te je enzimска aktivnost kod heterozigota između vrednosti homozigota (Massat i sar. 2005). SNP rs4680 se povezuje sa pojavom migrenoznih glavobolja (Park i sar., 2007), fibromijalgije (Finan i sar., 2011, Barbosa i sar., 2012), hroničnim postoperativnim bolom (Hickey i sar., 2011; Fernández-de-Las-Peñas i sar., 2012) i miofascijalnim bolom (Erdal i sar., 2003) Međutim, veliki broj studija na humanom modelu nije potvrdio postojanje veze ovog polimorfizma sa različitim bolnim fenotipovima (Kim i sar., 2006a; Cevoli i sar., 2006; Hagen i sar., 2006a, 2006b; Hocking i sar., 2010; Vossen i sar., 2010; Nicholl i sar., 2010; Xiang i sar, 2012).

Rezultati studija u kojima je ispitivana povezanost između genskih polimorfizama i pojave bola ukazuju na činjenicu da je modulacija bola preko gena za COMT pre regulisana sadejstvom više pojedinačnih polimorfizama u okviru jednodnog haplotipa koji dovode do smanjene aktivnosti COMT, nego i sa jednim pojedinačnim SNP (Kambur i Männistö, 2010) Proučavajući varijabilnosti gena koji determiniše COMT kao i njihovu ulogu u pojavi akutnog eksperimentalnog bola i sklonosti ka nastanku TMD Diatchenko i sar. (2005) su utvrdili postojanje tri osnovna haplotipa. Oni predstavljaju najčešće kombinacije (kod oko 96% ispitanika uočen je jedan od haplotipova) četiri SNP koji čine drugi haploblok gena za COMT: rs6269, rs4633, rs4818, rs4680. Ovi haplotipovi fenotipski odgovaraju niskoj, srednjoj i visokoj bolnoj osetljivosti, i do danas su najčešće proučavani COMT haplotipovi u okviru različitih bolnih stanja (Vargas-Alarcón i sar. 2007; Tammimäki i Männistö, 2012; Martínez-Jauand i sar. 2013). Kasnije studije su potvrdile da haplotip sa povećanom bolnom osetljivošću povećava rizik za nastanak TMD

(Smith i sar., 2011) i smanjuje efikasnost terapije propranololom kod pacijenata sa bolnim TMD (Tchivileva i sar., 2011) Povezanost COMT haplotipova utvrđena je i za pojavu TMD bola kod pacijenta podvrgnutih ortodontskoj terapiji (Slade i sar., 2008). Međutim, rezultati mnogih studija nisu potvrdili povezanost između ovih haplotipova gena za COMT i različitih modaliteta bola: multiplog somatoformnog poremećaja (Jakobi i sar., 2010), hroničnog generalizovanog bola (Nicholl i sar., 2010) , postoperativnog akutnog bola (Kim i sar., 2006a), i dr. Rezultati istraživanja Kim i sar. (2006a) su čak pokazali da je haplotip koji se povezuje sa sniženom bolnom osetljivošću (Diachenko i sar., 2005) prisutan i kod ispitanika koji imaju visoku osetljivost na bolne nadražaje. Nova istraživanja ukazuju na moguću povezanost TMD sa nekim drugim polimorfizmima gena za COMT (Smith i sar., 2011; Michelotti i sar., 2014), a koji mogu delovati nezavisno od SNP uključenih u navedene haplotipove.

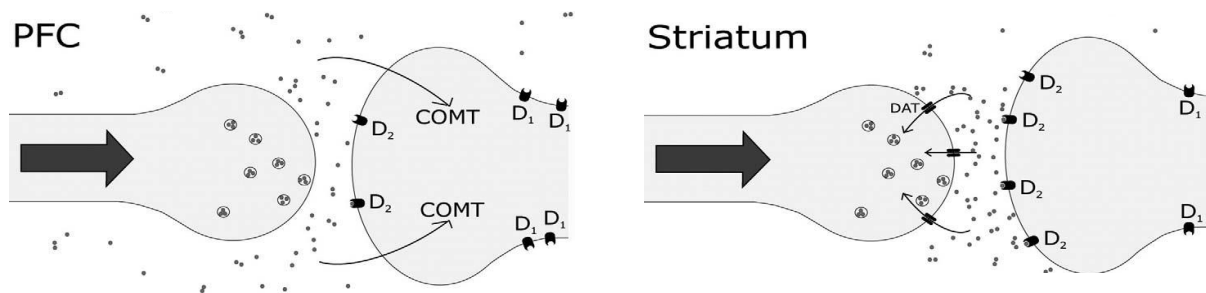
SNP rs165774 se nalazi u intronskom regionu u genu za COMT, između 5 i 6 egzona, deo je drugog haplobloka gena koji kodira COMT (Kambur i sar., 2013b), a pokazuje dominantni tip nasleđivanja (Voisey i sar., 2011). Prema rezultatima studije u kojoj je ispitivana bolna osetljivost na različite nadražaje od svih proučavanih polimorfizama gena za COMT, SNP rs165774 je pokazao najveću povezanost sa bolnom osetljivošću na toplo (Kambur i sar 2013). Ovaj SNP također se dovodi u vezu sa akutnim bolom (Applebaum, 2009), fibromijalgijom (Garcia-Fructoso i sar., 2008), hroničnim posttraumatskim bolom (Bortsov i sar., 2014) i mentalnom retardacijom (Zhang i sar., 2007). Meloto i sar. (2015) su utvrdili da ovaj SNP ima ulogu u ekspresiji nove izoforme COMT koja pokazuje veću efikasnost u razgradnji dopamina. Autori su također ukazali na moguću povezanost rs165774 sa pojavom bolnih temporomandibularnih disfunkcija.

1.4.1.1.2. Polimorfizam gena za COMT, depresija i somatizacija

Depresija i somatizacija su multifaktoriijelni poremećaji, a nastaju interakcijom velikog broja različitih gena sa faktorima sredine (Massat i sar., 2005). Genetički faktori mogu doprineti nastanku simptoma depresije i somatizacije pre svega preko gena koji regulišu monoaminergičke puteve, HPA osu, imuni odgovor i metabolizam omega masnih kiselina (Rief i sar. 2010). Među genima koji bi mogli biti odgovorni za regulaciju monoaminergičkih puteva, navode se geni za COMT (Klengel i sar., 2011).

Procenjuje se da udeo nasleđa u nastanku depresije iznosi gotovo 40% (Sullivan i sar., 2000). Uloga polimorfizama gena koji kodira COMT ogleda se u uticaju na više nivoa: na pojavu depresije, odgovor na antidepressive, popratne neurološke poremećaje (endofenotipove depresije) i ponašanje. Depresija se generalno dovodi u vezu sa povećanom aktivnošću enzima. Naime, COMT je važan regulator dopaminergičke neurotransmisije u prefrontalnom korteksu, a odgovoran je za oko 60% razgradnje dopamina (Karoum i sar., 1994). COMT kataboliše i ostale kateholamine i kateholne estrogene, koji se povezuju sa kognitivnim i emocionalnim funkcionisanjem (Bilder i sar., 2004) Povećana enzimska

aktivnost COMT dovodi do smanjenja noradrenalina i dopamina na sinaptičkim pukotinama i može povećati sklonost ka nastanku depresije (Massat i sar., 2005) (Slika 8).



Slika 8. Dopaminergička transmisija: prefrontalni korteks (PFC) i corpus striatum. COMT igra ključnu ulogu u uklanjanju dopamina (D) iz sinaptičke pukotine u PFC (Tunbridge i sar., 2006)

Međutim, podaci dobijeni u kliničkim studijama o povezanosti gena za COMT sa pojavom i izraženošću depresije su kontradiktorni. Tako su za najizučavaniji COMT polimorfizam, rs4680 (Val^{108/158}Met), neke studije pokazale povezanost depresije sa Met alelom (Mandelli i sar., 2007; Åberg i sar., 2011) dok druge ukazuju na povezanost sa Val alelom (Funke i sar., 2005; Massat i sar. 2005; Bækken i sar. 2008) (Antypa i sar., 2013) Sa druge strane, postoje dokazi koji govore u prilog povezanosti varijabilnost gena za COMT sa pojedinim neurološkim promenama koji prate depresiju (tzv. endofenotipovima) (Rasch i sar., 2005; Smolka i sar., 2010), kao i sa odgovorom na terapiju antidepresivima (Antypa i sar., 2013). Varijabilnost gena za COMT također utiče na kognitivno i emocionalno funkcionisanje preko katabolizma ostalih kateholamina i kateholnih estrogena (Bilder i sar., 2004). Uticaj polimorfizama gena za COMT na fenotipove depresije može biti moduliran uticajem drugih faktora, kao što su stres (Mandelli i sar., 2007) ili pol (Laatikainen i sar., 2013). Prema neki autorima, polimorfizmi gena za COMT ulogu u pojavi depresije ostvaruju u okviru haplotipova (Funke i sar., 2005; Kocabas i sar., 2010).

Patofiziološki mehanizmi odgovorni za nastanak somatizacije nisu u potpunosti poznati, (Holliday i sar.; 2010). Rezultati studija na blizancima ukazali su na postojanje nasledne komponente za pojavu somatizacije, (Gillespie i sar., 2000; Lembo i sar. 2008) kao i za različite sindrome koje karakteriše prisustvo simptoma somatizacije (Holliday i sar.; 2010). Ispitivanja bazirana na polimorfizmima nuklotidne sekvence izučavala su gene vezane za monoaminergički sistem i HPA (Rief i sar., 2010; Holliday i sar., 2010; Klengel i sar., 2011). Među genima koji učestvuju u regulaciji monoaminergičkih puteva navode se geni za COMT, dopaminski receptor (DRD4), enzim triptofan hidrolazu (TPH1, TPH2), transporter noradrenalina (SLC6A2) i serotonina (SLC6A4, 5-HTTLPR) i serotoninski receptor (HTR2A) (Rief i sar., 2010; Holliday i sar., 2010; Klengel i sar., 2011). Moguća uloga gena za COMT odnosi se na pojavu bolnih

simptoma somatizacije. Snižena enzimaska aktivnost COMT, budući da utiče na sniženje praga bola, dovodi se u vezu sa somatizacijom (Rief i sar., 2010).

Studije koje su sprovedene na pacijentima sa različitim hroničnim bolnim stanjima dale su različite rezultate o povezanost polimorfizama gena koji kodira COMT i simptoma depresije/somatizacije. Tako je pokazana povezanost SNP rs4633 i rs4680 sa depresijom i anksioznošću kod pacijenta sa hroničnim lumbalnim bolom (Omair i sar., 2012). Rezultati studije Martínez-Jauand i sar. (2013) ukazuju na značajnu povezanost opšte anksioznosti i afektivnog poremećaja, ali ne i trenutne anksioznosti i depresije sa Met (A) alelom polimorfizma rs4680 kod pacijenata sa fibromialgijom. Također, još uvek nema dokaza o direktnoj povezanosti polimorfizama gena za COMT sa simptomima depresije i somatizacije kod pacijenata sa TMD (Slade i sar., 2007; Schwahn i sar., 2011).

1.5. Oralnohirurške intervencije i nastanak TMD

Traumom tkiva (perifernih nerava, mekih i koštanih struktura) hirurške intervencije u orofacijalnoj regiji pokreću niz mehanizama koji mogu dovesti do pojave različitih simptoma, uključujući ograničene kretnje mandibule, poremećaj funkcija i pojavu postoperativnog bola (Juhl i sar., 2009). Bol nakon oralnohirurških intervencija obično je akutan i lokalnog karaktera, ali može poprimiti hroničan tok, ili zahvatiti i druge strukture u orofacijalnoj regiji, žvačne mišiće i temporomandibularni zglob (Huang i Rue, 2006 Juhl i sar., 2009)

Hronični postoperativni bol definiše se kao bol koji je nastao nakon hirurške intervencije, traje barem 2 meseca, a drugi izvori bola, uključujući i preoperativno prisutne bolne simptome, mogu se isključiti (Macrae i Davies 1999). Prelazak akutnog postoperativnog bola u hronični je složen i nedovoljno razjašnjen proces, a uključuju biološke, psihološke i socijalno-ekološke faktore (Katz i Seltzer, 2009). Postoperativni hronični bol u orofacijalnoj regiji pripisuje se razvoju neuropatskog bola (Juhl i sar., 2009) ili pojavi temporomandibularnog bola (Berge, 2002).

Više kliničkih studija ispitivalo je povezanost oralnohirurških intervencija i pojave TMD (Berge, 2002; Huang i sar., 2002. i 2006; Israel i sar., 2003; Akhter i sar., 2008; Juhl i sar., 2009). Nalazi nekih od istraživanja ukazuju da oralnohirurška trauma može imati ulogu u nastanku ili održanju znakova i simptoma disfunkcije (Huang i sar., 2002 i 2006; Israel i sar., 2003; Akhter i sar., 2008). Sa druge strane, rezultati drugih studija ne nalaze vezu između oralnohirurških intervencija i učestalije pojave simptoma i znakova TMD (Berge, 2002; Huang i sar., 2008; Juhl i sar., 2009).

Prisustvo znakova i simptoma TMD nakon oralnohirurških intervencija pripisuje se primeni sile na mandibulu u toku intervencije, dugom držanju otvorenih usta, uticaju neurobioloških faktora,

postoperativnim depresivnim simptomima, odsustvu protektivnih mehanizama u opštoj anesteziji, te preoperativno prisutnim znakovima i simptomima TMD (Huang i Rue, 2006; Juhl i sar., 2009). Usled dejstva sile većeg intenziteta na mandibulu u toku hirurškog zahvata može doći do prisilnog pomeranja kondila posteriorno (Juhl i sar., 2009), dislokacije diskusa (Huang i Rue, 2006) te do oštećenja zglobnih tkiva (diskusa i hrskavice) i rastezanja mišića i ligamenata (Huang i Rue, 2006), što se može manifestovati pojavom simptoma i znakova mišićne (Huang i sar., 2002) i zglobne disfunkcije (Juhl i sar., 2009). Dugo držanje otvorenih usta u toku oralnohirurških intervencija također deluje traumatski na TMZ i mastikatorne mišiće, te dovodi do pojave znakova i simptoma TMD (Huang i sar., 2002; Huang i Rue, 2006). Složenim promenama u perifernim tkivima i primarnim aferentnim nociceptivnim vlaknima, te izmenama u prenosu i *integraciji* bolnih impulsa na nivou CNS-a (periferna i centralna senzitivacija) akutna povreda tkiva dovodi do pojave hroničnog bola (Hansson, 2006; Juhl i sar., 2006; Juhl i sar., 2008). Oštećenje aferentnih nerava može biti okidač za povećanje intenziteta akutnog postoperativnog bola i njegovog prelaska u hronični bol (Katz i Seltzer 2009). Povreda nerava dovodi do pojave akutnih, ali i dugotrajnih promena ne samo u oštećenim, nego i u intaktnim okolnim nervnim vlaknima, na nivou puteva bola u CNS-u i u motornim i simpatičkim reakcijama (Devor i Seltzer, 1999). Nekoliko psihosocijalnih faktora: preoperativna anksioznost, depresija, neuroticizam i katastrofiziranje povezano je sa razvojem visokog intenziteta postoperativnog bola i može imati negativan efekat na hirurški ishod (Werner i sar., 2010). Kod pacijenata kod kojih se oralnohirurške intervencije vrše u opštoj anesteziji, izostaje dejstvo protektivnih mehanizama koji se suprotstavljaju urušavanju orofacijalnog sistema (Huang i Rue, 2006 ; Huang i sar., 2002).

Najviše ispitivana oralnohirurška intervencija sa aspekta pojave TMD svakako je ekstrakcija trećeg molara. Ekstrakcija trećeg molara je najčešći oralnohirurški operativni zahvat, (Berge, 2002. 108) a praćen je pojavom akutnog postoperativnog bola. Iako ovaj bol retko poprima hronični karakter, najveći procenat hroničnih bolnih simptoma nakon hirurške ekstrakcije impaktiranih trećih molara može se pripisati temporomandibularnom bolu (Berge, 2002.). Više kliničkih studija dalo je različite rezultate kada je u pitanju pojava TMD nakon hirurške ekstrakcije impaktiranih trećih molara (Berge ,2002.; Huang i sar., 2002. i 2006; Akhteri sar., 2008; Juhl i sar., 2009). Kao faktori rizika za pojavu disfunkcije u postoperativnom periodu navode se mlađi uzrast ispitanika (Huang i sar., 2008), veći stepen impakcije (Huang i sar., 2008), prisustvo depresije (Juhl i sar., 2009), te postojanje preoperativnog bola, ili drugih znakova i simptoma TMD (Juhl i sar., 2009; Berge, 2002). Prema pretpostavci Slade i sar. (2008), terapijske procedure u orofacijalnoj regiji deluju kao faktori sredine, koji kod pojedinaca sa naslednom sklonošću ka razvoju bola dovode do pojave bolnih simptoma.

1.5.1. Postoperativni bol i polimorfizam gena

Rezultati brojnih istraživanja govore u prilog postojanju genske kontrole bola nakon različitih hirurških zahvata. Genski polimorfizmi mogli bi biti odgovorni za pojavu akutnog bola nakon hirurške intervencije (Allegrini i sar., 2010) kao i za sklonost ka razvoju hroničnog postoperativnog bola (Kehlet i sar., 2006). Ipak, još uvek nisu prepoznati geni koji predodređuju nekoga za pojavu postoperativnog bola ili za tranziciju akutnog postoperativnog bola u hronični (Katz i Seltzer, 2009; Ballantyne i sar., 2011).

Polimorfizmi gena za COMT dovode se u vezu sa pojavom postoperativnog bola nakon tonzilektomije (Sadhasivam i sar. (2014), hirurškog odstranjenja karcinoma dojke (Kambur i sar., 2013b) operativnih zahvata na ramenu (George i sar., 2008), i lumbalnom delu kičme (Dai i sar., 2010).

Samo dve studije su ispitivale povezanost pojave bola nakon hirurške ekstrakcije impaktiranih trećih molara sa polimorfizmima gena za COMT. Kim i sar. (2006a) su analizirali pojavu akutnog postoperativnog bola, kod pacijenata kod kojih je hirurški vađen jedan ili više impaktiranih donjih trećih molara. Prema rezultatima ove studije, povezanost sa intenzitetom akutnog postoperativnog bola utvrđena je za SNP rs740603, ali ne i za ostale polimorfizme gena za COMT. U studiji Lee i sar. (2011) ispitivana je pojava akutnog i hroničnog postoperativnog bola kod pacijenata kod kojih je bilo indikovano vađenje više trećih molara pod opštom anestezijom. Za dva ispitivana polimorfizma (rs4818 i rs6269) utvrđena je povezanost sa akutnim postoperativnim bolom.

Imajući u vidu razlike u učestalosti genskih polimorfizama između etničkih grupa, različitost u nalazima o povezanosti gena za COMT sa hroničnim bolnim stanjima, mali broj studija o povezanosti sa pojavom TMD, nedostatak rezultata o povezanosti sa depresijom i somatizacijom kod pacijenata sa TMD i o povezanosti sa nastankom simptoma TMD nakon hirurške ekstrakcije impaktiranih trećih molara, cilj ove studije bi bio da se ispita zastupljenost varijanti gena za katehol-o-metil-transferazu (COMT) i njihov uticaj na pojavu TMD, temporomandibularnog bola, simptoma depresije i somatizacije i razvoj bola nakon hirurške ekstrakcije impaktiranih trećih donjih molara.

2. HIPOTEZA

Polimorfizmi gena za katehol-O-metil-transferazu udruženi su sa:

- pojavom temporomandibularnih disfunkcija, temporomandibularnog bola, simptomima depresije i somatizacije i bolnom osetljivošću i
- pojavom temporomandibularnog bola nakon ekstrakcije impaktiranih trećih donjih molara.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- utvrditi učestalost genotipova i frekvenciju alela za katehol-O-metil transferazu (COMT), u grupi obolelih od TMD i zdravih ispitanika bez TMD;
- utvrditi povezanost ispitivanih polimorfizama gena za COMT sa TMD;
- utvrditi povezanost ispitivanih polimorfizama gena za COMT sa karakteristikama bola i pojavom hroničnog temporomandibularnog bola;
- utvrditi povezanost ispitivanih polimorfizama gena za COMT sa pojavom simptoma depresije i somatizacije kod pacijenata sa TMD i zdravih ispitanika;
- utvrditi povezanost ispitivanih polimorfizama gena za COMT sa bolnom osetljivošću i pojavom temporomandibularnog i lokalnog bola nakon hirurške ekstrakcije impaktiranih trećih donjih molara kod pacijenata sa TMD i zdravih ispitanika.

4. MATERIJAL I METODOLOGIJA

4.1. Etičke izjave

Studija je odobrena od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Istočnom Sarajevu. Svi ispitanici koji su učestvovali u studiji bili su upoznati sa svrhom i postupkom ispitivanja, i od njih je dobijena pismena saglasnost. Istraživanja su sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom iz 1964. godine, verzija iz 2004 i po principima Dobre kliničke prakse.

Istraživanje se sastojalo iz dva dela. Prvi deo je dizajniran kao studija slučaj-kontrola, a drugi deo kao prospektivna studija.

4.2. Studija slučaj-kontrola

4.2.1. Ispitanici

U okviru prvog dela istraživanja koji je dizajniran kao studija slučaj-kontrola ispitivane su dve grupe ispitanika. Veličina uzorka kako bi se postiglo 80% statističke snage za jedan SNP u studiji dizajniranoj kao slučaj-kontrola sa odnosom 1:1 između ispitanika u grupama, i uz pretpostavku o učestalosti obolenja od 5% (kako je utvrđeno za pacijente sa TMD koji se javljaju na lečenje), zastupljenosti ređeg ili minor alela (engl. Minor Allele Frequency (MAF)) od 5%, potpunu vezanost (LD), statističku grešku od 5% ($\alpha=0,05$), za dominantni model nasleđivanja iznosila je 90 ispitanika (Hong i Park, 2012).

Selekcija ispitanika za TMD grupu vršena je među pacijentima koji su se javili na lečenje zbog postojanja znakova i simptoma TMD na Odjeljenje za stomatološku protetiku na Medicinskom fakultetu u Foči, RS, BiH u periodu od novembra 2015 do februara 2016. U studiji su mogli da učestvuju pacijenti koji su zadovoljili kriterijume Standardizovanog protokola za temporomandibularne disfunkcije (RDC/TMD) (Dworkin i LeResche, 1992) o postojanju nekog od tipova TMD, sa bolnim simptomima, oba pola.

Ispitanici kontrolne grupe odabrani su među pacijentima koji su se javili na redovnu kontrolu na Odjeljenje za karijesologiju i endodonciju na Medicinskom fakultetu u Foči. U kontrolnu grupu su mogli biti uključeni ispitanici bez znakova i simptoma TMD, tako da struktura grupe prema polu i uzrastu odgovara eksperimentalnoj grupi.

Iz studije su isključeni ispitanici mlađi od 18 i stariji od 45 godina, ispitanici sa sistemskim obolenjima, ispitanici sa hroničnim bolom u orofacijalnoj regiji drugog porekla, trudnice, dojilje, i žene sa neregularnim menstrualnim ciklusima, ispitanici koji su uzimali lekove sa analgetskim dejstvom, mišićne relaksante, lekove koji utiču na aktivnost CNSa, ili β -blokatore (u slučaju da je ispitanik uzimao neki od analgetika, pregled je obavljen 12 sati nakon uzimanja zadnje doze), ispitanici koji su imali povrede ili hirurške intervencije u orofacijalnoj regiji u toku poslednjih 6 nedelja, ispitanici sa nestabilnim okluzalnim kontaktima, ispitanici kod kojih nedostaje 1 ili više zuba sa ili bez protetskih nadoknada i pacijenti kod kojih je indikovana ili je u toku ortodontska terapija.

4.2.2. Klinički parametri - Utvrđivanje dijagnoze TMD i stepena temporomandibularnog bola, depresije, somatizacije i udaljenog bola

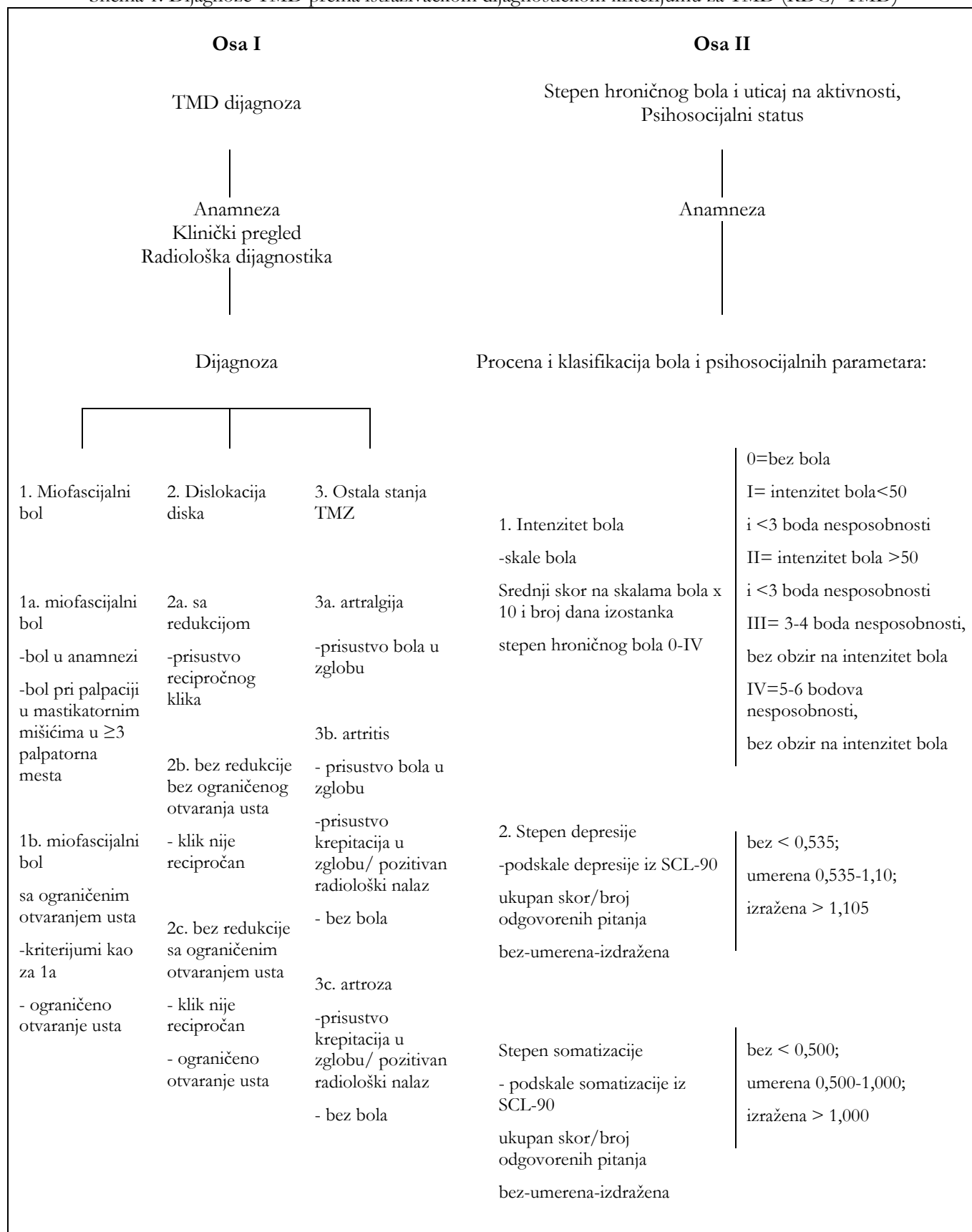
Kao dijagnostički kriterijum za određivanje postojanja TMD, kao i utvrđivanje stepena hroničnog temporomandibularnog bola analiziranih pacijenata, korišćen je standardizovani protokol za temporomandibularne disfunkcije, Research Diagnostic Criteria (RDC/TMD), predložen od Dworkina i LeResche (1992). Upitnik se sastoji iz anamnestičkog dela i dela u koji se unose podaci dobijeni na osnovu kliničkog ispitivanja. RDC/TMD sagledava TMD sa dva aspekta (ose). (Shema 1)

Osa I RDC/TMD upitnika koristi se u cilju dijagnostifikovanja TMD, pri čemu se utvrđuje i tip disfunkcije. RDC/TMD *razlikuje* tri osnovne dijagnostičke kategorije i nekoliko podtipova u okviru svake kategorije: miofascijalni bol (sa ili bez ograničenog otvaranja usta), dislokacija diska (sa ili bez redukcije, sa ili bez ograničenog otvaranja usta) i drugi poremećaji temporomandibularnog zgloba (artralgija, artritis, artroza). Dijagnostičke grupe su precizno definisane kriterijumom, u vidu prisustva specifičnih kombinacija znakova i simptoma TMD.

Osa II služi za utvrđivanje stepena hroničnog bola i njegovog uticaja na dnevne, radne aktivnosti i društveni život ispitanika, stepena depresije i somatizacije i ograničenosti funkcija mastikatornog sistema. Stepenu bola se utvrđuje pomoću 0-10 numeričke skale bola, a pacijenti na ovaj način procenjuju trenutni intenzitet bola, te prosečni i najviši stepen bola u toku prethodnih 6 meseci. Nivo depresije i somatizacije određuje se na osnovu podskala depresije i somatizacije iz upitnika simptoma SCL-90 psihometrijskog testa (Derogatis i Cleary, 1977) integrisanih u Osu II RDC/TMD protokola.

Za utvrđivanje postojanja bola na udaljenim mestima korišćen je SRQ (Symptom Report Questionnaire) upitnik (Lim i sar., 2010). SRQ je instrument za subjektivnu procenu obima i lokacije bola u periodu od 6 meseci pre pregleda. Za ovu studiju korišćeni su samo oni podaci iz SRQ upitnika koji se odnose na postojanje bola van orofacijalne regije.

Shema 1. Dijagnoze TMD prema istraživačkom dijagnostičkom kriterijumu za TMD (RDC/ TMD)



4.3. Prospektivna studija

4.3.1. Ispitanici

Prospektivna studija dizajnirana je u svrhu procene uticaja polimorfizama gena za COMT na pojavu bolne osetljivosti i temporomandibularnog bola nakon hirurške ekstrakcije impaktiranog trećeg donjeg molara. U studiji su učestvovali ispitanici iz studije preseka kod kojih je bila indikovana hirurška ekstrakcija barem jednog potpuno razvijenog impaktiranog trećeg donjeg molara u lokalnoj anesteziji, klasifikovani kao klasa I-III prema Američkom udruženju anesteziologa (ASA) (Cullen i sar., 2004), bez poznate preosetljivosti na artikain, paracetamol i brufen.

4.3.2. Hirurška intervencija

Uklanjanje impaktiranog umnjaka je vršeno po standardizovanom hirurškom protokolu, u lokalnoj anesteziji (4% artikain sa adrenalinom 1:200,000 (Ubistesin Forte, 3M ESPE AG, Seefeld, Nemačka)), bez korišćenja analgetika i antibiotika pre i propisivanja sedativa pre, u toku ili nakon intervencije. Hirurška intervencija podrazumeva odizanje bukalnog mukoperostanog režnja, uklanjanje kosti, i, u slučaju potrebe, separaciju zuba (Norholt, 1998) Za suzbijanje postoperativnog bola, davana se jedna udarna doza paracetamola (Panadol, GlaxoSmithKline, Dungaravan, Ireland) do 2g per os, te je propisan ibuprofen u dozi od 400 mg *per os*, po potrebi, a maksimalno šest puta dnevno, 5 dana postoperativno. Konci su uklanjani 1 sedmicu postoperativno.

Sve hirurške intervencije uradio je jedan specijalista oralne hirurgije.

4.3.3. Klinički parametri

Pacijenti su pregledani najranije 15 dana pre intervencije, te 7 dana i 3 meseca nakon operativnog zahvata. Prilikom svakog pregleda, pacijenti su ispitani prema propozicijama RDC/TMD upitnika, kako bi se utvrdilo prisustvo TMD i hroničnog bola, prema istim kriterijumima kako je to navedeno za studiju preseka. Pitanja vezana za trajanje bolnih simptoma (8-12. i 20.) preformulisana su u upitniku koji je korišćen 7 dana postoperativno.

Pored toga, praćen je intenzitet bola u regiji impaktiranog umnjaka preoperativno, odnosno području ekstrakcije 7 dana i 3meseca postoperativno na numeričkim skalama bola („Na skali od 0 do 10, pri čemu

je 0 bez bola, a 10 najjači mogući bol, kako bi ste ocenili vrednost trenutnog bola u predelu umnjaka?⁶). Tri meseca postoperativno, pacijenti su također ispitivani o trajanju bola u području ekstrakcije i dužini korišćenja analgetika („Koliko dana nakon vađenja umnjaka ste osećeli bol u predelu izvađenog zuba?; „Koliko dana posle vađenja umnjaka ste koristili lekove protiv bolova?⁶). U koliko su vađena oba donja umnjaka, u obzir su uzimane veće vrednosti.

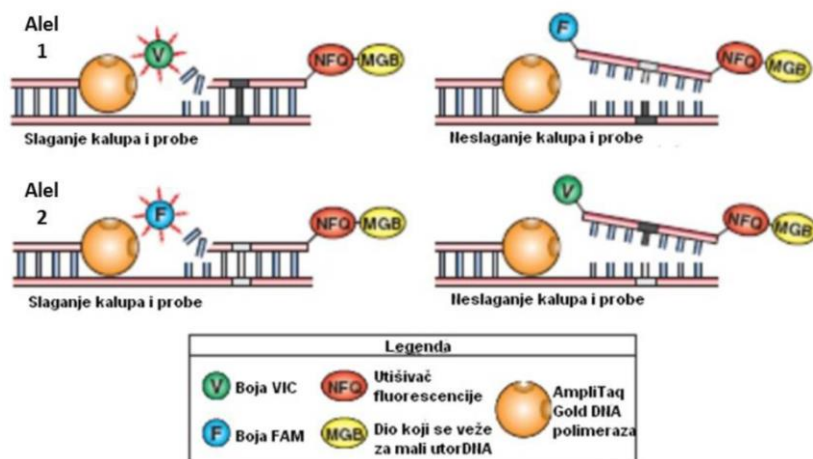
4.4. Genotipizacija

Svim ispitanicima je uzet uzorak venske krvi (2 ml) u plastične vakutajnere sa 3,2% natrijum-citratom, a uzorci su čuvani na -80°C do analize. Svi vakutajneri su bili kodirani brojevima. DNK je izolovana iz ukupno 182 uzorka krvi, 90 pacijenata i 92 zdravih ispitanika korišćenjem kita za izolaciju (DNK Blood Prep Isolation Kit, Qiagen, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Određivanje genotipa je obuhvatilo tri polimorfizma gena za COMT, pod identifikacionim brojem rs4680 (Val^{108/158}Met), rs6269 i rs165774 u bazi podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije SAD (db SNP NCBI). SNP rs4680 kodira zamjenu G-u-A, odnosno valina metioninom na poziciji 158 (za MB-COMT), (Lotta i sar.,1995). odnosno 108 (za S-COMT) (Val^{108/158}Met). SNP rs6269 (A>G) se nalazi na promoterskom regionu gena koji kodira S-COMT, a SNP rs165774 (G>A) u intronskom regionu u gena, između 5 i 6 egzona i deo je 2. haplobloka gena koji kodira COMT (Kambur i sar., 2013b).

Određivanje genotipa obzirom na ove polimorfizme vršeno je metodom lančane reakcije polimeraze (engl. polymerase chain reaction (PCR)) u stvarnom vremenu (engl. real time PCR) korišćenjem predizajniranih esaja za određivanje polimorfizama jednog nukleotida sa odgovarajućim probama (TaqManSNP, Applied biosystems, Warrington, Velika Britanija) na real time PCR aparatu „ABI Prism 7500“ (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) (Slika 9). Sistem se zasniva na detekciji i kvantifikaciji fluorescentnog signala koji je direktno proporcionalan količini PCR produkta u reakciji. Korišćeni komercijalno dostupni Taqman esaji za alelsku diskriminaciju sadrže par prajmera koji se nalaze iznad i ispod mesta potencijalne promene, odnosno ciljne sekvence genomske DNK koji sadrži polimorfizam od interesa, kao i dve probe za obe alelske forme, probu za izvorni alel (engl. wild type, wt) i probu za mutirani alel. Alel specifične fluorescentne krive je detektovan i analiziran korišćenjem 7500 System SDS programa.

Genotipizacija je rađena na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu.

Svi vakutajneri su bili kodirani brojevima, a osobe koje su radile genotipizaciju nisu bile upoznate sa kliničkim parametrima.



Slika 9. Shematski prikaz metode lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (Real time PCR) (preuzeto od Applied Biosystems, SAD).

4.5. Statistička analiza

Prikupljeni podaci obrađeni su u SPSS 20,0 programu za Windows.

Metodama deskriptivne analize izračunavane su prosečne vrednosti i standardne devijacije za parametrijska obeležja, te učestalost za neparametrijska obeležja.

Kolmogorov-Smirnovljev test je pokazao da podaci vezani za intenzitet i trajanje bola nisu imali normalnu raspodelu ($p > 0,05$). U svrhu poređenja podataka između ispitivanih grupa korišćeni su Kraskal-Volisova jednofaktorska analiza varijanse i Man-Vitnijev U test (za numerička obeležja koja nisu pokazala normalnu raspodelu i rangirana atributivna obeležja), Studentov t-test, (za numerička obeležja sa normalnom raspodelom podataka), i Hi-kvadrat i Fišerov test tačne verovatnoće (za dihotomna atributivna obeležja).

U cilju prospektivnog praćenja znakova i simptoma korišćeni su Fridmanova analiza varijanse sa rangovima (za numerička obeležja koja nisu pokazala normalnu raspodelu i rangirana atributivna obeležja) i Kohrejnov Q test (za dihotomna atributivna obeležja). U slučaju da je dobijena statistički značajna razlika kao *post hoc* test nakon Fridmanovog testa primenjen je Vilkoksonov test ekvivalentnih parova, a nakon Kohrejnovog Q testa MekNemarov test.

Za utvrđivanje postojanja asocijacija između polimorfizama gena i ispitivanih kliničkih varijabli izračunavan je unakrsni odnos šansi (engl. odds ratio (OR)) sa 95% intervalom poverenja (engl. 95% confidence interval (CI)). Prilagođeni odnos šansi (engl. adjusted OR) je izračunavan uključujući promenjive: pol i godine starosti.

Haploview program, verzija 4.2, korišćen je za proveru odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Vajnbergove ravnoteže, utvrđivanje frekvencije haplotipova i testiranje neravnoteže vezanosti (LD) (D') među SNP na osnovu algoritma maksimizacije očekivanja (Barrett i sar., 2005). Najvažniji parametri za merenje jačine LD su r^2 i D' , a kreću se od 0 (odsustvo vezanosti odn. neravnoteže) do 1 (potpuna vezanost ili neravnoteža). Za utvrđivanje potencijalne povezanosti određenih haplotipova sa rizikom za nastanak TMD korišćen je program Thesias v.3.121 (Tregouet i Garelle, 2007).

p vrednosti ispod 0,05 su smatrane statistički značajnim, a svi korišćeni testovi su bili dvosmerni.

5. REZULTATI

5.1. Studija preseka

5.1.1. Odabir ispitanika i formiranje istraživačkih grupa

Odabir ispitanika i formiranje istraživačkih grupa prikazani su na shemi 2. Selekcija za TMD grupu izvršena je među 99 ispitanika koji su se javili na lečenje zbog postojanja znakova i simptoma TMD. Pet ispitanika je isključeno iz studije: 2 pacijenta nisu pripadala ni jednoj dijagnostičkoj kategoriji RDC/TMD upitnika (hipermobilnost TMZ), a 3 pacijenta su isključena zbog starosne dobi (n=1), skorašnje traume (n=1), odnosno započetog ortodontskog tretmana (n=1). Od 94 ispitanika koji su zadovoljila kriterijume za uključivanje/isključivanje, tri su odbila da učestvuju u studiji, a jedan je isključen u cilju smanjivanja podgrupa u uzorku, kao jedini sa dijagnozom artritisa TMZ. Konačni uzorak je činilo 90 pacijenata sa TMD, 68 žena, starosti 19-45 godina ($\bar{X} \pm SD$: 28,37 \pm 5,85)

Od 122 zdrava ispitanika koji su se javili redovnu kontrolu kod stomatologa, 23 je isključeno iz istraživanja zbog starosne dobi (n=12), opšteg oboljenja (n=1), trudnoće (n=1), ranije ortodontske terapije (n=2), ili nedostatka zuba sa ili bez protetske nadoknade (n=7). Od 99 ispitanika koji su zadovoljila kriterijume za uključivanje/isključivanje, sedam je odbilo da učestvuju u studiji. Kontrolnu grupu su činila 92 zdrava ispitanika, a struktura grupe je prema polu i uzrastu odgovarala eksperimentalnoj grupi.

5.1.2. Klinički parametri

Demografski podaci u ispitivanim grupama dati su u tabeli 1. Statistička analiza nije pokazala značajnu razliku u starosti, polu, stepenu obrazovanja, bračnom i pušačkom statusu između ispitivanih grupa.

Rezultati o zastupljenosti i stepenu depresije i somatizacije prema podskalama RDC/TMD kriterijuma, kao i o prisustvu udaljenog bola prikazani su u tabeli 2. Prisustvo simptoma depresije uočeno je kod čak 55,6% ispitanika sa TMD i kod 32,6% ispitanika u kontrolnoj grupi. Kod najvećeg procenta ispitanika sa depresivnim simptomima u obe grupe utvrđena je umerena depresija. Nespecifični fizikalni simptomi pratili su po zastupljenosti simptome depresije, i bili su prisutni kod 55,6% ispitanika sa disfunkcijom i 29,4% ispitanika kontrolne grupe. Kod ispitanika sa TMD uočen je značajno veći stepen depresije ($p=0,002$) i somatizacije ($p<0,001$). Poredeći zastupljenost prisustva bola na udaljenim mestima između grupa, utvrđeno je da su pacijenti sa TMD ukazali na značajno veću zastupljenost glavobolje ($p=0,006$) i bola u mišićima ($p=0,017$), a tendencija ka statističkoj značajnosti utvrđena je za ukupan broj bolnih mesta ($p=0,073$).

Schema 2: Odabir ispitanika i formiranje istraživačkih grupa

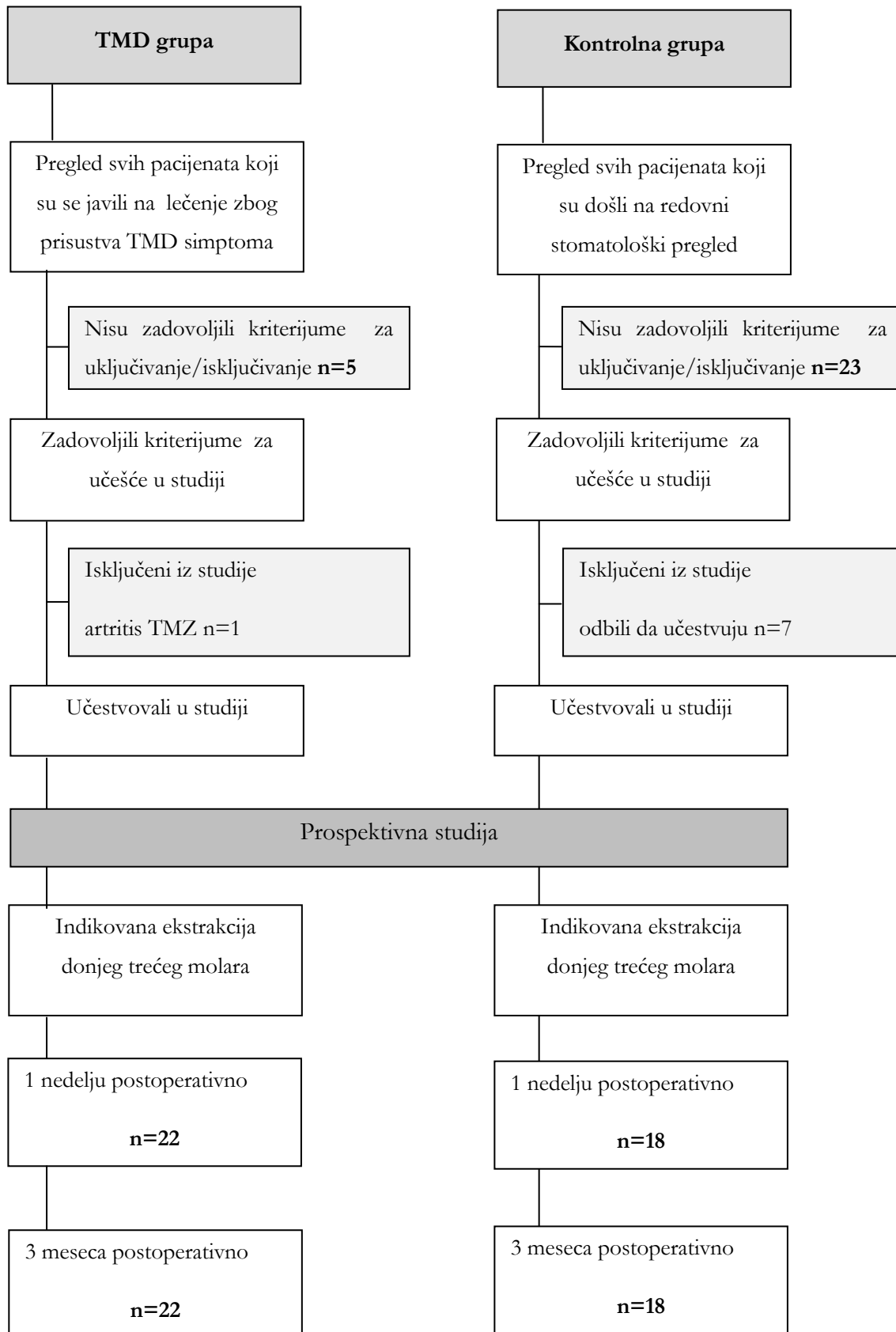


Tabela 1. Demografske karakteristike kod pacijenata sa TMD (n=90) i kontrolnih ispitanika (n=92)

			TMD grupa		Kontrolna grupa		<i>p</i> *
			(godine, $\bar{X} \pm SD$)				
Starost			28,37± 5,85		28,83 ± 6,34		NS
			n	(%)	n	(%)	
Pol	Ženski		68	75,6	57	62,0	NS
	Muški		22	24,4	35	38,9	
Najviši obrazovanja	stepen	Osnovna škola	0	0,0	0	0,0	NS
		Srednja škola	50	55,6	59	65,6	
		Viša škola	1	1,1	3	3,3	
		Fakultet	28	31,1	21	22,8	
		Poslediplomske studije	10	11,1	8	8,7	
Bračno stanje		Neoženjen/neudata	58	64,4	60	65,2	NS
		U braku	29	32,2	28	30,4	
		Razveden/a	1	1,1	1	1,1	
		Udovac/ica	0	0,0	1	1,1	
		Ostalo	2	2,2	2	2,2	
Pušenje		Nepušač	51	56,7	49	53,3	NS
		Bivši pušač	12	13,3	15	16,3	
		Pušač	27	30,0	28	30,4	

NS = bez statističke značajnosti na nivou $p > 0,05$

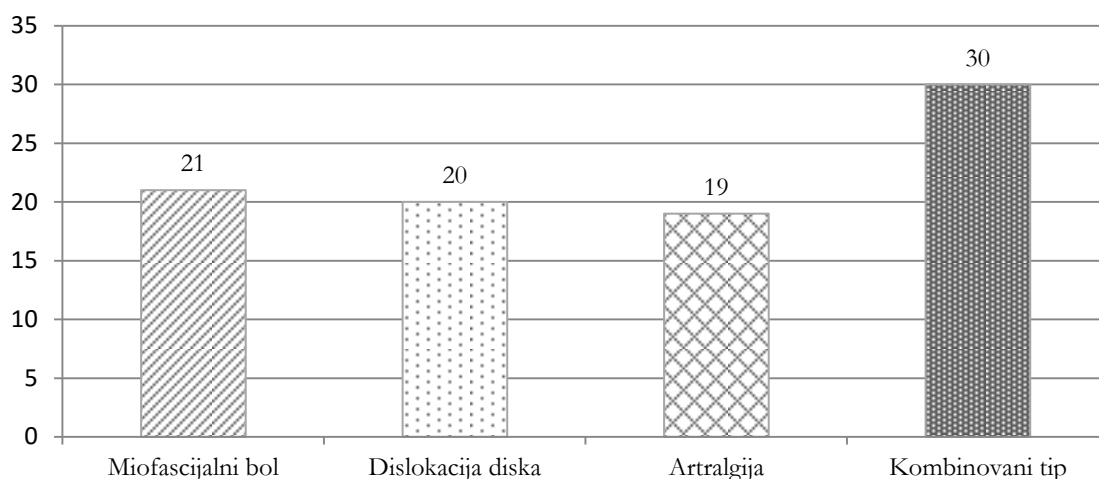
Tabela 2. Stepen depresije/somatizacije i prisustvo udaljenog bola kod pacijenata sa TMD (n=90) i kontrolnih ispitanika (n=92)

		TMD grupa		Kontrolna grupa		<i>p</i> *
Depresija	Bez depresije	40	44,4	62	67,4	0,002
	Srednja	32	35,6	21	22,8	
	Izražena	18	20,0	9	9,8	
Somatizacija	Bez somatizacije	40	44,4	65	70,7	0,000
	Srednja	27	30,0	19	20,7	
	Izražena	23	25,6	8	8,7	
Glavobolja		74	82,2	59	64,1	0,006
Bol u grudima		22	24,4	18	19,6	NS
Bol u leđima		48	53,3	43	46,7	NS
Bol u mišićima		46	51,1	31	33,7	0,017
Ukupan broj bolnih mesta	0	6	6,7	12	13,0	0,073
	1	27	30,0	36	39,1	
	2	19	21,1	23	25,0	
	3	25	27,8	14	15,2	
	4	13	14,4	7	7,6	

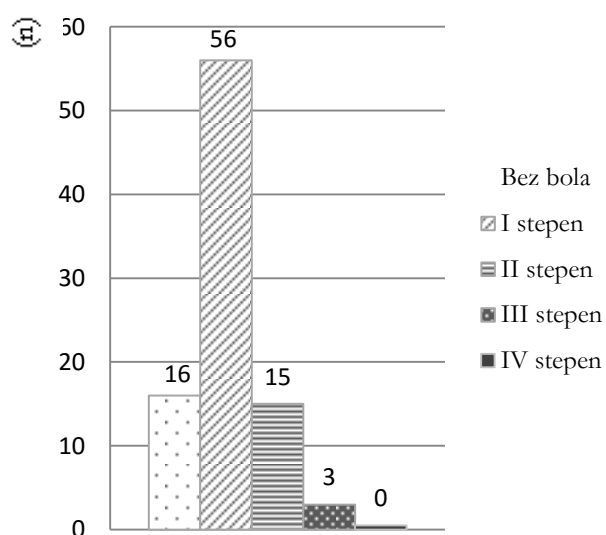
NS = bez statističke značajnosti na nivou $p > 0,10$; Značajne vrednosti ($p < 0,05$) su podebljane

Zastupljenost pojedinih TMD dijagnoza prema RDC/TMD kriterijumu, kao i zastupljenost i karakteristike temporomandibularnog bola u eksperimentalnoj grupi prikazani su u grafikonima 1, 2 i 3 i u tabeli 3. Najveći procenat pacijenata (33,3%) imao je kombinovani tip disfunkcije, a najveća zastupljenost među pojedinačnim RDC/TMD dijagnozama uočena je za miofascijalni bol (23,3%). Postojanje hroničnog bola uočeno kod 82,2% ispitanika sa disfunkcijom. Najveći procenat ispitanika imao je I stepen hroničnog bola (62,2%), dok postojanje IV stepena hroničnog bola nije utvrđeno. Najčešći bolni simptomi odnosili su se na palpatornu bolnu osetljivost temporomandibularnog zgloba (63,3%) i mastikatornih mišića (50%)

Grafikon 1. Zastupljenost TMD dijagnoza (Osa I) u TMD grupi (N=90)



Grafikon 2. Stepen hroničnog bola (prema Osi II) u TMD grupi (N=90)



Grafikon 3. Intenzitet hroničnog bola na numeričkim skalama bola

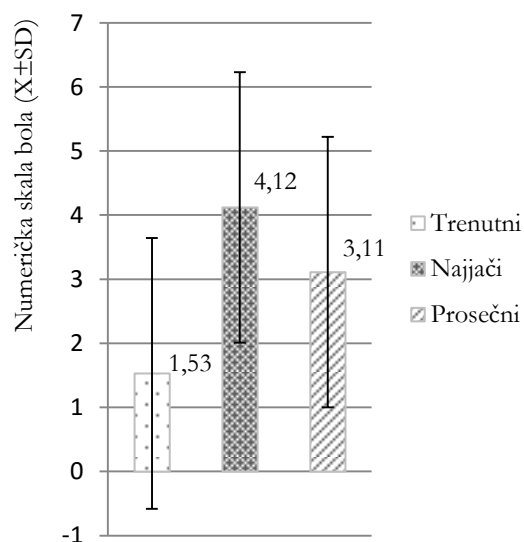


Tabela 3. Trajanje hroničnog bola i bolni simptomi kod pacijenata sa TMD (n=90)

Trajanje bola (meseci, $\bar{X} \pm SD$)		33,02 ± 30,91
Bolni TMD simptomi (n (%))	Mišićni bol pri kretjama vilice	18 (20,0)
	TMZ bol pri kretjama vilice	36 (40,0)
	Mišićni bol pri palpaciji ^a	45 (50,0)
	TMZ bol pri palpaciji	57 (63,3)

TMZ=temporomandibularni zglob

^aBol prisutan ≥3 tačke za palpaciju mastikatornih mišića (prema RDC/TMD upitniku)

5.1.3. Klinički parametri i polimorfizmi gena za COMT

Genotipizacija je urađena je na ukupno 182 uzorka krvi. Na osnovu dobijenih podataka izračunata je frekvencija genotipova i alela za polimorfizme rs4680 (Val108/158Met), rs6269 i rs165774 gena za COMT u ispitivanim grupama. Učestalost genotipova nije se razlikovala značajno između muških i ženskih ispitanika ($p=0,839$ za rs4680, $p=0,465$ za rs6269, $p=0,770$ za rs165774, za genotipove; $p=0,746$ za rs4680, $p=0,395$ za rs6269, $p=0,992$ za rs165774 za alele), te dalje analize nisu uključivale podele po polu. U svrhu ispitivanja povezanosti sa kliničkim parametrima, uz analizu pojedinačnih genotipova za ispitivane polimorfizme, urađena je i njihova dihotomizacija, te je vršeno poređenje monozigota za izvorni oblik (GG) sa heterozigotima i monozigotima za mutirani oblik (AG/AA).

Distribucije genotipova i alela ispitivanih polimorfizma gena za COMT kod pacijenata sa TMD i zdravih ispitanika date su u tabelama 4, 5 i 6. Statistička analiza je pokazala da postoji značajna razlika u distribuciji alela i genotipova za rs165774 između studijskih grupa. Kod obolelih od TMD utvrđena je veća zastupljenost A alela ($p=0,005$), AA genotipa ($p=0,006$) i genotipova sa A alelom (AG/AA) ($p=0,015$) u odnosu na ispitanike u kontrolnoj grupi. Povećan rizik od TMD uočen je kod homozigota sa mutiranim (AA) genotipom (OR=8,617; CI=1,784-41,613; $p=0,003$), kao i kod nosioca genotipa sa A alelom (AG/AA) (OR=2,089; CI=1,147-3,804; $p=0,017$) u poređenju sa homozigotima sa izvornim (GG) genotipom. Nakon uključivanja uzrasta i pola u analizu rizik je ostao značajan za nosioce AA genotipa (korigovani OR=9,448; CI=1,913-46,652; $p=0,006$) u poređenju sa nosiocima genotipa GG (tabela 4).

Tabela 4. Distribucija genotipova i alela polimorfizma rs165774 gena za COMT kod pacijenata sa TMD (n=90) i kontrolnih ispitanika (n=92)

COMT_rs165774		TMD grupa	Kontrolna grupa	<i>p</i>	OR [95% CI] direktni	<i>p</i>	OR [95% CI] korigovani*	<i>p</i>
Genotipovi	wt (GG)	30	47	0,006	Ref.		Ref.	
	het (AG)	49	43	#0,015	1,785 [0,966-3,300]	0,064	1,769 [0,949-3,298]	0,072
	mut (AA)	11	2		8,617 [1,784-41,613]	0,003	9,448 [1,913-46,652]	0,006
					#2,089[1,147-3,804]	0,015	#2,088 [1,138-3,829]	#0,017
Aleli	G	109	137	0,005	Ref.			
	A	71	47		1,899 [1,215-2,967]			

wt = izvorni tip, het = heterozigot, mut = mutirani tip;

NS = bez statističke značajnosti na nivou $p>0,10$; Značajne vrednosti ($p<0,05$) su podebljane; OR = odnos šansi, 95% CI = 95% interval poverenja, Ref.= referentni genotip (wt)

* korigovano za uzrast i pol; # nosioci A alela vs. GG genotip, (het/mut vs. wt)

Nije bilo značajne razlike u distribuciji genotipova i alela za rs4680 i rs6269 između pacijenata sa TMD i zdravih ispitanika. (Tabele 5 i 6)

Tabela 5. Distribucija genotipova i alela polimorfizma rs4680 gena za COMT kod pacijenata sa TMD (n=90) i kontrolnih ispitanika (n=92)

COMT_rs4680		TMD grupa	Kontrolna grupa	<i>p</i>	OR [95% CI] direktni	<i>p</i>	OR [95% CI] korigovani*	<i>p</i>
Genotipovi	wt (GG)	17	23	NS	Ref.		Ref.	
	het (AG)	55	52		1,431 [0,688-2,977]	NS	1,407 [0,670-2,952]	NS
	mut (AA)	18	17		1,433 [0,575-3,567]	NS	1,427 [0,567-3,597]	NS
Aleli	G	89	98	NS	Ref.			
	A	91	86		1,162 [0,772-1,758]	NS		

wt = izvorni tip, het = heterozigot, mut = mutirani tip; NS = bez statističke značajnosti na nivou $p > 0,10$;

OR = odnos šansi, 95% CI = 95% interval poverenja, Ref.= referentni genotip (wt)

* korigovano za uzrast i pol

Tabela 6. Distribucija genotipova i alela polimorfizma rs6269 gena za COMT kod pacijenata sa TMD (n=90) i kontrolnih ispitanika (n=92)

COMT_rs6269		TMD grupa	Kontrolna grupa	<i>p</i>	OR [95% CI] direktni	<i>p</i>	OR [95% CI] korigovani*	<i>p</i>
Genotipovi	wt (GG)	1	5	NS	Ref.		Ref.	
	het (AG)	57	60		5,926 [0,652-53,872]	NS	4,316 [0,483-38,535]	NS
	mut (AA)	32	27		4,750 [0,538-41,912]	NS	5,320 [0,578-48,928]	NS
Aleli	G	59	70	NS	Ref.			
	A	121	114		1,259 [0,819-1,937]			

wt = izvorni tip, het = heterozigot, mut = mutirani tip; NS = bez statističke značajnosti na nivou $p > 0,10$;

OR = odnos šansi, 95% CI = 95% interval poverenja, Ref.= referentni genotip (wt)

* korigovano za uzrast i pol

Povezanost genotipova za COMT sa TMD subdijagnozama (prema Osi I RDC/TMD) u celom uzorku data je u tabeli 7. Distribucija genotipova polimorfizma rs165774 gena za COMT značajno se razlikovala između ispitanika sa i bez artralgijske (p=0,037). Kod pacijenata sa artralgijskom i miofascijalnim bolom uočena je veća frekvencija homozigota sa mutiranim AA genotipom (p=0,011 za artralgijsku; p=0,035 za miofascijalni bol), i heterozigota (p=0,024 za artralgijsku; p=0,090 za miofascijalni bol) u odnosu na homozigote sa izvornim oblikom (GG). Genotip AA je bio povezan sa povećanim rizikom za pojavu artralgijske (OR=4,448; CI=1,311-15,089; p=0,011) i miofascijalnog bola (OR=3,543; CI=1,038-12,092; p=0,035), u poređenju sa homozigotima sa izvornim (GG) genotipom. Nije uočena razlika u prevalenci genotipova i alela polimorfizama rs4680 i rs6269.

Tabela 7. Distribucija genotipova polimorfizama gena za COMT u odnosu na bolne TMD dijagnoze, u celom uzorku (n=182)

COMT polimorfizmi		Miofascijalni bol					Artralgijska				
		+	-	<i>p</i>	OR* [95% CI]	<i>p</i>	+	-	<i>p</i>	OR* [95% CI]	<i>p</i>
rs4680	wt (GG)	9	31	NS	Ref.	7	33	NS	Ref.		
	het (AG)	26	81		1,106 [0,466-2,622]	NS	30	77	1,837 [0,733-4,601]	NS	
	mut (AA)	8	27		1,021 [0,345-3,015]	NS	8	27	1,397 [0,449-4,345]	NS	
rs6269	wt (GG)	1	5	NS	Ref.	1	5	NS	Ref.		
	het (AG)	20	87		1,724 [0,194-15,356]	NS	32	85	1,882 [0,212-16,738]	NS	
	mut (AA)	12	47		1,277 [0,136-11,975]	NS	12	47	1,277 [0,136-11,975]	NS	
rs165774	wt (GG)	15	62	NS	Ref.	16	61	0,037	Ref.		
	het (AG)	22	70		1,299 [0,620-2,733]	NS	22	70	1,198 [0,578-2,486]	NS	
	mut (AA)	6	7		3.543 [1.038-12.092]	0,035	7	6	4,448 [1,311-15,089]	0,011	

wt = izvorni tip, het = heterozigot, mut = mutirani tip;

NS = bez statističke značajnosti na nivou p>0,10; Značajne vrednosti (p<0,05) su podebljane;

OR = odnos šansi, 95% CI = 95% interval poverenja, Ref.= referentni genotip (wt)

Tabela 8 prikazuje povezanost genotipova ispitivanih polimorfizama gena za COMT sa prisutvom i karakteristikama hroničnog temporomandibularnog bola prema Osi II RDC/TMD. U uzorku koji je obuhvatio obe grupe ispitanika uočena je razlika u distribuciji genotipova polimorfizma rs165774 u odnosu na prisutvo ($p=0,017$) i stepen ($p=0,010$) hroničnog bola. Utvrđena je veća zastupljenost i veći stepen hroničnog bola kod ispitanika sa AA genotipom ($p=0,006$ za učestalost; $p=0,004$ za stepen) i heterozigotima ($p=0,017$ za učestalost; $p=0,034$ za stepen) u poređenju sa ispitanicima sa izvornim GG. Povećan rizik od hroničnog bola uočen je kod homozigota sa mutiranim (AA) genotipom ($OR=6,173$; $CI=1,565-24,353$; $p=0,006$), u poređenju sa nosiocima izvornog GG genotipa. Međutim, među pacijentima sa TMD, nije utvrđena povezanost genotipovima ispitivanih polimorfizama gena za COMT sa stepenom hroničnog bola ($p=0,330$ za rs4680; $p=0,135$ za rs6269; $p=0,919$ za rs165774) i prisustvom hroničnog bola ($p=0,359$ za rs4680; $p=0,405$ za rs6269; $p=0,208$ za rs165 774) (rezultati nisu prikazani).

Analizirajući vrednosti hroničnog temporomandibularnog bola na skalama bola, uočena je povezanosti između genotipova polimorfizma rs165774 i inteziteta prosečnog ($p=0,007$) i najjačeg bola ($p=0,021$). Značajno veće vrednosti prosečnog bola i najjačeg bola utvrđene su kod homozigota sa mutiranim oblikom (AA) ($p=0,001$ za prosečni, $p=0,005$ za najjači bol), i heterozigota ($p=0,011$ za prosečni, $p=0,022$ za najjači bol) u poređenju sa homozigotima sa izvornim oblikom (GG). Također je uočena tendencija ka povezanosti između genotipova rs165774 i trajanja hroničnog bola ($p=0,079$), pri čemu su veće vrednosti utvrđene kod monozigota sa mutiranim oblikom u odnosu na monozigote sa izvornim oblikom ($p=0,020$) (rezultati nisu prikazani u tabeli). Za distribuciju polimorfizama rs4680 i rs6269 u odnosu na ispitivane parametre temporomandibularnog bola nije pokazana značajna razlika između pacijenata sa TMD i kontrole. Također, nije utvrđena značajna razlika za intenzitete bola između genotipova za polimorfizam rs4680, rs6269 ili rs165774 kada je analiza urađena na uzorku pacijenata sa TMD.

Analizom distribucije genotipova ispitivanih polimorfizama gena za COMT u odnosu na pojavu bolnih simptoma TMD utvrđena je povezanost genotipova polimorfizma rs 165774 i pojave palpatorne bolne osetljivosti u TMZ ($p=0,024$), kao i pojave bola pri kretanjama donje vilice u mastikatornim mišićima ($p<0,000$) i TMZ ($p=0,049$). Monozigoti sa mutiranim oblikom češće ukazuju na bol pri palpaciji TMZ ($p=0,020$) i mišićni bol pri kretanjama vilice ($p=0,001$), od monozigota sa izvornim (GG) oblikom (rezultat nije prikazan u tabeli). Kada su analizom obuhvaćeni samo pacijenti sa TMD utvrđena je povezanost genotipova polimorfizma rs 165774 i pojave bola u mastikatornim mišićima pri kretanjama ($p=0,030$). Veća učestalost mišićnog bola pri kretanjama vilice uočena je kod pacijenata monozigota sa mutiranim oblikom ($p=0,041$) i heterozigota ($p=0,009$) od homozigota sa izvornim tipom genotipa (rezultati nisu prikazani).

Tabela 8. Distribucija genotipova polimorfizama gena za COMT u odnosu na prisustvo i karakteristike temporomandibularnog bola u celom uzorku (n=182)

Kliničke varijable	COMT SNPs												
	rs4680				rs6269				rs165774				
	wt	het	mut	<i>p</i>	wt	het	mut	<i>p</i>	wt	het	mut	<i>p</i>	
Prisustvo hroničnog bola	+	15	46	13	<i>NS</i>	1	49	24	<i>NS</i>	27	37	10	0,017
	-	25	61	22		5	68	35		50	55	3	
Stepen hroničnog bola ^a		87,9	94,3	87,0	<i>NS</i>	68,2	93,6	89,8	<i>NS</i>	85,2	92,3	123,0	0,010
Tenutni bol ^b		0,6	0,9	0,6	<i>NS</i>	0,0	0,9	0,7	<i>NS</i>	0,6	0,8	1,6	<i>NS</i>
Najjači bol ^b		1,7	2,2	1,8	<i>NS</i>	0,5	2,2	1,9	<i>NS</i>	1,7	2,1	3,8	0,021
Prosečni bol ^b		1,3	1,6	1,6	<i>NS</i>	0,3	1,6	1,5	<i>NS</i>	1,2	1,6	3,2	0,007
Trajanje bola (meseci) ^c		13,1	19,6	10,2	<i>NS</i>	0,5	18,4	13,9	<i>NS</i>	14,2	17,3	22,7	0,079
Palpatorna bol mišića	+	10	29	8	<i>NS</i>	2	31	14	<i>NS</i>	17	24	6	<i>NS</i>
	-	30	78	27		4	86	45		60	68	7	
Palpatorna bol TMZ	+	10	42	12	<i>NS</i>	1	42	21	<i>NS</i>	20	36	8	0,024
	-	30	65	23		5	75	38		57	56	5	
Bol mišića pri viličnim kretnjama	+	3	8	7	<i>NS</i>	0	11	7	<i>NS</i>	5	7	6	0,000
	-	37	99	28		6	106	52		72	85	7	
Bol TMZ pri viličnim kretnjama	+	4	28	9	<i>NS</i>	0	29	12	<i>NS</i>	11	25	5	0,049
	-	36	79	26		6	88	47		66	67	8	

wt = izvorni tip, het = heterozigot, mut = mutirani tip;

NS = bez statističke značajnosti na nivou $p > 0,10$; Značajne vrednosti ($p < 0,05$) su podebljane;

^aSrednja vrednost ranga; ^bSrednja vrednost, verbalna numerička skala bola; ^cSrednja vrednost

Učestalost bolnih simptoma u drugim delovima tela u odnosu na genotipove ispitivanih polimorfizama gena za COMT u celom uzorku data je u tabeli 9. Za polimorfizam rs6269, među genotipovima je uočena značajna razlika u ukupnom broju bolnih mesta ($p=0,041$) i tendencija ka značajnoj razlici u prevalenci bola u mišićima ($p=0,062$). Ispitanici sa AA genotipom ukazuju na veću učestalost bola u mišićima ($p=0,020$) kao i na veći broj bolnih mesta ($p=0,013$) od heterozigota, ali nisu pokazali veću sklonost ka pojavi bola na udaljenim mjestima ($p=1,000$ za učestalost bola u mišićima; $p=0,953$ za broj bolnih mesta), niti je pronađen značajan rizik od pojave bola u mišićima (OR=1,185, CI=0,221, $p=1,000$) u poređenju sa homozigotima sa GG genotipom (rezultati nisu prikazani u tabeli). Nije pronađen značajan rizik od pojave bola u mišićima (OR=1,185, CI=0,221, $p=1,000$).

Tabela 9. Distribucija genotipova polimorfizama gena za COMT u odnosu na prisustvo bola na udaljenim mestima u celom uzorku ($n=182$)

Kliničke varijable	COMT polimorfizmi												
	rs4680				rs6269				rs165774				
	wt	het	mut	<i>p</i>	wt	het	mut	<i>p</i>	wt	het	mut	<i>p</i>	
Glavobolja	+	30	80	23	<i>NS</i>	5	83	45	<i>NS</i>	56	70	7	<i>NS</i>
	-	10	27	12		1	34	14		21	22	6	
Bol u grudima	+	13	23	4	<i>0,088</i>	3	22	15	<i>NS</i>	19	19	2	<i>NS</i>
	-	27	84	31		3	95	44		58	73	11	
Bol u leđima	+	17	53	21	<i>NS</i>	2	55	34	<i>NS</i>	35	51	5	<i>NS</i>
	-	23	54	14		44	62	25		42	41	8	
Bol u mišićima	+	15	44	18	<i>NS</i>	3	42	32	<i>0,062</i>	29	42	6	<i>NS</i>
	-	25	63	17		3	75	27		48	50	6,7	
Ukupan broj bolnih mesta ^a		91,4	90,6	94,3	<i>NS</i>	101,4	84,4	104,6	<i>0,041</i>	88,6	95,8	78,3	<i>NS</i>

wt = izvorni tip, het = heterozigot, mut = mutirani tip;

NS = bez statističke značajnosti na nivou $p>0,10$; Značajne vrednosti ($p<0,05$) su podebljane;

^aSrednja vrednost ranga

Pri analizi psihosocijalnih komponenti TMD iz Ose II RDC/TMD, nije uočena značajna razlika u prisustvu i stepenu depresije i somatizacije između različitih genotipova ispitivanih polimorfizama gena za COMT, kako u celom uzorku (tabela 10), tako i u grupi pacijenata sa TMD. Za sva tri polimorfizma gena za COMT, najveći stepen depresije i somatizacije utvrđen je kod homozigota sa GG genotipom, a najmanji kod homozigota sa mutiranim oblikom za sva tri polimorfizma gena za COMT, ali uočena razlika nije prešla prag statističke značajnosti.

Tabela 10. Distribucija genotipova polimorfizama gena za COMT u odnosu na stepen depresije i somatizacije u celom uzorku (n=182)

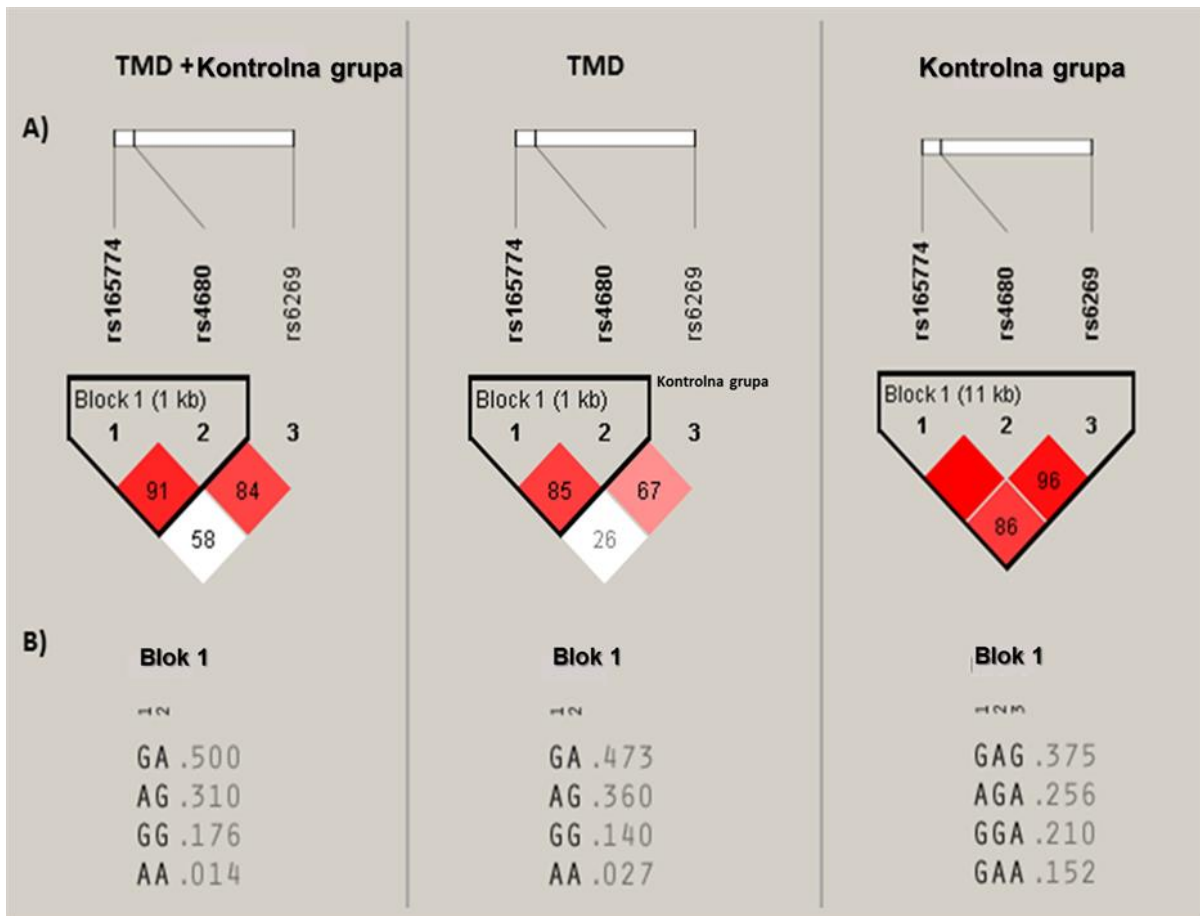
	COMT polimorfizmi											
	rs4680				rs6269				rs165774			
	wt	het	mut	<i>p</i>	wt	het	mut	<i>p</i>	wt	het	mut	<i>P</i>
Kliničke varijable	40	107	35	<i>p</i>	6	117	59	<i>p</i>	77	92	13	<i>P</i>
Stepen depresije ^a	101,2	89,3	87,1	<i>NS</i>	96,9	91,8	90,4	<i>NS</i>	94,5	90,0	84,4	<i>NS</i>
Stepen somatizacije ^a	93,8	90,9	90,8	<i>NS</i>	103,6	88,6	96,0	<i>NS</i>	90,9	92,9	85,0	<i>NS</i>

wt = izvorni tip, het = heterozigot, mut = mutirani tip; NS = bez statističke značajnosti na nivou $p > 0,10$

^aSrednja vrednost ranga

Za izradu LD (engl. linkage disequilibrium, neravnoteža vezanosti) matrice, utvrđivanje haplotipskih bloka ispitivanih polimorfizama gena za COMT i prevalencije haplotipova korišćen je program Haploview v. 4.2. Za utvrđivanje moguće haplotipske povezanosti polimorfizama sa rizikom za nastanak TMD, preko određivanja haplotipskog odnosa šansi (HOR; engl. haplotype odds ratio), primenjen je Thesias v.3.121 softver. Za dva polimorfizma (rs165774 i rs4680) utvrđen je visok stepen neravnoteže vezanosti, a 4 haplotipa su imala zastupljenost $> 1,0\%$. (Slika 10) Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji haplotipova između pacijenata sa TMD i zdravih ispitanika (GA- 47,3% vs. 37,5%, AG- 36% vs. 25,6%, GG- 14% vs. 21%). Ni jedan od haplotipova nije bio povezan sa rizikom za nastanak TMD (HOR (AG)=1,007, CI=0,230-4,401, $p=0,993$, HOR (GG-)=0,541, CI=0,204-1,436, $p=0,217$), u poređenju sa

najzastupljenijim haplotipom GA-. Također, nije utvrđena povezanost COMT haplotipova sa drugim ispitivanim varijablama.



Slika 10. Shematski prikaz blokova neravnoteže vezanosti (LD) unutar gena za COMT kod pacijenata sa TMD (n=90) i kontrolnih ispitanika (n=92). Crni trouglovi predstavljaju blokove neravnoteže vezanosti. Blok 1 sadrži rs165774 i rs4680 u zbirnoj studiji pacijenata sa TMD i kontrolnih ispitanika, i kod pacijenata sa TMD. A) LD obrazac predstavljen D' vrednostima između parova analiziranih polimorfizama gena za COMT: rs165774, rs4680 i rs6269. Nijanse roza boje: $LOD > 2, D' < 1$; Crvena: $LOD > 2, D' = 1$; Bela: $LOD < 2, D' < 1$; LOD – logaritam nadmoćnosti vezivanja B) Distribucija haplotipova u zbirnoj studiji, kod pacijenata sa TMD i kod kontrolnih ispitanika.

5.2. Prospektivna studija

5.2.1. Odabir ispitanika i formiranje istraživačkih grupa

Odabir ispitanika i formiranje istraživačkih grupa prikazani su na shemi 2. Od 182 ispitanika iz studije preseka, kod 40 ispitanika je bila indikovana ekstrakcija bar jednog donjeg trećeg molara. Ni kod jednog od ispitanika nije utvrđeno postojanje alergije na korišćeni anestetik i analgetik i svi pacijenti su pristali na predloženu hiruršku intervenciju. Konačno, prospektivna studija je obuhvatila 40 ispitanika, 31 ženu, 18 41 godina starosti ($\bar{X} \pm SD$: $28,37 \pm 5,85$ godina), 22 sa preoperativno prisutnim TMD.

5.2.2. Klinički podaci

Podaci koji se odnose na prisustvo preoperativnih i postoperativnih TMD, temporomandibularnog bola i bola u regiji impaktiranog trećeg molara kod pacijenata koji su bili podvrgnuti ekstrakciji impaktiranog trećeg molara su prikazani u tabeli 11 i grafikonima 4 i 5. U odnosu na preoperativne rezultate, uočen je značajan pad u zastupljenosti TMD 1 nedelju ($p=0,008$) i 3 meseca ($p=0,031$) postoperativno kod pacijenata sa preoperativno prisutnim TMD, ali ne i u celom uzorku.

Vrednosti temporomandibularnog bola na skalama bola bile su više 1 nedelju postoperativno u odnosu na preoperativne vrednosti. Značajna razlika uočena je za intenzitet trenutnog bola ($p=0,015$) kod pacijenata sa TMD i vrednosti trenutnog ($p=0,003$), maksimalnog ($p=0,014$) i prosečnog bola ($p=0,015$) kod svih ispitanika. U poređenju sa vrednostima dobijenim 1 nedelju postoperativno, 3 meseca postoperativno dobijene su značajno niže vrednosti za intenzitet trenutnog bola ($p=0,008$) kod pacijenata sa preoperativnim TMD i vrednosti za intenzitet trenutnog ($p=0,001$), maksimalnog ($p=0,011$) i prosečnog bola ($p=0,010$) kod svih ispitanika. Sve vrednosti temporomandibularnog bola izmerene 3 meseca postoperativno bile su slične preoperativnim vrednostima.

Analizom rezultata dobijenih za intenzitet bola u regiji impaktiranog trećeg molara, utvrđene su značajno veće vrednosti bola 1 nedelju postoperativno u poređenju sa vrednostima izmerenim preoperativno i u grupi pacijenata sa preoperativno prisutnim TMD ($p<0,000$) i u celom uzorku ($p<0,000$). Niko od ispitanika nije osećao bol u području ekstrakcije 3 meseca postoperativno.

Tabela 11. Prisustvo TMD, temporomandibularnog bola i bola u regionu impaktiranog trećeg molara, kod ispitanika podvrgnutih ekstrakciji impaktiranog trećeg molara: pacijenata sa TMD (n=22) i kod svih operisanih ispitanika (n=40)

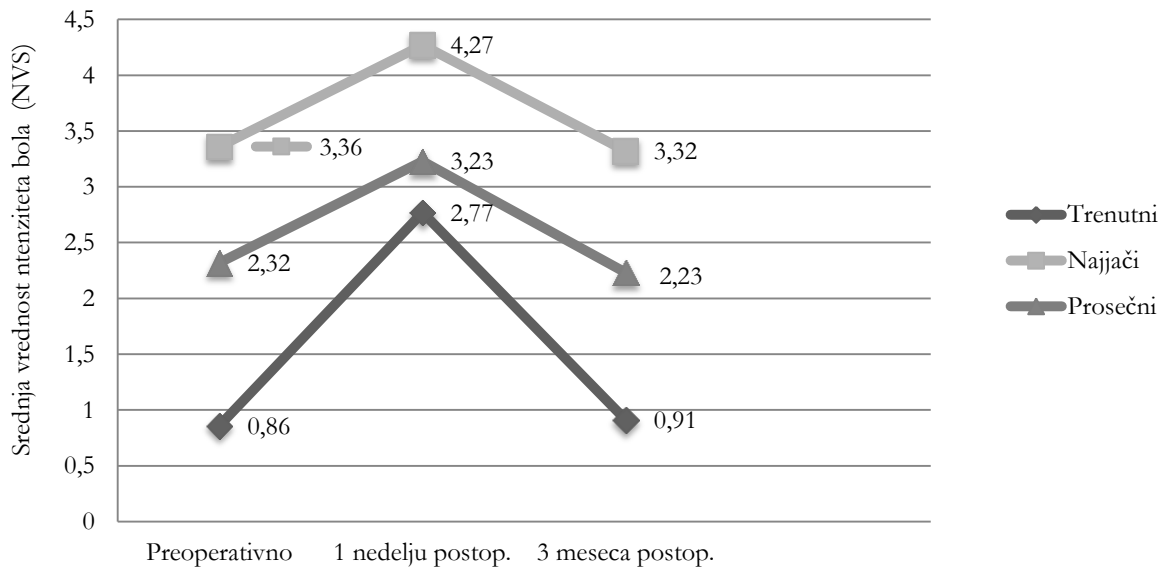
		TMD grupa		<i>p</i>	Svi ispitanici	<i>p</i>
TMD	Preop.	22	0,006		22	NS
	1n	14		0,008 preop vs. 1n	19	
	3m	16		0,031 preop vs. 3m NS 1n vs. 3m	17	
Prisustvo hroničnog TM bola	Preop.	13	NS		13	NS
	3m	11			12	
Stepen hroničnog TM bola ^a	Preop.	1,52	NS		1,50	NS
	3m	1,48			1,50	
Jačina bola imp 3.mol ^b	Preop.	0,55±1,37	0,000		0,50±1,34	0,000
	1n	4,41±2,75			4,55±2,72	
Trajanje bola imp 3. mol postoperativno (dani) ^c		6,36±5,63			6,12±5,14	
Dužina korišćenja analgetika postoperativno (dani) ^c		3,77±4,26			3,77±4,48	

preop = preoperativno, 1n = 1 nedelju postoperativno, 3m = 3meseca postoperativno; TM=temporomandibularni; imp 3. mol = impaktirani treći molar; NS = bez statističke značajnosti na nivou $p>0,10$; značajne vrednosti ($p<0,05$) su podebljane;

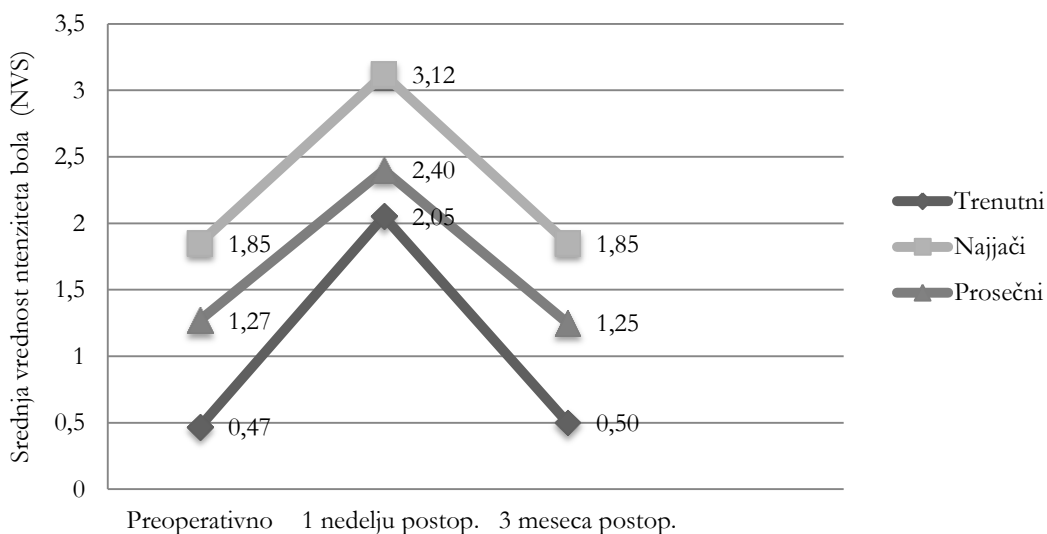
^asrednja vrednost ranga, ^b $\bar{X}\pm SD$, verbalna numerička skala bola, ^c $\bar{X}\pm SD$

Napomena: niko od ispitanika nije osećao bol u području ekstrakcije 3 meseca postoperativno

Grafikon 4. Intenzitet temporomandibularnog bola pre i nakon ekstrakcije impaktiranog trećeg molara kod pacijenata sa TMD (n=22)



Grafikon 5. Intenzitet temporomandibularnog bola pre i nakon ekstrakcije impaktiranog trećeg molara kod svih pacijenata (n=40)



5.2.3 Klinički parametri i polimorfizmi gena za COMT

Distribucija genotipova polimorfizama rs4680, rs6269 i rs165774 gena za COMT kod ispitanika koji su bili podvrgnuti ekstrakciji trećeg molara u odnosu na pojavu TMD i karakteristike bolnih simptoma data je u Tabeli 12. Nije utvrđena značajna razlika u distribuciji genotipova ovih polimorfizama između ispitanika sa i bez TMD dijagnoze preoperativno.

Tabela 12. Distribucija genotipova polimorfizama gena za COMT u odnosu na TMD i pojavu bola kod pacijenata podvrgnutih ekstrakciji impaktiranog trećeg molara (n=40)

Kliničke varijable	COMT SNPs												
	rs4680				rs6269				rs165774				
	wt	het	mut	<i>p</i>	wt	het	mut	<i>p</i>	wt	het	mut	<i>p</i>	
TMD preop	+	5	13	4	<i>NS</i>	0	16	6	<i>NS</i>	7	12	3	<i>NS</i>
	-	5	9	4		1	12	5		10	7	1	
TMD 1n	+	6	10	3	<i>NS</i>	0	16	3	<i>NS</i>	8	10	1	<i>NS</i>
	-	4	12	5		1	12	8		9	9	3	
TMD 3m	+	4	10	3	<i>NS</i>	0	14	3	<i>NS</i>	6	9	2	<i>NS</i>
	-	6	12	5		1	14	8		11	10	2	
Prisustvo tm hroničnog bola 3m	+	4	7	1	<i>NS</i>	0	12	0	0,025	4	7	1	<i>NS</i>
	-	6	15	7		1	16	11		13	12	3	
Stepen tm hroničnog bola 3m ^a		22,0	21,0	17,2	<i>NS</i>	15,0	23,4	13,7	0,017	18,7	22,4	19,4	<i>NS</i>
Trenutni tm bol 1n ^b		1,9	2,4	1,3	<i>NS</i>	0,0	2,6	0,9	0,090	1,7	2,7	0,5	<i>NS</i>
Najjači tm bol 1n ^b		3,7	3,2	2,1	<i>NS</i>	0,0	3,9	1,6	<i>NS</i>	2,9	3,8	1,0	<i>NS</i>
Prosečni tm bol 1n ^b		2,6	2,4	2,1	<i>NS</i>	0,0	2,8	1,6	<i>NS</i>	1,9	3,1	1,0	<i>NS</i>
Trenutni tm bol 6 mo ^b		0,3	0,7	0,3	<i>NS</i>	0,0	0,7	0,0	<i>NS</i>	0,4	0,6	0,5	<i>NS</i>
Najjači tm bol 6 mo ^b		2,2	2,0	1,0	<i>NS</i>	0,0	2,5	0,4	0,099	1,6	2,1	2,0	<i>NS</i>
Prosečni tm bol 6 mo ^b		1,4	1,3	0,9	<i>NS</i>	0,0	1,6	0,4	<i>NS</i>	0,7	1,6	1,8	<i>NS</i>
Jačina bola imp. 3. mol. preop ^b		0,5	0,4	0,9	<i>NS</i>	0,0	0,4	0,7	<i>NS</i>	0,4	0,3	1,8	<i>NS</i>
Jačina bola imp. 3. mol. 1n ^b		5,0	4,6	3,9	<i>NS</i>	1,0	5,3	3,1	0,030	4,4	4,8	4,0	<i>NS</i>

Trajanje bola imp.3. mol. postoperativno (dani) ^c	7,1	6,7	3,3	NS	1,0	7,2	3,9	0,028	6,8	5,9	4,5	NS
Dužina korišćenja analgetika postoperativno (dani) ^c	4,3	4,4	1,5	NS	0,0	4,5	2,3	0,017	3,8	4,2	2,0	NS

wt = izvorni tip, het = heterozigot, mut = mutirani;

preop = preoperativno, 1n = 1 nedelju postoperativno, 3m = 3meseca postoperativno;

tm= temporomandibularni; imp. 3. mol. = impaktirani treći molar; NS = bez statističke značajnosti na nivou $p > 0,10$; Značajne vrednosti ($p < 0,05$) su podebljane;

^aSrednje vrednosti ranga ; ^bSrednje vrednosti, numerička skala bola; ^cSrednje vrednosti

Uočena je povezanost genotipova polimorfizma rs6269 sa prisustvom ($p=0,025$) i stepenom ($p=0,017$) hroničnog postoperativnog temporomandibularnog bola, trajanjem ($p=0,028$) i intenzitetom ($p=0,030$) bola u području ekstrakcije, kao i dužinom korišćenja analgetika postoperativno ($p=0,017$). Kod nosioca mutiranog (AA) genotipa za rs6269 utvrđene su niže vrednosti za stepen ($p=0,040$) hroničnog temporomandibularnog bola, intenzitet ($p=0,026$) i trajanje ($p=0,024$) bola u području ekstrakcije i dužinu korišćenja analgetika postoperativno ($p=0,013$) u poređenju sa heterozigotima. Zbog malog broja ispitanika sa izvornim (GG) genotipom za rs6269, procena rizika za ispitivane kliničke varijable nije rađena. Ispitivani klinički parametri nisu se razlikovali među genotipovima polimorfizama rs4680 i rs165774.

6. DISKUSIJA

Temporomandibularne disfunkcije označavaju skup poremećaja koji zahvataju mastikatorne mišiće i temporomandibularni zglob (Romero-Reyes i Uyanik, 2014). Bol je vodeći simptom disfunkcije, (VanSelms i sar., 2009) a TMD predstavljaju najčešća neodontogena bolna stanja u orofacijalnoj regiji (Dworkin i sar. 1990). U razotkrivanju patofiziologije ovih poremećaja, skorija istraživanja pružila su dokaze o važnoj ulozi gena i psihosocijalnih varijabli u nastanku TMD i temporomandibularnog bola (Smith i sar., 2011; Fillingim i sar., 2011). COMT metaboliše kateholamine i igra ključnu ulogu u regulaciji percepcije bola, kognitivnih funkcija i afektivnih stanja (Nackley i sar., 2006). Polimorfizmi humanog gena za COMT se dovode u vezu sa TMD, (Diatchenko i sar., 2005; Smith i sar., 2011; Michelotti i sar., 2014) postoperativnim bolom, (Tammimäki i Männistö, 2012) a ispitivana je i njihova povezanost sa depresijom (Antypa i sar., 2013) i somatskim simptomima (Klengel i sar., 2011). Kako bi se razjasnili efekti varijacija gena za COMT, za koga se pretpostavlja da bi mogao igrati ulogu u nastanku bolnih simptoma i psihosocijalnih disfunkcija u okviru TMD, u okviru ovog istraživanja ispitivan je efekat tri polimorfizma gena za COMT, rs4680, rs6269 i rs165774. Rezultati su pokazali da rs165774 predstavlja faktor rizika za nastanak TMD i temporomandibularnog bola, a da je rs6269 povezan sa bolom u udaljenim regijama i postoperativnim bolom.

6.1. Metodološki aspekti studije

Istraživanje je provedeno na etnički homogenim populacijama belaca istog porekla, iz relativno uske uzrasne grupe: zdravih ispitanika i kliničke populacije pacijenata sa TMD. Uniformnost uzorka po pitanju rasne, etničke pripadnosti i uzrasta ispitanika, posebno se preporučuje za kliničke genetičke studije (Kim i sar., 2009; Kim i sar., 2010). Stavka etniciteta je od važnosti u ovoj vrsti istraživanja i zbog činjenice da je učestalost TMD u nekoj populaciji determinisana specifičnim kulturološkim i drugim faktorima vezanim za određenu etničku grupu. U tom smislu, genetske varijacije vezane za pojedine etničke grupacije mogu biti jedan od determinišućih faktora za rasprostranjenost TMD u nekoj populaciji (Oakley i Vieira, 2008; Kim i sar., 2009). Uzrasna grupa od 20 do 45 godina, obuhvaćena ovim istraživanjem predstavlja specifičnu ciljnu grupu u ispitivanju TMD, zbog uočene učestalosti i izraženosti znakova i simptoma TMD u reproduktivnom periodu (LeResche, 1999). Također se preporučuje da se uticaj genetskih faktora na pojavu hroničnog bola ispituje u mlađem uzrastu, zbog moguće akumulacije uticaja faktora sredine u kasnijem periodu (Hocking i sar. 2010). Grupe su obuhvatale ispitanike oba pola, budući da se zastupljenost za veliki broj alela najčešće ne razlikuje između polova, a omogućuje poređenje sa

rezultatima većine drugih studija (Kim i sar, 2006b). Kako bi se ispitaio uticaj pojedinačnih polimorfizama na pojavu i rizik za nastanak TMD, izvršeno je podešavanje prema faktorima koji bi mogli uticati na pojavu TMD (uzrast i pol).

Dijagnoza TMD je postavljena prema međunarodno prihvaćenom kriterijumu, RDC/TMD, koristeći prihvaćenu prevedenu verziju upitnika (Čelić, 2004). Ovaj instrument ima precizno definisane kriterijume za nekoliko kliničkih kategorija TMD, nivo hroničnog temporomandibularnog bola i pratećih psihosocijalnih parametara. Evaluacijom upotrebljivosti upitnika, utvrđeno je da obe komponente upitnika, Osa I i Osa II, imaju zadovoljavajuću pouzdanost (Dworkin i sar., 2002; Juhl i sar., 2009), čime je potvrđena primenljivost instrumenata.

U prospektivnoj studiji praćena je pojava postoperativnog bola nakon ekstrakcije donjeg impaktiranog umnjaka. Radi se o standardizovanoj hirurškoj proceduri, sa dobro definisanim hirurškim protokolom (Norholt, 1998) čime se minimalizuje mogući uticaj same intervencije na pojavu postoperativnog bola i drugih simptoma TMD. Iz istog razloga, u studiju su uključeni samo ispitanici kod kojih je bila indikovana ekstrakcija donjeg trećeg molara, budući da ove intervencije u gornjoj vilici imaju manje uticaja na pojavu postoperativnih TMD (Juhl i sar., 2009). Svi ispitanici koji su podvrgnuti hirurškoj intervenciji su pregledani u oba postoperativna perioda praćenja, čime je izostao mogući uticaj osipanja uzorka.

Pristrasnost prilikom istraživanja predstavlja vrlo bitan faktor. Ukoliko je moguće treba je izbeći kako bi se obezbedila objektivnost i validnost rezultata. S tim u vezi, analizu uzoraka krvi su uradili istraživači koji nisu bili upoznati sa rezultatima kliničkog pregleda. Imajući u vidu činjenicu da je oralni hirurg morao biti upoznat sa prisustvom preoperativnih simptoma TMD, nije se mogla izbeći pristrasnost prilikom provođenja hirurške intervencije. U cilju obezbeđivanja standardizovane procedure u ovoj studiji pregled ispitanika je sproveo jedan istraživač kalibrisan za klinički pregled u okviru RDC/TMD upitnika. Iz istog razloga sve hirurške intervencije je izvršio jedan operater, specijalista oralne hirurgije.

Obe studije unutar istraživanja imaju nekoliko ograničenja. Neki autori naglašavaju da studije u kojima se ispituje povezanost genskih polimorfizama sa različitim fenotipovima trebaju uključiti veći broj ispitanika (Kambur i sar., 2013b). Iako je veličina uzorka izračunata prema preporukama datim za genetičke studije, pretpostavljeni uslovi, model nasleđivanja i prevalenca *minor* alela ne odgovaraju svim ispitivanim polimorfizmima. Zbog niske zastupljenosti homozigota za neke od ispitivanih polimorfizama mali broj ispitanika u uzorku mogao je uticati na dobijene rezultate (Omair i sar., 2012). Međutim, velika većina kliničkih studija koje su ispitivale povezanost polimorfizama gena za COMT sa različitim bolnim stanjima rađena je na relativno malim uzorcima i stoga je imala malu snagu studije (Tammimäki i Männistö, 2012). Nedostatak studije preseka ogleda se u nemogućnosti praćenja simptoma, imajući u vidu činjenicu da TMD karakterišu oscilacije u pojavi znakova i simptoma disfunkcije (Mohlin i sar., 2007). Treba spomenuti i uticaj podgrupa među pacijentima sa TMD u ovom istraživanju. Naime, prateći raznolikost kliničkih manifestacija TMD, eksperimentalna grupa je obuhvatila pacijente sa različitim tipovima

disfunkcija praćenih bolom. Postojanje podgrupa koje karakteriše prisustvo bola različitog porekla u studiji koja ispituje povezanost genskih polimorfizama sa mišićnoskeletnim bolom može uticati na heterogenost rezultata (Tamminen i Männistö, 2012). Efekat polimorfizama na pojavu pojedinih subdijagnoza TMD, bolnih simptoma TMD i stepena hroničnog bola, najpre je ispitivan unutar grupe pacijenata sa TMD. Generalno je ovo grupisanje smanjilo statističku značajnost u poređenju sa analizama u celom uzorku, tako da izuzev rs165774 i mišićnog bola pri kretanjama mandibule, ni jedan polimorfizam nije pokazao značajnu povezanost sa ispitivanim kliničkim varijablama unutar grupe pacijenata sa TMD.

Osa II RDC/TMD upitnika korišćena u svrhu ispitivanja psihosocijalnih parametara ne sadrži skale za procenu stresa i anksioznosti. Oba faktora često prate TMD i mogu da igraju ulogu u nastanku i održanju simptoma disfunkcije (Rollman i Gillespie, 2000; Kafas i Leeson, 2006; Cairns, 2010), a studije ukazuju na njihovu povezanost sa polimorfizmima gena za COMT (Martínez-Jauand i sar., 2013; Hall i sar., 2015; Slade i sar., 2015). Pomenuta nova verzija upitnika, DC/TMD, sadrži instrumente za procenu nivoa stresa i anksioznosti, ali još uvek nije objavljena prihvaćena prevedena verzija.

Na rezultate prospektivne studije mogli su uticati i preoperativni simptomi TMD (Berge, 2002; Juhl i sar., 2009). Prisustvo TMD pre oralnohirurških zahvata može povećati zastupljenost znakova i simptoma disfunkcije nakon intervencije. Razlozi za uključivanje ispitanika sa preoperativnim TMD odnose se na činjenicu da su i ovi ispitanici deo populacije kod kojih je indikovana ekstrakcija umnjaka, (Juhl i sar., 2009) kao i da je pojava hroničnog postoperativnog bola retka među zdravom populacijom (Lee i sar., 2011).

Na kraju, istraživanje je obuhvatilo populaciju belaca istog porekla, te se dobijeni rezultati ne mogu generalizovati.

6.2. Polimorfizmi gena za COMT kod pacijenata sa TMD i kontrolnih ispitanika

6.2.1. Zastupljenost genotipova i alela ispitivanih polimorfizama gena za COMT

Činjenica da postoje značajne razlike u zastupljenosti genskih polimorfizama između pojedinih populacija, geografskih regiona i etničkih grupa, opravdava analizu njihove učestalosti u različitim populacijama. Distribucija genotipova i alela za ispitivane polimorfizme gena za COMT kod zdravih ispitanika je u skladu sa istraživanjima provedenim na finskoj (Kambur i sar., 2013b), španskoj (Martínez-Jauand i sar., 2013), kineskoj (Zhang i sar., 2005), australijskoj (Voisey i sar., 2011) i američkoj (Diatchenko i sar., 2005) populaciji. Odstupanja su uočena u odnosu na nalaze Zhang i sar. (2007) za polimorfizme rs4680 i

rs165774. Moguće je da je neslaganje rezultata posljedica različite rasne pripadnosti uzimajući u obzir da su Zhang i sar. istraživanje proveli na kineskoj, a većina ostalih istraživača na evropskim odnosno beličkim populacijama. U tom slučaju ispitanici naše studije su etnički puno bliže evropskim populacijama kod kojih je pronađena slična distribucija genotipova kao u ovom istraživanju.

Prevalenca genotipova i alela ispitivanih polimorfizama kod pacijenata sa TMD slična je rezultatima dobijenim kod pacijenata sa drugim hroničnim bolnim stanjem, fibromijalgijom (Garcia-Fructoso i sar., 2008; Martínez-Jauand i sar., 2013). Ovi nalazi potvrđuju ranije tvrdnje da kateholamini igraju ključnu ulogu u pojavi hroničnog bola, kao i da u pozadini hroničnog mišićnoskeletnog bola leži genski dirigovan disbalans kateholamina (Diatchenko i sar., 2005; Smith i sar., 2011!). U skladu sa strukturom grupa u studiji preseka u ovom istraživanju, rezultati preglednog rada ukazuju da je u većini studija u kojima je proučavana povezanost polimorfizama gena za COMT sa različitim bolnim stanjima, zastupljenost žena bila veća među obolelim u odnosu na zdrave ispitanike (Tammimäki i Männistö, 2012).

6.2.2. Polimorfizmi gena za COMT i TMD

Prema rezultatima ove studije, AA genotip i A alel polimorfizma rs165774 gena za COMT bili su povezani sa povećanim rizikom za pojavu TMD. Također je utvrđena povezanost ovog SNP sa rizikom za pojavu bolnih TMD dijagnoza mišićnog i zglobnog porekla (miofascijalni bol i artralgijska), kao i sa prisustvom i stepenom hroničnog temporomandibularnog bola. Kod ispitanika sa AA genotipom izmerene su veće vrednosti prosečnog i maksimalnog temporomandibularnog bola i veće vrednosti trajanja temporomandibularnog bola u poređenju sa izvornim (GG) genotipom. U ranijim istraživanjima polimorfizam rs165774, pojedinačno ili u sklopu različitih haplotipova, se dovodio u vezu sa mentalnom retardacijom (Zhang i sar., 2007), šizofrenijom (Voisey i sar., 2012), alkoholizmom (Voisey i sar., 2011) eksperimentalnim bolom (Kambur i sar., 2013b) i hroničnim posttraumatskim bolom (Bortsov i sar., 2014). U nedavno objavljenoj studiji utvrđena je povezanost SNP rs165774 sa rizikom za nastanak TMD i bolnom osetljivošću na različite nadražaje (Meloto i sar., 2015). Rezultati našeg istraživanja također ukazuju da AA genotip polimorfizma rs165774 može imati ulogu predisponirajućeg faktora za nastanak TMD. U skladu sa ovim nalazima su rezultati dobijeni u *in vitro* uslovima prema kojima A alel kodira formu enzima koja ima smanjenu aktivnost (Meloto i sar., 2015). U suprotnosti sa rezultatima ovog istraživanja, alel A se povezuje sa sniženom bolnom osetljivošću na modelu eksperimentalnog bola (Kambur i sar., 2013b). Ovi rezultati su potvrđeni i u novijoj studiji u dve nezavisne kohorte, za različite vrste stimulusa (Meloto i sar., 2015). U istoj studiji je uočeno da A alel polimorfizma rs165774 igra protektivnu ulogu u pojavi TMD. Prema rezultatima eksperimenata *in vitro*, rs165774 igra važnu ulogu u sintezi nove izoforme, alternativno splalajsovane (a)-COMT. (a)-COMT je funkcionalna varijanta i aktivna je u nekoliko tkiva, uključujući i moždano. Također je pokazano da ovaj oblik COMT kataboliše dopamin,

a ne adrenalin (Meloto i sar., 2015). Dopaminergička transmisija ima ključnu ulogu u centralnoj analgeziji, kao i u silaznoj inhibiciji bola na spinalnom nivou (Wood, 2008). Sa ove tačke gledišta, činjenica da je protektivni A alel polimorfizma rs165774 povezan sa smanjenom aktivnošću enzima, dokazuje da se uticaj ovog SNP odvija preko povećanog nivoa dopamina, a ne porasta adrenalina. Za neslaganje u rezultatima ove i prethodnih studija, mogli bi biti odgovorni drugi mehanizmi preko kojih COMT ostvaruje svoje dejstvo na pojavu bolnih simptoma. Budući da COMT učestvuje u metabolizmu estrogena, za koga se veruje da je uključen u patofiziologiju temporomandibularnog bola (Dao i LeResche 2000; Cimino i sar., 2000; Cairns, 2010), sasvim je moguće da varijacije gena za COMT utiču na pojavu bola preko još uvek nepoznatih mehanizama (-Tammimäki i Männistö, 2012). Interesantan je i podatak da, uprkos činjenici da je stabilnost mRNK veća kod COMT transkripata koji sadrži A alel polimorfizma rs165774, pokazano je da je nivo ekspresije proteina i aktivnosti enzima niži (Meloto i sar., 2015). Ovo je dobar primer kako alelske varijante mogu imati suprotan efekat na stabilnost mRNK i ekspresiju proteina.

Rezultati brojnih studija ukazuju da većina pacijenata sa TMD oseća bol i na udaljenim mestima (Lim i sar., 2010). Prema skoro objavljenom revijalnom članku o naslednosti temporomandibularnog bola, (Visscher i Lobbezoo, 2015) geni nisu isključivo povezani sa temporomandibularnim bolom, već sa individualnom osetljivošću na bol uopšte. U ovom istraživanju kod pacijenata sa TMD uočena je značajno veća zastupljenost glavobolje i bola u telesnim mišićima u poređenju sa kontrolnom grupom. Iako polimorfizam rs6269 nije bio povezan sa TMD, uočena povezanost AA genotipa ovog SNP sa pojavom bola u mišićima i ukupnim brojem bolnih mesta. U skladu sa ovim rezultatima, Diatchenko i sar. (2005) su utvrdili da su G alel i GG genotip polimorfizma rs6269 povezani sa manjom osetljivošću na eksperimentalni bol. U ovoj studiji distribucija genotipova za rs4680 i rs165774 nije se razlikovala između ispitanika sa i bez bola na udaljenim mestima. Naši rezultati su u skladu sa nalazima studije Hocking i sar. (2010), prema kojima nije uočena povezanost nijednog od 11 ispitivanih polimorfizama gena za COMT, među kojima i rs4680 i rs165774, sa hroničnim generalizovanim bolom u populaciji Britanaca bele rase. Rezultati ovog istraživanja također potvrđuju prethodne nalaze da uticaj aktivnosti COMT na pojavu hroničnog bola zavisi od tipa bola (Kambur i Männistö, 2015). Budući da se SNP rs6269 nalazi na distalnom kraju P2 promotora koji kodira oba transkripta, solubilni (S-COMT) i za membranu vezani oblik (MB-COMT) (Zhang i sar., 2009; Godar i Bortolato, 2014), ovaj polimorfizam bi mogao igrati važnu ulogu u metabolizmu dopamina, i na taj način u pojavi različitih bolnih stanja.

U ovom istraživanju nije utvrđena povezanost između polimorfizma rs4680 (Val108/158Met), najviše proučavanog među COMT polimorfizmima, sa pojavom TMD i ispitivanim bolnim simptomima. Uprkos dokazima koji ukazuju na to da bi polimorfizam rs4680 trebao biti povezan sa bolnom osetljivošću, (Zubieta i sar., 2003; Vargas-Alarcón i sar., 2007) naši rezultati su u skladu sa nalazima drugih studija prema kojima nema razlike u pojavi bolnih simptoma u zavisnosti od varijacija ovog polimorfizma. Povezanost nije utvrđena na modelu eksperimentalnog bola (Kim i sar., 2006b), mišićnoskeletnog bola (Hagen i sar., 2006a; Vossen i sar., 2010), hroničnog generalizovanog bola (Nicholl i sar., 2010) i migrenozne glavobolje

(Cevoli i sar., 2006; Hagen i sar., 2006b). Ovakvi nalazi mogu se objasniti činjenicom da efekti polimorfizma rs4680 mogu zavistiti od genomskeg okruženja, odnosno lokusa gde se polimorfizam nalazi, uključujući haplotipove ili simultane mutirane oblike drugih SNP (Diatchenko i sar., 2005) kao i epistatske interakcije između rs4680 i drugih funkcionalno povezanih gena (Smith i sar., 2014). Također se prepostavlja da su funkcionalne mutacije, kao što je to slučaj sa Met alelom polimorfizma rs4680, praćene kompenzatornim promenama od strane drugih polimorfizama (Kern i Kondrashov, 2004) koje je teško identifikovati (Shibata i sar., 2009). Uočeno je da i etnička pripadnost ispitanika može uticati na ove rezultate, pri čemu se povezanost rs4680 sa nekim bolnim stanjima gubi, ako se u analizu uključi belačka populacija bez belaca hispano porekla (Tammimäki i Männistö, 2012).

Nekoliko studija je pokazalo da polimorfizmi gena u okviru haplotipova pokazuju jaču povezanost sa ispitivanim fenotipom. Najčešće proučavani COMT haplotipovi oformljeni su od četiri polimorfizma iz centralnog bloka, rs6269, rs4633, rs4818 i rs4680, a odgovaraju niskoj (haplotip „LPS“), srednjoj („APS“) i visokoj („HPS“) osetljivosti na bol (Diachenko i sar., 2005). HPS haplotip povezan je sa rizikom za nastanak TMD (Smith i sar., 2011) i nižom efikasnošću β -blokatora propranolola kod pacijenata sa bolnim TMD (Tchivileva i sar., 2011). Za haplotipove nešto drugačije strukture (rs4633, rs4818, rs4680 i rs165774), dokazana je povezanost sa hroničnim posttraumatskim bolom (Bortsov i sar., 2014). U skoro objavljenoj studiji utvrđen je visok LD između APS COMT haplotipa i polimorfizma rs165774, pri čemu kombinacija APS i A alela polimorfizma rs165774 ima protektivnu ulogu u pojavi TMD (Meloto i sar., 2015). Voisey i sar. (2011) su uočili visoku vezanost između rs165774 i rs4680, kao i povezanost G-G haplotipa sa alkoholizmom. U ovoj studiji, za dva polimorfizma, rs165774 i rs4680, utvrđen je visok LD, a 4 haplotipa su imala zastupljenost >1,0%. Analiza COMT haplotipova između pacijenata sa TMD i zdravih ispitanika nije pokazala njihovu povezanost sa TMD niti je i jedan od haplotipova bio povezan sa rizikom za nastanak TMD. Ovakvo odstupanje od ranijih rezultata može biti posledica interakcija između haplotipa i drugih polimorfizama gena za COMT (Bortsov i sar., 2014) ili mogućeg uticaja pola na efekte haplotipa, koji je potvrđen za centralni haploblok (Tunbridge i Harrison, 2011). Kao što je već rečeno, iako je moguće postojanje manjeg broja gena koji direktno utiču na razvoj bola u okviru kliničke slike TMD, puno je veća verovatnoća da postoje geni koji utiču na intermedijarne osobine, odnosno specifične fenotipove, koji onda doprinose potpunoj slici bolesti.

6.2.3. Polimorfizmi gena za COMT i psihosocijalni parametri

Usprkos teorijskom zaleđu koje upućuje na to da bi polimorfizmi gena za COMT mogli biti povezani sa simptomima depresije i somatizacije kod pacijenta sa TMD, naši rezultati, kao i rezultati iz literature, nisu uspeli potvrditi tu hipotezu. Imajući u vidu ulogu kateholamina u razvoju simptoma depresije i bolne

osetljivosti, kao i važnost COMT u metabolizmu ovih transmitera, vršena su ispitivanja kako bi se utvrdila povezanost varijacija gena za COMT sa depresijom (Antypa i sar., 2013) i somatizacijom (Klengel i sar., 2011). Povećana aktivnost COMT u mozgu čoveka za posledicu ima niži nivo dopamina i noradrenalina, a ove promene se zauzvrat dovode u vezu sa depresijom (Massat i sar., 2005). Modifikacijom bolne osetljivosti i praga bola, COMT može uticati na pojavu bolnih simptoma somatizacije (Rief i sar., 2010). COMT također modifikuje svesnost o postojanju simptoma, te na taj način može imati uticaja na prijavu specifičnih simptoma od strane pacijenata sa funkcionalnim somatskim obolenjima (Hall i sar., 2015).

Rezultati ove studije su pokazali da su homozigoti sa G/G genotipom za sva tri ispitivana polimorfizma imali najviše vrednosti depresije i somatizacije, dok su najniže vrednosti zabeležene kod nosioca A/A genotipa. U prilog ovim nalazima idu rezultati *in vitro* studija koji ukazuju na povezanost G alela polimorfizama rs4680 i rs165774 sa povišenom aktivnošću COMT (Lotta i sar., 1995; Meloto i sar., 2015) a što za posledicu ima niži nivo kateholamina u moždanim strukturama. Izostanak značajnosti rezultata u ovoj studiji može se objasniti mogućim uticajem faktora kao što su pol ili prisustvo stresa, koji bi mogli igrati važnu ulogu u modulaciji efekata polimorfizama gena za COMT na pojavu depresivnih simptoma (Antypa i sar., 2013). Osim toga, za razliku od navedenih studija koje su rađene na hospitalizovanim pacijentima sa depresijom i simptomima somatizacije, ovo istraživanje je uključilo ispitanike sa simptomima depresije i somatizacije utvrđene na osnovu skala u okviru Ose II RDC/TMD upitnika. Iako postoje čvrsti dokazi koji ukazuju na pouzdanost, validnost i kliničku iskoristljivost Ose II, ona nije namenjena za postavljanje dijagnoze psihijatrijskih obolenja (Dworkin i sar. 2002). Ni rezultati prethodnih istraživanja nisu pokazali direktnu povezanost polimorfizama gena za COMT i psiholoških faktora koji se vezuju za TMD (Slade i sar., 2007; Schwahn i sar., 2011). U skladu sa ovim rezultatima je i nalaz Tchivileva i sar. (2010), prema kojem efekat neselektivnog β -adrenergičkog antagoniste propranolola na depresiju, anksioznost i stres kod pacijenta sa TMD nije bio povezan sa COMT haplotipovima. Također, nije utvrđena povezanost multisomatoformnog poremećaja ni sa jednim od ispitivanih polimorfizama gena za COMT (Jakobi i sar., 2010). Martínez-Jauand i sar. (2013) iznose pretpostavku da osetljivost na bolne nadražaje kod pacijenata sa fibromijalgijom, može biti posledica izmenjene obrade podataka na emocionalnom nivou kod nosioca Met/Met genotipa. Ipak, nakon korigovanja za depresiju i anksioznost, povezanost između COMT polimorfizma rs4680 sa osetljivošću na eksperimentalni bol je ostala značajna. Schwahn i sar. (2011) su zaključili da prisustvo depresivnih simptoma zapravo utiče na povezanost između gena za COMT i percepcije bola kod pacijenata sa TMD. Slade i sar. (2007) nisu potvrdili hipotezu da polimorfizmi gena za COMT moduliraju uticaj psiholoških faktora kao faktora rizika na pojavu TMD. Autori su zaključili da psihološki faktori i haplotipovi gena za COMT predstavljaju nezavisne faktore rizika za pojavu TMD.

Također treba imati u vidu da izmene u aktivnosti COMT mogu imati suprotan efekat na pojavu bola i simptoma depresije. Naime, dok visoka enzimska aktivnost smanjuje nivo kateholamina i deluje protektivno na pojavu bola, sa druge strane dovodi do povećane razgradnje dopamina i izaziva depresivno

stanje. Ovi nalazi ukazuju da je povezanost između aktivnosti COMT, psihosocijalnih parametara i TMD veoma složena i trebala bi da se ispita u budućim istraživanjima.

6.3. Polimorfizmi gena za COMT i postoperativni bol

Rezultati ove studije su pokazali da postoji povezanost između pojave postoperativnog bola nakon ekstrakcije impaktiranog trećeg molara i polimorfizma rs6269 gena za COMT. Ispitanici sa AA genotipom polimorfizma rs6269 su pokazali značajno niži nivo hroničnog postoperativnog temporomandibularnog bola u poređenju sa nosiocima G alela (GA/GG). Kod homozigota sa AA genotipom također su uočene niže vrednosti intenziteta akutnog bola i trajanja bola u postekstrakcionoj regiji, kao i kraći period korišćenja analgetika u odnosu na nosioce G alela. Izmerene vrednosti za sve spomenute varijable su bile najviše kod heterozigota. Nije utvrđena povezanost postoperativnog bola i drugih polimorfizama za COMT. U skladu sa ovim rezultatima, homozigoti sa AA genotipom polimorfizma rs6269 su pokazali niži intenzitet preoperativnog bola, kao i postoperativnog bola godinu dana nakon lumbarne diskektomije u poređenju sa nosiocima G alela (Rut i sar., 2014). Nasuprot ovim nalazima, Lee i sar. (2011) su ustanovili manju bolnu osetljivost i veću prevalencu pacijenata sa zadovoljavajućom postoperativnom analgezijom oksikodonom kod pacijenata sa GG genotipom ovog polimorfizma u prvoj nedelji nakon ekstrakcije trećeg molara. Ranija studija nije dokazala povezanost polimorfizama rs6269 i rs4680 sa pojavom bola nakon ekstrakcije trećeg molara (Kim i sar., 2006a). Kada su u pitanju rezultati vezani za postoperativni temporomandibularni bol, razlike u nalazima između studija bi se mogle objasniti činjenicom da se rezultati ovog istraživanja, kao i Rut i sar. (2014) odnose na duži postoperativni period praćenja, dok su nalazi kasnije pomenutih studija vezani za period od 1 nedelje. Naime, polimorfizmi gena sa COMT doprinose održanju bolnih simptoma kod hroničnih bolnih stanja (Martínez-Jauand i sar., 2013). Pored toga, samo jedan od ispitanika koji su praćeni u ovoj prospektivnoj studiji je imao izvorni GG genotip, pa se uočena povezanost rs6269 sa postoperativnim bolom može pripisati visokim vrednostima za intenzitet i trajanje postoperativnog bola kod heterozigota. Više vrednosti intenziteta bola kod heterozigota za polimorfizam rs6269 nakon ekstrakcije trećeg molara uočene su i u prethodnim studijama (Kim i sar., 2006a; Lee i sar., 2011).

Naši rezultati nisu potvrdili prethodne nalaze (Bortsov i sar., 2014) koji ukazuju na povezanost polimorfizma rs165774 gena za COMT i hroničnog posttraumatskog bola. Moguće objašnjenje za neslaganja u rezultatima leži u činjenici da se radi o hroničnom bolu različitog porekla. Naime, rezultati naše studije se odnose na postoperativni mišićnoskeletni bol, dok je u pomenutoj studiji Bortsov i sar. ispitivan hronični posttraumatski bol, a koji je najčešće neuropatske prirode (Tammimäki i Männistö, 2012). Prema Segall i sar. (2012) mišićnoskeletni, kao i nociceptivni bol izazvan je stimulacijom perifernih adrenergičkih receptora kateholaminima, dok se povećanjem stimulacije adrenergičkih receptora

neuropatski bol smanjuje. Na isti način se može objasniti izostanak potvrde rezultata ranijih istraživanja o povezanosti polimorfizma rs4680 sa hroničnim postoperativnim bolom *nakon mastektomije* (Hickey i sar., 2011; Fernández-de-Las-Peñas i sar., 2012).

Interesantan nalaz dobijen u okviru ovog istraživanja odnosi se na povezanost rs6269 alelskih varijanti sa bolom na udaljenim mestima i postoperativnim bolom. Naime, AA genotip je bio povezan sa većom prevalencom bola na udaljenim mestima, ali i sa nižim vrednostima postoperativnog bola. Ovi rezultati potvrđuju ranija opažanja o kompleksnom uticaju snižene aktivnosti COMT na bol, jer povećan nivo kateholamina može imati različit ili čak suprotan efekat na različite vrste bola (Tammimäki i Männistö, 2012).

7. ZAKLJUČCI

1. Učestalost genotipova ispitivanih polimorfizama gena za COMT, za rs4680 je iznosila 18,9% za izvorni tip, 61,1% za heterozigote i 20% za mutirani oblik, za rs6269 1,1% za izvorni tip, 63,3% za heterozigote i 35,6% za mutirani oblik, a za rs165774 33,3% za izvorni, 54,4% za heterozigot i 12,2% za mutirani tip u grupi sa TMD, dok je u kontrolnoj grupi učestalost genotipova za rs4680 iznosila 25% za izvorni tip, 56,5% za heterozigote i 18,5% za mutirani oblik, za rs6269 5,4% za izvorni, 65,2% za heterozigotni i 29,3% za mutirani oblik i za rs165774 je iznosila 51,1% za izvorni, 46,7% za heterozigote i 2,2% za mutirani oblik. Učestalost alela za rs4680 je iznosila 49,4% za G i 50,6% za A, za rs6269 32,8% za G i 67,2% za A, a za rs165774 učestalost alela je iznosila 60,6% za G i 39,4% za A alel kod ispitanika sa TMD. U kontrolnoj grupi učestalost alela za rs4680 je iznosila 53,3% za G i 46,7% za A alel, za rs6269 38% za G i 62% za A, a za rs165774 učestalost alela je iznosila 74,5% za G i 25,5% za A alel.

2. Utvrđena je povezanost A alela i genotipova sa A alelom (AG/AA) polimorfizma rs165774 sa pojavom TMD i subdijagnozama TMD: artalgijom i miofascijalnim bolom. Povećan rizik od TMD, artralgijske i miofascijalnog bola uočen je kod homozigota sa mutiranim (AA) alelom u poređenju sa homozigotima sa izvornim (GG) genotipom. Nije bilo značajne razlike u distribuciji genotipova i alela za rs4680 i rs6269 između pacijenata sa TMD i zdravih ispitanika.

3. Utvrđeni su veća zastupljenost i veći stepen hroničnog temporomandibularnog bola kod ispitanika sa AA genotipom i heterozigota za rs165774 u poređenju sa ispitanicima sa izvornim (GG) genotipom u celom uzorku. Povećan rizik od hroničnog bola uočen je kod homozigota sa mutiranim genotipom u poređenju sa nosiocima izvornog (GG) genotipa. Značajno veće vrednosti prosečnog i najjačeg bola utvrđene su kod homozigota sa mutiranim (AA) oblikom i heterozigota u poređenju sa homozigotima sa izvornim (GG) oblikom. Za distribuciju polimorfizama rs4680 i rs6269 u odnosu na ispitivane parametre temporomandibularnog bola nije pokazana značajna razlika između pacijenata sa TMD i kontrolnih ispitanika. U grupi pacijenata sa TMD nije zabeležena povezanost genotipova ispitivanih polimorfizama gena za COMT sa stepenom i prisustvom hroničnog bola.

4. Pri analizi psihosocijalnih komponenti TMD nije uočena značajna razlika u prisustvu i stepenu depresije i somatizacije između različitih genotipova ispitivanih polimorfizama gena za COMT, kako u celom uzorku tako i u grupi pacijenata sa TMD.

5. Utvrđena je povezanost AA genotipa polimorfizma rs6269 sa nižim stepenom hroničnog postoperativnog temporomandibularnog bola, nižim intezitetom i kraćim trajanjem bola u području ekstrakcije donjeg impaktiranog trećeg molara, kao i sa kraćim periodom korišćenja analgetika postoperativno u poređenju sa heterozigotima.

6. Nije utvrđena razlika u distribuciji haplotipova (za haploblok rs165774-rs4680) između pacijenata sa TMD i zdravih ispitanika. Ni jedan od haplotipova nije bio povezan sa rizikom za nastanak TMD.

8. LITERATURA

1. Aaron LA, Burke MM, Buchwald D. Overlapping conditions among patients with chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and temporomandibular disorder. *Arch Intern Med.* 2000;160:221–7.
2. Åberg E, Fandiño-Losada A, Sjöholm LK, Forsell Y, Lavebratt C. The functional Val158Met polymorphism in catechol-O-methyltransferase (COMT) is associated with depression and motivation in men from a Swedish population-based study. *J Affect Disord* 2011;129:158–66.
3. Akhter R, Hassan NM, Ohkubo R, Tsukazaki T, Aida J, Morita M. The relationship between jaw injury, third molar removal, and orthodontic treatment and TMD symptoms in university students in Japan. *J Orofac Pain.* 2008;22:50–6.
4. Albrecht PJ, Rice FL. Role of small-fiber afferents in pain mechanisms with implications on diagnosis and treatment. *Curr Pain Headache Rep* 2010;14:179–88.
5. Allegri M, De Gregori M, Niebel T, Minella C, Tinelli C, Govoni S et al. Pharmacogenetics and postoperative pain; a new approach to improve acute pain management. *Minerva Anestesiol* 2010;76:937–44.
6. Antypa N, Drago A, Serretti A. The role of COMT gene variants in depression: Bridging neuropsychological, behavioral and clinical phenotypes. *Neurosci Biobehav Rev* 2013;37:1597–610.
7. Applebaum EA. Genetic basis for individual variation in pain perception among endodontic patients. Master thesis, School of Dentistry, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill 2009.
8. Bækken PM, Skorpen F, Stordal E, Zwart JA, Hagen K. Depression and anxiety in relation to catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype in the general population: The Nord-Trøndelag health study (HUNT). *BMC Psychiatry* 2008;8:48
9. Babenko V, Graven-Nielsen T, Svensson P, Drewes AM, Jensen TS, Arendt-Nielsen L. Experimental human muscle pain and muscular hyperalgesia induced by combinations of serotonin and bradykinin. *Pain* 1999;82:1–8.
10. Balasubramaniam R, Laudenbach JM, Stoopler ET. Fibromyalgia: an update for oral health care providers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104:589–602.
11. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263–5.
12. Barsky A. Amplification, somatization and somatoform disorders. *Psychosomatics* 1992;33:28–34.
13. Ballantyne JC, Cousins MJ, Giamberardino MA, Jamison RN, McGrath PA, Rajagopal MR, et al. Chronic pain after surgery or injury, IASP Press: Pain Clinical Updates 2011;19(1):1–5.

14. Berberich P, Hoheisel U, Mense S. Effects of carrageenan-induced arthritis on the discharge properties of group II and IV muscle receptors in the cat, *J Neurophysiol* 1988;59:1395–409.
15. Belfer I, Segall SK, Lariviere WR, Smith SB, Dai F, Slade GD, et al. Pain modality- and sex-specific effects of COMT genetic functional variants. *Pain*. 2013;154:1368–76.
16. Bell WE. Clinical management of temporomandibular disorders. Chicago, Year Book Medical Publishers, 1982: p.128–7.
17. Berge TI. Incidence of chronic neuropathic pain subsequent to surgical removal of impacted third molars. *Acta Odontol Scand*. 2002;60:108–12.
18. Bilder RM, Volavka J, Lachman HM, Grace AA. The catechol-O-methyltransferase polymorphism: relations to the tonic-phasic dopamine hypothesis and neuropsychiatric phenotypes. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29:1943–61.
19. Bourke JH, Langford RM, White PD. The common link between functional somatic syndromes may be central sensitisation. *J Psychosom Res*. 2015;78:228–36.
20. Brown SJ, Child RB, Day SH, Donnelly AE. Indices of skeletal muscle damage and connective tissue breakdown following eccentric muscle contractions. *Eur J Appl Physiol* 1997;75:369–74.
21. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999;234:177–86.
22. Buskila D. Genetics of chronic pain states. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007;21:535–47.
23. Cairns BE. Pathophysiology of TMD pain-basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *J Oral Rehabil* 2010;37:391–410.
24. Cairns BE. Nociceptors in the orofacial region (temporomandibular joint & masseter muscle). In: Schmidt RF, Willis WD, editors. *Encyclopedic reference of pain*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 2006:14.
25. Cairns BE, Sessle BJ, Hu JW. Evidence that excitatory amino acid receptors within the temporomandibular joint region are involved in the reflex activation of the jaw muscles. *J Neurosci*. 1998;18:8056–64.
26. Cevoli S, Mochi M, Scapoli C, Marzocchi N, Pierangeli G, Pini LA, et al. A genetic association study of dopamine metabolism-related genes and chronic headache with drug abuse. *Eur J Neurol* 2006; 13:1009–1013.
27. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet*. 2004;75:807–21.
28. Chen FY, Tao W, Li YJ. Advances in brain imaging of neuropathic pain. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:653–7.
29. Chen J, Song J, Yuan P, Tian Q, Ji Y, Ren-Patterson R, et al. Orientation and cellular distribution of membrane-bound catechol-O-methyltransferase in cortical neurons: Implications for drug development. *J Biol Chem* 2011;286:34752–60.

30. Cimino R, Farella M, Michelotti A, Pugliese R, Martina R. Does the ovarian cycle influence the pressure-pain threshold of the masticatory muscles in symptom-free women? *J Orofac Pain* 2000;14:105–11.
31. Cullen DJ, Apolone G, Greenfield S, Guadagnoli E, Cleary P. ASA Physical Status and age predict morbidity after three surgical procedures. *Ann Surg.* 1994;220:3–9.
32. Ćelić R. Dijagnostički kriteriji za istraživanje temporomandibularnih poremećaja (DKI/TMP), 2004; http://www.rdc-tmdinternational.org/Portals/18/Translations_RDC/RDC-Croatian.pdf?ver=2012-07-19-074556-000;
33. Dao TT, LeResche L. Gender differences in pain. *J Orofac Pain* 2000;14:169–84.
34. de Leeuw R. Temporomandibular Disorders. In: de Leeuw R, editor. *Orofacial Pain Guidelines for Assessment, Diagnosis and Management*. 4th edition. Hanover Park, IL: Quintessence Publishing Co, Inc; 2008. pp. 158–176. (The American Academy of Orofacial Pain).
35. Bamshad M, Wooding S, Salisbury BA, Stephens JC. Deconstructing the relationship between genetics and race. *Nat Rev Genet* 2004;5:598–609.
36. Barbosa FR, Matsuda JB, Mazucato M, de Castro Franca S, Zingaretti SM, da Silva LM, et al. Influence of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphisms in pain sensibility of Brazilian fibromyalgia patients. *Rheumatol Int* 2012; 32:427–30
37. Dai F, Belfer I, Schwartz CE, Banco R, Martha JF, Tighioughart H, et al. Association of catechol-O-methyltransferase genetic variants with outcome in patients undergoing surgical treatment for lumbar degenerative disc disease. *Spine J* 2010; 10:949–957.
38. Derogatis LR, Cleary PA. Confirmation of the dimensional structure of the SCL-90: A study in construct validation. *J Clin Psychol* 1977;33:981–9.
39. Devor M, Seltzer Z. Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: *Textbook of Pain*. Wall PD, Melzack R (editors). 1999 Churchill Livingstone, Edinburgh, UK 129–64.
40. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, et al., Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet* 2005;14:135–43.
41. Diatchenko L, Anderson A, Slade G, Fillingim R, Shabalina S, Higgins T, et al. Three major haplotypes of the B2 adrenergic receptor define psychological profile, blood pressure, and the risk for development of a common musculoskeletal pain disorder. *Am J Med Genet Part B.* 2006; 141B:449–62.
42. Drago A, Crisafulli C, Sidoti A, Serretti A. The molecular interaction between the glutamatergic, noradrenergic, dopaminergic and serotonergic systems informs a detailed genetic perspective on depressive phenotypes. *Prog Neurobiol* 2011;94:418–60.

43. Dworkin SF. Psychological and psychosocial assessment. In: Laskin DM, Greene CS, Hylander WL (eds). TMDs. An evidence-based approach to diagnosis and treatment. Chicago: Quintessence, 2006:203–18.
44. Dworkin SF, Huggins KH, LeResche L, Von Korff M, Howard J, Trelove E, et al., Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. *J Am Dent Assoc* 1990;120:273–81.
45. Dworkin SF, LeResche L. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders. *J Craniomandib Disord* 1992;6:301–55.
46. Dworkin SF, Sherman JJ, Mancl L, Ohrbach R, LeResche L, Truelove E. Reliability, validity, and clinical utility of the research diagnostic criteria for temporomandibular disorders axis II scales: depression, non-specific physical symptoms and graded chronic pain. *J Orofac Pain* 2002;16:207–20.
47. Erdal ME, Herken H, Mutlu MN, Bayazit YA. Significance of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in myofacial pain syndrome. *Pain Clin* 2003;15:309–13.
48. Fernández-de-las-Peñas C, Fernández-Lao C, Cantarero-Villanueva I, Ambite-Quesada S, Rivas-Martínez I, del Moral-Avila R, et al. Catechol-O-methyltransferase genotype (Val158met) modulates cancer-related fatigue and pain sensitivity in breast cancer survivors. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:405–12.
49. Fields HL, Heinricher MM, Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:219–45.
50. Fillingim RB, Ohrbach R, Greenspan JD, Knott C, Dubner R, Bair E, et al. Potential psychosocial risk factors for chronic TMD: Descriptive data and empirically identified domains from the OPPERA case-control study. *J Pain* 2011;12:T46–60.
51. Finan PH, Zautra AJ, Davis MC, Lemery-Chalfant K, Covault J, Tennen H. COMT moderates the relation of daily maladaptive coping and pain in fibromyalgia. *Pain* 2011; 152 :300–7.
52. Funke B, Malhotra AK, Finn CT, Plocik AM, Lake SL, Lencz T, et al. COMT genetic variation confers risk for psychotic and affective disorders: a case control study. *Behav Brain Funct* 2005;1:19
53. Gallo LM. Modeling of temporomandibular joint function using MRI and jaw-tracking technologies-mechanics. *Cells Tissues Organs*. 2005;180:54–68.
54. Garcia-Fructuoso FJ, Lao-Villadoniga JI, Santos C, Poca-Dias V, Fernandez-Sola J. Identification of different genetic profiles in severe forms of fibromyalgia and chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a population-based genetic association study. *J of Clin Res* 2008;11:1–24.
55. Genetics Home Reference Glossary, U.S. National Library of Medicine <http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=polymorphism>, 21.12.2014

56. George SZ,Wallace MR,Wright TW, Moser MW, Greenfield WH III, Sack BK, et al. Evidence for a biopsychosocial influence on shoulder pain: pain catastrophizing and catechol-O-methyltransferase (COMT) diplotype predict clinical pain ratings. *Pain* 2008; 136:53–61.
57. Gillespie NA, Zhu G, Heath AC, Hickie IB, Martin NG. The genetic aetiology of somatic distress. *Psychol Med* 2000;30:1051–61.
58. Godar SC, Bortolato M. Gene-sex interactions in schizophrenia: Focus on dopamine neurotransmission. *Front Behav Neurosci* 2014;8:71.
59. Gray RJ, Davies SJ, Quayle AA. A clinical approach to temporomandibular disorders. 1.e Classification and functional anatomy. *Br Dent J* 1994;176:429–35.
60. Grzesiak RC. Psychologic considerations in temporomandibular dysfunction: a biopsychosocial view of symptom formation. *Dent Clin North Am* 1991;35:209–26.
61. Haenisch B, Linsel K, Brüss M, Gilsbach R, Propping P, Nöthen MN, et al. Association of major depression with rare functional variants in norepinephrine transporter and serotonin_{1A} receptor genes. *Am J Med Genet Part B* 150B:1013–6.
62. Hagen K, Pettersen E, Stovner LJ, Skorpen F, Zwart JA. No association between chronic musculoskeletal complaints and Val158Met polymorphism in the Catechol-O-methyltransferase gene. The HUNT study. *BMC Musculoskelet Disord* 2006a; 7:40.
63. Hall KT, Tolkin BR, Chinn GM, Kirsch I, Kelley JM, Lembo AJ, et al. Conscientiousness is modified by genetic variation in catechol-O-methyltransferase to reduce symptom complaints in IBS patients. *Brain Behav* 2015;5:39–44.
64. Hagen K, Pettersen E, Stovner LJ, Skorpen F, Zwart JA. The association between headache and Val158Met polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: the HUNT Study. *J Headache Pain* 2006;7:70–74.
65. Hansson E. Could chronic pain and spread of pain sensation be induced and maintained by glial activation? *Acta Physiol (Oxf)*. 2006;187:321–7.
66. Heiberg A, Heloe B, Heiberg AN, Heloe LA, Magnus P, Berg K, et al. Myofascial pain dysfunction (MPD) syndrome in twins. *Community Dent Oral Epidemiol* 1980;8:434–6.
67. Helkimo M. Studies of function and dysfunction of the masticatory system II. Index for anamnestic and clinical dysfunction and occlusal state. *Sweden Dent J* 1974;67:101–21.
68. Hickey OT, Nugent NF, Burke SM, Hafeez P, Mudrakouski AL, Shorten GD. Persistent pain after mastectomy with reconstruction. *J Clin Anesth* 2011;23:482-8.
69. Hiller W, Rief W, Brähler E. Somatization in the population: from mild bodily misperceptions to disabling symptoms. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 2006;41:704–12.
70. Hocking LJ, Smith BH, Jones GT, Reid DM, Strachan DP, Macfarlane GJ. Genetic variation in the beta2-adrenergic receptor but not catecholamine-O-methyltransferase predisposes to chronic pain: results from the 1958 British Birth Cohort Study. *Pain* 2010; 149:143–151.

71. Holliday KL, Macfarlane GJ, Nicholl BI, Creed F, Thomson W, McBeth J. Genetic variation in neuroendocrine genes associates with somatic symptoms in the general population: results from the EPIFUND study. *J Psychosom Res* 2010;68:469–74.
72. Hong J, Shu-Leong H, Tao X, Lap-Ping Y. Distribution of catechol-O-methyltransferase expression in human central nervous system. *Neuroreport* 1998;9:2861–4.
73. Huang GJ, Drangsholt MT, Rue TC, Cruikshank DC, Hobson KA. Age and third molar extraction as risk factors for temporomandibular disorder. *J Dent Res* 2008;87:283–7.
74. Huang GJ, LeResche L, Critchlow CW, Martin MD, Drangsholt MT. Risk factors for diagnostic subgroups of painful temporomandibular disorders (TMD). *J Dent Res* 2002;81:284–8.
75. Huang GJ, Rue TC. Third-molar extraction as a risk factor for temporomandibular disorder. *J Am Dent Assoc* 2006;137:1547–54.
76. International Association for the Study of Pain. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 1986;3:S1–226.
77. Jakobi J, Bernateck M, Tran AT, Holm L, Volkmann L, Buers D, et al. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms are not associated with multisomatoform disorder in a group of German multisomatoform disorder patients and healthy controls. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010;14:293–7.
78. Juhl GI, Svensson P, Norholt SE, Jensen TS. Long-lasting mechanical sensitization following third molar surgery. *J Orofac Pain*. 2006;20:59–73.
79. Juhl GI, Jensen TS, Norholt SE, Svensson P. Central sensitization phenomena after third molar surgery: a quantitative sensory testing study. *Eur J Pain*. 2008;12:116–27.
80. Juhl GI, Jensen TS, Norholt SE, Svensson P. Incidence of symptoms and signs of TMD following third molar surgery: a controlled, prospective study. *J Oral Rehabil* 2009;36:199–209.
81. Jones DA, Rollman GB, White KP, Hill ML, Brooke RI. The relationship between cognitive appraisal, affect, and catastrophizing in patients with chronic pain. *J Pain* 2003;4:267–77.
82. Kafas P, Leeson R. Assessment of pain in temporomandibular disorders: the bio-psychosocial complexity. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:145–9.
83. Kambur O, Männistö PT. Catechol-O-methyltransferase and pain. *Int Rev Neurobiol* 2010;95:227–79.
84. Kambur O. Catechol-O-methyltransferase and pain in rodents and humans. Academic dissertation, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Helsinki 2013a.
85. Kambur O, Kaunisto MA, Tikkanen E, Leal SM, Ripatti S, Kalso EA. Effect of catechol-o-methyltransferase-gene (COMT) variants on experimental and acute postoperative pain in 1,000 women undergoing surgery for breast cancer. *Anesthesiology* 2013b; 119:1422–33.

86. Karhunen T, Ulmanen I, Panula P. Catechol-O-methyltransferase in rat sensory ganglia and spinal cord. *Neuroscience* 1996;73:267–76.
87. Karoum F, Chrapusta SJ, Egan MF. 3-Methoxytyramine is the major metabolite of released dopamine in the rat frontal cortex: reassessment of the effects of antipsychotics on the dynamics of dopamine release and metabolism in the frontal cortex, nucleus accumbens, and striatum by a simple two pool model. *J Neurochem* 1994;63:972–9.
88. Katz J, Seltzer Z. Transition from acute to chronic postsurgical pain: risk factors and protective factors. *Expert Rev Neurother* 2009;9:723–44.
89. Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet* 2006;367:1618–25.
90. Kern AD, Kondrashov FA. Mechanisms and convergence of compensatory evolution in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nat Genet* 2004;36:1207–12.
91. Kim H, Clark D, Dionne RA. Genetic contributions to clinical pain and analgesia: avoiding pitfalls in genetic research. *J Pain* 2009;10:663–93.
92. Kim B, Kim Y, Yun P, Lee E, Bae J. The effects of estrogen receptor polymorphism on the prevalence of symptomatic temporomandibular disorders. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:2975–79.
93. Kim H, Lee H, Rowan J, Brahim J, Dionne RA. Genetic polymorphisms in monoamine neurotransmitter systems show only weak association with acute post-surgical pain in humans. *Mol Pain* 2006a;2:24.
94. Kim H, Mittal DP, Iadarola MJ, Dionne RA. Genetic predictors for acute experimental cold and heat pain sensitivity in humans. *J Med Genet* 2006b;43:e40.
95. King CD, Wong F, Currie T, Mauderli AP, Fillingim RB, Riley JL. Deficiency in endogenous modulation of prolonged heat pain in patients with Irritable Bowel Syndrome and Temporomandibular Disorder. *Pain*. 2009;143:172–178.
96. Klengel T, Heck A, Pfister H, Brückl T, Hennings JM, Menke A, et al. Somatization in major depression—clinical features and genetic associations. *Acta Psychiatr Scand* 2011;124:317–28.
97. Kocabas NA, Faghel C, Barreto M, Kasper S, Linotte S, Mendlewicz J, et al. The impact of catechol-O-methyltransferase SNPs and haplotypes on treatment response phenotypes in major depressive disorder: a case-control association study. *Int Clin Psychopharmacol* 2010;25:218–27
98. Ladwig KH, Marten-Mittag B, Erazo N, Gündel H. Identifying somatization disorder in a population-based health examination survey. *Psychosomatics* 2001;42:511–18.
99. LaCroix-Fralish ML, Mogil JS. Progress in genetic studies of pain and analgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009;49:97–121.

- 100.Laatikainen LM, Sharp T, Harrison PJ, Tunbridge EM. Sexually dimorphic effects of catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibition on dopamine metabolism in multiple brain regions. *PLoS One*. 2013;8:e61839
- 101.LaCroix-Fralish ML, Mogil JS. Progress in genetic studies of pain and analgesia. *Annu Rev Pharmacol* 49:97–121, 2009.
- 102.Lee PJ, Delaney P, Keogh J, Sleeman D, Shorten GD. Catecholamine-o-methyltransferase polymorphisms are associated with postoperative pain intensity. *Clin J Pain* 2011;27:93–101.
- 103.Lembo AJ, Zaman M, Krueger RF, Tomenson BM, Creed FH. Psychiatric disorder, irritable bowel syndrome, and extra-intestinal symptoms in a population-based sample of twins. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:686–694.
- 104.LeResche L. Gender considerations in the epidemiology of chronic pain. In: Crombie IK (editor.), *Epidemiology of pain*. Seattle: IASP Press; 1999. pp. 43e52.
- 105.Lim PF, Smith S, Bhalang K, Slade GD, Maixner W. Development of temporomandibular disorders is associated with greater bodily pain experience. *Clin J Pain*. 2010 Feb;26(2):116–20
- 106.Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melén K, Julkunen I, et al. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* 1995;34:4202–10,
- 107.Loughlin J: Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1 and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000;27:779–84.
- 108.Maes M, Meltzer HY. The serotonin hypothesis of major depression. In: Bloom F, Kupfer D, editors. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. Raven, New York: 1995. pp. 933–944.
- 109.Magnusson JE, Fisher K. The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Res*. 2000 ;855:260–6.
- 110.Maixner W, Diatchenko L, Dubner R, Fillingim RB, Greenspan JD, Knott C, et al. Orofacial pain prospective evaluation and risk assessment study - the OPPERA study. *J Pain*. 2011;12(11 Suppl):T4–11.e1–2
- 111.Mandelli L, Serretti A, Marino E, Pirovano A, Calati R, Colombo C. Interaction between serotonin transporter gene, catechol-O-methyltransferase gene and stressful life events in mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2007;10:437–47.
- 112.Manfredini D, Borella L, Favero L, Ferronato G, Guarda-Nardini L. Chronic pain severity and depression/somatization levels in TMD patients. *Int J Prosthodont*. 2010a;23:529–34.
- 113.Manfredini D, Bucci MB, Nardini LG. The diagnostic process for temporomandibular disorders. *Stomatologija*. 2007;9:35–9.

114. Manfredini D, Winocur E, Ahlberg J, Guarda-Nardini L, Lobbezoo F. Psychosocial impairment in temporomandibular disorders patients. RDC/TMD axis II findings from a multicentre study. *J Dent*. 2010b;38:765–72.
115. Männistö PT, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev* 1999;51:593–628.
116. Männistö PT, Ulmanen I, Lundström K, Taskinen J, Tenhunen J, Tilgmann C, et al. Characteristics of catechol O-methyl-transferase (COMT) and properties of selective COMT inhibitors. *Prog Drug Res* 1992;39: 291–350.
117. Marbach JJ, Levitt M. Erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in facial pain patients. *J Dent Res*. 1976;55:711
118. Martínez-Jauand M, Sitges C, Rodríguez V, Picornell A, Ramon M, Buskila D, Montoya P. Pain sensitivity in fibromyalgia is associated with catechol-O-methyltransferase (COMT) gene. *Eur J Pain*. 2013;17:16–27.
119. Massat I, Souery D, Del-Favero J, Nothen M, Blackwood D, Muir W, Kaneva R, Serretti A, Lorenzi C, Rietschel M, Milanova V, Papadimitriou GN, Dikeos D, Van Broekhoven C, Mendlewicz J. Association between COMT (Val158Met) functional polymorphism and early onset in patients with major depressive disorder in a European multicenter genetic association study. *Mol Psychiatry*. 2005;10:598–605.
120. McNeill C. Evidence-based TMD guidelines. *J Orofac Pain*. 1997a;11:93.
121. McNeill C. Management of temporomandibular disorders: Concepts and controversies. *J Prosthetic Dent* 1997b;77:510–22.
122. Melis M, Giosia MD. The role of genetic factors in the etiology of temporomandibular disorders: a review. *Cranio*. 2014 Sep 14:2151090314Y0000000027. [Epub ahead of print]
123. Meloto CB, Segall SK, Smith S, Parisien M, Shabalina SA, Rizzatti-Barbosa CM, et al. COMT gene locus: new functional variants. *Pain* 2015;156:2072–83.
124. Meloto CB, Serrano PO, Ribeiro-Dasilva MC, Rizzatti-Barbosa CM. Genomics and the new perspectives for temporomandibular disorders. *Arch Oral Biol* 2011;56:1181–91.
125. Mense S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain* 1993;54:241–89.
126. Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain: Description of chronic pain syndromes and definition of pain terms. IASP Press, WA, USA; 1994.
127. Michaelis M. Electrophysiological characteristics of injured peripheral nerves. in *Mechanisms and mediators of neuropathic pain* Malmberg AB, Chaplan SR (ed), Springer Basel AG; 2002.
128. Michalowicz BS, Pihlstrom BL, Hodges JS, Bouchard TJ Jr. No heritability of temporomandibular joint signs and symptoms. *J Dent Res* 2000;79:1573–8.

129. Michelotti A, Liguori R, Toriello M, D'Antò V, Vitale D, Castaldo G, et al. Catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphisms as risk factor in temporomandibular disorders patients from Southern Italy. *Clin J Pain* 2014;30:129–33.
130. Mogil JS. The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7744–51.
131. Mohlin B, Axelsson S, Paulin G, Pietila, Bondemarke L, Brattstro V, et al: TMD in relation to malocclusion and orthodontic treatment: a systematic review. *Angle Orthod* 2007;77:542e548
132. Mongini F, Ciccone G, Ibertis F, Negro C. Personality characteristics and accompanying symptoms in temporomandibular joint dysfunction, headache, and facial pain. *J Orofac Pain* 2000;14:52–8
133. Murray GM, Peck CC. Orofacial pain and jaw muscle activity: a new model. *J Orofac Pain*. 2007;21:263–278.
134. Myöhänen TT, Schendzielorz N, Männistö PT. Distribution of catechol-O-methyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice. *J Neurochem* 2010;113:1632–43.
135. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskyi O, Makarov SS, et al. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 2006;31:1930–3.
136. Nackley AG, Tan KS, Fecho K, Flood P, Diatchenko L, Maixner W. Catechol-O-methyltransferase inhibition increases pain sensitivity through activation of both beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors. *Pain* 2007; 128:199–208.
137. National Institutes of health technology assessment, Conference statement: Management of temporomandibular disorders, April 29-May 1, 1996. *Oral Surg Oral Med Oral Patholog Oral Radiol Endod* 1997;83:177–83
138. Newham DJ, Edwards RHT, Mills KR. Skeletal muscle pain. In: Wall PD, Melzack R (eds). *Textbook of pain*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994:423–40.
139. Nicholl BI, Holliday KL, Macfarlane GJ, Thomson W, Davies KA, O'Neill TW, et al. European Male Ageing Study Group. No evidence for a role of the catechol-O-methyltransferase pain sensitivity haplotypes in chronic widespread pain. *Ann Rheum Dis* 2010;69:2009–12.
140. Norholt SE. Treatment of acute pain following removal of mandibular third molars. Use of the dental pain model in pharmacological research and development of a comparable animal model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998;27(Suppl.1):1–41.
141. Oakley M, Vieira AR. The many faces of the genetics contribution to temporomandibular joint disorder. *Orthod Craniofac Res* 2008;11:125–35.
142. Okeson JP. *Bell's orofacial pains*. 5th edition. Chicago, Quintessence Publishing, 1995.

143. Okeson JP, editor. *Orofacial Pain, guidelines for assessment, diagnosis, and management*. Carol Stream, Illinois, Quintessence Publishing, 1996.
144. Okeson P. Current terminology and diagnostic classification schemes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;83:61–4.
145. Okeson JP. General considerations in occlusal therapy. In: Okeson JP, editor. *Management of temporomandibular disorders and occlusion*. 5th edition. St Louis, Mosby, 2003:p.551–65.
146. Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, Parada CA, Tambeli CH. 5-HT acts on nociceptive primary afferents through an indirect mechanism to induce hyperalgesia in the subcutaneous tissue. *Neuroscience* 2007;145:708–14.
147. Omair A, Lie BA, Reikeras O, Holden M, Brox JI. Genetic contribution of catechol-O-methyltransferase variants in treatment outcome of low back pain: a prospective genetic association study. *BMC Musculoskelet Disord* 2012;13:76
148. Oral K, Bal Küçük B, Ebeoğlu B, Dinçer S. Etiology of temporomandibular disorder pain. *Agri* 2009;21:89–94.
149. Park JW, Lee KS, Kim JS, Kim YI, Shin HE. Genetic Contribution of catechol-O-methyltransferase polymorphism in patients with migraine without aura. *J Clin Neurol* 2007;3:24–30.
150. Peck CC, Goulet JP, Lobbezoo F, Schiffman EL, Alstergren P, Anderson GC, et al. Expanding the taxonomy of the diagnostic criteria for temporomandibular disorders. *J Oral Rehabil*. 2014;41:2–23.
151. Peng YI, Liu HJ, Guo L, Fu TC. Mechanisms of adrenaline-induced antinociception in mice. *Chin J Physiol*. 1992;35:205–10,
152. Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol*. 2006;80:53–83.
153. Planello AC, Campos MIG, Meloto CB, Secolin R, Rizatti-Barbosa CM, Line SRP, et al. Association of matrix metalloproteinase gene polymorphism with temporomandibular joint degeneration. *Eur J Oral Sci* 2011;119:1–6.
154. Plesh O, Adams SH, Gansky SA. Temporomandibular joint and muscle disorder-type pain and comorbid pains in a national US sample. *J Orofac Pain*. 2011;25:190–8.
155. Poveda Roda R, Bagan JV, Díaz Fernández JM, Hernández Bazán S, Jiménez Soriano Y. Review of temporomandibular joint pathology. Part I: classification, epidemiology and risk factors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:E292–8.
156. Rasch B, Spalek K, Buholzer S, Luechinger R, Boesiger P, de Quervain DJ, et al. Aversive stimuli lead to differential amygdala activation and connectivity patterns depending on catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype. *Neuroimage* 2010;52:1712–9.
157. Renton T, Durham J, Aggarwal VR. The classification and differential diagnosis of orofacial pain. *Expert Rev Neurother* 2012;12:569–76.

158. Ribeiro-Dasilva MC, Peres Line SR, Leme Godoy dos Santos MC, Arthuri MT, Hou W, Fillingim RB, Rizzatti Barbosa CM. Estrogen receptor- α polymorphisms and predisposition to TMJ disorder. *J Pain*. 2009; 10:527–533.
159. Rief W, Hennings A, Riemer S, Euteneuer F. Psychobiological differences between depression and somatization. *J Psychosom Res*. 2010;68:495–502.
160. Rief W, Pilger F, Ihle D, Verkerk R, Scharpe S, Maes M. Psychobiological aspects of somatoform disorders: contributions of monoaminergic transmitter systems. *Neuropsychobiology* 2004;49:24–9.
161. Rief W, Schaefer S, Hiller W, Fichter MM. Lifetime diagnoses in patients with somatoform disorders: which came first? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1992;241:236–40.
162. Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000;405:847–56.
163. Raphael KG, Marbach JJ, Gallagher RM, Dohrenwend BP. Myofascial TMD does not run in families. *Pain* 1999;80:15–22.
164. Rollman GB, Gillespie JM. The role of psychosocial factors in temporomandibular disorders. *Curr Rev Pain* 2000;4:71–81.
165. Romero-Reyes M, Uyanik JM. Orofacial pain management: Current perspectives. *J Pain Res* 2014;7:99–115.
166. Ruhe HG, Mason NS, Schene AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine, and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry* 2007;12:331–59.
167. Rutherford K, Le Trong I, Stenkamp RE, Parson WW. Crystal structures of human 108V and 108M catechol O-methyltransferase. *J Mol Biol* 2008;380:120–130
168. Sadhasivam S, Chidambaran V, Olbrecht VA, Esslinger HR, Zhang K, Zhang X, et al. Genetics of pain perception, COMT and postoperative pain management in children. *Pharmacogenomics* 2014;15:277–84.
169. Sánchez C, Hyttel J. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol Neurobiol* 1999;19:467–89.
170. Sarlani E, Garrett PH, Grace EG, Greenspan JD. Temporal summation of pain characterizes women but not men with temporomandibular disorders. *J Orofac Pain* 2007;21:309–17.
171. Sarlani E, Grace EG, Reynolds MA, Greenspan JD. Evidence for up-regulated central nociceptive processing in patients with masticatory myofascial pain. *J Orofac Pain*. 2004;18:41–55.
172. Schiffman E, Orbach R, Truelove E, Look J, Anderson G, Goulet JP et al. Diagnostic criteria for temporomandibular disorders (DC/TMD) for clinical and research applications: Recommendations of the International RDC/TMD Consortium Network and Orofacial Pain Special Interest Group. *J Oral Facial Pain Headache*. 2014;28:6–27.

- 173.Segall SK, Maixner W, Belfer I, Wiltshire T, Seltzer Z, Diatchenko L. Janus molecule I: dichotomous effects of COMT in neuropathic vs nociceptive pain modalities. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012;11:222–35.
- 174.Serpell M. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Surgery* 2006;24:350–3.
- 175.Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anesthesiol.* 2005;71:117–136.
- 176.Sherman JJ, LeResche L, Huggins KH, Mancl LA, Sage JC, Dworkin SF. The relationship of somatization and depression to experimental pain response in women with temporomandibular disorders. *Psychosom Med* 2004;66:852–60.
- 177.Shibata K, Diatchenko L, Zaykin DV. Haplotype associations with quantitative traits in the presence of complex multilocus and heterogeneous effects. *Genet Epidemiol* 2009;33:63–78.
- 178.Slade GD, Diatchenko L, Bhalang K, Sigurdsson A, Fillingim RB, Belfer I, et al. Influence of psychological factors on risk of temporomandibular disorders. *J Dent Res* 2007;86:1120–5.
- 179.Slade GD, Diatchenko L, Ohrbach R, Maixner W. Orthodontic Treatment, Genetic Factors and Risk of Temporomandibular Disorder. *Semin Orthod* 2008;14:146–56.
- 180.Slade GD, Sanders AE, Ohrbach R, Bair E, Maixner W, Greenspan JD, et al. COMT diplotype amplifies effect of stress on risk of temporomandibular pain. *J Dent Res* 2015;94:1187–95.
- 181.Smith SB, Maixner DW, Greenspan JD, Dubner R, Fillingim RB, Ohrbach R, et al. Potential genetic risk factors for chronic TMD: genetic associations from the OPPERA case control study. *J Pain.* 2011;12(11 Suppl):T92–101.
- 182.Smolka MN, Schumann G, Wrase J, Grüsser SM, Flor H, Mann K, et al. Catechol-O-methyltransferase val158met genotype affects processing of emotional stimuli in the amygdala and prefrontal cortex. *J Neurosci.* 2005;25:836–42.
- 183.Stamford JA. Descending control of pain. *Br J Anaesth* 1995;75:217–27.
- 184.Stohler CS. Taking stock: from chasing occlusal contacts to vulnerability alleles. *Orthod Craniofac Res* 2004;7:157–61.
- 185.Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am. J. Psychiatry* 2000;157:1552–62.
- 186.Suvinen TI, Reade PC. Temporomandibular disorders: a critical review of the nature of pain and its assessment. *J Orofac Pain* 1995;9:317–39.
- 187.Suvinen TI, Reade PC, Kempainen P, Könönen M, Dworkin SF. Review of aetiological concepts of temporomandibular pain disorders: towards a biopsychosocial model for integration of physical disorder factors with psychological and psychosocial illness impact factors. *Eur J Pain.* 2005;9:613–33.
- 188.Svensson P, Graven-Nielsen T. Craniofacial muscle pain: review of mechanisms and clinical manifestations. *J Orofac Pain* 2001;15:117–45.

189. Takeuchi Y, Zeredo JL, Fujiyama R, Amagasa T, Toda K. Effects of experimentally induced inflammation on temporomandibular joint nociceptors in rats. *Neurosci Lett*. 2004; 354:172–4.
190. Tammimäki A, Männistö PT. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and chronic human pain: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics* 2012;22:673–91.
191. Tchivileva IE, Lim PF, Smith SB, Slade GD, Diatchenko L, McLean SA, et al. Effect of catechol-O-methyltransferase polymorphism on response to propranolol therapy in chronic musculoskeletal pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover pilot study. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20:239–48.
192. Tenhunen J, Salminen M, Lundström K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I. Genomic organization of the human catechol-O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem* 1994;223:1049–59.
193. Tracey I, Mantyh PW. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* 2007;55:377–91.
194. Tregouet DA, Garelle V. A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. *Bioinformatics* 2007;23:1038–9.
195. Tunbridge EM, Harrison PJ, Weinberger DR. Catechol-o-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond. *Biol Psychiatry*. 2006;60:141–51.
196. Tunbridge EM, Lane TA, Harrison PJ. Expression of multiple catechol-o-methyltransferase (COMT) mRNA variants in human brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007;144B:834–9.
197. Tunbridge EM, Harrison PJ. Importance of the COMT gene for sex differences in brain function and predisposition to psychiatric disorders. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 2011;8:119–40.
198. VanSelms MK, Lobbezoo F, Naeije M. Time courses of myofascial temporomandibular disorder complaints during a 12-month follow-up period. *J Orofac Pain* 2009;23:345–352.
199. Vargas-Alarcón G, Fragoso JM, Cruz-Robles D, Vargas A, Vargas A, Lao-Villadóniga JI, et al. Catechol-O-methyltransferase gene haplotypes in Mexican and Spanish patients with fibromyalgia. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R110,
200. Verhoeff NP, Christensen BK, Hussey D, Lee M, Papatheodorou G, Kopala L, et al. Effects of catecholamine depletion on D2 receptor binding, mood, and attentiveness in humans: a replication study. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;74:425–32.
201. Vernal R, Vela'squez E, Gamonal J, Garcia-Sanz JA, Silva A, Mariano Sanz. Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol* 2008;53:910–15.
202. Visscher CM, Lobbezoo F. TMD pain is partly heritable. A systematic review of family studies and genetic association studies. *J Oral Rehab* 2015;42:386–99.

- 203.Voisey J, Swagell CD, Hughes IP, Lawford BR, Young RM, Morris CP. HapMap tag-SNP analysis confirms a role for COMT in schizophrenia risk and reveals a novel association. *Eur Psychiatry*. 2012;27:372–6.
- 204.Voisey J, Swagell CD, Hughes IP, Lawford BR, Young RM, Morris CP. A novel SNP in COMT is associated with alcohol dependence but not opiate or nicotine dependence: a case control study. *Behav Brain Funct*. 2011;7:51
- 205.Vossen H, Kenis G, Rutten B, van Os J, Hermens H, Lousberg R. The genetic influence on the cortical processing of experimental pain and the moderating effect of pain status. *PLoS One* 2010; 5:e13641.
- 206.Wall J, Pritchard J. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 2003;9:477–85.
- 207.Werner MU, Mjöbo HN, Nielsen PR, Rudin A. Prediction of postoperative pain: a systematic review of predictive experimental pain studies. *Anesthesiology*. 2010;112:1494–502.
- 208.Wessely S, Nimnuan C, Sharpe M. Functional somatic syndromes: one or many? *Lancet*. 1999;354:936–9.
- 209.Wood PB. Role of central dopamine in pain and analgesia. *Exper Rev Neurother* 2008;8:781–97.
- 210.Xiang X, Jiang Y, Ni Y, Fan M, Shen F, Wang X, et al. Catechol-O-methyltransferase polymorphisms do not play a significant role in pain perception in male Chinese Han population. *Physiol Genomics* 2012;44:318–28
- 211.Young EE, Lariviere WR, Belfer I. Genetic basis of pain variability: Recent advances *J Med Genet* 2012;49:1–9.
- 212.Zhang K, Gao J, An C, Gao X, Zheng Z, Li R, et al. An association study between catechol-O-methyltransferase gene and mental retardation in the Chinese Han population. *Neurosci Lett* 2007;419:83–87.
- 213.Zhang J, Ji Y, Moon I, Pelleymounter LL, Ezequel Salavaggione O, Wu Y, et al. Catechol O-methyltransferase pharmacogenomics: Human liver genotype-phenotype correlation and proximal promoter studies. *Pharmacogenet Genomics* 2009;19:577–87.
- 214.Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, et al. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science* 2003, 299:1240–3.

9. LISTA SKRAĆENICA

DC/TMD, Dijagnostički kriterijum za temporomandibularne funkcije (engl. Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders)

CI, interval poverenja (engl. confidence interval)

COMT, katehol-O-metil-transferaza (engl. catechol-O-methyltransferase)

D', parametar za merenje jačine neravnoteže vezanosti

het, heterozigot

LD, neravnoteža vezanosti (engl. linkage disequilibrium)

mut, mutirani tip genotipa

MAF, zastupljenosti ređeg (minor) alela (engl. Minor Allele Frequency)

NS, bez statističke značajnosti (engl. non significant)

NVS, numerička skala bola (engl. numerical verbal rating scale)

OR, odnos šansi (engl. odds ratio)

PCR, lančana reakcija polimeraze (engl. polymerase chain reaction)

RDC/TMD, Istraživački dijagnostički kriterijum za temporomandibularne funkcije (engl. Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders)

SCL-90, upitnik simptoma psihometrijskog testa (engl. symptom checklist)

SD, standardna devijacija

SNP, polimorfizam nuklyoneotidne sekvence (engl. single nucleotide polymorphism)

TMD, temporomandibularne disfunkcije

TMZ, temporomandibularni zglob

wt, izvorni tip genotipa (engl. wild type)

\bar{X} , srednja vrednost