

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Boban Ž. Aničić

VARIJABILNOST NASLEDNE OSNOVE I  
RIZIK OD NASTANKA PLEOMORFNOG  
ADENOMA PLJUVAČNIH ŽLEZDA -  
ANALIZA GENA ZA SURVIVIN, TP53 I  
MATRIKSNU METALOPROTEINAZU 9

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Boban Ž. Aničić

GENETIC VARIABILITY AND RISK OF  
DEVELOPMENT OF SALIVARY GLAND  
PLEOMORPHIC ADENOMA: ANALYSIS  
OF SURVIVIN, TP53 AND MATRIX  
METALLOPROTEINASE 9 GENES

Doctoral dissertation

Belgrade 2014.

Mentor: **Prof. dr Vitomir Konstantinović**, Univerzitet u Beogradu,  
Stomatološki fakultet

Komentor: **Prof. dr Jelena Milašin**, Univerzitet u Beogradu, Stomatološki  
fakultet

Članovi Komisije:

**Prof. dr Miroslav Vukadinović**, Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

**Doc. dr Branka Popović**, Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

**Prof. dr Ivana Novaković**, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Datum odbrane: 15.07.2014.godine.

*Doktorska disertacija je realizovana na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju, Laboratoriji za molekularnu genetiku i Laboratoriji za patohistologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.*

*Želeo bih da se zahvalim:*

*Svom mentoru, Prof. dr Jeleni Milašin, na podršci, prijateljskim, stručnim i ljudskim savetima i pomoći koju mi je pružila u izradi ove doktorske disertacije. Velika mi je čast i privilegija što sam ovu studiju uradio pod njenim nadzorom.*

*Nađi Nikolić, na nemerljivom trudu i pomoći u izradi laboratorijskog dela doktorata.*

*Mariji Kostić, na pomoći u izvodjenju doktorata.*

*Mileni Leković, na pomoći u izradi doktorata.*

*Svojim roditeljima, Živojinu i Desanci, na ogromnoj podršci u životu - hvala što postojim.*

*Milici, Ani i Stevanu, što mi daju smisao postojanja.*

## **VARIJABILNOST NASLEDNE OSNOVE I RIZIK OD NASTANKA PLEOMORFNOG ADENOMA PLJUVAČNIH ŽLEZDA - ANALIZA GENA ZA SURVIVIN, TP53 I MATRIKSNU METALOPROTEINAZU 9**

**Uvod :** Genetičke studije neoplazmi pljuvačnih žlezda, uključujući i pleomorfni adenom (PA) su uglavnom bile fokusirane na hromozomske aberacije, i nekoliko specifičnih obrazaca hromozomskih translokacija je do sada opisano kao ključni događaji u nastanku PA. Molekularne promene uključene u patogenezu ovih tumora znatno su manje izučavane i okarakterisane, a podaci o genetičkim polimorfizmima kao faktorima rizika za razvoj PA ili kao prognostičkim faktorima, gotovo da su nepostojeći .

**Cilj:** Cilj ovog rada bio je da se ispita potencijalna uloga nekoliko polimorfizama u genima koji su uključeni u apoptozu i kontrolu ćelijskog ciklusa (survivin, TP53) i degradaciju i remodeliranje ekstracelularnog matriksa (matriksna metaloproteinaza 9 - MMP-9), kao potencijalnih faktora susceptibilnosti za nastanak pleomorfnom adenoma i kao prognostičkih markera u populaciji Srbije.

**Materijal i metode:** DNK je izolovana iz 74 parafinska uzorka pleomorfni adenoma pacijenata operisanih na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Kontrolna DNK je dobijena iz limfocita periferne krvi zdravih dobrovoljnih davalaca krvi, koji su odgovarali pacijentima u pogledu polne i starosne strukture. Analiza polimorfizama pojedinačnih nukleotida („single nucleotide polymorphism“-SNP) u regionu promotora gena za survivin, na položajima -241 (C/T supstitucija) i -31 (G/C supstitucija), zatim u promotorskom regionu MMP-9 gena (-1562 C/T supstitucija), i konačno SNP Pro47Ser u TP53 genu, urađena je metodom lančane reakcije polimeraze (Polymerase Chain Reaction-PCR) i restrikcionom analizom (polimorfizmi dužine restrikcionih fragmenata odnosno „Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP) zatim elektroforezom. Insercioni polimorfizam u TP53 gena, PIN3 Ins 16bp je analiziran pomoću PCR i gel elektroforeze. Asocijacija između genotipova i alela i rizika od razvoja PA, kao i

kliničkih parametara tumora određena je korišćenjem logističke regresione analize.

**Rezultati:** Većina pacijenata nalazila se u starosnoj grupi od 40 do 60 godina , a trajanje bolesti bilo je između 2 meseca i 360 meseci, sa srednjom dužinom trajanja od 41 meseca. Što se tiče uloge i značaja SNP kao faktora rizika, pokazano je da su nosioci C alela u položaju -31 G/C u genu za survivin imali 4 puta manji rizik za razvoj PA ( $p = 0,005$ ) u odnosu na GG homozigote. Nije bilo statistički značajne povezanosti između SNP -241 C/T i rizika od PA. Ni Pro47Ser ni PIN3 Ins polimorfizmi u TP53 genu nisu mogli da budu dovedeni u vezu sa rizikom od razvoja PA. Nosioci varijantnog alela T na poziciji -1562 u genu za MMP-9 imali su 4 puta veći rizik da razviju PA ( $p < 0.001$ ) u odnosu na „wild type“ CC homozigote. U pogledu veze između polimorfizama i kliničkih parametara, pokazano je da je alelna varijanta SNP u TP53 genu u heterozigotnom stanju nađena isključivo u tumorima preko 3 cm, a da su heterozigoti za survivin -31 polimorfizam (GC genotip) dominirali u starijoj grupi obolelih.

**Zaključak :** Pokazano je da su polimorfizmi -31 G/C u genu za survivin i -1562 C/T u genu za MMP-9 modulatori rizika za nastanak pleomorfnih adenoma pljuvačnih žlezda u našoj populaciji. Ispitivani polimorfizmi uglavnom nisu pokazali asocijaciju sa kliničkim parametrima, sa izuzetkom veličine tumora (u tumorima preko 3cm značajno češće je bio zastupljen TP53 SNP), i starosti pacijenata (stariju grupu je karakterisao polimorfizam -31 G/C). Ovo su prve studije asocijacije vezane za polimorfizme u genima za survivin, TP53 i MMP-9 u pleomorfnim adenomima pljuvačnih žlezda.

**Ključne reči:** pleomorfni adenom, genetički polimorfizmi, survivin, TP53, matriksna metaloproteinaza 9, PCR/RFLP analiza.

**Naučna oblast:** Maksilofacijalna hirurgija

**Uža naučna oblast:** Onkogenetika

**UDK:** 577.21:616.316-006.55(043.3)

## **GENETIC VARIABILITY AND RISK OF DEVELOPMENT OF SALIVARY GLAND PLEOMORPHIC ADENOMA: ANALYSIS OF SURVIVIN, TP53 AND MATRIX METALLOPROTEINASE 9 GENES.**

**Background:** Genetic studies of salivary gland neoplasms including pleomorphic adenomas (PA) were mainly focused on chromosomal changes and several specific patterns of chromosome translocations have been described. Molecular changes involved in tumour pathogenesis are less well characterized, and data regarding genetic polymorphisms as risk factors for PA development are almost inexistent.

**Aim:** The aim of this thesis was to investigate the putative role of several polymorphisms in genes involved in apoptosis (survivin), cell cycle control and apoptosis (TP53), and extracellular matrix degradation and remodeling (matrix metalloproteinases - MMP-9) as potential susceptibility factors and prognostic factors in Serbian patients with PA.

**Materials and Methods:** DNA was extracted from 74 formalin fixed, paraffin embedded samples of PA that were surgically removed at the Clinic of Maxillofacial Surgery, School of Dental Medicine, University of Belgrade. Control specimens of DNA were extracted from buccal swabs of healthy donors, sex and age matched with the patients group. Polymorphisms analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter region of the survivin gene, at positions -241 (a C/T substitution) and -31 (a G/C substitution), in the promoter region (-1562 C/T) of the MMP-9 gene, and Pro47Ser in the TP53 gene, was performed by PCR-RFLP followed by electrophoresis. The insertion polymorphism in the TP53 gene, PIN3 Ins 16bp was analyzed by PCR and gel electrophoresis. The association of genotypes and phenotypes with risk of PA development and clinical parameters of the tumor was determined using logistic regression analysis.

**Results:** The majority of the patients had an age range between 40 and 60 years and the duration of the disease was between 2 and 360 months, with a mean duration of 41 months. Regarding the relevance of SNPs, it was shown

that the carriers of the C allele at position -31 G/C of the survivin gene have a 4 fold decrease of the risk of developing PA ( $p=0.005$ ) compared to GG homozygotes. There was no statistically significant association between the SNP -241 C/T and the risk of PA. Neither the Pro47Ser nor the PIN3 Ins in the TP53 gene could be associated with the risk of PA. Carriers of the variant allele T of the -1562C/T SNP in MMP-9 gene had a 4 fold increase of the risk of developing PA ( $p<0.001$ ). In addition, the TP53 SNP was associated with tumours larger than 3 cm, whilst the -31 G/C survivin polymorphism was predominantly found in elder patients. **Conclusion:** It has been shown that the polymorphism -31 G/C in the survivin gene and -1562 C/T in the MMP-9 gene modulate the risk of pleomorphic adenomas development in Serbian population. The investigated polymorphisms have not shown a major impact on clinical parameters. However, an association was found between tumor size and TP53 polymorphism (the TP53 SNP was significantly more frequent in tumors over 3cm), and patients age and -31 G/C survivin polymorphism (G/C heterozygotes dominated in the older group of patients). These are the first association studies related to survivin, TP-53 and MMP-9 gene polymorphisms in pleomorphic adenoma of the parotid gland.

**Key words:** pleomorphic adenoma, genetic polymorphisms, survivin gene, TP53 gene, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene, PCR/RFLP analysis.

**Scientific field:** Maxillofacial surgery

**Scientific field Specialiyed:** Oncogenetic

**UDC:** 577.21:616.316-006.55(043.3)



## SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Anatomija i morfologija pljuvačnih žlezda	2
1.2. Tumori pljuvačnih žlezda	3
1.3. Pleomorfni adenom pljuvačnih žlezda	6
1.3.1. Kliničko-morfološke karakteristike	7
1.3.2. Histološke karakteristike	11
1.3.3. Klasifikacija	13
1.3.4. Dijagnostika	13
1.3.5. Lečenje	15
1.4. Molekularno-genetička osnova tumora	19
1.5. Genetički polimorfizmi	21
1.6. Geni uključeni u kontrolu proliferacije, diferencijacije i smrti ćelije	25
1.6.1. Apoptoza – Programirana ćelijska smrt	26
1.6.2. Proteini inhibitori apoptoze	29
1.6.2.1. Survivin	29
1.6.2.1.1. Polimorfizmi u genu za survivin (-31G/C, -241C/T, rs9904341)	32
1.6.2.2. Tumor protein 53	33
1.6.2.2.1. Polimorfizmi u genu za TP53 (Pro47Ser, PIN3 Ins 16bp, rs17878362)	37
1.7. Matriksne metaloproteinaze	39
1.7.1. Matriksna metaloproteinaza 9 (MMP-9)	41
1.7.1.1. Polimorfizam u genu za matriksnu metaloproteinazu 9 (MMP-9) (-1562 C/T, rs3918242)	43
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	44
3. METODOLOGIJA	45
3.1. Metode izolacije DNK	45
3.1.1. Izolacija DNK iz tumorskog tkiva	46
3.1.2. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi	46

3.2.	Lančana reakcija polimeraze (PCR metoda)	48
3.2.1.	PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za survivin	48
3.2.2.	PCR reakcija u analizi polimorfizma TP53 gena	50
3.2.3.	PCR reakcija u analizi polimorfizma MMP-9 gena	51
3.3.	Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)	52
3.4.	Restrikciona digestija PCR produkata i analiza dužine restrikcionih fragmenata (RFLP)	53
3.4.1.	RFLP u analizi polimorfizama gena za survivin (-31 G/C, -241 C/T)	54
3.4.2.	RFLP u analizi polimorfizama TP53 gena (Pro47Ser, PIN3 Ins 16bp)	55
3.4.2.1.	RFLP u analizi insercionog polimorfizma TP53 gena	57
3.4.3.	RFLP u analizi polimorfizma MMP-9 gena (-1562 C/T)	58
3.5.	Statistička analiza	60
4.	REZULTATI	61
4.1.	Rezultati opštih karakteristika uzorka	62
4.2.	Analiza genskih polimorfizama	73
4.2.1.	Analiza polimorfizama u genu za survivin	74
4.2.1.1.	Analiza polimorfizma -31 G/C (rs9904341) u genu za survivin	74
4.2.1.2.	Analiza polimorfizma -241 C/T (rs17878467) u genu za survivin	76
4.2.2.	Analiza polimorfizama u TP53 genu	78
4.2.2.1.	Analiza polimorfizma Pro47Ser u TP53 genu	79
4.2.2.2.	Analiza polimorfizma PIN3 Ins u TP53 genu	80
4.2.3.	Analiza polimorfizma -1562 C/T (rs3918242) u genu za MMP-9	82
4.3.	Povezanost kliničkih parametara i genotipova	85
4.3.1.	Povezanost veličine tumora i genotipova	85
4.3.2.	Povezanost evolutivnog perioda PA i genotipova	88

4.3.3. Povezanost godina starosti pacijenata i genotipova	91
5. DISKUSIJA	94
5.1. Klinička studija	94
5.2. Genetička studija	96
5.2.1. Polimorfizmi u genu za survivin	96
5.2.1.1. Polimorfizam -31 G/C (rs9904341) u genu za survivin	97
5.2.1.2. Polimorfizam -241 C/T (rs17878467) u genu za survivin	99
5.2.2. Polimorfizmi u TP53 genu	100
5.2.2.1. Polimorfizam Pro47Ser u TP53 genu	100
5.2.2.2. Polimorfizam PIN3 Ins u TP53 genu	101
5.2.3. Polimorfizam -1562 C/T (rs3918242) u genu za MMP-9	102
6. ZAKLJUČCI	104
7. LITERATURA	106
8. BIOGRAFIJA	119

## 1. UVOD

Tumori pljuvačnih žlezda, s obzirom na nedovoljno razjašnjenu etiologiju, varijetete patološko-anatomske gradje i kompleksnost u lečenju sa pravom predstavljaju značajnu oblast u maksilofacijalnoj hirurgiji. Pleomorfni adenom (PA) je najučestaliji tumor pljuvačnih žlezda. Histomorfološki se karakteriše jako razvijenom stromom ili pokazuje izrazitu celularnost nasuprot siromašne strome. Pored velike učestalosti i pojave recidiviranja, PA je jedini benigni tumor pljuvačnih žlezda koji pokazuje i sklonost ka malignoj alteraciji. Istraživanja u cilju rasvetljavanja uzroka nastanka ovog tumora otvaraju mogućnost delovanja u cilju prevencije i pravovremene i najadekvatnije terapije. Nastanak tumora je višefazni proces koji podrazumeva dejstvo mutagenih faktora spoljašnje sredine na onkogene i tumor supresorske gene u sinergizmu sa naslednim predisponirajućim faktorima. Genetičke izmene dovode do transformacije normalne ćelije u tumorsku. Neoplastična transformacija predstavlja proces narušavanja tkivne homeostaze u pravcu nekontrolisane proliferacije ćelija i inhibicije ćelijskog umiranja nekim od oblika programirane ćelijske smrti. Ćelije u procesu maligne transformacije prolaze kroz različite morfološke i biohemijske izmene što na kraju rezultira njihovom nekontrolisanom deobom. Održavanje fiziološke funkcije i stalnosti građe ćelija, tkiva, organa i organizma u celini, nemoguće je bez adekvatne kontrole rasta normalnih ćelija i programirane smrti ćelije, apoptoze. Oba procesa su pod kontrolom određenih regulatornih gena koji omogućavaju ove složene funkcije u organizmu.

Pored mutacija, koje se smatraju promenama gena direktno odgovornim za pojavu bolesti, postoje i takve promene u strukturi gena koje nisu neposredno vezane za patogenezu, već samo doprinose u manjoj ili većoj meri u stvaranju pogodnih uslova za nastanak oboljenja. Takve promene, označene kao genski polimorfizmi ili alelne varijante (varijante genske sekvence i sl.) koje se sreću i u populaciji zdravih ljudi, predstavljaju ono što nazivamo naslednom predispozicijom.

Saznanja iz oblasti humane molekularne i populacione genetike imaju veliki uticaj na medicinske nauke, a u poslednje vreme i na svakodnevnu

medicinsku praksu. Razumevanje molekularnih promena uključenih u nastanak bolesti nudi mogućnost predviđanja rizika za nastanak određene bolesti, poboljšanje postojećih klasifikacija i definisanje novih podtipova zasnovanih na genetičkim informacijama. Poznavanje tih promena može da omogući nove pristupe u lečenju i da vodi ka adekvatnijim personalizovanim medicinskim tretmanima. U okviru molekularnih promena koje zaslužuju da budu izučavane u procesu tumorske geneze, svakako posebno mesto zauzimaju genski polimorfizmi.

Predmet ove doktorske disertacije je analiza funkcionalnih polimorfizama u genu za SURVIVIN, TP-53 i MMP-9, odnosno analiza njihove povezanosti sa patološkim karakteristikama pleomorfnog adenoma pljuvačnih žlezda i utvrđivanje postojanja asocijacije između određenih genotipova ispitivanih polimorfizama i nastanka ovog tumora. Informacije o genetičkoj osnovi patogeneze PA su relativno oskudne i još uvek su najbrojniji podaci na citogenetičkom nivou. Malobrojne molekularno-genetičke studije odnose se pretežno na somatske mutacije a o germinativnim (konstitutivnim) mutacijama, odnosno genskim polimorfizmima i njihovoj ulozi u nastanku i razvoju PA, gotovo da nema podataka u svetskoj naučnoj literaturi.

### **1.1. Anatomija i morfologija pljuvačnih žlezda**

Pljuvačne žlezde su egzokrine žlezde koje proizvode i luče pljuvačku. Dele se na velike i male. Velike pljuvačne žlezde i male pljuvačne žlezde usne duplje su ektodermalnog porekla. Male pljuvačne žlezde izvan usne duplje su endodermalnog porekla. Nastaju invaginacijom pupoljaka epitela primitivne usne duplje (stomodeum) u mezenhim.

Velike žlezde (parotidne, submandibularne i sublingvalna) izdvojene su u posebne parenhimatozne organe koji su u vezi sa usnom šupljinom preko svojih izvodnih kanala. Imaju kapsulu koja obavija žlezdu, kao i septe koje polaze od kapsule u unutrašnjost organa i dele ga na lobuse i lobuluse. Septe poseduju različite količine rastresitog i fibroznog tkiva, u njima se nalaze krvni sudovi,

limfni sudovi i nervna vlakna. Parotidna žlezda je seroznog tipa, a ostale dve velike žlezde luče seromukoznu salivu.

Male pljuvačne žlezde su lokalizovane u submukoznom sloju sluzokože usana, obraza, nepca, jezika i farinksa. Prema anatomskoj lokalizaciji se dele na: labijalne, bukalne, palatinalne, tonzilarnе (Veberove žlezde), retromolarne, lingvalne (na bočnim ivicama jezika nalaze se Ebnerove žlezde a u predelu vrha jezika Blandin-Nunove ili glandulae apicis linguae) i faringealne. U manjem broju se nalaze u nazofarinksu, larinksu, paranazalnim šupljinama i traheji. U usnoj duplji čoveka ih ima od 600 do 1000. S obzirom na to da se nalaze neposredno ispod mukozne membrane usne duplje, njihovi izvodni kanali su vrlo kratki. Sastoje se od jednog reznjića veličine oko 1mm. Zajednička karakteristika malih pljuvačnih žlezda jeste da ne poseduju vezivno tkivnu kapsulu. Ebnerove žlezde su serozne, nepčane i žlezde u predelu korena jezika su mukozne, dok su labijalne i bukalne mešovite i luče seromukoznu pljuvačku.

Po svojoj histološkoj građi pljuvačne žlezde su tubuloacinarne žlezde. Njihovu osnovnu funkcionalnu jedinicu čini acinus i izvodni kanalikularni sistem. Acinus grade piramidne acinusne ćelije koje leže na bazalnoj membrani, dok svojim centralnim delovima zatvaraju lumen acinusa. Sa spoljašnje strane bazalne membrane acinusa nalaze se mioepitelne ćelije koje poseduju kontraktilne elemente. Kanalikularni sistem se sastoji iz interkalarnog (ductus intercalates) i prugastog (pars striata) dela koji se nalaze u okviru lobulusa i interlobularnog dela (ductus interlobularis).

## **1.2. Tumori pljuvačnih žlezda**

Tumori pljuvačnih žlezda obuhvataju benigne i maligne tumore epitelnog, mezenhimnog i limfoidnog porekla. Smatra se da potiču iz bazalnih, nediferentovanih ćelija i mioepitelnih ćelija izvodnih kanala, koje se u tumorima diferentuju u različite ćelijske tipove. Njihova učestalost u odnosu na sve neoplazme glave i vrata iznosi oko 3%, dok je udeo malignih tumora pljuvačnih žlezda u odnosu na malignitete glave i vrata oko 1% (1-5). Maligni tumori se

češće javljaju u malim pljuvačnim žlezdama nego u velikim. Oko 20% tumora parotidne žlezde, 35% tumora submandibularne žlezde, 50% tumora malih pljuvačnih žlezda i 80% tumora sublingvalne žlezde su maligni.

Etiopatogeneza tumora pljuvačnih žlezda nije u potpunosti razjašnjena. Trenutno su najaktuelnije dve teorije: bicelularna stem ćelijska i multicelularna teorija (Bradley, 2006) (6).

Bicelularna stem ćelijska teorija smatra da tumor nastaje od jedne ili dve nediferentovane stem ćelije ekskretornih duktalnih ili interkalarnih duktalnih ćelija. Od ekskretornih stem ćelija mogu nastati planocelularni (skvamocelularni) i mukoepidermoidni karcinom, a od interkalarnih stem ćelija pleomorfni adenom, onkocitom, adenoidni cistični karcinom, adenokarcinom i karcinom acinusnih ćelija (6).

Multicelularna teorija, za razliku od prethodne, smatra da od različitih vrsta diferentovanih ćelija pljuvačnih žlezda nastaju različiti tipovi tumora, tako da skvamocelularni karcinom nastaje od ekskretorne duktalne ćelije, pleomorfni adenom od interkalarne duktalne ćelije, onkocitom od strijatne duktalne ćelije, a karcinom acinusnih ćelija od acinusnih ćelija (6).

Bicelularna stem ćelijska teorija bolje objašnjava etiologiju nekih neoplazmi pljuvačnih žlezda, naročito pleomorfnog adenoma i adenolimfoma (Warthin-ovog tumora) (6).

Postoje brojne klasifikacije ovih tumora. Danas su najčešće u upotrebi Klasifikacija svetske zdravstvene organizacije (World Health Organization-WHO, Seifert and Sobin 1991), (Tabela 1.1), AFIP klasifikacija ( Armed Forces Institute of Pathology, Goode, Ellis and Auclair 1998) (5) i TNM klasifikacija ( International Union Against Cancer – IUAC 1997).

Tabela 1.1 WHO klasifikacija tumora pljuvačnih žlezda (Seifert, 1991)

<p><b>1. Adenomi</b>  Pleomorfni adenom  Mioepiteliom (mioepitelialni adenom)  Adenom bazalnih ćelija  Warthin's tumor (adenolimfom)  Onkocitom (onkocitni adenom)  Kanalikularni adenom  Sebacealni adenom  Duktalni papilom  Invertni duktalni papilom  Intraduktalni papilom  Papiliformni sialoadenom  Cistadenom  Papilarni cistadenom  Mucinozni cistadenom</p> <p><b>2. Karcinomi</b>  Karcinom acinusnih ćelija  Mukoepidermoidni karcinom  Adenoidni cistični karcinom  Polimorfni low-grade (terminalnih duktusa) adenokarcinom  Epitelno mioepitelni karcinom  Adenokarcinom bazalnih ćelija  Sebaceozni karcinom  Papilarni cistadenokarcinom  Mucinozniadenokarcinom  Onkocitni karcinom  Karcinom salivarnog duktusa  Adenokarcinom(neklasifikovan na drugi način)  Malignimioepiteliom(mioepitelialni karcinom)  Karcinom u pleomorfnom adenomu (maligni mešoviti tumor)</p>	<p>Karcinom skvamoznih ćelija  Karcinom malih ćelija  Nediferentovani karcinom  Ostali karcinomi</p> <p><b>3. Ne-epitelni tumori</b>  <b>4. Maligni limfomi</b>  <b>5. Sekundarni tumori</b>  <b>6. Neklasifikovani tumori</b>  <b>7. Tumorima slične lezije</b></p> <p>Sijaloadenoza  Onkocitoza  Nekrotizirajuća sijalometaplazija  Benigna limfoepitelijalna lezija  Ciste pljuvačnih žlezda  Hromični submandibularni sijaloadenitis (Kitnerov tumor)  Cistična limfoidna hiperplazija u AIDS-u.</p>
---	--

2004.godine je predložena nova WHO klasifikacija od strane Auclair PL, Ellis GL, El-Naggar AK, Gnepp DR, Eveson JW, Simpson RHW, Nagao T and Skalova A (7), koja je dopunjena 2005.godine (*Tabela 1.2*).



Tabela 1.2 WHO klasifikacija tumora pljuvačnih žlezda (Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, 2005)

<p><b>1. Benigni epitelni tumori</b></p> <p>Pleomorfni adenom Mioepiteliom Adenom bazalnih ćelija Warthin tumor (Adenolimfoma) Onkocitom (Onkocitni adenom) Kanalikularni adenom Sebaceozni adenom Limfadenom Sebacealni Ne-sebacealni Duktalni papilom Invertni duktalni papilom Intraduktalni papilom Sialoadenoma papiliferum Cistadenom</p> <p><b>2. Maligni epitelni tumori</b></p> <p>Karcinom acinusnih ćelija Mukoepidermoidni karcinom Adenoidni cistični karcinom Pilimorfni low-grade karcinom Epitelni-mioepitelni karcinom Karcinom svetlih ćelija, NOS Adenokarcinom bazalnih ćelija Sebaceozni karcinom</p>	<p>Sebaceozni limfadenokarcinom Cistadenokarcinom Low-grade kribriformni cistadenokarcinom Mucinozni adenokarcinom Onkocitni karcinom Salivarni duktalni karcinom Adenokarcinom, NOS Mioepitelni karcinom Karcinom u pleomorfnom adenomu Karcinom skvamoznih ćelija Karcinom malih ćelija Karcinom velikih ćelija Limfoepitelni karcinom Sialoblastom</p> <p><b>3. Ne-epitelni tumori</b> <b>4. Sekundarni tumori</b></p>
--	---

Ni u jednoj strukturi ljudskog organizma ne razvija se toliki broj različitih tumora kao u pljuvačnim žlezdama. Ovi tumori čine heterogenu grupu oboljenja velikih morfoloških varijacija čija klasifikacija nije nimalo jednostavna, i ima tendenciju stalnih izmena i dopunjavanja.

### 1.3. Pleomorfni adenom pljuvačnih žlezda

Pleomorfni adenom (PA) ili mešoviti tumor (adenoma pleomorphe, tumor mixtus) je najčešći tumor velikih pljuvačnih žlezda. Opisan je od strane Minsena 1874. godine kao epitelni i mezenhimni tumor. Velsh i Mayer 1968. godine ga opisuju kao tumor porekla epitelnih i mioepitelnih ćelija izvodnih kanalića.

Enorth 1964. godine i Swartz 1973. godine o njemu daju svoja zapažanja svrstavajući ga u čisto epitelni tumor pljuvačnih žlezda (4). Izgrađen je od više tipova ćelija sa embriološkim poreklom od jednog klicinog lista. Učestalost ovog tumora u odnosu na sve tumore pljuvačnih žlezda je oko 67%. Javlja se u 90% slučajeva u parotidnoj žlezdi, u 8% u submandibularnim, dok su u sublingvalnim i malim pljuvačnim žlezdama veoma retki. U parotidnoj žlezdi lokalizacija mu je najčešće u površnom režnju (90%), retko u predelu istmusa i do 10% u dubokom režnju žlezde (8). U epidemiološkoj studiji, koja je urađena 2010.godine na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu, PA su činili 37% tumora pljuvačnih žlezda (9).

### **1.3.1. Kliničko-morfološke karakteristike**

PA raste sporo, asimptomatski (bez tegoba), tako da je promena morfologije žlezde prvi simptom koji pacijenti primete. Obično se javlja u četvrtoj i petoj deceniji života. Kod pripadnica ženskog pola je češći. Smatra se da pljuvačne žlezde predstavljaju target tkivo za estrogen jer su pronađeni estrogenski receptori u jedru ćelija tumora pljuvačnih žlezda (10). Kod dece i adolescenata, PA je najučestaliji tumor pljuvačnih žlezda. Retka je pojava multiplih i bilateralnih tumora. Faktor izgubljenog vremena, odnosno dug vremenski period od pojave tumora do početka lečenja, pogoduje malignoj alteraciji tumorskog tkiva i pojavi karcinoma u pleomorfnom adenomu, a činjenica da je mala promena koja dugo perzistira počela naglo da se uvećava samo potvrđuje tu mogućnost.

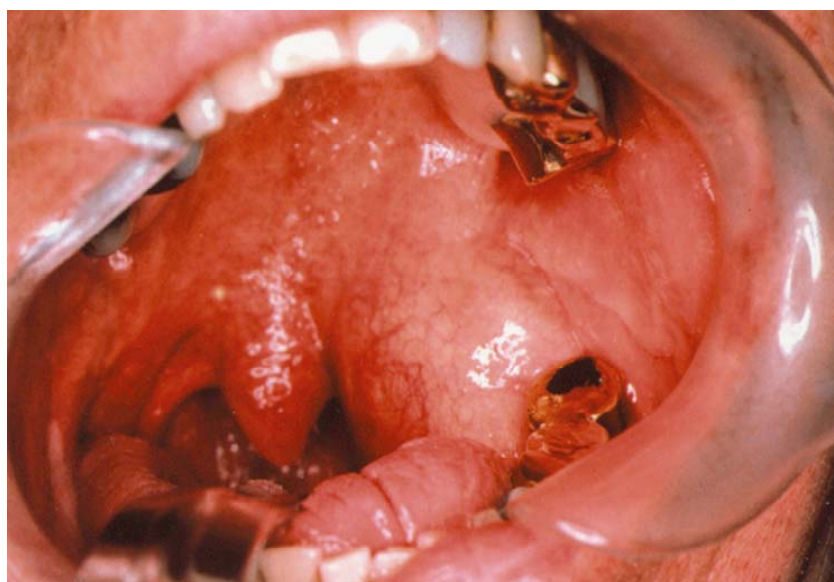
U parotidnoj žlezdi, gde mu je lokalizacija najčešća, obično je lokalizovan u površnom režnju iznad n.facialisa ispred ušne školjke, ili ispod u donjem polu žlezde (*slika 1.1*).



Slika 1.1 *Pleomorfni adenom parotidne pljuvačne žlezde*

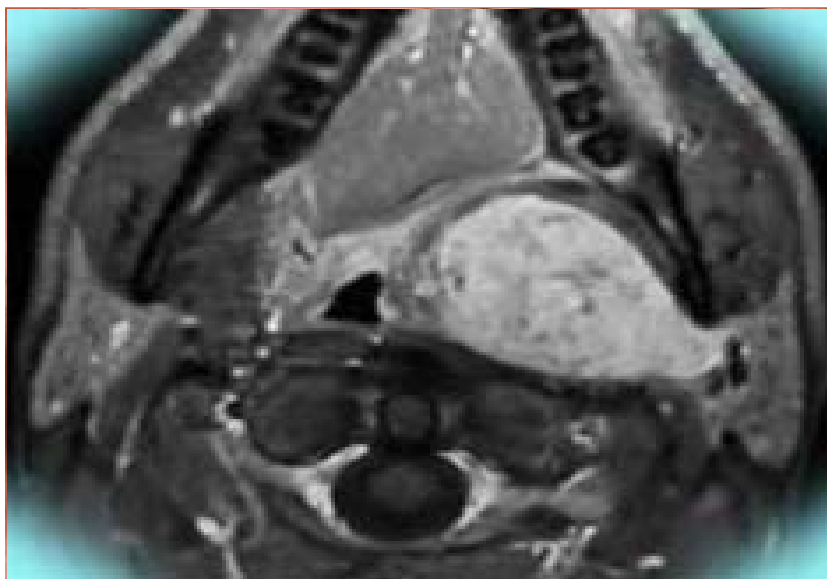
*Preuzeto: Iz kolekcije Prof.dr M. Gavrića*

Lokalizacija u dubokom režnju parotidne žlezde podrazumeva rast tumora ka parafaringealnom prostoru i simptome vezane za suženje lumena farinksa (otežano gutanje i disanje), a ponekad i jednostrani gubitak sluha i pojavu zapaljenja srednjeg uha (*slike 1.2 1.3*).



Slika 1.2 *PA u dubokom režnju parotidne žlezde (rast tumora prema parafaringealnom prostoru)*

*Preuzeto: Iz kolekcije Prof.dr M. Gavrića*



Slika 1.3 PA u dubokom reznju parotidne žlezde (NMR) (rast tumora prema parafaringealnom prostoru)

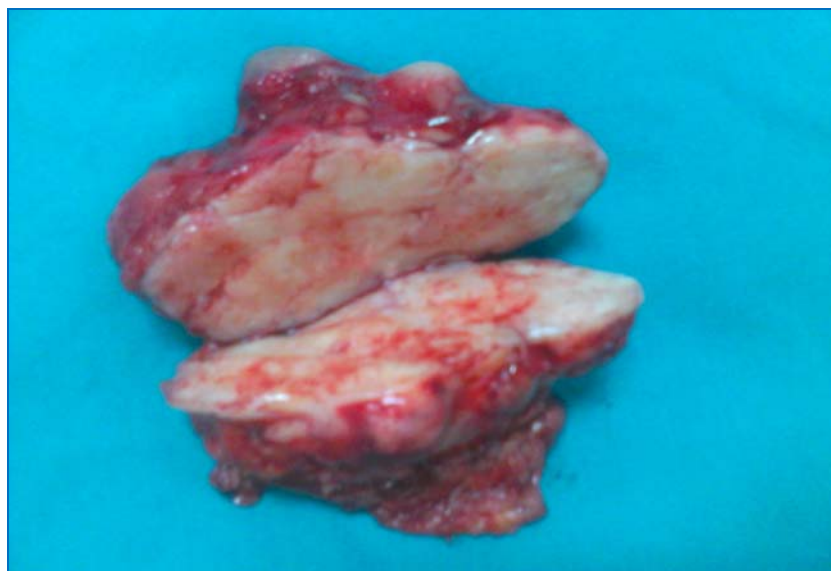
Preuzeto: Iz kolekcije Prof.dr M. Gavrića

Makroskopski, tumor je okruglog ili ovalnog oblika, glatke površine, jasno ograničen, inkapsuliran i solitaran. Veći tumori često imaju produžetke koji im daju lobularan izgled (slika 1.4).



Slika 1.4 Makroskopski izgled PA

Na poprečnom preseku PA je homogeno beličaste boje sa često prisutnim sjajnim, delimično transparentnim zonama koje predstavljaju miksohondroidne ili hrskavičave zone (*slika 1.5*).



*Slika 1.5 Makroskopski izgled PA - poprečni presek*

Klinički, palpatornim nalazom, PA je ovalan, okruglog oblika ili multilobularan. Glatke je površine, tvrdoelastičan, vezan za strukture žlezde, što mu ograničava pokretljivost koja je najveća prema površini. Koža iznad tumora je uglavnom nepromenjena i uobičajenih karakteristika. Funkcija n. facialisa je očuvana. Poremećaj funkcije n. facialisa prisutan je u slučaju maligne alteracije tumora

Predilekciono mesto tumora u malim pljuvačnim žlezdama je na granici tvrdog i mekog nepca (*slika 1.6*). Kada je lokalizovan u malim pljuvačnim žlezdama usne duplje i ždrele, podjezičnoj i podviličnim žlezdama, može svojim rastom da stvara simptome otežanog gutanja. Svojim rastom u nosnoj šupljini, na nosnom septumu i lateralnom zidu, zatvara lumen disajnih puteva i dovodi do pojave otežanog disanja.

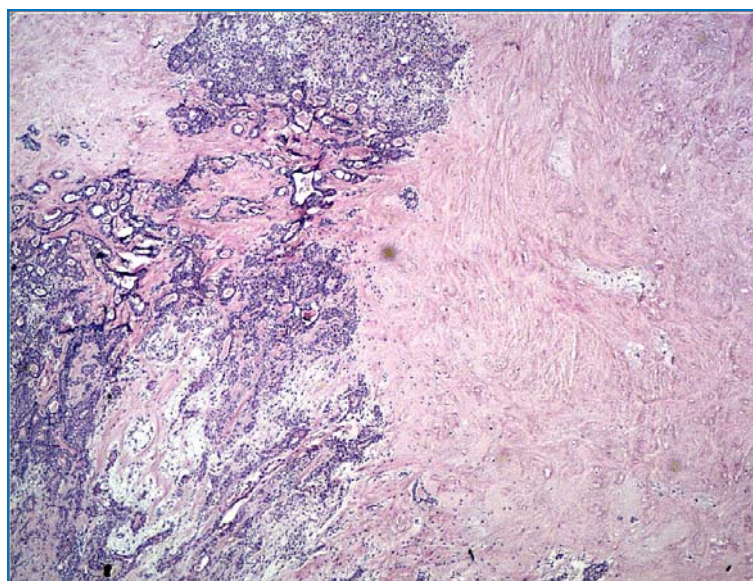


Slika br 1.6 *Lokalizacija PA u maloj pljuvačnoj žlezdi*

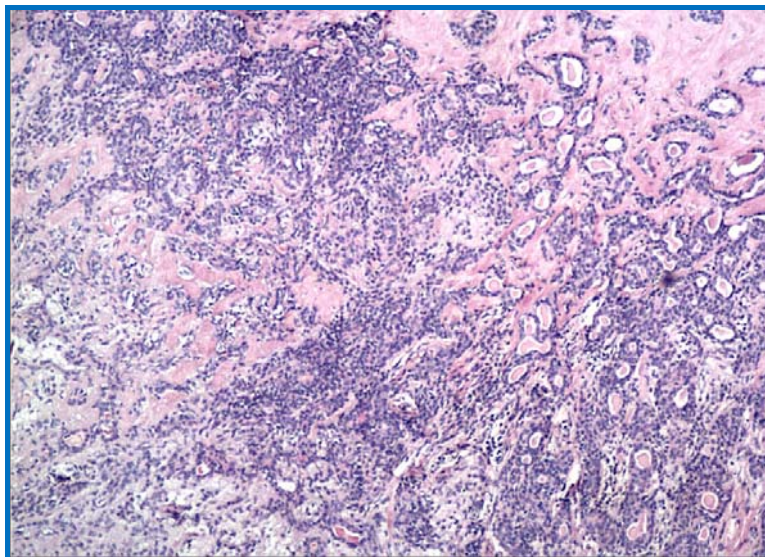
*Preuzeto: B.M. Wenig. Atlas of Head and Neck Pathology. Elsevier Inc. 2008.*

### 1.3.2. Histološke karakteristike

PA je sagrađen od epitelnog i mezenhimu-sličnog tkiva. Otuda stari naziv mešoviti tumor (tumor mixtus). Obično su zastupljene obe komponente, ali postoje tumori koji se sastoje samo od jedne (monomorfni, monofazni). Epitelnu komponentu čine solidna ognjišta, trabekule, acinusi i duktalne strukture, sagrađene od uniformnih kubičnih ćelija (*slike 1.7, 1.8*).



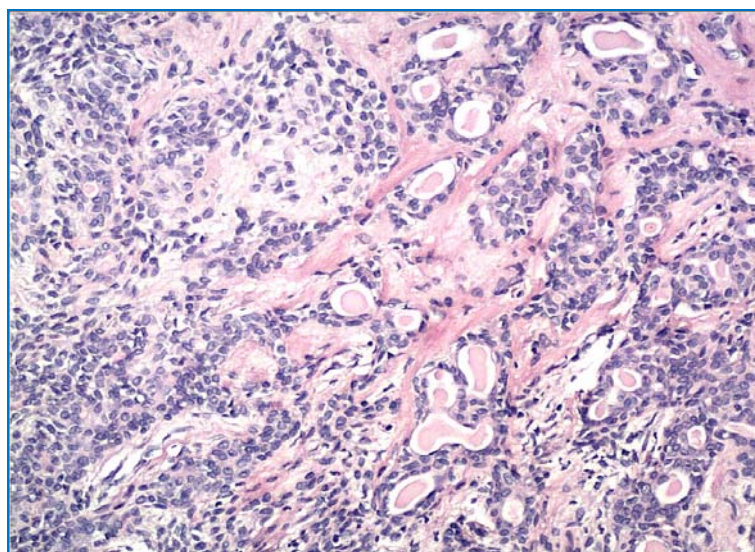
Slika 1.7 *Mikroskopski izgled PA / Preuzeto: Iz kolekcije Asist. Dr B. Dožića*



Slika 1.8 Mikroskopski izgled PA (uvećanje 4x)

Preuzeto: Iz kolekcije Asist. Dr B. Dožića

Na periferiji ovih epitelnih struktura su raspoređene mioepitelne ćelije (slika 1.9).



Slika 1.9 Histološki izgled PA - mioepitelne ćelije (uvećanje 10x)

Preuzeto: Iz kolekcije Asist. Dr B. Dožića

Za tumor je karakteristična hijalina, miksoidna i hondroidna stroma, kao posledica nakupljanja mukoidnog ili hijalinog materijala između mioepitelnih

ćelija. Raslojene mioepitelne ćelije trpe vakuolizaciju citoplazme, što dovodi do njihove sličnosti sa hondroцитima. Mioepitelne ćelije se mogu transformisati u ćelije vretenastog oblika eozinofilne citoplazme, slične glatko-mišićnim ćelijama. Ovako izmenjene, sa miksoidno ili hondroidno transformisanom stromom, stvaraju utisak mezenhimalne komponente tumora (11).

### 1.3.3. Klasifikacija

Najprihvatljiviju histološku klasifikaciju PA predložio je Seifert sa saradnicima. Podela je zasnovana na diferencijaciji epitelnih ćelija, osobinama strome i njihovom međusobnom odnosu. Dele se na tri tipa: ćelijski tip ("cell-rich"), miksoidni tip ("stroma-rich") i klasični tip ("stroma-cell balanced") (12). Zastupljenost pojedinih tipova navode Fabio Augusto Ito i saradnici 2009. godine u istraživanju histopatoloških karakteristika 189 PA. "Cell-rich" tip je utvrđen kod 36,5%, "stroma-rich" tip u 52,4% a "stroma-cell balanced" u 11,1% ispitivanih PA (13). Varijabilnost tumorske građe uslovljava različitost kako morfološkije tako i kliničkih osobina.

Kapsula PA ima debljinu od oko 5-250 mikrometara. Na pojedinim mestima mogu postojati zone tumorskog tkiva sa veoma tankom kapsulom ("focally very thin capsules"), bez kapsule, odnosno sa nekompletnom kapsulom ("focal absence of encapsulation") i zone sa hernijacijom ("capsular herniation"). Sam tumor u svom rastu može stvarati pseudopodije i satelitske čvorove ("satellite nodules"). Analizirajući histološku sliku na uzorku od 100 slučajeva PA Stennert i saradnici su veoma tanku kapsulu našli kod 97% tumora, zonu bez kapsule kod 46% a pseudopodije i satelitske noduse u 28%. U odnosu na histološki tip PA, veoma tanku kapsulu imalo je 97% celularnih, 96% miksoidnih i 100% klasičnih tipova PA. Najveća učestalost postojanja zone tumora bez kapsule (71%) je kod miksoidnog tipa (14). Ovu činjenicu posebno treba imati u vidu kod izbora metoda lečenja PA.

### 1.3.4. Dijagnostika

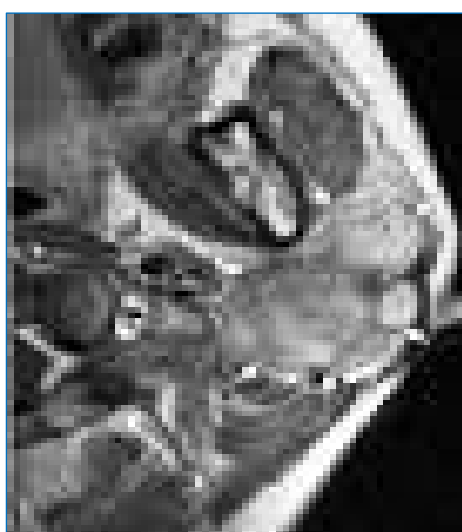
Dijagnostika PA zasnovana je na standardnim kliničkim procedurama, anamnestičkim podacima i detaljnom kliničkom pregledu uz korišćenje



ehotomografije (EHO), kompjuterizovane tomografije (CT) i nuklearne magnetne rezonance (NMR) (slike 1.10, 1.11). Aspiraciona biopsija ("fine needle aspiration biopsy") je često korišćena tehnika u HP dijagnostici, hvaljena zbog jednostavnosti izvođenja i osporavana kao nedovoljno precizna.



Slika 1.10 *Pleomorfni adenom CT vizuelizacija*



Slika 1.11 *Pleomorfni adenom NMR vizuelizacija*

### 1.3.5. Lečenje

Lečenje je hirurško i podrazumeva uklanjanje tumora zajedno sa zonom zdravog žlezdanog tkiva. Prisustvo n. facialis, s obzirom da prolazi kroz tkivo parotidne žlezde i u njoj počinje svoje grananje, bitno utiče na izvođenje hirurškog zahvata (*slika 1.12*).



Slika 1.11 *Anatomski odnos n. facialis i parotidne žlezde*

*Preuzeto: [www.prweb.com](http://www.prweb.com) / Micro Parotidectomy*

Kod lokalizacije PA u parotidnoj pljuvačnoj žlezdi uvek se radi parotidektomija sa očuvanjem strukture n. facialis. U hirurgiji parotidne pljuvačne žlezde izdiferencirano je nekoliko modaliteta ove hirurške procedure:

- Superfijalna parotidektomija
- Subtotalna parotidektomija
- Totalna parotidektomija
- Radikalna parotidektomija

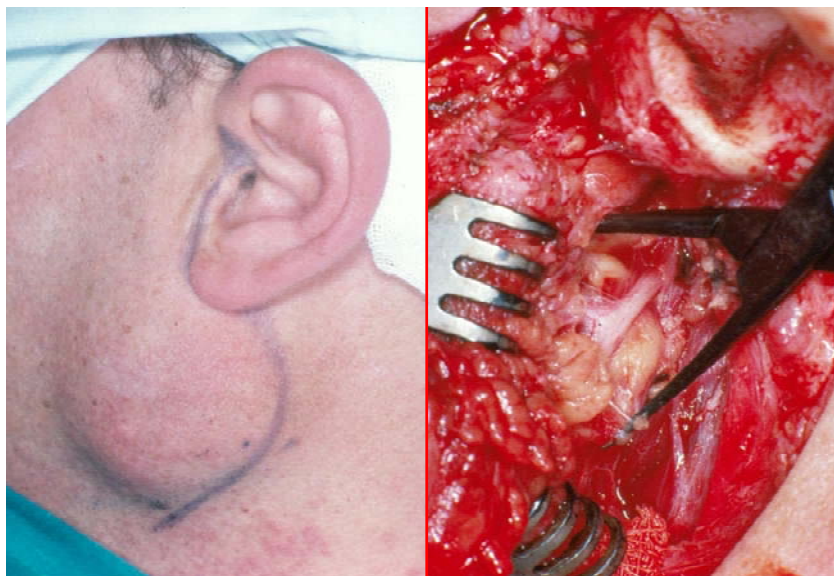
Koja će se metoda primeniti zavisi od lokalizacije, veličine i vrste tumora. Imperativ kod hirurškog lečenja je očuvanje stabla n. facialis, osim kod radikalne parotidektomije kada se isti uklanja zajedno sa parotidnom žlezdom. Superfijalna parotidektomija sa primenjuje u slučaju lokalizacije tumora u

površnom režnju žlezde. Ukoliko se tumorsko tkivo nalazi u dubokom režnju ili infiltriše celu strukturu žlezde radi se subtotalna, odnosno totalna parotidektomija. Ako je histopatološki dijagnostikovana maligna forma tumora, tada se primenjuje radikalna parotidektomija koja podrazumeva uklanjanje celokupne žlezde sa stablom n. facialis.

Tkivu parotidne pljuvačne žlezde pristupa se rezom na koži u preaurikularnom predelu. Najčešće se koristi takozvani S pristup (*slika 1.13*), koji počinje ispred pripoja heliksa ušne školjke, pa se linija incizije spušta u inferiornom smeru i nastavlja neposredno ispred tragusa do pripoja lobulusa. Zatim zavija ispod lobulusa put nazad do projekcije vrha mastoidnog nastavka pa se vraća prema inferiorno i napred sledeći rub sternokleidomastoidnog mišića. Rez se može produžiti superiorno u predeo kapilicijuma, inferiorno na vrat i ka submandibularnom predelu ukoliko je opseg operativnog zahvata veći. Po učinjenom rezu pristupa se odizanju kože sa potkožnim tkivom u sloju iznad parotidne regije do kapsule parotidne žlezde. Daljom preparacijom tkiva potrebno je učiniti identifikaciju stabla n. facialis.

U hirurgji tumora parotidne pljuvačne žlezde n. facialis se može identifikovati na više načina, ali se najčešće primenjuju indirektna i direktna metoda. Indirektnom metodom identifikacije se ogranci n. facialis traže na periferiji žlezde i potom nastavi sa postupnim prepariranjem ka glavnom stablu. Od svih perifernih grana najkonstantniji je položaj mandibularne grane n. facialis koja se nalazi 1 do 3 cm distalnije od donje ivice mandibule. Preparacijom se sledi tok marginalne grane i najpre dolazi do cervikofacijalne, zatim do temporofacijalne grane i konačno do glavnog stabla. Ova metoda je pogodna kod duboke lokalizacije tumora u infraaurikularnom delu žlezde, kada nije moguće pristupiti glavnom stablu n. facialis.

U većini operativnih zahvata kod tumora parotidne žlezde identifikaciji n. facialis se pristupa na mestu njegovog izlaska iz temporalne kosti kroz stilomastoidni otvor (foramen stilomastoideum) direktnom metodom (*slika 1.12*).



Slika 1.13 *Pristup parotidnoj žlezdi i identifikacija stabla n. facialis*

*Preuzeto: Iz kolekcije Prof.dr M. Gavrića*

Kapsula parotidne pljuvačne žlezde je pričvršćena za jagodični luk sa jedne i maseterični i sternokleidomastoidni mišić sa druge strane. Njena debljina i fiksacija varira na različitim delovima žlezde. Nakon incizije kapsule identifikuje se gornji rub digastričnog mišića koji polazi ispod apeksa mastoidnog nastavka ka napred ispod parotidne žlezde. Pomeranjem žlezde ka napred a sternokleidnog mišića ka nazad, ukazuje se hrskavičavi deo ušnog kanala. Na njegovom distalnom završetku treba uočiti prominenciju koju nazivamo pointer (putokaz) jer se na oko 5mm u dubini ispod njega nalazi izlazište n. facialis iz temporalne kosti, odnosno stilomastoidni otvor. Palpacijom u dubini rane može se lateralno od n. facialis palpirati stiloidni nastavak.

Po identifikaciji glavnog stabla n. facialis učini se preparacija istog prema mestu grananja na cervikofacijalnu i temporofacijalnu granu, od kojih će se odvajati ostale bočne grane. Izmedju tri bočne grane temporofacijalnog stabla prisutne su brojne anastomoze, a retke su kod dve bočne grane cervikofacijalnog dela. Veliki broj anatomskih varijacija završnih grana n. facialis zahtevaju stalnu opreznost prilikom operativnog zahvata.

Ukoliko se pažljivo isprati svaka od grana formiraće se ravan resekcije koja postupno odvaja površni od dubokog režnja žlezde (slika 1.14).



Slika 1.14 *Identifikacija grana n. facialis*

*Preuzeto: [www.player.mashpedia.com](http://www.player.mashpedia.com) / Facial Nerve Branches after superficial parotidectomy-Unedited voice during surgery*

Na kraju se ukloni tumor sa zonom okolnog zdravog tkiva pljuvačne žlezde da bi se ispoštovao hirurški princip radikalnosti. Operativna rana se, po učinjenoj hemostazi, suturira po slojevima i postavi aktivna sukciona drenaža.

Lokalizacija u podjezičnoj i podviličnoj žlezdi podrazumeva kompletno uklanjanje žlezde sa tumorom.

Operativno lečenje PA u malim pljuvačnim žlezdama zahteva eksciziju tumora sa zonom zdravog okolnog tkiva s obzirom da ove žlezde ne poseduju anatomske kapsule.

Pojava recidiviranja PA u direktnoj je vezi sa načinom hirurškog lečenja imajući u vidu varijacije tumorske građe i kapsule. Enukleacija tumora, kao metoda operativnog lečenja koja podrazumeva samo uklanjanje patološki izmenjenog tkiva žlezde, nosi rizik od ponovnog nastanka odnosno recidiviranja u oko 40% slučajeva (Langdon, 2001.) (15). Izbor adekvatne hirurške metode u lečenju PA može eliminisati pojavu recidiva (Leverstein et al, 1990.) (16). Stav

Klinike za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu je da se uvek radi parotidektomija a ne enukleacija tumora, što je i protokol u lečenju. Recidivantni PA imaju multifokalnu građu.

Prognoza lečenja PA je uglavnom dobra. Ukoliko se primene adekvatne metode lečenja 97% slučajeva je bez pojave recidiva u petogodišnjem a 94% u desetogodišnjem vremenskom periodu. Kao moguće komplikacije u hirurškom lečenju navode se oštećenje n.facialisa sa sledstvenim poremećajima funkcije i pojava Frejvog sindroma. Pored sklonosti ka recidiviranju PA ima osobenost da je jedini benigni tumor pljuvačnih žlezda koji maligno alteriše, prema podacima iz literature, u oko 6% slučajeva (17).

#### **1.4. Molekularno-genetička osnova tumora**

Tumorigeneza predstavlja heterogeni višestepeni proces koji se ogleda u promeni histologije tkiva, od normalnog, neizmenjenog tkiva ka hiperplaziji, displaziji, karcinomu *in situ* i invazivnom karcinomu (18, 19, 20). Neoplazije se razvijaju klonalno iz transformisanih ćelija koje su pretrpele različite genetičke promene (21). Do akumulacije genetičkih promena dolazi usled postojanja genetičke predispozicije, kao i usled uticaja faktora spoljašnje sredine, kao što su korišćenje duvana, alkohola, hronične inflamacije, virusne infekcije i dr (22). Molekularno genetičke promene najčešće pogađaju protoonkogene i tumor supresorske gene, koji se mogu inaktivirati ili prekomerno eksprimirati usled mutacija, gubitka heterozigotnosti (Loss of Heterozygosity-LOH), amplifikacija i/ili delecija i epigenetičkih modifikacija (23, 21). Pored protoonkogeno i tumor supresorskih gena (TSG) genetičke promene pogađaju i druge gene koji su uključeni u održavanje homeostaze, proliferacije i diferencijacije ćelija. Ove promene se mogu detektovati primenom molekularno genetičkih tehnika u svakom od stupnjeva bolesti i tumorske geneze (21).

I epigenetičke promene imaju izuzetno važnu ulogu u multistepenom procesu tumorske geneze. Obuhvataju modifikacije u genskoj ekspresiji bez promene primarne DNK strukture i to: metilaciju DNK, histonsku modifikaciju i

uključivanje malih nekodirajućih RNK u puteve TSG ekspresije (24). Geni koji su hipermetilovani u kancerima glave i vrata uključeni su u širok spektar ćelijskih procesa, kao što su regulacija ćelijskog ciklusa (p15, p16), apoptoza (p14, DAPK, p73, RASSF1A), Wnt signalni put (APC, WNF1, RUNX3), ćelijska adhezija (E-kadherin) i popravka DNK (MGMT i hMLH1). Za razliku od drugih genetičkih promena, epigenetičke promene su potencijalno reverzibilne (22).

Genetika i epigenetika benignih i malignih tumora pljuvačnih žlezda, uključujući i pleomorfne adenome, još uvek predstavljaju jednu relativno neistraženu naučnu oblast, a postojeći podaci se pretežno odnose na somatske mutacije, odnosno na promene u onkogenima i tumor supresorskim genima u samom tumorskom tkivu. Opisane su alteracije u HER-2 i TP53 genu u većem broju različitih tumora pljuvačnih žlezda (25), zatim hromozomska translokacija t(6;9) koja vodi nastanku fuzionog produkta MYB-NFIB gena u adenoidnom cističnom karcinomu (26), kao i translokacija t(11;19) i nastanak fuzionog produkta MECT1-MAML2 gena u mukoepidermoidnom karcinomu (27). Takođe je ustanovljen i postupni gubitak heterozigotnosti- LOH (loss of heterozygosity) na hromozomima 8q, 12q i 17p u toku nastanka i progresije karcinoma u pleomorfnom adenomu (carcinoma ex pleomorphic adenoma) (28).

Kada se radi specifično o genetici pleomorfnih adenoma, najviše je podataka dobijenih na osnovu citogenetičkih analiza, pošto se smatra da oko 70% tumora nosi nekakvu aberaciju kariotipa. Kao najčešće hromozomske aberacije u ovoj grupi tumora okarakterisane su aberacije koje pogađaju hromozom 8, posebno region 8q12, na kom se nalazi gen PLAG1 (pleomorphic adenoma gene), a najčešća translokacija je translokacija t(3;8)(p21;q12) (29). Susreće se takođe i translokacija koja uključuje hromozom 12, region 12q15 (30).

Pored prethodno navedenih genetičkih promena detektovanih u samom tumorskom tkivu, odnosno promena koje se najneposrednije dovode u vezu sa procesom tumorske geneze, postavlja se pitanje da li postojanje genetičkih varijacija određenih gena u humanom genomu može takođe imati izvesni uticaj

na razvoj pleomorfnog adenoma, u smislu stvaranja predispozicije za njegov nastanak.

Temeljna pretraga baza naučnih literaturnih podataka rezultovala je izuzetno malim brojem pronađenih radova na temu germinativnih mutacija odnosno polimorfizama u benignim tumorima pljuvačnih žlezda uopšte, a u pleomorfnim adenomima gotovo da ih ni nema, pa se tako definitivno nameće potreba za takvom jednom vrstom istraživanja.

### **1.5. Genetički polimorfizmi**

Smatra se da nasledna osnova čoveka sadrži oko 3,2 milijarde baznih parova po haploidnom setu i oko 24000 gena (31) smeštenih na 23 hromozomska para. Brojne populaciono genetičke analize su pokazale da postoji velika genetička varijabilnost u ljudskim populacijama. Najveći deo varijabilnosti odlazi na individualne razlike unutar lokalne populacije (oko 85%), a na nivou cele ljudske populacije postoji genetička uniformnost.

Varijabilnost nasledne osnove predstavlja nukleotidnu raznolikost koja se definiše kao odnos broja različitih baza prema ukupnom broju baznih parova dva genoma koja se porede. Genetička varijabilnost se meri pomoću proporcije polimorfnih lokusa i heterozigotnosti populacije. Razlike koje postoje u određenom DNK lokusu između individua jedne vrste označene su kao varijacije. Varijacije u naslednoj osnovi koje se normalno sreću u humanim populacijama nazivamo polimorfizmom. Sama varijabilnost se može posmatrati na morfološkom nivou i nivoima proteina, hromozoma i DNK sekvenci.

DNK polimorfizmi su varijacije nasledne osnove koje se sreću u populaciji zdravih ljudi. Za neki gen/lokus se kaže da je polimorfan ako u populaciji postoje bar dve njegove varijante (aleli), pri čemu je učestalost ređeg (ili najređeg) alela bar 1%. Da bi se varijacija mogla proglasiti polimorfizmom potrebno je da se određena alelna forma javlja sa frekvencom većom od 1%, odnosno da bude dovoljno velika da se ne smatra posledicom samo mutacionog procesa i da je učestalost heterozigota u populaciji veća od 2%



(32). Proporcija polimorfnih lokusa u populaciji označava odnos broja polimorfnih lokusa i ukupnog broja ispitanih lokusa u populaciji. Egzaktnija mera varijabilnosti u populaciji je heterozigotnost. Heterozigotnost za određeni lokus predstavlja proporciju heterozigotnih jedinki za taj lokus. Kada se ispituje više lokusa, odredi se i proseka za sve lokuse.

Izvor svih genetičkih varijabilnosti leži u mutacionom procesu koji se odvija različitim stopama na različitim delovima genoma. Stopa mutacije u ljudskoj populaciji se kreće od deset na sedmi do deset na deveti po nukleotidu po generaciji. U humanom genomu postoji  $6 \times 10^9$  na deveti nukleotida tako da je broj novih mutacija oko 200 po zigotu po generaciji. Najčešći tip mutacionih promena su supstitucije jednog nukleotida u drugi. Ove promene kod tranzicije menjaju jednu purinsku bazu u drugu ili pirimidinsku bazu u drugu. Kod transverzije dolazi do zamene purinske baze u pirimidinsku ili pirimidinske u purinsku. Procenjuje se da u humanom genomu postoji od 3-10 miliona polimorfizama sa učestalošću većom od 1%. Većina polimorfizama se dešava u nekodirajućim delovima genoma, dok je procena za kodirajuće regione od 10-50000, što povećava rizik za zamenu jedne aminokiseline drugom u proteinskom produktu (33).

DNK polimorfizmi se na osnovu svojih strukturnih razlika mogu podeliti na dve grupe.

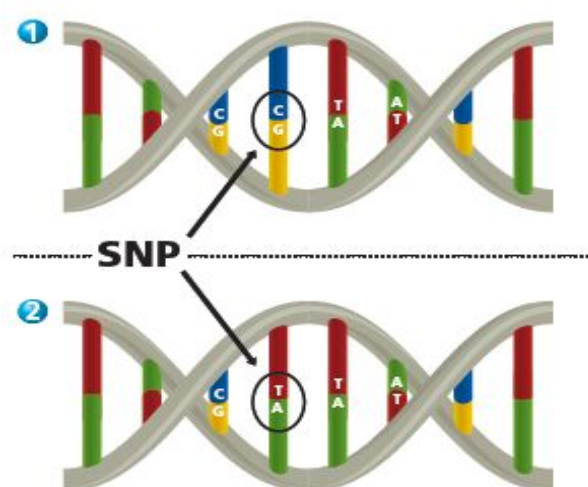
1. polimorfizmi nukleotidne sekvence u koje spadaju:

- polimorfizmi pojedinačnih nukleotida - SNP (*“single nucleotide polymorphism”*), vezni za varijabilnost bazne zamene,
- insercioni i delecioni polimorfizmi - INS, DEL, nastali kao rezultat insercije ili delecije određenog dela DNK.

2. polimorfizmi dužine sekvenci koji su vezani za različit broj ponovaka u mini i mikrosatelitskim lokusima:

- varijabilni broj tandemskih ponovaka - VNTR (*“variable number of tandem repeats”*).

SNP, tačkasti polimorfizmi, ili polimorfizmi jednog nukleotida (single nukleotide polymorphism – SNP) vezani su za varijabilnost tipa bazne zamene i čine oko 85% svih polimorfizama (slika 1.15). Procenjeno je da humani genom sadrži oko 11 miliona SNP-ova (31). Njihova lokalizacija na molekulu DNK može biti unutar promotorskog regiona, kada polimorfizam ima negativan predznak "-", u egzonu (kodirajućem regionu) ili u intronu (nekodirajućem regionu) kada polimorfizam ima pozitivan predznak "+".



Slika 1.15 SNP-polimorfizam pojedinačnog nukleotida

Preuzeto: [www.farma.ku.dk](http://www.farma.ku.dk) / Af Malene Hornbak og Åsa Andersson

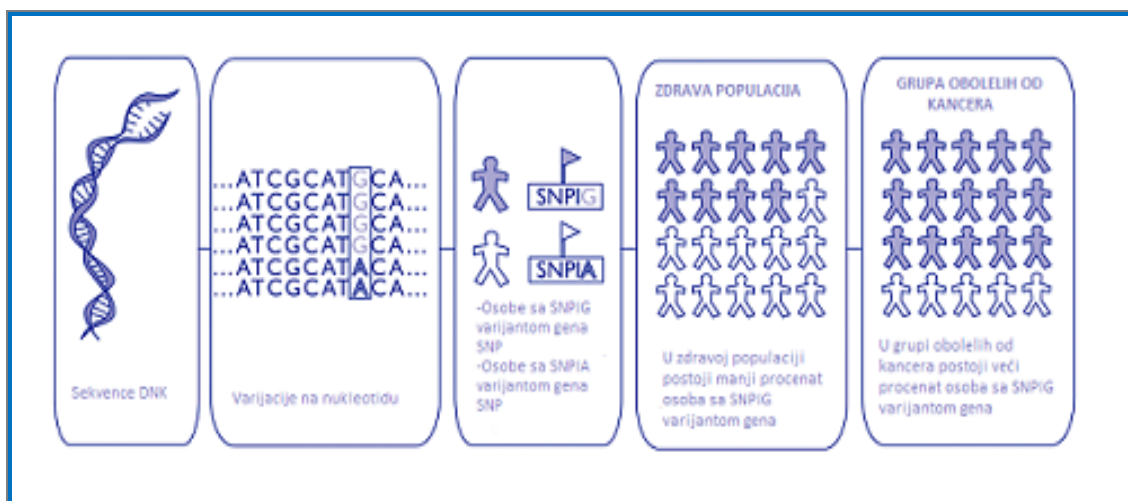
Kod inserciono-delecionijskih polimorfizama promene su vezane za inserciju ili deleciju određenog niza nukleotida. Ove varijacije mogu dovesti do promene u polipeptidnom lancu odgovarajućeg proteina i uticati na njihovu sintezu i funkciju, što neminovno stvara predispoziciju za nastanak pojedinih oboljenja i stanja.

Polimorfizmi različite dužine sekvence, ili varijabilni broj tandemskih ponovaka - VNTR (variable number of tandem repeats-VNTRs ili short tandem repeats-STRs), su predstavljeni različitim brojem ponovaka u lokusima sa

tandemski ponovljenim sekvencama (minisatelitskim i mikrosatelitskim lokusima).

Genetički polimorfizmi predstavljaju izraz normalnih varijacija u naslednoj osnovi. Zanimljiv je njihov uticaj na fenotip, a naročito je aktuelno povezivanje prisustva određenog SNP-a sa sklonošću ka različitim bolestima uključujući i malignitete. Poznavanje SNP-ova iz tih razloga predstavlja još jedan element u razumevanju genetičke osnove velikog broja bolesti. U studijama asocijacije (*slika 1.16*), ispituje se učestalost pojedinih genskih varijanti tj. genetičkih polimorfizama u grupi obolelih i upoređuje se sa podacima u zdravoj populaciji. Analizom rezultata različitih istraživanja nailazimo na brojne varijetete i česte protivrečnosti. Još uvek je relativno mali broj polimorfizama sa jasno potvrđenom ulogom genetičkog markera predispozicije. Neretko su rezultati i kontradiktorni, pošto su efekti tih polimorfizama pod uticajem spoljašnje sredine, pa se tako očekuju znatne varijacije u zavisnosti od etničke pripadnosti i geografske lokacije ispitivane populacije. Broj ispitivanih polimorfizama eksponencijalno raste pa je za očekivati da budu otkriveni novi, sa manjom ili većom ulogom u razvoju bolesti.

Ako se sve ovo ima u vidu jasno je zašto se polimorfizmi gena dovode u vezu sa predispozicijom jedinke za nastanak brojnih oboljenja i stanja. Kod monofaktorskih oboljenja genetički uticaj može biti jedini dovoljan za ispoljavanje bolesti. U slučaju multifaktorskih oboljenja, za koje su odgovorni sredinski i genetički faktori, genetički uticaj je komponenta skupa različitih faktora asociраних sa bolešću. Genetički faktori su predstavljeni kombinacijama polimorfizama sekvence DNK, koji mogu imati i kumulativni efekat. Oni doprinose jednom delu rizika i mogu imati ulogu u povećanju ili smanjenju predispozicije za nastanak oboljenja.



Slika 1.16 Učestalost pojedinih genskih varijanti u zdravoj populaciji i grupi obolelih od kancera i njihovo upoređivanje u tzv. studijama asocijacije  
Preuzeto: [www.cancerresearchuk.org](http://www.cancerresearchuk.org) (modifikovano)

Istraživanja DNK polimorfizama pored već navedenog, omogućavaju dobijanje važnih podataka o nivou genetičke varijabilnosti u populacijama, njihovim evolucionim istorijama, filogenetskim odnosima među vrstama, a koriste se i u identifikaciji individua i analizama rodoslova.

Patogeneza pleomorfog adenoma kao i većine drugih tumora podrazumeva mutacije u različitim genima, a između ostalih i u genima uključenim u regulaciju ćelijske proliferacije, diferencijacije i smrti. Značajnu ulogu u nastanku tumora imaju i članovi familije enzima, matriksnih metaloproteinaza (MMP), koji su odgovorni za lokalno tkivno remodelovanje i tkivnu destrukciju.

### 1.6. Geni uključeni u kontrolu proliferacije, diferencijacije i smrti ćelije

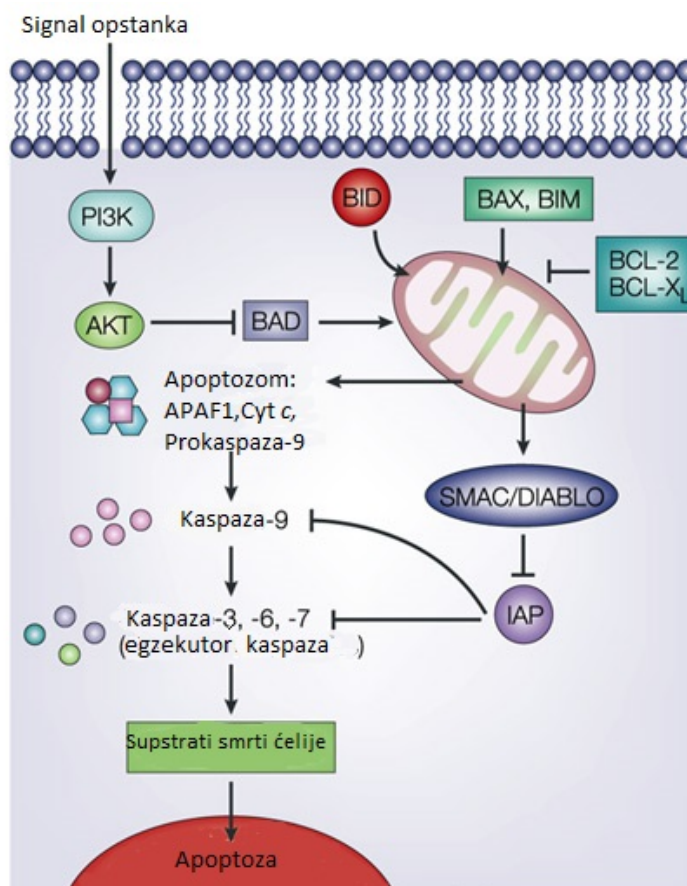
U važne predstavnike ove grupe gena spadaju gen za antiapoptotski protein survivin i gen za proapoptotski protein TP53.

### 1.6.1. Apoptoza – Programirana ćelijska smrt

Apoptoza predstavlja kontrolisan način ćelijskog umiranja, u kojem ćelija aktivno učestvuje, sprovodeći precizan, genski regulisan program ćelijskog suicida, odnosno autodestrukcije (34). Nastaje u pretežno fiziološkim okolnostima i služi za eliminaciju pojedinačnih ćelija okruženih normalnom ćelijskom populacijom. Veoma je važna za održavanje tkivne homeostaze i kao odbrambeni mehanizam u slučajevima oštećenja ćelije. Proces se normalno odvija tokom razvoja i starenja jedinke. Za apoptozu su karakteristične tipične morfološke promene ćelije. Nastaju smanjenje ćelije i promene na ćelijskoj membrani (35)

U sledećoj fazi javlja se dezintegracija ćelije i formiranje autentičnih formacija takozvanih apoptotskih tela koja sadrže citoplazmu, ćelijske organele i delove jedra. Apoptotska tela dalje bivaju fagocitozom uklonjena od strane makrofaga i okolnih ćelija. Smatra se da je ova faza asekretorna jer ne dolazi do oslobađanja ćelijskih komponenti u intersticijum, izostaje inflamatorna reakcija u okolnom tkivu a proces fagocitoze se odigrava brzo i samim tim ne inicira produkciju citokina (36).

Apoptoza je genetički determinisan proces koji ima ulogu u regulaciji broja ćelija u tkivu tokom morfogeneze i u odstranjivanju inficiranih ili ćelija sa oštećenjem potencijalno opasnim po ceo organizam, odnosno neophodna je za normalan razvoj, održavanje tkivne homeostaze i imunog odgovora. Pravilan tok apoptotskih procesa ključan je za pravilan embrionalni razvoj, ali se nastavlja i nakon rođenja. Poremećaji apoptoze dovode do nastanka patoloških stanja kao što su tumori, neke autoimune bolesti, različiti degenerativni procesi, itd. Različiti stimuli kao što su hipoksija, hemioterapeutici, UV i jonizujuće zračenje, nedostatak faktora rasta i dr, mogu je pokrenuti. Bez obzira na početni stimulus, postoje dva osnovna mehanizma indukcije apoptoze (*Slika 1.17*):



Nature Reviews | Cancer

Slika 1.17 Dva mehanizma indukcije apoptoze

Preuzeto: Nature Reviews Cancer / www.nature.com (modifikovano)

- spoljašnji put ili pozitivna indukcija, nakon vezivanja nosača (liganda) za membranske receptore,
- unutrašnji put ili negativna indukcija, koja nastaje zbog prestanka mehanizma supresije.

Apoptoza sa inicira preko kaskade molekularnih reakcija odnosno, spoljašnjeg ili unutrašnjeg puta (37). Spoljašji put podrazumeva vezivanje odgovarajućih liganada za specifične receptore na ćelijskoj membrani (death receptore), kao što su Fas ligand (FasL) i odgovarajući Fas receptor (FasR), ili faktor nekroze tumora (TNF) i njegov receptor TNFR1 (38). Nakon toga dolazi do formiranja DISC kompleksa (death-inducing signal complex) i aktivacije

kaspaze 8 (39). Za aktivaciju unutrašnjeg puta odgovorni su različiti signali unutar same ćelije-oštećenje DNK, hipoksija, toksini, hipertermija, slobodni radikali ili pak nedostatak pojedinih hormona, faktora rasta ili citokina (40). Svi ovi stimulusi dovode do promena na mitohondrijskoj membrani i otvaranja MPT (mitochondrial permeability transition) pore, kroz koju se u citoplazmu oslobađaju brojni proapoptotski proteini, uključujući i citohrom c. Druga grupa proapoptotskih proteina (AIF i endonukleaza G) svoje funkcije ostvaruje nezavisno od aktivacije kaspaza i dovodi do fragmentacije DNK. U regulaciji unutrašnjeg apoptotskog puta važnu ulogu imaju proteini koji pripadaju Bcl-2 porodici. Ovi proteini mogu da imaju kako antiapoptotsku (Bcl-2, Bcl-x, BAG) tako i proapoptotsku funkciju (Bcl-10, Bax, Bak) (41). Ove funkcije ostvaruju tako što menjaju propustljivost mitohondrijske membrane i regulišu oslobađanje citohroma c iz mitohondrija. Smatra se da je za regulaciju funkcije Bcl-2 porodice proteina odgovaran tumor-supresorski protein p53 (42).

Bilo kojim od pomenutih puteva da otpočne, za odigravanje apoptotičnog procesa neophodna je aktivacija izvršnog (kaskadnog) puta uz sadejstvo proteolitičnih enzima kaspaza. Ovi enzimi imaju važnu funkciju u inicijaciji apoptoze. Kaspaze se dele na inicijatore (2,8,9 i 10), efektore (3,6 i 7) i inflamatorne (1,4 i 5) (43).

Za regulaciju apoptoze važni su i proteini iz porodice IAP (inhibitor of apoptosis protein), XIAP, cIAP1, cIAP2 i survivin (44). Oni svoju antiapoptotsku funkciju ostvaruju vezujući se za kaspaze čime dovode do njihove inhibicije. Budući da se to odigrava na nivou efektor kaspaza 3, 6 i 7 (ali i inicijator kaspaze 9), IAP proteini blokiraju kako spoljašnji tako i unutrašnji put apoptoze (45).

Poremećaji u regulaciji apoptoze, bilo da dođe do usporavanja ili ubrzavanja ovog procesa, dovode do nastanka patoloških stanja. Smatra se da je sposobnost ćelija da izbegnu apoptozu jedan od šest ključnih koraka koji vode ka nastanku malignih tumora (46). To se može desiti zahvaljujući povećanoj ekspresiji antiapoptotskih proteina IAP ili Bcl-2 porodice ili zbog smanjene ekspresije proapoptotskih proteina kao što je Bax.

### 1.6.2. Proteini inhibitori apoptoze (*eng. Inhibitors of Apoptosis Proteins, IAP*)

IAP porodicu endogenih inhibitora apoptoze čine funkcionalno i strukturno srodni proteini (c-IAP1, c-IAP2, XIAP, NAIP, Survivin, Apollon, ML-IAP, livin, ILP-2) (47). Karakteristični su po tome što sadrže specifične sekvence aminokiselina tzv. BIR domen (*Baculovirus IAP Repeat* ~70 amino kiselina dug motiv) u jednoj do tri kopije, koji je neophodan za antiapoptotsku aktivnost IAPs-a. Interakcija između BIR domena i kaspaza (3, 7, 8, 9) inhibira njihovu aktivnost. Na C-terminusu sadrže RING motiv ili tzv. CARD domen (*eng. Caspase Activation Recruitment Domain*).

Ukoliko je aktivnost ovih proteina pojačana razvija se tumorska rezistencija, jer je onemogućena realizacija apoptotskog programa u ćelijama sa oštećenjima naslednog materijala. Kao posledica inhibicije dolazi do nekontrolisane proliferacije transformisanih ćelija (48).

#### 1.6.2.1. Survivin

Survivin je bifunkcionalni protein i najmanji član proteinske familije IAP koja inhibira apoptozu. Ima ulogu i u regulaciji ćelijskog ciklusa jer podstiče deobu stimulacijom prelaza ćelije iz G2 u M fazu (49). Prisutan je i u jedru i u citoplazmi ćelija. Pretpostavlja se da citoplazmatski survivin ima antiapoptotsku ulogu, dok je jedarni zadužen za kontrolu ćelijskih deoba. Sadrži samo jedan BIR domen i ne poseduje RING motiv što ga razlikuje od ostalih IAP proteina.

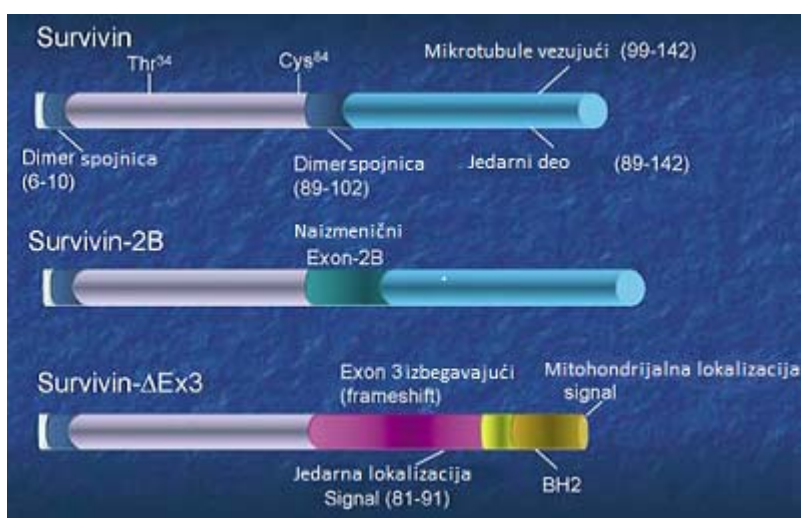
Gen za survivin (*eng. Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat Containig 5 - BIRC5*) je lociran na hromozomu 17 (17q25) i čine ga 4 egzona i 3 introna. Postoje 4 izoforme survivina koje su dobijene alternativnim iskrajanjem primarnog transkripta (50), (*Slika 1.18*):

- *Survivin 2B*: sadrži alternativni egzon 2,
- *Survivin ΔEx3*: bez egzona 3. Isključivanjem egzona 3 dolazi do vanfazne mutacije kojom se generiše jedinstveni COOH terminus sa



novom funkcijom koja podrazumeva signal za jedarnu i mitohondrijsku lokalizaciju,

- *Survivin 3B*: sadrži alternativni egzon 3B,
- *Survivin 2α*: ima, kao i izoforma survivin 2B, proapoptotsku funkciju za razliku od wt, 3B i ΔEx3 varijante.



Slika 1.18 *Različite izoforme survivina*

*Preuzeto: Altieri 2003. (modifikovano)*

Pretpostavlja se da svoju antiapoptotsku funkciju survivin obavlja inhibirajući kaspaze 3, 7 i 9 (51, 52). Mehanizam kojim učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa nije u potpunosti razjašnjen. Lokalizacija survivina tokom mitoze kao i vezivanje za komponente mitotskog aparata – centrozom, mikrotubule metafaznog i anafaznog deobnog vretena, upućuju na njegovu ulogu u ovim procesima.

Survivin se nalazi u embrionalnim tkivima u toku embrionalnog razvoja i u većini tumorskih tkiva. Naglašena ekspresija survivina je karakteristika malignih tumora. Njegovo prisustvo omogućava ćelijama izbegavanje apoptoze, a sa druge strane obezbeđuje neometane mitotičke deobe (53, 54) pa se sa pravom smatra tumorskim markerom i važnim činiocem u razvoju novih metoda lečenja.

Povećana ekspresija survivina je povezana sa progresijom kancera, skraćenim vremenom preživljavanja pacijenata, lošijom prognozom i rezistencijom na terapiju (55, 56, 57, 58, 59). U normalnim, diferenciranim ćelijama i tkivima ga nema (60), osim u malim količinama u timusu, bazalnom epitelu debelog creva, CD34<sup>+</sup> ćelijama koštane srži, u keratinocitama bazalnih ćelija normalnog epidermisa (61). Andrić i saradnici su pokazali ekspresiju survivina u benignim tumorima (odontogenim keratocističnim tumorima) (62).

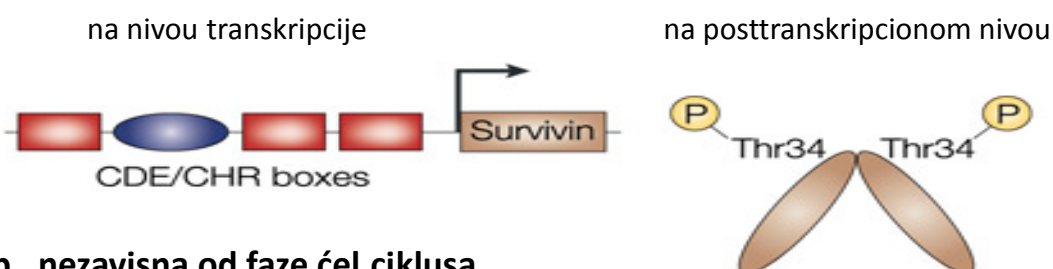
Sama regulacija ekspresije survivina je zavisna ili nezavisna od faze ćelijskog ciklusa (*Slika 1.19*). Ukoliko je zavisna od faze ćelijskog ciklusa (*eng. cell-cycle-dependent*), može biti na nivou transkripcije i na posttranskripcionom nivou.

Ekspresija survivina na nivou transkripcije je najveća tokom G2/M faze što uključuje tzv. CDE/CHR regulatorne elemente u promotorskom regionu. Ovaj mehanizam regulacije podržava i nalaz da je survivin poliubikvitiniziran i degradovan proteazomima tokom interfaze ćelijskog ciklusa (63), a kolokalizovan je sa komponentama deobnog vretena tokom metafaze i anafaze mitoze. Poseban vid kontrole ekspresije survivina na transkripcionom nivou je interakcija između proteina TP53 i promotorskog regiona survivina u kome su pronađena dva TP53 vezujuća mesta. Na taj način TP53 vrši inhibiciju transkripcije survivina.

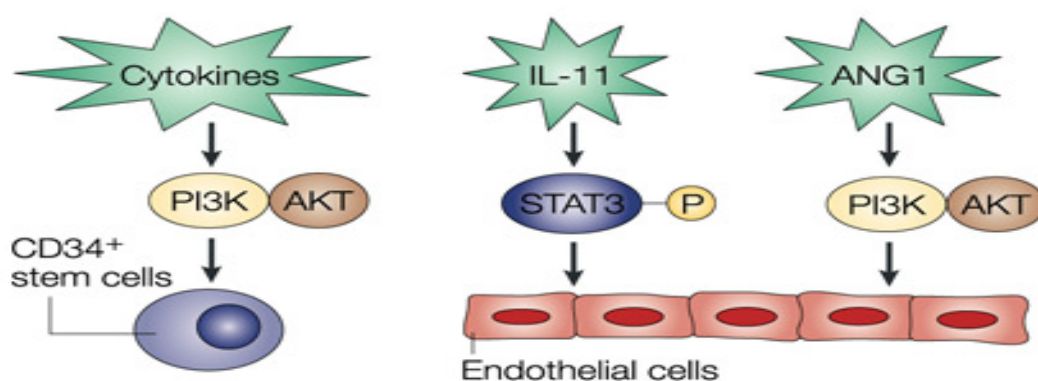
Ekspresija na posttranskripcionom nivou se ostvaruje modifikacijom tipa fosforilacije Thr 34, koja povećava stabilnost proteina u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (63). Fosforilacija survivina dovodi do inhibicije apoptoze i do ćelijske deobe.

Regulacija ekspresije survivina koja je nezavisna od faze ćelijskog ciklusa podrazumeva delovanje određenih citokina.

### a. zavisna od faze ćel.ciklusa



### b. nezavisna od faze ćel.ciklusa



Slika 1.19 *Regulacija ekspresije survivina*

*Preuzeto: Altieri, 2003. (modifikovano)*

#### 1.6.2.1.1. Polimorfizmi u genu za survivin (-31 G/C, -241 T/C, rs9904341)

Veliki broj SNP-ova je identifikovan u BIRC5 genu. Najinteresantniji su oni u promotorskom regionu ovog gena (-644 T/C, -625 G/C, -241 T/C, -31 G/C). Jedan od najispitavanih polimorfizama je na poziciji -31 G/C jer je CDE/CHR deo promotora gena za survivin vrlo značajan za regulaciju njegove ekspresije. G/C supstitucija na poziciji -31 utiče na nivo ekspresije survivina pa tako može da moduliše rizik od oboljevanja od različitih tipova kancera, kao što su kancer pluća, dojke, debelog creva, pankreasa, želuca, jednjaka i dr. Uočena je povećana ekspresija i kod obolelih od leukemije, neuroblastoma, melanoma i nemelanomskih tipova kancera (60, 61).

U ovom trenutku nije nađena nijedna studija asocijacije ovog polimorfizma sa tumorima pljuvačnih zvezda. Postoje izvesni podaci o asocijaciji ekspresije survivina sa različitim tipovima kancera glave i vrata. Tako, npr., survivin je izrazito eksprimiran u skvamocelularnim karcinomima, ali praktično izostaje u bazocelularnim. Zanimljivo je da je detektovana povećana ekspresija survivina u odontogenim keratocističnim tumorima (62).

### 1.6.2.2 Tumor protein 53

Najpoznatiji tumor supresorski gen TP53 otkriven je 1979. godine, a njegov povećan nivo u transformisanim ćelijama je prvi put opisan 1982. godine. TP53 gen u ćelijama čoveka ima ulogu da kodira tumor supresoni protein p53, odnosno, p53 je produkt ovog gena. On je jedan od najbolje proučenih tumor supresorskih gena s obzirom na njegovu ključnu ulogu u nastanku većine humanih malignih neoplazmi (64). P53 funkcioniše kao transkripcioni faktor i ima važnu ulogu u očuvanju stabilnosti genoma, apoptozi, inhibiciji angiogeneze i sprečavanju nastanka tumora. Količina p53 u ćelijama organizma u normalnim uslovima je veoma mala jer nije neophodan ni za razviće niti za adultni život. Mutacije tumor supresorskog gena TP53 najučestalije su genetičke alteracije u humanom kanceru koje pogađaju specifični gen (65, 66). Gen koji kodira p53 protein lociran je na hromozomu 17 (17p13.1) (67) i čini ga 11 egzona i 10 introna, s tim što je egzon 1 nekodirajući.

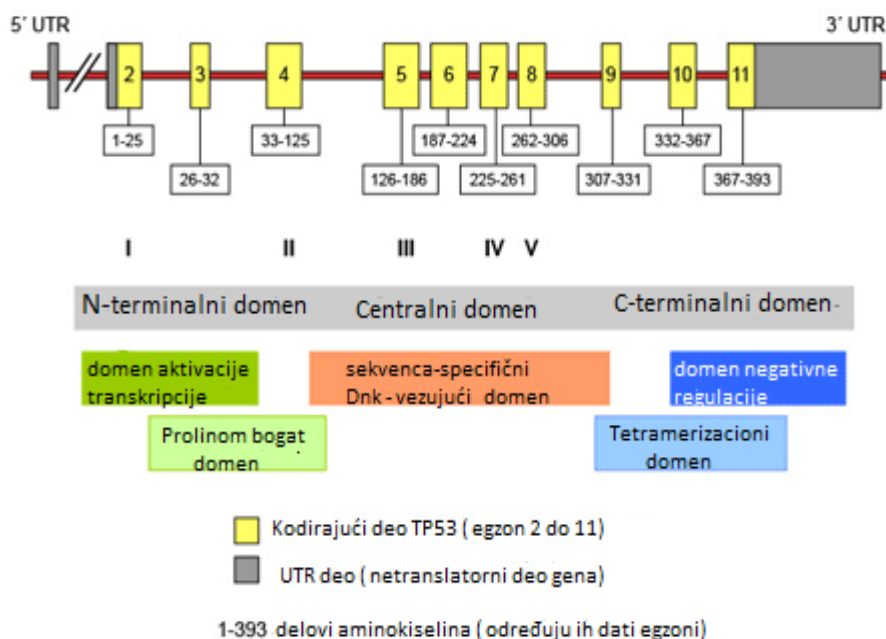
Humani TP53 protein obavlja brojne antiproliferativne funkcije kroz kontrolu transkripcije različitih ciljnih gena i protein-protein interakcije. Pošto ima važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i očuvanju stabilnosti genoma sprečavanjem mutacija, često se naziva i "čuvar genoma" (68). Ova zaštitna funkcija se ogleda u zaustavljanju replikacije oštećene DNK. Ako je DNK oštećena, tada se TP53 akumulira i zaustavlja replikaciju DNK i deobu ćelije za vreme dok se ne izvrši kompletna reparacija DNK. Ako su reparacioni mehanizmi neuspešni, TP53 aktivira apoptotični odgovor, a konačan rezultat je smrt ćelije. U slučaju da je TP53 izgubljen ili je mutirao, ćelija replikuje leziju na

DNK. Ovakve ćelije su genetički manje stabilne, akumuliraju mutacije i dovode do nastanka tumora (69, 70, 71).

TP53 gen kodira jedarni fosfoprotein – tumor supresorski protein p53 koji se sastoji od 393 aminokiseline (AK) i na poliakrilamidnom gelu ima masu od 53kDa, mada mu je stvarna masa nešto manja. Domeni su raspoređeni duž lanca počev od 1-393 AK. P53 poseduje 5 domena svaki sa specifičnom funkcijom (*slika 1.20*):

- Amino terminalni deo od 1-42 amino kiseline (AK), sadrži kiseli transaktivacioni domen i Mdm2 vezujuće mesto i visoko konzervirani domen I (HCDI),
- Region od 40-92 AK, sadrži niz ponovljenih prolinskih ostataka konzerviranih kod većine TP53 kao i drugi transaktivacioni domen,
- Centralni region od 101-306 AK, sadrži DNK vezujući domen. 90% mutacija u TP53 koje se javljaju u humanim malignim neoplazmama je u ovom regionu. Sadrži HCD II, III, IV i V,
- Oligomerizacioni domen od 307-355 AK, specifičan je po tome što se u njemu nalazi  $\beta$ -lanac koji interaguje sa drugim TP53 monomerom formirajući dimer, dok  $\alpha$ -lanac omogućava dimerizaciju dva TP53 u formu tetramera. U oligomerizacionom domenu je i jedarni signal za izvoz (NES),
- Karboksilni kraj TP53 od 356-393 AK, sadrži tri jedarna lokalizaciona signala i nespecifični DNK vezujući domen koji se vezuje za oštećenu DNK. Ovaj region je uključen u downregulation vezivanja centralnog domena za DNK.

## STRUKTURA GENA TP53 I PROTEINA P53



Slika 1.20 *Strukturna organizacija TP53 gena i proteina p53*

*Preuzeto: www.stjude.org (modifikovano)*

Aktivacija TP53 je odgovor na delovanje različitih tipova stresa, koji mogu uključivati DNK oštećenje indukovano UV zračenjem ili hemijskim agensima, oksidativni stres, osmotski šok, neregulisanu ekspresiju onkogeni i druge raznovrsne vidove stresa. Nakon aktivacije, u zavisnosti od signala stresa, obrasca posttranslacionih modifikacija i ćelijskog konteksta, TP53 deluje kao aktivator/represor transkripcije velikog broja gena. Poluživot p53 se drastično povećava što dovodi do brze akumulacije p53 u ćelijama koje su pretrpele stresne uticaje.

U više od polovine svih humanih malignih tumora identifikovane su mutacije gena TP53 (72). Najveći broj mutacija ovog gena rezultira produkcijom strukturno abnormalnog p53 koji se ne može vezati za lanac DNK i obaviti svoju transkripcionu funkciju. Mutirana forma p53 ostaje prisutna u ćeliji uz povećanu ekspresiju i može se lako detektovati imunohistohemijskim metodama. Postoji

mogućnost da povećana ekspresija mutiranog proteina dovodi do supresije nemutiranog p53. Ovim se objašnjava kako heterozigotna mutacija gena za p53 ipak može dovesti do nastanka tumora (72). Mutacije koje inaktiviraju TP53 se uglavnom odigravaju u centralnom regionu gena. Karakteristično je da su ovi visokokonzervirani domeni najčešće pogođeni mutacijama, što ukazuje na to da imaju posebno značajnu ulogu u regulatornim funkcijama TP53.

Tumor supresorska funkcija TP53 ostvaruje se putem sledećih mehanizama:

- TP53 blokira ćelijsku deobu na prelazu iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa,
- stimuliše popravku oštećenja DNK i
- indukuje apoptozu

Krajnji ishod aktivacije ovog proteina zavisi od stepena oštećenja ćelije. Kao prvo, ako je stepen oštećenja manji, može da aktivira mehanizme za reparaciju DNK i da indukuje zaustavljanje rasta ćelije zadržavajući ćelijski ciklus u G1/S regulacionoj tački dovoljno dugo da bi „repair“ proteini mogli da poprave oštećenja na DNK, a nakon reparacije, ćelija će moći da nastavi ciklus. Ovo omogućava da genetički neoštećena ćelija nastavi život (73). Ukoliko se pak oštećenje DNK ne može popraviti jer je preveliko, p53 će trajno zaustaviti ćelijski ciklus i aktivirati proces programirane ćelijske smrti (74). Dokazano je da i sama p53-indukovana apoptoza može biti reverzibilna ukoliko se u ranoj fazi procesa izgubi inicijalni apoptotski stimulus (75).

P53 zaustavlja ćelijski ciklus u G1 i G2 fazi vezivanjem za DNK i aktiviranjem složene nizvodne signalizacije kaskade (p21, G1-S/CDK (CDK2) i S/CDK komplekse, koji su važni za prelazak ćelije iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa). Kada je p21 u kompleksu sa CDK2, ćelija ne može preći u sledeću fazu ćelijske deobe (76, 77). Ako je protein p53 mutiran, izostaje sinteza proteina p21. Time je onemogućena njegova uloga stop - signala za ćelijsku deobu, pa će ćelija nastaviti da se nekontrolisano deli i dovešće do nastanka tumora. P53 je jedan od najvažnijih aktivatora mitohondrijskog (unutrašnjeg)

puta apoptoze (78). Ovaj proces se postiže transkripcionom aktivacijom proapoptotskih proteina Noxa, Puma, Bax, Apaf-1 ili supresijom antiapoptotskih proteina Bcl-2 i survivina (72).

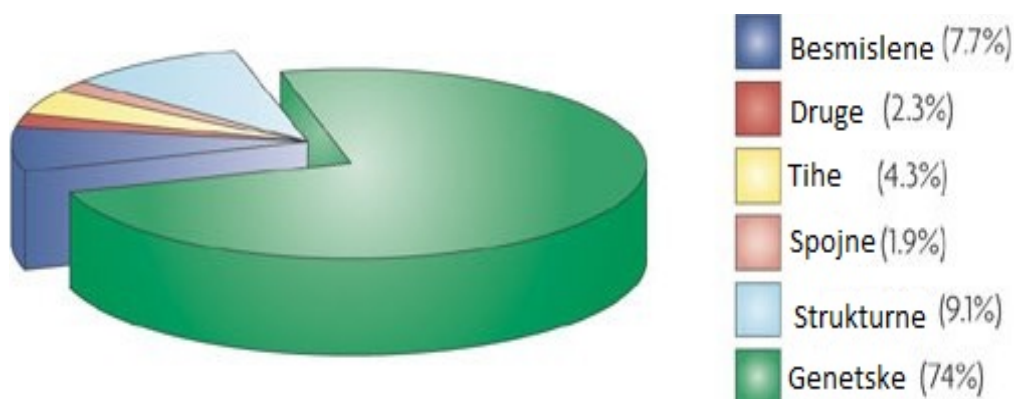
Translokacijom u mitohondrije TP53 inicira mitohondrijalnu apoptotsku kaskadu, a osobina da preko C-terminusa prepoznaje jednolančane prekide DNK, dovodi do lokalizacije TP53 na lezijama DNK i regrutovanja reparacionih mehanizama (79). Ako postoji oštećenje TP53 gena njegova funkcija supresije tumora je jako redukovana. Osobe koje su nasledile samo jednu funkcionalnu kopiju TP53 gena će verovatno razviti tumore u ranom životnom dobu. Često oboljevaju od Li-Fraumeni sindroma koga karakteriše pojava multiplih malignih tumora pre tridesete godine (80, 81).

#### **1.6.2.2.1. Polimorfizmi u genu za TP53 (Pro47Ser, PIN3 Ins 16bp, rs17878362)**

Opisano je preko 27000 mutacija TP53 gena u naučnoj literaturi koje se javljaju kako u kodirajućim tako i u nekodirajućim delovima gena. Mutacije su pronađene u gotovo svim tipovima malignih tumora, ali isto tako i u benignim i premaligim lezijama. Prisutne su velike razlike u učestalosti javljanja i prirodi mutacija. Nastaju u ranoj fazi kancerogeneze. Često se otkrivaju u premaligim lezijama i kada je prisutna izloženost kancerogenima iz okoline. Mutacije TP53 nemaju presudni značaj za samu inicijaciju nastanka tumora, već omogućavaju ćelijama da prevaziđu odgovor na signale koji bi normalno vodili ćeliju sa oštećenjima u apoptozu ili zastoj ciklusa. Tako je ćelijama sa oštećenom DNK na kratko omogućena proliferacija, što konačno povećava rizik za progresiju tumora.

Najučestalije izmene TP53 su tačkaste mutacije u vidu supstitucije jednog nukleotida u egzonima 5-8, koje dovode do sinteze izmenjenog proteina koji se od produkta divljeg alela razlikuje u jednoj aminokiselini (*“missense”* mutacije), *slika 1.21*. Sve ovo uzrokuje promenu tercijarne strukture molekula te izostaje transkripciona aktivacija ciljnih gena (82).





Slika 1.21 Najučestalije izmene TP53 gena u malignim neoplazmama  
Preuzeto: Brosh i Rotter, 2009. (modifikovano)

Proces kancerogeneze uključuje sticanje onkogene aktivnosti i gubitak tumor supresorske funkcije gena TP53, tako da su njegove abnormalnosti otkrivene kod velikog broja malignih tumora. Pored ogromnog broja mutacija koje su neposredno dovedene u vezu sa inaktivacijom TP53 kao tumor supresorskog gena, do danas je u bazi podataka Međunarodne agencije za istraživanje kancera evidentirano 85 SNP-ova TP53 gena od kojih je više od 80% u nekodirajućim sekvencama i kao takvi nisu dovedeni u asocijaciju sa pojavom i razvojem kancera, (the International Agency for Research on Cancer TP53 Mutation Database: [www.p53.iarc.fr](http://www.p53.iarc.fr)). Međutim del/ins polimorfizam u intronu 3, odnosno duplikacija segmenta od 16bp (TP53 PIN3 Ins 16bp) je istraživana od strane velikog broja autora i povezan je sa pojavom različitih tipova kancera, (posebno dojke, pluća i kolorektalnim).

Kada su u pitanju kodirajućii regioni TP53 gena, dva polimorfizma privlače najveću pažnju naučnika: Arg72Pro i Pro47Ser, oba locirana u egzonu 4. Ovo su najegzaktnije proučeni polimorfizmi TP53 gena. Utvrđeno je da polimorfizam na kodonu 47 egzona 4 smanjuje sposobnost TP53 da indukuje apoptozu. Kodon 47 kodira prolin (CCG) kod *wild type* varijante TP53. Kod malog broja ljudi može da kodira i serin (TCG), što su prvi identifikovali Felley-Bosco i saradnici (1993.). Ser 47 varijanta je vrlo retka, sa alelskom učestalošću

manjom od 5% u populacijama Afričkog porekla (83, 84), dok je u populaciji Kavkazijanaca 0%.

Istraživanja koja se odnose na regulaciju apoptoze su od posebnog značaja s obzirom da su poremećaji na ovom nivou jedan od ključnih mehanizama nastanka tumora. Pokazano je da fosforilacija N-terminalnog domena p53 reguliše njegova transaktivaciona svojstva. P38 fosforiliše Ser46, što pojačava transkripciju apoptotski povezanih gena i promovise p53 posredovanu apoptozu. Stoga bi se očekivalo da zamena Pro47, koja se dešava u Pro47Ser polimorfizmu smanjuje fosforilaciju u Ser46, smanjujući samim tim i transaktivaciju proapoptotskih ciljnih gena što bi potencijalno povećalo rizik za nastanak kancera (85, 86). Funkcionalni dokazi u različitim eksperimentalnim sistemima pokazuju neusaglašenost. U istraživanjima na miševima, blokiranje S46 fosforilacije ima samo skromne fenotipske posledice (87). Moguće je da ovaj SNP utiče na p53 funkciju samo pod specifičnim uslovima (88).

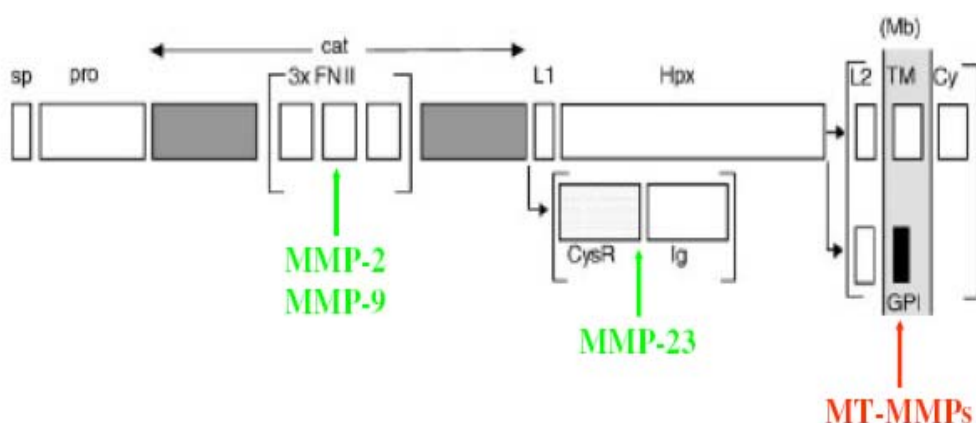
### **1.7. Matriksne metaloproteinaze**

Interakcija ćelija sa ekstracelularnim matriksom (ECM) je neophodna da bi organizam normalno funkcionisao i razvijao se. Regulacija ove interakcije se dešava putem jedinstvenog proteolitičkog sistema matriksnih metaloproteinaza (MMP), odgovornog za hidrolizu različitih komponenti ECM-a, kao i kontrolu signala matriksnih molekula koji regulišu rast i razvoj ćelija. Remodeliranje ECM-a mora biti strogo regulisano jer u suprotnom, svaka nekontrolisana proteoliza može dovesti do patoloških pojava, koje se karakterišu ili prekomernom degradacijom ili odsustvom degradacije komponenti ECM-a (89), a karakteristične su za rast tumora, njegovu invazivnost i metastaze (90). Matriksne metaloproteinaze su homogena grupa od 23 strukturno slične endopeptidaze koje razgrađuju komponente izvan ekstraćelijskog matriksa sa zajedničkim strukturnim i funkcionalnim elementima. Funkcionalno MMP su enzimi zavisni od  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  sintetisani kao transmembranski ili pro-enzimi za

sekreciju, koji nakon uklanjanja 10 kDa amino-terminalnog propeptida postaju aktivni. Aktiviraju se različitim agensima, članovima MMP familije ili drugim proteazama. Nakon aktivacije, njihovu proteolitičku aktivnost inhibiraju tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMPs). MMP su podeljene, na osnovu supstrata koji degraduju ili sličnih strukturnih domena, u 6 podgrupa: kolagenaze, želatinaze, stromelizini, matrilizini, membranske MMP i ostale.

Matriksne metaloproteinaze se sastoje od: 1. propeptida ili pro-domena (pro), 2. katalitičkog domena (cat), 3. peptida koji povezuje (cat sa Hpx) ili zglobnog područja (L1) i 4. hemopeksinskih domena.

MMP-7, MMP-23 i MMP-26 ne poseduju peptid koji povezuje ili zglobno područje (L1/Hpx). MMP-23 ima domen bogat cisteinskim ostacima (CysR) i domen sličan imunoglobulinima. MMP-2 i MMP-9 sadrže domen sličan fibronektinu ugrađen unutar katalitičkog domena, verovatno radi boljeg vezivanja za supstrat. MMP-9 se još dodatno razlikuje po tome što u svojoj strukturi sadrži i kolagen-V-like domen. Uloga ovog domena je da povećava specifičnost i jača vezivanje za supstrat. Zajedničke strukturne karakteristike MMP-a su motivi koji vezuju  $Zn^{2+}$  unutar katalitičkog domena (HEXXHXXGXXH) i motiv cisteinske „sklopke“ unutar propeptida (PRCXXPD). Struktura MMP prikazana je na *slici 1.22*.



Slika 1.22 Struktura matriksnih metaloproteinaza

Kada se sintetišu MMP su u neaktivnoj, zimogenoj formi. Aktivacija zimogena (proMMP) je veoma značajan regulacijski korak u aktivaciji MMP. Tokom ovog procesa uklanja se prodomen (interakcija SH (Cys) u pro i  $Zn^{2+}$ ). Aktivne MMP mogu učestvovati u aktivaciji drugih MMP. Jedino se MMP-26 autoaktivira. Koncentracija MMP u većini tkiva odraslih osoba je vrlo niska (91), ali se ona drastično povećava tokom tkivnog remodelovanja.

Aktivnost MMP je strogo regulisana proteolitičkom degradacijom i inaktivacijom, nespecifičnim endogenim inhibitorima kao što je  $\alpha 2$  makroglobulin i specifičnim tkivnim inhibitorima MMP (TIMP) (92).

Najveća grupa endogenih regulatora aktivnosti MMP u tkivima su TIMP i do danas ih je identifikovano 4 (93, 94, 95, 96). Neravnoteža između aktivnosti TIMP i MMP podstiče razgradnju komponenti ECM, rast primarnog tumora i metastaziranje. Efektori mogu biti i raznovrsni faktori rasta, citokini, hemijski agensi, fizički stres, kao i onkogene ćelijske transformacije (97).

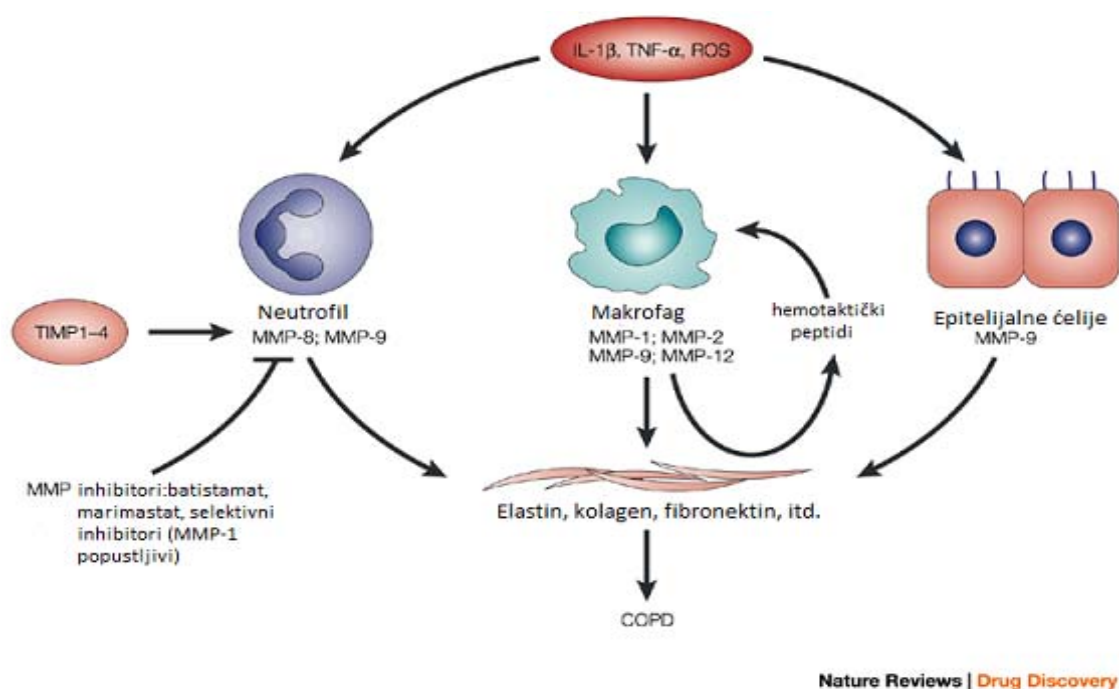
MMP predstavljaju grupu matriks-degradirajućih proteina čija je osnovna uloga degradacija proteina, regulacija različitih ćelijskih ponašanja sa stanovišta biologije tumora. Uključene su u rast ćelija, diferencijaciju, apoptozu, migraciju i invaziju, regulaciju tumorske angiogeneze i imunog odgovora (98). Ekspresija i aktivacija MMP uočena je kod gotovo svih vrsta tumora (posebno MMP-1 2,3, 7,9,10,11,13,14). Želatinaze MMP-2 i MMP-9 su povezane sa malignim fenotipom tumorskih ćelija zbog njihove jedinstvene sposobnosti da degradiraju kolagen tipa IV, kao najveću komponentu bazalne membrane (99), koja odvaja epidermis od dermisa i predstavlja prvu barijeru za invaziju tumorskih ćelija (100).

### **1.7.1. Matriksna metaloproteinaza 9 (MMP-9)**

MMP-9 (želatinaza B) je inducibilan enzim iz podgrupe želatinaza. Aktivira se uklanjanjem prodomena (~10 kD) koji biva odvojen delovanjem MMP-2, -3, -13 ili plazmina (85). Smatra se da je MMP-3 njen najčešći activator (101). Uključena je u razgradnju želatina, kolagena (IV, V, XI, XVII) i elastina

(102). Gen za MMP-9 se nalazi na hromozomu 20q11.2-q13.1 i poseduje 13 egzona (103).

Ekspresija MMP-9 je uglavnom ograničena na neutrofile, ali se detektuje u različitim ćelijama povezanim sa tumorskim metastazama. Inflamatorna stimulacija, odnosno citokini kao što su TNF-alpha i IL-1 $\beta$  indukuju ekspresiju MMP-9 u mnogim ćelijama uključujući endotelijalne ćelije, makrofage, fibroblaste, koronarne arterije i glatke mišićne ćelije (slika 1.23)(104, 105, 106, 107). MMP-9 učestvuje i u angiogenezi koja je uključena u razvoj tumora, mada ima podataka koji ukazuju i na njen obrnut efekat, odnosno antiangiogenetski efekat (108). Prisutna je u malim količinama u zdravim plućima odraslih, ali je mnogo izraženija u nekim plućnim bolestima (109).



Slika 1.23 Ekspresija MMP-9 u različitim tipovima ćelija

Preuzeto: Barnes, 2002. (modifikovano)

### 1.7.1.1. Polimorfizam u genu za matriksnu metaloproteinazu 9 (MMP-9) (-1562 C/T, rs3918242)

Polimorfizmi u genu za MMP-9 su bili predmet istraživanja mnogih studija. Zhang i saradnici (1999) su dokazali da polimorfizam (-1562 C/T) u promotorskom regionu MMP-9 gena ima funkcionalne efekte na transkripciju i da je povezan sa težinom ateroskleroze kod pacijenata sa koronarnom arterijskom bolešću (110). Podstaknuti time, katalogizirali su varijante sekvenci u 2.2 kb promotorske sekvence i svih 13 egzona (ukupno 3.3 kb) MMP-9 gena. Isti autori su identifikovali ukupno 10 varijabilnih mesta: 4 u promotorskom regionu, 5 u kodirajućem regionu i 1 u 3' netranslatiranoj sekvenci. Analiza sekvenci ukazuje da bi neke varijante mogle imati uticaja na nivo ekspresije ili na enzimatsku aktivnost.

Polimorfizmi u promotoru MMP-9 gena su dovedeni u vezu sa izmenjenom genskom ekspresijom i sklonošću ka različitim oboljenjima. Dve od pet identifikovanih varijanti sekvence su funkcionalno relevantne: SNP na -1562 bp (C/T) i jedan (CA)<sub>n</sub> mikrosatelit na poziciji -131 bp. C/T supstitucija na poziciji -1562 rezultuje gubitkom vezivanja jedarnog proteina i povećanjem transkripcione aktivnosti kod makrofaga (111). Najviša aktivnost promotora je primećena kod reporter - konstrukta koji sadrže 21 ili 23 (CA) ponovaka, što nagoveštava da broj ponovaka oblikuje transkripcionu aktivnost (111).

Pored nekoliko polimorfnih promena u regulatornom regionu gena (Zhang i sar., 1995), -1562 C/T polimorfizam dovodi do povećanja promotorske aktivnosti ovog gena (112) i do izmenjene transkripcije. Pokazano je da ovaj polimorfizam igra značajnu ulogu u razvoju ateroskleroze (110), kao i da je povezan sa emfizemom kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća (102). Povećana ekspresija i aktivnost MMP-9 je zapažena i kod akutnog respiratornog distres sindroma (ARDS)(93), poliomiozitisa, dermatomiozitisa, reumatoidnog artritisa (94), Alchajmerove bolesti (95) i drugih neurodegenerativnih bolesti (113), kao i u raznim malignitetima (89).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Da bi se ustanovio potencijalni značaj pomenutih polimorfizama kao (a) faktora rizika za nastanak PA i (b) kao prognostičkog faktora za dalju evoluciju tumora postavljen je cilj istraživanja:

- Utvrđivanje povezanosti polimorfizama u genima TP53, SURVIVIN i MMP-9 i rizika za pojavu pleomorfog adenoma pljuvačnih žlezda.

Za postizanje postavljenog cilja istraživanja doktorske disertacije, definisani su sledeći zadaci:

- Ispitati kliničke i epidemiološke karakteristike pleomorfog adenoma.
- Utvrditi učestalosti genotipova i alela za insercioni polimorfizam u TP53 genu kao i polimorfizam pojedinačnih nukleotida TP53, SURVIVIN i MMP-9 gena kod pacijenata sa pleomorfnim adenomom pljuvačnih žlezda i u kontrolnoj grupi.
- Utvrditi povezanost polimorfizama gore navedenih gena i rizika za pojavu PA pljuvačnih žlezda.
- Utvrditi eventualnu povezanost između etioloških faktora i polimorfizama ispitivanih gena, kao i njihovu vezu sa tokom i ishodom bolesti, odnosno eventualnom evolucijom PA u maligni tumor pljuvačnih žlezda.

HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA se odnosi na postojanje povezanosti polimorfizama ispitivanih gena sa rizikom za nastanak PA pljuvačnih žlezda, kao i njegovim daljim ponašanjem. Prisustvo specifičnih genotipova u okviru ispitivanih polimorfizama u genima za SURVIVIN, TP53 i MMP-9 može da se pokaže kao faktor rizika (ili alternativno kao protektivni faktor) u patogenezi pleomorfog adenoma pljuvačnih žlezda.

### 3. METODOLOGIJA

Istraživanje je sprovedeno zahvaljujući saradnji Klinike za maksilofacijalnu hirurgiju, Laboratorije za patohistologiju i Laboratorije za molekularnu genetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Pacijenti su uključeni u studiju, tek nakon davanja informisanog pristanka.

Kliničke i epidemiološke karakteristike PA utvrđene su:

- a) uvidom u medicinsku dokumentaciju Klinike za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu,
- b) na osnovu anamnestičkih podataka iz istorija bolesti pripadnika eksperimentalne grupe,
- c) evaluacijom rezultata dobijenih iz originalnog istraživačkog kartona dizajniranog za potrebe ovog istraživanja.

Eksperimentalnu grupu su činila 74 pacijenta sa PA parotidne pljuvačne žlezde operisana na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu, u periodu od 2007. do 2012. godine. Eksperimentalni materijal je bila genomska DNK izolovana iz 74 parafinska uzorka tumorskog tkiva.

Kontrolnoj grupi su pripadale zdrave osobe, dobrovoljni davaoci krvi, koji prema polu i starosti odgovaraju grupi ispitanika. Genomska DNK je izolovana iz limfocita periferne krvi. U kontrolnoj grupi za SURVIVIN-31 bilo je 127 osoba, 69 za SURVIVIN-241, za TP53-SNP njih 71 koliko je bilo i za TP53-INS i 101 za MMP-9.

Etički komitet Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je odobrio izvođenje ove studije.

#### 3.1. Metode izolacije DNK

Za potrebe ovog istraživanja DNK je izolovana iz parafinskih kalupa pleomorfni adenoma i limfocita periferne krvi.



### 3.1.1. Izolacija DNK iz tumorskog tkiva

Iz tumorskog tkiva pacijenata sa dijagnostikovanim PA izolovana je genomska DNK. Deparafinizacija je postignuta ispiranjem uzorka ksilolom i apsolutnim etanolom a zatim destilovanom vodom. Tumorsko tkivo je macerirano i u njega je dodato 500  $\mu$ L NE pufera. Zatim je uzorak centrifugiran na 13000 obrtaja u trajanju od 2 minuta, odbačen je supernatant i dodato je 500  $\mu$ L NE pufera, 10  $\mu$ L 10% SDS (Na-dodecilsulfat) i 20  $\mu$ L proteinaze K (10 mg/mL). Posle šejkiranja smeša je inkubirana 24h na temperaturi od 50°C u termostatu. Nakon isparavanja etanola ćelijski materijal je tretiran digestivnim TNE puferom sa proteinazom K u finalnoj koncentraciji 200  $\mu$ g/mL i SDS u finalnoj koncentraciji 1%. Dobijeni ćelijski talog je preko noći inkubiran na 37°C. Opisanim postupkom su razbijene ćelijske i jedarne membrane. Ekstrakcija i prevodjenje DNK iz organske u vodenu fazu učinjena je tretmanom sa fenol / hloroform / izoamil alkoholom. DNK je precipitirana u apsolutnom etanolu sa 3M Na-acetatom nakon čega je talog opran u 70% etanolu sa ciljem da se uklone soli. Suv talog DNK je rastvoren u destilovanoj vodi.

Za izolaciju DNK iz tumorskog tkiva korišćeni su puferi sledećeg sastava:

- *NE pufer* - 150 mM NaCl i 25 mM EDTA,
- *TNE pufer* - 100 mM NaCl, 10 mM TRIS HCl pH 8.0 i 25mM EDTA.

Koncentracija DNK određena je spektrofotometrijski.

### 3.1.2. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi

Genomska DNK zdravih osoba, pripadnika kontrolne grupe, izolovana je iz limfocita periferne krvi. Osnovne karakteristike ove eksperimentalne metode su hemijska liza ćelije i prevodjenje DNK u vodenu fazu kao i hemijsko uklanjanje proteina i RNK molekula iz izolata. Cikličnim centrifugiranjima odstranjene su membrane liziranih ćelija krvi i membrane jedara razbijenih leukocita. Daljim tretmanom jonskim deterdžentima, kao što je SDS, omogućena je denaturacija proteina, odnosno da se DNK oslobodi iz nukleoproteinskog kompleksa. Ovim postupkom se i inaktivira enzim DNK-aza (denaturacijom enzima), čijom inaktivacijom je izolacija DNK moguća na sobnoj temperaturi.

Celokupan metodološki proces trajao je dva dana. Uzet je uzorak od 5mL venske krvi sa antikoagulansima (Na-citrat, EDTA) i pomešan sa istom količinom pufera za lizu na 4°C 15 do 20 minuta. Nakon adekvatne resuspenzije uzorak krvi držan je na ledu 10 do 15 minuta. Uzorak je zatim centrifugiran 15 minuta na 2000 obrtaja (2000rpm) i po završenom centrifugiranju odbačen supernatant a talog resuspendovan u 5mL fizio-pufera. Potom je ponovo centrifugiran 15 minuta na 2000 obrtaja, odbačen supernatant i resuspendovan, a postupak je ponavljan 2 do 3 puta dok talog nije pobeleo. Po završetku poslednjeg ispiranja supernatant je odbačen a talog rastvoren u 3 mL pufera A i dodato 200 µL 10% SDS (Natrijum dodecil sulfat) i 20 µL proteinaze K (finalne koncentracije 200 µg/mL). Uzorak je dobro resuspendovan i inkubiran preko noći na 37°C u termostatu. Drugog dana je dodat 1mL 6M NaCl (saturisanog) da bi se povećala rastvorljivost DNK. Precipitirani denaturisani proteini su istaloženi centrifugiranjem na 3000 rpm u trajanju od 15 minuta. Supernatant, u kome se nalazi rastvorena DNK, je prenet u čiste epruvete i centrifugiran 15 minuta na 3000 rpm. Uzorak je preliven u graduisanu epruvetu i dodata je ista količina izopropanola koji je omogućio precipitaciju molekula DNK. Pažljivim mućkanjem DNK je izdvojena u vidu beličastog končića, a končić uhvaćen Pasterovom pipetom i potopljen 30 sekundi u 70% etanol da bi se uklonio višak soli. Nakon ispiranja DNK je sušena na vazduhu 30 sekundi i rastvorena u 100 µL TE-pufera ili redestilovane vode.

Za izolaciju DNK iz limfocita periferne krvi korišćeni su puferi sledećeg sastava:

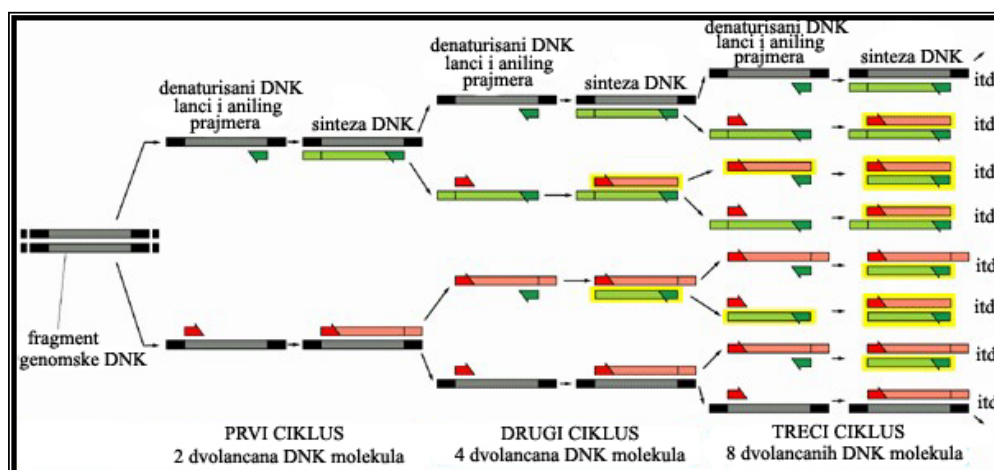
- *Pufer za lizu*- 0,32M SAHAROZA, 10mM TRIS Hcl pH 7.5, 1% TRITON x 100, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (autoklavirati i čuvati na 4°C),
- *Fiziološki puffer*- 0.075 M NaCl i 0.025 M EDTA pH8,
- *Pufer A*- 10 mM TRIS Hcl pH8, 400ml NaCl i 2mM EDTA,
- *TE puffer*- 10 mM TRIS Hcl, 1mM EDTA.

Koncentracija DNK određena je spektrofotometrijski na talasnoj dužini 260/280nm.

### 3.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR metoda)

Lančana reakcija polimeraze (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR) je metoda koja omogućava selektivno umnožavanje određenog segmenta molekula DNK u in vitro uslovima. Predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije, odnosno amplifikaciju definisane, unapred poznate DNK sekvence. Sinteza DNK je katalizovana termostabilnom *Taq* DNK polimerazom. PCR ciklus se sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane termostabilne DNK polimeraze. Ponavljanje ciklusa rezultuje u eksponencijalnoj amplifikaciji specifičnog DNK fragmenta.

PCR se izvodi u reakcionoj smeši zapremine 25 $\mu$ L, koja se u PCR aparatima podvrgava preciznim, cikličnim promenama temperature. Reakcija se odvija u 35 ponovljenih ciklusa DNK sinteze, koji vode eksponencijalnom umnožavanju broja ciljnih segmenata gena (*slika 3.1*).



Slika 3.1 Prva tri ciklusa PCR-a

#### 3.2.1. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za survivin

U *tabeli 3.1* prikazane su sekvence korišćenih prajmera za PCR reakciju i uslovi pod kojima se PCR reakcija odvijala.

Tabela 3.1 *Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije za survivin*

Gen	Sekvence prajmera			Veličina PCR produkta
<b>SURVIVIN</b>	Fw: 5'- AAG AGG GCG TGC GCT CCC GACA-3'			<b>151 bp</b>
	Rv: 5'- GAG ATG CGG TGG TCC TTG AGA AA - 3'			
	35 CIKLUSA			
Inicijalna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna ekstenzija
4 minuta	45 sec	45 sec	1 minut	10 minuta
95 ° C	95 ° C	60 ° C	72 ° C	72 ° C

Komponente reakcione smeše u ukupnoj zapremini od 25 µL su prikazane u tabeli 3.2:

Tabela 3.2 *Sastav reakcione smeše za PCR reakciju survivina*

MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,0 µL
10 x PCR pufer	2,5 µL
dNTP ( 10mM)	0,5 µL
prajmer F	0,2 µL
prajmer R	0,2 µL
ddH <sub>2</sub> O	16,6 µL
Taq polimeraza	0,2 µL
DNK uzorak ( c = 200 µg/ µL)	2 µL

### 3.2.2. PCR reakcija u analizi polimorfizma TP53 gena

U *tabeli 3.3* prikazane su sekvence korišćenih prajmera za PCR reakciju i uslovi pod kojima se PCR reakcija odvija.

Tabela 3.3 *Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije za TP 53*

Gen	Sekvence prajmera			Veličina PCR produkta
TP 53	A-Fw: 5'- CTG GTA AGG ACA AGG GTT GG -3'			201 bp/ 185 bp
	A-Rv: 5' – TCA TCT GGA CCT GGG TCT TC -3'			
	B-Fw: 5'- GAA GAC CCA GGT CCA GAT GA -3'			
	B-Rv: 5' –CTG CCC TGG TAG GTT TTC TG – 3'			
	35 CIKLUSA			
Inicijalna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna ekstenzija
5 minuta	30 sec	30 sec	1 sec	5 minuta
94 ° C	94 ° C	60° C	60 ° C	72 ° C

Komponente reakcione smeše u ukupnoj zapremini od 25 µL su prikazane u *tabeli 3.4*:

Tabela 3.4 Sastav reakcione smeše za PCR reakciju TP 53

MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0 µL
10 x PCR pufer	2,5 µL
dNTP ( 10mM)	0,5 µL
prajmer F	0,15 µL
prajmer R	0,15 µL
ddH <sub>2</sub> O	18,6 µL
Taq polimeraza	0,15 µL
DNK uzorak ( c = 200 µg/ µL )	2 µL

### 3.2.3 PCR reakcija u analizi polimorfizma MMP-9 gena

U tabeli 3.5 prikazane su sekvence korišćenih prajmera za PCR reakciju i uslovi pod kojima se PCR reakcija odvija.

Tabela 3.5 Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije za MMP 9

Gen	Sekvence prajmera			Veličina PCR produkta
<b>MMP 9</b>	Fw: 5'- AAG AGG GCG TGC GCT CCC GACA-3'			<b>151</b>
	Rv: 5'- GAG ATG CGG TGG TCC TTG AGA AA - 3'			
	35 CIKLUSA			
Inicijalna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna ekstenzija
4 minuta	45 sec	45 sec	1 minut	10 minuta
95 ° C	95 ° C	60 ° C	72 ° C	72 ° C

Komponente reakcione smeše u ukupnoj zapremini od 25 µL su prikazane u tabeli 3.6:

Tabela 3.6 Sastav reakcione smeše za PCR reakciju MMP-9

MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,0 µL
10 x PCR pufer	2,5 µL
dNTP ( 10mM)	0,5 µL
prajmer F	0,2 µL
prajmer R	0,2 µL
ddH <sub>2</sub> O	16,6 µL
Taq polimeraza	0,2 µL
DNK uzorak ( c = 200 µg/ µL )	2 µL

### 3.3. Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)

Gel elektroforeza je metoda koja omogućava razdvajanje molekula DNK koristeći razlike koje postoje između biomakromolekula u njihovoj pokretljivosti u gelu kada se nađu u električnom polju. Razlike u pokretljivosti počivaju na razlikama u molekulskim masama, prostornoj konformaciji, količini i iznad svega u naelektrisanju koje je presudno za smer kretanja makromolekula u električnom polju. Zbog ovih razlika oni imaju različitu pokretljivost u gelu pod uticajem električne struje, pri čemu manji molekuli putuju brže kroz gel u električnom polju nego veći. U slučaju DNK, koja je zahvaljujući prisustvu velikog broja fosfatnih grupa koje su na fiziološkom pH u jonizovanom stanju, tj. negativno naelektrisane, kretanje ovog makromolekula je od katode (negativne elektrode) ka anodi (pozitivnoj elektrodi).

PCR produkti su analizirani vertikalnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu čiji je sastav prikazan u *tabeli* 3.7. Poliakrilamidni gel se dobija mešanjem akrilamida i bis-akrilamida uz korišćenje adekvatnih katalizatora. Polimerizacijom monomera akrilamida nastaju dugački lanci polimera. Bis-akrilamid formira poprečne veze, kojima se povezuju polimeri akrilamida, te se na taj način dobija mrežasta struktura. Kao inicijatori i katalizatori procesa polimerizacije akrilamida dodaju se Amonijum persulfat (APS) i TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamin). Zahvaljujući brzini kojom se izvodi i visokoj rezoluciji PAGE je jedna od najboljih metoda koja se

koristi za razdvajanje i vizuelizaciju nukleinskih kiselina. Elektforeza je vršena na 8% gel u 1xTBE puferu, pri konstantnom naponu struje od 220 V u trajanju od 60 minuta.

Tabela 3.7 Sastav 8% poliakrilamidnog gela

komponente smeše:	zapremina (ukupno 6 mL):
ddH <sub>2</sub> O	3,6 mL
5 x TBE	1,2 mL
Akrlamid / Bis-akrlamid 40 %	1,2 mL
APS 10%	42 µL
TEMED	7,8 µL

Za vizuelizaciju fragmenata DNK korišćen je etidium bromid, koji se interkalira između lanaca DNK molekula i fluorescira kada se osvetli UV svetlom na transiluminatoru.

### 3.4. Restrikciona digestija PCR produkata i analiza dužine restrikcioniha fragmenata (RFLP)

Restrikciona analiza zasniva se na korišćenju restrikcioniha endonukleaza, koje imaju sposobnost da prepoznaju specifične sekvence na dsDNK, dužine 4-6 bp, i da iseku DNK molekul u okviru ili veoma blizu tih specifičnih sekvenci. Restrikciona analiza ima primenu u detekciji RFLP-ova, odnosno polimorfizama restrikcioniha mesta, kao genetičkih markera u genealoškim istraživanjima. Ovi polimorfizmi javljaju se zbog razlika među individuama u broju restrikcioniha mesta u okviru ispitivanog DNK fragmenta. Savremeni pristup u restrikcionoju analizi podrazumeva:

- amplifikaciju specifične sekvence (PCR) u kojoj se odigrala mutacija tipa nukleotidne zamene, potom,
- restrikcionu digestiju amplifikovaniha fragmenata i na kraju
- proveru veličine produkata digestije na PAA gelu.

Prisustvo ili odsustvo restrikcionog mesta je signal za prisustvo ili odsustvo mutacije. Prednost ove metode je u njenoju jednostavnosti, dostupnosti i mogućnosti



da se analizira veći broj uzoraka. Na osnovu veličine i broja traka uočenih na gelu nakon restrikcije i elektroforeze, određeni su genotipovi za analizirane polimorfizme.

### 3.4.1. RFLP u analizi polimorfizama gena za survivin (-31 G/C, -241 C/T)

Restrikcija PCR produkata dužine 151 bp vršena restrikcionim enzimom Msp I (Fermentas). Enzim prepoznaje specifičnu sekvencu 5'... C ↓ CG G...3', i vrši zasecanje DNK lanca na mestu C. U slučaju odsustva mutacije, enzim prepoznaje navedeni niz nukleotida i iseca PCR produkt čime ga deli na dva fragmenta: od 90 bp i 61 bp. Restrikcija enzimom Msp I se odvija u restrikcionalnoj smeši prikazanoj u *Tabeli 3.8*.

Tabela 3.8 *Sastav restrikcione smeše za digestiju survivina*

komponente smeše	zapremina (ukupno 20 $\mu$ L):
voda	6 $\mu$ L
pufer	2 $\mu$ L
enzim MspI	1 $\mu$ L
PCR amplifikat	11 $\mu$ L

Analiza produkata digestije vršena je elektroforezom na 8% PAA gelu. Pošto u okviru amplifikovanog fragmenta postoji jedno restrikciono mesto za enzim MspI, a mutacija -31 G/C i -241 C/T ukida restrikciono mesto, genotipovi obolelih i zdravih osoba mogu biti (*slike 3.2, 3.3*):

- Homozigoti bez mutacije-wild type (WT) (genotip C/C) poseduju dva fragmenta, dužine 90 bp i 61 bp,
- Heterozigoti (HT) za mutaciju (genotip G/C) poseduju tri fragmenta, dužine 151 bp, 90 bp i 61 bp,
- Homozigoti za mutaciju (MUT-genotip G/G) poseduju jedan fragment, dužine 151 bp.



Slika 3.2 Prikaz PCR produkata pre digestije na PAA gelu za survivin



Slika 3.3 Prikaz PCR produkata nakon digestije na PAA gelu za survivin

#### 3.4.2. RFLP u analizi polimorfizma TP53 gena (Pro47Ser, PIN3 Ins 16bp)

Restrikcija PCR produkata je vršena restrikcionim enzimom Msp I (Fermentas). U okviru amplifikovanog fragmenta postoji jedno restrikciono mesto za enzim Msp I, kod wt alela dolazi do sečenja u okviru datog restrikcionog mesta i PCR produkt se deli na dva fragmenta od 156/140 bp i 45 bp. Mutacija C/T u okviru restrikcionog mesta ukida dato restrikciono mesto i stoga ne dolazi do sečenja. Razlike u dužini dužeg fragmenta su posledica mogućeg prisustva duplikacije od 16 bp, pri čemu originalna sekvenca od 185 bp posle sečenja daje fragment od 140 bp,

a usled prisustva polimorfizma PIN3 Ins16bp uočava se dužina fragmenta od 156 bp. Restrikcija enzimom Msp I se odvija u restrikcionoj smeši čiji je sastav prikazan u tabeli 3.9:

Tabela 3.9 Sastav restrikcione smeše za digestiju TP53

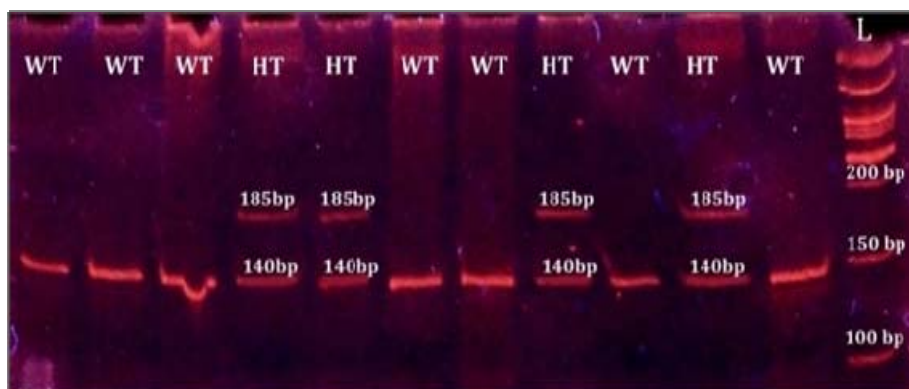
komponente smeše:	zapremina (ukupno 20 $\mu$ L):
voda	7,5 $\mu$ L
pufer	2 $\mu$ L
enzim MspI	0,5 $\mu$ L
PCR amplifikat	10 $\mu$ L

Inkubacija PCR produkta u restrikcionoj smeši trajala je 3 sata na 37°C. Analiza produkata digestije je usledila nakon elektroforeze na 8% PAA gelu (Slika 3.4, 3.5). Mogući genotipovi zdravih i obolelih osoba su :

- Homozigoti genotipa TP-53 C/C (bez mutacije - wt) poseduju dva fragmenta različite dužine 156 ili 140 bp i 45 bp,
- Heterozigoti za mutaciju (C>T), genotipa C/T, poseduju tri fragmenata 201 ili 185 bp, 156 ili 140 bp i 45 bp,
- Homozigoti za mutaciju, genotipa T/T, poseduju jedan fragment 201 ili 185 bp.



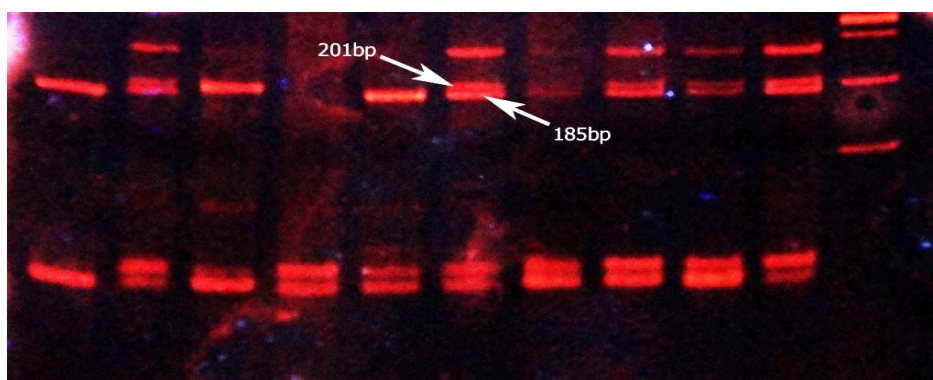
Slika 3.4 Prikaz PCR produkata pre digestije na PAA gelu za TP53



Slika 3.5 Prikaz PCR produkata nakon digestije na PAA gelu za TP53

#### 3.4.2.1. RFLP u analizi Insercionog polimorfizma TP53 gena

Među polimorfizmima identifikovanim u intronima, polimorfizam introna 3 PIN3 Ins16bp gde dolazi do duplikacije 16bp je privukao najveću pažnju. U slučajevima izostanka ove duplikacije, imamo homozigote A1/A1, a na gelu uočavamo samo jednu traku od 185bp, ako je duplikacija prisutna na samo jednom alelu dobijamo heterozigote A1/A2 i uočavamo dve trake od 185 i 201bp, a u slučaju prisustva na oba alela, homozigote A2/A2 i opet se uočava jedna traka, ali visine 201bp *slika 3.6*.



Slika 3.6 Prikaz PCR produkata nakon digestije na PAA gelu za TP53 INS

### 3.4.3. RFLP u analizi polimorfizma MMP-9 gena (-1562 C/T)

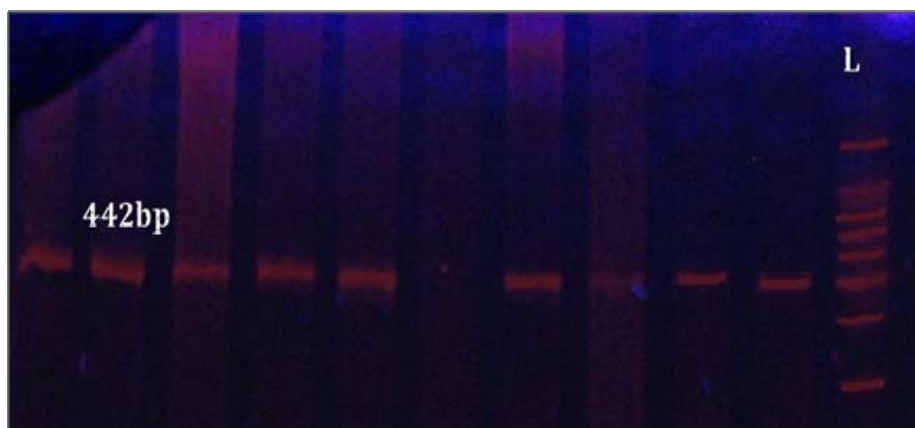
Restrikcija PCR produkata je vršena restrikcionim enzimom Sph I. Enzim prepoznaje niz nukleotida 5'... GCATG ↓ C...3' i u slučaju postojanja mutacije vrši zasecanje DNK lanca na mestu T, čime PCR produkt veličine 442 bp deli na dva fragmenta: od 264 bp i 178 bp (*Slika 3.7, 3.8*). Restrikcija enzimom Sph I se odvijala u restrikcionalnoj smeši čiji je sastav prikazan u *tabeli 3.10*:

Tabela 3.10 Sastav restrikcione smeše za digestiju MMP-9

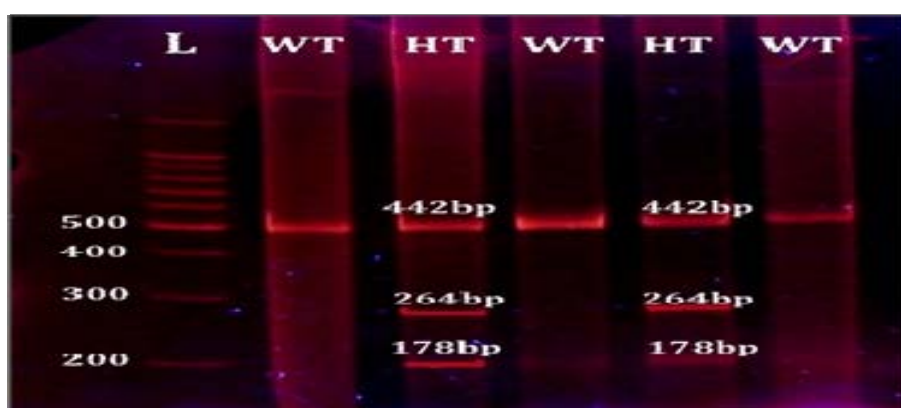
komponente smeše:	zapremina (18 µL):
voda	4,5 µL
pufer	2 µL
enzim Hin 1II	1,5 µL
PCR amplifikat	10 µL

Inkubacija restrikcione smeše je trajala 16 sati na 37°C. Analiza produkata digestije je usledila nakon elektroforeze u 8% PAA gelu, imajući u vidu da:

- Homozigoti bez mutacije - wild type (WT) (genotipa C/C) poseduju jedan fragment dužine 442 bp,
- Heterozigoti (HT) za mutaciju (genotip C/T) poseduju tri fragmenta, dužine 442 bp, 264 bp i 178 bp,
- Homozigoti za mutaciju (MUT-genotip T/T) poseduju dva fragmenta, dužine 264 bp i 178 bp.



Slika 3.7 Prikaz PCR produkata pre digestije na PAA gelu za MMP-9



Slika 3.8 Prikaz PCR produkata nakon digestije na PAA gelu za MMP-9

### 3.5. Statistička analiza

Statistička obrada podataka urađena je korišćenjem deskriptivnih i analitičkih statističkih metoda.

Od deskriptivnih metoda korišćeni su:

- Apsolutni i relativni brojevi (%)
- Mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- Mere disperzije (standardna devijacija, minimum, maksimum).

Od analitičkih metoda korišćen je neparametrijski test razlike - Hi kvadrat ( $\chi^2$ ) test za utvrđivanje razlika u distribuciji učestalosti različitih alela i genotipova u grupama obolelih od pleomorfog adenoma i kontrolnoj grupi.

Pored testova razlike urađena je i analiza povezanosti. Logističkom regresionom analizom računat je odnos verovatnoća (*eng. Odds Ratio*) za utvrđivanje rizika oboljevanja od PA, sa intervalom poverenja (*engl. Confidence Interval, CI*) od 95%.

Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim programom SPSS 12.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois) softverskom paketu.

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Sve vrednosti kojima je p vrednost manja od 0.05 su smatrane statistički značajnim.

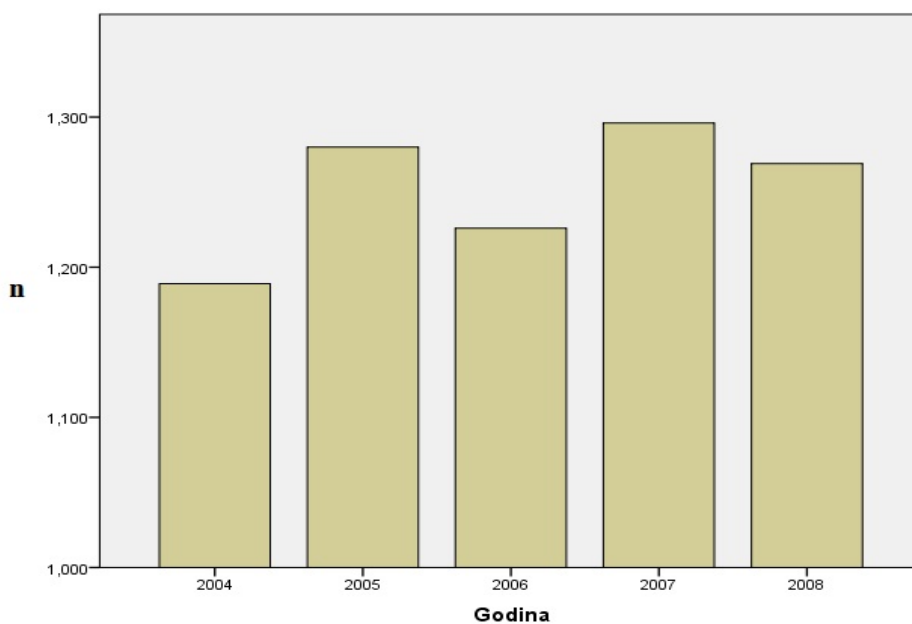
#### 4. REZULTATI

U petogodišnjem periodu, od 2004. do 2009. godine, na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu u hospitalnim uslovima lečeno je 6260 pacijenata (1189-2004., 1280-2005., 1226-2006., 1296-2007., 1269-2008. ) (tabela 4.1, grafikon 4.1)

*Tabela 4.1 Distribucija broja hospitalizovanih pacijenata*

godina	broj hospitalizacija
2004	1189
2005	1280
2006	1226
2007	1296
2008	1269
ukupno	6260

*Grafikon 4.1 Distribucija broja hospitalizovanih pacijenata*





Od 6260 lečenih pacijenata 537 (8,58%) je operisano od različitih oblika tumora pljuvačnih žlezda. 71% ovih tumora (381) bilo je benignih a 29% (156) malignih karakteristika. PA je dijagnostifikovan kod 206 operisanih što čini 37% svih tumora pljuvačnih žlezda, dok je njegov udeo u ukupnoj ispitivanoj patologiji 3,29%.

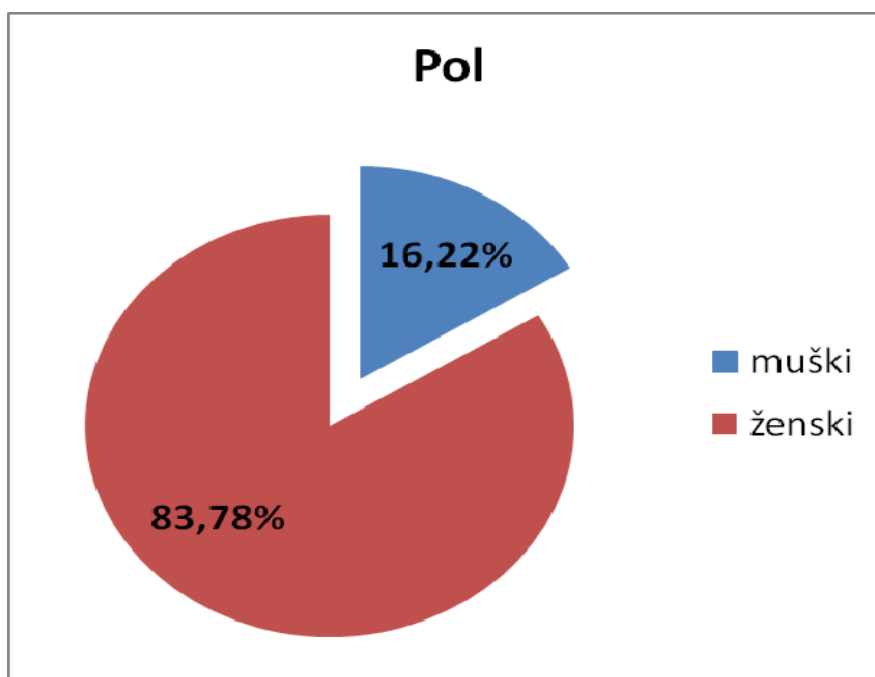
#### 4.1. Rezultati opštih karakteristika uzorka

Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 74 pacijenta sa pleomorfnim adenomom pljuvačnih žlezda i 127 zdravih pojedinaca, dobrovoljnih davalaca krvi.

U ispitivanoj grupi (74 ispitanika sa dijagnozom PA) 16,2% odnosno 12 pacijenata su činili pripadnici muškog pola, a u značajno većem procentu-83,8% odnosno 62 pacijentkinje su bile pripadnice ženskog pola. Pleomorfnii adenoma pljuvačnih žlezda se javljao 5,25 puta češće kod osoba ženskog pola nego kod osoba muškog pola ( *tabela 4.2, grafikon 4.2* ).

Tabela 4.2 *Distribucija pacijenata prema polu*

	n	%
muški	12	16,22
ženski	62	83,78
ukupno	74	100,0

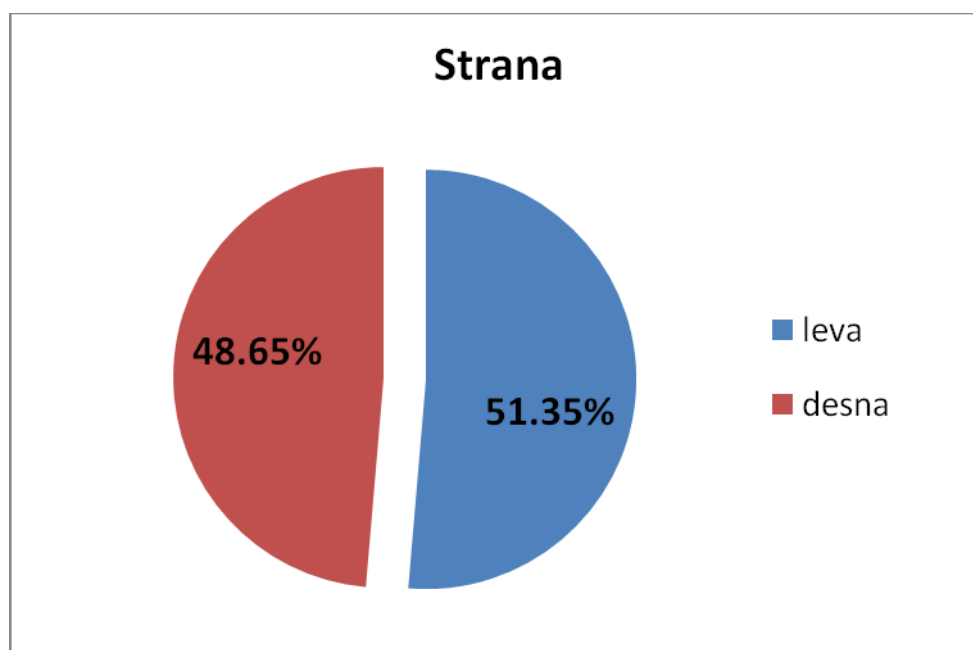
Grafikon 4.2 *Distribucija pacijenata prema polu*

U pogledu lokalizacije tumora, odnosno leve/desne strane, nije bilo nikakve razlike. Od ukupno 74 PA, 38 je bilo lokalizovano na levoj strani (51,35%) a 36 na desnoj (48,65%) (*tabela 4.3, grafikon 4.3*).

Tabela 4.3 *Distribucija pacijenata prema lokalizaciji tumora*

strana	n	%
leva	38	51,35
desna	36	48,65
ukupno	74	100,0

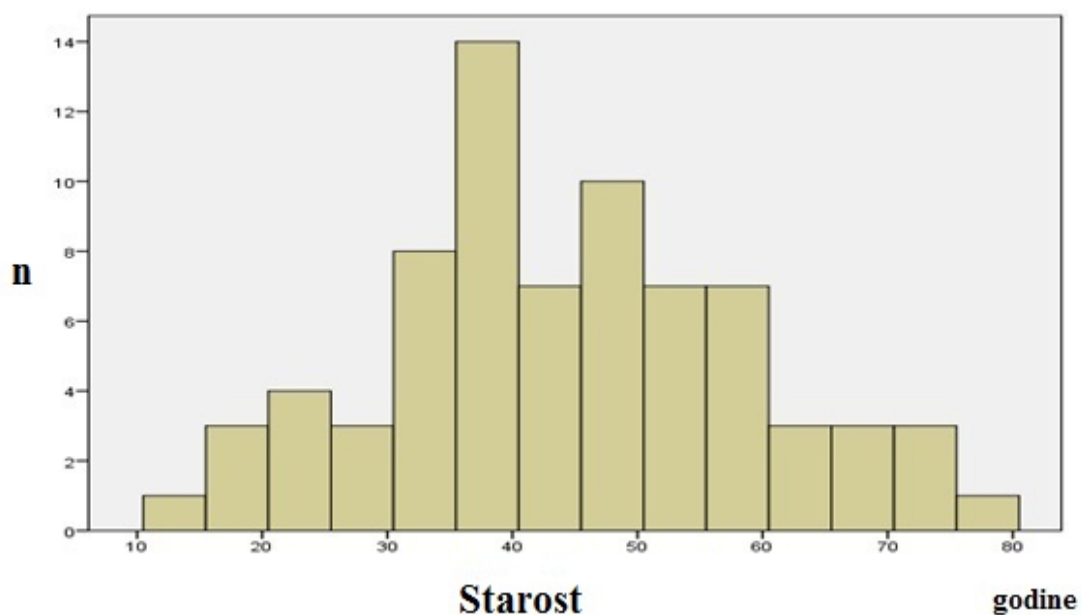
Grafikon 4.3 Distribucija pacijenata prema lokalizaciji tumora



Najmlađi pacijent je bio star 13, a najstariji 76 godina. Tumor se javljao u svim godinama starosti pomenutog intervala, sa najvećom učestalošću u četvrtoj 22/74 (29,72%), i petoj deceniji života 17/74 (22,97%) (tabela 4.4, grafikon 4.4). U ove dve decenije bilo je ukupno 39 slučajeva ili 52,70%.

Tabela 4.4 Distribucija pacijenata prema starosti

n	$\bar{x}$	SD	med.	min.	max.
74	44.22	14.365	42.50	13	76

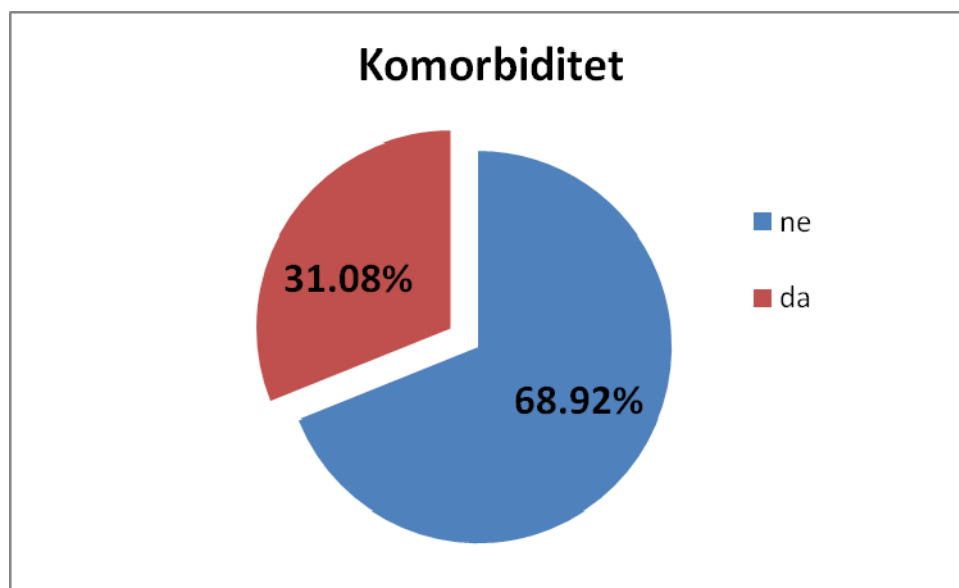
Grafikon 4.4 *Distribucija pacijenata prema starosti*

Prisustvo drugih oboljenja je nađeno kod 23 operisana pacijenta (31,08%), dok je njih 51 (68,92%) bez patoloških stanja u organizmu (*tabela 4.5, grafikon 4.5*).

Tabela 4.5 *Distribucija pacijenata u odnosu na komorbiditet*

	n	%
ne	51	68,92
da	23	31,08
ukupno	74	100,0

Grafikon 4.5 Distribucija pacijenata u odnosu na komorbiditet

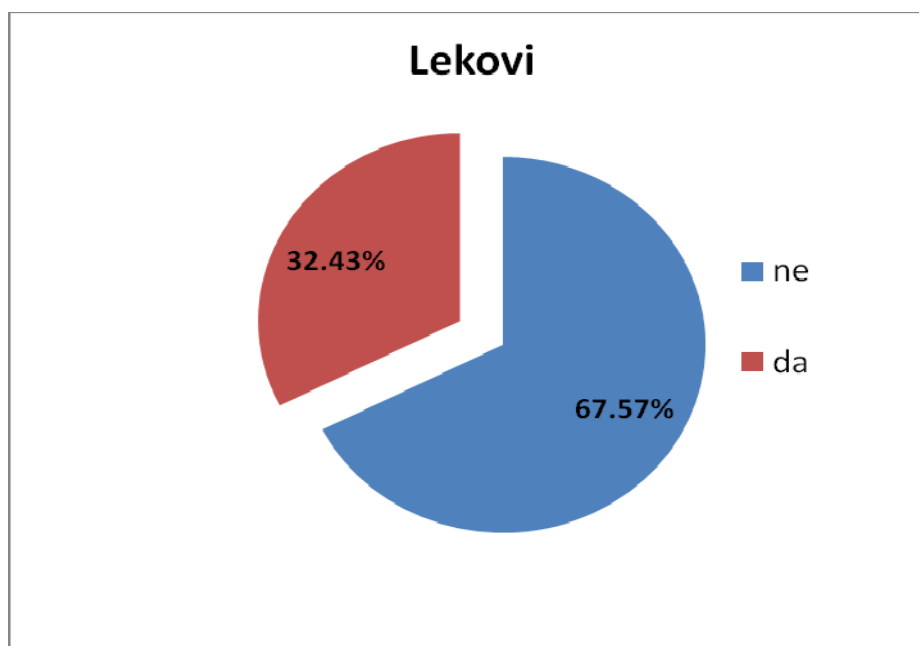


Od arterijske hipertenzije boluje 18 od 23 pacijenta (78,26%), dok su druga oboljenja zastupljena sa manjom učestalošću (hipotireoza 3, depresija 3, aritmije 2, mijelodisplastični sindrom (MDS) 1 i anksioznost 1).

S tim u vezi i lekovi koje uzimaju su iz farmakologije ovih oboljenja (50 ispitanika (67,56%) ne koristi nikakve lekove) (tabela 4.6, grafikon 4.6).

Tabela 4.6 Distribucija pacijenata u odnosu na farmakoterapiju

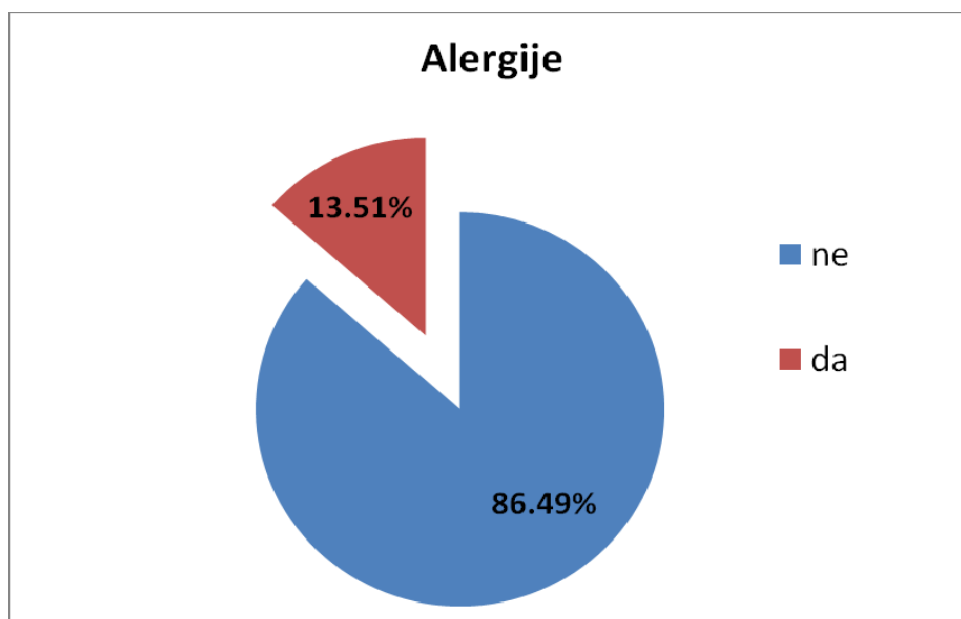
	n	%
ne	50	67,56
da	24	32,44
ukupno	74	100,0

Grafikon 4.6 *Distribucija pacijenata u odnosu na farmakoterapiju*

Alergijske manifestacije su prisutne kod 13,51% slučajeva (10) i to na penicilin, bactrim, aspirin, sulfonamide, novalgetol, cafetin i favistan (*tabela 4.7, grafikon 4.7*).

Tabela 4.7 *Distribucija pacijenata u odnosu na alergijske manifestacije*

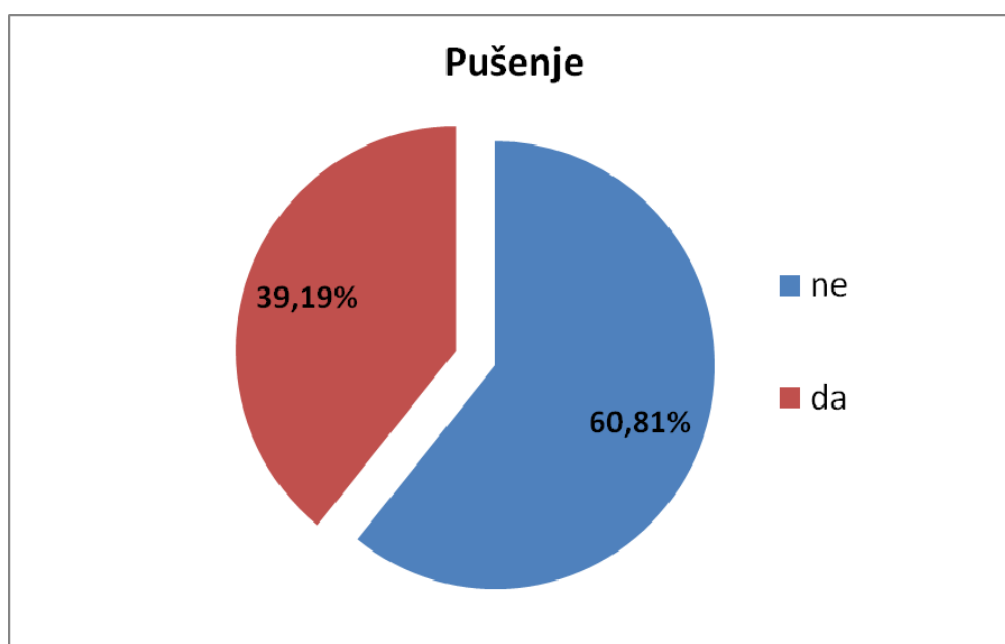
	n	%
ne	64	86,49
da	10	13,51
ukupno	74	100,0

Grafikon 4.7 *Distribucija pacijenata u odnosu na alergijske manifestacije*

U ispitivanoj grupi alkohol konzumira 11 ispitanika (14,86%), 29 su pušači (39,18%), bez faktora rizika je 41 ( 55,40%), a njih 7 su i pušači i konzumiraju alkohol (9,45%). Jedan od faktora rizika je zastupljen kod 35,13% slučajeva (26/74) (*tabele 4.8, 4.9 i grafikoni 4.8,4.9*).

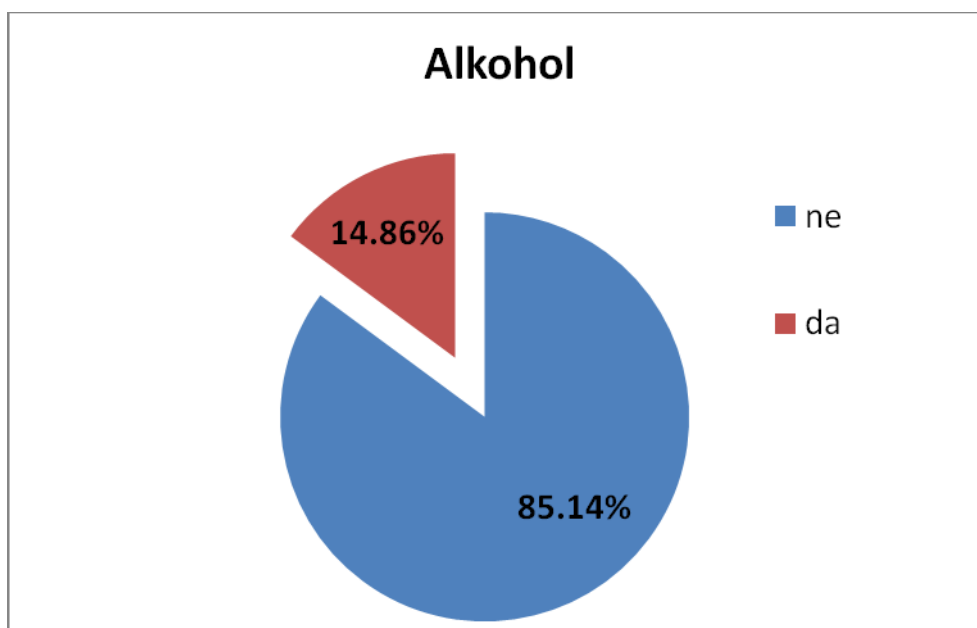
Tabela 4.8 *Distribucija pacijenata u odnosu na konzumiranje duvana*

	n	%
ne	45	60,81
da	29	39,19
ukupno	74	100,0

Grafikon 4.8 *Distribucija pacijenata u odnosu na konzumiranje duvana*Tabela 4.9 *Distribucija pacijenata u odnosu na konzumiranje alkohola*

	n	%
ne	63	85,1
da	11	14,9
ukupno	74	100,0



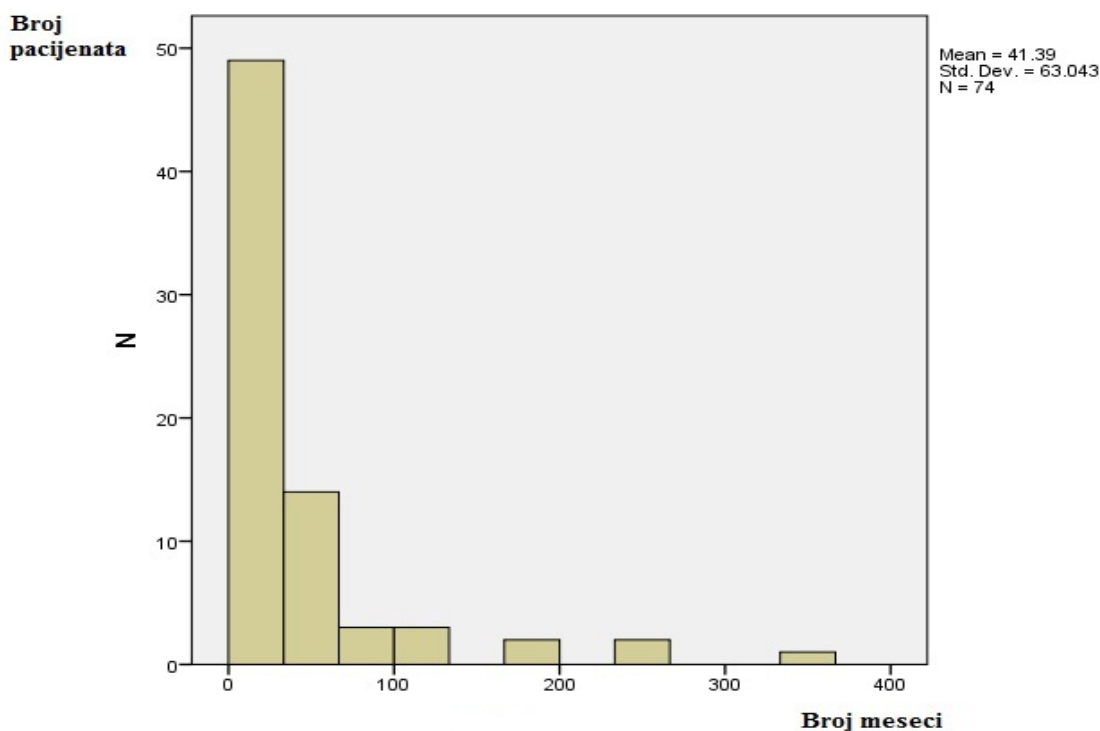
Grafikon 4.9 *Distribucija pacijenata u odnosu na konzumiranje alkohola*

Vremenski period od pojave prvih simptoma PA do početka lečenja je u intervalu od 2 meseca pa do 360 meseci (*tabela 4.10, grafikon 4.10*).

Tabela 4.10 *Prikaz odnosa broja pacijenata i vremena proteklog od uočavanja prve promene do trenutka lečenja*

n	$\bar{x}$	SD	med.	min.	max.
74	41,39	63	24	2	360

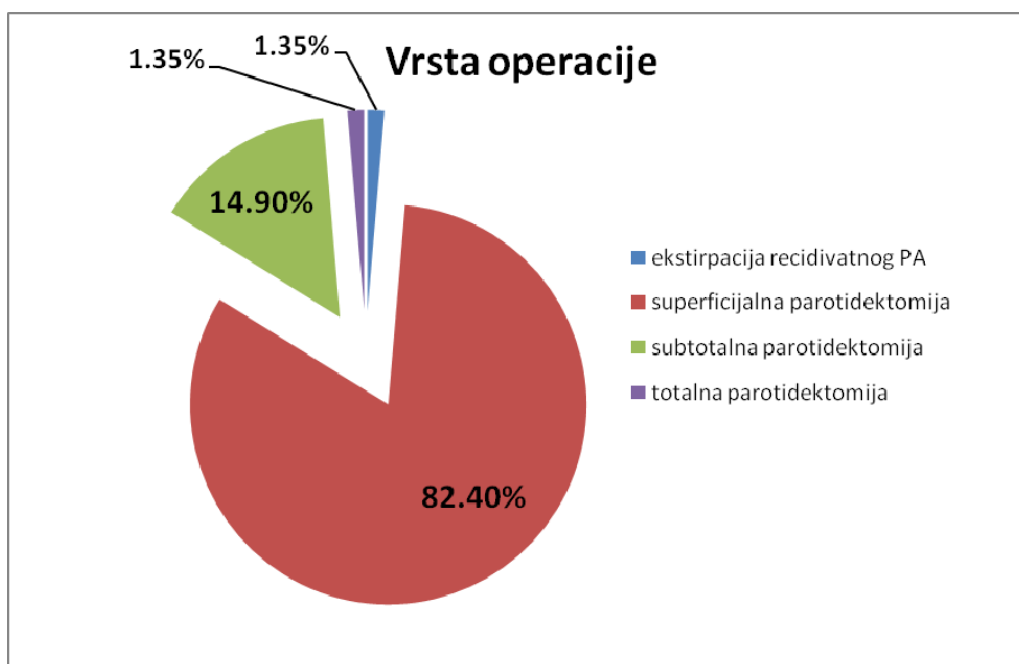
Grafikon 4.10 *Prikaz odnosa broja pacijenata i vremena proteklog od uočavanja prve promene do trenutka lečenja*



U prvoj godini evolucije tumora operisana su 32 PA (43,24%), u drugoj 9 (12,16%), u trećoj 12 (16,21%), četvrtoj 6 (8,10%), petoj 4 (5,40%) a od šeste do tridesete godine preostalih 11 (14,86%). Učinjena je 61 superficijalna parotidektomija sa očuvanjem facijalnog nerva (82,43%), 11 subtotalnih parotidektomija (14,86%), 1 totalna parotidektomija (1,35%) i 1 ekstirpacija recidivantnog tumora (*tabela 4.11, grafikon 4.11*).

Tabela 4.11 *Prikaz modaliteta operativnog lečenja*

vrsta operativnog zahvata	n	%
ekstirpacija recidivatnog PA	1	1,35
superficijalna parotidektomija	61	82,40
subtotalna parotidektomija	11	14,90
totalna parotidektomija	1	1,35
ukupno	74	100,0

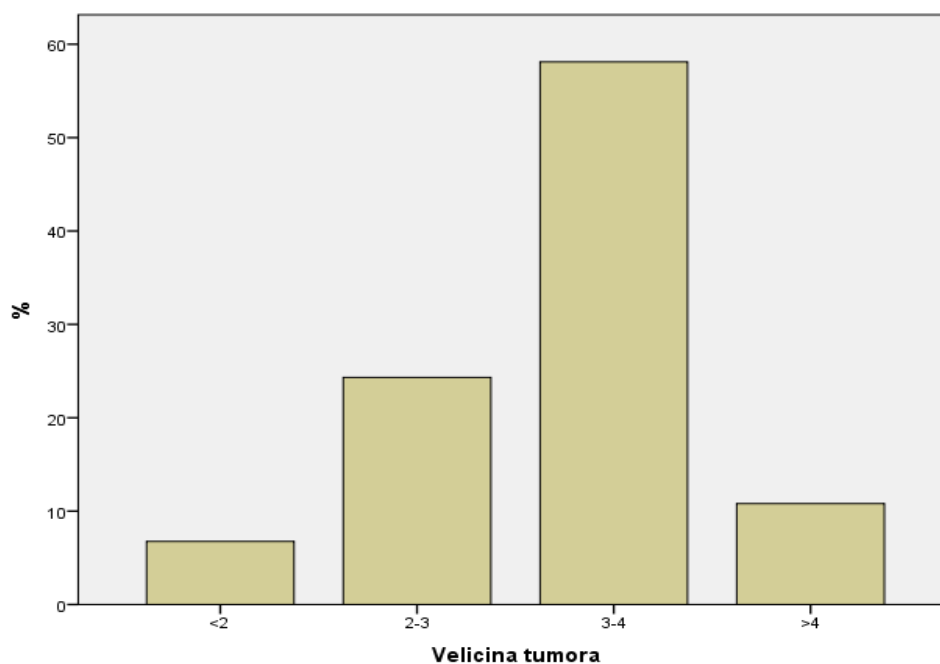
Grafikon 4.11 *Prikaz modaliteta operativnog lečenja*

Posledica operativnog lečenja nije bilo. 71 PA (95,95%) je operisan prvi put kao primarni tumor. 3 PA su recidivantni tumori (4,05%) i po redosledu recidiviranja pojavljuju se prvi put, drugi i četvrti put.

Klinička veličina PA se kretala od najmanjeg 0,5 x 0,5 cm, pa do najvećeg čije su dimenzije 7 x 6 cm. 6,76% (5/74) PA bili su manji od 2 cm. 24,32% (18/74) imali su dimenzije od 2 do 3 cm. Veličinu od 3 do 4 cm imalo je 43 tumora (58,11%), a preko 4 cm njih 8 (10,81%) (*tabela 4.12, grafikon 4.12*). Veličina PA nije proporcionalna sa vremenom evolucije.

Tabela 4.12 *Prikaz odnosa broja pacijenata i veličine tumora*

veličina PA u cm	n	%
< 2	5	6,8
2-3	18	24,3
3-4	43	58,1
> 4	8	10,8
Ukupno	74	100,0

Grafikon 4.12 *Prikaz odnosa broja pacijenata i veličine tumora*

#### 4.2. Analiza genskih polimorfizama

U delu koji sledi prikazani su rezultati ispitivanja polimorfizama u genu za survivin, TP53 i matriksnu metaloproteinazu 9.

#### 4.2.1. Analiza polimorfizama u genu za survivin

Za ovu studiju asocijacije odabrana su dva funkcionalna polimorfizma (SNP) u promotorskom regionu gena za survivin koji su se pokazali kao faktori rizika za nastanak nekoliko benignih i malignih tumora. U genu za survivin ispitivani su polimorfizmi pojedinačnog nukleotida za survivin-31 (SNP-31) i polimorfizmi pojedinačnog nukleotida za survivin-241 (SNP-241).

##### 4.2.1.1. Analiza polimorfizma -31 G/C (rs9904341) u genu za survivin

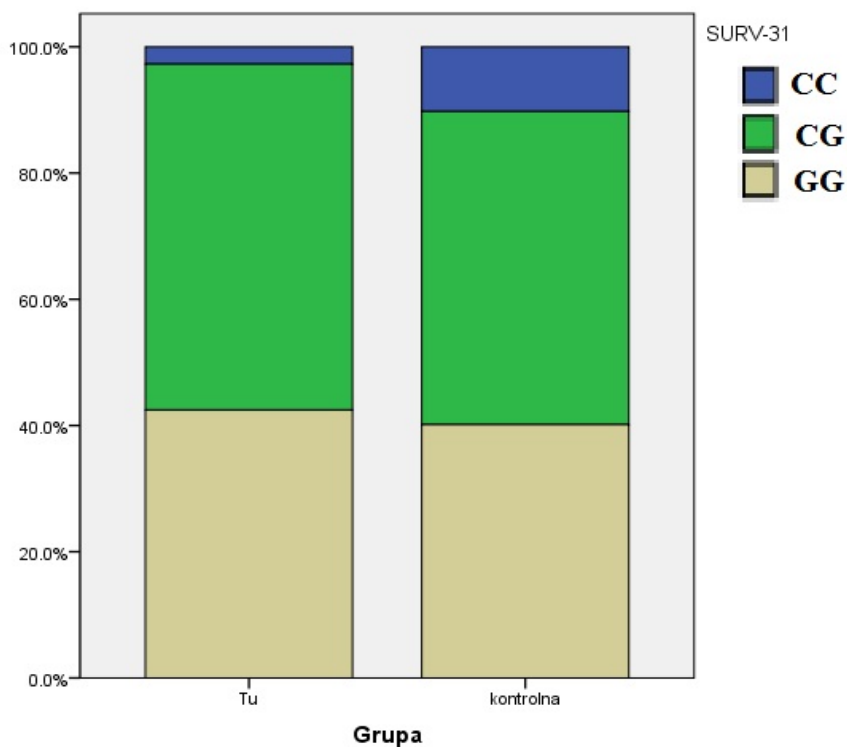
Ispitivanjem polimorfizama pojedinačnog nukleotida za survivin -31 G/C dobijeni su sledeći rezultati: najzastupljeniji genotipovi bili su heterozigoti (G/C) sa 54%, odnosno 40 od 74 pacijenata, zatim "wild type" homozigoti (G/G) sa 43% odnosno 32 od 74 pacijenta, i najređi su bili varijantni homozigoti (C/C) koji su ustanovljeni kod 2 od 74 ispitanika (3%). U kontrolnoj grupi, koju je činilo 127 ispitanika takođe su bili najčešći heterozigoti G/C koji su utvrđeni u 50% slučajeva (63/127), zatim homozigoti G/G, koji su nađeni u 40% slučajeva (51/127), a i u ovoj grupi najređi su bili C/C homozigoti, nađeni kod 10% slučajeva odnosno u 13 od 127 ispitanika. Distribucija različitih genotipova ovog polimorfizma kod pacijenata sa PA i zdravih pojedinaca prikazana je u *tabelama 4.13, 4.14* i na *grafikonu 4.13*.

Tabela 4.13 *Distribucija učestalosti genotipova u ispitivanim grupama u analizi polimorfizama gena za survivin -31*

		SURVIVIN -31			ukupno	
		CC	CG	GG		
grupa	PA	n	2	40	32	74
		%	2.7%	54.1%	43.2%	100.0%
	kontrolna	n	13	63	51	127
		%	10.2%	49.6%	40.2%	100.0%
ukupno		n	15	103	83	201
		%	7.5%	51.2%	41.3%	100.0%

Nema statistički značajne razlike između grupa po survivin -31 ( $X^2=1,189$ ;  $p=0,275$ ).

Grafikon 4.13 *Distribucija učestalosti genotipova u ispitivanim grupama u analizi polimorfizama gena za survivin -31*



U cilju utvrđivanja postojanja asocijacije između određenog genotipa gena za survivin -31 i rizika za razvoj PA, izračunat je *Crude Odds Ratio*. Bez obzira što nije ustanovljena statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata sa PA i pripadnika kontrolne grupe, logistička regresiona analiza je ipak pokazala da pacijenti sa CC genotipom imaju 4 puta manji rizik da obole od PA u odnosu na GG genotip, odnosno da alel C u homozigotnom stanju ima protektivni efekat (*tabela 4.14*).

Tabela 4.14 Polimorfizam u genu za survivin -31 i rizik za nastanak pleomorfnog adenoma - crude Odds Ratio

Gen/Genotip	PA (74)		K (127)		OR (95% CI)	p	
	n	%	n	%			
SURVIVIN -31	GG	32	43	51	10.2	1 reference	
	GC	40	54	63	49.6	1.01 (0.56-1.83)	0.54
	CC	2	3	13	40.2	0.25 (0.05-1.16)	<b>0.050*</b>
	GC+CC	42	57	76	89.8	0.88 (0.49-1.57)	0.388
	Aleli						
	G	104	70.3	165	64.9	1.00 reference	
	C	44	29.7	89	35.1	0.76 (0.42-1.38)	0.23

n-broj ispitanika, PA(pacijenti sa pleomorfim adenomom)-eksperimentalna grupa, K-kontrolna grupa, OR(Odds Ratio)-relativni rizik, CI(Confidence Interval)-interval poverenja, p(probability)-verovatnoća

#### 4.2.1.1. Analiza polimorfizma -241 C/T (rs17878467) u genu za survivin

Od 74 DNK uzorka tumorskog tkiva PA podvrgnuta analizi, samo je za 36 uzoraka uspešno određen genotip za promotorski polimorfizam na poziciji -241.

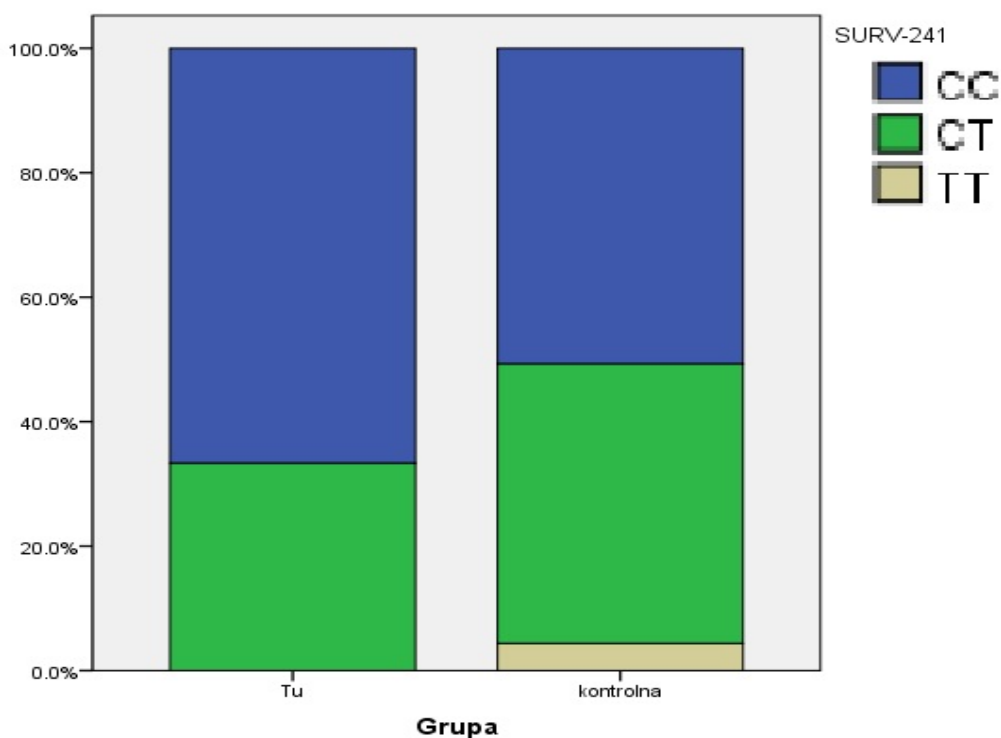
Rezultati ispitivanja ovog polimorfizama pojedinačnog nukleotida pokazali su kod pripadnika eksperimentalne grupe, prisustvo "wild-type" C/C homozigota u 68% (25) slučajeva a C/T heterozigota u 32% (12). T/T homozigoti za mutaciju nisu nadjeni. U kontrolnoj grupi (69 ispitanika) homozigota C/C bilo je 35 (50,7%), heterozigota C/T 31 (45%), a homozigota za mutaciju 3 (4%). Distribucija ovog polimorfizma prikazana je u tabelama 4.15, 4.16 i na grafikonu 4.14.

Tabela 4.15 *Distribucija učestalosti genotipova u ispitivanim grupama u analizi polimorfizama gena za survivin -241*

		SURVIVIN -241			ukupno	
		CC	CT	TT		
grupa	PA	n	25	12	0	37
		%	67.6%	32.4%	0.0%	100.0%
kontrolna		n	35	31	3	69
		%	50.7%	44.9%	4.3%	100.0%
ukupno		n	60	43	3	106
		%	56.6%	40.6%	2.8%	100.0%

Nema statistički značajne razlike između grupa po survivin -241 ( $X^2=3,152$ ;  $p=0,093$ ).

Grafikon 4.14 *Distribucija učestalosti genotipova u ispitivanim grupama u analizi polimorfizama gena za survivin -241*





U cilju ispitivanja postojanja asocijacije između određenog genotipa gena za survivin -241 i rizika za razvoj PA izračunat je *Crude Odds Ratio*. Logistička regresiona analiza je pokazala i u ovom slučaju, kao i u slučaju polimorfizma na poziciji -31 protektivni efekat alelne varijante. Nosioi alela T imaju 2 puta manji rizik da obole u odnosu na CC "wild type" homozigote, iako bez statističke značajnosti (vrednost je na samoj granici značajnosti) (tabela 4.16).

Tabela 4.16 Polimorfizam u genu za survivin -241 i rizik za nastanak pleomorfnog adenoma - crude Odds Ratio

Gen/Genotip	PA (37)		K (69)		OR		p
	n	%	n	%	(95% CI)		
<b>CC</b>	25	67.6	35	50.7	1	reference	
<b>CT</b>	12	32.4	31	45.0	0.54	(0.23-1.26)	0.11
<b>TT</b>	0	0	3	4.3	-	-	
<b>CT+TT</b>	12	32.4	34	49.3	0.49	(0.21-1.14)	<b>0.07</b>
<b>Aleli</b>							
<b>C</b>	62	83.8	10	73.2	1	reference	
<b>T</b>	12	16.2	37	26.8	0.53	(0.26-1.08)	<b>0.06</b>

n-broj ispitanika, PA(pacijenti sa pleomorfim adenomom)-eksperimentalna grupa, K-kontrolna grupa, OR(Odds Ratio)-relativni rizik, CI(Confidence Interval)-interval poverenja, p(probability)-verovatnoća

#### 4.2.2. Analiza polimorfizama u TP53 genu

Ispitivani su polimorfizam pojedinačnog nukleotida (TP53 SNP) i insercioni polimorfizam (TP53 INS). Od 74 DNK uzorka tumorskog tkiva PA, PCR analiza gena za TP53 bila je uspešna u 66.

#### 4.2.2.1. Analiza polimorfizma Pro47Ser u TP53 genu

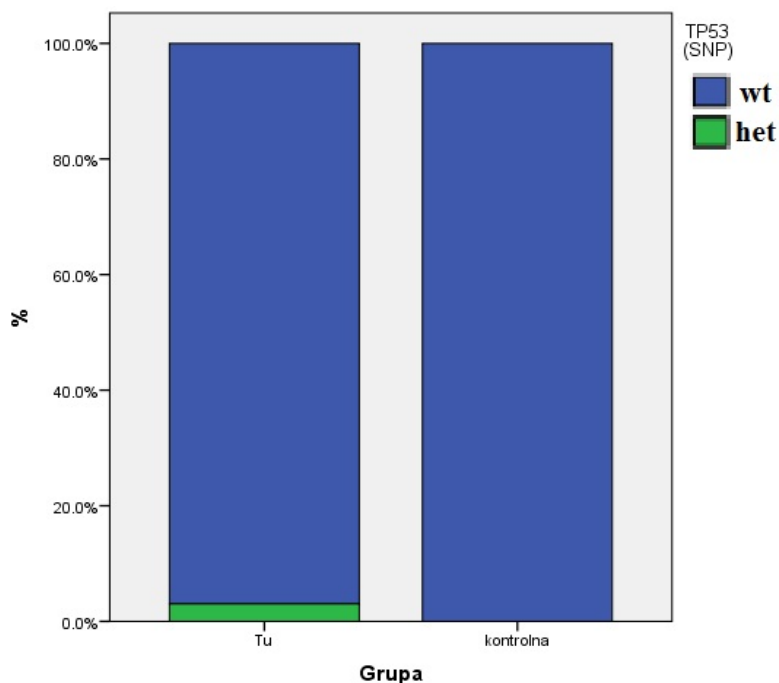
Kodon 47 u okviru egzona 4 kodira prolin (CCG) kod "wild type" individua, ali kod malog broja ljudi, usled mutacije C/T, može da kodira i serin (TCG). Ser47 varijanta u populacijama zdravih ljudi je vrlo retka, što je pokazalo i ovo istraživanje. Varijantni alel T nije nađen u homozigotnom stanju (T/T) ni kod jednog od 66 ispitanika sa PA. "Wild type" homozigoti (C/C) prisutni su bili kod 64/66 (97%), a heterozigotni genotip (C/T) je nađen u 3% slučajeva (2/66). U kontrolnoj grupi kod 71/71 ispitanika (100%) prisutni su bili homozigoti bez mutacije (C/C), dok heterozigoti (C/T) i mutirani homozigoti (T/T) nisu nađeni. Kao posledica toga, ne postoji statistički značajna razlika u učestalostima genotipova i alelela u grupi ispitanika u odnosu na kontrolnu grupu. Distribucija SNP polimorfizma u TP53 genu prikazana je u tabeli 4.17 i na grafikonu 4.15.

Tabela 4.17 *Distribucija učestalosti genotipova u ispitivanim grupama u analizi polimorfizama gena za TP53 SNP*

		TP53 (SNP)		ukupno	
		wt	het		
grupa	PA	n	64	2	66
		%	97.0%	3.0%	100.0%
kontrolna		n	71	0	71
		%	100.0%	0.0%	100.0%
ukupno		n	135	2	137
		%	98.5%	1.5%	100.0%

Nema statistički značajne razlike između grupa po TP53 snp ( $X^2=2,183$ ;  $p=0,230$ ).

Grafikon 4.15 *Distribucija učestalosti genotipova u ispitivanim grupama u analizi polimorfizama gena za TP53 SNP*



#### 4.2.2.2. Analiza polimorfizma PIN3 Ins u TP53 genu

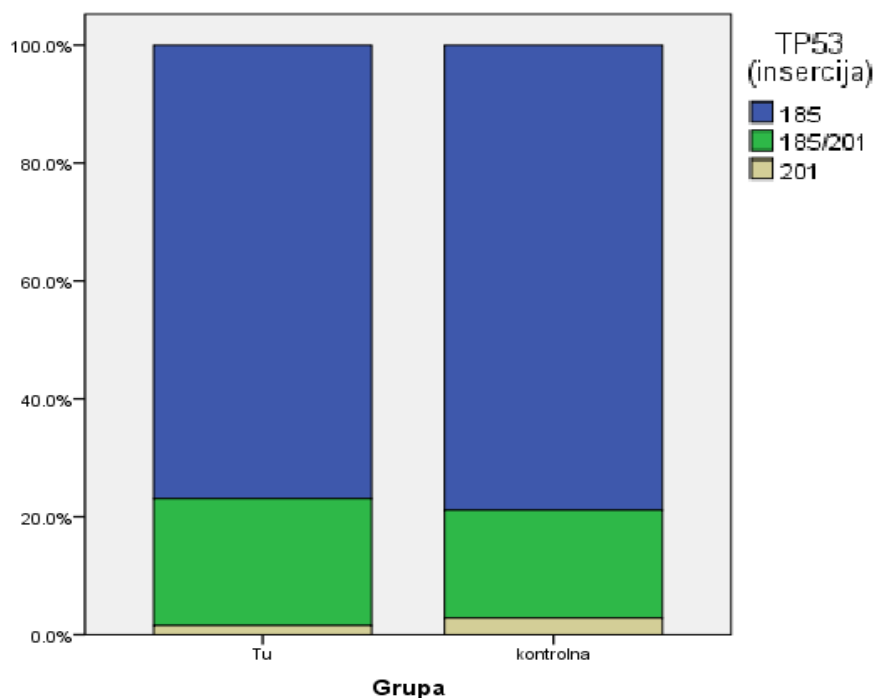
TP53 insercioni polimorfizam, koji podrazumeva odsustvo/prisustvo insercije od 16 baznih parova, kod obolelih od PA bio je zastupljen sa sledećom učestalošću: “wild type” homozigoti (185bp) kod 76% (50/66) slučajeva, heterozigoti (185/201 bp) u 23% (15/66), a homozigoti za inserciju (201bp) u 2% (1/66). U kontrolnoj grupi, “wild type” homozigota (185 bp) bilo je 79% (56/71), heterozigota (185/201 bp) 18% (13/71) i homozigota za mutaciju 3% (2/71). Rezultati ispitivanja ovog polimorfizma prikazani su u *tabelama 4.18, 4.19* i na *grafikonu 4.16*.

Tabela 4.18 *Distribucija učestalosti genotipova u ispitivanim grupama u analizi polimorfizama gena za TP53 INS*

		TP53 (insercija)			ukupno	
		185	185/201	201		
Grupa	PA	n	50	15	1	66
		%	75.8%	22.7%	1.5%	100.0%
	kontrolna	n	56	13	2	71
		%	78.9%	18.3%	2.8%	100.0%
ukupno		n	106	28	3	136
		%	77.4%	20.4%	2.2%	100.0%

Nema statistički značajne razlike između grupa po TP53 ins ( $X^2=0,446$ ;  $p=0,872$ ).

Grafikon 4.16 *Distribucija učestalosti genotipova u ispitivanim grupama u analizi polimorfizama gena za TP53 INS*



*Crude Odds Ratio* je računat i za polimorfizam u genu za TP53 INS da bi se ispitalo postojanje asocijacije između određenog genotipa i rizika za razvoj PA.

Logističkom regresionom analizom nije utvrđeno da je prisustvo određenog genotipa povezano sa povećanim ili smanjenim rizikom za pojavu PA (*tabela 4.19*).

Tabela 4.19 Polimorfizam u genu za TP53 INS i rizik za nastanak pleomorfno adenoma - *crude Odds Ratio*

Gen/Genotip	PA (66)		K (71)		OR	(95% CI)	p
	n	%	n	%			
<b>A1/A1</b>	50	75.8	56	78.9	1	reference	
<b>A1/A2</b>	15	22.7	13	18.3	1.29	(0.56-2.98)	0.34
<b>A2/A2</b>	1	1.5	2	2.8	0.56	(0.05-6.36)	0.55
<b>(A1/A2 A2/A2)</b>	16	24.2	15	21.1	1.19	(0.54-2.66)	0.41
<b>Aleli</b>							
<b>A1</b>	115	87.1	12	88	1.00	reference	
<b>A2</b>	17	12.9	17	12	1.19	(0.54-2.66)	0.41

n-broj ispitanika, PA(pacijenti sa pleomorfnim adenomom)-eksperimentalna grupa, K-kontrolna grupa, OR(Odds Ratio)-relativni rizik, CI(Confidence Interval)-interval poverenja, p(probability)-verovatnoća

#### 4.2.3. Analiza polimorfizma -1562 C/T (rs3918242) u genu za MMP-9

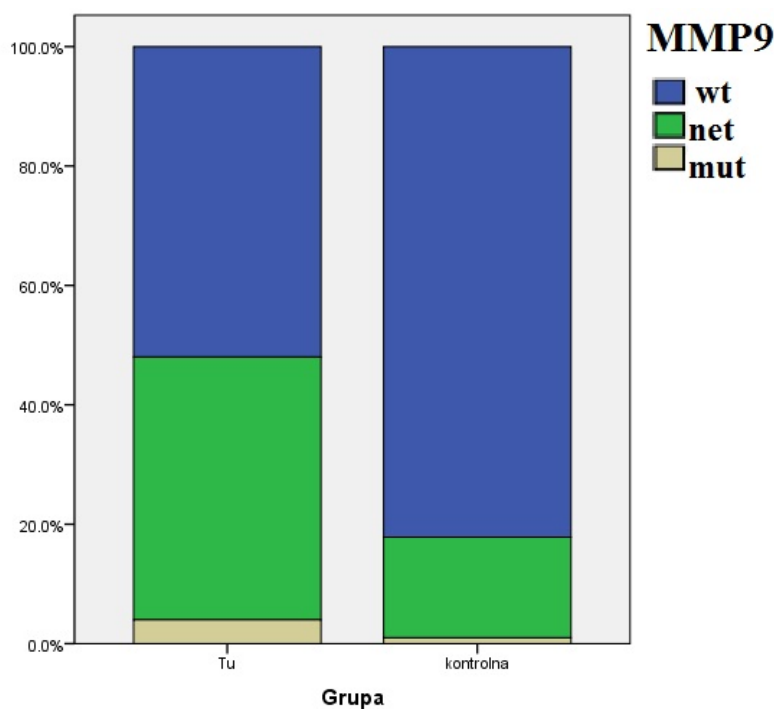
Od 74 DNK uzorka tumorskog tkiva PA, PCR analiza gena za MMP-9 bila je uspešna u 51. Rezultati analize polimorfizama pojedinačnog nukleotida za MMP-9 na poziciji -1562 su sledeći: u obe grupe najzastupljeniji su bili "wild type" homozigoti, u PA grupi bilo ih je 27 (53%), a u kontrolnoj 83 (82%), zatim su sledili heterozigoti, 22 (43%) u PA grupi u kontrolnoj 17 (17%). Homozigota za mutaciju bilo je 2 (4%) u PA grupi, a svega 1 u kontrolnoj (*tabele 4.20, 4.21 i grafikon 4.17*).

Tabela 4.20 *Distribucija učestalosti genotipova u ispitivanim grupama u analizi polimorfizama gena za MMP-9*

		MMP-9			ukupno	
		wt	het	mut		
grupa	PA	n	27	22	2	51
		%	52.9%	43.1%	3.9%	100.0%
	kontrolna	n	83	17	1	101
		%	82.2%	16.8%	1.0%	100.0%
ukupno		n	110	39	3	152
		%	72.4%	25.7%	2.0%	100.0%

Postoji statistički značajna razlika između grupa po MMP-9 ( $X^2=14,700$ ;  $p<0,001$ ).

Grafikon 4.17 *Distribucija učestalosti genotipova u ispitivanim grupama u analizi polimorfizama gena za MMP-9*



U tabeli 4.21 prikazani su rezultati logističke regresione analize koja je rađena u cilju ispitivanja postojanja asocijacije između određenog genotipa i rizika za razvoj PA. Izračunat je *Crude Odds Ratio* za polimorfizam u genu za MMP-9. Logistička regresiona analiza je pokazala da heterozigoti (C/T) imaju 4 puta veći rizik da obole od PA u odnosu na "wild type" genotip, sa visokom statističkom značajnošću. T/T homozigoti imaju 6 puta veći rizik da obole u odnosu na C/C genotip, ali zbog malog broja pacijenata sa tim genotipom OR ne dostiže statističku značajnost.

Tabela 4.21 Polimorfizam u genu za MMP-9 i rizik za nastanak pleomorfno adenoma - crude Odds Ratio

Gen/Genotip	PA (51)		K (101)		OR	(95% CI)	p
	n	%	n	%			
<b>CC</b>	27	53	83	82	1.00	reference	
<b>CT</b>	22	43	17	17	3.98	(1.85-8.57)	<b>0.001*</b>
<b>TT</b>	2	4	1	1	6.1	(0.54-70.50)	0.16
<b>CT+TT</b>	24	47	18	18	4.1	(1.94-8.67)	<b>0.001*</b>
<b>Aleli</b>							
<b>C</b>	76	74.5	183	90.6	1.00	reference	
<b>T</b>	26	25.5	19	9.4	3.37	(1.48-7.66)	<b>0.002*</b>

n-broj ispitanika, PA(pacijenti sa pleomorfnim adenomom)-eksperimentalna grupa, K-kontrolna grupa, OR(Odds Ratio)-relativni rizik, CI(Confidence Interval)-interval poverenja, p(probability)-verovatnoća

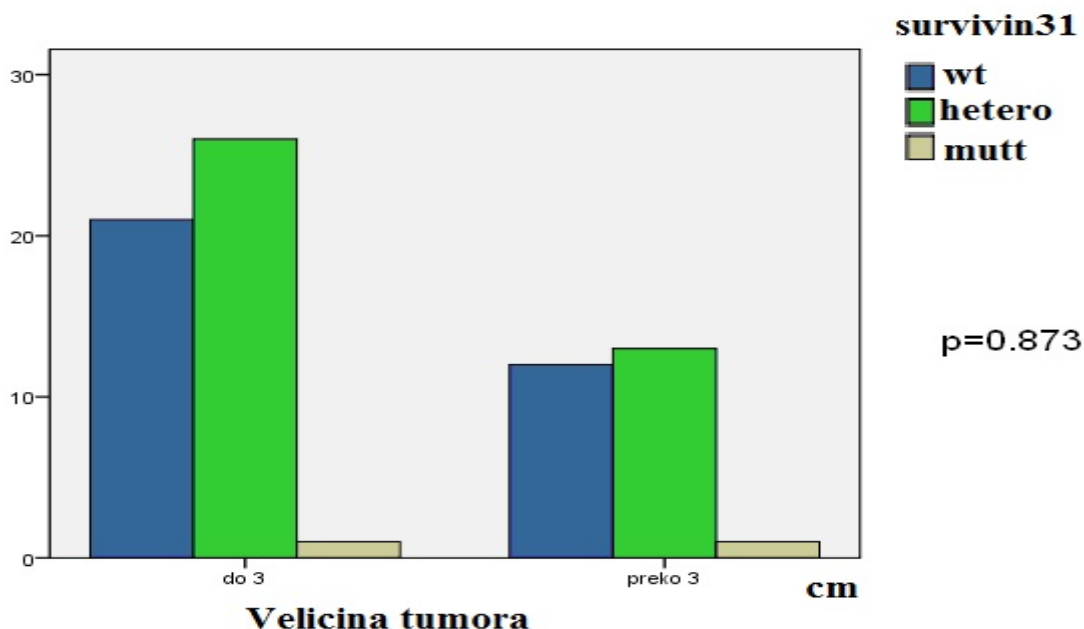
### 4.3. POVEZANOST KLINIČKIH PARAMETARA I GENOTIPOVA

Povezanost kliničkih parametara i genotipova utvrđena je analizom asocijacije genotipova ispitivanih polimorfizama gena za survivin, TP53 matriksnu metaloproteinazu 9 (MMP-9) sa veličinom tumora, evolutivnim periodom PA i uzrastom pacijenata.

#### 4.3.1. Povezanost veličine tumora i genotipova

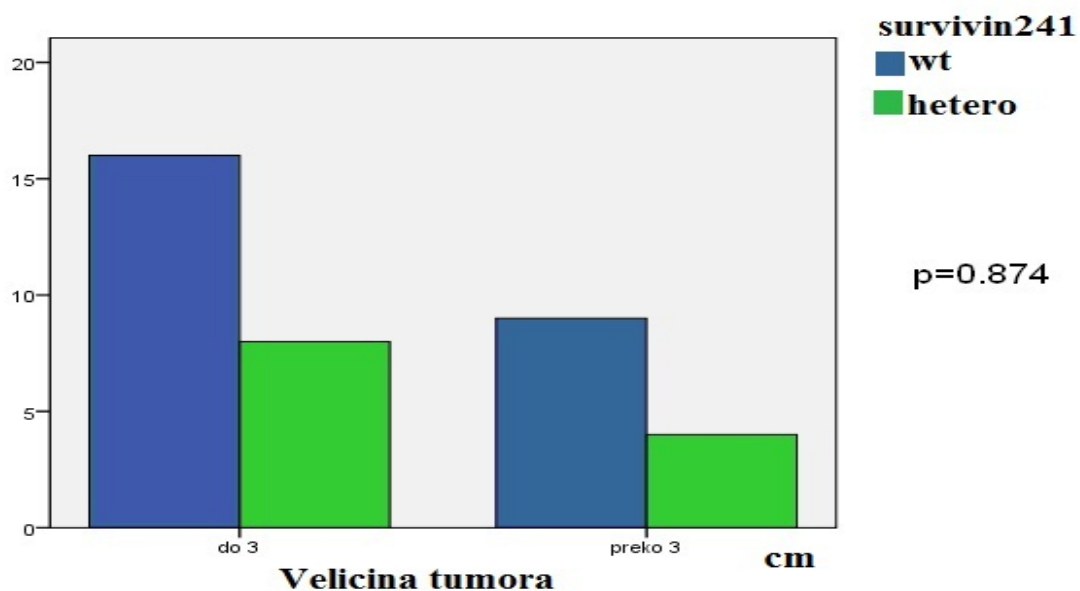
Analiza asocijacije genotipova ispitivanih polimorfizama sa veličinom tumora pokazala je da kod MMP-9 SNP-a postoji povećanje broja heterozigota u tumorima većih dimenzija, ali bez statističke značajnosti. SNP u TP53 genu koji je izuzetno redak u evropskim populacijama, i koji je isto tako izuzetno redak u našem uzorku ipak se pokazao kao genetički marker povezan sa tumorima velikih dimenzija. Ostali polimorfizmi nisu pokazali nikakvu asocijaciju sa veličinom tumora. Rezultati su prikazani na grafikonima od *grafikonima* od 4.18 do 4.22.

Grafikon 4.18 *Distribucija povezanosti veličine tumora i genotipova u analizi polimorfizama gena za survivin -31*

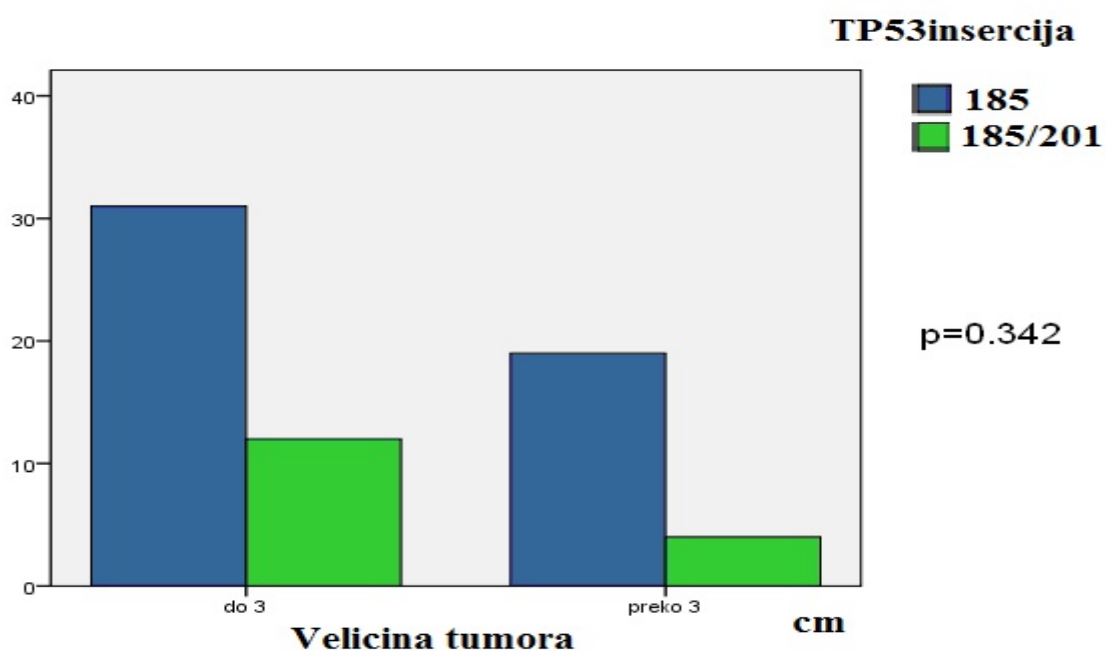




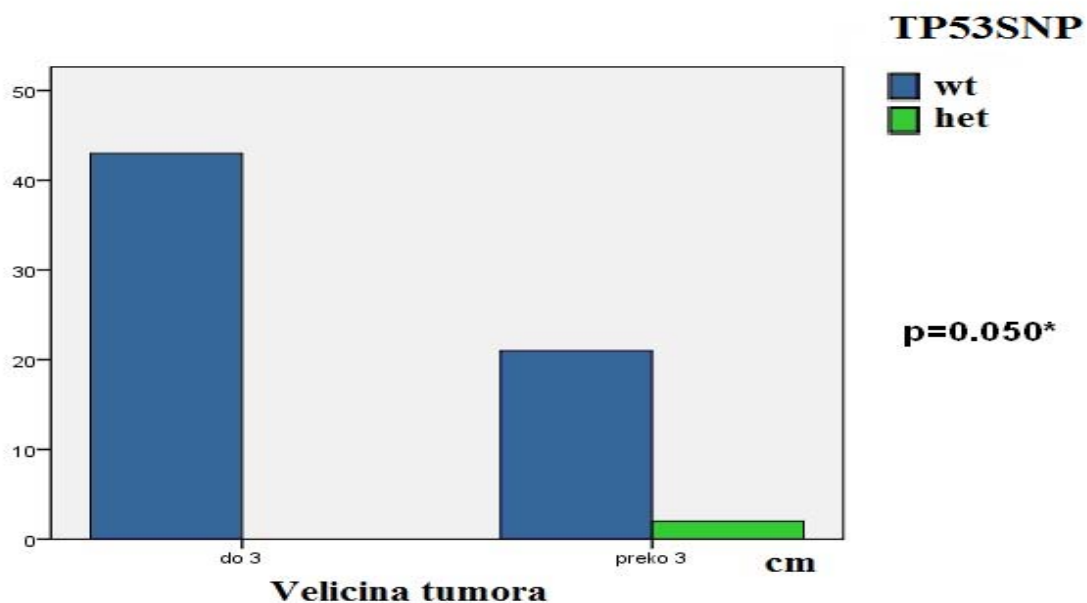
Grafikon 4.19 *Distribucija povezanosti veličine tumora i genotipova u analizi polimorfizama gena za survivin -241*



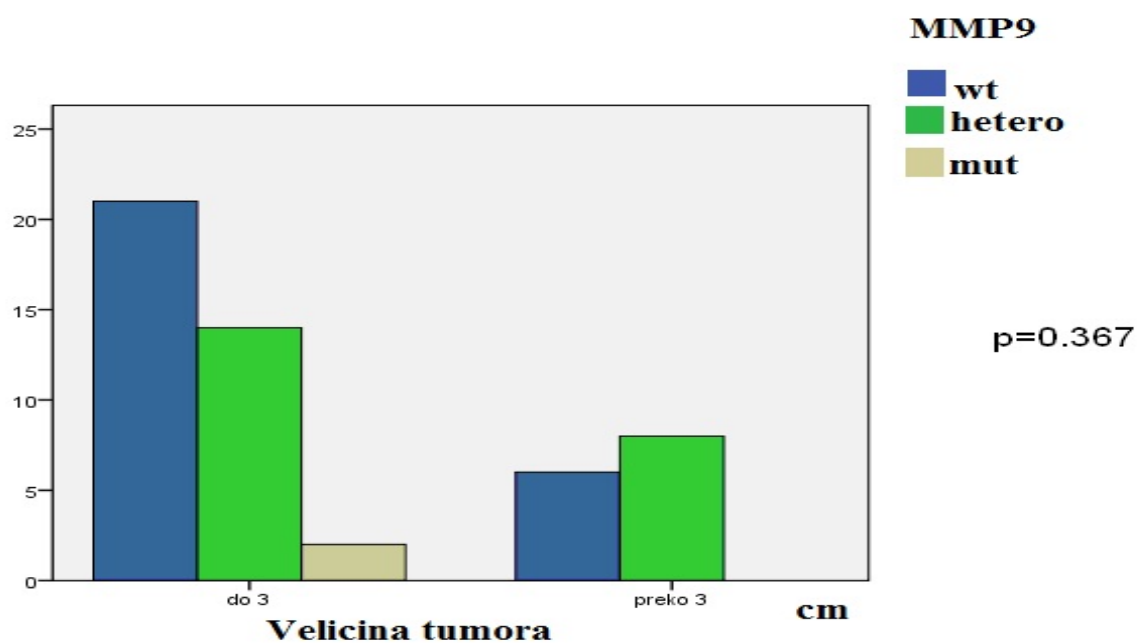
Grafikon 4.20 *Distribucija povezanosti veličine tumora i genotipova u analizi polimorfizama gena za TP53 INS*



Grafikon 4.21 *Distribucija povezanosti veličine tumora i genotipova u analizi polimorfizama gena za TP53 SNP*



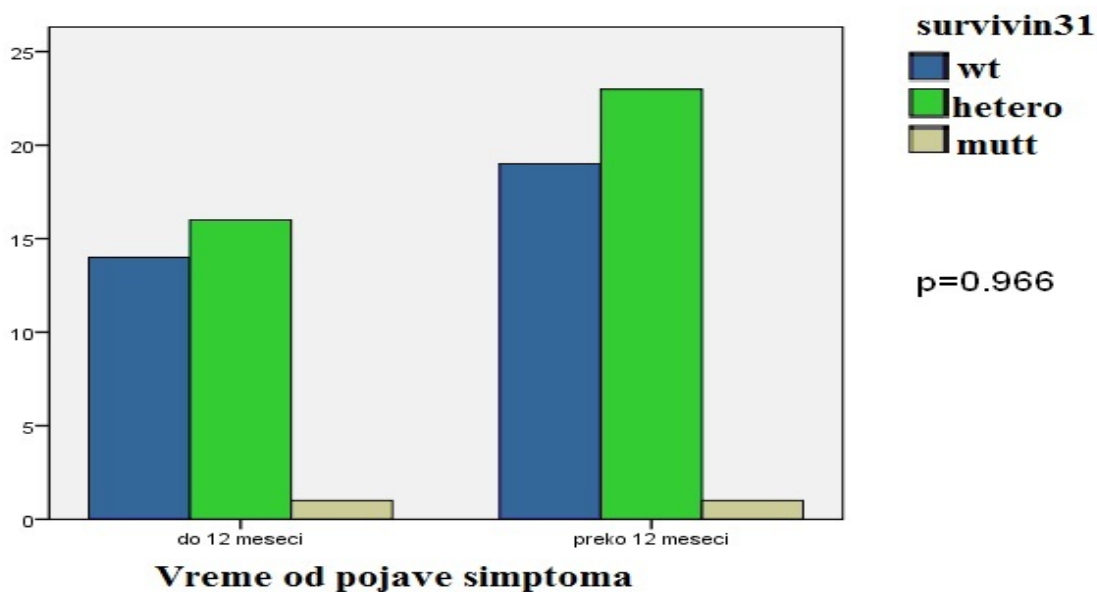
Grafikon 4.22 *Distribucija povezanosti veličine tumora i genotipova u analizi polimorfizama gena za MMP-9*



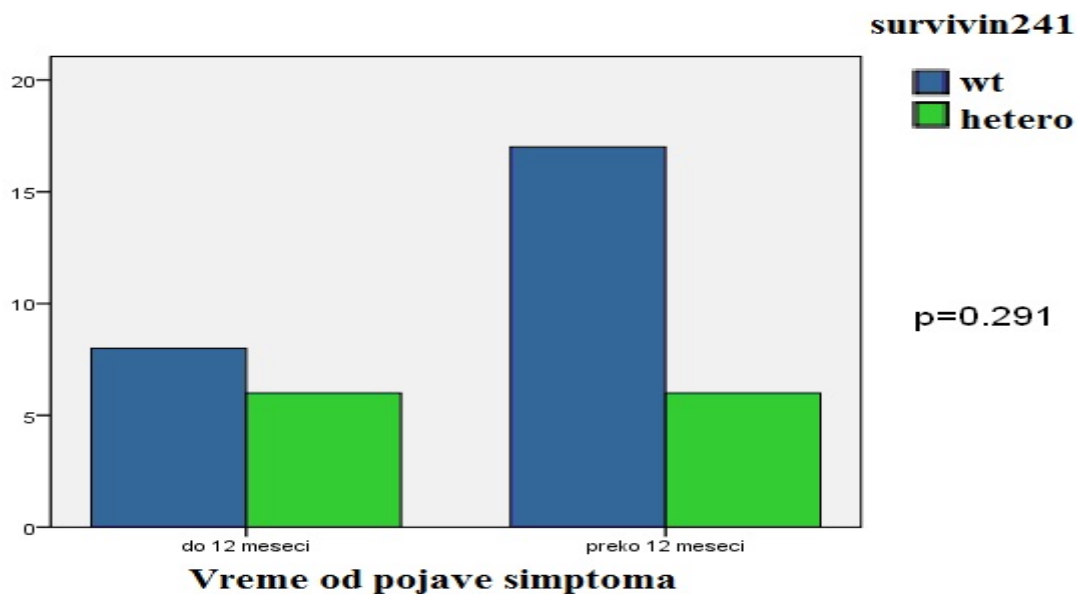
#### 4.3.2. Povezanost evolutivnog perioda PA i genotipova

Analiza asocijacije između evolucije tumora i pojedinih genotipova nije ukazala na postojanje neke jasne veze između ovog kliničkog parametra i alelnih kombinacija. Zapažen je trend povećanja broja heterozigota za MMP-9 polimorfizam među pacijentima sa dužim trajanjem simptoma, ali ne dostiže se statistička značajnost. Rezultati analize prikazani su na *grafikonima* od 4.23 do 4.27.

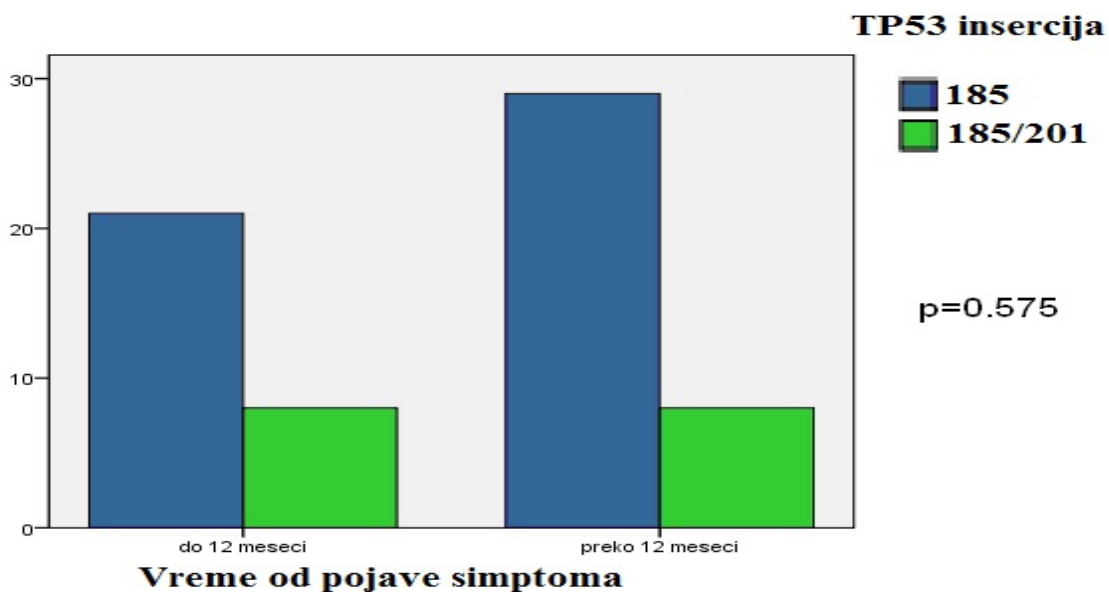
Grafikon 4.23 *Distribucija povezanosti evolutivnog perioda PA i genotipova u analizi polimorfizama gena za survivin -31*



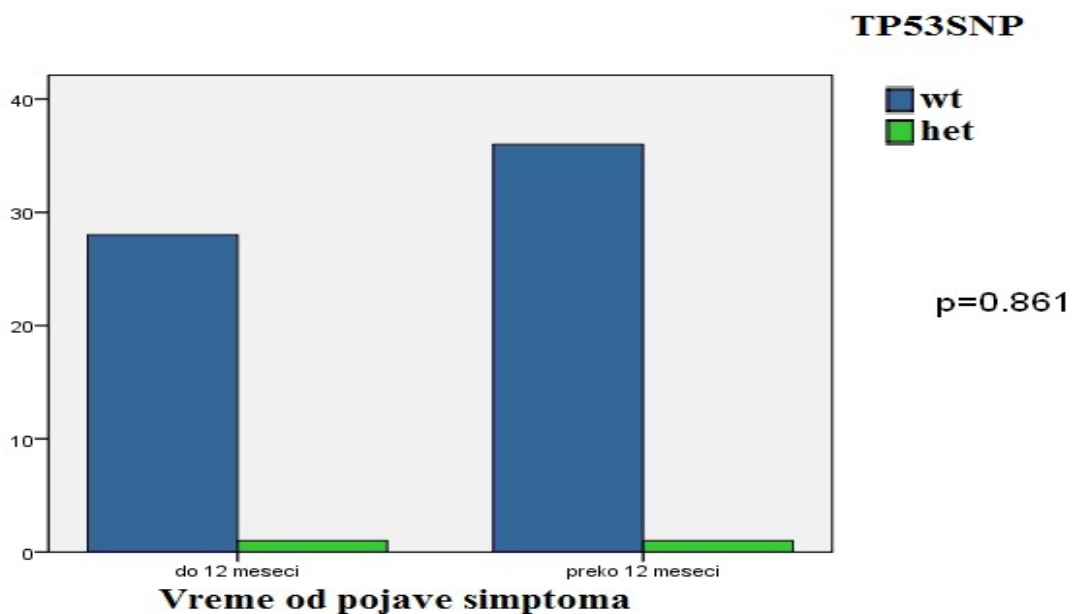
Grafikon 4.24 *Distribucija povezanosti evolutivnog perioda PA i genotipova u analizi polimorfizama gena za survivin -241*



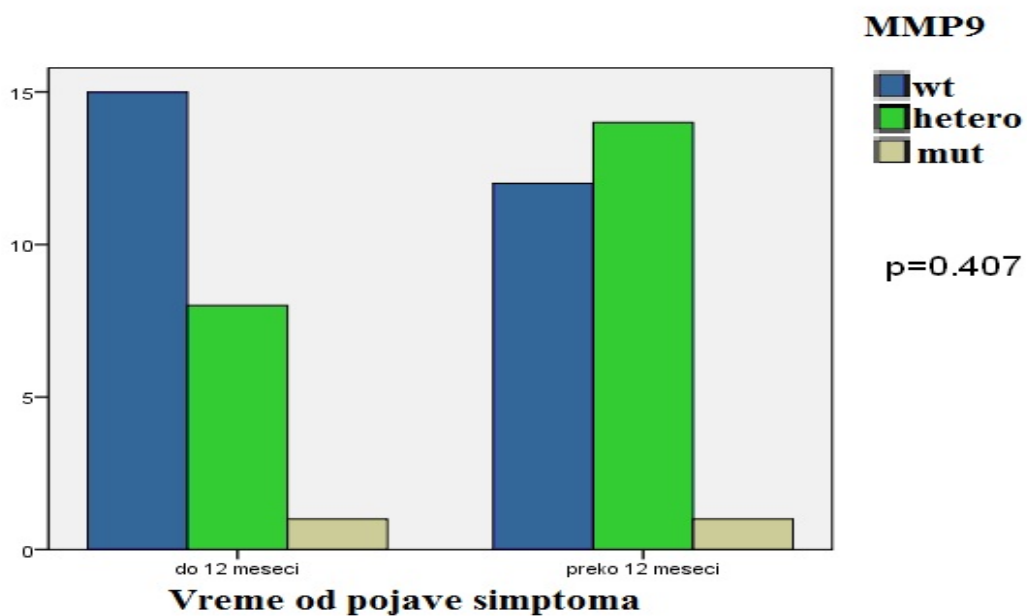
Grafikon 4.25 *Distribucija povezanosti evolutivnog perioda PA i genotipova u analizi polimorfizama gena za TP53 INS*



Grafikon 4.26 *Distribucija povezanosti evolutivnog perioda PA i genotipova u analizi polimorfizama gena za TP53 SNP*



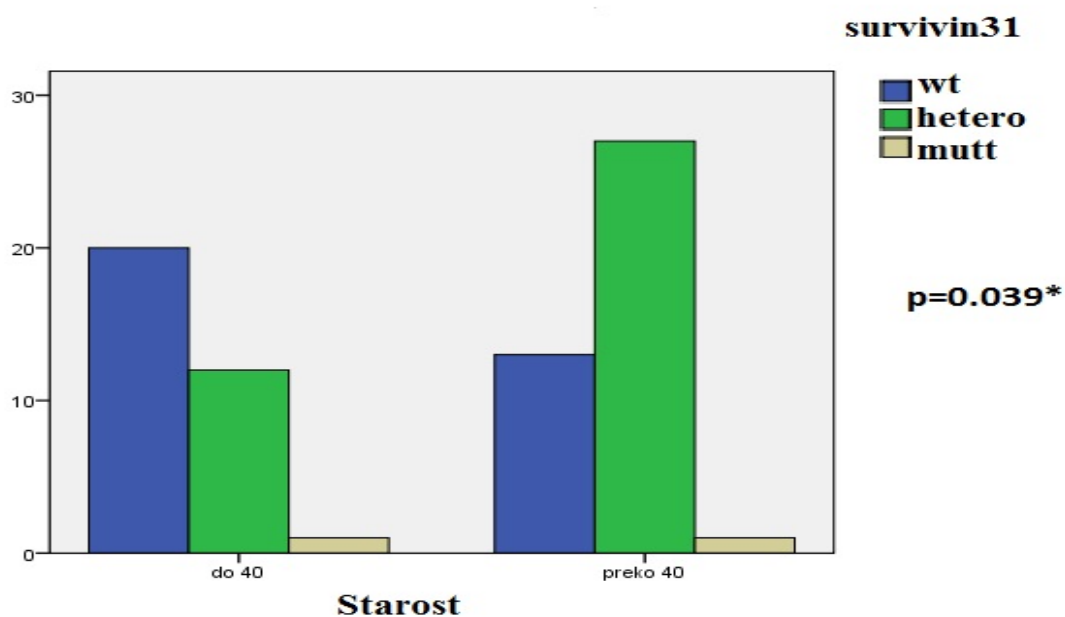
Grafikon 4.27 *Distribucija povezanosti evolutivnog perioda PA i genotipova u analizi polimorfizama gena za MMP-9*



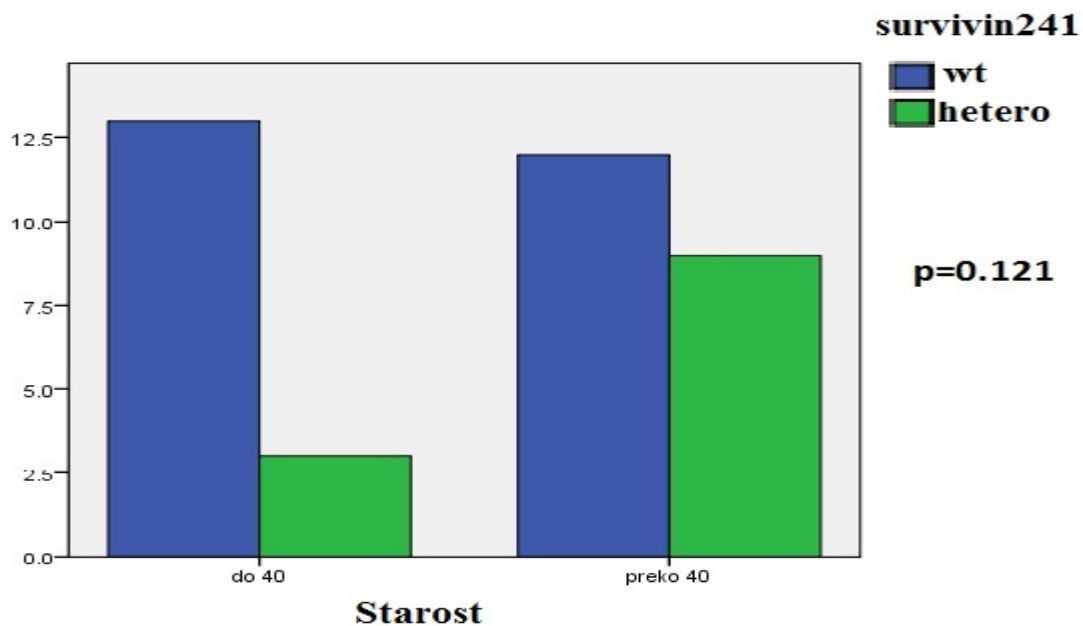
### 4.3.3. Povezanost godina starosti pacijenata i genotipova

Analiza asocijacije između godina u kojima se tumor javio i određenih genotipova nije ukazala na značajniji uticaj posmatranih polimorfizama na ovaj kliničko-epidemiološki parametar. Izuzetak predstavlja SNP -31 G/C u promotoru survivina, čiji se varijantni alel znatno češće javlja kod starije populacije obolelih od PA. Rezultati ove analize prikazani su na narednim *grafikonima* od 4.28 do 4.32.

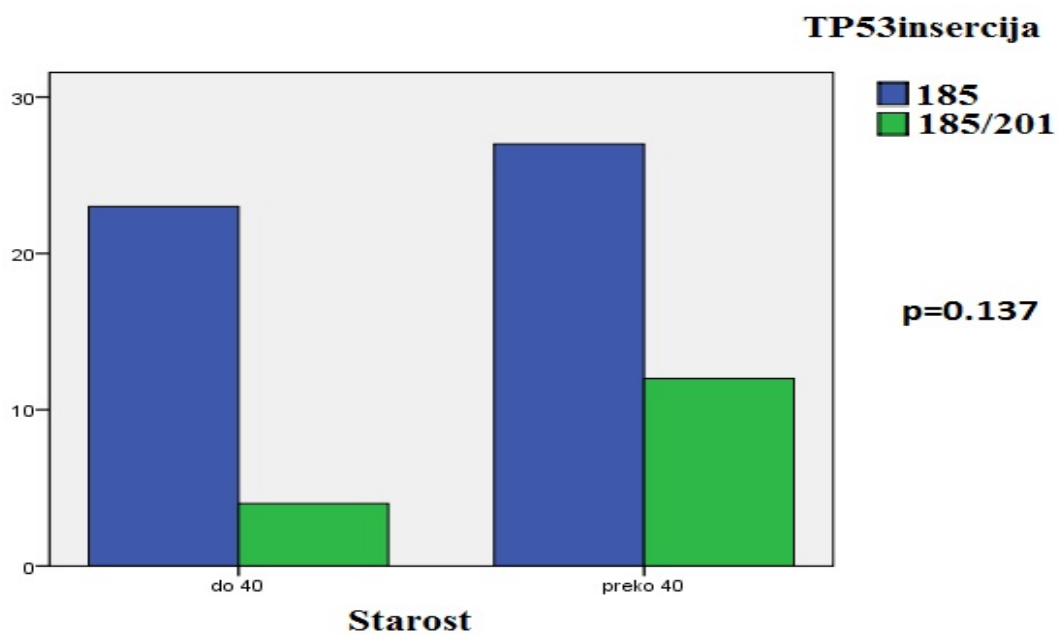
Grafikon 4.28 *Distribucija povezanosti godina starosti pacijenata i genotipova u analizi polimorfizama gena za survivin -31*



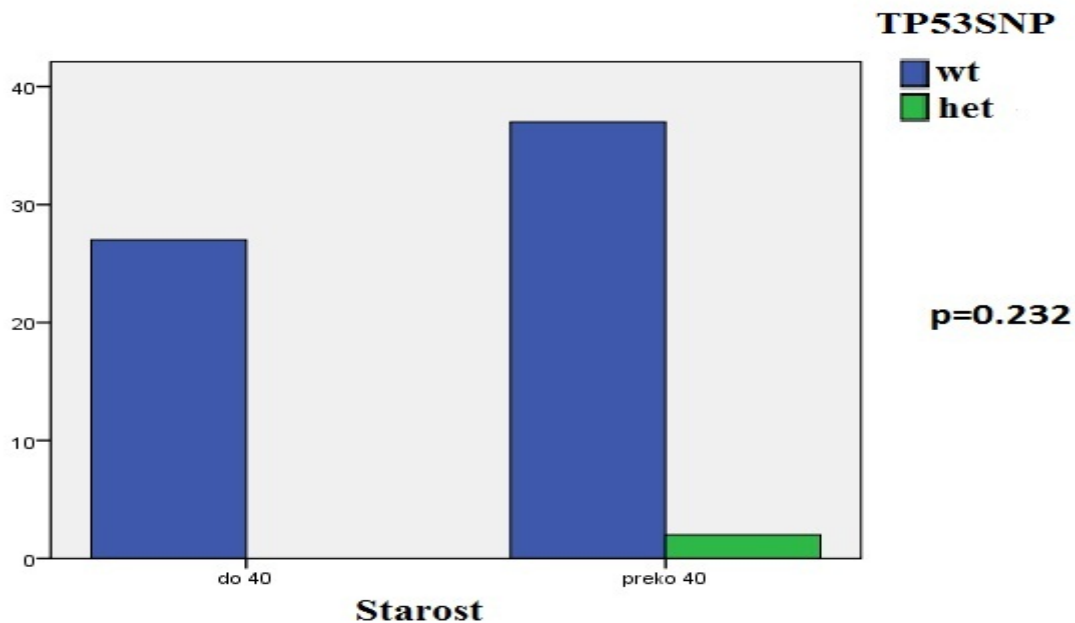
Grafikon 4.29 Distribucija povezanosti godina starosti pacijenata i genotipova u analizi polimorfizama gena za survivin -241



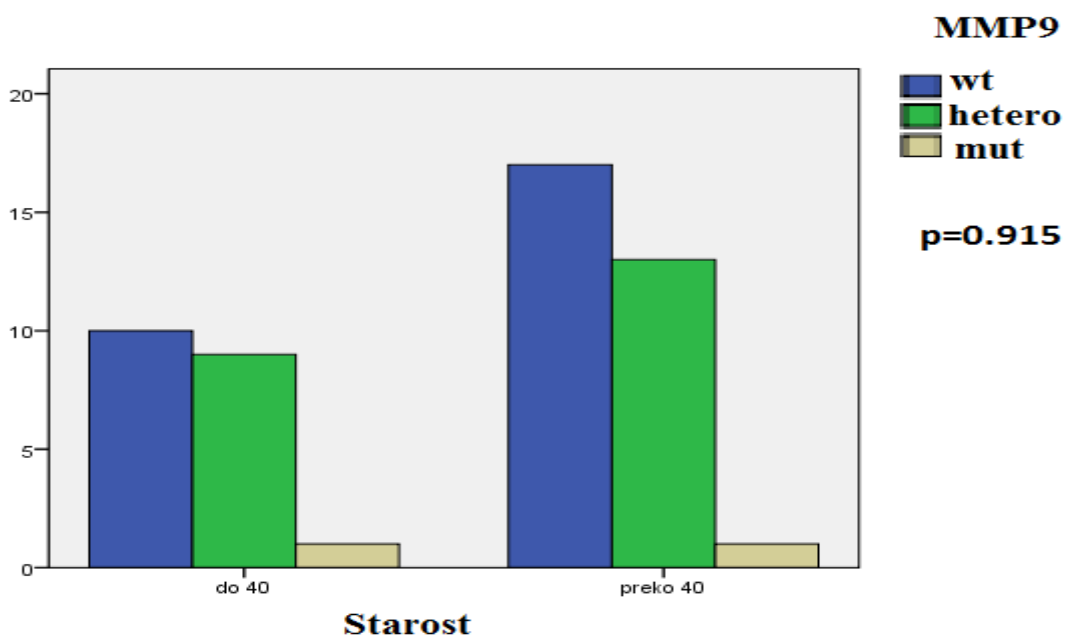
Grafikon 4.30 Distribucija povezanosti godina starosti pacijenata i genotipova u analizi polimorfizama gena za TP53 INS



Grafikon 4.31 *Distribucija povezanosti godina starosti pacijenata i genotipova u analizi polimorfizama gena za TP53 SNP*



Grafikon 4.32 *Distribucija povezanosti godina starosti pacijenata i genotipova u analizi polimorfizama gena za MMP-9*





## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Klinička studija

Uvidom u dostupnu literaturu nađen je izuzetno mali broj tzv. "studija asocijacije", odnosno studija koje se bave izučavanjem genetičkog rizika ili predisponirajućih faktora, vezanih za pleomorfni adenom. Kada je reč o studijama asocijacije polimorfizama gena za SURVIVIN, TP53 i MMP-9 kao faktora susceptibilnosti za nastanak pleomorfnih adenoma pljuvačnih žlezda, one su nepostojeće, što ukazuje na značaj ovog istraživanja.

Dobijeni rezultati kliničkog dela istraživanja potvrdili su već poznate karakteristike pleomorfnog adenoma pljuvačnih žlezda. U ispitivanoj grupi, PA je znatno češći kod pripadnica ženskog pola (u 83,8% slučajeva) nego kod pripadnika muškog pola. U literaturi postoji malo dostupnih podataka o ispitivanju estrogena, progesterona i njihovih receptora kod tumora pljuvačnih žlezda. Ozono smatra da pljuvačne žlezde predstavljaju target tkiva za estrogen (10). U svojim istraživanjima on je našao progesteron u citoplazmi ekskretornog dukalnog sistema normalnih pljuvačnih žlezda, dok su estrogenski receptori bili ograničeni na jedra ćelija. Jedra su bila pozitivna za oba hormona. PA je nešto dominantniji na levoj strani (51,35%) u odnosu na desnu. Javljao se u uzrastu od 13 do 76 godina starosti sa najvećom učestalošću u četvrtoj (29,72%) i petoj deceniji života (22,97%), što zajedno čini 52,70%. U prve tri decenije života udeo oboljevanja je 13,64% što se može dovesti u vezu sa dobrom regulacijom ćelijskog rasta i diferencijacije ćelija kod mlađih osoba i kraćoj izloženosti mutagenim faktorima.

Opšte karakteristike ispitivane grupe sa PA su da je reč o relativno zdravoj populaciji. 68,91% ispitanika (51 od 74) ne navodi postojanje drugih oboljenja, a njih 50 ne uzima nikakve lekove. Najčešća utvrđena oboljenja kod preostala 23 pacijenta su arterijska hipertenzija-18, hipotireoza-3, depresija-3, aritmije-2, MDS-1 i anksioznost-1. Prisustvo jednog oboljenja je zabeleženo kod 18 pacijenata, 2 kod 4 i 3 oboljenja kod svega 1 pacijenta. Alergijske manifestacije prisutne su kod 13,5% pripadnika grupe sa PA.

Rezultati ispitivanja prisustva egzogenih faktora rizika odnosno, konzumiranja alkohola i duvana su pokazali da 55,40% pripadnika eksperimentalne grupe sa PA

(41 od 74) nisu bili izloženi uticajima pomenutih kancerogena, a samo 9,45% (7 od 74) su bili konzumenti i alkohola i duvana. Preostali deo ispitanika je bio izložen jednom od pomenutih faktora. Iako se u literaturi još uvek sa preciznošću ne može govoriti o direktnim etiološkim faktorima u nastanku PA već o uslovno doprinosećim, više od polovine pacijenata nije bilo izloženo pomenutim uticajima. Ova činjenica, kao i relativno dobro opšte stanje (68,91% je bez drugih oboljenja), navodi na razmatranje uloge drugih faktora i mehanizama u nastanku PA i dalja istraživanja u tom pravcu.

Analiza trajanja evolutivnog razvoja, odnosno vremenskog perioda od pojave prvih simptoma PA do početka lečenja, pokazala je da se on kreće od 2 meseca do 360 meseci. 43,24% ispitanika operativno je lečeno u prvoj godini manifestacije tumora. Nasuprot ovome, 14,86% slučajeva je operisano sa tumorom čija je evolucija bila duža od 5 godina, odnosno trajala i do 30 godina. Duže vreme perzistencije tumora u organizmu nosi rizik za malignu alteraciju PA u njegovu malignu formu karcinom u pleomorfnom adenoma (Ca ex PA). Kod pripadnika eksperimentalne grupe (74 pacijenta sa PA) tokom izrade ove disertacije nije bilo pojave maligne alteracije tumora.

Podaci o kliničkoj veličini tumora dobijeni su na osnovu anamnestičkih podataka iz istorija bolesti i uvidom u postojeće nalaze EHO dijagnostike. Najmanji tumor je imao dimenzije 0,5 cm a najveći 7 x 6 cm. 58,11% tumora (43 od 74) bilo je u opsegu od 3 do 4 cm. I pored izrazito vidljive tumorske formacije veliki broj pacijenata nije preduzimao pravovremene korake u njegovom lečenju, iako je rana dijagnostika i pravovremena terapija od izuzetnog značaja.

Sklonost PA ka recidiviranju dovodi se u vezu sa morfološkim karakteristikama samog tumora i izborom hirurške metode lečenja. Zbog postojanja varijabilnosti veoma tanke kapsule tumora, kao i prisustva pseudopodija i satelitskih čvorova, doktrinarni stav u hirurškom lečenju je uklanjanje tumora sa zonom okolnog zdravog žlezdanog tkiva, odnosno parotidektomija sa očuvanjem facijalnog nerva. U literaturi postoje brojne studije koje su ispitivale i dokazale ispravnost pomenute tvrdnje (114, 115, 116,117). Enukleacija tumora nosi ogroman rizik od nedovoljne radikalnosti zahvata, a sa tim u vezi i od pojave recidiva (118,). 82,43% pripadnika eksperimentalne grupe hirurški je lečeno metodom superficijalne parotidektomije (61

od 74). Učinjeno je i 11 subtotalnih parotidektomija i 1 totalna parotidektomija, uglavnom kod tumora velikih dimenzija. Pomenuta zadnja dva modaliteta lečenja su komplikovanija za izvođenje i nose rizik od oštećenja facijalnog nerva. Zato se još jednom naglašava značaj što ranijeg otkrivanja postojanja PA i početka hirurškog lečenja. U jednom slučaju recidivantnog tumora primenjena je ekstirpacija. U grupi obolelih, u tri slučaja radilo se o recidivu PA (4,05%). Dva pacijenta su operisana ranije u drugim ustanovama a jedan na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Po redosledu recidiviranja pojavljuju se prvi put, drugi i četvrti put. Operativni zahvat kod recidivantnog PA je zahtevniji u odnosu na parotidektomiju kod primarnog tumora. Izmenjeni anatomske odnosi u parotidnoj regiji, kao posledica prethodnog zahvata i prisustvo ožiljnog tkiva, otežavaju preparaciju tkiva i identifikaciju n. facialis. Recidivantni PA imaju multifokalnu građu koja upućuje na uklanjanje šire zone preostalog zdravog žlezdanog tkiva, odnosno subtotalnu ili totalnu parotidektomiju. Smatra se da maligno alterišu u oko 7% slučajeva.

Posledica operativnog lečenja kod pripadnika eksperimentalne grupe nije bilo što ukazuje na adekvatnost hirurškog lečenja.

## **5.2. Genetička studija**

### **5.2.1. Polimorfizmi u genu za survivin**

U dostupnoj literaturi nema podataka o istraživanjima polimorfizama u genu za survivin kod pleomorfno adenoma pljuvačnih žlezda, i pored činjenice da su polimorfizmi u ovom genu, s obzirom na njegov značaj, bili čest predmet studija u najraznovrsnijim benignim i malignim tumorima.

Survivin je član familije proteina inhibitora apoptoze, koji ima važnu ulogu u kontroli apoptoze i ćelijske proliferacije. Iako je survivin visoko eksprimiran tokom fetalnog razvoja, on se retko nalazi u normalnom adultnom tkivu, osim u ponekim tkivima/ćelijama, ali je često eksprimiran u kanceru (119, 120). Tačnije, ponovna aktivacija i ekspresija survivina sreće se kod većine humanih kancera uključujući karcinom pankreasa, pluća, creva, dojke, jajnika, prostate i dr (121).

Mnogobrojne *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale da survivin inhibira ćelijsku smrt, naročito apoptozu. Zahvaljujući mogućnosti da inhibira apoptotske stimulse

omogućava ćeliji preživljavanje koje vodi ka ćelijskoj proliferaciji mutiranih ćelija, a krajnji ishod je formiranje neoplazije. Do poremećaja ekspresije survivina u tumorima dolazi putem nekoliko mehanizama, uključujući amplifikaciju lokusa na hromozomu 17q25, demetilaciju, povećanu aktivnost promotora itd. Pored toga, povećana ekspresija survivina u ćelijama tumora je najverovatnije nezavisna od ćelijskog ciklusa, ukazujući na povećanje njegove antiapoptotske uloge u poređenju sa normalnim ćelijama u kojima je funkcija regulacije mitoze dominantna. Promenljiva intracelularna lokalizacija survivina u tumorima (citoplazmatska i jedarna) može biti relativno egzaktn pokazatelj aktivnosti survivina i već se u nekoliko studija ispostavilo da može da posluži kao prognostički marker. Posebno je zanimljiva studija ekspresije survivina u malignim tumorima parotidnih žlezda, u kojoj je pokazano da je povećana ekspresija u direktnoj vezi sa lošijim preživljavanjem pacijenata (122). Sličan rezultat je dobijen i za kancer želuca (123).

#### **5.2.1.1. Polimorfizam -31 G/C (rs9904341) u genu za survivin**

CDE/CHR (Cell cycle Dependent/ Cell Homology region) predstavlja deo promotora gena za survivin važan za regulaciju njegove ekspresije. Zato se danas sve više ispituju različiti polimorfizmi upravo u ovom regionu. Jedan od ispitivanih je i polimorfizam C > G na poziciji – 31, za koji je pokazano da dovodi do povećane ekspresije survivina pa i do povećanja rizika od oboljevanja od različitih tipova tumora.

Xu i sar. su prvi identifikovali ovu –31 C>G supstituciju, lokalizovanu u okviru CDE/CHR elementa i pokazali da ovaj polimorfizam menja transkripciju survivina zavisnu od ćelijskog ciklusa i dovodi do prekomerne ekspresije survivina kako na iRNK tako i na proteinskom nivou (124).

Postoje brojni radovi koji su ispitivali polimorfizam survivina na poziciji -31 i njegovu vezu sa drugim tipovima tumora.

Wang i sar. su objavili studiju o povezanosti polimorfizma -31 u promotorskom regionu gena za survivin i urotelijalnog karcinoma (UK) u Tajvanskoj populaciji. Rezultati istraživanja su potvrdili vezu ovog polimorfizma sa rizikom obolevanja od UK. Učestalost C/C i C/G genotipova je bila veća kod obolelih od UK nego kod kontrolne grupe (125).

Jang i sar. su ispitali vezu između ovog SNP i rizika od kancera pluća u Korejskoj populaciji i pokazali su da je distribucija -31G/C genotipova bila značajno različita između grupe obolelih i grupe zdravih osoba. Individue sa bar jednim -31G alelom imaju značajno niži rizik da obole od kancera pluća u poređenju sa -31 CC genotipom, što govori o tome da -31G alel ima manju promotorsku aktivnost od -31C alela (126).

U studiji na iranskoj populaciji ustanovljena je povezanost između polimorfizma na poziciji -31 gena za survivin i papilarnog karcinoma tireoidee. Utvrđeno je da je učestalost -31G/C i -31C/C genotipa veća kod osoba obolelih od kancera u poređenju sa kontrolnom grupom (127).

Istraživanje na indijskoj populaciji, o mogućoj povezanosti polimorfizma survivina (-31C/G) sa nastankom kancera jednjaka, ukazuje na viši stepen rizika kod nosilaca CC genotipa (128).

Takođe, u kineskoj populaciji je utvrđeno da su učestalosti -31C alela i C/C genotipa značajno više kod osoba obolelih od karcinoma želuca, nego kod zdravih osoba, što ovaj polimorfizam samim tim svrstava u faktore susceptibilnosti za razvoj kancera želuca Cheng i sar. (2008)(129). Zanimljivo je da druga studija na istoj populaciji nije potvrdila rezultate Cheng-a i saradnika, odnosno Yang i sar. (2009) su konstatovali da nema statistički značajne veze između karcinoma želuca uopšte i varijantnih genotipova (G/G+G/C), ali da postoji veza između genotipova i distalnih, dobro diferentovanih karcinoma. Bez obzira što su interpopulacijske varijacije uobičajene i česte, ovaj diskrepantni rezultat na istoj populaciji je neobičan.

Utvrđeno je da genotip C/C u odnosu na G/G više doprinosi (ali bez statističke značajnosti) ranijem oboljevanju (u mlađoj životnoj dobi) od primarnog epitelnog karcinoma ovarijuma (130).

Neke studije pak negiraju bilo kakvu povezanost između -31G/C SNP-a i oboljenja. Borbely i saradnici su ispitali vezu između ovog polimorfizma i razvoja karcinoma grlića materice u populaciji Mađarske i rezultati nisu ukazali na postojanje veze (131).

Potrebno je istaći da su u našoj populaciji urađene dve studije asocijacije, jedna kod dece obolele od Wilms-ovog tumora (132) i druga na pacijentima sa odontogenim keratocističnim tumorima (62), i obe su pokazale da je polimorfizam -31

G/C modulator rizika za pojavu, u prvom slučaju jednog malignog, a drugom slučaju jednog benignog tumora.

U ovoj studiji, G alel u homozigotnom stanju (G/G) bio je prisutan kod pacijenata sa PA u 43% što je neznatno više u odnosu na kontrolnu grupu (40%). Heterozigotni genotip C/G je za 4% više zastupljen kod pripadnika eksperimentalne grupe, dok homozigota C/C ima više u kontrolnoj grupi. Nađena je statistički značajna razlika u učestalostima homozigotnih genotipova (GG i CC), s tim da se alel C ponaša kao protektivni factor. CC homozigoti imaju 4 puta manji rizik da obole od PA u odnosu na GG. Prisustvo alelne varijante nije uticalo ni na veličinu tumora, kao ni na dužinu njegove evolucije. Međutim, prisustvo mutiranog alela u genotipu bilo je sa statističkom značajnošću udruženo sa starijom dobi oboljevanja.

#### **5.2.1.2. Polimorfizam -241 C/T (rs17878467) u genu za survivin**

Podataka o promotorskom polimorfizmu na poziciji -241 (C/T) je neuporedivo manje nego za polimorfizam na poziciji -31 (G/C). U studiji na indijskoj populaciji, utvrđeno je da je heterozigotni genotip CT imao protektivni efekat, odnosno da je uticao na smanjenje rizika od karcinoma mokraćne bešike kod indijskih ispitanika (Jaiswal PK, 2012) (133).

Analiza asocijacije između -241 C/T SNP-a i mezotelioma u slovenačkoj populaciji nije pokazala statističku značajnost, ali iako se SNP nije pokazao kao predisponirajući faktor za pojavu ovog maligniteta, bio je udružen sa starošću pacijenata pri postavljanju dijagnoze (Hmeljak J, 2011) (134). Han i saradnici pokušali su da nađu vezu između ovog polimorfizma i ovarijalnog karcinoma i nekih kliničkih parametara kao što su starost pri dijagnozi i ishod bolesti, ali nisu uspjeli da ustanove bilo kakvu korelaciju (130). Slično tome ni u studiji Škodrić i saradnika, kod dece obolele od Vilmsovog tumora, nije ustanovljena bilo kakva asocijacija između SNP -241 i bolesti, niti kao faktora rizika niti kao prognostičkog faktora (132).

Zanimljivo je da je u ovom istraživanju, slično rezultatima Jaiswala i sar. (133), pokazan protektivni efekat varijantnog alela T, odnosno pokazano je da su heterozigoti CT imali dva puta manji rizik da obole od PA u odnosu na homozigote CC. Rezultati su bili na granici statističke značajnosti.

## 5.2.2. Polimorfizmi u TP53 genu

TP53 gen ima veoma važnu ulogu kontrolora ćelijskog ciklusa i glavnog "čuvara" našeg genoma. Ćelijska homeostaza se održava, između ostalog i funkcijom TP53 usmerenom na reparaciju nastalih DNK oštećenja ili indukciju apoptoze, kojom se u potpunosti eliminišu nastala oštećenja (ovom drugom mehanizmu ćelija pribegava u slučaju jako velikih oštećenja DNK molekula). Zato mutacije u genu TP53 mogu da dovedu do abnormalne ćelijske proliferacije i razvoja tumora.

Gubitak funkcije TP53 gena prisutan je u više od polovine humanih kancera, što ukazuje na nemevljivu ulogu ovog gena u kancerogenezi. Mutacije ovog gena su nađene u skoro svim tipovima kancera, a njihova učestalost varira među različitim tipovima kancera.

Polimorfizmi u TP53 genu znatno su ređe bili predmet istraživanja u odnosu na mutacije, ali poslednjih godina, zahvaljujući sprovedenim studijama, dobijeno je dosta podataka i o ulozi polimorfizama kao modulatorima različitih oboljenja.

### 5.2.2.1. Polimorfizam Pro47Ser u TP53 genu

Ovaj polimorfizam TP53 gena je izuzetno redak, odnosno Ser47 varijanta je zastupljena sa učestalošću od 5% u populacijama Afričkog porekla, dok je u populaciji Kavkazijanaca 0%. Pretpostavlja se da ovaj polimorfizam smanjuje transaktivaciju proapoptotskih ciljnih gena, što bi potencijalno povećalo rizik za nastanak kancera (Feng i sar., 2006) (85), ali samo pod specifičnim uslovima (Olivier i sar. (2010)(135). Nema mnogo podataka u literaturi u uticaja ovog polimorfizma na razvoj kancera. Jedino je studija Almeida L.O. i sar. (2009) pokazala asocijaciju Ser47 alela sa razvojem ekstra-aksijalnih tumora mozga (136). Sameer i sar. (2010) nisu pronašli asocijaciju ovog polimorfizma sa razvojem kolorektalnog kancera u populaciji iz Kašmira (137), kao ni Pinto i sar. (2008.) koji su ispitivali vezu između ovog polimorfizma i razvoja glioma u Brazilskoj populaciji (138).

Rezultati ove analize su pokazali potpuno odsustvo Ser47 varijante u kontrolnoj grupi, dok su u grupi pacijenata sa PA nađena dva heterozigota. Izostala

je asocijacija ovog polimorfizma sa rizikom za nastanak PA, ali postoji statistički značajna veza između prisustva Ser47 varijante i većih dimenzija tumora.

#### **5.2.2.2. Polimorfizam PIN3 Ins u TP53 genu**

Drugi analizirani polimorfizam TP53 gena, je insercioni polimorfizam od 16bp u intronu 3 (TP53PIN3 Ins 16bp), sa alelima koji se označavaju kao A1 i A2, pri čemu je alel A2 sa prisutnom insercijom. Biološki efekti ovog polimorfizma nisu razjašnjeni, ali je poznato da polimorfizmi u intronima mogu da utiču na egzone, odnosno mogu da povećaju verovatnoću nastanka štetnog fenotipa (Malkinson, 1994) (139). Takođe, mutacije u intronskim sekvencama mogu da utiču na proces splajsinga i na regulaciju genske ekspresije i interakcije DNK i proteina (Avigad i sar., 1997) (140). Meta-analiza Hu i sar. (2010), kojom je bila obuhvaćena velika kohorta pacijenta obolelih od različitih tipova kancera iz 26 studija poreklom iz različitih zemalja i populacija, pokazala je povezanost ovog polimorfizma sa povećanim rizikom za nastanak kancera, što ga čini potencijalno relevantnim genetičkim markerom (141).

Costa i sar. su utvrdili da žene sa A2/A2 genotipom imaju povećan rizik za razvoj kancera dojke, kao i da je ovaj polimorfizam povezan sa pojavom metastaza u limfnim čvorovima (142). Studija urađena na populaciji Hrvatske utvrdila je povezanost ovog polimorfizma i sporadičnog kancera dojke kod žena (Bisof i sar., 2010) (143), kao i studija Faghani i sar. (2011) na populaciji Irana (144). Suprotno ovim rezultatima, Hrtska i sar. nisu uočili povezanost ovog polimorfizma i kancera dojke u češkoj populaciji. Međutim, oni su uočili povezanost sa većom incidencom metastaza limfnih čvorova (145). Sličan rezultat je dobijen i na tunižanskoj populaciji. Khaliq i sar. su ispitivali ovaj polimorfizam i njegovu povezanost sa kancerom dojke u 9 etničkih grupa Pakistana i pokazali da zaista postoje razlike u alelskim učestalostima. Odsustvo insercije 16bp bilo je uobičajeno za etničke grupe na severu, a najveća učestalost ove alelske varijante je među pripadnicima Hazara (146).

Loša prognoza kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća takođe je povezana sa ovim polimorfizmom (Boldrini i sar., 2008) (147). Zbog toga što postoji razlika u riziku za razvoj kancera pluća među različitim etničkim grupama Wu i sar. (2002) su ispitivali povezanost između pripadnosti određenoj etničkoj grupi i ovog polimorfizma sa rizikom za kancer pluća. Učestalosti genotipova i haplotipova su



varirali u zavisnosti od etničke grupe, ali u svim etničkim grupama je PIN3 Ins 16bp polimorfizam bio povezan sa povećanim rizikom za kancer pluća (148).

U ovom istraživanju nije pokazana asocijacija između PIN3 Ins 16bp polimorfizma TP53 gena i rizika za pojavu PA, kao što nije utvrđena ni povezanost genotipova sa kliničkim parametrima.

### **5.2.3. Polimorfizam u genu za MMP-9**

Matriksne metaloproteinaze (MMPs) predstavljaju grupu matriksdegradirajućih proteina koji igraju važnu ulogu u degradaciji i remodeliranju ekstraćelijskog matriksa i bazalne membrane, i tako ostvaruju uticaj na ćelijske deobe, njihovu migraciju i invazivnost, na angiogenezu i druge procese (149). Za neke polimorfizme je pokazano da imaju uticaja na gensku ekspresiju, aktivnost, stabilnost, različite protein-protein interakcije, i sigurno mogu da budu povezane sa tumorskim fenotipom i povećanim rizikom za njihov nastanak, ali isto tako i za nastanak drugih bolesti.

Povećan nivo MMP-9 kod obolelih od multiple skleroze dokazan je u cerebrospinalnoj tečnosti (150), a kod artritisa u sinovijalnoj tečnosti (151). Smatra se da bi povećan nivo MMP-9 u cerebrospinalnoj tečnosti mogao da bude marker kod pacijenata obolelih od malignog glioblastoma (152). MMP-9 aktivnost je povećana kod pacijenata sa laringealnim i orofaringealnim kancerom u poređenju sa kontrolnom grupom (153).

MMP-9 pokazuje povećanje ekspresije i kod pacijenata obolelih od karcinoma mokraćne bešike (154). Turner sa saradnicima je ustanovio da je ekspresija MMP-9 prisutna u nekim invazivnim i recidivirajućim adenomima hipofize i u većini karcinoma hipofize, kao i da je ekspresija MMP-9 u vezi sa agresivnim ponašanjem tumora. I dok mehanizmi pomoću kojih MMP-9 utiče na inicijalno i ponovno pojavljivanje tumora ostaju nerazjašnjeni, njihove opservacije ukazuju da bi potencijalne strategije u terapiji za neke tumore hipofize mogle dovesti do uvođenja sintetičkog MMP-9 inhibitora (155).

Opisani su brojni funkcionalni polimorfizmi u genima za različite matriksne metaloproteinaze, koji imaju uticaja između ostalog i na nivo ekspresije ovih enzima. Jedan od takvih polimorfizama je i SNP u promotoru matriksne metaloproteinaze 9, na poziciji -1562. Studijom na kineskoj populaciji, koja je obuhvatila 4124 pacijenta

obolelih od različitih tipova kancera i 4728 kontrola, ispitan je pomenuti polimorfizam u MMP-9 genu i njegova povezanost sa malignitetima, ali nije utvrđeno postojanje bilo kakve asocijacije (Zhang et al 2012) (156).

Prekomerna ekspresija MMP-9 je detektovana u 39,5% ispitivanih pacijenata sa oralnim skvamocelularnim karcinomom u studiji Napgal-a i Das-a 2003 (157). I jedna grčka studija jasno pokazuje vezu ovog polimorfizma sa skvamocelularnim karcinomom usne regije (Vairaktaris i sar., 2007) (158), dok je u studiji Tu-a i saradnika (2007) pokazano da ne postoji asocijacija ovog polimorfizma sa oralnim skvamocelularnim karcinomom, ali da postoje neke genotipske razlike među pacijentima zavisno kom starosnom dobu pripadaju (159).

Bez obzira na neosporan značaj MMP-9 kao pokazatelja patoloških procesa koji se događaju u organizmu, relativno je mali broj studija koje se bave polimorfizmima u ovom genu, a ovo je prvo istraživanje SNP -1562 u pleomorfnim adenomima pljuvačnih žlezda.

Rezultati koji su dobijeni u ovoj studiji pokazuju statistički značajnu razliku između grupe pacijenata sa PA u odnosu na kontrolnu grupu, u pogledu učestalosti i alela i genotipova, što znači da se ovaj polimorfizam može smatrati modulatorom rizika za razvoj PA u našoj populaciji.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

- Najveći broj pacijenata sa PA se nalazio u starosnoj grupi između 40 i 60 godina i tumor se značajno češće javlja kod osoba ženskog pola.
- Trajanje pleomorfnog adenoma se kretalo između 2 i 360 meseci, a u proseku je iznosilo 41 mesec.
- Između grupe pacijenata sa pleomorfnim adenomima i kontrolne grupe uočena je statistički značajna razlika u učestalosti homozigota za divlji tip alela i homozigota za varijantni tip u -31 G/C polimorfizmu gena za survivin. Alel C imao je protektivni efekat, odnosno homozigoti CC su imali 4 puta manju verovatnoću da obole od PA u odnosu na GG homozigote. Alel C je takođe bio povezan sa pojavom bolesti u starijoj dobi.
- Nije bilo razlike u distribuciji alela za promotorski polimorfizam na poziciji -241 C/T u genu za survivin, pa se on ne može smatrati faktorom rizika za nastanak ovog tumora, iako se dobijeni rezultati nalaze na samoj granici statističke značajnosti.
- Nije uočena statistički značajna razlika ni u distribuciji alela i genotipova između pacijenata i zdravih kontrola za polimorfizam Pro47Ser u TP53 genu što znači da ni ovaj polimorfizam nije modulator rizika za nastanak pleomorfnih adenoma u našoj populaciji. Međutim Ser varijanta je bila udružena sa većim dimenzijama tumora.
- Insercioni polimorfizam u TP53 genu, PIN3 Ins 16bp, nije pokazao statistički značajnu razliku učestalosti genotipova u dve analizirane grupe tako da se

ovaj polimorfizam ne može smatrati modulatorom rizika za nastanak pleomorfnog adenoma.

- Podaci dobijeni analizom učestalosti alela i genotipova pacijenata sa PA i njihovim poređenjem sa kontrolnom grupom zdravih individua pokazali su visoko značajnu asocijaciju promotorskog polimorfizma -1562C/T MMP- 9 gena sa rizikom oboljevanja od ovog tipa tumora. Nosioci varijantnog T alela imaju 4 puta veću verovatnoću da obole od pleomorfnog adenoma u odnosu na CC homozigote, pa se tako ovaj polimorfizam može smatrati faktorom susceptibilnosti za razvoj pleomorfnog adenoma u našoj populaciji.
- Ispitivani polimorfizmi uglavnom nisu pokazali asocijaciju sa kliničkim parametrima. Izuzetak je retka alelna varijanta SNP u TP53 genu koja je u heterozigotnom stanju nađena isključivo u tumorima preko 3 cm, kao i heterozigoti za survivin -31 polimorfizam koji su dominirali u starijoj grupi obolelih.

## 7. LITERATURA

1. Batsakis JG. Tumors of the head and neck: clinical and pathological considerations. 2nd. Baltimore, MD: Williams & Willkins; 1979. pp. 1-120.
2. Som PM, Curtin HD. Head and neck imaging. 3rd. Vol. 2. St. Louis, MO: Mosby; 1996. Pp. 877-912.
3. Ellis GL, Auclair PL. Tumors of the salivary glands. 3rd ed. Armed Forces Institute of Pathology: Washington; 1996.
4. Robbins SL. Pathologic basis of disease. Saunders. Philadelphia. 1997.
5. Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumors. Oral Diseases. 2002; 8(5):229-40.
6. Michael JM, Harri PA. Salivary Gland Neoplasms. www.e Medicine.com, Inc.
7. Philips C, Kapadia S. Newly recognized salivary gland tumors. Pathology international. 2004; 54(1):245-255.
8. Glaser A. Gescmwulste der Kopfspeichldusen. Veb-Georg Theime, Leipzig, 1979.
9. Aničić B, Dozić B. Tumori pljuvačnih žlezda - petogodišnja studija. 25. Congress of the International College for Maxillofacial Surgery. 27-30 October, Belgrade, Serbia, 2010.
10. Ozono S, Onozuka M, Sato K. Immunohistochemical localization of estradiol, progesterone and progesterone receptor in human salivary glands and salivary adenoid cystic carcinomas. Cell Struct Funct. 1992; 17(3):169-175.
11. Atanacković M. i saradnici. Patologija. Libri medicorum: udžbenici Medicinskog fakulteta u Beogradu. Beograd. 2003; 397-398.
12. Seifert G, Langrock I, Donath K. A pathological classification of pleomorphic adenoma of the salivary glands (author's transl). HNO 1976; 100:415-426.
13. Fabio Augusto Ito, Jacks Jorge, Pablo Agustin Vargas, Marcio Ajudarte Lopes. Histopathological findings of pleomorphic adenomas of the salivary glands. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2009; 14(2):E57-61.
14. Eberhard Stennert, MD; Orlando Guntinas-Lichius, MD; Jens Peter Klussmann, MD; Georg Arnold, MD. Histopathology of Pleomorphic Adenoma in the Parotid Gland: A Prospective Unselected Series of 100 Cases. Laryngoscope. 2001; 111:2195-2200.
15. Langdon J. The significance of the tumour capsule in pleomorphic adenoma. The changing face of conventional principles. In: McGurk M, Renehan A, eds. Controversies in the management of salivary gland disease. Oxford University. Press: Oxford, 2001; pp. 67-73.

16. Leverstein H, van der Wal JE, Tiwari RM, van der Wal I, Snow JB. Surgical management of 246 previously untreated pleomorphic adenomas of the parotid gland. *Br J Surg.* 1997; 84:399-403.
17. Gnepp DR. Malignant mixed tumors of the salivary glands: a review. *Pathol Annu.* 1993; 28:279-328.
18. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2001; 345(26):1890-1900.
19. C. Rene Leemans, Boudewijn J.M. Braakhuis & Ruud H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2011; 11:9-22.
20. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res.* 2008; 87(1):14-32.
21. Lingen MW, Pinto A, Mendes RA et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. *Oral Disease.* 2011; 17:7-22.
22. Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Rey JM, Garcia-Garcia A. V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2009; 35:707-713.
23. Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol.* 2006; 59: 445-453.
24. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003; 349:2042–2054.
25. Nagao T. Dedifferentiation and high-grade transformation in salivary gland carcinomas. *Head Neck Pathol.* 2013; 7 Suppl 1:S37-47.
26. Moskaluk CA. Adenoid cystic carcinoma: clinical and molecular features. *Head Neck Pathol.* 2013; 7(1):17-22.
27. Bell D, El-Naggar AK. Molecular heterogeneity in mucoepidermoid carcinoma: conceptual and practical implications. *Head Neck Pathol.* 2013; 7(1):23-27.
28. Antony J, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a comprehensive review of clinical, pathological and molecular data. *Head Neck Pathol.* 2012; 6(1):1-9.
29. Kandasamy J, Smith A, Diaz S, Rose B, O'Brien C. Heterogeneity of PLAG1 gene rearrangements in pleomorphic adenoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007; 177(1):1-5.
30. Voz ML, Agten NS, Van de Ven WJ, Kas K. PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. *Cancer Res.* 2000; 60(1):106-113.

31. Turnpenny PD, Ellard S. *Emerijevi Osnovi Medicinske Genetike*, 13. Izdanje, Data Status, Beograd, 2009.
32. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Biotechniques*. 2009; 46(3):229-231.
33. Wright AF. Genetic variation: Polymorphisms and mutations. In: Agro AF, Zheng Y, Tickle C, Jansson R, Cooper DN, Kehrer-Sawatzki H, Melino G, Delves P, Battista J, Levitan I, Hetherington AM, Bynum WF, Valpuesta JM, Harper D, editors, *Enciclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons Inc 2005. p. 1-10.
34. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995; 146:3-15.
35. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000;301:5-17.
36. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*. 2003;171:4672-4679.
  
37. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35: 495-516.
38. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281:1305-1308.
39. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*. 1995; 14:5579-5588.
40. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35: 495-516.
41. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(9):647-656.
42. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001; 29:684-688.
43. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997; 326(Pt 1):1-16.
44. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 1999; 13:239-252.
45. Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M, Diederich M. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 1010:1-8.
46. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100:57-70.

47. Reed JC. Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell*. 1997; 91(5):559-562.
48. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74(4):609-619.
49. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(6):401-410.
50. Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM, Altura RA. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene*. 2005; 24(12):1994-2007.
51. Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H, Ng SC: Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood*. 2000; 96:4002-4003.
52. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry*. 2001; 40(4):1117-1123.
53. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(6):401-410.
54. Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer*. 2005; 114(4):509-512.
55. Grabowski P, Kühnel T, Mühr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Höpfner M, Germer CT, Scherübl H. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2003; 88(1):115-119.
56. Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2000; 31(5):1080-1085.
57. Javle MM, Tan D, Yu J, LeVeae CM, Li F, Kuvshinoff BW, Gibbs JF. Nuclear survivin expression predicts poor outcome in cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2004; 51(60):1653-1657.
58. Lu B, Gonzalez A, Massion PP, Shyr Y, Shaktour B, Carbone DP, Hallahan DE. Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2004; 91(3):537-540.
59. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3 (1): 46–54.



60. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997; 3:917–921.
61. Altieri DC. The molecular basis and potential role of surviving in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med.* 2001; 7:542–547.
62. Andrić M, Nikolić N, Bošković M, Miličić B, Škodrić S, Basta Jovanović G, et al. Survivin gene promoter polymorphism-31G/C as a risk factor for keratocystic odontogenic tumor development. *Eur J Oral Sci.* 2012; 120:9-13.
63. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene.* 2003; 22(53):8581-8589.
64. Ruddon W. *Cancer Biology* by Raymond W. Ruddon. (2007, Paperback, Revised), Oxford University Press, Incorporated.
65. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Pétré A, Mounawar M, Plymoth A, de Fromental CC, Hainaut P. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther.* 2009; 16(1):1-12.
66. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 2007; 28(6):622-629.
67. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature.* 1986; 320(6057):84-85.
68. Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J.* 1984; 3(13):3257-3262.
69. Frebourg T, Kassel J, Lam KT, Gryka MA, Barbier N, Andersen TI, Borresen AL, Friend SH. Germ-line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients with high risk for cancer inactivate the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(14):6413-6417.
70. Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62:623-651.
71. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 8493-9497.
72. Moll UM, Concin N. P53 in human cancer – somatic and inherited mutations and mutation-independent mechanisms. In: Zambeti GP (ed). *The p53 Tumor Sppressor Pathway and Cancer*, Springer, New York, 2005, pp.115-154.

73. Brady CA, Attardi LD. P53 at a glance. *J Cell Sci.* 2010; 123(Pt 15):2527-2532.
74. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 2009; 137(3):413-431.
75. Geske FJ, Lieberman R, Strange R, Gerschenson LE. Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death Differ.* 2001; 8(2):182-191.
76. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993; 75(4):817-825.
77. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S et al. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1997; 1(1):3-11.
78. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.* 2002; 108(2):153-164.
79. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(22):7475-7484.
80. Malkin D, Jolly KW, Barbier N, Look AT, Friend SH, Gebhardt MC et al. Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. *N Engl J Med.* 1992; 326(20):1309-1315.
81. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science.* 1990; 250(4985):1233-1238.
82. Joerger AC, Ang HC, Fersht AR. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(41):15056-15061.
83. Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene.* 2006; 25(11):1602-1611.
84. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(2):95-107.
85. Feng L, Hollstein M, Xu Y. Ser46 phosphorylation regulates p53-dependent apoptosis and replicative senescence. *Cell Cycle.* 2006; 5(23):2812-2819.
86. Kurihara A, Nagoshi H, Yabuki M, Okuyama R, Obinata M, Ikawa S. Ser46 phosphorylation of p53 is not always sufficient to induce apoptosis: multiple mechanisms of regulation of p53-dependent apoptosis. *Genes Cells.* 2007; 12(7):853-861.
87. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(12):909-923.

88. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(1):a001008.
89. Mandal M, Mandal A, Das S, Chakraborti T, Sajal C. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biochem.* 2003; 252(1-2):305-329.
90. Vihinen P, Kahari V M (2002). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J cancer,* 99, 157-166.
91. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(2):197-250.
92. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004; 10(6):311-318.
93. Ricou B, Nicod L, Lacraz S, Welgus HG, Suter PM, Dayer JM. Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154(2 Pt 1):346-352.
94. Jackson C, Nguyen M, Arkell J, Sambrook P. Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibition in rheumatoid arthritis--targetting gelatinase A activation. *Inflamm Res.* 2001; 50(4):183-186.
95. Asahina M, Yoshiyama Y, Hattori T: Expression of matrix metalloproteinase-9 and urinary-type plasminogen activator in Alzheimer's disease brain. *Clin Neuropathol.* 2001; 20: 60-63.
96. Ho SL, Dogar GF, Wang J, Crean J, Wu QD, Oliver N, Weitz S, Murray A, Cleary PE, O'Brien C. Elevated aqueous humour tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol.* 2005; 89(2):169-173.
97. Nagase H. and Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21491-21494.
98. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(3):161-174.
99. Devarajan P, Johnston JJ, Ginsberg SS, Van Wart HE, Berliner N. Structure and expression of neutrophil gelatinase cDNA. Identity with type IV collagenase from HT1080 cells. *J Biol Chem.* 1992; 267(35):25228-25232.
100. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol.* 1999; 35(3):227-233.

101. Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem.* 1992; 267(7):4583-4591.
102. Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishima M. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172(11):1378-1382.
103. Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem.* 1991; 266(25):16485-16490.
104. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994; 94(6):2493-2503.
105. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell.* 2000; 103(3):481-490.
106. Schwingshackl A, Duszyk M, Brown N, Moqbel R. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF-alpha. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104(5):983-989.
107. Yao PM, Maitre B, Delacourt C, Buhler JM, Harf A, Lafuma C. Divergent regulation of 92-kDa gelatinase and TIMP-1 by HBECs in response to IL-1beta and TNF-alpha. *Am J Physiol.* 1997; 273(4 Pt 1):866-874.
108. Heljasvaara R, Nyberg P, Luostarinen J, Parikka M, Heikkilä P, Rehn M, Sorsa T, Salo T, Pihlajaniemi T. Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Exp Cell Res.* 2005; 307(2):292-304.
109. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix Metalloproteinase 9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; 28(1):12-24.
110. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1999; 99(14):1788-1794.

111. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2002; 37(6):375-536.
112. Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. *Hum Genet*. 1999; 105(5):418-423.
113. Iłzecka J, Stelmasiak Z, Dobosz B. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Neurochir Pol*. 2001; 35(6):1035-1043.
114. Lawson HH. Capsular penetration and perforation in pleomorphic adenoma of the parotid salivary gland. *Br J Surg* 1989; 76:594-596.
115. Henriksson G, Westrin KM, Carlsoo B, Silfversward C. Recurrent primary pleomorphic adenomas of salivary gland origin: intrasurgical rupture, histopathologic features, and pseudopodia. *Cancer* 1998; 82:617-620.
116. Von Glass W, Pesch HJ, Braun R, Krause J. Surgery of pleomorphic adenoma of the parotid gland (in German). *HNO* 1989; 37:426-431.
117. Natvig K, Soberg R. Relationship of intraoperative rupture of pleomorphic adenomas to recurrence: an 11-25 year follow-up study. *Head Neck* 1994; 16:213-217.
118. Touquet R, Mackenzie IJ, Carruth JA. Management of the parotid pleomorphic adenoma, the problem of exposing tumour tissue at operation: the logical pursuit of treatment policies. *Br J Oral Maxillofac. Surg*. 1990; 28:404-408.
119. Ryan B. M., O'Donovan N., Duffy M. J., Survivin: A new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews* 35(2009) 553-562.
120. Wagner M., Schmelz K., Dörken B., Tamm I., Epigenetic and genetic analysis of the survivin promoter in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* 32 (2008) 1054-1060.
121. Ambrosini G, Adida C, Altieri D.C. A novel antiapoptosis gene, survivin expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med*. 1997; 3:917-921.
122. Stenner M, Demgensky A, Molls C, Hardt A, Luers JC, Grosheva M, Huebbers CU, Klusmann JP. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in parotid gland cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012; 269:1225-32.
123. Bertazza L, Mocellin S, Marchet A, Pilati P, Gabrieli J, Scalerta R, Nitti D. Survivin gene levels in the peripheral blood of patients with gastric cancer

- independently predict survival. *J Transl Med.* 2009 Dec 22;7:111. doi: 10.1186/1479-5876-7-111.
124. Xu Y, Feng F, Ludewig G, Jones D. A mutation found in the promotor region of the human survivin gene is correlated to over expression of survivin in cancer cells. *DNA Cell Biol.* 2004; 23: 419-429.
125. Wang YH, Chiou HY, Lin CT, Hsieh HY, Wu CC, Hsu CD, Shen CH. Association between survivin gene promoter -31 C/G polymorphism and urothelial carcinoma risk in Taiwanese population. *Urology.* 2009; 73(3):670-674.
126. Jang JS, Kim KM, Kang KH, Choi JE, Lee WK, Kim CH, Kang YM, Kam S, Kim IS, Jun JE, Jung TH, Park JY. Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer. *Lung Cancer.* 2008; 60(1):31-39.
127. Yazdani N., Sayahpour F.A., Haghpanah V., Amiri P., Shahrabi- Farahani M., Moradi M., Mirmiran A., Khorsandi MT., Larijani B., Mostaan L.V., Amoli M.M., Survivin gene polymorphism association with papillary thyroid carcinoma. *Pathology Res and Practise* 208 (2012) 100-103
128. Upadhyay R., Khurana R., Kumar S., Chand Ghosel U., Mittal B., Role of Survivin Gene Promoter Polymorphism (-31G>C) in Susceptibility and Survival of Esophageal Cancer in Northern India. *Ann Surg Oncol* (2011) 18: 880-887 Cheng ZJ, Hu LH, Huang SJ. Correlation of -31G/C polymorphisms of survivin promoter to tumorigenesis of gastric carcinoma. *Ai Zheng.* 2008; 27(3):258-263.
129. Yang L, Zhu H, Zhou B, Gu H, Yan H, Tang N, Dong H, Sun Q, Cong R, Chen G, Wang B. The association between the survivin C-31G polymorphism and gastric cancer risk in a Chinese population. *Dig Dis Sci.* 2009; 54(5):1021-1028.
130. Han CH, Wei Q, Lu KK, Liu Z, Mills GB, Wang LE. Polymorphisms in the survivin promoter are associated with age of onset of ovarian cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2009; 2(4):289-299.
131. Borbely AA, Murvai M, Szarka K, Kónya J, Gergely L, Hernádi Z, Veress G. Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2007; 60(3): 303–306.
132. Radojević-Škodrić S, Basta-Jovanović G, Brasanac D, Nikolić N, Bogdanović L, Miličić B, et al. Survivin gene promoter -31 G/C polymorphism is associated with

- Wilms tumor susceptibility in Serbian children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2012; 34:310-314.
133. Jaiswal PK, Goel A, Mandhani A, Mittal RD. Functional polymorphisms in promoter survivin gene and its association with susceptibility to bladder cancer in North Indian cohort. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(5):5615-5621.
134. Hmeljak J, Erculj N, Dolzan V, Kern I, Cor A. BIRC5 promoter SNPs do not affect nuclear survivin expression and survival of malignant pleural mesothelioma patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137(11):1641-1651.
135. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(1):a001008.
136. Almeida LO, Custódio AC, Pinto GR, Santos MJ, Almeida JR, Clara CA, Rey JA, Casartelli C. Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors. *Genet Mol Res.* 2009; 8(1):8-18.
137. Sameer AS, Shah ZA, Syeed N, Banday MZ, Bashir SM, Bhat BA, Siddiqi MA. TP53 Pro47Ser and Arg72Pro polymorphisms and colorectal cancer predisposition in an ethnic Kashmiri population. *Genet Mol Res.* 2010; 9(2):651-660.
138. Pinto GR, Yoshioka FK, Silva RL, Clara CA, Santos MJ, Almeida JR, Burbano RR, Rey JA, Casartelli C. Prognostic value of TP53 Pro47Ser and Arg72Pro single nucleotide polymorphisms and the susceptibility to gliomas in individuals from Southeast Brazil. *Genet Mol Res.* 2008; 7(1):207-216.
139. Malkinson AM, You M. The intronic structure of cancer-related genes regulates susceptibility to cancer. *Mol Carcinog.* 1994; 10(2):61-65.
140. Avigad S, Barel D, Blau O, Malka A, Zoldan M, Mor C, et al. A novel germ line p53 mutation in intron 6 in diverse childhood malignancies. *Oncogene* 1997; 14:1541–1545.
141. Hu Z, Li X, Qu X, He Y, Ring BZ, Song E, Su L. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of TP53 contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis. *Carcinogenesis.* 2010; 31(4):643-647.

142. Costa S, Pinto DR, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, Schmitt F. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer*. 2008; 8:32.
143. Bisof V, Salihović MP, Narancić NS, Skarić-Jurić T, Jakić-Razumović J, Janićijević B, Turek S, Rudan P. TP53 gene polymorphisms and breast cancer in Croatian women: a pilot study. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2010; 31(5):539-544.
144. Faghani M, Ghasemi FM, Nikhbakht M, Salehi M. TP53 PIN3 polymorphism associated with breast cancer risk in Iranian women. *Indian Journal of CANCER*. 2011; 48(3):298-302.
145. Hrstka R, Beranek M, Klocova K, Nenutil R, Vojtesek B. Intronic polymorphisms in TP53 indicate lymph node metastasis in breast cancer. *Oncol Rep*. 2009; 22(5):1205-1211.
146. Khaliq S, Hameed A, Khaliq T, Ayub Q, Qamar R, Mohyuddin A, Mazhar K, Qasim-Mehdi S. P53 mutations, polymorphisms, and haplotypes in Pakistani ethnic groups and breast cancer patients. *Genet Test*. 2000; 4(1):23-29.
147. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Greco G, Mussi A, Donati V, Fontanini G. Effect of the p53 codon 72 and intron 3 polymorphisms on non-small cell lung cancer (NSCLC) prognosis. *Cancer Invest*. 2008; 26(2):168-172.
148. Wu X, Zhao H, Amos CI, Shete S, Maman N, Hong WK, Kadlubar FF, Spitz MR. p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94(9):681-690.
149. Cotignola J, Reva B, Mitra N, Ishill N, Chuai S, Patel A, Shah S, Vanderbeek G, Coit D, Busam K, Halpern A, Houghton A, Sander C, Berwick M, Orlow I. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. *BMC Med Genet*. 2007; 8:8-10.
150. Gijbels K, Masure S, Carton H, Opdenakker G. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmun*. 1992; 41:29-34.



151. Opdenakker G, Masure S, Grillet B, Van Damme J. Cytocine mediated regulation of human leucocyte gelatinases and role in arthritis. *Lymphokine Cytokine Res.* 1991; 10:317-324.
152. Wong ET, Alsop D, Lee D, Tam A, Barron L, Gautam S, Wu JK. Cerebrospinal fluid matrix metalloproteinase-9 increases during treatment of recurrent malignant gliomas. *Cerebrospinal Fluid Res.* Jan 2008.
153. Ranuncolo SM, Matos E, Loria D, Vilensky M, Rojo R, Bal de Kier Joffé E, Inés Puricelli L. Circulating 92-kilodalton matrix metalloproteinase (MMP-9) activity is enhanced in the euglobulin plasma fraction of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2002; 94(5):1483-1491.
154. Di Carlo A, Terracciano D, Mariano A, Macchia V. Urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) in human bladder tumors. *Oncol Rep.* 2006; 15(5):1321-1326.
155. Turner HE, Nagy Z, Esiri MM, Harris AL, Wass JAH. Role of matrix metalloproteinase-9 in pituitary tumor behavior. *J Clin Endocr Metab.* 2000; 85:2931-2935.
156. Zhang LF, Mi YY, Cao Q, Wang W, Qin C, Wei JF, Zhou YJ, Li YF, Tang M, Liu WM, Zhang W, Zou JG. Update analysis of studies on the MMP-9 -1562 C>T polymorphism and cancer risk. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(4):3435-3441.
157. Nagpal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol.* 2003; 39(3):213-221.
158. Vairaktaris E, Vassiliou S, Nkenke E, Serefoglou Z, Derka S, Tsigris C, Vylliotis A, Yapijakis C, Neukam FW, Patsouris E. A metalloproteinase-9 polymorphism which affects its expression is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2008; 34(4):450-455.
159. Tu HF, Wu CH, Kao SY, Liu CJ, Liu TY, Lui MT. Functional -1562 C-to-T polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) promoter is associated with the risk for oral squamous cell carcinoma in younger male areca users. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36(7):409-414.

## 8. BIOGRAFIJA

Dr Boban Aničić rođen je 18.06.1967. godine u Šapcu. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 1987. godine a diplomirao je 1993. godine sa prosečnom ocenom 8,55. Obavezni staž završio je 1994. godine na Stomatološkom fakultetu u Beogradu kada je položio stručni ispit za doktora stomatologije.

Poslediplomske studije je upisao 1993. godine, a zvanje magistra stomatoloških nauka stekao je juna 1997. godine sa temom: „Osnove modela za evaluaciju programa preventivne stomatološke zaštite“. Radni odnos na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu zasnovao je februara 1994. godine. 1995. godine izabran je u zvanje asistenta pripravnika na predmetu Socijalna medicina sa higijenom i epidemiologijom. 1997. godine izabran je u zvanje asistenta na predmetu Socijalna medicina sa higijenom i epidemiologijom. U oktobru 1997. godine izabran je u zvanje asistenta i na Medicinskom fakultetu Univerzitea u Beogradu na predmetu Socijalna medicina.

Od juna 2001. godine zaposlen je na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Specijalistički ispit je položio u martu 2003. godine i stekao zvanje specijaliste maksilofacijalne hirurgije.

Doktorske studije iz naučne oblasti Maksilofacijalna hirurgija, dr Boban Aničić upisao je školske 2007/2008. godine i položio sve ispite predviđene nastavnim planom i programom doktorskih studija. Nastavno-naučno veće Stomatološkog fakulteta je 2012. godine donelo odluku o usvajanju predloga teme doktorske disertacije.

Dr Boban Aničić objavio je 4 naučna rada od kojih su 2 u međunarodnim časopisima. Učestvovao je na domaćim i međunarodnim kongresima gde je prezentovao 17 naučnih radova u kojima je bio autor ili koautor.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Boban Aničić

број уписа 16/07

### Изјављујем

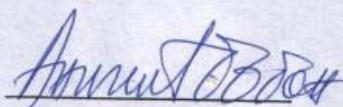
да је докторска дисертација под насловом

"Varijabilnost nasledne osnove i rizik od nastanka pleomorfnog adenoma pljuvačnih žlezda-analiza gena za survivin, TP53 i matriksnu metaloproteinazu 9"

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

Потпис докторанда

У Београду, 08.07.2014. godine.



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Boban Aničić

Број уписа 16/07

Студијски програм "Varijabilnost nasledne osnove i rizik od nastanka pleomorfnoг adenoma

Наслов рада pljuvačnih žlezda-analiza gena za survivin, TP53 i matriksnu metaloprotef

zu 9"

Ментор Prof. dr Vitomir Konstantinović

Потписани Boban Aničić


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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 08.07.2014. godine.



Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

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

"Varijabilnost nasledne osnove i rizik od nastanka pleomorfnoг adenoma pljuvačnih žlezda – analiza gena za survivin, TP53 i matriksnu metaloproteinazu 9"

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 08.07.2014. godine.

