

Univerzitet u Beogradu

Stomatološki fakultet

Marija Živković Sandić

**UTICAJ MUTACIJA RUNX2 I WNT10A
GENA NA BROJ I VELIČINU ZUBA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

University of Belgrade

Faculty of Dentistry

Marija Živković Sandić

**THE INFLUENCE OF RUNX2 AND
WNT10A GENE MUTATIONS ON TOOTH
NUMBER AND SIZE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

MENTORI

Prof dr Branislav Glišić

Klinika za ortopediju vilica, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof dr Branka Popović

Institutski predmeti, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE

Prof dr Ivana Šćepan, Klinika za ortopediju vilica, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof dr Marko Babić, Institutski predmeti, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof dr Predrag Vučinić, Klinika za ortopediju vilica, Odsek za stomatologiju, Medicinski fakultet Novi Sad

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se svojim mentorima, Prof dr Branislavu Glišiću i Prof Dr Branki Popović, na ukazanom poverenju, uloženom trudu, stručnoj i prijateljskoj podršci tokom izrade disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem prof dr Branki Popović koja me je sve vreme bodrila , uz osmeh usmeravala i motivisala da istrajem. Zahvalna sam joj što mi je genetiku učinila bliskom.

Veliku zahvalnost dugujem Prof dr Ivani Šćepan i Prof dr Marku Babiću za izdvojeno vreme, korisne sugestije i kreativne savete.

Zahvaljujem se prof Milanu Gajiću na posvećenom trudu i vremenu, i velikoj pomoći pri statističkoj obradi rezultata disertacije.

Posebno se zahvaljujem kolegama sa Klinike za ortopediju vilica, kao i kolegama iz Laboratorije za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu, na uloženom trudu i prijateljskoj pomoći.

Najveće hvala mojim roditeljima i mom Srdjanu, za bezrezervnu ljubav i veru u mene svih ovih godina.

UTICAJ MUTACIJA RUNX2 I WNT10A GENA NA BROJ I VELIČINU ZUBA

Hipodoncija-urođeni nedostatak zuba, predstavlja jednu od najčešćih razvojnih anomalija kod ljudi, i može biti nesindromska i sindromska. Do razvoja hipodoncije može doći usled izmena u genima uključenim u morfogenezu zuba, a čiji produkti su signalni i transkripcioni faktori, odgovorni za vremenski programiranu ekspresiju gena u fazama pupoljka, kape i zvona. Iz palete gena uključenih u odontogenezu, zbog svog ključnog značaja izdvaja se WNT10A gen (ekspimiran u dentalnom epitelu), i RUNX2 gen (ekspimiran u mezenhimu). Mutacije gena povezanih sa odontogenezom mogu dovesti do izmena u morfologiji, broju i strukturi zuba.

Ciljevi ove studije su bili da se ispita zastupljenost potencijalnih mutacija u RUNX2 i WNT10A genima i utvrdi njihov način nasledjivanja kod izolovanih (nesindromskih) formi hipodoncije. Drugi deo istraživanja odnosio se na upoređivanje veličine zuba pacijenata sa urođenim nedostatkom zuba i zdravih pacijenata kako bi se utvrdilo da li je hipodoncija/oligodoncija povezana sa eventualnim anomalijama veličine zuba .

Mutacioni status RUNX2 i WNT10A gena, određen je kod 24 porodice (72 ispitanika), pri čemu je kod 29 osoba, klinički potvrđena hipodoncija. Merenje meziodistalnih širina zuba je urađeno kod 25 pacijenata sa urođenim nedostatkom zuba i 25 pacijenata kontrolne grupe. Prisustvo mutacija potvrđeno je primenom tehnike direktnog sekvenciranja, dok je određivanje meziodistalnih širina zuba urađeno primenom 3D skenera i merenjima na digitalnim modelima u kompjuterskom programu.

Mutaciona analiza WNT10A gena, pokazala je prisustvo 2 nukleotidne izmene u regionu egzona 2 (rs10180544, rs141074983) i 3 izmene u egzonu 3 (rs121908120, rs77583146, rs146902156). Mutacionom analizom RUNX2 gena utvrđeno je prisustvo 4 nukleotidne izmene u egzonu 3 (rs6921145, COSM1658842, rs759395776, rs768156797) i jedna nukleotidna izmena u regionu egzona 4 (34 insC). Mutacije u WNT10A genu bile su prisutne kod 52% pacijenata u uzorku, u RUNX2 genu kod 59%,

u oba gena kod 35%, dok kod 24% pacijenta nije bila prisutna ni jedna mutacija. Rezultati kliničkog dela istraživanja su pokazali da su svi zubi kod pacijenata sa urođenim nedostatkom zuba bili manjih meziodistalnih dimenzija u odnosu na zdrave pacijente. Razlika u veličini je bila statistički značajna kod svih zuba, osim kod gornjih očnjaka. U ispitivanom uzorku zubi koji su najčešće urođeno nedostajali bili su gornji lateralni sekutići i donji drugi premolari.

Analizirane mutacije u funkcionalno važnim regionima WNT10A i RUNX2 gena mogu imati važnu ulogu u razvoju urođenog nedostatka zuba (pre svega lateralnih sekutića i drugih premolara) i smanjenju veličine zuba kod nesindromskih formi hipodoncije/oligodoncije.

Ključne reči: odontogeneza, geni, RUNX2, WNT10A, hipodoncija, oligodoncija, veličina zuba

Naučna oblast: stomatologija

Uža naučna oblast: ortopedija vilica

UDK: 575.224:616.314-007(043.3)

THE INFLUENCE OF RUNX2 AND WNT10A GENE MUTATIONS ON TOOTH NUMBER AND SIZE

Hypodontia (tooth agenesis) is one of the most common dental anomalies in humans that occurs either in non-syndromic forms or as a part of various syndroms. Hypodontia can be a result of nucleotide substitutions in genes that are involved in tooth morphogenesis, whose products are signal molecules and transcription factors that control gene expression in different phases of tooth morphogenesis (bud, cap and bell stage). Among many genes, WNT10A (with its expression in dental epithelial tissue) and RUNX2 gene (with its expression in mesenchymal tissue) have been singled out due to their key role in odontogenesis. Mutations of genes involved in odontogenesis can lead to changes in tooth morphology, structure and the number of teeth.

The aim of this study was to examine the presence of potential mutations in RUNX2 and WNT10A genes, and to determine their inheritance path in patients with isolated (non-syndromic) forms of tooth agenesis. The second part of the investigation was aimed to compare tooth dimensions in hypodontia patients and healthy controls, in order to determine whether hypodontia / oligodontia is related to potential tooth size anomalies.

Mutational status for RUNX2 and WNT10A genes was determined for 24 families. The sample included 72 subjects, 29 of which had clinically confirmed tooth agenesis. Mesiodistal tooth width was measured in 25 hypodontia patients and 25 healthy controls. Genetic mutations presence was confirmed by direct sequencing. Mesiodistal tooth width was measured on digitized study models using a computer software.

Mutational analysis of WNT10A gene revealed the presence of two nucleotide substitutions in the exon 2 region (rs10180544, rs141074983) and three nucleotide substitutions in exon 3 (rs121908120, rs77583146, rs146902156). Mutational analysis of RUNX2 gene revealed four nucleotide substitutions in exon 3 (rs6921145, COSM1658842, rs759395776, rs768156797) and one in exon 4 (34 insC). Mutations in WNT10A gene were present in 52% of subjects, mutations in RUNX2 gene in 59% of subjects, mutations in both genes 35% of subjects, and no mutations were found in 24% of the sample. Results of the clinical part of the study showed mesiodistal tooth

dimensions were smaller in patients with tooth agenesis than in healthy controls. The difference in size was statistically significant for all teeth, except for upper canines. Teeth that were most commonly congenitally missing within the investigated sample were upper lateral incisors and lower second premolars.

Analyzed mutations in functionally important regions of WNT10A and RUNX2 genes could have an important role in the etiology of non-syndromic tooth agenesis (especially for upper lateral incisors and lower second premolars agenesis).

Keywords: odontogenesis, genes, RUNX2, WNT10A, hypodontia, oligodontia, tooth size

SADRŽAJ

I UVOD	1
1.1.HIPODONCIJA KAO RAZVOJNA ANOMALIJA ZUBA	3
1.1.1.Razvoj zuba	3
1.1.2.Teorije o zubnoj agenezi.....	5
1.2.ETIOLOGIJA HIPODONCIJE.....	7
1.3.DIJAGNOZA I PREVALENCA HIPODONCIJE	9
1.3.1.Dijagnoza.....	9
1.3.2.Prevalenca.....	10
1.4.POVEZANOST ANOMALIJA ZUBA SA HIPODONCIJOM	13
1.5.KLINIČKE IMPLIKACIJE I TERAPIJSKE METODE KOD OSOBA SA HIPODONCIJOM.....	15
1.6. GENSKA OSNOVA HIPODONCIJE.....	18
1.6.1.Uloga ključnih gena u hipodonciji.....	22
1.6.2.Uloga WNT10A gena u morfogenezi zuba	23
1.6.3.Uloga RUNX gena u morfogenezi zuba.....	24
II CILJEVI ISTRAŽIVANJA	28
III MATERIJAL I METODE	30
3.1.MATERIJAL I METODE ZA KLINIČKA ISTRAŽIVANJA	31
3.1.1.Statističke metode.....	34
3.2.MATERIJAL I METODE ZA MOLEKULARNO GENETIČKA ISTRAŽIVANJA.....	34
3.2.1.Izolovanje genomske DNK iz brisa bukalne sluzokože	35
3.2.1.1.Procedura izolacije DNK iz brisa oralne sluzokože.....	36
3.2.2.PCR – lančana reakcija polimerizacije	36
3.2.3.Metod sekvenciranja.....	39

3.2.3.1.Priprema uzoraka za reakciju sekvenciranja	40
3.2.3.2.Priprema reakcione smese za sekvenciranje	41
3.2.3.3.Prečišćavanje PCR produkata reakcije sekvenciranja.....	42
3.2.3.4.Kapilarna elektroforeza produkata reakcije sekvenciranja na automatskom sekvenatoru	43
3.2.3.5.Analiza sekvenci dobijenih na automatskom sekvenatoru	43
IV REZULTATI	44
4.1.REZULTATI KLINIČKIH ISTRAŽIVANJA.....	45
4.2.REZULTATI MOLEKULARNO GENETIČKIH ISTRAŽIVANJA	56
4.2.1.Rezultati mutacionih analiza RUNX2 i WNT10A gena.....	56
4.2.2. Rodoslovna stabla porodica sa hipodoncijom	64
4.2.3. Rezultati mutacionih analiza WNT10A i RUNX2 gena.....	88
4.3. KORELACIJA HIPODONCIJE I MUTACIJA WNT10A I RUNX2 GENA.....	96
V DISKUSIJA	98
5.1. DISKUSIJA KLINIČKIH ISTRAŽIVANJA	99
5.2. DISKUSIJA MOLEKULARNO-GENETIČKIH ISTRAŽIVANJA.....	104
VI ZAKLJUČAK	115
VII LITERATURA	118

I
UVOD

Jedna od najčešćih razvojnih anomalija kod ljudi je hipodoncija, koja može biti izolovana (nesindromska) i sindromska. Nesindromska hipodoncija podrazumeva nedostatak jednog ili dva zuba (oko 81% slučajeva), tri do pet zuba (oko 14%) ili šest i više zuba (oko 3%) (Khalaf i sar. 2014), dok sindromsku hipodonciju karakteriše značajna genotipska i fenotipska varijabilnost.

Hipodoncija je mnogo češće prisutna u stalnoj nego u mlečnoj denticiji. Podaci iz literature ukazuju da prevalenca zubne ageneze u stalnoj denticiji varira od 2.6% do 11.3%, isključujući treće molare (Larmour 2005) . Uočeno je da je hipodoncija različito zastupljena kod pripadnika različitih rasa, a pojedina istraživanja ukazuju i na razlike u zastupljenosti medju polovima.

Hipodoncija je vrlo često povezana sa nekim drugim razvojnim anomalijama, kao što su rascep usne i/ili nepca, mikrodoncija, impakcija, zakasnelo formiranje i nicanje drugih zuba, teskoba, transpozicija očnjaka i prvog premolara, hipoplazija gledji, taurodontizam i poremećaj kraniofacijalnog rasta (Brook 1984, Thesleff 2006, Nasman i sar. 1997, Pedersen i sar. 2012, Grahnen 1956, Schalk-van der Weide 1992, Pirinen i Thesleff 1995).

1.1. HIPODONCIJA KAO RAZVOJNA ANOMALIJA ZUBA

Hipodoncija je termin koji se najčešće koristi kada se opisuje pojava urođenog nedostatka zuba. Međutim, u literaturi se mogu naći i mnogi drugi izrazi koji se također odnose na pojavu urođeno smanjenog broja zuba u vilici, kao što su: oligodoncija, anodoncija, aplazija zuba, urođeni nedostatak zuba, zubna ageneza itd.

Termin hipodoncija "u užem smislu" koristi se kada nedostaje jedan do nekoliko zuba, dok se termin oligodoncija koristi kada nedostaje veliki broj zuba. Anodoncija uglavnom podrazumeva ekstremne slučajeve potpunog nedostatka denticije u vilicama. Ipak, za opis nedostatka određenih zuba koriste se i precizniji termini koji jasnije definišu ovu anomaliju. Tako se *hipodoncija* označava kao nedostatak od 1 do 6 zuba (isključujući treće molare). *Oligodoncija* je termin koji ukazuje da u denticiji nedostaje više od 6 zuba (isključujući treće molare), dok se *anodoncija* vezuje za slučajeve kompletnog odsustva svih zuba u vilicama (Arte i Pirinen 2004).

1.1.1. Razvoj zuba

Izraz odontogeneza inicijalno je bio korišćen da opiše događaje i procese u razvoju zuba koji su vezani za poreklo i početak formiranja zuba. Kasnije je u svom eksperimentalnom istraživanju odontogeneze, autor Ten Cate proširio ovu definiciju i na razvoj, odnosno i na poreklo i početak formiranja potpornih zubnih tkiva cementa, periodontalnog ligamenta i alveolarne kosti. Značajnija eksperimentalna istraživanja procesa odontogeneze započela su pre oko 60 godina. Do tada, sva saznanja o rastu i razvoju zuba uglavnom su podrazumevala samo deskriptivnu histologiju zuba (Ten Cate 1995).

Zubi se, kao i svi epitelni derivati, formiraju putem niza induktivnih signala između epitela i mezenhima nervnog grebena. U tom kaskadnom razvoju, svaki sloj tkiva utiče na susedni dovodeći do stvaranja visoko specijalizovanih zubnih struktura kao što su: sekutići, očnjaci, premolari i molari, pri čemu se svaka od ovih grupa zuba razvija od različitih delova oralnog epitela. Tako različite vrste zuba mogu nastati od ektoderma i endoderma, ili samo od ektoderma (Smith 2003, Soukup 2008).

Kod čoveka razvoj zuba započinje u 6. nedelji prenatalnog života kada se formiraju 52 zuba raspoređena u 2 generacije ili denticije: 20 u mlečnoj i 32 u stalnoj. Razvoj svih zuba prolazi kroz iste stadijume razvića - pupoljak, kapa i zvono, kao i formiranje korena zuba. Zubi se razvijaju iz epitela usne duplje koji je ektodermalnog porekla i ektomezenhima koji se nalazi ispod njega, a sastoji se od ćelija koje su tu dospele migracijom iz nervnog grebena. Zubi se razvijaju u medjusobnoj interakciji pomenutih tkiva, diferencijacijom ćelija pod uticajem više talasa recipročne indukcije, formirajući najpre čvrsta zubna tkiva, a zatim i strukture potpornih tkiva. Proces razvitka zuba je tipičan primer epitelno mezenhimne interakcije (Nikolić 2007).

U šestoj nedelji razvoja ćelije bazalnog sloja oralnog epitela proliferišu i formiraju epitelnu traku oblika potkovice koja se zove osnovna zubna gredica (*lamina dentalis*). U 8. nedelji embrionalnog razvoja dolazi do pojave zadebljanja na unutrašnjoj strani zubne gredice, koji predstavljaju začetke mlečnih zuba (stadijum pupoljka). Ispod bazalnog dela pupoljka dolazi do kondenzovanja okolnog mezenhima. Ubrzo se sa prednje strane zubne gredice odvaja pomoćna zubna gredica od koje će se razviti pupoljci stalnih zuba. Stalni zubi koji nemaju prethodnike u mlečnoj denticiji razvijaju se iz osnovne zubne gredice, tako da ona ostaje aktivna sve do oko 15. godine života.

U 10. Nedelji intrauterinog razvoja bazalna strana pupoljka zuba se uvlači i on prelazi u stadijum kape. U pupoljku se diferenciraju ćelije od kojih će kasnije nastati gledj zuba, i koje se označavaju kao gledjni organ. Ćelije na spoljašnjoj strani gledjnog organa čine spoljašnji gledjni epitel, dok ćelije na njegovoj unutrašnjoj strani čine unutrašnji gledjni epitel. U stadijumu kape, u centralnom delu unutrašnjeg gledjnog epitela nalazi se gledjni čvor, privremena struktura koja se smatra organizacionim centrom sa zadatkom da usmerava diferencijaciju u najranijim stadijumima razvića zuba (Nikolić 2007).

Gledjni čvor je gusto upakovana grupa ćelija centralnog (najkonkavnijeg) dela unutrašnjeg gledjnog epitela. Ćelije gledjnog čvora eksprimiraju veliki broj signalnih molekula (SHH, FGF, BMP, WNT), protein ćelijskog ciklusa-p21 i transkripcioni factor-MSX2 (Lačković i sar. 2012).

U 14. nedelji razvoja, daljom morfogenezom i diferencijacijom, gledjni organ prelazi u stadijum zvona. Periferne mezenhimne ćelije papile zuba diferencijuju se u odontoblaste koje stvaraju i na svom apikalnom polu luče organski matriks dentina-predentin.

Predentin indukuje stvaranje ameloblasta, koji nakon formiranja nekoliko slojeva dentina počinju da sekretuju gledj. Od momenta kada se stvori omotač od čvrstih tkiva oko papile zuba, ona postaje zubna pulpa. Taloženjem slojeva gledji i dentina formira se krunica zuba, a čim ona bude završena, ameloblasti nestaju apoptozom. Nakon toga, počinje poslednja faza razvoja zuba, a to je stvaranje korena zuba.

1.1.2. Teorije o zubnoj agenezi

Poremećaji u razvoju zuba su vrlo zanimljiva problematika za različite istraživače. Ova problematika je uvek interesantna i intrigantna za proučavanje, ali i pored brojnih pokušaja da se oni objasne, još uvek postoje nedoumice i nedorečenosti.

Butlerova teorija (Butler 1939) je bila jedna od prvih i pokušala je da objasni zašto razvoj pojedinih zuba izostaje češće od drugih. Naime, prema ovoj hipotezi denticija sisara može biti podeljena u 3 različita morfološka polja koja odgovaraju sekutićima, očnjacima i premolarima/molarima. U svakom od ovih polja postoji po jedan “ključni” zub koji se smatra stabilnim, dok zubi postavljeni bočno od njega mogu postati progresivno nestabilni. U molarno/premolarnom kvadrantu “ključnim” zubom se smatra prvi molar. Na distalnom kraju kvadranta nalaze se drugi i treći molar, dok su u mezijalnom delu kvadranta prvi i drugi premolar. Prema Butleru, prvi premolar i treći molar bi zbog toga trebalo da budu najvarijabilniji i po veličini i po obliku. Činjenica je takodje da klinička epidemiologija ovo objašnjenje podržava za treći molar, ali ne i za prvi premolar. Ovu teoriju potvrđuje i saznanje da su najraniji sisari imali 4 premolara, a da su viši primati, uključujući i čoveka evolucijom izgubili dva premolara. Izgubljeni zubi bi trebalo da budu najudaljeniji od “ključnog” zuba, i u evolucionom smislu smatraju se nestabilnim (Bailit 1975).

Clayton je na uzorku od 3557 ispitanika takođe primetio da u zubnom nizu poslednji ili najposteriojniji zubi (sekutići, premolari, molari) najčešće nedostaju, i smatrao je da su ti poslednji zubi “rudimentirani” i bez nekog posebnog značaja za modernog čoveka (Clayton 1956).

Nasuprot evolucionom modelu, Svinhufvud i sar. su selektivnost zubne ageneze objasnili anatomskim modelom. Preciznije, po ovim autorima, određeni regioni su za vreme razvoja zuba (npr. mesta fuzija kod embriona) podložniji pojavi ageneze. Po njihovom mišljenju, zub koji najčešće nedostaje i koji je najvarijabilniji po veličini (lateralni gornji sekutić) obično se razvija na mestu fuzije lateralnog maksilarnog i medijalnog nazalnog procesusa. U mandibuli, najčešće nedostaje drugi stalni premolar, koji se razvija u regiji distalnog kraja primarne dentalne lamine. Treće mesto gde se najčešće javlja ageneza je mesto gde se razvijaju centralni mandibularni sekutići, odnosno mesto spajanja mandibularnih procesusa koji formiraju srednju liniju buduće mandibule (Svinhufvud i sar. 1988).

U cilju rasvetljavanja prirode zubne ageneze, Kjaer je u svojim istraživanjima tvrdio da se ova razvojna anomalija može povezati sa razvitkom inervacije maksile (regija sekutića, regija očnjaka/premolara i molara). Navedena tvrdnja objašnjena je činjenicom da su najosetljivije regije za izostanak razvoja zuba mesta gde se inervacija razvija poslednja (Kjaer 1997).

Uzimajući u obzir genetsku osnovu, Grahnen je još 1956.godine posmatrao zubnu agenezu kao naslednu anomaliju, koja se nasledjuje autozomno dominantno, sa nekompletnom penetrantnošću i varijabilnom ekspresivnošću gena. Njegova studija je pokazala da je penetrantnost hipodoncije (procenat osoba sa određenom kombinacijom gena koje pokazuju određenu karakteristiku) bila 86%, dok je varijabilna fenotipska ekspresivnost, podrazumevala da nasledjeni zubi ukoliko ne nedostaju mogu biti modifikovanog oblika i veličine (Grahnen 1956).

U ranijim istraživanjima, studije blizanaca su korišćene da se pokaže važnost genetske komponente u kontroli veličine (Lundstrom 1948, Osborne i sar. 1958) i oblika zuba (Ludwig 1957, Lundstrom 1963). Potvrđeno je da postoje slučajevi gde je

izražena konkordantnost (nasledljivost) kod monozigotnih blizanaca kada je u pitanju urođeni nedostatak zuba, ali i oni gde postoji i značajna varijabilnost u ekspresivnosti. U jednom istraživanju, na uzorku od 165 blizanaca (99 monozigotnih i 66 dizigotnih), 14 parova blizanaca imalo je hipodonciju. Pokazano je da monozigotni blizanci pokazuju višu konkordantnost u odnosu na dizigotne (8 od 9 parova monozigotnih blizanaca sa hipodoncijom pokazalo je konkordantnost), dok kod dizigotnih nije pronađena konkordantnost ni kod jednog od 5 parova sa hipodoncijom (Markovic 1982).

Brojne populacione studije su pokazale da urođeni nedostatak zuba može postojati izolovano ili kao deo nekog sindroma (Jorgenson 1980, Gorlin i sar. 1990). Izolovane forme nedostatka zuba mogu biti sporadične ili familijarne (Markovic 1982). Familijarni urođeni nedostatak zuba može biti rezultat defekta jednog dominantnog (Arte i sar. 2001, Goldenberg i sar. 2000), recesivnog (Pirinen i sar. 2001) ili X-vezanog gena (Erpenstein i Pfeiffer 1967) sa značajnim varijacijama u penetrantnosti i ekspresivnosti. Međutim, hipodoncija trećih molara se ne može objasniti jednostavnim modelom autozomno dominantnog nasledjivanja (Grahnen 1956), pa se u literaturi često pominje i model poligenog nasledjivanja (Chosack i sar. 1975).

1.2. ETIOLOGIJA HIPODONCIJE

Hipodoncija ima multifaktorsku etiologiju, koja podrazumeva uticaj genetskih i sredinskih faktora. Brojna istraživanja pokazala su značajan genetski uticaj, i veću zastupljenost hipodoncije medju srodnicima (Brook 1984, Thesleff 2006, Grahnen 1956). Naime, po Brook-u, u većini slučajeva, hipodoncija se nasledjuje poligeno, pri čemu rizik nasledjivanja medju srodnicima zavisi od kombinacije brojnih genetskih faktora i faktora sredine (Brook 1984).

Napretkom molekularne biologije i genetike, do danas je otkriveno preko 300 gena povezanih sa morfogeneom zuba i ćelijskom diferencijacijom (Thesleff 2006).

Takodje, brojni faktori sredine mogu uticati na zaustavljanje formiranja zubne klice. U literaturi se kao najčešći uzroci navode traume, frakture, hirurške intervencije na vilicama i ekstrakcija mlečnog zuba (Grahnen 1956, Schalk- van der Weide 1992).

U prilog hipotezi o važnosti različitih sredinskih faktora u razvoju hipodoncije, Yamaguchi i saradnici pronalaze značajnu povezanost između hipodoncije i prisustva nekog tipa alergije (Yamaguchi i sar. 2008). Takodje, Chalothorn i saradnici pronalaze da žene sa dijagnozom epitelnog karcinoma jajnika imaju 8.1 put veću šansu postojanja hipodoncije u odnosu na zdrave žene (Chalothorn i sar. 2008). Do istog zaključka došli su i Fekonja i saradnici, kod kojih je mogućnost postojanja hipodoncije kod žena sa ovarijalnim karcinomom bila 2.63 puta veća u odnosu na kontrolnu grupu (Fekonja i sar. 2014).

Faktori koji takodje mogu uticati na izostanak formiranja zuba su hemoterapija i radioterapija u ranoj životnoj dobi. Ovaj efekat značajno zavisi od godina kada je terapija primana, kao i od vrste hemoterapije (Nasman i sar. 1997, Pedersen i sar. 2012). Takođe, kod ove dece je primećena i mikrodoncija, zaustavljen razvoj korena, prevremeno apikalno zatvaranje i hipoplazija gledji. Efekti ove terapije na razvoj zuba su ozbiljniji kada je hemoterapija kombinovana sa radioterapijom, u odnosu na efekte kod pacijenata koji su primali samo hemoterapiju (Nasman i sar. 1997).

Pušenje u trudnoći, takodje, može ostaviti posledice na razvoj zuba ploda. Heikkinen (Heikkinen i sar.1994) je u svom istraživanju koje je obuhvatilo 2159 majki crne i bele rase, zaključio da su meziodistalne širine stalnih prvih molara i sekutića, kod dece čije su majke bile pušači u trudnoći smanjene kao i da je posebno osetljiv period od 24. do 28. nedelje intrauterinog razvoja.

Često, hipodoncija može biti ispoljena kod osoba sa određenim sindromima. Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM) sadrži listu sindroma, koji uključuju hipodonciju kao deo fenotipskog spektra anomalija, i za većinu od njih definisani su kandidat geni. (OMIM 2007). Neki od najčešćih sindroma su: *rascep usne i nepca*, *ektodermalna displazija*, *Pierre-Robinov sindrom*, *Down-ov sindrom*.

Hipodoncija je veoma česta kod pacijenata sa *rascepima usne i nepca*. Prevalenca zavisi od populacije, i povećava se sa težinom kliničke slike rascepa (Ranta 1986). Tako, u studiji Shapira i saradnika na uzorku od 278 dece sa rascepom usne, nepca, ili kombinacije ova dva defekta, prevalenca hipodoncije iznosi 77%. Takođe, u istoj studiji, hipodoncija je bila češća na levoj strani (i u gornjoj i u donjoj vilici) kao i sami rascepi (Shapira i sar. 2000). Slične rezultate navode Larmour i saradnici, pri čemu najčešće nedostaje lateralni sekutić na strani rascepa, i u mlečnoj i u stalnoj denticiji, dok kontralateralni ili nedostaje ili je manje veličine (Larmour i sar. 2005).

Ektodermalna displazija se može nasledjivati X-vezano ili autozomno dominantno, sa varijabilnom genskom penetracijom i manifestacijama. Ovaj poremećaj pogađa ektodermalna tkiva, a najčešće manifestacije su hipotrihoza (retka kosa), hipodoncija i hipohidroza (nedostatak znojnih žlezda). Kod najozbiljnijih slučajeva može se javiti kompletan nedostatak denticije (anodoncija) (Larmour i sar. 2005). Kod hipohidrotične ektodermalne displazije, otkriveno je da su 4 gena (EDA, EDAR, EDARADD, WNT10A) odgovorna za 90% slučajeva ovog poremećaja (Cluzeau i sar. 2011).

Kod *Pierre-Robinovog sindrom*, koga karakterišu rascep nepca, mikrognatija i glosoptoza, zabeležena je prevalenca hipodoncije od 50%. Hipodoncija u donjoj vilici kod ovog sindroma je češća nego kod pacijenata sa rascepom nepca (Ranta 1986).

Pacijenti sa *Down-ovim Sindromom* imaju visoku učestalost hipodoncije koja varira od 38.6% (Mestrovic i sar. 1998) do 63% (Kumasaka i sar. 1997). Zubi koji najčešće nedostaju su gornji lateralni sekutići (Mestrovic i sar. 1998) ili donji lateralni sekutići (Kumasaka i sar. 1997).

1.3.DIJAGNOZA I PREVALENCA HIPODONCIJE

1.3.1.Dijagnoza

Smatra se da zub urođeno nedostaje ako nije iznikao u usnoj duplji i nije vidljiv na radiogramima. Uzimajući u obzir normalan razvojni proces, do treće godine života

izniknu svi mlečni zubi, a svi stalni zubi osim trećih molara da se nađu u vilicama do 12 i 14.godine. U slučaju da zub nije vidljiv u usnoj šupljini, preporučuje se da se obavezno ortopantomogramskim snimkom potvrdi njegovo odsustvo.

Na rođenju se svi mlečni zubi kao i zamenci prvih stalnih molara mogu se videti na ortopantomografskom snimku. Krunice prvog i drugog premolara i drugog molara započinju mineralizaciju blizu druge godine, a krunice svih stalnih zuba (osim trećih molara) započinju mineralizaciju do 6. godine. Formiranje trećih molara je vrlo varijabilno. Najčešće su vidljivi na radiogramu od 8 do 10.godine, ali se nekada dešava da se pojave i veoma kasno (14-16.god). Formiranje denticije traje više godina, a vreme mineralizacije može biti različito u zavisnosti od rase, pola, nasleđa ili je vezano za individualne karakteristike osobe. Posebno kod drugih premolara, može se uočiti kasna mineralizacija, a što često može dovesti do lažne dijagnoze hipodoncije na radiogramima. U cilju postavljanja pouzdane dijagnoze, hipodoncija u stalnoj denticiji, obično se postavlja posle 6.godine (ne uključujući treće molare), ili posle 10.godine, ukoliko se analiziraju i treći molari (Pirinen i Thesleff 1995).

1.3.2.Prevalenca

Hipodoncija je mnogo češća u stalnoj nego u mlečnoj denticiji. Zabeležena prevalenca hipodoncije u mlečnoj denticiji iznosi od 0.5% u Islandskoj populaciji do 2.4% u Japanskoj populaciji (Larmour 2005). U populaciji dece uzrasta 3 do 6 godina u Hrvatskoj, na uzorku od 2987 dece, konstatovana je učestalost hipodoncije mlečnih zuba od 0.47%, dok je na osnovu ortopantomografskih snimaka takodje utvrđeno da je kod svih pacijenata sa nedostatkom mlečnih zuba uočena hipodoncija i u stalnoj denticiji (Skrinjaric i Barac-Furtinovic 1991).

Podaci iz literature pokazuju da prevalenca zubne ageneze u stalnoj denticiji varira od 2.6% do 11.3%, isključujući treće molare. (Larmour i sar. 2005) Jedna najnovija meta analiza, koja je obuhvatila 93 studije o prevalenci hipodoncije (od 2002. do 2012), ukazala je na učestalost hipodoncije od 6.4% (Khalaf i sar. 2014). U istoj studiji je potvrđena i statistički značajna razlika u prevalenci hipodoncije na različitim kontinentima (Afrika-13.4%, Evropa-7%, Azija i Australija-6.3%, Severna Amerika-

5%, Latinska Amerika sa Karibima-4.4%). Međutim, autori navedene meta analize nisu pronašli statistički značajnu razliku u prevalenci hipodoncije u zavisnosti od tipa ispitivanog dela populacije (školska deca, stomatološki pacijenti, ortodontski pacijenti).

Zubi koji su najređe pogođeni agenezom su gornji centralni sekutići, gornji i donji prvi molari i donji očnjaci. Ipak, ukoliko ovi zubi nedostaju u vilicama, njihovo odsustvo najčešće se povezuje sa sindromskom oligodoncijom (Khalaf i sar. 2014). Takodje, istraživanja Khalaf i saradnika pokazala su da je zubna ageneza češća u gornjoj (53.2%) nego u donjoj vilici(46.8%).

Smatra se da zubi koji najčešće nedostaju, su oni koji se u svojoj grupi poslednji razvijaju, a to su: lateralni sekutić, drugi premolar i treći molar. Ipak, hipodoncija trećih molara je najčešća, i u zavisnosti od demografskog i geografskog profila, može biti prisutna sa učestalošću od preko 20% (Lynham 1990, Topkara i Sari 2011, Celikoglu i Kamak 2012). U studiji Celikoglu i Kamaka, prevalenca hipodoncije trećih molara je iznosila 22.7% među ortodontskim pacijentima, dok je u istoj studiji ova učestalost bila značajno veća kod pacijenata sa malokluzijom klase III po Angle-u, u odnosu na pacijente sa klasom I i II po Angle-u (Celikoglu i Kamak 2012). Uzimajući u obzir poziciju zuba, brojna istraživanja su takodje pokazala da osim trećih molara, najčešće nedostaju donji i gornji drugi premolari, i gornji lateralni sekutić (Larmour i sar. 2005, Topkara i Sari 2011, Polder i sar. 2004, Khalaf i sar. 2014). U studiji Symonsa i saradnika koja je obuhvatila 5127 pacijenata i koja se bavila anomalijama zuba povezanim sa hipodoncijom gornjeg lateralnog sekutića i drugog donjeg premolara, nedostatak gornjeg lateralnog sekutića je zabeležen u 2.2% slučajeva, a nedostatak donjeg drugog premolara u 3.4% ispitanika. (Symons i sar. 1993). Interesantan podatak je zabeležen u istraživanjima Azijske populacije, gde je donji sekutić zub koji veoma često nedostaje. (Larmour i sar. 2005, Chung i sar. 2008). U istraživanju Chunga i saradnika, lateralni sekutić u donjoj vilici nedostajao je čak u 20.4% slučajeva (Chung i sar. 2008).

Kada je u pitanju hipodoncija primećena je i različita zastupljenost ove razvojne anomalije kod pripadnika različitih rasa. Istraživanje Harrisa i Clark-a, koje je obuhvatilo 1700 ispitanika, imalo je za cilj da ispita razlike u prevalenci hipodoncije

između pripadnika crne i bele rase. Dobijeni rezultati su pokazali da je prevalenca osoba crne rase sa hipodoncijom bila 11%, dok je kod pripadnika bele rase bila značajno veća i iznosila je 27%. Osim toga i broj zuba koji nedostaju je bio manji kod osoba crne rase (1.75) , nego u osoba bele rase (2.07) (Harris i Clark 2008).

Veliki broj istraživanja bavio se i razlikama u zastupljenosti hipodoncije među polovima. U najvećem broju slučajeva pokazano je da je hipodoncija češća kod žena nego kod osoba muškog pola. (Larmour i sar. 2005, Pedersen i sar. 2012, Polder i sar. 2004, Mattheeuws i sar. 2004, Khalaf i sar. 2014, Kim i sar. 2011). U meta analizi Poldera i sar. (Polder i sar. 2004) učestalost hipodoncije je bila veća kod žena 1.37 puta nego kod muškaraca, dok je u meta analizi Khalafa i sar. (Khalaf i sar. 2014) zastupljenost hipodoncije takođe bila veća kod žena, i to 1.22 puta.

Nekoliko studija se bavilo učestalošću hipodoncije kod različitih tipova malokluzija i svuda je učestalost bila najveća kod pacijenata sa klasom III po Angle-u (Chung i sar. 2008, Uslu i sar. 2009, Vahid Dastjerdi i sar. 2010). Međutim, Kim i saradnici u svojim istraživanjima nisu pokazali razliku u učestalosti hipodoncije u zavisnosti od klase malokluzije (Kim i sar. 2011).

U zemljama u regionu rađena su brojna istraživanja, koja su se bavila prevalencom hipodoncije (Skrinjaric i Barac- Furtinovic 1991, Viskovic i sar. 1988, Fekonja 2015, Pop Acev i Gjorgova 2014, Gabris i sar. 2006). Na uzorku od 2066 ortodontskih pacijenata u Hrvatskoj, učestalost hipodoncije bila je 5.52%, i neznatno učestalija kod žena nego kod muškaraca. Uočeno je da su najčešće nedostajali drugi donji premolar i gornji lateralni sekutić (Viskovic i sar. 1988). U istraživanju Fekonje koje je imalo za cilj da odredi prevalencu hipodoncije u Sloveniji, registrovana je učestalost hipodoncije od 6.9%, ne uključujući treće molare. I u slovenačkoj populaciji najčešće su nedostajali drugi donji premolar, gornji lateralni sekutić, i gornji drugi premolar (Fekonja 2015). U Makedoniji je učestalost hipodoncije na uzorku od 8160 ispitanika, iznosila 7.52%. I ovde je hipodoncija bila češća kod ženskog pola, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Zub koji je najčešće nedostajao bio je drugi donji premolar (Pop Acev i Gjorgova 2014). U Mađarskoj je među pacijentima Klinike za dečiju stomatologiju i Ortodonciju, učestalost hipodoncije iznosila 14.69%, a najčešće

su nedostajali gornji lateralni sekutić, donji drugi premolar, gornji drugi premolar i donji centralni sekutić (Gabris i sar. 2006).

O prevalenci hipodoncije u Srbiji nema mnogo literaturnih podataka. Rezultati studije koja je imala za cilj da ispita prevalencu hipodoncije, među ortodontskim pacijentima Klinike u Nišu, ukazali su na učestalost hipodoncije od 6.28%, na uzorku od 2470 pacijenata oba pola. Najčešće su nedostajali drugi premolari i gornji lateralni sekutići, dok je veća učestalost hipodoncije registrovana kod osoba ženskog pola (Janošević i sar. 2004). Jedna studija o učestalosti hipodoncije kod dece u Knjaževcu, takođe je pokazala slične rezultate u pogledu tipa zuba koji nedostaju, dok je učestalost hipodoncije registrovana u nešto manjem procentu i iznosila je 5.34% (Jankulovski i Filipovic 2009).

1.4.POVEZANOST ANOMALIJA ZUBA SA HIPODONCIJOM

Hipodoncija gornjih lateralnih sekutića i donjih drugih premolara se najčešće dovodi u vezu sa drugim anomalijama zuba, kao što su nedostatak drugih stalnih zuba, pojava impaktiranih očnjaka, teskoba u zubnom nizu, rastresitost zuba, dijastema medijana, ektopično ili zakasnelo nicanje zuba i hipoplazija prvih stalnih molara. Najčešća anomalija u vezi sa hipodoncijom gornjih lateralnih sekutića i donjih drugih premolara, bio je je urođeni nedostatak nekih drugih stalnih zuba (63.6% povezano sa hipodoncijom drugih premolara, i u 38.4% u vezi sa hipodoncijom lateralnih gornjih sekutića). Prisustvo impaktiranih zuba zabeleženo je u 13.1% slučajeva i bilo je udruženo sa hipodoncijom drugog donjeg premolara. Ostale anomalije zabeležene su u znatno manjem procentu (Symons i sar. 1993).

Kod hipodoncije donjeg drugog premolara, zabeležena je u literaturi i veća učestalost mikrodoncije lateralnog sekutića nego u opštoj populaciji. Rezultati studije Gariba i saradnika pokazali su da je 20% pacijenata sa agenezom drugog donjeg premolara imalo smanjenu veličinu gornjeg lateralnog sekutića. Ista studija je pokazala da je kod pacijenata sa urođenim nedostatkom drugog donjeg premolara učestalost palatinalno postavljenog očnjaka iznosila 8.1%, što je oko 5 puta više nego u opštoj

populaciji. Infraokluzija mlečnih drugih molara zabeležena je u 24.6% slučajeva i to je bilo značajno više od učestalosti u opštoj populaciji (Garib i sar. 2009).

Još jedno istraživanje (Kuchler i sar.) daje potvrdu da je infraokluzija mlečnih molara češća kod pacijenata sa hipodoncijom. Međutim, povezanost između taurodontizma i hipodoncije kao i između mikrodoncije i hipodoncije nije zabeležena. Ispitanici koji su imali unilateralnu agenezu gornjeg lateralnog sekutića, nisu pokazivali veću šansu da sekutić sa druge strane bude manje veličine ili drugačijeg oblika. Takođe, nije pronađena ni veza između hipodoncije i pojave prekobrojnih zuba (Kuchler i sar. 2008).

Brojna istraživanja su se bavila povezanošću između hipodoncije i anomalija veličine zuba, i najveći broj zaključuje da su kod pacijenata sa hipodoncijom zubi nešto manjih dimenzija (Garn i Lewis 1970, Gungor i Turkkahraman 2013, Rune i Sarnas 1974, Brook i sar. 2008, Schalk-van der Weide i sar. 1994, Baum and Cohen 1971).

Garn i Lewis (Garn i Lewis 1970) su zaključili da pacijenti sa agenezom trećih molara imaju značajno smanjenu veličinu zuba u odnosu na pacijente sa punom denticijom. Takođe, jedno novije istraživanje (Gungor i Turkkahraman 2013) je pokazalo da su kod pacijenata sa blagom ili ozbiljnijom formom hipodoncije, zubi nešto manji u meziodistalnom i bukolingvalnom promeru u odnosu na kontrolnu grupu bez hipodoncije. Sa izraženijom hipodoncijom, i smanjenje veličine zuba bilo je izraženije. U studiji Gungor i Turkkahramana najveću razliku u meziodistalnom promeru pokazali su gornji lateralni sekutići, dok su u labiolingvalnom smeru najvarijabilniji bili donji očnjaci. Na varijabilnost meziodistalnog i bukolingvalnog promera očnjaka kod pacijenata sa hipodoncijom su ukazali i Baum i Cohen (Baum i Cohen 1971). U istraživanju Brooka i saradnika najveću razliku u meziodistalnom promeru pokazali su donji centralni i gornji lateralni sekutići, dok je u labiolingvalnom promeru to bio donji centralni sekutić (Brook i sar. 2008).

1.5. KLINIČKE IMPLIKACIJE I TERAPIJSKE MOGUĆNOSTI KOD OSOBA SA HIPODONCIJOM

Neizbežna posledica zubne ageneze je vrlo česta pojava malokluzija zbog nepravilne pozicije zuba i slabijeg rasta alveolarne kosti, koji su takodje u vezi sa zubima koji nedostaju (Nik-Hussein 1989) i viškom prostora u zubnim lukovima. Zbog tog prostora često dolazi do naginjanja susednih zuba i supraokluzije zuba antagonista (Chai i Ngeow 1999). Nedostatak zuba u bočnim segmentima je vrlo često praćen smanjenom visinom alveolarne kosti. Pored loše estetike, pacijenti sa urođenim nedostatkom zuba mogu patiti i od oštećenja parodontijuma, smanjene sposobnosti žvakanja ili nepravilnog izgovora određenih glasova.

Iako su se kliničari dugo bavili problematikom urođenog nedostatka zuba, preventivne ili interceptivne mere, kao i terapijska rešenja su i dalje su ograničena. Terapija ove anomalije je fazna, komplikovana, dugotrajna i uključuje više stomatoloških specijalnosti (ortodontija, dečja stomatologija, protetika, parodontologija, maksilofacijalna hirurgija). Medjutim jedan od najvažnijih problema je činjenica da hipodontija ima negativan efekat na estetiku i funkciju preostalih zuba. Estetika kao bitan faktor često može uticati na pacijentovo samopouzdanje, ponašanje u komunikaciji, odnosno na profesionalni uspeh i kvalitet života (Rakhshan 2015).

U zubnom luku može nedostajati različit broj i tip zuba. U zavisnosti od broja zuba koji nedostaju, kao i ozbiljnosti malokluzije, terapija je manje ili više kompleksna, zahteva uključivanje više stomatoloških grana, i predstavlja izazov za svakog stomatologa.

Postoje dve osnovne terapijske mogućnosti, i one su vezane za zatvaranje prostora na mestu urođenog nedostatka, odnosno stvaranje prostora za izradu buduće nadoknade (Sabri 1999). S obzirom na to da je lateralni sekutić jedan od zuba koji veoma često nedostaje, u literaturi se mogu naći brojne mogućnosti za rešavanje njegovog urođenog nedostatka. U slučaju ageneze gornjih lateralnih sekutića, stvaranje prostora za buduće nadoknade je indikovano onda kada postoji dovoljno prostora u

gornjem zubnom luku. Kod pacijenata sa dentoalveolarnom protruzijom i konveksnim profilom, ovaj vid terapije nije najbolji izbor (Mc Neill i Joondeph 1973).

Medjutim, ako su gornji sekutići uspravljeni, a trebalo bi da budu protrudirani ili labijalno inklinirani, da bi se ispravio obrnut preklap sekutića ili obezbedila bolja potpora gornjoj usni (na primer kod pacijenata sa rascepom usne ili nepca) indikovano je stvaranje prostora za jedan ili oba sekutića, čak i u slučaju postojanja vrlo malog prostora u zubnom luku. Tada je potrebno obezbediti okluziju bočnih zuba i klase po Angle-u, rasporediti slobodne prostore, zatvoriti dijastemu između centralnih sekutića, retrahovati i uspraviti očnjake do momenta dok se ne stvore adekvatni prostori za lateralne sekutiće (Sabri 1999).

Veličinu prostora koji treba stvoriti za lateralne sekutiće koji nedostaju određuju dva osnovna faktora: estetika meziodistalne širine prednjih zuba i okluzija. Prema zlatnoj proporciji, širina lateralnog sekutića trebalo bi da bude dve trećine širine centralnog sekutića (Levin 1978).

Okluzija je drugi faktor koji određuje veličinu prostora za nadoknadu gornjih lateralnih sekutića koji nedostaju. Dobra interkuspidacija i odnos očnjaka, poklapanje sredina gornjeg i donjeg zubnog niza, sa optimalnim vertikalnim i horizontalnim preklapom, trebalo bi da obezbede adekvatan prostor za nadoknadu lateralnih sekutića sa zadovoljavajućim estetskim efektom (Fields 1981). Ipak glavni nedostatak ovog vida terapije je činjenica da je pacijent do kraja života prinudjen da ima protetsku nadoknadu u vidljivoj zoni, gde boja zuba i linija gingive mogu biti značajan estetski problem (Tuverson 1970).

Zatvaranje prostora u slučaju urođenog nedostatka lateralnih gornjih sekutića je indikovano u slučajevima izražene protruzije gornjih prednjih zuba, odnosno slučajevima njihove izražene labijalne inklinacije. U ovom slučaju bi stvaranje prostora za lateralne sekutiće uticalo na još veću protruziju centralnih, čime bi se pogoršao profil pacijenta i bila bi kompromitovana stabilnost ortodonske terapije. Ako pacijent ima normalan profil, sa normalno inkliniranim prednjim zubima, ali sa malo ili nimalo prostora u gornjem zubnom luku, onda je indikovano ortodonsko zatvaranje prostora.

Kad god je u mandibularnom luku indikovano vadjenje nekih zuba iz ortodontskih razloga (teskoba ili protruzija) u gornjem zubnom luku je u terapiji indikovano zatvaranje prostora (Sabri 1999).

Da bi se postigli optimalni estetski i funkcionalni rezultati nakon ortodontskog zatvaranja prostora, nekad je potrebna remodelacija očnjaka kako bi što više ličili na lateralne sekutiće. Postoje tri načina da se postigne ravna incizalna ivica, a izbor zavisi od linije gingive i samog oblika očnjaka. Prvi način je ravnjanje kvržice očnjaka, drugi podrazumeva nadogradnju kompozitom mezijalnog i distalnog ugla, a treći kombinaciju ova dva načina (Tuverson 1970, Yankelson 1973). S obzirom na to da su očnjaci nešto tamniji nego centralni sekutići, tehnikom izbeljivanja moguće je postići bolji estetski efekat, a jednostavnom hirurškom intervencijom i produženje kliničke krune, ukoliko je to potrebno (Rosa i Zacharisson 2001).

Najveća prednost ortodontskog zatvaranja prostora je stabilnost krajnjeg rezultata, i izbegavanje potrebe za stalnom protetskom nadoknadom (Tuverson 1970). Ovde kraj ortodontske terapije predstavlja kraj celokupne terapije, i rezultat je trajan (Sabri 1999). Najveća mana ovog načina lečenja je tendencija otvaranja prostora između prednjih zuba, ali se ona može sprečiti fiksnom retencijom, u vidu žice zalepljene kompozitnim materijalom na palatinalnim površinama sekutića i očnjaka (Faure i sar. 1994).

Od protetskih nadoknada u terapiji se najčešće koriste mobilne parcijalne proteze, konvencionalni i kompozitni mostovi, a prostor se ponekad može zatvoriti i autotransplantatom, ili implantatom na mestu zuba koji nedostaje (Rupp i sar. 1997).

Jedno istraživanje je potvrdilo da autotransplantacija premolara na mestu lateralnog sekutića koji nedostaje omogućava povoljan estetski rezultat kod blizu 73% pacijenata (Czochrowska i sar. 2002). U eri implantologije, nadoknada sekutića koji nedostaje implantatom postaje sve češća. U ovom slučaju je potrebno da ortodont stvori dovoljno prostora za implantat i obezbedi dobar položaj krunica i korenova susednih zuba, kao i da hirurg prethodno proceni kvalitet i količinu kosti u željenoj regiji.

Takođe, neophodno je ortodontskom terapijom omogućiti da korenovi centralnog sekutića i očnjaka budu paralelni ili blago divergentni (Bordei i Dragos 2010).

1.6.GENSKA OSNOVA HIPODONCIJE

Kao i u drugim granama medicine, genetika je značajnu ulogu pronašla i u istraživanjima etiologije različitih kraniofacijalnih i dentalnih anomalija kao i u načinu njihovog nasleđivanja. Istraživanjima humanih gena koji učestvuju u zubnoj morfogenezi, prethodila su istraživanja na denticijama eksperimentalnih životinja (miševa). Denticija miševa, iako značajno različita od ljudske (ima samo dva različita oblika zuba i jednu denticiju), predstavlja dobar model za ova istraživanja, a mišja zuba klica u razvoju prihvatljiv model u tumačenju i razumevanju procesa organogeneze (Miletich i Sharpe 2003).

U eri napretka molekularne biologije i genetike jasnije i preciznije su definisani molekularni aspekti odontogeneze, ukazujući na taj način da je razvoj zuba pod striktnom genetičkom kontrolom. Do danas je otkriveno preko 300 gena koji su uključeni u određivanje pozicije, broja, veličine i oblika zuba (Thesleff 2006).

U bazi podataka naslednih bolesti kod čoveka, OMIM, nalaze se reference za preko 100 sindroma povezanih sa hipodoncijom, dok se urođeni nedostatak zuba najčešće beleži kod zdravih osoba kao izolovana anomalija (<http://omim.org/>, Cobourne MT, 2007). U većini slučajeva, familijarna (izolovana) hipodoncija nasleđuje se autozomno-dominatno (Nieminen 2009).

Kod 25% osoba različitih populacija ne dolazi do razvoja trećeg molara, kod više od 5% ne razvija se nekoliko stalnih zuba, dok su teški oblici ageneze relativno retki (Arte 2001, Polder 2004). Ageneza 6 i više stalnih zuba, dešava se kod 1 od 1000 osoba (Rølling 2009). U većini slučajeva (90%) patogene mutacije nisu identifikovane, ukazujući na postojanje mnogo šire i kompleksne palete molekularnih markera uključenih u hipodonciju.

Mutacije gena uključenih u morfogenezu zuba dovode do izmena glavnih signalnih molekula i transkripcionih faktora, odgovornih za vremenski programiranu ekspresiju gena, koji uvode ćelije epitelno-mezenhimnog tkiva u proliferaciju i diferencijaciju.

Kod čoveka razviće zuba počinje u 6. nedelji prenatalnog života i formiraju se 52 zuba raspoređena u 2 generacije ili denticije: 20 u mlečnoj i 32 u stalnoj. Razvoj svih zuba prolazi kroz iste stadijume razvića (pupoljak, kapa i zvono). Proces razvitka zuba predstavlja tipičan primer epitelno mezenhimne interakcije, na nivou recipročnih signalnih procesa, dva blisko locirana tkiva, koji se sukcesivno dešavaju kroz sve tri razvojne faze. Invaginacijom dentalne plakode dolazi do kondenzacije mezenhima, na stadijumu pupoljka, a zatim se u blizini vrha zubnog pupoljka izdvaja grupa ćelija, koja obrazuje privremenu strukturu, gleđni čvor, na stadijumu kape. Gleđni čvor se smatra organizacionim centrom koji usmerava i kontroliše ćelijsku diferencijaciju u najranijim stadijumima razvića zuba. Ćelije gleđnog čvora nemaju sposobnost proliferacije, ali proizvode faktore rasta i transkripcione faktore (Nikolić 2007). U toku faze zvona, morfogeneza zuba je preusmerena ka formiranju zubne krune, uz paralelnu diferencijaciju odontoblasta, ameloblasta i cementoblasta. Mineralizacijom matriksa formira se zubna kruna, a zatim dolazi do razvoja korena zuba i erupcije zuba.

Svaki od razvojnih stadijuma zuba je pod kontrolom određene grupe gena, čiji proteinski produkti rezultuju signalnim molekulima i transkripcionim faktorima, koji se aktiviraju u određenim vremenskim intervalima, i određenim tipovima ćelija epitela i mezenhima (Slika 1).

Glavnu ulogu u epitelno-mezenhimnim interakcijama, u toku razvoja zuba, imaju četiri familije signalnih proteina, od inicijalne faze do erupcije zuba: koštani morfogenetski protein (BMP), fibroblastni faktor rasta (FGF), hedgehog (HH) i wingless(Wnt) (Fraser 2009).

Najznačajniji signalni molekuli koji se povezuju sa sindromskom i nesindromskom (familijarnom) hipodoncijom kod ljudi, nalaze se pod kontrolom gena: MSX1, PAX9, AXIN1, EDA, EDAR, EDARADD, RUNX2 i WNT10A. (Slika 2)

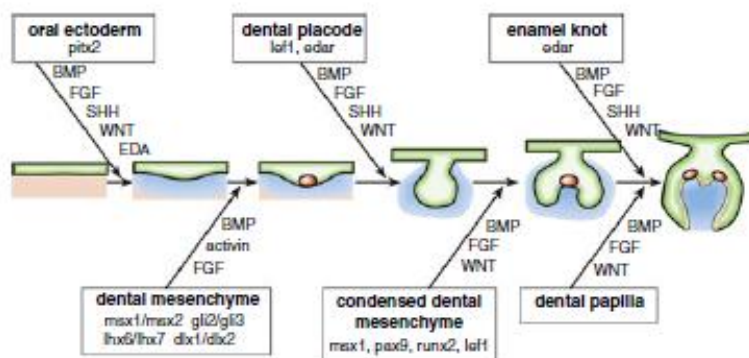
(Chhabra i sar. 2014, Vastardis 2000, Thesleff 2006, De Coster i sar. 2009, Van den Boogaard i sar. 2012).

Važnu ulogu u najranijoj fazi razvoja zubne klice, u stadijumu pupoljka, ima **WNT10A** gen. Produkt ovog gena je signalni molekul, koji se eksprimira u epitelnim ćelijama i koji *Wnt/β-catenin* signalnim putem utiče na aktivaciju mezenhima.

Prelazak iz stadijuma pupoljka u stadijum kape, veoma je kritičan period u zubnoj morfogenezi, i pod uticajem je signala iz epitela i ektomezenhima. Od posebnog značaja u ovoj razvojnoj fazi zuba je **RUNX2** gen, čiji je proteinski produkt transkripcioni faktor, koji se eksprimira u mezenhimu.

Abnormalna funkcija proteina koji kontrolišu razvoj zuba, može dovesti do morfoloških, bročanih i strukturnih dentalnih anomalija. Kada su u pitanju anomalije broja zuba, neadekvatne ekspresije signalnih molekula mogu dovesti do odsustva zubne klice (*Wnt,p63*) ili zaustavljanja razvoja na stupnju pupoljka (*Lef1, Msx1, Msx2, Pax9, Pitx2*) ili na stupnju kape/zvona (*Cbfa1/Runx2*) (Zhao 2000, Satokata 2000, Das 2002, Lin 1999).

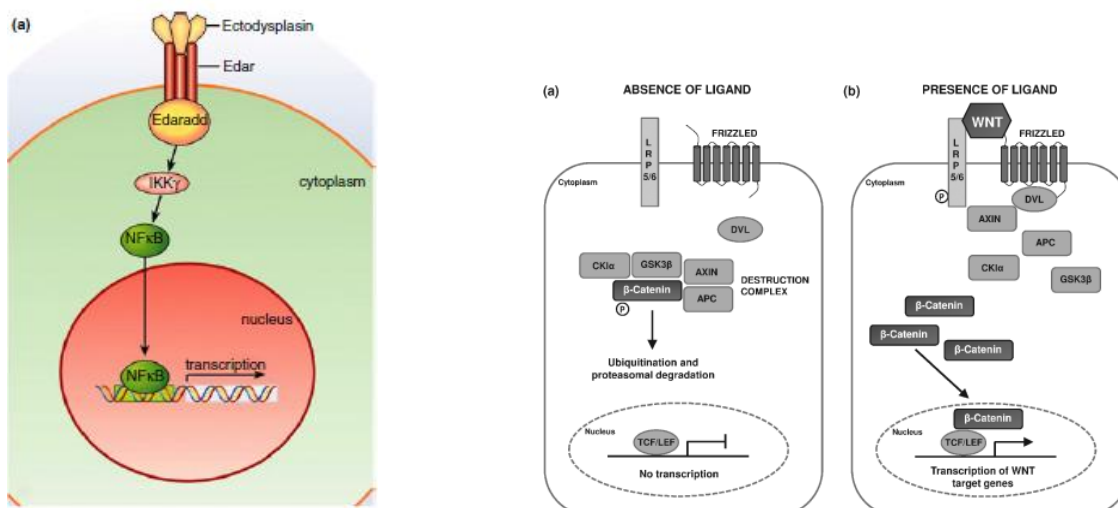
Anomalije broja zuba kategorisane kao nesindromske forme hipodoncije, označavaju se i kao sporadične (izolovane, familijarne). Familijarne forme mogu se nasleđivati putem autozomno-dominantnog, autozomno-recesivnog, i X-vezanog modela, pri čemu se registruju varijacije u penetrantnosti i ekspresivnosti gena (Burzyn'ski 1983). Prema literaturnim podacima, spektar mutacija odgovornih za razvoj hipodoncije je širok, pri čemu se iz palete gena mogu izdvojiti ključni faktori hipodoncije.



Slika 1. Razvojne faze odontogeneze. Preuzeto od: Thesleff I 2014.

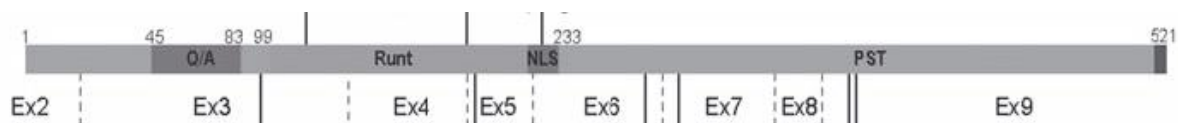
Stage of tooth development	Protein factors involved in signaling from epithelium	Protein factors involved in signaling from mesenchyme
Initiation Stage	Fgfs, Bmps, Shh, Pitx2 and Wnts	Pax9, Ptc, Msx1, Msx2, Bmp4, Lhx6, Lhx7, Lef1, Dlx1, Dlx2, Gli1, Gli2, Gli3 and Barx1
Bud Stage	Bmp, Fgf, Wnts, Shh, Pdgf, p21, Msx2, Lef1 and Tgf-β	Pax9, Bmp, Dlx1, Dlx2, Lhx6, Lhx7, Msx1, Lef1, Gli1, Gli2, Gli3, Barx1 and Fgfs
Cap Stage	Bmp, Fgf, Wnts, Shh, Pdgf, p21, Msx2, Lef1 and Tgf-β	Pax9, Bmp, Dlx1, Dlx2, Lhx6, Lhx7, Msx1, Lef1, Gli1, Gli2, Gli3, Barx1, Bmp4, Msx2 and Fgfs
Bell Stage		

Slika 2. Molekularni markeri odontogeneze. Preuzeto od: Chhabra N 2014.



Slika 3. Signalni mehanizam, EDAR-EDARADD. Preuzeto od: Thesleff I 2014.

Slika 4. WNT10A signalni mehanizam. Preuzeto od: Mostowska A 2013



Slika 5. RUNX2 gen. Preuzeto od Hansen L, 2012

1.6.1. Uloga ključnih gena u hipodonciji

MSX1gen (muscle segment homeobox 1), deo subfamilije homeobox gena, kodira transkripcioni faktor koji se eksprimira u ektodermalnim derivatima zubne klice i dentalnom mezenhimu u svim razvojnim fazama (Mc Kenzie i sar. 1991, Tucker i sar. 1998). Ovaj gen ima ulogu u određivanju pozicije i oblika zuba (Miletich i sar. 2003). Mutacije MSX1 gena dovode do odsustva premolara (Kim 2006). Abnormalna ekspresija MSX1 gena dovodi do razvoja rascepa usne i nepca, a isto tako i do povećanog rizika od razvoja tumora dojke (Jumlongras 2001, Sliwinski 2010).

PAX9 gen (paired box gene 9) kodira transkripcioni faktor koji se eksprimira u mezenhimnom delu zuba u ranim razvojnim fazama (Neubuser i sar. 1997). Kod ljudi je identifikovan veliki broj polimorfizama i mutacija na PAX9 genu, koje se dovode u vezu sa različitim oblicima oligodoncija, i to onih koje uglavnom pogađaju regiju molara (Frazier-Bowers i sar. 2002, Mostowska i sar. 2006).

Pored analize mutacija i pokušaja pronalaska gena povezanih sa hipodoncijom i oligodoncijom, biološka istraživanja su usmerena ka jasnijem sagledavanju molekularnih interakcija, koje dovode do zastoja u formiranju zubne klice. Postoje dokazi da su MSX1 i PAX9 geni u određenoj interakciji tokom odontogeneze, i na genskom i na proteinskom nivou. Himerični protein, MSX1/PAX9, omogućava tranziciju od stadijuma pupoljka do kape, i dovodi do indukcije gleđnog čvora u kasnoj fazi kape (Ogawa 2005). Tako kod miševa isključivanjem ovih gena dolazi do prestanka odontogeneze na stadijumu pupoljka (Peters i sar. 1998). Mutacije MSX1 i PAX9 gena registruju se u manjem procentu kod osoba sa sporadičnom hipodoncijom.

AXIN2gen, (axis inhibition protein 2) kodira signalni protein u okviru *Wnt/β-catenin* signalne kaskade. Mutacije u okviru ovog gena povezuju se sa odsustvom molara i premolara kod pacijenata sa oligodoncijom, dok se sa druge strane, AXIN mutacije povezuju i sa značajnim rizikom od nastanka kolorektalnog karcinoma (Lammi i sar. 2004).

EDA gen, (ectodysplasin A), kodira signalni molekul, ektodisplazin, koji je aktivan u epitelu, i koji preko signalne kaskade, receptor (EDAR)-citoplazmatski medijator (EDARADD)-transkripcioni faktor (NFκB), prosleđuje signal za proliferaciju do jedra epitelijalnih ćelija (Slika 3). Mutacije u EDA genu dovode do odsustva sekutića kod pacijenata sa oligodoncijom, a istovremeno se povezuju sa X recesivnim nasleđivanjem ektodermalne displazije (Han 2008, Song 2009).

S obzirom na veliki broj “kandidat” gena dobijenih u studijama na miševima (Tencate 1995), pomalo je iznenađujuće što su mutacije malog broja ovih gena pronađene i kod ljudi. Međutim, to takođe ukazuje da je familijarna hipodoncija mnogo kompleksnija i da na nju mogu uticati mnogi dodatni faktori.

1.6.2. Uloga WNT10A gena u morfogenezi zuba

WNTA10A gen (wingless-type), veličine 14.4kb, lociran na 2q35, sadrži 4 egzona, kodira signalni protein koji ima dva domena: signalni domen (1-35ak.) i Wnt domen (60-417ak.)

WNT10A gen u okviru *Wnt/β-catenin* signalnog puta, ima važnu ulogu u regulisanju ćelijskih interakcija u toku embriogeneze, kao i u homeostazi adultnih tkiva, pri čemu izraženu ekspresiju pokazuje u embrionalnom epitelu, koži i njenim derivatima (zubi, folikul dlake, nokti, znojne žlezde) (Logan 2004, Gordon 2006). WNT10A gen je eksprimiran u dentalnom epitelu i mezenhimu i ima ključnu ulogu u morfogenezi zuba, u incijalnoj fazi i na nivou pupoljka (Thesleff 2003, Liu i sar. 2008). Blokiranje Wnt signala dovodi do odsustva zubne plakode, a samim tim i do inicijacije razvoja zuba. U stadijumu kape, Wnt signal se aktivira u signalnom centru tj. glednom čvoru, stimulišući na taj način formiranje dentisialofosfoproteina-DSPP, tokom diferencijacije

odontoblasta (Yamashiro i sar. 2007). Ulogu u aktivaciji odontogenog potencijala mezenhima u ranoj fazi razvoja zuba, kao i u formiranju gleđnog čvora u epitelu Wnt signal ostvaruje preko ciljnog signalnog molekula, β -catenin-a koji se u jedru vezuje za brojne gene čiji produkti regulišu dentinogenezu (Slika 4) (MacDonald 2009). Odsustvo Wnt liganda ili β -catenin-a u signalnoj mreži, može dovesti do zaustavljanja razvoja zuba već na stadijumu pupoljka, dok konstitutivna aktivacija β -catenin-a u embrionalnom oralnom epitelu, može dovesti do pojave viška zuba (Wang 2009).

Zbog svoje ključne uloge u morfogenezi zuba, kako u primarnoj tako i sekundarnoj denticiji, WNT10A gen se povezuje za hipodoncijom (Yamashiro 2007, Liu i Millar 2010). Navedena zapažanja su izvedena iz rezultata, koji dovode u vezu mutacije WNT10A sa smanjenom genskom aktivnošću, a koja posledično dovodi do inhibicije proliferacije zubnih mezenhimnih ćelija, odnosno na kliničkom nivou, do razvoja malih i slabo razvijenih zuba.

Mutacije WNT10A gena, registruju se kako kod nesindromske hipodoncije, tako i kod sindromskih formi, autozomno-recesivnih ektodermalnih displazija (odontonycho-dermal dysplasia, ODD; Schöpf-Schulz-Passarge syndrome, SSPS) (Mostowska i sar. 2013, Adaimy 2007).

Fenotipski efekti mutacija WNT10A gena, mogu se kretati od blažih formi, kod sporadičnih hipodoncija, do težih formi, kod sindromskih oblika, dok se istovremeno zapaža teža forma hipodoncije kod muškaraca nego kod žena. (Bohring 2009).

1.6.3. Uloga RUNX gena u morfogenezi zuba

RUNX2 gen (Cbfa1, PEBP2A1, AML3, OSF2), lociran na 6p21, veličine 220kb. (8 egzona), kodira transkripcioni faktor koji ima ključnu ulogu u diferencijaciji pluripotentnih mezenhimalnih ćelija u osteoblaste i hondrocite. RUNX2 pripada RUNX familiji gena, koju kod sisara čine tri gena: RUNX1, RUNX2 i RUNX3. Sva tri gena imaju slične sekvence, čijom ekspresijom se formiraju različiti regulatorni proteini, pri čemu sva 3 transkripciona faktora imaju ulogu i u razvoju zuba (Yamashiro i sar. 2002).

RUNX1 gen (21q22.3), ima primarnu ulogu u razvoju svih tipova hematopoeznih ćelija, dok onkogenom transformacijom može dovesti do akutne mijeloidne leukemije. Takođe, ovaj gen je uključen u osteogenezu i odontogenezu. (Yamashiro i sar. 2002)

RUNX3 gen (1p36), učestvuje u gastrointestinalnoj organogenezi i neurogenezi (Li i sar. 2002).

RUNX2 gen (6p21), ima važnu ulogu u osteogenezi, putem stimulacije ekspresije faktora neophodnih u diferencijaciji osteoblasta i hondrocita: osteopontina, osteokalcina, koštanog sialoproteina, kolagena I, kolageneze 3 i vaskularnog faktora rasta (Ducy 2000, Enomoto i sar., 2000). Ekspresija RUNX2 opada sa godinama, što između ostalog dovodi do smanjenja funkcije osteoblasta i formiranja koštanog tkiva. (Christiansen 2000).

Brojna istraživanja su potvrdila da različite heterozigotne mutacije RUNX2 gena kod ljudi, dovode do autozomno-dominantnog oboljenja, kleidokranijalne displazije (KKD) (Mundlos i sar. 1995, Buffalino i sar. 2012). Kliničke manifestacije KKD su: nizak rast, aplazija ili hipoplazija klavikula, brahicefalija, zakasnelo zatvaranje fontanela i sutura, hipoplazija srednje trećine lica, nerazvijeni sinusi, zakasnelo spajanje mandibularne simfize, zakasnelo nicanje zuba, prekobrojni zubi u stalnoj denticiji, zakasnela osifikacija pubične simfize i brahidaktilija (Cohen 2009). Navedeni poremećaji ukazuju da je RUNX2 gen aktivan ne samo u toku ranog embrionalnog razvoja, u kome ne dolazi do razvoja skeletnih elemenata (ključnih kostiju), već je aktivan i u toku fetalnog rasta i postnatalnog razvoja (Otto i sar. 1997). Tako, Otto i sar. u svojoj studiji na eksperimentalnim miševima, pokazuju da je inaktivacija jednog alela Runx2 gena, dovela do skeletnih poremećaja koji su gotovo identični onim kod KKD čoveka, usled zaustavljene diferencijacije osteoblasta. Međutim, kod miševa nije bilo prekobrojnih zuba, što se može objasniti činjenicom da miševi imaju samo jednu denticiju, a da su prekobrojni zubi kod čoveka vezani isključivo za stalnu denticiju. Takođe, RUNX2 se povezuje sa nesindromskim rascepom usne i nepca (Wu i sar. 2012).

Pored značajne uloge u osteogenezi, RUNX2 gen ima važnu ulogu i u razvoju zuba. Naime, dentalni epitel preko FGF dovodi do RUNX2 ekspresije u mezenhimu, u stadijumu pupoljka i kape, dok je uloga RUNX2 gena nešto smanjena u stadijumu zvona i dentalnoj papili (Aberg 2004). Preciznije, ekspresija RUNX2 u dentalnoj papili i dentalnom folikulu, ukazuje na njegovu određenu ulogu u diferencijaciji odontoblasta i osteoblasta, a takođe, uočena je i ekspresija ovog gena u periodontalnim fibroblastima. (Jiang 1999). U toku razvoja zuba, različita je ekspresija RUNX2 u odontoblastima i osteoblastima, a takođe je prisutna različita ekspresija u gornjoj i donjoj vilici, kod mišjih modela. Na osnovu eksperimentalnih rezultata, RUNX2 pokazuje povećanu ekspresiju u nezrelim odontoblastima, dok je njegova ekspresija slaba ili odsutna u diferenciranim ćelijama, za razliku od diferenciranih osteoblasta koji pokazuju izraženu ekspresiju (Liu 2005, Chen 2005).

Zbog uloge RUNX2 gena u sazrevanju osteoblasta i odontoblasta, usled deficita ovog proteina, odloženi razvoj zuba je očekivan, pa shodno tome kod pacijenta sa KKD koji poseduju RUNX2 mutaciju primećeno je kašnjenje stalnih zuba u periodu od 4 godine u poređenju sa zdravim osobama (Seow 1995). Odložen rast zuba i ektopična erupcija, povezuju se sa narušenom ekspresijom RUNX2 u alveolarnoj kosti (Jiang 1999).

RUNX2 protein sadrži tri domena: 1. N terminalni (Q/A) sa 23 glutamina (Q), praćena sa 17 alanina (A), 2. RUNT domen (α), označen još i kao DNK vezujući domen, koji se u heterodimernoj formi sa CBF β proteinom, vezuje za DNK ciljnih gena čiju ekspresiju kontroliše 3. C terminalni domen, PST (prolin-serin-treonin), uključen je u transkripcionu regulaciju putem vezivanja koaktivatora/ korepresora transkripcije (Slika 5).

RUNX2 gen poseduje dva promotora, proksimalni-P2 i distalni-P1, koji dovode do sinteze dve različite izoforme proteina (Tip 1 i 2). Kod eksperimentalnih modela miševa, tokom osteogeneze, u incijalnoj fazi diferencijacije osteoblasta i tokom njihove proliferacije, aktivan je Tip 1 proteina, dok je u terminalnoj fazi diferencijacije, aktivan Tip 2 (Banerjee C, 2001). Tokom dentinogeneze, visoku ekspresiju pokazuje izoforma-Tip 1, dok dodatno, Tip-2 ima ulogu u diferencijaciji odontoblasta i ameloblasta, pri

čemu se sintetišu: dentin matrix protein (DMP1), dentin sialoprotein (DSPP), amelogenin (AMGN), i ameloblastin (AMBN) (Kobayashi 2006). Da proteinski produkt RUNX2 gena ima važnu ulogu u formiranju gleđi, potvrđuju i histološke analize stalnih zuba pacijenta sa KKD, kod kojih se uočava hipoplazija (Fukuta 2001). Takođe, RUNX2 gen je eksprimiran (Tip 2) u korenu zuba i peridoncijumu, tj. u cementoblastima, cementocitima, osteblastima, i osteocitima, dok u osteoklastima ne pokazuje ekspresiju (Bronckers 2001).

Najveći broj otkrivenih mutacija RUNX2 gena su "missense" mutacije locirane u RUNT domenu, koje onemogućavaju vezivanje RUNX2 proteina za OSE2 gene (geni za diferencijaciju osteoblasta (Zhou 1999).

Na osnovu rezultata dobijenih na eksperimentalnim miševima, sva tri RUNX gena mogu delovati sinergistički u istim tkivima, ali i u različitim vremenskim intervalima. RUNX1 i RUNX3 geni pokazuju ekspresiju u hematopoeznim ćelijama, pri čemu RUNX1 ima vodeću ulogu (De Bruijn i Speck 2004). Sa druge strane, RUNX2 i RUNX1 geni, pokazuju podjednaku ekspresiju u toku formiranja frontalnih i maksilarnih kostiju (Yamashiro i sar. 2002). Takođe, sva tri gena RUNX familije imaju određene uloge u razvoju zuba. Tačnije, u dentalnom epitelu, u stadijumu pupoljka i kape, eksprimiran je RUNX1, dok je u odontoblastima pored RUNX2 eksprimiran i RUNX3.

U našoj populaciji ne postoje podaci koji se odnose na mutacionu analizu gena uključenih u odontogenezu i njihov uticaj na pojavu ove razvojne anomalije. Zato je osnovni cilj ovih istraživanja bio da se na određenom broju ispitanika, kod kojih je dijagnostikovano urođeni nedostatak jednog ili više zuba, proveriti da li postoji veza između tipova mutacija na genima RUNX2 i WNT10A i kliničkih karakteristika pacijenata sa hipodoncijom. Takođe, literaturni podaci su oskudni kada je u pitanju genska osnova hipodoncije, što ovoj studiji daje poseban značaj u pogledu rasvetljavanja molekularnog aspekta odontogeneze.

II

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Radna hipoteza

Mutacije RUNX2 gena (egzoni 3 i 4) i WNT10A (egzoni 2 i 3) mogu da utiču na pojavu hipodoncije/oligodoncije, odnosno da dovedu do anomalija veličine zuba kod osoba sa hipodoncijom/oligodoncijom.

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je da se ispita da li potencijalne mutacije RUNX2 i WNT10A gena utiču na razvoj hipodoncije, odnosno na pojavu anomalija veličine zuba osoba sa hipodoncijom.

U okviru osnovnog cilja definisani su sledeći istraživački zadaci:

1. Da se ispituju tipovi i zastupljenost mutacija RUNX2 gena (egzoni 3 i 4), kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom
2. Da se ispituju tipovi i zastupljenost mutacija WNT10A gena (egzoni 2 i 3), kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom
3. Da se utvrdi veza između tipova mutacija u oba ispitana gena i kliničkih karakteristika pacijenata sa hipodoncijom
4. Da se utvrdi, da li kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom, postoje anomalije veličine zuba u odnosu na pacijente bez hipodoncije
5. Da se utvrdi korelacija između veličine zuba i prisustva mutacija u analiziranim egzonima WNT10A i RUNX2 gena

III
MATERIJAL I METODE

Prema postavljenim ciljevima istraživanje je realizovano u dva pravca. Jedan deo istraživanja odnosio se na ispitivanje tipova i zastupljenosti mutacija RUNX2 i WNT10A gena kod pacijenata sa urođenim nedostatkom zuba i njihovih srodnika, dok je drugi deo istraživanja podrazumevao merenje meziodistalnih širina zuba kod pacijenata sa urođenim nedostatkom zuba, i njihovo upoređivanje sa meziodistalnim širinama zuba pacijenata bez hipodoncije/oligodoncije.

3.1. MATERIJAL I METODE ZA KLINIČKA ISTRAŽIVANJA

Kliničko istraživanje sprovedeno je na Klinici za Ortopediju vilica. Ovaj deo istraživanja obuhvatio je 50 ispitanika (30 ženskog pola i 20 muškog pola) pacijenata Klinike za ortopediju vilica Stomatološkog Fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Uzorak je obuhvatio dve grupe ispitanika - ekperimentalnu i kontrolnu.

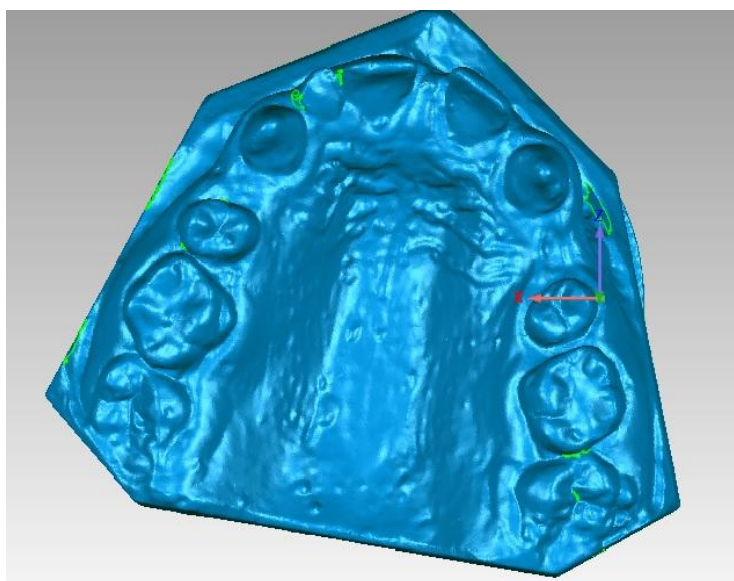
Eksperimentalnu grupu je činilo 25 pacijenata sa urođenim nedostatkom jednog ili više zuba (15 ženskog i 10 muškog pola). Kriterijum za uključivanje u eksperimentalnu grupu je podrazumevao urođeni nedostatak jednog ili više zuba (bez uključivanja trećih molara) i odsustvo klinički vidljivih promena ili anamnestičkih podataka koji bi mogli ukazivati na neki od sindroma povezanih sa hipodoncijom. Dijagnoza urođenog nedostatka zuba je potvrđivana na osnovu anamnestičkih podataka i ortopantomografskih snimaka.

Kontrolnu grupu od 25 pacijenta, takođe su činili pacijenti Klinike za Ortopediju vilica, ali bez dijagnostikovane hipodoncije/oligodoncije, a koji su po polu bili usklađeni sa eksperimentalnom grupom (15 ženskog i 10 muškog pola). Iz studije su bili isključeni mlečni zubi, impaktirani zubi, zubi u nicanju, zubi sa protetskim nadoknadama i velikim restorativnim ispunima, kao i zubi oštećeni na gipsanim modelima.

Primenjujući navedene parametre za isključenje iz morfometrijske analize, iz eksperimentalne grupe bilo je isključeno 67 zuba, dok je 82 zuba dijagnostikovano kao

urođeni nedostatak u zubnom nizu. U eksperimentalnoj grupi ukupno je bio meren 451 zub. Iz kontrolne grupe bilo je isključeno 38 zuba, a ukupno je mereno 562 zuba.

Svim pacijentima u obe grupe su uzeti otisci alginatnim materijalom, i potom istog dana izliveni tvrdim gipsom. Dobijeni studijski modeli su zatim obrađeni i pripremljeni za skeniranje. Studijski modeli su postavljeni na postolje 3D skenera Next Engine Scan Studio HDTM Version 1.3.2. (2006-2010 Next Engine Inc., Shape Tools LLC and Inus Technology Inc.) kako bi se mogla realizovati precizna merenja veličine zuba, putem skeniranja u 2 pozicije (pod uglom od 45 stepeni i -10 stepeni). Dobijeni skenovi su sačuvani kao datoteke sa ekstenzijom .STL, a zatim konvertovani u datoteke sa ekstenzijom .WRP, koja je karakteristična samo za Geomagic software (3D Systems Inc, Cary, NC) u kome su i obavljena merenja dimenzija krunica zuba (Slika 6). Meziodistalna širina krunica zuba na modelu, merena je kao najveća udaljenost kontaktnih tačaka na aproksimalnim površinama zuba koristeći alatku “Measure distance” u programu Geomagic. Merene su meziodistalne širine centralnih i lateralnih sekutića, očnjaka, prvih i drugih premolara, i prvih molara u obe vilice, na svakom skeniranom modelu. Izmerene vrednosti izražene su u stotim delovima milimetra. Sva merenja je uradila ista osoba (MZS), pri čemu su merenja u eksperimentalnoj grupi urađena dva puta u razmaku od 2 nedelje.



Slika 6. Digitalni model pacijenta sa hipodoncijom na kome su vršena merenja meziodistalnih širina zuba

Vrednosti meziodistalnih širina 451 zuba eksperimentalne grupe, uključene su u određivanje greške pri merenju (Intraoperator error). Greška pri merenju je određivana tako što su sabrane vrednosti meziodistalnih širina istoimenih zuba sa leve i desne strane, pronađene srednje vrednosti za svaki zub u svakom od dva merenja, a zatim upoređene vrednosti prvog i drugog merenja.

Prosečne veličine svih zuba (centralnih sekutića, bočnih sekutića, očnjaka, prvog i drugog premolara, i prvih molara u obe vilice) dobijene su na osnovu srednjih vrednosti meziodistalnih širina istoimenih zuba leve i desne strane. Ukoliko je postojao zub samo sa jedne strane (a sa druge nedostajao iz bilo kog razloga), u analizi je korišćena vrednost meziodistalne širine prisutnog zuba.

Da bi se proverilo da li postoje razlike u veličini, vrednosti meziodistalnih širina istoimenih zuba u eksperimentalnoj grupi upoređivane su sa vrednostima istoimenih zuba kontrolne grupe. Takođe su urađena i poređenja u odnosu na pol i grupu (vrednosti meziodistalnih širina zuba ženskih/muških ispitanika u eksperimentalnoj grupi su upoređivane sa vrednostima širina zuba ženskih/muških ispitanika u kontrolnoj grupi). Pored toga, analiza je uključila i poređenja pojedinačnih istoimenih zuba (sa leve i desne strane) u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi.

U grupi pacijenata eksperimentalne grupe formirana je podgrupa od 10 pacijenata sa hipodoncijom, u kojoj je pored merenja meziodistalnih širina zuba, radjena i mutaciona analiza egzona 2 i 3 kod WNT10A gena i egzona 3 i 4 kod RUNX2 gena, kako bi se utvrdilo da li se mutacije na ovim egzonima mogu dovesti u vezu sa eventualnim anomalijama veličine zuba. Prosečne vrednosti veličina zuba u ovoj podgrupi predstavljaju srednje vrednosti istoimenih zuba leve i desne strane, a poredjenje veličina zuba je vršeno sa prosečnim vrednostima kontrolne grupe iz kliničkog dela istraživanja.

3.1.1. Statističke metode

Prikupljeni podaci kliničkog dela istraživanja obradjeni su i analizirani u SPSS IBM Statistics 20 programu. Kolmogorov-Smirnov test je korišćen da se proverí da li je uzorak normalno distribuiran .

Studentov T-test za nezavisne uzorke je korišćen da ukaže na uticaj pola i prisutne hipodoncije na realizovana merenja, a studentov T-test za vezane uzorke, korišćen je za utvrđivanje razlika izmedju sprovedenih merenja. Nivo statističke značajnosti je utvrđen na $p=0.05$.

3.2. MATERIJAL I METODE ZA MOLEKULARNO-GENETIČKA ISTRAŽIVANJA

Molekularno-genetičko istraživanje obavljeno je u Laboratoriji za humanu genetiku Stomatološkog Fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Laboratoriji za genetiku, Instituta za neurologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

U molekularno-genetičkim istraživanjima korišćen je biološki materijal (bris bukalne sluzokože) pacijenata Klinike za Ortopediju vilica Stomatološkog Fakulteta u Beogradu, sa potvrđenom dijagnozom postojanja hipodoncije/oligodoncije, i uz njihovu pismenu saglasnost za dobrovoljno učešće u istraživanju. Takođe, uz potpisanu saglasnost i njihovi članovi porodica (sa ili bez fenotipskih obeležja hipodoncije/oligodoncije) su uzeli učešće u ovom istraživanju. Za maloletne pacijente sa hipodoncijom saglasnost su potpisom potvrdili njihovi roditelji.

Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog Komiteta Stomatološkog fakulteta u Beogradu (broj 36/31, decembar 2014 god.).

Istraživanje je obuhvatilo 24 porodice (72 ispitanika), kod kojih je bar kod jednog člana (probanda) dijagnostikovao urođeni nedostatak jednog ili više zuba (bez uključivanja trećih molara). Dijagnoza urođenog nedostatka zuba kod ispitanika je

postavljena na osnovu anamneze, intraoralnog pregleda i ortopantomografskih snimaka. Kod ostalih članova porodica, uz anamnestičke podatke o postojanju hipodoncije/oligodoncije, uzeti su i podaci o eventualnom nedostajanju određenih zuba. Kod svih porodica kod kojih su sprovedena molekularno-genetička istraživanja, formirana su porodična stabla, sa naznačenim članovima porodice sa urođenim nedostatkom zuba.

Osnovni kriterijum za uključivanje pacijenata u studiju bio je urođeni nedostatak jednog ili više zuba, kao i odsustvo klinički vidljivih promena ili anamnestičkih podataka koji bi mogli ukazivati na neki od sindroma povezanih sa hipodoncijom. Pacijenti sa rascepima usne ili nepca i drugim orofacijalnim anomalijama nisu uključivani u ovo istraživanje.

Za svakog pacijenta formiran je poseban istraživački karton. Klinički deo istraživačkog kartona za pacijente i njihove srodnike obuhvatao je podatke o polu, broju i tipu zuba koji nedostaju, kao i podatke o izmenjenoj morfologiji zuba .

Za molekularno-genetičke analize, korišćena je DNK dobijena iz brisa bukalne sluzokože pacijenta sa hipodoncijom/oligodoncijom i njihovih najbližih srodnika. Brisevi su uzimani sa unutrašnje strane obraza, u trajanju od 30sekundi po pacijentu, a zatim čuvani u sterilnim ependorfama na -20°C do njihove dalje laboratorijske analize. Izolacija genomske DNK je urađena najviše mesec dana nakon uzimanja brisa.

3.2.1. Izolovanje genomske DNK iz brisa bukalne sluzokože

Iz brisa bukalne sluzokože izolovana je genomska DNK upotrebom *PureLink Genomic DNA kita* (Invitrogen, USA). Sam postupak izolacije DNK zasniva se na inkubaciji epitelijalnih ćelija u puferu za lizu u prisustvu digestivnog enzima proteinaze K. Zatim se lizat propušta kroz *Mini spin* kolonice, pri čemu se DNK vezuje za silikonsku membranu, dok se preostale ćelijske komponente sakupljaju u tube. Sa ciljem da se vezana genomska DNK oslobodi proteina i drugih agenasa koji mogu inhibirati PCR reakciju, kolonice se tretiraju puferima za ispiranje. Isprana i prečišćena DNK u

poslednjem koraku se tretira puferom za eluciju, pri čemu se DNK spira sa membrane u tubu.

3.2.1.1. Procedura izolacije DNK iz brisa bukalne sluzokože

U mikrotubu je prenet uzorak brisa bukalne sluzokože, a zatim dodato 200 μ l PBS-a, 20 μ l proteinaze K, i 200 μ l pufera za lizu. Uzorci su potom inkubirani 10 min. na 55°C. U sledećem koraku u uzorke je dodato 200 μ l etanola (96 – 100%). Nakon kratkog vorteksovanja, uzorci su preneti u *PureLink* kolonice i centrifugirani 1 min. pri brzini od 10000 rpm. Potom su kolonice sa vezanom genomskom DNK prebačene u čiste kolekcione tube. U sledeća dva koraka ispirana je DNK, dodavanjem 500 μ l pufera za ispiranje (WB1) u kolonicu, centrifugiranjem na 10000 rpm/ 1 min., a zatim dodavanjem 500 μ l pufera za ispiranje (WB2), centrifugiranjem na 13000 rpm/3 min. U poslednjem koraku dodato je 50 μ l pufera za eluciju, i nakon inkubacije 1 min. na sobnoj temperaturi, uz centrifugiranje na 13000 rpm./1 min. prikupljena je genomski DNK.

Nakon izolacije, određena je koncentracija DNK spektrofotometrijski, odnosno na osnovu absorbance na 260nm određene su kvantitativne vrednosti uzoraka. Podatak o odnosu apsorbanci na 260 i 280 nm, bio je pokazatelj čistoće uzoraka (odsustvo proteina i fenola). Ovaj parametar se kretao u vrednostima od 1,8 do 2,0 ($A_{260}/A_{280}=1,8-2,0$).

3.2.2. PCR - LANČANA REAKCIJA POLIMERIZACIJE

PCR reakcija predstavlja *in vitro* amplifikaciju određenog segmenta DNK molekula. Sam proces amplifikacije zasniva se na upotrebi oligonukleotidnih sekvenci, tzv. prajmera (oko 20 nukleotida) koji se po principu komplementarnosti vezuju za graničnu sekvencu segmenta koji se umnožava, dok se pod kontrolom enzima *Taq* polimeraze odvija ugradnja nukleotida u nosivost DNK lance. Putem PCR reakcije kroz sukcesivnu smenu 35-40 ciklusa, dolazi do sinteze od 10^6 - 10^9 kopija

željenog segmenta DNK. Svaki ciklus čine tri faze koje se odvijaju na određenim temperaturama: denaturacija DNK, hibridizacija prajmera, i elongacija-sinteza novih lanaca DNK.

PCR reakcije su urađene u PeqStar PCR aparatu. Reakcionu smešu PCR reakcije, volumena 25 μ l, činile su sledeće komponente: 2,5 μ l 10xPCR buffer (*Fermentas*, Nemačka), 2,5 μ l 25mM MgCl₂, 0,5 μ l 10mM dNTPs, po 2,5 μ l F i R prajmera 5 μ M, 1 μ l DMSO (*Serva*, Nemačka), 1U Taq polimeraze, 3 μ l DNK (300ng), i 10,5 μ l dH₂O.

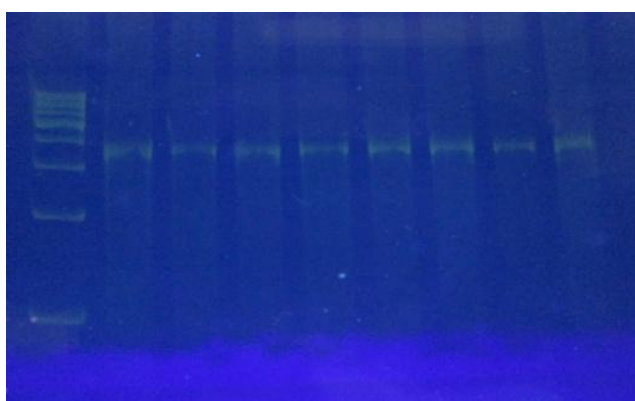
Sekvence prajmera korišćenih u PCR-u, temperaturni profil reakcija i dužine amplifikovanih fragmenata date su u Tabeli 1.

Tabela 1. Sekvence prajmera, temperaturni profil i veličine PCR produkata

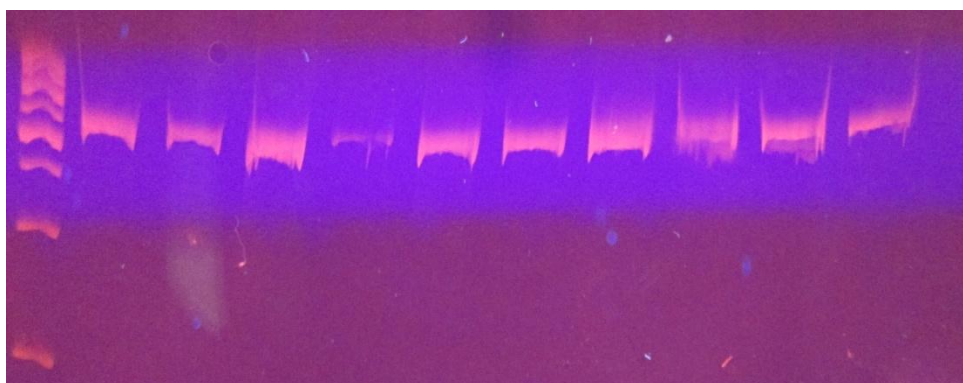
Geni	Prajmeri	Temperaturni profil	PCR produkt
WNT10A, egzon 2	F, 5' CCGTTGGGACAGAGTGTGTG 3' R, 5' CAGCTTGAGGCAGTGGGTTAG 3'	95 ⁰ C 3min.	441bp.
WNT10A, egzon 3	F, 5' GGGCTTCAGTTTCTCCTTGG 3' R, 5'AGCAACGTGGTCCTCAGAAG 3'	95 ⁰ C 45s, 55 ⁰ C 1min., 72 ⁰ C 1min., × 35 ciklusa	570bp.
RUNX2, egzon 3	F, 5' CCGGCAAAATGAGCGACG 3' R, 5' GTAAGAGGCTACACCGCCC 3'	72 ⁰ C 5min	336bp.
RUNX2, egzon 4	F, 5' CAGATGCTTCATTCTGTCGG 3' R, 5' CTAGTCTGTATACAAATCAGCAC 3'		391bp.

Uspešnost PCR reakcije proverena je elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu (PAA). PAA gel je dobijen putem polimerizacije akrilamida i bisakrilamida u prisustvu APS-a (amonijumpersulfat) i TEMED-a (tetrametiletilendiamin). Nakon nanošenja 8 μ l amplifikata na gel, u kolu jednosmerne struje na 100V, dolazi do

migracije PCR produkta u zavisnosti od njihove dužine (manji fragmenti se breže kreću i pozicioniraju niže na gelu). Poređenjem sa tzv. markerom (lestvicom DNK fragmenata) određuje se specifičnost PCR produkta. Nakon elektroforeze, vizuelizacija PCR produkata izvršena je bojenjem sa etidijum-bromidom (EtBr) koji se interkalira u DNK. Izlaganje obojenog PAA gela UV svetlu (talasne dužine, $\lambda=254$ nm) na transiluminatoru, apsorbirana svetlost od strane DNK molekula prenosi se na EtBr koji reemituje (fluorescira) svetlost na višoj talasnoj dužini ($\lambda=590$ nm), kada se uočava narandžasto-crvena obojena traka DNK na gelu. (Slike 7 i 8)



Slika 7. RUNX2, egzon 3; PCR produkt-336bp.



Slika 8. WNT10A, egzon 3, PCR produkt-570bp.

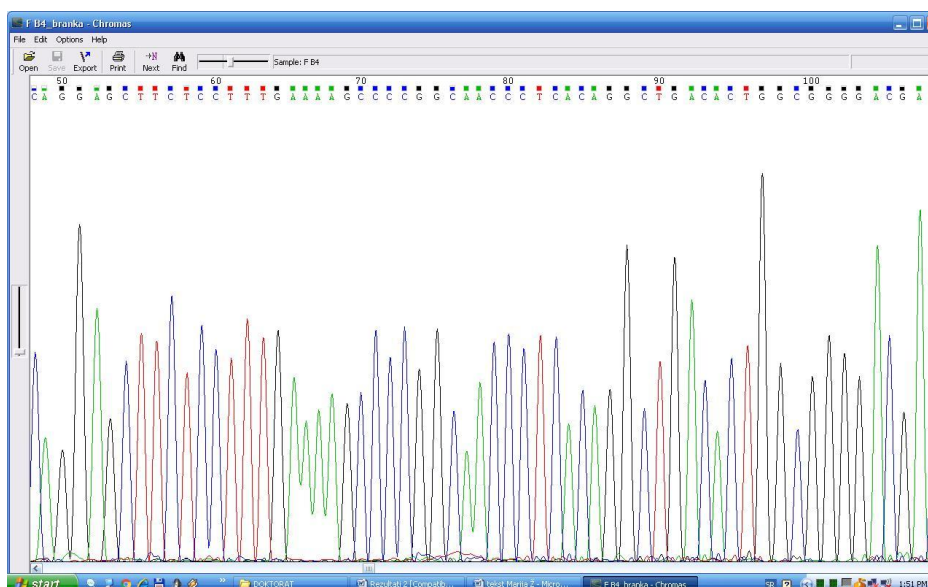
3.2.3. METOD SEKVENCIRANJA

Sa ciljem da se odredi mutacioni status analiziranih egzona WNT10A i RUNX2 gena, primenjena je metoda direktnog sekvenciranja, tj. određivanje nukleotidnog sastava DNK sekvence.

Princip direktnog sekvenciranja zasniva se na separaciji fluorescentno obeleženih DNK fragmenata putem kapilarne elektroforeze i softverskom beleženju tipa florescentnog signala. Sama kapilarna elektroforeza bazira se na korišćenju polimera kroz koji migriraju DNK fragmenti u funkciji dužine, tako da je moguće razlikovati fragmente koji se vrlo malo razlikuju u dužini (samo 1bp). Fragmenti koji se razdvajaju obeleženi su jednom od četiri fluorescentne boje. Na donjem delu kapilare fragmenti prolaze kroz prozor za detekciju, gde se pobuđuju laserskim zrakom, pri čemu ekscitovana boja emituje svetlost talasne dužine karakteristične za jednu od boja. Svetlost emitovanu od strane boja detektuje CCD kamera, koja beleži specifičan fluorescentni signal, a odgovarajući softver prikuplja podatke o tipu, redosledu i intenzitetu signala.

U ovoj studiji primenjena je tehnologija sekvenciranja pod nazivom *Dye-terminator* sekvenciranje, koja se bazira na Sangerovoj metodi sekvenciranja. Sam Sangerov metod sekvenciranja podrazumeva izvođenje četiri nezavisne PCR reakcije, jer se svakoj od reakcija pored komponenti: DNK matrice, DNK polimeraze, dNTP miksa (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), nezavisno dodaje samo jedan od dideoksiribonukleotid trifosfata (ddATP, ddGTP, ddCTP ili ddTTP). Tokom komplementarnog povezivanja nukleotida, prilikom ugradnje ddNTP po principu slučajnosti, polimerizacija se završava, tako da se u svakoj reakcionoj smeši nalazi miks fragmenta različite dužine, koji se uvek završavaju istom bazom (adenin, guanin, citozin, timin). Istovremenim razdvajanjem fragmenata na denaturišućem PAA gelu, rezultat svake od četiri reakcije se predstavlja kao niz traka po opadajućoj veličini (od vrha ka dnu) u četiri staze. Čitanjem pozicija traka (baza) od dna ka vrhu, određuje se nukleotidni sastav analiziranog fragmenta.

Modifikovani metod sekvenciranja, *Dye-terminator*, zasniva se na korišćenju fluorescentno obeleženih ddNTP, koji se zajedno sa neobebeženim dNTP ugrađuju po principu koplementarnosti i slučajnosti, u jednoj istoj PCR reakciji. Svakim terminalnim vezivanjem fluorescentno obeleženih ddNTP, zaustavlja se dalja ugradnja nukleotida. Kao rezultat PCR reakcije za sekvenciranje, u reakcionoj smeši se nalazi skup DNK fragmenata različite dužine, koji na svojim krajevima imaju jedan od četiri bojama obeležene ddNTP. Dobijeni fragmenti se nanose na kapilarnu elektroforezu u automatski DNK sekvenator, sa ciljem sa se razdvoje, pri čemu se redosled registrovnja fluorescentni signala, beleži u vidu elektroferograma. (Slika 9)



Slika 9. Elektroferogram

3.2.3.1. Priprema uzoraka za reakciju sekvenciranja

Nakon klasičnog PCR-a, amplifikati se prečišćavaju od neugrađenih prajmera i dNTP. Za prečišćavanje se koriste dva enzima: *Exonuclease I* (Exo I) (*Fermentas*, Nemačka) i *Shrimp alkaline phosphatase* (SAP) (*Fermentas*, Nemačka). Exo I degradira prajmere, dok SAP odvaja fosfatne grupe sa nukleotida. Za samu reakciju uzeto je 5 μ l PCR produkta, 10 U Exo I i 2 U SAP enzima. Zatim se reakciona smeša inkubira na 37 $^{\circ}$ C, 15 min., pa se potom na 80 $^{\circ}$ C, 15 min. inaktiviraju enzimi.

3.2.3.2. Priprema reakcione smeše za sekvenciranje

Za reakciju sekvenciranja korišćen je *BigDye Terminator Ready Reaction* kit (*Applied Biosystems*, USA). U plejtove (96X) uneta je reakciona smeša za sekvenciranje i prečišćen PCR produkt, da bi se korišćenjem samo jednog prajmera (F-uzvodni ili R-nizvodni) očitala sekvenca. Reakcija sekvenciranja je sprovedena u GeneAmp® PCR System 9700 (*Applied Biosystems*, USA) PCR mašini.

Tabela 2. Protokol za reakciju sekvenciranja
BigDye Terminator Ready Reaction kitom

KOMPONENTE	KOLIČINA
<i>Ready Reaction Premix v3.1 (2,5x)</i>	0,5 µl
<i>5xPCR Buffer</i>	1,5 µl
Prajmer (10 pmol/µl)	0,4 µl
PCR produkt	1 µl
dH₂O	6,6 µl
	10 µl

Tabela 3. Temperaturni protocol PCR reakcije za sekvenciranje

PCR reakcija za sekvenciranje
96°C 1 min.
96°C 10s., 50°C 5s., 60°C 4min., X 25ciklusa
4°C

3.2.3.3. Prečišćavanja PCR produkata reakcije sekvenciranja

Nakon PCR reakcije za sekvenciranje, amplifikati se prečišćavaju od ostataka fluorescentno obeleženih ddNTP-ova. Na ovaj način se sprečava registrovanje dodatnog fluorescentnog signala koji potiče od neugrađenih ddNTP-ova. Sam postupak prečišćavanja se sastoji od precipitacije PCR produkata u prisustvu etanola i Na-acetata. Neugrađeni ddNTP-ovi tokom prečišćavanja ostaju u vodenom rastvoru. Nakon etanol/Na-acetat precipitacije sledi rastvaranje fluorescentno obeleženih DNK fragmenata u denaturišućem agensu (formamidu), a zatim njihovo podvrgavanje denaturaciji. U denaturisanom stanju, jednolančani DNK fragmenti se nanose na kapilarnu elektroforezu.

Tabela 4. Postupak prečišćavanja PCR produkata reakcije sekvenciranja

1.	<u>Na 10 μl PCR produkta dodati:</u> -10 μ l dH ₂ O -2 μ l 3M Na-acetata -50 μ l 99% C ₂ H ₅ OH	Inkubacija 15 min. na sobnoj temperaturi
2.	Centrifugirati plejt; 15 min. na 13000 rpm. (Centrifuge 5804 R, rotor FA-45-30-11, <i>Eppendorf</i> , Nemačka)	Odbaciti supernatant
3.	Dodati: - 9,8 μ l 70% C ₂ H ₅ OH - 4,2 μ l dH ₂ O	Centrifugirati plejt, 10 min. 13000; odbaciti supernatant; osušiti precipitat 2 min. 90 ⁰ C
4.	Dodati 20 μ l dejonizovanog formamida (HiDi Formamide, <i>Applied Biosystems</i> , USA)	Vorteksovati; denaturisati 2 min. 95 ⁰ C; držati na ledu

3.2.3.4. Kapilarna elektroforeza produkata reakcije sekvenciranja na automatskom sekvencatoru

Kapilarna elektroforeza sprovedena je na aparatu ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (*AppliedBiosystems*, USA), dok je prikupljanje fluorescentnih signala, „sirovih“ podataka (eng. *Raw data*) urađeno primenom 310 Data Collection softvera (*AppliedBiosystems*, USA).

Za elektroforezu je korišćen polimer POP6 (*AppliedBiosystems*, USA) i kapilara od 47 cm, dok je elektroforeza vršena na 15kV i 50⁰C (*Run module Seq POP6 Rapid 1ml E.md*).

3.2.3.5. Analiza sekvenci dobijenih automatskim sekvenciranjem

Prikupljeni podaci tokom kapilarne elektroforeze od strane 310 Data collection softvera, obrađeni su programom Sequencing Analysis v5.3.1 (*AppliedBiosystems*, USA). Dobijene sekvence analizirane se putem njihovog poređenja sa *wt* sekvencama (eng. *wild type*, "normalne") koje su preuzete iz Ensembl baze podataka (<http://www.ensembl.org/index.html>), pomoću Demo softvera, Sequencher 4.10.1 (*Gene Codes Corporation*, USA).

Sve promene u analiziranim sekvencama su poređene sa bazama podataka, sa ciljem da se utvrdi da li su već opisane, kao i da se odredi njihov patološki značaj. Korišćene su dve najveće baze podataka: dbSNP v135 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) i HGMD (eng. *The Human Gene Mutation Database*, <http://www.hgmd.org>).

Potencijalni patološki značaj detektovanih promena je predviđan i *in silico*, korišćenjem MutationTaster softvera (<http://www.mutationtaster.org>). Ovim programom se predviđa da li je testirana promena sekvence mutacija koja dovodi do oboljevanja ili benigni polimorfizam.

IV REZULTATI

4.1. REZULTATI KLINIČKIH ISTRAŽIVANJA

Dobijeni rezultati kliničkih istraživanja su predstavljani u Tabelama 5-8 i Grafikonima 1-11.

Analiza rezultata merenja veličine zuba u eksperimentalnoj grupi urađena je nakon dva merenja. Vrednosti date u tabelama za eksperimentalnu grupu predstavljaju prosečne vrednosti dva merenja. Vrednosti za svaki zub u tabelama predstavljaju srednje vrednosti za zube leve i desne strane. Merenja u kontrolnoj grupi rađena su samo jednom jer se greška izražava stotim delovima milimetra i smatra se klinički irelevantnom.

Greške u merenju meziodistalnih širina zuba gornje i donje vilice u eksperimentalnoj grupi, izražene su u stotim delovima milimetra, tako da se mogu smatrati klinički irelevantnim.

Generalno gledano sve vrednosti meziodistalnih širina merenih zuba eksperimentalne grupe su bile manje od meziodistalnih širina zuba kontrolne grupe.

Srednje vrednosti meziodistalnih širina, svih analiziranih zuba u gornjoj vilici eksperimentalne grupe, osim očnjaka, bile su statistički značajno manje od srednjih vrednosti u kontrolnoj grupi. (Tabela 5, Grafikon 1).

Takođe, sve srednje vrednosti izmerenih meziodistalnih širina zuba eksperimentalne grupe u donjoj vilici, bile su sa statističkom značajnošću manje od meziodistalnih širina zuba kontrolne grupe. (Tabela 6, Grafikon 2)

Analiza srednjih vrednosti meziodistalnih širina zuba eksperimentalne grupe, u gornjoj vilici, nije pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na pol, osim kod drugog premolara. (Tabela 7, Grafikon 4)

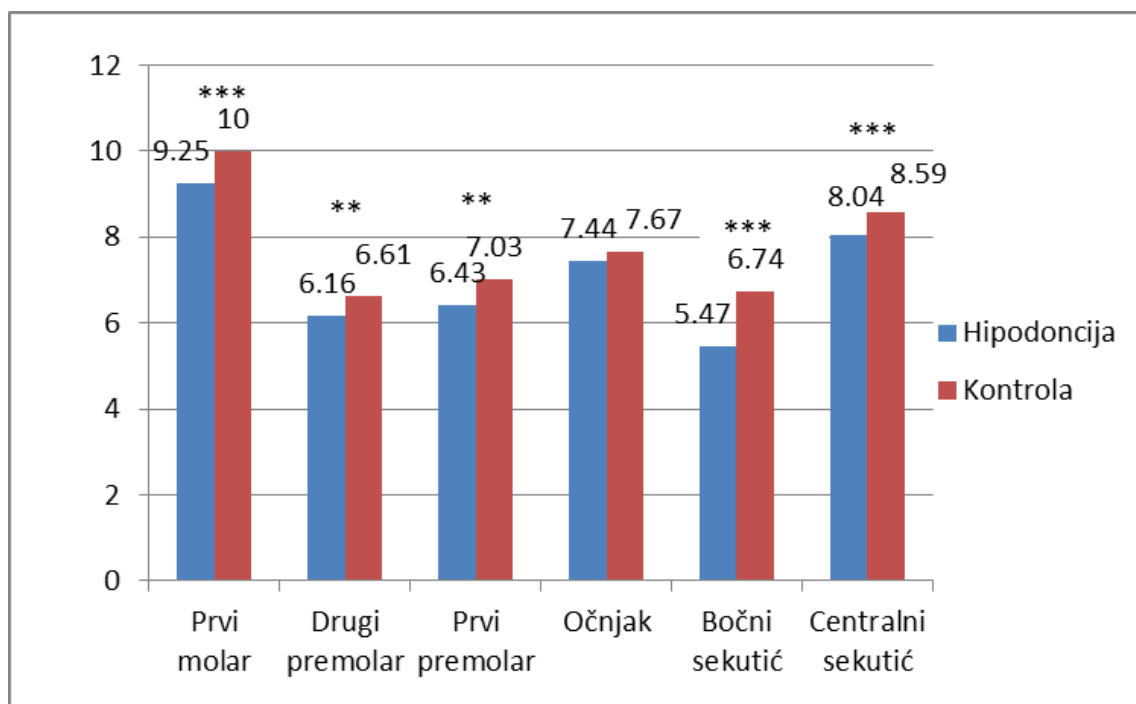
Takođe, analiza srednjih vrednosti meziodistalnih širina zuba u eksperimentalnoj grupi, u donjoj vilici, pokazala je da su zubi kod muškaraca sa hipodoncijom uglavnom

nešto većih dimenzija nego kod osoba ženskog pola, ali ove vrednosti nisu polazale statističku značajnost, osim kod očnjaka. (Tabela 8, Grafikon 4)

Tabela 5. Srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba eksperimentalne i kontrolne grupe u gornjoj vilici

Zub	Grupa	N	\bar{x} (mm)	SD	p
Prvi molar	Hipodoncija	24	9.25	.59	<0.001***
	Kontrola	25	10.00	.53	
Drugi premolar	Hipodoncija	13	6.16	.43	.003**
	Kontrola	25	6.61	.42	
Prvi premolar	Hipodoncija	21	6.43	.46	.001**
	Kontrola	14	7.03	.44	
Očnjak	Hipodoncija	15	7.44	.54	.114
	Kontrola	25	7.67	.38	
Bočni sekutić	Hipodoncija	13	5.47	.74	<0.001***
	Kontrola	25	6.74	.48	
Centralni sekutić	Hipodoncija	25	8.04	.45	<0.001***
	Kontrola	25	8.59	.48	

p<0.01=**, p<0.001=***

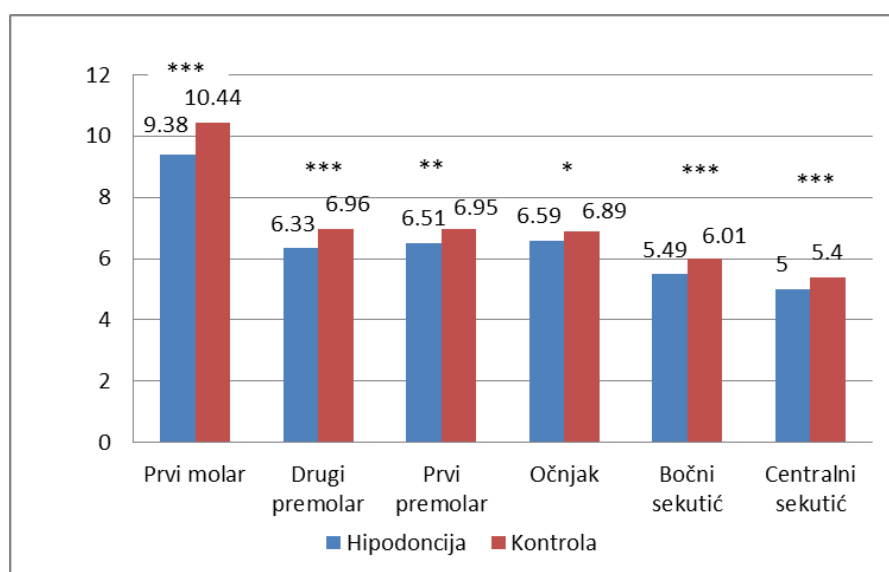


Grafikon 1. Srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba eksperimentalne i kontrolne grupe u gornjoj vilici

Tabela 6. Srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba eksperimentalne i kontrolne grupe u donjoj vilici

Zub	Grupa	N	\bar{x} (mm)	SD	p
Prvi molar	Hipodoncija	24	9.38	.72	<0.001***
	Kontrola	24	10.44	.58	
Drugi premolar	Hipodoncija	12	6.33	.42	<0.001***
	Kontrola	25	6.96	.48	
Prvi premolar	Hipodoncija	19	6.51	.57	.006**
	Kontrola	21	6.95	.39	
Očnjak	Hipodoncija	20	6.59	.51	.029*
	Kontrola	25	6.89	.38	
Bočni sekutić	Hipodoncija	25	5.49	.38	<0.001***
	Kontrola	25	6.01	.32	
Centralni sekutić	Hipodoncija	24	5.00	.40	<0.001***
	Kontrola	25	5.40	.27	

* $p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$, $p < 0.001 = ***$

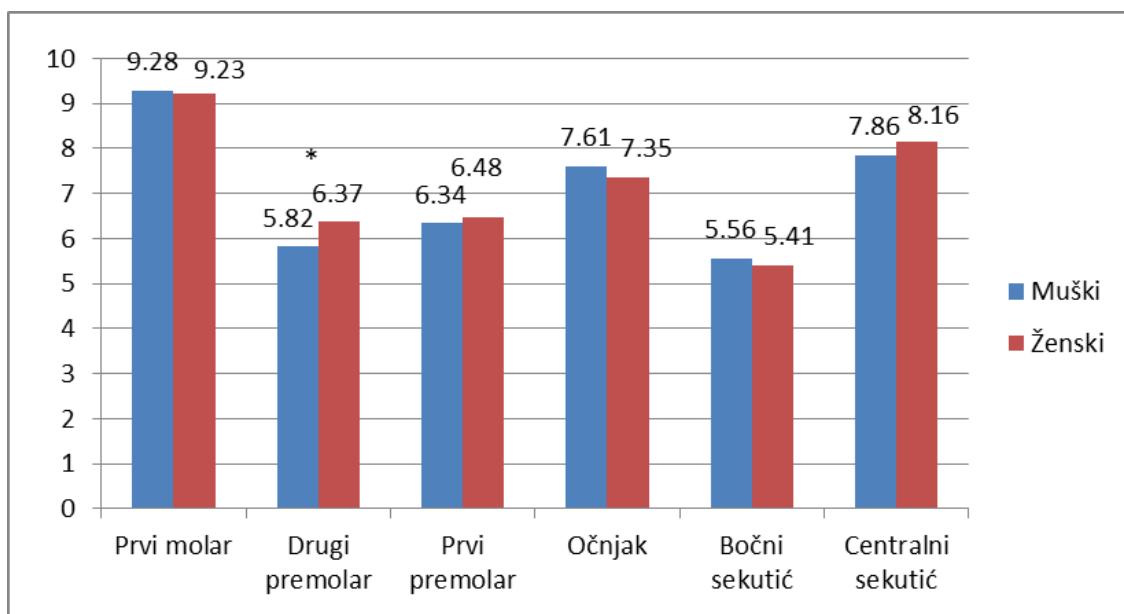


Grafikon 2. Srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba eksperimentalne i kontrolne grupe u donjoj vilici

Tabela 7. Srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba eksperimentalne grupe u gornjoj vilici u odnosu na pol

Zub	Pol	N	\bar{x} (mm)	SD	p
Prvi molar	Muški	9	9.28	.68	.841
	Ženski	15	9.23	.55	
Drugi premolar	Muški	5	5.82	.30	.018*
	Ženski	8	6.37	.37	
Prvi premolar	Muški	7	6.34	.25	.541
	Ženski	14	6.48	.53	
Očnjak	Muški	5	7.61	.69	.397
	Ženski	10	7.35	.47	
Bočni sekutić	Muški	5	5.56	.61	.753
	Ženski	8	5.41	.85	
Centralni sekutić	Muški	10	7,86	.45	.104
	Ženski	15	8.16	.43	

p<0.05

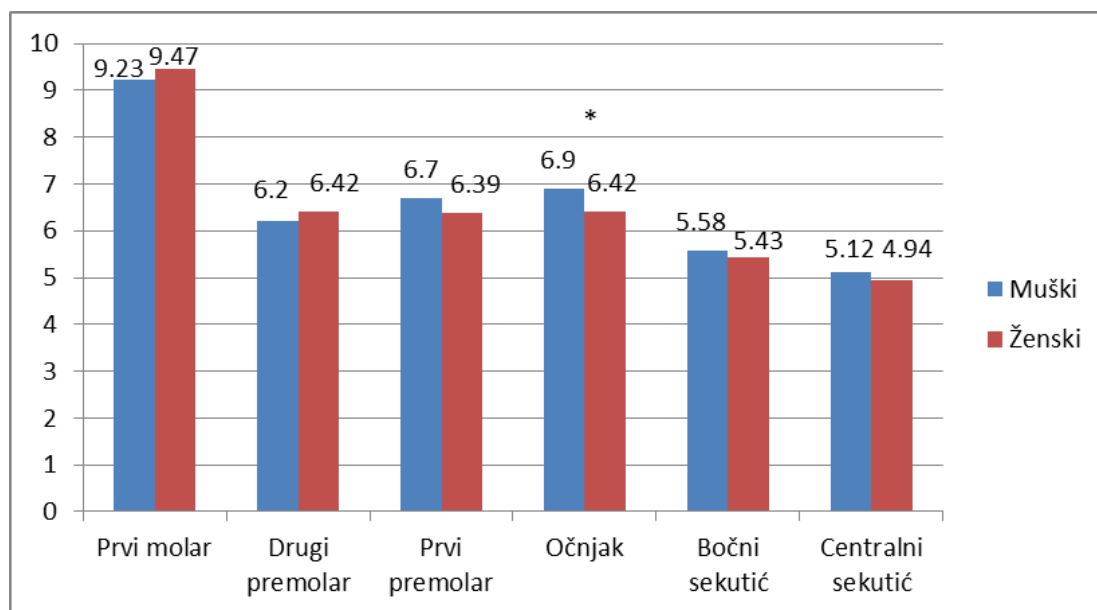


Grafikon 3 .Srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba eksperimentalne grupe u gornjoj vilici u odnosu na pol

Tabela 8.Srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba eksperimentalne grupe u donjoj vilici u odnosu na pol

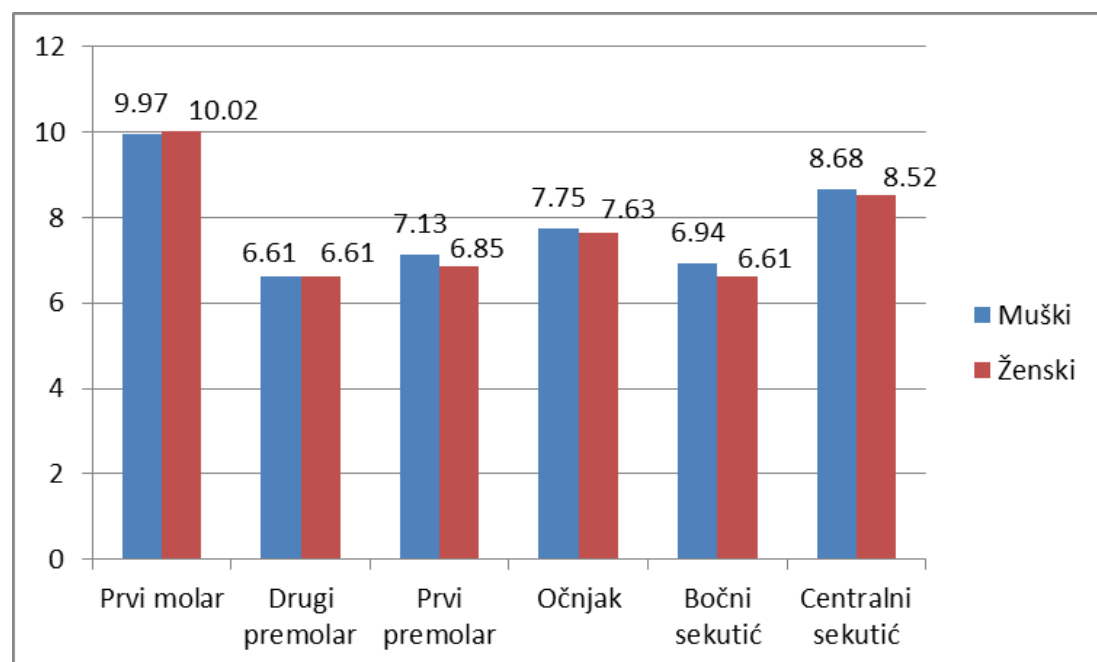
Zub	Pol	N	\bar{x}	SD	p
Prvi molar	Muški	9	9.23	.96	.434
	Ženski	15	9.47	.55	
Drugi premolar	Muški	5	6.20	.21	.395
	Ženski	7	6.42	.52	
Prvi premolar	Muški	7	6.70	.70	.265
	Ženski	12	6.39	.48	
Očnjak	Muški	7	6.90	.48	.040*
	Ženski	13	6.42	.46	
Bočni sekutić	Muški	10	5.58	.40	.312
	Ženski	15	5.43	.36	
Centralni sekutić	Muški	9	5.12	.48	.304
	Ženski	15	4.94	.35	

*p<0.05

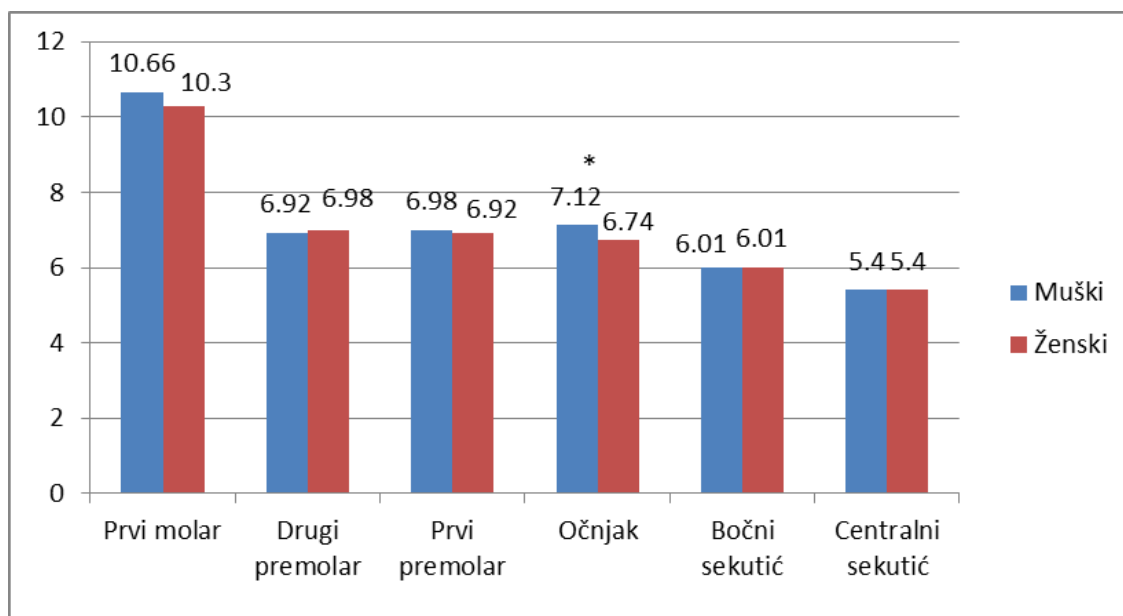


Grafikon 4. Srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba eksperimentalne grupe u donjoj vilici u odnosu na pol

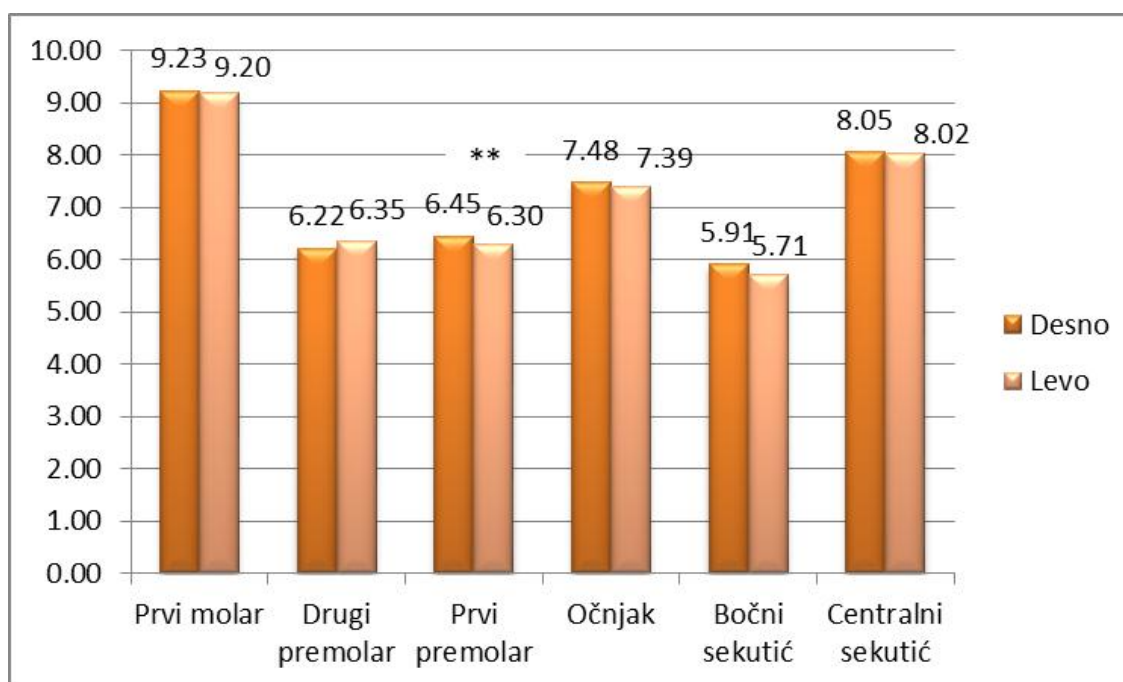
Srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba kontrolne grupe, u odnosu na pol, u gornjoj i donjoj vilici, nisu pokazale su značajnu razliku, izuzev očnjaka u donjoj vilici ($p=0.012$). (Grafikon 5 i 6)



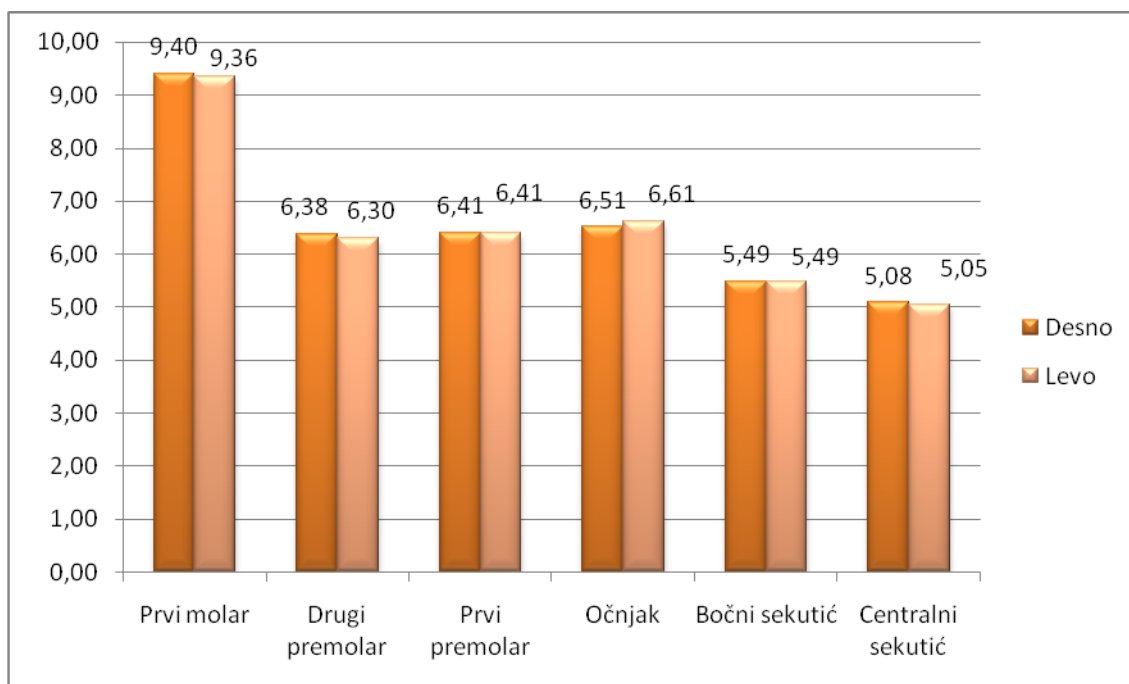
Grafikon 5. Srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba kontrolne grupe u gornjoj vilici u odnosu na pol



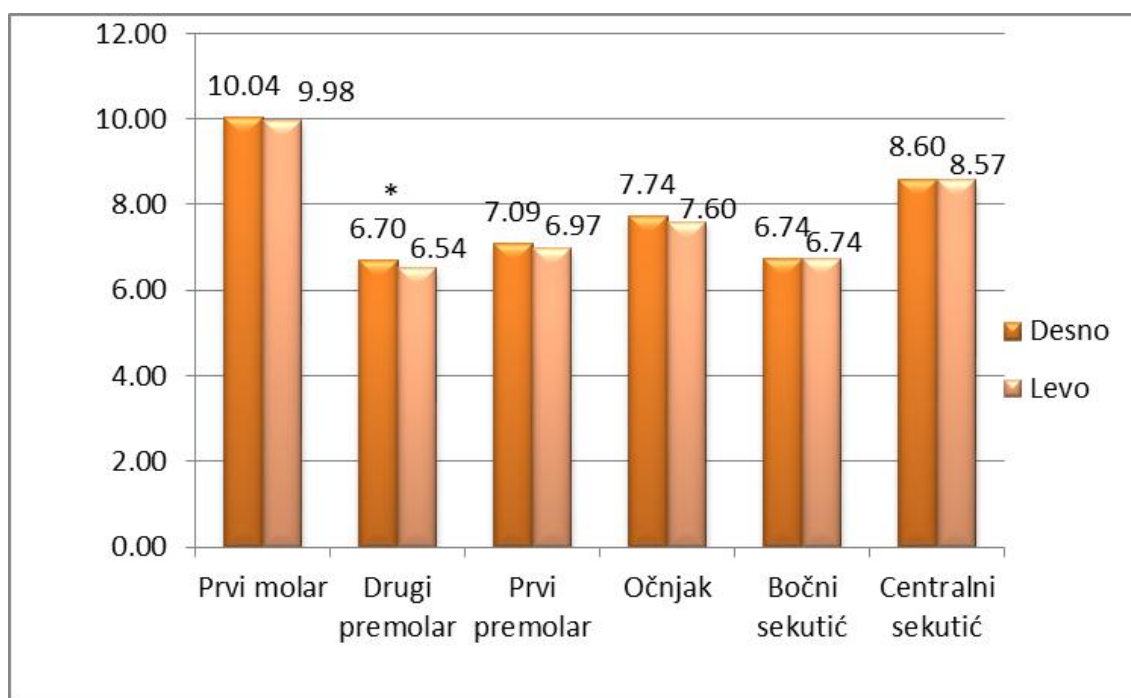
Grafikon 6. Srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba kontrolne grupe u donjoj vilici u odnosu na pol



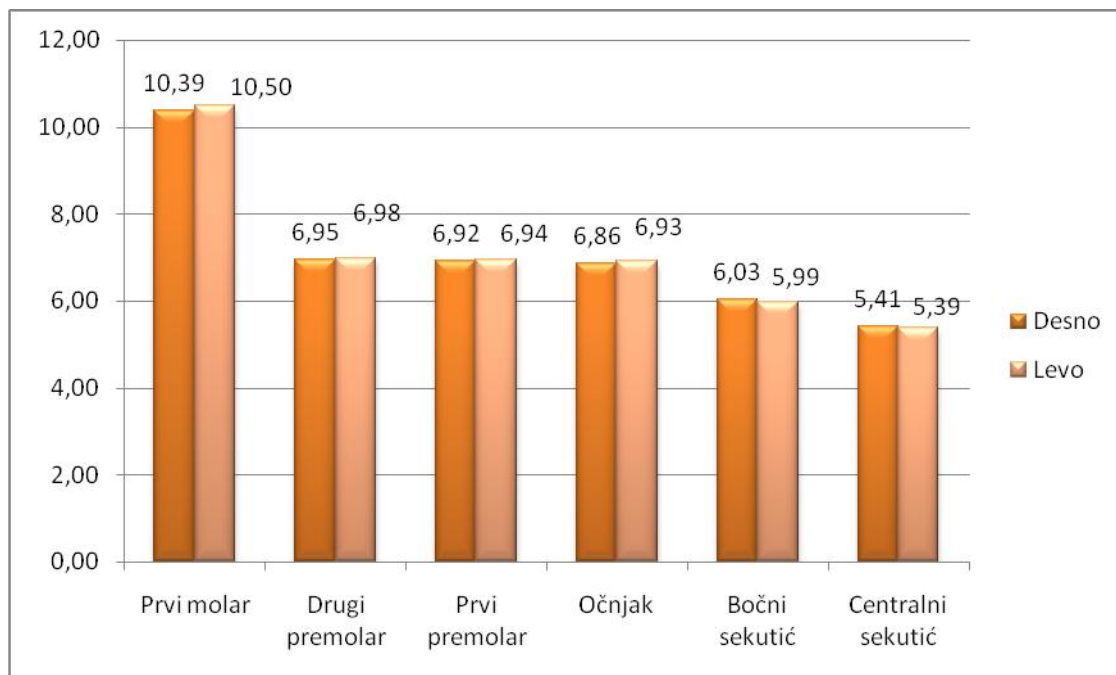
Grafikon 7. Grafički prikaz srednjih vrednosti meziodistalnih širina pojedinačnih zuba eksperimentalne grupe u gornjoj vilici sa leve i desne strane



Grafikon 8. Grafički prikaz srednjih vrednosti meziodistalnih širina pojedinačnih zuba eksperimentalne grupe u donjoj vilici sa leve i desne strane

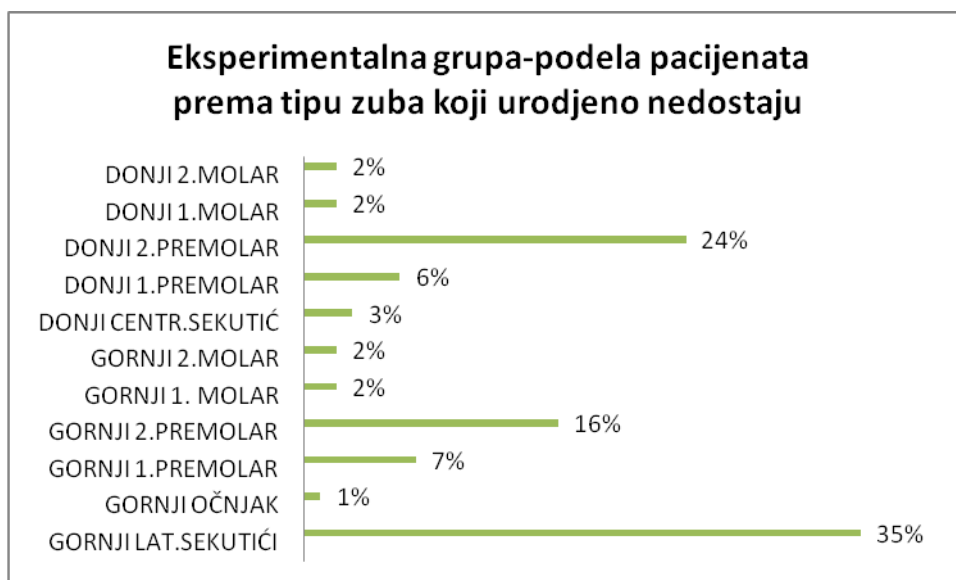


Grafikon 9. Grafički prikaz srednjih vrednosti meziodistalnih širina pojedinačnih zuba kontrolne grupe u gornjoj vilici sa leve i desne strane



Grafikon 10. Grafički prikaz srednjih vrednosti meziodistalnih širina pojedinačnih zuba kontrolne grupe u donjoj vilici sa leve i desne strane

U eksperimentalnoj grupi 20 pacijenata imalo je hipodonciju (urođjeni nedostatak 1 do 6 zuba), dok je 5 pacijenata imalo oligodonciju (nedostatak od 6 do 12 zuba). Prosečan broj zuba koji nedostaju u grupi sa hipodoncijom bio je 2.25, dok je u grupi sa oligodoncijom taj broj bio 8.2. U celoj eksperimentalnoj grupi prosečan broj zuba koji nedostaju bio je 3.44. Zastupljenost vrsta zuba koji su urođeno nedostajali u eksperimentalnoj grupi prikazan je u Grafikonu 11.



Grafikon 11. Zastupljenost vrsta zuba koji su urodjeno nedostajali u grupi pacijenata sa hipodoncijom kliničkog dela istraživanja

4.2. REZULTATI MOLEKULARNO GENETIČKIH ISTRAŽIVANJA

4.2.1. Rezultati mutacione analize RUNX2 i WNT10A gena

U okviru ove studije analizirane su 24 porodice (72 ispitanika) sa registrovanim bar jednim članom koji ima urođeni nedostatak zuba. Kod 29 osoba sa potvrđenom hipodoncijom nakon kliničkog pregleda i ortopantomografskih snimaka, analiziran je mutacioni status po dva egzona u WNT10A i RUNX2 genima.

I Sekvenciranjem egzona 2, WNT10A gena, registrovane su dve nukleotidne izmene:

1. **rs10180544** (g.6573T>C, c.114-56T>C), intron 1-2.rs10180544 polimorfizam, u uzorku pacijenata sa hipodoncijom, pokazao je prisustvo nemutiranog alela u homozigotnom genotipu (TT), mutiranog alela C u heterozigotnom (TC*) i homozigotnom (C*C*) genotipu. Slika 10.
2. **rs341074983** (c.337C>T [CGC→TGC], p.Arg113Cys) "missense" mutacija.CC ("wild type"), CT*(heterozigot). Slika 11.

II Sekvenciranjem egzona 3, WNT10A gena, registrovane su tri nukleotidne izmene:

1. **rs121908120** (c.682T>A [TTT→ATT], p.Phe228Ile) "missense" mutacijaTT ("wild type"), TA*(heterozigot), A*A*(mutirani homozigot). Slika 12.
2. **rs77583146** (c.493G>A [GGG→AGG],p.Gly165Arg) "missense" mutacijaGG ("wild type"), GA*(heterozigot). Slika 13.
3. **rs146902156** (c.649G>A [GAC→AAC], p.Asp217Asn) "missense" mutacijaGG ("wild type"), GA*(heterozigot). Slika 14.

III Sekvenciranjem egzona 3, RUNX2 gena, uočene su četiri nukleotidne izmene:

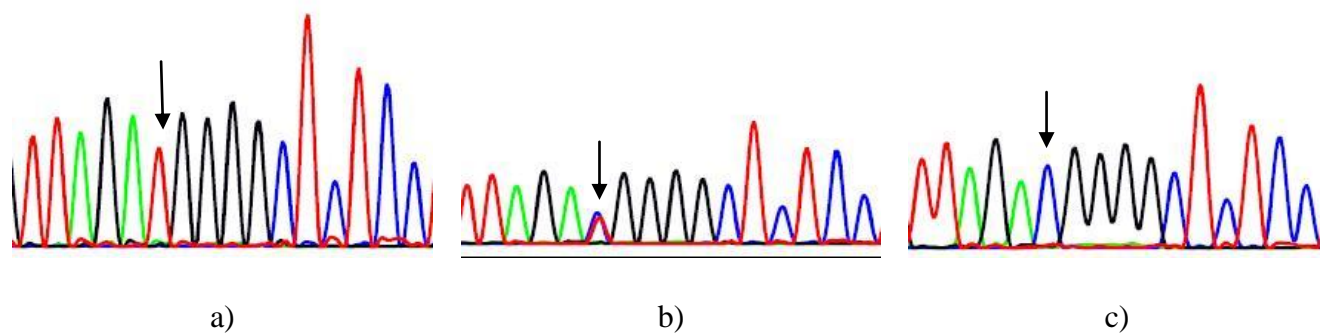
1. **rs6921145** (c.240G>A [GCG/GCA] p.Ala80)GG("wild type"), GA*(heterozigot), A*A*(mutirani homozigot). Slika 15.

2. **COSM1658842**, c.217_234del18, p.Ala84_Ala89,delAAAAAA(delecija - "In frame")GCGGCGGCGGCGGCTGCG/-del/del (homozigotna delecija), 18n/- (heterozigotna delecija). Slika 16.
3. **rs759395776**, c.174_175 insCAG, p.58_59 insGln (insercija - "In frame")- /CAG (heterozigotna insercija). Slika 17.
4. **rs768156797** c.160_180insCAGCAGCAGCAGCAACAGCAG, p. Gln65_Gln71, ins.QQQQQQ(insercija - "In frame"), -/21n (heterozigotna insercija). Slika 18.

IV Sekvenciranjem egzona 4, RUNX2 gena, uočene je jedna nukleotidna izmena:

34Ins.C u intronu 3-4. Slika 19.

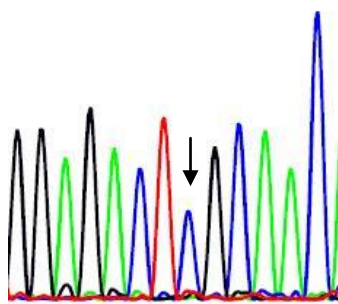
GTTAGATGGGGCTCTCC ;TTAGACGGGGCTCTCC ;TTAGACGGGGCTCTCC



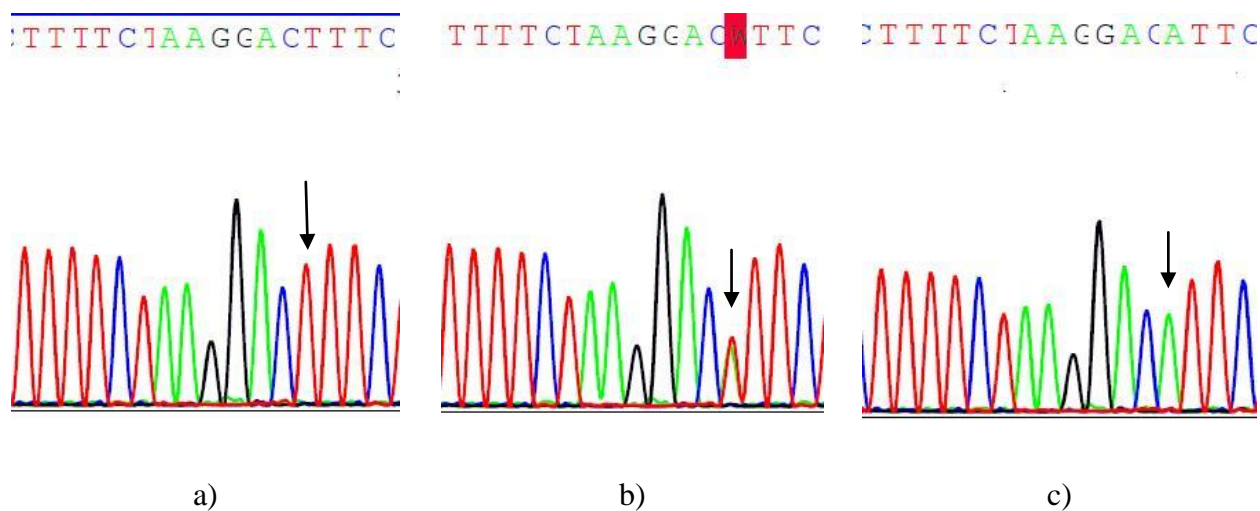
Slika 10. Sekvenca polimorfizma rs10180544 (g.6573T>C, c.114-56T>C) u intronu 2, WNT10A gena. a) TT-"wild type" b) TC* c) C*C*

GGAGACTCGCAAC

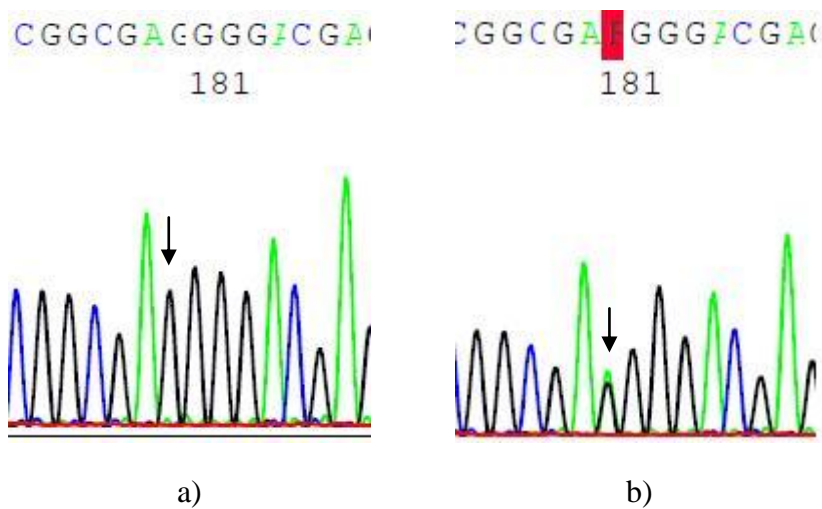
GGAGACTTGC AAC



Slika 11. Sekvenca "missense" mutacije rs.141074983, c.337C>T [CGC→TGC], u egzonu 2, WNT10A gena. a) CC-"wild type" b) CT*



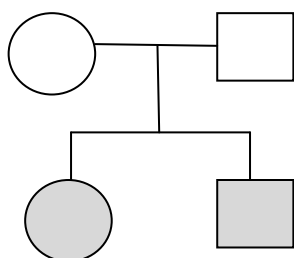
Slika 12. Sekvenca "missense" mutacije rs.121908120, c.682T>A[TTT->ATT], u egzonu 3, WNT10A gena. a) TT-"wild type" b) TA* c) A*A*



Slika 13. Sekvenca "missense" mutacije rs. 77583146, c.493G>A[GGG->AGG], u egzonu 3, WNT10A gena. a) GG-"wild type" b) GA*

4.2.2. Rodoslovna stabla porodica sa hipodoncijom

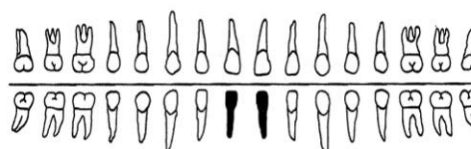
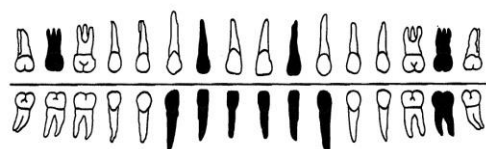
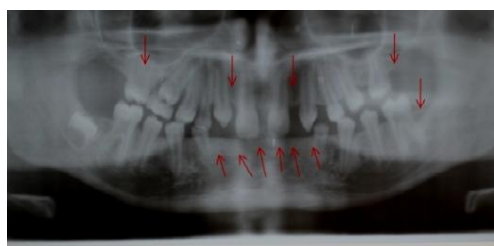
Porodica 1



Anamneza

- Roditelji negiraju prisustvo urođenog nedostatka zuba

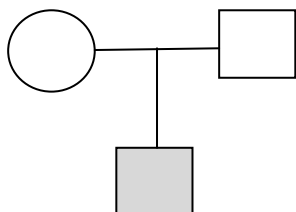
Porodica 1	WNT10A (egzon 2)	WNT10A(egzon 3) (rs121908120)	RUNX2 (egzon 3)	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	/	T/A*	/	/	/	/
MAJKA	/	T/A*	/	/	/	/
SIN	/	A*/A*	/	/	31,41	2
ĆERKA	/	A*/A*	/	/	17,12,22,27,37,33,32,31 41,42,43	11



Ćerka

Sin

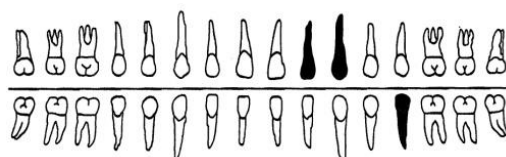
Porodica 2



Anamneza

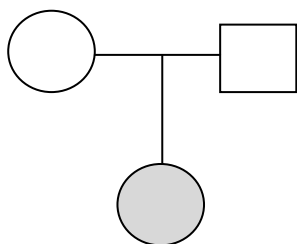
- Roditelji negiraju prisustvo urođenog nedostatka zuba

Porodica 2	WNT10A (egzon2) rs10180544	WNT10A (egzon3)	RUNX2 (egzon3) rs6921145	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	T/T	/	GG	/	/	/
MAJKA	T/C*	/	G/A*	/	/	/
SIN	T/C*	/	G/A*	/	22,23,35	3



Sin

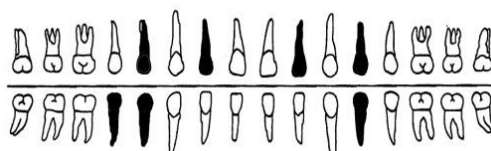
Porodica 3



Anamneza

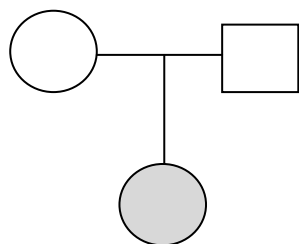
- Roditelji negiraju prisustvo urođenog nedostatka zuba

Porodica 3	WNT10A (egzon2)	WNT10A(egzon3) rs121908120	RUNX2(egzon3) rs6921145, COSM1658842	RUNX2 (egzon4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	/	/	G/A*	/	/	/
MAJKA	/	/	del/del	/	/	/
ĆERKA	/	T/A*	del/del	/	14,12,22,24,34,44,45	7



Ćerka

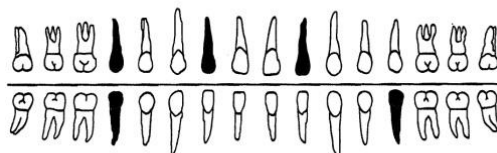
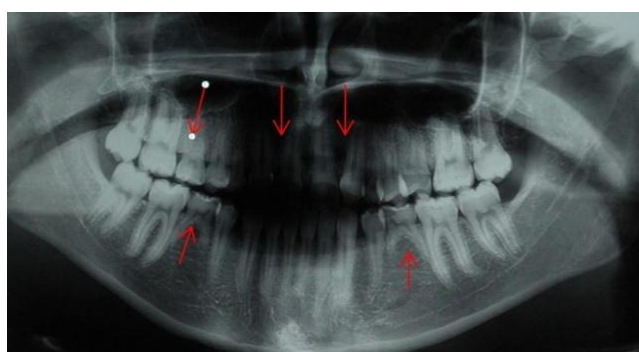
Porodica 4



Anamneza

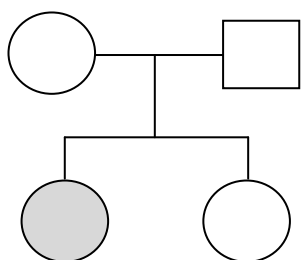
- Roditelji negiraju prisustvo urođenog nedostatka zuba

Porodica 4	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3)	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
MAJKA	/	/	/	/	/	/
ĆERKA	/	/	/	/	15,12,22,35,45	5



Ćerka

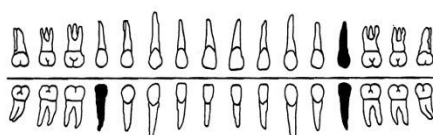
Porodica 5



Anamneza

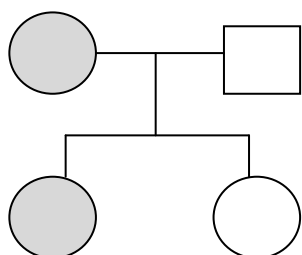
- Roditelji negiraju prisustvo urođenog nedostatka zuba

Porodica 5	WNT10A (egzon 2)	WNT10A(egzon 3) rs121908120	RUNX2 (egzon 3)	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	/	TT	/	/	/	/
MAJKA	/	T/A*	/	/	/	/
ĆERKA 1	/	T/A*	/	/	25,35,45	3
ĆERKA 2	/	TT	/	/	/	11



Ćerka 1

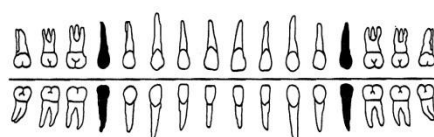
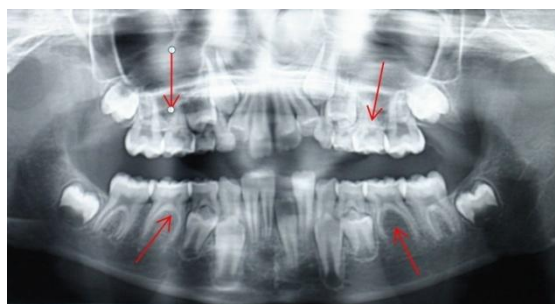
Porodica 6



Anamneza

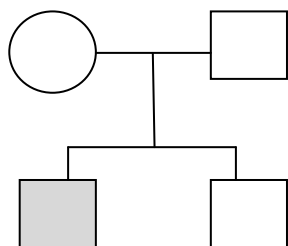
- Otac negira postojanje urođenog nedostatka zuba, majka navodi urođeni nedostatak 1 zuba

Porodica 6	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3)	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	/	/	/	/	/	/
MAJKA	/	/	/	/	45	1
ĆERKA 1	/	/	/	/	15,25,35,45	4
ĆERKA 2	/	/	/	/	/	/



Ćerka 1

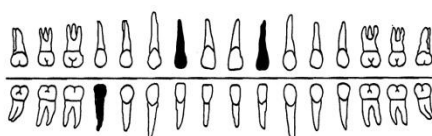
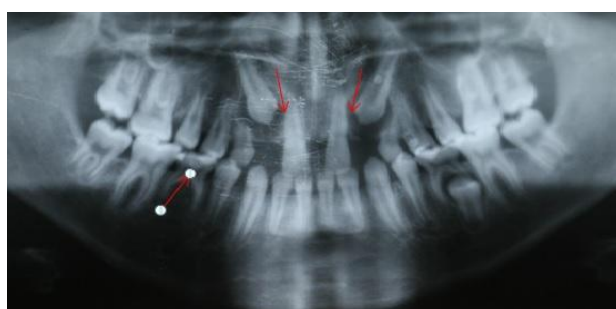
Porodica 7



Anamneza

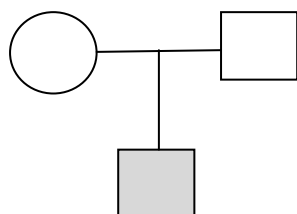
- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 7	WNT10A(e gzon 2) rs10180544	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3) rs6921145 rs768156797	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	T/T	/	G/A*	/	/	/
MAJKA	T/C*	/	-/21n	/	/	/
SIN1	T/C*	/	-/21n	/	12,22,45	3
ĆERKA 2	/	/	/	/	/	



Sin 1

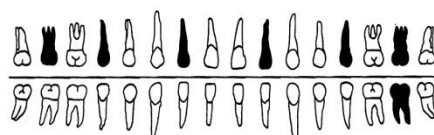
Porodica 8



Anamneza

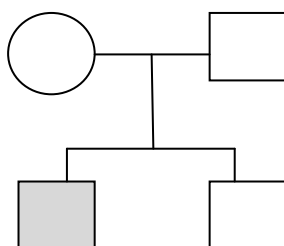
- Otac negira postojanje urođenog nedostatka zuba
- Majka navodi urođeni nedostatak jednog zuba

Porodica 8	WNT10A (egzon 2) 1. rs10180544 2. rs141074983	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3) rs6921145	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	1.TT 2. CC	/	A*A*	/	/	/
MAJKA	1.T/C* 2. C/T*	/	/	/	45	1
SIN	1.TT 2. C/T*	/	A*A*	/	17,15,12,22,25,27,3 7	7



Sin

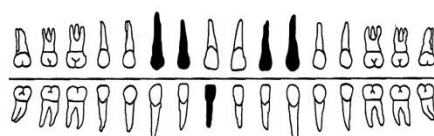
Porodica 9



Anamneza

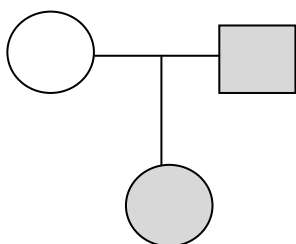
- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 9	WNT10A (egzon 2) rs10180544	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3) COSM1658842	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	T/C*	/	GG	/	/	/
MAJKA	TT	/	18n/-	/	/	/
SIN1	T/C*	/	18n/-	/	13,12,22,23,41	5
SIN2	T/C*	/	GG	/	/	/



Sin 1

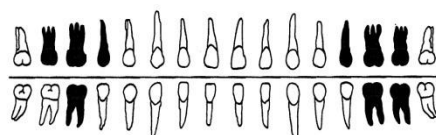
Porodica 10



Anamneza

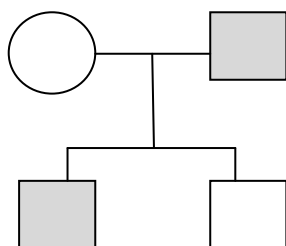
- Otac navodi postojanje urođenog nedostatka 8 zuba (potvrđeno kliničkim pregledom)

Porodica 10	WNT10A (egzon 2) rs10180544	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3) rs6921145	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	T/C*	/	/	/	17,16,15,25,26,27,3 7,46	8
ĆERKA	TT	/	A*/A*	/	17,16,15,25,26,27,3 6,37,46	9



Ćerka

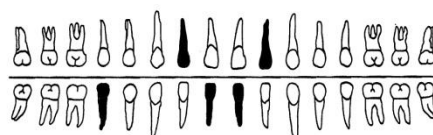
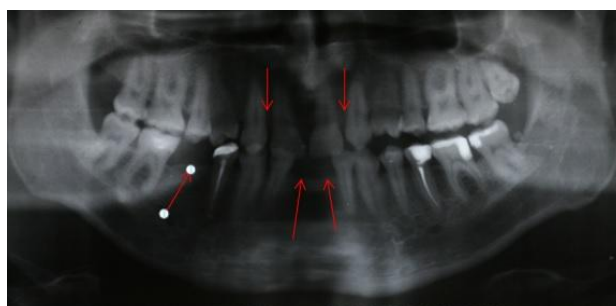
Porodica 11



Anamneza

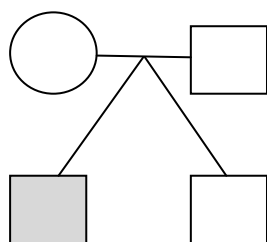
– Otac navodi urođeni nedostatak 2 zuba

Porodica 11	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3) rs146902156	RUNX2 (egzon 3) rs6921145	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	/	G/A*	G/A*	/	34,35	2
SIN	/	G/A*	GG	/	12,22,31,41,45	5



Sin

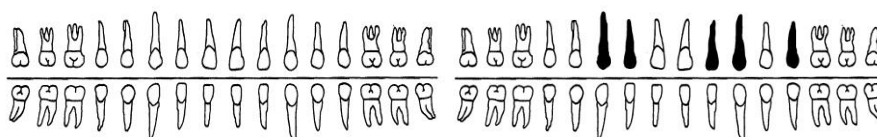
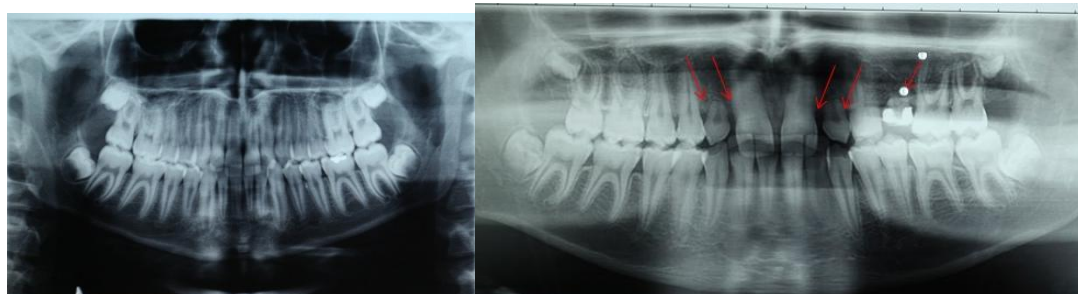
Porodica 12



Anamneza

- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

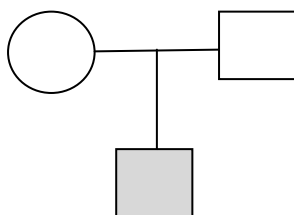
Porodica 12	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3) rs77583146	RUNX2 (egzon 3) COSM1658842	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	/	G/A*	del/del	/	/	/
MAJKA	/	GG	del/del	/	/	/
SIN1	/	G/A*	del/del	/	/	/
SIN2	/	G/A*	del/del	/	12,13,22,23,25	5



Sin1

Sin2

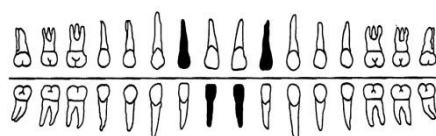
Porodica 13



Anamneza

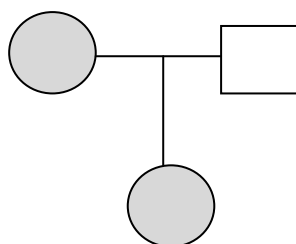
- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 13	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3) rs6921145 COSM1658842	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	/	/	del/del	/	/	/
MAJKA	/	/	A*/A*	/	/	/
SIN	/	/	del/del	/	12,22,31,41	4



Sin

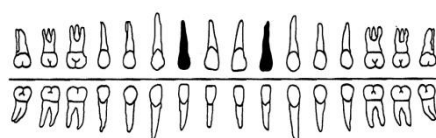
Porodica 14



Anamneza

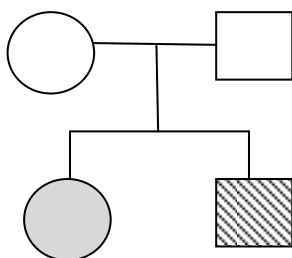
- Otac negira postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 14	WNT10A (egzon 2) rs10180544	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon3) COSM1658842	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	TT	/	del/del	/	/	/
MAJKA	C*/C*	/	18n/-	/	12,22	2
ĆERKA	T/C*	/	del/del	/	12,22	2



Ćerka

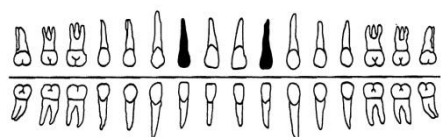
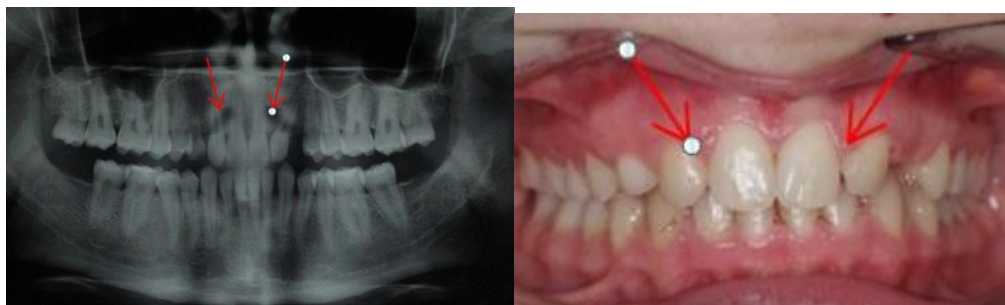
Porodica 15



Anamneza

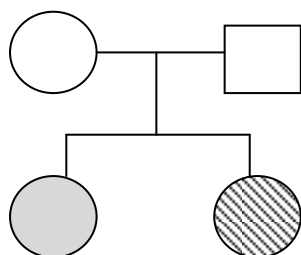
- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 15	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3)	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	/	/	/	/	/	/
MAJKA	/	/	/	/	/	/
SIN	/	/	/	/	Hiper 12,22 (anamnest)	/
ĆERKA	/	/	/	/	12,22	2



Ćerka

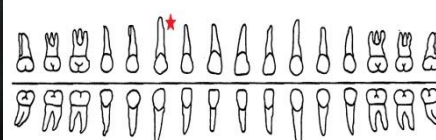
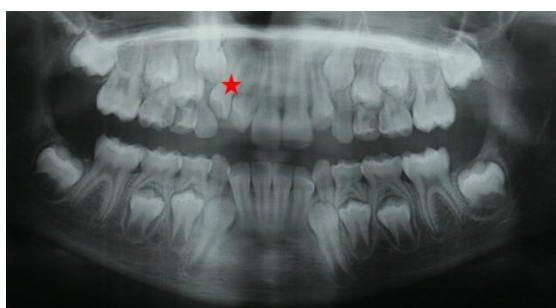
Porodica 16



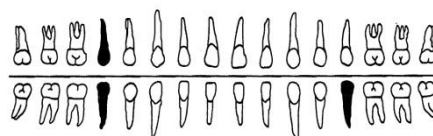
Anamneza

- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 16	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3) rs6921145	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	/	/	G/A*	/	/	/
MAJKA	/	/	GG	/	/	/
ĆERKA 1	/	/	GG	/	Hiperdoncija 12	/
ĆERKA 2	/	/	GG	/	15,35,45	3

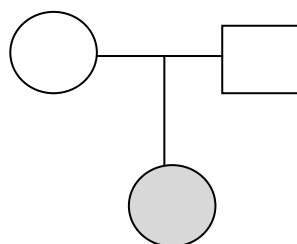


Ćerka 1



Ćerka 2

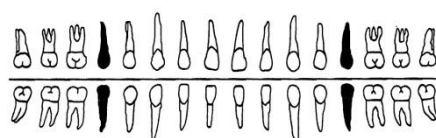
Porodica 17



Anamneza

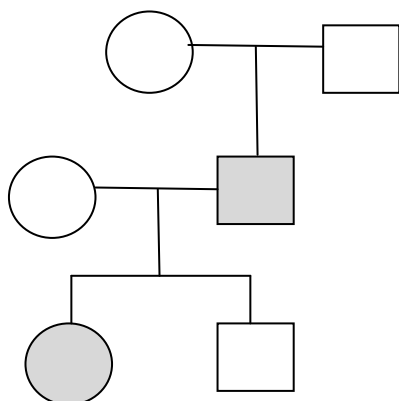
- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 17	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3) rs6921145	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
MAJKA	/	/	A*A*	/	/	/
ĆERKA	/	/	A*A*	/	15,25,35,45	4



Ćerka

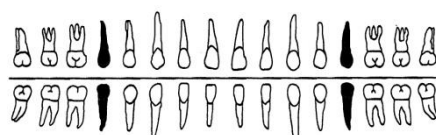
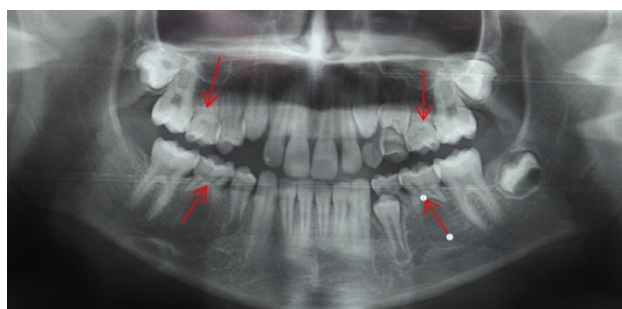
Porodica 18



Anamneza

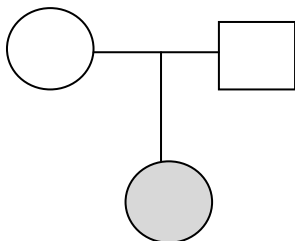
- Majka i deda po ocu negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba
- Otac navodi urođeni nedostatak 4 zuba

Porodica 18	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3)	RUNX2 (egzon 4) 34 ins. C intron 3-4	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
DEDA PO OCU	/	/	/	34 ins. C	/	/
OTAC	/	/	/	34 ins. C	15,25,35,45	4
ĆERKA	/	/	/	34 ins. C	15,25,35,45	4



Ćerka

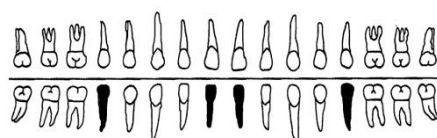
Porodica 19



Anamneza

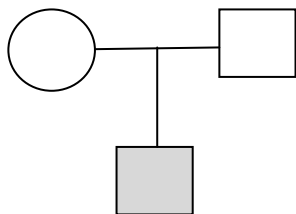
- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 19	WNT10A (egzon 2) rs10180544	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3) COSM1658 842	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	T/C*	/	18n/-	/	/	/
ĆERKA	TT	/	del/del	/	15,25,35,45	4



Ćerka

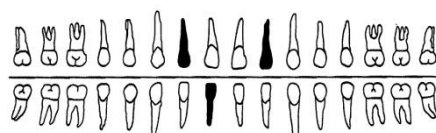
Porodica 20



Anamneza

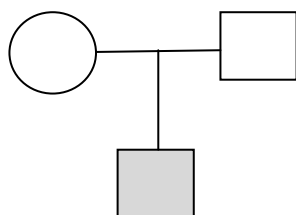
- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 20	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3) rs759395776	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
MAJKA	/	/	GG	/	/	/
SIN	/	/	-/CAG	/	12,22,41	3



Sin

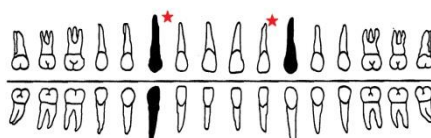
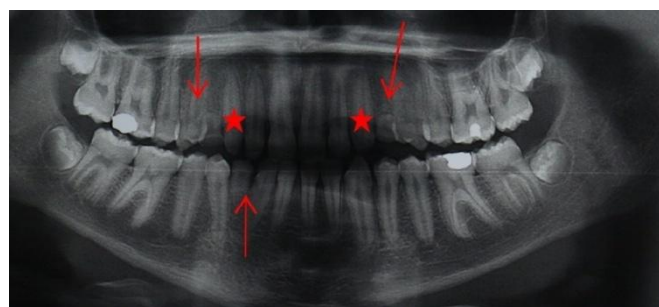
Porodica 21



Anamneza

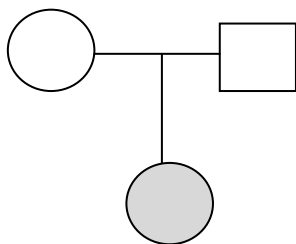
- Majka negira postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 21	WNT10A (egzon 2) rs10180544	WNT10A (egzon 3) rs121908120	RUNX2 (egzon 3) COSM1658842	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
MAJKA	/	/	18n/-	/	/	/
SIN	T/C*	T/A*	18n/-	/	13,23,43 Hiperdoncija 12,22	3



Sin

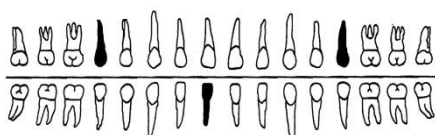
Porodica 22



Anamneza

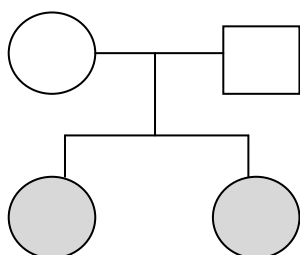
- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 22	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3) rs121908120	RUNX2 (egzon 3) COSM1658842	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
MAJKA	/	T/A*	del/del	/	/	/
ĆERKA	/	T/A*	del/del	/	15,25,41	3



Sin

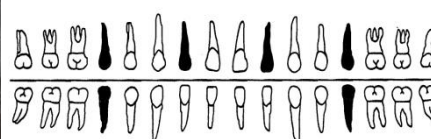
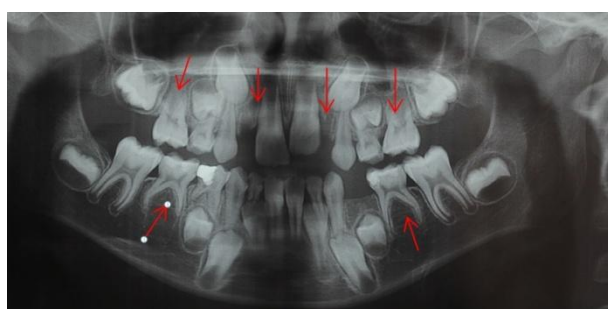
Porodica 23



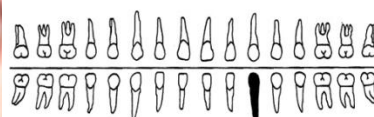
Anamneza

- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 23	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3)	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
OTAC	/	/	/	/	/	/
MAJKA	/	/	/	/	/	/
ĆERKA 1	/	/	/	/	15,12,22,25,35,45	6
ĆERKA 2	/	/	/	/	35	1

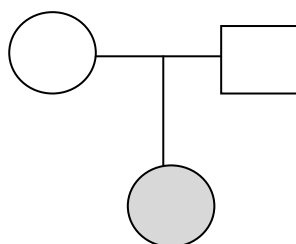


Ćerka 1



Ćerka 2

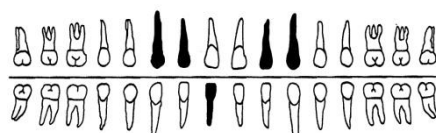
Porodica 24



Anamneza

- Roditelji negiraju postojanje urođenog nedostatka zuba

Porodica 24	WNT10A (egzon 2)	WNT10A (egzon 3)	RUNX2 (egzon 3) rs6921145	RUNX2 (egzon 4)	HIPODONCIJA	BROJ ZUBA
MAJKA	/	/	G/A*	/	/	/
ĆERKA	/	/	GG	/	13,22,23,31,41	5



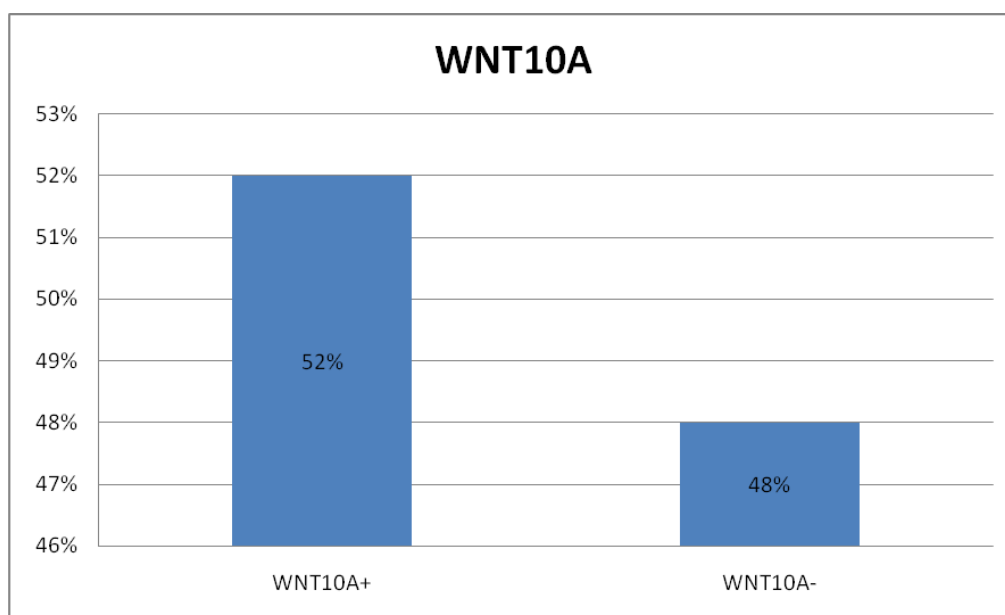
Ćerka

4.2.3. Rezultati mutacionih analiza WNT10A i RUNX2 gena

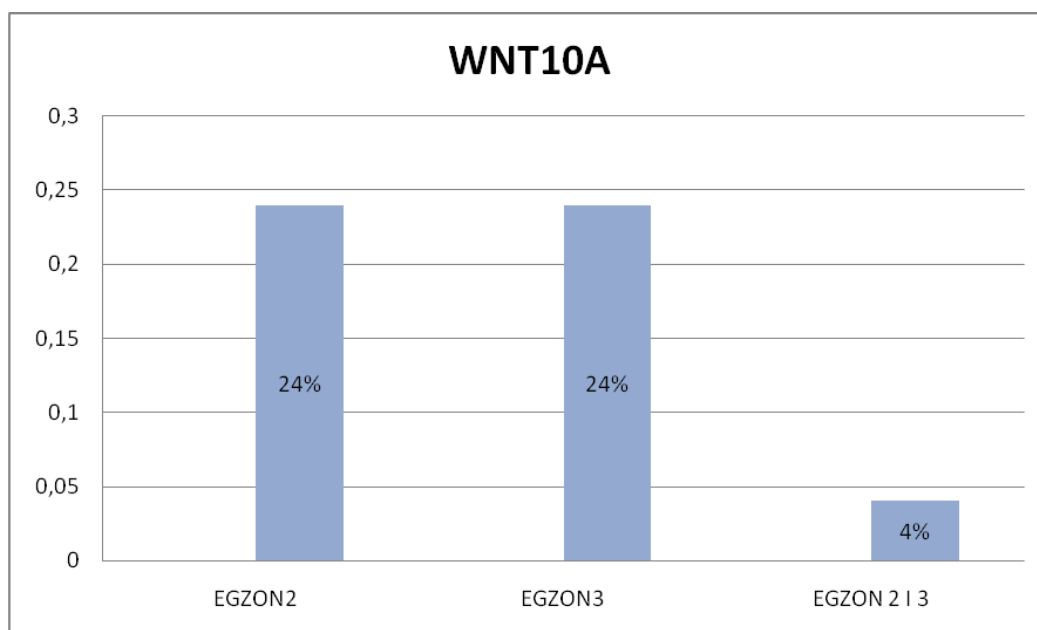
U okviru ove studije analiziran je mutacioni status WNT10A I RUNX2 gena, kod 24 porodice (72 ispitanika), u kojima je registrovan bar jedan član sa urođenim nedostatkom zuba. Od 72 ispitanika izdvojeno je 29 osoba sa klinički potvrđenom hipodoncijom. Analiza zastupljenosti mutacija kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom data je u Tabeli 9.

Tabela 9. Tipovi i zastupljenosti registrovanih mutacija u WNT10A i RUNX2 genima

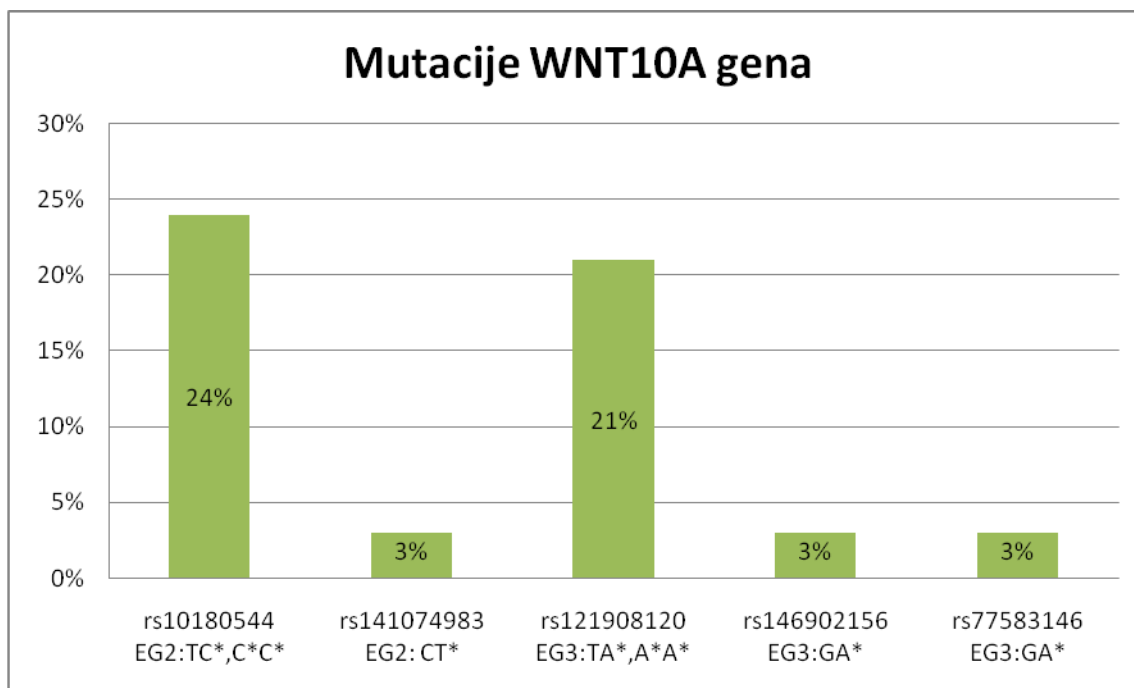
WNT10A			RUNX2		
EGZON 2	N=29 (%)		EGZON 3	N=29 (%)	
rs10180544 TC*, C*C*	7 (24%)	8 (27%)	rs.6921145 GA*, A*A*	4 (14%)	15(52%)
rs.141074983 CT*	1 (3%)		COSM1658842 del/del, 18/-	9 (32%)	
			rs759395776 -/ CAG	1 (3%)	
		rs768156797 -/21n	1 (3%)		
BEZ MUTACIJA	21 (73%)	73%	BEZ MUTACIJA	14(48%)	
EGZON 3	N=29 (%)		EGZON 4	N=29 (%)	
rs.121908120, TA*, A*A*	6 (21%)	8(27%)	ins.C	2 (7%)	2(7%)
rs.77583146, GA*	1 (3%)				
rs. 146902156, GA*	1 (3%)				
BEZ MUTACIJA	21 (73%)	73%	BEZ MUTACIJA	27 (93%)	93%



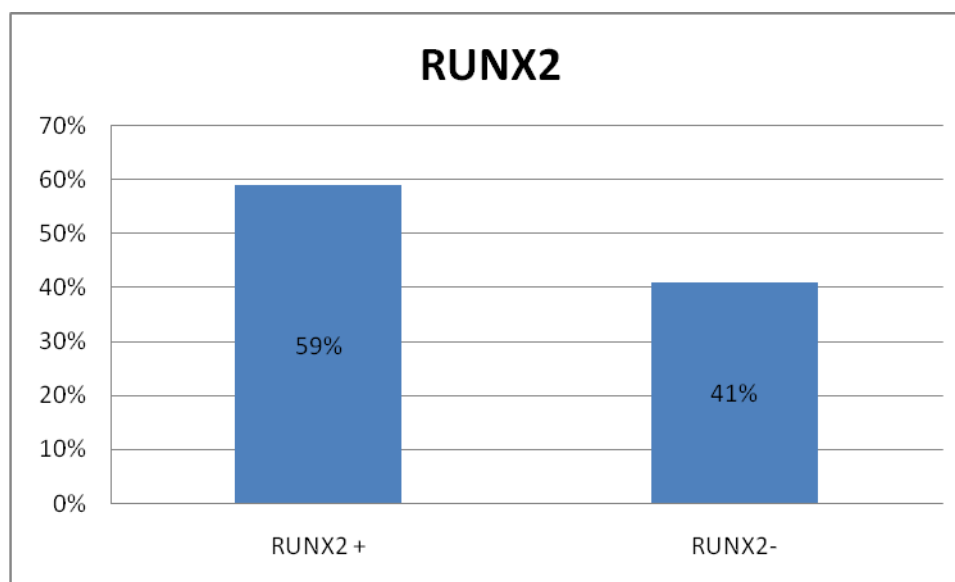
Grafikon 12. Zastupljenost mutacija WNT10A gena kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom (kod jednog pacijenta bile su prisutne mutacije u oba egzona WNT10A gena, pa zbog toga postoji razlika od 2% u odnosu na rezultate u Tabeli 9)



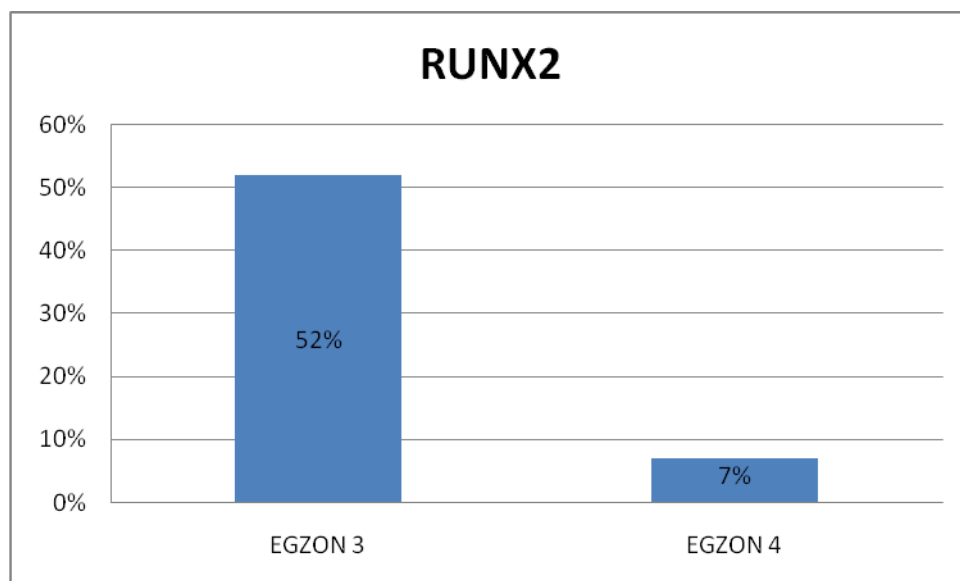
Grafikon13. Zastupljenost mutacija WNT10A gena, u regionu egzona 2 i 3, kod pacijenata sa hipodoncijom /oligodoncijom (kod jednog pacijenta bile su prisutne mutacije u oba egzona WNT10A gena, pa zbog toga postoji razlika od 2% u odnosu na rezultate u Tabeli 9)



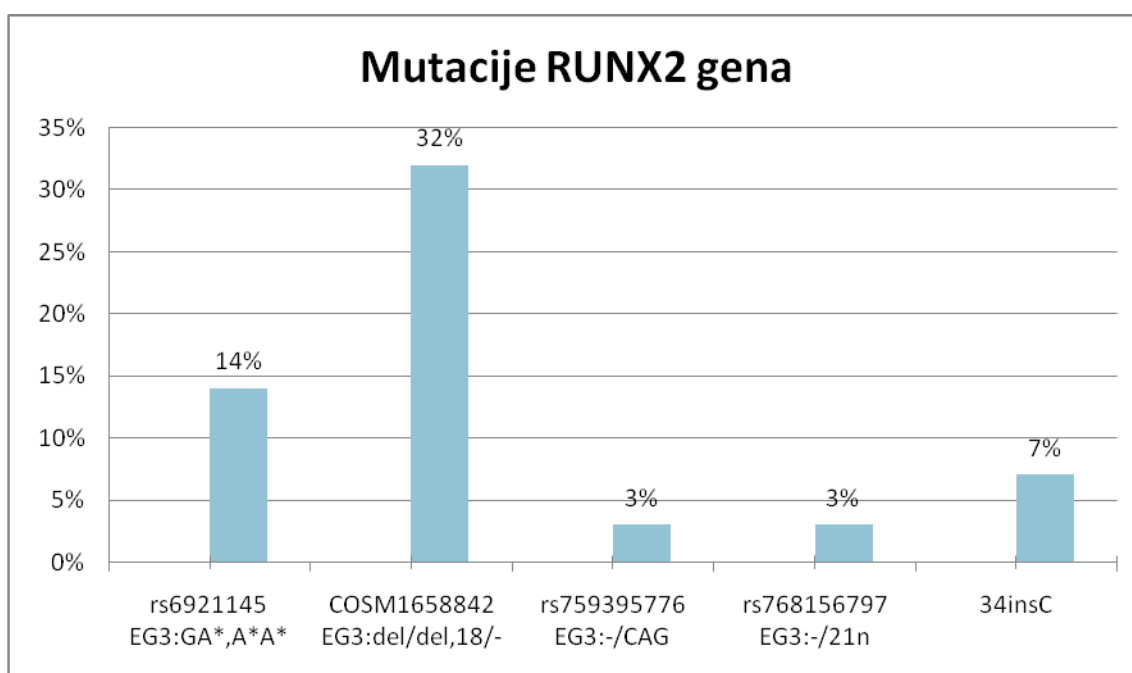
Grafikon 14. Zastupljenost mutacija WNT10A gena, u regionu egzona 2 i 3, kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom



Grafikon 15. Zastupljenost mutacija RUNX2 gena kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom

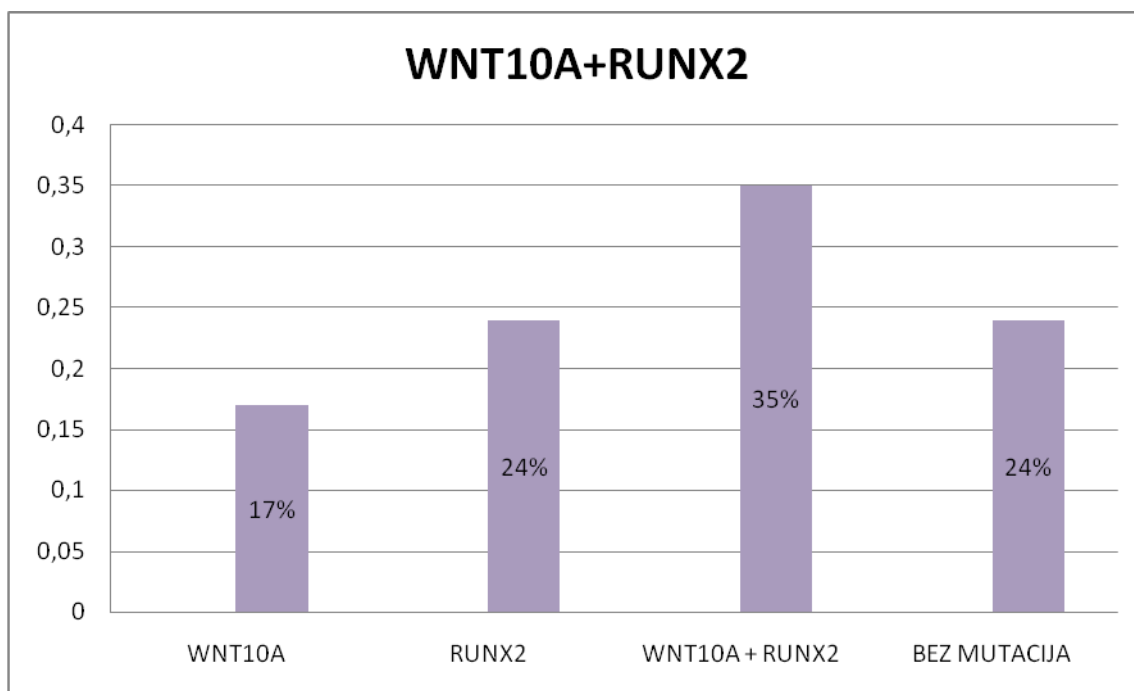


Grafikon 16. Zastupljenost mutacija RUNX2 gena, u regionima egzona 3 i 4 kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom



Grafikon 17. Zastupljenost registrovanih mutacija u regionima egzona 3 i 4 RUNX2 gena

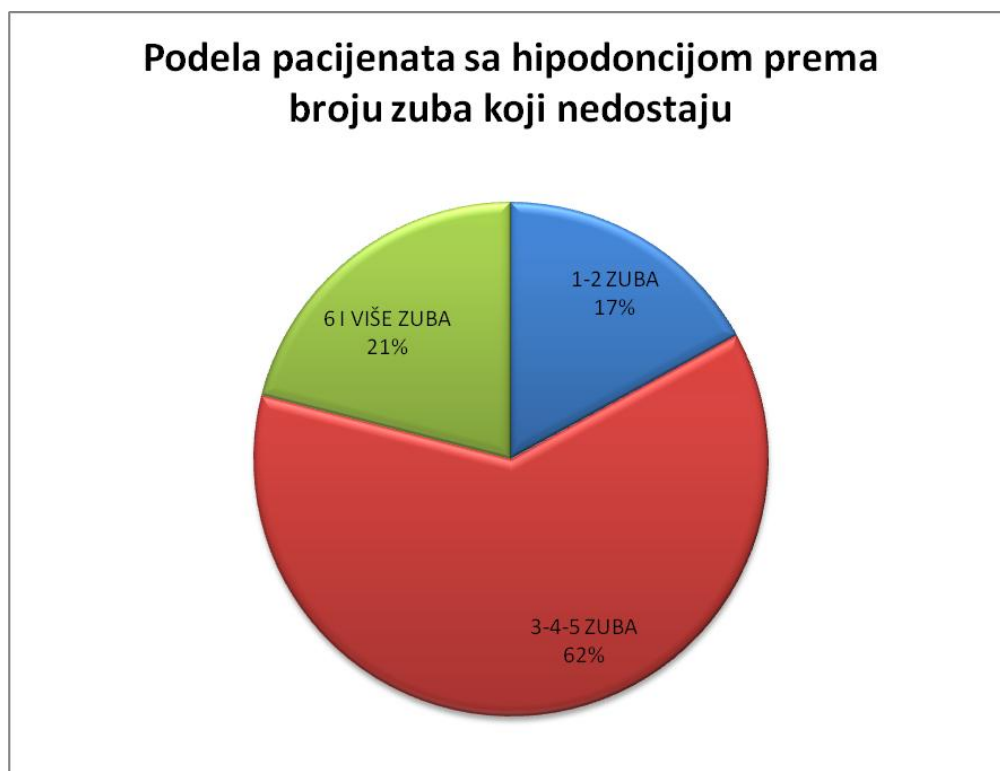
Analizirajući mutacioni status oba gena kod pacijenta sa hipodoncijom/oligodoncijom, uočeno je da je 10 pacijenata (35%) imalo mutaciju oba gena, 5 pacijenata (17%) WNT10A mutaciju, 7 pacijenata (24%) RUNX2 mutaciju, i 7 pacijenata (24%) je bilo bez mutacije. (Grafikon 18)



Grafikon 18. Zastupljenost mutacija WNT10A i RUNX2 gena (pojedinačno i zbirno) kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom

4.2.4. Korelacija hipodoncije i mutacija WNT10A i RUNX2 gena

Distribucija pacijenata prema broju zuba koji im urođeno nedostaju, uradjena je tako što su formirane 3 grupe pacijenata: pacijenti sa urođenim nedostatkom 1 ili 2 zuba, pacijenti sa urođenim nedostatkom 3,4 ili 5 zuba i grupa pacijenata sa urođenim nedostatkom 6 ili više zuba. (Grafikon 19) U uzorku od 29 pacijenata, 23 od 29 (79%) je imalo nedostatak od 1 do 5 zuba (prosečno, 3,4), dok je 6 od 29 (21%) imalo oligodonciju-manjak od 6 do 11 zuba (nedostajalo je prosečno 8 zuba). U celom uzorku prosečan broj zuba koji nedostaju bio je 4.4.

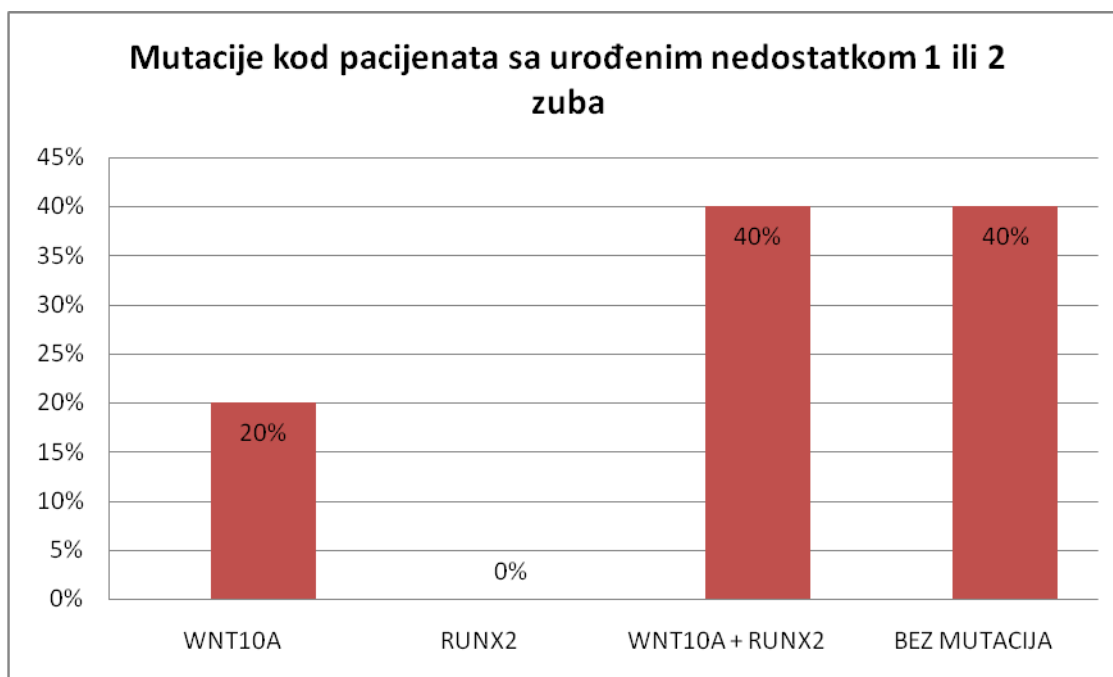


Grafikon 19. Distribucija pacijenata sa hipodoncijom u odnosu na broj zuba koji urođeno nedostaju

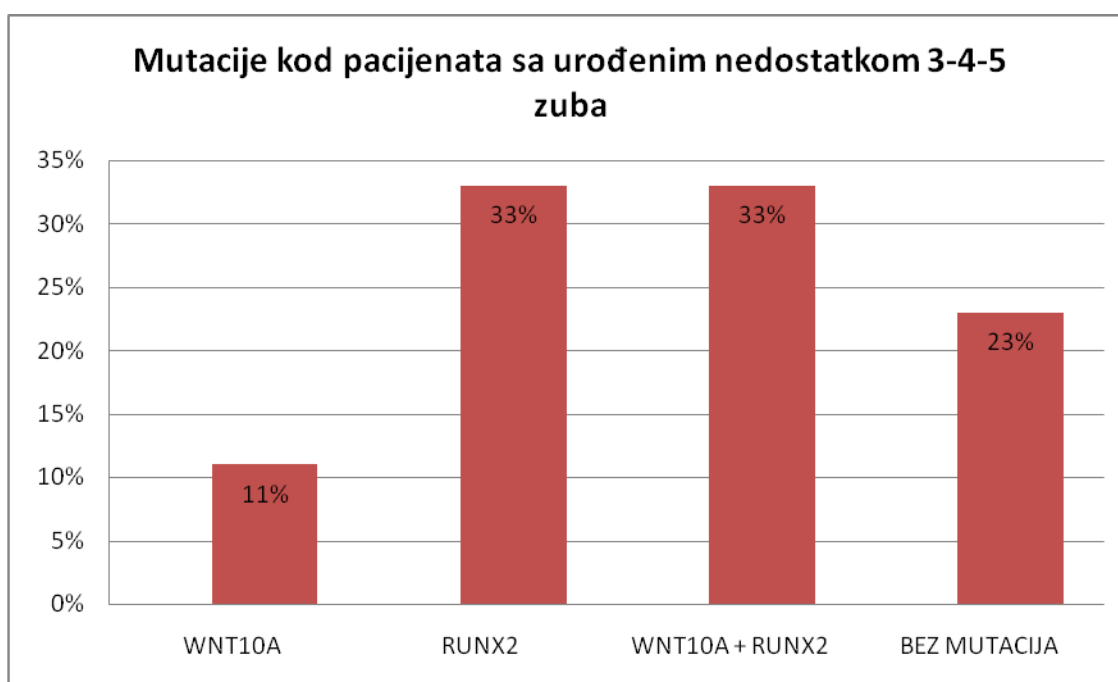
Dobijene zastupljenosti mutacija u WNT10A i RUNX2 genima, kod pacijenata sa hipodoncijom u odnosu na broj zuba koji urođeno nedostaju, prikazane su u tabeli i grafikonima. (Tabela 10, Grafikon 20, Grafikon 21, Grafikon 22)

Tabela 10. Vrste registrovanih mutacija u uzorku u odnosu na broj zuba koji urođeno nedostaju

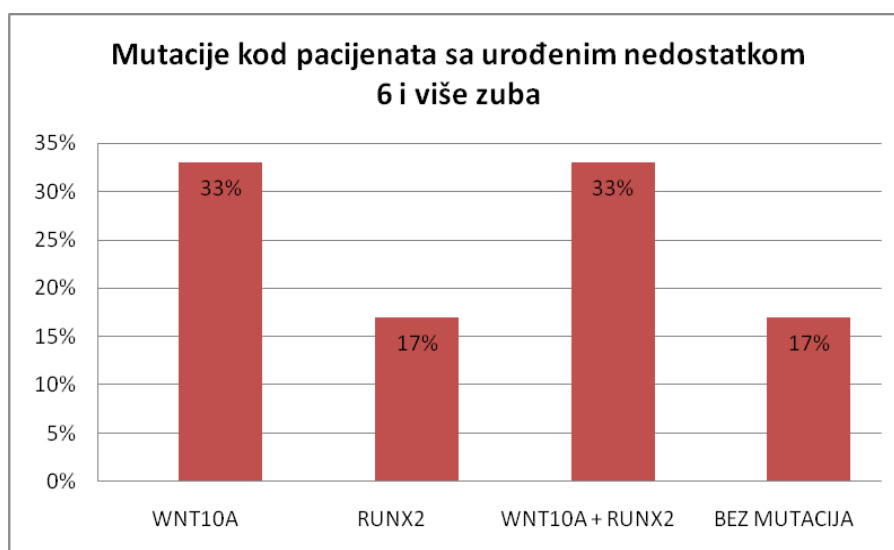
	HIPODONCIJA 1-2 ZUBA	HIPODONCIJA 3-4-5 ZUBA	OLIGODONCIJA 6 I VIŠE ZUBA
WNT10A	1 (20%)	2 (11%)	2 (33%)
RUNX2	0	6 (33%)	1 (17%)
WNT10A+RUNX2	2 (40%)	6 (33%)	2 (33%)
BEZ MUTACIJA	2 (40%)	4 (23%)	1 (17%)
	5 (100%)	18 (100%)	6 (100%)



Grafikon 20. Zastupljenost mutacija kod pacijenata sa urođenim nedostatkom 1 ili 2 zuba

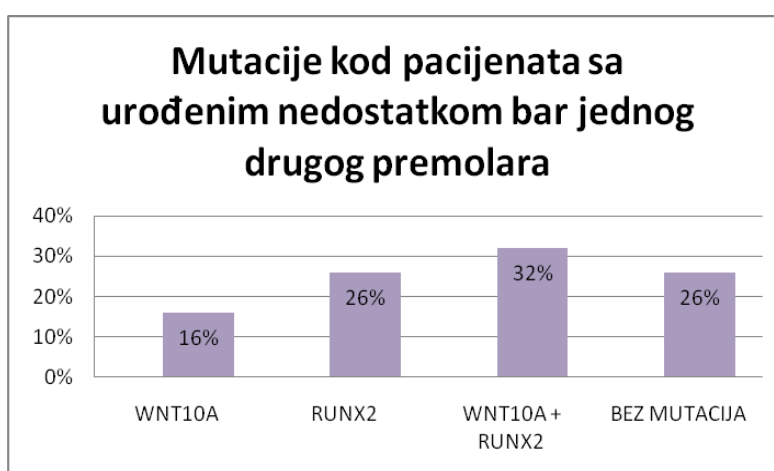


Grafikon 21. Zastupljenost mutacija kod pacijenata sa urođenim nedostatkom 3,4 ili 5 zuba

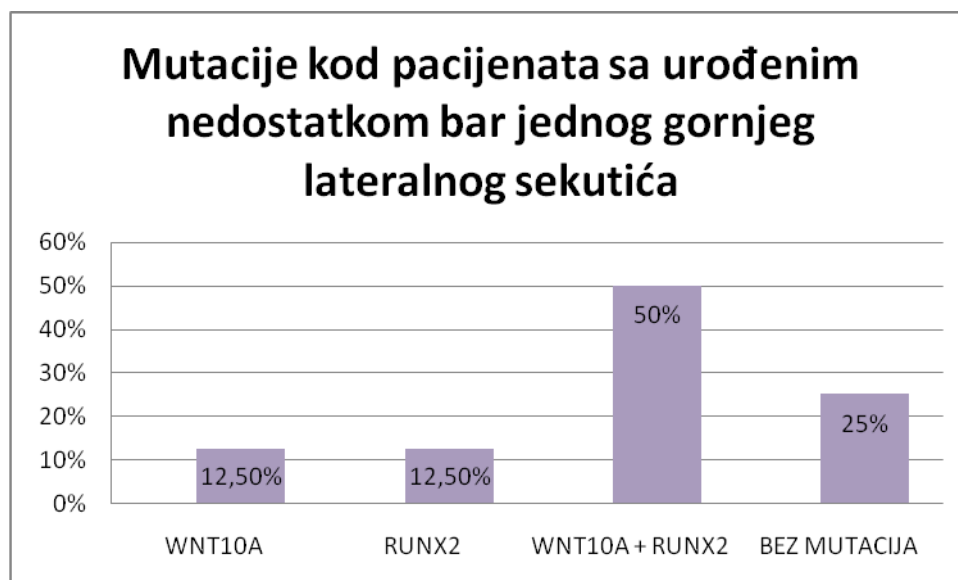


Grafikon 22. Zastupljenost mutacija kod pacijenata sa urođenim nedostatkom 6 ili više zuba

Na osnovu vrste zuba koji nedostaju, rađena je analiza mutacija kod pacijenata sa nedostatkom bar jednog drugog premolara ili bar jednog lateralnog sekutića, s obzirom na to da su to zubi koji najčešće urođeno nedostaju u zubnom nizu. U našem uzorku bilo je 19 pacijenata sa nedostatkom bar jednog premolara, i 16 pacijenata sa nedostatkom bar jednog lateralnog sekutića. Rezultati mutacione analize prikazani su na grafikonima. (Grafikon 23, Grafikon 24)



Grafikon 23. Zastupljenost mutacija kod pacijenata sa urođenim nedostatkom bar jednog drugog premolara



Grafikon 24. Zastupljenost mutacija kod pacijenata sa urođenim nedostatkom bar jednog gornjeg lateralnog sekutića

4.3. Korelacija hipodoncije i mutacija WNT10A i RUNX2 gena

U Tabeli 11 su predstavljene vrednosti veličina zuba kod 10 pacijenata sa hipodoncijom, kod kojih je pored merenja meziodistalnih širina zuba analiziran i mutacioni status WNT10A i RUNX2 gena. Zubi koji nisu bili dostupni za merenje, zbog hipodoncije ili zbog smene denticije, predstavljeni su u tabeli simbolom *.

Kao što je prikazano u tabeli, meziodistalna širina zuba kod pacijenata sa urođenim nedostatkom zuba bila je uglavnom manja nego kod pacijenata bez urođenog nedostatka zuba. Mutacije u oba gena, WNT10A i RUNX2, bile su prisutne kod 40% pacijenata sa hipodoncijom u analiziranom uzorku, dok je 30% imalo samo mutaciju u RUNX2 genu, a kod 30% nisu zabeležene mutacije. (Tabela 11)

Tabela 11. Korelacija hipodoncije i mutacija WNT10A i RUNX2 gena

		Molar	Drugi premolar	Prvi premolar	Očnjak	Bočni sekutić	Centralni sekutić	WNT10A MUTACIJE	RUNX2 MUTACIJE
Prosek Kontrola	G	10,00	6,61	7,03	7,67	6,74	8,59		
	D	10,44	6,96	6,95	6,89	6,01	5,40		
Pacijent 1	G	9,13	5,31	6,05	*	5,57	8,27	rs10180544	rs6921145
	D	10,37	*	*	*	6,18	5,31		
Pacijent 2	G	9,45	5,95	6,52	6,50	*	7,35	/	rs75995776
	D	9,09	6,13	6,37	6,64	4,91	4,23		
Pacijent 3	G	9,48	5,78	5,97	*	*	7,33	rs10180544	rs768156797
	D	10,12	*	6,60	6,17	5,52	4,52		
Pacijent 4	G	9,36	*	*	*	*	7,27	/	COSM1658842
	D	9,29	*	*	*	6,35	*		
Pacijent 5	G	9,84	6,96	*	7,68	*	8,21	rs121908120	COSM1658842
	D	9,91	6,54	*	7,04	5,17	5,18		
Pacijent 6	G	9,23	5,99	6,35	7,38	*	8,68	/	/
	D	9,68	*	6,28	6,99	5,77	5,31		
Pacijent 7	G	8,57	*	6,73	*	6,42	7,80	/	/
	D	9,14	*	*	*	5,46	4,47		
Pacijent 8	G	8,60	*	5,42	7,62	5,29	7,45	/	rs6921145
	D	9,52	*	5,70	6,57	4,86	4,45		
Pacijent 9	G	9,55	*	7,37	*	*	8,24	rs10180544	COSM1658842
	D	9,50	*	*	*	5,36	4,80		
Pacijent 10	G	8,77	6,32	6,23	6,97	*	7,17	/	/
	D	8,41	6,57	6,11	5,78	4,72	4,40		

V
DISKUSIJA

5.1.DISKUSIJA KLINIČKIH ISTRAŽIVANJA

Istraživači i kliničari su tokom godina koristili različite metode za merenje dimenzija zuba. Decenijama su najviše korišćeni nonijusi, dok su kasnije u istraživačku praksu uvedeni digitalni nonijusi, koji se i danas koriste u svakodnevnoj ortodontskoj praksi. Razvoj moderne tehnologije je postao važan i neizostavan segment stomatološke, a samim tim i ortodontske prakse. Zahvaljujući elektronskoj formi omogućena je lakša i brža saradnja među terapeutima, efikasno i jednostavno skladištenje modela u elektronskoj formi, kao i brža razmena informacija. Gipsane modele je moguće skenirati laserskim skenerom i prevesti u digitalnu formu, a zatim na njima raditi različite analize u odgovarajućim kompjuterskim programima. Poznato je da su gipsani modeli koji se koriste za ortodontske analize skloni lomu i oštećenjima, odnosno zauzimaju puno prostora za skladištenje, pa zato skenirani 3D modeli sve više dobijaju na popularnosti, jer omogućavaju prevazilaženje ovih problema.

Određene studije koje su se bavile preciznošću i pouzdanošću merenja na 3D modelima, u poređenju sa standardnim merenjima gipsanih modela su pokazale da su razlike između ove dve metode klinički prihvatljive (Stevens i sar. 2006, Quimby i sar. 2004, Leifert i sar. 2009, Zilberman i sar. 2003, Santoro i sar. 2003). Fleming i sar. su u svojoj revijalnoj studiji objedinili rezultate 17 studija, i došli su do zaključka da digitalni modeli pružaju veliku preciznost merenja u poređenju sa direktnim merenjima na gipsanim modelima (Fleming i sar. 2011). Takođe, u studiji Kim i sar. pokazano je da 3D modeli dobijeni laserskim skeniranjem mogu biti adekvatna zamena za gipsane modele i CBCT skenove modela (Kim i sar. 2013).

U najvećem broju studija 3D modeli su mereni u programu OrthoCad, i u poređenju sa merenjima na gipsanim modelima ove vrednosti su bile slične i klinički prihvatljive (Quimby 2004, Leifert i sar. 2009, Zilberman i sar. 2003, Santoro i sar. 2003). U našoj studiji korišćen je program-Geomagic studio software (3D Systems Inc, Cary, NC). Ovaj program se koristi u takozvanom procesu reverznog inženjeringa i bazira na stvaranju zakrivljenih površina i složenih digitalnih modela. U ovom istraživanju su stvoreni 3D modeli zubnih nizova, koji su rekonstruisani na osnovu skeniranih gipsanih modela, a zatim mereni u istom programu. Preciznost merenja u

Geomagic Studio programu proveravali su Zhou i sar. na 20 modela, poredeći merenja dobijena u Geomagic softveru sa merenjima istih modela uz pomoć digitalnog nonijusa. Razlike u merenjima su bile manje od 0.05mm i nisu bile značajne, što ide u prilog velikoj preciznosti ove metode (Zhou i sar. 2016).

O razlikama u veličini zuba osoba sa hipodoncijom i osoba bez ove urođene anomalije postoje brojna istraživanja (Gungor and Turkkahraman 2013, Brook i sar. 2009, Schalk-van der Weide i sar. 1994, Kerekes Mathe i sar. 2015, Garn and Lewis 1970, Fekonja 2013. Mc Keown i sar. 2002).

Prilikom određivanja veličine zuba u različitim istraživanjima su korišćene različite metodologije. Gungor i Turkkahraman (Gungor i Turkkahraman 2013), Brook i sar. (Brook i sar. 2009), Fekonja (Fekonja 2013) i Schalk-van der Weide (Schalk-van der Weide i sar. 1994) su koristili digitalni nonijus za merenje meziodistalnih širina zuba na gipsanim modelima pacijenata. Svi istraživači su koristili digitalne nonijuse sa preciznošću od 0.01mm, a Brook i Fekonja čak i digitalne nonijuse istog proizvođača (Mitutoyo UK Ltd, United Kingdom).

Medjutim, Kerekes Mathe i Mc Keown su koristili nešto drugačiju metodologiju koja bazira na fotografisanju modela pod istim uslovima u dve pozicije, i potom su vršili merenja u kompjuterskom programu. Ova metodologija je precizno predstavljena od strane Brook-a i sar. (Brook i sar. 1998).

Rezultati naše studije su pokazali da su meziodistalne širine svih zuba kod pacijenata sa urođenim nedostatkom zuba manje od meziodistalnih širina zuba kod pacijenata u kontrolnoj grupi. Kod prvih molara, prvih i drugih premolara, centralnih i bočnih sekutića u obe vilice i donjih očnjaka, razlika u veličini između grupa je bila statistički značajna. Jedino su meziodistalne širine gornjih očnjaka, u grupi pacijenata sa hipodoncijom bile manje u odnosu na iste zube kontrolne grupe, ali bez statistički značajne razlike.

Do sličnih rezultata u svom istraživanju došli su Brook i sar., gde se dovodi u vezu manji meziodistalni promer zuba kod pacijenata sa hipodoncijom, u odnosu na

zube kontrolne grupe, i ta je razlika bila statistički značajna za sve zube, osim za gornje očnjake, gornji levi prvi premolar i donji desni prvi premolar, kod osoba ženskog pola (Brook i sar. 2009). U istoj studiji su kod muškaraca svi zubi pokazali manje meziodistalne promere u grupi sa hipodoncijom, i ova razlika je bila statistički značajna za sve zube, osim gornjeg prvog desnog premolara i donjeg desnog centralnog sekutića. Interesanto je da Brook i sar. uočavaju da je gornji desni drugi premolar u grupi muških pacijenata sa hipodoncijom bio nešto veći nego u kontrolnoj grupi. Takođe, Brook i sar. zaključuju da što je veći broj zuba koji nedostaje, veća je i razlika u veličini zuba. Slično rezultatima Brook i sar., Gungor i Turkkahraman su u svom istraživanju pokazali da je smanjenje veličine zuba veće ukoliko je hipodoncija ozbiljnije izražena (Gungor i Turkkahraman 2013). Suprotno našim podacima u pogledu statističke validnosti, u istraživanju autora Kerekes Mathe, meziodistalna širina očnjaka kod pacijenata oba pola, bila je statistički značajno manja kod pacijenata sa blagom hipodoncijom, nego u kontrolnoj grupi (Kerekes Mathe i sar. 2015).

U našem istraživanju najveću varijabilnost (SD vrednost) u meziodistalnom promeru u grupi pacijenata sa hipodoncijom pokazali su: bočni sekutići, prvi molari, i očnjaci u gornjoj vilici, kao i prvi molari, prvi premolari, i očnjaci u donjoj vilici. U kontrolnoj grupi navarijabilniji bili su: prvi molari, centralni i bočni sekutići u gornjoj vilici, a u donjoj vilici: prvi molar, i drugi premolar. Generalno gledano, varijabilnost je bila nešto veća u grupi pacijenata sa hipodoncijom nego u kontrolnoj grupi, na što je ukazao i Brook i sar. u svom istraživanju.

U istraživanju Fekonje i sar. meziodistalne širine zuba kod pacijenata sa urođenim nedostatkom zuba bile su takođe manje u poređenju sa kontrolnom grupom (Fekonja 2013). Ova razlika bila je statistički značajna za sve zube, osim za: gornje leve očnjake, donje leve bočne sekutiće, i donje leve prve premolare, kod ženskih ispitanika; kao i za gornje leve druge premolare kod muških ispitanika. U ovom istraživanju najveću razliku u meziodistalnim dimenzijama pokazali su gornji bočni sekutići, donji centralni sekutići i donji drugi premolari. Varijabilnost veličine sekutića je u skladu sa teorijom morfogenetskog polja, po kojoj su u denticiji najmanje varijabilni po morfologiji oni zubi koji se prvi razvijaju u svom delu denticije (Butler 1939).

Medjutim, rezultati naših istraživanja ukazuju na to da su molari najvarijabilniji po morfologiji, iako su to zubi koji se prvi razvijaju, a što nije u skladu sa ovom teorijom.

U istraživanjima autora Gungor i Turkkahramana, zubi koji su pokazali najveću razliku u dimenzijama bili su prvi premolari u grupi sa blago izraženom hipodoncijom, dok su u grupi sa urođenim nedostatkom više zuba to bili gornji bočni sekutići (Gungor i Turkkahraman 2013). U skladu sa prethodnim navodima, kao i prema Brookovim istraživanjima, najvarijabilniji u dimenzijama su bili gornji lateralni sekutić, i donji centralni sekutić.

Kada je u pitanju veličina zuba pacijenata sa hipodoncijom vezana za pol, u istraživanju Kerekes Mathe i sar., najveću varijabilnost u veličini kod ispitanika ženskog pola, su pokazali gornji prvi premolari, očnjaci i centralni sekutići i donji centralni sekutići i drugi premolari (Kerekes Mathe i sar. 2015). U delu uzorka muškog pola, u istom istraživanju, najvarijabilniji su bili gornji centralni sekutići, bočni sekutići, očnjaci odnosno donji drugi premolar i centralni sekutić.

Analiza rezultata naše studije među polovima, u grupi sa hipodoncijom i u kontrolnoj grupi je pokazala da uglavnom nije bilo statistički značajne raličke u veličini zuba među polovima izuzev kod donjih očnjaka. Uočeno je jedino da su meziodistalne širine donjih očnjaka u obe grupe bile statistički značajno veće kod muškog nego kod ženskog pola.

Takođe, jedino je drugi premolar u gornjoj vilici kod žena, u grupi sa hipodoncijom, bio statistički značajno veći kod žena nego kod muškaraca. Ovo se može objasniti činjenicom da je drugi premolar zub koji veoma često urođeno nedostaje, pa je mali broj zuba i učestvovao u merenju (5-muški pol, 8-ženski pol). Da je veći broj ovih zuba bio dostupan u uzorku, verovatno bi i ovi rezultati bili drugačiji.

Slično našim rezultatima, u radu Gungor i Turkkahramana, je takodje uočeno da su gornji centralni sekutići kod ženskog pola bili neznatno veći gornji centralni sekutići (Gungor i Turkkahraman 2013).

Medjutim suprotno našim rezultatima, u studiji Fekonje i sar., kod osoba ženskog pola su neznatno bili veći gornji prvi premolar i prvi molar, odnosno donji lateralni sekutić i prvi i drugi premolar. U prilog validnosti naših dobijenih podataka idu i rezultati studije Kerekes Mathe i sar. u kojima je navedeno da su vrednosti veličina zuba, u grupi sa hipodoncijom manji kod žena nego kod muškaraca, sa statistički značajnim razlikama u regiji očnjaka, premolara i molara (Kerekes Mathe i sar. 2015).

Analiza pojedinačno merenih zuba sa svake strane zubnog niza, generalno gledano, nije pokazala postojanje statistički značajne različitosti, meziodistalnih širina pojedinačnih zuba leve i desne strane, ni u grupi pacijenta sa hipodoncijom niti u kontrolnoj grupi. Izuzetak predstavljanju jedino prvi premolari u grupi sa hipodoncijom, i drugi premolari u kontrolnoj grupi, gde je primećena značajno veća veličina zuba desne strane.

Poređenjem srednjih vrednosti meziodistalnih širina zuba u našem istraživanju i vrednosti meziodistalnih širina zuba u grupi sa nedostatkom od 2 do 5 zuba, u studiji Gungor i Turkkahramana, uočeno je da su srednje vrednosti meziodistalnog promera svih zuba bile veće u njihovoj studiji. Jedino su dimenzije gornjih i donjih očnjaka u grupi sa hipodoncijom bile veće u našoj studiji (Gungor i Turkkahraman 2013).

Analizom i poređenjem srednjih vrednosti meziodistalnih širina zuba kod muškog i ženskog pola eksperimentalne grupe u našoj studiji i poređenjem sa rezultatima Kerekes Mathe i sar. uočeno je da su vrednosti za zube u gornjoj vilici bile veće u njihovom istraživanju, osim kod očnjaka i centralnih sekutića koji su bili nešto širi u našem istraživanju (Kerekes Mathe i sar. 2015).

Što se tiče rezultata u donjoj vilici kod pacijenata sa hipodoncijom, sve srednje vrednosti meziodistalnih širina zuba su bile veće kod oba pola u istraživanju Kerekes Mathe i sar. nego u našem istraživanju. Ovo se možda može objasniti činjenicom što su u njihovom istraživanju pacijenti imali nešto blaže izraženu hipodonciju (urođeni nedostatak 1 ili 2 zuba), pa je samim tim i redukcija veličine zuba bila manja.

Poređenjem vrednosti veličine zuba kontrolnih grupa u našoj studiji i radu Kerekes Mathe i sar., uočeno je da su srednje vrednosti meziodistalnih promera svih zuba u oba pola i u obe vilice bile nešto veće u pomenutoj studiji.

5.2. DISKUSIJA MOLEKULARNO-GENETIČKIH ISTRAŽIVANJA

Analizirajući zastupljenost mutacija u DNK vezujućem regionu WNT10A gena (egzoni 2 i 3) pokazano je da 15 od 29 (52%) pacijenata sa hipodoncijom ima navedene promene. Najučestalija mutacija, rs10180544, registrovana je u regionu egzona 2 (intron 1-2) kod 24% pacijenata u homozigotnom ili heterozigotnom obliku. Takođe, u egzonu 2 zabeležena je "missense" mutacija, rs141074983 (c.337C>T), kod 3% pacijenata u uzorku. U egzonu 3 WNT10A gena uočene su tri "missense" mutacije: rs121908120 (c.682T>A) - 21%, rs77583146 (c.493G>A) - 3%, i rs146902156 (c.649G>A) - 3%.

Sumirajući zastupljenosti mutacija u svakom od analiziranih regiona egzona 2 i 3, dobijena je ista incidenca mutacija (po 24%), dok je 4% pacijenata u uzorku imalo mutacije u oba egzona.

Pre svega, mutacije WNT10A gena su opisane u literaturi u sklopu različitih sindroma ektodermalnih displazija, koje mogu imati heterogenu kliničku sliku i genetsku osnovu. Generalno, WNT10A mutacije se povezuju sa širokim spektrom fenotipskih promena, počev od izolovanih formi hipodoncije, preko oligodoncija sa blagim znacima ektodermalne displazije, pa sve do težih formi ektodermalne displazije (kožni eritem, hiperkeratoza, hipohidroza, hipotrihoza, hipo/oligodoncija, displazija noktiju), kod kojih se uočava i povećan rizik od nastanka tumora kože (odonto-onihodermalna displazija-OODD, Schopf-Schulz-Passarge sindrom-SSPS). Ipak, kod pacijenta sa WNT10A mutacijom najčešći simptom bila je oligodoncija u stalnoj denticiji, sa normalnom ili blago izmenjenom mlečnom denticijom, što ukazuje na značaj Wnt/ β -catenin signalnog puta u formiranju stalne denticije. Analizirajući način nasleđivanja WNT10A mutacija kod sindromskih formi hipodoncije (OODD, SSPS) uočen je autozomno-recesivni, dok je kod izolovanih formi uočen autozomno-dominantni i autozomno-recesivni vid nasleđivanja.

U radu Bohring-a i sar., u grupi pacijenata sa odonto-oniho-dermalnom displazijom u nemačkoj populaciji je registrovano 5 različitih WNT10A mutacija kod 12 pacijenata (42%), pri čemu su dve predstavljale "missense" mutacije, c.682T>A i c.493G>A, koje su zabeležene i u našoj studiji (Bohring i sar. 2009). Mutacija koju autori izdvajaju u navedenoj studiji, zbog svog patogenog efekta, c.682T>A, pokazuje jaku korelaciju između hetereoziotnog/homoziotnog genotipa i težih formi ektodermalne displazije. Interesantno je da se u istom radu, u neznatnoj frekvenci pronalazi WNT10A mutacija, kod zdravih članova porodica sa hipodoncijom (c.493G>A-0.7%, c.682T>A-0.5%). Takođe, u navedenoj studiji se navodi da su WNT10A mutacije češće povezane sa promenama na zubima kod osoba muškog (oko 70%) nego kod ženskog pola (oko 20%). Dodatna potvrda da su WNT10A mutacije ključni epitet sindromskih formi ektodermalne displazije predstavlja podatak da se ova mutacija nalazi kod 90% pacijenta francuske populacije sa HED (hipohidrozni oblik) (Cluzeau i sar. 2011).

Nasuprot sindromskih formi hipodoncije, autori Kantaputra i Sripathomsawat, u svom istraživanju prikazuju dominantni način nasleđivanja WNT10A mutacija kod jedne porodice sa izolovanom (nesindromskom) hipodoncijom i bez dodatnih promena u drugim derivatima ektoderma. Naime, u porodici su registrovane dve heteroziotne "missense" mutacije WNT10A gena, c.682T>A i c.649G>A. Preciznije, patogenu mutaciju u heteroziotnom obliku, c.682T>A, imaju otac (kome urodjeno nedostaje 1 zub), i dva sina (jedan sa nedostatkom 2 zuba, drugi sa mikrodoncijom), dok heteroziotnu mutaciju, c.649G>A, imaju zdrava majka (nepotpuno penetrantna mutacija) i dva sina (jedan sa -3 zuba i drugi sa mikrodoncijom). Interesantno je da sin sa mikrodoncijom ima dve različite mutacije (c.682T>A i c.649G>A), ali ne i nedostatak zuba. Osim trećih molara, u navedenoj porodici su nedostajali lateralni sekutići u obe vilice, kao i drugi premolari (Kantaputra i Sripathomsawat, 2011). Navedeni rezultati navode na zaključak da su date mutacije povezane kako sa nedostatkom zuba, tako i sa mikrodoncijom, pri čemu dodatno mogu pokazati i nepotpunu penetrantnost. Dodatnu potvrdu o kompleksnom fenotipskom efektu WNT10A mutacije i načinu njenog nasleđivanja predstavlja prikaz jedne porodice sa hipodoncijom (studija Bohring-a i sar.), gde se kod 6 od 9 članova sa c.682T>A

mutacijom uočava visoka nepotpuna penetrantnost, dok se ista mutacija u homozigotnom obliku, ispoljava kod jednog člana sa OODD sindromom. Takođe, i u našoj studiji, kod jednog pacijenta sa urođenim nedostatkom od 11 zuba registrovana je homozigotna mutacija, c.682T>A, što može ukazati na postojanje korelacije genotip-fenotip u pogledu težine poremećaja.

Da su mutacije WNT10A gena povezane ne samo sa oligodoncijom već i sa blagim znacima ektodermalne displazije pokazuje istraživanje Plaisancie i sar. (Plaisancie i sar. 2013). Prema podacima ovog autora, 42% pacijenata sa mutacijom i oligodoncijom (nedostatak 13 zuba u proseku), spektrom od 28 različitih WNT10A mutacija pokazuju različite simptome ektodermalne displazije. Pored nejasne veze između tipa mutacije i fenotipa ostaje nedoumica u pogledu načina nasleđivanja datih mutacija. Preciznije, WNT10A mutacije mogu se nasleđivati autozomno dominantno i recesivno, pri čemu se uz nisku penetrantnost heterozigotne i homozigotne mutacije mogu manifestovati različitim fenotipskim varijacijama (od asimptomskih oblika, preko hipo/oligodoncija, do teških formi ED).

Slično našim rezultatima Van den Boogard i sar. pronalaze 56% mutacija WNT10A gena u grupi pacijenta sa oligodoncijom (ageneza 6-28 zuba) u holandskoj populaciji (Van den Boogard i sar. 2012). Sa druge strane, od 7 pronađenih mutacija WNT10A gena, najčešće registrovana (homo/heterozigotna) bila je c.682T>A (62%), dok je u našem uzorku ona iznosila 21%. Ova oko tri puta manja zastupljenost iste mutacije, c.682T>A, može se objasniti činjenicom da je prosečan broj zuba koji nedostaje po osobi, u studiji Van den Boogarda i sar. bio 15.6, dok je u našem istraživanju, sa dominantno prisutnim pacijentima sa hipodoncijom, prosečan broj zuba koji nedostaju po osobi bio znatno manji - 4.4 (ageneza 1-11 zuba).

Da je WNT10A gen ključni faktor u etiologiji nesindromske dentalne ageneze, pokazuju i rezultati Mostowske i sar. koji su na uzorku od 157 pacijenata sa hipodoncijom i 430 zdravih osoba kontrolne grupe poljske populacije analizirali mutacioni status 13 WNT gena, PAX9, Mix1, i grupe gena uključenih u *WNTβ catenin* signalnu kaskadu (Mostowska i sar. 2013). Slično našim rezultatima, i u ovoj studiji je uočena visoka zastupljenost WNT10A mutacija (62%), ali u njihovom uzorku su

dominirali pacijenti sa oligodoncijom (25-oligodoncija, 1-hipodoncija, ageneza 4-26 zuba). Od svih testiranih gena, na osnovu distribucije genotipova sa mutacijom u WNT10A genu, kod pacijenata sa hipodoncijom i kod kontrolne grupe, pokazano je da jedino mutacija WNT10A gena, dovodi do 9 puta povećanog rizika za razvoj izolovane forme hipodoncije. Pri tome od 9 patogenih mutacija, Mostowska i sar. izdvajaju dve najučestalije mutacije, c.682T>A i c.321C>A. Izražen patogeni efekat homozigotne mutacije, c.321C>A, ogleda se u odsustvu skoro svih stalnih zuba (26 i 21), dok se kod pacijenta sa homozigotnom mutacijom c.682T>A, beleži nešto manji broj odsutnih zuba (10 i 13). Takođe, kao i u našoj studiji navodi se prisustvo i c.337C>T mutacije. Nešto veća zastupljenost mutacija u studiji Mostowske i sar. u odnosu na naše rezultate (62% prema 52%), može se tumačiti većim prosečnim brojem zuba koji nedostaju po u njihovoj studiji (12.3 prema 4.4).

U istraživanju Mostowske i sar. najveća zastupljenost WNT10A mutacija vezuje se za odsustvo drugih premolara i bočnih sekutića. Tako, u navedenoj studiji, među pacijenatima koji su imali nedostatak drugih premolara, 22.6% imalo je mutacije WNT10A gena. U našem istraživanju, kod pacijenata sa hipodoncijom bar jednog drugog premolara, kod 16% pacijenata je uočena mutacija samo WNT10A gena, dok je 32% pacijenata imalo mutacije i WNT10A i RUNX2 gena (zbirno 48%). Takođe, u istoj studiji među pacijentima sa hipodoncijom i odsustvom lateralnih sekutića, 18.6% je imalo mutaciju WNT10A gena. Slično ovim rezultatima, rezultati našeg istraživanja su pokazali da među pacijentima koji su imali nedostatak jednog ili oba lateralna sekutića, kod 12.5% pacijenata je uočena mutacija samo WNT10A gena, dok je čak 50% pacijenata imalo mutacije i WNT10A i RUNX2 gena (zbirno 62,5%). Poredjenjem navedenih rezultata, primetna je nešto veća zastupljenost WNT10A mutacija vezanih za specifičnu grupu zuba u našem uzorku (drugi premolari 48%, bočni sekutići 62,5%).

Poseban osvrt na ulogu bočnih sekutića u dentalnoj agenezi, čija je zastupljenost u opštoj populaciji 0,8- 4,25%, daje Mostowska i sar. u svom istraživanju, dovodeći u vezu ulogu WNT10A mutacija u mikrodonciji i klinastom obliku zuba kod pacijenata sa kongenitalnim nedostatkom lateralnih sekutića (Mostowska i sar. 2015). Naime, u datoj studiji navodi se zastupljenost WNT10A mutacija samo kod pacijenata sa odsustvom bočnih sekutića od 25%, pri čemu su od 4 uočene mutacije, 3 identične kao i u našoj

studiji (c.682T>A, c.337C>T, c.493G>A). Između ostalog, u ovom radu na osnovu poređenja sa kontrolnom grupom, patogeni efekat c.682T>A mutacije, ogleda se u 5 puta povećanom riziku za odsustvo bočnih sekutića, i 30 puta povećanom riziku za razvoj oligodoncije. Svi ovi podaci dodatno potvrđuju značaj udela c.682T>A mutacije (21%) u patogenezi hipodoncije u našem uzorku. Sa druge strane, c.493G>A mutacija u radu Mostowske i sar. ne pokazuje visoku zastupljenost i korelaciju sa težim oblicima zubne ageneze kao i u našoj studiji (3% incidenca), tako da se može smatrati benignom varijantom, što je inače u saglasnosti sa podacima koje navode Bohring i sar. (Bohring i sar. 2009). Inače, fenotipski efekat c.493G>A mutacije može biti posledica zamene jedne amino-kiseline, Gly-Arg, pri čemu se u proteinu formira niz od 3 Arg, koji predstavljaju signal za zadržavanje Wnt proteina u citoplazmi (Marcello i sar. 2010). Nasuprot ovim podacima, c.493G>A mutacija, se relativno češće pronalazi kod pacijenata sa oligodoncijom, u finskoj populaciji (Arte i sar. 2013).

Takođe, relativno mala zastupljenost WNT10A mutacija (oko 20%), u istraživanju Mostowska i sar., može se objasniti većom zastupljenošću pacijenata sa hipodoncijom (nedostatak do 5 zuba) u odnosu na one sa oligodoncijom. Ovi rezultati dodatno potvrđuju uočen trend porasta incidence mutacija sa porastom broja nedostajućih zuba (Mostowska i sar. 2013, Van den Boogard i sar. 2012). Analizom našeg uzorka beleži se porast WNT10A mutacija (pojedinačnih i zbirnih), idući od pacijenata sa manjkom do 5 zuba (50% mutacija) pa do pacijenata sa oligodoncijom (66% mutacija) koji je praćen blagim porastom prosečnog broja zuba koji nedostaju (od 3,4 kod hipodoncija do 8 kod oligodoncija). Sličan trend beleže i kineski autori, pri čemu 16% pacijenata sa mutacijom ima manjak od 1-3 zuba, dok oko 52% pacijenta sa mutacijom ima manjak više od 4 zuba (Song 2014).

Zanimljiv podatak predstavlja činjenica da su u evropskoj populaciji, dominantne mutacije WNT10A gena c.682T>A i c.321C>A, a u kineskoj populaciji c.511C>T i c.637G>A, što potvrđuju brojna istraživanja (Plaisancie i sar. 2013, Van den Boogard i sar. 2012, Arte i sar. 2013, Song 2014). Takođe, dodatna specifičnost vezana za WNT10A mutacije u kineskoj populaciji predstavlja podatak da se na uzorku od 505 pacijenata sa hipodoncijom registruje potpuno nova paleta od 25 različitih WNT10A mutacija (Song 2014).

Nasuprot većini publikovanih podataka, relativno manju zastupljenost mutacija WNT10A gena u švedskoj populaciji, navode Arzoo i sar. (28% pacijenata sa oligodoncijom) (Arzoo i sar. 2014). Korelišući broj broja zuba koji nedostaju sa genotipom, autori ove studije ukazuju na težu kliničku sliku kod pacijenata sa bialelnim mutacijama (11.09 odsutnih zuba) u odnosu na pacijente sa monoalelnim mutacijama (6.82 odsutnih zuba). Takođe, bialelne mutacije u ovoj studiji se povezuju sa značajnim odsustvom molara gornje i donje vilice, kao i centralnih sekutića mandibule. Kada je u pitanju tip zuba koji najčešće nedostaju, i kod pacijenata sa bialelnim i monoalelnim mutacijama, primećeno je značajno odsustvo premolara obe vilice. Kao i u našoj studiji, najčešće otkrivena WNT10A "missense" mutacija u analiziranom uzorku bila je c.682T>A-22,3%, a za kojom sledi još 5 mutacija u znatno manjem procentu, između ostalog i c.337C>T (0,5%).

Slično rezultatima Arzoo i sar. manju zastupljenost WNT10A mutacije (25%) kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom u finskoj populaciji, navode Arte i sar. (Arte i sar. 2014). Ova manja prevalenca može se objasniti kako populacionim razlikama u zastupljenosti mutiranih gena, tako i manjim prosečnim brojem odsutnih zuba (-9) kod analizirane grupe pacijenata. U datoj studiji među 9 mutacija WNT10A gena nalaze se i 3 "missense" mutacije opisane u našem radu, c.682T>A, c.493G>A, c.337C>T. I u ovoj studiji, navedene mutacije u homozigotnom obliku dovode do težih fenotipskih efekata (veći prosečan broj odsutnih zuba, bez simptoma ED), za razliku od pojedinačnih heterozigotnih. Takođe, heterozigotne promene u WNT10A genu, udružene sa mutacijama drugih gena vezanih za agenezu (EDA, EDAR, EDARAAD), rezultuju sličnim fenotipom (težim oblicima) kao i homozigotne (bialelne) mutacije. Generalno gledano, pored razlike u težini kliničke slike između genotipova pokazano je da čak i isti genotipovi mogu imati varijabilne kliničke manifestacije, najverovatnije usled sadejstva drugih genskih i faktora sredine. Suprotno ovim podacima, naši rezultati nisu pokazali povezanost između homozigotnog mutiranog genotipa (ili heterozigotnog genotipa udruženog sa mutacijama drugih gena) i težih oblika hipodoncije. Takođe, fenotipski efekat WNT10A mutacija ne ogleda se samo u broju, već i u tipu odsutnih zuba. Naime, u navedenoj studiji mutacije WNT10A gena dovode se u vezu sa odsustvom, pre svega, drugih premolara i bočnih sekutića, a što je potvrđeno i u našoj

studiji (48% kod drugog premolara, i 62,5% kod bočnog sekutića). Za razliku od fenotipskog efekta WNT10A mutacija, MSX1 mutacije su udružene sa odsustvom trećeg molara i drugog premolara, PAX9 mutacije sa odsustvom stalnih molara, dok se EDA mutacije povezuju sa manjkom mlečnih i stalnih sekutića (Arte i sar. 2013, Arzoo i sar. 2014).

Pored većine referenci koje se odnose na asocijaciju mutacija i hipodoncije, u studiji Vink i sar. mutacije WNT10A gena dovode se u vezu sa hipoplazijom facijalnog skeleta, utičući na taj način na promenu profila (Vink i sar. 2014). Uočene dento-facijalne promene u ovoj studiji mogu biti posledica redukovane osteogeneze viličnih kostiju, usled WNT neaktivne signalne kaskade. Isto zapažanje iznosi i Acharya i sar. dovodeći u vezu teže oblike dentalne ageneze, sa smanjenim rastom, pre svega, gornje vilice (Acharya i sar. 2010). Prema podacima ove studije, a i mnogih drugih, isti tipovi WNT10A mutacija dovode do velike fenotipske varijabilnosti, pri čemu se kao klinički pokazatelji težine poremećaja navode: hipo/oligodontocija udružena sa ektodermalnom displazijom, mikrodoncija, konusni oblik zuba, i hipoplazija viličnih kostiju.

Uzimajući u obzir dostupne kliničke podatke o meziodistalnim širinama zuba pacijenta sa hipodoncijom, a kod kojih su analizirane i mutacije u WNT10A i RUNX2 genima, dobijena je potvrda o manjoj veličini zuba kod ove ciljne grupe. Da su testirani genski markeri verovatno važan faktor u morfogenezi i determinaciji broja zuba, potvrđuju i naši rezultati. Što se tiče prisustva mutacija među pacijentima sa hipodoncijom i smanjenom meziodistalnom širinom zuba, 40% pacijenata imalo je mutaciju WNT10A gena, 70% mutacije RUNX2 gena, dok je istovremeno mutacije u oba gena posedovalo 40% pacijenata, 30% samo mutacije u okviru RUNX2 gena, dok je 30% bilo bez mutacija.

Takođe, u našoj studiji je analizom RUNX2 gena registrovana zastupljenost nukleotidnih izmena kod 59% pacijenata sa hipodoncijom, sa učestalijim promenama dobijenim u egzonu 3 (52%) u odnosu na region egzona 4 (7%). Kada su u pitanju nukleotidne izmene u egzonu 3, zanimljiv podatak predstavlja činjenica da su od 4 dobijene promene, 3 primeri delecionog/insercionog polimorfizma, dok je samo jedna izmena SNP varijanta. Preciznije, deleciju 18 nukleotida, odnosno gubitak 6 Ala od 84.

do 89. pozicije u proteinu pokazalo je 32% pacijenata, dok je po jedan pacijent (3%) imao inserciju CAG tripleta (umetanje Gln između 58. i 59. pozicije u proteinu), odnosno inserciju 21-og nukleotida (umetanje 7 Gln između 65. i 71. pozicije u proteinu). Sve tri izmene predstavljaju primer delecionog/insercionog polimorfizma, sa lokacijom na N terminusu proteina (Q/A domenu), od 48. do 89. aminokiseline. Takođe, u istom regionu uočena je supstitucija, koja je rezultovala tihom mutacijom, odnosno ugradnjom Ala na 80. poziciji (rs 6921145). Interesantan podatak je da u egzonu 4 nisu pronađene nukleotidne izmene, međutim, na 34. poziciji, "uzvodno" od kodirajuće sekvence egzona 4, uočena je kod tri pacijenta, insercija nukleotida C u intronu 3-4.

Posmatrajući uopšteno zastupljenost mutacija kod pacijenata sa hipodoncijom, incidenca pojedinačnih RUNX2 mutacija (24%), nešto je veća nego pojedinačnih WNT10A mutacija (17%), dok svoj udruženi efekat ostvaruju kod 35% pacijenata.

Upoređujući zastupljenost mutacija, u zavisnosti od broja nedostajućih zuba, kod 40% hipodoncija (1-2) su uočene isključivo udružene RUNX2 i WNT10A mutacije, kod 66% hipodoncija (3-4-5), u istom procentu dobijene su pojedinačne i udružene RUNX2 mutacije, dok se kod 50% oligodoncija uočava veća frekvencija udruženih mutacija nego pojedinačnih. Dakle, primetan je porast RUNX2 mutacija sa težinom hipodoncije, pri čemu se značajna razlika uočava između hipodoncija 1-2 i 3-4-5.

Sa ciljem da se manjak najčešće nedostajućih zuba poveže sa specifičnim tipom mutacija ustanovljeno je da nema značajne razlike između lateralnih sekutića i premolara u pogledu zastupljenosti RUNX2 mutacija (pojedinačnih/zbirnih). Međutim, primetna je veća frekvencija pojedinačnih RUNX2 mutacija kod nedostajućih drugih premolara u odnosu na sekutiće.

U pokušaju da navedene rezultate naše mutacione analize jasnije sagledamo i uporedimo sa drugim literaturnim podacima, korišćena je PubMed baza podataka koja RUNX2 mutacije uglavnom dovodi u vezu sa kleidokranijalnom displazijom (KKD) (Mundlos i sar. 1997, Otto i sar. 1997, Lo Muzio i sar. 2007). Samo jedna referenca iz navedene baze prikazuje analizu specifične RUNX2 mutacije, kod pacijenata sa hipodoncijom (Molin i sar. 2015). Kako se mutacije RUNX2 gena prevenstveno

dovode u vezu za poremećajima u razvoju skeleta, pre svega kod pacijenata sa KKD, namera nam je bila da efekte eventualno sličnih mutacija povežemo sa hipodoncijom.

Tako, Lee i sar. u svom prikazu slučaja 29-godišnjeg muškarca sa KKD, pronalaze dve mutacije, p.Ala80 i pTh420Ile (Lee i sar. 2015). Prva od navedenih mutacija, p.Ala80 je dobijena i u našim analizama, dok se pTh420Ile "missense" mutacija u PST domenu (C terminus) povezuje sa redukovanom funkcijom RUNX2 proteina kao transkripcionog faktora. Takođe, isti polimorfizam, rs6921145, beleže Zhang i sar. kod pacijenta sa KKD, čija zdrava majka ima istu promenu (Zhang i sar. 2010). Da dati polimorfizam može imati i fenotipske manifestacije, pokazuju i publikacije koje dovode u vezu rs6921145 (p.Ala80) sa smanjenom gustinom kosti i patološkim frakturama kod žena u menopauzi (Vaughan i sar. 2004, Doecke i sar. 2006).

Takođe, da su promene u sekvenci Q/A domena RUNX2 proteina bitne, potvrđuju i naši rezultati, jer se izmenjena DNK sekvenca uočava baš u ovom regionu, kod pacijenata sa hipodoncijom. Kada su u pitanju promene u normalnom regionu, 23Q/17A, one se retko odnose na promenu dužine poli-Ala(A) ili poli-Gln(Q) niza kod KKD. Prva takva zabeležena ekspanzija poli-Ala niza, usled duplikacije 30bp. u radu Mundlos-a, dovodi do formiranja 23Q/27A (+10Ala) domena, dok se u radu Shibata-e uočava ekspanzija +3Ala (23Q/20A) (Mundlos 1997, Shibata 2016). Sa druge strane, zabeležene su ekspanzije i Gln, 27Q/17A, (+4Gln) kod pacijenata sa KKD (Mastushita 2015). Prema literaturnim podacima, ekspanzije u Q/A domenu transkripcionih faktora, dovode se u vezu sa razvojem različitih kongenitalnih anomalija (Amiel 2004). Generalno, normalan broj Ala je od 14 do 20, dok se patološkim varijantama smatraju nizovi od 18 do 29 Ala. Proteini sa ekspanzijom Ala u poli-Ala nizu, formiraju intraćelijske inkluzije koje se degraduju u proteozomima, a što za posledicu ima ćelijsku smrt. Pored ekspanzije Ala, u Q/A domenu može doći i do uvećanja tripleta za Gln, usled povećane podložnosti ovog regiona greškama u toku replikacije (Yoshida 2002). Promena broja ponovaka za Gln u Q/A domenu, prema literaturnim navodima, vezuje se za stepen mineralizacije kostiju, odnosno podložnosti ka frakturama, kod osoba sa manjkom (15Q, 16Q) i viškom Gln (24Q, 30Q) u australijskoj populaciji, a takođe i u španskoj populaciji, gde se registruju pacijenti sa (16Q, 18Q, i 30Q) (Vaughan 2002, Pineda 2010). Na osnovu iznetih podataka, dve dobijene mutacije u našem uzorku pacijenata, 30Q i 24Q, mogu imati važnu ulogu u razvoju hipodoncije. Generalno,

promene u broju Ala/Gln u okviru Q/A domena, mogu značajno uticati na transaktivacionu funkciju RUNX2 proteina (Sears 2007).

Da se pored insercija i delecije u Q/A domenu, dovode u vezu sa patogeneзом, pokazuju i podaci o prisustvu delecije od 18bp pa se umesto 17 Ala, u u poli-Ala regionu, nalazi 11 Ala, kod pacijenata sa KKD i osteoporozom (Mundlos i sar 1997, Vaughan 2002, Pineda 2010). Kada je u pitanju delecija 18bp, postoje oprečni rezultati, jer se po Mundlos-u ovaj polimorfizam smatra retkom i normalnom genskom varijantom, dok autori Vaughan i Pineda ne pronalaze asocijaciju između 11A gena i smanjene gustine kostiju. Sa druge strane, na osnovu studija asocijacije, ovaj polimorfizam (11A) se dovodi u vezu sa KKD, dok se kod nesrodnih osoba normalne populacije ne registruje (Tessa 2003). Iako se u većini publikacija manjak Ala u Q/A domenu, smatra normalnim polimorfizmom, ne treba zanemariti činjenicu da smanjenje broja Ala, verovatno utiče na sekundarnu strukturu proteina, odnosno na sposobnost aktivacije ciljnih gena od strane RUNX2 proteina. Ova hipoteza može biti potvrđena i našim rezultatima, jer 32% pacijenata sa hipodoncijom, ima prisutan jedan deletiran gen (11A), koji najverovatnije dovodi do redukovane doze RUNX2 proteina, odnosno do nemogućnosti pravilne odontogeneze.

Nasuprot našim podacima o tipu mutacija kod pacijenata sa hipodoncijom, kod pacijenata sa KKD, mutacije RUNX2 gena se pretežno nalaze u DNK vezujućem regionu, Runt domenu proteina, od 102 do 229ak. Najveću incidencu u Runt domenu, gde su uglavnom skoncentrisane "missense" mutacije pokazuje R225Q mutacija (Quack i sar. 1999, Yoshida i sar. 2002). Sa druge strane, u transaktivacionim domenima, Q/A i PST, pretežno se nalaze delecije/insercije, "nonsense" mutacije, i izmenjen splajsing (Kim i sar. 2006). Mutacije u Runt i PST domenima čine oko 65% svih mutacija kod KKD (Yoshida 2002, Otto 2002). Iako se u najvećoj meri beleže mutacije u kodirajućoj sekvenci RUNX2 gena, takođe i polimorfizmi (SNP) u promotoru (regulatornoj sekvenci), mogu imati određenu ulogu u genskoj ekspresiji (Napierala 2005). Pored nekodirajuće sekvence promotora u našoj studiji, u jednoj porodici kroz tri generacije, uočena je nukleotidna supstitucija u intronu 3-4 RUNX2 gena, koja potencijalno može da utiče na obradu prepisa gena, odnosno na sintezu funkcionalnog proteina. Interesantno je da ova promena, prema našim saznanjima do sad nije zabeležena.

Izmene u ovim ključnim domenima RUNX2 proteina, uglavnom dovode do sinteze nefunkcionalnih skraćenih proteina koji se brzo degraduju, a što za posledicu ima narušenu ekspresiju ciljnih gena pod kontrolom RUNX2 faktora. Bez obzira na tip mutacija, sve one dovode do tzv. haploinsuficijencije, odnosno do sinteze nedovoljne količine normalnih proteina, pod kontrolom jednog normalnog gena, jer druga mutirana forma rezultuje nefunkcionalnim proteinom. Umanjena i različita koncentracija RUNX2 proteina u ćelijama, može dovesti do različitih fenotipskih manifestacija kod pacijenata sa KKD, a verovatno i kod pacijenata sa izolovanom hipodoncijom. Suprotno ovim podacima, analizom jedne porodice, Molin i sar., pronalaze duplikaciju RUNX2 gena kod majke i sina sa izolovanom hipodoncijom, dok se kod dva deteta uočava kraniosinostoza udružena sa hipodoncijom (Molin i sar. 2015). Imajući u vidu da RUNX2 gen ima ključnu ulogu u okoštavanju, pretpostavka je da je potrebna veća količina RUNX2 proteina u toku formiranja koštanih struktura, nego tokom odontogeneze (Yoshida 2002).

Preciznije, i pored otkrivenih brojnih mutacija u RUNX2 genu, ne postoji jasna korelacija između specifičnog genotipa i fenotipa, odnosno težine poremećaja, a11 koja može da varira od izolovanih dentalnih anomalija, preko srednjih do teških oblika KKD (Zhou i sar. 1999, Cunningham 2006).

Imajući u vidu da mutaciona analiza RUNX2 gena nije do sad analizirana kod pacijenata sa izolovanom hipodoncijom, dobijeni rezultati mogu ukazati na važnu ulogu RUNX2 gena u etiopatogenezi ove urođene anomalije.

S obzirom na registrovanu relativno visoku stopu mutacija u WNT10A i RUNX2 genima, ovi molekularni markeri mogu imati dodatni značaj u dijagnostici i genetičkom testiranju porodica sa hipodoncijom.

**VI
ZAKLJUČAK**

Zaključci kliničkog dela istraživanja

- Meziodistalne širine svih zuba pacijenata sa urođenim nedostatkom zuba, bile su manje u odnosu na zdrave pacijente. Razlika u veličini zuba pokazuje statističku značajnost za sve zube, osim za gornje očnjake.
- Analiza meziodistalnih širina zuba kod pacijenata sa urođenim nedostatkom zuba i zdravih pacijenata, nije pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na pol, osim kod donjih očnjaka koji su bili statistički značajno širi kod muškaraca nego kod žena
- Kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom i zdravih pacijenata analiza meziodistalnih širina pojedinačnih zuba leve i desne strane nije pokazala statistički značajnu razliku ni za jedan zub, osim za prvi premolar u gornjoj vilici kod pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom i drugi premolar kod zdravih pacijenata, koji su bili širi na desnoj strani zubnog niza
- U grupi pacijenata sa hipodoncijom, najviše su nedostajali gornji lateralni sekutići (35%) i drugi donji premolari (24%)

Zaključci molekularno-genetičkog dela istraživanja

- Mutacije WNT10A gena bile su zastupljene kod 52% pacijenata sa urođenim nedostatkom zuba, dok su mutacije RUNX2 gena registrovane kod 59% pacijenata
- Mutaciona analiza WNT10A gena pokazala je prisustvo 2 nukleotidne izmene u regionu egzona 2 (rs10180544-24%, rs141074983-3%) i 3 nukleotidne izmene u egzonu 3 (rs121908120-21%, rs77583146-3%, rs146902156-3%)
- Sve mutacije u WNT10A genu osim rs10180544 (supstitucija u intronu) su "missense" mutacije, koje mogu imati patogeni efekat, odnosno mogu se povezati sa razvojem hipodoncije, usled potencijalnih izmena u WNT signalnoj kaskadi

- Mutaciona analiza RUNX2 gena pokazala je prisustvo 4 nukleotidne izmene u egzonu 3 (rs 6921145-14%, COSM1658842-32%, rs759395776-3%, rs768156797-3%) i jednu izmenu u regionu egzona 4 (34Ins.C-7%)
- Sve mutacije u egzonu 3 RUNX2 gena, osim rs 6921145 (sinonimna mutacija), predstavljaju "in frame" delecije / ili "in frame" insercije, koje usled gubitka ili dodavanja određenog broja aminokiselina u RUNX2 proteinu, mogu uticati na njegovu transkripcionu aktivnost, odnosno na nemogućnost aktivacije gena odgovornih za odontogenezu
- Mutacije u oba gena WNT10A i RUNX2, registrovane su kod 35% pacijenata sa hipodoncijom, dok kod 25% pacijenata nisu uočene mutacije
- Sa porastom broja zuba koji nedostaju raste i zastupljenost mutacija u oba gena (pojedinačnih ili zbirnih); hipodoncija (1-2 zuba) - 60% mutacija, hipodoncija (3-4-5 zuba) - 77% mutacija, oligodoncija (nedostatak 6 i više zuba) - 83% mutacija
- Mutacije u WNT10A genu pokazuju nešto veću zastupljenost kod pacijenata sa nedostatkom bar jednog lateralnog sekutića (62,5%), nego kod pacijenata sa nedostatkom bar jednog drugog premolara (48%), dok ova razlika nije uočena kada je u pitanju RUNX2 mutacija
- U grupi pacijenata sa hipodoncijom/oligodoncijom koji su pokazali manje vrednosti meziodistalnih širina u odnosu na zdrave pacijente, registrovane su mutacije u oba gena kod 40% pacijenata, dok je kod 30% pacijenata uočena mutacija samo u RUNX2 genu

VII
LITERATURA

- Aberg T, Wang XP, Kim JH, Yamashiro T, Bei M, Rice R, Ryoo HM, Thesleff I. Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. *Dev Biol* 2004; 270: 76–93.
- Acharya PN, Jones SP, Moles D, Gill D, Hunt NP. A cephalometric study to investigate the skeletal relationships in patients with increasing severity of hypodontia. *Angle Orthod.* 2010;80(4):511-8.
- Adaimy L, Chouery E, Mégarbané H, Mroueh S, Delague V, Nicolas E, Belguith H, de Mazancourt P, Mégarbané A. Mutation in WNT10A is associated with an autosomal recessive ectodermal dysplasia: the odonto-onycho-dermal dysplasia. *The American Journal of Human Genetics.* 2007 ;81(4):821-8.
- Amiel J, Trochet D, Clément-Ziza M, Munnich A and Lyonnet S. Polyalanine expansions in human. *Hum. Mol. Genet.*2004; 13: R235–243.
- Arte S .Phenotypic and genotypic features of familial hypodontia.2001.Thesis, Institute of Dentistry, University of Helsinki. Available: <http://ethesis.helsinki.fi>.
- Arte S, Nieminen P, Apajalahti S et al. Characteristics of incisor-premolar hypodontia in families. *J Dent Res* 2001; **80**: 1445-1450.
- Arte S, Parmanen S, Pirinen S, Alaluusua S, Nieminen P. Candidate gene analysis of tooth agenesis identifies novel mutations in six genes and suggests significant role for WNT and EDA signaling and allele combinations. *PLoS One.* 2013;8(8):e73705.
- Arte S, Pirinen S. Hypodontia. <http://www.orphanet/data/patho/GB/uk-hypodontiapdf>. Orphanet 2004.
- Arzoo PS, Klar J, Bergendal B, Norderyd J, Dahl N. WNT10A mutations account for ¼ of population-based isolated oligodontia and show phenotypic correlations. *Am J Med Genet A* 2014;164A(2):353–9.
- Bailit HL. Dental variation among populations: an anthropologic view. *Dent Clin North Am* 1975;19:125-39.

- Banerjee C, Javed A, Choi JY, Green J, Rosen V, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 N-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* 2001;142: 4026–4039.
- Baum B, Cohen M. Agenesis and tooth size in the permanent dentition. *Angle Orthod* 1971;41:100-102.
- Bohring A, Stamm T, Spaich C, Haase C, Spree K, Hehr U, et al. WNT10A mutations are a frequent cause of a broad spectrum of ectodermal dysplasias with sex-biased manifestation pattern in heterozygotes. *Am J Hum Genet* 2009;85(1):97–105.
- Bordei Anca G, Dragos S. Orthodontic treatment considerations for the single tooth implant when a lateral incisor is missing. *Medicine in evolution* 2010;16(2):55-58
- Bronckers AL, Engelse MA, Cavender A, Gaikwad J, D'Souza RN. Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues. *Mech Dev* 2001; 101: 255–258.
- Brook AH, Griffin RC, Smith RN, Townsend GC, Kaur G, Davis GR, Fearn J. Tooth size patterns in patients with hypodontia and supernumerary teeth. *archives of oral biology*. 2009;54:63-70.
- Brook AH, Smith RN, Elcock C, Al-Sharood MH, Shah AA, Karmo M. The measurement of tooth morphology: development and validation of a new image analysis system. *Dental morphology*. 1998:380-7.
- Brook AH. A unifying aetiological explanation for anomalies of human tooth number and size. *Arch Oral Biol*. 1984;29(5):373-8.
- Bufalino A, Paranaiba LM, Gouvea AF, Gueiros LA, et al. Cleidocranial dysplasia: oral features and genetic analysis of 11 patients. *Oral Dis*. 2012;18: 184-190.
- Burzyn'ski NJ, Escobar VH. Classification and genetics of numeric anomalies of dentition. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1983; 19:95–106.

- Butler PM. Studies of the Mammalian Dentition.–Differentiation of the Post-canine Dentition. Proceedings of the Zoological Society of London 1939;B109: 1–36. doi:10.1111/j.1469-7998.1939.tb00021.x
- Celikoglu M, Kamak H. Patterns of third-molar agenesis in an orthodontic patient population with different skeletal malocclusions. Angle Orthodontist. 2012;82(1):165-9.
- Chai WL, Ngeow WC. Familial cases of missing mandibular incisor: three case presentations. Dent Update 1999;26:298–302.
- Chalothorn LA, Beeman CS, Ebersole JL, Kluemper GT, Hicks EP, Kryscio RJ et al. Hypodontia as a risk marker for epithelial ovarian cancer: a case controlled study. J Am Dent Assoc 2008; 139: 163–9.
- Chen S, Rani S, Wu Y, Unterbrink A, Gu TT, Gluhak-Heinrich J, Chuang HH, MacDougall M. Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by Runx2 during odontoblast cytodifferentiation. J Biol Chem 2005; 280:29717–29727.
- Chhabra N, Goswami M, Chhabra A. Genetic basis of dental agenesis - molecular genetics patterning clinical dentistry. Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugia Bucal. 2014;19(2):E112-E9.
- Chosack A, Eidelman E, Cohen T. Hypodontia: a polygenic trait a family study among Israeli Jews. J Dent Res 1975;54:16-9.
- Christiansen M, Kveiborg M, Kassem M, Clark BFC, Rattan SIS. CBFA1 and topoisomerase i mRNA levels decline during cellular aging of human trabecular osteoblasts. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2000; 55: B194–B200.
- Chung CJ, Han JH, Kim KH. The pattern and prevalence of hypodontia in Koreans. Oral Diseases. 2008;14(7):620-5.
- Clayton JM. Congenital dental anomalies occurring in 3,557 children. ASDC J Dent Child 1956;23:206-8.

- Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M, Mansour S, Guigue P, Masmoudi S, Bal E, Chassaing N, Vincent MC, Viot G, Clauss F, Maniere MC, Toupenay S, Le Merrer M, Lyonnet S, Cormier-Daire V, Amiel J, Faivre L, de Prost Y, Munnich A, Bonnefont JP, Bodemer C, Smahi A. Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. *Hum Mutat* 2011;32:70–72.
- Cohen MM Jr. 2009. Perspectives on RUNX genes: An update *Am J Med Genet Part A* 149A 2009;2629–46.
- Cunningham ML, Seto ML, Hing AV, Bull MJ, et al. Cleidocranial dysplasia with severe parietal bone dysplasia: C-terminal RUNX2 mutations. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2006; 76: 78-85.
- Czochrowska EM, Stenvik A, Zachrisson BU. The esthetic outcome of autotransplanted premolars replacing maxillary incisors. *Dental traumatology* 2002 ;18(5): 237-245.
- Das P, Stockton DW, Bauer C, Shaffer LG, D'Souza RN, Wright T, et al. Haploinsufficiency of PAX9 is associated with autosomal dominant hypodontia. *Hum Genet.* 2002; 110: 371–6.
- De Bruijn MFTR, Speck NA. Core-binding factors in hematopoiesis and immune function. *Oncogene* 2004;23:4238–48.
- De Coster PJ, Marks LA, Martens LC, Huysseune A. Dental agenesis: genetic and clinical perspectives. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 2009;38(1):1-17.
- Doecke J. Genetic variation in RUNX2 related to bone mineral density (Phd thesis). Griffith University; 2006.
- Ducy P. Cbfa1: A molecular switch in osteoblast biology. *Developmental Dynamics.* 2000;219(4):461-71.

- Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. Cbfa1 Is a Positive Regulatory Factor in Chondrocyte Maturation. *J Biol Chem* 2000; 275: 8695-8702.
- Erpenstein H, Pfeiffer R A. Sex-linked-dominant hereditary reduction in number of teeth. *Humangenetik* 1967; 4: 280-293.
- Faure J, Baron P, Justumus P. Agénésies des incisives latérales supérieures: evaluation statistiques des traitements par substitution. [Agenesis of upper lateral incisors: statistical evaluation of substitution treatment.] *Rev Orthop Dento Faciale* 1994;28(3):211-24.
- Fekonja A, Cretnik A, Takac I. Hypodontia prevalence and pattern in women with epithelial ovarian cancer. *The Angle Orthodontist*: September 2014, Vol. 84, No. 5, pp. 810-14.
- Fekonja A. Hypodontia Prevalence over Four Decades in a Slovenian Population. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2015;27 (1):37–43
- Fekonja A. Comparison of mesiodistal crown dimension and arch width in subjects with and without hypodontia. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2013;25(3): 203-210.
- Fields HW Jr. Orthodontic-restorative treatment of relative mandibular anterior excess tooth size problems. *Am J Orthod* 1981;79(2):176-83.
- Fleming PS, Marinho V, Johal A: Orthodontic measurements on digital study models compared with plaster models: a systematic review. *Orthod Craniofac Res* 2011;14:1-16
- Fraser GJ, Hulsey CD, Bloomquist RF, Uyesugi K, Manley NR, Streelman JT. An ancient gene network is co-opted for teeth on old and new jaws. *PLoS Biol.* 2009;7(2):e1000031.
- Frazier-Bowers S A, Guo D C, Cavender A et al. A novel mutation in human PAX9 causes molar oligodontia. *J Dent Res* 2002; **81**: 129-133.

- Fukuta Y, Totsuka M, Fukuta Y, Takeda Y, Yoshida Y, Niitsu J, Yamamoto H. Histological and analytical studies of a tooth in a patient with cleidocranial dysostosis. *J Oral Sci* 2001; 43: 85–89.
- Garib DG, Peck S, Gomes CS. Increased Occurrence of Dental Anomalies Associated with Second-Premolar Agenesis. *The Angle Orthodontist* 2009; **79**:3, 436-441.
- Garn SM, Lewis AB. The gradient and the pattern of crown size reduction in simple hypodontia. *Angle Orthod.* 1970;40(1):51–58.
- Goldenberg M, Das P, Messersmith M et al. Clinical, radiographic, and genetic evaluation of a novel form of autosomal-dominant oligodontia. *J Dent Res* 2000; **79**: 1469-1475.
- Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *Journal of Biological Chemistry.* 2006;281(32):22429-33.
- Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS. *Syndromes of the Head and Neck.* New York: Oxford University Press; 1990.
- Grahn H. Hypodontia in the permanent dentition: a clinical and genetical investigation. *Odont Revy* 1956;7:1-100.
- Gungor AY, Turkkahraman H. Tooth sizes in nonsyndromic hypodontia patients. *The Angle Orthodontist* 2013;83(1):16-21.
- Han D, Gong Y, Wu H, Zhang X, Yan M, Wang X, Qu H, Feng H, Song S. Novel EDA mutation resulting in X-linked non-syndromic hypodontia and the pattern of EDA-associated isolated tooth agenesis. *European journal of medical genetics.* 2008;51(6):536-46.
- Hansen L, Riis AK, Silaharoglu A, Hove H, Lauridsen E, Eiberg H, Kreiborg S. RUNX2 analysis of Danish cleidocranial dysplasia families. *Clin Genet.* 2011;79(3):254-63. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01458.x.

- Harris EF, Clark LL. Hypodontia: an epidemiologic study of American black and white people. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 134. United States 2008. p. 761-7.
- Heikkinen T, Alvesalo L, Osborne RH, Tienari J. Maternal smoking and tooth formation in the foetus. II. Tooth crown size in the permanent dentition. *Early Human Development* 1994; 40: 73- 86
- Jankulovski S, Filipovic G. Hipodoncija stalnih zuba dece iz Knjazevca. *Journal of the Anthropological Society of Serbia* 2009;44:141-146
- Janošević M, Filipović G, Rusić-Tasić V. Frequency of hypodontia of permanent teeth in children. *Acta Stomatologica Naissi* 2004;20(45):219-26
- Jiang H, Sodek J, Karsenty G, Thomas H, Ranly D, Chen J. Expression of core binding factor *Osf2/Cbfa-1* and bone sialoprotein in tooth development. *Mech Dev* 1999; 81: 169–173
- Jorgenson RJ. Clinician's view of hypodontia. *J Am Dent Assoc* 1980;101:283-6.
- Jumlongras D, Bei M, Stimson JM et al . A nonsense mutation in *MSX1* causes Witkop syndrome. *Am J Hum Genet.* 2001; 69:67–74
- Kantaputra P, Sripathomsawat W. *WNT10A* and isolated hypodontia. *Am J Med Genet A* 2011;155A(5):1119–22.
- Kerekes Mathe B, Brook AH, Martha K, Szekely M, Smith R. Mild hypodontia is associated with smaller tooth dimensions and cusp numbers than in controls. *Archives of oral biology* 2015 ;60:1442 – 49
- Khalaf K, Miskelly J, Voge E and Macfarlane T. Prevalence of hypodontia and associated factors: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Orthodontics* 2014; 41(4), 299-316. DOI: 10.1179/1465313314Y.0000000116
- Kim HJ, Nam SH, Kim HJ, Park HS, Ryoo HM, Kim SY, Cho TJ, Kim SG, Bae SC, Kim IS, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB, Choi JY. Four novel

RUNX2 mutations including a splice donor site result in the cleidocranial dysplasia phenotype. *J Cell Physiol.* 2006;207(1):114-22.

Kim J, Heo G, Lagravere MO: Accuracy of laser-scanned models compared to plaster models and cone-beam computed tomography. *Angle Orthod* 2013;84(3):443-50. doi:10.2319/051213-365.1.

Kim JW, Simmer JP, Lin BPJ, Hu JCC (2006) Novel MSX1 frameshift causes autosomal-dominant oligodontia. *J Dent Res* 85:267–271

Kim YH. Investigation of hypodontia as clinically related dental anomaly: prevalence and characteristics. *ISRN dentistry*, 2011. doi:10.5402/2011/246135

Kjaer I. Can the location of tooth agenesis and the location of initial bone loss seen in juvenile periodontitis be explained by neural developmental field in the jaws. *Acta Odontol Scand* 1997;55:70–2.

Kobayashi I, Kiyoshima T, Wada H, Matsuo K, Nonaka K, Honda JY, Koyano K, Sakai H. Type II/III Runx2/Cbfa1 is required for tooth germ development. *Bone* 2006;38: 836–844.

Kuchler E, Risso P, Castro Cosa M, Modesto A, Vieira A. Studies of dental anomalies in a large group of school Children. *Archives Oral Biol* 2008;53:941-946

Kumasaka S, Miyagi A, Sakai N, Shindo J, Kashima I. Oligodontia: A radiographic comparison of subjects with Down's syndrome and normal subjects. *Spec Care Dent* 1997;17:137–141.

Lačković V, Nikolić I, Todorović V. Osnovna i oralna histologija i embriologija. Prvo izdanje. Beograd: Data status, 2012

Lammi L, Arte S, Somer M et al. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* 2004; **74**: 1043-1050.

- Larmour CJ, Mossey PA, Thind BS, Forgie AH, Stirrups DR. Hypodontia - A retrospective review of prevalence and etiology. Part I. *Quintessence International*. 2005;36(4):263-70.
- Lee C, Jung HS, Baek JA, Leem DH, Ko SO. Manifestations and treatment in a cleidocranial dysplasia patient with a RUNX2 (T420I) mutation. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2015;37(1):41.
- Leifert MF, Leifert MM, Efstratiadis SS, Cangialosi TJ: Comparison of space analysis Evaluations with digital models and plaster dental casts. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;136:16 e1-4
- Levin EI. Dental esthetics and the golden proportion. *J Prosthet Dent* 1978; 40(3):244-52
- Li Q-L, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K-I, Chi X-Z, Lee C-W, Han S-B, Kim H-M, Kim W-J, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae S-C, Ito Y. Causal relationship between loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002;109:113–124.
- Lin CR, Kiousi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, et al. Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature*. 1999; 401: 279–82.
- Liu F, Chu EY, Watt B, Zhang Y, Gallant NM, Andl T, Yang SH, Lu MM, Piccolo S, Schmidt-Ullrich R, Taketo MM, Morrisey EE, Atit R, Dlugosz AA, Millar SE. Wnt/beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol*. 2008 ;313(1):210-24.
- Liu F, Millar SE. Wnt/ β -catenin Signaling in Oral Tissue Development and Disease. *Journal of Dental Research*. 2010;89(4):318-330. doi:10.1177/0022034510363373.
- Liu H, Li W, Shi S, Habelitz S, Gao C, Denbesten P. MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 923–928.

- Liu Y, Han D, Wang L, Feng H. Down-regulation of Wnt10a affects odontogenesis and proliferation in mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;434(4):717–21.
- Lo Muzio L, Tete S, Mastrangelo F, Cazzolla AP, et al. A novel mutation of gene CBFA1/RUNX2 in cleidocranial dysplasia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2007;37: 115-120.
- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004;20:781–810.
- Ludwig FJ. The mandibular second premolars: morphologic variation and inheritance. *J Dent Res* 1957;36:263-73.
- Lundstrom A. Tooth morphology as a basis for distinguishing monozygotic twins. *Am J Hum Genet* 1963;15:34-43.
- Lundstrom A. Tooth size and occlusion in twins. Basle: Karger;1948.
- Lynham A. Panoramic radiographic survey of hypodontia in Australian Defence Force recruits. *Aust Dent J.* 1990;35(1):19-22.
- MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17 (1): 9–26.
- MacKenzie A, Ferguson M W, Sharpe P T. Hox-7 expression during murine craniofacial development. *Development* 1991; 113: 601-611.
- Marcello E, Gardoni F, Di Luca M, Pérez-Otaño I. An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(14):10376-84.
- Markovic M. Hypodontia in twins. *Swed Dent J Suppl* 1982;15:153-62.
- Mastushita M, Kitoh H, Subasioglu A, Kurt Colak F, Dundar M, Mishima K, Nishida Y and Ishiguro N. A Glutamine Repeat Variant of the RUNX2 Gene Causes Cleidocranial Dysplasia. *Mol. Syndromol.* 2015;6: 50–53.

- Mattheeuws N, Dermaut L, Martens G. Has hypodontia increased in Caucasians during the 20th century? A meta-analysis. *Eur J Orthod*. 2004;26(1):99-103.
- McKeown H, Robinson D, Elcock C, Al-Sharood M, Brook A. Tooth dimensions in hypodontia patients, their unaffected relatives and a control group measured by a new image analysis system. *Eur J Orthod* 2002;24:131–41.
- McNeill RW, Joondeph DR. Congenitally absent maxillary lateral incisors: treatment planning considerations. *Angle Orthod* 1973;43:24-9.
- Mestrovic SR, Rajic Z, Papic JS. Hypodontia in patients with Down's syndrome. *Coll Anthropol* 1998;22:69–72.
- Miletich I, Sharpe PT. Normal and abnormal dental development. *Hum Mol Genet*. 2003;12 Spec No 1:R69-73.
- Molin A, Lopez-Cazaux S, Pichon O, Vincent M, Isidor B, Le Caignec C. Patients with isolated oligo/hypodontia caused by RUNX2 duplication. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2015;167(6):1386-90.
- Mostowska A, Biedziak B, Trzeciak W H. A novel mutation in PAX9 causes familial form of molar oligodontia. *Eur J Hum Genet* 2006; **14**: 173-179.
- Mostowska A, Biedziak B, Zadurska M, Dunin-Wilczynska I, Lianeri M, Jagodzinski PP. Nucleotide variants of genes encoding components of the Wnt signalling pathway and the risk of non-syndromic tooth agenesis. *Clinical genetics*. 2013;84(5):429-40.
- Mostowska A, Biedziak B, Zadurska M, Matuszewska-Trojan S, Jagodziński PP. WNT10A coding variants and maxillary lateral incisor agenesis with associated dental anomalies. *European journal of oral sciences*. 2015;123(1):1-8.
- Mundlos S, Mulliken JB, Abramson DL, Warman ML, Knoll JH, and Olsen BR. Genetic mapping of cleidocranial dysplasia and evidence of a microdeletion in one family. *Hum. Mol Genet* 1995; 4:71–75.

- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*. 1997 ;89(5):773-9.
- Napierala D, Garcia-Rojas X, Sam K, Wakui K, Chen C, Mendoza-Londono R, Zhou G, Zheng Q, Lee B. Mutations and promoter SNPs in RUNX2, a transcriptional regulator of bone formation. *Mol Genet Metab*. 2005;86(1-2):257-68.
- Nasman M, Forsberg CM, Dahllof G. Long-term dental development in children after treatment for malignant disease. *Eur J Orthod*. 1997;19(2):151-9.
- Neubüser A, Peters H, Balling R et al. Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* 1997; **90**: 247-255.
- Nieminen P. Genetic basis of tooth agenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009;312B(4):320–42
- Nik-Hussein NN. Hypodontia in the permanent dentition: a study of its prevalence in Malaysian children. *Aust Orthod J* 1989;11:93–5.
- Nikolić I. Embriologija čoveka: tekst i atlas. Treće izdanje. Beograd: Data status, 2007
- Ogawa T, Kapadia H, Wang B, D'Souza RN. Studies on Pax9-Msx1 protein interactions. *Arch Oral Biol*. 2005; 50: 141–5.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. McKusick- Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). URL: <http://omim.org/>.
- Osborne RH, Horowitz SL, De George FV. Genetic variation in tooth dimensions: a twin study of the permanent anterior teeth. *Am J Hum Genet* 1958;10:350-6.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997;89: 765-771.

- Otto F, Kanegane H, Mundlos S. Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia, *Hum. Mutat.* 2002; 19:209–216.
- Pedersen LB, Clausen N, Schroder H, Schmidt M, Poulsen S. Microdontia and hypodontia of premolars and permanent molars in childhood cancer survivors after chemotherapy. *International Journal of Paediatric Dentistry.* 2012;22(4):239-43.
- Peters H, Neubuser A, Kratochwil K et al. Pax9 deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 1998; 12: 2735-2747.
- Pineda B, Hermenegildo C, Laporta P, Tarín JJ, Cano A, García-Pérez MÁ. Common polymorphisms rather than rare genetic variants of the Runx2 gene are associated with femoral neck BMD in Spanish women. *J Bone Miner Metab.* 2010 ;28(6):696-705. doi: 10.1007/s00774-010-0183-2.
- Pirinen S, Kentala A, Nieminen P et al. Recessively inherited lower incisor hypodontia. *J Med Genet* 2001; 38: 551-556.
- Pirinen S, Thesleff I . Development of the dentition. In: Thilander B, Rönning O (eds). *Introduction to Orthodontics* 1995. Stockholm: Lic Förlag 41-43.
- Plaisancié J, Bailleul-Forestier I, Gaston V, Vaysse F, Lacombe D, Holder-Espinasse M, Abramowicz M, Coubes C, Plessis G, Faivre L, Demeer B, Vincent-Delorme C, Dollfus H, Sigaudy S, Guillén-Navarro E, Verloes A, Jonveaux P, Martin-Coignard D, Colin E, Bieth E, Calvas P, Chassaing N. Mutations in WNT10A are frequently involved in oligodontia associated with minor signs of ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet A.* 2013 Apr;161A(4):671-8.
- Polder BJ, Van't Hof MA, Van der Linden FP, Kuijpers-Jagtman AM A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. *Community Dent Oral Epidemiol* 2004;32: 217-226. doi:10.1111/j.1600-0528.2004.00158.x. PubMed: 15151692.
- Pop Acev D, Gjorgova J. Prevalence of Hypodontia in the Permanent Dentition of

Macedonian Population, *Balk J Dent Med*, 2014; 18:93-98

Quack I, Vonderstrass B, Stock M et al. Mutation analysis of core binding factor A1 in patients with cleidocranial dysplasia. *Am J Hum Genet* 1999;65: 1268–1278.

Quimby ML, Vig KW, Rashid RG, Firestone AR. The accuracy and reliability of measurements made on computer-based digital models. *Angle Orthod* 2004;74:298-303

Rakhshan V. Congenitally missing teeth (hypodontia): A review of the literature concerning the etiology, prevalence, risk factors, patterns and treatment. *Dent Res J (Isfahan)*. 2015;12(1):1-13.

Ranta R. A review of tooth formation in children with cleft lip and palate. *Am J Orthodont Maxillo Ortho* 1986;90:11–18.

Rølling S, Poulsen S. Agenesis of permanent teeth in 8138 Danish schoolchildren: prevalence and intra-oral distribution according to gender. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2009;19(3):172-5.

Rosa M, Zachrisson BU. Integrating esthetic dentistry and space closure in patients with missing maxillary lateral incisors. *J Clin Orthod* 2001; 35:221-234.

Rune B, Sarnas KV. Tooth size and tooth formation in children with advanced hypodontia. *Angle Orthod*. 1974;44(4):316–321.

Rupp RP, Dillehay JK, Squire CF. Orthodontics, prosthodontics, and periodontics: a multidisciplinary approach. *Gen Dent* 1997; 45(3):286-9.

Sabri R.: Management of missing maxillary lateral incisors, *J. Amer. Dent. Assoc.* 130:80-84, 1999.

Santoro M, Galkin S, Teredesai M, Nicolay OF, Cangialosi TJ: Comparison of measurements made on digital and plaster models. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003; 124(1):101-5

- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, et al. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet.* 2000; 24: 391–5.
- Schalk-van der Weide Y . Oligodontia. A clinical, radiographic and genetic evaluation. Thesis. Utrecht, University of Utrecht;1992.
- Schalk-van der Weide Y, Steen W, Beemer F, Bosman F. Reductions in size and left right asymmetry of teeth in human oligodontia. *Arch Oral Biol* 1994;39(11):935-939.
- Sears KE, Goswami A, Flynn JJ, Niswander LA. The correlated evolution of Runx2 tandem repeats, transcriptional activity, and facial length in carnivora. *Evolution & development.* 2007 ;9(6):555-65.
- Seow WK, Hertzberg J. Dental development and molar root length in children with cleidocranial dysplasia. *Pediatr Dent* 1995; 17: 101–105.
- Shapira, Yehoshua, Erwin Lubit, and Mladen M. Kuftinec. Hypodontia in children with various types of clefts. *The Angle Orthodontist* 2000;70(1) : 16-21.
- Shibata A, Machida J, Yamaguchi S, Kimura M, Tatematsu T, Miyachi H, Matsushita M, Kitoh H, Ishiguro N, Nakayama A, Higashi Y, Shimozato K, Tokita Y. Characterisation of novel RUNX2 mutation with alanine tract expansion from Japanese cleidocranial dysplasia patient. *Mutagenesis.* 2016;31(1):61-7
- Skrinjaric I, Barac-Furtinovic V. Anomalije mliječnih zuba i stanje trajne denticije. *Acta Stomatologica Croatica* 1991; 25:151-6
- Sliwinski T, Synowiec E, Czarny P et al. The c.469+46_56del mutation in the homeobox MSX1 gene – a novel risk factor in breast cancer? *Cancer Epidemiol* 2010; 5:652–655
- Smith MM: Vertebrate dentitions at the origin of jaws: when and how pattern evolved. *Evol Dev* 2003, 5:394-413.

- Song S, Han D, Qu H, Gong Y, Wu H, Zhang X, et al. EDA gene mutations underlie non-syndromic oligodontia. *J Dent Res.* 2009;88(2):126–31. doi: 10.1177/0022034508328627. pmid:19278982
- Song S, Zhao R, He H, Zhang J, Feng H, Lin L. WNT10A variants are associated with non-syndromic tooth agenesis in the general population. *Human genetics.* 2014;133(1):117-24.
- Soukup V, Epperlein H, Horacek I, Cerny R: Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature* 2008, 455:795-796.
- Stevens DR, Flores-Mir C.,Nebbe B.,Raboud DW,Heo G, Major PW: Validity, reliability, and reproducibility of plaster vs digital study models:comparison of peer assessment rating and Bolton analysis and their constituent measurements.*Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:794-803
- Svinhufvud E, Myllarniemi S, Norio R. Dominant inheritance of tooth malpositions and their association to hypodontia. *Clin Genet* 1988;34:373-81.
- Symons AL, Stritzel F, Stamation J. Anomalies associated with hypodontia of the permanent lateral incisor and second premolar. *J Clin Pediatr Dent.* 1993;17(2):109-11.
- Ten Cate AR. The experimental investigation of odontogenesis. *Int J Dev Biol* 1995;39:5-11
- Tessa A, Salvi S, Casali C, Garavelli L, Digilio MC, Dotti MT, Di Giandomenico S, Valoppi M, Grieco GS, Comanducci G, Bianchini G, Fortini D, Federico A, Giannotti A, Santorelli FM. Six novel mutations of the RUNX2 gene in Italian patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat.* 2003;22(1):104.
- Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *Journal of cell science* 2003;116(9): 1647-1648.
- Thesleff I. The genetic basis of tooth development and dental defects. *American Journal of Medical Genetics Part A.* 2006;140A(23):2530-5.

- Thesleff I. Current understanding of the process of tooth formation: transfer from the laboratory to the clinic. *Australian dental journal*. 2014;59(s1):48-54.
- Topkara A, Sari Z. Prevalence and distribution of hypodontia in a Turkish orthodontic patient population: results from a large academic cohort. *European Journal of Paediatric Dentistry*. 2011;12(2):123-7.
- Tucker A S, Al Khamis A, Sharpe P T. Interactions between Bmp-4 and Msx-1 act to restrict gene expression to odontogenic mesenchyme. *Dev Dyn* 1998; **212**: 533-539.
- Tuverson DL. Orthodontic treatment using canines in place of missing maxillary lateral incisors. *Am J Orthod* 1970;58(2):109- 27.
- Uslu O, Akcam MO, Evirgen S, Cebeci I. Prevalence of dental anomalies in various malocclusions. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2009;135(3): 328-335.
- Vahid-Dastjerdi E, Borzabadi-Farahani A, Mahdian M, Amini N. Nonsyndromic hypodontia in an Iranian orthodontic population. *J Oral Sci* 2010; 52: 455–61.
- Van den Boogaard MJ, Creton M, Bronkhorst Y, Van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D, et al. Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases. *J Med Genet* 2012;49(5):327–31.
- Van den Boogaard M-J, Creton M, Bronkhorst Y, van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D, et al. Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases. *Journal of Medical Genetics*. 2012;49(5):327-31.
- Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: New discoveries for understanding dental anomalies. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2000;117(6):650-6.
- Vaughan T, Pasco JA, Kotowicz MA, Nicholson GC, Morrison NA .Alleles of RUNX2/CBFA1 gene are associated with differences in bone mineral density and risk of fracture. *J Bone Miner Res* 2002; 17:1527–1534.

- Vaughan T, Reid DM, Morrison NA, Ralston SH .RUNX2 alleles associated with BMD in Scottish women: interaction of RUNX2 alleles with menopausal status and body mass index. *Bone (NY)* 2004; 34:1029–1036
- Vink C, Ockeloen C, ten Kate S, Koolen D, Ploos van Amstel JK, Kuijpers-Jagtman A, van Heumen C, Kleefstra T, Carels C. Variability in dentofacial phenotypes in four families with WNT10A mutations. *Eur J Hum Genet.* 2014 September; 22(9): 1063–1070.
- Viskovic R, Jursic A, Cmelnik N. Hipodoncija-prevalencija I varijacije u ortodontskih pacijenata. *Acta Stomatologica Croatica* 1988;22-1
- Wang XP, O'Connell DJ, Lund JJ et al. Apc inhibition of Wnt signaling regulates supernumerary tooth formation during embryogenesis and throughout adulthood. *Development* 2009; 136 (11): 1939–1949.
- Wu T, Fallin MD, Shi M, Ruczinski I, Liang KY, Hetmanski JB, Wang H, Ingersoll RG, Huang S, Ye X, Wu-Chou YH. Evidence of gene-environment interaction for the RUNX2 gene and environmental tobacco smoke in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology.* 2012 Feb 1;94(2):76-83.
- Yamaguchi T, Tomoyasu Y, Nakadate T, Oguchi K, Maki K. Allergy as a possible predisposing factor for hypodontia. *Eur J Orthod* 2008; 30: 641–44.
- Yamashiro T, Aberg T, Levanon D, Groner Y, Thesleff I. Expression of Runx1, -2 and -3 during tooth, palate and craniofacial bone development. *Mech Dev.* 119 Suppl 1. Ireland 2002. p. S107-10.
- Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M, Tsubakimoto T, Takada K, Takano-Yamamoto T, Thesleff I. Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation.* 2007 ;75(5):452-62.
- Yamashiro T, Aberg T, Levanon D, Groner Y, Thesleff I. Expression of Runx1, -2, and -3 during tooth, palate and craniofacial bone development. *Gene Expr Patterns*

2002;2:109–112.

Yankelson M. Altering canines to resemble lateral incisors: a new technique. *J Int Assoc Dent Child* 1973;4(2):39-40.

Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani N, et al. Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat Genet* 2002; 32: 633–638

Yoshida T, Kanegane H, Osato M, Yanagida M, Miyawaki T, Ito Y, Shigesada K. Functional analysis of RUNX2 mutations in Japanese patients with cleidocranial dysplasia demonstrates novel genotype–phenotype correlations, *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71:724–738.

Zhang C, Zheng S, Wang Y, Zhao Y, Zhu J, Ge L. Mutational analysis of RUNX2 gene in Chinese patients with cleidocranial dysplasia. *Mutagenesis*. 2010 Nov 1;25(6):589-94.

Zhang YW, Yasui N, Kakazu N, Abe T, Takada K, Imai S, Sato M, Nomura S, Ochi T, Okuzumi S, Nogami H, Nagai T, Ohashi H, Ito Y. PEBP2alphaA/CBFA1 mutations in Japanese cleidocranial dysplasia patients, *Gene* 2000;244:21–28.

Zhao X, Zhang Z, Song Y, Zhang X, Zhang Y, Hu Y, et al. Transgenically ectopic expression of Bmp4 to the Msx1 mutant dental mesenchyme restores downstream gene expression but represses Shh and Bmp2 in the enamel knot of wild type tooth germ. *Mech Dev.* 2000; 99: 29–38.

Zhou G, Chen Y, Zhou L, Thirunavukkarasu K, Hecht J, Chitayat D, Gelb BD, Pirinen S, Berry SA, Greenberg CR, Karsenty G. CBFA1 mutation analysis and functional correlation with phenotypic variability in cleidocranial dysplasia. *Human molecular genetics*. 1999 Nov 1;8(12):2311-6.

Zhou Q, Wang Z, Chen J, Song J, Chen L, Lu Y. Development and evaluation of a digital dental modeling method based on grating projection and reverse engineering software. *The Journal of prosthetic dentistry* 2016; 115(1): 42-6.

Zilberman O,Huggare JA,Parikakis KA:Evaluation of the validity of tooth size and arch width measurements using conventional and three-dimensional virtual orthodontic models.Angle Orthod 2003;73:301-6

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Живковић Сандић
број индекса 8/04

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

УТИЦАЈ МУТАЦИЈА RUNX2 И WNT104 ГЕНА
НА БРОЈ И ВЕЉИЧИНУ ЗУБА

- 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, 8.9.2016.

Marija Sandić

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора МАРИЈА ЖИВКОВИЋ САНДИЋ

Број индекса 8/04

Студијски програм _____

Наслов рада УТИЦАЈ МУТАЦИЈА PUNX2 И WNT10A ГЕНА НА
БРОЈ И ВЕЛИЧИНУ ЗУБА

Ментор ПРОФ ДР ЈОРАНИСЛАВ ГИШИЋ, ПРОФ ДР БРАНКА ПОПОВИЋ

Потписани/а МАРИЈА ЖИВКОВИЋ САНДИЋ

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, 8.9.2016.

MŽivkovićSandić

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

УТИЦАЈ МУТАЦИЈА PUNX2 и WNT10A ГЕНА НА
БРОД И ВЕЛИЧИНУ ЗУБА

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, 8.9.2016

M Živčević Sudić