



MEDICINSKI FAKULTET VMA
UNIVERZITET ODBRANE U BEOGRADU
MINISTARSTVO ODBRANE REPUBLIKE SRBIJE



dr Saša Jović

**Povezanost genetičkih promena u tumor supresorima p53, p21 i
cycD1 sa kliničkim parametrima, prognozom i predikcijom odgovora
na hemioterapiju cisplatinom kod pacijenata sa HPV- negativnim
oralnim planocelularnim karcinomom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021. godine

Sadržaj:

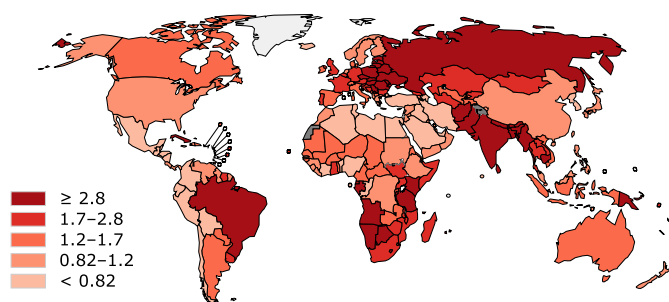
1. UVOD.....	3
1.2 Epidemiologija i etiologija.....	3
1.3 TNM klasifikacija i lečenje.....	6
1.4 HPV i oralni karcinom.....	16
1.5 Tumor supresori i onkogeni.....	20
1.5.1 p53.....	24
1.5.2 p21 i CycD1.....	28
1.5.3 Polimorfizam gena.....	32
2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	33
2.1 Hipoteze.....	33
2.2 Ciljevi istraživanja.....	34
3. ISPITANICI I METODE.....	35
3.1 Etička izjava i studijska grupa.....	35
3.2 Uzorkovanje.....	35
3.3 Genetičke analize.....	36
3.4 Statistička analiza.....	37
4. REZULTATI.....	39
5. DISKUSIJA.....	54
6. ZAKLJUČCI.....	69
7. BIBLIOGRAFIJA.....	70

UVOD

Oralni planocelularni karcinom (oral squamous cell carcinoma - OSCC) je najčešći tip karcinoma glave i vrata koji se odlikuje velikom stopom recidiva i lošim preživljavanjem. Više od 90% karcinoma usne duplje čini planocelularni karcinom (1).

1.2 Epidemiologija i etiologija

Godišnje se, u svetu, dijagnostikuje oko 600000 novootkrivenih bolesnika sa karcinomom glave i vrata (2). Oralni karcinom je šesti karcinom po učestalosti kod muškaraca i deseti kod žena, u razvijenim zemljama, a treći po učestalosti kod muškaraca i četvrti kod žena u zemljama u razvoju (3). Prema izveštajima International Agency for Research on Cancer: Globocan za 2012. godinu, broj novoobolelih od oralnog karcinoma u Srbiji je bio 603 za muškarce i 238 za žene. OSCC je izuzetno redak u dečijem uzrastu. Češće se javlja kod muškaraca nego kod žena, a odnos je od 1,1:1 do 4,4:1, u zavisnosti od posmatranog regiona i zemlje. Najveća učestalost (slika 1) ovog karcinoma na Azijskom kontinentu je u Papua Novoj Gvineji, Pakistanu, Indiji i Bangladešu, a u Evropi u Francuskoj, Letoniji, Mađarskoj, Slovačkoj i Sloveniji, pri čemu se primećuje trend smanjenja u poslednje dve zemlje (4).



Slika 1. Zemlje sa visokom incidencom oralnog karcinoma, muškarci (4)

Smatra se da više faktora učestvuje u nastanku oralnog karcinoma, a najčešće se povezuje sa pušenjem preko 20 cigareta dnevno i konzumiranjem alkohola (3). Oko 20-30% slučajeva OSCC-a može biti povezano sa pušenjem duvana, a 7-19% sa konzumiranjem alkohola, što povećava rizik od karcinoma usne duplje 2-3 puta (5). Rizik za razvoj oralnog karcinoma je 3 puta veći kod pušača (6). Takođe, ovaj rizik je manji za 35% kod ljudi koji su prestali da puše pre četiri godine u odnosu na one koji su nastavili da puše, a identičan je kod onih koji su prestali da puše pre 20 godina u odnosu na nepušače. Važno je naglasiti da se rizik povećava i kod ljudi koji su dugo u okruženju gde se nalazi duvanski dim, a nepušači su. Kod pasivnih pušača je rizik veći za 87% u odnosu na nepušače koji nisu boravili u prostorijama u kojima je duvanski dim (7).

Enzimi alkoholne dehidrogenaze, pre svega acetaldehid dehidrogenaza 2 (ALDH2) i alhololna dehidrogenaza 1C (ADH1C) su ključni enzimi odgovorni za metabolizam alkohola koji vrše oksidaciju i nastanak kancerogenog metabolita, acetaldehida, koji može dovesti do maligne transformacije ćelija usne duplje (Brocic et al, 2011). Osim toga, alkohol inhibira metabolizam folata, narušava sintezu putina i pirimidina utičući na sintezu i popravku oštećene DNK i doveden je u vezu sa povećanom DNK metilacijom na većem broju tumor supresorskih gena kod oralnog karcinoma (Supic et al, 2011). Osim toga, alkohol utiče na karcinogenezu kako lokalno: povećavajući permeabilnost sluznice i olakšavajući ulazak acetaldehida i karcinogena duvanskog dima, tako i sistemski: smanjujući količinu pljuvačke, oštećujući jetru i smanjujući njenu sposobnost da metaboliše alkohol, toksine i potencijalne kancerogene materije i delujući inhibitorno na antitumorski imunski odgovor (7).

U zemljama južne Azije (najviše Indija sa 30% muške populacije, Šri Lanka, Malezija, južni delovi Kine, Tajvan ali i Saudijska Arabija), ukupno 10-20% svetske populacije, rasprostranjeno je žvakanje "betel quid" i „betel nut“ koje dovodi do oralne submukozne fibroze, kao hronične premaligne lezije (8). Konzumiranje više kancerogenih materija povećava kumulativni rizik od razvoja oralnog karcinoma i smanjuje godine u kojima se javlja karcinom gornjeg dela aerodigestivnog trakta, tako da udruženo konzumiranje betel quid sa alkoholom i/ili duvanom dovodi do toga da se kod takvih osoba oralni karcinom javlja 7 godina ranije nego u ostatku populacije (Chien-Hung Lee et al, 2011). Većina nabrojanih faktora mogu da dovedu do pojave "kancerizacije polja" (fields of cancerization) koje je kao termin prvi uveo Slaughter 1953. (9). Ovaj termin označava pojavu da u delovima sluznice, usled izlaganja štetnom delovanju alkohola, kancerogena

duvanskog dima i drugih kancerogenih agenasa, dolazi do genetičkih promena iako histološki deluju neizmenjeno, odnosno zdravo. Na ovim mestima se javljaju lokalni recidivi nakon ekscizije primarnog karcinoma sa patohistološki negativnim, odnosno „čistim“ marginama. Takođe kancerizacija polja dovodi do pojave sekundarnog primarnog karcinoma koji može da budu sa suprotne strane u odnosu na prvobitni ili čak da se javi u drugim delovima aerodigestivnog sistema. Oni mogu da se a razvijaju sinhrono ili metahrono. Najčešće su to karcinomi pluća, ždrela, jednjaka i larinksa. Još je Billroth 1869. pisao o mogućnosti razvoja sekundarnog karcinoma nakon uspešnog lečenja primarnog. Warren and Gates (10) su 1932. definisali kriterijume za sekundarni primarni tumor (SPT): oba moraju da su potvrđena patohistološki, tumori moraju da budu odvojeni normalnom sluznicom (u današnje vreme je to bar 2 cm) i mora da se isključi mogućnost da se radi o metastazi primarnog tumora. Učestalost sekundarnih primarnih tumora tokom petogodišnjeg praćenja, kod prethodno lečenog oralnog karcinoma, je od 10-20% ili čak 5% (Hui-Hsin Ko et al, 2016; Dhooge IJ et al, 1998; Leon X et al, 1999), u zavisnosti od dužine praćenja (11). Boakye i saradnici su 2018. objavili da je pojava sekundarnog primarnog tumora oko 12.3% za HPV-negativni oralni karcinom i da ti pacijenti imaju za 15% veću verovatnoću da razviju sekundarni primarni tumor nego pacijenti sa HPV-pozitivnim oralnim karcinomom (12). Smatra se da je to jedan od glavnih uzroka smrti kod pacijenata sa oralnim karcinomom tokom prve dve do tri godine od početka lečenja (13). Primećeno je da lokalizacija primarnog oralnog karcinoma statistički ne utiče značajno na pojavu sekundarnog primarnog karcinoma (11).

Faktori koji se takođe dovode u vezu sa razvojem oralnog carcinoma su loša oralna higijena, hronična iritacija od strane oštih ivica zuba, koji dovode do hronične inflamacije, kao i infekcija Humanim papilloma virusom (HPV). Prvi put je postavljena sumnja na povezanost HPV infekcije i oralnog karcinoma daleke 1907. godine kad je Ullman povezoao “bradavičaste” promene na lariksu sa HPV infekcijom (14).

Za razliku od odraslih, gde su glavni predisponirajući faktori pušenje i alkoholizam, u dečijem uzrastu treba razmotriti postojanje faktora kod kojih je poremećen sistem popravke DNK oštećenja (DNK repair). Najčešće se dovode u vezu sa Bloom sindromom, kod koga se često javljaju multipli karcinomi (oralni karcinom, karcinom ezofagusa, adenokarcinom sigmoidnog kolona), leukemije i limfomi (15), Fankonijevom anemijom, postojanjem xeroderme pigmentosum, ataxia teleangiectasia (16) (17). Preporuka je da

se kod dece sa planocelularnim karcinomom usne duplje izvrše ispitivanja za postojanje Fankonijeve anemije čak i kad nisu prisutne karakteristične morfološke promene.

Patohistološke varijante oralnog planocelularnog karcinoma: konvencionalni sa različitim stepenom diferencijacije, verukozni planocelularni karcinom, bazaloidni planocelularni karcinom, sarkomatoidni planocelularni karcinom (eng. Spindle cell carcinoma), adenoskvamozni karcinom, akantolitični planocelularni karcinom, papilarni planocelularni karcinom, carcinoma cuniculatum (3). Početni stadijumi oralnih prekanceroznih lezija, promena u vidu beličastih (leukoplakija) ili crvenih (eritroplakija, ređe) polja na sluznici usne duplje koje mogu da se razviju u planocelularni karcinom.

1.3 TNM klasifikacija i lečenje

Hirurgija još uvek ostaje najefikasniji oblik lečenja u najvećem broju slučajeva. Kod najvećeg broja pacijenata se postoperativno sprovodi zračna terapija u seansama od 2 Gy (uglavnom je ukupna doza 60 Gy), pri čemu se oko 20 Gy primenjuje na ležište tumora a 40 Gy na ležište tumora i vrat. Pacijenti koji imaju visok rizik od recidiva bolesti, dva ili više pozitivnih limfonodusa na vratu, ektranodalno širenje tumora, pozitivne margine (iako je u tim slučajevima najadekvatniji pristup dodatna hirurška ekscizija) ili margine koje su blizu tumora (do 5 mm od tumora), infiltracija koštanih struktura, dobijaju i potencijaciju u vidu hemioterapije cisplatinom u dozi do 100mg/m² površine tela. Često je procena o uključivanju hemioterapije i rizika od ranog recidiva bolesti (skraćenog vremena preživljavanja bez bolesti) samo na osnovu hirurških margina neadekvatna zato što su studije pokazale da neki pacijenti, koji su sa patohistološki čistim marginama, imaju poremećaje na molekulularnom nivou u okolnom tkivu, najčešće mutacije u p53, Cyclin D1, p21, p16, Ras (18). Pojava lokalnog recidiva na mestu radikalno ekscidiranog primarnog tumora, sa patohistološki čistim marginama, objašnjava se poljem kancerizacije (field of cancerization) (19) gde je tkivo histološki zdravo ali je genetički izmenjeno.

Procena udaljenosti margina od tumora je i dalje predmet kontroverzi i neki autori tvrde da nisu našli povezanost hirurških margina ispod 5 mm i dužine preživljavanja bez bolesti (20-22).

Postoje dva sistema za klasifikaciju tumora; klinički TNM (cTNM) i patohistološki TNM (pTNM). pTNM se primenjuje samo kod pacijenata koji su operisani a cTNM klasifikacija za sve. Nakon prikupljanja svih podataka koji obuhvataju rezultat biopsije, CT pregled glave i vrata, radiografiju grudnog koša (ili CT), ultrazvuk abdomena i klinički pregled, određuje se klinička TNM klasifikacija (cTNM), stadijum bolesti i donosi odluka o tipu lečenja. Svi pacijenti trebaju da imaju cTNM zbog planiranja daljeg lečenja kao i postojanja uniformnog standarda u svim cetrima u svetu koji omogućava poređenje pacijenata.

Osmo izdanje American joint committee on cancer (AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition) (23) je donelo novine u TNM klasifikaciji, kao i elementima koji su važni za procenu rizika od recidiva bolesti. Neke od ključnih promena su eliminisanje T0 (osim za EpsteinBarr Virus (EBV)) vezani karcinom nazofarinksa i HPV-pozitivan orofaringealni karcinom (koji je odvojen), uvođenje dubine invazije (Depth of invasion; DOI) da bi se napravila razlika između površnih, egzofitičnih u odnosu na mnogo invazivnije i na osnovu koje su tumori klasifikovani na površne < 5mm, srednje dubine >5 mm i < 10mm i invazivne >10mm. Infiltracija geniohioideusa, genioglosusa, hioglosusa i stiloglosusa se više ne kategorizuje kao T4, a razloge je to što DOI zamenjuje ovaj deo i lakša je identifikacija i klasifikacija tokom patohistološke analize. Klinički je često teško razlikovati dubinu invazije, pogotovo za tonzilarnu regiju i meko nepce i kad smo nesigurni, tad se klasifikuje uvek kao niža DOI kategorija. T kriterijum se određuje na osnovu veličine tumora i dubine invazije (23), Tabela 1.

Tabela 1. Određivanje T kriterijuma bolesti

T	Kriterijum
Tx	Primarni tumor nije otkriven
Tis	Tumor in situ
T1	Tumor < 2cm, < 5 mm DOI, imati u vidu da se odnosi na dubinu invazije, a ne debljinu tumora
T2	Tumor < 2cm, DOI > 5 mm i < 10 mm <i>ili</i> tumor > 2 cm, ali < 4 cm i < 10 mm DOI
T3	Tumor > 4 cm Ili bilo koji tumor > 10 mm DOI
T4	Umereno do znatno uznapredovala bolest

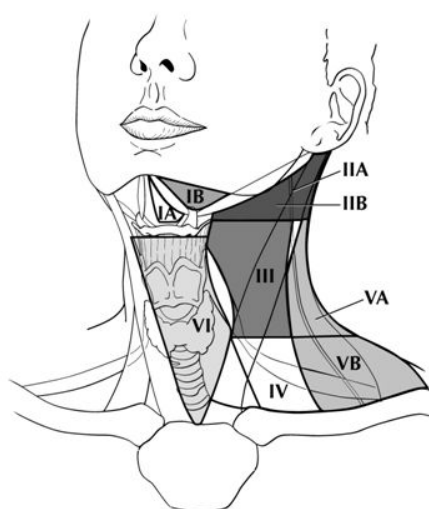
T4a	Umereno uznapredovala lokalna bolest Usna -tumor infiltriše korteks kosti ili n. alveolaris inferior, pod usne duplje ili okolnu kožu Usna duplja - Tumor infiltriše okolne strukture (kroz korteks kosti mandibule ili maksile, maksilarni sinus ili okolnu kožu) Dodatak: površna erozija kosti/samo zubne alveole od strane primarnog gingivalnog tumora nije dovoljan kriterijum za T4 klasifikaciju
T4b	Veoma uznapredovala lokalna bolest, a tumor zahvata mastikatorni prostor, pterigoide ili bazu lobanje i/ili unutrašnju karotidnu arteriju

Takođe su uvedene i promene vezane za limfonodalni status. Ključna promena je uvođenje ekstranodalnog širenja (ENE), čija je uloga na prognozu evidentna i važi za sve osim za visokorizični (High Risk) HPV (23). Prisustvo ENE je često uočljivo i fizičkim pregledom ili radiografskim metodama i može da se uključi u cTNM klasifikaciju, ali radiografija može da bude i nedovoljno sofisticirana tako da ne možemo uvek da se jedino na nju oslonimo. Za cTNM je neophodno da je klinički updaljiva infiltracija okolnih struktura (koža, mišići, nerv) uz istovremeno prisustvo sigurne radiografske potvrde. Meri se najveća dimenzija metastaze, a ne veličina limfonodusa i obavezno obeležava kao ENE pozitivna ili negativna. Kod određivanja pTNM za ENE pozitivno, mora da se vidi siguran proboj kapsule, a svi nesigurni slučajevi se vode kao ENE negativni.

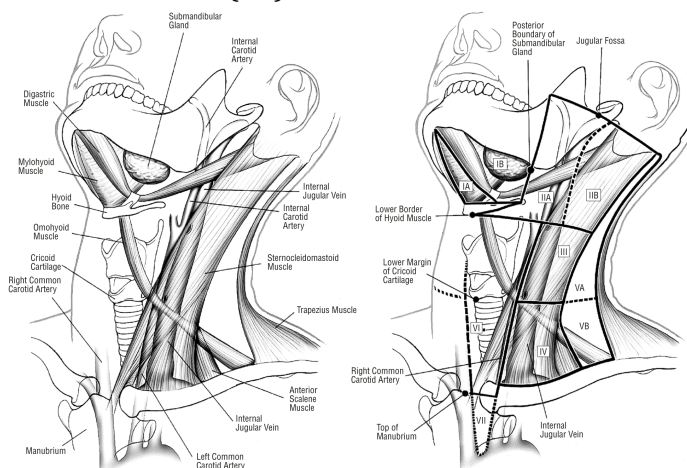
Grupe limfonodusa i njihova drenažna područja (slika 2. i 3.):

1. Submentalna (nivo IA): pod usne duplje, prednji deo jezika, prednji deo alveolarnog grebena, donja usna
2. Submandibularna (nivo IB): usna duplja, prednji deo nosne šupljine, koža i meka tkiva srednje rećine lica
3. Gornja jugularna grupa (nivo IIA i IIB): usna duplja, nosna šupljina, nazofarinks, orofarinks, hipofarinks, larinks, parotidna žlezda
4. Srednja jugularna grupa (nivo III): usna duplja, nazofarinks, orofarinks, hipofarinks, larinks
5. Donja jugularna grupa (nivo IV): hipofarinks, tireoidna žlezda, cervikalni deo ezofagusa, larinks
6. Zadnji trougao vrata (nivo VA i VB): nazofarinks, orofarinks, koža poglavine pozadi i koža vrata
7. Gornji medijastinalni (nivo VII): tireoidna žlezda, ezofagus.

Pored ovih grupa, postoje i limfonodusi koji su podeljeni prema njihovoj lokaciji: subokcipitalni, retrofaringealni, parafaringealni, bukalni, preaurikularni, peri i intraparotidni.



Slika 2. Šematski prikaz grupa limfonodusa na vratu (preuzeto i prilagođeno iz AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition (23))



Slika 3. Šematski prikaz anatomskih granica za grupe limfonodusa na vratu (preuzeto i prilagođeno iz AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition (23))

Određivanje kliničkog (cN) i patohistološkog (pN) stadijuma je prikazano u tabelama broj 2 i 3.

Tabela 2. Klinički nalaz za limfonoduse (cN) (preuzeto i prilagođeno iz AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition) (23)

N kategorija	N kriterijum
NX	Regionalni limfonodusi se ne mogu obraditi
N0	Regionalni limfonodusi se ne detektuju
N1	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfonodusu, 3 cm ili manja u najvećem dijametri i ENE(-)
N2	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfonodusu veća od 3 cm, ali manja od 6 cm u najvećem dijametri i ENE(-); ili metastaza u multiplim ipsilateralnim limfonodusima, ali ne veće od 6 cm i ENE(-); ili u bilateralnim ili kontralateralnim limfonodusima, ali ni jedna ne veća od 6 cm i ENE(-)
N2a	Metastaza u jednom ipsilateralnom ili kontralateralnom limfonodusu veća od 3 cm ali manja od 6 cm i ENE (-)
N2b	Metastaze u multiplim ipsilateralnim limfonodusima, ne veće od 6 cm i ENE (-)
N2c	Metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfonodusima, ne veće od 6 cm i ENE (-)
N3	Metastaza veća od 6 cm i ENE (-); ili metastaza u jednom limfonodusu, ali ENE (+) ili multiplim ipsilateralni, kontralateralnim ili bilateralnim limfonodusima ali ENE(+)
N3a	Metastaza veća od 6 cm i ENE (-)
N3b	Metastaza jednom ipsilateralnom i ENE (+) ili multiplim ipsilateralnim, kontralateralnim ili bilateralnim i bilo koja da je ENE (+)

Tabela 3. Patohistološki nalaz za limfonoduse (pN) (preuzeto i prilagođeno iz AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition) (23)

N kategorija	N kriterijum
NX	Regionalni limfonodusi se ne mogu obraditi
N0	Regionalni limfonodusi se ne detektuju
N1	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfonodusu, 3 cm ili manja u najvećem dijametri i ENE(-)
N2	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfonodusu manja od 3 cm i ENE(+); ili veća od 3 cm, a manja od 6 cm i ENE(-); Ili metastaze u multiplim ipsilateralnim limfonodusima ali ne veće od 6 cm i ENE(-); ili u bilateralnim ili kontralateralnim limfonodusima, ali ni jedna ne veća od 6 cm i ENE(-)
N2a	Metastaza u jednom ipsilateralnom ili kontralateralnom limfonodusu manja od 3 cm i ENE(+); Ili jednom ipsilateralnom i dimenzija od 3cm do 6 cm i ENE(-)
N2b	Metastaze u multiplim ipsilateralnim limfonodusima, ne veće od 6 cm i ENE (-)
N2c	Metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfonodusima, ne veće od 6 cm i ENE (-)
N3	Metastaza veća od 6 cm i ENE (-); ili metastaza u jednom ipsilateralnom limfonodusu do 3 cm, ali ENE(+); ili multiplim ipsilateralni, kontralateralnim ili bilateralnim limfonodusima, ali ENE(+)
N3a	Metastaza veća od 6 cm i ENE(-)
N3b	Metastaza jednom ipsilateralnom veća od 3 cm i ENE(+); ili multiplim ipsilateralnim, kontralateralnim ili bilateralnim i bilo koja da je ENE(+)

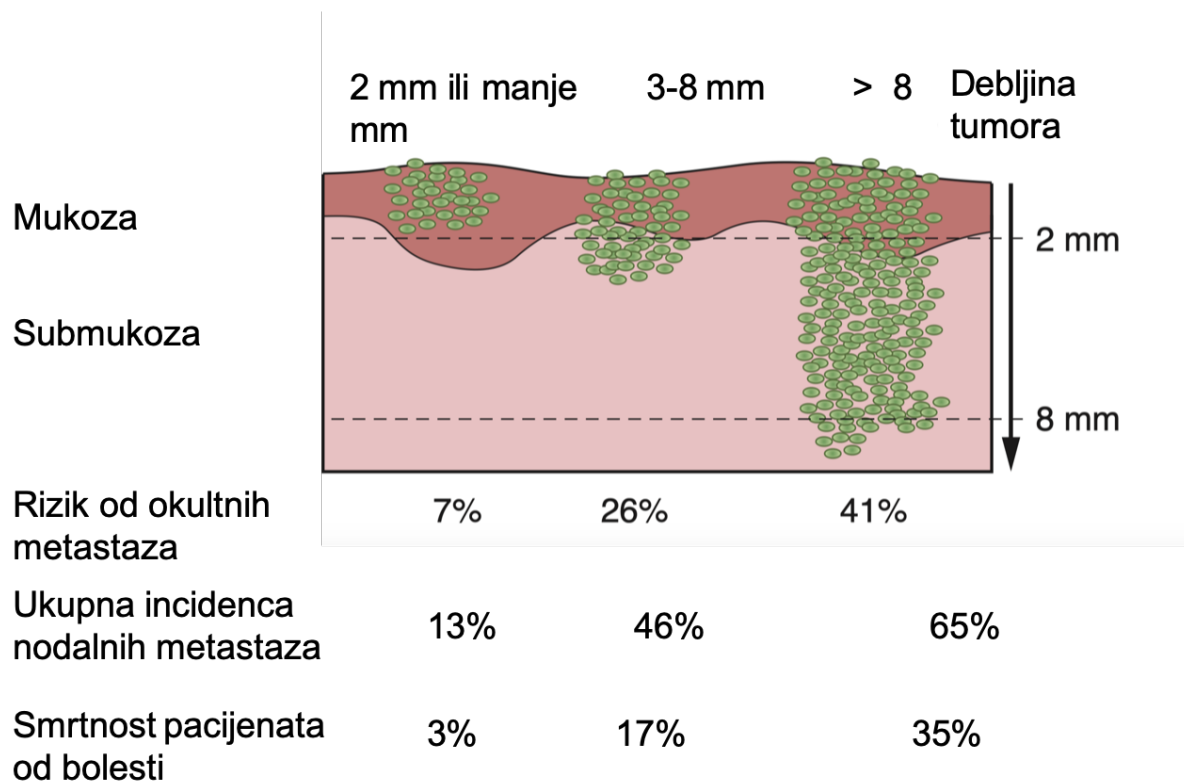
Na osnovu T, N i M kriterijuma se određuje stadijum bolesti, tabela 4. (23).

Tabela 4. AJCC grupe i stadijum bolesti za planocelularni karcinom usne duplje (preuzeto i prilagođeno iz AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition)

T	N	M	Stadijum
T1	N0	M0	I
T2	N0	M0	II
T3	N0	M0	III
T1, 2, 3	N1	M0	III
T4a	N0, 1	M0	IVA
T1, 2, 3, 4	N2	M0	IVA
Bilo koji T	N3	M0	IVB
T4b	Bilo koji N	M0	IVB
Bilo koji T	Bilo koji N	M1	IVC

Kao važni prognostički faktori, pored DOI i ENE, obavezno se beleži perineuralna i limfovaskularna invazija (23). Udaljene metastaze oralnog karcinoma su najčešće u plućima i kostima, a u mozgu i jetri su ređe. Medijastinalni limfonodusi se posmatraju kao udaljene metastaze osim onih koje pripadaju nivou VII (Superior Mediastinal) (23). Dodatni podaci koje treba prikupljati su: komorbiditet, Performance Status – ECOG ili Karnofsky, životne navike (pušenje - kutije dnevno/godine, alkohol - broj čašica/dnevno ili nedeljno, gubitak u težini (više od 10% za tri meseca).

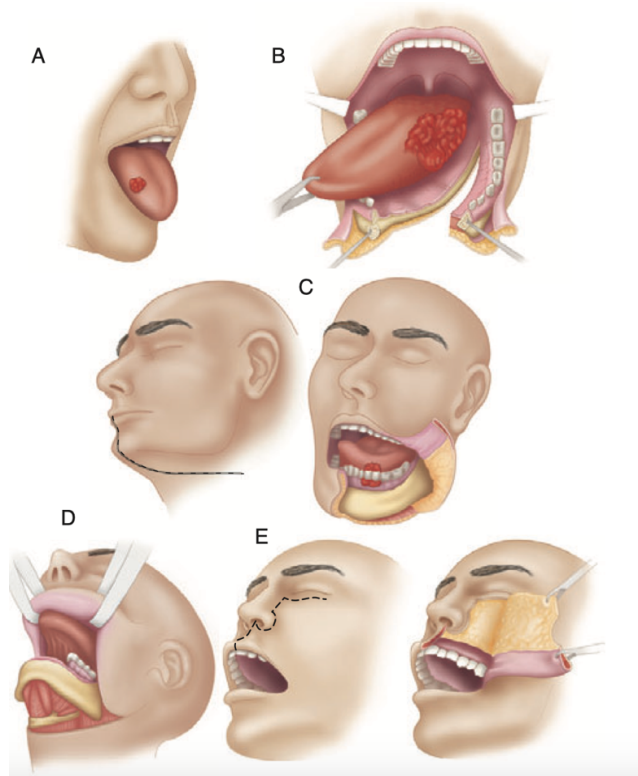
Većina lezija skvamoznog epitela je sa različitim stepenom histološke progresije. One se kreću od od in situ do invazivnog karcinoma. Agresivnost tumora pokazuje histološki gradus. OSCC može da se kreće od diferentovanog do slabo diferentovanog, kao i nediferentovanog i sarkomatoidnog. Ovo je određeno stepenom u kome tumor pokazuje nuklearni pleomorfizam, citološku atipiju i morfološku sličnost sa benignom sluznicom. Tumori koji su slabo diferentovani, nediferentovani ili sarkomatoidnog tipa su najagresivniji. Kao što smo već napomenuli, dubina invazije je jedna od najvažnijih karakteristika koja određuje tip lečenja i utiče na njegov ishod. Plitke i površne lezije imaju odličnu prognozu i veom mali rizik od metastaziranja. Rizik od metastaziranja u zavisnosti od dubine invazije može da se vidi na slici 4.



Slika 4. Preuzeto i modifikovano iz Shah: Head and Neck Surgery and Oncology 4th edition (24)

Na ishod lečenja, pored veličine tumora, stepena diferencijacije i DOI, takođe utiče i da li je rast endofitičan ili egzofitičan, limfovaskularna i perineuralna invazija, infiltracija kosti, nodalni status i ekstrapodalno širenje, udaljenost slobodne margine od tumora (24). Za većinu T1 i T2 OSCC je izbor lečenje hirurgija, i to veoma često kao jedini tretman (dominatno za T1) i praćenje takvih pacijenata po utvrđenom protokolu. T3 i T4 oralni karcinomi zahtevaju, pored inicijalnog hirurškog lečenja, uključivanje postoperativne radioterapije ili u kombinaciji sa hemioterapijom. Studije Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) i European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) su pokazale da se kod pacijenta u uznapredovalim stadijumima bolesti (III i IV) postiže bolja lokoregionalna kontrola bolesti ako se postoperativno primenjuje radiohemioterapija. (24). Hirurško lečenje i operativni plan zavise od lokalizacije tumora (karcinomi donje usne se veoma često ponašaju kao i kožni planocelularni karcinom, a oralni karcinom gingive maksile ima manju tendenciju ka metastaziranju u limfne čvorove; da li je karcinom u prednjem delu usne duplje ili pozadi), veličine, infiltracije lokalnih koštanih struktura (maksila, mandibula), limfonodalnog statusa. Sa povećanjem veličine tumora i

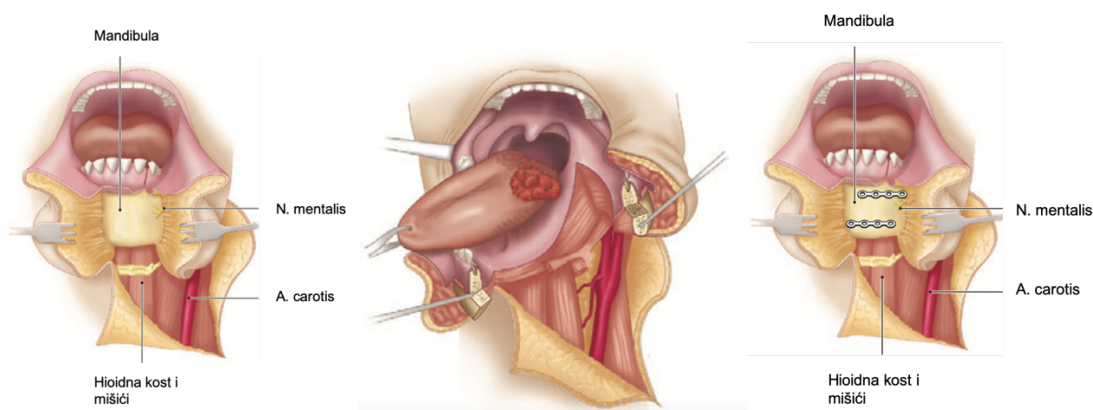
DOI, raste i verovatnoća metastaziranja u limfonoduse vrata, kao i kod tumora u zadnjem delovima usne duplje. Sve ovo ukazuje na neophodnost elektivne disekcije vrata koji je klinički N0. OSCC koji naleže na koštane strukture ne infiltriše kost direktno kroz kompaktnu veću zalazi preko ležišta zuba u alveole (kod pacijenata koji nisu bezubi) i dalje nastavlja infiltraciju, a kod bezubih vilica, dolazi do dentalnih pora na alveolarnom grebenu i odatle započinje infiltraciju. Kod početne invazije mandibule, koja je normalne debljine, moguće je postići adekvatnu hiruršku radikalnost i marginalnom mandibulotomijom, međutim, svaka dublja infiltracija (najčešće više od 5 mm) ili infiltracija bezube i istanjene mandibule, zahteva parcijalne, segmente resekcije mandibule. Trenutne indikacije za segmente resekcije mandibule su: velika infiltracija karcinomom, invazija do mandibularnog kanala (ispadi senzibiliteta usne, brade), masivna infiltracija naležućih mekotkivnih struktura i tkiva, primarni tumor kosti ili metastaze drugih tumora u mandibulu (24).



Slika 5. A. Peroralno, B. Mandibulotomija, C. Lower cheek flap, D. Visor flap, E. Upper cheek flap. (preuzeto i modifikovano iz Shah: Head and Neck Surgery and Oncology 4th edition) (24)

Hirurški pristupi (slika 5) zavise od veličine i lokalizacije tumora, infiltracije kosti, prisutnog trizmusa i kreću se od peroralnog do pristupa koji zahtevaju privremenu mandibulotomiju.

Tumori lokalizovani u zadnjim delovima usne duplje, kao i uznapredovali OSCC, zahtevaju primenu privremene lateralne mandibulotomije (slika 6).



Slika 6. Privremena lateralna mandibulotomija (preuzeto i modificovano iz Shah: Head and Neck Surgery and Oncology 4th edition) (24)

Cilj hirurškog lečenja je radikalna „en bloc“ ekscizija tumora sa poželjnim marginama od 4-5 mm do 1 cm za uznapredovale karcinome (posmatrano trodimenzionalno a ne kao margine na sluznici). Uz eksciziju, naročito za uznapredovale OSCC i klinički suspektne metastaze na vratu, neophodno je uraditi disekciju vrata.

Važeća klasifikacija disekcija vrata Udruženja za hirurgiju glave i vrata i onkologiju Američke akademije za otorinolaringologiju (Head and Neck Surgery and Oncology of the American Academy of Otolaryngology):

- Radikalna disekcija vrata
- Modifikovana radikalna disekcija vrata (tip 1, 2 i 3)
- Selektivne disekcije vrata
- Proširena radikalna disekcija vrata

Radikalna disekcija vrata podrazumeva uklanjanje svih limfonodusa vrata zajedno sa sternokleidomastoidnim mišićem, ligacijom v. jugularis interna-e i presecanjem akcesornog živca, donjim polom parotidne žlezde, submandibularnom žlezdom. Uz

potrebu da se sačuvaju sve nelimfatične strukture, koliko god je to moguće, a u isto vreme postigne identičan terapijski efekat, razvijena je modifikovana radikalna disekcija vrata (tip 1: očuvanje sternokleidomastoidnog mišića, v. jugularis interna-e i akcesornog živca; tip 2: očuvanje v. jugularis interna-e i akcesornog živca; tip 3: očuvanje akcesornog živca). Selektivne disekcije vrata podrazumevaju očuvanje određenih grupa limfnih čvorova. Kod klinički N0 vrata, ili suspektnih limfonodusa u Ia i Ib grupi, najčešće se uklanjaju limfonodusi Ia, Ib, IIa, IIb i III grupe. Proširena disekcija vrata podrazumeva i uklanjanje struktura koje se uobičajeno ne uklanjaju kod radikalne disekcije vrata (ligacija spoljašnje karotidne arterije, hipoglosnog živca, parotidne žlezde, subokcipitalnih limfonodusa, mandibule, prevertebralnih mišića).

Pored istostrane disekcije vrata, zahvaćenost, ili klinička sumnja na zahvaćenost limfonodusa na kontralateralnoj strani vrata (naročito kod tumora koji prelaze središnju liniju poda usne duplje, jezika i na korenu jezika), podrazumeva obostrane disekcije vrata, u zavisnosti od kliničkog nalaza.

Najveći rizik od lokalnog recidiva je tokom prve dve godine, a naročito u prvoj godini nakon hirurškog i postoperativnog lečenja radioterapijom/hemioterapijom (3), tako da se u prvoj godini sprovode mesečne kontrole a u drugoj godini, kontrole na dva meseca. U period praćenja pacijenata, potrebno je uraditi CT pregled glave i vrata nakon šest meseci i nakon godinu dana, kao i klasičnu tomografiju grudnog koša i ultrazvuk abdomena.

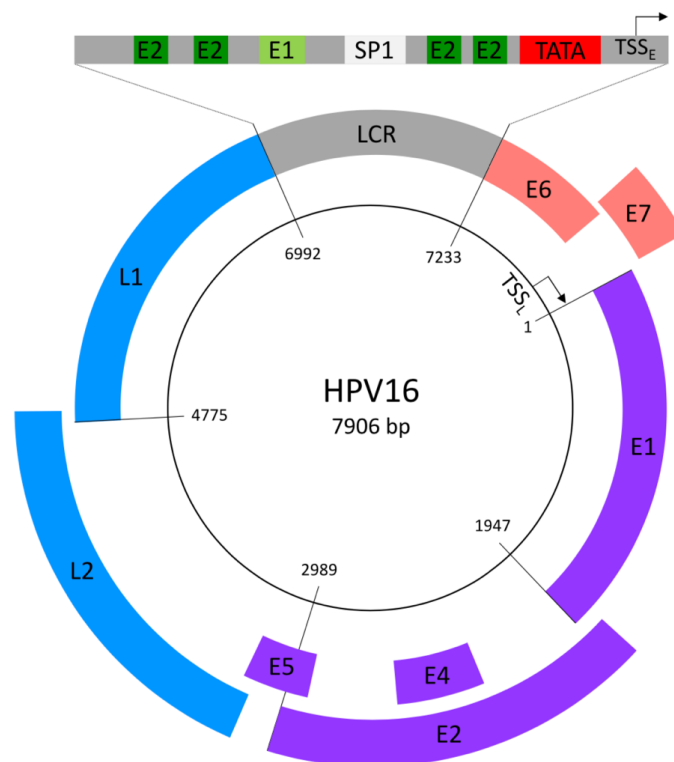
1.4 HPV i oralni karcinom

Humani papilloma virus (HPV) (slika 7) je DNK virus. Manja grupa takozvanih visokorizičnih tipova HPV virusa može da dovede do razvoja prekanceroza. Takođe, manji broj osoba koje su inficirane visoko-rizičnim podtipovima HPV će razviti karcinom, koji se javlja nakon više godina od infekcije. Najveći napredak u povezivanju HPV infekcije i oralnog karcinoma je napravljen posle 2000. godine. U "A review of human carcinogens" je 2009. godine objavljeno da postoje snažni dokazi o povezanosti pojedinih tipova humanog papilloma virusa i oralnog karcinoma (25). Najjača povezanost je između HPV 16 infekcije i karcinoma orofarinksa. Catalan Institute of Oncology (ICO) je sproveo veliku međunarodnu studiju, čiji su rezultati objavljeni 2016. godine. U okviru tog istraživanja

je dokazano da je najveća učestalost HPV infekcije, sa HPV16, u orofarinksu (18.5–22.4 % HPV16 pozitivnih karcinoma orofarinksa, 3.0–4.4 % pozitivnih karcinoma usne duplje, 1.5–3.5 % pozitivnih karcinoma larinksa). HPV16 je detektovan u 75.2 % HPV pozitivnih oralnih karcinoma (83 % orofaringelanih, 68.8 % usne duplje i 50.8 % karcinoma larinksa) (26).

Njegov genom je u vidu cirkularne DNK i sastoji se od 8000 baznih parova (bp) koji kodiraju 10 proteina. Samo jedan lanac se transkribuje u mRNK. HPV genom ima tri regiona:

- 4000 bp region koji kodira proteine uključene u replikaciju virusa
- 3000 bp region koji kodira strukturne proteine virusa
- 1000 bp nekodirajući region koji sadrži početak viralne DNK replikacije i transkripcione regulatorne elemente.



Slika 7. Šematski prikaz HPV (preuzeto i prilagođeno iz Faraji: Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer)

HPV imaju osam kodirajućih područja (open reading frames, ORF) i prema vremenu ekspresije su podjeljena na rana; E1, E2, E4, E5, E6 i E7 i kasna: L1 i L2 (27).

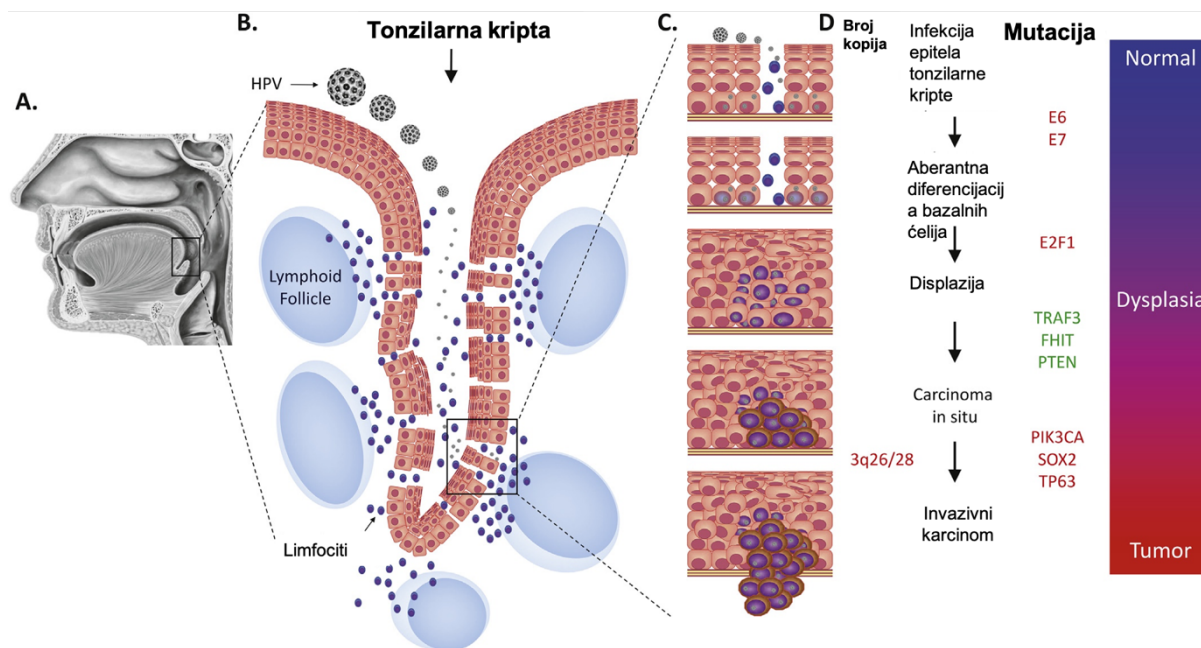
Dva klastera gena se nalaze u okviru HPV genoma: "rani" (early) geni (E1-7) i "kasni" (late) geni (L1, L2) (27, 28). Rani geni kodiraju regulatorne proteine (E1 i E2) i tri onkoproteina (E5, E6 i E7). Kasni geni kodiraju dva strukturna proteina kapsida, L1 i L2. E1 i E2 proteini su neophodni za replikaciju virusa. Uloga E4 gena nije još uvek poznata, ali je njegova ekspresija ključna za produktivnu fazu infekcije papiloma virusom. Ovaj protein je takođe prisutan u velikoj količini tokom kasne faze životnog ciklusa HPV i moguće je da utiče na oslobađanje zrelih virusa (29-31). E5 protein je kratak, transmembranski protein. Iako deluje antiapoptotički, smatra se da E5 nije neophodan za kasnu fazu HPV indukovane karcinogeneze. Sa druge strane, E6 i E7 proteini podržavaju i omogućavaju progresiju ćelijskog ciklusa i virusnu DNK replikaciju u diferentovanim keratinocitima. E6 protein visoko-rizičnih HPV se vezuje i degradira p53 tumor supresor protein, dok se E7 protein vezuje za retinoblastoma (Rb) tumor supresor protein i za njega vezane proteine (32).

Postoji više od 150 vrsta HPV i neki od njih inficiraju mukoza, a drugi epidermalne ćelije. Mukozni, α -HPV, su klasifikovani u nisko-rizične i visoko-rizične HPV prema njihovoj sposobnosti da indukuju malignu transformaciju ćelija mukoze (33). Pored velikog broja različitih tipova HPV, bar dvanaest ih je ubrojano u visoko-rizičnu grupu, a njih deset je identifikovano u HPV pozitivnom orofaringealnom karcinomu (HPV 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 56, 58 i 59), kao i šest nisko-rizičnih (HPV 11, 32, 44, 53, 57 i 81) (34, 35). HPV16 je najčešće izolovan, u 87% slučajeva, a najveći deo preostalih tumora je bio pozitivan na HPV18 and HPV33 (36).

Životni ciklus visoko-rizičnog HPV je vezan za proliferaciju i diferencijaciju ćelija bazalnog sloja epitela. Maligna transformacija sluznice epitela, koja je njim zaražena, zavisi od mnogih procesa, koji uključuju zaobilaženje kontrole ćelijskog ciklusa, DNK sintezu, inhibiciju apoptoze i transkripcioni aktivaciju gena koji promovišu proliferaciju (32).

Ulazno mesto infekcije su keratinociti bazalnog sloja. U eksperimentalnom modelu se sugerije da je za infekciju potreban pristup HPV bazalnoj membrani, a do bazalnog sloja dospevaju preko mikroošćenja epitela kože ili sluznice anogenitalne regije (37, 38).

U orofarinksu, nije neophodno postojanje mikroabrazija pošto limfno tkivo Waldajerovog prstena poseduje specijalizovan retikularni skvamozni epitel koji je infiltrovan limfnim tkivom i u njemu postoje fenestre (slika 8), prekidi u bazalnom sloju, preko koga je omogućen kontakt ćelija imunog sistema sa oralnim antigenima (39, 40).



Slika 8. Ulazak HPV preko kripti limfnog tkiva (preuzeto i prilagođeno iz Faraji: Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer)

Keck et al (41) su objavili rezultate analize ekspresije gena kod HPV-pozitivnih i negativnih tumora i na osnovu toga su predložili podjelu na grupu HPV-negativnih, koje su dalje podjeli na podgrupe bazalnih (basal, BA), klasičnih (classical, CL) i inflamiranih/mezenhimalnih (inflamed/mesenchymal IMS) OSCC. Sa druge strane, grupu HPV pozitivnih su podjeli na klasične (classical, CL) inflamatorne/mezenhimalne (eng. inflamed/mesenchymal IMS). Za bazalni tip su pokazali da ima izraženu ekspresiju hipoksija zavisnih gena (hypoxia-responsive) HIF1A, CA9 i VEGF, zatim receptora faktora rasta EGFR, AREG (amphiregulin) i NRG1 (neuregulin 1/herregulin), kao i epitelijalnih markera P-kadherina (CDH3) i citokeratina (KRT1, KRT9) zbog čega su hiperkeratizovani. Kod klasičnog tipa su uočili povišene količine poliamina (izraženo kod pušača), izraženiji nivo proliferacije u odnosu na druge grupe, povećanu ekspresiju MCM2, MCM10), cell division cycle protein kinase (CDC7) i CDKN2A, E2F2 i RPA2, pri čemu su ovi molekuli mnogo više eksprimirani kod HPV-negativnog klasičnog tipa nego kod istog HPV-pozitivnog klasičnog tipa. Osim toga, uočili su da 74% dugogodišnjih

pušača pripada klasičnom tipu ali HPV-negativnom, dok je kod klasičnog HPV-pozitivnog tipa samo 42% dugogodišnjih pušača.

Inflamirani/mezenhimalni tip pokazao je izraženu ekspresiju gena vezanih za imuni odgovor: CD8, ICOS, LAG3, i HLA-DRA i oni su vezani za CD8⁺ T-limfocitnu infiltraciju u tumoru. Inflamirani/mezenhimalni tip je imao i izraženu ekspresiju mezenhimalnih gena: vimentin (VIM), matriks metaloproteinaze (MMP9) i S100A4, a ovo je tipično udruženo sa povećanim rizikom od metastaziranja. Zatim, smanjenu ekspresiju epitelijalnih markera, kadherina (CDH3) i citokeratini (KRT1, KRT9). Kao i kod HPV-negativnih i HPV-pozitivnih klasičnih tipova OSCC i ovde je uočena razlika u procentu dugogodišnjih pušača koji su češći kod HPV- negativnog OSCC. Inflamirani/mezenhimalni HPV-negativni takođe imaju jače izraženu proliferaciju, dok su HPV-negativni nekeratizovani i slabo diferentovani. Orofaringealni tumori su uglavnom (71%) HPV-pozitivni (klasični ili inflamirani/mezenhimalni tip). Oralni karcinomi su, za razliku od prethodnih, uglavnom (72%) HPV-negativni bazalni tip. 74% klasičnih HPV-negativnih i 85% inflamiranih/mezenhimalnih HPV-negativnih su dugogodišnji pušači. Inflamirani/mezenhimalni HPV-pozitivni tip ima duže petogodišnje preživljavanje od klasičnog HPV-pozitivnog tipa (41).

HPV pozitivni orofaringealni karcinom često izgleda kao lokalno uznapredovao, ali ima bolji odgovor na terapiju i duže preživljavanje. Uzimajući u obzir da je oralni karcinom biološki heterogeno oboljenje, potrebno je naći odgovarajuće biološke markere koji bi omogućavali adekvatnu procenu rizičnosti određenih podvrsta i prognozu koji bi diktirali izbor terapije, pošto je tradicionalni način procenjivanja rizika preko veličine tumora sve više neadekvatan.

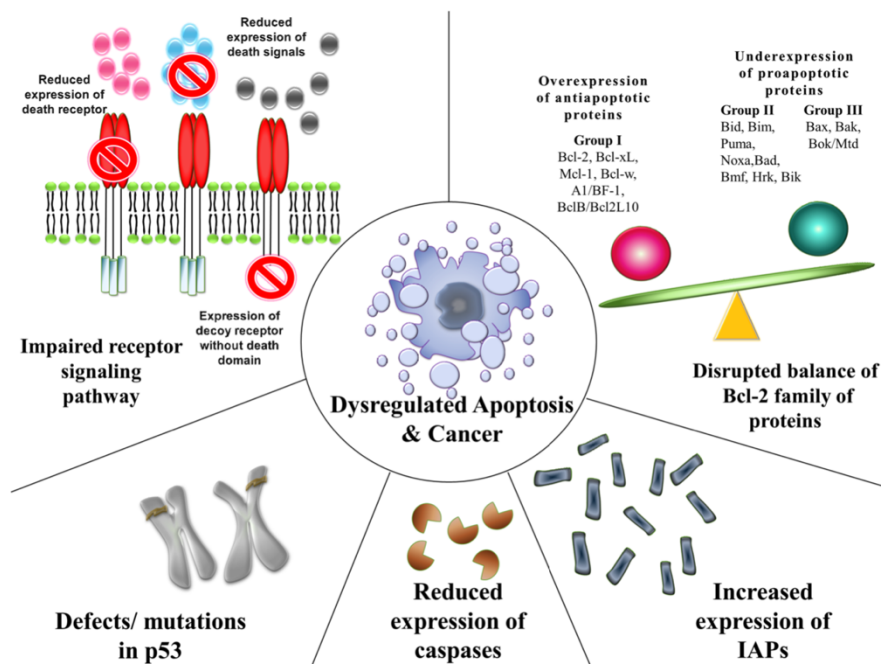
1.5 Tumor supresori i onkogeni

Iako je poznata povezanost unosa alkohola, pušenja i sinergistički efekat ova dva faktora na povećan rizik za pojavu oralnog karcinoma, neće svi alkoholičari i pušači razviti OSCC, što ukazuje na važnost individualne genetske predispozicije. Oralna kancerogeneza je složen i višestepen proces u kome dolazi do progresivnog akumuliranja genetičkih promena. Jedna od osnovnih odlika i uslova maligne transformacije ćelije je inaktivacija negativnih regulatora ćelijske proliferacije – tumor supresorskih gena tačkastim mutacijama, delecijama i rearanžmanima gena.

Onkogeni su geni čiji proteinski produkti potenciraju ćelijsku proliferaciju tokom regulacije ćelijskog ciklusa. Tumor supresor geni kodiraju različite proteine, transkripcione faktore koji omogućavaju aktivaciju apoptoze, programirane ćelijske smrti, i/ili regulatore ćelijskog ciklusa, koji dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i omogućavaju da se genetičke greške isprave pre nastavljanja ciklusa, ili, u slučaju da to nije moguće, usmeravaju ćelije ka apoptozi. Onkogeni i/ili tumor supresori, povezani sa regulacijom ćelijskog ciklusa, su često izmenjeni u kancerogenezi (42).

Razumevanje apoptoze daje uvid u patogenezu bolesti, ali i ukazuje na potencijalna mesta na koja možemo da delujemo u cilju lečenja oboljenja. Kod karcinoma je narušena ravnoteža između ćelijske deobe i apoptoze, a ćelije koje su trebale da budu usmerene ka apoptozi nisu dobile signale da to urade. Problem može nastati u bilo kom koraku na putu apoptoze za koji je najčešće potrebno nekoliko sati od početka do konačne ćelijske fragmentacije (43). Morfološka obeležja apoptoze su kondenzacija hromatina i fragmentacija jedra, zaobljavanje ćelije, smanjenje zapremine ćelije i gubitaka pseudopoda (44). Glavne biohemijske promene koje se tad dešavaju su aktivacija kaspaza, razgradnja DNK i proteina i promene membrane i prepoznavanje od strane fagocitnih ćelija (45). Kaspaze, kao inicijatori i izvršioци, zauzimaju centralnu poziciju u mehanizmu apoptoze. One mogu da se aktiviraju na tri načina: unutrašnji put (mitohondrijalni), spoljašnji put (preko receptora) i put vezan za endoplazmatski retikulum (46, 47). Najpoznatiji receptori za spoljašnji put su tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) i Fas (CD95) protein, kao i njihovi ligandi (48). Unutrašnji put započinje u ćeliji, a na njega utiču stimulus kao što su nepopravljivo genetsko oštećenje (zračenjem, citotoksičnim lekovima), hipoksija, izuzetno visoke koncentracije citosolnog kalcijuma i jak oksidativni stres. Ovaj put je regulisan grupom proteina koji pripadaju Bcl-2 familji proteina. Oni su podeljeni u dve grupe: pro-apoptotički proteini (Bak, Bax, Bad, Bcl-Ks, Bid, Bik, Bim i Hrk) i anti-apoptotički proteini (Bcl-2, Bcl-KSL, Bcl-V, Bfl-1 i Mcl-1). Anti-apoptotički blokiraju oslobađanje citohroma C iz mitohondrija, a pro-apoptotički deluju suprotno. Za spoljašnji put apoptoze je ključna kaspaza 9 (caspase 9), a za spoljašnji kaspaza 8 (caspase 8). Unutrašnji put vezan za endoplazmatski retikulum je najmanje proučen i smatra se da zavisi od kaspaze 12 (caspase 12) i ne zavisi od mitohondrija (46). Mehanizme pomoću kojih dolazi do izbegavanja apoptoze možemo da podelimo na: poremećenu ravnotežu pro-apoptotičkih i anti-apoptotičkih proteina,

smanjenu funkciju kaspaze i poremećenu signalizaciju apoptotičkih receptora (shema 1)
(46)



Shema 1. Mehanizmi izbegavanja apoptoze (preuzeto i prilagođeno iz Rebecca SY Wong: Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment)

Pojačana funkcija onkogena, koja dovodi do povećanog proliferativnog signala i maligne transformacije ćelije, može da nastane usled mutacije na jednoj kopiji onkogena, pa se dominantno nasleđuju. Za razliku od njih, za poremećaj funkcije tumor supresorskih gena i njihove kontrole ćelijskog ciklusa, potrebne su najčešće mutacije na oba alela, što dovodi do recesivnog nasleđivanja. Ovaj model tzv. dvostrukog udara postavio je Knudson još pre 50 godina, ali je u međuvremenu postavljen noviji model haploinsuficijencije, po kome mutacije tumor supresora i u heterozigotnom obliku mogu dovesti do maligne transformacije usled nedovoljne količine tumor supresorskog proteina u ćeliji. Nedostatak ili afunkcionalnost proteina koji su proizvod tumor supresorskih gena, dovodi do odsustva kontrolnih mehanizama u ćelijskom ciklusu, akumulacije genetičkih promena i genomske nestabilnosti, što za posledicu ima malignu transformaciju ćelija. Kao odgovor na DNK oštećenja ćelije dolazi do aktivacije signalnih proteina kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, „checkpoint“ proteina, kao što je ATM, serin/treonin kinaza koja se regrutuje i aktivira usled dvolančanih prekida u molekulima DNK (DNA double-strand

breaks, DSB). ATM kinaza fosforiliše veći broj ključnih proteina koji iniciraju aktivaciju „checkpoint“ proteina DNK oštećenja, koji dalje dovode do aktivacije tumor supresora, predominantno p53, ključnog tumor supresora koji je često mutiran kod karcinoma glave i vrata. Aktivacija p53 proteina dovodi do povećanja njegove koncentracije te premeštanja iz citoplazme u jedro gde se vezuje za ciljne gene i preko njih ostvaruje kontrolu ćelijskog ciklusa.

Prvo zaustavljanje ciklusa je na prelazu iz G1 u S fazu koja se ostvaruje p53 indukovanom transkripcijom p21 koji je zadužen da zaustavi ćelijski ciklus u ovoj fazi. Vezivanje jednog molekula p21 proteina omogućava aktivnost ciklin-zavisnih kinaza, dok vezivanje dva molekula deluje inhibitorno. Progresija ćelije kroz ovu fazu ćelijskog ciklusa zavisi od međusobnog odnosa E2F transkripcionog faktora i proteina retinoblastoma (pRb), gde hipo ili nefosforilisani Rb protein se vezuje za E2F transkripcione faktore i tako blokira njihovo vezivanje za DNK. Fosforilisan ciklin-zavisnim kinazama (CDK2, CDK4/6), pRb se odvaja od E2F i omogućava njihovo delovanje na transkripciju ciljnih gena koji dovode do progresije ćelijskog ciklusa u S fazu. Na ovaj način p53 ima ključnu ulogu u kontrolnoj tački G1/S, čime se osigurava da u S fazu, u kojoj dolazi do replikacije DNK, mogu ući samo ćelije bez DNK oštećenja. Kod ćelija koje imaju akumulirana DNK oštećenja dolazi do zaustavljanja progresije ćelijskog ciklusa, ćelija ostaje u G1 fazi, čime se omogućava vreme da kompleksni mehanizmi DNK reparacije uklone oštećenja. Kad ona budu uklonjena, nastavlja se progresija iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa. Međutim, ako oštećenja ne mogu biti uklonjena, p53 je ključni molekul koji će aktivirati procese apoptoze i uvesti ćeliju sa DNK oštećenjima u programiranu smrt. Kod ćelija kod kojih postoje mutacije u kodirajućim sekvencama TP53 gena koje dovode do ugradnje pogrešne amino kiseline i nastanak nefunkcionalnog p53 proteina, ne dolazi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa pre replikacije pa se mutacije fiksiraju, molekul DNK sa oštećenjem se replicira i ulazi u G2 fazu u kojoj se ćelija priprema za fazu ćelijske deobe, M. U sledećoj ćelijskoj deobi novonastala ćelija i sve ćelije koje iz nje nastanu će imati fiksiranu mutaciju, ako u narednoj kontrolnoj tački na prelazu iz G2 u M fazu ćelijskog ciklusa, progresija ćelijskog ciklusa ne bude zaustavljena i ćelija uvedena u apoptozu. Prolazak kroz G2/M tačku zavisi od aktivacije ciklina B, što omogućava Cdc2 (gen za ciklin zavisnu kinazu 1, CDK1). Inhibicija Cdc2 i ciklina B u velikoj meri zavisi od aktivnosti p53 i p21 koji su neophodni za zadržavanje ćelije u ovoj fazi u slučaju postojanja DNK oštećenja. p21 vrši inicijalnu inhibiciju ciklin B/Cdc2 kompleksa i snižava njihove nivoe u ćeliji. p53 blokira promotore

za ciklin B i Cdc2. Takođe, p53 vrši aktivaciju na više još nekih ciljnih gena, kao što su 14-3-3 σ , koji se vezuje za fosforilisane Cdc2-ciklin B kinaze i transportuje ih iz jedra, i GADD45 koji takođe deluje inhibitory na Cdc2 i ciklin B. U slučaju da se ne izvrši popravka oštećene DNK, ćelija se usmerava ka apoptozi ili ireverzibilnom zaustavljanju ćelijskog ciklusa (senescence). Više ciljnih p53 gena ispoljava proapoptotičku funkciju i za indukciju apoptoze neophodna je njihova simultana i koordinisana aktivacija. Ovi geni se mogu podeliti u dve grupe: prva grupa kodira proteine koji deluju preko receptorima posredovanim signalima a druga grupa kodira proteine koji dalje regulišu apoptotičke efektorske proteine.

1.5.1 p53

Jedan od najbolje proučenih tumor supresora je gen za protein p53 (TP53). Tumor supresor protein p53 su 1979. godine otkrili David Lane, Arnold Levine, Lionel Crawford i Lloyd Old. Dobio je naziv prema masi koja je 53 kilodaltona (kDa). Kodira ga gen TP53 koji se nalazi na kratkom kraku hromozoma 17 (17p13.1) (49, 50). Prvo je posmatran kao molekula (51). Tad je opisano da "wild type" p53 (normalan i funkcionalan p53) zaustavlja ćelijsku deobu, nakon oštećenja ćelije, u G1 fazi i ne dozvoljava prelazak u S fazu ako oštećenje nije popravljeno. U tom slučaju, ćelija se usmerava ka apoptozi. 1993. godine je proglašen za "molekul godine" (52).

Zbog svoje ključne uloge u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze nazvan je "čuvarem genoma" (53), i "ćelijskim čuvarem kapije" (54). Pored privremenog zaustavljanja ćelijskog ciklusa na prelasku iz G1 u S fazu, i određivanja daljeg pravca deobe ćelije, bilo u smislu popravke oštećene DNK ili progresije ka apoptozi, p53, preko retinoblastoma tumor supresorskog puta, može da dovede ćelije u stanje permanentnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa (cellular senescence) (55). I dalje nije tačno poznat mehanizam na koji način ćelije dolaze do prolaznog zaustavljanja ćelijskog ciklusa (checkpoint arrest) ili do ireverzibilnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa (senescence) i na koji način p53 i p16 održavaju to stanje ćelije.

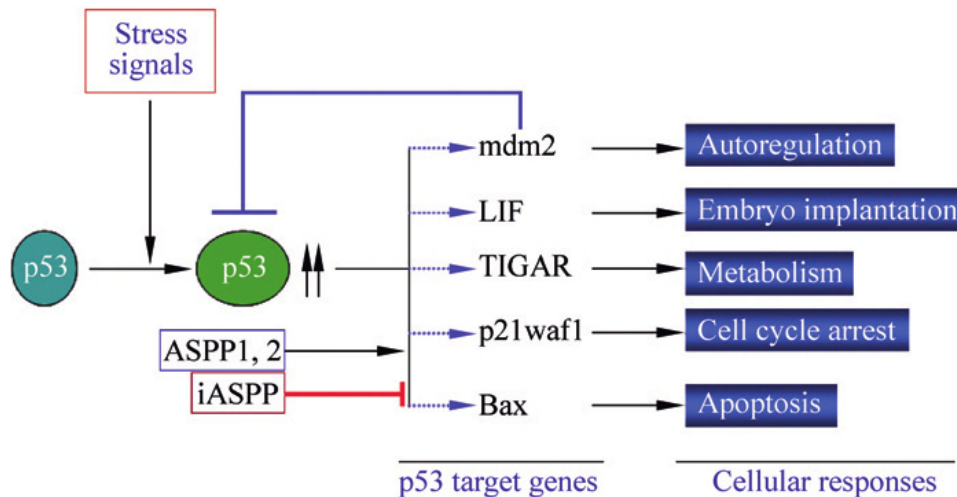
On predstavlja jedan od najčešće mutiranih gena kod karcinoma. Njegova mutacija je otkrivena u više od 50% karcinoma kod ljudi. Li-Fraumeni sindrom je retko oboljenje koje je vezano upravo za mutaciju gena za p53 i prenosi se autozomno dominantno a

dodvodi do predispozicije za rani razvoj karcinoma, prvenstveno sarkoma, karcinoma dojke, leukemija i karcinoma nadbubrega (56).

TP53 gen je veličine 20 kilobaza i sastoji se od 11 egzona od kojih je prvi neaktivan i ima dva mesta na kojima započinje transkripcija. TP53 gen kodira bar devet izoformi p53, zahvaljujući postojanju dva promotora, dva mesta na kojima započinje transkripcija i alternativne obrade primarnog transkripta, odnosno alternativnog splajsinga (splicing) (57). Različite izoforme se eksprimiraju zavisno od vrste tkiva. Dva alternativna splajsing mesta su na intronu 2 i između egzona 9 i 10. Mesto početka transkripcije je na intronu 4 (unutrašnji promotor za TP53 gen). Prvi promotor se nalazi na 100-250 baznih parova (bp) od 218-bp nekodirajućeg prvog egzona, a drugi, jači, na intronu 1 (58, 59). TP53 protein sadrži 393 aminokiseline podeljenih u pet domena kod kojih svaki ima svoju strukturu i funkciju. Prvi domen je N-terminalni domain koji sadrži 42 aminokiseline i naziva se domen za transkripcionu aktivaciju (transcriptional activation, TA domain). On je ključan za aktivaciju p53 target gena. Na njemu se nalazi i mesto za vezivanje HDM2 (humanog analoga MDM2; Mouse double minute 2). Drugi domen (aminokiseline 61-94) je "bogat prolinom" i mutacije na njemu smanjuju sposobnost p53 da posreduje u apoptozi i zaustavljanju ćelijskog ciklusa. Polimorfizam na ovom domenu dovodi do toga da je na ovom delu p53 prisutan ili prolin ili arginin i na taj način nastaju dve forme wild-type p53 (p53P i p53A) koje su funkcionalno drugačije i utiču na odgovor na radio i hemioterapiju. Treći domen (aminokiseline 97-300) je centralni ili DNK-vezujući domen. U okviru njega je region koji je odgovoran za sekvencno-specifično vezivanje za DNK. Većina missense mutacija se odigrava na ovom domenu. Četvrti i peti region (aminokiseline 300-393) je karboksi (C) terminalni region koji sadrži dva manja domena koji su međusobno fleksibilno povezani. Oligomerizacioni domen služi da se od monomera formiraju dimeri i tetrameri.

Karboksi (C) terminalni kraj (aminokiseline 363-393) formira otvoren domen koji vrši interakciju sa DNK-vezujućim domenom i negativno reguliše mogućnost da se p53 vezuje za ciljne gene na DNK lancu. Post translacioni mehanizmi (fosforilacija, acetilacija) C-terminalnog dela konvertuju p53 u aktivnu formu i omogućavaju njegovo vezivanje za ciljne gene (slika 9). Ovaj domen je i odgovoran za sposobnost da se p53 nespecifično vezuje za DNK, a to je važno za proces popravke DNK molekula.

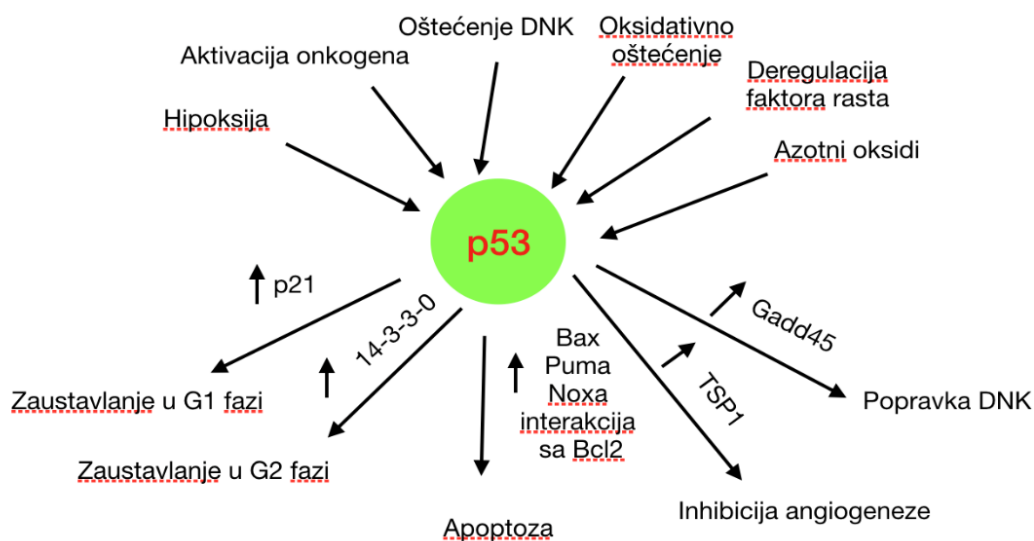
Dokazano je da aktivacija p53, kao odgovor na ćelijski stres i DNK oštećenja, podrazumeva tri osnovna koraka: stabilizaciju p53, sekvencno-specifično vezivanje za DNK i transkripcionu aktivaciju ciljnih gena.



Slika 9. Pojednostavljeni prikaz ciljnih gena za p53 protein nakon njegove aktivacije (preuzeto i prilagođeno iz Xin-Yuan Liu: Recent Advances in Cancer Research and Therapy)

Stabilizacija se primarno postiže preko niza događaja (posttranslaciona modifikacija fosforilacijom amino terminalnog kraja p53 kinazama poput ATM, ATR, DNA-PK, Chk1 i Chk2) koji prekidaju interakciju sa HDM2 proteinom koji je negativni regulator za p53. On se inače vezuje za N-terminalni kraj p53 i time inhibira njegovu transkripcionu aktivnost a fosforilacija amino (N) terminalnog kraja p53 upravo sprečava vezivanje HDM2 i inaktivaciju p53.

Nakon stabilizacije, p53 se, preko DNK vezujućih domena, sekvencno-specifično vezuje za DNK. Upravo ovi DNK vezujući domeni su ključna mesta ("hot spots") za mutacije p53. p53 poseduje i karboksi (C) terminalni kraj preko koga se takođe vezuje za DNK i to u strukturno-specifičnom smislu. Sposobnost vezivanja preko C-terminalnog kraja, olakšava vezivanje p53 za DNK i u ćelijama koje nisu izložene "stresu" i traženje ciljnih mesta koja nastaju nakon oštećenja izazvanim raznim vidovima ćelijskog stresa (55).



Slika 10. Faktori koji utiču na p53 i njegova aktivacija

Različiti oblici ćelijskog stresa, kao što su oštećenje DNK, oksidativno oštećenje, prisustvo aktiviranih onkogena, hipoksija, dejstvo citotoksičnih-antitumorskih agenasa, oštećenje DNK UV i jonizujućim zračenjem, velika količina faktora rasta i citokina, stvaraju signale koje integriše p53 i omogućava ćelijama da odgovore na različite oblike stresa. Ovu funkciju ostvaruje delujući na veliki broj ciljnih gena. Posle bilo kog stresnog signala, povećava se količina p53 u ćeliji, on se prebacuje iz citoplazme u jedro, najčešće formirajući tetramere sa drugim p53 molekulima. Monomeri p53 takođe mogu da deluju kao transkripcioni faktor, ali sa manjom efikasnošću. U formi tetramera, ako je jedan molekul mutiran, tetramer će i dalje delovati kao transkripcioni faktor, ali sa smanjenom aktivnošću. Da bi ceo tetramer bio afunkcionalan, potrebno je da bar tri od četiri molekula budu mutirana, Njegov krucijalni značaj je sprečavanje neadekvatne ćelijske proliferacije zaustavljanjem rasta u različitim tačkama ćelijskog ciklusa i održavanjem integriteta genoma, te usmeravanjem ćelija sa DNK oštećenjem ka apoptozi. Preko p21, 14-3-3-s, cyclin G, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Gadd45 zaustavlja ćelijski ciklus. Dejstvo na ciljne gene Gadd45, ERCC2 (XPD), TF11H omogućava popravku DNK oštećenja, a delujući na Bax, Apaf 1, Puma, Noxa, Fas, PIG3, p53AIP, poly ADP-ribose polymerase (PARP) usmerava ćelije u kojima nije bilo moguće ispraviti DNK grške i oštećenje, ka apoptozi (slika 10).

1.5.2 p21 i Cyclin D1

Homeostaza tkiva zavisi od koordinacije različitih signalnih puteva u ćelijama koji dovode do proliferacije, zaustavljanja rasta, ireverzibilnog zaustavljanju ćelijskog ciklusa ili apoptoze. U kom od ovih pravaca će ćelija krenuti zavisi od regulacije ćelijskog ciklusa koji je, pored ostalog, vezan za aktivaciju i inaktivaciju ciklin zavisnih kinaza (CDK). Postoje dve ključne familije inhibitora ciklin zavisnih kinaza, WAF1/CIPKIP familija, koja obuhvata p21, p27 i p57. Oni inhibiraju više različitih ciklin zavisnih kinaza. Druga familija je INK4 familija, koja obuhvata p15, p16, p18 i p19, koji selektivno bokiraju CDK4 i CDK6. p21 protein, kodiran WAF1/CIP genom (Wild Type p53 Activated Fragment 1/cdk Interacting Protein) je inhibitor ciklin zavisnih kinaza, neophodnih za propagaciju ćelijskog ciklusa i indukuje zaustavljanje u G1/S tački ćelijskog ciklusa (el-Deiry et al, 1993), zavisno ili nezavisno od p53. On je 21-kDa regulatorni protein ćelijskog ciklusa kodiran p21^{WAF1} genom koji se nalazi na hromozomu 6p21.2. p51 i p73, kao p53 zavisni produkti, stimulišu sintezu p21. (60). Pored zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1/S tački, p21 utiče i na prelaz G2 u M fazu.

Vezivanje za kompleks ciklin/ciklin zavisna kinaza se odvija preko amino terminalnog kraja proteina p21. Karboksi terminalni kraj proteina je sa dva fosforilišuća mesta preko kojih se vezuje ili za proliferišući nuklearni ćelijski antigen (PCNA - Proliferating cell nuclear antigen) ili za kompleks ciklin/ciklin zavisna kinaza.

p21 se direktno veže za katalitičke podjedinice ciklin zavisnih kinaza u kompleksima koji sadrže cikline A, B, D i E, a pokazalo se da njegova povećana ekspresija smanjuje aktivnost ciklin zavisnih kinaza i inhibira sintezu DNK. Za inhibiciju kompleksa ciklini/ciklin zavisne kinaze je nekad neophodno da se veže više p21 molekula, kao što je to u G1 fazi, a u S fazi je dovoljno vezivanje jednog p21 molekula. Ovo sugerise da je molekul ciklina taj koji određuje stehiometrijski uticaj inhibitornog efekta p21 (61).

p21 igra ulogu i u diferencijaciji ćelija. U normalnoj oralnoj sluznici je eksprimiran u manje od 60% ćelija (isključivo u slojevima sa diferencijacijom, ali ne i u proliferišućim slojevima), u displazijama do 90% a kod karcinoma do 80% ćelija (62). Još uvek nije sa

sigurnošću potvrđena njegova uloga u tumorskoj diferencijaciji pošto su neke studije našle tu povezanost (63, 64), ali druge to nisu dokazale (65, 66).

U G₀ fazi p21 dovodi do privremenog zaustavljanja ćelijskog ciklusa. Tad dolazi do povećanja kompleksa cyclinD/cdk4 i cyclinD/cdk6 koji započinju fosforilaciju retinoblastom proteina (pRb), a tu fosforilaciju dovršava cyclinE/cdk2 kompleks. Ta fosforilacija dovodi do oslobađanja E2F koji se odvajava od pRb i omogućava transaktivaciju ciljnih gena neophodnih za nastavak ćelijskog ciklusa i prelazak u S fazu. p21 u G₁ fazi deluje dvojako. Bazalni nivoi p21 su neophodni da bi se aktivirao cyclin D/cdk kompleks, dok visoki nivoi upravo blokiraju aktivnost tog kompleksa. Inhibitorni efekat p21 je dominantan, naročito na cyclin E/cdk 2 kompleks. Zaustavljanje ciklusa u G₁ fazi, p21 vrši i vezivanjem za PCNA blokirajući njegovu interakciju sa DNK metiltransferazom te na taj način blokirajući DNK replikaciju.

Nivo p21 se povećava kao odgovor na različite vidove DNK oštećenja, nakon aktivacije p53 koji direktno povećava ekspresiju p21. Međutim, do povećane ekspresije p21 dolazi i kod ćelija sa mutiranim i afunkcionalnim p53, što ukazuje da postoje p53-zaivisni i p53-nezavisni načini povećanja nivoa p21. Još uvek nije u potpunosti razjašnjen mehanizam indukcije p21 nakon oštećenja DNK u ćelijama sa mutiranim p53, ali je pokazano da je p53-nezavisno povećanje nivoa p21 u ćelijama zavisi od citokina, kao što je TGF- β , glukokortikoida i retinoida (67, 68).

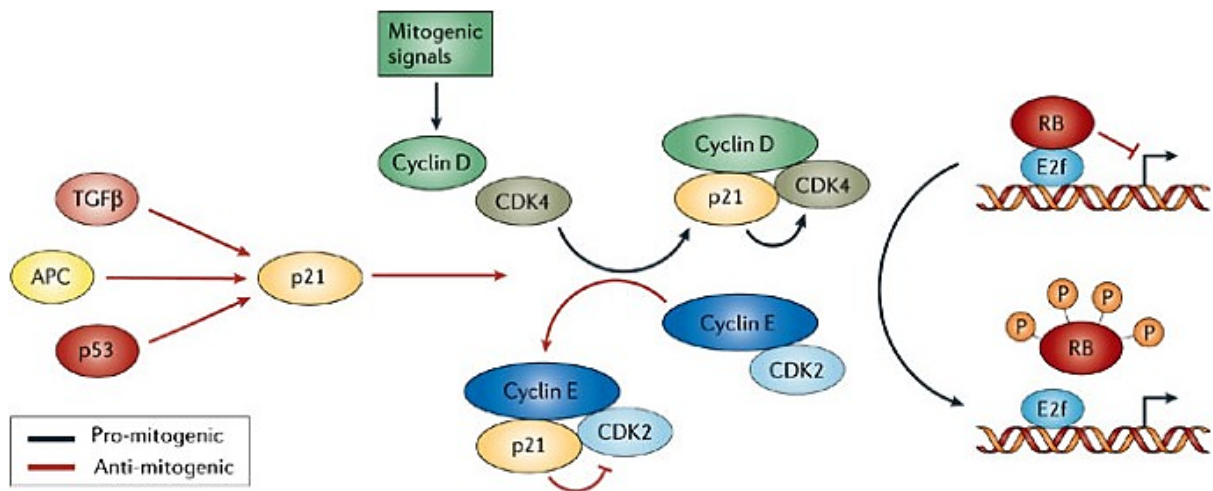
Iako mnoge studije nisu dokazale povezanost povišenih nivoa p21 tokom ćelijske diferencijacije, kao što je to kod keratinocita oralne sluznice, postoji mnogo dokaza da ćelije sa niskim nivoom p21 nisu u stanju da uđu u stadijum trajnog zaustavljanja deobe i pokrenu mehanizme za diferencijaciju. Takođe, ove ćelije mogu da započnu nove deobne cikluse i sintezu DNK nakon nekoliko dana i na taj način je zaključeno da su visoki nivoi p21 neophodni za trajno zaustavljanje ćelijskog ciklusa i početak diferencijacije (69).

Ako se zna uloga p53 u apoptozi, logična je veza između p21, kao jednog od ciljnih gena na koje on utiče, i apoptoze ćelije. On je ciljno mesto na koje deluje kaspazu 3, uklanjajući 52 aminokiseline sa C-terminalnog kraja ovog proteina, čime se uklanja mesto za vezivanje PCNA. Ovakva inaktivacija p21 je verovatno jedan od ključnih trenutaka kad ćelija nije više u stanju zaustavljanja ćelijskog ciklusa, već se usmerava ka apoptozi. Međutim, on može da se veže i za prokaspazu 3 da bi inaktivisao kaspazu 3 i time degradaciju p21. Ovo vezivanje može čak da bude posledica disfunkcije mitohondrija i smanjene produkcije ATP-a (70-72).

Ciklini su ključni regulatori ćelijskog ciklusa koji omogućavaju rast normalnih ćelija, ali i tumorskih ćelija kod oralnog karcinoma. Ciklini D grupe su regulatorne komponente ciklin zavisnih kinaza (CDK4/CDK6) i važni su za G1 fazu ćelijskog ciklusa. Ciklini A i E grupe, zajedno sa CDK2, su važni za tranziciju G1 u S fazu, progresiju S faze i ulazak u M fazu. Postoje tri izoforme ciklina D (veličine 33-34 kDa): D1, D2 i D3, ali je samo D1 značajno eksprimiran u oralnom karcinomu (73). Njegova transkripcija zavisi od faze ćelijskog ciklusa, a na to utiču mnogi transkripcioni faktori, kao što su STAT3/5A, NFκB, ETS1, β-Catenin, c-Myc i AP-1 (74). Pojačana ekspresija epidermalnog faktora rasta (EGFR) je veoma česta u oralnom karcinomu, a on utiče na JAK/STAT signalni put indukcije ekspresije ciklina D1. Ciklin D1 gen se nalazi na hromozomu 11q13 i prvi put je otkriven u paratireoidnim adenomima. Pojačana ekspresija ciklina D1 ubrzava prolazak ćelije kroz G1 fazu i smanjuje potrebu za mitogenima (75). Jedna od najznačajnijih uloga je da, kao onkogen, u formi kompleksa sa ciklin zavisnim kinazama CDK4 i CDK6 vrši fosforilaciju pRb i tako suprimira njegovu inhibitornu funkciju na rast ćelija (76). Mehanizmi koji leže u osnovi prekomerne ekspresije ciklina D1 kod karcinoma uključuju amplifikaciju gena, hromozomsku translokaciju i mitogenu stimulaciju transkripcije gena. Polimorfizmi nukleotidne sekvence (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) u genu za ciklin D1 su nađeni kod oralnih karcinoma i dovedeni u vezu sa sprečavanjem degradacije ciklin D1 proteina (77, 78).

U većini primarnih oralnih karcinoma, prekomerna ekspresija ciklina D1 je nezavisna od p16^{INK4} inaktivacije (79), a vezana je za povećanu sklonost ka pojavi okultnih metastaza i lošijom prognozom (80). Kod eksperimentalnih životinja, njegova pojačana ekspresija, zajedno sa afunkcionalnim p53, je dovela do vrlo brzog razvoja oralnih displazija i njihove progresije u oralni karcinom.

Kompleksi ciklini/ciklin-zavisne kinaze (CDK) i inhibitori kinaze zavisni od ciklina (CKI), su ključni modulatori progresije ćelijskog ciklusa. Fazno specifični ciklini i CDK su aktivni u različitim fazama ćelijskog ciklusa i bitni su za kontrolu ćelijskog ciklusa. Cdk2 kontroliše prelazak G1-S i S fazu, dok su Cdk4 i Cdk6 važni za napredovanje napredovanje u G1 fazi (81). Nakon oštećenja DNK, različiti mehanizmi inhibiraju različite ciklin-zavisne kinaze. Cdk2 je inhibiran od strane p21, dok saradnja p21 i drugih inhibitora CDK, poput p27, inhibira Cdk4, a fosforilacija Thr-14/Tir-15 inhibira Cdk2 (81).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Slika 11. Interakcija p53, p21 i cdc2 pri malignoj transformaciji. Preuzeto iz Rowland, B., Peeper, D. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 11–23 (2006).

CDK inhibitor p21 (Waf1/Cip1/CDKN1A) je član porodice CIP/KIP, zajedno sa p27 i p57, koji reguliše prelaz iz G1 u S fazu i modulira ćelijski ciklus i apoptozu (42). Tumor supresor gene CDKN1A kodira p21 protein i nakon oštećenja DNK, p53 na više reguliše ekspresiju p21 (82). Do danas je opisano najmanje 40 genetskih varijanti CDKN1A, od kojih sedam ima učestalost alela veću od 10% (83). Među opsežno proučenim varijantama su rs1801270 (C> A), missense varijanta koja se nalazi u kodonu 31 i rs1059234 (T> C) u 3'- untranslated regionu gena CDKN1A. Obe varijante mogu uticati na funkciju p21 proteina i posledično dovesti do kancerogeneze.

Protoonkogen CCND1 nalazi se na hromozomu 11k13 i kodira 45-kDa proteinski ciklin D1 (cyclin D1, Cdc21). Cdc21 stupa u interakciju sa ciklin-zavisnim kinazama 4 i 6 (CDK4/6) i glavni je regulatorni protein za prelazak G1-S. Ovaj kompleks katalizuje fosforilaciju retinoblastoma (Rb), podstičući oslobađanje E2F, što dodatno pogoduje progresiji ćelijskog ciklusa. rs9344 (G> A) varijanta gena CCND1, koji se nalazi na splicing regionu u egzonu 4, na poziciji 870, rezultira sintezom skraćene proteinske varijante, ciklina D1b (cyclin D1b), koji ima veću transformacionu aktivnost (84).

1.5.3 Polimorfizam gena

Proteklih godina se u velikom broju studija istražuju polimorfizmi gena kao izvor genetičke predispozicije za nastanak kompleksnih bolesti, uključujući i različite tipove tumora. Polimorfizmi su varijacije sekvenci DNK koje su zajedničke za određenu populaciju i zastupljene su u više od 1% zdrave populacije. Ako je ta varijacija zastupljena u manje od 1% određene populacije, onda se označavaju kao mutacije. Najčešći tip genetičkih polimorfizama genoma su polimorfizmi nukleotidne sekvence (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). To su stabilne zamene jednog nukleotida drugim u molekulu DNK. Izmene se mogu dogoditi u kodirajućem delu gena - egzonu, u nekodirajućem delu, intronu ili u uzvodnim i nizvodnim regulatornim sekvencama.

Promena nukleotida u kodirajućem regionu može dovesti do zamene jedne amino kiseline drugom, čime se menja funkcija proteina, odnosno enzima. Iako polimorfizmi u nekodirajućim regionima gena ne dovode do promene aminokiseliske sekvence, oni mogu uticati na afinitet vezivanja transkripcionih faktora, a time i na nivo ekspresije gena, ili mogu dovesti do smanjene obrade primarnog transkripta, smanjenog polu-životu informacione RNK, ili se mogu odraziti na vezivanje mikro RNK, malih regulatornih RNK koje deluju na post-transkripcionom nivou regulacije ekspresije gena.

Sullivan saradnici su zaključili da SNP na egzonu 4 gena p53, gde se kodira ili arginin (72R) ili prolin (72P), utiče na odgovor na hemioterapiju cisplatinom. Pacijenti sa polimorfizmom koji imaju (72R) umesto wild-type (72P), imaju bolji odgovor na radiohemioterapiju i duže ukupno preživljavanje (85).

Do danas je nekoliko studija istraživalo varijante u genima CDKN1A i CCND1 u okviru OSCC-a, ali su nalazi ovih studija nekonzistentni. Varijacije broja kopija gena cycD1 ispitivane su kod OSCC pacijenata srpske populacije, ali nisu pokazale povezanost sa progresijom OSCC (86).

Prema našim saznanjima, polimorfizmi nukleotidne sekvence u genima CDKN1A i CCND1, nisu proučavani kod pacijenata sa oralnim karcinomom ili bilo kojim drugim karcinomom u srpskoj populaciji. Naše ispitivanje je procenilo povezanost varijanti gena rs1801270 i rs1059234 u CDKN1A i rs9344 u CCND1, sa rizikom za OSCC, kliničko-patološkim karakteristikama i prognozom pacijenata obolelih od oralnog karcinoma.

2. HIPOTEZE I CILJEVI

2.1 Hipoteze

1. Mutacije i polimorfizmi u p53 genu, kao i polimorfizmi u p21 i cycD1 genima, mogu biti u vezi sa etiološkim faktorima, pušenjem i unosom veće količine alkohola kod pacijenata sa HPV–negativnim oralnim karcinomom.
2. Genetičke promene u p53, p21 i cycD1 genima mogu biti marker toka, ishoda bolesti i dužine preživljavanja pacijenata sa HPV-negativnim oralnim karcinomom.
3. Postoje razlike u učestalosti genetičkih promena u p53, p21 i cycD1 genima između pacijenata sa uznapredovalim stadijumom oralnog karcinoma (stadijum III i IV sa metastazama limfnih čvorova, N+) u odnosu na pacijente sa ranim stadijumom bolesti (II stadijum, bez metastaza limfnih čvorova, N-).
4. Mutacije i polimorfizmi u p53 genu, kao i polimorfizmi u p53 i cycD1 genima mogu biti prediktor odgovora na hemioterapiju cisplatinom HPV–negativnih oralnih karcinoma.
5. Patogene mutacije TP53 mogu biti bolji prediktor preživljavanja i odgovora na hemioterapiju cisplatinom HPV–negativnih oralnih karcinoma u odnosu na nepatogene TP53 mutacije.
6. Polimorfizmi u p21 i cycD1 genima mogu biti u vezi sa predispozicijom za pojavu oralnog karcinoma.

2.1 Ciljevi istraživanja

1. Odrediti učestalosti mutacija u p53 genu sekvenciranjem egzona 4, 5, 6, 7 i 8, kod 82 pacijenta sa HPV-negativnim oralnim planocelularnim karcinomom.
2. Utvrditi učestalosti 3 polimorfizma Real-time PCR metodom, rs1059234 i rs3088440, u p21 genu (CDKN1A), kao i polimorfizma rs9344 u cycD1 genu, kod grupe od 104 pacijenata sa oralnim planocelularnim karcinomom, kao i kod 107 osoba kontrolne grupe, zdravih davaoca krvi, bez istorije malignih oboljenja.
3. Stratifikovati mutacije u TP53 genu na nisko rizične/nepatogene i visoko rizične/patogene p53 mutacije na osnovu njihovog kliničkog značaja, na osnovu dostupnih baza podataka NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) i odgovarajućih računarskih programa za analizu mutacija.
4. Utvrditi povezanost ovih genetičkih promena u p53/p21/cycD1 genima sa faktorima rizika, godinama, pušenjem i konzumiranjem alkohola.
5. Utvrditi povezanost ispitivanih genetičkih promena sa kliničkim parametrima, stadijumom bolesti, nukleusnim i histološkim gradusom i nodalnim statusom.
6. Utvrditi povezanost genetičkih promena u ispitivanim genima sa tokom i ishodom bolesti, odnosno sa ukupnim preživljavanjem i vremenom do pojave bolesti.
7. Utvrditi povezanost ispitivanih genetičkih promena, posebno patogenih p53 mutacija, sa odgovorom na konkomitantnu hemioterapiju cisplatinom u odnosu na pacijente koji je nisu primili.
8. Utvrditi povezanost polimorfizama u p21 i cycD1 genima sa predispozicijom za pojavu oralnog karcinoma, poređenjem sa kontrolnom grupom zdravih osoba, bez istorije malignih oboljenja.

3. ISPITANICI I METODE

3.1 Etička izjava i studijska grupa

Studija je retrospektivna kohortna sa periodom praćenja preživljavanja bez bolesti i ukupnog preživljavanja od minimum tri godine. Sprovedena je kao akademsko i neprofitno istraživanje prema principima dobre kliničke prakse i Helsinške deklaracije. Pre sprovođenja studije plan i protokol istraživanja su dostavljeni nadležnom Etičkom komitetu VMA koji je odlukom broj 162/2019, od 26.12.2019., dao odobrenje za sprovođenje studije.

3.2 Uzorkovanje

Uključeni su pacijenti oba pola, stariji od 18 godina, a mlađi od 80 godina, kod kojih je kliničkim i radiografskim pregledima konstatovan i patohistološki potvrđen oralni planocelularni karcinom. Svi pacijenti su dijagnostikovani, operisani i lečeni u Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beograd u periodu između 2015. i 2018. godine. Procena operabilnosti vršena je na osnovu kliničkog pregleda, radiografije pluća, kompjuterizovane tomografije glave i vrata i ultrazvučnog pregleda abdomena. Kod svih pacijenata je rađena ekscizija primarnog tumora uz disekciju vrata u zavisnosti od kliničkog i radiografskog nalaza. Patohistološki su tumori klasifikovani prema važećoj reviziji TNM klasifikacije American Joint Committee on Cancer (AJCC Cancer staging manual 8th Edition) iz 2018. godine i Američkog udruženja za glavu i vrat (American Head and Neck Society).

Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su 1. Prethodno operisani malignitet, osim bazocelularnog karcinoma kože za koji postoji dokaz da je radikalno operisan i ne postoji recidiv. 2. Rest ili recidiv prethodno operisanog planocelularnog karcinoma jezika i poda usne duplje. 3. Preoperativno sprovedena zračna i/ili hemioterapija.

Studijom su obuhvaćena 104 pacijenata obolelih od oralnog planocelularnog karcinoma, od kojih je oko 2/3 (78) sa uznapredovalim stadijumom bolesti. Postoperativno je, prema protokolu, sprovedena zračna terapija u dozi od 60 Gy (2Gy/dnevno), a 25 pacijenata je primilo terapiju cisplatinom u dozi od 100 mg/m² telesne površine u jednonedeljnim ciklusima.

Analiza sekvenciranja TP53 je rađena kod 82 pacijenta sa oralnim planocelularnim karcinomom, a analiza polimorfizama u p21 i cycD1 genima je rađena na proširenoj grupi od 104 pacijenta sa oralnim planocelularnim karcinomom, od kojih je 82 bilo obuhvaćeno analizom mutacionog statusa p53. Kontrolu grupu za analizu polimorfizama u p21 i cycD1 genima čini 107 zdravih ispitanika, odgovarajuće starosne i polne distribucije, koje nisu imale oralni karcinom niti neko drugo maligno ili sistemsko oboljenje.

Od 82 pacijenata sa OSCC-om, 35 (42,7%) je bilo mlađe od 58 godina, 58 (70,7%) su bili muškarci, 57 (69,5%) je imalo istoriju veće konzumacije alkohola, 19 (23,2%) je imalo II stadijum OSCC, dok je 63 (76,8) % imalo uznapredovale stadijume OSCC (III i IV stadijum).

3.3 Genetičke analize

Genetičke analize su sprovedene u Odseku za molekulsku genetiku, Instituta za medicinska istraživanja, VMA.

Izolacija DNK i HPV analiza

Uzorci tkiva OSCC su, do ekstrakcije DNK, čuvani na -200 ° C. Genomska DNK je izolovana reagensom TRI (Sigma-Aldrich, SAD), prema protokolu proizvođača. Uzorci DNK su čuvani na -200 ° C do dalje analize. Tipno-specifičan PCR je korišćen za identifikaciju visokorizičnih HPV tipova 16, 18, 31, 33.

Iz prikupljenih bioloških uzoraka, tumorskog tkiva pacijenata sa OSCC i periferne krvi iz kontrolne grupe, DNK je izolovana pomoću Kiagen KIAamp Mini Kit (Kiagen, Nemačka) i čuvana na -40°C do dalje upotrebe.

TP53 Sanger sekvenciranje

Ciljano sekvencioniranje egzona 4-8 p53 je vršeno aparatom za kapilarno sekvenciranje ABI 3130 automatizovanom sekvenceru (Applied Biosystems, USA). Prajmeri egzona 4-8 su preuzeti iz The International Agency for Research on Cancer (IARC) TP53 baze. PCR je rađen korišćenjem Platinum Taq DNA Polymerase PCR kita (Life Technologies). Amplikoni su sekvencionirani korišćenjem BigDye terminator cycle sequencing kita. Sekvencionirani uzorci su analizirani uz pomoć GeneScreen

(<http://dna.leeds.ac.uk/genescreen/>), a nakon toga vizuelnom inspekcijom, pri čemu je kao referenca korišćen hg19/GRCh37 (<http://genome.ucsc.edu>).

TP53 klasifikacija mutacija je vršena prema njihovom kliničkom značaju. Za informacije o patogenim mutacijama TP53, genetskim varijantama sa kliničkim značajem, korišćeni su ClinVar baza National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) i web server aplikacija Simple ClinVar (<http://simple-clinvar.broadinstitute.org/>) (87).

TP53 mutacije su klasifikovane kao patogene i nepatogene, na osnovu ClinVar baze i Simple ClinVar (88), kao i prethodnih studija vezanih za karcinom glave i vrata (40, 89). Missense, stop-gain, in-frame insercije/delecije, frameshift i splice site TP53 mutacije sa patološkim ili verovatno patološkim značajem su klasifikovane kao patogene mutacije. Verovatno benigne, zaštitne ili sve one sa neizvesnim značajem su klasifikovane kao nepatološke mutacije.

Analiza varijanti gena za p21 i cyclin D1

Varijante u genima CDKN1A i CCND1 su izabrane iz baze podataka polimorfizama nukleotidne sekvence (engl. single-nucleotide polymorphism SNP) prema učestalosti alela iznad 1%, potencijalnim funkcionalnim efektima na ekspresiju gena, proteinske aktivnosti i stabilnosti, kao i prethodno sprovedenih studija povezanosti u drugim populacijama. Odabrane varijante gena unutar CDKN1A (rs1801270, rs1059234) i CCND1 (rs9344) su genotipizirane korišćenjem komercijalnih testova genotipizacije, 40xTaqMan SNPs genotyping assay (C_14977_20, C_7514111_10, C_744725_1) i 2xUniversal TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, USA) prema uputstvu proizvođača. Genotipizacija je izvedena uz pomoć Real-Time PCR 7500 (Applied Biosystems, USA) pod sledećim uslovima: 95°C tokom 10 minuta, 40 ciklusa od 95°C tokom 15 s i 60°C tokom 60 s. Dobijeni rezultati alelne diskriminacije analizirani su SDS softverom (v.2.3).

3.4 Statistička analiza

Dobijeni podaci su analizirani pomoću SPSS 20.0 software (IBM Inc., Chicago, IL, USA). Kontingencijske tabele su dobijene primenom χ^2 - testa ili Fisher-ovog testa. Ukupno preživljavanje je računato od datuma postavljanja dijagnoze do smrtnog ishoda iz bilo

kog razloga. Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja su poređene uz pomoć long-rank testa.

Cox-ova proporcionalna regresiona analiza rizika je korišćena za procenu nivo rizika (engl. hazard ratio, HR), sa intervalom poverenja od 95% (95% CI). Varijable, za koje je u univarijantnoj analizi utvrđeno da su značajne, uključujući i one sa nivoom značajnosti ispod 20%, su posle analizirane multivarijantnom Cox-ovom regresionom analizom. Povezanost je posmatrana kao značajna ako su p vrednosti manje od 0.05.

Za utvrđivanje eventualnog postojanja epistatičke interakcije gena i genetičkih varijanti korišćena je neparametrijska analiza GMDR (Generalized Multifactorial Dimensionality Reduction) (90-92). Pomoću programa GMDR software, verzija 0.9, identifikovane su interakcije gena i polimorfizama po modelu koji je uključio relevantne parametre (ukrštena validaciona konzistentnost (eng. cross validation consistency, CVC), testiranje balansirane pouzdanosti (testing balanced accuracy, TeBA), isprobavanje balansirane pouzdanosti (training balanced accuracy, TrBA)), a vrednosti verovatnoće manje od 0.05 su smatrane značajnim.

4. REZULTATI

Urađena je analiza prisustva TP53 mutacija kod 82 HPV-negativna uzorka OSCC-a u egzonomima 4-8, a mutacije su nađene kod ukupno 49 pacijenata (59,8%). Mutacije TP53 su klasifikovane kao patogene i nepatogene, kao što je prethodno pomenuto (40, 89).

Spisak otkrivenih TP53 mutacija i njihova klasifikacija prema kliničkom značaju, procenjena prema ClinVar bazi podataka i Simple ClinVar veb serveru, prikazana je u tabeli 5. Patogene p53 mutacije otkrivene su kod 26 od 82 (31,7%) pacijenta sa OSCC.

TP53 Mutacija	Klinički značaj	Tip karcinoma/Sindroma
NM_000546.5(TP53):c.215=(p.Pro72=)	Benign	not specified
NM_000546.5(TP53):c.273G>A (p.Trp91Ter)	Pathogenic	Hereditary cancer-predisposing sy ca jajnika Li-Fraumeni sy 1
NM_001126114.2(TP53):c.560-11_560-8dup	Likely benign	Li-Fraumeni sy
NM_000546.5(TP53):c.820_821delGT (p.Val274Leufs)	Pathogenic	Li-Fraumeni sy
NM_000546.5(TP53):c.896_909del (p.Leu299Hisfs)	Pathogenic	not provided
NM_000546.5(TP53):c.273G>A (p.Trp91Ter)	Pathogenic	Li-Fraumeni sy not provided Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.380C>G (p.Ser127Cys)	Uncertain significance	Li-Fraumeni sy
NM_000546.5(TP53):c.384T>C (p.Pro128=)	Likely benign	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.389T>C (p.Leu130Pro)	Likely pathogenic	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.401T>G (p.Phe134Cys)	Likely pathogenic	not provided Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.411G>C (p.Leu137=)	Likely benign	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.421T>A (p.Cys141Ser)	Likely pathogenic	Multipli mielom HNSCC ca pluća AML RCC ca prostate, uterusa, pankreasa kolona
NM_000546.5(TP53):c.428T>G (p.Val143Gly)	Uncertain significance	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.517G>T (p.Val173Leu)	Pathogenic	Melanom HNSCC Mikrocelularni ca i adenoCa pluća Li-Fraumeni sy ca pankreasa, kolona, ezofagusa, jajnika, uterusa, dojke
NM_000546.5(TP53):c.560-15A>C	Likely benign	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.578A>G (p.His193Arg)	Likely pathogenic	Ca jetre, dojke, bubrega, kolona, ezofagusa, mokraćne bešike, prostate, uterusa HLL HNSCC Mikrocelularni skamozni i Adeno ca pluća Li-Fraumeni sy
NM_000546.5(TP53):c.591G>A (p.Val197=)	Uncertain significance	Li-Fraumeni sy
NM_000546.5(TP53):c.592delG (p.Glu198Lysfs)	Pathogenic	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.599delA (p.Asn200Ilefs)	Pathogenic	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.642T>C (p.His214=)	Likely benign	Li-Fraumeni sy
NM_000546.5(TP53):c.678C>A (p.Gly226=)	Likely benign	not specified
NM_000546.5(TP53):c.698A>G (p.His233Arg)	Uncertain significance	not specified Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.700T>C (p.Tyr234His)	Pathogenic	Ca jetre HNSCC Mikrocelularni i skvamozni ca pluća Li-Fraumeni sy Ca jetre, dojke, bubrega, kolona, ezofagusa, mokraćne bešike, prostate Hereditary cancer-predisposing sy
NM_001126113.2(TP53):c.710T>A (p.Met237Lys)	Likely pathogenic	HNSCC Adeno ca pluća Skvamozni ca pluća tumori mozga i dojke Ca pankreasa, kolona, ezofagusa, jajnika, uterusa
NM_000546.5(TP53):c.712T>C (p.Cys238Arg)	Pathogenic	Ca jetre HLL MM HNSCC Adeno ca pluća tumori mozga i dojke Hereditary cancer-predisposing sy Ca pankreasa, kolona, ezofagusa, jajnika, uterusa

NM_000546.5(TP53):c.718A>G (p.Ser240Gly)	Likely pathogenic	Li-Fraumeni sy
NM_000546.5(TP53):c.724T>C (p.Cys242Arg)	Likely pathogenic	not provided
NM_000546.5(TP53):c.727A>C (p.Met243Leu)	Uncertain significance	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.728T>C (p.Met243Thr)	Conflicting interpretations of pathogenicity	Li-Fraumeni sy not specified Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.730G>A (p.Gly244Ser)	Pathogenic/Likely pathogenic	Ca jetre HNSCC Mikrocelularni, skvamozni i adeno Ca pluća Li-Fraumeni sy tumori mozga Glioblastom Hereditary cancer-predisposing sy ca kolona, ezofagusa, jajnika, želudca, uterusa
NM_000546.5(TP53):c.734G>C (p.Gly245Ala)	Likely pathogenic	Ca jetre HNSCC Adeno i skvamozni ca pluća tumori mozga i dojke Glioblastom Ca pankreasa, bešike, ezofagusa, želudca, jajnika, uterusa
NM_000546.5(TP53):c.737T>G (p.Met246Arg)	Pathogenic	not provided
NM_000546.5(TP53):c.770T>A (p.Leu257Gln)	Uncertain significance	Li-Fraumeni-like sy Li-Fraumeni sy
NM_000546.5(TP53):c.782+12C>T	Benign/Likely benign	Li-Fraumeni sy1 not specified Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.782+14T>G	Likely benign	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.783-1G>A	Pathogenic/Likely pathogenic	Li-Fraumeni sy Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.785delG (p.Gly262Valfs)	Pathogenic	not provided Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.789T>C (p.Asn263=)	Likely benign	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.794T>C (p.Leu265Pro)	Pathogenic/Likely pathogenic	Li-Fraumeni sy1 Li-Fraumeni sy not provided Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.401T>G (p.Phe134Cys)	Likely pathogenic	Hereditary cancer-predisposing sy not provided
NM_000546.5(TP53):c.798A>T (p.Gly266=)	Likely benign	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.814G>T (p.Val272Leu)	Likely pathogenic	Meduloblastom MM HNSCC Li-Fraumeni sy1 Adeno ca pluća Ca bubrega, pankreasa, skvamozni kože, kolona, želudca, jajnika, uterusa
NM_000546.5(TP53):c.829T>C (p.Cys277Arg)	Likely pathogenic	not provided
NM_000546.5(TP53):c.869G>A (p.Arg290His)	Uncertain significance	Li-Fraumeni sy1 Li-Fraumeni sy not specified Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.890A>G (p.His297Arg)	Uncertain significance	Hereditary cancer-predisposing sy
NM_000546.5(TP53):c.904G>C (p.Gly302Arg)	Uncertain significance	Li-Fraumeni sy
NM_000546.5(TP53):c.907A>G (p.Ser303Gly)	Uncertain significance	Li-Fraumeni sy Hereditary cancer-predisposing sy

Tabela 5. Lista detektovanih TP53 mutacija i njihova klasifikacija ClinVar bazi podataka i Simple ClinVar veb serveru

Povezanost mutacija gena TP53 i patogenih mutacija TP53 sa demografskim i kliničkopatološkim karakteristikama ispitivane grupe OSCC pacijenata

Povezanost mutacija gena TP53, patogenih mutacija TP53 i polimorfizma p72 sa demografskim i kliničko -patološkim karakteristikama prikazana je u Tabelama 6 i 7. Nije pronađena povezanost između mutacija TP53 ili patogenih mutacija TP53 i pola, ili pušenja.

Patogene mutacije TP53 bile su značajno povezane sa starošću, $p = 0,005$ i visokim unosom alkohola, $p = 0,009$, (tabela 6).

Varijable		Ukupan N	Sve TP53 mut.		E4		E5		E6		E7		E8		Patogene TP53 mut.	
			+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Pol	Muški	58	35	23	30	28	6	52	16	42	2	56	16	42	16	42
	Ženski	24	14	10	13	11	1	23	10	14	0	24	4	20	10	14
	p		0.866		0.840		0.362		0.357		0.295		0.479		0.231	
Godine	<58	35	23	12	17	18	4	31	17	18	1	34	9	26	17	18
	≥ 58	47	21	26	26	21	3	44	9	38	1	46	11	36	9	36
	p		0.342		0.545		0.419		0.832		0.810		0.563		0.005	
Pušenje cigareta	Nikad	25	15	10	15	10	1	24	7	18	0	25	7	18	7	18
	Nekad	57	34	23	28	29	6	51	19	38	2	55	13	44	19	38
	p		0.976		0.364		0.330		0.343		0.614		0.017		0.798	
Konzumiranje većih količina alkohola	Ne	57	33	24	30	27	5	52	13	44	1	56	14	43	13	44
	Da	25	16	9	13	12	2	23	13	12	1	24	6	19	13	12
	p		0.604		0.958		0.908		0.544		0.957		0.419		0.009	
	III	63	36	27	35	28	4	59	21	42	1	62	1	47	21	42
	p		0.380		0.303		0.197		0.363		0.699		0.387		0.564	

Tabela 6. Povezanost mutacija na genu p53 sa demografskim karakteristikama (N- Ukupan broj pacijenata; E – Egzon, Značajne vrednosti, $p < 0.05$, su podebljane)

Lokalno uznapredovali tumori nisu imali statistički značajno veću stopu mutacija TP53 ili patogene mutacije TP53, u poređenju sa početnim stadijumima OSCC.

Mutacije u egzonu 4 gena p53 bile su značajno povezane sa histološkim i nuklearnim gradusom ($p = 0,012$ i $p = 0,032$, respektivno), dok su mutacije u egzonu 7 povezane sa pušenjem cigareta, $p = 0,017$.

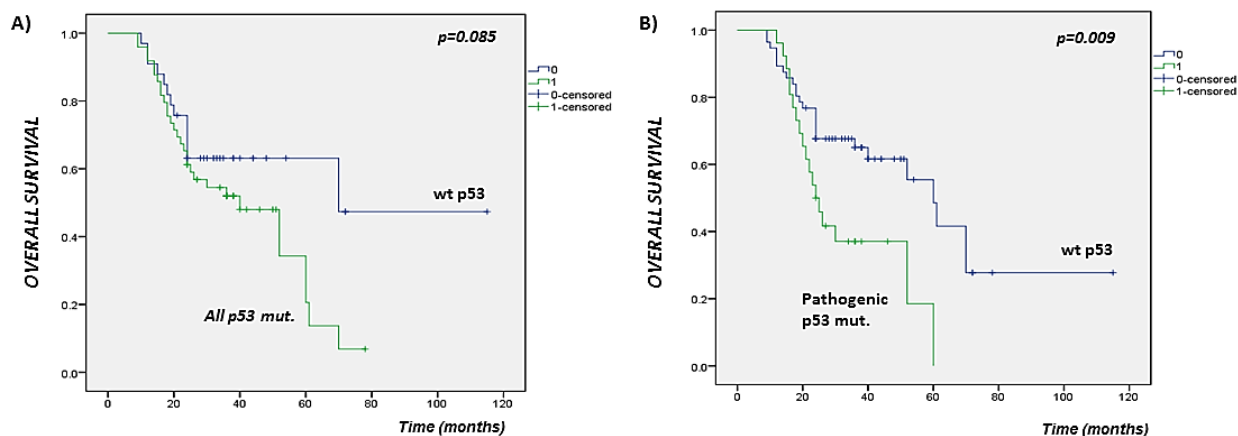
Varijable		Ukupan N	Sve TP53 mut.		E4		E5		E6		E7		E8		Patogene TP53 mut.	
			+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Histološki gradus	1	61	3 4	27	2 7	3 4	6	5 5	1 6	4 5	1	6 0	1 5	4 6	16	45
	2/3	21	1 5	6	1 6	5	1	2 0	1 0	1 1	1	2 0	5	1 6	10	11
	<i>p</i>		0.206		0.012		0.473	0.424	0.943	0.342	0.069					
Nuklearni gradus	1	58	3 2	26	2 6	3 2	6	5 2	1 7	4 1	1	5 7	1 5	4 3	17	41
	2/3	24	1 7	7	1 7	7	1	2 3	9	1 5	1	2 3	5	1 9	9	15
	<i>p</i>		0.188		0.032		0.362	0.514	0.629	0.220	0.468					
Nodalni status	-	19	1 4	5	1 0	9	2	1 7	7	1 2	0	1 9	5	1 4	7	12
	+	63	3 5	28	2 9	3 4	5	5 8	1 9	4 4	2	6 1	1 5	4 8	19	44
	<i>p</i>		0.158		0.614		0.723	0.432	0.824	0.865	0.583					
Tumor veličina	T1/2	60	3 7	23	2 9	3 1	6	5 4	2 1	3 9	2	5 8	1 5	4 5	21	39
	T3/4	22	1 2	10	1 4	8	1	2 1	5	1 7	0	2 2	5	1 7	5	17
	<i>p</i>		0.560		0.219		0.434	0.386	0.832	0.137	0.290					
Stadijum	II	19	1 3	6	8	1 1	3	1 6	5	1 4	1	1 8	4	1 5	5	14
	III	63	3 6	27	3 5	2 8	4	5 9	2 1	4 2	1	6 2	1 6	4 7	21	42
	<i>p</i>		0.380		0.303		0.197	0.363	0.699	0.387	0.564					

Tabela 7. Povezanost mutacija na genu p53 sa kliničkopatološkim karakteristikama (N- Ukupan broj pacijenata; E – Egzon, Značajne vrednosti, $p < 0.05$, su podebljane)

Povezanost mutacija gena TP53, patogenih mutacija TP53 sa ukupnim preživljavanjem

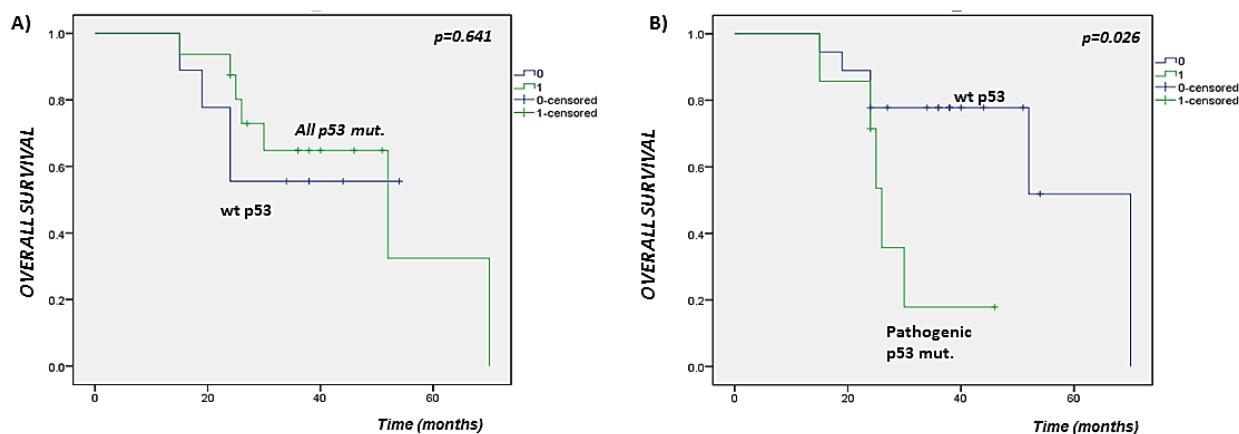
Krive ukupnog preživljavanja (OS) su procenjene Kaplan-Meier analizom i upoređene pomoću log-rank testa. HPV-negativni OSCC pacijenti sa mutiranim TP53 imali su tendenciju ka lošijem preživljavanju, $p = 0,085$, za razliku od pacijenata bez TP53 mutacija. Međutim, OSCC pacijenti sa patogenim mutacijama u TP53 imali su značajno smanjeno ukupno preživljavanje, $p = 0,009$, slika 12.

Nepatogene mutacije TP53 nisu bile povezane sa OS pacijenata sa OSCC ($p = 0,785$, log-rank test).



Slika 12. Kaplan–Meier krive ukupnog preživljavanja baziranog na TP53 mutacionom status kod 82 HPV-negativna OSCC pacijenta. A. Poređenje preživljavanja između svih TP53 mutacija i wild type (wt) TP53; B. Poređenje patoloških TP53 mutacija i wt TP53.

U podgrupi od 25 pacijenata koji su primali hemioterapiju, kada su uzete u obzir sve mutacije p53, status mutacije p53 nije bio povezan sa odgovorom na hemioterapiju, $p = 0,641$ (Slika 12A). Međutim, ukupno preživljavanje kod pacijenata koji su primili hemioterapiju cisplatinom bilo je značajno kraće za one sa patogenim mutacijama p53 u poređenju sa pacijentima sa nemutiranim (wild type; wt) p53, $p = 0,026$ (Slika 12B). Nepatogene mutacije TP53 kod pacijenata koji su primili hemioterapiju cisplatinom nisu bile povezane sa OS u našoj kohorti ($p = 0.453$, log-rank test). Ovi nalazi ukazuju na to da je odgovor na hemioterapiju povezan sa tipom p53 mutacije i da su pacijenti sa patogenim mutacijama p53 pokazali rezistenciju na hemioterapiju na bazi platine, za razliku od pacijenata sa nemutiranim p53 (slika 13).



Slika 13. Povezanost mutacija TP53 i preživljavanja podgrupe 25 OSCC pacijenata koji su primili hemioterapiju na bazi platine **A.** Poređenje preživljavanja između svih TP53 mutacija i wild type (wt) TP53; **B.** Poređenje patogenih TP53 mutacija i wt TP53.

Cox-ova regresiona analiza je pokazala da su visoki unos alkohola, stadijum, veličina tumora, nodalni status i recidivi visoko povezani sa povećanim rizikom od kraćeg preživljavanja, hazard risk, HR (tabela 8).

Dok su pacijenti sa p53 mutacijama imali povećan rizik od kraćeg preživljavanja HR, ali koji nije dostigao značajnost, HR = 1,747, [0,907-3,366], p = 0.096, pacijenti sa patogenim mutacijama p53 imali su značajno povećan rizik od lošeg preživljavanja, HR = 2.230, [1.186-4.194], p = 0.013. Varijable za koje je utvrđeno da su statistički značajne u univarijantnoj analizi, uključujući varijable sa nivoom značajnosti ispod 20%, dodatno su analizirane u multivarijantnoj Cox-ovoj regresionoj analizi. Multivarijantna analiza je otkrila da su recidivi nezavisni prognostički faktor kraćeg preživljavanja kod ispitivane grupe OSCC pacijenata (HR = 4,733, [2,027-11,053], p = 0,0001) (tabela 8), dok se ostali faktori nisu izdvojili kao nezavisni prediktori preživljavanja.

Cox-ova regresiona analiza	Demografske ili patološke karakteristike	UKUPNO PREŽIVLJAVANJE (OS)	
		HR [95% CI]	p
Univarijantna analiza	Pol	0.660 [0.335-1.300]	0.230
	Godine	0.605 [0.332-1.102]	0.100
	Pušenje cigareta	1.682 [0.804-3.519]	0.167
	Konзумiranje veće količine alkohola	2.938 [1.610-5.360]	0.0001
	Nuklearni gradus	1.245 [0.900-1.721]	0.186
	Histološki gradus	1.270 [0.914-1.764]	0.155
	Stadijum	3.898 [1.388-10.947]	0.010
	Veličina tumora	1.654 [1.189-2.302]	0.003
	Nodalni status	3.055 [1.199-7.786]	0.019
	Recidiv	4.727 [2.108-10.597]	0.0001
	Sve TP53 mutacije	1.747 [0.907-3.366]	0.096
Patogene TP53 mutacije	2.230 [1.186-4.194]	0.013	
Multivarijantna analiza	Recidiv	4.733 [2.027-11.053]	0.0001

Tabela 8. Cox-ova proporcionalna regresiona analiza rizika, prema ukupnom preživljavanju (OS) pacijenata sa OSCC-om (HR-hazard ratio; CI- interval poverenja; SNP – polimorfizama nukleotidne sekvence; Značajne vrednosti, p <0.05, su podebljane)

Distribucija genotipa i alela CDKN1A i CCND1 varijanti gena

Tabela 9. prikazuje demografske karakteristike, genotip i učestalost alela analiziranih varijanti u genima CDKN1A i CCND1. Prosečna starost pri postavljanju dijagnoze za pacijente sa OSCC-om je bila 58 godina, samo 2 pacijenta su bila mlađa od 40 godina, a srednja starost je bila 64. Tako je medijana starosti od 58 godina korištena kao granična vrednost godina u našoj ispitivanoj grupi pacijenata. Nije bilo razlika u odnosu na pol, starost, status pušenja i unos alkohola među ispitivanim grupama. Učestalost genotipa i alela varijante rs9344 gena CCND1 značajno se razlikovala između OSCC pacijenata i kontrolne grupe ($P = 0,017$, $P = 0,005$, respektivno).

Varijable		OSCC		Kontrole		P
		N	%	N	%	
Pol	Female	31	29.81	35	32.71	0.659
	Male	73	70.19	72	67.29	
Godine	< 58	54	51.92	51	47.66	0.583
	≥ 58	50	48.08	56	52.34	
Pušenje cigareta	Never	28	26.92	43	40.19	0.058
	Ever	76	73.08	64	59.81	
Konzumiranje alkohola	No/Low	72	69.23	77	71.96	0.388
	High	32	30.77	30	28.04	
CCND1 (rs9344)	GG	20	19.23	38	35.51	0.017
	GA	54	51.92	50	46.73	
	AA	30	28.85	19	17.76	
	G	94	45.19	126	58.88	0.005
CDKN1A (rs1801270)	CC	89	85.58	90	84.11	0.568
	CA	10	9.62	14	13.08	
	AA	5	4.81	3	2.80	
	C	188	90.38	194	90.65	0.925
	A	20	9.62	20	9.35	
CDKN1A (rs1059234)	CC	84	80.77	90	84.11	0.804
	CT	18	17.31	15	14.02	
	TT	2	1.92	2	1.87	
	C	186	89.42	195	91.12	0.556
	T	22	10.58	19	8.88	

Tabela 9. Demografske karakteristike i rasprostranjenost varijanti gena kod pacijenata sa OSCC i kontrolne grupe ispitanika; N – ukupan broj pacijenata/kontrola; $P < 0.05$ vrednosti su boldovane.

Nisu primećene razlike u distribuciji genotipova za rs1801270 i rs1059234 u genu CDKN1A. Varijante gena su ispitivane na postojanje ravnoteže vezanosti odn. Hardy-Weinberg ekvilibrijuma (HWE) u ispitivanim grupama. Nije bilo odstupanja od HWE ($P > 0,05$), osim u slučaju varijante CDKN1A rs1801270 u grupi OSCC pacijenata ($P < 0,05$) (tabela 10).

Gene (variant)	HWE p value*	
	OSCC	Controls
CCND1 (rs9344)	0.807	0.831
CDKN1A (rs1801270)	0.0008	0.087
CDKN1A (rs1059234)	0.617	0.367

Tabela 10: Hardi-Vajnbergov test ravnoteže analiziranih varijanti u genima CDKN1A i CCND1

Povezanost između varijanti gena CDKN1A i CCND1 i rizika za pojavu OSCC

Da bi se procenila povezanost analiziranih varijanti gena sa rizikom za nastanak OSCC, izvršena je analiza binarne logističke regresije. Pošto su starost i pol mogu biti značajni faktori rizika za pojavu OSCC, odnosno predstavljaju zbunjujuće varijable, ova dva faktora su uključeni u analizu i proračun prilagođenog odnosa rizika, Adjusted Odds Ratio (OR). Rezultati dobijeni analizom prilagođenog odnosa rizika, koji je prilagođen polu i starosti, pokazuju da je CCND1 rs9344 povezan sa predispozicijom za OSCC (tabela 11.)

Heterozigotni GA, kao i mutirani AA genotip, bili su povezani sa povećanim rizikom za OSCC u poređenju sa wild type GG (OR = 2,955, $P = 0,007$; OR = 2,029, $P = 0,037$, respektivno). Recesivni genetički model koji testira mutirani AA u odnosu na kombinovani heterozigotni GA i wild type GG, pokazuje povezanost sa povećanim rizikom za OSCC (OR = 2.285, $P = 0.010$). Nije pronađena povezanost u dominantnom genetičkom

modelu. Analizirane varijante rs1801270 i rs1059234 u genu CDKN1A nisu bile povezane sa rizikom za pojavu OSCC (tabela 11).

Varijanta gena	Model	Genoti P	OSCC		Kontrole		Prilagođen OR# [95% CI]	P*
			N=104	%	N=107	%		
CCND1 rs9344	Genotip	GG	20	19.23	38	35.51	1.000	Ref.
		GA	54	51.92	50	46.73	2.955 [1.339-6.521]	0.007
		AA	30	28.85	19	17.76	2.029 [1.042-3.952]	0.037
	Dominantan	GG+GA vs. AA	74	71.15	88	82.24	1.362 [0.968-3.582]	0.062
	Recesivan	GG vs. GA+AA	84	80.77	69	64.49	2.285 [1.217-4.292]	0.010
CDKN1A rs1801270	Genotip	CC	89	85.58	90	84.11	1.000	Ref.
		CA	10	9.62	14	13.08	1.749 [0.403-7.589]	0.455
		AA	5	4.81	3	2.80	2.316 [0.445-12.044]	0.318
	Dominantan	CA+AA vs. CC	15	14.42	17	15.89	1.073 [0.500-2.303]	0.857
	Recesivan	AA vs. CA+CC	99	95.19	104	97.20	0.551 [0.127-2.382]	0.425
CDKN1A rs1059234	Genotip	CC	84	80.77	90	84.11	1.000	Ref.
		CT	18	17.31	15	14.02	0.942 [0.129-6.872]	0.953
		TT	2	1.92	2	1.87	1.212 [0.151-9.713]	0.856
	Dominantan	CT + TT vs. CC	20	19.23	17	15.89	0.794 [0.389-1.619]	0.526
	Recesivan	TT vs. CT+CC	102	98.08	105	98.13	0.981 [0.135-7.126]	0.985

Tabela 11. Povezanost analiziranih *CCND1* i *CDKN1A* varijanti gena i rizika za OSCC

Ref. Referentni genotip, N - ukupan broja pacijenata/kontrola; # Prilagođen za pol i godine; OR [95% CI] – Odds Ratio [95% Confidence Interval]; vs – *versus*; *P<0.05 su podebljane

Povezanost CDKN1A i CCND1 varijanti gena sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata sa OSCC-om

Tabele 12 i 13 prikazuju vezu između varijanti gena i demografskih i kliničko-patoloških karakteristika pacijenata sa OSCC -om. Uočen je statistički trend za vezu između rs9344 varijante gena CCND1 i starosti, prema medijani (P = 0,057). Ni za jednu varijablu nije pronađena povezanost sa analiziranim varijantama genima CDKN1A i CCND1.

Varijable		N	CCND1 rs9344			CDKN1A rs1801270			CDKN1A rs1059234		
			GG	GA	AA	CC	CA	AA	CC	CT	TT
Godine (median)	<58	54	15	33	6	49	4	1	42	11	1
	≥58	50	15	21	14	40	6	4	42	7	1
	P*		0.057			0.228			0.692		
Pol	Muško	73	21	38	14	62	8	3	58	14	1
	Žensko	31	9	16	6	27	2	2	26	4	1
	P*		0.999			0.698			0.626		
Pušenje cigareta	Nikad	28	7	13	8	22	4	2	23	4	1
	Nekad	76	23	41	12	67	6	3	61	14	1
	P*		0.340			0.467			0.686		
Konzumiranje alkohola	Broj/ Malo	72	22	34	16	61	7	4	57	13	2
	Mnogo	32	3	20	14	28	3	1	27	5	0
	P*		0.313			0.863			0.595		

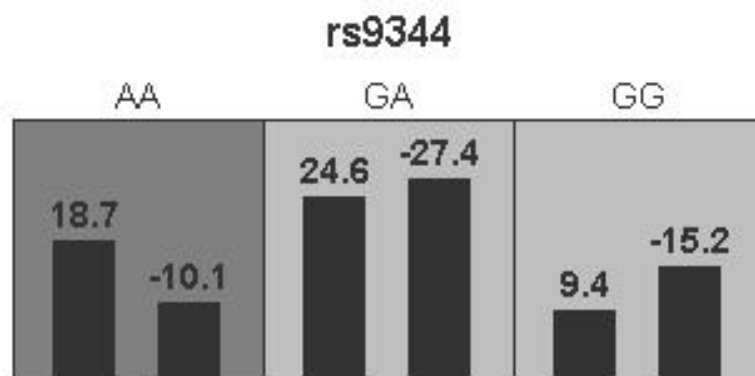
Tabela 12. Povezanost varijanti gena CCND1 i CDKN1A sa demografskim karakteristikama pacijenata sa OSCC-om (N – ukupan broja pacijenata; I/II – stadijum I i II zajedno; III/IV – stadijum III i IV zajedno; G1/G2 - dobro/srednje diferentovan; G3 - slabo diferentovan)

Varijable		N	CCND1 rs9344			CDKN1A rs1801270			CDKN1A rs1059234		
			GG	GA	AA	CC	CA	AA	CC	CT	TT
Histološki gradus	G1/G2	83	22	44	17	71	8	4	65	17	1
	G3	21	8	10	3	18	2	1	19	1	1
	P*		0.804			0.583			0.159		
Nuklearni gradus	½	74	19	39	16	66	6	2	62	12	0
	3	30	11	15	4	23	4	3	22	6	2
	P*		0.774			0.344			0.139		
Stadijum	I/II	27	9	13	5	20	4	3	21	6	3
	III/IV	77	21	41	15	69	6	2	63	12	2
	P*		0.833			0.100			0.535		
Veličina tumora	T1/2	77	23	38	16	67	6	4	65	11	1
	T3/4	27	7	16	4	22	4	1	19	7	1
	P*		0.652			0.552			0.265		
Nodalni status	N -	28	9	12	7	22	4	2	23	5	0
	N +	76	21	42	13	67	6	3	61	13	2
	P*		0.493			0.467			0.686		
Recidiv	Ne	43	15	21	7	36	5	2	35	8	0
	Da	61	15	33	13	53	5	3	49	10	2
	P*		0.498			0.843			0.476		

Tabela 13. Povezanost varijanti gena CCND1 i CDKN1A sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata sa OSCC-om (N – ukupan broja pacijenata; I/II – stadijum I i II zajedno; III/IV – stadijum III i IV zajedno; G1/G2 - dobro/srednje diferentovan; G3 - slabo diferentovan)

Epistatičke interakcije među analiziranim CDKN1A i CCND1 varijantama gena

Urađena je GMDR analiza rs1801270, rs1059234 i rs9344 gena CDKN1A i CCND1. Budući da je oralni karcinom bolest složene etiologije, ne treba zanemariti istraživanje potencijalnog postojanja epistatičkih interakcija među testiranim varijantama gena. Nijedan od testiranih statističkih modela nije bio značajan (slika 14, tabela 14). Međutim, kao najbolji genetski model identifikovana je pojedinačno testirana varijanta rs9344 u genu CCND1.



Slika 14. CCND1 rs9344 model visokog rizika za OSCC identifikovan GMDR analizom. Tamno sivi kvadrat označava visokorizični genotip, dok sivi kvadrati označavaju genotipove niskog rizika. Vrednosti je generisao GMDR softver, v.0.9.

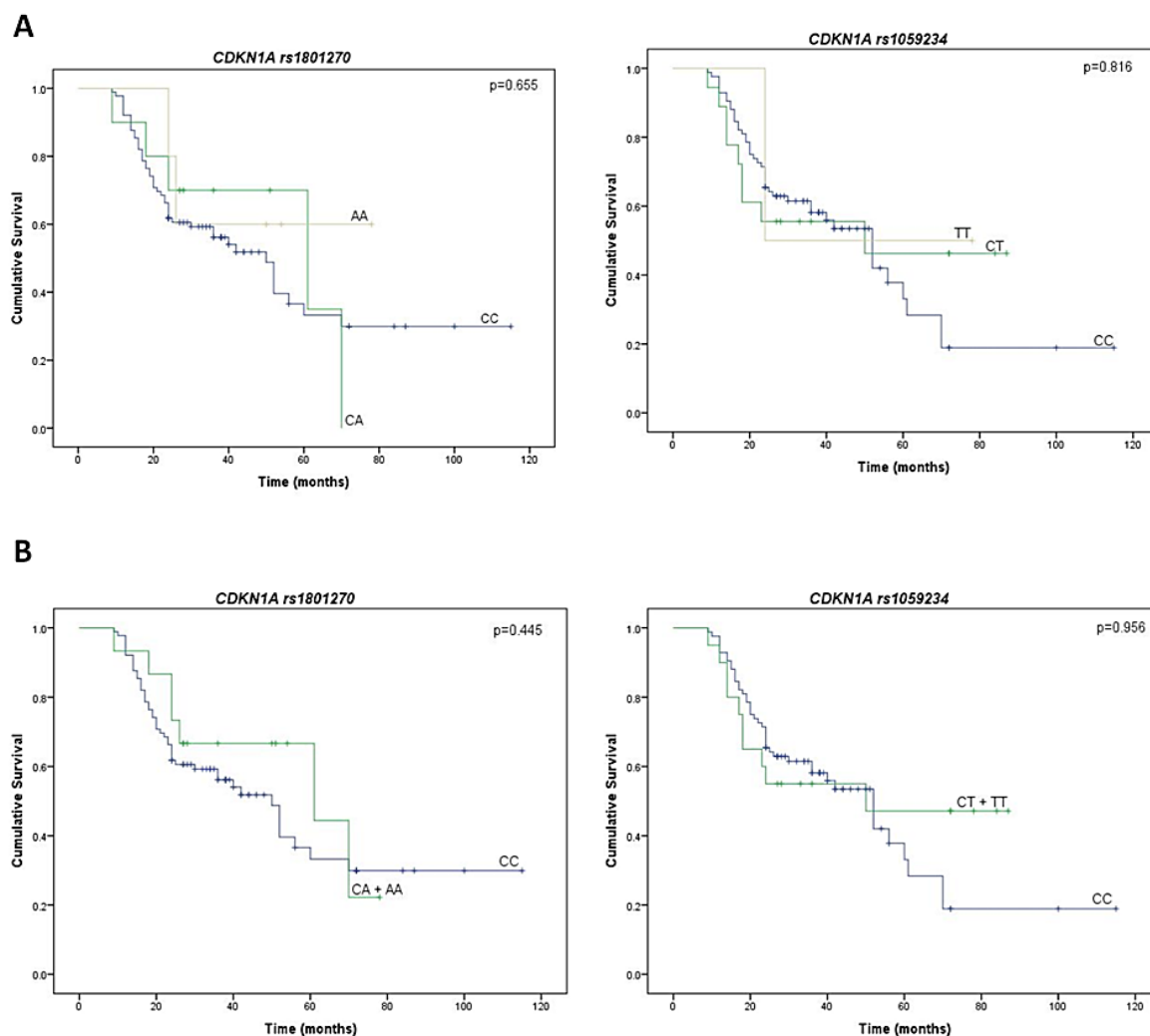
Model	TrBA	TeBA	CVC	Sign test (P)
rs9344	0.579	0.574	10/10	0.054
rs1801270-rs9344	0.600	0.564	7/10	0.054
rs1801270-rs1059234-rs9344	0.625	0.569	10/10	0.171

Tabela 14. Epistatičke interakcije između analiziranih varijanti u genima CCND1 (rs9344) i CDKN1A (rs1801270, rs1059234) dobijene GMDR analizom (TrBA – training balanced accuracy; TeBA – testing balanced accuracy; CVC – cross validation consistency)

Povezanost varijanti gena CDKN1A i CCND1 sa ukupnim preživljavanjem pacijenata sa OSCC

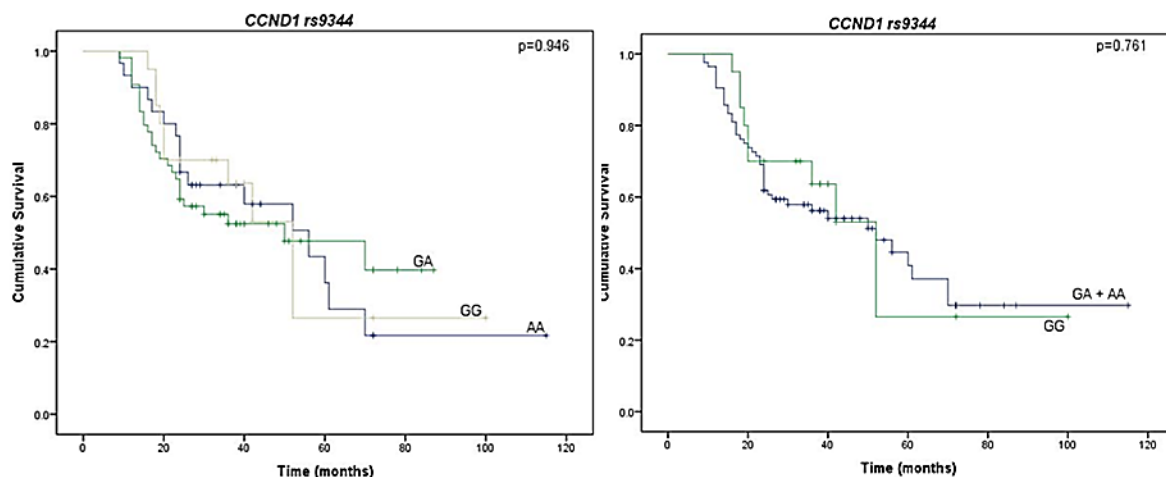
Korišćena je Kaplan-Meier analiza je za procenu ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez bolesti kod pacijenata sa OSCC. Krive preživljavanja upoređene su pomoću log-rank testa. Nisu uočene značajne razlike u ukupnom preživljavanju između pacijenata sa OSCC-om sa wild type, heterozigotnim i mutiranim genotipovima ispitivanih varijanti rs1801270 (P = 0,655), rs1059234 (P = 0,816) i rs9344 (P = 0,946) (slika 15A).

Nisu primećene razlike u preživljavanju bez bolesti kod pacijenata sa OSCC sa wild type, heterozigotnim i mutiranim genotipovima rs1801270 ($P = 0,708$), rs1059234 ($P = 0,092$) i rs9344 ($P = 0,440$).



Slika 15. Krive preživljavanja pacijenata sa oralnim planocelularnim karcinomom prema (A) wild type, heterozigotnim i mutiranim genotipovima (B) wild type i kombinovanim heterozigotnim i mutiranim genotipovima varijanti CDKN1A rs1801270 i rs1059234. P vrednosti su izračunate log-rank testom.

Nije bilo značajnih razlika u preživljavanju između kombinovanih heterozigotnih i mutiranih genotipova u odnosu na wild type svih analiziranih varijanti u genima CDKN1A i CCND1 (slika 15B). Nisu primećene razlike u ukupnom preživljavanju kada se uporede krive preživljavanja mutiranog genotipa u odnosu na wild type i heterozigot kombinovane za sve analizirane varijante.



Slika 16. Krive preživljavanja pacijenata sa oralnim planocelularnim karcinomom prema (A) wild type, heterozigotnim i mutiranim genotipovima (B) wild type i kombinovanim heterozigotnim i mutiranim genotipovima varijanti CCND1 rs9344. P vrednosti su izračunate log-rank testom.

Prema rezultatima Cox-ove analize rizika, kao nezavisni prognostički faktori kod OSCC pacijenata identifikovan je unos alkohola, histološki i nuklearni gradus, stadijum, veličina tumora, limfonodalni status i recidivi, tabela 15.

Variable	HR [95% CI]	P*
Age (median)	0.800 (0.464-1.381)	0.424
Smoking	1.589 (0.797-3.168)	0.188
Alcohol intake	2.571 (1.506-4.390)	0.001
Histological grade	1.370 (1.006-1.866)	0.046
Nuclear grade	1.465 (1.103-1.945)	0.008
Stage	4.980 (1.980-12.526)	0.001
Tumour size	2.470 (1.401-4.355)	0.002
Nodal status	3.674 (1.656-8.152)	0.001
Recurrence	6.008 (2.988-12.083)	<0.0001
CCND1 rs9344	0.971 (0.665-1.416)	0.876
CDKN1A rs1801270	0.776 (0.440-1.368)	0.380
CDKN1A rs1059234	0.831 (0.456-1.513)	0.544

Tabela 15. Cox-ove analize rizika prognostičkih faktora kod pacijenata sa OSCC

5. DISKUSIJA

Oralni planocelularni karcinom ćelija je najčešći tip karcinoma glave i vrata, koji se odlikuje velikom stopom recidiva i lošim preživljavanjem. Dok su orofaringealni karcinomi pretežno HPV-pozitivni, oralni karcinom je uglavnom HPV-negativan, bazalni tip (40). Pacijenti sa HPV-negativnim oralnim karcinomom imaju značajno kraće ukupno vreme preživljavanje (93), za razliku od pacijenata sa HPV-pozitivnim karcinomom (94). Karcinogeneza HPV-negativnog planocelularnog karcinoma glave i vrata zavisi od velikog broja mutacija koje utiču na signalne puteve tokom ćelijskog ciklusa, a kod HPV-pozitivnog, ključna je uloga E6/E7 onkoproteina.

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da su HPV-negativni OSCC pacijenti sa patogenim mutacijama p53 imali značajno nižu stopu preživljavanja. U grupi OSCC pacijenata koji su bili podvrgnuti hemoterapiji zasnovanoj na cisplatinu, ukupno preživljavanje je bilo značajno kraće za one sa patogenim mutacijama p53 od odnosu na one sa wild type TP53. Nasuprot tome, kada su uzete u obzir sve mutacije TP53, status mutacije TP53 nije bio povezan sa ukupnim preživljavanjem. Ovi nalazi ukazuju na to da bi opšte preživljavanje i otpornost na hemioterapiju na bazi platine u OSCC-u mogli biti povezani sa tipom mutacije TP53, te da su patogene mutacije TP53 značajan prediktor lošeg opšteg preživljavanja za razliku od benignih ili verovatno benignih mutacija. Na osnovu mehanizma delovanja p53, kao jednog od ključnih regulatora ćelijskog ciklusa nakon oštećenja DNK, brojna ispitivanja istražuju vezu između mutacije TP53 i preživljavanja, kao i odgovora na radio i hemioterapiju. Naši nalazi o visokoj učestalosti TP53 mutacije u HPV-negativnom OSCC-u su u skladu sa prethodnim studijama, gde je TP53 mutiran u približno 50% slučajeva OSCC -a (95).

Mutacije u DNK vezujućem domenu TP53 mogu uticati na individualni odgovor na hemioterapiju putem njegove sposobnosti da posreduje u apoptozi i zaustavljanju ćelijskog ciklusa (96). Iako još uvek nije u potpunosti jasan mehanizam delovanja cisplatina, smatra se da je aktivacija p53 jedan od glavnih efekata tretmana cisplatinom i zato njegove mutacije igraju važnu ulogu u neadekvatnom terapijskom odgovoru i progresiji karcinoma. Pošto je mutacija gena p53 otkrivena u više od polovine slučajeva OSCC, važno je proceniti odnos između rezistencije na cisplatin i statusa mutacije p53. Najpreciznija procena bi trebala da obuhvati analizu mutacija i njihov pojedinačni odnos

ka rezistenciji na tretman cisplatinom (97). Jo et al su ispitujući tri ćelijske linije in vitro, od kojih je jedna sa wild type p53 (YD-9), jedna sa tačkastom mutacijom na egzonu 8 (YD-8) i jedna sa delecijom i potpuno afunkcionalnim p53 (YD-38), i uticaj primene rastvora cisplatina na ćelijski ciklus, uočili da je citotoksični efekat cisplatina bio najizraženije u liniji sa normalnim p53, slabiji u ćelijama sa tačkastom mutacijom i najslabiji kod ćelija sa afunkcionalnim p53. Takođ je YD-8 i YD-9 ćelijskim linijama utvrđeno postojanje p21 koji je vezan za aktivnost p53. Njihov zaključak je da bi u donošenju odluke o uključivanju cisplatina kao monoterapije trebalo proveriti p53 mutacioni status (97). Ovo upućuje na potrebu individualizovanog pristupa pri određivanju hemioterapijskog protokola.

Nasuprot navedenim podacima, drugo istraživanje na in vitro ćelijskim linijama je pokazalo da je citotoksični efekat cisplatina bio je izraženiji u mutiranim ćelijskim linijama p53 nego u wild type p53 ćelijskim linijama (98). Najverovatnije se radi o tome što su u apoptozu uključeni p53 zavisni i p53 nezavisni putevi, kao što sugerišu neki autori (99-101).

Najčešća genetska promena u našem istraživanju bila je polimorfizam kodona 72 TP53, ali nije bila povezana sa prognozom ili odgovorom na hemioterapiju. Mnogo studija pokazuje divergentnu prognozu zasnovanu na HPV statusu pacijenata sa OSCC. HPV-pozitivni tumori glave i vrata su uzrokovani HPV infekcijom, za razliku od HPV-negativnih tumora, koji su vođeni genetičkim mutacijama u TP53 ili nekom drugom tumor supresor genu, pa se stoga karakterišu kao tumori sa lošijom prognozom (102).

HPV-negativni OSCC ima različite patološke i kliničke karakteristike u poređenju sa HPV-pozitivnim tumorima (103). HPV-negativni oralni karcinomi su slabo diferentovani tumori i pacijenti sa ovim tipom karcinoma imaju lošije stope ukupnog preživljavanja u poređenju sa HPV-pozitivnim karcinomima (88). U brojnim studijama, HPV-pozitivni OSCC su obično povezani sa povoljnom prognozom (88, 102, 104, 105). Ključni transkripcioni faktori koji razlikuju HPV-pozitivne i HPV-negativne oralne karcinome su p53, AP -1, NF-kappaB i STAT3 (103).

Kod HPV-pozitivnog OSCC-a, prisutan je uglavnom wild type p53, ali se njegovi niski nivoi pripisuju aktivnosti proteina HPV E6, koji cilja p53 i indukuje njegovu "ubikvitinaciju" i razgradnju (106). Ova karakteristika HPV-pozitivnih tumora može da dovede do veće osetljivosti na radioterapiju i zračenjem indukovanu apoptozu (107, 108). Kliničke studije su pokazale da su HPV-negativni tumori sa smanjenim vremenom preživljavanja, za razliku od HPV-pozitivnog OSCC-a (109).

U skladu sa našim rezultatima, mutacije p53 su povezane sa rezistencijom na hemioterapiju kod pacijenata sa OSCC-om (110-112). Perrone et al (2010.) su objavili da je u analizi 58 pacijenata sa oralnim karcinomom postojala značajna povezanost nefunkcionalnog, mutiranog TP53 i male verovatnoće za kompletnim odgovorom na terapiju kod pacijenata koji su primali neoadjuvantnu hemioterapiju cisplatinom. Gubitak funkcije usled mutacije p53 bio je povezan sa niskom stopom remisije i suboptimalnim odgovorom na neoadjuvantnu hemioterapiju cisplatinom kod pacijenata sa OSCC-om (112).

Iako HPV infekcija nije ključni prediktor za uspeh operacije ili odgovora na radioterapiju orofaringealnog karcinoma (113), cisplatin, standardni hemoterapijski režim kod karcinoma glave i vrata, efikasniji je kod HPV-negativnih ćelija (114).

Rezultati TAX 324 (WU) studije, vezane za lokalno uznapredovali orofaringealni karcinom, ukazuju da se HPV-negativni pacijenti mogu podeliti u dve prognostički različite grupe na osnovu ekspresije određenih biomarkera. Visokorizični pacijenti (ukupno 34 pacijenta) su HPV-negativni i sa povećanom ekspresijom beta-tubulin II (β T-II) i bar dva od tri dodatna markera, povišena glutathion S-transferasa (GST- π), povišen p53 i snižen Bcl-2. Oni koji su HPV-negativni ali ne ispunjavaju druga dva uslova se posmatraju kao pacijenti sa umerenim rizikom (ukupno 25 pacijenata). Prosečno vreme preživljavanja za srednje rizičnu grupu je bilo 44.2 meseca a za visokorizičnu grupu je iznosilo 12.1 mesec. Dvogodišnje preživljavanje za HPV-pozitivnu grupu (55 pacijenata) je iznosilo 89%, za srednje rizičnu 67% a za visokorizičnu grupu 29%. Ova studija sugeriše da visokorizični pacijenti imaju izrazito kraće vreme preživljavanja u odnosu na HPV-pozitivne i srednje rizičnu grupu pacijenata. (115).

U studiji Weinberger et al su formirali tri grupe pacijenata gde su HPV DNK određivali Real-Time PCR metodom a ekspresiju p53, pRb i p16 kvantitativnom in situ metodom analize proteina (AQUA) : HPV16-negativnih/p16 bez ekspresije, HPV16-pozitivni/ p16 bez ekspresije i HPV16-pozitivni/p16 izražena ekspresija. U grupi HPV16-pozitivnih sa izraženom ekspresijom p16 je ukupno preživljavanje bilo 79% (u prve dve 20% i 18%), preživljavanje bez bolesti je bilo 75% (u prve dve 15% i 13%), pojava lokalnog recidiva je bila 14% (u prve dve 45% i 74%). Samo su pacijenti u trećoj grupi imali smanjenu ekspresiju p53 i pRb. Autori su na ovaj način dokazali da je jedino grupa koja je HPV16 pozitivna sa p16 izraženom ekspresijom, grupa koja ima povoljniju prognozu (94).

Slebos et al su potvrdili da CDKN2A, koji kodira p16, jedini statistički značajno drugačije eksprimiran gen između HPV-pozitivnog (značajno više eksprimiran) i negativnog planocelularnog karcinom glave i vrata (116). Isti autor je u studiji iz 2013. godine otkrio značajno veću regulaciju na više MCM (minichromosome maintenance) 2, 6 i 7 (117). Članovi ove familije funkcionišu kao helikaze u ranim fazama ćelijskog ciklusa u G1 fazi.

Dalje razjašnjenje funkcije i regulacije TP53, kao ključnog tumor supresor gena, omogućilo bi napredak u predviđanju kliničkog ponašanja, prognozi i odgovoru na hemioterapiju HPV-negativnih oralnih karcinoma.

U normalnim ćelijama, p53 se nalazi u niskoj koncentraciji, pošto ima kratko vreme poluživota, od 5-20 minuta (118). Za razliku od funkcionalnog, "wild-type" p53, mutirana forma ovog proteina ima mnogo duže vreme poluživota i deluje kao antigen prema kome se stvaraju auto-antitela. Mutirane forme p53, kao i auto-antitela, mogu da se detektuju u serumu pacijenta i koriste kao prediktor prognoze i odgovora na radio, i još više, na hemioterapiju koja oštećuje DNK i na taj način pokreće p53 zavisnu apoptozu. Pored ovako logičnog zaključka, postoji mnogo izazova da se to poveže sa kliničkom praksom. Mutacije p53 su rani događaj kod određenih tipova karcinoma, kao što su karcinomi pluća, kože, oralni karcinom i karcinom jednjaka. Kod karcinoma kolona, dojki i prostate, mutacije p53 se odigravaju u kasnijim fazama razvoja karcinoma. Do sad je pronađeno oko 25000 mutacija na TP53 (119). Najveći broj mutacija, oko 70% su "missense" mutacije (120). Kod njih dolazi do ubacivanja pogrešnog nukleotida u DNK lanac i promene kodona za određenu aminokislinu te sinteze TP53 koji je normalne dužine ali nefunkcionalan.

Pored "missense" mutacija, postoje i oštećenja po tipu delecija, insercija. Takođe postoje i mutacije koje vode ka stop kodonu i tad dolazi do prestanka sinteze p53 koji je, u ovom slučaju, manje veličine i nefunkcionalan (121). Od preko 25000 mutacija, oko 30% se dešava na šest kodona: 175, 245, 248, 249, 273 i 282. Kodon 238-248 (egzon 7) i kodon 278-281 (egzon 8) su najčešći kodoni (hot spots) na kojima se javljaju mutacije i nalaze se na DNK-vezujućem domenu te na taj način sprečavaju vezivanje p53 za promotore ciljnih gena. Neke mutacije dovode do sticanja novih funkcija (gain of function; GOF), kao što je stimulacija faktora rasta (fibroblasni faktor rasta, endotelijalni vaskularni faktor rasta, ekspresija receptora za epidermalni faktor rasta) i, na taj način, stimulacija deobe ćelija (121).

Inaktivacija p53 je moguća i bez mutacija gena koji ga kodira. Jedan od načina je kad se wild-type p53 vezuje za HPV16 virus. Virusni E6 protein HPV16 se takmiči sa hdm2 za vezivanje za p53. Često se mutacije p53, kod tumora koji nose HPV16, ne detektuju. p53 može biti deaktiviran i prekomernom ekspresijom hdm2, mada za ovaj tip inaktivacije nema dokaza da je značajan za karcinome glave i vrata (121).

Polazaći od pomenutih mehanizama u kojima p53 učestvuje kao jedan od ključnih faktora regulacije ćelijskog ciklusa nakon oštećenja DNK, počela su istraživanja povezanosti mutacije na TP53 i njihove korelacije sa dužinom preživljavanja i odgovorom na radioterapiju i hemioterapiju.

Mehanizam nefunkcionisanja normalnog p53 zavisnog puta apoptoze kod HPV-negativnog i HPV-pozitivnog oralnog karcinoma je različit. Kod HPV-negativnog, najčešće se radi o mutacijama u p53 genu i sintezi afunkcionalnog TP53. Kod HPV-pozitivnog oralnog karcinoma, postoji, najčešće, funkcionalan TP53 koji je blokiran HPV proteinima. Vezivanje HPV je preko L1 proteina za proteoglikane bazalne membrane nakon čega dolazi do konformacionih promena u njihovoj strukturi, te ulaska viriona u ćeliju. Nakon ulaska u citoplazmu, uklanja se omotač virusa i njegova DNK ubacuje u jedro ćelije domaćina gde je u obliku epizoma u malom broju (50 do 100) kopija (122). Upravo je ovaj mali broj kopija jedan od načina kako HPV izbegava imuni odgovor domaćina. U normalnom epitelu, samo su bazalni keratinociti stem ćelije koje su sposobne za proliferaciju i od jedne ćelije nastaju dve, asimetričnom deobom. Od njih jedna postaje nova bazalna stem ćelija a druga se diferencira u zreli keratinociti. Upravo HPV kodirani proteini, E6 i E7, remete ovaj proces i omogućavaju neprestanu deobu ćelija u cilju zaokruživanja ciklusa replikacije i umnožavanja virusa. Kao što je već navedeno, HPV onkoprotein E6 se vezuje za p53 i indukuje ubikvitin zavisnu proteolizu p53 tumor supresorskog proteina. Samo E6 visoko-rizičnih HPV ima potencijal da se veže za p53 i jačina njegovog vezivanja za p53 predstavlja onkogeni potencijal HPV tipova. Tako E6 iz HPV 16 ima dva puta veći afinitet da se vezuje za p53 nego onaj iz HPV 18 (26, 123). Da bi HPV ispoljio kancerogeni potencijal, neophodno je da se inhibira apoptoza, a glavna funkcija E6 proteina je da inhibira proapoptotičku funkciju p53 (124). E6 se direktno vezuje za E6-AP (E6 associated protein) koji funkcioniše kao specifična ubikvitin ligaza za degradaciju p53. Nisko-rizični HPV E6 protein takođe može da se veže za E6-AP, ali to ne dovodi do degradacije p53 proteina (125). E6 može da se veže za p53 na dva regiona, karboksi terminalnom kraju, gde se vezuju i nisko i visoko-rizični E6 i centralni region,

gde nakon vezivanja dolazi do degradacije p53 (126). Na ovaj način se zaobilazi checkpoint vezan za p53 put apoptoze. U radu Rapmias et al se dokazuje obnavljanje p53 i Rb puta apoptoze nakon suzbijanja ekspresije visoko-rizičnog HPV E6/E7 uz pomoć retrovirusne shRNK (127). Jedinstvena karakteristika visoko-rizičnog E6 onkoproteina je postojanje PDZ vezujućeg motiva na C-terminalnom kraju koji nije prisutan kod nisko-rizičnih tipova HPV (126). Delecija ovog motiva iz virusne DNK smanjuje njegov replikativni potencijal. Visoko-rizični HPV E6 se vezuje za mnoge proteine koji poseduju PDZ vezujući domen i tumor supresorsku ulogu koju ostvaraju na različite načine (održavanje polarizovanosti ćelije, međućelijskih spojeva i veza i različitih signalnih puteva) (128, 129).

Ćelije HPV-negativnog karcinoma imaju drugačiji molekularni profil od HPV-pozitivnog orofaringealnog karcinoma. HPV-negativan orofaringealni karcinom ima mnogo veću učestalost gubitka 3p, 9p i/ili 17p hromozomskog kraka (130). Gubitak heterozigotnosti (LOH) na 17p13 uključuje TP53 a LOH na 9p21 uključuje INK4a, tumor supresor gen koji kodira p16. HPV-negativan planocelularni karcinom glave i vrata inaktivira INK4a bilo gubitkom dela hromozoma, bilo hipermetilacijom i to je glavni način za inaktivaciju Rb apoptotičnog puta (131). Za razliku od njega, HPV-pozitivan planocelularni karcinom glave i vrata sa ekspresijom E6/E7 virusnih onkoproteina, ima mnogo manji broj genskih alteracija vezanih za p53 i p16 (130). U prilog ovom idu i nalazi dve studije gde je dokazano da HPV-negativan planocelularni karcinom glave i vrata ima bar dva puta manje mutacija (132, 133).

Uobičajeni preporučeni režim postoperativnog lečenja visokorizičnog OSCC uključuje primenu cisplatina u dozi od 100 mg/m². Nakon ulaska u ćeliju, pomoću Ctr1 (copper transporter 1), dolazi do hidrolize cisplatina tako što se odvajaju atomi hlora, a takav hidrolizirani molekul može da reaguje sa sulfhidrilnim grupama proteina i atomima azota na nukleinskim kiselinama. On se dalje vezuje za N7 reaktivni centar purinskih rezidua i na taj način oštećuje DNK karcinomskih ćelija. Cisplatin indukuje oštećenje DNK i te ćelije bi trebale da budu usmerene ka apoptozi, a p53 usmerena apoptoza se, nakon DNK oštećenja nastalog dejstvom cisplatina, odvija preko „flip-like inhibitory protein“ (FLIP), direktnog vezivanja i suzbijanje antiapoptotske funkcije Bcl-xL, pojačane ekspresije PTEN i inhibicije AMPK (134).

U kohorti od 68 pacijenata, koji su prvo primili hemioterapiju sa cisplatinom i nakon toga operisani zbog lokalno uznapredovalog oralnog karcinoma i analiziranim mutacijama na

TP53 na osnovu "EAp53 scoring" (EA - evolutionary action) sistema ("http://mammoth.bcm.tmc.edu/EAp53/"), grupa pacijenata sa visokorizičnom mutacijom na TP53 je imala smanjenu senzitivnost na cisplatin i imala je 10 puta veću verovatnoću za rezidualnu bolest u poređenju sa grupom sa niskorizičnim mutacijama na TP53 (135).

Čak i polimorfizam na kodonu 72 TP53, gde je kodiran ili arginin ili prolin, drugačije moduliraju funkciju p73 i daju drugačiji odgovor na terapiju cisplatinom. 72R (arginin) verzije imaju slabiji odgovor na terapiju cisplatinom od 72P (prolin) verzije TP53 (96).

Temam et al (2010.) su tokom ispitivanja uticaja tumorskog stadijuma, ekspresije p53 i mutacija na p53, kod 105 pacijenata sa planocelularnim karcinomom sluznice glave i vrata, zaključili da je mutacija na p53 jedina varijabla koja daje značajnu predikciju odgovora na terapiju (110).

Slabiji odgovor na hemioterapiju zasnovanu na cisplatinu kod pacijenata sa mutiranim TP53 ukazao je na potencijalnu kliničku upotrebljivost novih terapijskih modela sa lekovima koji trebaju da obnove funkcije p53, lekovima kojima se preko adenovirusa ubacuje wild-type TP53. Primećena je tumorska regresija bilo kod terapije samo adenovirusnim TP53 ili u kombinaciji sa radioterapijom ili hemioterapijom (136). Cabelguenne et al su objavili da mutacija na TP53 povećava rizik da oralni karcinom ispolji rezistenciju na terapiju cisplatinom i 5-Fu za 2.7 puta u donosu na grupu sa normalnim TP53 (111).

Takođe potencijalno obećavajući terapijski pristup je lečenje malim molekulima koji reaktiviraju mutirani p53, koristeći PRIMA-1 (P53 Reactivation and Induction of Massive Apoptosis) kao monoterapije, bilo u kombinaciji sa standardnom hemoterapijom (137).

PRIMA-1 terapija je aktivnija u ćelijskim linijama koje sadrže mutiran p53 nego u ćelijama sa wild type p53, i rezultira povećanom ekspresijom p53 ciljanih gena: p21, Bak, Puma i Noka (137). Još jedan mali molekul koji reaktivira p53, RITA (reaktivacija p53 i indukcija apoptoze tumorskih ćelija; reactivation of the p53 and induction of tumor cell apoptosis), indukuje akumulaciju i reaktivaciju p53, potencira apoptozu putem regulacijom na više p21, BAX i caspase-3, i indukuje inhibiciju rasta OSCC ćelija in vitro i in vivo (138).

Braakhuis et al su uočili da su dve genetičke promene najčešće kod primarnog oralnog karcinoma i razvoja sekundarnog primarnog tumora (SPT), LOH i mutacije u p53. Analizirajući podatke iz osam studija vezanih za sekundarne primarne tumore zaključili su da treba tražiti genetičku sličnost primarnog i sekundarnog tumora, a da su

potencijalno ometajući faktori tipovi analiza, kao i metod kako se izvode. Važno je posmatrati, tražiti da li oba tumora imaju identičan klon ćelija. Za razliku od analize LOH, p53 bi trebao da pruži snažne dokaze o zajedničkom genetičkom poreklu oba tumora pošto su njegove promene specifične. Postoji oko 5% verovatnoće da se sasvim slučajno kod oba tumora odigraju promene na identičnim hot spot mestima i takvi tumori bi zahtevali dodatnu analizu. Generalni zaključci iz dostupnih studija su: 1. da postoje SPT sa identičnom genetičkom osnovom kao i primarni (najviše izraženo karcinoma pluća nakon primarnog oralnog karcinom), 2. Da postoje SPT sa potpuno različitom genetičkom osnovom (nazivaju ih i pravi SPT), 3. SPT koji imaju donekle sličnu, ali ne u potpuosti, genetičku osnovu (139). Još uvek nije poznato na koji način se razvijaju genetički identični tumori (Braakhuis et al ih posmatraju kao jednu leziju), da li se tumorske ćelije šire krvlju, pljuvačkom, preko mukoze ili submukozno. Predlažu uvođenje termina "sekundarnog tumorskog polja" (Secon field tumors, SFT) kod sekundarnih tumora koji imaju identičnu genetičku osnovu i nastaju na terenu genetički pobuđene sluznice. Na osnovu ovih podataka, smatraju da bi trebalo uvesti novu molekularnu poddelu SPT-a. Ako se tumor javlja u blizini ili na mestu primarnog onda su to rekurentni tumor/recidiv (sve genetičke promene su identične ili veoma slične), SFT (tumori su donekle slični, neki marker se poklapaju ali su drugi različiti) ili pravi SPT (molekularni profili im se potpuno razlikuju). Ako su tumori na drugom anatomskom mestu onda su to metastaze (svi molekularni markeri se poklapaju), SFT (neki molekularni markeri se poklapaju, a kasnije su različiti) ili pravi SPT (svi molekularni profili su različiti) (139).

Ovakvi zaključci dodatno upućuju na značaj analize p53 gena u tumorskom tkivu gde pored predviđanja odgovora na hemioterapiju, njihovo otkrivanje može da ukaže na povećanu verovatnoću razvoja sekundarnih tumora.

Zbog sve veće učestalosti i loše prognoze uznapredovalog OSCC -a, ključno je pronaći nove biomarkere koji otkrivaju individualnu podložnost OSCC-u i predvideti napredovanje bolesti i prognozu. Pošto je u ćelijama karcinoma najčešće oštećena kontrola ćelijskog ciklusa, veliki broj istraživanja je usmereno proučavanju varijanti gena (polimorfizama) uključenih u regulaciju kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa. Genske varijante se smatraju jednim od najvažnijih faktora koji određuju individualnu sklonost ka razvoju karcinoma.

Varijante gena CDKN1A, kodirajućeg za p21, i gena CCND1, kodirajućeg za ciklin D1, uključene su u apoptozu i igraju ulogu u neoplastičnoj transformaciji u različitim vrstama karcinoma, uključujući karcinom glave i vrata (92, 140).

Kao što se E6 vezuje za p53, tako se i E7 vezuje za Rb i dovodi do njegove proteolitičke razgradnje (141). Rb regulise ćelijski ciklus tako što kontroliše akumulaciju E2F u jedru i na taj način prelazak iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa. E7 vrši degradaciju Rb i na taj način se omogućava oslobađanje E2F mitogenih transkripcionih faktora koji promovišu ulazak u S fazu i aktivaciju proliferacije (142, 143).

Degradacija Rb takođe oslobađa ekspresiju CDKN2A gena, koji kodiraju tumor supresor p14^{ARF}, kao i p16^{INK4A} koji je marker za HPV pozitivan orofaringealni karcinom (144, 145). Ciklin D1, D2 i D3 reaguju sa ciklin zavisnim kinazama (CDK 4 i 6). Ove kinaze fosforilišu Rb (njegova inaktivacija je vezana za fosforilaciju) i tako omogućavaju prolazak ciklusa iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa. Aktivnost CDK je vezana za inhibitore ciklin zavisnih kinaza (CKI) a jedan od najpoznatijih CKI je tumor supresor protein p16. On je produkt CDKN2(MTS1) gena. Pripada INK4 familiji (p15, p16, p18 i p19). Oni se vezuju za CDK4 i/ili CDK6 i inhibiraju katalitičku aktivnost CDK/cyclinD kompleksa. Na ovaj način p16, kao i ostali članovi ove familije, regulišu fosforilaciju i supresivnu funkciju Rb. Postoji obrnuto proporcionalni odnos između ekspresije p16 i količine normalnog (funkcionalnog) Rb (negativna povratna sprega). Kad god je Rb inaktiviran, mutiran ili prisutan u maloj količini, postoji povećan nivo p16. Ekspresija gena za p16 je vezana za E2F transkripcioni faktor, i preko njega se aktivira, a njegova aktivnost je regulisana preko Rb. Rb je ključna meta za p16. Visok nivo p16 neće dovesti do supresije rasta tumora i deobe ćelija ako ne postoji funkcionalan Rb.

Nisko-rizični HPV E7 vezuje Rb sa malim afinitetom koji nije dovoljan da indukuje Rb degradaciju tog nivo koji je potreban za malignu transformaciju ćelije (146, 147)

Ugrađivanje virusne DNK u DNK domaćina nije obavezan deo životnog ciklusa HPV i češće se viđa kod onkogenih tipova HPV (148, 149). Procenat u kome je HPV DNK ugrađena u DNK domaćina varira između studija, od 39% do 71% (150). Transkripcioni faktori koji potiču iz integrisane viruse DNK su stabilniji nego kod epizomalne DNK. Olthof et al su pronasli da ne postoji razlika u broju virusnih kopija, ekspresije HPV 16 "interrupted" gena i virusnih onkogenih E2, E6 i E7 između HPV-integrisanih i epizomalnih tumora (150).

Glavna uloga visoko-rizičnog HPV E7 proteina je da reprogramira završnu diferencijaciju keratinocita da ponovo nastave ćelijski ciklus i eksprimiraju proteine koji su neophodni za replikaciju virusnog genoma. Ekspresija E7 proteina u ćelijama koje se nalaze u fazi zaustavljenog rasta, indikuje da E7 indukuje ćelijsku DNK sintezu i prelaz iz G1 u S fazu (151). E7 se vezuje za Rb tumor supresor protein i članove njegove familije i sprečava vezivanje za E2F, što dovodi do pojačane ekspresije E2F-zavisnih gena od kojih su mnogi važni za progresiju ćelijskog ciklusa u S fazu (cyclin A i E, DNA polymerase α , PCNA, hTERT i p21 CIP1). E7 takođe inhibira aktivnost inhibitora ciklin zavisnih kinaza i reaguje sa cyclin-cdk kompleksom te na taj način stimuliše progresiju ćelijskog ciklusa (152, 153). Da bi E7 omogućio zaobilazanje faze zaustavljanja ćelijskog ciklusa, neophodna je i degradacija Rb i ukidanje p21 inhibicije (154). E7 protein nisko-rizičnih HPV nije u mogućnosti da vrši degradaciju Rb i slabije inhibira p21.

Koliko znamo, naša studija je prva koja istražuje varijante CDKN1A i CCND1 kod OSCC pacijenata u srpskoj populaciji i pruža prve dokaze o povezanosti varijante rs9344 u genu CCND1 i povećanog rizika od pojave OSCC.

Naši rezultati pokazuju da se varijanta rs9344 u genu CCND1 može smatrati potencijalnim faktorom molekularnog rizika za predispoziciju ka razvoju OSCC, dok varijante gena CDKN1A rs1801270 i rs105923 nisu povezane sa rizikom od oralnog karcinoma. Kontrolnu grupu su činili zdravi pojedinci, slični grupi pacijenata u svim aspektima osim u istoriji karcinoma. Grupa obolelih i kontrolna grupa bile su usklađene prema starosti, polu i svi su iz iste etničke populacije. Studije kontrole slučaja, koje retrospektivno upoređuju grupe radi identifikacije faktora rizika ili biomarkera bolesti, omogućavaju vrednu procenu rizika u manjim retrospektivnim analizama, naročito u proučavanju ređih bolesti, poput oralnog karcinoma.

Prema našim rezultatima, CCND1 rs9344 heterozigotni GA i mutirani AA genotipovi mogu biti faktori rizika za povećanu sklonost ka oralnom karcinomu. Pacijenti sa GA/AA genotipovima su imali 2,95/2,03 puta veći rizik od oralnog karcinoma u poređenju sa wild type GG genotipom.

U recesivnom genetskom modelu, genotip AA bio je povezan sa 2,3 puta povećanim OSCC rizikom. To je u skladu sa nalazima prijavljenim za nemačko stanovništvo (155) i ranije objavljenim studijama kontrole slučaja (156). Osim toga, prema rezultatima meta-analize sprovedene na indijskoj populaciji, rs9344 je identifikovan kao faktor rizika za karcinom dojke, kolorektalni karcinom i karcinom jednjaka (157).

Takođe smo primetili pojedinačno testiranu varijantu rs9344 u CCND1 genu kao najbolji genetski model, pomoću GMDR analize, koja bi mogla da delimično potvrdi statističku značajnost procenjenu za istu varijantu gena u našoj studijskoj grupi. Uočena asocijacija se može pripisati funkcionalnom efektu ispitivane varijante. Naime, rs9344 je „splice site“ (mesto spajanja) varijanta koja rezultira alternativnim mestom spajanja u mRNA. Kao posledica toga, varijanta proteina cycD1 poznatija kao cycD1b, je sa promenjenim C-terminalnim domenom i ima stabilniji oblik (84, 158).

Ćelije u kojima je cycD1 mutiran mogu da izgube kontrolnu tačku G1 i tad ne dolazi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa na prelazu kontrolne tačke G1/S. Ovo bi moglo biti potencijalno objašnjenje kako varijanta CCND1 rs9344 povećava rizik od razvoja karcinoma u usnoj šupljini. Kao kritični regulator ćelijskog ciklusa, varijanta CCND1 rs9344, sa stvaranjem varijante ciklinD1b, ima povećan kapacitet za regulaciju aktivnosti CDK i služi kao moćan onkogen (158, 159).

Neophodna su dalja istraživanja i funkcionalne studije za procenu pravog onkogenog potencijala rs9344 varijante u etiologiji OSCC. Osim CCND1 varijante rs9344 koja je uključena u onkogene događaje, amplifikacija gena CCND1, mutacije, aktivacije različitih puteva, dovodi do regulacije ciklina D1 na više i njegove prekomerna ekspresijae u ćelijama koje pokazuju onkogeno delovanje (160).

U literaturi su još uvek prisutni nedosledni rezultati o povezanosti rs9344 i OSCC. U različitim populacijama primećeni su suprotni efekti genotipova rs9344 na rizik od OSCC. Na primer, u populaciji Tajvana, rs9344 je bio povezan sa smanjenim rizikom od oralnog karcinoma (161), dok u brazilskoj i nemačkoj populaciji nije pronađena ta povezanost (162, 163).

Dve nezavisne meta-analize pokazale su odsustvo povezanosti između rs9344 i rizika od oralnog karcinoma (163, 164), dok je pozitivna povezanost primećena u azijskoj podgrupi (164).

Na takve razlike među studijama bi mogao da utiče ograničen broj uzoraka, razlike u primenjenim kriterijima za uključivanje pacijenata ili kontrolne grupe, stratifikacija populacije, kao i etničke razlike u učestalosti alela i genotipova. Štaviše, izloženost različitim faktorima rizika, koji nisu uključeni u analizu, mogla bi da utiče na pojavu nedoslednosti rezultata.

Budući da je oralna kancerogeneza složen proces koji je rezultat interakcije genetskih promena i izloženosti faktorima rizika, važno je identifikovati faktore životne sredine koji

zajedno sa alelom rizika rs9344 potencijalno doprinose oralnoj kancerogenezi. Iako genotipovi rs9344 nisu bili povezani sa navikama pušenja u našoj studijskoj grupi, interakcija između rs9344 i pušenja u razvoju oralnog karcinoma je već dokazana (161). Poznati prognostički faktori povezani sa OSCC-om, uključujući recidive, zahvaćenost limfnih čvorova, veličina i gradus tumora, takođe su prediktor lošeg preživljavanja kod pacijenata u našoj kohorti. Međutim, nije bilo razlika u ukupnom preživljavanju i preživljavanju bez bolesti među pacijentima sa OSCC-om stratifikovanim prema genotipovima analiziranih varijanti gena CDKN1A i CCND1. Naši rezultati su u skladu sa studijom koja nije ukazala na povezanost varijante rs9344 i preživljavanja kod nemačkih OSCC pacijenata (163).

Nasuprot tome, prethodne studije ukazuju na značaj varijante CCND1 rs9344 kao prognostičkog pokazatelja u oralnom karcinomu. Predložen je kao biomarker preživljavanja bez bolesti kod pacijenata sa oralnim karcinomom (165).

U uznapredovalim oblicima i stadijumima karcinoma glave i vrata, rs9344 je bio povezan sa boljim preživljavanjem pacijenata koji nisu lečeni radioterapijom (166). Uočene razlike u preživljavanju u našim i drugim studijama mogu se pripisati specifičnosti različitih tipova karcinoma glave i vrata, ali i razlikama u veličini uzorka, kao i dužini praćenja pacijenata.

Pored postojećih mogućnosti lečenja, koje uključuju hirurgiju, radioterapiju i hemioterapiju, nova terapijska strategija lečenja OSCC uključuje razvoj inhibitora CDK (167). Zbog toga bi saznanje da je pacijent sa genotipom rs9344 moglo da bude značajno za planiranje primene ciljane terapije.

Naše istraživanje nije otkrilo statistički značajnu povezanost između varijanti rs1801270 i rs1059234 i rizika od razvoja OSCC-a. Jedna od prethodnih studija je pokazala skoro 1,5 puta povećan rizik sa kombinovanim heterozigotnim i mutiranim genotipovima rs1059234 varijante CDKN1A u poređenju sa wild type varijantom istog gena među bivšim alkoholičarima i onima koji nikad nisu konzumirali alkohol, bivšim pušačima i onima koji nikad nisu pušili a boleli su od orofaringealnog karcinoma (168). U istoj studiji, kombinovani heterozigotni i mutirani genotipovi rs1801270 bili su povezani sa 1,4 puta povećanjem rizika u poređenju sa wild type varijantom genotipom među bivšim korisnicima alkohola i pušačima (168). Osim toga, meta-analiza je pokazala da je rs1059234 u dominantnom genetskom modelu (CT+TT naspram CC) povezan sa 1,5 puta povećanim rizikom za karcinom glave i vrata (169).

Heterozigotni i mutirani genotipovi varijanti CDKN1A rs1801270 i rs1059234 su imali povećan rizik za razvoj drugog primarnog maligniteta kod pacijenata sa karcinomom glave i vrata (170). Nasuprot tome, uočeno je odsustvo povezanosti između varijanti gena CDKN1A i rizika od raka dojke (171), karcinoma bešike (172) i karcinoma nazofarinksa (173), što ukazuje na povezanost za određene tipove karcinoma. Sveukupno posmatrano, ovi rezultati sugerišu da varijante rs1801270 i rs1059234 CDKN1A mogu doprineti genetskoj predispoziciji za karcinom glave i vrata (168).

Razlika između ovog i naših rezultata mogla bi da se objasni manjom veličinom uzorka naše studijske grupe, ali i genetskom heterogenošću među različitim populacijama. Nasuprot tome, nije postojala značajna povezanost između genotipova rs1801270 i rizika od OSCC-a u brazilskoj populaciji (162), što je u skladu s našim nalazima. Vredi napomenuti da u našoj grupi slučajeva OSCC varijanta rs1801270 nije bila u HW ekvilibrijumu, dok je u kontrolnoj grupi primećen statistički trend. Dok odstupanje HWE-a u grupi pacijenata obolelih od OSCC-a može ukazivati na potencijalnu povezanost zajedničkog alela sa rizikom od oboljevanja, odsustvo HWE-a u kontrolnoj grupi je moguće zbog više različitih razloga (174). Odstupanje od HWE-a bi moglo da utiče na procenu efekta alela na rizik od oboljevanja u studijama genetske povezanosti. Ono takođe može da nastane i zbog stratifikacije stanovništva, zbunjujućih faktora koji nisu uračunati. Takođe postoji mogućnost da druge varijante gena, koje su u jakoj ravnotežnoj vezi sa rs1801270, mogu da dovedu do odstupanja HWE.

Iako mutacije na TP53 služe kao prediktor prognoze i odgovora na terapiju, još uvek ne postoji u potpunosti adekvatan sistem za stratifikaciju pacijenata u određene grupe. Naši nalazi ukazuju na to da bi patogene mutacije TP53 u HPV-negativnim OSCC tumorima mogle biti prognostički marker koji ukazuje na kraće vreme ukupnog preživljavanja. Osim toga, HPV-negativni OSCC pacijenti sa patogenom mutacijom TP53 koji su primili hemioterapiju cisplatinom imaju značajno nižu stopu preživljavanja, što ukazuje na to da bi patogene mutacije TP53 mogle biti marker rezistencije na hemioterapiju kod tih pacijenata. Dalje razjašnjenje funkcije i regulacije TP53 i novi terapijski pristup sa malim molekulima koji reaktiviraju mutirani TP53, značajno bi unapredili terapiju oralnog karcinoma.

Za razliku od p53, mnogo su ređe mutacije u p21 genu, ali se disregulacija njegove ekspresije uočava u većini planocelularnih karcinoma glave i vrata. Njegova povećana ekspresija je uočena u proliferišućim ćelijama kod oralnih displazija, nezavisna je od p53

i najverovatnije je određen koekspresijom PCNA, tako da je njegova inhibitorna funkcija u rastu ovih tumora isključena. Smatra se da je njegova pojačana ekspresija rani događaj kod razvoja oralnih karcinoma i vezana je za PCNA/p21 binarni kompleks, stehiometrijske promene u vezivanju sa ciklin D/cdk kompleksom, sposobnošću tumorskih ćelija da angažuju p21 da se veže za taj kompleks i/ili povećanom ekspresijom drugih regulatornih molekula kao što je ciklin D1. Upravo činjenica da je njegova ekspresija rani događaj kod razvoja oralnih karcinoma može da posluži kao faktor koji bi mogao da utiče na prognozu, kao i za razvoj ciljane terapije. Kratkotrajno praćenje eksperimentalnih miševa sa mutacijom na p21 genu nije pokazalo povećanu incidence pojave tumora, ali su novije studije pokazale da miševi sa mutacijom na p21, tokom dvogodišnjeg praćenja, razvijaju tumore (dominantno sarkome i B limfome, dok nije uočeno za tumore epidermalnog porekla) koji su bili uzrok umiranja kod 55% muških i 27% ženskih jedinki (175). U kombinaciji sa defektom u još nekim tumor supresorima, kao što su članovi INK4a familije, mutacije na p21 i/ili p27 su uticali na povećanu smrtnost kod sarkoma i limfoma (176). Prekomerna ekspresija p21 značajno smanjuje preživljavanje pacijenata sa skvamocelularnim karcinomom jednjaka i mutacijama u genu p53 (177). Uočeno je da je potreban duži vremenski period za razvoj tumora koje možemo da povežemo sa mutacijama u p21 genu (13-18 meseci), za razliku od mutacija u p53 genu (5 meseci) (175).

Rezultati naše studije ukazuju na to da se rs9344 varijanta u CCND1 genu može smatrati potencijalnim molekularnim biomarkerom povećanog rizika za predispoziciju ka razvoju oralnog karcinoma. Zbog svoje ključne uloge u regulaciji ćelijskog ciklusa, dalja istraživanja bi trebala da uključe više varijanti CCND1 gena, gen-gen i gen-okolina interakcijama, u kombinaciji sa nalazima iz transkriptomike i epigenetske analize, kako bi se u potpunosti razjasnila uloga CCND1 rs9344 u etiologiji oralnog karcinoma. Potvrda naših nalaza u budućim većim prospektivnim studijama bi mogla da olakša ranu identifikaciju osoba sa povećanim rizikom za razvoj OSCC-a i potencijalno omogućiti personalizovan pristup u lečenju i ciljanoj terapiji pacijenata sa OSCC-om.

6. ZAKLJUČCI

- Naši nalazi ukazuju na to da bi patogene mutacije TP53 u HPV-negativnim OSCC tumorima mogle biti prognostički marker koji ukazuje na kraće vreme ukupnog preživljavanja.
- HPV-negativni OSCC pacijenti sa patogenom mutacijom TP53 koji su primili hemioterapiju cisplatinom imaju značajno nižu stopu preživljavanja u odnosu na pacijente koji nemaju patogene mutacije TP53.
- Nismo uočili povezanost patogenih mutacija TP53 sa polom niti pušenjem
- Patogene mutacije TP53 bile su značajno povezane sa starošću pacijenata, $p = 0,005$ i visokim unosom alkohola, $p = 0,009$.
- Nismo uočili povezanost varijanti gena CCND1, koji kodira cycD1 i CDKN1A, koji kodira p21 sa demografskim niti kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata sa OSCC-om
- Nismo uočili povezanost varijanti gena CCND1 i CDKN1A sa ukupnim preživljavanjem pacijenata sa OSCC-om
- rs9344 varijanta u CCND1 genu može smatrati potencijalnim molekularnim biomarkerom povećanog rizika za predispoziciju ka razvoju oralnog karcinoma.
- Nismo uočili povezanost CDKN1A gena sa rizikom za predispozicijom za pojavu OSCC

7. BIBLIOGRAFIJA:

1. El-Naggar A, Chan J, Grandis JT, T, Sootweg P. WHO Classification of Tumours. 4 ed. Lyon: IARC Press; 2017. 347 p.
2. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X. Lyon, France: IARC Scientific Publication; 2014. 1365 p.
3. Shah J, Johnson N, Batsakis J. Oral cancer. New York: Martin Dunitz Thieme Medical Publishers Inc; 2003. 496 p.
4. Miranda-Filho A, Bray F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncol.* 2020;102:104551.
5. Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):340-50.
6. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008;122(1):155-64.
7. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11884-94.
8. Wang M, Xiao C, Ni P, Yu JJ, Wang XW, Sun H. Correlation of Betel Quid with Oral Cancer from 1998 to 2017: A Study Based on Bibliometric Analysis. *Chin Med J (Engl).* 2018;131(16):1975-82.
9. Slaughter D, Southwick H, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953;6(5).
10. Warren S, Gates O. Multiple Primary Malignant Tumors: A Survey of the Literature and Statistical Study. *American Journal of Cancer.* 1932;16:1358-414.
11. van der Waal I, de Bree R. Second primary tumours in oral cancer. *Oral Oncol.* 2010;46(6):426-8.
12. Adjei Boakye E, Buchanan P, Hinyard L, Stamatakis K, Osazuwa-Peters N, Simpson MC, et al. Risk and outcomes for second primary human papillomavirus-related and -unrelated head and neck malignancy. *Laryngoscope.* 2019;129(8):1828-35.
13. Hsu SH, Wong YK, Wang CP, Wang CC, Jiang RS, Chen FJ, et al. Survival analysis of patients with oral squamous cell carcinoma with simultaneous second primary tumors. *Head Neck.* 2013;35(12):1801-7.
14. van Rensburg EJ, Venter EH, Simson IW. Human papillomavirus DNA in aerodigestive squamous carcinomas demonstrated by means of in situ hybridisation. *S Afr Med J.* 1993;83(7):516-8.
15. Amor-Gu ret M. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Lett.* 2006;236(1):1-12.
16. Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, Giampietro PF, Batish SD, Huvos AG, et al. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(1):106-12.
17. B ez A. Genetic and environmental factors in head and neck cancer genesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2008;26(2):174-200.
18. Ball VA, Righi PD, Tejada E, Radpour S, Pavelic ZP, Gluckman JL. p53 immunostaining of surgical margins as a predictor of local recurrence in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Ear Nose Throat J.* 1997;76(11):818-23.
19. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(1):47-62.

20. Daniell J, Udovicich C, Rowe D, McDowell L, Vital D, Bressel M, et al. Impact of histological Oral Tongue Cancer margins on locoregional recurrence: A multi-centre retrospective analysis. *Oral Oncol.* 2020;111:105004.
21. Brinkman D, Callanan D, O'Shea R, Jawad H, Feeley L, Sheahan P. Impact of 3 mm margin on risk of recurrence and survival in oral cancer. *Oral Oncol.* 2020;110:104883.
22. Nason RW, Binahmed A, Pathak KA, Abdoh AA, Sándor GK. What is the adequate margin of surgical resection in oral cancer? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(5):625-9.
23. Gershenwald JE, Amin MB, Schilsky RL, Gaspar LE, Washington MK, Sullivan DC, et al. *AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition* 8ed. Shah JP, Ridge JA, Lydiatt WM, Patel SG, Glastonbury CM, Brandwein-Weber M, et al., editors. New York: Springer International Publishing; 2017. 1032 p.
24. Shah J, Patel S, Singh B. *Head and Neck Surgery and Oncology.* 4 ed. Philadelphia: Mosby; 2012. 858 p.
25. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):321-2.
26. Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(6):djv403.
27. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S7-15.
28. Engel LW, Heilman CA, Howley PM. Transcriptional organization of bovine papillomavirus type 1. *J Virol.* 1983;47(3):516-28.
29. Brown DR, Kitchin D, Qadadri B, Neptune N, Batteiger T, Ermel A. The human papillomavirus type 11 E1--E4 protein is a transglutaminase 3 substrate and induces abnormalities of the cornified cell envelope. *Virology.* 2006;345(1):290-8.
30. Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA. Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* 2005;79(11):6732-40.
31. Peh WL, Brandsma JL, Christensen ND, Cladel NM, Wu X, Doorbar J. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol.* 2004;78(4):2142-51.
32. Rampias T, Sasaki C, Psyrris A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncol.* 2014;50(5):356-63.
33. Klingelutz AJ, Roman A. Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology.* 2012;424(2):77-98.
34. Anantharaman D, Gheit T, Waterboer T, Abedi-Ardekani B, Carreira C, McKay-Chopin S, et al. Human papillomavirus infections and upper aero-digestive tract cancers: the ARCAGE study. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(8):536-45.
35. Michaud DS, Langevin SM, Eliot M, Nelson HH, Pawlita M, McClean MD, et al. High-risk HPV types and head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2014;135(7):1653-61.
36. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsagué X, Laporte L, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):1319-31.
37. Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(48):20458-63.

38. Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, et al. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med.* 2007;13(7):857-61.
39. Perry ME. The specialised structure of crypt epithelium in the human palatine tonsil and its functional significance. *J Anat.* 1994;185 (Pt 1):111-27.
40. Westra WH. The morphologic profile of HPV-related head and neck squamous carcinoma: implications for diagnosis, prognosis, and clinical management. *Head Neck Pathol.* 2012;6 Suppl 1:S48-54.
41. Keck MK, Zuo Z, Khattri A, Stricker TP, Brown CD, Imanguli M, et al. Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clin Cancer Res.* 2015;21(4):870-81.
42. Poon RY, Jiang W, Toyoshima H, Hunter T. Cyclin-dependent kinases are inactivated by a combination of p21 and Thr-14/Tyr-15 phosphorylation after UV-induced DNA damage. *J Biol Chem.* 1996;271(22):13283-91.
43. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 2004;19:124-8.
44. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 2:1463-7.
45. Kumar, Vinay, Abbas, K A, Fausto, Nelson, et al. *Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease, 8th Edition 8ed.* Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p. 25-32.
46. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30:87.
47. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(3):175-93.
48. Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell.* 2001;104(3):325-8.
49. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature.* 1986;320(6057):84-5.
50. McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(1):130-4.
51. Kastan MB, Kuerbitz SJ. Control of G1 arrest after DNA damage. *Environ Health Perspect.* 1993;101 Suppl 5:55-8.
52. Koshland DE. Molecule of the year. *Science.* 1993;262(5142):1953.
53. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358(6381):15-6.
54. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88(3):323-31.
55. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(5):a001883.
56. Li FP, Fraumeni JF. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med.* 1969;71(4):747-52.
57. Khoury MP, Bourdon JC. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(3):a000927.
58. Reisman D, Greenberg M, Rotter V. Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(14):5146-50.
59. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2005;19(18):2122-37.

60. Gorospe M, Wang X, Holbrook NJ. p53-dependent elevation of p21Waf1 expression by UV light is mediated through mRNA stabilization and involves a vanadate-sensitive regulatory system. *Mol Cell Biol.* 1998;18(3):1400-7.
61. Adkins JN, Lumb KJ. Stoichiometry of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 inhibition by p21Cip1/Waf1. *Biochemistry.* 2000;39(45):13925-30.
62. Harada K, Ogden GR. An overview of the cell cycle arrest protein, p21(WAF1). *Oral Oncol.* 2000;36(1):3-7.
63. van Oijen MG, Tilanus MG, Medema RH, Slootweg PJ. Expression of p21 (Waf1/Cip1) in head and neck cancer in relation to proliferation, differentiation, p53 status and cyclin D1 expression. *J Oral Pathol Med.* 1998;27(8):367-75.
64. Agarwal S, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Expression of cyclin dependent kinase inhibitor p21waf1/cip1 in premalignant and malignant oral lesions: relationship with p53 status. *Oral Oncol.* 1998;34(5):353-60.
65. Tatemoto Y, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T, Ueta E, Kimura T. Expression of p53 and p21 proteins in oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and response to chemoradiotherapy. *Pathol Res Pract.* 1998;194(12):821-30.
66. Ng IO, Lam KY, Ng M, Regezi JA. Expression of p21/waf1 in oral squamous cell carcinomas--correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. *Oral Oncol.* 1999;35(1):63-9.
67. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(6):400-14.
68. El-Deiry WS. p21(WAF1) Mediates Cell-Cycle Inhibition, Relevant to Cancer Suppression and Therapy. *Cancer Res.* 2016;76(18):5189-91.
69. Weinberg WC, Denning MF. P21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(6):453-64.
70. Kreis NN, Louwen F, Yuan J. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/. *Cancers (Basel).* 2019;11(9).
71. Suzuki A, Tsutomi Y, Yamamoto N, Shibutani T, Akahane K. Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Mol Cell Biol.* 1999;19(5):3842-7.
72. Kim JS, Ha JY, Yang SJ, Son JH. A Novel Non-Apoptotic Role of Procaspase-3 in the Regulation of Mitochondrial Biogenesis Activators. *J Cell Biochem.* 2018;119(1):347-57.
73. Bartkova J, Lukas J, Müller H, Strauss M, Gusterson B, Bartek J. Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer. *Cancer Res.* 1995;55(4):949-56.
74. Mishra R, Das BR. Cyclin D1 expression and its possible regulation in chewing tobacco mediated oral squamous cell carcinoma progression. *Arch Oral Biol.* 2009;54(10):917-23.
75. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, et al. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* 1993;7(8):1559-71.
76. Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, et al. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(1):51-61.
77. Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T, Kannan S. CCND1 polymorphisms (A870G and C1722G) modulate its protein expression and survival in oral carcinoma. *Oral Oncol.* 2008;44(7):689-97.

78. Huang M, Spitz MR, Gu J, Lee JJ, Lin J, Lippman SM, et al. Cyclin D1 gene polymorphism as a risk factor for oral premalignant lesions. *Carcinogenesis*. 2006;27(10):2034-7.
79. Okami K, Reed AL, Cairns P, Koch WM, Westra WH, Wehage S, et al. Cyclin D1 amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 1999;18(23):3541-5.
80. Capaccio P, Pruneri G, Carboni N, Pagliari AV, Quatela M, Cesana BM, et al. Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes. *Head Neck*. 2000;22(3):234-40.
81. Friedlander PL. Genomic instability in head and neck cancer patients. *Head Neck*. 2001;23(8):683-91.
82. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. 1993;366(6456):701-4.
83. Souto-García A, Fernández-Somoano A, Pascual T, Álvarez-Avellón SM, Tardón A. Association of p21 Ser31Arg and p53 Arg72Pro polymorphisms with lung cancer risk in CAPUA study. *Lung Cancer (Auckl)*. 2012;3:69-78.
84. Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene*. 1995;11(5):1005-11.
85. Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiante G, Attard M, et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2004;23(19):3328-37.
86. Tanić N, Milašin J, Dramićanin T, Bošković M, Vukadinović M, Milošević V, et al. TP53 and c-myc Co-alterations: A hallmark of oral cancer progression. *J Med Biochem* 2013;32(4):380-8.
87. Pérez-Palma E, Gramm M, Nürnberg P, May P, Lal D. Simple ClinVar: an interactive web server to explore and retrieve gene and disease variants aggregated in ClinVar database. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W99-W105.
88. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(1):24-35.
89. Caponio VCA, Troiano G, Adipietro I, Zhurakivska K, Arena C, Mangieri D, et al. Computational analysis of TP53 mutational landscape unveils key prognostic signatures and distinct pathobiological pathways in head and neck squamous cell cancer. *Br J Cancer*. 2020;123(8):1302-14.
90. Xu HM, Xu LF, Hou TT, Luo LF, Chen GB, Sun XW, et al. GMDR: Versatile Software for Detecting Gene-Gene and Gene-Environment Interactions Underlying Complex Traits. *Curr Genomics*. 2016;17(5):396-402.
91. Lou XY, Chen GB, Yan L, Ma JZ, Mangold JE, Zhu J, et al. A combinatorial approach to detecting gene-gene and gene-environment interactions in family studies. *Am J Hum Genet*. 2008;83(4):457-67.
92. Chen GB, Xu Y, Xu HM, Li MD, Zhu J, Lou XY. Practical and theoretical considerations in study design for detecting gene-gene interactions using MDR and GMDR approaches. *PLoS One*. 2011;6(2):e16981.
93. Iyer NG, Dogan S, Palmer F, Rahmati R, Nixon IJ, Lee N, et al. Detailed Analysis of Clinicopathologic Factors Demonstrate Distinct Difference in Outcome and Prognostic Factors Between Surgically Treated HPV-Positive and Negative Oropharyngeal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(13):4411-21.

94. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol.* 2006;24(5):736-47.
95. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2001;345(26):1890-900.
96. Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiante G, et al. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell.* 2003;3(4):387-402.
97. Jo DW, Kim YK, Yun PY. The influence of p53 mutation status on the anti-cancer effect of cisplatin in oral squamous cell carcinoma cell lines. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2016;42(6):337-44.
98. Bradford CR, Zhu S, Ogawa H, Ogawa T, Ubell M, Narayan A, et al. P53 mutation correlates with cisplatin sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma lines. *Head Neck.* 2003;25(8):654-61.
99. Wagner AJ, Kokontis JM, Hay N. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes Dev.* 1994;8(23):2817-30.
100. Zamble DB, Jacks T, Lippard SJ. p53-Dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(11):6163-8.
101. Siddik ZH, Mims B, Lozano G, Thai G. Independent pathways of p53 induction by cisplatin and X-rays in a cisplatin-resistant ovarian tumor cell line. *Cancer Res.* 1998;58(4):698-703.
102. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer.* 2003;104(3):336-44.
103. Verma G, Vishnoi K, Tyagi A, Jadli M, Singh T, Goel A, et al. Characterization of key transcription factors as molecular signatures of HPV-positive and HPV-negative oral cancers. *Cancer Med.* 2017;6(3):591-604.
104. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2007;121(8):1813-20.
105. Nichols AC, Faquin WC, Westra WH, Mroz EA, Begum S, Clark JR, et al. HPV-16 infection predicts treatment outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;140(2):228-34.
106. Hafkamp HC, Manni JJ, Speel EJ. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol.* 2004;124(4):520-6.
107. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer.* 2001;92(4):805-13.
108. Peltenburg LT. Radiosensitivity of tumor cells. Oncogenes and apoptosis. *Q J Nucl Med.* 2000;44(4):355-64.
109. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(4):261-9.

110. Temam S, Flahault A, Périé S, Monceaux G, Coulet F, Callard P, et al. p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2000;18(2):385-94.
111. Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, Carnot F, Houllier AM, Soussi T, et al. p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol.* 2000;18(7):1465-73.
112. Perrone F, Bossi P, Cortelazzi B, Locati L, Quattrone P, Pierotti MA, et al. TP53 mutations and pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin and fluorouracil chemotherapy in resected oral cavity squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2010;28(5):761-6.
113. Wittekindt C, Wagner S, Sharma SJ, Würdemann N, Knuth J, Reder H, et al. [HPV - A different view on Head and Neck Cancer]. *Laryngorhinootologie.* 2018;97(S 01):S48-S113.
114. Kim YR, Lee B, Byun MR, Lee JK, Choi JW. Evaluation of pemetrexed and etoposide as therapeutic regimens for human papillomavirus-positive oral and oropharyngeal cancer. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200509.
115. Wu Y, Posner MR, Schumaker LM, Nikitakis N, Goloubeva O, Tan M, et al. Novel biomarker panel predicts prognosis in human papillomavirus-negative oropharyngeal cancer: an analysis of the TAX 324 trial. *Cancer.* 2012;118(7):1811-7.
116. Slebos RJ, Yi Y, Ely K, Carter J, Evjen A, Zhang X, et al. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(3 Pt 1):701-9.
117. Slebos RJ, Jehmlich N, Brown B, Yin Z, Chung CH, Yarbrough WG, et al. Proteomic analysis of oropharyngeal carcinomas reveals novel HPV-associated biological pathways. *Int J Cancer.* 2013;132(3):568-79.
118. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):994-1013.
119. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat.* 2016;37(9):865-76.
120. Liu X-Y, Pestka S, Shi Y-F. p53: A Target and a Biomarker of Cancer Therapy? . *Recent Advances in Cancer Research and Therapy.* 1st Edition ed: Elsevier; 2012. p. 700.
121. Partridge M, Costea DE, Huang X. The changing face of p53 in head and neck cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(12):1123-38.
122. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000318.
123. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990;248(4951):76-9.
124. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990;63(6):1129-36.
125. Li X, Coffino P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol.* 1996;70(7):4509-16.
126. Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, et al. Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science.* 1997;275(5296):73-7.
127. Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrris A. E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(6):412-23.

128. Gardiol D, Kühne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*. 1999;18(40):5487-96.
129. Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE, Lambert PF. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol*. 2003;77(12):6957-64.
130. Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, et al. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(13):998-1006.
131. Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2001;37(6):498-504.
132. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*. 2011;333(6046):1157-60.
133. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*. 2011;333(6046):1154-7.
134. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-78.
135. Zhou G, Liu Z, Myers JN. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *J Cell Biochem*. 2016;117(12):2682-92.
136. Tassone P, Old M, Teknos TN, Pan Q. p53-based therapeutics for head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2013;49(8):733-7.
137. Roh JL, Kang SK, Minn I, Califano JA, Sidransky D, Koch WM. p53-Reactivating small molecules induce apoptosis and enhance chemotherapeutic cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2011;47(1):8-15.
138. Roh JL, Ko JH, Moon SJ, Ryu CH, Choi JY, Koch WM. The p53-reactivating small-molecule RITA enhances cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in head and neck cancer. *Cancer Lett*. 2012;325(1):35-41.
139. Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck*. 2002;24(2):198-206.
140. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2016;42:63-71.
141. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*. 1996;56(20):4620-4.
142. Ikeda MA, Jakoi L, Nevins JR. A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(8):3215-20.
143. Nevins JR. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*. 1992;258(5081):424-9.
144. Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):4350-4.

145. Riethdorf S, Neffen EF, Cviko A, Löning T, Crum CP, Riethdorf L. p16INK4A expression as biomarker for HPV 16-related vulvar neoplasias. *Hum Pathol.* 2004;35(12):1477-83.
146. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 1989;8(13):4099-105.
147. Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* 1990;9(1):153-60.
148. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res.* 2004;64(11):3878-84.
149. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res.* 2008;68(1):307-13.
150. Olthof NC, Speel EJ, Kolligs J, Haesevoets A, Henfling M, Ramaekers FC, et al. Comprehensive analysis of HPV16 integration in OSCC reveals no significant impact of physical status on viral oncogene and virally disrupted human gene expression. *PLoS One.* 2014;9(2):e88718.
151. Banks L, Barnett SC, Crook T. HPV-16 E7 functions at the G1 to S phase transition in the cell cycle. *Oncogene.* 1990;5(6):833-7.
152. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997;11(16):2090-100.
153. Jones DL, Alani RM, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 1997;11(16):2101-11.
154. Helt AM, Funk JO, Galloway DA. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J Virol.* 2002;76(20):10559-68.
155. Holley SL, Matthias C, Jahnke V, Fryer AA, Strange RC, Hoban PR. Association of cyclin D1 polymorphism with increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005;41(2):156-60.
156. Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, Wang LE, Eicher SA, Strom SS, et al. Cyclin D1 polymorphism and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Carcinogenesis.* 2001;22(8):1195-9.
157. Thakur N, Kumari S, Mehrotra R. Association between Cyclin D1 G870A (rs9344) polymorphism and cancer risk in Indian population: meta-analysis and trial sequential analysis. *Biosci Rep.* 2018;38(6).
158. Knudsen KE. The cyclin D1b splice variant: an old oncogene learns new tricks. *Cell Div.* 2006;1:15.
159. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene.* 2006;25(11):1620-8.
160. Ramos-García P, Gil-Montoya JA, Scully C, Ayén A, González-Ruiz L, Navarro-Triviño FJ, et al. An update on the implications of cyclin D1 in oral carcinogenesis. *Oral Dis.* 2017;23(7):897-912.

161. Tsai MH, Tsai CW, Tsou YA, Hua CH, Hsu CF, Bau DT. Significant association of cyclin D1 single nucleotide polymorphisms with oral cancer in taiwan. *Anticancer Res.* 2011;31(1):227-31.
162. Gomes CC, Drummond SN, Guimarães AL, Andrade CI, Mesquita RA, Gomez RS. P21/WAF1 and cyclin D1 variants and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(3):151-6.
163. Atac A, Riecke B, Assaf AT, Gröbe A, Friedrich RE, Heiland M, et al. Lack of evidence for predictive and prognostic value of cyclin D1 gene polymorphism CCND1 G870A for oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2014;34(1):235-8.
164. Wang L, Wang Z, Gao X, Li X, Sun X, Liu C. Association between Cyclin D1 polymorphism and oral cancer susceptibility: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35(2):1149-55.
165. Murali A, Varghese BT, Kumar RR, Kannan S. Combination of genetic variants in cyclin D1 and retinoblastoma genes predict clinical outcome in oral cancer patients. *Tumour Biol.* 2016;37(3):3609-17.
166. Zhong S, Nukui T, Buch S, Diergaard B, Weissfeld LA, Grandis J, et al. Effects of ERCC2 Lys751Gln (A35931C) and CCND1 (G870A) polymorphism on outcome of advanced-stage squamous cell carcinoma of the head and neck are treatment dependent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(11):2429-37.
167. Karunakaran K, Muniyan R. Genetic alterations and clinical dimensions of oral cancer: a review. *Mol Biol Rep.* 2020;47(11):9135-48.
168. Li G, Liu Z, Sturgis EM, Shi Q, Chamberlain RM, Spitz MR, et al. Genetic polymorphisms of p21 are associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis.* 2005;26(9):1596-602.
169. Li J, Li Z, Kan Q, Sun S, Li Y, Wang S. Association of p21 3' UTR gene polymorphism with cancer risk: Evidence from a meta-analysis. *Sci Rep.* 2015;5:13189.
170. Wang Z, Sturgis EM, Zhang F, Lei D, Liu Z, Xu L, et al. Genetic variants of p27 and p21 as predictors for risk of second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of head and neck. *Mol Cancer.* 2012;11:17.
171. Keshava C, Frye BL, Wolff MS, McCanlies EC, Weston A. Waf-1 (p21) and p53 polymorphisms in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(1):127-30.
172. Jaiswal PK, Singh V, Mittal RD. Polymorphism at P21 codon 31 and dinucleotide polymorphism of P73 gene and susceptibility to bladder cancer in individuals from North India. *Indian J Hum Genet.* 2013;19(3):293-300.
173. Tsai MH, Chen WC, Tsai FJ. Correlation of p21 gene codon 31 polymorphism and TNF-alpha gene polymorphism with nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Lab Anal.* 2002;16(3):146-50.
174. Zintzaras E, Lau J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. *J Clin Epidemiol.* 2008;61(7):634-45.
175. Martín-Caballero J, Flores JM, García-Palencia P, Serrano M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res.* 2001;61(16):6234-8.
176. Martín-Caballero J, Flores JM, García-Palencia P, Collado M, Serrano M. Different cooperating effect of p21 or p27 deficiency in combination with INK4a/ARF deletion in mice. *Oncogene.* 2004;23(50):8231-7.

177. Goan YG, Hsu HK, Chang HC, Chou YP, Chiang KH, Cheng JT. Deregulated p21(WAF1) overexpression impacts survival of surgically resected esophageal squamous cell carcinoma patients. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(3):1007-16.