

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

MR SCI DRAGO B. JELOVAC

**ANALIZA ALTERACIJA ONKOGENA I
TUMORSUPRESORNIH GENA U
HISTOLOŠKI NEGATIVNIM MARGINAMA
PLANOCELULARNIH KARCINOMA
USNE DUPLJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

MSci dr Drago B. Jelovac

**ANALYSIS OF ALTERATIONS OF
ONCOGENES AND
TUMORSUPPRESSOR GENES IN
HISTOLOGICALLY FREE MARGINS OF
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

Doctoral dissertation

Belgrade 2014.

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Mr Sci Drago B. Jelovac

**ANALIZA ALTERACIJA ONKOGENA I
TUMORSUPRESORNIH GENA U
HISTOLOŠKI NEGATIVNIM MARGINAMA
PLANOCELULARNIH KARCINOMA
USNE DUPLJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

Mentori:

Prof. dr Vitomir Konstantinović,

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,

Klinika za maksilofacijalnu hirurgiju

Prof dr Jelena Milašin

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,

Institut za humanu genetiku

Članovi komisije:

Dr Sci, Miroslav Vukadinović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,

Klinika za maksilofacijalnu hirurgiju

Dr Sci, Branka Popović, profesor

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,

Institut za humanu genetiku

Dr Sci, Ljiljana Luković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet,

Institut za humanu genetiku

Datum odbrane_____

Zahvalnica:

Posebno se zahvaljujem profesorki Jeleni Milašin koja me je svojim strpljenjem uvela u svet genetike tumora. Nepochenjivu pomoć u laboratorijskim ispitivanjima pružila mi je profesorka Branka Popović, a u statističkoj obradi i tumačenju rezultata dr Biljana Miličić. Profesoru Miroslavu Vukadinoviću zahvaljujem se na savetima i na kraju svom mentoru profesoru Vitomiru Konstantinoviću na dragocenoj pomoći u naučnoistraživačkom radu.

Ovom prilikom posebnu zahvalnost zaslužuju: ćerka Nina, supruga Mirjana, brat Rajko, stričevi Dragomir, Vuk i Radivoje, ujak Radomir i roditelji Snežana i Blagoje. Ovo je tim koji mi daje podršku i koji me čini radosnim i srećnim svako na svoj način.

SAŽETAK

ANALIZA ALTERACIJA ONKOGENA I TUMORSUPRESORNIH GENA U HISTOLOŠKI NEGATIVNIM MARGINAMA PLANOCELULARNIH KARCINOMA USNE DUPLJE

Karcinom pločasto slojevitog epitela usne duplje - oralni planocelularni karcinom (OPK) je invazivna patološka lezija epitela različitog stepena skvamozne diferencijacije koji se odlikuje ranim i ekstenzivnim metastazama. Ključni faktor za tok bolesti i ishod hirurškog lečenja kod pacijenata sa planocelularnim karcinomom glave i vrata je pravovremena dijagnoza i adekvatno hirurško lečenje. Postoje brojni dokazi da je prisustvo malignih ćelija u hirurškim marginama u direktnoj vezi sa povećanim rizikom za razvoj recidiva bolesti kao i manjom stopom preživljavanja. Za sada ne postoje jedinstveni kriterijumi koji definišu šta je „čista“ odnosno histološki negativna hirurška margina kod OPK. U literaturi ima mnogo kontradiktornih podataka vezanih za uticaj statusa margina na ishod hirurškog lečenja zbog ograničenog dometa histopatološke analize. Predmet ove studije je molekularno-genetička analiza histološki negativnih margina OPK, kao potencijalno relevantan parametar sa stanovišta procene ishoda hirurške intervencije. Istraživanje je obuhvatilo analizu gena *TP53*, *H-ras*, *c-myc* i *c-erb B2* koji imaju značajnu ulogu u malignoj transformaciji ćelija. Nakon histopatološke verifikacije da u graničnom tkivu nema prodora malignih ćelija, pristupilo se daljoj molekularno genetičkoj analizi graničnog tkiva. Studijom je obuhvaćeno 50 pacijenata. Skrining tačkastih mutacija u egzonima 5-7 *TP53* gena i *H-ras* gena, urađen je pomoću PCR-SSCP metode (lančana reakcija polimeraze i konformacioni polimorfizam jednolančane DNK) a uzorci koji su pokazali izmenjenu elektroforetsku pokretljivost su (komercijalno) sekvencirani. Dobijene sekvence upoređivane su sa bazom podataka NCBI GeneBank. Za analizu genske amplifikacije (*c-myc* i *c-erbB2*) korišćena je metoda diferencijalnog PCR-a, kao i metoda relativne kvantifikacije na real-time PCR aparatu, upotrebom kontrolnog («house-keeping»)

gena. Distribucija mutacija u histološki negativnim marginama OPK-a je sledeća: C-erbB2 (11/50)- 22%; C-myc (15/50) - 30%; TP53 (11/50) - 22%; H-ras 12% (5/42) Ispitana je povezanost mutacija sa anamnestičkim, kliničkim i histološkim parametrima, stopom recidiva i stopom petogodišnjeg preživljavanja (predstavljeno *Kaplan Majerovim* krivama). Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa mutiranim *c-erb B2* genom u histološki negativnoj margini je statistički značajno kraće u odnosu na pacijente kod kojih nije identifikovana mutacija. Na osnovu dobijenih rezultata, mutacije *c-erb B2* gena se mogu svrstati u grupu negativnih prediktora bolesti planocelularnog karcinoma usne duplje.

Takođe, kod pacijenta kod kojih je identifikovana mutacija u *c-erb B2* genu u histološki negativnoj margini je statistički češće zabeležen recidiv bolesti. Ta grupa pacijenata ima nižu stopu petogodišnjeg preživljavanja. Pomenutu grupu pacijenta bi trebalo češće kontrolisati u postoperativnom periodu. Histopatološka procena ostaje i dalje važna za stadijum, prognozu i plan terapije kod pacijenata sa OPK, ali smatramo da molekularno-genetičke analize takođe treba da zauzmu svoje mesto u dijagnostici sa ciljem što boljeg sagledavanja procesa kancerogeneze.

Ključne reči: **oralni karcinom, tumor-supresorni geni, c ERB-B2, recidiv, petogodišnje preživljavanje.**

Naučna oblast: **Stomatološke nauke**

Uža naučna oblast: **Genetika malignih oboljenja**

UDK broj: **616.31-006.6:575.224(043.3)**

ABSTRACT

ANALYSIS OF ALTERATIONS OF ONCOGENES AND TUMOR SUPPRESSOR GENES IN HISTOLOGICALLY FREE MARGINS IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF ORAL CAVITY

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is an invasive epithelial pathological lesion with different degree of squamous differentiation and tendency for early and extensive metastasis in regional lymphatic nodes. Successfulness of tumour surgical removal represents an important prognostic factor in patient with oral squamous cell carcinoma is. There is evidence that the presence of microscopic cancer decreases loco-regional disease control and survival rates. Until now there is no unique criteria which define what is a „clear“ surgical margin in OSCC. There are still controversies in scientific literature about surgical margins and their influence on the outcome of the surgical treatment. Though important, routine histopathological examination has limited accuracy. The main aim of this study was to test the hypothesis that molecular-genetic analysis of tumor free margins in patients with OSCC, may be a more reliable parameter for the estimation of surgical treatment outcome.. The study focused on the analysis of alterations in TP53, H- ras, c-myc and c erb B2 (Her2) genes, which are known to play an important role in malignant transformation. After histopathological verification that surgical margins are indeed tumor free, further molecular-genetic analysis was performed. The study included 50 patients. Screening of point mutation in exons 5-7 of TP53 and codons 12-13 in H-ras genes were performed using PCR-SSCP method. In order to confirm the results of PCR-SSCP, DNA samples were sequenced commercially. Differential PCR was used for the detection of c-myc and c-erbB-2 amplification, and relative quantification by real-time PCR served as a control. A relatively high incidence of genetic lesions was detected: 11 out of 50 patients (22%) harboured TP53 mutations, 11 out of 50 (22%) had c- Erb B2, 15 out of 50 (30%) had c-Myc amplification and 5 out of 42 patients (11.2%) harboured H-ras mutations. Kaplan-

Meier analysis and log rank test showed statistically significant differences in 5 year survival rates between patients with tumours positive for c-erbB2 amplifications and patients without this alteration (p=0,002). Patients who harboured c-erb B2 amplification also developed relapses more frequently than patients without erb amplification with statistical significance. Consequently, c erb B2 gene amplification could be one of the predictor of poor prognosis of OSCC.

Kew words: oral cancer, tumor suppressor genes, c-erb B2, relapse,
five year survival rate.

Scientific field: Dental medicine

Scientific field Specalized: Cancer genetics

UDC: 615.46:616.71-003.93(043.3)

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Uvod	1
1.2. Hirurška anatomija usne duplje	8
1.3. Hirurška podela limfnih čvorova vrata	13
1.4. Planocelularni karcinomi usne duplje (opk)	17
1.4.1. Epidemiologija i godišnji prirast oralnog karcinoma	18
1.4.2. Etiologija i faktori rizika za nastanak karcinoma usne duplje	20
1.4.2.1. Konzumiranje duvana	21
1.4.2.2. Konzumiranje duvana	21
1.4.2.3. Kofaktori	22
1.4.3. Klinička slika oralnog planocelularnog karcinoma	23
1.4.4. Lečenje	29
1.4.4.1. Hirurški pristup	29
1.4.4.2. Zračna i polihemioterapija	33
1.4.5. Preživljavanje	35
1.4.6. Prevencija i princip postoperativnih kliničkih kontrola	36
1.5. Histološke margine kod oralnih karcinoma	36
1.5.1. Pojam histološke margine	36
1.5.2 Polja kancerizacije	39
1.6. Genetika tumora	41
1.6.1 Onkogeni i tumor supresorni geni	41
1.6.1.1 Tp53, glavni čuvar genoma- kontrolor ćelijskog ciklusa	42

1.6.1.2. C erb b2 (her2), jedan od membranskih receptora u signalnoj transdukciji	47
1.6.1.3. Ras gen, membranski glasnik signalne transdukcije	48
1.6.1.4. C-myc-gen, realizator proliferativnog signala	50
1.7. Naučna osnova problema	52
2. Cilj	55
3. Materijal i metode	56
3.1. Uzorak ispitanika	56
3.2. Klinička ispitivanja	56
3.3. Molekularno-genetička istraživanja	57
3.3.1. Izolacija DNK iz svežeg tkiva tumorske margine	58
3.3.2. PCR - lančana reakcija polimeraze	58
3.3.3. PCR - SSCP metoda-konformacioni polimorfizam jednolančane dnk	60
3.3.4. Diferencijalni PCR i analiza nivoa amplifikacije	61
3.3.5. Real-Time PCR metoda	62
3.4. Statistički testovi	62
4. Rezultati	64
4.1 Ispitanici	64
4.2. Anamnestički parametri	65
4.3. Klinički parametri:	66
4.3.1. Lokalizacija i stadijum OPK	66
4.3.2. Status limfnih čvorova vrata	67

4.4. Faktori rizika	68
4.5. Genetički parametri	69
4.5.1. Mutacije u TP53 genu	69
4.5.2. Mutacije u H-RAS genu	70
4.5.3. Analiza nivoa amplifikacija c erbB2 gena	71
4.5.4. Analiza nivoa amplifikacije c- myc gena	73
4.6. Uporedna analiza rezultata	76
4.6.1. Analiza genetičkih i anamnestičkih parametara	76
4.6.2. Genetički i kliničko-patohistološki parametri	76
4.6.3. Korelacija kliničkih, anamnestičkih, histopatoloških i Genetičkih parametara u odnosu na ishod bolesti	78
4.6.4. Kaplan-meier-ove krive preživljavanja	79
4.4.5. Genetički parametri i učestalost recidiva	85
5. Diskusija	86
6. Zaključci	100
7. Literatura	101
Prilozi	126
Biografija autora	135

1. UVOD

1.1. Uvod

Kancer je vodeći uzrok smrti u ekonomski razvijenim zemljama, dok se u zemljama koje su u razvoju nalazi na drugom mestu (Boyle i Levin, 2008). U svetu se godišnje beleži oko 10 miliona novih slučajeva malignih bolesti i oko 8 miliona smrtnih ishoda. Procenjuje se da će jedna od tri osobe starosti do 75 godina starosti oboleti od raka (Jemal i sar., 2010). Zabrinjavajuća je procena Ferlay-a i saradnika da će broj dijagnostikovanih malignih bolesti do 2030 godine (8.23 milijarde stanovnika) biti u nesrazmernom porastu u odnosu na period od 1975 godine do 2008 godine (6.7 milijardi stanovnika) (Ferlay i sar., 2004). Povećanju ukupnog broja obolelih od malignih bolesti na globalnom nivou doprinosi duži životni vek ljudi odnosno ubrzano starenje svetske populacije.

Preko 20 miliona ljudi širom sveta živi sa dijagnostikovanim kancerom, a više od polovine njih živi u zemljama u razvoju. „Epidemija“ malignih oboljenja u visoko razvijenim zemljama opada, dok je u srednje i slabo razvijenim u porastu zbog povećane izloženosti stanovnika faktorima rizika. Procenjuje se da oko 70-80% svetske populacije pripada upravo zemljama u razvoju (Parkin i sar., 2005). Broj obolelih od malignih tumora je u konstantnom porastu i u našoj zemlji. Od 1990 do 2001 godine njihova učestalost se povećala za približno 150%, a smrtnost je u istom periodu porasla preko 30%. Novija statistika za centralnu Srbiju (2002 do 2011) takođe potvrđuje trend uvećanja stope mortaliteta od malignih bolesti (Marković-Denić i sar., 2014).

Procenjuje se da se oko 43% smrtnih slučajeva usled kancera javlja kao posledica konzumiranja duvana i alkohola, neadekvatne ishrane, neaktivnog načina života i infekcija (Shopland i sar., 1991). Pored karcinoma pluća, konzumiranje duvana je značajan faktor rizika za razvoj karcinoma usne duplje, ždrelo, grkljana, ezofagusa, želuca, pankreasa, jetre, bubrega, uretera, mokraćne bešike, grlića materice i koštane srži (mijeloidne leukemije). Udruženi efekat konzumiranja alkohola i duvana je najizraženiji kod oralnog karcinoma. Učestalost karcinoma i stope preživljavanja su

direktno povezane sa socioekonomskim faktorima. Literaturni podaci pokazuju da se primenom specifičnih preventivnih mera i podizanjem svesti o javnom zdravlju (izbegavanje kancerogena ili drugih faktora rizika) može značajno smanjiti incidenca različitih karcinoma (Shopland i sar., 1991; Mc Gregor i sar., 1986).

Tumori ili neoplazme (od grčke reči *neoplasia*-novi rast) se dele u dve glavne grupe: benigne i maligne.

Maligni tumori (tumor malignus) se karakterišu infiltrativnim (invazivnim) i destruktivnim rastom, pri čemu razaraju okolna normalna tkiva. Njeasno su ograničeni prema okolini, a rastu brže od benignih tumora. Po pravilu daju metastaze (metastasis). U slučaju da se ne leče, dovode do smrti organizma domaćiina.

Benigni tumori (tumor benignus) su jasno ograničeni, rastu sporo pri čemu potiskuju i komprimiraju okolno tkivo. Nikada ne metastaziraju. Najčešće su ograničeni kapsulom. Rast benignih tumora ne dovodi do smrti organizma domaćina. Benigne neoplazme se odlikuju dobrom ćelijskom diferencijacijom. Za razliku od njih, maligne neoplazme se karakterišu invazijom okolnih tkiva, a mogu biti dobro, srednje i slabo diferentovane. Histološka klasifikacija tumora vrši se prema stepenu histološke diferencijacije i procene rasta i deobe ćelija zasnovane na mitotičkom indeksu. Jedan od načina klasifikacije se zasniva na proceni stepena atipičnosti ćelija i jedra u odnosu na normalno stanje (Walker i sar., 2003).

U zavisnosti od porekla ćelija od kojih nastaju, maligne neoplazme mogu biti karcinomi - 96% (od epitelnih ćelija) ili sarkomi – 4% (od mezenhimalnih ćelija). Najveći procenat humanih maligniteta se razvija od epitelnog tkiva, pri čemu se karcinomi koji nastaju od pločastog epitela nazivaju planocelularni karcinomi, od bazalnog epitela- bazocelularni kacinomi, a od žlezdanog epitela adenokarcinomi (Walker i sar., 2003).

Maligni tumori usne duplje

Ova grupa tumora može da se razvija se na jeziku, gingivi, podu usta, obrazu, nepcu, tonzilama kao i orofarinksu (McCullough i sar., 2010; Rethman i sar., 2010).

Oralni karcinom može zahvatiti bilo koje tkivo u kome postoji oralni epitel (Neville i Day., 2002; Warnakulasuriya i Saman, 2009).

Oralni planocelularni karcinom (OPK) ili kako se još naziva oralni skvamocelularni karcinom, je invazivna patološka promena epitela sa različitim stepenom skvamozne diferencijacije i sklonošću ka ranim i ekstenzivnim metastazama u limfne čvorove. Pretežno se razvija kod osoba u petoj i šestoj deceniji života koji redovno i kontinuirano konzumiraju alkohol i duvan.

U maligne tumore usne duplje koji vode poreklo od epitela svrstavaju se planocelularni karcinom i limfoepitelijalni karcinom. Histološki tipovi planocelularnog karcinoma su: 1. verukozni karcinom; 2. bazaloidni planocelularni karcinom; 3. papilarni karcinom; 4. karcinom vretenastih ćelija (eng. *Spindle cell*); 5. akantolitični karcinom; 6. adenoskvamozni karcinom; 7. carcinoma cuniculatum. Oko 95 % svih malignih tumora usne duplje su planocelularni karcinomi.

Svetska zdravstvena organizacija (*World Health Organisation- WHO*) pokrenula je program koji ima za cilj prevenciju oralnog karcinoma u pojedinim zemljama, kao i podsticanje razmene informacija i iskustava između zemalja koje su usvojile različite programe za prevenciju OPK, promociju zdravlja, i razvijanje globalnog sistema praćenja OPK i faktora rizika. Globalni sistem za praćenje ovih maligniteta ima za cilj da se odrede faktori rizika i da se pomogne u planiranju efektivnih nacionalnih preventivnih programa.

Epidemiološki podaci o incidenci oralnog karcinoma i udruženog mortaliteta sakupljaju se u *Svetskoj Banci Podataka Oralnog Zdravlja (Global Oral Health Data Bank)*. Svetska zdravstvena skupština je 2007 godine usvojila rezoluciju vezanu za oralni karcinom koja bi trebalo da postane deo nacionalnih projekata za kontrolu i prevenciju karcinoma. Uprkos napretku koji je ostvaren poslednjih decenija u programima prevencije i terapiji OPK, nije ostvaren veliki napredak u pogledu stope petogodišnjeg preživljavanja koja i dalje iznosi oko 50% (Greenlee i sar., 2000). Ovako visoka stopa mortaliteta nije registovana ni kod najčešćih karcinoma kao što su kolorektalni, cervikalni ili karcinom dojke. U trenutku postavljanja dijagnoze ovi karcinomi često već imaju metastaze u regionalnim limfnim čvorovima, a ponekad i u udaljenim organima. Mere koje treba da spreče njihovu pojavu i poboljšaju ishod lečenja su prevencija i rana dijagnostika.

Dijagnoza i klinička slika

Dijagnoza bolesti kod pacijenata sa OPK se postavlja na osnovu anamneze, kliničkog pregleda, histopatološke verifikacije i primene odgovarajućih dopunskih dijagnostičkih metoda.

U cilju određivanja precizne lokalizacije i ekstenzivnosti primarnog tumora, prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, kao i isključivanje drugih primarnih tumora sprovodi se detaljan klinički pregled. Ukoliko postoje faktori rizika za razvoj planocelularnog karcinoma sluzokože gornjeg aerodigestivnog trakta vrši se panendoskopski pregled fiberoptičkim instrumentima i ogledalima. Prema protokolu lečenja u cilju utvrđivanja udaljenih metastaza, potrebno je uraditi nativni snimak grudnog koša. Primenom dopunskih radioloških metoda kao što su kompjuterizovana tomografija (CT) (sa primenom kontrastnog sredstva) ili magnetne rezonance (MR) (sa primenom kontrastnog sredstva) može se bolje definisati primarni tumor i eventualno prisustvo uvećanih limfnih čvorova na vratu. U slučajevima uznapredovalih stadijuma OPK preoperativno bi trebalo razmotriti primenu pozitron emisione tomografije – PET SCAN. S obzirom na kompleksnost bolesti potreban je multidisciplinarni pristup u preoperativnoj evaluaciji bolesnika (logoped, nutricionista, otorinolaringolog).

Kliničke manifestacije i subjektivne tegobe koje prate OPK zavise od lokalizacije i stadijuma bolesti. Razgovor sa pacijentom se započinje prikupljanjem podataka o sadašnjoj bolesti. Neophodno je precizno odrediti lokalizaciju promene i vreme koje je proteklo od kada je pacijent primetio prve simptome bolesti. To mogu biti ranice koje ne pokazuju tendenciju zarastanja, izraštaji u predelu usne duplje i vrata, bol, klaćenje zuba, krvavljenje kao i poremećaji funkcije kranijalnih nerava.

Bol se izdvaja kao najčešći simptom bolesti (u oko 40% slučajeva) (Bagan i sar, 2010). Iako bol predstavlja jedan od glavnih simptoma bolesti, nažalost, tada već postoji lezija koja je dostigla određene dimenzije koje su karakteristične za odmakli stadijum bolesti. Rani stadijumi OPK su asimptomatski ili mogu biti praćeni neznatnim i neodređenim tegobama u vidu peckanja i svraba. Upravo zbog ovih karakteristika, OPK u ranom stadijumu često ostaje neprimećen od strane pacijenata ali i lekara.

Kod uznapredovalog stadijuma bolesti, simptomi i znaci OPK mogu biti: bol (posebno u predelu jezika i uha- „zračenje ili sevanje“ bola u predelu uha), klaćenje

zuba, otežano disanje, gutanje i žvakanje, poremećaj govor, nestabilnost zubnih proteza, ograničeno otvaranje usta, poremećaj funkcije kranijalnih nerava (parestezija) i dr. Kod tumora poda usne duplje i prednjeg dela jezika bol se može javiti u početnom stadijumu. Pokretljivost jezika i prisutne oštre ivice zuba i proteza mogu provocirati i potencirati postojeći bol. OPK obraza i usne se nasuprot pomenutim lokalizacijama karakteriše bolom tek u uznapredovalom stadijumu bolesti.

Karcinom u početnom stadijumu klinički može se manifestovati u vidu crvenih ili belih polja sluzokože (eritroplakija ili/i leukoplakija). Razvijena forma oralnog karcinoma (OK) usne duplje se karakteriše ulceracijom sluzokože usne duplje. Veoma je važno da se OK može razviti i u podsluzokožnom sloju sa ili bez zahvatanja „pripadajuće“ sluzokože usne duplje što treba imati u vidu kada je u pitanju rana dijagnoza bolesti. Za razliku od tumora, podsluzokožne lezije koje su glatke i oble površine obično predstavljaju ciste malih pljuvačnih žlezdi.

Glavni simptomi karcinoma usne duplje nezavisno od njihove lokalizacije su: ranica sluzokože, perzistirajući otok, ograničena pokretljivost jezika, klaćenje većeg broja klinički zdravih zuba. Postoje i opšti simptomi i znakovi bolesti koji mogu ukazivati na postojanje OPK. Postojanje nekog opšteg znaka ili simptoma ne znači da kod tog pacijenta sigurno i postoji OPK, s obzirom da pomenuti pokazatelji mogu biti prisutni i u drugim patološkim stanjima. Opšti simptomi OPK su prisutni u razvijenom stadijumu bolesti i to su: gubitak telesne težine (kaheksija), malaksalost i zamor, povišena telesna temperatura, bol, promena boje kože (hiperpigmentacija, eritem, svrab, žutica, pojačana maljavost). Takođe, u terminalnom stadijumu OPK mogu biti prisutne kutane fistule, spontano krvavljenje i teži oblik anemije.

Terapijski pristup

U skladu sa protokolom onkološke hirurgije, prvo se sprovodi histopatološka verifikacija tumora. Biopsija predstavlja medicinsku tehniku koja uključuje uzimanje tkiva ili ćelija radi ispitivanja. Kada se uzima samo deo tkiva, takva procedura se naziva incizionna biopsija. Ekscizionna biopsija podrazumeva uklanjanje promene u celosti i ona se ređe koristi. Tkivo se ispituje pod mikroskopom. Nalaz patologa je neophodan da bi se planirao i izveo hirurški zahvat. U lečenju OPK primenjuje se hirurška, zračna i

polihemioterapija (retko). Poslednjih godina u lečenju OPK u određenim indikacijama primenjuje se ciljana (target) terapija kao i uključivanje pacijenata u neke od kliničkih studija (Tabela 1.1)

Cilj hirurške terapije je potpuno uklanjanje tumora makroskopski do u zdravo tkivo i sprečavanje mogućih puteva širenja. Princip hirurške terapije je da se prvo uklone regionalni limfni čvorovi a potom se uklanja i tumor.

Hirurško lečenje OPK zahteva radikalne operacije kojima se uklanja veliki deo tkiva usne duplje. Defekti koji nastaju posle takvih intervencija, zahvaljujući savremenim metodama rekonstrukcije, mogu se nadoknaditi. Pošto su funkcije disanja, ishrane i govora veoma složene i zavise od više organa, uprkos rekonstrukciji, ostaju manje ili više izraženi njihovi poremećaji (Konstantinović VS, 1999). Sve to utiče na snižavanje kvaliteta života, odsustvo sa posla, materijalne troškove i prevremen odlazak u penziju.

Kod pacijenata sa dijagnostikovanim OPK postoperativno sprovode se redovne kliničke kontrole u trajanju od najmanje pet godina.

Uprkos savremenim metodama terapije i dalje postoji visoka učestalost recidiva kod OPK i u visoko razvijenim zemljama. Postoje brojni dokazi koji potvrđuju da je prisustvo malignih ćelija u hirurškim marginama loš prognostički parametar. Decenijama se postavlja pitanje gde je granica radikalnosti u hirurškom lečenju OPK. U literaturi postoje i dalje kontroverzni stavovi kada je u pitanju „granična zona“, tj. koliko radikalno se tumor mora ukloniti, i gde se nalazi „zona sigurnosti“.

Jedan od načina da se odredi i definiše „zona sigurnosti“ mogla bi da bude detaljna *molekularno-genetička analiza* tkiva koje se nalazi na liniji resekcije, tzv. graničnog tkiva.

Sa brzim razvojem i istraživanjima iz oblasti molekularne genetike, savremeni onkološki pristup lečenju nastoji da poveže terapiju i prognozu ishoda bolesti sa proučavanjem molekularne biologije tumorske ćelije. Stoga su brojna istraživanja usmerena na pokušaj integracije bioloških-molekularno genetičkih nalaza i kliničkog određivanja stadijuma bolesti, čime bi postojeće standardne klasifikacije tumora bile dopunjene ili izmenjene preciznijim određivanjem stadijuma bolesti. U toku je kontinuirana potraga za validnim molekularnim biomarkerima, čime bi do sada korišćen

terapijski pristup mogao biti unapređen (Arantes i sar., 2014; Uchida i sar., 2014; Yakob i sar., 2014).

Tabela 1.1 Opšti principi lečenja oralnog karcinoma

STADIJUM KARCINOMA	VRSTA TRETMANA	SVRHA LEČENJA
Rani stadijum	Hirurško uklanjanje primarnog tumora /ili disekcija vrata Zračna terapija	Uklanjanje malignog tkiva (do histološk zdravog) , prezervacija tkiva i funkcije. Uništavanje DNK u malignim ćelijama koje imaju sposobnost deljenja u određenom regionu, ostavljanje okolnog tkiva intaktnog i prezervacija funkcije
Uznapredovali stadijum	Hirurško uklanjanje primarnog tumora i disekcija vrata i / ili zračna terapija Hirurško uklanjanje primarnog tumora i disekcija vrata, zračna terapija i/ili polihemioterapija Hirurško uklanjanje primarnog tumora i disekcija vrata, zračna terapija i/ili target terapija	I jedan i drugi vid terapije ima za cilj da uništi i ukloni maligne ćelije Ekscizija tumora uz imedijatnu inhibiciju deljenja malignih ćelija u cilju sprečavanja rasta tumora i metastaziranja Ekscizija primarnog tumora i povećanje citotoksičnog efekta koje vodi destrukciji tumora blokiranjem EGFR (receptora faktora rasta- epidermal growth factor receptor) i sprečavanje neoangiogeneze

(Preuzeto iz Prelec i sar., 2014)

Ukoliko se u histološki negativnim marginama nađu učestale mutacije u nekom od kancerskih gena može se očekivati veća učestalost recidiv i manja stopa petogodišnjeg preživljavanja.

Mutacioni status kancerskih gena u histološki negativnim marginama OPK mogao bi uticati na promenu režima postoperativnih kliničkih kontrola. Takođe, status gena u histološki negativnim marginama mogao bi uticati na primenu zračne i specifične polihemoterapije terapije i ciljane (target) terapije.

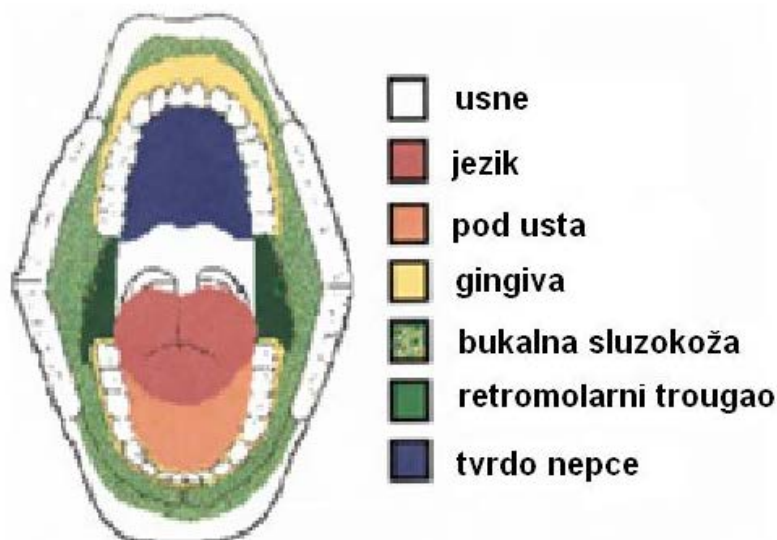
U ovom trenutku jedine studije koje se bave molekularno-genetičkom analizom histološki negativnih margina oralnog planocelularnog karcinoma su one koje ispituju mutacije u TP53 genu. Bez obzira na to što TP53 gen zaista zauzima ključnu poziciju u regulisanju ćelijskog ciklusa i što mutacije u pomenutom genu vode malignoj transformaciji ćelije, postoje i drugi geni (onkogeni H-ras, c-myc i c-erb B2) čija je uloga takođe važna za ovaj proces i koji zaslužuju da budu istraženi u histološki negativnim marginama oralnog planocelularnog karcinoma.

1.2. Hirurška anatomija usne duplje

Usna duplja čini početni deo digestivnog trakta ima ulogu u žvakanju i pripremanju hrane za varenje, gutanju, govoru i disanju. U njoj je smešteno i čulo ukusa.

Usna duplja je napred preko usnog otvora (*rima oris*) otvorena prema spoljašnjoj sredini, a pozadi se nastavlja preko ždrelnog suženja (*isthmus faucium*) prema orofarinksu. Deli se na predvorje usne duplje (*vestibulum oris*) i usnu duplju u užem smislu (*cavitas oris proprium*). Granicu između njih čine zubni nastavci gornje i donje vilice sa gornjim i donjim zubnim lukovima. Zidove usne duplje grade: napred usne, bočno obrazi, gore tvrdo i meko nepce, dole pod usne duplje sa jezikom i podjezičnim predelom. Napred je ograničena mukokutanom linijom rumenog dela gornje i donje usne. Pozadi se prostire do opšančenih papila jezika kao prednjeg nepčanog luka, tj. nepčano- jezičnog luka (Mc Gregor i sar., 1986; Shah i sar., 2001). Tonzile, meko nepce i zadnja trećina jezika pripadaju orofarinxu.

Usna duplja je podeljena u sledeće predele: usna, prednje dve trećine jezika, sluzokoža obraza, gingiva, retromolarni predeo i tvrdo nepce (Slika br 1.1.).



Slika 1.1 Podela usne duplje na regione (Preuzeto iz Shah i sar., 2011)

Sluzokoža obraza čini bočni zid usne duplje.

Gingiva zubnih nastavaka se sastoji od debele keratinizovane sluzokože koja je snažno pripojena za periost.

Vaskularizacija usana potiče od arterije i vene (*a. i v. labialis*), koje su grane arterije lica (*a. facialis*), odnosno pritoke vene lica (*v. facialis*). Od lokalizacije i veličine tumora zavisi metastaziranje. Limfni sudovi se iz donje usne dreniraju obostrano u limfne čvorove submentalnog (I – A nivo) i submandibularnog predela (I – B nivo). Limfni čvorovi ispred i iza arterije lica, u gornjem delu submandibularne regije predstavljaju potencijalna mesta za metastaze karcinoma usana. Limfni sudovi iz predela gornje usne dreniraju se u istostrane limfne čvorove, submandibularnog, parotidnog i preaurikularnog predela.

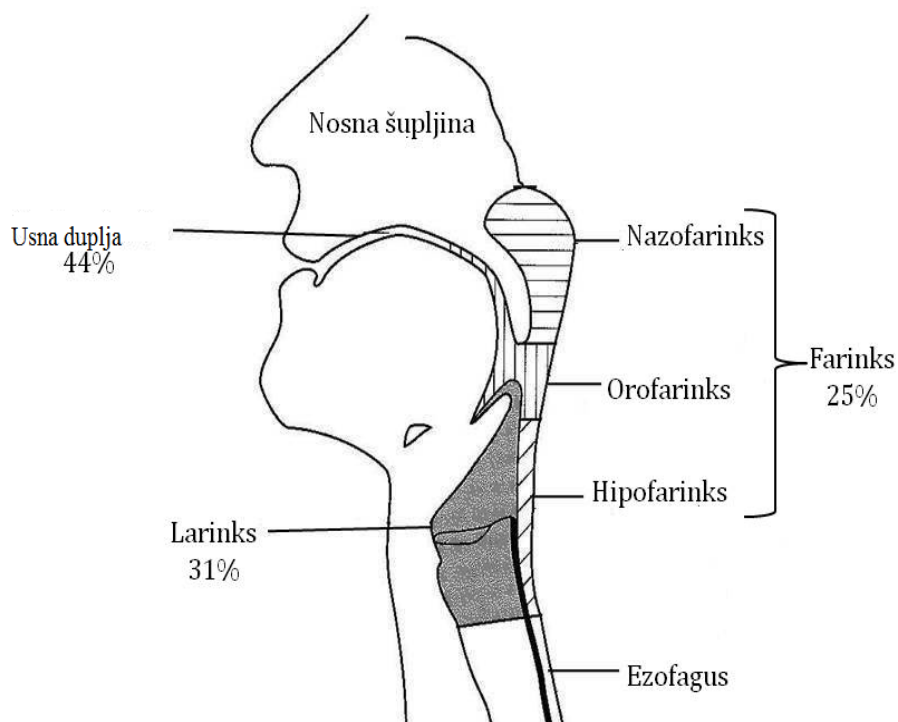
Gornja (*dorzalna*) površina jezika je prekrivena pločasto slojevitim epitelom u kome se nalaze papile. Tu su lokalizovani brojni receptori za ukus, limfni sudovi, kao i male - Von Ebnerove pljuvačne žlezde. Donja (*ventralna*) strana jezika je prekrivena tankim nekeratinizirajućim pločasto slojevitim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

Limfna drenaža jezika počinje u bogatom podsluzokožnom limfnom pleksusu jezika. Glavni limfni putevi jezika mogu biti podeljeni u dve grupe - u marginalnu i centralnu. Marginalni limfni sudovi dreniraju limfu iz latelarne trećine dorzuma jezika u istostrane submandibularne limfne čvorove. Idući prema vrhu jezika, limfni putevi marginalnih sudova idu ka submentalim limfnim čvorovima. Centralna grupa limfnih sudova vodi limfu u submandibularne limfne čvorove. Neki od marginalnih i centralnih limfnih sudova jezika mogu drenirati limfu direktno do grupe jugulo-digastričnih (Shah et al., 2001) kao i do jugulo-omohoidnih limfnih čvorova. Sudovi iz predela opšaničenih papila (*papillae circumvallatae*) kao i zadnje trećine jezika dreniraju limfu u jugulo-digastrične (Kitnerov limfni čvor) i jugulo-omohoidne limfne čvorove (intermedijatne limfne čvorove). Limfni sudovi iz gingive se obično dreniraju u submandibularne limfne čvorove, ali u predelu donjih sekutića drenažni put vodi do submentalnih limfnih čvorova (Lotrić i Jovanović, 1983).

Limfa se može drenirati obostrano kada tumor svojim razvojem pređe središnju liniju, vrh, ili u posebnim slučajevima bazu jezika.

Limfa iz bočnih delova jezika drenira se većinom u istostrane limfne čvorove i to u submandibularne ili jugulodigastrične. Lezije koje se razvijaju u predelu baze jezika prvo metastaziraju u grupu jugulodigastričnih i dubokih limfnih čvorova jugularnog lanca. Tumori koji su lokalizovani na vrhu jezika prvo daju metastaze u submentalne limfne čvorove. Sve promene koje su lokalizovane u medijalnoj liniji mogu metastazirati obostrano. Lezije koje se razvijaju u prednjem delu jezika metastaziraju direktno u donju trećinu lanca jugularnih limfnih čvorova.

Od svih karcinoma glave i vrata, 44% čine karcinomi usne duplje, u koje spadaju karcinomi jezika (prve 2/3 jezika), poda usne duplje, tvrdog nepca, usana i bukalne sluzokože (Slika 1.2) (Pfister et al., 2011).



Slika 1.2 Tumori glave i vrata (preuzeto: Pfister i sar., 2011, modifikovano)

Tumori koji su lokalizovani u prednjim delovima usne duplje pokazuju manju ćelijsku atipiju, za razliku od tumora koji su lokalizovani u zadnjim delovima usne duplje. Lokalizacija tumora znatno utiče na hirurški tretman i rekonstrukciju postoperativnog defekta.

Retromolarni predeo je deo keratinizovane sluzokože koja pokriva deo zubnog nastavka iza trećeg molara donje vilice. Tumori koji se razvijaju u ovom predelu se šire lako i brzo u kost donje vilice, mandibularni kanal, pterigomandibularni i submaseterični prostor, nepčane krajnike, pod usta i bazu jezika. Ukoliko postoji infiltracija pokosnice ili kosti, u okviru hirurške terapije sprovodi se i hirurška resekcija donje vilice.

Tvrdo nepce je ograničeno alveolarnim nastavkom gornje vilice i u obliku je „potkovice“. Keratinizovana sluzokoža pokriva palatinalnu kost. I pored toga što je očuvanje nezahvaćenih vitalnih struktura imperativ hirurškog lečenja često nakon resekcije tumora na tvrdom i mekom nepcu dolazi do stvaranja oronazalne fistule. Limfni sudovi tvrdog nepca se dreniraju u duboki jugularni lanac limfnih čvorova, kao i u retrofaringealne limfne čvorove. Tumori lokalizovani u prednjim delovima tvrdog

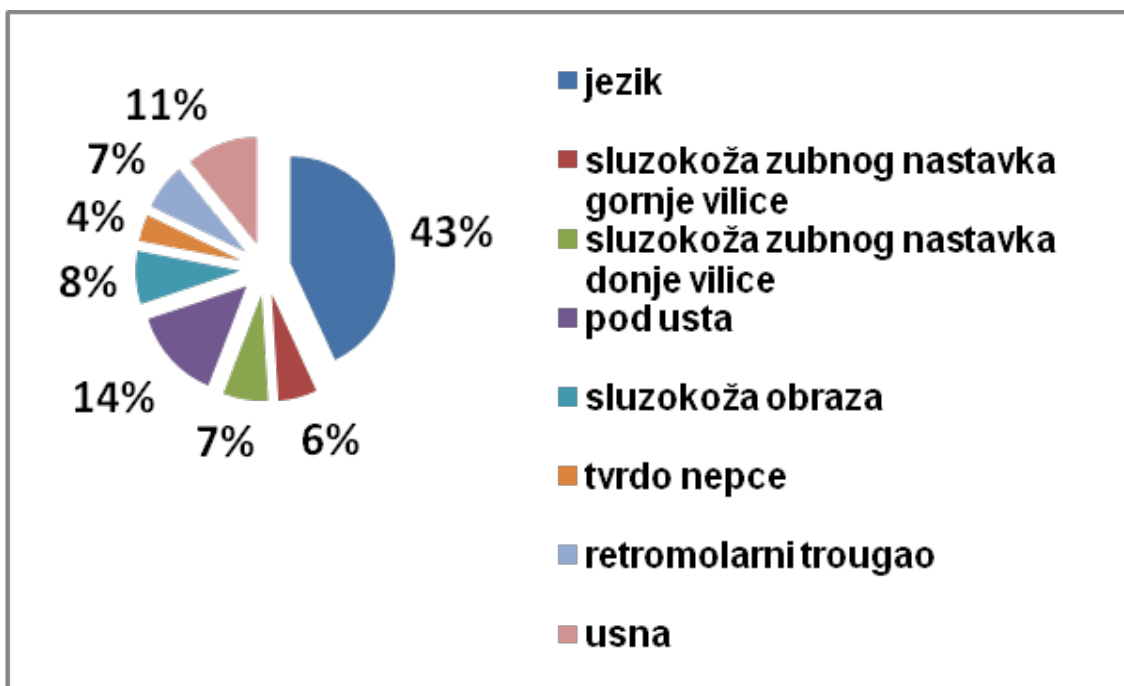
nepca mogu metastazirati u limfne čvorove ispred arterije lica (a. facialis) submandibularnog predela. Većina limfnih sudova nepca se drenira u grupu jugulodigastričnih limfnih čvorova, dok se neki dreniraju u retrofaringealne limfne čvorove.

Pod usta je polumesečastog oblika, i nalazi se iznad milohoidnog i hioglosnog mišića. Prostire se od unutrašnje površine zubnog nastavka donje vilice do ventralne strane jezika. Podeljen je jezičnom resicom na dva dela. U njemu se nalaze otvori izvodnih kanala submandibularnih i sublingvalnih pljuvačnih žlezda. Pokriven je glatkom, pokretljivom sluzokožom, koja napred i bočno prelazi u sluzokožu desni, a pozadi se prebacuje na donju stranu tela jezika.

Na slici 1.3 predstavljena je zastupljenost OPK prema regionima (Shah i sar., 2001).

Oko 75 % OPK razvija se u predelu koji obuhvata sluzokožu poda usta i okolnu sluzokožu ventralne strane jezika, sublingvalnog žleba kao i retromolarnog predela iako ovaj region čini samo oko 20 % od ukupne površine oralne sluzokože (Shah i sar., 2001).

Ova zona sluzokože, se često zove „drenažna zona“ i smatra se da se bilo koja kancerogena materija koja se nađe u usnoj šupljini skuplja u ovom predelu pre nego što se proguta (Shah i sar., 2001). Tumori mogu metastazirati obostrano ukoliko su lokalizovani u srednjoj liniji. Tumori koji su lokalizovani u prednjim delovima poda usta prvo metastaziraju u submandibularne i submentalne limfne čvorove, dok tumori koji su lokalizovani u zadnjem delu poda usta prvo metastaziraju u grupu jugulodigastričnih limfnih čvorova.



Slika br.1.3 Zastupljenost OPK prema regionima (Preuzeto iz Shah i sar., 2011)

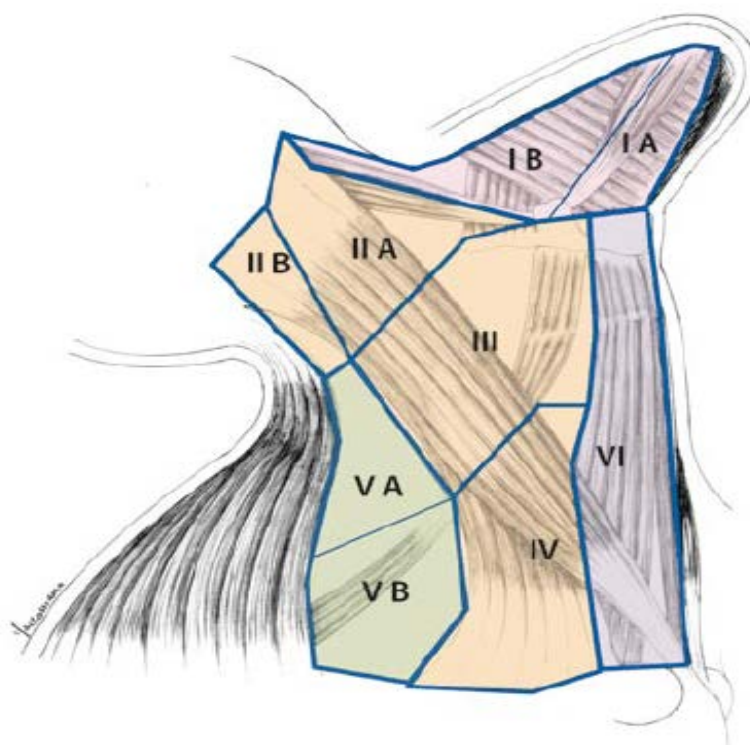
1.3. Hirurška podela limfnih čvorova vrata

Poznavanje osnovnih principa limfne drenaže je od izuzetne važnosti u lečenju oralnih karcinoma. Vrat je na osnovu anatomskih struktura podeljen u šest „hirurških nivoa“ (slika br 1.4) (slika br.1. 5).

Svaki anatomski region usne duplje ima određeni put drenaže limfe u preko 300 limfnih čvorova vrata (slika br.1.5) (Rouviere, 1938).

Nivo I obuhvata limfne čvorove submentalnog i submandibularnog predela. Nivo I-A (grupa submentalnih limfnih čvorova) je ograničen prema dole hioidnom kosti, donjom ivicom donje vilice prema gore i pozadi, a bočno prednjim trbuhom digastričnog mišića. Nivo I-B (grupa submandibularnih limfnih čvorova) je ograničen prema dole zadnjim trbuhom digastričnog mišića, telom donje vilice prema gore, prednjim trbuhom digastričnog mišića prema napred i stilohioidnim mišićem prema pozadi (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002)

Nivo II obuhvata grupu limfnih čvorova koji se nalaze duž gornje trećine unutrašnje jugularne vene (*v. jugularis internae*) i akcesornog živca. Nivo II-A je ograničen prema dole zamišljenom horizontalnom linijom koja je u nivou tela hioidne kosti, prema gore bazom lobanje, prema napred stilohioidnim mišićem i prema pozadi zamišljenom vertikalnom linijom koja odgovara akcesornom živcu.



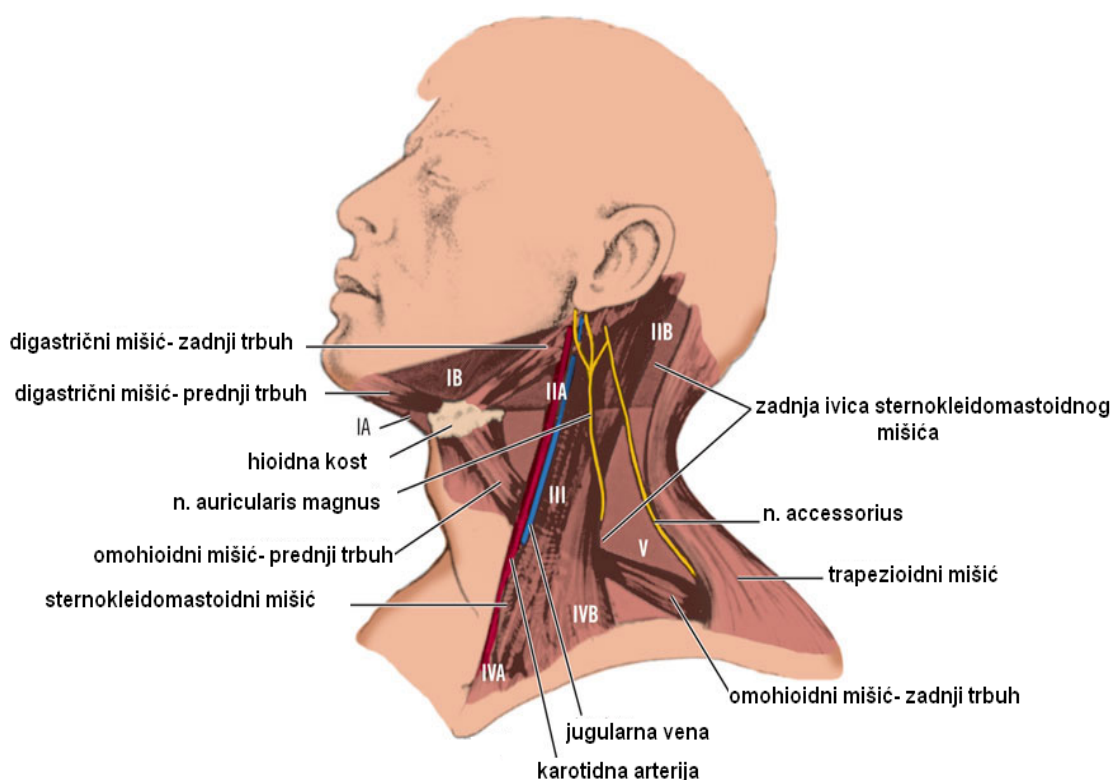
Slika br. 1.4 – Hirurška podela limfnih čvorova prema nivoima (Preuzeto iz Luconi, 2007)

Donju granicu nivoa II-B čini zamišljena horizontalna linija koja prolazi kroz donju ivicu tela hioidne kosti, a gornju granicu čini baza lobanje. Napred je nivo II-B definisan akcesornim živcem, a pozadi zadnjom ivicom sternokleidomastoidnog mišića (SCM) (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002).

Nivo III obuhvata grupu limfnih čvorova koji se nalaze duž srednje trećine unutrašnje jugularne vene. Ograničen je prema dole zamišljenom horizontalnom linijom koja prolazi kroz donju ivicu krikoidne hrskavice, prema gore zamišljenom horizontalnom linijom koja prolazi kroz donju ivicu hioidne kosti, prema napred zadnjom ivicom sternohioidnog mišića, a prema nazad zadnjom ivicom

sternokleidomastoidnog mišića ili senzitivnim granama vratnog pleksusa (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002).

Nivo IV obuhvata grupu limfnih čvorova duž donje trećine unutrašnje jugularne vene. Donja granica ovog nivoa predstavljena je ključnom kosti, gornja je predstavljena zamišljenom horizontalnom linijom koja prolazi kroz donju ivicu krikoidne hrskavice, napred je ograničen zadnjom ivicom sternohioidnog mišića, a pozadi zadnjom ivicom sternokleidomastoidnog mišića, ili senzitivnim granama vratnog pleksusa (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002).



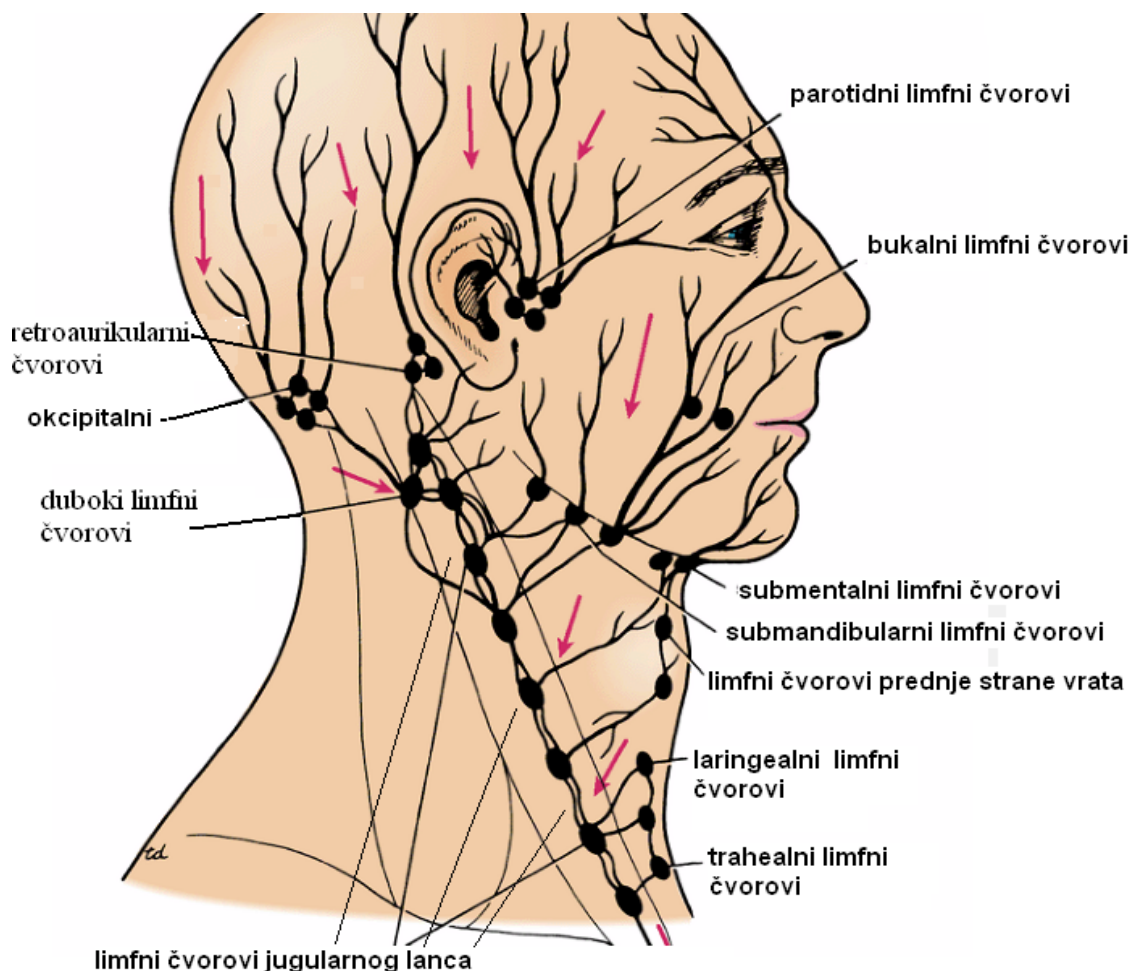
Slika br. 1.5 Topografska anatomija vrata (Preuzeto i prilagođeno iz Shah i sar., 2001)

Nivo V obuhvata sve limfne čvorove zadnjeg trougla, tzv. „zaboravljenog trougla“ vrata, limfne čvorove duž akcesornog živca kao i limfne čvorove duž poprečne arterije vrata, kao i limfne čvorove duž sve tri trećine unutrašnje jugularne vene u projekciji zadnje ivice sternokleidomastoidnog mišića (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002). Nivo V-A je ograničen dole zamišljenom horizontalnom linijom koja

prolazi kroz donju ivicu krikoidne hrskavice, gore apeksom na kojem se susstiču sternokleidomastoidni (SCM) i trapezoidni mišić, napred zadnjim trbuhom SCM-a, ili senzitivnim granama vratnog prleksusa, a nazad prednjim trbuhom trapezoidnog mišića.

Nivo V-B je dole ograničen ključnom kosti, gore zamišljenom horizontalnom linijom koja prolazi kroz donju ivicu hioidne kosti, napred zadnjim trbuhom SCM-a, a pozadi prednjim trbuhom trapezoidnog mišića.

Nivo VI obugvata pretrahealne, paratrahealne kao i prelaringealne, takozvane „Delphian-ove“ limfne čvorove. Gornju granicu ovog nivoa čini hioidna kost, donju suprasternalna incizura, a pozadi zajednička karotidna arterija. Ovaj nivo se još naziva „prednji kompartment“ (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002).



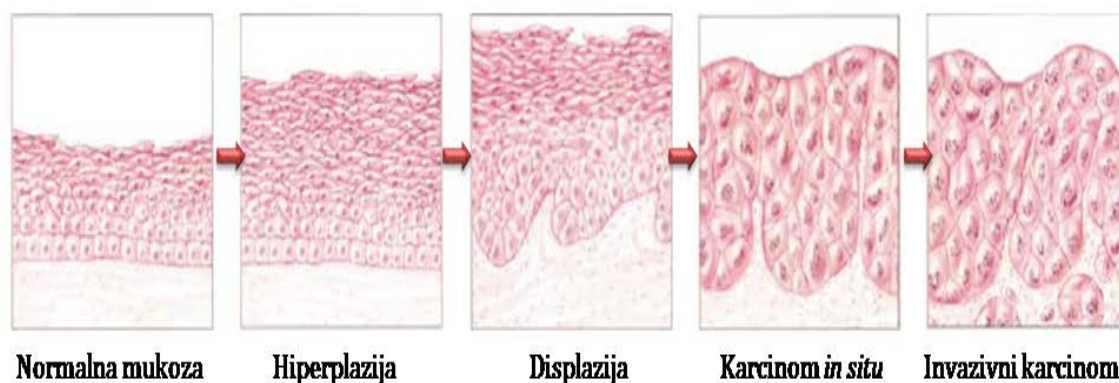
Slika br 1.6 Limfni čvorovi glave i vrata (Preuzeto i prilagođeno iz Shah i sar, 2001)

1.4. Planocelularni karcinomi usne duplje (OPK)

Planocelularni karcinom čini oko 95% oralnih karcinoma (Mashberg, 2000, Johnson, 2001; Sargeran i sar., 2008). Ostalih 5 % uključuje histološke podtipove: verukozni, adenoskvamozni, adenoidnoskvamozni, mukoepidermoidni i bazaloidni planocelularni karcinom. Mukoepidermoidni karcinomi predstavljaju malignitete pljuvačnih žlezdi, dok se za adenoskvamozne karcinome smatra da nastaju iz oralne mukoze koja u sebi nose tumorske izmene žlezdanih komponenti. Bazaloidni planocelularni karcinom je nedavno opisan kao novi entitet, i predstavlja retku histološku varijantu OPK, a najčešće se razvija u jeziku, supraglotičnom delu larinksa i hipofarinksa. Ne treba smetnuti s uma da u usnu duplju mogu da metastaziraju karcinomi koji svoje primarno poreklo vode iz regionalnih ali i udaljenih delova organizma.

Izloženost kancerogenima prouzrokuje genetičke promene u ćelijama sluzokože usne duplje. Kada ove genetske izmene dovedu do aktivacije proto-onkogeni i inaktivacije tumor-supresornih gena, stvaraju se uslovi za nekontrolisani rast ćelije. Narušavanje proliferacije ćelije, kao posledica oštećene kontrole ćelijskog ciklusa, vodi stvaranju populacije premalignih, genetički izmenjenih ćelija sluzokože usne duplje. Populacije tako genetski izmenjenih ćelija imaju tendenciju da akumuliraju dodatne genetičke abnormalnosti između ostalog i zbog svoje genomske nestabilnosti. Genetska nestabilnost premalignih ćelija se ogleda u ubrzanom ćelijskom ciklusu, tako da ćelija nema dovoljno vremena i kapaciteta da popravi „greške“ u DNK molekulu. U ovoj populaciji ćelija, stopa akumulacije genetskih abnormalnosti raste u funkciji vremena (Ha i Califano., 2003).

Konačno u vremenu, ove izmenjene ćelije stiču pravi maligni fenotip koji podrazumeva njihovu patološku diferencijaciju. Može se reći da se OPK razvija kao posledica mnogobrojnih mutacija na molekularnom nivou, koje prati patohistološka evolucija: hiperplazija, displazija, *carcinoma in situ* i invazivni karcinom (Slika br. 1.7). Probijanjem bazalne membrane, maligne ćelije postaju destruktivne i metastaziraju lokalno ili u udaljene organe i tkiva. Ove ćelije izbegavaju imuni odgovor organizma, produkuju faktore koji stimulišu neoangiogenezu što sve vodi progresiji tumora.



Slika br. 1.7 Patohistološka evolucija OPK

1.4.1. Epidemiologija i godišnji prirast oralnog karcinoma

U literaturi postoji nedostatak epidemioloških podataka koji se odnose na učestalost oralnog karcinoma u svetu. Većina studija prikazuje incidencu oralnog karcinoma zajedno sa karcinomom farinksa i larinksa zbog pogodnosti prilikom statističke obrade (Daftary i sar., 1992). Globalna učestalost karcinoma usne duplje, farinksa i larinksa je oko 500 000 obolelih godišnje, sa smrtnošću od oko 270 000 (Parkin i sar., 2005). U zemljama Evropske unije incidenca oralnog i faringealnog karcinoma je najveća u sledećim zemljama: Mađarska, Slovenija, Slovačka (Warnakulasuriya, 2009). Incidenca pomenutih tumora je relativno niska u Nordijskim zemljama, Velikoj Britaniji, Irskoj, Španiji (Boyle i Levin, 2008). Prema podacima pomenute studije, Srbija je jedna od zemalja u „sivoj zoni“, kada je u pitanju incidenca oralnog karcinoma.

U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) godišnje se dijagnostikuje 21 500 novih slučajeva oralnih karcinoma, dok zbog te bolesti umre 6000 ljudi (Landis i sar., 1999). Prema najnovijim podacima, očekuje se da će u SAD-u 2014 biti dijagnostikковано oko 28 000 novih slučajeva oralnog karcinoma, a da će u istoj godini zbog OK umreti oko 5 500 ljudi (Siegel i sar, 2014). U odnosu na ostale karcinome incidenca oralnog karcinoma u SAD-u je niska i iznosi 2-3% (Jemal i sar., 2008). Nešto manja incidenca (1,6%) zabeležena je u Velikoj Britaniji u 2003 (*Cancer Research Campaign* , 2005). Procenjuje se da širom sveta, svake godine oko 300 000 oboli od oralnog karcinoma (Jemal i sar 2010), od kojih oko 126 000 umre od posledica

pomenute bolesti. Na Azijskom kontinentu (Indija, Šri Lanka, Pakistan i Taiwan) oralni karcinom je najčešći malignitet, obuhvatajući najmanje jednu četvrtinu svih maligniteta (Warnakulasuriya, 2009). Procenjuje se da je godišnji prirast novih slučajeva karcinoma u regionima Burme, Kambodže, Malezije, Nepala, Singapura, Tajlanda i Vietnama izuzetno visok i iznosi oko 100 000 (Daftary i sar., 1991). Područja sa najvećom zastupljenošću ovog karcinoma su oblasti Pacifika (Melanesia, Papua i Nova Gvineja sa pripadajućim ostrvima), Zapadna Evropa (Francuska) i Južna i Jugoistočna Azija (prethodno navedene zemlje), Južna Amerika i Karibi (Porto Riko, Brazil i Urugvaj). Nedavne studije potvrđuju da oralni karcinom čini veliki procenat karcinoma u pojedinim delovima Indije (Sunny i sar., 2004) .

Paradoks predstavlja gore pomenuta zabrinjavajuća statistika. I pored toga što su i usna duplja i orofarinks pristupačni za klinički pregled i samopregled, kako stomatologu tako i lekaru, rana dijagnostika suspektnih lezija je nedopustivo spora i neodgovarajuća za razliku od sve bolje rane dijagnostike karcinoma dojke, debelog creva, prostate i melanoma (Fuller i sar., 2014).



Slika br.1.8. Zemlje sa visokom incidencom i mortalitetom od oralnog karcinoma
(preuzeto: Warnakulasuriya, 2009, preuređeno)

Uprkos naprednoj tehnologiji i uvođenju novih dijagnostičkih uređaja i terapijskih modaliteta, stopa mortaliteta od oralnog karcinoma se u poslednjih 35 godina nije značajno promenila čak ni u razvijenim zemljama i ostala je visoka (preko 50%) (Jemal i sar., 2008). U cilju rane detekcije oralnog karcinoma, kao i povećanju stope

preživljavanja pacijenata sa OPK, postoji potreba za pronalaženjem skrining testa odgovarajuće senzitivnosti i specifičnosti, što bi doprinelo identifikaciji oralnih maligniteta u početnom stadijumu.

Prema najnovijim podacima karcinomi oralne regije i oro farinxa su kod muškaraca u zemljama Evropske Unije na sedmom mestu (Boyle i Ferlay, 2005).

Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u centralnoj Srbiji u 2011 godini karcinom usne duplje i farinxa kod muškaraca se nalazi na 12 mestu (prema podacima registra za rak u centralnoj Srbiji, 2013).

Najčešće se ovaj karcinom javlja kod pacijenata između 40 i 60 godina starosti. Odnos 3:1 između muškaraca i žena pokazuje tendenciju opadanja, tj. izjednačavanja učestalosti u odnosu na polove.

Studija koju su sprovedeli Vukadinović i saradnici na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu, pokazala je da je u periodu 1995-2005 bilo hospitalizovano 223 pacijenta zbog karcinoma usana. Odnos muškaraca i žena je iznosio 5:1 (Vukadinović i sar., 2005). Studija sprovedena na istoj Klinici 2008 godine, pokazala je sličnu distribuciju u odnosu na pol (Petrović i Jelovac, 2008).

1.4.2. Etiologija i faktori rizika za nastanak karcinoma usne duplje

Oralni karcinom je multifaktorsko oboljenje. Poznato je da izlaganje jednom od tri široke grupe kancerogena (hemijski, fizički ili virusni) može indukovati karcinom. Kada je u pitanju usna duplja, čini se da je karcinom uzrokovan uglavnom hemijskim kancerogenima, mada dokazi govore i o značaju virusnih i fizičkih agenasa u razvoju nekih vrsta oralnih karcinoma (Syrjanen, 2005; Reddout i sar., 2007). Patogeneza oralnog karcinoma je veoma kompleksna i izlaganje kancerogenima ne dovodi obavezno i do razvoja karcinoma. Postoje brojni porodični, higijensko dijetalni, hormonski kao i drugi faktori rizika koji su modulatori neoplastičkih procesa uopšte. Alkohol i duvan su izdvojeni kao najvažniji faktori rizika za razvoj oralnog karcinoma. Procenjuje se da je za preko tri četvrtine oralnih karcinoma odgovorno konzumiranje duvana i alkohola (Garavello i sar., 2010). U druge faktore spadaju ultravioletno zračenje, nutritivni faktori, potencijalno maligne lezije, imunosupresija, genetski i

dentalni faktori (hronična iritacija oštre ivice zuba ili neadekvatne proteze i dr.) (Konstantinović, Jelovac, 2014).

1.4.2.1. Konzumiranje duvana

Duvan sadrži preko trideset poznatih kancerogena. Duvanski dim je veoma jak kancerogen, jer benzopiren i brojni nitrozoamini u njegovom sastavu, mogu uzrokovati genetičke mutacije. Jedna od potvrda da je duvan bitan kancerogen, leži i u podatku da oko 50% svih karcinoma kod stanovnika Indije čine OPK i da se javljaju kod osoba koje intenzivno žvaću duvan (Kannan i sar., 1999).

Veza između korišćenja duvana i oralnog karcinoma je mogla biti uspostavljena još početkom 18. veka, kada je karcinom usne bio zastupljen kod uživaoca duvana (Sawyer i Wood, 1992). Epidemiološke studije pokazuju da je rizik za razvoj oralnog karcinoma pet do devet puta veći kod pušača u odnosu na nepušače, i da se ovaj rizik može povećati do 17 puta kod „teških“ pušača (koji puše 80 i više cigareta dnevno) (Neville i Day, 2002). Većina pacijenata sa OPK su pušači, što predstavlja dvostruku do trostruku veću izloženost duvanu u odnosu na opštu populaciju (Fuller i sar., 2014; Moura i sar., 2014, Fang i sar., 2014; Perie i sar., 2014; Jovanovic i sar., 1993). Takođe, hirurški lečeni pacijenti zbog OPK, koji nastavljaju da konzumiraju duvan imaju dva do šest puta veći rizik za razvoj “sekundarnog primarnog” tumora gornjeg aerodigestivnog trakta u poređenju sa osobama koje su prestale da konzumiraju duvan (Silverman i Griffith, 1972; Silverman i Shillitoes, 1998; Do i sar., 2004).

Ušmrkavanje i žvakanje duvana je takođe u vezi sa povećanim rizikom za razvoj oralnog karcinoma (Schildt i sar., 1998). Pacijenti koji su konzumirali “bezdimni” duvan, imali su značajnu sklonost za razvoj oralnog karcinoma na mestu kontakta sa duvanom. Međutim, ipak je korišćenje bezdimnog duvana povezano sa manjim rizikom za razvoj oralnog karcinoma, u poređenju sa pacijentima koji „uvlače dim“. Npr, iako Zapadna Virdžinija ima najveću stopu žvakanja duvana u SAD-a, incidenca oralnog karcinoma u pomenutom predelu je ispod američkog nacionalnog proseka (Bouquot i Meckestroth, 1998). Studije iz Skandinavije pokazuju da korišćenje “Švedske cigarete” (koja nema fermentata i ima niži nivo nitrozamina) nije u vezi sa povećanim rizikom za razvoj oralnog karcinoma. (Johnson, 2001; Neville, 2002).

U prilogu povezanosti između konzumiranja duvana i OPK govori učestalost oralnih displazija (premalighnih oralnih lezija) kod pušača (Sreedhar i sar., 2014).

Rizik za razvoj OPK kod osoba koje konzumiraju i alkohol i duvan je trideset osam puta veći u poređenju sa osobama koje ih ne konzumiraju (Blot i sar., 1998).

Žvakanje duvana i „betel quid“ takođe povećavaju rizik za razvoj OPK (Liao i sar., 2014). Hronična izloženost karcinogenima stvara „efekat polja“ i cela izmenjena sluzokoža gornjeg dela aerodigestivnog trakta nosi veći rizik za razvoj karcinoma kod pušača i alkoholičara (Thomson i Hamadah., 2007).

1.4.2.2. Konzumiranje alkohola

Utvrđena je pozitivna korelacija između doze dnevnog unosa alkohola (kontinuiranog unosa), tj. „žestokih“ alkoholnih pića i povećanog rizika za razvoj karcinoma. Sinergistički efekat između duvana i alkohola je pokazan kod oralnih karcinoma u mnogobrojnim studijama (Znaor i sar., 2003; Ko i sar., 1995).

Autori (Maier i sar., 1994) navode dahronično konzumiranje alkohola može uticati na izmenu funkcije enzima citohroma P-450. Ovaj enzimski sistem može kasnije dovesti do aktivacije prokarcinogena u karcinogen.

1.4.2.3. Kofaktori

Postoje brojni kofaktori koji se mogu dovesti u vezu sa OPK. To su seme palme koja raste u Indiji i istočnoj Africi („Areca nut-Betel Quid“) koje se „žvaće“ i u još nekim delovima Azije (Ko i sar., 1995; Yadav i sar., 2014). Takođe, loša oralna higijena, hronična inflamacija gingive, neadekvatne stomatološke proteze (Tsai i sar., 2014; Rajesh i sar., 2013; Goyal i sar., 2014; Oji i Chukwuneke, 2012; Chang i sar., 2013) profesije koje uključuju izloženost organskim hemikalijama (Mayer i sar., 1991), socio-ekonomski status kao i edukacioni status (Hwang i sar., 2014) infekcije humanim paliploma virusom (HPV 16,18), herpes simpleks virusom (HSV), virusom humane imunodeficijencije (HIV), kao i Epštajn Barrovim virusom (EBV) (Saulle R i sar., 2014;

Senyuta i sar., 2014; Zaravinos i sar., 2014) dovode se u vezu sa nastankom OPK. Uticaja mogu imati i gastroezofagealni refluks (Freije i sar., 1996) kao i različite vrste higijensko dijetskog režima (Filomeno i sar., 2014)

1.4.3. Klinička slika planocelularnog karcinoma usne duplje

Klinička slika OPK zavisi od stadijuma i lokalizacije tumora. OPK se manifestuju hroničnim zapaljenjem ili ulceracijom sluzokože, perzistirajućim otokom, ograničenom pokretljivošću jezika, recidivirajućim krvavljenjima bez jasnog uzroka, poremećajem čula ukusa, neprijatnim zadahom iz usta (Slika 1.9 i Slika 1.10). Opšti simptomi OPK su prisutni u razvijenom stadijumu bolesti.

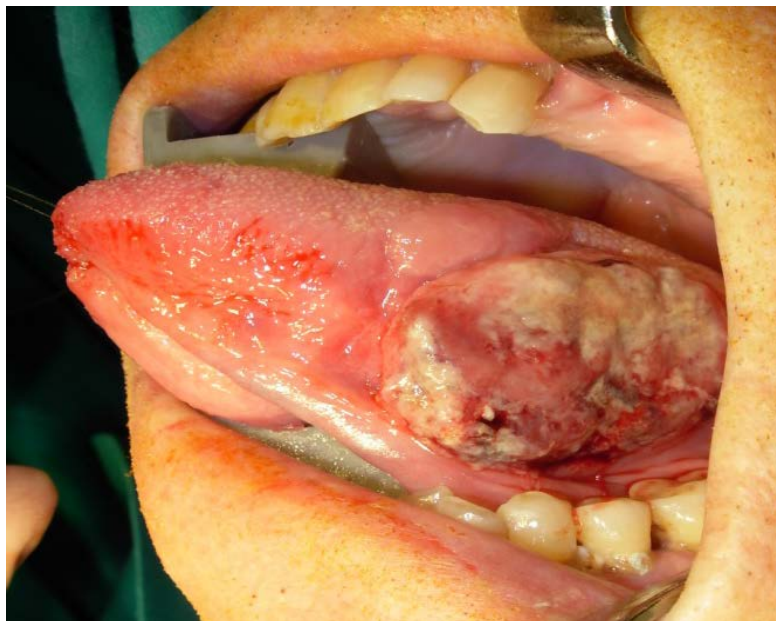
OPK se mogu razviti iz premalignih lezija kao što su leukoplakija ili eritroplakija.. Ove lezije imaju tendenciju ka malignoj transformaciji i predstavljaju stadijum koji prethodi karcinomu.

OPK se manifestuje u sledećim kliničkim formama: pečurkasto - egzofitičnoj (slika br 1.11) i ulceroznoj- endofitičnoj (slika br. 1.12).

Egzofitični oblik karcinoma se karakteriše papilomatoznim rastom tumora. Spoljna površina tumora ima, usled izraženog orožavanja, beličastu prebojenost. Tumorski izraštaj ima karfiolast izgled, tvrd je i infiltriše okolne strukture.

Endofitični oblik karcinoma karakteriše ulceracija koju ograničava režnjevita, tvrda i izdignuta ivična zona. Ovaj oblik karcinoma skoro uvek prati superinfekcija. To je ponovna infekcija nekom novom inokulacijom istog prouzrokovala koji je već izazvao odgovarajuću bolest, ili infekcija klicama rezistentnim na antimikrobsku terapiju, primenjenu u infekciji koja već postoji.

U razgovoru sa pacijentom se dobijaju podaci koji se odnose na tok i početak bolesti. Lekar pokušava da sazna kada je pacijent primetio prve subjektivne tegobe, ili kada je uočio prve promene. U početnom stadijumu bolesti pacijenti se obično žale na bol, otežano gutanje i govor, nelagodnost prilikom jela, utrnulost dela usne duplje. Porodična anamneza može ukazati da kod pacijenta postoji predispozicija za razvoj karcinoma (Ankathil i sar., 1996).



Slika br.1.9 A. Klinička manifestacija PK leve strane jezika i poda usta



Slika br. 1.10 Klinička slika PK poda usta i ventralne strane jezika



Slika br. 1.11 Pečurkasta forma OPK



Slika br. 1.12 Ulcerativna forma OPK

U razvijenim stadijumima bolesti, pacijenti se žale na klaćenje zuba koji se do tada nisu klatili kao i da im proteza „slabije stoji“. Nekada se žale na ograničeno ili onemogućeno otvaranje usta (*trismus*). Otežano gutanje i govor, nelagodnost prilikom jela, poremećaj čula ukusa, neprijatan zadržak iz usta (*foetor ex ore*), simptomi u vidu ispada nekog od kranijalnih nerava, kao što je *Sebileau*-ov znak (tj. skretanje jezika prema oboleloj strani zbog zahvaćenosti mišićne jezika tumorom sa te strane), mogu biti prisutni u kasnijim stadijumima bolesti.

Tegobe se pojačavaju prilikom konzumiranja hrane ljutog, kiselog, slanog ukusa, zatim gaziranih i alkoholnih pića i dr. Promena se manifestuje u vidu ranice (*ulceracije*) koja ne zarasta duže od dve nedelje, *izrasline* sluzokože, perzistirajućeg otoka ili recidivirajućeg krvavljenja bez jasnog uzroka. Nepostojanje tendencije ka zarastanju ekstrakcionih rana takođe može pobuditi sumnju na oralni karcinom. Opšti simptomi OPK mogu biti gubitak telesne težine, malaksalost, „pepeljasta“ – siva boja kože, „bezizrazan“ izgled očiju, itd.

Detaljan palpatorni pregled glave i vrata je neophodan da bi se precizno utvrdila lokalizacija i stadijum primarnog tumora kao i eventualno prisustvo uvećanih limfnih čvorova (suspektne regionalne metastaze). Uopšteno, „početni“ karcinomi mogu biti prisutni kao neulcerisana bela ili crvena polja. OPK u punoj kliničkog formi se manifestuju kao lezije sluzokože. Međutim retko neki skvamocelularni karcinomi mogu biti lokalizovani predominantno u sloju ispod sluzokože a da pri tome ne zahvataju ili veoma malo zahvataju sluzokožu. Čvrste podsluzokožne lezije su mnogo češće tumori porekla malih pljuvačnih žlezda.

Od velike važnosti je u toku pregleda detaljno zabeležiti u istoriju bolesti sledeće karakteristike tumora: lokalizaciju, izgled, oblik, veličinu (izraženu u centimetrima), tvrdoću, pokretljivost, granice, ograničenost, odnose sa okolinom. Takođe je bitno zabeležiti i proceniti da li promena zahvata dublje anatomske strukture (posebno kost i mastikatornu mišićaturu).

Trismus predstavlja loš prognostički znak koji ukazuje da je zahvaćen pterigoidni ili maseterični prostor. Takođe je potreban detaljan neurološki pregled svih kranijalnih nerava, a posebno mandibularnog (parestezije u predelu kože brade),

hipoglosusa (poremećena pokretljivost jezika), facijalisa (pareze, paralize) i akcesornog nerva. Ispadi funkcija kranijalnih nerava su posledica perineuralne invazije i kanalikularnog širenja OPK.

OPK primarno metastaziraju limfnim putem u regionalne limfne čvorove vrata. Retko se mogu širiti i hematogeno. Pri prvom pregledu regionalnih limfnih čvorova metastaze se mogu naći kod oko 40 % bolesnika.

Prisustvo palpatorno izmenjenih limfnih čvorova pri prvom pregledu je loš prognostički znak. Nasuprot tome, 60% bolesnika sa dijagnostikovanom OPK, a koji su bez regionalnih metastaza na početku lečenja, mogu očekivati pozitivan ishod lečenja. Ukoliko na početku lečenja postoje istostrane metastaze, smatra se da je potpuno izlečenje moguće kod svega 30 % bolesnika, a pri obostrano uvećanim limfnim čvorovima svega 1 % bolesnika ima šansu za ozdravljenje. Udaljene metastaze usne duplje se sreću retko i to samo u uznapredovaloj fazi bolesti. Oko 80% udaljenih metastaza postaju manifestne dve godine posle pojave regionalnih metastaza. Najčešće su u plućima (45%) i u skeletnom sistemu (25%). Udaljene metastaze se pri prvom pregledu nalaze kod svega 1 % bolesnika (Gavrić. i sar, 2001).

Dijagnostika i procena oralnih karcinoma koji zahvataju dublje strukture zahtevaju primenu dopunskih radioloških dijagnostičkih metoda, kao što su kompjuterizovana tomografija (CT), magnetna rezonanca (MR) i u novije vreme Pozitron emisiona tomografija – „PET scan“ (Gobel i sar., 2014).

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

Slovom „T“ označava se tumor, slovom „N“ označava se regionalni limfni čvor, a slovom „M“ označavaju se udaljene metastaze; T_x - primarni tumor se ne može ustanoviti; T₀ - znaci primarnog tumora nisu nađeni; T_{is} – Carcinoma *in situ*; T1- tumor veličine do 2cm; T2- tumor veličine 2-4cm; T3 – tumor veći od 4cm; T4_a (usna duplja)- tumor kroz kortikalni deo kosti infiltriše muskulaturu jezika, gornjoviličnu šupljinu, ili kožu lica; T4_b- tumor infiltriše; prostore koje ograničavaju mastikatorni mišići, pterigoidni nastavci ili baza lobanje; unutrašnju karotidnu arteriju.

Klasifikacija se na osnovu zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova vrši na sledeći način: N_x- regionalne metastaze se ne mogu ustanoviti; N₀ – nisu nađene regionalne metastaze; N₁₋₃ prisustvo palpatorno izmenjenih limfnih čvorova.

Na osnovu TNM Klasifikacije određuje se stadijum bolesti za svaki pojedinačni slučaj (tabela br 1.2).

Tabela br. 1.2 Određivanje stadijuma bolesti za karcinome usne duplje na osnovu TNM vrednosti			
Stadijum 0	Tis	N0	M0
Stadijum I	T1	N0	M0
Stadijum II	T2	N0	M0
Stadijum III	T1,T2	N1	M0
	T3	N0,N1	M0
Stadijum IVA	T1,T2,T3	N2	M0
Stadijum IVB	T1-4	N3	M0
	T4b	N1-3	M0
Stadijum IVC	T1-4	N1-3	M1

Histološke karakteristike OPK su keratinizacije epitela (različitog stepena), skvamozna diferencijacija ćelija kao i invazivni rast. Invazivni rast se manifestuje rupturom bazalne membrane i prodorom u dublje slojeve tkiva. Invazija krvnih i limfnih sudova kao i perineuralna infiltracija je takođe jedan od karakteristika OPK. Prema izgledu ćelija tumori su tradicionalno podeljeni na dobro, srednje i loše diferentovane OPK. Dobro diferentovan OPK (gradus I) se karakteriše skoro neizmenjenim pločasto slojevitim epitelom. Srednje diferentovan OPK (gradus II) se karakteriše različitim stepenom jedarnog polimorfizma, uključujući abnormalne mitoze i slabiji stepen keratinizacije. Osobine slabo diferentovanih OPK (gradus III) su mlade, nezrele ćelije, sa velikim brojem atipičnih mitozama i minimalnom keratinizacijom. Iako se keratinizacija javlja i kod srednje i dobro diferentovanih OPK, stepen keratinizacije se ne smatra važnim histološkim kriterijumom u histološkom rangiranju tumora.

1.4.4. Lečenje

1.4.4.1. Hirurški pristup

Donošenje odluke o lečenju OPK je složen proces. Najvažnije pitanje koje se postavlja je: da li je tumor „operabilan“, tj da li se hirurškom intervencijom može tumor ukloniti u potpunosti? Drugo najvažnije pitanje koje se postavlja je: koje su metode lečenja i koje su moguće komplikacije ili neželjena dejstva sprovedenih procedura?

Treće pitanje se odnosi na hirurško lečenje vrata. Da li je potrebna disekcija vrata? Da li već postoje metastaze na vratu ili je primarni tumor povezan sa povećanim rizikom za razvoj metastaza na vratu? Ukoliko je debljina tumora veća od 4 mm postoji povećan rizik za razvoj metastaza na vratu.

Pacijent i multidisciplinarni tim – konzilijum donose odluku zajedno o definitivnom lečenju. Ukoliko hirurško lečenje može dovesti do komplikacija i neželjenih efekata pacijenti mogu da izaberu i nehirurški vid tretmana koji takođe ima za cilj produženje života bolesnika. Konzilijum na maksilofacijalnu regiju predlaže odgovarajući terapijski postupak pacijentu. Pacijent donosi odluku da li prihvata specifično onkološko lečenje i to potvrđuje potpisom (pismeni pristanak).

Cilj hirurškog lečenja je široka i potpuna ekscizija tumora do u klinički - maksroskopski zdravo tkivo, uklanjanje regionalnih limfnih čvorova ako su zahvaćeni metastazama i rekonstrukcija reseciranog dela tkiva ili organa. Hirurška terapija podrazumeva i čuvanje integriteta nezahvaćenih struktura.

Radikalna ekscizija tumora podrazumeva hirurški postupak u toku koje se zajedno sa tumorom „en bloc“ resekira i sloj graničnog, klinički zdravog tkiva. Ova tzv. „sigurnosna zona“ iznosi od 3 mm za početni do 1 cm za napredni stadijum bolesti.

Uklanjanje regionalnih limfnih čvorova je od izuzetne važnosti za lečenje OPK. To je sastavni deo hirurškog lečenja većine karcinoma usne duplje. Taj postupak se izvodi kada postoji i najmanja klinička sumnja da su u limfnim čvorovima na vratu prisutne metastaze. Ovaj postupak se naziva disekcija vrata i najčešće prethodi uklanjanju primarnog tumora.

Udruženje za hirurgiju glave i vrata i onkologiju Američke Akademije za otorinolaringologiju i hirurgiju glave i vrata klasifikovalo je disekcije vrata na sledeći način:

- Radikalna disekcija vrata
- Modifikovana radikalna disekcija vrata
- Selektivna disekcija vrata
- Proširena radikalna disekcija vrata

Radikalna disekcija vrata je operativni zahvat koju je prvi put opisao Crile još 1906 godine. Podrazumeva uklanjanje limfnih čvorova od I do V nivoa, a uklanjaju se i sledeće strukture: platizma, sternokleidomastoidni i omohioidni mišić, fascije vrata, akcesorni živac, podvilična pljuvačna žlezda, donji pol površnog reznja parotidne pljuvačne žlezde kao i spoljna i unutrašnja jugularna vena. Postoji više autora koji su opisali radikalnu disekciju vrata (slika br.1.13).

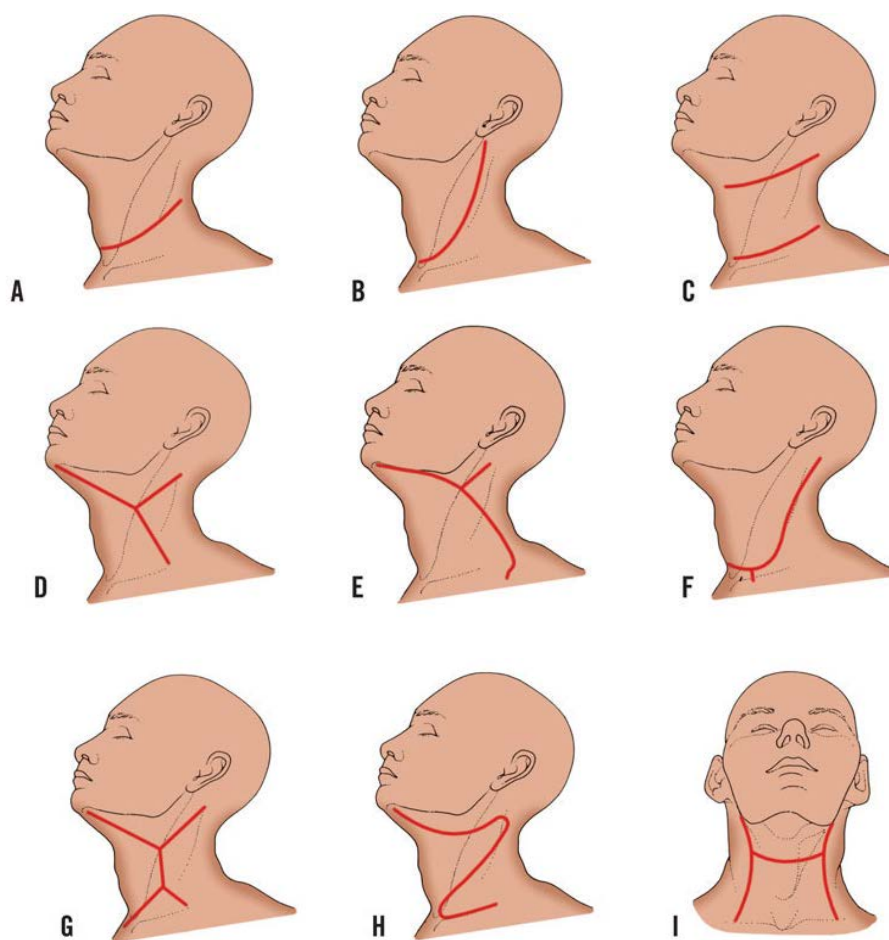
Modifikovana radikalna disekcija vrata je procedura u kojoj se vrši uklanjanje limfnih čvorova kao i u prethodno navedenoj hirurškoj proceduri, uz očuvanje „nelimfatičnog tkiva“ - sternokleidomastoidnog mišića, unutrašnje jugularne vene i akcesornog živca. U zavisnosti od toga koja se anatomska struktura čuva, ova vrsta disekcije vrata podeljena je na sledeće podtipove:

- Tip 1 (prezervacija akcesornog živca, sternokleidomastoidnog mišića, unutrašnje jugularne vene)
- Tip 2 (prezervacija unutrašnje jugularne vene i akcesornog živca)
- Tip 3 (prezervacija akcesornog živca)

Procedura koja podrazumeva prezervaciju jedne ili više grupa limfnih čvorova koje se uklanjaju u toku radikalne disekcije naziva se selektivna disekcije vrata (slika br.1.14). Razlikuju se: supraomohioidna, anterolateralna, središnja i posterolateralna. U okviru supraomohioidne disekcije vrata uklanjaju se limfni čvorovi I, II i III nivoa (koristi se kod primarnih oralnih karcinoma).

Anterolateralna disekcija koristi se uglavnom kod primarnih tumora hipofarinksa i larinksa, a uklanjaju se limfni čvorovi nivoa II, III i IV. Središnja disekcija se koristi u

sklopu hirurškog lečenja malignih tumora štitaste žlezde. Posterolateralna disekcija obuhvata limfne čvorove okcipitalnog trougla, zadnjeg trougla vrata, kao i limfne čvorove grupe dubokog jugularnog lanca nivoa II, III i IV. Koristi se kod melanoma kao i kod karcinoma kože zadnjeg dela poglavine (Shah, 2001).



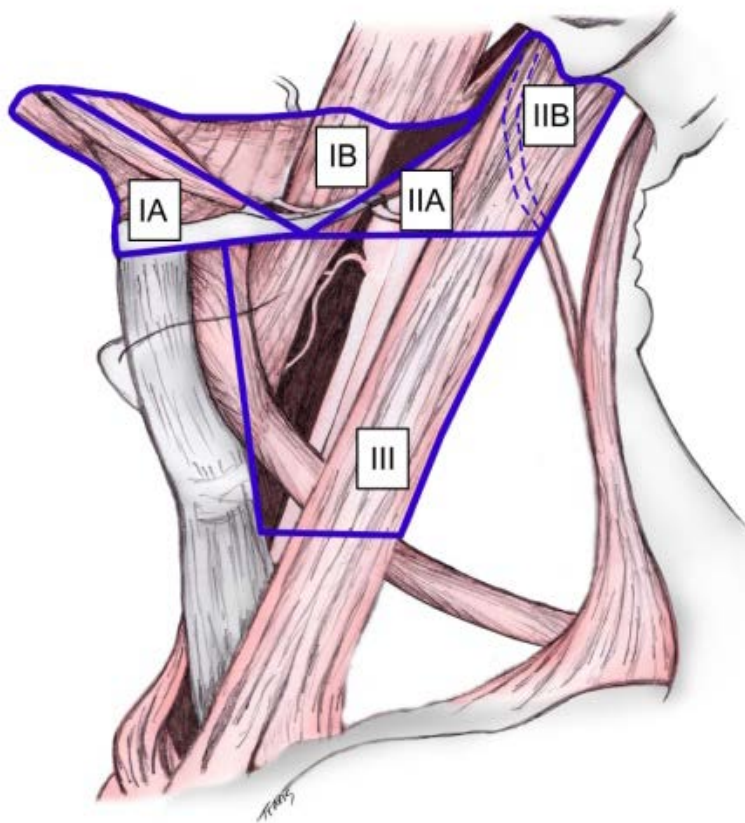
Slika br. 1.13 Različiti hirurški pristupi disekciji vrata: A- Attie; B- Eckers and Byer; C-MacFee; D- Morestin; E- Conley; F- Latyshevsky; G- Martin; H-Z; I- Barbosa. (preuzeto iz Shah i sar., 2001)

Proširena disekcija vrata podrazumeva proceduru u toku koje se uklanjaju i limfni čvorovi kao i strukture koji se ne uklanjaju u toku radikalne disekcije vrata.

U hirurškom lečenju OPK često se pristupa resekciji gornje vilice (maksilektomija) i resekcija donje vilice (mandibulektomija).

Maksilektomija podrazumeva da se sa tumorom ukloni i deo gornje vilice zajedno sa zubnim nastavkom, zubima i delom nepca. Resekcija gornje vilice može biti parcijalna, subtotalna i totalna.

Mandibulektomija podrazumeva uklanjanje dela donje vilice zajedno sa tumorom. Resekcija donje vilice u zavisnosti od količine uklonjenog tkiva može biti marginalna, segmentalna, hemiresekcija i totalna.



Slika br. 1.14 Selektivna disekcija vrata Nivo I – III (Preuzeto iz Shah i sar., 2001)

U savremenom lečenju oralnog karcinoma, terapija izbora je hirurška. U najvećem broju slučajeva primenjuje se i postoperativna zračna terapija. Imajući u vidu da su ovi tumori visokog malignog potencijala, da brzo metastaziraju i da često recidiviraju, operativni zahvati koji se vrše moraju biti radikalni.

Hirurški pristup oralnim karcinomima može biti intraoralni ili ekstraoralni (Shah i sar., 1987) Intraoralnim pristupom moguće je adekvatno ekscidirati samo manje tumore (T1 i T2). U pojedinim slučajevima kada je donja vilica bezuba, intraoralni pristup je dovoljan i za eksciziju većih tumora (T3 i T4), pogotovo ako su locirani u prednje dve trećine jezika ili poda usta. Ukoliko ovakav pristup ne omogućava hirurgu dobru preglednost, tumorima usne duplje pristupa se ekstraoralno. Najčešće se primenjuje privremeno presecanje donje usne - „lip splitting“. Ovaj rez može biti klasičan, modifikovan ili kao produžetak reza kojim se vrši pristup vratu prilikom disekcije – donji obrazni režanj (Greenle i sar., 2000; Shah i sar., 1987). Kod većih tumora (T3,T4) naročito ako su lokalizovani u srednjoj ili zadnjoj trećini jezika i poda usta, neophodna je privremena (temporarna) mandibulotomija. Pristup tumoru može se postići kombinacijom intraoralnog i ekstraoralnog pristupa (*pull-through approach*).

Hirurzi u poslednje vreme sve više primenjuju vrste modifikovane i selektivne disekcije vrata. Ukoliko kliničkim pregledom nisu pronađeni uvećani limfni čvorovi vrata to ne znači da nema metastaza u limfnim čvorovima. Profilaktični hirurški tretman vrata može smanjiti stopu pojave metastaza u udaljenim organima („*systemic metastatic disease*“).

U literaturi su, osim klasične ekscizije skalpelom ili elektroskalpelom, opisani i drugi načini uklanjanja tumora, kao što je krioterapija, ili ablacija tumora karbon – dioksidnim laserom (Yang i sar., 2011; Cecchi i sar., 2011; Goodson i sar., 2012).

Posle uspešnog tretmana oralnog kancera, rizik za razvoj sekundarnog primarnog karcinoma je oko 3,7 % u godini i raste na oko 24% u narednih deset godina (Day i Blot, 1992).

1.4.4.2. Zračna i polihemioterapija

Radioterapija ili zračna terapija predstavlja korišćenje jonizujućeg zračenja u lečenju malignih oboljenja. Ona je neselektivna i zaustavlja ćelijski rast i deobu malignih ali i zdravih ćelija što dovodi do njihovog odumiranja. Može se sprovoditi u

kombinaciji sa hirurškim lečenjem ili nezavisno u zavisnosti od indikacija. Zračna terapija se može primeniti preoperativno, intraoperativno i postoperativno.

Indikacije za primenu postoperativne zračne terapije su:

- prisustvo malignih ćelija na ivici hirurške resekcije;
- ivice resekcije su veoma blizu tumora;
- ekстранodalno širenja tumora;
- višestruke metastaze u limfnim čvorovima;
- slabo diferentovani tumor i visok histološki gradus sa perineuralnom i perivaskularnom infiltracijom

Terapija se sprovodi na predeo primarnog tumora i limfnih čvorova vrata obostrano sa 40 Gy, i dodatnim zračenjem od 20 Gy samo na poziciji primarnog tumora, ukoliko limfni čvorovi vrata nisu metastatski izmenjeni. U slučaju da postoje metastaze u regionalnim limfnim čvorovima vrata, sprovodi se postoperativna zračna terapija od 60 Gy i u predelu limfnih čvorova.

Intraoperativna „ex tempore“ procena hirurških margina može uticati na dalje mere sprovođenja postoperativne zračne terapije (Rutkowski i sar., 2010, Gooris i sar., 2003).

Polihemioterapija (citostatici) u lečenju oralnog karcinoma se vrlo retko primenjuje. Preparati kao što su 5-Fluorouracil i Cis platina primenjuju se samo u slučajevima slabo diferentovanih karcinoma kod osoba mlađeg životnog doba, kada su iscrpljene sve metode hirurškog i zračnog lečenja (Patil i sar., 2014). Međutim kada je u pitanju stav „Nacionalne sveobuhvatne mreže za karcinome“ (*National Comprehensive Cancer Network*) iz 2014 godine za sve, pacijenti kod kojih je dijagnostikovao karcinom, preporučuje se ulazak u neku od kliničkih studija, ukoliko je to moguće. Ciljana (target) terapija je i dalje u razvoju. Lek koji se najčešće koristi je Cetuximab, monoklonsko antitelo koje se vezuje za receptore za epidermalne faktore rasta (EGFR). EGFR može biti prekomerno eksprimiran na membranama epitelnih ćelija OPK. Primena target terapije Cetuximab-om u kombinaciji sa radioterapijom može povećati efikasnost lečenja (Prelec i sar., 2014).

1.4.5. Preživljavanje

Kod pacijenata sa ranim stadijumom oralnog karcinoma sprovedena je studija (Spiro i sar., 1986) koja je pokazala da je petogodišnja stopa preživljavanja oko 95%. Kod bolesnika koji su se javili lekaru u razvijenim stadijumima petogodišnja stopa preživljavanja bila je manja od 80%. Franceschi je u svojoj studiji pokazao da je petogodišnja stopa preživljavanja kod pacijenata stadijuma I i II oko 82%, dok je kod pacijenata sa stadijumom III i IV oko 49% (Franceschi i sar., 1993). Shaha i saradnici tvrde da je stopa petogodišnjeg preživljavanja kod pacijenata sa karcinomom poda usta u zavisnosti od stadijuma, idući od (stadijuma I do IV), sledeća: 88%, 80%, 66% i 32% (Shaha i sar., 1984).

Radikalnost hirurškog zahvata utiče na stopu petogodišnjeg preživljavanja (Loree i Strong, 1990; Wang i sar., 2013). Stopa se, posmatrano u odnosu na histopatološki nalaz u margini, drastično razlikuje: kod pacijenata sa displazijom u margini - 94 %, kod pacijenata sa Ca in situ - 71%, a kod pacijenata sa marginom koja je manje od 5 mm udaljena od tumora - 51%, dok je najniža stopa petogodišnjeg preživljavanja zabeležena kod pacijenata sa invazivnim karcinomom u margini – 43% (Loree i Strong, 1990).

Prisustvo regionalnih metastaza na vratu ili lokalno naprednog stadijuma bolesti smanjuje stopu petogodišnjeg preživljavanja kod pacijenata sa karcinomom sluzokože tvrdog nepca i zubnog nastavka gornje vilice sa 70% na 30 % (Loree i Strong, 1990). Petogodišnja stopa preživljavanja za karcinome usne šupljine i farinksa je 46 % u svetu, ali su velike razlike između razvijenih (59%) i zemalja u razvoju (39%). Četiri od pet zemalja u Evropi sa najvećom stopom mortaliteta, su u Istočnoj Evropi (Landis i sar.,1999)

Loša prognoza je najverovatnije rezultat slabog odgovora na postojeću terapiju, uglavnom tumora dijagnostikovanih u uznapredovalom stadijumu (Mascolo i sar., 2012).

1.4.6. Prevencija i princip postoperativnih kliničkih kontrola

Primarna prevencija – prestanak pušenja kao i konzumiranja alkohola je najefikasniji način za smanjenje rizika za razvoj karcinoma.

Rano otkrivanje treba da bude prioritet, jer rana detekcija lezije omogućava pravovremenu terapiju i dobru prognozu.

Veliku ulogu u blagovremenom prepoznavanju potencijalno malignih lezija u početnom stadijumu imaju stomatolozi u toku rutinskih pregleda. Bitna je rana dijagnostika oralnih prekanceroznih lezija kao što su leukoplakija, eritroplakija, lihen planus i dr. Kod ovih pacijenata neophodno je sprovesti češće kliničke kontrole, kako bi se u što ranijem stadijumu otkrila eventualna maligna transformacija postojeće promene. Pacijentima treba objasniti da su konzumiranje alkohola i duvana veliki faktor rizika za razvoj karcinoma.

U cilju prevencije sprovode se i redovne postoperativne kontrole. Princip sprovođenja postoperativnih kliničkih kontrola je sledeći: jednom mesečno u prvoj godini nakon operacije; jednom u dva meseca u drugoj godini od operacije; jednom u tri meseca treće i četvrte godine godine od operacije; potom jednom u šest meseci. Postoperativni period praćenja od 5 godina u kome nije zabeležen recidiv ili metastaze smatra se izlečenjem.

1.5. Histološke margine kod oralnih karcinoma

1.5.1. Pojam histološke margine

U literaturi ne postoje jedinstveni kriterijumi koji definišu šta je „čista“ hirurška margina kod OPK. U najvećem broju studija, margina se smatra „čistom“ ukoliko *ex tempore* dijagnostika ukaže da u graničnom tkivu nisu nađene maligne ćelije, ali ovo mišljenje ne zastupaju svi. Ispitivanje kojim su anketirani hirurzi koji se bave onkologijom glave i vrata ukazalo je da oko 70 % lekara uzima granične uzorke nakon kompletne hirurške ekscizije tumora iz predela postekscizionog defekta (Jeremy i sar., 2005).

Uzimanje uzoraka tkiva hirurških margina se mora izvoditi po tačno utvrđenom protokolu. Izvor mogućih grešaka mogu biti hirurg, patolog i pomoćno osoblje. Margine se mogu oštetiti elektrokauterom. Usled neadekvatnog protokola uzimanja uzoraka tkiva može doći do pogrešne interpretacije rezultata. Najvažniji prognostički faktor kod pacijenata sa planocelularnim karcinomima glave i vrata je uspešnost hirurškog uklanjanje tumora, odnosno da li je tumor u potpunosti odstranjen ili ne (Snow, 1989; Blons i Laurent-Puig., 2003; Temam i sar., 2000)

Postoje brojni dokazi da prisustvo displazije ili *carcinoma in situ* u hirurškim marginama smanjuje lokalnu kontrolu bolesti i stopu preživljavanja (Jones i sar., 1992; School i sar., 1986; Spiro i sar., 1988; Gandour-Edwards i sar., 1993; RF, Davidson i sar., 1981; Davidson i sar., 1988; Davidson i sar., 1984; Zieske i sar., 1986; Brennan i sar., 1991).

Najefikasniji tretman za pozitivne hirurške margine je reoperacija, sa dodatnom ekscizijom okolnog tkiva (School i sar., 1986; Looser i sar., 1978; Zieske i sar., 1986). Ukoliko opšte stanje pacijenta i stadijum bolesti ne dozvoljavaju reoperaciju, kao alternativa se koristi radioterapija (Zieske i sar., 1986; Liu i sar., 2014; Fan i sar., 2014).

U anketi koja je sprovedena 2004 u okviru američkog udruženja hirurga glave i vrata najčešće se pod „čistom“ marginom podrazumevala ona margina koja je bila preko 5mm udaljena od tumora nakon mikroskopske evaluacije. Međutim mnogi od istraživača su bili različitih mišljenja i postojale su velike kontroverze oko definicije „čiste“ margine (Jeremy i sar., 2005).

Detekcija displazija, znakova premaligniteta i *Ca in situ* u hirurškim marginama ili tzv. „bliske margine“ („*close margins*“)(koja je bliža od 5mm tumoru) smatra se pozitivnim marginama (Loree i Strong, 1990). Kod svih pacijenata sa pozitivnim marginama zabeležena je statistički značajno povećana učestalost recidiva. (Loree i Strong, 1990). Spiro i sar. su sprovedli studiju na 150 pacijenata koji su lečeni zbog OPK jezika (Spiro i sar., 1999). U toj studiji je pokazano statistički značajno povećanje učestalosti recidiva kod pacijenata sa pozitivnim marginama . U studiji koja je sprovedena na 332 pacijenta sa oralnim i orofaringealnim karcinomom, na osnovu kriterijuma „čista margina“ (ona koja je preko 5mm, udaljena od ivice tumora) i „bliska margina“ (udaljenost resekcione linije manja od 5 mm) nije utvrđena statistički

značajna razlika u pogledu recidiva kao i petogodišnje stope preživljavanja (McMahon i sar., 2003).

Pomenute tri studije ilustruju kontroverzu koja postoji u literaturi, a odnosi se na uticaj hirurških margina na prognozu bolesti, i na učestalost recidiva (Jeremy i sar., 2005). Očigledno da ne postoje jedinstveni kriterijumi, koji se mogu primeniti na sve oblasti glave i vrata, zbog toga što se margine tumora glotisa ne mogu upoređivati sa karcinomima oralne duplje i farinksa (Batsakis i sar., 1999).

Takođe, definisanje čistih tumorskih margina nakon sprovedene hemioterapije i dalje ostaje nejasno. Možda bi se odgovor lakše mogao dobiti u okviru multicentričnih kliničkih ispitivanja (Jeremy i sar., 2005).

Carcinoma in situ prema navodima grupe autora ima „jednaku biološku značajnost“ kao i teški oblik displazije (Batsakis i sar., 1999). Interesantno, u drugoj anketi koja je sprovedena 2005 godine, 83 % hirurga je odgovorilo da *carcinoma in situ* u margini predstavlja pozitivnu marginu dok je blizu 80% ispitanika, što je poražavajuće, kategorisala marginu sa prisustvom displazijom kao negativnu marginu (Jeremy i sar., 2005).

U istraživanju koje je sprovedeno među lekarima (Jeremy i sar., 2005), skoro svi - oko 99% hirurga je odgovorilo da je u nekim slučajevima korišćenje *ex tempore* dijagnostike preporučljivo radi intraoperativne procene histoloških margina. Korisnost i pouzdanost ovih margina je dobro dokumentovana (Spiro i sar., 1999; Junaid i sar., 2012; Patel i sar., 2010). I pored toga što je pouzdanost *ex tempore* bila oko 99 % (Ord i Aisner, 1997) i dalje *ex tempore* dijagnostika nije uvek dovoljna da se izbegnu pozitivne margine.

Zbog toga, ispitivanje margina sve se više vrši primenom različitih molekularnih tehnika. Nekoliko studija pokušalo je da objasni kako se razvija lokalni recidiv kod tumora kod kojih je margina bila histološki negativna. Sprovedena su nova istraživanja sa ciljem da se utvrdi status nekih molekularnih markera koji su prisutni u margini tumora. Tako je utvrđeno da pojedini pacijenti sa histopatološki negativnim marginama, zapravo imaju mutacije u TP53 genu. Ti pacijenti sa detektovanim mutacijama pokazali su povećan rizik za razvoj lokalnog recidiva (Brennan i sar., 1995).

Definisanje margina, upotrebom osetljivih molekularno-genetičkih tehnika ne sme naravno da zanemari nalaze kdobijene konvencionalnim histopatološkim pregledom margina koje ostaju neprikosnovene (Batsakis i sar., 1999).

Na Univerzitetu u Baltimoru, na Klinici za otorinolaringologiju, se od 1995 godine standardno koriste molekularne analize za procenu hirurških margina kod pacijenata sa planocelularnim karcinomom (Jeremy i sar., 2005). Ovaj pristup u proceni hirurških margina utoliko ima više smisla ukoliko se uzme u obzir i fenomen polja kancerizacije.

1.5.2. Polja kancerizacije

Često se dešava da se tumor razvija na istom anatomskom mestu gde je prethodno sprovedena ekscizija tumora. Ova vrsta recidiva koja se javlja na mestu potpune ekscizije tumora objašnjava koncept polja kancerizacije (Gandor i sar, 1988; Reibel i sar., 2003).

Određeni region oralne mukoze može biti „histološki zdrav“, a genetički izmenjen, usled dejstva kancerogenih agenasa, što je čest nalaz kod osoba koje konzumiraju duvan i akohol (Brakhuis i sar., 2002). Te zone oralne mukoze koje makroskopski deluju normalno, a na molekularnom nivou su već izmenjene, Brakhuis naziva "polja kancerizacije" (*fields of cancerisation*). Njih čine genetički različiti ćelijski klonovi, formirani selekcijom i ekspanzijom određenih izmenjenih ćelija. Kao rezultat kontinuirane evolucije procesa, unutar "polja kancerizacije" nalaze se ćelijske populacije koje nisu uniformne i iz kojih mogu da se formiraju i primarni i sekundarni tumori. Upravo zato jedan od važnih faktora rizika za pojavu OPK je činjenica da je u prošlosti već bio zabeležen karcinom usne duplje, ili sluzokože gornjeg respiratornog trakta. Zbog toga se kod pacijenata koji nose pomenute faktore rizika preoperativno podvrgavaju detaljnom panendoskopskom pregledu. U studijama su praćeni pacijenti koji su prethodno hirurški lećeni od karcinoma glave i vrata i pokazalo se da postoji veći rizik za razvijanje sekundarnih primarnih tumora ili recidiva na sluzokoži gornjeg aerodigestivnog trakta (Partridge i sar., 2000; Brakhuis i sar., 2002). Rizik za razvoj sekundarnog primarnog tumora kod pacijenta koji je u istoriji imao planocelularni karcinom iznosi 20% (Dakubo i sar., 2007). Određivanje ovih polja koja su sklona

razvoju karcinoma bazira se na identifikaciji molekularnih signalnih puteva u genetski izmenjenim ali u histološki normalnim regionima koji se nazivaju peritumorsko kancersko područje (peritumoral-cancer field).

Zanimljivo je da je koncept i definiciju polja kancerizacije prvi u medicinsku terminologiju uveo Slaughter još davne 1953 godine, kada je analizirao tkivo oko planocelularnog karcinoma (Slaughter i sar., 1953). Koncept je predstavljen na primeru multiplih primarnih tumora i recidiva tumora gornjeg aerodigestivnog trakta. Ovi tumori vode poreklo od različitih ćelija koje imaju tendenciju ka malignoj transformaciji. Termin „lateralna kancerizacija“ je uveden kasnije kako bi se objasnilo širenje tumora, koje se češće odigrava zahvaljujući progresivnoj transformaciji ćelija tkiva koje se nalaze u blizini tumora, a ređe zbog širenja već postojećih malignih ćelija u okolno tkivo (Slaughter i sar., 1946). Analizom 783 slučajeva karcinoma Slaughter i sar. su došli do zaključka da celokupan epitel koji se nalazi u okolni tumora poseduje više od jedne nezavisne regije malignih karakteristika. Kasnije je teorija o poljima kancerizacije usvojena. Ti nalazi su potvrđivali da izlaganje kancerogenima dovodi do submikroskopskih promena u sluzokoži oko primarnog tumora i čini je pogodnom za razvoj višestrukih malignih fokusa. Submikroskopske promene iziskivale su uvođenje različitih molekularnih analiza sa ciljem da se ispita prisustvo genetičkih mutacija i malignih ćelijskih klonova i pokuša objasniti ovaj model kancerogeneze. Već je naglašeno da u usnoj duplji alkohol i duvan ostvaruju sinergizam kao primarni kancerogeni u razvoju OPK. Ovi faktori sredine mogu simultano uzrokovati promene na čitavoj površini sluzokože i oštetiti veliki broj ćelija što potencijalno dovodi do razvoja malignih lezija. Ekspresija različitih molekularnih markera u epitelu i vezivnom tkivu (p53, p16, Cyclin D1, p21, Ras, Erb, receptori za faktore rasta, itd..) mogla bi da odredi polja kancerizacije

Ovaj koncept polja kancerizacije proširen je i na ostale organe i sisteme kao što su orofarinks, jednjak, pluća, kolon, grlić materice, anus, koža i bešika (Mohan i sar., 2014).

1.6. Genetika tumora

1.6.1 Onkogeni i tumor supresorni geni

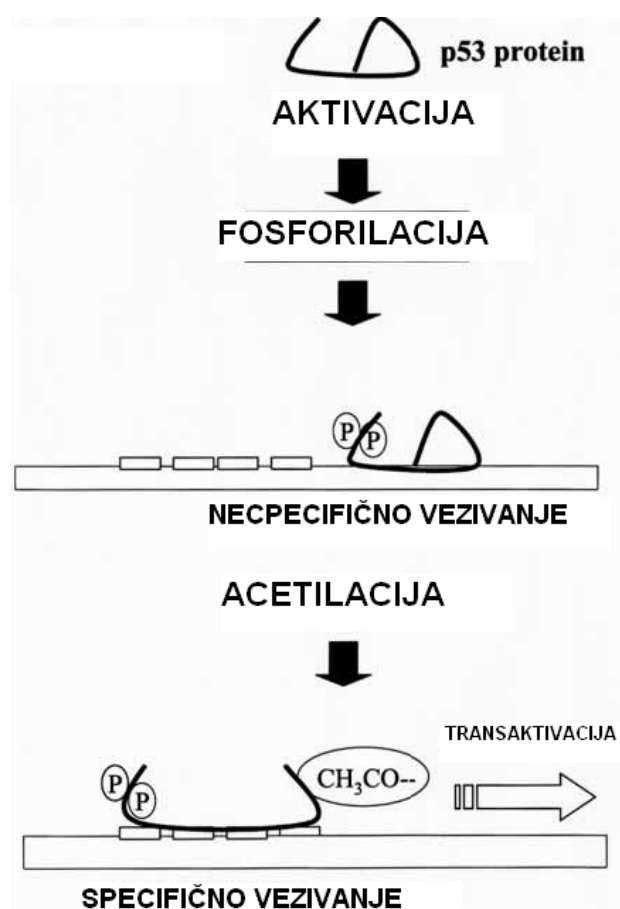
Tumor nastaje klonalnom ekspanzijom jedne maligne ćelije a vreme za koje se tumorske ćelije dele i umnožavaju, određuju brojni faktori. Kinetika tumorskog rasta objašnjava način i brzinu rasta transformisanih malignih ćelija, uticaj faktora koji određuju progresiju kao i molekularne osnove invazije i metastaza.

Protoonkogeni su normalni ćelijski geni, čiji proteinski produkti regulišu bazične ćelijske procese, kao što su proliferacija i diferencijacija, stvaranjem signala transdukcionog mehanizma. Aktiviranje ove kompleksne signalizacione kaskade strogo je regulisano u pogledu vremena i mesta. Abnormalno inciran signal može da dovede do maligne transformacije ćelija. Do neželjenog pokretanja proliferativnog signala može doći usled izmena u jednoj od kopija protoonkogeni, što za posledicu ima njegovu aktivaciju, odnosno pojačanu funkciju njegovog proteinskog produkta. Osnovni genetički mehanizmi aktivacije protoonkogeni su: tačkaste mutacije, amplifikacija i hromozomski rearanžmani, što sve dovodi do izmenjene ekspresije onkoproteina.

Tumor supresorni geni ili antionkogeni, su geni čiji produkti kontrolišu ćelijski ciklus, pre svega tako što onemogućavaju deobe ćelija ukoliko dođe do oštećenja naslednog materijala. Proteinski produkti ovih gena uključeni su u regulaciju ćelijskog ciklusa na više kontrolnih punktova i u sprečavanje napredovanje ćelije kroz ciklus, dok se lezije na naslednom materijalu ne repariraju. Ako su oštećenja suviše velika produkti ovih gena zaduženi su za aktivaciju apoptoze, (programirane ćelijske smrti). Nasuprot dominantnom efektu mutacije jednog alela onkogeni, transformišući potencijal tumor supresorni geni stiču funkcionalnom inaktivacijom oba alela, tj. mutacijama koje su recesivnog karaktera. Odsustvo ili nefunkcionalnost proteinskih produkata tumor supresornih gena, oslobađa ćeliju kontrolnih mehanizama, tako da se akumuliraju i propagiraju brojne lezije iz ciklusa u ciklus, odnosno dolazi do opšte genomske nestabilnosti, što je osnovna karakteristika tumorskih ćelija.

1.6.1.1 TP53, glavni čuvar genoma - kontrolor ćelijskog ciklusa

Uprkos velikim dostignućima u razumevanju procesa ćelijske proliferacije i dalje ne postoji adekvatna translacija ovih saznanja u efikasnu terapiju. Moderna molekularna onkologija je uveliko počela da se bavi pitanjima koja su u vezi sa terapijom kancera.



Slika br. 1.15 Mehanizam aktivacije TP53 gena

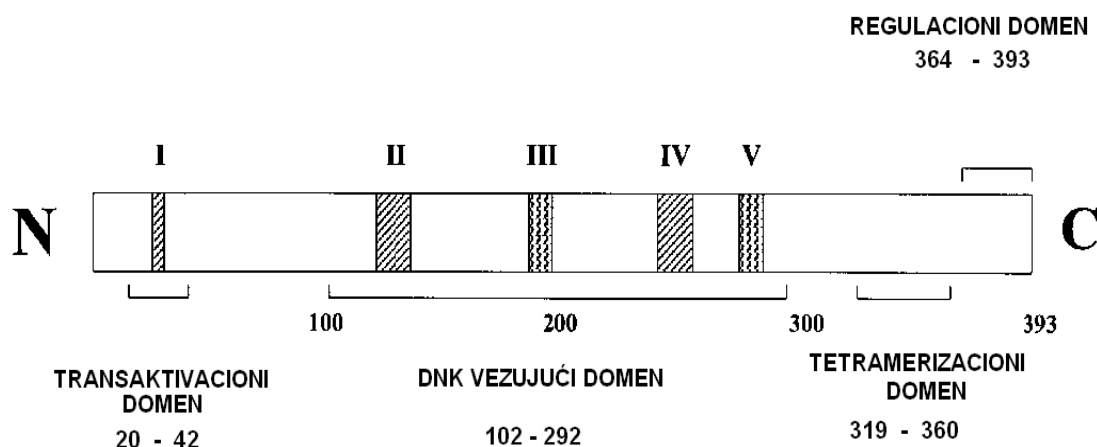
Postoje mnoge studije koje se bave ćelijskim ciklusom, a koje mogu doprineti definisanju cilja terapije karcinoma. Stoga se sve više nameće potreba da se tumor supresorna biologija koja još nije orjentisana kao “kancer -terapijska” disciplina, razvija u tom smeru.

TP53 kao transkripcioni faktor, ima centralnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, i ćelijske smrti, posebno kada se javi oštećenja na DNK molekulu.

Iako je prvobitno mišljenje bilo da ima funkciju onkogen, izolacija divljeg tipa (*Wild type*) gena za TP53 vodila je do otkrića da TP53 funkcioniše kao potentni tumor supresorni gen, odnosno da je važan u prevenciji maligne progresije (Partridge i sar., 2000; Bray i sar., 1998; Prives i Hall, 1999; Lane, 1998; Anderson i sar., 1997; Sakaguchi i sar., 1998; Bates i sar., 1998). Kod eksperimentalnih miševa, koji su imali nedostatak aktivnosti TP53 gena, brzo je dolazilo do razvijanja tumora (Prives , 1998; Larín i sar.; 1999; Levine i sar., 1998). Poznato je da je TP53 gen jedan od najčešće mutiranih gena u humanim tumorima, odnosno da je gubitak njegove funkcije usled mutacije u vezi sa razvijanjem mnogih humanih maligniteta. Aproximativno 50 % svih humanih tumora imaju neku od TP53 mutacija (Stommel i sar., 1999; Lowe i Ruley, 1993; Graeber i sar., 1996). Objašnjenje mehanizama koji aktiviraju i regulišu TP53 (slika br. 1.15), trebalo bi takođe da doprinese rasvetljavanju mehanizma razvitka kancera kao i otkriću novih terapijskih sredstava u borbi protiv malignih oboljenja.

TP53 je lociran na kratkom kraku hromozoma 17 i kodira protein p53. TP53 se sastoji od 11 egzona, od kojih je prvi nekodirajući, dok se njegov proteinski produkt p53 sastoji od 393 aminokiseline i obuhvata četiri domena sa različitim funkcijama. Na slici br. 1.16 dat je šematski prikaz p53 proteina sa 5 definisanih regiona.

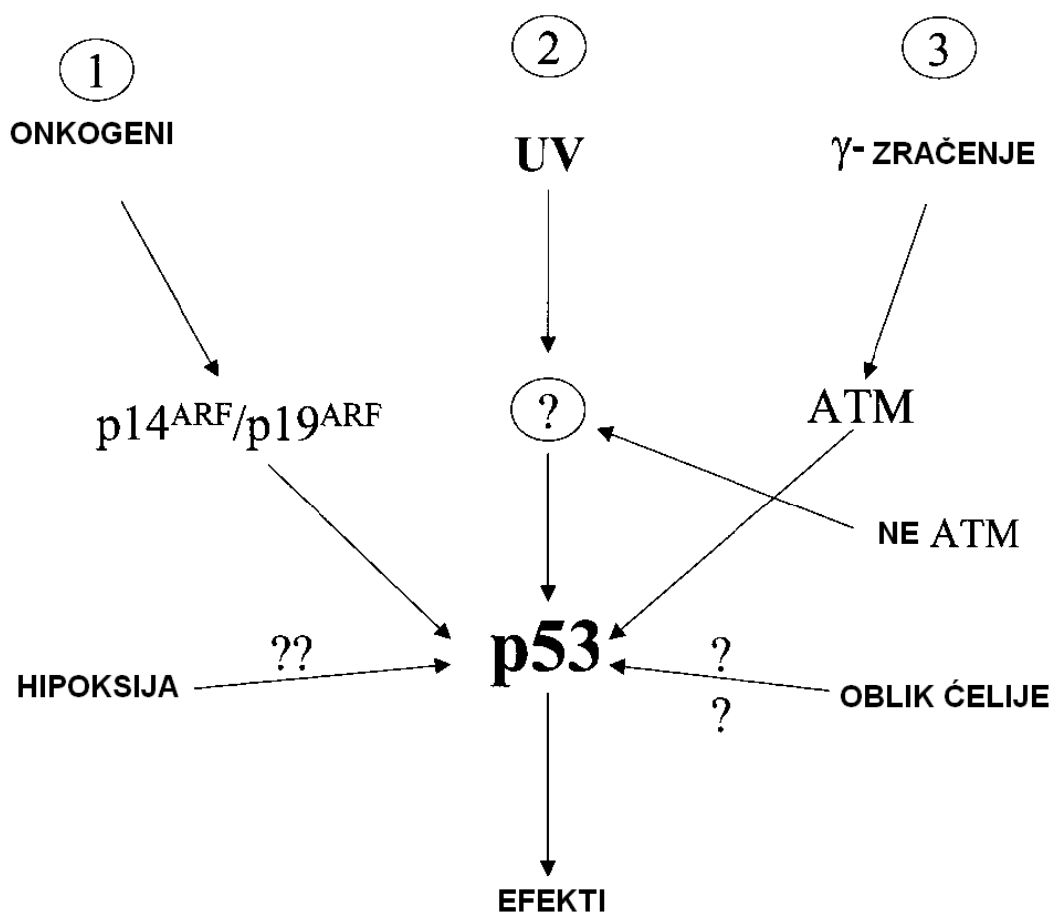
Jednom aktiviran, p53 može blokirati rast ćelije ali isto tako i ćelijsku smrt. Na N-terminusu proteina postoji transaktivacioni domen koji je važan za specifičnu aktivaciju određenih gena, na primer, MDM2 gena. U centralnom delu, postoji DNK-vezujući domen (slika br.1.16.) preko koga se p53 vezuje za specifične sekvence DNK. Protein p53 ima veoma kratak polu-život i zbog toga ga je izuzetno teško detektovati u normalnom tkivu. Međutim, protein može ostati u tkivu duže iz određenih razloga, kao što su mutacije, koje usporavaju njegovu degradaciju, ili ukoliko se veže za različite proteine uključujući i proteine virusnog porekla. Aktivacija TP53 gena (slika br.1.16) fosforilacijom i acetilacijom je i dalje kontroverzna.



Slika br.1.16 Šematski prikaz p53 proteina

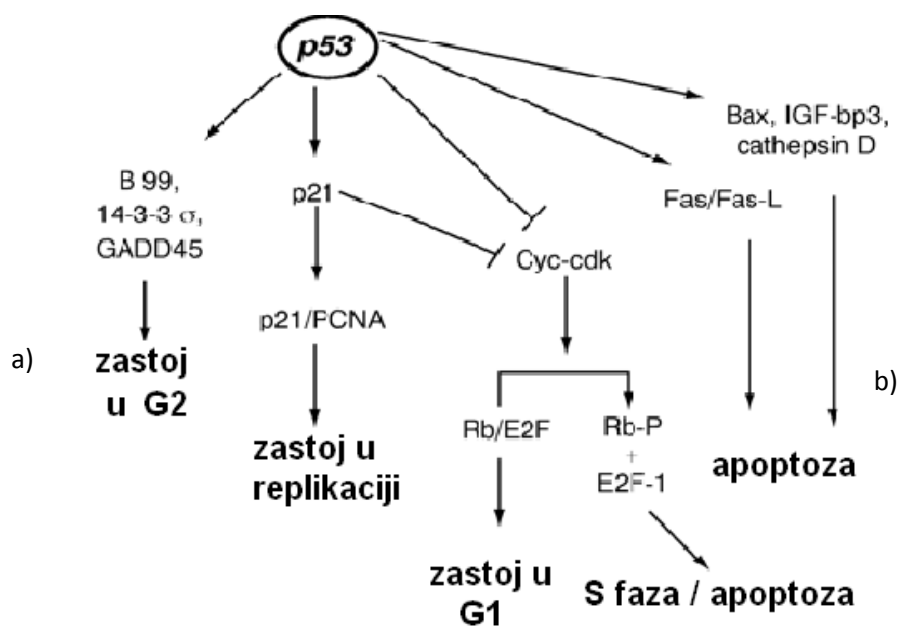
Da bi izvršio svoju funkciju, p53 mora preći u jedro i formirati tetramere sa drugim p53 molekulima. Formiranje tetramera je neophodno da bi p53 postao aktivan i mogao da indukuje zaustavljanje rasta ćelije ili programiranu ćelijsku smrt (apoptozu) – dva moćna zaštitna mehanizma ćelije.

Nekoliko gena i njihovih produkata uključeno je u regulaciju aktivnosti p53, između ostalih i MDM2 gen. MDM2 kodira protein sa istim akronimom (MDM2), koji se može vezati za TP53 proteina i tako blokirati TP53 transkripcionu aktivnost. Vezivanje MDM2 proteina za TP53 protein je takođe odgovorno za transport TP53 proteina iz jedra u citoplazmu gde se TP53 protein degraduje. Među stimulse koji dovode do *TP53* aktivacije, izdvajaju se: povećana ekspresija različitih onkogeni, dejstvo citotoksičnih-antitumorskih agenasa, jonizujuće zračenje i UV zračenje. Takođe, i drugi faktori mogu dovesti do *TP53* aktivacije, kao što su: hipoksija, citokini, faktori rasta, nefunkcionalno deobno vreteno, nedostatak ribonukleotida, dejstvo NO itd (Leri i sar., 1999). Humani TP53 gen kodira protein koji se sastoji od 393 aminokiseline (slika br. 1.16), koji je podeljen u nekoliko dobro karakterizovanih strukturnih i funkcionalnih domena. Dalja istraživanja, su pokazala da je *TP53* gen, tumor supresorni gen za čiji gubitak funkcije, međutim, nisu neophodne dve mutacije, već je dovoljna jedna; mutirani polipeptid u kompleksu sa normalnim TP53 proteinima formira nefunkcionalne tetramerne forme TP53 proteina.

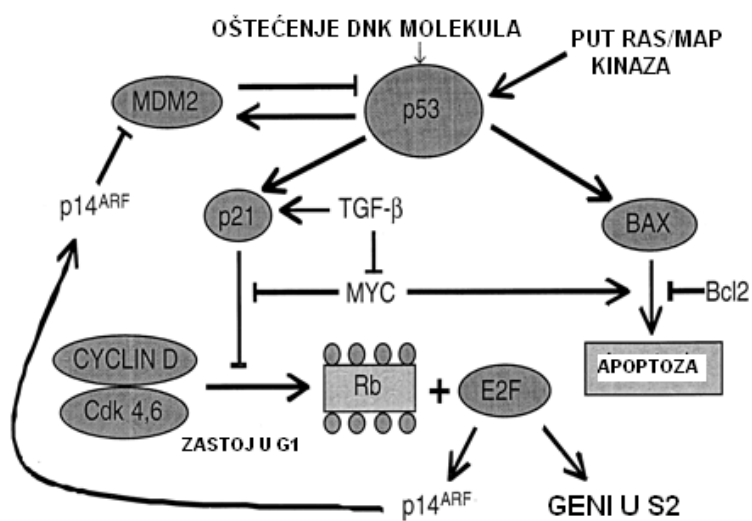


Slika br.1.17 Putevi aktivacije TP53 gena

Dakle, dovoljna je samo jedna mutirana forma *TP53 gena* pod čijom će se kontrolom sintetisati dovoljna količina izmenjenog polipeptida, da bi se izgubila normalna funkcija divlje forme TP53 proteina u hetero-oligomernom kompleksu (Joers i sar., 2000). Bez obzira o kom stimulusu se radi, suština dejstva TP53 proteina zasniva se na zaustavljanju ćelijskog ciklusa u G1/S i/ili G2/M kontrolnim punktovima, čime se ćeliji pruža mogućnost da reparira oštećenu DNK ili ukoliko su greške nepopravljive da aktivira program apoptoze u G1, sa ciljem da se obezbedi stabilnost genoma. Svojim transaktivirajućim dejstvom TP53 protein stimuliše sintezu inhibitora ćelijskog ciklusa u G1: P21^{waf1} i Gadd45 i u G2:14-3-3sigma i Reprimo proteina (Hermeking i sar.,1997)



Slika br.1.18 Regulatorni mehanizmi koje kontroliše TP53 protein



Slika br.1.19 Veza između različitih signalnih puteva i TP53 proteina.

Analizirajući mutacioni spektar *TP53 gena*, kod različitih tipova tumora, preko 90% "missense" mutacija detektovano je u visoko konzerviranom regionu *TP53 gena*, DNK vezujućem, od 5. do 8. egzona. Takođe, unutar ove egzonske sekvence, 20-30%

mutacija je locirano u tzv. "hot spot" kodonima: 175, 245, 248, 249 i 273. Sve ostale mutacije su dispergovane po nekonzerviranim segmentima gena. Shodno lokaciji mutacije, TP53 mutirani proteini, mogu se označiti kao: "kontakt mutanti" i "konformacioni mutanti". Ukoliko je mutacija locirana u konzerviranom regionu, "kontakt mutanti" gube sposobnost vezivanja za promotore ciljnih gena, dok mutacije u nekonzerviranim regionima daju "konformacione mutante" koji ne mogu da obrazuju aktivnu konformaciju. Pored tačkastih mutacija koje zahvataju jedan alel, sreću se i delecije *TP53* tumor supresornog gena, tj. dolazi do gubitka heterozigotnosti (LOH) pri čemu se inaktiviraju oba alela. Kao što je napred rečeno ovaj gen često pokazuje odstupanje od opšteg pravila inaktivacije TSG, odnosno umesto dve, dovoljna je jedna mutacija, koja će imati dominantan efekat, tako što će mutirani monomeri u kompleksu sa normalnim dati tetramere izmenjene aktivnosti. Sem mutacijama, TP53 gen se može inaktivirati i epimutacijama; naime, u tumorskim ćelijama, detektovana je i hipermetilacija CpG dinukleotida u samom promotorskom regionu ovog gena. Zbog svoje ključne važnosti u kontroli ćelijskog ciklusa, ne čudi činjenica da je *TP53* gen mutiran u preko 50% tipova malignih tumora.

1.6.1.2 C Erb B2 (HER2)-membranski receptor u signalnoj transdukciji

Za razliku od normalnih ćelija, tumorske ćelije mogu da autonomno generišu proliferativne signale odnosno da produkuju faktore rasta, koji vezivanjem za odgovarajuće receptore na membrani dovode do rasta. Mutacije u protoonkogenima za faktore rasta i njihove receptore, rezultuju kvantitativnim ili kvalitativnim promenama u ekspresiji onkoproteina, što je jedan od preduslova za razvoj neoplastičnih ćelija.

C ErbB2 gen, je jedan od članova EGFR familije gena - *ERBB1 (HER-1)*, *ERBB-2 (HER-2, NEU)*, *ERBB-3 (HER-3)*, i *ERBB-4 (HER-4)* gen. ErbB-2 gen lociran na kratkom kraku hromozoma 17, kodira transmembranski glikoprotein, p185, sa tirozin kinaznom aktivnošću. Svi članovi EGFR familije pokazuju strukturnu i funkcionalnu homologiju, tj. poseduju N-terminalni ekstracelularni ligand-vezujući domen, koji ima važnu ulogu u receptorskoj dimerizaciji, transmembranski α -heliks i citoplazmatski C-terminalni domen sa tirozin-kinaznom aktivnošću (Beckhardt i sar., 1995). Vezivanjem specifičnih liganada - EGF, TGF- α , neuregulin-a i dr. dolazi do aktivacije specifičnih

receptora, odnosno do njihove hetero i homodimerizacije, što za posledicu ima autofosforilaciju citoplazmatskog domena i kaskadnu aktivaciju efektornih proteina. Tako na primer, EGF indukuje heterodimerizaciju erbB1-erbB2 i homodimerizaciju receptora erbB1, dok neuregulin-1 dovodi do heterodimerizacije erbB2-erbB3/4 (Riese i sar., 1998; Klapper i sar., 1999). Diferencijalnom aktivacijom receptora, iniciraju se različiti signalni putevi kancerogeneze, kao što su: ras put, MAPK kaskada, fosfatidilinozitol-kinazni (PI3K) put i dr. (Yarden i sar., 2001).

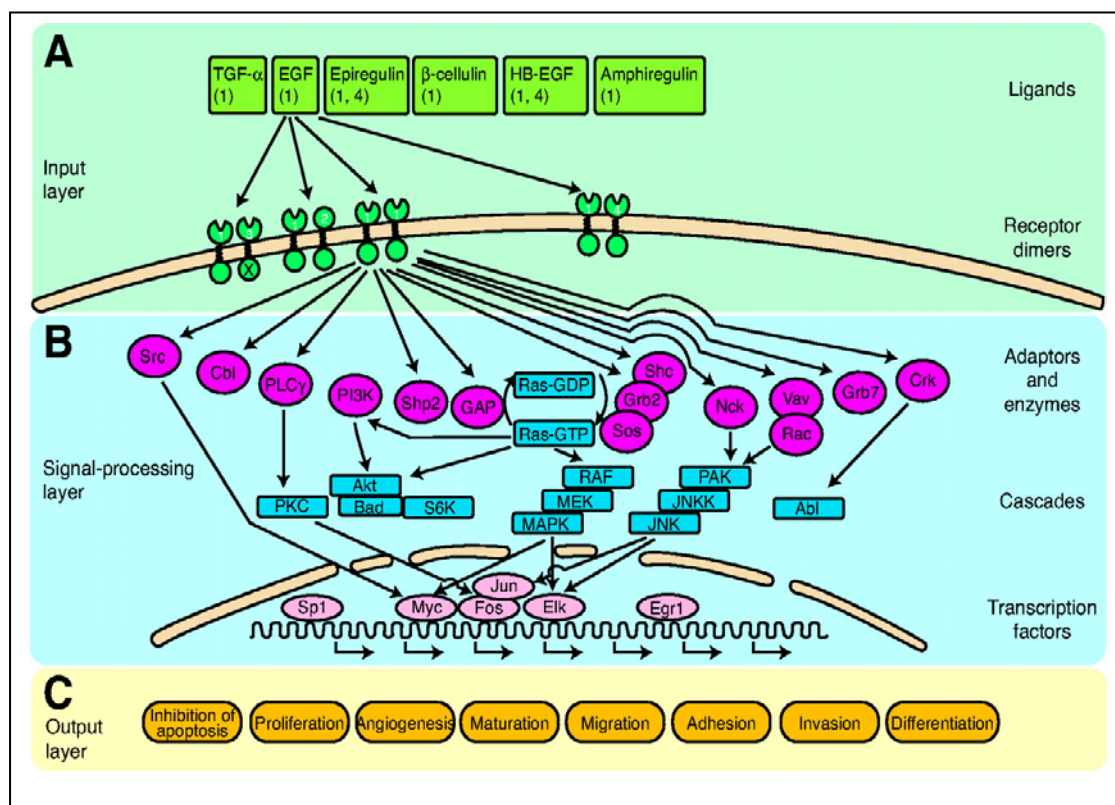
U humanim ćelijama do onkogene aktivacije erbB2 gena, najčešće dolazi putem njegove amplifikacije odnosno povećane ekspresije. U sporadičnim slučajevima, onkogene aktivacija može biti posledica delecije egzona - od 2 do 7, odnosno aminokiselina - od 6 do 276. (Moscatello i sar., 1995; Wikstrand i sar., 1995).

1.6.1.3 Ras gen, membranski glasnik signalne transdukcije

Proteinski produkti ras familije gena locirani su na unutrašnjoj strani plazma membrane, i imaju funkciju u transdukciji ekstracelularnog signala sa receptora na »nizvodne« citoplazmatske protein kinaze. Nizvodno aktivirani različiti efektorni molekuli dovode do geneze signala za proliferaciju, diferencijaciju i inhibiciju apoptoze. Ras proteini pripadaju grupi G proteina, koji vezivanjem GTP/GDP nukleotida prelaze iz konformaciono aktivnog u neaktivno stanje i obrnuto. Naime, ras protein iz aktivnog stanja prelazi u neaktivno, hidrolizom vezanog GTP-a u GDP-a od strane GAP-a (»GTP-ase activating proteins«); aktivnošću GEF-a (»guanine nucleotide exchange factors«) odvaja se GDP i sa većim afinitetom vezuje se GTP, zbog svoje desetostruko veće količine u ćeliji (Buday i sar., 1993).

Ras proteini u ćelijama sisara, kodirani su od strane ras familije gena, koju čine tri člana: H-ras, K-ras i N-ras, a koja su redom locirana na hromozomima 11, 12 i 1 (Barbacid, 1987). Ras gene sisara, čine 4 egzona koja kodiraju 4 slična proteina p21, molekulske težine 21kDa i to: 188 aminokiselina poseduje K-RasB protein i 189 aminokiselina - H-ras, K-RasA, i N-Ras proteini. A i B izoforme K-Ras proteina rezultat su alternative obrade četvrtog egzona, pri čemu je količina A forme u ćeliji veća od B (Lowy i sar., 1993). Kritičan domen za GTP-aznu funkciju predstavljaju

prvih 165 aminokiselina na N terminusu Ras proteina. Poređenjem primarnih sekvenci Ras proteina, izdvajaju se tri regiona. Prvi region čine 84 aminokiseline, koje su potpuno identične kod različitih formi proteina. U ovom regionu leže Ras efektor vezujući domeni, od 32 do 40 i od 60 do 76 aminokiseline. To su kritična mesta za koja se vezuju svi targetni molekuli Ras proteina. Sledećih 80 aminokiselina, čini drugi region, koji pokazuje 85% homologiju između različitih formi proteina. Treći, hipervarijabilni region, startuje od 165 aminokiseline i ne pokazuje sličnost između različitih formi proteina, osim u konzerviranom motivu CAAX na C terminusu, a koji usmerava postranslacinu obradu. Asocijacija Ras proteina sa unutrašnjom stranom membrane omogućena je postranslacionom modifikacijom na C terminusu. P21-GTP aktivna forma proteina, mitogeni signal prenosi preko Raf/MAP/Erk kinaza do transkripcionih faktora, c-myc, c-jun i c-fos-a (Khosravi-Far i sar., 1998; Heidecker i sar., 1990) (Slika 1.20). Do onkogene aktivacije ras gena uglavnom dolazi usled tačkastih mutacija na kodonima 12, 13 i 61 (Barbacid, 1987). Mutacije na kodonima 12 i 13 povećavaju afinitet GTP-a u GTP vezujućem mestu, a mutacije na kodonu 61 sprečavaju GTP-aznu funkciju, odnosno vezivanje GAP-a. Mutacije, na kodonima 28, 116-119, 144 i 146, rezultuju nižim afinitetom Ras proteina prema GDP-u u odnosu na GTP (Walter i sar., 1986; Reinstein i sar., 1991). Bez obzira na poziciju, navedene mutacije, odražavaju se na aminokiselinski sastav, odnosno na konformaciju p21 proteina, koji formira stabilan kompleks sa GTP-om, tj. zadržava se u aktivnom stanju, konstantno inicirajući mitogeni signal. Mutacije u efektornim regionima, 32-40 i 60-76 u aminokiselinskom nizu, odražavaju se na konformaciju p21 proteina u GTP vezujućem mestu, a samim tim i na smanjen afinitet GAP-a (Adari i sar., 1988). Bez obzira da li se radi o onkogenim mutacijama koje onemogućavaju hidrolizu GTP-a, vezivanje GAP-a ili efektornim mutacijama, posledica je ista, p21 ostaje u trajno aktivnom stanju, što neprekidno generiše i prenosi transformišući signal na efektorne proteine.



Slika 1.20 Veza između EGFR i Ras proteina u signalnoj transdukciji. (preuzeto od The Oncologist, 2002; Vol 7. Suppl 4, 31-39)

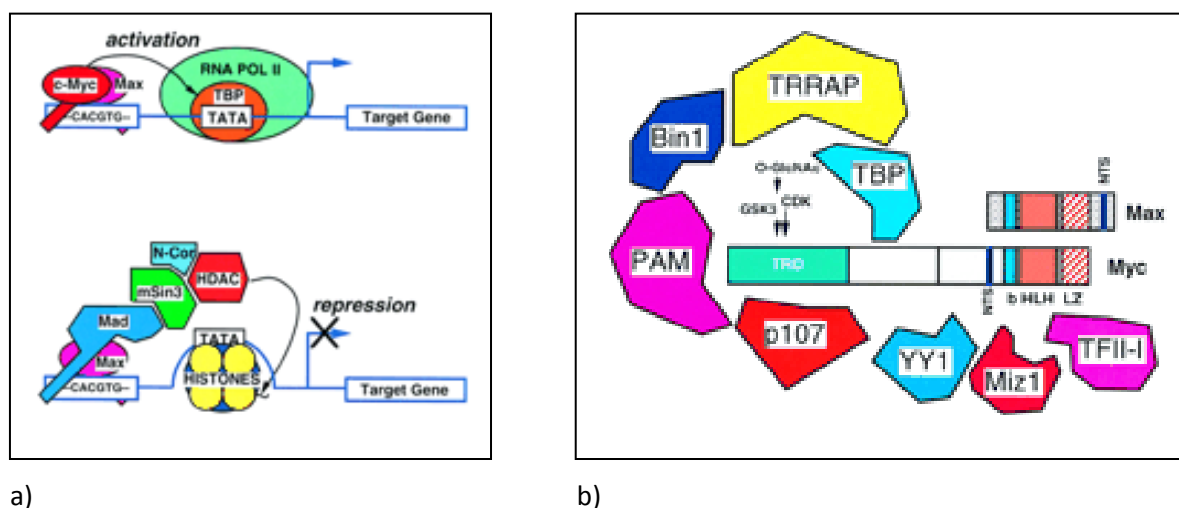
1.6.1.4 *c-Myc-gen, realizator proliferativnog signala*

Bez obzira, da li je onkogeno mutacija inicirala proliferativni signal na nivou faktora rasta, njihovih receptora ili citoplazmatskih kinaza, putevi vode ka jedru, odnosno transkripcionim faktorima onkogenog i antionkogenog potencijala.

Jedan od najvažnijih transkripcionih faktora onkogenog potencijala, uključen u regulaciju ekspresije 10-15% gena kod sisara, je *c-myc* gen (Hey-Jung i Levens, 2005). Ovaj podatak jasno ide u prilog činjenici da *c-myc* gen ima važnu ulogu u transaktivaciji brojnih gena čiji proteinski produkt, između ostalog, kontrolišu bazične ćelijske procese, kao što su stimulacija deobe, inhibicija terminalne diferencijacije i aktivacija apoptoze.

C-myc gen, lociran na 8q12.4, pripada porodici koju čine B-myc, L-myc, N-myc, s-myc i c-myc geni, a među njima L, N i c-myc geni mogu imati onkogeni potencijal (Henriksson i sar., 1996). Kodirajuću sekvencu c-myc gena čine tri egzona, pri čemu se drugi i treći visoko konzervirani egzoni, prevode počevši od CUG kodona (egzona 2) u c-myc1 protein i od nizvodno postavljenog AUG kodona u c-myc2 protein. C-myc2 protein koji podstiče ćelijski rast ima molekulsku masu od 64kDa i za 14 aminokiselina je kraći od izoforme c-myc1 koja ima 67kDa i inhibitornu ulogu (Hann i sar., 1994). U normalnim ćelijama koncentracija oba proteina menja se u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa, dok u tumorskim ćelijama dolazi do konstantne i povećane ekspresije c-Myc proteina.

Funkcionalno važne regione c-Myc proteina, predstavljaju njegov C i N terminus. N terminus čini transaktivacioni domen od 143 aminokiseline, dok C terminus čine aminokiseline od broja 355 do 439. C-myc protein formira heterodimer sa funkcionalno srodnim Max proteinom, pri čemu nastaje transkripcioni kompleks, Myc/Max, koji se vezuje za sekvencu CACGTG, promotora ili pojačivača ciljnih gena (Ferre-D'Amare i sar., 1993; Prendergast i sar., 1989) (Slika 1.21). Kompleks regulatornih proteina i transkripcionih faktora, čini mehanizam koji aktivira transkripciju gena koji uvode ćeliju u proliferaciju (McMahon i sar., 1998; Peukert i sar., 1997). Myc protein, pored stimulacije transkripcije određenih gena, vrši i represiju transkripcije gena za diferencijaciju, tako što se vezuje za njihove promotore. Direktna blokada gena za diferencijaciju i aktivacija gena za proliferaciju, rezultuje ćelijskim rastom i deobama (Smale i sar., 1989).



Slika 1.21 a) Transkripciona regulacija ciljnih gena od strane myc/max i max/mad dime
 b) Asocijacija različitih transkripcionih regulatornih proteina za transaktivacioni domen c-myc proteina (preuzeto od Dang, Mol Cell Biol., 1999; 19:1-11)

Ciljni geni, koji omogućavaju napredovanje kroz ćelijski ciklus ili ga stopiraju u G1 podfazi interfaze, a čiju ekspresiju c-myc reguliše, predstavljaju geni: promotori ćelijske proliferacije (*ciklin A, E, D1, D2, cdk4, cdc25A, cdc2, Id2*), represori ćelijskog rasta (*p15^{Ink4B}, p21^{Cip1}, gadd45 i gas1*) i induktori apoptoze (*p14^{arf}-Mdm2-TP53* signalni put) (Perez-Roger, 1997; Galaktionov, 1996; Rudolph i sar., 1996; Zindy i sar., 1998). Takođe, pojačano eksprimiran c-Myc protein može biti uključen u: regulaciju metabolizma favorizujući anaerobnu glikolizu, sintezu proteina (elongacioni faktori translacije, faktori transporta aminokiselina, ribozomalni proteini), inhibiciju sinteze atezivnih molekula (kolagen, tropomiozin i trombospondin, fibronektin) itd. (Rosenwald i sar., 1993; Brand i sar., 1997).

Najčešći oblik onkogene aktivacije c-myc-a je njegova amplifikacija.

1.7. Naučna osnova problema

Za sada ne postoje jedinstveni kriterijumi koji definišu šta je „čista“ odnosno histološki negativna hirurška margina, kao ni jedinstveni kriterijumi koji se odnose na hirurške margine OPK. Takođe, postoji kontroverza u pogledu uticaja statusa hirurških

marginata na prognozu bolesti i učestalost recidiva. U najvećem broju studija, margina se smatra „negativnom (čistom)“ ukoliko *ex tempore* dijagnoza pokaže da u graničnom tkivu nisu nađene maligne ćelije.

S obzirom na kontradiktorne podatke vezane za uticaj margina na ishod lečenja, koji su uslovljeni ograničenim dometom histopatološke analize, smatra se poželjnim ispitivanje graničnog tkiva i na molekularnom nivou. U studiji koja je objavljena 2002 godine ispitan je gen TP53, ključni kontrolor ćelijskog ciklusa, kao molekularni marker za detekciju rezidualnog karcinoma regiona glave i vrata, i utvrđena je povezanost prisustva mutacija sa histomorfološkim parametrima (Brakhuis i sar., 2002). I druge studije su pokazale da nakon kompletne resekcije tumora, u histološki, odnosno mikroskopski, „negativnim“ hirurškim marginama, mogu često da budu registrovane mutacije u TP53 genu. Pokazano je da je kod pacijenata sa prisustvom TP53 mutacija u marginama bio povećan rizik za razvoj lokalnog recidiva. Zbog toga bi trebalo, kod pacijenata sa promenama na molekularno-genetičkom nivou, sprovoditi mere intenzivnijeg postoperativnog praćenja, kao i razmotriti mogućnosti primene postoperativne zračne terapije i ciljane (target) terapije.

U stručnoj literaturi postoje i kontroverze koje se odnose na molekularni status histoloških margina OPK. Nedostatak većine studija koje se bave ovom problematikom je relativno mali broj pacijenata uključenih u analizu što vodi nepouzdanosti statistici. Iz tog razloga teško je donositi čvrste zaključke o značaju molekularnog statusa margina.

Nedostatak pomenutih studija je i taj da se većina njih bavi gotovo isključivo ispitivanjem mutacionog statusa TP53 gena, umesto da se paleta gena proširi s obzirom na kompleksnost procesa kancerogeneze.

U naučnoj literaturi ne postoje studije koje ispituju napred navedene onkogene u histološki negativnim marginama OPK. Nameće se potreba za temeljnom studijom operativnih margina oralnih planocelularnih karcinoma na molekularnom nivou. Pored već pomenutog TP53, geni koje treba uključiti u studiju su onkogeni ErbB2 (koji kodira transmembranski glikoprotein sa tirozin kinaznom aktivnošću) zatim H- ras gen (čiji produkt ima funkciju u transdukciji ekstracelularnog signala sa receptora na nizvodne citoplazmatske protein kinaze) i konačno c-myc gen (čiji produkt spada među najvažnije transkripcione faktore uključene u transaktivaciju brojnih gena).

Potrebno je ispitati da li genetičke alteracije utiču na nepovoljan tok bolesti i loš ishod, tj. kraću stopu petogodišnjeg preživljavanja, odnosno da li neka od alteracija može da predstavlja pokazatelj tumorskog ponašanja.

Pomenuti onkogeni zauzimaju bitno mesto u složenom procesu kancerogeneze, pa bi se tako modifikacijom njihove aktivnosti mogao postići protektivni efekat na dalji razvoj tumora.

Ukoliko se alteracije u pomenutim onkogenima izdvoje i kao prediktori loše prognoze i lošeg ishoda lečenja kod bolesnika koji ih nose, može se razmotriti primena ciljane (target) terapije. Ona bi mogla biti usmerena ka blokadi pomenutih receptora i signalnih puteva.

2. CILJ

Cilj ovog istraživanja bio je određivanje molekularno-genetičkog statusa histološki negativnih margina oralnog planocelularnog karcinoma kroz analizu mutacija gena koji igraju ključnu ulogu u malignoj transformaciji ćelije, i utvrđivanje značaja molekularno-genetičkog statusa u proceni ishoda lečenja.

Da bi se cilj ovog istraživanja ostvario formulisani su sledeći zadaci:

- Utvrditi učestalost tačkastih mutacija u egzonima 5 i 7 *TP53* gena u histološki negativnim marginama OPK
- Utvrditi učestalost tačkastih mutacija u kodonima 12 i 13 *H-ras* gena u histološki negativnim marginama OPK
- Analizirati prisustvo amplifikacije *c-erbB2* gena u histološki negativnim marginama OPK
- Analizirati prisustvo amplifikacije *c-myc* gena u histološki negativnim marginama OPK
- Utvrditi stepen povezanosti promena u molekulu DNK sa anamnestičkim parametrima, stadijumom bolesti, histološkim gradusom, dubinom invazije, recidivima i stopom preživljavanja

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorak ispitanika

Istraživanje u vidu prospektivne studije je obuhvatilo 50 pacijenata sa histopatološki verifikovanim OPK koji su operisani na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu tokom 2007 i 2008 godine.

3.2. Klinička ispitivanja

Ispitanici su bili anamnestički obrađeni na dan prijema u bolnicu.

Svi pacijenti su popunjavali formular koji se odnosi na njihovu saglasnost da budu uključeni u studiju (u prilogu). Obavešteni su o prirodi i ciljevima ove studije, putem informatora (u prilogu). Prethodno su upoznati sa tim da mogu da se povuku iz studije u bilo kom trenutku bez predrasuda prema njihovom daljem tretmanu.

Za evidenciju podataka prikupljenih u toku istraživanja korišćeni su istraživački kartoni (u prilogu). Analizirani su sledeći parametri:

- Anamnestički podaci:
 - porodična anamneza i lična anamneza
 - period od prvih subjektivnih tegoba do operativnog zahvata
 - loše navike

Porodična anamneza na karcinome je zabeležena kao pozitivivna samo u prvoj liniji srodstva. Ukoliko je postojao karcinom kod prvostepenog srodnika porodična anamneza se smatrala „pozitivnom“. Beleženo je da li pacijenti konzumiraju duvan ili ne, kao i prosečan dnevni broj popušenih cigareta (istraživački karton u prilogu).

U pogledu konzumiranja alkohola analizirano je da li pacijent konzumira žestoka alkoholna pića ili ne, kao i dužina konzumiranja alkohola.

- Klinički nalaz:
 - precizna lokalizacija tumora
 - veličina tumora
 - prisustvo uvećanih limfnih čvorova vrata
 - TNM klasifikacija

TNM klasifikacija je detaljno određena za svakog pacijenta pojedinačno na osnovu klasifikacije Američke asocijacije za borbu protiv karcinoma iz 2002 godine (u prilogu).

- Histopatološka analiza
 - histološki gradus tumora
 - dubina invazije tumora,
 - histopatološka analiza limfnih čvorova vrata
- Epidemiološki pokazatelji
 - Stopa petogodišnjeg preživljavanja
 - Pojava recidiva

3.3. Molekularno-genetička istraživanja

Posle uklanjanja tumora (makroskopski do u zdravo tkivo) eksidirano je granično tkivo sa najmanje jednog mesta oko tumora. Materijal je prosleđivan u histopatološku laboratoriju Stomatološkog fakulteta. Kada je histopatološka verifikacija pokazala da u graničnom tkivu nema prodora malignih ćelija, pristupalo se daljoj molekularno genetičkoj analizi „graničnog tkiva“. Molekularno genetička analiza vršena je na uzorku graničnog tkiva perifernije od linije resekcije. Prilikom ekscizije graničnog preparata, na uputu za histopatološki pregled obeležavana je precizna lokalizacija ekscidiranog graničnog preparata.

Molekularno genetičko istraživanje je obavljeno u Laboratoriji za molekularnu genetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu i obuhvatilo je sledeće postupke:

- izolacija DNK iz svežeg tkiva,
- reakcija lančanog umnožavanja ciljnih segmenata gena (PCR-polymerase chain reaction)
- skrining mutacija u TP53 i H-ras genima PCR- SSCP metodom (konformacioni polimorfizam jednolančane DNK)
- analiza amplifikacije c-myc i c-erb B2 gena metodom diferencijalnog PCR-a i real-time PCR.

3.3.1. Izolacija DNK iz svežeg tkiva tumorske margine

- Materijal graničnog tkiva tumora bio je tretiran digestivnim puferom – TNE (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 25mM EDTA) sa proteinazom K u finalnoj koncentraciji 200 μ g/ml i SDS u finalnoj koncentraciji 1%. Čelijski talog je preko noći inkubiran na 37°C. Ovim postupkom su razbijene čelijske i jedarne membrane.
- Tretman fenol/hloroform/izoamil alkoholom ekstrahuje DNK i prevodi je iz organske u vodenu fazu.
- DNK je precipitirana u apsolutnom etanolu sa 3M Na-acetatom, a zatim je talog opran u 70% etanolu sa ciljem da se uklone soli.
- Suv talog DNK rastvoren je u dH₂O.
Koncentracija DNK uzoraka određivana je spektrofotometrijski

3.3.2. PCR- Lančane reakcija polimeraze

PCR tehnika predstavlja "*in vitro*" reakciju umnožavanja unapred definisanog regiona DNK, primenom dizajniranih prajmera, nukleotida i termostabilne Taq-polimeraze u prisustvu jona Mg. Amplifikacija ciljne sekvence DNK omogućena je

Primenom PCR tehnike dobijeni su produkti koji su potom metodom SSCP i direktnim sekvenciranjem analizirani na prisustvo "point" mutacija, dok je primenom diferencijalnog PCR-a utvrđeno prisustvo genske amplifikacije.

3.3.3. PCR- SSCP metoda-konformacioni polimorfizam jednolančane DNK

Metoda se zasniva na činjenici da jednolačana DNK u nenedenurišućoj sredini ima konformaciju koja je bazirana na nukleotidnom sastavu analiziranog fragmenata, pa se tako svaka promena primarne strukture direktno odražava na sekundarnu strukturu, tj. na njegovu konformaciju i elektroforetsku pokretljivost.

Postupak SSCP se odvija u sledećim koracima:

- Priprema PCR amplifikata za SSCP putem mešanja sa formamidom-denaturišućim agensom (95% formamid, 20mM EDTA, 0.05% ksilencijalno (XCY), 0.05% bromfenol plavo (BPB), zatim sledi denaturacija na 96°C, 6 min., naglo hlađenje na ledu i nanošenje na nenedenurišući gel.
- U zavisnosti od kvaliteta PCR amplifikata, na gel je nanošeno od 5 do 7 µl amplifikata resuspendovanog u 7-10 µl formamida.
- U postupku su korišćeni 10-12% nenedenurišući PAA gelovi u zavisnosti od dužine praćenog amplifikata. Elektroforeza je izvođena na +4°C pod naponom od 400-700V u trajanju od 4-6 sati u 0.5-1XTBE puferu. Svaki uzorak je testiran najmanje dve puta u različitim eksperimentalnim uslovima sa ciljem da se sa visokom pouzdanošću dobiju reproducibilni rezultati. Nakon elektroforeze gelovi su bojeni Ag NO₃.

U cilju eliminisanja lažno pozitivnih rezultata u SSCP metodi, svaki amplifikat je proveravan na 8% PAA gelu, da bi se procenio kvalitet dobijenih traka, odnosno da bi se selektovali amplikoni bez dodatnih, tzv. nespecifičnih traka. Delimičnom izmenom uslova PCR reakcije, a koja se ogledala u izmeni koncentracije jona Mg²⁺, stvoreni su specifični amplifikati i kod onih uzoraka, koji su u prethodnim PCR reakcijama, pokazivali nespecifičnost. Takođe, lažno pozitivni rezultati su eliminisani, putem ponavljanja SSCP metode, najmanje dva puta, na istoj seriji amplikona, dobijenih u nezavisnim PCR reakcijama. Problem u SSCP analizi mogu da predstavljaju i lažno negativni rezultati, koji su posledica ograničenosti same metode, a koja se donekle može

prevazići variranjem eksperimentalnih uslova, da bi se dobila što pouzdanija informacija o prisustvu tačkastih mutacija. Iz tog razloga, svaki amplikon je najmanje dva puta proveravan u određenoj kombinaciji eksperimentalnih uslova, da bi se potvrdila reproducibilnost kako pozitivnih tako i negativnih rezultata. Takođe, prilikom određivanja SSCP profila tokom svake elektroforeze, pored testiranih uzoraka suspektnih na „point“ mutacije, na gelove su nanošeni i najmanje dva amplikona dobijena putem amplifikacije normalne genomske DNK (DNK izolovana iz krvi zdrave osobe), da bi se sa što većom sigurnošću detektovale "ekstra" trake, pokazatelji mutantnih konformacija sa izmenjenom migracijom u PAA gelu.

3.3.4. Diferencijalni PCR i analiza nivoa amplifikacije

Polazeći od podatka da je amplifikacija osnovni mehanizam onkogene aktivacije c-erbB2 i c-myc gena u ćelijama solidnih tumora, u ovoj studiji testiran je amplifikacioni status oba gena. Određen je primenom metode diferencijalnog PCR-a (dPCR), tako što se simultano amplifikuju ciljani gen (c-myc ili c-erbB2) i referentni, kontrolni gen (D2R-dopamin receptor gen), koji je uvek prisutan u jednostrukoj dozi u genomu ("*single copy gene*"). Svi analizirani uzorci najmanje su dva puta testirani putem dPCR-a. D2R gen, predstavlja internu kontrolu na osnovu koje je određen amplifikacioni nivo c-erbB2 i c-myc gena, putem poređenja fluorescence i debljine traka kod svakog analiziranog uzorka. Tačnije, ovo poređenje fluorescence (bojenja) i debljine traka, obavljeno je na dva načina: vizuelno, od strane dva nezavisna posmatrača i primenom kompjuterskog programa-Scion image. Softverska obrada podataka sastojala se u markiranju traka, merenju broja piksela c-erbB2/c-myc i D2R trake i u prikazu rezultata, u vidu procentualnog iznosa, na osnovu poređenja izmerenih vrednosti. Uzimajući u obzir vizuelni utisak i konkretne numeričke relacije, svi analizirani karcinomi kod kojih je procentualni odnos broja piksela traka koje su poređene, bio veći od 25%, kategorisani su kao karcinomi sa c-myc ili c-erbB2 amplifikacijom. Takođe, kod nekih uzoraka kontrolna, D2R traka, posedovala je višestruko jaču fluorescencu od c-myc i c-erbB2 traka, što se može okarakterisati kao delecija, aberacija koja ukazuje na genomsku nestabilnost prisutnu u graničnom tkivu.

3.3.5 Real Time PCR metoda

Real time PCR je metoda koja predstavlja kombinaciju standardne PCR amplifikacije i fluorimetrije.

Za real time kvantifikaciju se koriste dva pristupa:

- (1) boje koje se specifično vezuju za dvolančanu DNK (dsDNK boje)
- (2) specifične, fluorescentnim bojama obeležene probe

U ovom radu korišćen je prvi pristup i boja "Syber Green". Tokom PCR reakcije boja se vezuje za nosintetisane molekule DNK, što rezultuje povećanjem fluorescencije. Nivo fluorescencije se očitava nakon svakog ciklusa, a odgovarajući program omogućava praćenje tih vrednosti na monitoru računara (praćenje reakcije u realnom vremenu). Pošto tokom PCR reakcije dolazi do nagomilavanja dvolančanih produkata, u jednom trenutku se dostiže „kritični“ nivo fluorescencije i ona počinje eksponencijalno da raste. Broj ciklusa u kojima se to dešava zavisi od početnog broja kopija gena u uzorku. Uz svaku seriju uzoraka koji se analiziraju postavlja se i standardna kriva, odnosno nekoliko uzoraka u kojima je poznat početni broj kopija gena (koncentracija DNK).

Međutim, boje se vezuju za svaku dvolančanu DNK, uključujući i nespecifične produkte PCR reakcije kao i dimere prajmera. Radi isključivanja nespecifičnih produkata analiziraju se krive topljenja produkata PCR reakcije (22–24). Naime, svaki gen ima karakterističnu temperature topljenja koja se definiše kao ona temperatura na kojoj je denaturisano 50% molekula. Oblik i pozicija krive topljenja su određeni veličinom DNK fragmenta i brojem GC u odnosu na broj AT baznih parova.

3.4. Statistički testovi

Prilikom utvrđivanja prisustva korelacije između različitih kliničkih, histopatoloških parametara i mutacionog statusa tumor supresornog gena TP53 i onkogeni c-myc, H-ras i c-ERB B2, korišćeni su statistički testovi: Fisher exact test i Chi-kvadrat test i Studentov T test.

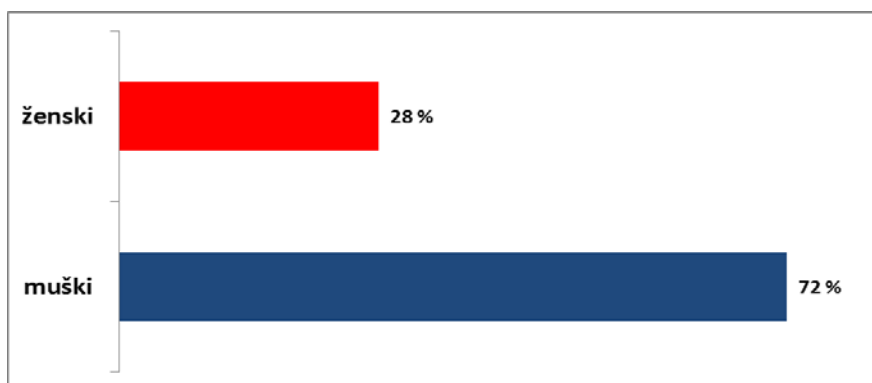
Podaci su obrađeni u odgovarajućim programima M. Excell, M. Accesses, a parametri su upoređeni statističkim testovima. Statistička analiza je urađena pomoću *Fisher's exact* i Hi kvadrat testa. Stopa petogodišnjeg preživljavanja je analizirano Kaplan Majerovim testom. Razlike u krivama preživljavanja su određena *log-rank* testom. Statistička značajnost je iznosila $p < 0.05$. Korišćen je program *Software package SPSS ver.18*.

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Stomatološkog Fakulteta.

4. REZULTATI

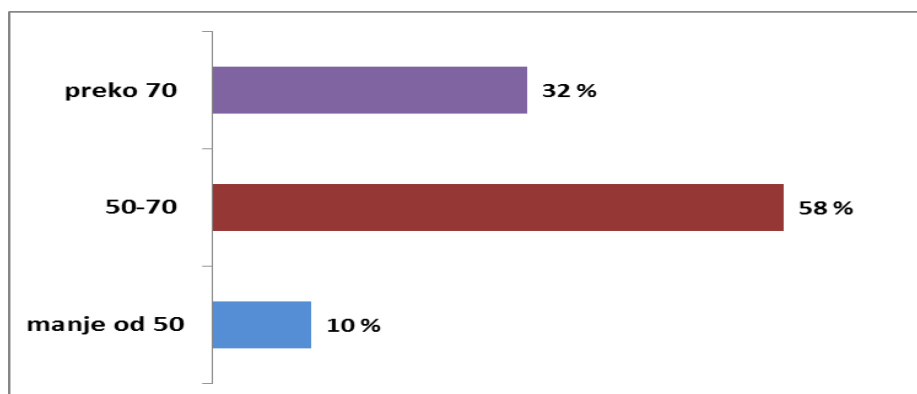
4.1. Ispitanici

U našem uzorku distribucija OPK u odnosu na pol bila je sledeća: 36 pacijenata (72%) je bilo muškog pola a 14 pacijenata je bilo ženskog pola (28%) (grafikon br.4.1).



Grafikon br 4.1 Distribucija OPK prema polu

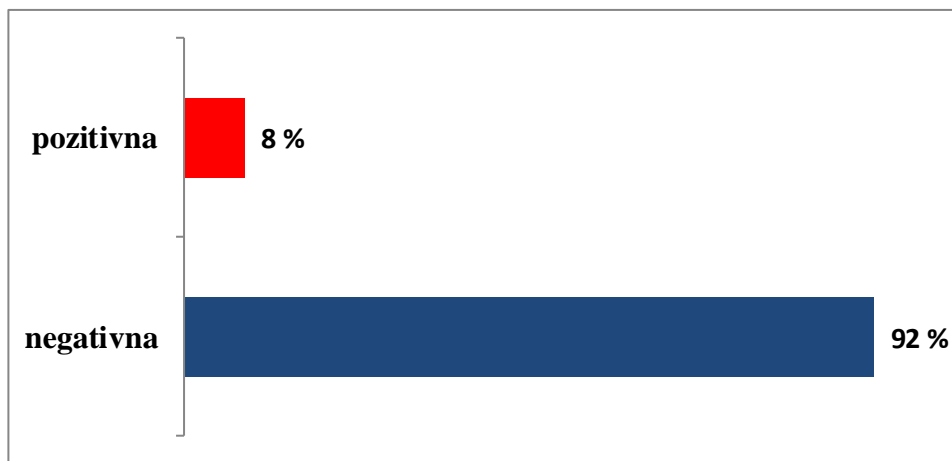
U odnosu na godine starosti OPK je najčešće detektovan kod pacijenata između 50 i 60 godina starosti – ukupno 29 pacijenata (58%), dok je preko 70 godina starosti bilo 16 pacijenata (32%), a 10% pacijenata je bilo mlađe od 50 godina (grafikon br. 4.2).



Grafikon 4.2 Distribucija OPK u odnosu na godine starosti

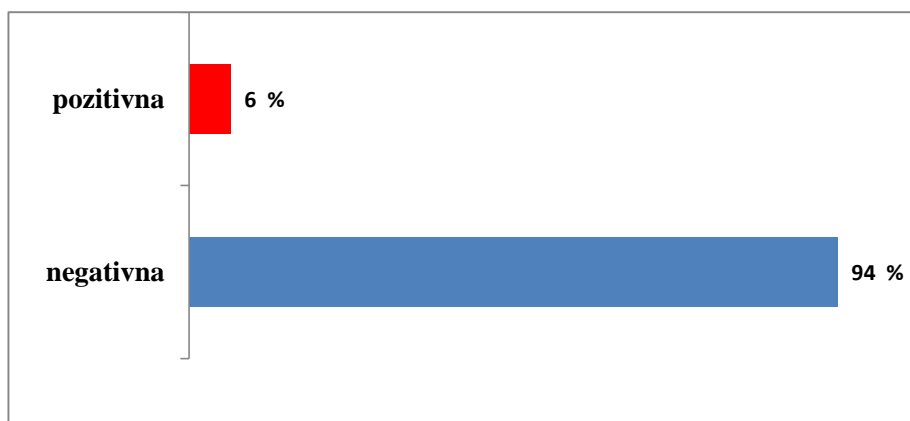
4.2. Anamnestički parametri

Podaci o porodičnoj i ličnoj anamnezi prikazani su na grafikonima br. 4.3 i 4.4. U užoj porodici ispitanika (prvi stepen srodstva) karcinom je zabeležen kod svega četiri pacijenta (8 %) – tj. u toj grupi je bila prisutna pozitivna porodična anamneza na karcinom usne duplje (grafikon br.4.3).



Grafikon br. 4.3 Distribucija OPK pacijenata u odnosu na porodičnu anamnezu

Prema podacima iz lične anamneza, kod 2 pacijenta je registrovano prisustvo karcinoma druge regije, tj. komorbiditeta. (4%) (grafikon br. 4.4).

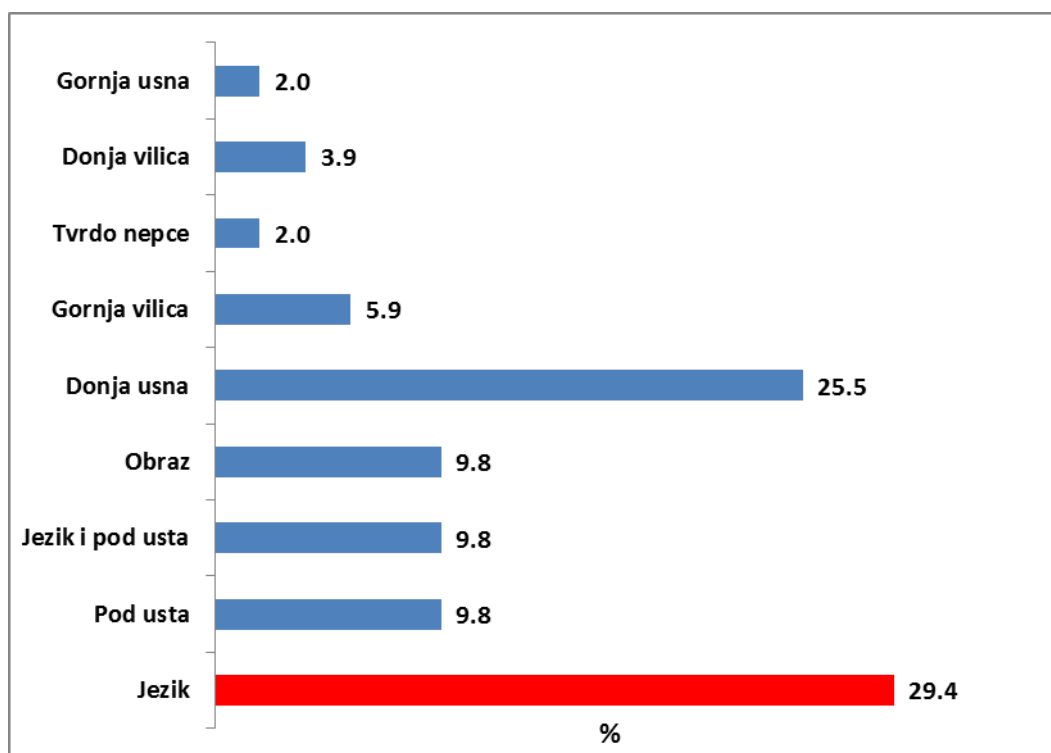


Grafikon br. 4.4 Distribucija OPK u odnosu na ličnu anamnezu

4.3. Klinički parametri

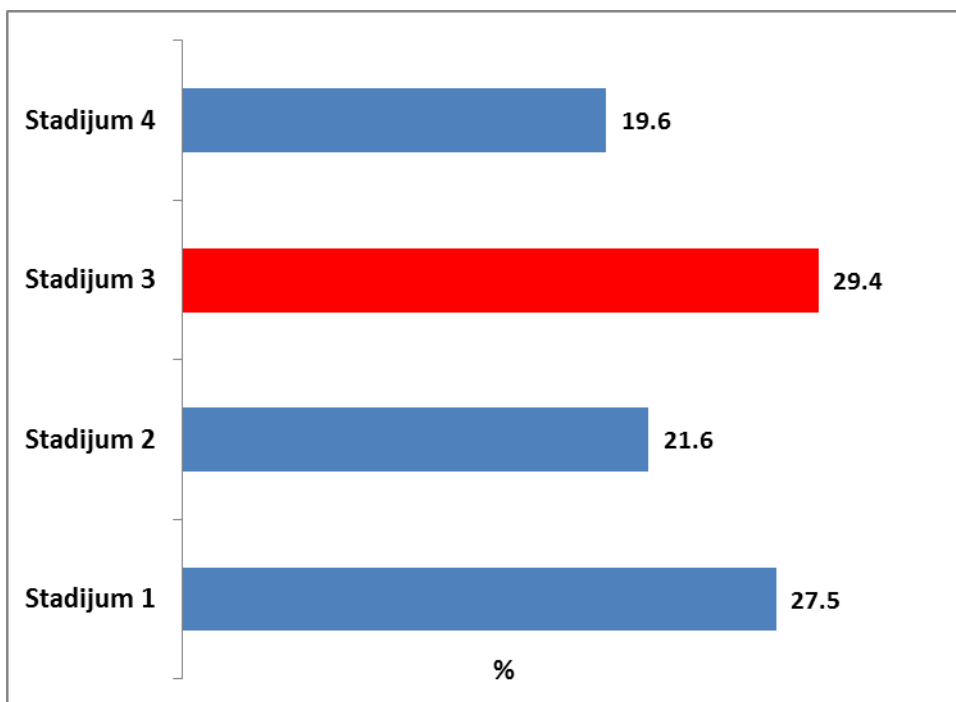
4.3.1. Lokalizacija i stadijum OPK

Od ukupnog broja analiziranih karcinoma usne duplje, najveći broj bio je lokalizovan na jeziku - 15 (30%), zatim na donjoj usni - 13 (26%), podu usta i jezika, podu usta i sluzokože obraza sa podjednakom zastupljenošću - 5 (10%), sluzokoži gornje vilice – 3 (6%), sluzokoži zubnog nastavka donje vilice - 2 (4%), dok se na poslednjem mestu po zastupljenosti nalaze sluzokoža tvrdog nepca i sluzokoža gornje usne - 1 (2%) (grafikon br. 4.5; crvenom bojom je obeležena najveća učestalost). Grafikonima br. 4.5 i br. 4.6 predstavljena je distribucija OPK u odnosu na lokalizaciju i stadijum tumora.



Grafikon br. 4.5 Učestalost OPK prema lokalizaciji

Opadajuća procentualna distribucija OPK u odnosu na stadijum je sledeća: stadijum 3 – 15 ispitanika (30%), zatim sledi stadijum 1 – 14 ispitanika (28%), stadijum 2 – 11 ispitanika (22%) i stadijum 4 – 10 ispitanika (20%)(grafikon br.4.6).



Grafikon br. 4.6 Distribucija OPK u odnosu na stadijum bolesti

4.3.2. Status limfnih čvorova vrata

Od ukupnog broja analiziranih pacijenata, kod 23 ispitanika limfni čvorovi vrata nisu evaluirani histopatološkim pregledom (46%), kod 13 ispitanika nije utvrđeno prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (26%), dok je kod 14 pacijenata histopatološkim pregledom dokazano prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (28%). U tabeli br. 4.1 prikazan je status limfnih čvorova vrata.

Tabela br. 4.1 Status limfnih čvorova vrata

nisu evaluirani	23 (46%)
Nisu nađene metastaze	13 (26%)
Prisutne metastaze	14 (28%)

4.4. Faktori rizika

Prema upitniku, u našem uzorku 28 ispitanika je konzumiralo duvan (56 %). U grupi pacijenata pušača, u odnosu na broj popušanih cigareta u toku dana najviše je bilo ispitanika koji su konzumirali od 20 do 40 cigareta dnevno – 13 ispitanika (26 %). U odnosu na dužinu pušačkog staža, najviše je bilo ispitanika koji su konzumirali duvan preko 20 godina – 21 ispitanik (42%). Nađeno je da 34 (68 %) ispitanika nije konzumiralo alkohol. U pogledu dužine konzumiranja alkohola 10 (20 %) pacijenata navodi da konzumira alkohol preko 20 godina (tabela br. 4.2.).

Tabela br. 4.2 Loše navike

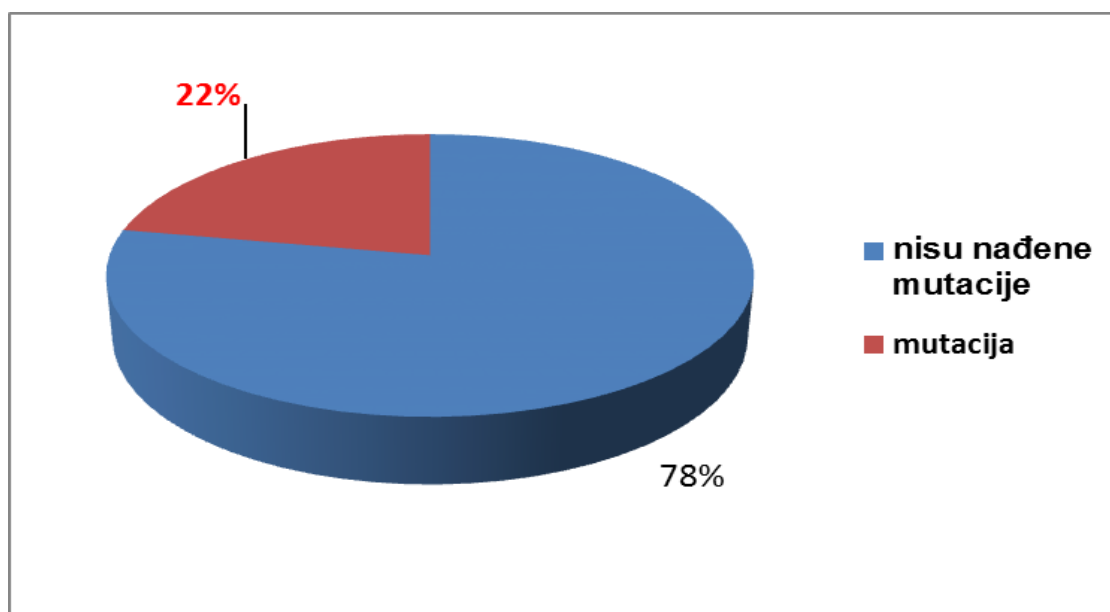
Loše navike		Učestalost
Pušenje	Da	28 (56%)
	Ne	22 (44%)
Broj popušanih cigareta	do 20 cigareta dnevno	9 (18%)
	od 20 do 40 cigareta dnevno	13 (26%)
	više od 40 cigareta dnevno	6 (12%)
Pušački staž	10 do 20 godina	8 (16%)
	više od 20 godina	21 (42%)
Žestoka alkoholna pića	ne pije	34 (68%)
	povremeno	8 (16%)
	često	3 (6%)
	redovno	5 (10%)
Dužina konzumiranja alkohola	Manje od 5 godina	2 (4%)
	Između 5 i 10 godina	2 (4%)
	između 10 i 20 godina	4 (8%)
	Preko 20 godina	10 (20%)

4.5. Genetički parametri

Analizom mutacionog statusa histološki negativnih margina 50 planocelularnih karcinoma usne regije ustanovljena je relativno visoka učestalost alteracija koja je u zavisnosti od ispitivanog gena varirala između 12 i 30 %.

4.5.1 Mutacije u TP53 genu

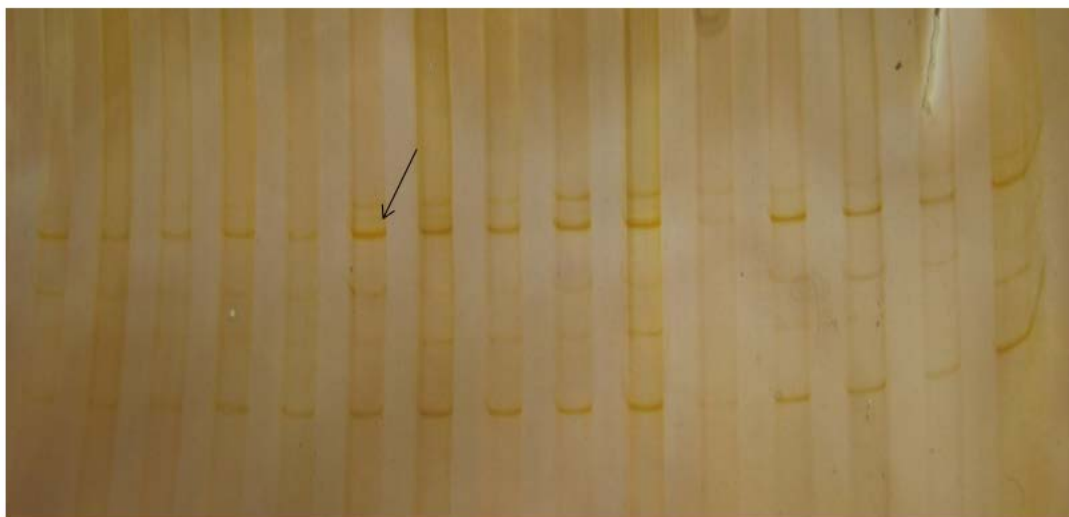
Učestalost mutacija u TP53 genu u histološki negativnim marginama OPK iznosila je 22% (11 pacijenata). Učestalost mutacija u egzonu 5 gena TP53 bila je 14 %, odnosno mutacije su nađene kod 7 pacijenata (Slika 4.1). Učestalost mutacija u egzonu 7 iznosila je 10 %, odnosno mutacije su detektovane kod 6 pacijenata.



Grafikon br 4.7 Učestalost mutacija u genu TP53

Na grafikonu br. 4.7. prikazana je učestalost mutacija u genu TP53 u histološki negativnim marginama kod pacijenata sa dijagnostikovanim OPK.

Kod 2 pacijenta (4%) su detektovane mutacije istovremeno i u egzonu 5 i u egzonu 7 TP53 gena.

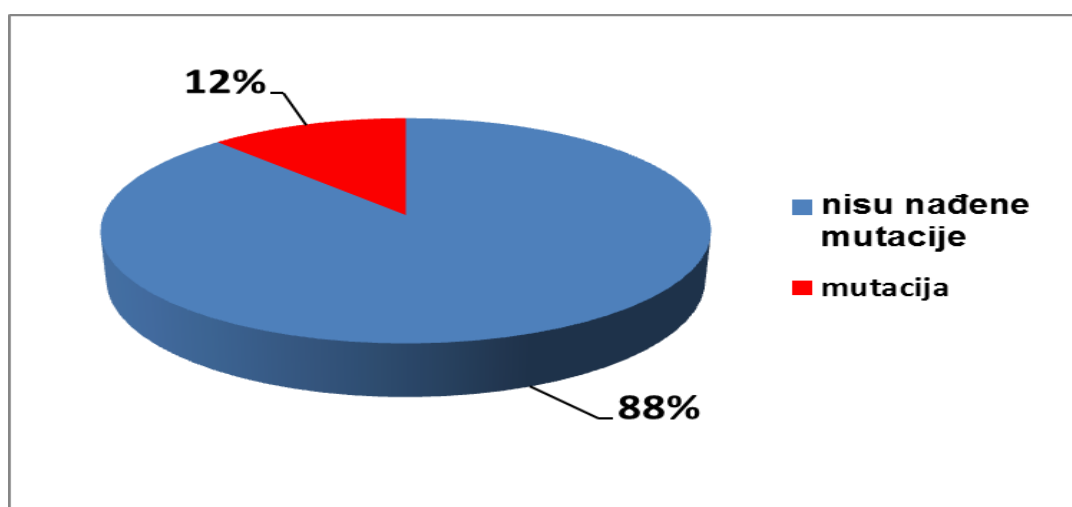


Slika 4.1 SSCP, egzon 5 p53 gena

4.5.2 Mutacije u H-ras genu

Mutacije u genu H-ras detektovane su kod 5 od 42 ispitanika (12 %) (Slika 4.2).

Na grafikonu br. 4.8. prikazana je učestalost mutacija u genu H-ras u histološki negativnim marginama kod pacijenata sa dijagnostikovanim OPK.

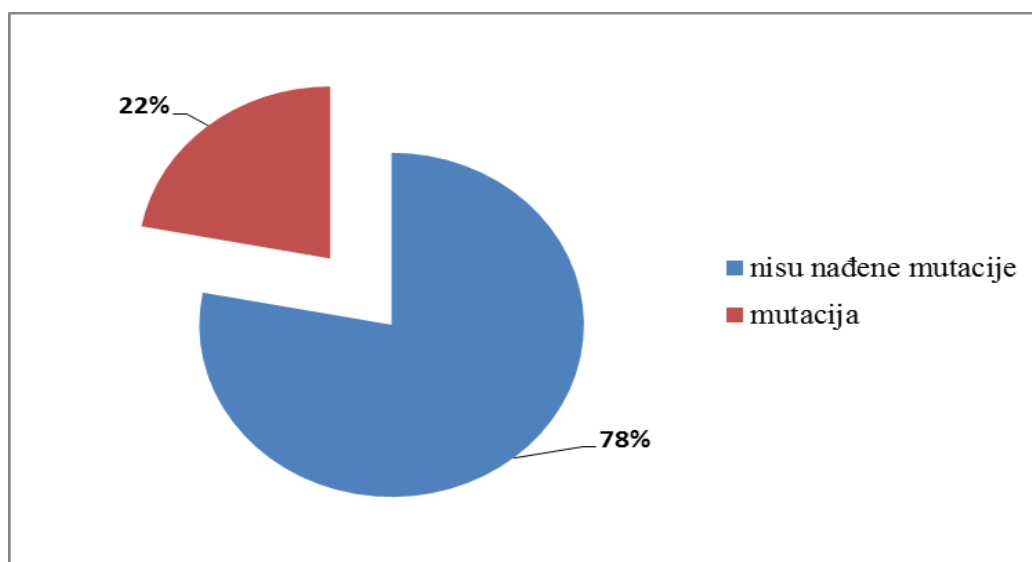


Grafikon br 4.8. Učestalost mutacija u H-ras genu

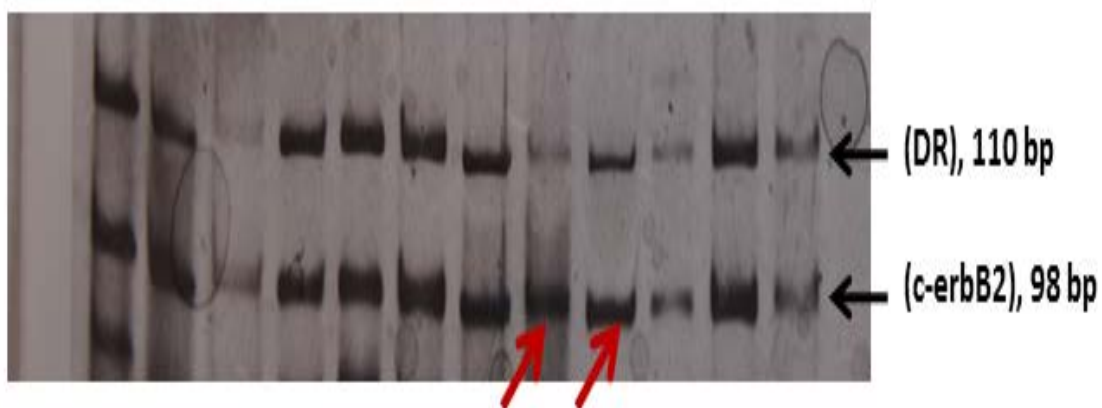
4.5.3. Analiza nivoa amplifikacija c-erb-B2 gena

Nivo amplifikacije c-erb B2 gena varirao je od slučaja do slučaja, što se jasno vidi na osnovu različite debljine traka na fotografiji poliakrilamidnog gela (Slika br. 4.2) kao i na histogramu generisanom na real-time PCR aparatu (Slika br. 4.3). Svi uzorci koji su pokazivali više od 2,5 puta nivo c-erbB2 gena u odnosu na kontrolu smatrani su pozitivnim na amplifikaciju. Ona je detektovana kod 11 pacijenata odnosno u 22 % slučajeva.

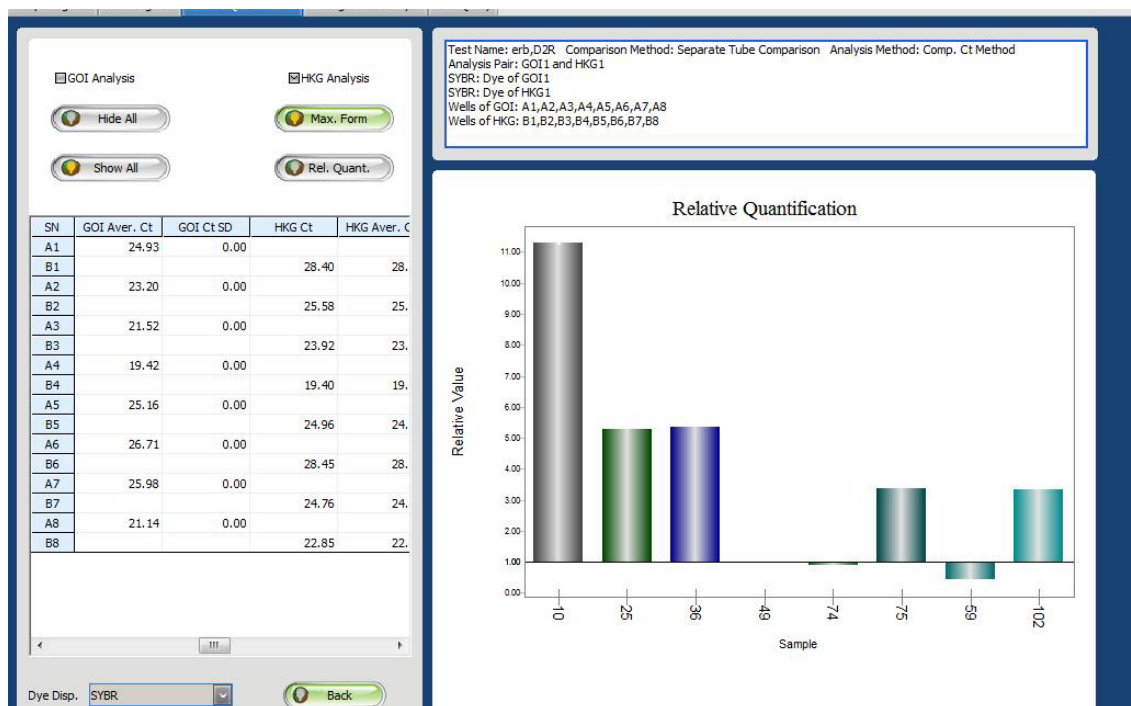
Na grafikonu br. 4.9. prikazana je učestalost amplifikacije c-erb B2 gena u histološki negativnim marginama kod pacijenata sa dijagnostikovanim OPK.



Grafikon br 4.9 Učestalost amplifikacija c-erb B2 gena



Slika br 4.2 d PCR, c ERB B2 amplifikacija, strelica označava pojačanu amplifikaciju gena



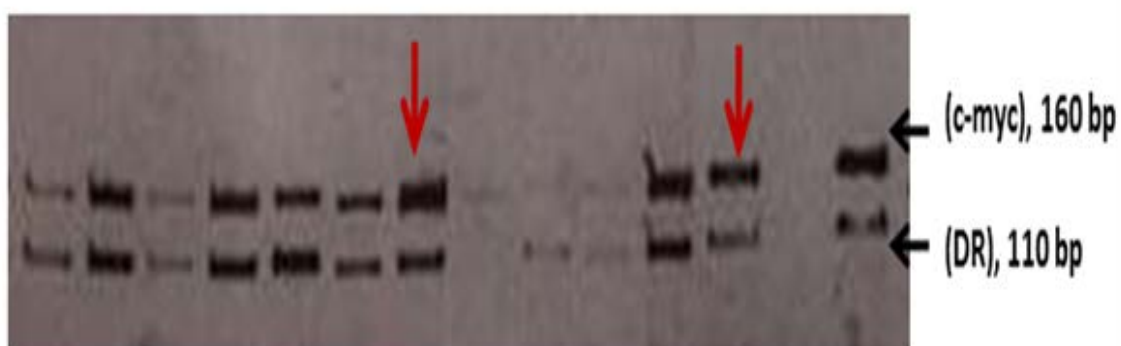
Slika br 4.3 Relativna kvantitativna analiza c-erbB2 gena.

+ amplifikacija – uzorci: 10, 25, 36, 75, 102

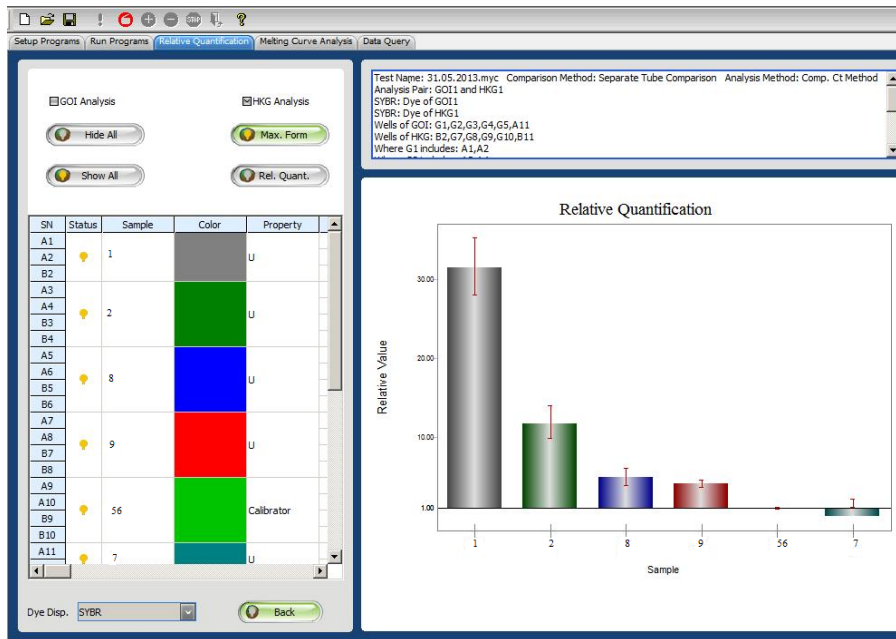
– amplifikacija – uzorci: 74, 59

4.5.4. Analiza nivoa amplifikacije c- Myc gena

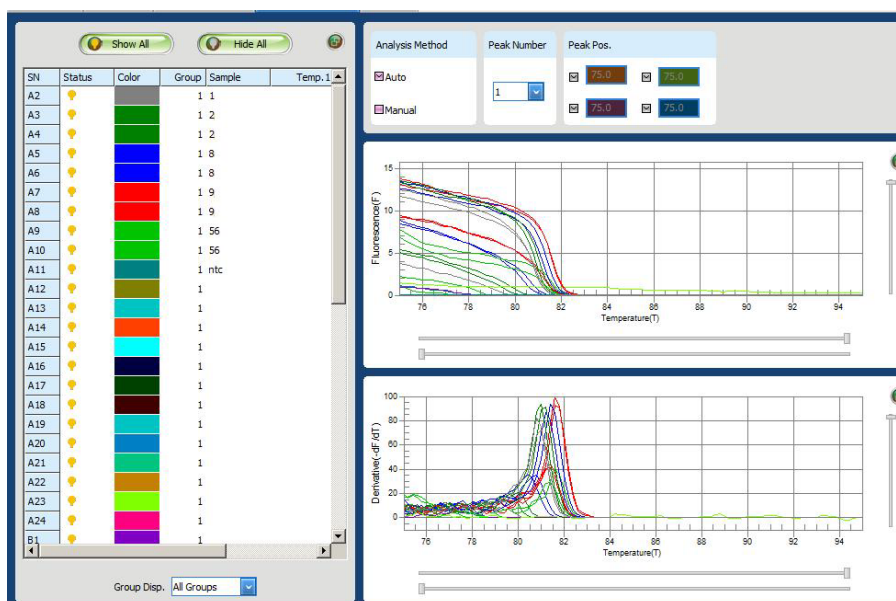
Kao i kod erb gena, i u slučaju myc gena nivo amplifikacije je bio prilično varijabilan od slučaja do slučaja što je takođe jasno ilustrovano različitom debljinom traka nakon dPCR (Slika br. 4.4), odnosno odgovarajućim histogramom dobijenim putem real-time PCR aparatu. (Slika br 4.5). Sveukupno, amplifikacija c-myc onkogeneta, detektovana je kod 15 od 50 pacijenata odnosno u 30% slučajeva. I ovde je važilo isto pravilo kao i za erb gen da nivo amplifikacije pređe prag od 2,5 puta u odnosu na kontrolni gen.



Slika br. 4.4. dPCR, strelice na slici prikazuju mesta pojačane amplifikacije C MYC gena



a)



b)

Slika br 4.5 Rezultati c-myc gena

a) Relativna kvantitativna analiza c-myc gena

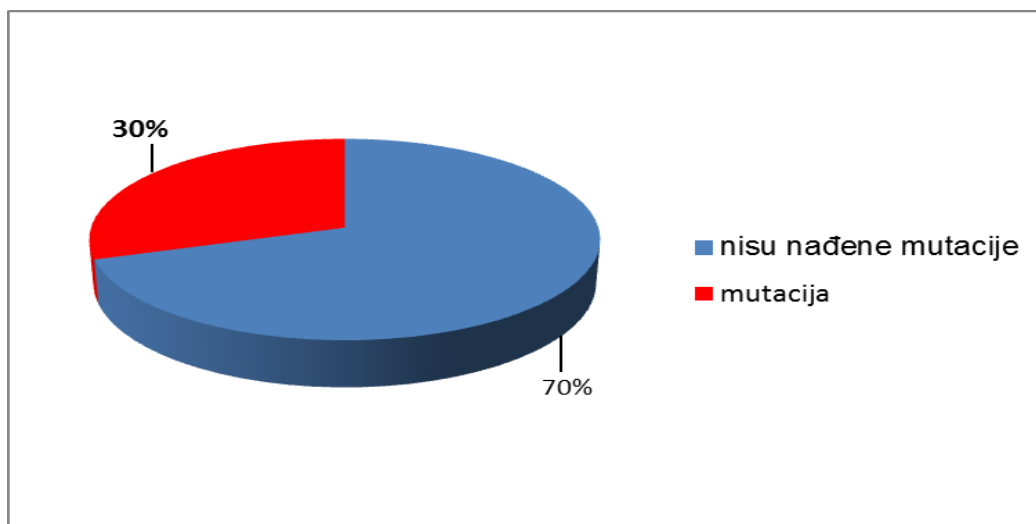
+ amplifikacija – uzorci: 1, 2, 8, 9

– amplifikacija – uzorci: 7

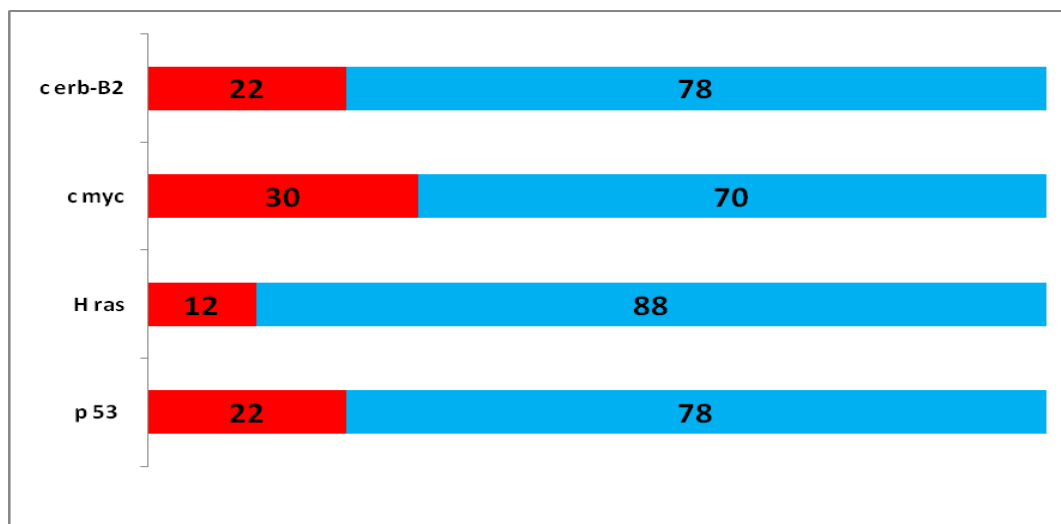
b) Krive topljenja PCR produkata c-myc i D2R gena

U grafikonu br. 4.10. prikazana je učestalost amplifikacije c-myc gena u histološki negativnim marginama kod pacijenata sa dijagnostikovanim OPK.

Grafikon br 4.10 Učestalost amplifikacija c-myc gena



Komparativna učestalost mutacija u TP53, H-ras, c-myc i c ERB B2 gena prikazana je na grafikonu 4.11.



Grafikon 4.11 Procentualna zastupljenost analiziranih genskih alteracija
* crveno - mutacije; plavo - bez mutacije

4.6. Uporedna analiza rezultata

4.6.1. Analiza genetičkih i anamnestičkih parametara

Uporednom analizom distribucije mutacija gena TP53, H-ras, c-myc i c-erb B2 u odnosu na pol utvrđeno je da c-Myc amplifikacija bila statistički značajno zastupljenija u muškom polu (Pearson, $\chi^2 = 0.028^*$) ($p < 0.05$). Mutacije u genu TP53 bile su statistički značajno češće prisutne u populaciji osoba preko 70 godina starosti (pearson, $\chi^2 = 0.035^*$) ($p < 0.05$). Suprotno tome, mutacija u H-ras genu bila je statistički značajno prisutnija u populaciji mlađoj od 70 godina starosti (Pearson, $\chi^2 = 0.046^*$) ($p < 0.05$). Mutacije u c-erb B2 i c-myc genu nisu pokazale statističku značajnost u odnosu na uzrast (Tabela 4.3.). Začuđujući su podaci o većoj učestalosti mutacija u TP53 genu kod nepušača nego kod pušača, a najverovatnije objašnjenje za ovaj nelogičan rezultat su netačni podaci koje su pacijenti dali o svojim životnim navikama.

4.6.2. Genetički i kliničko-patohistološki parametri

Korelacijom mutacija u genima TP53, H-ras, c-myc, c-Erb B2 i histološkog gradusa ustanovljeno je da je najveći broj mutacija pomenutih gena identifikovan u marginama kod pacijenata sa histološkim gradusom II planocelularnog karcinoma, ali bez statističke značajnosti. Upoređivanjem stadijuma tumora i prisustva mutacija u pomenutim genima nije zabeležena statistička značajnost.

Tabela 4.3 Distribucija pacijenata sa mutacijom u TP53, HER-2, c-myc i H-ras genu prema anamnestičkim parametrima

	Broj	TP53	p	No.	C erb B2	p	No.	c-myc	p	No.	H-ras	p
	50	11		50	11		50	15		42	5	
Pol												
Muški	36	8		36	8		36	14		31	4	
Ženski	14	3	0.951	14	3	0.951	14	1	0.028*	11	1	0.737
godine)												
Do 50	5	1		5	1		5	2		4	2	
50-70	29	3		29	7		29	9		23	2	
preko 70	16	7	0.035*	16	3	0.911	16	4	0.801	15	1	0.046*
Duvan												
da	28	3		28	7		28	9		22	1	
ne	22	8	0.03*	22	4	0.563	22	6	0.709	20	4	0.122
Alkohol												
da	35	5		35	2		35	7		13	2	
ne	14	6	0.205	14	9	0.333	14	8	0.092	29	3	0.641

Tabela br 4.4. Korelacija učestalosti pacijenata sa mutacijama u TP53, HER-2, c-myc and H-ras

	No.	TP53	P	No.	c ERB B2	p	No.	c-myc	p	No.	H-ras	p
	50	11		50	11		50	15		42	5	
Histološki gradus												
1	13	5		13	2		13	5		12	1	
2	31	5		31	7		31	9		24	3	
3	6	1	0.25	6	2	0.675	6	1	0.617	6	1	0.868
Stadijum												
I	14	3		14	4		14	4		11	1	
II	11	2		11	2		11	2		11	2	
III	15	4		15	1		15	6		11	2	
IV	10	2	0.958	10	4	0.222	10	3	0.692	9	0	0.547
Limfni čvorovi												
Nisu evaluirani	23	2		23	2		23	7		22	4	
Bez metastaza	13	6		13	5		13	4		9	0	
Metastaze	14	3	0.033*	14	4	0.092	14	4	0.99	11	1	0.345

4.6.3 Korelacija kliničkih, anamnestičkih, histopatoloških i genetičkih parametara u odnosu na ishod bolesti

U odnosu na ishod bolesti nije utvrđena statistički značajna razlika među polovima i starosnim grupama pacijenata (Tabela br. 4.5).

Prisustvo karcinoma u porodičnoj i ličnoj anamnezi nije uticalo na ishod lečenja. Takođe, korelacijom lične i porodične anamneze u odnosu na karcinom i onih koji su preminuli i preživeli nije ustanovljena statistička značajnost. (Pearson, $\chi^2 = 0.162$ (pearson, $\chi^2 = 0.108$) ($p < 0.05$).

Ustanovljena je nešto veća prosečna dubina invazije u grupi pacijenata koji su umrli (7.12) u odnosu na grupu pacijenata koji su živi (6.04).

Učestalost mutacija c-erb B2 gena je statistički značajno veća u histološki negativnim marginama bolesnika sa OPK koji su umrli u odnosu na žive. (Pearson, $\chi^2 = 0.033^*$) ($p < 0.05$).

Prisustvo mutacija TP53 gena, c Myc gena i H ras gena u histološki negativnim marginama bolesnika sa OPK nije uticalo na ishod lečenja ($p=0.305$; $p=0.782$; $p=0.559$)

Poređenje statusa limfnih čvorova vrata i stadijuma tumora nije bilo u statistički značajnoj vezi sa ishodom lečenja (Pearson, $\chi^2=0.39$ (Pearson, $\chi^2=0.47$) ($p<0.05$).

Svi izneseni rezultati uporedne analize prikazani su na tabeli 4.5.

4.6.4. Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja

Polazeći od trenutka postavljanja dijagnoze OPK kod pacijenata koji su operisani na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta, praćena je dužina preživljavanja u korelaciji sa mutacionim statusom TP53, c-myc, c-erb2 i H-ras gena.

Stopa petogodišnjeg preživljavanja pacijenata koji su oboleli od OPK a koji su bili uključeni u istraživanje iznosila je 36%.

Na osnovu praćenja bolesnika sa OPK u toku 5 godina, dobijene su stope njihovog petogodišnjeg preživljavanja u funkciji mutacionog statusa ispitivanih gena u histološki negativnim marginama. Može se konstatovati da je 5-godišnji period preživljavanja u zavisnosti od prisustva i odsustva mutacija u analiziranim genima bio sledeći: TP53+/TP53- (55%/30%), c-myc+/c-myc- (35%/35%), c-erbB2+/c-erbB2-(10%/43%) i H-ras+/H-ras-(20%/37%) (Tabela 4.6). Iako se može zapaziti nešto niža stopa preživljavanja kod pacijenata sa mutacijama u H-ras genu ona nije statistički značajna (Grafikon 4.12)

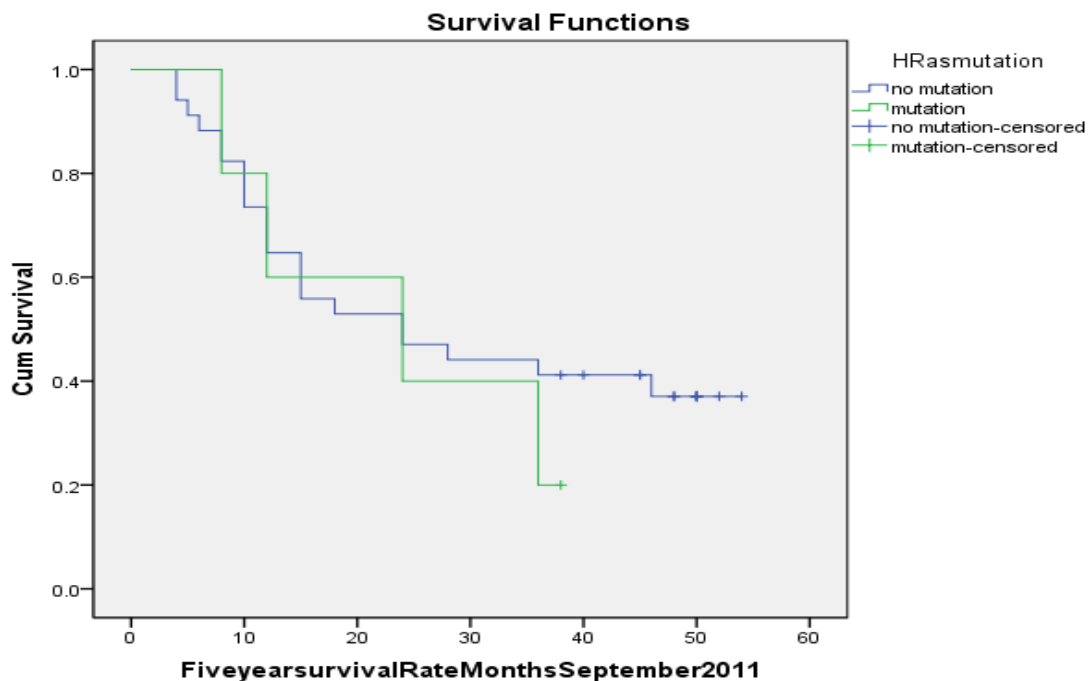
Pacijenti sa amplifikacijom c-myc gena ne pokazuju razlike u stopi petogodišnjeg preživljavanja u odnosu na pacijente kod kojih nije detektovana promena (Grafikon 4.13). Međutim, pacijenti koji su imali amplifikaciju c-erbB2 gena imali su statistički značajno kraće preživljavanje od pacijenata koji nisu imali tu gensku abnormalnost ($p=0.002^*$) (Grafikon 4.14). Prisustvo mutacija u TP53 genu nije se odrazilo na dužinu preživljavanja pacijenata (Grafikon 4.15),

Tabela br 4.5 Pregled anamnestičkih, kliničkih i histopatoloških parametara u odnosu na ishod lečenja

Varijable		živ	mrtav	P
Pol	muški	13	21	0.634
	ženski	4	9	
Uzrast		64 ± 13.32	62.27 ± 9.79	0.561
Porodična anamneza na karcinome	pozitivna	3	1	0.108
	negativna	14	27	
Lična anamneza na karcinome	pozitivna	0	3	0.162
	negativna	17	25	
Prosečna dubina tumorske invazije		6.04	7.12	
TP53 mutacija	ne	12	25	0.305
	da	5	5	
HER-2 mutacija	ne	16	20	0.033*
	da	1	10	
C Myc mutacija	ne	12	20	0.782
	da	5	10	
H ras mutacija	ne	13	21	0.559
	da	1	4	
Status limfnih čvorova vrata	Nisu evaluirani			0.39
	Bez metastaza	7	14	
	metastaza	3	9	
	metastaza	7	7	
Stadijum	I	7	7	0.475
	II	4	5	
	III	4	10	
	IV	2	7	

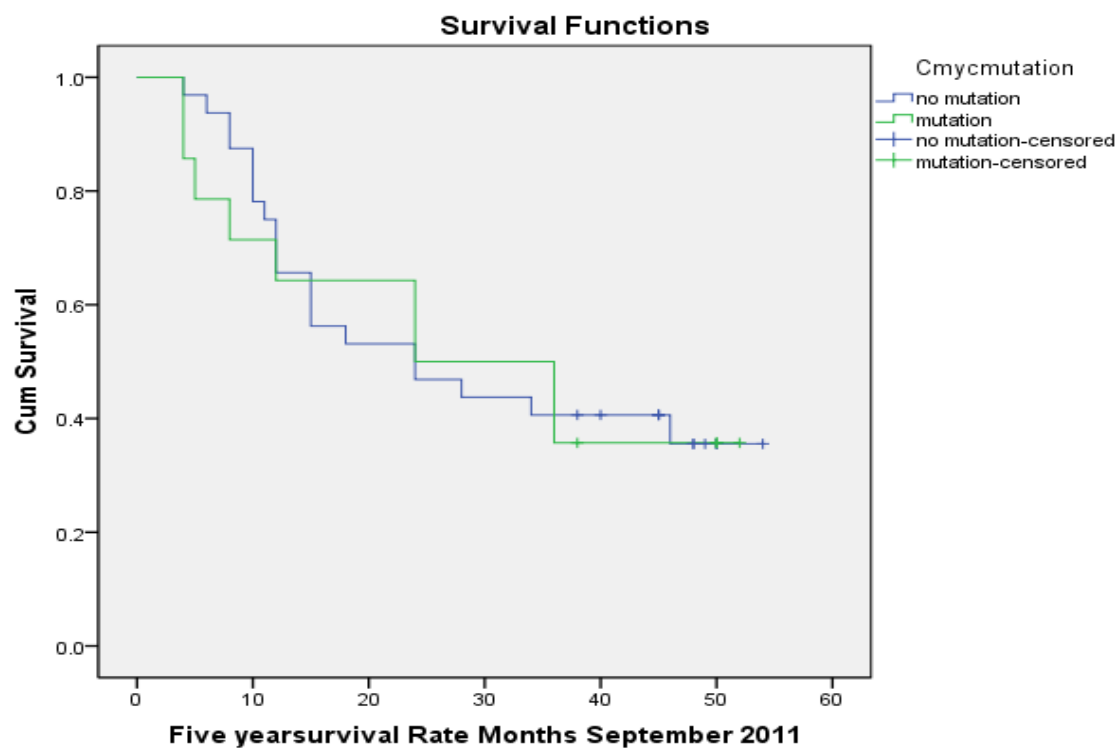
Tabela br 4.6 Preživljavanje bolesnika tokom 5 godina praćenja i mutacioni status gena

preživljavanje/godišnje - 5 godina		1. godina	2.godin a	3.godin a	4.godin a	5.godin a	p
Ukupno		65.2%	47.8%	39.1%	35.9%	35.9%	/
Pol	muški	66.7%	51.5%	39.4%	39.4%	39.4%	0.57
	ženski	61.5%	38.5%	38.5%	19.2%	19.2%	
TP53 mutacija	ne	70.3%	51.4%	35.1%	30.07%	30.07%	0.19
	da	77.8%	66.7%	55.7%	55.7%	55.7%	
c-erb B2 mutacija	ne	83.3%	66.7%	47.2%	42.9%	42.9%	0.002*
	da	30%	20%	10%	10%	10%	
c myc mutacija	ne	75%	46.9%	40.06%	35.5%	35.5%	0.938
	da	64.3%	50%	35.7%	35.7%	35.7%	
H ras mutacija	ne	64.7%	47.1%	41.2%	37.1%	37.1%	0.559
	da	80%	60%	20%	20%	20%	

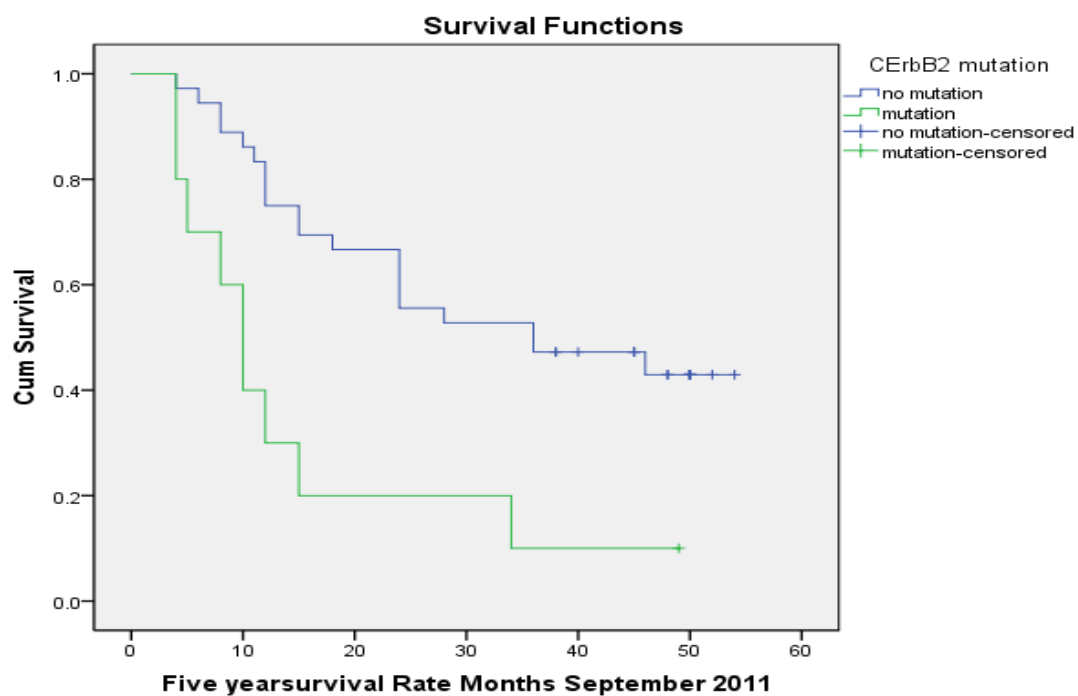


Grafikon br.4.12 Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja za H- Ras gen

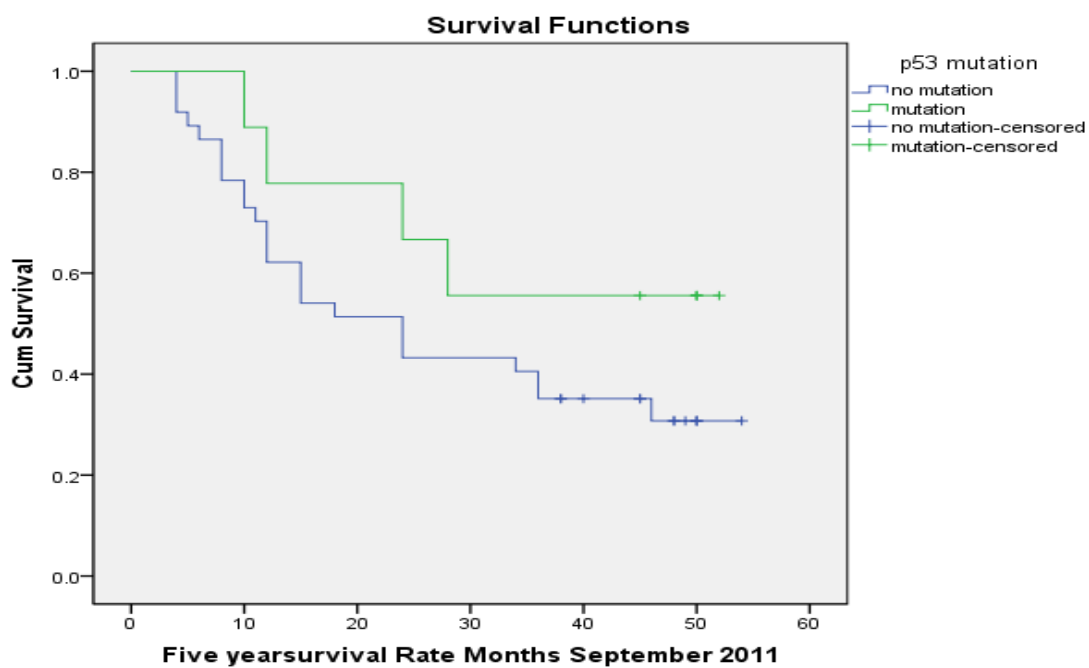
Da bi se utvrdila razlika u preživljavanju na osnovu prisustva, odnosno odsustva mutacija kod 4 gena (TP53, c-myc, c-erb2 i H-ras) primenjen je statistički test, Log-Rank. Kod pacijenata sa višim stadijumom bolesti i većim histološkim gradusom zabeležena je niža stopa petogodišnjeg preživljavanja, ali bez statističke značajnosti (Grafikon br 4.16)



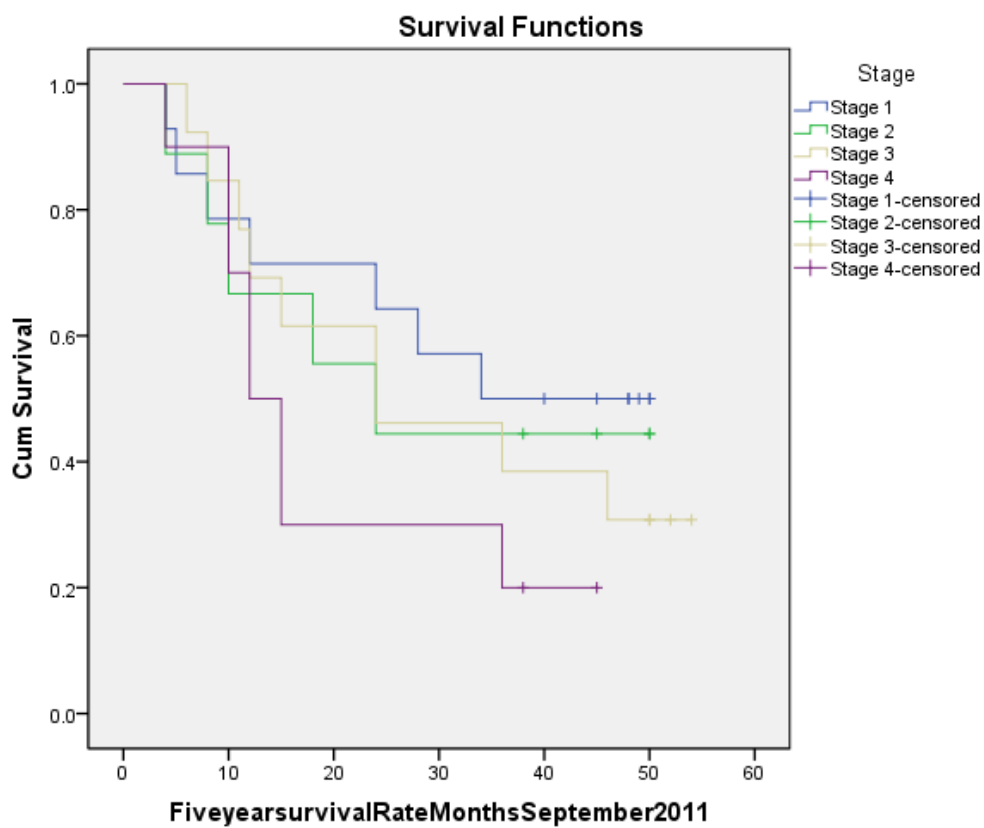
Grafikon br.4.13 Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja za gen C-Myc



Grafikon br.4.14 Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja za c-Erb B2 gen



Grafikon br.4.15 Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja za TP53 gen



Grafikon br.4.16 Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja za stadujum bolesti

4.6.5. Genetički parametri i učestalost recidiva

Komparativnom analizom, utvrđeno je da su bolesnici kod kojih je nađena amplifikacija c-erb B2 u histološki negativnim marginama OPK imali veću učestalost recidiva (pearson, $\chi^2 = 0.017$). Bolesnici kod kojih je identifikovana mutacija u TP53 genu razvijali su recidiv u 6 % slučajeva, što nije bilo statistički značajno (pearson, $\chi^2 = 0.103$) ($p < 0.05$) (Tabela br 4.7).

Tabela br 4.7 Distribucija recidiva u odnosu na genetičke parametre

		Bez recidiva	recidiv	P
TP53 mutacija	ne	34	4	0.103
	da	7	3	
C erbB2 mutacija	Ne	35	3	0.017*
	Da	6	4	
C myc mutacija	Ne	29	5	0.427
	Da	12	2	
H ras mutacija	ne	30	7	0.287
	da	5	0	

5. DISKUSIJA

Tokom proteklih dvadesetak godina, objavljen je veliki broj studija koje se bave molekularnim mehanizmima patogeneze malignih tumora čoveka i mutacionom analizom onkogenih i tumorsupresornih gena. Postoji takođe i veliki broj radova u čijem fokusu su oralni karcinomi i molekularne promene koje se u njima događaju. U centralne gene uključene u kancerogenezu koji su najčešća meta promena, a samim tim i predmet istraživanja spadaju između ostalih i TP53, H-ras, c-myc i c-erbB2. Njihova uloga je dokazana i u oralnim planocelularnim karcinomima (Popović i sar., 2010).

Paralelno sa fundamentalnim istraživanjima molekularnih mehanizama u osnovi maligne transformacije ćelije, tražila se i veza između molekularnih promena i ponašanja tumora. Dugi niz godina ulagali su se veliki napori u pronalaženje genetičkih markera koji će sa većom dozom pouzdanosti od TNM kategorizacije i histološkog gradusa tumora, moći da predvide rizik od recidiviranja i metastaziranja tumora. Više od četvrt veka traga se za čvrstom vezom između genetičkih alteracija u tumorskom tkivu i fenotipa tumora. Pre desetak godina se započelo i sa ispitivanjem mutacionog statusa tumorskih margina, kao potencijalnog prediktora evolucije tumora. Međutim, vrlo je zanimljivo da je ta analiza bila ograničena na TP53 gen.

Ovo je prva studija tumorskih margina oralnih planocelularnih karcinoma koja se bavi detekcijom mutacija u tri onkogenih (H-ras, c-myc i c-erb2), pored analize promena u pomenutom TP53 tumorsupresornom genu, pa je nemoguće podatke dobijene u ovim istraživanjima porediti sa literaturnim, u pogledu njihovog praktičnog značaja u predikciji ponašanja OPK.

Postoje studije koje su se bavile mutacionim statusom u planocelularnim karcinomima, ali je u njima uglavnom analiziran mutacioni status, udruženo, larinksa, farinksa i usne duplje, tj. gornjeg dela aerodigestivnog trakta, za razliku od ove studije gde je predmet istraživanja isključivo sluzokoža usne duplje. Ovo je značajno jer je poznato da su efekti glavnih faktora rizika za pojavu planocelularnog karcinoma različiti u zavisnosti od toga na koju regiju deluju.

Ova studija imala je za cilj šire povezivanje molekularnih promena sa faktorima rizika, sa kliničkom slikom, epidemiološkim i drugim parametrima relevantnim za lekara hirurga, koje bi unapredilo njegovo sagledavanje bolesti i pacijenta.

Ovo povezivanje kliničkih i histopatoloških karakteristika analizirane grupe karcinoma, etioloških faktore sa mutacionim statusom četiri gena kao i povezivanje molekularnih promena sa preživljavanjem pacijenata, dalo je rezultate koji naglašavaju određene aspekte patogeneze planocelularnog karcinoma usne duplje.

Nekontrolisan proliferativni signal može biti iniciran na membrani od strane faktora rasta ili/i njihovih receptora, koji se dalje preko intraćelijskih proteina prenosi preko citoplazmatskih kinaza do transkripcionih faktora u nukleusu. Iz tog razloga za ovu studiju odabran je c-erbB2/H-ras/c-myc signalni put.

Onkogeni mutacija može aktivirati proliferativni signalni mehanizam, ali on ne mora da dovede do neoplastične transformacije ukoliko su u ćeliji prisutni normalni tumorsupresorni geni, čiji će produkti blokirati progresiju ćelijskog ciklusa. To nas je navelo da u ovoj studiji ispitamo i mutacioni status jednog od ključnih tumorsupresornih gena, TP53 gena, glavnog kontrolora ćelijskog ciklusa, u histološki negativnim marginama OPK.

Mutacije u egzonima 5 i 7 TP53 gena detektovane su u 22% histopatološki negativnih margina kod pacijenata sa dijagnostikovanom OPK. U studiji genetičkih alteracija OPK koja je sprovedena u srpskoj populaciji mutacije u egzonima 5 i 7 bile su dominirajuće (Popović i sar., 2007), i zbog tog razloga su ova dva egzona TP 53 gena ispitivana i u ovoj studiji. S druge strane, činjenica da su samo ta dva egzona odabrana, može da objasni to što je naša učestalost mutacija nešto niža u odnosu na literaturne podatke.

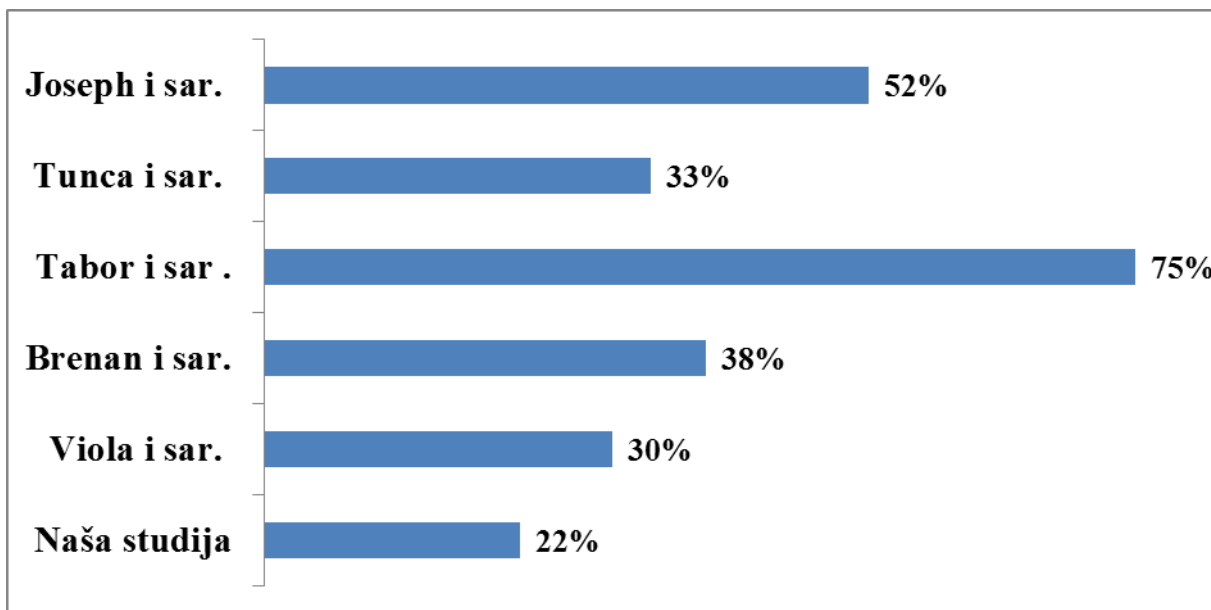
U studiji iz 2002 godine na 30 pacijenata, mutacije u TP53 genu u histološki negativnim marginama detektovane su u 30% slučajeva, što je slično rezultatima dobijenim u ovom ispitivanju (Viola i sar., 2002). Najčešće se mutacije u genu TP53 kod pacijenata sa OPK događaju u egzonima 5-8. Mutacije koje se dešavaju van egzona 5-8 gena TP53 nisu karakteristične za planocelularne karcinome glave i vrata (Brenan i sar., 1995). Pomenuti autori su pokazali da TP53 mutacija može biti identifikovana i u

tumoru i u hirurškoj margini. Brennan i sar. su našli učestalost TP53 mutacije od 38 % u hirurškim marginama, koje su histopatološki bile negativne. U studiji Tunca-e i saradnika, TP53 mutacija detektovana je u hirurškim marginama kod 33,3% pacijenata koji su imali mutaciju u uzorku primarnog tumora (Tunca i sar., 2007). U pomenutoj studiji u postoperativnom periodu praćenja od 30 meseci nije zabeležen recidiv, ali je zabeležena pojava jedne udaljene metastaze kod pacijenta kod koga je detektovana TP53 mutacija u histološki negativnoj margini. U studiji Josepha i saradnika iz 1995 godine TP53 mutacija su identifikovane u 52 % histološki negativnih margina kod planocelularnih karcinoma glave i vrata (Joseph i sar., 1995) . Za razliku od prethodnih studija, Tabor i saradnici su dokazali prisustvo mutacija čak u 75 % hirurških margina kod pacijenata koji su imali mutaciju TP53 gena u tumoru (Grafikon 5.1.) (Tabor i sar., 2001).

U našoj grupi ispitanika, dva pacijenta kod kojih je identifikovana mutacija i u egzonu 5 i u egzonu 7 imali su značajno manje preživljavanje u odnosu na grupu pacijenata bez mutacija.

U studiji Virole i saradnika TP53 gen kao molekularni marker u hirurškim marginama karcinoma glave i vrata korelisan je sa njihovim morfološkim osobinama (Viola i sar., 2002). U marginama u kojima je ustanovljeno prisustvo mutiranog TP53 gena, na histomorfološkom nivou detektovane su različite vrste displazija, minimalno invazivnog karcinoma kao i prekancerozne lezije.

Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti ispitanika sa mutacijom u egzonu 5 i 7 gena TP53, između grupa sa različitim stadijumom bolesti (pearson, $\chi^2 = 0.958$).



Grafikon br 5.1 Učestalost mutacija TP53 gena u literaturi i našoj studiji

U studiji Josepha i saradnika vršena je molekularna procena limfnih čvorova i utvrđene su mutacije i u limfnim čvorovima u kojima histopatološki pregled nije pokazao znakove maligniteta (Joseph i sar., 1995). Brennan i sar. su u svojoj studiji pokazali da je nakon histopatološkog pregleda 33 limfna čvora na vratu kod pacijenata sa OPK samo u 5 (15%) nađeno prisustvo metastaza, a molekularnim tehnikama dokazano je prisustvo TP53 mutacija u 11 limfnih čvorova od preostalih 28 u kojima histopatološki nisu dokazane maligne ćelije (Brennan i sar., 1995). Prema Američkom udruženju za rak (American Joint Committee on Cancer) u tim slučajevima vrši se prekvalifikacija stadijuma tumora. Smatra se da patolozi mogu prevideti karcinom u ranom stadijumu na nivou regionalnih limfnih čvorova. Zbog toga je primena molekularnih tehnika, kao dodatna analiza, nedvosmisleno indikovana u proceni statusa limfnih čvorova kod pacijenata sa planocelularnim karcinomom glave i vrata, i trebalo bi u budućnosti da bude uvedena u svakodnevnu kliničku praksu.

Učestalost mutacija TP53 gena u samim planocelularnim karcinomima glave i vrata varira od 30%-70%, u zavisnosti od metodologije koja se koristi za procenu statusa TP53 gena u tumorskom tkivu, tipa tumorskog materijala kao i njegove

heterogenosti (Alsner i sar., 2001; Brennan i sar., 1995; Cabelguenne i sar., 2000; Gillison i sar., 2000; Ko i sar., 2001; Temam i sar., 2000; Bergh i sar., 1995). Smatra se da je glavni razlog variranja učestalosti TP53 mutacija izloženost različitim faktorima rizika u posmatranim populacionim grupama (Blons i sar., 2003).

U već pomenutoj studiji Tunca (Tunca i sar., 2007), nije nađena statistička značajnost u pogledu prisutva mutacija TP53 gena u odnosu na lokaciju tumora, TNM status, histopatološki gradus, invaziju hrskavice, perineuralnu i vaskularnu invaziju kao i ekstrakapsularno širenje tumora. Utvrđeno je da se sa nešto većom verovatnoćom mogu identifikovati mutacije TP53 gena kod pacijenata sa pozitivnim limfnim čvorovima na vratu kao i kod pacijenata sa lošijim histološkim gradusom tumora, tj. slabijom ćelijskom diferencijacijom. Generalno posmatrano, korelacija između učestalosti mutacija u TP53 genu i lošeg ishoda je i dalje izuzetno kontroverzna i prisutne su brojne nesuglasice u naučnom svetu (Blons i sar., 2003.) U mnogim studijama nije ustanovljena nijedna vrsta korelacije između mutacija i kliničkih parametara (Georgiou i sar., 2001; Gonzalez-Moles et i sar.,2001; Hirvikoski i sar., 1997; Jeannon i sar., 2000; Kokoska i sar., 1996; Sittel i sar., 2000), dok je u drugim studijama pak pokazana lošija prognoza kod pacijenata sa prisutnom TP53 mutacijom. (Bandoh i sar.,2002; Bradford i sar., 1997; Mineta i sar., 1998).

Kada se govori o ekspresiji TP53 u tumorskom tkivu, koristeći imunohistohemijske analize, rezultati nisu ništa manje kontroverzni. U više studija je pokazano da je kod oralnih prekanceroznih lezija, ekspresija TP53 u suprabazalnim slojevima epitela jedan od indikatora razvoja maligniteta, odnosno parametara lošeg ishoda bolesti u slučajevima kada tumor već postoji (Jin i sar., 1998; Shin i sar., 2000).

Međutim, u mnogim studijama veza između prekomerne ekspresije TP53 i ponašanja tumora nije ustanovljena, kao što nije ustanovljena ni između mutacija i ponašanja tumora [Georgiou i sar., 2001; Gonzalez-Moles et i sar.,2001; Hirvikoski i sar., 1997; Jeannon i sar., 2000;Kokoska i sar., 1996; Sittel i sar., 2000]. Proces kancerogeneze je veoma složen. TP 53 gen iako najčešće analiziran tumor supresorni gen u literaturi, predstavlja samo jednu kariku u tom složenom lancu događaja. Zbog toga nije iznenađujuće da se u mnogim studijama nije pronađena veza između genetskih alteracija TP53 gena i ishoda lečenja.

C-erbB2, H-ras i C-Myc mutacije

Kao što je već istaknuto, ovo je prva studija koja se bavi analizom alteracija C-erbB2, H-ras i C-Myc mutacije onkogeni u histološki negativnim marginama usne duplje. Zanimljiva je pojava da je molekularna epidemiologija tumorskih margina pretežno ograničena na ispitivanje mutacionog statusa TP53 gena. S obzirom na imponzantan broj studija koje su ispitivale TP53, neobična je činjenica da je izuzetno mali broj studija koje su se bavile drugim genima potencijalno značajnim sa stanovišta maligne transformacije ćelije. U skorije vreme objavljeno je nekoliko radova koji su analizirali metilacioni status različitih gena u hirurškim marginama OPK i tražili vezu između metilacije i ponašanja tumora (Shaw i sar., 2013; Supic i sar., 2011). Takođe, nedavno je objavljeno istraživanje nivoa ekspresije veće grupe gena u tumorskim marginama, u okviru koje su se četiri gena- MMP1, COL4A1, P4HA2 i THBS2- izdvojila kao karakteristični i specifični genski markeri (“*gene signature*“) recidivirajućih tumora (Reis i sar., 2011). Ipak ostaje neobjašnjivo da ne postoje podaci u literaturi o alteracijama c-erb B2, H ras i C-Myc gena u histološki negativnim marginama planocelularnih karcinoma usne duplje, s obzirom na njihovu dokazanu ulogu u patogenezi ovih malignih neoplazija. Shodno tome, rezultati ove studije se ne mogu porediti sa literaturnim podacima, već je jedino moguće praviti poređenja i tražiti analogije sa rezultatima dobijenim na osnovu ispitivanja samog tumorskog tkiva. Ispitivanjem mutacionog statusa c-erbB2 gena u histološki negativnim marginama ustanovljena je stopa mutacija od 22%, dok je za H-ras gen ona iznosila 12 %. Ovi procenti se potpuno uklapaju u vrednosti koje mogu da se projektuju na osnovu poznavanja incidence mutacija u samim tumorima.

U studiji koja je sprovedena na našoj populaciji (Popović i sar., 2007.) u kojoj je analiziran status pomenutih gena u tumorskom tkivu, dobijeni su sledeći rezultati: c-erbB2- 32%, a H-ras gen 22%, koji se uklapaju u literaturne podatke. Naime procenjuje se da oko 30% oralnih karcinoma ima amplifikovan neki od gena EGFR familije (Scully, 1993). Takođe, kada je u pitanju sam c-erbB2 gen, u studiji autora Werkmeister dobijena je vrlo slična stopa amplifikacije (25%) korišćenjem dPCR-a; korišćenjem druge metode (FISH tehnika) Khan i sar detektuju takođe povišenu ekspresiju c-erbB2 u 25% uzoraka. Podaci imunohistohemijskih studija pokazuju veliku

varijabilnost. Povećana ekspresija c-erbB2 proteina se kreće od 17% do čak 88% (Werkmeister i sar., 2000; Khan i sar., 2002; Craven i sar., 1992; Landis i sar., 1999; Ibrahim i sar. 1997). Interesantno je da Werkmeister u svojoj studiji, pored amplifikacije, detektuje i deleciju c-erbB2-a, a varijabilnost u broju kopija, odnosno ponekad smanjenje a ponekad povećanje prosečnog broja genskih kopija najverovatnije ukazuje na genomsku nestabilnost.

Podaci koji se odnose na učestalost H-ras u tumorskom tkivu OPK veoma variraju i kreću se od 5% (Kiaris sar., 1991, Paterson i sar. 1996) kod uznapredovalih oralnih karcinoma u zapadnim zemljama do 35% u azijskoj populaciji (Saranath sar.,1991). U našoj populaciji na uzorku sačinjenom isključivo od vermilion usne (Milašin i sar. ,1994) nalaze čak 55% mutiranih H-ras gena. Autori ovako visok procenat mutacija objašnjavaju sinergizmom tri potentna kancerogena, odnosno faktora rizika: duvan, UV zračenje i alkohol.

Ovo je prva studija koja se bavi ispitivanjem H-ras mutacija u histološki negativnim marginama u našoj populaciji a i u svetskoj literaturi. Različite tumore karakteriše različita učestalost mutacija gena iz ras familije gena. U karcinomima pankreasa K-ras mutacije se sreću u 90% slučajeva, u štitastoj žlezdi i kolonu u 50%, dok je kod leukemija N-ras i K-ras mutiran u oko 20% slučajeva. Smatra se da u proseku 30% svih humanih tumora poseduje mutiran neki od ras gena (Bos, 1989).

Kada je u pitanju mutacioni status c-myc gena, u studiji (Popović i sar., 2007) utvrđeno je da 35% planocelularnih karcinoma poseduje povećan broj kopija ovog gena. Na osnovu dostupnih literaturnih podataka iz različitih geografskih regiona, ustanovljeno je da c-myc amplifikaciju pokazuje 20-40% oralnih planocelularnih karcinoma u zemljama Evrope i Amerike (Bitzer i sar., 2003; Leonard i sar., 1991; Merritt i sar., 1990; Volling i sar.,1993), dok je taj procenat znatno veći u jugoistočnoj Aziji i do 60% (Saranath i sar., 1991; Zheng i sar., 2004). Sa uvođenjem "real-time PCR"-a, potvrđena je visoka stopa amplifikacije i u severnoameričkoj populaciji (45%) (Akervall i sar., 2003).

Na osnovu korelacija između nuklearnog gradusa, ćelijske diferencijacije, stadijuma bolesti i prisustva mutacija analiziranih gena, nije utvrđena statistička

značajnost, međutim sa većom učestalošću su identifikovane mutacije gena c Erb B2 kod pacijenata koji su imali srednji stepen histološkog gradusa, i c Myc gena kod pacijenata takođe srednjeg histološkog gradusa i trećeg stadijuma bolesti. S obzirom da nema podataka u literaturi o analizi alteracija ovih onkogeni u histološki negativnim marginama OPK, analizirana je literatura koja se odnosi na analizu alteracija pomenutih gena u OPK.

Kao i kada su u pitanju drugi genetički markeri, i literaturni podaci vezani za ulogu c-myc onkogeni u patogenezi oralnih planocelularnih karcinoma su prilično kontradiktorni. Naime, Baral i sar. navode da se kod slabo diferenciranih karcinoma u stadijumu III, zapaža veća c-myc ekspresija nego kod dobro i srednje diferenciranih karcinoma, nižih stadijuma (Baral i sar., 1998). Za razliku od ovih podataka, brojni su radovi koji ovu korelaciju ne pronalaze (Akervall i sar., 2003).

Korelacija genetičkih i anamnestičkih, histopatoloških i klinički parametara

Relativno visoka učestalost genetičkih promena koja je identifikovana u TP53 genu -11 pacijenata (22%); u c- Erb-B2 genu - 11 pacijenata (22%); u c-Myc genu 15 pacijenata (30%) i u H-ras genu 5 pacijenata (od 42)- 11.9 %, korelirana je sa kliničko-histopatološkim parametrima. Među analiziranim genima, jedino je TP53 mutacija bila statistički značajno češće zastupljenija kod pacijenata koji su bili stariji od 70 godina ($p=0.035^*$). Utvrđeno je da je prisustvo c-erb B2 amplifikacije prisutno kod pacijenata koji su imali veći stadijum bolesti, tumor većih dimenzija i veću učestalost metastaza u limfnim čvorovima. U odnosu na pol, muškarci su češće bili nosioci c-myc amplifikacije (sa statističkom značajnošću $p=0.028^*$). Drugi kliničko-histopatološki parametri nisu pokazali statistički značajnu vezu između analiziranih varijabli.

Pacijenti koji su nosioci mutacije u TP53 genu i amplifikacije u c-myc genu u histološki negativnim marginama OPK nisu pokazali statistički značajnu razliku u pogledu smrtnog ishoda u odnosu na pacijente bez promena u tim genima ($p=0.305$; $p=0.782$).

Kod pacijenata koji su bili nosioci H-ras mutacije utvrđeno je manje petogodišnje preživljavanje u odnosu na pacijente kod kojih nije identifikovana mutacija, ali bez statističke značajnosti ($p=0.559$).

Međutim, kod pacijenata kod kojih je identifikovana amplifikacija u c-erb B2 gena u histološki negativnim marginama OPK, u odnosu na pacijente bez genetičke alteracije u pomenutom genu, utvrđena je veća stopa smrtnih ishoda, tj statistički značajna veza sa većim mortalitetom ($p=0.033^*$).

Pacijenti sa prisutnom c-erb B2 amplifikacijom u histološki negativnim marginama OPK pokazali su takođe i statistički značajno kraće petogodišnje preživljavanje u odnosu na pacijente bez te genetičke alteracije.

Korišćenjem *Kaplan-Meier*-ovih krivi i log rank testa za petogodišnje preživljavanje pacijenata koji su imali pozitivne nalaze za amplifikaciju c-erb B2 gena i one sa negativnim nalazom, utvrđena je statistički značajna razlika između ove dve grupe ($p=0.002^*$).

Kurpopakt i saradnici su pokazali jaku asocijaciju između c-erb B2 ekspresije i kraće stope petogodišnje preživljavanja (Kurpopakt i sar., 2002).

Pacijenti koji su bili pozitivni na c-erb B2 amplifikaciju češće su razvijali recidiv u odnosu na grupu pacijenata bez c-erb B2 mutacije (0.017^*). I pacijenti kod kojih je identifikovana mutacija u TP53 genu pokazali su veću stopu petogodišnjeg preživljavanja u odnosu na grupu pacijenata koji nisu nosili mutaciju, ali bez statističke značajnosti.

U multivarijantnom modelu Cox-ove regresione analize ova mutacija se nije izdvojila kao nezavisni prediktor ishoda bolesti što je u saglasnosti sa prethodno pomenutim studijama. Pacijenti kod kojih je registrovana mutacija u genu c -myc u histološki negativnim marginama OPK pokazali su relativno sličnu stopu petogodišnjeg preživljavanja kao i pacijenti bez mutacije.

U univarijantnom modelu Cox-ove regresione analize, prisustvo c-erb B2 amplifikacije u histološki negativnim marginama, konzumiranje duvana i dužina konzumiranja alkohola su se pojedinačno izdvojile kao statistički značajni faktori rizika

lošeg ishoda bolesti OPK ($p=0,004^*$, $p=0,041^*$, $p=0,027^*$). Veća verovatnoća detekcije mutacija u histološki negativnim marginama OPK je bila u vezi sa većom dubinom invazije ($7,12\pm 3.48$ mm) ali bez statističke značajnosti.

Podaci koji se odnose na stopu petogodišnjeg preživljavanja su veoma kontroverzni. Supić i saradnici su pokazali da pacijenti sa mutacijom u TP53 genu u tumorskom tkivu imaju statistički značajno manje preživljavanje u odnosu na pacijente bez mutacije. Pacijenti kod kojih je bila identifikovana i TP53 mutacija i HPV infekcija u tumorskom tkivu pokazali su kraće preživljavanje u odnosu na pacijente koji su imali samo HPV infekcije (Supić i sar., 2011). Popović i saradnici su pokazali da pacijenti sa c-erb B2 mutacijom i H-ras mutacijom u OPK imaju tendenciju ka nižoj stopi preživljavanja, ali bez statističke značajnosti (Popović i sar., 2007). U ovoj studiji potvrđena je pomenuta tendencija kraćeg preživljavanja kod pacijenata sa pomenutim mutacijama.

Veoma je interesantna činjenica da su dva pacijenta koja su nosila mutaciju u TP53 genu, c-myc i c-erb B2 genu imali značajno kraća vremena preživljavanja. Kumulativni efekat navedenih genetičkih alteracija mogao bi biti uzrok lošem ishodu bolesti kod ovih pacijenata.

Kod pacijenata koji su konzumirali alkohol češće je identifikovana mutacija u TP53 genu, što je bilo na granici statističke značajnosti (pearson, $\chi^2 = 0.205$) ($p < 0.05$). Ovi podaci su u saglasnosti sa istraživanjem koje je sprovedeno takođe u srpskoj populaciji i u kom nije nađena statistička značajnost u pogledu konzumiranja alkohola i prisustva p53 mutacija (Kozomara, 2005.). U studiji Tunke i saradnika (2007) sprovedenoj na 34 ispitanika, oko 80 % mutacija je identifikovano kod pacijenata koji su bili pušači. Brojni su radovi iz različitih geografskih regiona, koji potvrđuju korelaciju između TP53 mutacije i/ili ekspresije proteina i konzumiranja duvana (Brennan i sar., 1995).

Smatra se da je oko 75 % svih oralnih karcinoma moguće sprečiti (faktori rizika alkohol i duvan). Kod ostalih 25 % pacijenata koji nisu izloženi ovim supstancama, uzrok pojave tumora ostaje i dalje nepoznat (Walker i sar., 2003) Vredna pažnje je

činjenica da je veća frekvencija mutacija TP53 gena u Evropi i Americi (oko 60%) nego u jugoistočnoj Aziji (oko 10%). Ova razlika se može dovesti u vezu sa različitim životnim navikama, odnosno etiološkim faktorima. Takođe, moguće je da su učestale alteracije H-ras, c-erb B2, i C-myc gena, kod pripadnika azijske populacije, i u odsustvu TP53 mutacija, dovoljne da omoguće nekontrolisan rast. To još uvek ne isključuje mogućnost da je TP53 gen inaktiviran nekim drugim mehanizmima a ne mutacijama. Treba svakako uzeti u obzir infekcije humanim papiloma virusom (HPV16, HPV18, HPV33 i dr podtipovi sa onkogenim potencijalom) koje imaju sposobnost inaktiviranja tumorsupresornih gena, a naravno mogući su i epigenetički mehanizmi TP53 inaktivacije.

Kod oralnih karcinoma postoji korelacija u odnosu na konzumiranje alkohola i predilekciono mesto za razvoj karcinoma. Kod onih koji konzumiraju alkohol predilekciono mesto za razvoj OPK je pod usta (Zheng i sar., 1990) dok kod onih koji ne konzumiraju alkohol veći rizik je da se OPK pojavi na bukalnoj sluzokoži kao i lateralnoj strani poleđine jezika. U našoj studiji pacijenti koji su konzumirali alkohol češće su razvijali karcinom u predelu poda usta i jezika. Rezultat je bio na granici statističke značajnosti (pearson, $\chi^2=0.07$) ($p<0.05$).

Dužina konzumiranja alkohola se u Cox-ovoj regresionoj analizi u multivarijantnom modelu izdvojila kao nezavisni prediktor lošeg ishoda bolesti.

Analizirajući distribuciju mutacija u histološki negativnim marginama c-erbB2 i H-ras gena po gradusima i tipovima invazije, zapaža se da ne postoji statistički značajna razlika u stopi mutacija ova dva gena kod različitih kliničkih, odnosno histopatoloških nivoa gradacije, a što je u saglasnosti sa rezultatima nekih autora (Werkmeister i sar., 2000; Khan i sar.2002, Popović i sar., 2007). Kod jednog pacijenta je nađena mutacija u H-Ras genu u histološki negativnoj margini i metastatski limfni čvor na vratu (N1). Kod pacijenata kod kojih nije identifikovana H-ras mutacija u negativnoj margini nije zabeležena metastaza u limfnim čvorovima na vratu (N0), ali ovaj odnos nije statistički značajan. Moguće je da je fiksirana H-ras mutacija zajedno sa dodatnim izmenama u genetičkom materijalu, odgovorna za razvoj malignijeg fenotipa, kako primarnih tumora tako i recidiva.

Paralelnom analizom c-erbB2 gena u histološki negativnim marginama OPK i prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima na vratu nije uočena statistička značajnost (8 % pacijenata) između pacijenata sa mutacijama i bez njih. Iako razlike nisu statistički značajne, one ipak mogu da ukažu na maligniji fenotip u odnosu na karcinome koji ne nose genske izmene. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa nalazima brojnih autora, koji detektuju mutiran c-erbB2 gen ili eksprimiran onkoprotein, kod uznapredovalih malignih lezija, kako planocelularnih karcinoma usne duplje, tako i kod karcinoma dojke, ovarijuma, materice, pluća, larinksa, osteosarkoma, jednjaka i gastriontesinalnog trakta (Brix i sar., 2014; Liu i sar., 2014; Nagase i sar., 2014; Li i sar., 2014)

Bez obzira na nepostojanje statistički značajne razlike, ipak treba ukazati na podatak da je kod karcinoma bez lokalnih metastaza bila veća učestalost mutacija TP53, C erb B2 i C Myc gena u histološki negativnim marginama.

Sumirajući dobijene rezultate o procentualnoj zastupljenosti c-myc, c-erbB2 i H-ras mutacija kod planocelularnih karcinoma usne duplje, procentualne vrednosti analiziranih mutacija u našoj populaciji nešto su veće nego što pokazuje jedna metaanaliza urađena za evropske zemlje (Paterson i sar., 1996).

Prognoza će biti znatno bolja ukoliko se dijagnoza postavi u ranom, tj. početnom stadijumu bolesti. Pacijenti često dolaze u uznapredovalim stadijumima bolesti koji su inoperabilni ili je potreban hirurški zahvat koji ostavlja velike funkcionalne posledice kod pacijenata. Nažalost, i pored savremenog specifičnog onkološkog lečenja maligni tumori ovakve lokalizacije, među kojima je planocelularni karcinom skoro isključiv patohistološki tip, imaju veoma lošu prognozu.

U Indiji postoje „skrining“ programi koji se bave primarnom prevencijom i ranom detekcijom oralnog kancera i premalignih lezija, ali i dalje nema dokaza da ovaj vid „skrininga“ zaista smanjuje smrtnost. Skrining je najefektivniji kada se definiše ciljna visokorizična grupa – na primer „ teški alkoholičari i pušači“. Primarna prevencija – prestanak pušenja kao i umerenije konzumiranje alkohola je najefektivniji način za smanjenje smrtnosti. Rana detekcija bi takođe trebalo da bude prioritet, jer rana detekcija lezije znači i dobru prognozu. Stomatolozi imaju veoma važnu ulogu u ranoj

dijagnostici i prepoznavanju premalignih i malignih lezija, zbog toga što je dijagnostikovanje OPK u ranom stadijumu od izuzetne važnosti za prognozu i dalji tok bolesti kod ovih pacijenata.

Očekivani naučni doprinos u dijagnostici i terapiji OPK

Ovo istraživanje je pokazalo sa kojom učestalošću se javljaju alteracije u genima TP53, c-myc, c-erb B2 i H- ras, u tumorskim marginama koje se klinički i histopatološki smatraju zdravim tkivom i kakva je njihova povezanost sa kliničkim parametrima. Pregled literature ukazuje na nedostatak podataka vezanih za promene u ovim genima, u marginama OPK. Utvrđena je jasna veza između prisustva mutacije i određenih aspekata biologije tumora, odnosno ishoda bolesti.. Ideja je da mutacioni status histološke margine pacijenta pomogne u preciznijem predviđanju daljeg toka bolesti, dužine preživljavanja, pojave recidiva u petogodišnjem postoperativnom periodu i dr. kao i da pomogne u predviđanju ishoda lečenja, i u nalaženju najadekvatnije terapije.

Pacijente u čijim marginama su detektovane genske promene, neophodno je pratiti u dužem periodu i kroz učestalije kontrole. S obzirom da u savremenoj literaturi postoji nesuglasica u pogledu definisanja „čistih“ hirurških margina bilo bi od koristi uključivanje u neku međunarodnu, multicentričnu studiju koja bi obuhvatila veći broj pacijenata sa planocelularnim karcinomom. Buduća istraživanja, iz kojih bi proizašla identifikacija novih biomarkera trebalo bi da budu usmerena na uporednu analizu mutacionog statusa planocelularnog karcinoma usne duplje, hirurških margina, i zdravog tkiva kao indikatora biološkog stanja organizma.

U svetu su pokrenuti naučni projekti posvećeni otkrivanju i razvoju novih, efektivnijih biomarkera. Biomarkeri se danas smatraju ključem personalizovane medicine, tretmana koji su povezani sa određenim pacijentom u cilju visoko efikasne intervencije u procesu lečenja bolesti. Idealni marker za dijagnozu trebalo bi da ima visoku senzitivnost, specifičnost i tačnost u prikazivanju čitave bolesti. Tumorski marker bi trebalo da bude i prognostički, da predvidi vraćanje bolesti i da ukaže na efektivnost antikancerske terapije. Marker bi trebalo da bude prisupačan i da se lako

može detektovati bez komplikovanih medicinskih ili laboratorijskih procedura. Marker bolesti koji se mogu detektovati u serumu i urinu su dobri za primenu u ranom skriningu.

Kod OPK, potencijalni marker mogao bi da bude c-erb B2 koji je povezan sa nekoliko kliničkih parametara. S obzirom na njegovu visoku ekspresiju u tumorima glave i vrata, i na ulogu receptora u važnoj onkogenoj signalizacionoj kaskadi, on bi istovremeno mogao da bude i jedna od meta u tumorskoj terapiji. Jedan od glavnih primera c-erb B2 usmerene terapije je primena preparata herceptina kod kancera dojke.

6. ZAKLJUČCI

- Od svih ispitanih kancerskih gena, c-myc onkogen pokazuje najveću učestalost mutacija u histološki negativnim marginama. Vrednost od 30%, ukazuje na njegovu važnu ulogu u razvoju planocelularnog karcinoma.
- Mutacije u tumor supresornom genu TP53 zabeležene su u hirurški negativnoj margini planocelularnog karcinoma kod 22% bolesnika, što je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima.
- Mutacije u H-ras genu ustanovljene su u hirurškim marginama tumora kod svega 12% pacijenata, drugim rečima to je od svih analiziranih gena najređe mutiran gen u našem uzorku.
- Amplifikacija c-erbB2 onkogeno zabeležena je u tumorskim marginama 22% pacijenata.
- Mutacije su najčešće bile detektovane u karcinomu jezika i podu usta 44% (13/29).
- Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa amplifikacijom c-erbB2 gena u histološki negativnim marginama je statistički značajno kraće u odnosu na pacijente kod kojih nije identifikovana ova promena.
- Pacijenti kod kojih je identifikovana amplifikacija c-erb B2 gena u histološki negativnim marginama statistički značajno češće razvijaju recidiv u postoperativnom toku.
- S obzirom na statistički značajno veću učestalost recidiva i kraće petogodišnje preživljavanje kod pacijenata sa prisutnom amplifikacijom u c-erb B2 genu u histološki negativnoj margini OPK, te pacijete treba češće kontrolisati u postoperativnom periodu.
- Prosečna dubina invazije tumora bila je veća u grupi pacijenata sa genskim alteracijama nego u onima bez alteracija, ali nije dostigla statističku značajnost.

7. LITERATURA

Adari H, Lowy DR, Willumsen BM, Der CJ, McCormick F (1988). Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain. *Science*; 240 (4851): 518-521.

Akervall J, Bockmuhl U, Peterson I, Yang K, Carey TE, Kurnit DM (2003). The gene ratios c-myc: cyclin-dependent kinase (CDK) N2A and CCND1:CDKN2A correlate with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*; 9(5): 1750-5.

Alsner J, Sorensen SB, Overgaard J (2001): TTP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol*; 59: 179-185.

Ankathil R, A. Mathew, F. Joseph and M. K. Nair (1996). Is oral cancer susceptibility inherited? report of five oral cancer families. *European Journal of Cancer. Part B: Oral Oncology*; 32(1): 63-67.

Anderson ME, Woelker B, Reed M, Wang P, Tegtmayer P (1997). Reciprocal interference between the sequence specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of TP53: implications for regulation. *Mol Cell Biol*; 17: 6255–64.

Arantes LM, de Carvalho AC, Melendez ME, Carvalho AL, Goloni-Bertollo EM (2014). Methylation as a biomarker for head and neck cancer. *Oral Oncology*; 50(6): 587 – 592.

Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y (2010). Oral cancer: clinical features. *Oral oncology*; 46(6): 414-7.

Bandoh N, Hayashi T, Kishibe K, Takahara M, Imada M, Nonaka S, Harabuchi Y. (2002). Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Cancer*, 94(7): 1968-1980.

Baral R, Patnaik S, Das BR (1998). Co-overexpression of p53 and c-myc proteins linked with advanced stages of betel-and tobacco-related oral squamous cell carcinomas from eastern India. *Eur J Oral Sci*; 106(5): 907-13.

Barbacid M (1987). Ras genes. *Annu Rev Biochem*; 56: 779–827.

Batsakis JG (1999). Surgical excision margins: a pathologist's perspective. *Adv Anat Pathol* ; 6: 140–148.

Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH (1998). p14ARF links the tumour suppressor RB and TP53. *Nature*; 395: 124–5.

Beckardt RN, Kiyokawa N, Xi L, Liu TJ, Huang MC, El-Naggar AK, Yhang HZ, Clazman GL (1995). HER-2/neu oncogene characterization in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*;121: 1265-1270.

Bergh J, Norberk T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L (1995). Complete sequencing of the TTP53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med*; 1: 1029-1034.

Bitzer M, Stahl M, Arjumand J, Ress M, Klump B, Heep H, Gabbert HE, Serbia M (2003). C-myc gene amplification in different stages of oesophageal squamous cell carcinoma: prognostic value in relation to treatment modality. *Anticancer Res*; 23(2B): 1489-93.

Blons H, Laurent-Puig P (2003): TTP53 and head and neck neoplasms. *Hum Mutat*; 21: 252-257.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*;48: 3282–7.

Bos JL (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*; 49: 4682–9.

Boyle P, Levin B (2008). World cancer report. International Agency for Research on Cancer.

Boyle P, Ferlay J (2004). Cancer incidence and mortality in Europe 2004. *Ann Oncol*; 16: 481–488.

Bouquot JE, Meckstroth RL(1998). Oral cancer in a tobacco-chewing U.S. population – no apparent increased incidence or mortality. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 86: 697-706.

Bradford CR, Zhu S, Poore J, Fisher SG, Beals TF, Thoraval D, Hanash SM, Carey TE, Wolf GT (1997). p53 mutation as a prognostic marker in advanced laryngeal carcinoma. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*; 123(6): 605-609.

Brakhuis BJM, Tabor MP, Lemans CR, Van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH (2002). Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck*; 24: 198–206.

Brand KA, Hermfisse U (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J*; 11: 388-395.

Bray SE, Schorl C, Hall PA (1998). The challenge of TP53: linking biochemistry, biology and patient management. *Stem Cells (Dayt)*; 16: 248–60.

Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D (1995): Association between cigarette smoking and mutation of the TTP53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*; 332: 712-717.

Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, Goodman SN, Sidransky D (1995). Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*; 332: 429-35.

Brennan CT, Sessions DG, Spitznagel EL Jr, Harvey JE (1991). Surgical pathology of cancer of the oral cavity and oropharynx. *Laryngoscope*; 101: 1175- 97.

Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, Goodman SN, Sidransky D (1995). Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*; 332: 429–435.

Brix DM, Clemmensen KKB, Kallunki T (2014). When Good Turns Bad: Regulation of Invasion and Metastasis by ErbB2 Receptor Tyrosine Kinase. *Cells*; 3(1): 53-78.

Buday L, Downward J (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*;73: 611–20

Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, Carnot F, Houllier AM, Soussi T, Brasnu D, Beaune P, Laccourreye O, Laurent- Puig P (2000): TP53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol*; 18: 1465-1473.

Cancer Research Campaign . CancerStats. Oral cancer – UK. UK: CRC; April 2005.

Cecchi R, Bartoli L, Brunetti L, Pavesi M (2011). Oral verrucous carcinoma treated with imiquimod 5% cream and carbon dioxide laser. *Eur J Dermatol*; 21: 596-7.

Chang JS, Lo HI, Wong TY, Huang CC, Lee WT, Tsai ST, Chen KC, Yen CJ, Wu YH, Hsueh WT, Yang MW, Wu SY, Chang KY, Chang JY, Ou CY, Wang YH, Weng YL, Yang HC, Wang FT, Lin CL, Huang JS, Hsiao JR (2013). Investigating the association between oral hygiene and head and neck cancer. *Oral Oncol*; 49(10): 1010-7.

Chung HJ, Levens D (2005). C-myc expression: keep the noise down! *Mol Cells*; 20: 157-166.

Craven JM, Pavelic ZP, Stambrook PJ, Pavelic L, Gapany M, Kellez DJ, Gapany S, Gluckman JL (1992). Expression of c-erbB-2 gene in human head and neck carcinoma. *Anticancer Res*; 12: 2273-2276.

Davidson TM, Nahum AM, Astarita RW (1981). Microscopic controlled excisions for epidermoid carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*; 89: 244-51.

Davidson TM, Haghghi P, Baird S, Astarita R, Seagren S (1988). MOHS for head and neck mucosal cancer: report on 111 patients. *Laryngoscope*; 98: 1078-83.

Daftary DK, Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Mehta FS, Pindborg JJ (1992). Oral squamous cell carcinoma, In *Oral Diseases in the Tropics*, eds Patbhu SR, Wilson DS, Daftary DK, Johnson NW; 37: 429-448.

Dakubo G, Jakupciak J, Birch-Machin M (2007). Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell Inter*; 7: 2.

Day GL, Blot WJ (1992). Second primary tumors in patients with oral cancer. *Cancer*; 70:14-9.

Davidson TM, Nahum AM, Haghghi P, Astarita RW, Saltzstein SL, Seagren S (1984). The biology of head and neck cancer: detection and control by parallel histologic sections. *Arch Otolaryngol*;110: 193-6.

Do KA, Johnson MM, Lee JJ, Wu XF, Dong Q, Hong WK, Khuri FR, Spitz MR (2004). Longitudinal study of smoking patterns in relation to the development of smoking-related secondary primary tumors in patients with upper aerodigestive tract malignancies. *Cancer*; 101(12): 2837-2842.

Fan KH, Lin CY, Kang CJ, Lee LY, Huang SF, Liao CT, Chen IH, Ng SH, Wang HM, Chang JT (2014). Postoperative concomitant chemoradiotherapy improved treatment outcomes of patients with oral cavity cancer with multiple-node metastases but no other major risk factors. *PLoS One*; 9(2): e86922.

Fang QG, Shi S, Liu FY, Sun CF (2014). Squamous cell carcinoma of the oral cavity in ever smokers: a matched-pair analysis of survival. *J Craniofac Surg*; 25(3): 934-7.

Ferlay J, Bray F, Pisani P and Parkin DM (2004). GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC Cancer Base No. 5. version 2.0, IARCPress, Lyon.

Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK (1993). Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature*; 363: 38-45.

Filomeno M, Bosetti C, Garavello W, Levi F, Galeone C, Negri E, et al. The role of a Mediterranean diet on the risk of oral and pharyngeal cancer. *Br J Cancer*. 2014.

Franceschi D, Gupta R, Spiro RH, Shah JP (1993). Improved survival in the treatment of squamous carcinoma of the oral tongue. *Am J Surg*; 166: 360-5.

Freije JE, Beatty TW, Campbell BH, Woodson BT, Schultz CJ, Toohill RJ (1996). Carcinoma of the larynx in patients with gastroesophageal reflux. *Am J Otolaryngol*; 17: 386-90.

Fuller C, Camilon R, Nguyen S, Jennings J, Day T, Gillespie MB (2014). Adjunctive diagnostic techniques for oral lesions of unknown malignant potential: Systematic review with meta-analysis. *Head & Neck*; Article first published online: 5 MAY 2014. DOI: 10.1002/hed.23667

Galaktionov K, Chen X, Beach D (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*; 382: 511-517.

Gandor DW, Meyer J (1988). A simple two-dye basic stain facilitating recognition of mitosis in plastic embedded tissue sections. *Stain Technol*; 63: 75-81.

Gandour-Edwards RF, Donald PJ, Lie JT (1993). Clinical utility of intraoperative frozen section diagnosis in head and neck surgery: a quality assurance perspective. *Head Neck*; 15: 373.

Garavello W, Bertuccio P, Levi F, Lucchini F, Bosetti C, Malvezzi M, et al (2010). The oral cancer epidemic in central and eastern Europe. *International Journal of Cancer*; 127(1): 160-71.

Gavrić M, Pišćević A, Sjerobabin I (2001). *Maksilofacijalna hirurgija*. Beograd, Draganić.

Georgiou A, Gomatos IP, Ferekidis E, Syrigos K, Bistola V, Giotakis J, Adamopoulos G, Androulakis G (2001). Prognostic significance of TP53, bax and bcl-2 gene expression in patients with laryngeal carcinoma. *Eur J Surg Oncol*; 27: 574-580.

Giaccia AJ, Kastan MB (1998). The complexity of TP53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*; 12: 2973-83.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000). Evidence for a casual association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*; 92: 709-720.

Gobel Y, Valette G, Abgral R, Clodic C, Mornet E, Potard G, et al (2014). Interpretation of suspect head and neck fixations seen on PET/CT in lung cancer. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*.

Goodson ML, Sugden K, Kometa S, Thomson PJ (2012). Complications following interventional laser surgery for oral cancer and precancerous lesions. *Br J Oral Maxillofac Surg*; 50(7): 597-600.

Gooris PJ, Vermey B, de Visscher JG, Roodenburg JL (2003). Frozen section examination of the margins for resection of squamous cell carcinoma of the lower lip. *J Oral Maxillofac Surg*; 61(8): 890-4; discussion 5-7.

Goyal S, Tiwari VK, Nair KS, Raj S (2014). Risk factors and costs of oral cancer in a tertiary care hospital in Delhi. *Asian Pac J Cancer Prev*; 15(4): 1659-65.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ (1996). Hypoxia mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature*; 379: 88–91.

Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA (2000). Cancer statistics 2000. *CA Cancer J Clin*; 50: 7–33.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al, editors (2002). Head and neck sites. In: *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer- Verlag; 17–22.

Gonzalez-Moles MA, Galindo P, Gutierrez-Fernandez J, Sanchez-Fernandez E, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Brovo M (2001): TP53 protein expression in oral squamous cell carcinoma. Survival analysis. *Anticancer Res*; 21: 2889-2894.

Hann SR, Dixit M, Sears RC, Sealy L (1994). The alternatively initiated c-Myc proteins differentially regulate transcription through a noncanonical DNA-binding site. *Genes Dev*; 8 (20): 2441-2452.

Ha PK, Califano JA (2003). The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Crit Rev Oral Biol Med*; 14(5): 363-9.

Heidecker G, Huleihel M, Cleveland JL, Kolch W, Beck TW, Lloyd P, et al (1990). Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol Cell Biol*; 10: 2503–12.

Henriksson M, Luscher B (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*; 68: 109-182.

Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, et al (1997). 14-3-3 δ is a TP53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*; 1(1): 3-11.

Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Johansson R, Haapasalo H, Marin S, Halonen P, Helin H, Raitiola H, Pukander J, Kellokumpu-Lehtinen P, Kosma VM (1997): TP53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*; 15: 3111-3120.

Hwang E, Johnson-Obaseki S, McDonald JT, Connell C, Corsten M. Incidence of head and neck cancer and socioeconomic status in Canada from 1992 to 2007 (2013). *Oral Oncol*; 49(11): 1072-6.

Ibrahim SO, Vasstrand EN, Liavaag PG, Johannessen AC, Lillehaug JR (1997). Expression of c-erbB proto-oncogene family members in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*; 17: 4539-46.

Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“. Incidenca i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2011 (2013). Registar za rak u centralnoj Srbiji. ISBN 86-7358-030-7, Izveštaj br.3., Beograd.

Jeannon JP, Soames J, Lunec J, Awwad S, Ashton V, Wilson JA (2000). Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1) and TP53 tumour suppressor gene in laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol*; 25: 23-27.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao, Y, Xu J, Murray T, et al (2008). Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*; 58(2): 71-96.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010). Cancer statistics 2010. *CA Cancer J Clin*; 60: 277-300.

Jin YT, Kayser S, Kemp BL, Ordonez NG, Tucker SL, Clayman GL, et al (1998). The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*; 82: 2159-2165.

Jõers A, Kristjuhan A, Kadaja L, Maimets T (2000). Tumour associated mutants of p53 can inhibit transcriptional activity of p53 without heterooligomerization. *Oncogene*; 17: 2351–8.

Johnson NW (2001). Tobacco use and oral Cancer: a global perspective. *J Dent Educ*; 65: 328- 339.

Jones KR, Lodge-Rigal RD, Reddick RL, Tudor GE, Shockley WW (1992). Prognostic factors in the recurrence of stage I and II squamous cell cancer of the oral cavity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 118: 483-5.

Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, et al (1993). Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*; 22: 459-462.

Junaid M, Choudhary MM, Sobani ZA, Murtaza G, Qadeer S, Ali NS, et al (2012). A comparative analysis of toluidine blue with frozen section in oral squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol*; 10: 57.

Kannan K, Munirajan AK, Krishnamurthy J, Bhuvaramurthy V, Mohanprasad BK, Panishankar KH, Tsuchida NI, Shanmugam G (1999). Low incidence of p53 mutation in betel quid and tobacco chewing-associated oral squamous carcinoma from India. *Int J Oncol*; 15 (6): 1133-1136.

Khan A, King BL, Smith BD, Smith GL, Di Giovanna MP, Carter D. and Haffty BG (2002). Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*; 8: 540-548.

Kiaris H, Spandidos DA, Jones AS, et al (1991). Mutations, expression and genomic instability of the H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. *Br J Cancer*; 63: 70–4.

Klapper L, Glathe S, Vaisman N, et al (1999). The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 4995-5000.

Khosravi-Far R, Campbell S, Rossman KL, Der CJ (1998). Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv Cancer Res*; 72: 57–107.

Ko Y, Abel J, Harth V, Brode P, Antony C, Donat S, Fischer HP, Ortiz-Pallardo ME, Thier R, Sachinidis A, Vetter H, Bolt HM, Herberhold C, Bruning T (2001). Association of CYP1B1 codon 432 mutant allele in head and neck squamous cell cancer is reflected by somatic mutations of TP53 in tumor tissue. *Cancer Res*; 61: 4398-4404.

Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM, Tsai CC (1995). Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med*; 24(10): 450-3.

Kokoska MS, Piccirillo JF, el-Mofty SK, Emami B, Haughey BH, Schoinick SB (1996). Prognostic significance of clinical factors and p53 expression in patients with glottic carcinoma treated with radiation therapy. *Cancer*; 78(8): 1693-1700.

Konstantinović VS, Dimić ND (1998). Articulatory function and tongue mobility after surgery followed by radiotherapy for tongue and floor of the mouth cancer patients. *Br J Plast Surg*; 51(8): 589-93.

Konstantinović V, Jelovac D. Monografije naučnih skupa AMN SLD, Ur. Jović N, Magić Z. Klinički značaj genetskih i epigenetskih promena u oralnim planocelularnim karcinomima. Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva, Beograd 2013, vol 2, br. 2. Poglavlje X, Prevencija oralnog planocelularnog karcinoma, str 217-231.

Kozomara R, Jović N, Magić Z, Branković-Magić M, Minić V (2005). p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*; 33(5): 342-348.

Kurpopakt C, Venkatesan TK, Caldarelli DD, Oanje WR, Hutchinson J, Preisler HD, Coon JS, Werner JA (2002). Abnormalities of molecular regulators of proliferation and

apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Auris Nasus Larynx*; 29(2): 165-174.

Lain S, Midgley C, Sparks A, Lane EB, Lane DP (1999). An inhibitor of nuclear export activates the TP53 response and induces the localization of hdm2 and TP53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs. *Exp Cell Res*; 248: 457–72.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1999). Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin*; 49: 8–31.

Lane DP (1998). Killing tumor cell with viruses – a question of specificity. *Nat Med*; 4: 1012–3.

Leri A, Liu Y, Claudio PP, Kajstura J, Wang X, Wang S, Kang P, Malhotra A, Anversa P (1999). Insulin-like growth factor-1 induces Mdm2 and down-regulates TP53, attenuating the myocyte renin-angiotensin system and stretch-mediated apoptosis. *Am J Pathol*; 154(2): 567-80.

Leonard JK, Kearsley JH, Chenevix-Trench G, Hayward NK (1991). Analysis of gene amplification in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*; 48: 511-515.

Levine AJ, Murphy M, Freeman D, et al (1998). The regulation of the p53 protein and the genes regulate protein. 9th p53 workshop, Crete, Greece. *J Oral Pathol Med*; 29: 413–25 423.

Liao CT, Wallace CG, Lee LY, Hsueh C, Lin CY, Fan KH, et al (2014). Clinical evidence of field cancerization in patients with oral cavity cancer in a betel quid chewing area. *Oral Oncol*; 50(8): 721-31.

Li J-C, Zhao Y-H, Wang X-Y, Yang Y, Pan D-L, Qiu Z-D, et al (2014). Clinical significance of the expression of EGFR signaling pathway-related proteins in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumor Biology*; ;35(1): 651-7.

Liu SH, Chao KS, Leu YS, Lee JC, Liu CJ, Huang YC, et al (2014). Guideline and Preliminary Clinical Practice Results for Dose Specification and Target Delineation for Postoperative Radiotherapy of Oral Cavity Cancer. *Head Neck*. 2014 Mar 14. doi: 10.1002/hed.23692.

Liu Y, Ma Y-H, Sun Z-Z, Rui Y-J, Yin Q-D, Song S, et al (2014). Effect of c-erbB2 overexpression on prognosis in osteosarcoma: evidence from eight studies. *Tumor Biology*; 35(9): 8939-43.

Looser KG, Shah JP, Strong EW (1978). The significance of “positive” margins in surgically resected epidermoid carcinomas. *Head Neck Surg*; 1:107–11.

Loree TR, Strong EW (1990). Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg*; 160: 410–414.

Lotrić NL, Jovanović SV (1983). *Deskriptivna i topografska anatomija čoveka. Glava i vrat*, Naučna knjiga, Beograd, 1983, str. 172.

Lowe SW, Ruley HE (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor gene is induced by adenovirus E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev*; 7: 535–45.

Lowy DR, Willumsen BM (1993). Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem*; 62: 851–891.

Luconi M (2007). *Practical guide to neck dissection*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Mashberg A (2000). Diagnosis of early oral and oropharyngeal squamous carcinoma: obstacles and their amelioration. *Oral Oncol*; 36: 253-255.

Maier H, Sennewald E, Heller GF, Weidauer H (1994). Chronic alcohol consumption—the key risk factor for pharyngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*; 110: 168–73.

Markovic-Denic L, Cirkovic A, Zivkovic S, Stanic D, Skodric-Trifunovic V (2014). Cancer mortality in central serbia. *Journal of BU ON: official journal of the Balkan Union of Oncology*; 19(1): 273.

Mascolo M, Ilardi G, Romano MF, Celetti A, Siano M, Romano S, et al (2012). Overexpression of chromatin assembly factor-1 p60, poly(ADP-ribose) polymerase 1 and nestin predicts metastasizing behaviour of oral cancer. *Histopathology*; 61(6): 1089-105.

Mc Gregor IA, McGregor FM (1986). *Cancer of the face and mouth. Pathology and management for surgeons*, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York: 470-493.

McCullough MJ, Prasad G, Farah CS (2010). Oral mucosal malignancy and potentially malignant lesions: an update on the epidemiology, risk factors, diagnosis and management. *Aust Dent J*; 55 Suppl 1: 61-65.

McMahon J, O'Brien CJ, Pathak I, et al (2003). Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg*;41: 224–231.

McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Dole CM (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell*; 94: 363-374.

Meier JD, Oliver DA, Varvares MA (2005). Surgical margin determination in head and neck Oncology: current clinical practice. The results of an International American Head and Neck Society Member Survey. *Head Neck*; 27(11): 952– 958.

Merritt WD, Weissler Mc, Turk BF, Glimmer TM (1990). Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 116: 1394-1398.

Milašin J, Pujić N, Dedović N, Nikolić Ž, Petrović V, Dimitrijević B (1994). High incidence of H-ras oncogene mutations in squamous cell carcinoma of lip vermilion. *J Oral Pathol Med*; 23(7): 298-301.

Mohan M, Jagannathan N (2014). Oral field cancerization: an update on current concepts. *Oncology Reviews*; 8(1).

Mineta H, Borg A, Dictor M, Wahlberg P, Akervall J, Wennerberg J (1998). p53 mutation, but not p53 overexpression, correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*; 78(8): 1084-90.

Moura MA, Bergmann A, Aguiar SS, Thuler LC (2014). The magnitude of the association between smoking and the risk of developing cancer in Brazil: a multicenter study. *BMJ Open*; 4(2): e003736.

Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK et al (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res*; 55: 5536–5539.

Nagase S, Suzuki F, Tokunaga H, Toyoshima M, Utsunomiya H, Niikura H, et al (2014). Molecular Pathogenesis of Uterine Serous Carcinoma. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*; 3(1): 33-9.

Neville BW, Day TA (2002). Oral cancers and precancerous lesions. *CA cancer J Clin*; 52: 195-215.

Oji C, Chukwunke F (2012). Poor oral hygiene may be the sole cause of oral cancer. *J Maxillofac Oral Surg*; 11(4): 379-83.

Ord RA, Aisner S (1997). Accuracy of frozen sections in assessing margins in oral cancer resection. *J Oral Maxillofac Surg*; 55: 663–669.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*; 55(2): 74-108.

Partridge M, Li SR, Pateromichelakis S, Francis R, Phillips E, uang XH, Tesfa-Selase F, Langdon JD (2000). Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. *Clinical Cancer Res*; 6: 2718-2725.

Patel RS, Goldstein DP, Guillemaud J, Bruch GA, Brown D, Gilbert RW, et al (2010). Impact of positive frozen section microscopic tumor cut-through revised to negative on oral carcinoma control and survival rates. *Head Neck*; 32(11): 1444-51.

Paterson IC, Eveson JW, Prime SS (1996). Molecular changes in oral cancer may reflect aetiology and ethnic origin. *Eur J Cancer B Oral Oncol*; 32(3): 150-153.

Patil VM, Chakraborty S, Shenoy PK, Manuprasad A, Sajith Babu TP, Shivkumar T, et al (2014). Tolerance and toxicity of neoadjuvant docetaxel, cisplatin and 5 fluorouracil regimen in technically unresectable oral cancer in resource limited rural based tertiary cancer center. *Indian J Cancer*; 51(1): 69-72.

Perez-Roger I, Solomon DLC, Sewing A, Land H (1997). Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27Kip1 binding to newly formed complexes. *Oncogene*; 14: 2373-2381.

Perie S, Meyers M, Mazzaschi O, De Crouy Chanel O, Baujat B, Lacau St Guily J (2014). Epidemiology and anatomy of head and neck cancers. *Bull Cancer*; 101(5): 404-10.

Petrović M, Jelovac D (2008). The Frequency and Outcome of Lip Cancer in Serbian Population. *Balkan Journal of Stomatology*; 12:34-7.

Peukert K, Staller P, Schneider A, Carmichael G, Hanel F, Eilers M (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J*; 16: 5672-5686.

Pfister D, Ang K, Brizel D, Burtneess B, Cmelak A, Colevas D et al (2011). Head and neck cancers. *J Natl Compr Canc Netw*; 9: 596-650.

Prelec J, Laronde DM (2014). Treatment modalities of oral cancer. *Can J Dent Hyg*; 48(1): 13-9.

Prendergast GC, Ziff EB (1989). DNA-binding motif. *Nature*; 341(6241): 392.

Prives C, Hall PA (1999). The p53 pathway. *J Pathol*; 187: 112–26.

Prives C (1998) Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 95: 5–8.

Popovic B, Jekic B, Novakovic I, Lukovic LJ, Tepavcevic Z, Jurisic V, Vukadinovic M, Milasin J (2007). Bcl-2 expression in oral squamous cell carcinoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1095: 19-25.

Popović B, Jekić B, Novaković I, Luković L, Konstantinović V, Babić M, Milašin J (2010). Cancer genes alterations and HPV infection in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*; 39(9): 909-915.

Rajesh KS, Thomas D, Hegde S, Kumar MS (2013). Poor periodontal health: A cancer risk? *J Indian Soc Periodontol*; 17(6): 706-10.

Reddout N, Christensen T, Bunnell A, Jensen D, Johnson D, O'Malley S et al (2007). High risk HPV types 18 and 16 are potent modulators of oral squamous cell carcinoma phenotypes in vitro. *Infect Agent Cancer*; 2(1): 21.

Reibel J (2003). Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med*;14:47-62.

Reinstein J, Schlichting I, Frech M, Goody RS, Wittinghofer A (1991). p21 with a phenylalanine 28 leucine mutation reacts normally with the GTPase activating protein GAP but nevertheless has transforming properties. *J Biol Chem*; 266(26): 17700-17706.

Reis PP, Waldron L, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Galloni NN, Xuan Y, et al (2011). A gene signature in histologically normal surgical margins is predictive of oral carcinoma recurrence. *BMC Cancer*; 11: 437.

Rethman MP, Carpenter W, Cohen EE, et al (2010). Evidence-based clinical recommendations regarding screening for oral squamous cell carcinomas. *J Am Dent Assoc*; 141(5): 509-520.

Riese DJ, Stern DF (1998). Specificity within the EGF/ErbB receptor family signaling network. *Bio Essays*; 20:41-48.

Robbins KT, Clayman G, Levine PA, et al (2002). Neck dissection classification update: Revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 128: 751–8.

Rosenwald IB, Rhoads DB, Callanan LD, Isselbacher KJ, Schmidt EV (1993). Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 6175-6178.

Rudolph B, Saffrich R, Zwicker J, Henglein B, Müller R, Ansorge W, Eilers M (1996). Activation of cyclin-dependent kinases by Myc mediates induction of cyclin A, but not apoptosis. *EMBO J* ; 15: 3065-3076.

Rutkowski T, Wygoda A, Hutnik M, Skłodowski K, Wydmanski J, Maciejewski A, et al (2010). Intraoperative radiotherapy (IORT) with low-energy photons as a boost in patients with early-stage oral cancer with the indications for postoperative radiotherapy: treatment feasibility and preliminary results. *Strahlenther Onkol*; 186(9): 496-501.

Sakaguchi K, Herrera JE, Saito SI, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Appella E (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation–acetylation cascade. *Genes & development*; 12(18): 2831-2841.

Saranath D, Change Se, Bhotie LT et al (1991). High frequency of mutations in codons 12 and 61 of H-ras proto-oncogene in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer*; 63: 573–8.

Sargeran K, Murtomaa H, Safavi SM, Vehkalahti MM, Teronen O (2008). Survival after diagnosis of cancer of the oral cavity. *Br J Oral Maxillofac Surg*; 46: 187-191.

Saulle R, Semyonov L, Mannocci A, Careri A, Saburri F, Ottolenghi L, et al (2014). HPV and cancerous diseases of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oral Diseases*. doi: 10.1111/odi.12269.

Sawyer DR, Wood NK (1992). Oral cancer: Etiology, recognition and management. In *The Dental Clinics of North America. Topics in Oral Dignosis I*, eds. D'Ambrosia JA, Fotos PG. 36: 919-944.

Schildt EB, Eriksson M, Hardell L, Magnuson A (1998). Oral snuff, smoking habits and alcohol consumption in relation to oral cancer in a Swedish case-control study. *Int J Cancer*; 77(3): 341-6.

Scholl P, Byers RM, Batsakis JG, Wolf P, Santini H (1986). Microscopic cutthroughof cancer in the surgical treatment of squamous carcinoma of the tongue: prognostic and therapeutic implications. *Am J Surg*; 152: 354.

Scully C (1993). Oncogenes, tumour suppressers and viruses in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med*; 22: 337–47.

Senyuta N, Yakovleva L, Goncharova E, Scherback L, Diduk S, Smirnova K, et al (2014). Epstein-barr virus latent membrane protein 1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia. *J Med Virol*; 86(2): 290-300.

Shah JP et al (2001). *Atlas of Clinical Oncology, Cancer of Head and Neck*: 102. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York.

Shah JP, Shemen LJ, Strong EW (1987). Buccal mucosa, alveolus, retromolar trigone, floor of the mouth, hard palate, and tongue tumors. U: Thawley S.E, i Panje W.R. (urednici) *Comprehensive Management of Head and Neck Tumors*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Mexico Sity, Rio de Janeiro, Sydney, Tokio, Hong Kong , str. 551-563.

Shaha AR, Spiro RH, Shah JP, Strong EW (1984). Squamous carcinoma of the floor of the mouth. *Am J Surg*; 148: 455–9.

Shaw RJ, Hobkirk AJ, Nikolaidis G, Woolgar JA, Triantafyllou A, Brown JS et al (2013). Molecular staging of surgical margins in oral squamous cell carcinoma using promoter methylation of p16(INK4A), cytoglobin, E-cadherin, and TMEFF2. *Ann Surg Oncol*; 20(8): 2796-802.

Shin DM, Mao L, Papadimitrakopoulou VM, Clayman G, El- Naggar A, Shin HJ et al (2000). Biochemopreventive therapy for patients with premalignant lesions of the head and neck and p53 gene expression. *J Natl Cancer Inst*; 92: 69- 73.

Shopland DR, Eyre HJ, Pechacek TF (1991). Smoking-attributable cancer mortality in 1991: is lung cancer now the leading cause of death among smokers in the United States? *J Natl Cancer Inst*; 83: 1142–8.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A (2014). Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*; 64(1): 9-29. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2014; 64(5): 364.

Silverman SJr, Griffith M (1972). Smoking characteristics of patients with oral carcinoma and the risk for second oral primary carcinoma. *J Am Dent Assoc*; 85: 637-640.

Silverman SJr, Shillitoe EF (1998). Etiology and Predisposing Factors. In: Silverman S Jr ed. *Oral Cancer*, 4th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc: 7-24.

Sittel C, Eckel HE, Damm M, von Pritzbuer E, Kvasnicka HM (2000). Ki-67 (MIB1), p53, and Lewis-X (LeuM1) as prognostic factors of recurrence in T1 and T2 laryngeal carcinoma. *Laryngoscope*; 110: 1012-1017.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer*; 6: 963–8.

Slaughter DP (1946). Multicentric origin of intraoral carcinoma. *Surgery*; 20: 133-46.

Smale ST, Baltimore D (1989). The „initiator“ as a transcription control element. *Cell*; 57: 103-113.

Snow GB (1989). Evaluation and staging of the patient with head and neck cancer. In: Myers EN, Suen JY, eds. *Cancer of the head and neck*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, str.17-38.

Spiro RH, Guillamondegui O Jr, Paulino AF, Huvos AG (1999). Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck*; 21: 408–413.

Spiro RH, Huvos AG, Wong GY, Spiro JD, Gnecco CA, Strong EW (1986). Predictive value of tumor thickness in squamous carcinoma confined to the tongue and floor of the mouth.

Am J Surg; 152(4): 345-350.

Spiro RH, King W, Harvey W, Strong EW (1988). Squamous carcinoma of the gums. *Am J Surg*; 156: 281-5.

Sreedhar G, Narayanappa Sumalatha M, Shukla D (2014). An overview of the risk factors associated with multiple oral premalignant lesions with a case report of extensive field cancerization in a female patient. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*

Stommel J, Jimenez G, Marchenko N, Moll U, Hope T, Wahl GM (1999). A nuclear export signal within the TP53 tetramerization domain provides a mechanistic link between structure, subcellular localization and oligomerization (abstr.). *ISREC conference on "cancer and the cell cycle"*.

Sunny L, Yeole BB, Hakama M, Shiri R, Sastry PS, Mathews S et al (2004). Oral cancer in Mumbai, India: A fifteen years perspective with respect to incidence trend and cumulative risk. *Asian Pac J Cancer Prev*; 5: 294-300.

Supic G, Kozomara R, Jovic N, Zeljic K, Magic Z (2011). Hypermethylation of RUNX3 but not WIF1 gene and its association with stage and nodal status of tongue cancers. *Oral Dis*; 17(8): 794-800.

Syrjanen S (2005). Human papilloma virus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol*; 32 (suppl): 59-66.

Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VMM, Kummer A, Snel MHJ, Snijders PJF et al (2001) Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: Biological and clinical implications. *Clinical Cancer Res*; 7: 1523-1532.

Thomson PJ, Hamadah O (2007). Cancerisation within the oral cavity: the use of field mapping biopsies' in clinical management. *Oral Oncol*; 43(1):20-6.

Temam S, Flahault A, Perie S, Monceaux G, Coulet F, Callard P et al (2000). 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*; 18: 385-394.

Tsai ST, Wong TY, Ou CY, Fang SY, Chen KC, Hsiao JR et al (2014). The interplay between alcohol consumption, oral hygiene, ALDH2 and ADH1B in the risk of head and neck cancer. *Int J Cancer*; 135(10): 2424-36.

Tunca B, Erisen L, Coskun H, Cecener G, Ozuysal S, Egeli U (2007). p53 gene mutations in surgical margins and primary tumor tissues of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Tumori*; 93: 182-188.

Uchida K, Veeramachaneni R, Huey B, Bhattacharya A, Schmidt BL, Albertson DG (2014). Investigation of HOXA9 promoter methylation as a biomarker to distinguish oral cancer patients at low risk of neck metastasis. *BMC Cancer*; 14(1): 353.

van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Alain Kummer J, Denkers F, Dijkstra, J et al (2002). Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *J Pathol*; 198(4): 476-86.

Volling P, Jungehulsing M, Stutzer H, Diehl V, Tesch H (1993). Analysis of proto-oncogenes in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Oncology* 3: 671-677.

Vukadinovic M, Jezdic Z, Petrovic M, Medenica LM, Lens M (2007). Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: analysis of a 10-year experience in 223 patients. *J Oral Maxillofac Surg*; 65(4), 675-679.

Walker DM, Boey G, McDonald LA (2003) The pathology of oral cancer. *Pathology*; 35: 376-83.

Walter M, Clark SG, Levinson AD (1986). The oncogenic activation of human p21ras by a novel mechanism. *Science*, 233: 649-652.

Wang B, Zhang S, Yue K, Wang XD (2013). The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases. *Chin J Cancer*; 32(11): 614-8.

Warnakulasuriya KA, Tavassoli M, Johnson NW (1998). Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*; 27: 376-381.

Warnakulasuriya S (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*; 45: 309-316.

Werkmeister R, Brandt B, Joos U (2000). Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncology*; 36:100-105.

Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, Hill ML, Humphrey PA, Kurpad SN et al (1995). Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res*; 55: 3140–3148.

Yadav DS, Chattopadhyay I, Verma A, Devi TR, Singh LC, Sharma JD, et al (2014). A pilot study evaluating genetic alterations that drive tobacco- and betel quid-associated oral cancer in Northeast India. *Tumour Biol*; 35(9): 9317-30.

Yakob M, Fuentes L, Wang MB, Abemayor E, Wong DT (2014). Salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma - current state and recent advances.. *Curr Oral Health Rep*; 1(2): 133-141.

Yang SW, Tsai CN, Lee YS, Chen TA (2011) Treatment outcome of dysplastic oral leukoplakia with carbon dioxide laser--emphasis on the factors affecting recurrence. *J Oral Maxillofac Surg*; 69(6): e78-87.

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2: 127–137.

Zaravinos A (2014). An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. *Oncotarget*; 5(12): 3956-69.

Zieske LA, Johnson JT, Myers EN, Thearle PB (1986). Squamous cell carcinoma with positive margins: surgery and postoperative irradiation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 112: 863-6.

Zheng TZ, Boyle P, Hu HF, (1990). Dentition, oral hygiene, and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People's Republic of China. *Cancer Causes Control* ;1: 235–41.

Zheng G, Yang YC (2004). ZNF76, a novel transcriptional repressor targeting TBP, is modulated by sumoylation. *J Biol Chem* 20; 279: 42410–21.

Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ et al (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12: 2424-2433.

Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew A, Shanta V, Varghese C et al (2003) Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer* 105(5):681-6.

PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада _____

Ментор _____

Потписани _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.**Изјава о коришћењу**

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

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Tabela br.1.1 TNM Klasifikacija karcinoma usne duplje

T- Primarni tumor**Tx-** Primarni tumor se ne može ustanoviti**T0-** Nema znakova primarnog tumora**Tis-** Carcinoma in situ**T1-** Tumor veličine do 2 cm**T2-** Tumor veličine 2-4 cm**T3-** Tumor veći od 4 cm**T (usna)**

Tumor infiltriše kortikalni deo kosti, donjovilični živac, pod usta, ili kožu (nosa ili brade)

T4a (usna duplja)

Tumor kroz kortikalni deo kosti infiltriše muskulaturu jezika (m.genioglossus, m.hyoglossus, m.palatoglossus i m.styloglossus), gornjoviličnu šupljinu, ili kožu lica

T4b (usna i usna duplja)

Tumor infiltriše: prostore koje ograničavaju mastikartorni mišići, pterigoidni nastavci, ili baza lobanje; unutrašnju karotidnu arteriju (a.carotidis interna)

N-Regionalni limfni čvorovi**Nx-** Regionalne metastaze se ne mogu ustanoviti**N0-** nema regionalnih metastaza**N1-** metastaza u jednom, ipsilateralanom limfnom čvoru, čiji dijametar ne prelazi 3cm**N2-****N2a-** metastaza u jednom ipsilateralanom limfnom čvoru, koji je veći od 3cm, a manji od 6cm u prečniku**N2b-** metastaza u više ipsilateralanih limfnih čvorova, do 6cm u prečniku**N2c-** metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima, od kojih ni jedna ne prelazi 6cm u prečniku**N3-** metastaza u limfnom čvoru prelazi 6cm u prečniku

M- Udaljene metastaze**Mx-** udaljene metastaze se ne mogu ustanoviti**M0-** nema udaljenih metastaza**M1-** postoje udaljene metastaze

Vreme proteklo od prvih tegoba do operacije

Lokalizacija promene:

Veličina promene:

Datum intervencije:

Histopatološka dijagnoza bolesti:

TNM klasifikacija:

U Beogradu,

Potpis ispitanika

Potpis istraživača

Klinika za maksilofacijalnu Hirurgiju
Stomatološki fakultet
Univerzitet u Beogradu
ul. Dr Subotića br. 4
tel: 011/2685-064

INFORMATOR ZA PACIJENTA (OBAVEŠTENJE ZA PACIJENTA)

NASLOV ISTRAŽIVNJA

Analiza TP53 gena u histološki negativnim marginama skvamocelularnih karcinoma usne duplje

Predlog i svrha istraživanja

Ovo je klinička studija Klinike za Maksilofacijalnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Cilj ovog istraživanja je detekcija mutacija u TTP53 genu u histološki negativnim marginama skvamocelularnog karcinoma sluzokože usne duplje, utvrđivanje korelacije između učestalosti mutacija TP53 gena, histološkog gradusa tumora i kliničko-deskriptivnog nalaza.

Procedura ispitivanja

U okviru studije, pacijenti će biti podvrgnuti operaciji (hirurškom uklanjanju tumora sluzokože usne duplje) kao i postoperativnim kontrolama. U toku operacije bi se uzimalo granično tkivo, s tim što bi se molekularno genetička analiza vršila na preparatu graničnog tkiva perifernije od linije resekcije. U slučaju kada bi histopatološka verifikacija ukazala da u graničnom tkivu nema prodora malignih ćelija pristupilo bi se daljoj molekularno genetičkoj analizi.

Rizici po pacijenta i ograničenje istraživanja

Rizici po pacijente koji će biti uključeni u istraživanje vezani su isključivo za operativni zahvat i anesteziološku proceduru.

Očekivana korist od istraživanja

Ukoliko se u histološki negativnim marginama pokaže prisustvo mutacija TP53 gena može se očekivati veća učestalost recidiva tako da bi kod pacijentata sa TP53 mutacijom u negativnoj margini trebalo sprovesti mere intenzivnijeg postoperativnog skrininga. Značaj predviđenog istraživanja je tim veći što, do sada, nije utvrđen procenat mutacija ovog gena u histološki negativnim marginama skvamocelularnog karcinoma sluzokože usne duplje u našoj populaciji, a što bi svakako moglo doprineti boljoj prevenciji ovog oboljenja.

Učestvovanje u studiji je dobrovoljno

Učestvovanje u ovoj studiji je na dobrovoljnoj bazii ne podrazumeva materijalnu nadoknadu ni materijalne troškove pacijenta. Pacijent može odustati ili izići iz studije u bilo koje vreme.

Dokumentacija o pacijentu

Dokumentacija o pacijentu je poverljiva. Direktan uvid u medicinsku dokumentaciju mogu osim ordinirajućeg lekara imati samo članovi istraživačkog tima.

Pacijent će blagovremeno biti obavešten ako nove informacije postanu dostupne

Pacijent će na vreme biti obavešten ako dođe do bilo kakvih promena u istraživanju ili ako nove informacije u nauci i praksi postanu dostupne. Sve informacije će moći da dobije od članova istraživačkog tima, kao i stručnu negu i tretman u slučaju potencijalne povrede tokom učestvovanja u studiji.

Okolnosti i uslovi pod kojima će istraživanje biti izvedeno

Okolnosti i uslovi pod kojima će istraživanje biti izvedeno neće se razlikovati od uobičajenih uslova pod kojim se izvodi hirurška intervencija ekscizije tumora sluzokože usne duplje.

Približan broj učesnika u studiji

Približan broj učesnika u studiji je oko 40-60 pacijenata.

BIOGRAFIJA AUTORA

Mr Sci Dr Drago Jelovac rođen je 28. XII 1981.godine u Beogradu. Osnovnu i srednju školu završio je u Beogradu. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2000. godine, a diplomirao je 2005. godine sa prosečnom ocenom 9,62. Bio je i dobitnik nagrade za najboljeg studenta pete godine osnovnih studija za 2005. godinu sa prosečnom ocenom 10. Obavezni lekarski staž završio je 2007. godine, kada je položio stručni ispit za doktora stomatologije. Poslediplomske studije je upisao 2005. godine na smeru Maksilofacijalna hirurgija a zvanje magistra stomatoloških nauka stekao je oktobra 2009. Dr Drago Jelovac zaposlen je od 2010. godine na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Dr Drago Jelovac je 2011 godine upisao i Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu i trenutno pohađa, veoma uspešno 4. godinu studija. U toku poslediplomskih studija kao istraživač je učestvovao u dva domaća i tri međunarodna projekta. Za pokazano interesovanje u proučavanju oralnih karcinoma dr Jelovac dobio je plaketu Srpskog Lekarskog Društva i Medicinske Akademije Nauka za naučni doprinos, u prevenciji, ranoj dijagnostici i terapiji oralnog karcinoma. Bio je član organizacionog odbora XII Kongresa maksilofacijalnih hirurga Srbije sa međunarodnim učešćem u Beogradu. Za vreme studiranja bio je stipendista Republike Srbije, Grada Beograda. Dobitnik je stipendije Kraljevine Norveške. U toku poslediplomskih studija bio je stipendista Ministarstva Nauke Srbije. Nastavno-naučno veće Stomatološkog fakulteta je 2010. godine donelo odluku o usvajanju predloga teme doktorske disertacije. Mr Sci Drago Jelovac objavio je 16 naučnih radova, od kojih su 6 u međunarodnim časopisima (SCI lista). Koautor je dve monografije a održao je i tri predavanja po pozivu. Učestvovao je na domaćim i međunarodnim kongresima gde je prezentovano 50 naučnih radova u kojima je bio autor ili koautor. Član je srpskog lekarskog društva (SLD-a) (sekcija za maksilofacijalnu hirurgiju i kliničku farmakologiju), međunarodnog udruženja oralnih i maksilofacijalnih hirurga (IAOMS-a), asocijacije za oseointegraciju i kraniomaksilofacijalnu hirurgiju (AO-CMF-a), balkanskog udruženja maksilofacijalnih hirurga (BAMFS-a), evropskog udruženja kraniomaksilofacijalnih hirurga (EACMFS-a).