
UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marija M. Kostić

**VARIJABILNOST GENA UKLJUČENIH U
INFLAMATORNE, IMUNOMODULATORNE I
APOPTOTSKE PROCESSE
KAO FAKTOR RIZIKA ZA NASTANAK
BAZOCELULARNOG KARCINOMA
GLAVE I VRATA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija M. Kostić

**VARIABILITY OF GENES INVOLVED IN
INFLAMMATORY, IMMUNOMODULATORY
AND APOPTOTIC PROCESSES
AS A RISK FACTOR FOR
HEAD AND NECK
BASAL CELL CARCINOMAS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTORI

dr Marina Stamenković-Radak, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Jelena Milašin, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

ČLAN KOMISIJE

dr Ivana Novaković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____ 2012. godine

ZAHVALNICA

Najsrdajnije se zahvaljujem svojim profesorkama i mentorikama prof.dr Jeleni Milašin i prof.dr Marini Stamenković-Radač na ukazanom poverenju, strpljenju, iscrpnim sugestijama i diskusijama tokom eksperimentalnog rada i pisanja teze, kao i na znanju koje su mi nesebično prenele i na svoj podršci i pomoći u mom naučnom usavršavanju.

Zahvaljujem se i prof.dr Ivani Novaković na predusretljivosti, čitanju teze i korisnim primedbama.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Branki Popović na konstruktivnim sugestijama i komentarima, kao i na spremnosti da sasluša, saučestvuje i pomogne.

Najiskrenije se zahvaljujem dr Katarini Zeljić na velikom i nesebičnom zalaganju i pomoći u svim fazama izrade teze. Njena stručnost, znanje i bezrezervna prijateljska podrška su umnogome doprineli kvalitetu ove teze.

Dragim koleginicama iz laboratorije, Nađi i Bobi, izražavam zahvalnost na stručnoj pomoći, podršci i kolegijalnosti.

Dragim koleginicama Jasmini, Mariji i Milici na prijateljskoj podršci prilikom nastojanja da ova disertacija postane stvarnost.

Ogromnu zahvalnost dugujem mojim najdražima: suprugu Srđanu, mami, tati, Mileni i Bojani na razumevanju, strpljenju i ljubavi koju su mi pružili tokom čitavog školovanja. Vi ste bili moja najveća podrška i inspiracija. Ovaj doktorat i posvećujem vama.

Marija Kostić

Varijabilnost gena uključenih u inflamatorne, imunomodulatorne i apoptotske procese kao faktor rizika za nastanak bazocelularnog karcinoma glave i vrata

Rezime

Uvod: Bazocelularni karcinom (BCK), poznat kao i bazaliom, je najčešći oblik kancera u populaciji Kavkazijanaca. BCK čini oko 75% svih karcinoma kože. Metastazira veoma retko, ali sa porastom veličine tumora povećava se i incidenca metastaza. U najvećem broju slučajeva ovaj karcinom se javlja na delovima kože izloženim Sunčevom (UV) zračenju, ali faktori kao što su starost, postojanje ranijih opekotina od Sunca mogu doprineti povećanom riziku za razvoj BCK-a. Precizni mehanizmi nastanka BCK-a još uvek nisu poznati, ali se pretpostavlja da patogeneza BCK-a najčešće podrazumeva apsorpciju UVB zraka od strane DNK molekula, što dalje dovodi do mutacija u različitim genima, posebno u genima uključenim u proces ćelijske proliferacije, diferencijacije i smrti, kao što su *survivin* i *TP53*. Poznato je i da keratinocyte pod dejstvom UV zračenja oslobađaju i prostaglandine i citokine, između ostalog i *TNF-alpha* koji ostvaruje svoje biološke efekte u ćelijama preko molekula koji su svrstani u porodicu receptora za TNF, među kojima su najznačajnija dva *TNF-R1* i *TNF-R2*. Produkcija citokina je blisko povezana sa produkcijom matriks metaloproteinaza (*MMP*) koje su odgovorne za lokalnu tkivnu destrukciju. Na funkciju i stabilnost ovih proteina, mogu da utiču različiti polimorfizmi prisutni u kodirajućim i nekodirajućim sekvencama njihovih gena. Bazocelularni karcinomi, se javljaju kao posledica različitih štetnih uticaja spoljašnje sredine, ali isto tako pokazuju i izraženu naslednu predispoziciju, pa se u poslednje vreme sve više pažnje usmerava upravo na proučavanje doprinosa genskih polimorfizama kao modulatora predispozicije za malignu transformaciju.

Cilj: Cilj ove doktorske disertacije je analiza funkcionalnih polimorfizama u genima za *TNF-alpha*, *TNF-R1*, *TNF-R2*, *MMP-9*, *survivin* i *TP53*, kao i analiza njihove povezanosti sa patološkim karakteristikama BCK-a.

Materijal i metode: Studijska grupa je obuhvatala 80 pacijenata sa dijagnostikovanim BCK-om i 80 zdravih osoba, kontrolne grupe, koji prema starosti i polu odgovaraju grupi ispitanika, svi su srpske nacionalnosti. DNK je izolovana iz tkiva negativnih margina tumora u grupi pacijenata i periferne krvi kontrolne grupe. Restrikcionom digestijom PCR produkata i analizom dužine restrikcionih fragmenata (PCR-RFLP) analizirani su polimorfizmi u genima za *TNF-alpha* (-308G/A), *TNF-R1* (+36A/G), *TNF-R2* (+676T/G), *MMP-9* (-1562C/T), *Survivin* (-31G/C), *TP53* (Pro47Ser), kao i insercioni polimorfizam (*TP53 PIN3 Ins 16bp*) kako bi se utvrdila distribucija učestalosti genotipova alela u grupi pacijenata i kontrolnoj grupi. Hi-kvadrat i Fišerov egzaktni test su korišćeni za utvrđivanje razlika u distribuciji učestalosti različitih genotipova i alela. Logističkom regresionom analizom utvrđivan je rizik za oboljevanje od BCK-a. Sve vrednosti p smatrale su se statistički značajnim ako su bile manje od 0.05. Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim programom SPSS 13.0.

Rezultati: Najveći broj obolelih od BCK-a su osobe starije od 60 godina (84%), što potvrđuje ranije podatke da je BCK češći u starijoj populaciji, kao i da se incidence njegovog nastanka povećava sa godinama života. Što se tiče lokacije BCK-a, najzastupljeniji je u predelu nosa, kao najisturenijem delu lica. Zabeležene su značajne razlike u distribuciji genotipova u analizi polimorfizma +676T/G *TNF-R2* gena, (p=0.001, χ^2 test) i *PIN3 Ins 16bp TP53* gena (p=0.043, χ^2 test). Statistički značajna razlika u distribuciji alela je zabeležena samo u slučaju polimorfizma +676T/G *TNF-R2* gena, (p=0.011, χ^2 test). Značajno povećanje rizika za razvoj BCK-a utvrđeno je kod heterozigota TG u analizi polimorfizma +676T/G *TNF-R2* gena, (OR=4.86, p<0.001) u poređenju sa *wild type* TT genotipom, kao i kod heterozigota A1/A2 u analizi polimorfizma *PIN3 Ins 16bp TP53* gena (OR=2.40, p=0.027) u poređenju sa *wild type* A1/A1 genotipom. Interesantno je da polimorfizam -31G/C gena za *survivin* je pokazao značajno smanjenje rizika za razvoj BCK-a tek nakon što je računat *Adjusted OR*, za heterozigote GC genotipa (OR=0.46, p=0.047) u odnosu na homozigote GG genotipa. Ostali polimorfizmi u genima za *TNF-alpha* (-308G/A), *TNF-R1* (+36A/G), *MMP-9* (-1562C/T), *TP53* (Pro47Ser) nisu pokazali

postojanje značajne razlike u distribuciji učestalosti genotipova i alela između grupe pacijenata i kontrolne grupe.

Zaključak: Ovo istraživanje bazirano na analizi polimorfizama nekoliko odabranih gena, pokazalo je da su polimorfizmi nukleotidne sekvence +676T/G u *TNF-R2* genu i -31G/C u promotoru gena za *survivin*, kao i insercioni polimorfizam *PIN3 Ins 16bp* u *TP53* genu modulatori rizika za razvoj BCK-a u našoj populaciji.

Ključne reči: bazocelularni karcinom, polimorfizmi nukleotidne sekvence, TNF-alpha, TNF receptori, MMP-9, survivin, TP53.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK: 575.22:[616.006.6:611.92/93](043.3)

**Variability of genes involved in inflammatory,
immunomodulatory and apoptotic processes as a risk factor for
head and neck basal cell carcinomas**

Abstract

Introduction: Basal-cell carcinoma (BCC), also known as basalioma, is the most frequent type of cancer among the Caucasus. BCC accounts for approximately 75% of all skin cancers. It metastasizes extremely rarely, however its growth increases the risk and incidence of metastases. In the majority of cases, this cancer appears on the skin areas exposed to the sun rays (UV), but factors including age and the existence of earlier sunburn may considerably enhance the risk of BCC development. The precise mechanisms of BCC development are yet unknown, but BCC pathogenesis most commonly relates to the DNA molecule absorption of UVB rays, which furthermore, leads to mutations in various genes, especially in those included in the process of cell proliferation, differentiation, and death, like *survivin* and *TP53*. It is also known that keratinocytes under influence of UV rays release prostaglandins and cytokines and, among others, *TNF-alpha* which exerts its effects in cells via molecules belonging to the family of *TNF receptors*, the most significant of which are *TNF-R1* and *TNF-R2*. The production of cytokines is closely connected to the production of matrix metalloproteinases (*MMP*) that are responsible for the local tissue destruction. Different polymorphisms can affect the function and stability of these proteins, which are present in the coding and noncoding sequences of their genes. Basal cellcarcinomas occurs a result of various adverse environmental impacts, but also show an expressed hereditary predisposition, so more attention is recently directed precisely to the study of the contribution of genetic polymorphisms as modulators of predisposition to malignant transformation.

Aim: The aim of this doctoral dissertation is the analysis of functional polymorphisms in genes for *TNF-alpha*, *TNF-R1*, *TNF-R2*, *MMP-9*, *survivin* and *TP53*, but also the analysis of their association with pathological features of BCC.

Material and methods: The study group included 80 patients diagnosed with basal cell carcinoma and 80 healthy individuals, the control group, matched in age and gender with the examinees, all of them of Serbian nationality. In the patients group, DNA was isolated from the tissue of histologically negative tumor margins, and in the control group from peripheral blood samples. The polymorphisms in *TNF-alpha* gene (-308G/A), *TNF-R1* (+36A/G), *TNF-R2* (+676T/G), *MMP-9* (-1562C/T), *survivin* (-31G/C), *TP53* (Pro47Ser), and insertion polymorphism (*TP53 PIN3 Ins 16bp*) were analyzed by restriction digestion of PCR products and by analysis of restriction fragment length, in order to determine the distribution frequency of genotype and allele in the patient and control group. Chi square test and Fisher exact test were used for determination of differences in the genotype and allele distribution frequencies. Logistic regression was used for BCC risk assessment. If amounting to less than 0.05, all the p values were considered statistically significant. Calculations were performed by using SPSS 13.0 statistical software.

Results: The largest number of patients with BCC is among patients over 60 years (84%), which confirms earlier reports that BCC is more common in the older population, and that its incidence increases with age. As for the location of BCC, it affects most commonly the nose area, as the most protruding part of the face. Statistically significant differences in the distribution of alleles and genotypes of the polymorphisms +676T/G *TNF-R2* (p=0.001, χ^2 test) and *PIN3 Ins 16bp* *TP53* gene (p=0.043, χ^2 test) were observed. A significant increase of BCC development risk was observed in TG heterozygotes for the polymorphism +676T/G *TNF-R2* in comparison to wild type TT genotypes (OR=4.86, p<0.001), and also in A1/A2 heterozygotes of *PIN3 Ins 16bp* analyzed polymorphism in *TP53* gene in comparison to the wild type A1/A1 genotypes (OR=2.40, p=0.027). Interestingly, GC heterozygotes for the polymorphism -31G/C in the *survivin* gene showed a significant decrease of BCC development risk after calculating the adjusted OR in comparison to GG genotypes (OR=0.46, p=0.047). The remaining polymorphisms in *TNF-alpha* gene (-308G/A), *TNF-R1* (+36A/G), *MMP-9* (-1562C/T), *TP53*

(Pro47Ser) did not show significant difference in the frequencies of genotypes and alleles between patients and control group.

Conclusion: This research, based on the analysis of polymorphisms in several selected genes, showed that the polymorphisms +676T/G of TNF-R2 gene, PIN3 Ins 16bp of TP53 gene, and -31G/C of survivin gene are modulators of the risk for BCC development in Serbian population.

Key words: basal cell carcinoma, single nucleotide polymorphisms, TNF-alpha, TNF receptors, MMP-9, survivin, TP53.

Scientific field: Biology

Narrower scientific field: Genetics

UDC: 575.22:[616.006.6:611.92/93](043.3)

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1.KANCER.....	3
1.2.GENETIČKA OSNOVA KANCERA.....	4
1.3.KARCINOMI KOŽE.....	6
1.3.1.GRAĐA KOŽE.....	6
1.3.2.TIPOVI KARCINOMA KOŽE.....	9
1.3.2.1.Bazocelularni karcinom (BCK).....	10
1.3.2.2.Klasifikacija bazocelularnog karcinoma.....	12
1.3.2.3.Epidemiologija bazocelularnog karcinoma.....	17
1.3.2.4.Etiologija bazocelularnog karcinoma.....	19
1.3.2.5.UV zračenje i bazocelularni karcinom.....	21
1.4.GENETIČKI POLIMORFIZMI.....	23
1.5.FAKTORI UKLJUČENI U INVAZIJE I METASTAZE.....	26
1.5.1.CITOKINI.....	26
1.5.1.1.Faktor nekroze tumora (TNF-alpha).....	27
1.5.1.2.Polimorfizam u genu za TNF-alpha (-308 G/A).....	29
1.5.1.3.Receptori TNF-alpha (TNF-R1, TNF-R2).....	31
1.5.1.4.Polimorfizmi u genima za TNF receptore:TNF-R1 (+36 A/G), TNF-R2 (+676 T/G).....	34
1.5.2.MATRIKS METALOPROTEINAZE.....	35
1.5.2.1.Matriks metaloproteinaza 9 (MMP- 9).....	38
1.5.2.2.Polimorfizam u genu za matriks metaloproteinazu 9(-1562 C/T).....	40
1.6.FAKTORI UKLJUČENI U KONTROLU ČELIJSKE PROLIFERACIJE, DIFERENCIJACIJE I SMRTI.....	41
1.6.1.APOPTOZA, programirana smrt ćelije.....	41
1.6.2.PROTEINI INHIBITORI APOPTOZE.....	43
1.6.2.1.Survivin.....	43
1.6.2.2.Polimorfizam u genu za survivin (-31 G/C).....	46
1.6.3.TUMOR PROTEIN 53.....	47
1.6.3.1.Polimorfizmi u genu za TP53(Pro47Ser, PIN3 Ins 16bp).....	51
2. CILJEVI RADA	55
HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	56
3. PACIJENTI,MATERIJAL I METODE	57
3.1. PACIJENTI I BIOLOŠKI MATERIJAL.....	58
3.2. METODE.....	58
3.2.1. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi.....	58
3.2.2. Izolacija DNK iz tumorskog tkiva.....	60
3.2.3. Određivanje koncentracije DNK u uzorku.....	61
3.2.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR metoda).....	62
3.2.4.1. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za TNF-alpha.....	63
3.2.4.2. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za TNF-R1.....	64
3.2.4.3. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za TNF-R2.....	65
3.2.4.4. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za MMP-9.....	66
3.2.4.5. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za survivin.....	67
3.2.4.6. PCR reakcija u analizi polimorfizma TP53 gena.....	68
3.2.5. Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE).....	69

3.2.6. Restrikciona digestija PCR produkata i analiza dužine restrikcionihih fragmenata (RFLP)	70
3.2.6.1. RFLP u analizi polimorfizma gena za TNF alpha -308 G/A.....	70
3.2.6.2. RFLP u analizi polimorfizma TNF-R1 gena za +36 A/G.....	72
3.2.6.3. RFLP u analizi polimorfizma TNF-R2 gena za +676 T/G.....	73
3.2.6.4. RFLP u analizi polimorfizma MMP-9 gena za -1562 C/T.....	74
3.2.6.5. RFLP u analizi polimorfizma gena za SURVIVIN za -31 G/C.....	75
3.2.6.6. RFLP u analizi polimorfizma TP53 gena (Pro47Ser, PIN3 Ins 16bp).....	76
3.2.7. Statistička analiza	78
4. REZULTATI.....	79
4.1. DISTRIBUCIJA PACIJENATA PREMA GODINAMA STAROSTI	80
4.2. LOKACIJA TUMORA.....	81
4.3. VELIČINA TUMORA I PROTEKLO VREME OD UOČAVANJA PRVE PROMENE.....	83
4.4. ANALIZA GENETIČKIH REZULTATA	85
4.4.1. Analiza polimorfizma u genu za TNF-alpha.....	85
4.4.2. Analiza polimorfizma u genu za TNF-R1.....	87
4.4.3. Analiza polimorfizma u genu za TNF-R2.....	90
4.4.4. Analiza polimorfizma u genu za MMP-9.....	92
4.4.5. Analiza polimorfizma u genu za survivin	95
4.4.6. Analiza polimorfizma u TP53 genu.....	97
5. DISKUSIJA.....	101
5.1. POLIMORFIZAM U GENU ZA TNF-ALPHA.....	102
5.2. POLIMORFIZMI U GENIMA ZA TNF RECEPTORE: TNF-R1 I TNF-R2.....	108
5.3. POLIMORFIZAM U GENU ZA MMP-9.....	112
5.4. POLIMORFIZAM -31G/C U GENU ZA SURVIVIN.....	115
5.5. POLIMORFIZMI U TP53 GENU, PRO47SER I PIN3 INS 16BP	118
6. ZAKLJUČCI	123
7. LITERATURA.....	126
8. BIOGRAFIJA AUTORA	155
9. PRILOZI.....	157

1. UVOD

Razvoj velikog broja molekulsko-bioloških i molekulsko-genetičkih metoda poslednjih decenija u značajnoj meri je doprineo boljem razumevanju strukture i organizacije genetičkog materijala. To nam je dalo i uvid u različite aspekte normalnog funkcionisanja ćelija, kao i patoloških promena u njima.

Procesi poput apoptoze, zatim složeni mehanizmi regulacije ćelijskog ciklusa, kao i procesi neoplastične transformacije danas su u osnovnim crtama dobro opisani. Razvijene su mnoge eksperimentalne tehnike koje nam omogućavaju bolju dijagnostiku i razumevanje etiologije malignih oboljenja. U budućnosti će nam pružiti i načine za bolju prevenciju, efikasniju terapiju, i, u velikoj meri, personalizovanu medicinu.

1.1. KANCER

Tumori predstavljaju masu izmenjenih ćelija koje se karakterišu nepravilanim i progresivnim rastom. Mogu biti maligni (zloćudni) i benigni (dobroćudni). Razlika između njih je u agresivnosti rasta. Zapravo, maligni se karakterišu metastazama i šire se (infiltriraju) u okolno tkivo, dok benigni tumori ne daju metastaze u druge organe i ne infiltriraju okolno zdravo tkivo, već ga potiskuju.

Rak (ili još kancer, maligna neoplazma, maligni tumor) nastaje neoplastičnom transformacijom ćelija i tkiva. Neoplastična transformacija je proces narušavanja tkivne homeostaze u pravcu nekontrolisane proliferacije ćelija i inhibicije ćelijskog umiranja nekim od oblika programirane ćelijske smrti. To je višestepeni proces, a svaki stepen odražava genetičke izmene koje dovode do transformacije normalne ćelije u malignu. Ćelija prolazi kroz različite morfološke i biohemijske izmene, što sve dovodi do nekontrolisane deobe ćelije i, konačno, usled poremećaja u imunološkom nadzoru i angiogenezi do metastaze na udaljenim mestima u telu.

U zavisnosti od porekla ćelija od kojih nastaju, maligni tumori se dele u nekoliko grupa:

- **Karcinomi** – počinje na pokrovnom epitelu kože, sluznica ili tkiva koje pokrivaju unutrašnje organe,
- **Sarkomi** – rak mišićnog i vezivnih tkiva (kostiju, hrskavice, masnog tkiva krvnih sudova ili vezivnih tkiva u i oko zglobova),
- **Leukemije** – rak krvi - počinje u kostnoj srži, gde se obrazuju sve ćelije krvnih elementa, odakle kao izmenjene ćelije odlaze u cirkulaciju,
- **Limfomi i mijelomi** – rak limfnog sistema (limfnih čvorova-žlezda i limfnih sudova)
- **Tumori centralnog nervnog sistema** – mozga, kičmene moždine i ovojnica se razvija u tkivima koje sačinjavaju mozak i kičmena moždina.

1.2. GENETIČKA OSNOVA KANCERA

Danas je prihvaćen stav da je kancer u osnovi bolest povezana sa promenama u genima, koja se razvija u više faza. Za malignu transformaciju je najčešće potrebno 5–7 nezavisnih mutacija, a u ovaj proces su neposredno uključene dve glavne klase gena: protonkogeni i tumor-supresor geni.

Onkogeni su geni čiji proteinski produkti stimulišu ćelijski rast i deobu. U formi proto-onkogeni (normalni, nemutirani) oni se vremenski i prostorno strogo kontrolisano ekspimiraju. Mutacijom proto-onkogeni prelaze u formu onkogeni, koji se nekontrolisano ekspimiraju. Te mutacije mogu biti:

- tačkaste mutacije
- genske delecije
- amplifikacije gena
- hromozomski rearanžmani (najčešće translokacije)

Mutacije u proto-onkogenima su dominantne u odnosu na malignitet – dovoljna je jedna kopija aktiviranog onkogeni da bi se ispoljio kancerogeni efekat.

Na osnovu funkcije proto-onkogeni mogu biti:

- faktori rasta (c-sis)
- receptori faktora rasta (c-erbB)
- prenosioci signala (c-abl, c-src, c-ras)
- regulatorni proteini nukleusa (c-myc, c-fos, c-erbA).

Tumor-supresorni geni (antionkogeni) su geni čija je osnovna funkcija regulisanje ćelijskog ciklusa, kontrola procesa proliferacije i diferencijacije i očuvanje ukupne stabilnosti genoma. Nedostatak ekspresije ovih gena dovodi do gubitka kontrole ćelijskog ciklusa i povezuje se sa malignom alteracijom ćelije. Za razliku od onkogeni, ovde se mutacije u odnosu na malignitet ponašaju recesivno – neophodna je izmena oba alela (homozigotno stanje) da bi došlo do kancerogenog efekta.

Na osnovu funkcije antionkogeni mogu biti:

- regulatori ćelijskog ciklusa
- regulatori signalne transdukcije
- geni uključeni u međućelijske interakcije i interakcije ćelije i matriksa
- regulatori apoptoze
- citoskeletni geni
- neklasifikovani

Savremene podele u posebne kategorije svrstavaju gene uključene u proces apoptoze i u popravke DNK oštećenja. Ovi geni se po svojm krajnjem efektu mogu takođe klasifikovati u onkogene i antionkogene (npr. proapoptotski geni bili bi antionkogeni, a antiapoptotski onkogeni).

Danas je jasno da su procesi maligne transformacije u velikoj meri posledica različitih štetnih uticaja spoljašnje sredine. Takođe, poznato je da mnoga maligna oboljenja nose i naslednu predispoziciju za svoj nastanak. U poslednje vreme sve više pažnje se usmerava na proučavanje doprinosa genetičkih polimorfizama u malignoj transformaciji. To će nam omogućiti i da bolje pratimo tok razvoja bolesti i preciznije utvrdimo prognostičke parametre pri terapiji različitih pacijenata.

Najučestaliji tip karcinoma kod čoveka, o čijoj se genetici i epigenetici još uvek nedovoljno zna, čine karcinomi kože, zloćudne promene koje u 90% slučajeva nastaju na fotoekspoziranim delovima tela i direktno se povezuju sa oštećenjima kože nastalim pri dugotrajnom izlaganju ultraljubičastim zracima (UVA, UVB). Njihova incidence je u konstantnom porastu poslednjih decenija i sve češće se javljaju i u mlađem uzrastu tako da predstavljaju sve izraženiji medicinski problem.

1.3. KARCINOMI KOŽE

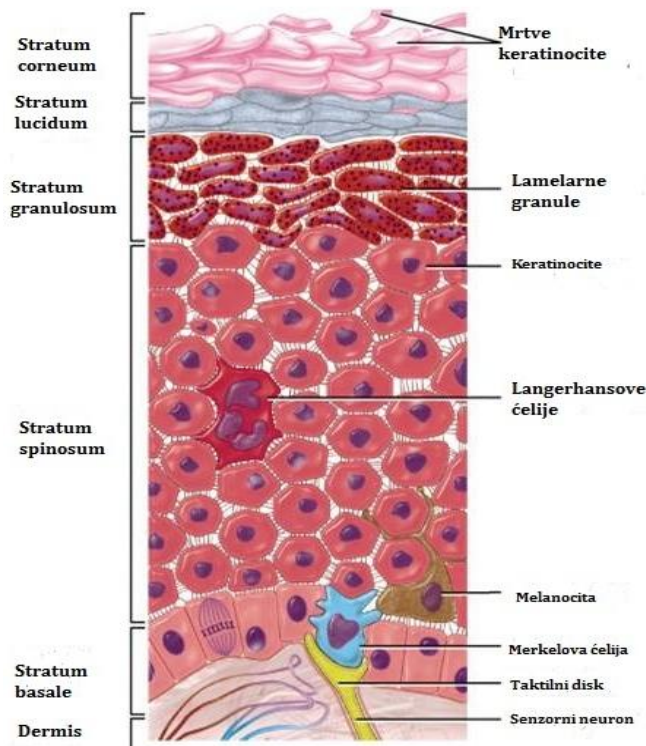
Da bi se bolje razumela patogeneza malignih tumora kože, izuzetno rasprostranjenog oboljenja današnjice, neophodno je dati osnovne informacije o histološkoj građi i karakteristikama kože kao najvećeg organa našeg tela i njegovog omotača koji je u neposrednom kontaktu sa spoljašnjom sredinom.

1.3.1. GRAĐA KOŽE

Građa kože je izuzetno složena. Podeljena je u dva različita, ali funkcionalno zavisna sloja, **epidermisa** (pokožice) i **dermisa** (krzna). Funkcija kože je na prvom mestu zaštitna, štiti telo od mehaničkih povreda, hemijskih, termičkih uticaja, patogenih mikroorganizama i uticaja UV zračenja.

Epidermis

Epidermis je površinski sloj kože izgrađen od velikog broja epitelijalnih



Slika 1. Građa epidermisa

preuzeto:<http://lcsdanatomyphysiology.wikispaces.com/Epidermal+cells,+p1>, modifikovano

ćelija koje su zbijene jedna uz drugu i grade kompaktan sloj. Njegova debljina varira od 0,1mm na telu, tek 0,02mm na licu do 1-5mm na tabanima i šakama. Keratinocite su raspoređena tako da grade 5 slojeva epidermisa: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* i *stratum corneum* (Slika 1).

Stratum basale čine keratinocite ravnomerno raspoređene na bazalnoj membrani koja oštro razgraničava epidermis od dermisa i koje su

aktivne u toku celog života i svojim deobama obrazuju gornje slojeve ćelija. U ćelijama gornjih slojeva epidermisa dolazi do procesa orožnjavanja, odnosno izumiranja ćelija i taj sloj epidermisa se odbacuje. U bazalnom sloju smeštene su i melanocite, ćelije koje stvaraju pigment i pružaju zaštitu od mutageneze izazvane UV zračenjem.

Bazalna membrana

Bazalna membrana je zona između bazalnih keratinocita i dermisa. Njena osnovna uloga je da deluje kao propustljiva barijera i da kontroliše ćelijsku organizaciju i diferencijaciju između receptora na površini ćelija i molekula unutar ekstraćelijskog matriksa.

Dermis

Dermis je sastavljen od rastresitog vezivnog tkiva u kome su dominantna kolagena vlakna utopljena u matriksu koji sadrži ćelije: fibroblaste, makrofage, limfocite, adipozne ćelije. Pored toga u dermisu su smešteni i završeci krvnih i limfnih sudova, nervni završeci, razni čulni organi, snopovi glatkih mišićnih vlakana, derivati epidermisa i krzna, čulni organi, razne egzokrine žlezde koje preko izvodnih kanala izbacuju sekret na površinu kože.

Površina dermisa obrazuje mnoga ispupčenja koja zalaze u epidermis čime je ostvarena tesna veza između ova dva dela.

Ekstraćelijski matriks (ECM)

Popunjava prostor između ćelija i povezuje ćelije istog ili različitih tkiva. Tri glavna konstituenta ECM-a su:

- kolagena vlakna
- adhezivni proteini koji formiraju mrežu (elastin, laminin, fibronektin)
- interfibrilarni solubilni polimeri- proteoglikani

Njegove uloge su:

- strukturna potpora ćelijama i tkivima
- regulacija ćelijskog ponašanja (utiče na razviće, oblik, polarizaciju, ponašanje i funkciju ćelija i tkiva, pričvršćuje ih i omogućava migraciju ćelija).

Podela kože po fototipovima

Prema načinu i brzini reakcije kože na delovanje Sunčevih zraka razlikuje se šest fototipova kože. Najosetljivije su osobe sa tipovima kože I i II.

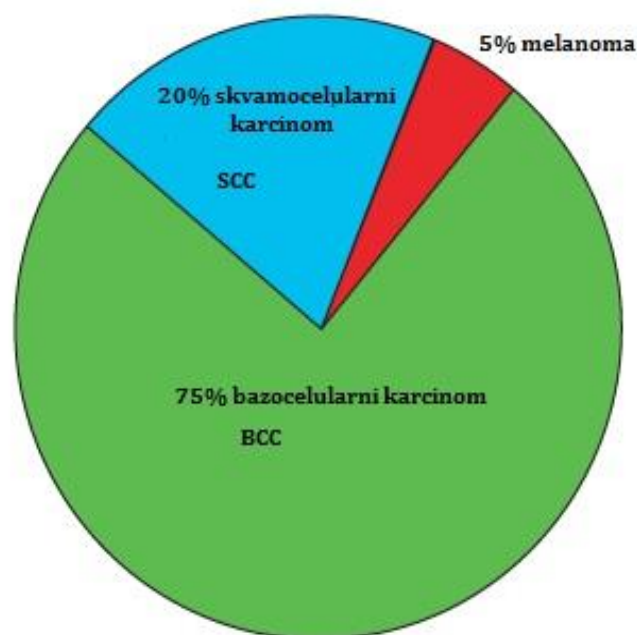
- **Tip I:** keltski tip kože: lako gori, uvek pocrveni, nikada ne tamni. Svetle oči, beo ten sa pegama, riđa ili plava kosa. Najčešće zastupljen u Kanadi i na krajnjem severu Evrope.
- **Tip II:** germanski tip kože: lako gori, uvek pocrveni, vrlo malo tamni. Oči plave, smeđe ili boje lešnika, kosa riđa ili svetla i ten svetao.
- **Tip III:** srednje evropski, kavkaski tip kože: umereno gori, postepeno i ravnomerno tamni. Ten je srednje svetao. Svetla koža, kestenjasta kosa i oči.
- **Tip IV:** mediteranski, mongolski, orijentalni ili hispano tip kože: minimalno gori i uvek dobro tamni do srednje tamne nijanse. Koža je svetla ili umereno tamna, oči i kosa su tamnosmeđe boje.
- **Tip V:** hispano, indijanski tip kože: retko gori, dobro tamni do tamnobraon nijanse. Nesunčana koža je vrlo tamna, tamne oči i kosa.
- **Tip VI:** crni (afrički i američki crnci, i Aboridžini): koža nikad ne gori, ima veliku količinu pigmentata, potpuno je crna i bez sunčanja. Crne oči i kosa.

1.3.2. TIPOVI KARCINOMA KOŽE

Maligni epitelni karcinomi kože, pa i regiona glave i vrata, dele se na melanomske i nemelanomske (amelanotične).

Nemelanomske karcinome kože (NMKK) ili keratinocitne karcinome čine najvećim delom bazocelularni karcinom (BCK) koji zahvata bazalni epitel i skvamocelularni karcinom (SCK), poreklom od pločastog epitela (oko 95%, *Slika 2*). Melanomi čine svega 5% malignih tumora kože.

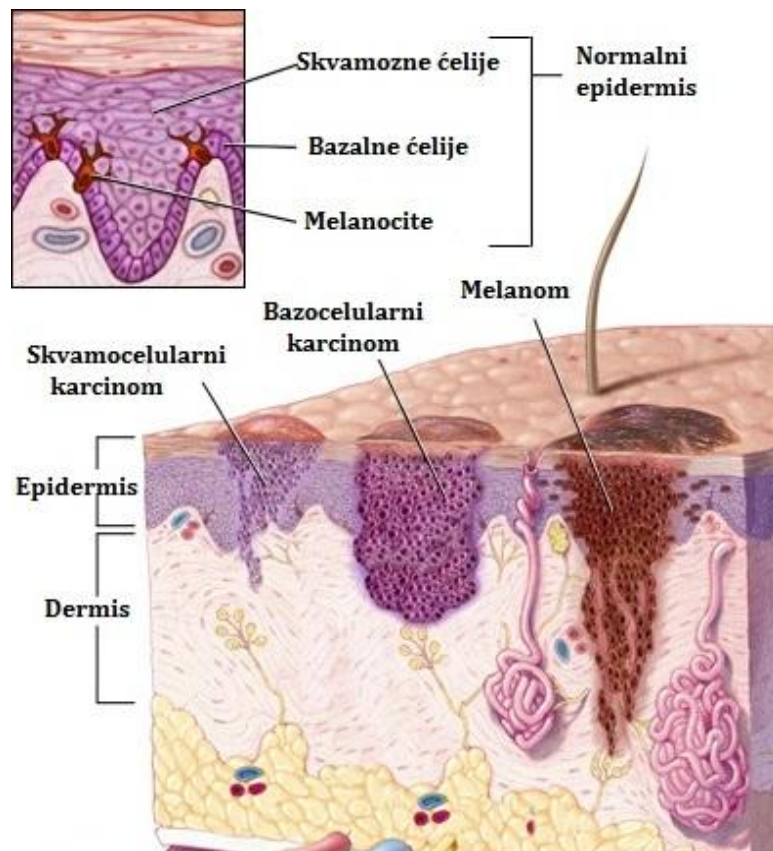
Incidenca nemelanomskih karcinoma kože u konstantnom je porastu. Utvrđeno je da svake godine oboli 2-3 miliona ljudi od ovog tipa karcinoma (Foster, 2008; WHO, 2009). Samo u SAD-u oboli 1,3 miliona ljudi svake godine, a očekuje se da će se taj broj udvostručiti u narednih 30 godina (Rhee, 2007). Najveći trendovi oboljevanja od ovog karcinoma su u pojedinim delovima Evrope, u Kanadi, SAD-u, Australiji (u proseku 3-8% populacije svake godine).



Slika 2. Najčešći oblici karcinoma kože sa procentualnim učestalostima
preuzeto:<http://www.doctorsapproach.com/blog/category/skin-cancer/>, modifikovano

1.3.2.1. BAZOCELULARNI KARCINOM (BCK)

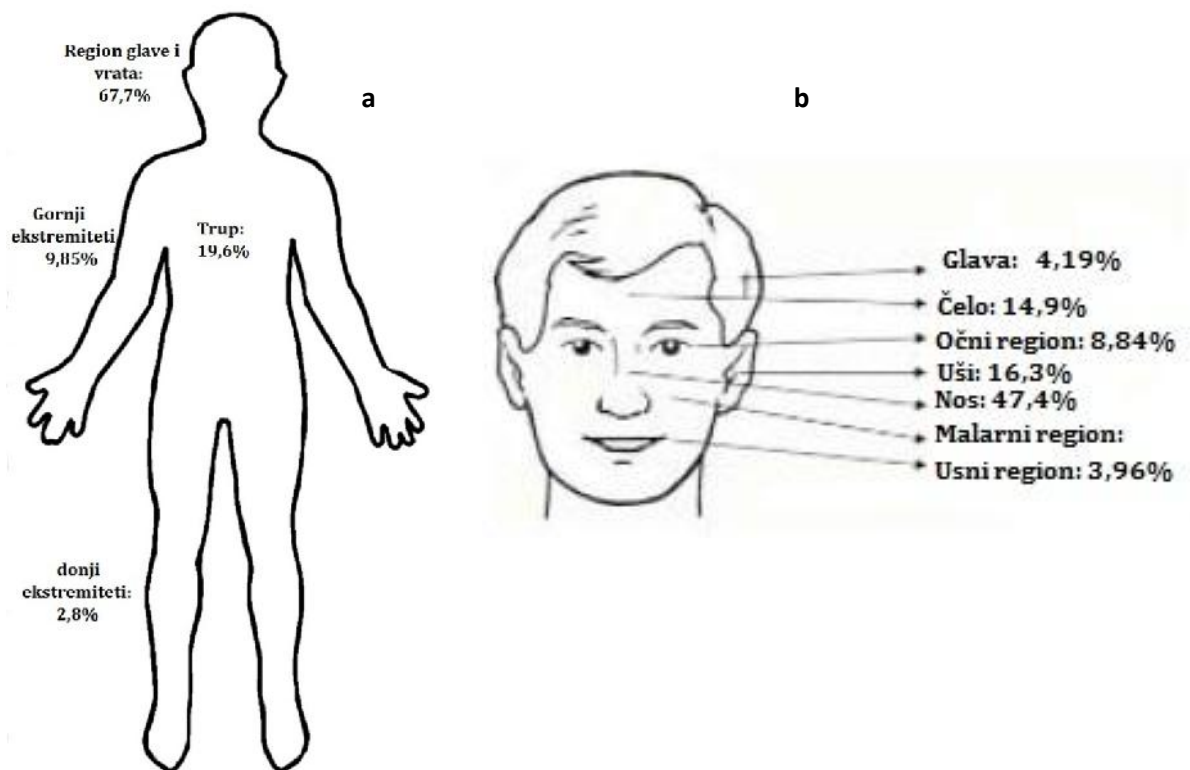
Bazocelularni karcinom (sinonimi: *epithelioma basocellulare*, bazaliom) neosporno je najčešći maligni karcinom kože, a njegova učestalost je u stalnom porastu. Prvi put je opisan 1824. godine i čini oko 75% (Slika 2) svih karcinoma kože, posebno u populaciji Kavkazijanaca (Chung, 2012). To je relativno sporo rastuća, bezbolna, lokalno invazivna i rekurentna maligna epidermalna neoplazma (Wong i sar., 2003). Razvija se od nediferenciranih ćelija bazalnog sloja epidermisa (Slika 3) ili iz gornjeg dela spoljnjeg lista korena dlake koji neprekidno prati folikularni epidermis i podleže keratinizaciji kao i epidermis (Wong i sar., 2003). Bazocelularni karcinomi su histološki solidni epitelni tumori čiji celularni elementi liče na *stratum basale* epidermisa. Parenhim tumora grade ćelije sa velikim, ovalnim bazofilnim jedrima, dok je stroma oskudna. Tumorske ćelije su grupisane u trake koje od epidermisa rastu u korijum. Spoljašnji sloj ćelija je palisadnog rasporeda, dok su u centru tumora ćelije nepravilno raspoređene. Između traka tumorskih ćelija nalazi se vezivno tkivo koje je više (sklerodermiformni tip) ili manje zastupljeno.



Slika 3: Prikaz ćelija epidermisa u zdravom obliku i u karcinomima

preuzeto:<http://www.mayoclinic.com/health/medical/IM00941>, modifikovano

Studije pokazuju da se u najvećem broju slučajeva ovaj karcinom javlja na delovima kože izloženoj sunčevim (UV) zracima, odnosno u regionu glave i vrata (Tilli i sar., 2005) *Slika 4a*, a najčešće u gornjim dvema trećinama lica, iznad linije koja spaja ugao usana i tragus ušne školjke, u predelu usana, očnih kapaka, nazolabijalnog puta, nosa (*Slika 4b*), a zatim na trupu i na gornjim i donjim ekstremitetima. Bazocelularni karcinom kože najčešće se javlja *de novo*, ređe iz prekanceroza, kao što su senilne keratoze, radijacione dermatoze. Bazocelularni karcinomi mogu da se jave kod oboljenja Xeroderma pigmentosum.



Slika 4. Zastupljenost BCK-a na delovima tela (a) i u regionu glave i vrata (b)

Postoje rasne (etničke) i geografske razlike u javljanju bazocelularnih karcinoma, a takođe na njegovu pojavu jasan je i uticaj profesije i načina života (osobe poput farmera, zemljoradnika daleko češće obolevaju od ovog tipa kancera nego oni koji svoje radne obaveze obavljaju u zatvorenim prostorijama; takođe žene imaju veću incidencu ovog karcinoma na nogama u odnosu na muškarce, zbog veće izloženosti ovih delova tela UV zracima). Značaj ekspozicije Suncu i uopšte

značaj uticaja faktora spoljašnje sredine priznaju praktično svi autori. Međutim, veliki procenat BCK-a na delovima tela koji nisu izloženi UV zračenju ukazuje na to da i drugi faktori mogu imati značajnu ulogu u razvoju BCK-a (Gallagher, 1996).

1.3.2.2. Klasifikacija bazocelularnog karcinoma

Ne postoji opšteprihvaćena klasifikacija BCK-a i nekoliko sistema klasifikacije je u primeni (Vantuchova, 2006), *Tabela 1*.

Tabela 1: Poređenje klasifikacije BCK-a prema različitim autorima

Sloan 1977	Sexton 1990	Rippey 1998	Weedon 2002	Rosai 2004	WHO 2006	Patterson 2006
Nodular	Nodular	Nodular, including micronodular	Nodular	Nodular	Nodular	Nodular
Superficial	Superficial	Superficial	Superficial	Superficial	Superficial	Superficial
Infiltrating	Infiltrating	Infiltrating, including sclerosing	Infiltrating	Infiltrating	Infiltrating	Infiltrating
Nodular with infiltrative margin			Micronodular	Micronodular	Micronodular	
			Fibroepithelial	Fibroepithelial	Fibroepithelial	Fibroepithelial
			Basosquamous	Basosquamous (metatypical)	Basosquamous	Basosquamous
			Keratotic	Keratotic	Keratotic	Keratotic
			Pigmented	Pigmented		Pigmented
			Infundibulocystic	Infundibulocystic	With adnexal differentiation	
			Adenoid	Adenoid		Adenoid
			Cystic	Cystic		
			Sklerosing	Sklerosing		Sklerosing
			Metatypical	Clear cell		Metatypical
	mixed	mixed	mixed			Basosebaceous

Međutim, danas se ipak najviše koristi klasifikacija BCK-a predložena od strane AJCC (*eng. American Joint Committee on Cancer Classification*), koja vrši podelu prema tzv. TNM-sistemu:

Tabela 2: Kategorije tumora prema njegovoj veličini (T)

TX	Tumor se ne može oceniti
T0	Nema znakova tumora
Tis	Karcinom <i>in situ</i>
T1	Tumor veličine 2cm ili manji u najvećem dijametri
T2	Tumori veći od 2cm, ali manji od 5cm
T3	Tumor veličine 5cm i veći, u najvećem dijametri, tzv. džinovski BCK
T4	Velika invazija tumora duboko u tkivo

Tabela 3 : Stepem širenja tumora prema regionalnim limfnim čvorovima (N)

NX	Reg.limf.čvorovi se ne mogu oceniti
N0	Nema metastaza u reg.limf.čvorovima
N1	Metastaze su prisutne, tumor se proširio na najbliže ili mali broj reg.limf.čvorova, u najširem dijametri 3cm
N2	Metastaze su prisutne u dijametri većem od 3cm, ali manjem od 6 cm
N3	Metastaze su prisutne u dijametri većem od 6 cm

Tabela 4: Prisustvo metastaza (M)

M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Metastaze u udaljenim organima (izvan reg.limf.čvorova)

Na osnovu svih navedenih parametara (T, N, M) izvodi se podela na stadijume (*Tabela 5*), s obzirom da su kod BCK-a parametri N i M uvek jednaki 0, stadijum zavisi direktno od veličine tumora (T). Stadijum kancera je jako bitan parametar koji lekaru pokazuje kojom brzinom se kancer zapravo širi, a to je važno jer dalji tretman pacijenta uglavnom od toga zavisi.

Tabela 5: Stadijum kancera

Stadijum 0	Tis; N0; M0
Stadijum 1	T1; N0; M0
Stadijum 2	T2; N0; M0
Stadijum 3	T3; N0; M0 ili T1 do T3; N1; M0
Stadijum 4	T1 do T3; N2; M0 ili bilo koje T; bilo koje N; M1

Spates i saradnici (2003) navode da prvi opis metastazirajućeg BCK-a datira iz 1894. godine. Iako metastazira relativno retko (0,028%-0,55%), porast veličine karcinoma povećava incidencu metastaza. Karcinomi veći od 3cm imaju incidencu metastaziranja 2%; veći od 5cm povećavaju taj rizik na 25%; sa porastom veličine karcinoma do 10 cm u prečniku, rizik od pojave metastaza raste do 50%; a kada karcinom dostigne veličinu od 25cm u prečniku i više, metastaze su gotovo sigurno prisutne.

Opisani su mnogobrojni morfološki podtipovi BCK-a. Kao najčešći ističu se:

• ***epithelioma basocellulare nodulare:***

50-80% svih slučajeva BCK-a pripadaju ovoj grupi, a 85-90% slučajeva je u regionu glave i vrata i karakterističan je za stariji deo populacije. Formira se u vidu čvorića veličine čiodine glave, tvrdoelastične konzistencije, boje normalne kože ili lako presijavajuće. Tumefakt se sporo uvećava, a na površini se primećuju telangiektazije (prošireni kapilari). Karcinom može da naraste do nekloliko centimetara, mada češće, posle nekog vremena, u centru tumora nastaje nekroza, koja se prekriva slabo adherentnom krastom, dok se po ivici vide sitni perlasi tumefakti.



Slika 5. Nodularni BCK

preuzeto: Chung, 2012.

- **epithelioma basocellulare superficiale:**

Drugi po učestalosti sa oko 10-15% slučajeva BCK-a, najčešće se javlja na trupu (40%) ili donjim ekstremitetima (14%) i to kod mlađih ljudi. Ima veoma spor razvoj i može da dostigne nekoliko centimetara u prečniku. Manifestuje se u vidu plaža nepravilnog oblika, lako uzdignutih, transparentnih ili perlastih ivica. Površina mu je eritematozna sa ožiljnim ili atrofičnim arealima i sivkastim, umereno čvrstim prominencijama između kojih se mogu naći tačkaste erozije pokrivene krustoskvamama. Ovo je najuobičajnija forma BCK-a kod pacijenata obolelih od HIV-a.



Slika 6. Superficialni BCK

preuzeto: Detanac, 2010.

- **ulcus rodens (Jacobi ulcus):**

počinje malom ranicom obično posle neke mikro povrede, ogrebotine i sl. Ranica je nepravilnog oblika, bezbolna, pokrivena prljavo žutom, braonkastom do mrkom krustom, koja povremeno otpada i zamenjuje se novom, a ranica ne zarasta već se postepeno širi i produbljuje. Ivice su nepravilne, oštre, u ravni okolne kože ili neznatno uzdignute.



Slika 7. Ulcus rodens

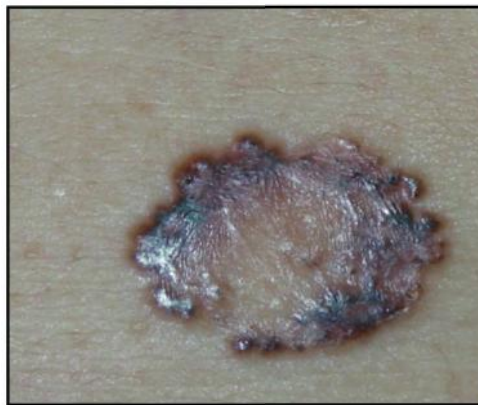
preuzeto: Chung, 2012.

- **ulcus terebrans:** prethodna ulceracija najednom počinje naglo da se širi i produbljuje izazivajući destrukciju okolnog tkiva. Destruktivni procesi su veoma jaki, tako da za kratko vreme zahvate kožu, mišićno tkivo ispod krvne i nervne strukture, koštane elemente, dovodeći veoma brzo do veoma opsežnih razaranja i unakaženja. Lokalizuje se obično u predelu lica i poglavine.

• ***epithelioma basocellulare sclerodermiformis***: 5% svih BCK-a, obično se javlja na licu u vidu lako uzdignutog, bledožućkastog čvorića glatke površine, koji nije oštro ograničen u odnosu na okolnu zdravu kožu.

• ***epithelioma basocellulare pigmentosum***:

čini oko 6% svih BCK-a. Karakteriše se tamnobraon do potpuno mrkom pigmentacijom koja je prisutna od samog nastanka tumora. Najčešće poprima osobine nodularnog ili nodozno-ulceroznog BCK-a. Češće se javlja kod osoba tamne kože, kose i očiju, a smatra se uobičajenom formom u populaciji Azijata.



Slika 8. *Pigmentovani BCK*
preuzeto: Chung, 2012.

Retki su infundibulocistični, metatipični, bazoskvamozni, infiltrativni, mikronodularni tipovi BCK-a, ali oni važe i za mnogo agresivnije i karakteriše ih veća stopa recidiva (Jacobs, 1982).

Sindrom nevoidnog BCK-a (Sy Gorlin-goltz) je redak nasledni oblik BCK-a. Nasleđuje se autozomno dominantno, a mutacija gena lokalizovana je na hromozomu 9q22.3-q31. Javlja se na licu ili trupu u vidu većeg broja tumorskih čvorića, boje normalne kože, glatke površine. Promene na koži praćene su anomalijama u razvoju koštanog sistema i/ili intelektualnim i drugim poremećajima (Epstein, 1999).

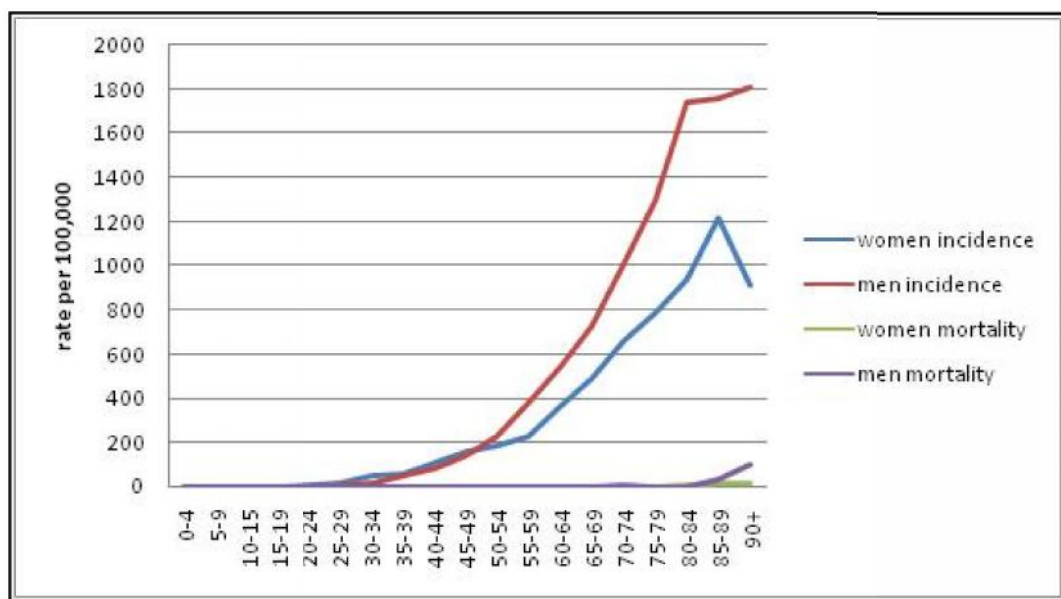
Metode lečenja BCK-a uključuju: ranu hiruršku eksciziju *in toto* uz patohistološku analizu, krioterapiju, kiretažu i elektrodisekciju, radioterapiju, fotodinamsku terapiju, te lokalnu primenu citostatika i imunomodulatora.

Nelečen ili neodgovarajuće lečen BCK može da postane invazivan i lokalno agresivan, iako veoma retko metastazira (Lear i sar., 2007).

1.3.2.3. Epidemiologija bazocelularnog karcinoma

Bazocelularni karcinom može da se javi već u trećoj deceniji života, ali je to, pre svega, bolest zrelog i starijeg životnog doba i incidenca izrazito raste sa godinama života kod oba pola (Slika 9). Svega 5-15% obolelih su osobe između 20 i 40 godina, a 70% obolelih čine osobe starije od 70 godina (Chung, 2012; Slika 9). Noviji rezultati istraživanja govore da su detinjstvo i adolescencija kritični periodi za kasniji razvoj malignih karcinoma kože jer se u tom životnom dobu apsorbuje do 80% UV zraka, dok se ostalih 20% apsorbuje u ostalim periodima života. Ovo nameće zaključak da rana i pravilna fotozaštita može da smanji rizik od kasnijeg nastanka malignih karcinoma kože (Pašić, 1998). Korišćenje kreme za sunčanje sa visokim faktorom zaštite tokom prvih 18 godina života, može da smanji incidencu oboljevanja od BCK-a čak do 70% (Diffey, 1991).

Bazocelularni karcinom kože češći je kod starijih muškaraca nego kod žena, taj odnos se kreće oko 2:1 (Chung, 2012), odnosno na 100 000 Kavkazijanaca godišnje oboli 475 muškaraca i 250 žena. Međutim, zbog upotrebe solarijuma i sredstava za potamnjanje kože, broj žena obolelih od BCK-a između 16 i 29 godine života, u poslednjih 30 godina se udvostručio.

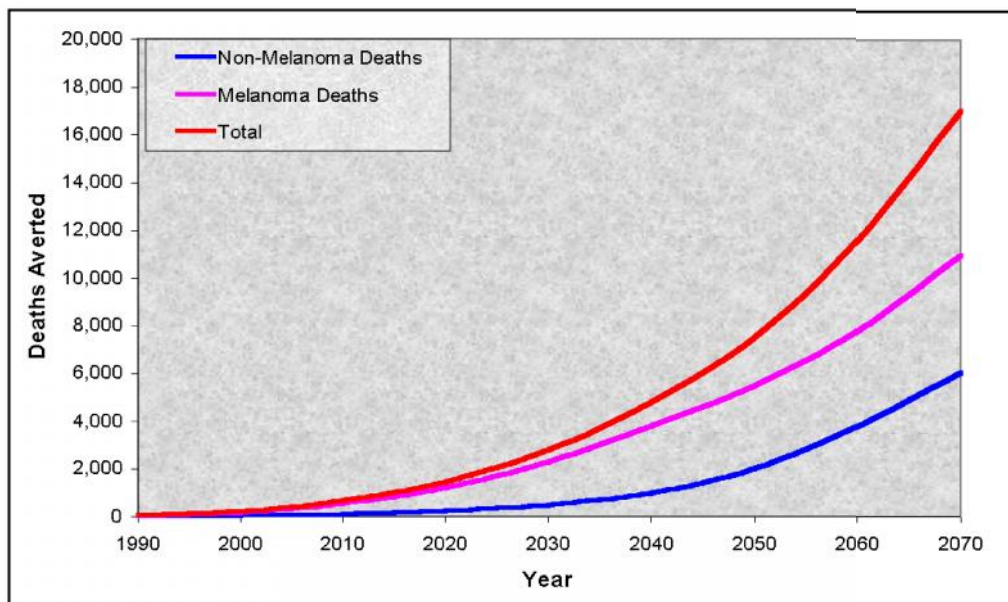


Slika 9. Incidenca pojave BCK-a i stopa mortaliteta u odnosu na godine života kod muškaraca i žena

preuzeto: http://www.ucalgary.ca/familymedicine/Skin_Cancer

Incidenca BCK-a je relativno niska u populaciji Azijata, Crnaca i Hispanaca (Chung, 2012), dok je među Kavkazijancima visoka, posebno kod osoba sa tipovima kože I i II (Boukamp, 2005). Uzrok tome je što koža belaca nema veliku mogućnost stvaranja pigmenta pa je, samim tim, izloženija štetnom uticaju ultraljubičastog (UV) zračenja. Nekoliko epidemioloških studija pokazalo je da učestalost zavisi od godišnjeg broja sunčanih dana, odnosno da postoji značajna povezanost sa geografskom širinom. Tako su najveće zabeležene incidence u severnom delu Australije (Cancer Council Australia, 2008). Idući od ekvatora prema polovima, za svakih 10 stepeni geografske širine učestalost se smanjuje za oko 50%. Ovo je samo još jedna potvrda već poznate činjenice da porast geografske širine, počev od ekvatora i smanjenje pigmentacije kože u značajnoj su vezi sa povećanjem incidence različitih tipova kancera ili povećanjem agresivnosti kancera (Bouillon i sar., 2006; Deeb i sar., 2007).

Najnovija istraživanja pokazuju porast incidence BCK-a za 3-8% godišnje, širom sveta. Zabeležen je znatan porast u Evropi, Sjedinjenim Američkim Državama i Australiji, u toku nekoliko prošlih decenija (Massari i sar., 2007). U budućnosti se procenjuje da će ova incidenca biti još veća (Slika 10). Razlog tome



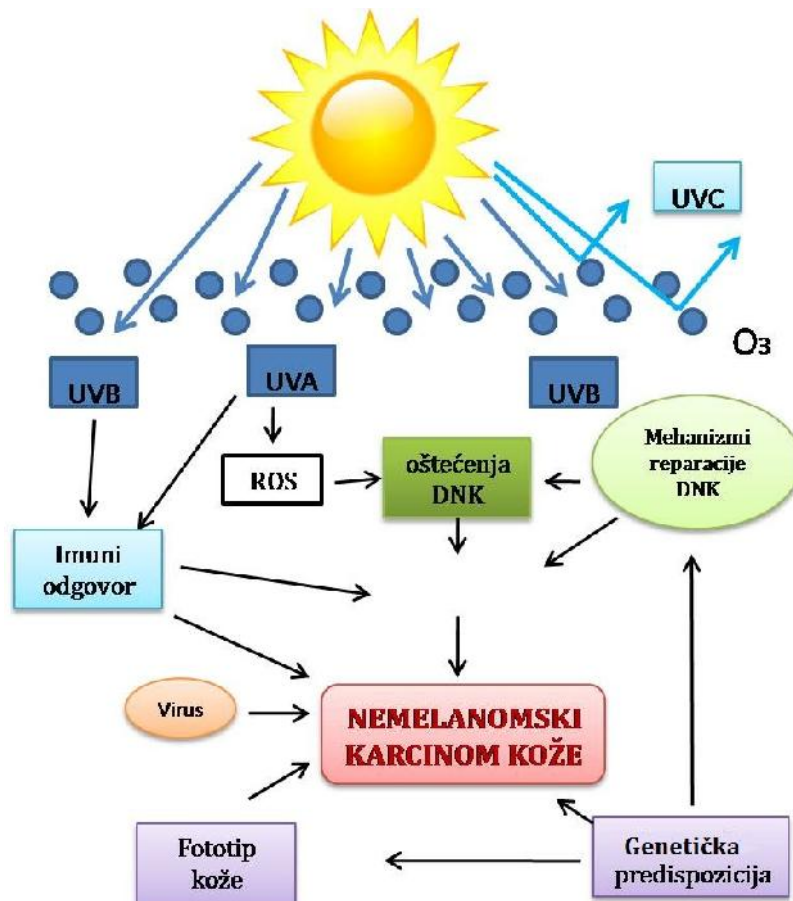
Slika 10. Prikaz povećanja broja umrlih od BCK-a kroz vreme sa prognozama za budućnost

preuzeto: *Global Benefits and Costs of the Montreal Protocol on Substance that Deplete the Ozone Layer*

su povećana izloženost UV zracima, sve veća oštećenja ozonskog omotača, promene kulturoloških navika, duži životni vek ljudi (Gloster, 1996) i dr.

1.3.2.4. Etiologija bazocelularnog karcinoma

U nastanku BCK-a važnu ulogu ima mnoštvo endogenih i egzogenih etiopatogenetskih faktora. Od egzogenih faktora najvažnija uloga pridaje se uticaju Sunčevih, nejonizujućih, ultraljubičastih (UV) elektromagnetnih talasa, čije je delovanje potencirano tanjenjem ozonskog omotača i širenjem ozonskih rupa. Količina UV zraka koja dolazi do površine Zemlje zavisi od stanja u atmosferi i okolini (npr. oblačno vreme, zagađenje vazduha), nadmorske visine, godišnjeg doba i geografske širine (ozonski sloj je tanji oko ekvatora).



Slika 11. Uloga egzogenih i endogenih faktora u nastanku nemelanomskog karcinoma kože

Osim izrazitog mutirajućeg efekta na ćelijsku DNK, UV zračenje može da deluje i suprimirajuće na imuni odgovor (*Slika 11*). Imunodeficientni i imunosuprimirani bolesnici (oboleli od hroničnih leukemija, od AIDS-a, posle transplantacije organa, na sistemskoj kortikosteroidnoj terapiji i dr.) imaju izrazito povećan rizik za nastanak BCK-a. Važnu ulogu u nastanku BCK-a imaju i različite hemijske materije i jonizujuće zračenje. Hemijske supstance koje mogu uticati na razvoj ovog karcinoma su katrani, parafinsko ulje i arsen. U prošlosti su se arsenska jedinjenja koristila u obliku Fowler-ovih rastvora (trovalentni neorganski arsen) za lečenje astme i psorijaze, što je dovodilo do nastanka karcinoma kože, doduše uz vreme latencije od 20 do 30 godina. Multiple lezije superficijalnog BCK-a mogu biti povezane sa unošenjem arsena u lekovima, hrane ili vode kontaminirane arsenom ili tokom profesionalne izloženosti u industriji. Duvanski dim je takođe povezan sa pojavom nemelanomskog karcinoma kože, ali je ta veza daleko jača kod SCK-a u odnosu na BCK. Međutim, Boyd i saradnici (2001) su utvrdili da postoji značajna povezanost duvanskog dima i pojave BCK-a kod mlađih žena.

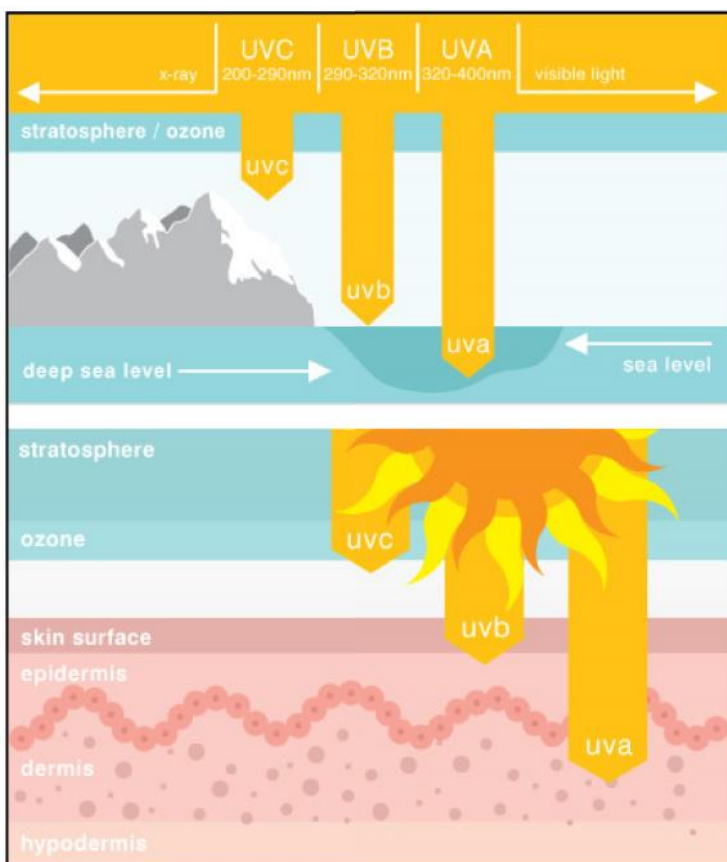
Jonizujuće zračenje takođe može dovesti do nastanka BCK-a, najčešće kod ljudi koji su profesionalno izloženi rendgenskim zracima, ali je ovaj rizik smanjen usled dobro kontrolisane profesionalne ekspozicije.

Više autora je ukazalo na asocijaciju infekcije humanim papiloma virusom (HPV) i pojave BCK-a. Harwood i Proby (2002) su pokazali da HPV može sprečiti apoptozu ćelija indukovanu UV zračenjem.

U endogene činioce ubrajaju se genetički (konstituciono) određen tip kože (fototip), koji se razlikuje prema osnovnoj boji kože kao i mogućnosti tamnjenja tokom izlaganja UV zračenju. Naročitu sklonost za razvoj BCK-a imaju tipovi kože I i II. Drugi značajan endogeni faktor je količina lipida na površini kože. Viši nivo lipida štiti od UV zračenja, te smanjuje njegov uticaj u nastanku BCK-a. Poznato je da bolesnici sa seboroičnom kožom, sklonom nastanku akni, imaju manju verovatnoću nastanka BCK-a (Kennedy i sar., 2003).

1.3.2.5. UV zračenje i bazocelularni karcinom

Sunce emituje dve vrste UV zraka koji mogu dospeti do površine Zemlje (Slika 12), UVA (talasne dužine 320 - 400 nm) i UVB (talasne dužine između 290 i 320 nm), dok su UVC zraci (talasne dužine 200 - 290 nm) uglavnom filtrirani ozonskim omotačem u gornjim delovima atmosfere. Sa stanovišta kancerogeneze najštetniji deo spektra Sunčeve svetlosti su UVB zraci. Samo jedan procenat UVB zraka dospe do površine Zemlje.



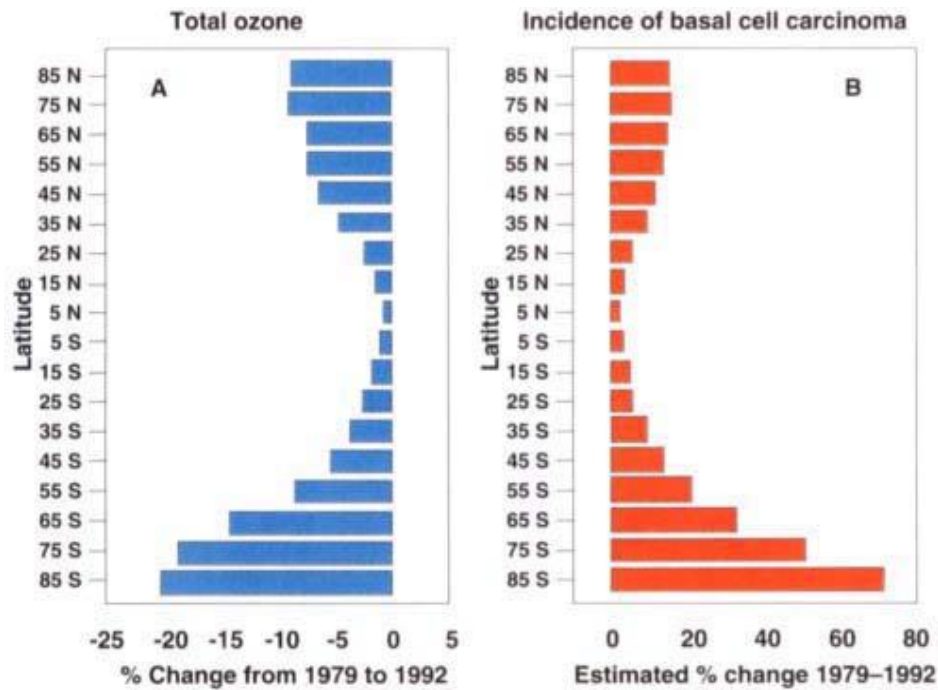
Slika 12. Tipovi UV zraka i njihova prodornost na koži

preuzeto: <http://www.coolasuncare.com/sun-science/uva-vs-uvb>

zračenje izaziva karcinom kože. Najubedljivija je činjenica da se karcinom dominantno pojavljuje na delovima tela koji su stalno izloženi Suncu, to su prevashodno lice, glava i vrat.

Izloženost kože UV zracima je najčešći uzrok nastanka BCK-a. Koncept UV zračenja, kao glavnog etiološkog faktora u patogenezi BCK-a, potiče s početka XX veka, kada su lekari zapazili da se karcinom češće javlja na Suncem oštećenoj koži, mahom kod osoba koje se bave poslovima na otvorenom. Tako je Sunčeva svetlost bila jedan od prvih prepoznatih kancerogenih faktora za ljude. Od tada su brojne epidemiološke studije potvrdile da UV

Osamdesetih godina prošlog veka utvrđeno je da se ozonski sloj smanjuje delovanjem hlorofluorokarbonskih i drugih hemikalija koje se koriste u industriji i otpuštaju u atmosferu. Zbog toga danas oštećenje ozonskog omotača i povećana kumulativna izloženost UV zračenju usled produženog životnog veka, znatno povećavaju rizik za dobijanje BCK-a (Slika 13).



Slika 13. Uticaj oštećenja ozonskog omotača na povećan rizik za oboljevanje od BCK-a

preuzeto: <http://ucce.ucdavis.edu/files/repository/calag/fig4903p26.jpg>

Međutim, važno je napomenuti da incidenca skvamocelularnog karcinoma (SCK-a) više zavisi od izloženosti Sunčevim zracima nego što je to slučaj sa BCK-om, ukazujući na to da i drugi faktori, uz izloženost Sunčevim zracima, mogu biti odgovorni za razvoj BCK-a. Nekoliko epidemioloških studija pokazalo je da incidenca BCK-a u slabijoj asocijaciji s kumulativnom izloženošću Sunčevoj svetlosti tokom života i da je više povezana s povremenim, intenzivnim izlaganjem Suncu i izlaganjem u toku detinjstva, praćenim bolnim opekotinama. Skorašnja, kohortna studija, sprovedena među 966 ispitanika (Kennedy i sar., 2003) analizirala je faktore sredine i genetičke faktore rizika za karcinom kože. Rezultati studije su

pokazali povezanost bolnih opekotina od Sunca koje su se javljale pre dvadesete godine života sa skvamocelularnim i bazocelularnim karcinomom, kao i sa aktiničnom keratozom. Međutim, kumulativna izloženost Suncu u toku života u vezi je sa skvamocelularnim karcinomom i aktiničnom keratozom, ali zanemarljivom stepenu sa BCK-om (Wikonakal i Brash, 1999).

1.4. GENETIČKI POLIMORFIZMI

Genom čoveka sadrži oko 3,2 milijarde baznih parova po haploidnom setu i oko 20 000 gena (Turnpenny i Ellard, 2009). Varijabilnost (raznovrsnost) među jedinkama ili grupama jedinki u populaciji može se posmatrati na morfološkom nivou, na nivou protein, hromozoma i konačno na nivou DNK sekvenci. Populaciono genetičkim analizama utvrđeno je da postoji velika genetička varijabilnost u ljudskim populacijama, pri čemu najveći deo varijabilnosti odlazi na individualne razlike unutar lokalne populacije (oko 85%), a da na nivou cele ljudske populacije postoji genetička uniformnost.

Genetička varijabilnosti obično se meri pomoću dva parametra – proporcije polimorfnih lokusa i heterozigotnosti populacije.

Za neki gen/lokus se kaže da je polimorfan ako u populaciji postoje bar dve njegove varijante (aleli), pri čemu je učestalost ređeg (ili najređeg) alela bar 1%, tj. pri čemu je ona dovoljno velika da se ne smatra proizvodom samo mutacionog procesa (Frazer i sar., 2009). Proporcija polimorfnih lokusa u populaciji predstavlja odnos broja polimorfnih lokusa i ukupnog broja ispitanih lokusa u populaciji. Bolja mera varijabilnosti u populaciji je heterozigotnost. Heterozigotnost za određeni lokus predstavlja proporciju heterozigotnih jedinki za taj lokus, a ako se ispituje više lokusa, odredi se i proseka za sve lokuse.

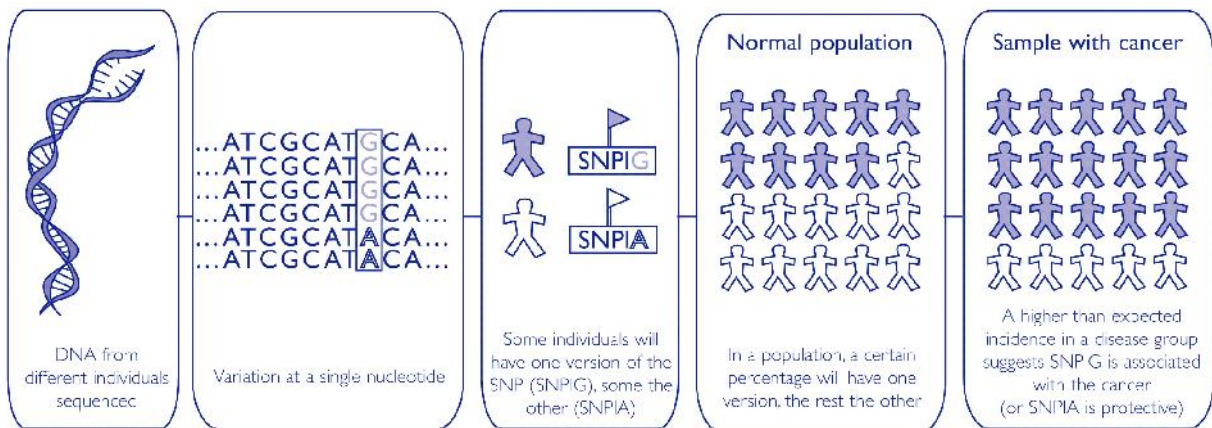
Postoji više različitih DNK polimorfizama:

- SNP (polimorfizmi pojedinačnih nukleotida)
- VNTR (varijabilni broj tandemskih ponovaka)
- Del/Ins polimorfizmi-nastaju kao rezultat insercije ili delecije određenog dela DNK

SNP-ovi čine oko 85% svih polimorfizama. Procenjeno je da humani genom sadrži čak 11 miliona SNP-ova (Frazer i sar., 2009). Njihova lokacija na molekulu DNK može biti unutar promotorskog regiona (kada polimorfizam ima negativan predznak "-") u egzonu (kodirajućem regionu) ili u intronu (nekodirajućem regionu), kada polimorfizam ima pozitivan predznak "+".

Svi ovi polimorfizmi nam daju važne podatke o nivou genetičke varijabilnosti u populacijama, njihovim evolucionim istorijama, filogenetskim odnosima među vrstama, a koriste nam i u identifikaciji individua i analizama rodoslova itd.

Iako genetički polimorfizmi predstavljaju izraz normalnih varijacija u naslednoj osnovi, zanimljiv je njihov uticaj na fenotip, a naročito je aktuelno povezivanje prisustva određenog SNP-a sa sklonošću ka različitim bolestima uključujući i malignitete. Poznavanje SNP-ova iz tih razloga predstavlja još jedan element u razumevanju genetičke osnove velikog broja bolesti. U tzv. studijama asocijacije (*Slika 14*) ispituje se učestalost pojedinih genskih varijanti, tj. genetičkih polimorfizama u grupi obolelih i upoređuje se sa podacima u zdravoj populaciji. Rezultati različitih studija su često protivurečni, pa je još uvek mali broj polimorfizama sa jasno potvrđenom ulogom genetičkog markera predispozicije. Ali treba napomenuti da broj ispitivanih polimorfizama gotovo eksponencijalno raste iz dana u dan, pa se tako može očekivati da bude otkriveno više njih koji imaju manju ili veću ulogu u razvoju bolesti.



Slika 14. Učestalost pojedinih genskih varijanti u zdravoj populaciji i grupi obolelih od kancera i njihovo upoređivanje u tzv. studijama asocijacije

preuzeto: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/causes/genes/inheritedrisk/inherited-cancer-risk>

Patogeneza bazocelularnog karcinoma najčešće podrazumeva apsorpciju UVB zraka od strane DNK molekula koja rezultuje stvaranjem pirimidinskih dimera, odnosno nastankom mutacija u različitim genima, između ostalih i u genima uključenim u regulaciju ćelijske proliferacije, diferencijacije i smrti. U važne predstavnike ove grupe gena spadaju i geni za antiapoptotski protein **survivin** i proapoptotski **TP53**. Keratinocite pod dejstvom UV zračenja oslobađaju prostaglandine kao i proinflamatorne i imunomodulatorne citokine. Među ostalih, oslobađaju se interleukin 1 i 6, zatim interleukin 10 i faktor nekroze tumora (**TNF**). Produkcija citokina je blisko povezana sa produkcijom matriks metaloproteinaza (**MMP**), odgovornih za lokalnu tkivnu destrukciju. Dokazano je da UV zraci mogu da utiču i na aktivnost različitih molekula lociranih kako na ćelijskoj membrani, tako i u citoplazmi, ali precizni mehanizmi nastanka BCK još uvek nisu poznati.

Dalje u radu su opisani geni čiji su polimorfizmi ispitivani kao faktori predispozicije za pojavu bazocelularnog karcinoma u regionu glave i vrata i njegovih manifestacija u našoj populaciji.

1.5. FAKTORI UKLJUČENI U INVAZIJE I METASTAZE

1.5.1. CITOKINI

Citokini predstavljaju veliku familiju proteinskih molekula koji funkcionišu kao medijatori i regulatori ćelijskih komunikacija, kako u fiziološkim tako i u patološkim uslovima. Rast tumora, invazija i metastaze su olakšani kada dođe do poremećaja produkcije citokina. To su solubilni proteini, odgovorni za komunikaciju između samih leukocita i između leukocita i drugih ćelija. Prema konvenciji, većina molekulski definisanih citokina nazivaju se interleukini, sa ciljem da se naglasi da su to molekuli koje proizvode leukociti (makrofagi i T-ćelije) i da deluju na leukocite. U stvarnosti je drugačije jer citokine proizvode i druge ćelije ili oni deluju na druge ćelije koje ne pripadaju leukocitima.

Citokini su proteini iz porodice glikoproteina, male molekulske mase, od 6-70 kDa, koji deluju kao posrednici između elemenata imunskog sistema (Mire-Sluis i sar., 1998). Citokini se odlikuju **plejotropnošću** (jedan citokin može da deluje na više različitih tipova ćelija i ima više različitih dejstava) i **izrođenošću** (redundantnošću, više različitih citokina može da ispolji istu aktivnost). Mnogi se citokini izlučuju i deluju u kaskadi, odnosno jedan citokin može da indukuje ili inhibira produkciju drugih citokina (Rubin, 1992).

Citokini učestvuju u svim etapama inflamacijskog procesa uključujući adheziju i migraciju ćelija, aktivaciju, diferencijaciju i proliferaciju. Neophodni su za normalno odvijanje svih faza imunog odgovora i značajan su faktor regulacije tipa, jačine i dužine imune reakcije. Nema imunog odgovora u organizmu bez produkcije citokina tako da oni regulišu i nespecifični i specifični imuni odgovor. Citokini deluju preko specifičnih receptora u samoj ćeliji i na ćelijskoj membrani. Oni mogu biti pozitivni i negativni regulatori imunog odgovora i neka vrsta prenosioca („glasnika“) koji, pored hormona i neurotransmitera, spadaju u vrlo važne činioce u komunikaciji između ljudskih ćelija u organizmu. Citokini predaju informaciju ciljnoj ćeliji, koja ispoljava odgovarajući receptor. Nakon predaje informacije dolazi do aktivacija gena sa posledničnim fenotipskim ili funkcionalnim promenama ciljne ćelije. Sintezu i otpuštanje citokina mogu zaustaviti razne ćelije

(Mire-Sluis i sar., 1998) inhibitori, modulirajući biološku aktivnost citokina ili inhibirajući sposobnost odgovora ciljne ćelije.

Većina citokina deluje na same ćelije koje ih stvaraju (**autokrino dejstvo**) ili na susedne ćelije (**parakrino dejstvo**).

Citokini se prema svojim funkcijama (odnosno biološkim osobinama) dele u tri grupe:

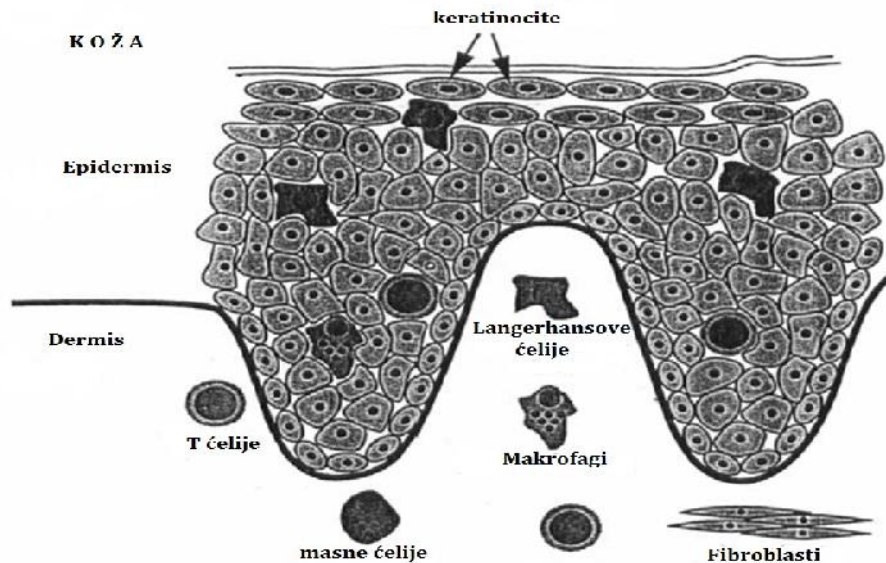
- **Medijatori i regulatori nespecifične (urođene) imunosti:**
 - ❖ Proinflamatorni: faktor nekroze tumora (TNF), Interleukin-1 (IL-1), IL-6
 - ❖ Aktivatori NK i T ćelija: IL-12, IL-18
 - ❖ Hemokini: IL-8
- **Medijatori i regulatori stečene imunosti:** IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TGF- β
- **Stimulatori hematopoeze:** IL-3 i faktori rasta kolonija (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) koji stimulišu proliferaciju matičnih ćelija kosne srži

1.5.1.1. Faktor nekroze tumora (TNF-alpha)

Faktor nekroze tumora (*eng. Tumor Necrosis Factor*, TNF-alpha ili kahektin) je solubilni, multifunkcionalni protein koga izlučuju makrofagi, aktivirani T-limfociti, keratinocite i Langerhansove ćelije (*Slika 15*), a zbog svojih mnogobrojnih bioloških uloga smatra se jednim od najvažnijih lokalnih humoralnih faktora u posredovanju i regulaciji imunoloških i upalnih reakcija u organizmu (Jacob, 1992; Bentzen, 1988; Artese i sar., 1991). Primarna uloga TNF-alpha je regulacija imunih ćelija.

Gen koji kodira TNF-alpha nalazi se na hromozomu **6p21.3**, sadrži oko 3kb i ima 4 egzona (Muller i sar., 1987). U ovom delu hromozoma nalazi se region glavnog kompleksa histokompatibilnosti (*eng. Major Histocompatibility Complex*, MHC) koji karakteriše najveća gustina lokusa koji su odgovorni za određivanje

individualnog imunog odgovora i region sa najvećim brojem polimorfizama u genomu (Hajeer, 2000).



Slika 15. Izvori lučenja TNF-alpha u koži

preuzeto: Younes, 1996.

TNF se sintetiše u formi propeptida (pro-TNF), veličine 26 kDa, a oslobađa se delovanjem TNF-konvertujućeg enzima (*eng. TNF-Converting Enzyme, TACE*). TACE takođe može da uklanja receptore za TNF sa površine ćelije, tj. sa ćelijske membrane, tako da se regulacijom broja membranskih receptornih proteina vrši kontrola biološke aktivnosti solubilnog TNF po principu negativne povratne sprege. Po strukturi je heterotrimerni protein molekulske mase 17 kDa (Kriegler i sar., 1988) ekspresija TNF-alpha podrazumeva regulaciju na nivou transkripcije, translacije i posttranslacione produkcije proteina.

TNF igra važnu ulogu u regulaciji rasta, ćelijske diferencijacije, odgovoru na virusne, bakterijske, gljivične ili parazitske infekcije. Međutim, ukazano je da povećana ekspresija TNF gena ima ulogu u patogenezi mnogih poremećaja: autoimunih (multipla skleroza, reumatoidni artritis), alergijskih, rezistencije na insulin (Oppenheim, 2001).

Iako je dokazan njegov antineoplastični efekat, TNF takođe može indukovati malignu transformaciju, tj. dovesti do tumorogeneze. TNF mogu proizvoditi

tumor-infiltrirani makrofagi i nekoliko tipova kancera (ovarijuma, kolorektalni, ezofagalni, karcinom prostate, mokraćne bešike i bubrega, melanomi i hematološki maligniteti).

U *in vitro* modelima, niska doza TNF-alpha može dovesti do proliferacije nekih maligno transformisanih ćelijskih linija. TNF-alpha takođe može da deluje kao autokrini faktor rasta tumora indukujući ćelijsko preživljavanje aktivacijom NF-kB, PI3K-PKB/Atk- i MAPK-zavisnih anti-apoptotskih, proliferativnih, odnosno puteva koji vode preživljavanju ćelije (Mocellin i sar., 2005).

U eksperimentima sa nokaut (*eng. knockout*) životinjama (kada je inaktiviran određeni gen), utvrđena je povećana incidenca razvoja karcinoma kod TNF^{+/+} životinja u odnosu na one koje su TNF^{-/-} genotipa (Korner i sar., 2000). Ova rezistencija TNF^{-/-} životinja na hemijski indukovanu kancerogenezu može se povezati sa privremenim kašnjenjem aktivacij protein kinaze C (PKC) i transkripcionog faktora AP-1. Ovo kašnjenje verovatno utiče na ekspresiju gena za koje se zna da su uključeni u procese tumorogeneze, kao što su matriksne metaloproteinaze -3 i -9, koje su suprimirane kod TNF^{-/-} miševa, ali ne kod *wild-type* miševa koji su izloženi delovanju kancerogenih supstanci.

Predložen je i model po kome TNF može da dovede do oštećenja DNK i inhibicije DNK reparacije povećanom produkcijom genotoksičnih agenasa (kakav je npr. NO) od strane ćelija kancera ili okolnih makrofaga.

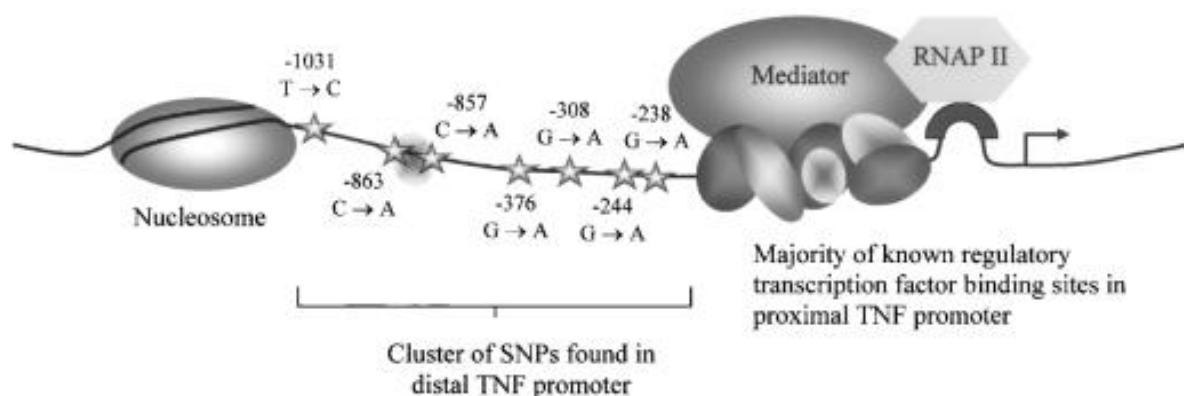
Slična otkrića dobijena su kod TNF-R nokaut životinja. U modelu indukcije kancerogeneze kože, da bi došlo do razvoja tumora, potrebno je prisustvo i TNF-R1 i TNF-R2. Sa druge strane, u modelu kancerogeneze jetre, ona zavisi isključivo od ekspresije TNF-R1 gena, odnosno receptora.

1.5.1.2. Polimorfizam u genu za TNF-alpha (-308 G/A, rs 1800629)

Polimorfizmi u genu za TNF-alpha kao i u njegovoj okolini imaju veliki uticaj na produkciju ovog citokina (Hajeer i Hutchinson, 2000). Studije na pacijentima koji imaju solidne tumore i hematološke malignitete, pokazale su postojanje asocijacije između povišenog nivoa TNF-alpha u plazmi i lošeg kliničkog ishoda

(Dosquet i sar., 1997; Warzocha i sar., 1998; Ferrajoli i sar., 2002; Michalaki i sar., 2004). Takođe, neki hemioterapijski agensi (talidomid) umanjuju nivo solubilnog TNF-alpha, što navodi na teoriju da je za njihovu antikancerogenu aktivnost zaslužna njihova sposobnost da deluju kao nespecifični TNF antagonisti (Dredge i sar., 2002).

U TNF lokusu, nađen je veći broj SNP-ova (Slika 16) i polimorfizama manjeg broja ponovaka (mikrosatelita). Ima ih u 5' regulatornim sekvencama kao i u 3' nekodirajućim i kodirajućim sekvencama. Nekoliko studija pokazalo je asocijaciju između SNP (polimorfizama jednog nukleotida) u TNF-alpha genu i rizika od razvoja različitih tipova karcinoma. Jedan od takvih polimorfizama na poziciji -308 G/A (u okviru promotorskog regiona) je povezan sa povećanom osetljivošću, tj. podložnošću različitim karcinomima.



Slika 16. Promotorski region TNF-alpha gena; posebno je označena većina SNP-ova mapiranih u distalnom regionu promotora, kao i većina mesta vezivanja transkripcionih faktora u proksimalnom regionu promotora

preuzeto: <http://www.clinsci.org/cs/104/0493/cs1040493f05.htm?resolution=STD>

Međutim, mnogi autori došli su do drugačijih saznanja. Na primer, nema značajne asocijacije između TNF haplotipa i kliničkog ishoda kod dece sa limfoblastnom leukemijom.

Zanimljivo je da neki autori ne samo da pokazuju odsustvo korelacije između -308 TNF-alpha polimorfizma i rizika od kancerogeneze, već opisuju i protektivnu ulogu dva polimorfizma (-238A i +857T) u incidenci različitih tumora.

1.5.1.3. Receptori TNF-alpha (TNF-R1, TNF-R2)

TNF-alpha ostvaruje svoje biološke efekte u ćelijama preko molekula koji su svrstani u porodicu (superfamiliju) receptora za TNF, među kojima su najznačajnija dva:

1. TNF-R1, poznat još i kao CD120a ili p55/60 (veliĉine 55 kDa)
2. TNF-R2, ili CD120b ili p75/80 (veliĉine 75 kDa)

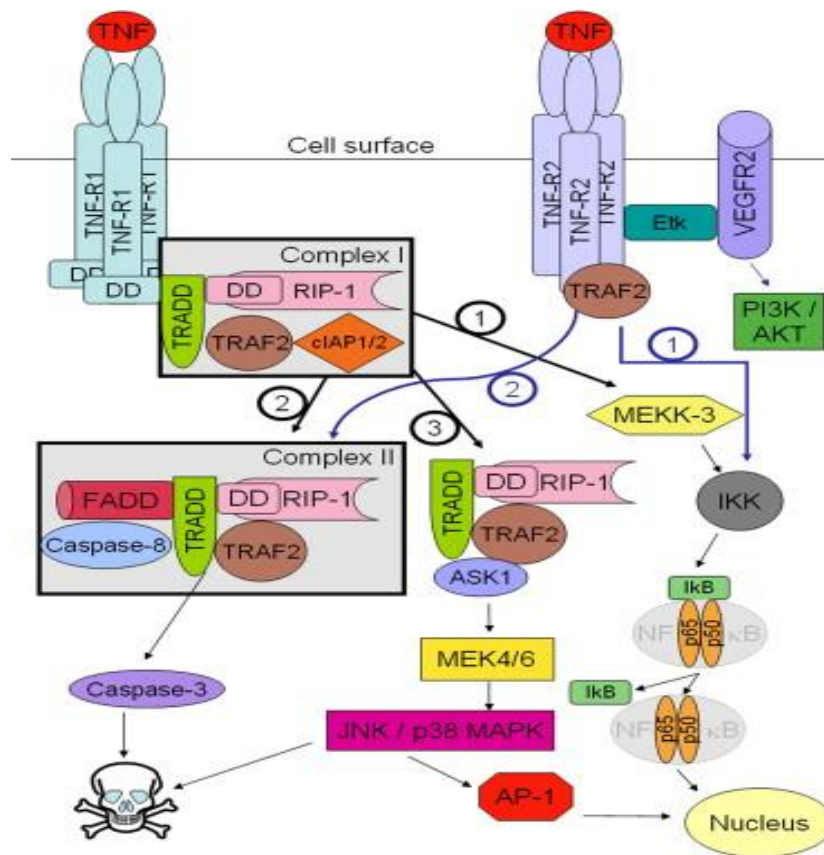
Oba receptora pripadaju velikoj superfamiliji TNF receptora. Od otkrića TNF-alpha do danas, utvrđeno je postojanje 20 članova tzv. superfamilije TNF proteina (do 15-20% identični međusobno) koji prenose signale u ćeliju preko 29 receptornih proteina, koji se pak mogu svrstati u tri veće grupe. Jedna grupa na citoplazmatskom repu sadrži takozvane domene smrti (*eng. Death Domains*, DDs). U ovu grupu receptora spada i TNF-R1, jedan od receptora preko kojih TNF-alpha pokreće ćelijsku signalnu kaskadu.

TNF-R1 je prisutan u većini tkiva, nema ga samo u eritrocitima i nestimulisanim limfocitima i može biti aktiviran sa obe forme TNF-alpha i sa membranski vezanom i sa solubilnom formom. Za razliku od njega, TNF-R2 se može naći samo u ćelijama imunog sistema i odgovara na formu TNF-alpha vezanom za membranu. Ni jedan od ovih receptora ne poseduje enzimsku aktivnost, već signal prenose "regrutovanjem" mnoštva drugih signalnih proteina, koji zajedno iniciraju signalne kaskade aktivirajući tako efektorne proteine (kaspaze) i protein kinaze (MMKK, IKK, koje uglavnom dovode do aktivacije transkripcionih faktora AP-1 i NF-kB). Aktivacijom ovih signalnih puteva, tj. transkripcionih faktora započinje inflamatorni, proliferativni ili antiapoptotski odgovor ćelije na signal dobijen od strane TNF-alpha.

TNF-alpha u većini slučajeva prenosi signale u ćeliju preko TNF-R1. TNF-alpha se vezuje u svojoj heterotrimernoj (aktivnoj) formi za ekstracelularni domen receptora, inicirajući na taj način njegovu trimerizaciju. Na taj način, sa intracelularnog DD receptora se oslobađa inhibitorni protein SODD (*eng. Silencer Of Death Domains*). Kada je oslobođen inhibitornog uticaja, dovodi do "regrutovanja" intracelularnih adaptornih proteina kao što su FADD (*eng. Fas-Associated DD*) i TRADD (*eng. TNF-R Associated DD*). Nakon TRADD vezivanja, tri signalna puta mogu biti inicirana (Chen, 2002; Gaur, 2003), *Slika 17*:

1. **Aktivacija NF- κ B:** TRADD regrutuje TRAF2 (*eng. TNF Receptor Associated Factor 2*) i RIP. TRAF2 zatim regrutuje multikomponentni protein kinazu IKK, što omogućava serin-treonin kinazi RIP da ga aktivira. Inhibitorni protein, I κ B α , koji se normalno vezuje za NF- κ B i inhibira njegovu translokaciju, se fosforiliše IKK kinazom i naknadno se degradira, čime se oslobađa NF- κ B. NF- κ B je heterodimerni transkripcioni faktor koji se translocira u nukleus i posreduje transkripciju velikog broja proteina koji imaju udela u ćelijskom preživljavanju i proliferaciji, inflamatornom odgovoru, kao i stvaranju anti-apoptoznih faktora.
2. **Indukcija signala smrti:** TRADD vezuje FADD, koji onda regrutuje cistein proteazu kaspazu-8. Visoka koncentracija kaspaze-8 indukuje njegovu auto-proteolitičku aktivaciju i naknadno cepanje efektorskih kaspaza, što dovodi do ćelijske apoptoze.
3. **Aktivacija MAPK puta:** Od tri glavne MAPK (*eng. Mitogen Activated Protein Kinase*) kaskade, TNF indukuje jaku aktivaciju stres-vezane JNK grupe, evocira umereni p38-MAPK odgovor, i odgovoran je za minimalnu aktivaciju klasičnih ERK proteina. TRAF2 aktivira JNK-indukujuće nizvodne kinaze MEKK1 i ASK1 (bilo direktno ili kroz GCK i Trx, respektivno), i te dve kinaze fosforilizuju MKK7, koja onda aktivira JNK. JNK se translocira u nukleus i aktivira transkripcione faktore kao što su c-Jun i ATF2. JNK signalni put

učestvuje u ćelijskoj diferencijaciji, proliferaciji, i generalno je pro-apoptozan.



Slika 17. Signalna kaskada indukovana od TNF-alpha

preuzeto: Haider i Knöfler, 2009.

Za razliku od nekih drugih membranskih receptornih proteina koji direktno regrutuju FADD, TNF-R1 dovodi do programirane ćelijske smrti samo pod određenim uslovima (npr. kada je blokirana sinteza proteina). Kod već razvijenih organizama, TNF-R1 mnogo češće dovodi do indukcije transkripcije i samim tim aktivacije inflamatornih gena (Locksley i sar., 2001). Genetički izmenjeni miševi, bez gena za TNF-R1, ispoljavali su veći poremećaj u proinflamatornom odgovoru u odnosu na one bez gena za TNF-R2, što ukazuje da je receptor TNF-R1 važniji za funkcionisanje ovog citokina (Locksley i sar., 2001). Takođe, TNF-R2 signalizacija je uglavnom ograničena na endotelne i hematopoetske ćelije.

Kod zdravih osoba nivo serumskih receptora je veoma stabilan i genetički regulisan. Porast nivoa cirkulišućih receptora zapažen je kod starijih osoba, što je povezano sa smanjenim antitumorskim i antiinfektivnim efektima TNF-alpha. Ovakva slična pojava uočena je i kod pacijenata sa autoimunim, infektivnim i malignim oboljenjima (Krajcik i sar., 2003).

1.5.1.4. Polimorfizmi u genima za TNF receptore:

TNF-R1 (+36 A/G, rs767455), TNF-R2 (+676 T/G, rs1061622)

Gen koji kodira sintezu TNF-R1 nalazi se na kratkom kraku hromozoma 12 (**12p13.2**), a gen za TNF-R2 nalazi se na hromozomu 1 na poziciji **1p36.2** (Baker i sar., 1991).

Brojni polimorfizmi su identifikovani u ovim genima i dovedeni u vezu sa pojavom različitih oboljenja. U promotoru gena za TNF-R1 identifikovano je nekoliko SNP-ova, kao u egzonu 1 (tiha supstitucija) i intronima 2, 4, 6, 7 i 8 (Aksentijevich i sar., 2001). Gen za TNF-R2 u svom sastavu ima 10 egzona i 9 introna, a polimorfizmi su nađeni u egzonima 4, 6, 9 i 10 (Pantelidis i sar., 1999). Među svima njima, posebno se izdvajaju polimorfizam +36 A/G u egzonu 1 TNF-R1 gena i +676 T/G u egzonu 6 gena za TNF-R2, kao i njihove povezanosti sa različitim oboljenjima kao što su reumatoidni artritis, neke autoimune i infektivne bolesti (Brinkman i sar., 1997; Barton i sar., 2001; Buchs i sar., 2001; Fabris i sar., 2002; Sashio i sar., 2002; Dieude i sar., 2004). Nađena je veza između specifičnih varijanti u TNF-R1 i R2 genima i prevremenih porođaja u crnačkoj populaciji u Americi (Menon i sar., 2006). Takođe, povećana koncentracija TNF-R1 i R2 u makrofagima uočena je kod kancera jajnika, dok se povećana koncentracija TNF-R1 dovodi u vezu sa različitim krvnim oboljenjima, posebno limfomima (Warzocha i sar., 2000).

1.5.2. MATRIKS METALOPROTEINAZE

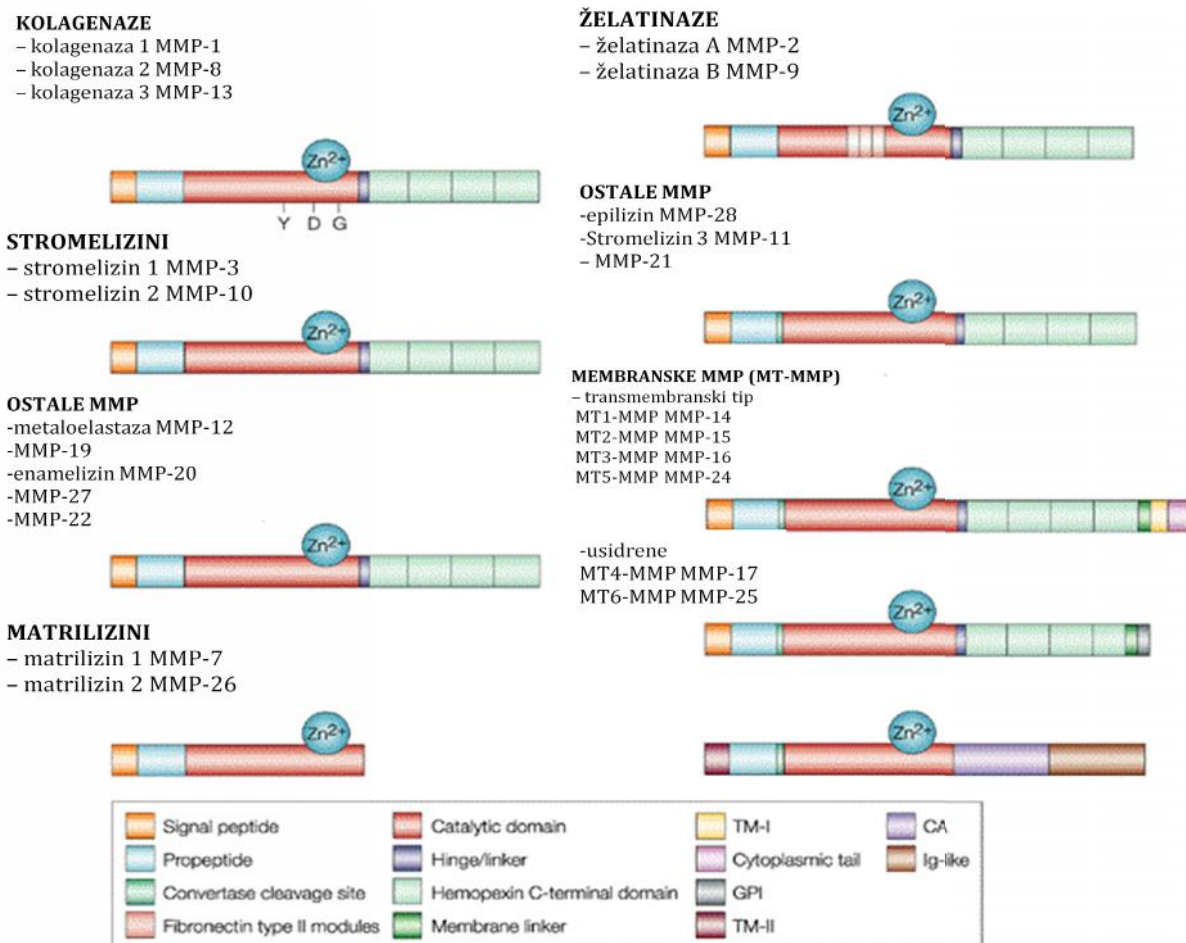
Za normalan razvoj i funkcionisanje organizma neophodna je interakcija ćelija sa ekstraćelijskim matriksom. Regulacija ove interakcije se dešava putem jedinstvenog proteolitičkog sistema matriks metaloproteinaza (MMP), odgovornog za hidrolizu različitih komponenti ECM-a, kao i kontrolu signala matriksnih molekula koji regulišu rast i razvoj ćelija. Remodeliranje ECM-a mora biti strogo regulisano jer u suprotnom, svaka nekontrolisana proteoliza može dovesti do patoloških pojava, koje se karakterišu ili prekomernom degradacijom ili odsustvom degradacije komponenti ECM-a (Mandal i sar., 2003), a karakteristične su za rast tumora, njegovu invazivnost i metastaze (Overall i Lopez-Otin, 2002). Invazija i metastaza malignih ćelija predstavljaju veliki klinički problem i glavni uzrok smrti pacijenata obolelih od kancera. Metastaze su višestepeni proces koji uključuje vezivanje tumorskih ćelija za komponente ekstraćelijskog matriksa, degradaciju ekstraćelijskog matriksa, kretanje tumorskih ćelija kroz degradiran prostor, indukciju angiogeneze i proteolitičkih enzima i njihovih inhibitora i proliferaciju u udaljenim organima. Sposobnost tumorskih ćelija da invadiraju i metastaziraju zavisi od stepena diferencijacije, s obzirom da su slabo diferencirane ćelije invazivnije u poređenju sa ćelijama koje se nalaze na višem stupnju diferencijacije. Prekidi u bazalnoj membrane su neophodni za prolaz malignih ćelija sa primarnog, na neka druga, udaljena mesta (Han i sar., 2002).

Matriks metaloproteinaze su homogena familija od 23 strukturno slične endopeptidaze koje razgrađuju komponente ekstraćelijskog matriksa sa zajedničkim strukturnim i funkcionalnim elementima. To su enzimi zavisni od Ca^{2+} i Zn^{2+} sintetisani kao transmembranski ili pro-enzimi za sekreciju, koji nakon uklanjanja 10 kDa amino-terminalnog propeptida postaju aktivni. Nakon aktiviranja, njihovu proteolitičku aktivnost inhibiraju tkivni inhibitori poznati kao tkivni inhibitori metaloproteinaza (*eng. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*, TIMPs). MMP-e se mogu aktivirati različitim agensima, članovima MMP familije ili drugim proteazama. Na osnovu supstrata koji degraduju ili sličnih strukturnih domena MMP-e se mogu podeliti u 6 podgrupa kao: kolagenaze, želatinaze, stromelizini, matrilizini, membranske MMP-e i ostale MMP (*Slika 18*).

Struktura MMP-aza:

Matriksne metaloproteinaze se uglavnom sastoje od:

- Propeptida ili pro-domena (pro)
- Katalitičkog domena (cat)
- Peptida koji povezuje (cat sa Hpx) ili zglobnog područja (L1)
- Hemopeksinskih domena



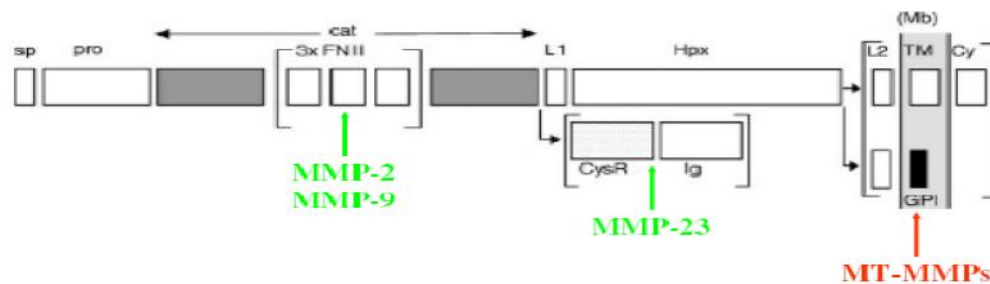
Slika 18. Podela matriks metaloproteinaza na osnovu supstrata koji degraduju ili sličnih strukturnih domena

preuzeto: http://www.clip.ubc.ca/archive/mmp_timp_folder/mmp_schematic_master.gif,
 modifikovano

Izuzetak su MMP-7, MMP-23 i MMP-26 koje nemaju L1 i Hpx. MMP-23 ima domen bogat cisteinskim ostacima (CysR) i domen sličan imunoglobulinima (Ig), Slika 19. Dve od MMP (MMP-2 i MMP-9) sadrže domen sličan fibronektinu ugrađen

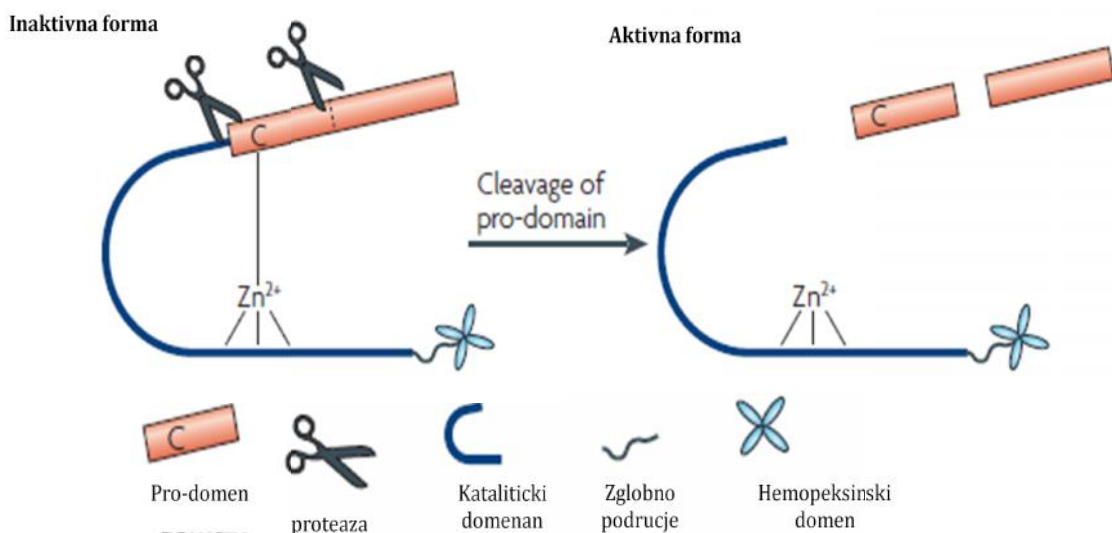
unutar katalitičkog domena, verovatno radi boljeg vezivanja za supstrat. MMP-9 takođe sadrži i domen sličan kolagenu V, koji povećava specifičnost i jače vezivanje za supstrat.

Zajedničke strukturne karakteristike MMP-a su motivi koji vezuju Zn^{2+} unutar katalitičkog domena (HEXXHXXGXXH) i motiv cisteinske „sklopke“ unutar propeptida (PRCXXPD).



Slika 19. Domeni matriksnih metaloproteinaza

MMP se sintetišu u neaktivnoj, zimogenoj formi. Aktivacija zimogena (proMMP) važan je regulacijski korak u aktivaciji MMP (Slika 20): uklanja se prodomen (interakcija SH (Cys) u pro i Zn^{2+}). Aktivne MMP mogu učestvovati u aktivaciji drugih MMP. Izuzetak je MMP-26 koja se auto-aktivira.



Slika 20. Aktivacija matriks metaloproteinaza, prevođenje inaktivne u aktivnu formu

preuzeto: Page-McCaw i sar., 2007. modificovano

U većini tkiva odraslih koncentracija MMP je vrlo niska (Birkedal-Hansen i sar., 1993), ali se ona drastično povećava tokom tkivnog remodeliranja. Njihova aktivnost je strogo regulisana na nekoliko načina (Sorsa i sar., 2004):

- proteolitička degradacija i inaktivacija
- nespecifičnim endogenim inhibitorima kao što je $\alpha 2$ makroglobulin
- specifičnim tkivnim inhibitorima MMP (TIMPs)

TIMPs su najveća grupa endogenih regulatora aktivnosti MMP u tkivima i do danas ih je identifikovano 4 (Ricou i sar., 1996; Jackson i sar., 2001; Asahina i sar., 2001; Ho i sar., 2005). Neravnoteža između aktivnosti TIMP-a i MMP podstiče razgradnju komponenti ECM-a, rast primarnog tumora i metastaziranje. Ali pored njih efektori mogu biti i raznovrsni faktori rasta, citokini, hemijski agensi, fizički stres, kao i onkogene ćelijske transformacije (Nagase i Woessner, 1999).

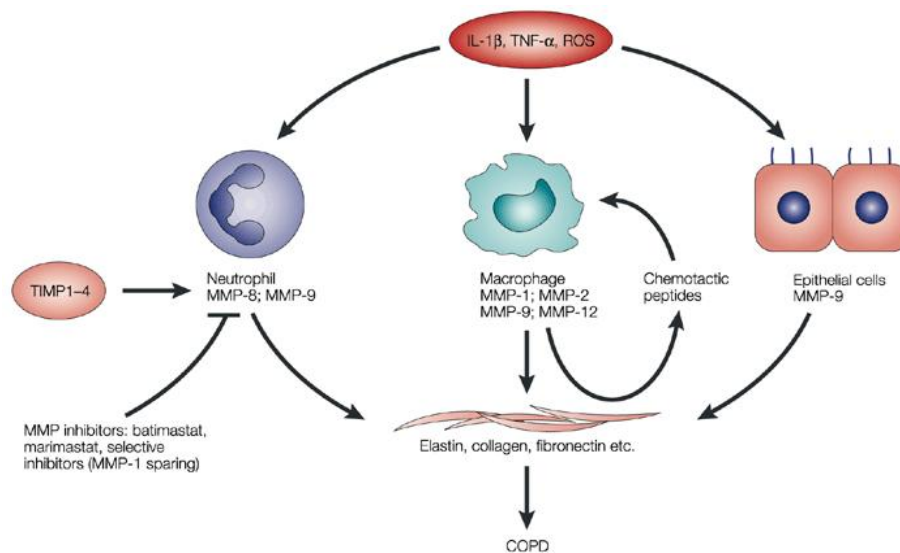
Osnovna uloga matriksnih metaloproteinaza je degradacija proteina, regulacija različitih ćelijskih ponašanja sa stanovišta biologije kancera. Uključene su u rast ćelija, diferencijaciju, apoptozu, migraciju i invaziju, regulaciju tumorske angiogeneze i imunskog odgovora (Egeblad i Werb, 2002). Ekspresija i aktivacija MMP uočena je kod gotovo svih vrsta tumora (posebno MMP-1, 2, 3, 7, 9, 10, 11, 13, 14). Među svima njima, želatinaze MMP-2 i MMP-9 su povezane sa malignim fenotipom tumorskih ćelija zbog njihove jedinstvene sposobnosti da degradiraju kolagen tipa IV, kao najveću komponentu bazalne membrane (Devarajan i sar., 1992), koja odvaja epidermis od dermisa i predstavlja prvu barijeru za invaziju tumorskih ćelija (Thomas i sar., 1999).

1.5.2.1. Matriks metaloproteinaza 9 (MMP- 9)

MMP-9 (želatinaza B) je inducibilan enzim iz podgrupe želatinaza. Aktivira se uklanjanjem prodomena (~10 kD) koji biva odvojen delovanjem MMP-2,-3,-13 ili plazmina (Mandal i sar., 2003), mada se MMP-3 izdvaja kao najčešći aktivator (Goldberg i sar., 1992.). MMP-9 je uključena u razgradnju želatina, kolagena (IV, V, XI, XVII) i elastina (Ito i sar., 2005).

Gen za želatinazu B (MMP-9) nalazi se na hromozomu **20q11.2-q13.1** i ima 13 egzona (Huhtala i sar., 1991).

Ekspresija želatinaze B je uglavnom ograničena na neutrofile, ali se detektuje u različitim ćelijama povezanim sa tumorskim metastazama. Inflamatorna stimulacija, odnosno citokini kao što su TNF-alpha i IL-1 β indukuju ekspresiju MMP-9 u mnogim ćelijama uključujući endotelijalne ćelije, makrofage, fibroblaste, koronarne arterije i glatkim mišićnim ćelijama (Galis i sar., 1994; Coussens i sar., 2000; Schwingshackl i sar., 1999; Yao i sar., 1997), *Slika 21*. MMP-9 učestvuje i u angiogenezi koja je uključena u razvoj tumora (Bergers i sar., 2000), mada ima izveštaja koji ukazuju na njen antiangiogenetski efekat (Heljasvaara i sar., 2005). Takođe, prisutna je u malim količinama u zdravim plućima odraslih, ali je mnogo izražajniya u nekim plućnim bolestima (Atkinson, 2003).



Slika 21. Ekspresija MMP-9 u različitim tipovima ćelija

preuzeto: Barnes, 2002.

1.5.2.2. Polimorfizam u genu za matriks metaloproteinazu 9 (-1562 C/T, rs3918242)

Studija Zhanga i saradnika (1999) je pokazala da polimorfizam (-1562 C/T) u promotorskom regionu MMP-9 gena ima funkcionalne efekte na transkripciju i da je povezan sa težinom ateroskleroze kod pacijenata sa koronarnom arterijskom bolešću. Podstaknuti time oni su katalogizirali varijante sekvenci u 2.2 kb promotorske sekvence i svih 13 egzona (ukupno 3.3 kb) MMP-9 gena. Identifikovali su ukupno 10 varijabilnih mesta: 4 u promotorskom regionu, 5 u kodirajućem regionu i 1 u 3' netranslatiranoj sekvenci. Analiza sekvenci ukazuje da bi neke varijante mogle imati uticaja na nivo ekspresije ili na enzimatsku aktivnost.

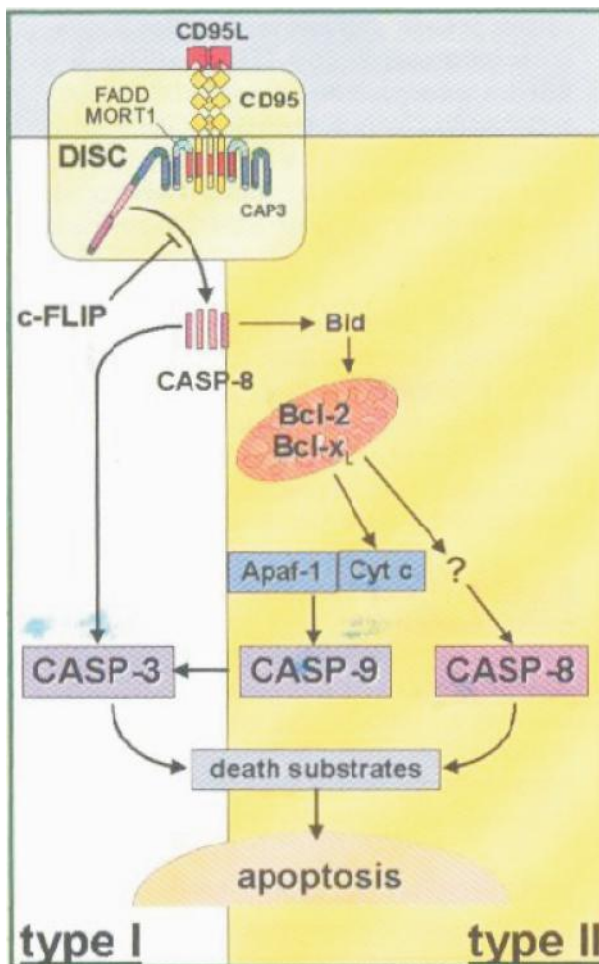
Polimorfizmi u promotoru MMP-9 gena su dovedeni u vezu sa izmenjenom genskom ekspresijom i sklonošću ka različitim oboljenjima. Dve od pet identifikovanih varijanti sekvence su funkcionalno relevantne: SNP na -1562 bp (C/T) i jedan (CA)_n mikrosatelit na poziciji -131 bp. C/T supstitucija na poziciji -1562 rezultuje gubitkom vezivanja jedarnog proteina i povećanjem transkripcione aktivnosti kod makrofaga (Van den Steen i sar., 2002). Slično tome, najviša aktivnost promotora je primećena kod reporter - konstrukta koji sadrže 21 ili 23 (CA) ponovaka, što nagoveštava da broj ponovaka oblikuje transkripcionu aktivnost (Van den Steen i sar., 2002).

Pored nekoliko polimorfnih promena u regulatornom regionu gena (Zhang i sar., 1995), -1562 C/T polimorfizam dovodi do povećanja promotorske aktivnosti ovog gena (Zhang i sar., 1999) i do izmenjene transkripcije. Pokazano je da ovaj polimorfizam igra značajnu ulogu u razvoju ateroskleroze (Zhang i sar., 1999), kao i da je povezan sa emfizemom kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća (Ito i sar., 2005). Pored ovih bolesti, povećana ekspresija i aktivnost MMP-9 je zapažena i kod akutnog respiratornog distres sindroma (ARDS)(Ricou i sar., 1996), poliomiozitisa, dermatomiozitisa, reumatoidnog artritisa (Jackson i sar., 2001), Alchajmerove bolesti (Asahina i sar., 2001) i drugih neurodegenerativnih bolesti (Ilzecka i sar., 2001), kao i u raznim malignitetima (Mandal i sar., 2003).

1.6. FAKTORI UKLJUČENI U KONTROLU ĆELIJSKE PROLIFERACIJE, DIFERENCIJACIJE I SMRTI

1.6.1. APOPTOZA, programirana smrt ćelije

Apoptoza ili programirana ćelijska smrt je ključan proces uključen u normalan razvoj, održavanje tkivne homeostaze i imunog odgovora. To je genetički determinisan proces koji ima ulogu u regulaciji broja ćelija u tkivu tokom morfogeneze i u odstranjivanju inficiranih ili ćelija sa oštećenjem potencijalno opasnim po ceo organizam. Pravilan tok apoptotskih procesa ključan je za pravilan embrionalni razvoj, ali se nastavlja i nakon rođenja, pa tako na primer, keratinocite



pri migraciji iz dubljih slojeva kože do njene površine podležu apoptozi pretvarajući se u spoljašnji, zaštitni sloj odumrlih ćelija. Poremećaji apoptoze vezani su za patogenezu bolesti kao što su tumori, neke autoimune bolesti, različiti degenerativni procesi, itd.

Apoptozu mogu inicirati različiti stimuli kao što su UV i jonizujuće zračenje, hipoksija, hemioterapeutici, nedostatak faktora rasta, ali i aktivacija takozvanih aporeceptora. U osnovi, bez obzira na početni stimulus, postoje dva mehanizma indukcije apoptoze (Slika 22):

Slika 22. Dva mehanizma indukcije apoptoze

preuzeto: Baskic i sar., 2002.

- 1) pozitivna indukcija ili spoljašnji put, nakon vezivanja liganda za membranske aporeceptore,
- 2) negativna indukcija ili unutrašnji put, zbog prestanka supresije

Oba puta dovode do aktivacije cistein proteaza (kaspaza) odgovornih za kontrolisanu razgradnju ćelije.

Pozitivna indukcija apoptoze podrazumeva aktivaciju membranskih aporeceptora iz superfamilije faktora nekroze tumora (TNF). Ligandi i receptori uključeni u indukciju apoptoze nazivaju se i ligandi i receptori smrti. Vezivanje aporeceptora i liganda dovodi do angažovanja adaptorskih proteina i posledične aktivacije prokaspaze 8, prve u nishodnoj kaskadi kaspaza, koja preko kaspaze 3 aktivira proces apoptoze (Kroemer i sar., 1998).

Sa druge strane, ostarele ili oštećene ćelije veoma često kreću u pravcu samoubistva bez prethodne aktivacije aporeceptora. U ovom modelu negativne indukcije apoptoze glavnu ulogu igraju ćelijske organele, na prvom mestu mitohondrije, koje imaju funkciju pojačala koje amplifikuje početni apoptotični signal (Green, 1998). Nakon prijema ovog signala integritet mitohondrijalne membrane se menja tako da dolazi do pada transmembranskog potencijala, povećanja koncentracije kalcijuma u mitohondrijama i disrupcije transportnog lanca elektrona. Porast nivoa kalcijuma dovodi do otvaranja tranzitornih pora mitohondrija i oslobađanja niskomolekularnih proteina kao što je citohrom c u citoplazmu, čime se preko kaspaze 9, a zatim i kaspaze 3, pokreće nishodna kaskada kaspaza.

U regulaciji apoptoze učestvuju proapoptotični i antiapoptotični proteini ove familije (Reed, 1997).

1.6.2. PROTEINI INHIBITORI APOPTOZE

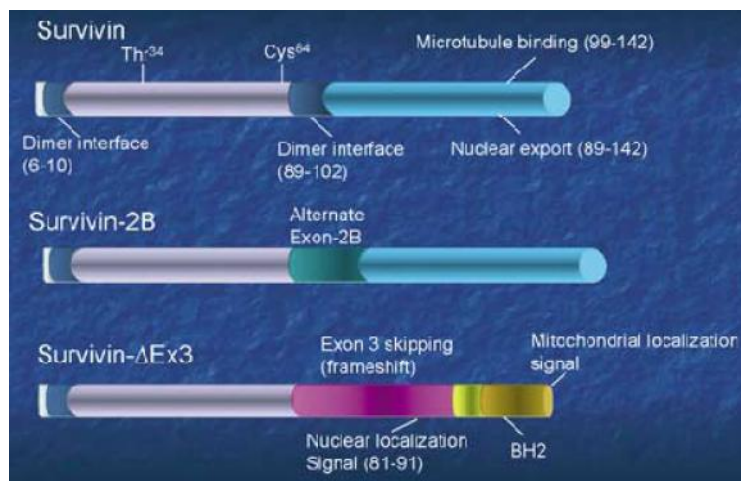
Proteini inhibitori apoptoze (*eng. Inhibitors of Apoptosis Proteins, IAP*) su porodica funkcionalno i strukturno srodnih proteina, endogenih inhibitora apoptoze. Trenutno je poznato ukupno 8 takvih proteina (c-IAP1, c-IAP2, XIAP, NAIP, Survivin, Apollon, ML-IAP, livin, ILP-2 (Reed, 1997)). Za njih je zajedničko da sadrže tzv. BIR domen (*Baculovirus IAP Repeat* ~70 amino kiselina dug motiv) u jednoj do tri kopije, koji je neophodan za antiapoptotičnu aktivnost IAPs-a, jer upravo interakcija između BIR domena i kaspaza (-3, -7, -8, -9) inhibira njihovu aktivnost. Takođe sadrže i na C-terminusu RING motiv ili tzv. CARD domen (*eng. Caspase Activation Recruitment Domain*).

Pojačana aktivnost ovih proteina dovodi se u vezu s tumorskom rezistencijom jer onemogućavaju realizaciju apoptotskog programa u ćelijama sa oštećenjima naslednog materijala i ujedno promovišu nekontrolisanu proliferaciju transformisanih ćelija (Oltvai i sar., 1993).

1.6.2.1. SURVIVIN

Survivin je bifunkcionalni 16,5 kD protein, najmanji je član proteinske familije inhibitora apoptoze i regulator ćelijskog ciklusa (podstiče deobu ćelije time što stimuliše prelaz ćelije iz G2 u M fazu; Salvesen, 2002). Prisutan je i u jedrima i u citoplazmi ćelija i pretpostavlja se da citoplazmatski survivin ima antiapoptotsku ulogu, dok onaj u jedrima ćelija je zadužen za kontrolu deoba ćelija. Za razliku od svih ostalih protein IAP familije, ima samo jedan BIR domen i ne poseduje RING motiv.

Gen za survivin (*eng. Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat Containig 5-BIRC5*) je lociran na hromozomu 17 (**17q25**) i čine ga 4 egzona i 3 introna. Alternativnim iskrajanjem primarnog transkripta dobija se nekoliko izoformi survivina (Caldas i sar., 2005), *Slika 23*:



Slika 23. *Različite izoforme survivina*

preuzeto: Altieri, 2003.

- **Survivin 2B:** sadrži alternativni egzon 2B
- **Survivin ΔEx3:** bez egzona 3. Isključivanjem egzona 3 dolazi do vanfazne mutacije kojom se generiše jedinstveni COOH terminus sa novom funkcijom koja podrazumeva signal za jedarnu i mitohondrijsku lokalizaciju
- **Survivin 3B:** sadrži alternativni egzon 3B
- **Survivin 2α:** ima, kao i izoforma survivin 2B, proapoptotsku funkciju za razliku od wt, 3B i ΔEx3 varijante.

Putevi kojima survivin blokira apoptozu nisu do kraja jasni, pretpostavlja se da svoju antiapoptotsku funkciju obavlja inhibirajući kaspaze 3, 7 i 9 (Banks i sar., 2000; Shin i sar., 2001). U to je uključena i inhibicija apoptoze zavisne od mitohondrija (i citohroma C), preko ΔEx3 varijante, uz učešće još nekih proteina.

Survivin se eksprimira u toku embrionalnog razvića i u različitim kancerima omogućavajući ćelijama kancera izbegavanje apoptoze i mitozu (Salvesen, 2002; Li, 2005). Kao posledica toga, povećana ekspresija survivina je povezana sa progresijom kancera, skraćenim vremenom preživljavanja pacijenata, lošijom prognozom i rezistencijom na terapiju (Grabowski i sar., 2003; Ito i sar., 2000; Javle i sar., 2004; Altieri, 2003) kod mnogih tipova kancera, ali postoje i suprotni rezultati (Lehner i sar., 2002; Kennedy i sar., 2003; Trieb i sar., 2003). U normalnim, diferenciranim ćelijama i tkivima ga nema (Ambrosini i sar., 1997), osim u malim količinama u timusu, bazalnom epitelu debelog creva, CD34+

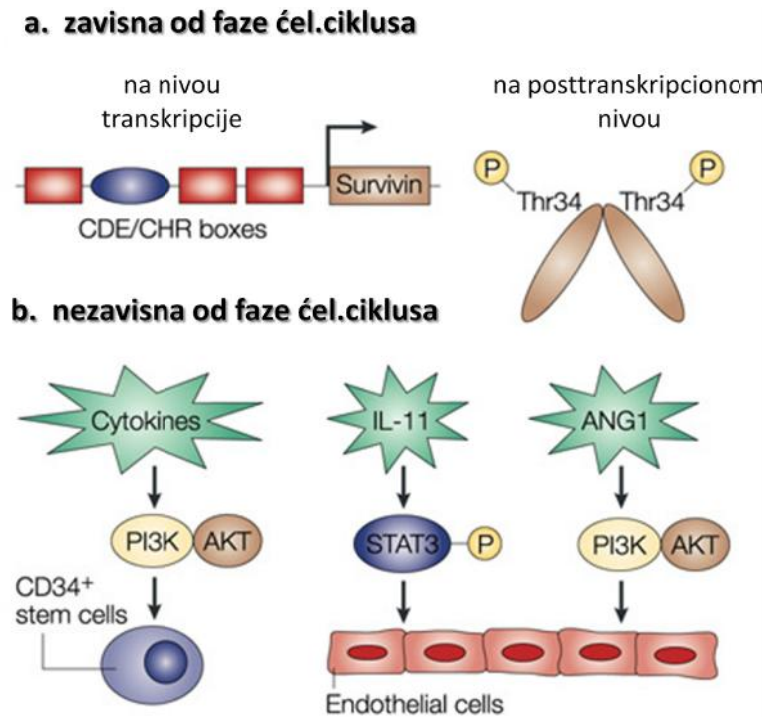
ćelijama kosne srži, u keratinocitama bazalnih ćelija normalnog epidermisa (Altieri, 2001). Muzio i saradnici su pokazali ekspresiju survivina u 100% metastaza, dok u normalnom oralnom epitelijumu nije uočena ekspresija.

Iako mehanizam kojim survivin reguliše ćelijski ciklus nije u potpunosti razjašnjen, njegova lokalizacija tokom mitoze kao i vezivanje za komponente mitotskog aparata – centrozom, mikrotubule metafaznog i anafaznog deobnog vretena, upućuju na njegovu ulogu u ovim procesima.

Kod tumorskih ćelija koje su nokaut za survivin (inaktiviraju ga), dolazi do poremećaja u organizaciji mikrotubula što na kraju dovodi do poliploidije i masovne apoptoze.

Regulacija njegove ekspresije je prilično kompleksna. Ona može biti (*Slika 24*):

- a. **zavisna od faze ćelijskog ciklusa** (*eng. cell-cycle-dependent*), i to:
 - **na nivou transkripcije** (što uključuje tzv. CDE/CHR regulatorne elemente u promotorskom regionu), ekspresija survivina je najveća tokom G2/M faze. Ovaj mehanizam regulacije podržava i nalaz da je survivin poli-ubikvitiniziran i degradovan proteazomima tokom interfaze ćelijskog ciklusa (Altieri, 2003), a kolokalizovan je sa komponentama deobnog vretena tokom metafaze i anafaze mitoze. Još jedan vid kontrole ekspresije survivina na transkripcionom nivou je interakcija između proteina TP53 i promotorskog regiona survivina u kome su pronađena dva TP53 vezujuća mesta. Ovom interakcijom TP53 vrši inhibiciju transkripcije survivina.
 - **na posttranskripcionom nivou**, ostvarena modifikacijom tipa fosforilacije Thr 34, koja povećava stabilnost proteina u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Altieri, 2003). Fosforilacija survivina dovodi do inhibicije apoptoze i do ćelijske deobe.
- b. **nezavisna od faze ćelijskog ciklusa** (određeni citokini)



Slika 24. Regulacija ekspresije survivina

preuzeto: Altieri, 2003. modifikovano

1.6.2.2. Polimorfizam u genu za survivin (-31 G/C, rs9904341)

Do danas je identifikovano 199 SNP-ova u BIRC5 genu kod ljudi. Među svima njima svakako su najinteresantniji oni u promotorskom regionu ovog gena (-644 T/C, -625 G/C, -241 T/C, -31 G/C). CDE/CHR deo promotora gena za survivin, veoma je važan za regulaciju njegove ekspresije i zato je jedan od najispitavanijih polimorfizama na poziciji - 31, kod koga je pokazano da mutacija G/C dovodi do povećane ekspresije survivina pa i do povećanja rizika od oboljevanja od različitih tipova kancera, kao što su kancer pluća, dojke, debelog creva, pankreasa, želuca, jednjaka, materice, jajnika, zatim je povećana ekspresija uočena i u leukemijama, neuroblastomima, melanomima i nemelanomskim tipovima kancera (Ambrosini i sar., 1997; Altieri, 2001).

Gotovo da ne postoje studije asocijacije ovog polimorfizma sa bazocelularnim karcinomom, ali postoje podaci o asocijaciji ekspresije survivina i

različitim tipovima kancera. Survivin je izrazito eksprimiran u skvamocelularnim karcinomima, ali praktično izostaje u bazocelularnim. Međutim, rezultati studije Al-Khalaf i Aboussekhra (2012) su pokazali povećanu ekspresiju u starijim ćelijama i organima, odnosno povećanu ekspresiju survivina sa godinama života u fibroblastima kože, što ide u prilog asocijacije sa bazocelularnim karcinomom, s obzirom da je on daleko učestaliji u starijoj populaciji.

1.6.3. TUMOR PROTEIN 53

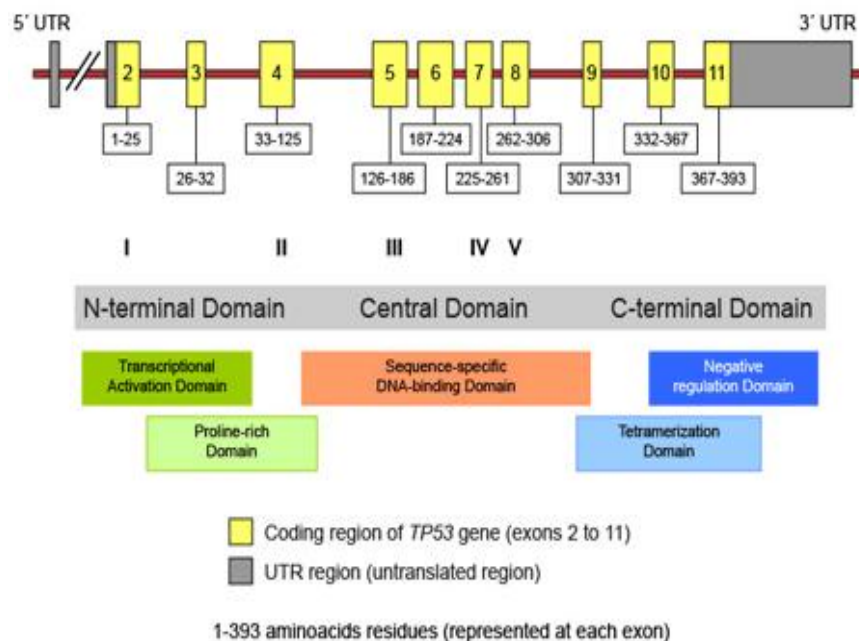
Ključni događaj u transformaciji premaligne ćelije u malignu je inaktivacija negativnih regulatora ćelijske proliferacije – tumor supresorskih gena tačkastim mutacijama, delecijama i rearanžmanima gena ili hipermetilacijom.

TP53 (*Tumor protein 53, p53*) je jedan od najbolje proučenih tumor supresor gena sa ključnom ulogom u genezi humanih kancera (Ruddon, 2007). Mutacije tumor supresorskog gena TP53 najučestalije su genetičke alteracije u humanom kanceru koje pogađaju specifični gen (Olivier i sar., 2009; Petitjean i sar., 2007).

Gen koji kodira za TP53 lociran je na hromozomu 17 (**17p13.1**) (Isobe i sar., 1986) i čini ga 11 egzona i 10 introna, s tim što je egzon 1 nekodirajući (*Slika 19*). Od ovog gena kodira se humani TP53 protein, sačinjen od 393 aminokiseline koji obavlja brojne antiproliferativne funkcije kroz kontrolu transkripcije različitih ciljnih gena i kroz protein-protein interakcije. Pošto ima važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i očuvanju stabilnosti genoma sprečavanjem mutacija, često se naziva i “čuvarem genoma” (Matlashewski i sar., 1984). Ova zaštitna funkcija se ogleda u zaustavljanju replikacije oštećene DNK. Ako je DNK oštećena, tada se TP53 akumulira i zaustavlja replikaciju DNK i deobu ćelije za vreme dok se DNK ne reparira. Ako su reparacioni mehanizmi neuspešni, TP53 okida apoptotični odgovor, a konačan rezultat je smrt ćelije. Ali, ako je TP53 izgubljen ili je mutirao, ćelija replikuje leziju na DNK. Ovakve ćelije su genetički manje stabilne, akumuliraju mutacije i dovode do generisanja malignog stanja koje se zatim još pojačava, što se ogleda u progresiji tumora (Frebours i sar., 1992; Levine, 1993; Agarwal i sar., 1995;).

Protein TP53 poseduje 5 domena svaki sa specifičnom funkcijom (Slika 25):

1. Amino terminalni deo od 1-42 amino kiseline (AK), sadrži kiseli transaktivacioni domen i MDM2 vezujuće mesto. Takođe sadrži visoko konzervirani domen I (*eng. Highly Conserved Domain, HCDI*);
2. Region od 40-92 AK, sadrži niz ponovljenih prolinskih ostataka konzerviranih kod većine TP53; kao i drugi transaktivacioni domen;
3. Centralni region od 101-306 AK, sadrži DNK vezujući domen. 90% mutacija u TP53 koje se javljaju u humanim kancerima je u ovom regionu. On sadrži HCD od II-V;
4. Oligomerizacioni domen (307-355 AK, TET), sadrži β -lanac koji interaguje sa drugim TP53 monomerom formirajući dimer, dok α -lanac omogućava dimerizaciju dva TP53 u formu tetramera. Jedarni signal za izvoz (NES) lokalizovan je u ovom oligomerizacionom domenu;
5. Karboksilni kraj TP53 od 356-393 AK, sadrži tri jedarna lokalizaciona signala (NLS) i nespecifični DNK vezujući domen koji se vezuje za oštećenu DNK. Ovaj region je uključen u nizvodnu regulaciju vezivanja centralnog domena za DNK.



Slika 25. Strukturna organizacija TP53 gena i proteina

preuzeto:<http://www.stjude.org/stjude/v/index.jsp?vgnextoid=ed17ca796f775310VgnVCM100000290115acRCRD&vgnextchannel=d645ff98a6775310VgnVCM100000290115acRCRD>

Mutacije koje inaktiviraju TP53 u kancerima se obično odigravaju u centralnom regionu. Većina ovih mutacija onemogućava proteinu da se veže za ciljnu DNK sekvencu i stoga sprečava transkripcionu aktivaciju tih gena. Karakteristično je da su ovi visokokonzervirani domeni najčešće pogođeni mutacijama, što ukazuje na to da imaju posebno značajnu ulogu u regulatornim funkcijama TP53.

TP53 se aktivira u odgovoru na mnoštvo različitih tipova stresa, koji mogu uključivati DNK oštećenje indukovano UV zračenjem ili hemijskim agensima, oksidativni stres, osmotski šok, neregulisanu ekspresiju onkogeni i druge raznovrsne vidove stresa.

Do prevođenja latentne u aktivnu formu TP53 dolazi fosforilacijom, acetilacijom ili glikozilacijom C-terminalnog domena. Fosforilaciju katalizuju S i G2/M ciklin-zavisne kinaze koje utiču na odabir ciljne sekvence na DNK za koju će se vezati TP53 čime moduliraju aktivaciju TP53 ciljnog gena (Rodier i sar., 2007). Protein kinaze koje fosforilišu aminokiseline u N terminusu mogu se podeliti u dve grupe. Prva grupa protein kinaza pripada MAPK porodici (JNK1-3, ERK, p38 MAPK) za koju se zna da odgovara na nekoliko različitih tipova stresa, kao što je oštećenje ćelijske membrane, oksidativni stres, osmotski šok i dr. Druga grupa protein kinaza (ATR, ATM, CHK1 i CHK2, DNA-PK, CAK) je uključena u molekularnu kaskadu koja detektuje i odgovara na nekoliko tipova DNK oštećenja prouzrokovanih genotoksičnim stresom. Onkogeni takođe mogu stimulisati aktivnost TP53, posredstvom proteina p14ARF (*eng. Alternative Reading Frame*) koji interaguje sa MDM2, čime ga inaktivira i omogućava aktivaciju TP53 (Kaelin, 1999). *wt TP53* u fiziološkim uslovima ima veoma kratak period polu-života od 4-5 minuta, a kao odgovor na stres biva stabilizovan fosforilacijom N-terminusa (Giaccia, 1998). Ovim post-translacionim modifikacijama vreme poluživota stabilizovanog TP53 je produženo na nekoliko časova. Mutirane forme TP53 su značajno stabilnije, sa vremenom poluživota od 6 časova.

U normalnim ćelijama TP53 se održava na niskom nivou kroz neprekidnu degradaciju. Protein HDM2, humani homolog MDM2 (lociran na *mouse double*

minute 2 hromozomu) onkogen, je negativni regulator TP53, koji se vezuje za N-terminalni kraj TP53, čime inhibira transkripcionu aktivnost TP53 proteina. Takođe, MDM2 funkcioniše kao ubikvitin ligaza i kovalentno vezuje ubikvitin za TP53, čime obeležava TP53 za degradaciju u proteazomima. Međutim, vezivanje ubikvitina za TP53 je reverzibilno. Ubikvitin specifična proteaza USP7 može da ukloni ubikvitin sa TP53, štiteći ga pritom od degradacije u proteazomima. Ovo je jedan način kojim se TP53 stabilizuje u odgovoru na onkogeni "napad".

Aktivirani TP53 se vezuje za DNK i reguliše ekspresiju nekoliko gena. Između ostalog, TP53 funkcioniše kao transkripcioni aktivator gena za protein p21 (ciklin-zavisni inhibitor kinaze, CDK1), koji je kodiran WAF1/CIP genom (*eng. Wild Type p53 Activated Fragment 1/cdk Interacting Protein*). Protein p21 se vezuje za G1-S/CDK (CDK2) i S/CDK komplekse (molekule važne za prelazak iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa) inhibirajući njihovu aktivnost (el-Deiry i sar., 1998). Kada je p21 u kompleksu sa CDK2, ćelija ne može preći u sledeću fazu ćelijske deobe. Međutim, ukoliko je protein TP53 mutiran, izostaje sinteza proteina p21, a samim tim izostaje i njegova uloga stop-signal za ćelijsku deobu, pa će se ćelije nekontrolisano deliti i formirati tumore.

Generalno je prihvaćeno stanovište da se tumor supresorska funkcija TP53 ostvaruje putem niza mehanizama u kojima učestvuje TP53:

- 1) TP53 blokira ćelijsku deobu na prelazu iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa,
- 2) stimuliše popravak oštećenja DNK i
- 3) indukuje apoptozu

Zaustavljanjem ćelijskog ciklusa TP53 omogućava vreme da se reparacionim mehanizmima uklone oštećenja pre replikacije DNK (S faze), aktivacijom integriše različite signale stresa, nakon čega inicira ili prolazno zaustavljanje ćelijskog ciklusa, ili trajno zaustavljanje ćelijskog ciklusa ili inicira apoptozu, u zavisnosti od stepena oštećenja ćelije. U slučaju gubitka funkcije TP53 dolazi do akumulacije mutacija i kancera (Rodier i sar., 2007). Nakon aktivacije, u zavisnosti od signala stresa, obrasca posttranslacionih modifikacija i ćelijskog konteksta, TP53 deluje kao aktivator/represor transkripcije velikog broja gena.

Translokacijom u mitohondrije TP53 inicira mitohondrijalnu apoptotsku kaskadu, a osobina da preko C-terminusa prepozna je jednonančane prekide DNK, dovodi do lokalizacije TP53 na lezijama DNK i regrutovanja reparacionih mehanizama (Rodier i sar., 2007).

Ćelijska *senescenca* i starenje tkiva važne su biološke posledice aktivacije TP53 genotoksičnim stresom i značajno doprinose njegovoj tumor-supresorskoj aktivnosti. Kod *TP53 +/m* miševa, ekspresija mutantnog alela sa delecijom prvih 6 egzona TP53 i skraćenim mutantnim proteinskim produktom dovela je do redukcije broja spontanih tumora, ali je indukovala ubrzano starenje ovih miševa u odnosu na one koji nose divlji tip gena (Tyner i sar., 2002). Ovakav fenotip posledica je permanentne aktivacije TP53 koja nastaje kao rezultat interakcije mutantnog i normalnog TP53. U ispitivanju ćelijskog odgovora na inflamaciju indukovanu donorima azot oksida, utvrđeno je da TP53 inicira senescencu preko nishodnog efektoru mikroRNA miR-34a. Pojačana ekspresija miR-34a zaustavlja ćelijski rast i replikaciju i dovodi do starenja tkiva (Hussain i Harris, 2007).

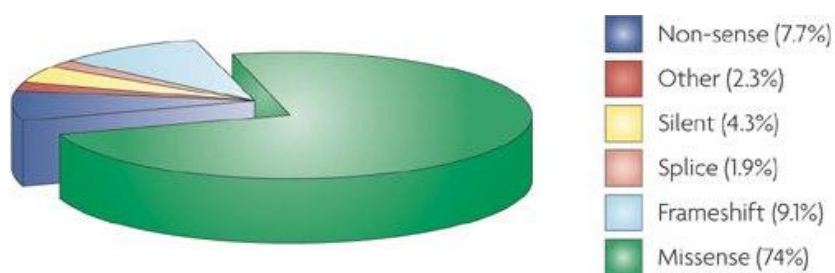
1.6.3.1. Polimorfizmi u genu za TP53

(Pro47Ser, PIN3 Ins 16bp - rs17878362)

U naučnoj literaturi opisano je preko 27.000 mutacija u TP53 genu. Mutacije su pronađene u gotovo svim tipovima kancera sa različitom učestalošću javljanja i po svojoj prirodi su veoma raznovrsne. Događaju se rano u kancerogenezi i otkrivaju često u premalignim lezijama, pogotovo kad postoji izloženost kancerogenima iz sredine. Istraživanja kancera jetre i ezofagusa pokazala su da se TP53 mutacije mogu desiti na samom početku prirodnog toka ovih maligniteta (Olivier i sar., 2004). Mutacije TP53 nemaju presudni značaj za samu inicijaciju kancerogeneze, već dozvole ćelijama da prevaziđu ograničenje deobe koje postoji u stanju distresa, tj. da ignorišu odgovor na signale koji alterisane ćelije vode u apoptozu ili zastoj ciklusa. Tako je ćelijama sa oštećenom DNK na kratko omogućena proliferacija, što konačno povećava rizik za progresiju kancera.

Generalno, identifikovan je veliki broj polimorfizama TP53 gena i u kodirajućim i u nekodirajućim regionima (Costa i sar., 2008). Najučestalije izmene

TP53 gena u humanim malignim neoplazmama su tačkaste (*eng. point*) mutacije u vidu supstitucije jednog nukleotida koje dovode do sinteze mutantnog proteina koji se od produkta divljeg alela razlikuje u jednoj aminokiselini (*eng. missense* mutacije) *Slika 26*. To obično uzrokuje izmenu tercijarne strukture molekula ili onemogućava vezivanje za DNK usled zamene argininskih ostataka u DNK-vezujućem domenu TP53 molekula koji direktno interaguju sa DNK (Joerger i sar., 2006), te izostaje transkripciona aktivacija ciljnih gena.



Slika 26. Najučestalije izmene TP53 gena u malignim neoplazmama
preuzeto: Brosh i Rotter, 2009.

Do danas, kako je evidentirano u bazi podataka međunarodne agencije za istraživanje kancera (the International Agency for Research on Cancer TP53 Mutation Database: <http://www-p53.iarc.fr/PolymorphismView.asp>), opisano je 85 SNP-ova TP53 gena od kojih je više od 80% u nekodirajućim sekvencama i kao takvi nisu dovedeni u asocijaciju sa pojavom i razvojem kancera. Međutim del/ins polimorfizam u intronu 3, insercija 16bp (TP53PIN3 Ins 16bp) je istraživana od strane velikog broja autora i povezan je sa pojavom različitih tipova kancera, posebno dojke, pluća i kolorektalnim kancerom. Utvrđeno je da je ovaj polimorfizam asociran sa povećanom incidencom metastaza limfnih čvorova.

Što se tiče kodirajućih regiona TP53 gena, dva polimorfizma privlače najveću pažnju naučnika: Arg72Pro i Pro47Ser, oba locirana na egzonu 4. To su ujedno i najbolje proučeni polimorfizmi TP53 gena. Utvrđeno je da polimorfizam na kodonu 47, egzona 4 smanjuje sposobnost TP53 da indukuje apoptozu. Kodon 47 kodira prolin (CCG) kod *wild type* varijante TP53, ali kod malog broja ljudi može da kodira i serin (TCG), što su prvi identifikovali Felley-Bosco i saradnici (1993). Ser 47 varijanta je vrlo retka, sa alelskom učestalošću manjom od 5% u

populacijama Afričkog porekla (Pietsch i sar., 2006; Whibley i sar., 2009), dok je u populaciji Kavkazijanaca 0%. Da bi istražili posledicu ove aminokiselinske zamene konstruisana je cDNK koja je sadržala mutaciju, i konstrukt je unet u adenokarcinomsku ćelijsku liniju (Calu-6) koja ne eksprimira p53. Rezultati su pokazali da ovaj polimorfizam ne bi trebalo da utiče na supresorsku aktivnost p53.

Istraživanja koja se odnose na regulaciju apoptoze su posebno interesantna budući da su poremećaji na ovom nivou jedan od ključnih mehanizama nastanka tumora. Pokazano je da fosforilacija N-terminalnog domena p53 reguliše njegova transaktivaciona svojstva. P38 i HIPK2 (*eng. Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2*) fosforilišu Ser46, što pojačava transkripciju apoptotski povezanih gena i prema tome promoviše p53 posredovanu apoptozu. Ove dve kinaze su usmerene da fosforilišu mesta prolinskih rezidua u okolini Ser46. Stoga bi se očekivalo da zamena Pro47, koja se dešava u Pro47Ser polimorfizmu smanjuje fosforilaciju u Ser46, smanjujući samim tim i transaktivaciju proapoptotskih ciljnih gena što bi potencijalno povećalo rizik za nastanak kancera (Feng i sar., 2006; Kurihara i sar., 2007).

Li i sar. (2005) su uočili u ćelijskim linijama čoveka transfeciranim sa p53-Ser47 varijantom da smanjenje fosforilacije Ser46 u p53 proteinu smanjuje sposobnost indukcije dva p53 ciljna proapoptotska gena P53AIP1 (*eng. p53-regulated apoptosis-inducing protein 1*) i BBC3 (*eng. BCL2 binding component 3*), i smanjuje apoptozu. Oni su pokazali da se Ser47 i *wt* protein ne razlikuju po sposobnosti vezivanja za DNK, prenosu u mitohondrije, ili regulaciji ekspresije većine p53 ciljnih gena. Međutim, funkcionalni dokazi u različitim eksperimentalnim sistemima pokazuju neusaglašenost. U miševima, blokiranje Ser46 fosforilacije ima samo skromne fenotipske posledice (Toledo i Wahl, 2006). Moguće je da ovaj SNP utiče na p53 funkciju samo pod specifičnim stresnim uslovima (Olivier i sar., 2010). Preostaje da se uticaj ovog polimorfizma na predispoziciju za razvoj kancera dalje prouči.

Vrlo interesantnu povezanost su pokazale studije molekularne epidemiologije TP53 mutacija između ekspozicije specifičnim karcinogenima i

karakteristične sheme mutacija u razvoju određenih neoplazmi (Soussi i sar., 2006; Harris, 1993). Najmarkantniji je primer tandem mutacija koje se često sreću u bazocelularnom i skvamocelularnom karcinomu kože, dok je njihova pojava u drugim neoplazmama izuzetno retka (Brash, 1998). U ovim tumorima registrovana je visoka učestalost C/T tranzicija na dipirimidinskim mestima (CC), te se smatra da je mutacija indukovana ekspozicijom ultravioletnom zračenju. Za karcinom pluća, rak jednjaka i tumore glave i vrata karakteristična je visoka učestalost transverzija G/T (čak 65% za kancere glave i vrata). Transverzija G u T na kodonima 157, 158, 248 i 273 javlja se u karcinomu pluća u 30% slučajeva, a u drugim tumorima u manje od 10% i smatra se posledicom izloženosti duvanskom dimu, odnosno mutagenom dejstvu benzopirena (Denissenko i sar., 1996).

2. CILJEVI RADA

Predmet doktorske disertacije je analiza funkcionalnih polimorfizama nukleotidne sekvence u genu za *TNF alpha*, *TNF-R1*, *TNF-R2*, *MMP-9*, *SURVIVIN* i *TP-53*, odnosno analiza njihove povezanosti sa patološkim karakteristikama bazocelularnog karcinoma, ishodom bolesti, kao i utvrđivanje postojanja asocijacije između određenih genotipova ispitivanih polimorfizama i nastanka ovog karcinoma. Iz ovoga proističu zadaci istraživanja:

- Utvrđivanje starosne strukture pacijenata s obzirom da je bazocelularni karcinom očekivano češći među starijim delom populacije
- Genotipizacija i utvrđivanje učestalosti alela gena za *TNF alpha*, *TNF-R1*, *TNF-R2*, *MMP-9*, *SURVIVIN* i *TP-53* u grupi pacijenata sa bazocelularnim karcinomom i u kontrolnoj grupi;
- Utvrđivanje povezanosti polimorfizama navedenih gena i rizika za pojavu bazocelularnog karcinoma, kao i kliničko-patoloških karakteristika tumora (stadijum bolesti, veličina tumora) i ishoda bolesti;
- Ispitivanje postojanja asocijacije između etioloških faktora i genotipova ispitivanih gena, kao i njihove veze sa ishodom i tokom bolesti.

HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

- Prisustvo specifičnih genotipova u okviru ispitivanih polimorfizama (*TNF alpha*, *TNF-R1*, *TNF-R2*, *MMP-9*, *SURVIVIN* i *TP-53*) može da se pokaže kao faktor rizika (ili alternativno kao protektivni faktor) u patogenezi bazocelularnog karcinoma.

**3.PACIJENTI,
MATERIJAL I METODE**

Ova studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Stomatološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.1. PACIJENTI I BIOLOŠKI MATERIJAL

U eksperimentalnom radu korišćena je DNK izolovana iz krvi ili briseva bukalne sluzokože zdravih osoba (kontrolna grupa) i genomska DNK pacijenata lečenih na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, izolovana iz tkiva histološki negativnih margina nakon hirurškog odstranjivanja bazocelularnog karcinoma kože glave i vrata.

Molekulano genetičko istraživanje je izvršeno u Laboratoriji za Genetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Grupa pacijenata je obuhvatala 36 muškaraca i 44 žene, starosti od 33 do 90, prosečna starost 69.89 godina, medijana 71 godina. Specijalista patologije je obavio disekciju tumorskog tkiva i izvršio TMN klasifikaciju. Kontrolnu grupu činilo je 80 zdravih osoba, dobrovoljnih davaoca krvi, koji i prema polu i starosti odgovaraju grupi ispitanika.

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi

Genomska DNK je izolovana iz limfocita periferne krvi zdravih osoba, pripadnika kontrolne grupe metodom čija je osnovna karakteristika hemijska liza ćelije i provođenje DNK u vodenu fazu kao i hemijsko uklanjanje proteina i RNK molekula iz izolata. Mnogobrojni koraci centrifugiranja imaju za svrhu odstranjivanje membrane liziranih ćelija krvi i membrane jedara razbijenih leukocita. Tretman smeše različitim jonskim deterdžentima, kao što je SDS, ima dvojaku ulogu:

- a) omogućava da se izvrši denaturacija proteina, tj. da se DNK oslobodi iz nukleoproteinskog kompleksa i
- b) da se inaktivira enzim DNK-aza (denaturacijom enzima), tako da se izolacija može vršiti na sobnoj temperaturi.

Celokupan metodološki proces izolacije DNK iz limfocita periferne krvi, po danima, je opisan u tekstu koji sledi.

Prvi dan

Uzorak od 5mL venske krvi sa antikoagulansima (Na-citrat,EDTA) se pomeša istom količinom pufera za lizu 15 do 20 min na +4°C. Dobro se resuspenduje i drži 10 -15 min na ledu.

Uzorak se potom centrifugira 15 min na 2000 obrtaja (2000kpm), nakon čega se supernatant odbacuje, a talog se resuspenduje u 5mL fizio-pufera (fiziološkog rastvora).

Uzorak se potom centrifugira 15 min na 2000 obrtaja, a ovaj postupak "ispiranja" se ponavlja 2 - 3 puta dok talog ne pobeli.

Nakon poslednjeg ispiranja supernatant se odbaci, a talog se rastvori u 3mL pufera A, pa se doda 200 µL 10% SDS (Na-dodecilsulfat) i 20 µL proteinaze K (finalne koncentracije 200µg/mL).

Uzorak se dobro resuspenduje i inkubira preko noći na 37°C u termostatu.

Drugi dan

Sledećeg dana dodaje se 1mL 6M NaCl (saturisanog) i dobro promućka 15 sec. Ovo finalno dodavanje NaCl ima za posledicu povećanje rastvorljivosti DNK. Precipitirani denaturisani proteini se talože centrifugiranjem na 3000 rpm 15 min.

Supernatant, u kome se nalazi rastvorena DNK, se prenosi u čiste epruvete i centrifugira 15 min na 3000 rpm.

Supernatant se preliva u graduisanu epruvetu, a zatim se dodaje isit volumen izopropanola, koji omogućava precipitaciju molekula DNK.

Pažljivim mućkanjem izdvaja se DNK u vidu beličastog končića.

Končić se hvata Pasterovom pipetom i potapa 30 sec u 70% etanol da bi se uklonio višak soli.

DNK se suši na vazduhu 30 sec i zatim se rastvara u 100 µL TE-pufera ili redestilovane vode, zatim se koncentracija DNK određuje spektrofotometrijski na talasnoj dužini 260/280 nm.

Pufer za lizu:

- 0,32M SAHAROZA
- 10 mM TRIS HCl, pH 7.5
- 1% TRITON x 100
- 5 mM MgCl₂

Autoklavirati i čuvati na +4°C

Pufer A:

- 10 mM TRIS HCl, pH8
- 400ml NaCl
- 2 mM EDTA

Fiziološki pufer:

- 0.075 M NaCl
- 0.025 M EDTA, pH 8

TE pufer:

- 10 mM TRIS HCl
- 1 mM EDTA

3.2.2. Izolacija DNK iz tumorskog tkiva

Iz tumorskog tkiva pacijenata sa dijagnostikovanim BCK-om, DNK je izolovana metodom koja je detaljnije opisana u narednom tekstu.

Tumorsko tkivo macerirati i dodati 500 µL NE pufera.

Uzorak se potom centrifugira 2 min na 13 000 obrtaja, nakon čega se supernatant odbacuje i dodaje se 500 µL NE pufera, 10 µL 10% SDS (Nadodecilsulfat) i 20 µL proteinaze K (konc. 10 mg/mL). Zatim sledi šejkiranje, a onda i inkubacija 24h na 50 °C u termostatu.

Nakon isparavanja etanola ćelijski materijal tretiran je digestivnim TNE puferom sa proteinazom K u finalnoj koncentraciji 200µg/mL i SDS u finalnoj koncentraciji 1%. Ćelijski talog je preko noći inkubiran na 37°C. Ovim postupkom se razbijaju ćelijske i jedarne membrane.

Tretman fenol/hloroform/izoamil alkoholom ekstrahuje i prevodi DNK, 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 određena je spektrofotometrijski.

NE pufer:

- 150 mM NaCl
- 25 mM EDTA

TNE pufer:

- 100 mM NaCl
- 10 mM TRIS HCl pH 8.0
- 25 mM EDTA

3.2.3. Određivanje koncentracije DNK u uzorku

Na spektrofotometru (Gene Quant, Pharmacia LKB, Švedska) su merene apsorbanca na 260 i 280 nm. Koncentracije DNK su izračunate po formuli:

$$c (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (A_{260} \times R \times F \times OP) / 1\ 000,$$

gde je A_{260} - apsorbanca uzorka na 260 nm, R - razblaženje ($R=100$, 5 µL uzorka rastvoreno sa 495 µL sterilne redestilovane vode), F - faktor konverzije za dvolančanu DNK, ($F=50$), a OP - optički put svetlosti ($OP=1$ cm). Određen je odnos apsorbanca $R=A_{260}/A_{280}$, gde je na osnovu odnosa apsorbanca na 260nm i 280 nm određivana čistoća uzorka, odnosno kontaminacija proteinima.

3.2.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR metoda)

Lančana reakcija polimeraze (*eng. Polymerase Chain Reaction, PCR*) je *in vitro* amplifikacija definisane DNK sekvence i predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije. Sinteza DNK je katalizovana termostabilnom *Taq* DNK polimerazom. Ponavljanje ciklusa, od kojih se svaki sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane termostabilne DNK polimeraze, rezultuje u eksponencijalnoj amplifikaciji specifičnog DNK fragmenta.

PCR se izvodi u mikrotubi zapremine 25 μ L, gde se u PCR aparatima podvrgava preciznim, cikličnim promenama temperature. Reakcija se odvija u 35 ponovljenih ciklusa DNK sinteze.

3.2.4.1. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za TNF-alpha

Za PCR reakciju korišćeni su prajmeri čije su sekvence prikazane u *Tabeli 6*, proizvođača „Metabion“, kao i uslovi pod kojima se odvijala PCR reakcija.

Tabela 6: Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije za TNF alpha

Gen	Sekvence prajmera			Veličina PCR produkta
TNF alpha	Fw: 5'- AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT -3'			117 bp
	Rv: 5'- ACA CTC CCC ATC CTCCT GCT -3'			
35 CIKLUSA				
Inicijalna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna ekstenzija
3 minuta	1 minut	1 minut	1 minut	7 minuta
94 ° C	94 ° C	59° C	72 ° C	72 ° C

Reakcionu smešu u ukupnoj zapremini od 25 µL su činile sledeće komponente prikazane u *Tabeli 7*:

Tabela 7: Reakciona smeša za PCR reakciju TNF alpha

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

3.2.4.2. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za TNF-R1

Za PCR reakciju korišćeni su prajmeri čije su sekvence prikazane u *Tabeli 8*, proizvođača „Metabion“, kao i uslovi pod kojima se odvijala PCR reakcija.

Tabela 8: Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije za TNF-R1

Gen	Sekvence prajmera			Veličina PCR produkta
TNF R1	Fw: 5'-GAC CCC AAA TGG GGG AGT GAG AGG -3'			183 bp
	Rv: 5'- ACC AGG CCC GGG CAG GAG AG - 3'			
35 CIKLUSA				
Inicijalna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna ekstenzija
3 minuta	1 minut	1 minut	1 minut	7 minuta
95 ° C	94 ° C	65° C	72 ° C	72 ° C

Reakcionu smešu u ukupnoj zapremini od 25 µL su činile sledeće komponente prikazane u *Tabeli 9*:

Tabela 9: Reakciona smeša za PCR reakciju TNF-R1

MgCl ₂ (25 mM)	0,5 µL
10 x PCR pufer	2,5 µL
dNTP (10mM)	0,5 µL
prajmer F	0,15 µL
prajmer R	0,15 µL
ddH ₂ O	20,1 µL
Taq polimeraza	0,1 µL
DNK uzorak (c = 200 µg/ µL)	1 µL

3.2.4.3. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za TNF-R2

Za PCR reakciju korišćeni su prajmeri čije su sekvence prikazane u *Tabeli 10*, proizvođača „Metabion“, kao i uslovi pod kojima se odvijala PCR reakcija.

Tabela 10: Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije za TNF-R2

Gen	Sekvence prajmera			Veličina PCR produkta
TNF R2	Fw: 5'- TTC TGG AGT TGG CTG CGT GT - 3'			242 bp
	Rv: 5'- ACT CTC CTA TCC TGC CTG CT -3'			
35 CIKLUSA				
Inicijalna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna ekstenzija
3 minuta	1 minut	1 minut	1 minut	7 minuta
95 ° C	94 ° C	58° C	72 ° C	72 ° C

Reakcionu smešu u ukupnoj zapremini od 25 µL su činile sledeće komponente prikazane u *Tabeli 11*:

Tabela 11: Reakciona smeša za PCR reakciju TNF-R2

MgCl ₂ (25 mM)	3,5 µL
10 x PCR pufer	2,5 µL
dNTP (10mM)	1,0 µL
prajmer F	0,25 µL
prajmer R	0,25 µL
ddH ₂ O	16,3 µL
Taq polimeraza	0,15 µL
DNK uzorak (c = 200 µg/ µL)	1 µL

3.2.4.4. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za MMP-9

Za PCR reakciju korišćeni su prajmeri čije su sekvence prikazane u *Tabeli 12*, proizvođača „Metabion“, kao i uslovi pod kojima se odvijala PCR reakcija.

Tabela 12: Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije za MMP 9

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

Reakcionu smešu u ukupnoj zapremini od 25 µL su činile sledeće komponente prikazane u *Tabeli 13*:

Tabela 13: Reakciona smeša za PCR reakciju MMP-9

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

3.2.4.5. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za survivin

Za PCR reakciju korišćeni su prajmeri čije su sekvence prikazane u *Tabeli 14*, proizvođača „Metabion“, kao i uslovi pod kojima se odvijala PCR reakcija.

Tabela 14: Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije za SURVIVIN

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

Reakcionu smešu u ukupnoj zapremini od 25 µL su činile sledeće komponente prikazane u *Tabeli 15*:

Tabela 15: Reakciona smeša za PCR reakciju SURVIVINA

MgCl₂ (25 mM)	3,0 µL
10 x PCR pufer	2,5 µL
dNTP (10mM)	0,5 µL
prajmer F	0,2 µL
prajmer R	0,2 µL
ddH₂O	16,6 µL
Taq polimeraza	0,2 µL
DNK uzorak (c = 200 µg/ µL)	2 µL

3.2.4.6. PCR reakcija u analizi polimorfizma TP53 gena

Za PCR reakciju korišćeni su prajmeri čije su sekvence prikazane u *Tabeli 16*, proizvođača „Metabion“, kao i uslovi pod kojima se odvijala PCR reakcija.

Tabela 16: Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije za TP 53

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

Reakcionu smešu u ukupnoj zapremini od 25 µL su činile sledeće komponente prikazane u *Tabeli 17*:

Tabela 17: Reakciona smeša za PCR reakciju TP 53

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

3.2.5. Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)

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

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

Tabela 18: 8% poliakrilamidni gel

ddH₂O	3,6 mL
5 x TBE	1,2 mL
Akrilamid / Bis-akrilamid 40 %	1,2 mL
APS 10%	42 µL
TEMED	7,8 µL

Elektroforeza je vršena na 8% gel u 1xTBE puferu, pri konstantnom naponu struje od 220 V u trajanju od 60 minuta.

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

3.2.6. Restrikciona digestija PCR produkata i analiza dužine restrikcionihi fragmenata (RFLP)

Restrikciona analiza zasniva se na korišćenju restrikcionihi endonukleaza, koje imaju sposobnost da prepoznaju specifične sekvence na dsDNK, dužine 4-6 bp, i da iseku DNK molekul u okviru ili veoma blizu tih specifičnih sekvenci.

Restrikciona analiza ima primenu u detekciji RFLP-ova, odnosno polimorfizama restrikcionihi mesta, kao genetičkih markera u genealoškim istraživanjima. Ovi polimorfizmi javljaju se zbog razlika među individuama u broju restrikcionihi mesta u okviru ispitivanog DNK fragmenta. Savremeni pristup u restrikcionoju analizi podrazumeva:

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

Prisustvo ili odsustvo restrikcionog mesta je signal za prisustvo ili odsustvo mutacije. Prednost ove metode je u njenoju jednostavnosti, dostupnosti i mogućnosti da se analizira veći broj uzoraka.

3.2.6.1. RFLP u analizi polimorfizma gena za TNF alpha -308 G/A

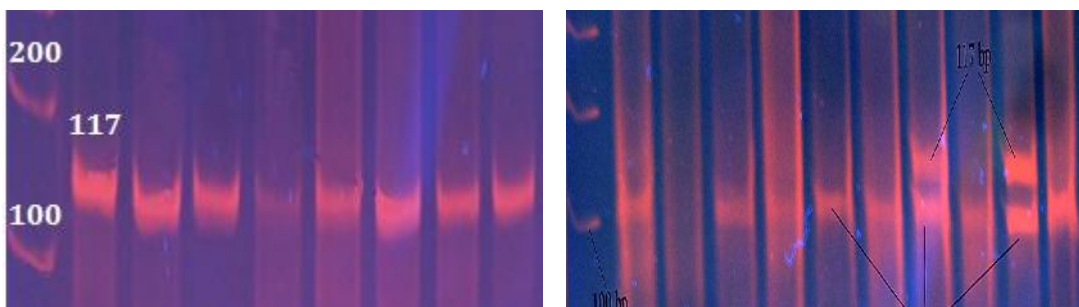
Restrikcija PCR produkata dužine 117bp vršena restrikcionim enzimom **Nco I** (Fermentas). Enzim prepoznaje specifičnu sekvencu **5'...C ↓ CATG G...3'**. U slučaju odsustva mutacije, enzim prepoznaje navedeni niz nukleotida i iseca PCR produkt čime ga deli na dva fragmenta: od 97bp i 20bp. Restrikcija enzimom **Nco I** se odvija u restrikcionoju smeši prikazanoju u *Tabeli 19*. Inkubacija se odvija preko noći na temperaturi od 37°C.

Tabela 19: Komponente smeše za digestiju TNF-alpha i njihove zapremine

Komponente smeše:	Zapremina (ukupno 20,2 μ L):
Voda	5 μL
Pufer	2 μL
Enzim Nco I	0,2 μL
PCR amplifikat	13 μL

Analiza produkata digestije vršena je elektroforezom na 8% PAA gelu. U okviru amplifikovanog fragmenta postoji jedno restrikciono mesto za enzim Nco I, a mutacija G/A ukida restrikciono mesto, genotipovi obolelih i zdravih osoba mogu biti (Slika 27):

- Homozigoti bez mutacije - divlji tip (*eng.wild type*, WT) (genotipa G/G) poseduju dva fragmenta dužine 97bp i 20bp;
- Heterozigoti (HT) za mutaciju (genotipa G/A) poseduju tri fragmenta dužine 117bp, 97bp i 20bp;
- Homozigoti za mutaciju (MUT - genotipa A/A) poseduju jedan fragment, dužine 117bp.



Slika 27: Prikaz PCR produkata (levo) i digestije (desno) na PAA gelu za TNF alpha

S obzirom da je fragment od 20bp mali i samim tim brzo putuje kroz gel, nakon sat vremena odvijanja elektroforeze neće se vizuelizovati na gelu. Ipak, ovo ne predstavlja problem, s obzirom da postojanje traka od 117bp i 97bp svakako uslovljava postojanje i trake od 20bp.

3.2.6.2. RFLP u analizi polimorfizma TNF-R1 gena za +36 A/G

Restrikcija PCR produkata dužine 183bp vršena restrikcionim enzimom **MspA1I**. Enzim prepoznaje specifičnu sekvencu **5'...CACG↓ CGTG...3'**. U slučaju prisustva mutacije, za razliku od prethodnog polimorfizma, enzim prepoznaje navedeni niz nukleotida i iseca PCR produkt čime ga deli na dva fragmenta: od 108bp i 75bp. Restrikcija enzimom MspA 1I se odvija u restrikcionoj smeši prikazanoj u *Tabeli 20*. Inkubacija traje 3 sata na temperature od 37°C.

Tabela 20: Komponente smeše za digestiju TNF-R1 i njihove zapremine

Komponente smeše:	Zapremina (ukupno 20,4 µL):
Voda	5 µL
Multicor Pufer	2 µL
BSA	0,2 µL
Enzim MspA 1I	0,2 µL
PCR amplifikat	13 µL

Analiza produkata digestije vršena je elektroforezom na 8% PAA gelu. Ovde je situacija drugačija od prethodnog polimorfizma. Prisustvo mutacije A/G dovodi do isecanja PCR produkta, pa genotipovi obolelih i zdravih osoba mogu biti:

- Homozigoti bez mutacije - WT, (genotipa G/G) poseduju jedan fragment dužine 183bp;
- Heterozigoti (HT) za mutaciju (genotipa A/G) poseduju tri fragmenta dužine 183bp, 108bp i 75bp;
- Homozigoti za mutaciju (MUT - genotipa A/A) poseduju dva fragmenta dužine 108bp i 75bp.

3.2.6.3. RFLP u analizi polimorfizma TNF-R2 gena za +676 T/G

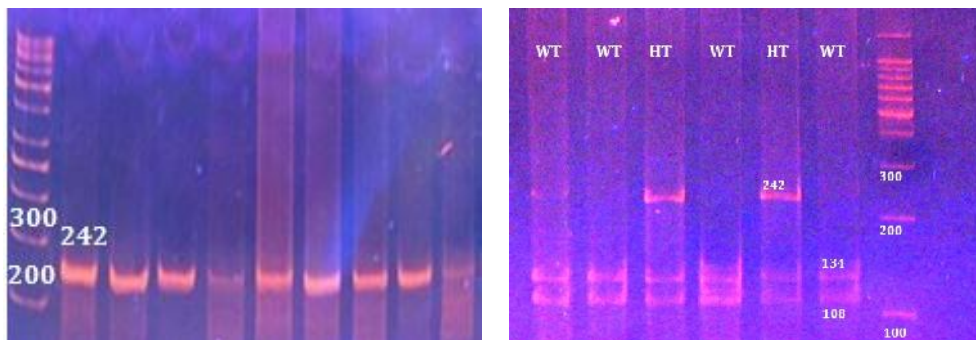
Restrikcija PCR produkata dužine 242bp vršena restrikcionim enzimom **Hin 1II**. Enzim prepoznaje specifičnu sekvencu **5'...CATG↓...3'**. Restrikcija enzimom Hin 1II se odvija u restrikcionalnoj smeši prikazanoj u *Tabeli 21*. Reakcija inkubacije traje 12 sati na temperature od 37°C.

Tabela 21: Komponente smeše za digestiju TNF-R2 i njihove zapremine

Komponente smeše:	Zapremina (ukupno 20,3 µL):
Voda	3 µL
Pufer	2 µL
Enzim Hin 1II	0,3 µL
PCR amplifikat	15 µL

Analiza produkata digestije vršena je elektroforezom na 8% PAA gelu. Kod ovog polimorfizma prisustvo mutacije T/G ukida restrikciono mesto, pa genotipovi mogu biti (*Slika 28*):

- Homozigoti bez mutacije - wild type (WT) (genotipa T/T) poseduju dva fragmenta dužine 134bp i 108bp;
- Heterozigoti (HT) za mutaciju (genotipa T/G) poseduju tri fragmenta, dužine 242bp, 134bp i 108bp;
- Homozigoti za mutaciju (MUT - genotipa G/G) poseduju jedan fragment dužine 242bp.



Slika 28: Prikaz PCR produkata (levo) i digestije (desno) na PAA gelu za TNF-R2

3.2.6.4. RFLP u analizi polimorfizma MMP-9 gena za -1562 C/T

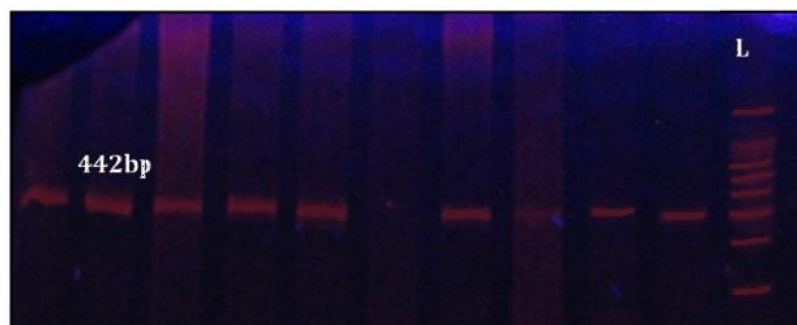
Restrikcija PCR produkata je vršena restrikcionim enzimom **Sph I**. Enzim prepoznaje niz nukleotida 5'... GCATG ↓ C...3' i u slučaju postojanja mutacije vrši zasecanje DNK lanca na mestu T, čime PCR produkt veličine 442bp deli na dva fragmenta: od 264bp i 178bp (*Slika 29*). Restrikcija enzimom Sph I se odvija u restrikcionoj smeši koja sadrži:

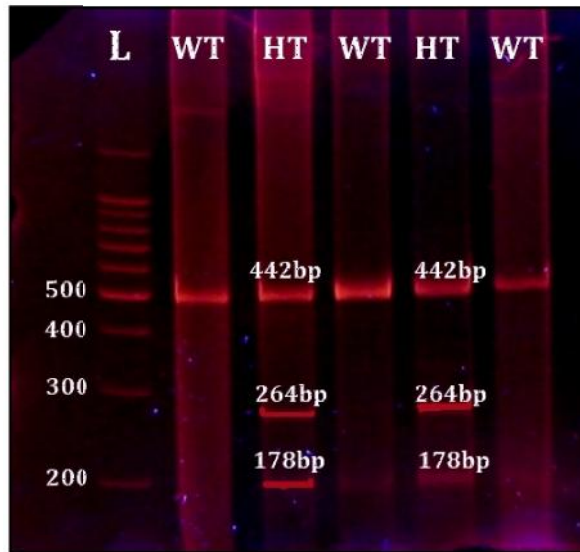
Tabela 22: Komponente smeše za digestiju MMP-9 i njihove zapremine

Komponente smeše:	Zapremina (18 µL):
Voda	4,5 µL
Pufer	2 µL
Enzim Hin 1II	1,5 µL
PCR amplifikat	10 µL

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

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





Slika 29: Prikaz PCR produkata (gore) i digestije (dole) na PAA gelu za MMP-9

3.2.6.5. RFLP u analizi polimorfizma gena za SURVIVIN za -31 G/C

Restrikcija PCR produkata dužine 151bp vršena restrikcionim enzimom **Msp I** (Fermentas). Enzim prepoznaje specifičnu sekvencu 5'... C ↓ CG G...3', i vrši zasecanje DNK lanca na mestu C. U slučaju odsustva mutacije, enzim prepoznaje navedeni niz nukleotida i iseca PCR produkt čime ga deli na dva fragmenta: od 90bp i 61bp. Restrikcija enzimom Msp I se odvija u restrikcionoj smeši prikazanoj u *Tabeli 23*.

Tabela 23: Komponente smeše za digestiju SURVIVINA i njihove zapremine

Komponente smeše:	Zapremina (ukupno 20 µL):
Voda	6 µL
Pufer	2 µL
Enzim MspI	1 µL
PCR amplifikat	11 µL

Analiza produkata digestije vršena je elektroforezom na 8% PAA gelu. Pošto u okviru amplifikovanog fragmenta postoji jedno restrikciono mesto za enzim

MspI, a mutacija -31 G/C ukida restrikciono mesto, genotipovi obolelih i zdravih osoba mogu biti (Slika 30):

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



Slika 30: Prikaz PCR produkata (gore) i digestije (dole) na PAA gelu za SURVIVIN

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

Restrikcija PCR produkata je vršena restrikcionim enzimom **Msp I** (Fermentas). U okviru amplifikovanog fragmenta postoji jedno restrikciono mesto za enzim Msp I, kod *wt* alela dolazi do sečenja u okviru datog restrikcionog mesta i PCR produkt se deli na dva fragmenta od 156/140bp i 45bp. Mutacija C/T u okviru restrikcionog mesta ukida dato restrikciono mesto i stoga ne dolazi do

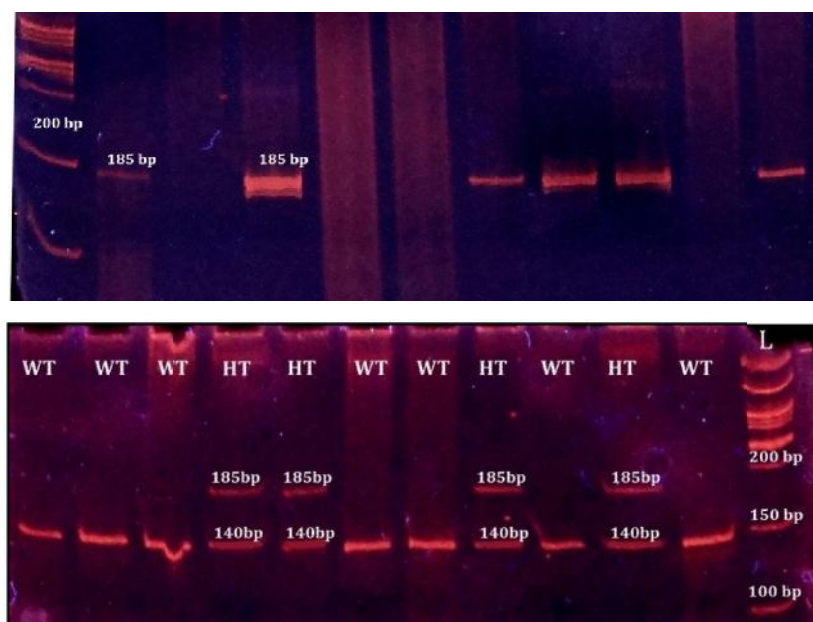
sečenja. Razlike u dužini dužeg fragmenta su posledica mogućeg prisustva insercije od 16bp, pri čemu originalna sekvenca od 185bp posle sečenja daje fragment od 140bp, a usled prisustva polimorfizma PIN3 Ins16bp uočava se dužina fragmenta od 156 bp.

Tabela 24: Komponente smeše za digestiju TP53 i njihove zapremine

Komponente smeše:	Zapremina (ukupno 20 μ L):
Voda	7,5 μ L
Pufer	2 μ L
Enzim MspI	0,5 μ L
PCR amplifikat	10 μ L

Inkubacija restrikcione smeše je trajala 3 sata na 37°C. Analiza produkata digestije je usledila nakon elektroforeze u 8% PAA gelu (Slika 31). Mogući genotipovi zdravih i obolelih osoba su :

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



Slika 31: Prikaz PCR produkata (gore) i digestije (dole) na PAA gelu za TP53

Insercioni polimorfizam TP 53 gena

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

3.2.7. Statistička analiza

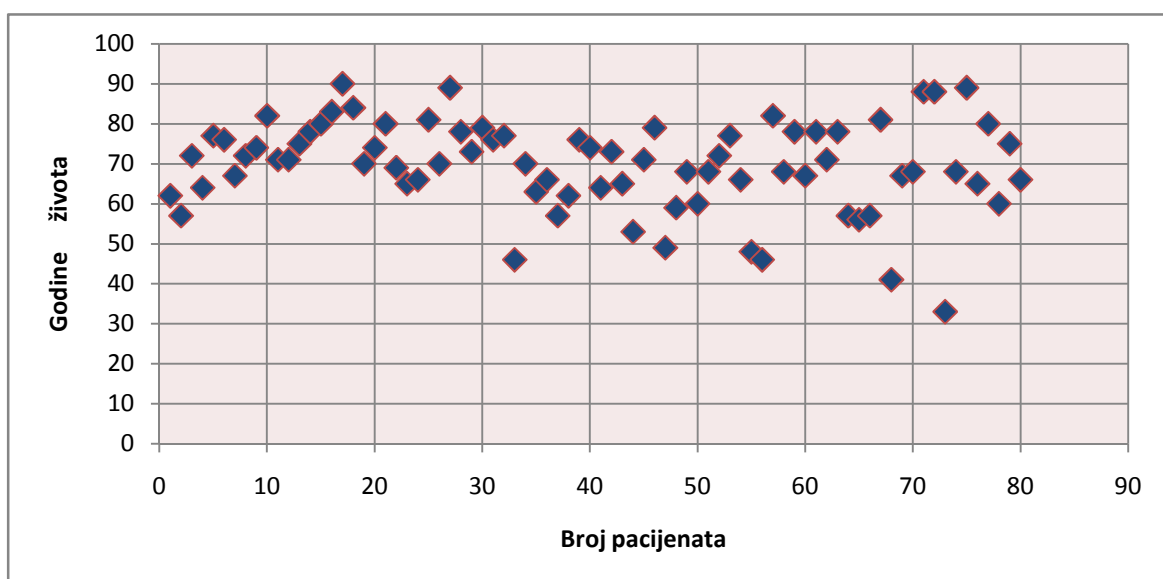
Statistička obrada podataka urađena je uz pomoć nekoliko testova: Hi kvadrat (χ^2) test za utvrđivanje razlika u distribuciji učestalosti različitih alela i genotipova u grupama obolelih od bazocelularnog karcinoma i kontrolnoj grupi. Fišerovim testom egzaktne verovatnoće (*eng. Fisher Exact Probability Test*) su testirane razlike u slučaju da se radi o uzorku manjem od 5. Logističkom regresionom analizom računat je odnos verovatnoća (*eng. Odds Ratio*) za utvrđivanje rizika oboljevanja od bazocelularnog karcinoma, sa intervalom poverenja (*eng. Confidence Interval, CI*) od 95%. Sve vrednosti p smatrale su se statistički značajnim ako su bile manje od 0.05. Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim programom SPSS (verzija 13.0, IBM SPSS Inc.).

4. REZULTATI

Poglavlje rezultati je podeljeno u 4 dela. U prva tri dela su detaljnije predstavljene karakteristike grupe pacijenata sa dijagnostifikovanim BCK-om: prema starosti (4.1.), lokaciji tumora (4.2.) i veličini tumora (4.3.). Poslednje, četvrto poglavlje (4.4.) obuhvata analizu genetičkih rezultata, odnosno povezanosti ispitivanih polimorfizama sa razvojem bazocelularnog karcinoma.

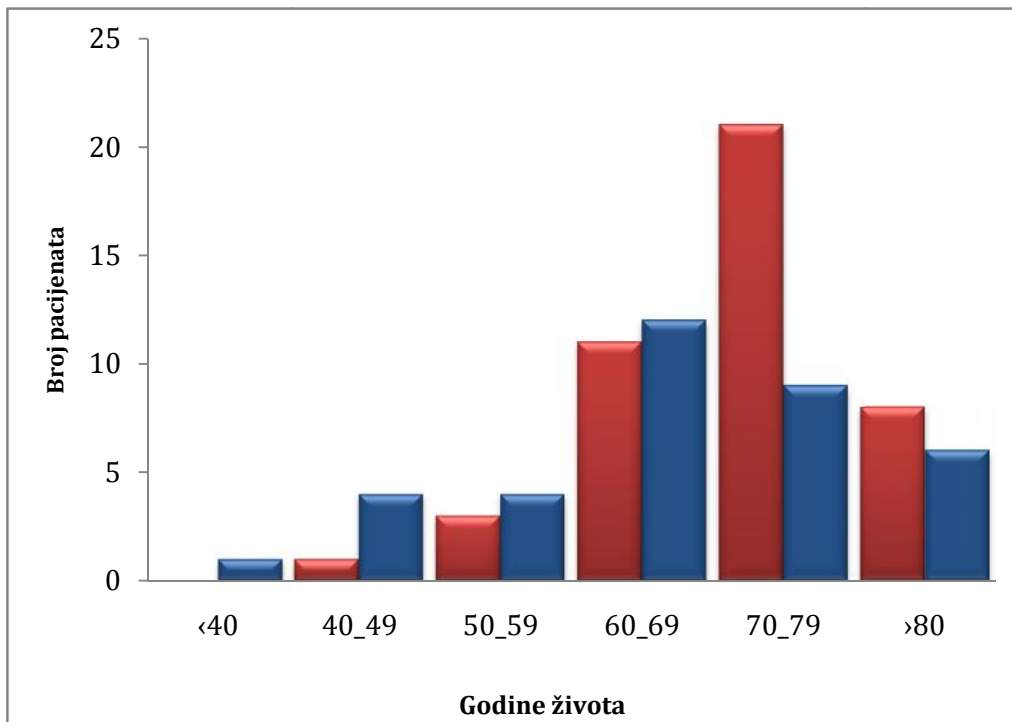
4.1. Distribucija pacijenata prema godinama starosti

Analizom je obuhvaćeno 160 ispitanika, od toga 80 pacijenata obolelih od bazocelularnog karcinoma lečenih na klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kontrolnu grupu činilo je 80 zdravih osoba, dobrovoljnih davaoca krvi, koji i prema polu i starosti odgovaraju grupi ispitanika. Grupa pacijenata je obuhvatala muškarace i žene, starosti od 33 do 90, prosečna starost 69.89 godina, medijana 71 godina (Slika 32). Prema podacima u literaturi, 5-15% obolelih su između 20 i 40 godina, dok je čak 70% starosti do 70 godina. U odnosu na navedene podatke možemo reći da naša studija ima svega 1.25% obolelih između 20 i 40 godina, a najveći broj pacijenata su stariji od 60 godina (84%), sa maksimumom na kategoriji između 70 i 79 godina (Slika 33). Naši rezultati potvrđuju da je BCK češći u starijem delu populacije i da se incidenca njegovog nastanka povećava sa godinama.



Slika 32: Prikaz odnosa broja pacijenata sa BCK-om u odnosu na godine života

Grupu pacijenata sa bazocelularnim karcinomom činilo je 36 muškarca i 44 žene, pri čemu je odnos među polovima M:Ž=1:1.2. Ranije je pomenuto da je incidenca oboljevanja od BCK-a veća u muškoj populaciji, ako se posmatraju svi delovi tela. U našem uzorku žene su neznatno brojnije (*Slika 33*), ali je naša analiza obuhvatila samo BCK regiona glave i vrata, gde je odnos polova oko 1:1, što znači da se naša populacija uklapa u svetske podatke.



Slika 33: Prikaz odnosa broja pacijenata sa BCK-om u odnosu na godine života i pol

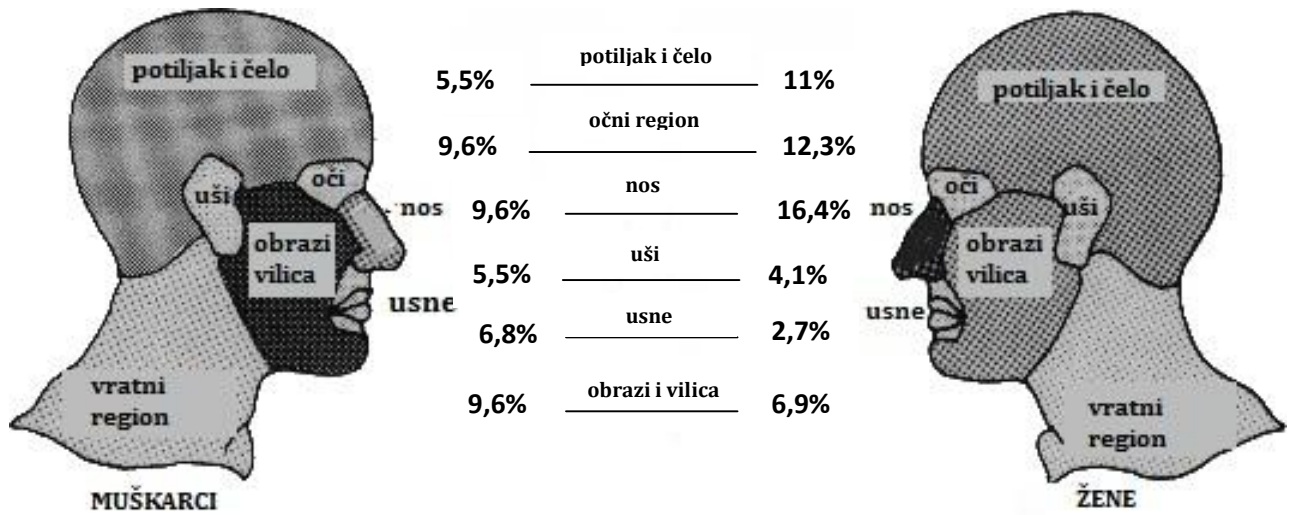
4.2. Lokacija tumora

U *Tabeli 25* su prikazane lokacije bazocelularnog karcinoma u regionu glave sa njihovim procentualnim zastupljenostima, dok *Slika 34* prikazuje njihovu zastupljenost u odnosu na pol. Većina bazocelularnih karcinoma je locirana u samom središtu lica. Najveći procenat obuhvata region nosa, čak 26%, što se u potpunosti poklapa sa podacima iz literature, s obzirom da je to najistureniji deo

glave. Takođe, treba napomenuti da je nešto veća zastupljenost na ovoj lokaciji kod ženskog pola. Odmah za njim sledi očni region (21,9%). Razlika među polovima je manja nego u regionu nosa, dok je na svim ostalim delovima lica bazocelularni karcinom ravnomerno raspoređen u odnosu na polove (Slika 34).

Tabela 25: Procentualna zastupljenost bazocelularnog karcinoma u regionu glave i vrata

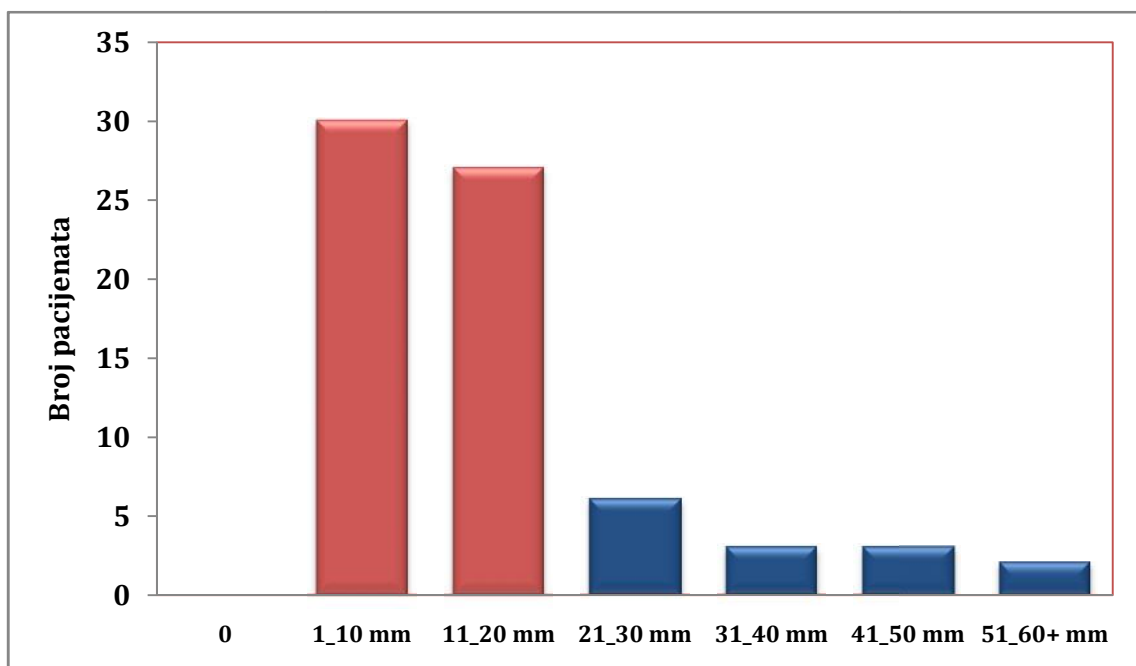
Red.br.	Lokacija tumora	%
1	Occipitalis (potiljak)	2,7
2	Frontalis (čelo)	8,2
3	Frontotemporalis (spoj čela i slepoočnice)	1,4
4	Temporalis (slepoočnica)	4,1
5	Dorsi nasi (koren nosa)	16,4
6	Alae nasi (nosno krilce)	9,6
7	Canthi medialis (unut.ugao oka)	5,5
8	Palpebrae inferioris (donji očni kapak)	2,7
9	Orbitae (očne duplje)	1,4
10	Infraorbitalis (ispod očne duplje)	10,9
11	Lateroorbitalis (spolj.strana očne duplje)	1,4
12	Zygomatica (jagodice)	5,5
13	Buccae (obrazi)	9,6
14	Sulci nasolabialis (od nozdrva do usana)	2,7
15	Labi oris superioris (gornja usna)	6,8
16	Arotidomasterica (od zgloba donje vilice do ugla donje vilice)	1,4
17	Preauricularis (pre ušne školjke)	5,5
18	Auriculae (uši)	4,1



Slika 34: Prikaz odnosa broja pacijenata sa BCK-om u odnosu na delove glave i lica

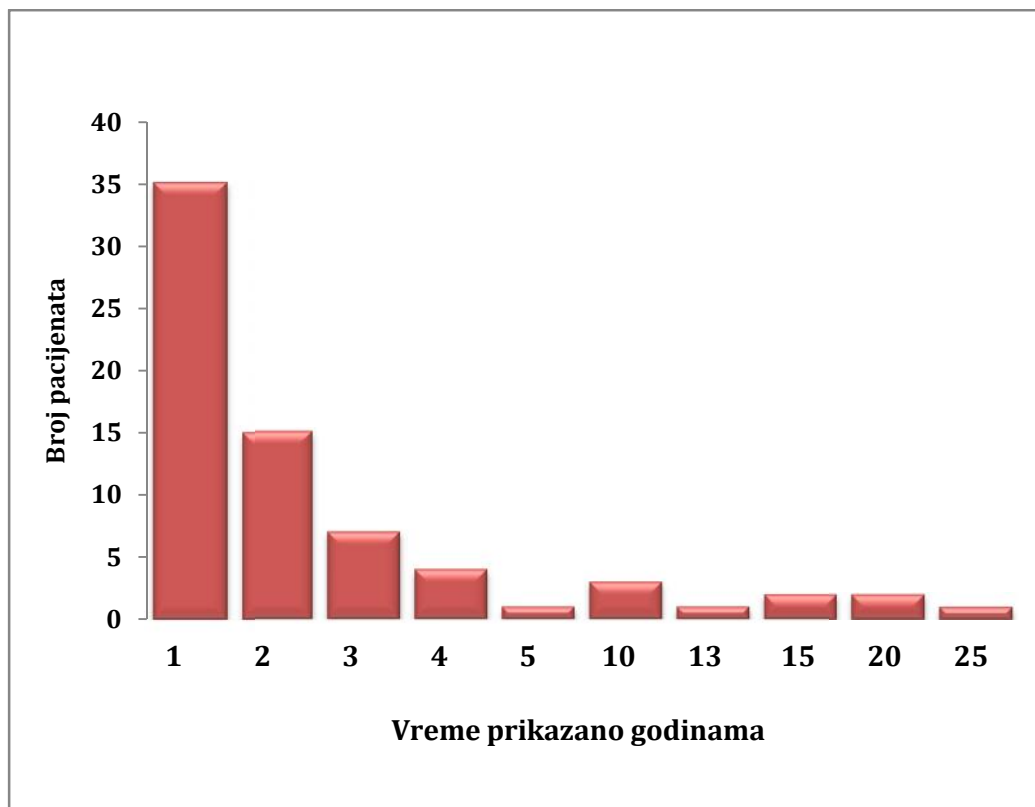
4.3. Veličina tumora i proteklo vreme od uočavanja prve promene

Veličina tumora iznosila je od 5 do 80mm. Većina tumora bila je manja od 10mm (42.25%), sledeći po zastupljenosti bili su tumori veličine 11-20mm (38.03%), a samo 19.72% tumora bilo je veće od 20mm i klasifikovano kao T2 prema TNM klasifikaciji predloženoj od strane American Joint Commite (Slika 35).



Slika 35: Prikaz odnosa broja pacijenata i veličine tumora (crvenom bojom označen tumor manji od 20mm, plavom veći od 20mm)

Kada analiziramo vreme koje je proteklo od kako je pacijent uočio prvu promenu na koži do trenutka operacije, opseg se kreće od minimalnih mesec dana do maksimalnih 25 godina. Najveći broj pacijenata, čak 49% su oni koji su reagovali odmah u prvoj godini nakon uočene prve promene na koži, a odmah za njima po zastupljenosti, su pacijenti koji su se javili lekaru tokom druge godine od trenutka uočavanja prve promene (21%). Važno je napomenuti da broj pacijenata koji su duže od 10 godina nosili promene na koži pre nego što su se obratili lekaru u našem uzorku iznosi svega oko 10% (Slika 36).



Slika 36: Prikaz odnosa broja pacijenata i proteklog vremena od uočavanja prve promene na koži do trenutka operacije

4.4. Analiza genetičkih rezultata

4.4.1. Analiza polimorfizma u genu za TNF-alpha

Distribucija učestalosti genotipova i alela, kao rezultat mutacije u promotorskom regionu gena za TNF-alpha na poziciji -308, odnosno supstitucije guanina u adenin, prikazani su u *Tabeli 26*.

Tabela 26: Distribucija učestalosti genotipova i alela u ispitivanim grupama u analizi polimorfizma gena za TNF-alpha

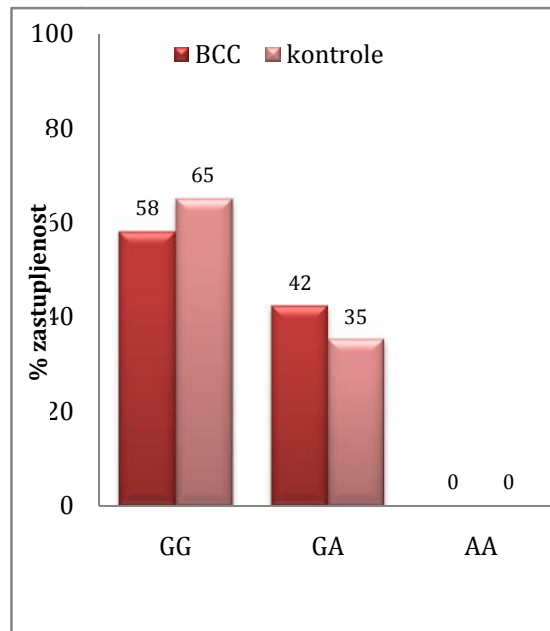
Gen/SNP	Genotip	BCK	K	χ^2	p
		N	N		
TNF alpha rs1800629	GG	29	39	0.57	0.452
	GA	21	21		
	AA	/	/		
	Aleli			0.62	0.512
	G	79	99		
	A	21	21		

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, χ^2 -hi-kvadrat vrednost, p-Pirsonov (Pearson's) koeficijent

U grupi obolelih od bazocelularnog karcinoma od ukupno 50 ispitanika 29 ima GG genotip (58%), GA genotip 21 ispitanik (42%), a nema ni jednog mutiranog homozigota. U kontrolnoj grupi od 60 ispitanika, 39 ima GG genotip (65%), 21 GA genotip (35%), a takođe izostaje mutirani homozigot (*Tabela 27, Slika 37*). Iz učestalosti genotipova slede učestalosti alela. *Wild type* alel G je zastupljen sa 79% u grupi ispitanika oboleloj od BCK-a, dok je u kontrolnoj grupi nešto veća i iznosi 82.5%, a mutirani alel je znatno manje zastupljen u obe ispitivane grupe, sa 21% i 17.5% redom.

Hi-kvadrat test je pokazao da nema statistički značajnih razlika ($p > 0.05$) u učestalostima ispitivanih alela i genotipova *gena za TNF alpha* između grupe pacijenata i kontrolne grupe (*Tabela 26*). Takođe, kada su testirane međusobno upoređene grupe odgovarajuće starosti, nije dobijena značajna razlika.

Rezultati prikazani u *Tabeli 27*, ukazuju da nosioci alela A imaju 25% (OR=1.25, 95%CI=0.64-2.46) veći rizik oboljevanja od BCK-a. Kod heterozigotnih osoba je taj rizik povećan na 34% (OR=1.34, 95%CI=0.62-2.91), dok mutirane homozigote nismo našli ni u jednoj od ispitivanih grupa. Nijedna vrednost nije statistički značajna (*Tabela 27*).



Slika 37: Procentualna zastupljenost genotipova u ispitivanim grupama

Tabela 27: Polimorfizam u genu za TNF-alpha i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - crude Odds Ratio

Gen/Genotip	BCK		K		Crude OR (95% CI)	p	
	N	%	N	%			
TNF alpha rs1800629	GG	29	58.0	39	65.0	1.00	Ref.
	GA	21	42.0	21	35.0	1.34 (0.62-2.91)	0.452
	AA	/	0.0	/	0.0	0.00 (0.00-0.00)	1.000
	GA+AA	21	42.0	21	35.0	1.34 (0.62-2.91)	0.452
Aleli							
G	79	79.0	99	82.5	1.00	Ref.	
A	21	21.0	21	17.5	1.25 (0.64-2.46)	0.512	

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća)

Ako u analizu uključimo podatke o ispitanicima vezane za njihove godine, pol, konzumiranje cigareta i alkohola i izračunamo tzv. *Adjusted OR* (Tabela 28), vidimo da heterozigoti GA genotipa imaju 1.51 puta veći rizik za oboljevanje od BCK-a u poređenju sa *wild type* homozigotima, GG genotipa.

Tabela 28: Polimorfizam u genu za *TNF-alpha* i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - *Adjusted Odds Ratio*

Gen/Genotip	BCK		K		Adjusted OR (95% CI)	p	
	N	%	N	%			
TNF alpha rs1800629	GG	29	58.0	39	65.0	1.00	Ref.
	GA	21	42.0	21	35.0	1.51 (0.66-3.45)	0.326
	AA	/	0.0	/	0.0	0.00 (0.00-0.00)	1.000
	GA+AA	21	42.0	21	35.0	1.51 (0.66-3.45)	0.326

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća)

4.4.2. Analiza polimorfizma u genu za *TNF-R1*

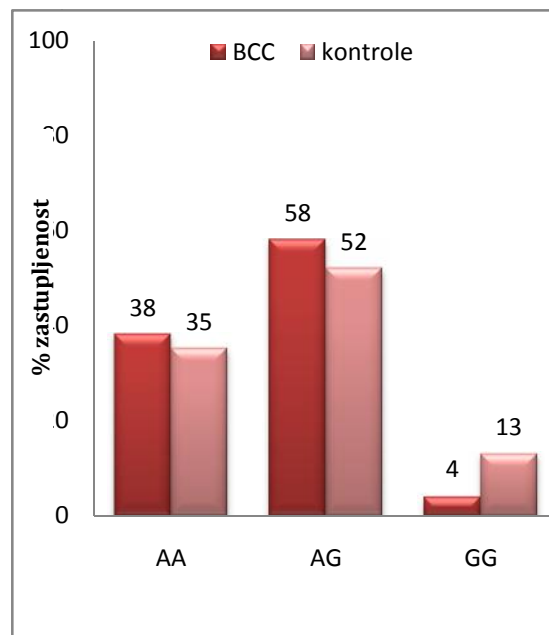
Tabela 29: Distribucija učestalosti genotipova i alela u ispitivanim grupama u analizi polimorfizma gena za *TNF-R1*

Gen/SNP	Genotip	BCK	K	χ^2	p	
		N	N			
TNF -R1 rs767455	AA	19	21	2.88	0.237	
	AG	29	31			
	GG	2	8			
	Aleli				0.65	0.343
	A	67	73			
	G	33	47			

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, χ^2 -hi-kvadrat vrednost, p-Pirsonov (Pearson's) koeficijent

U Tabeli 29 prikazane su učestalosti genotipova i alela u grupi ispitanika oboljelih od BCK-a i u kontrolnoj grupi, za polimorfizam u egzonu 1, na poziciji +36 gena za *TNF-R1*. Analiza učestalosti genotipova je pokazala da je u grupi

pacijenata najzastupljeniji AG genotip sa 58%, potom *wt* homozigot, AA sa 38%, a onda i mutirani homozigot, GG sa 4%. U kontrolnoj grupi redosled genotipova prema zastupljenosti je isti kao i u grupi pacijenata, sa vrednostima: AG genotip 51.6 %, AA genotip 35%, GG genotip sa 13.4%. Učestalost mutiranog homozigota je veća u kontrolnoj grupi, ali nema statistički značajne razlike (*Tabela 30, Slika 38*).



Slika 38: Procentualna zastupljenost genotipova u ispitivanim grupama

Na osnovu učestalosti genotipova izračunate su i učestalosti alela, A (*wild type*) i mutiranog G alela. Razlike u njihovim učestalostima u dve ispitivane grupe nisu statistički značajne ($\chi^2=0.65$, $p=0.343$), *Tabela 29*.

U cilju utvrđivanja postojanja asocijacije između određenog genotipa gena za TNF-R1 i rizika za razvoj BCK-a, računat je *Crude Odds Ratio* logističkom regresionom analizom (*Tabela 30*). Rezultati prikazani u *Tabeli 30* ukazuju da alel G ispoljava 1,3 puta manji rizik za oboljevanje od BCK-a u odnosu na alel A (OR=0.76, 95%CI=0.44-1.33), ali ta vrednost nije statistički značajna. Takođe, heterozigoti AG genotipa ne iskazuju rizik za nastanak BCK-a, dok mutirani homozigoti genotipa GG pokazuju čak 3.7 puta manji rizik za oboljevanje od BCK-a

(OR=0.27, 95%CI=0.05-1.47), *Tabela 30*. Međutim, kada u logističku regresionu analizu uključimo godine, pol i podatke vezane za konzumiranje alkohola i cigareta ispitanika, dobijamo *Adjusted OR* (*Tabela 31*), koji pokazuje da je rizik za oboljevanje od BCK-a 1.32 puta veći kod heterozigota AG genotipa u odnosu na AA genotip, dok se vrednost za GG genotip nije značajno promenila.

Tabela 30: Polimorfizam u genu za TNF-R1 i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - crude Odds Ratio

Gen/Genotip	BCK		K		Crude OR (95% CI)	p	
	N	%	N	%			
TNF-R1 rs767455	AA	19	38.0	21	35.0	1.00	Ref.
	AG	29	58.0	31	51.6	1.03 (0.46-2.30)	0.920
	GG	2	4.0	8	13.4	0.27 (0.05-1.47)	0.110*
	AG+GG	31	62.0	39	65.0	0.88 (0.40-1.91)	0.740
	Aleli						
A	67	67.0	73	60.8	1.00	Ref.	
G	33	33.0	47	39.2	0.76 (0.44-1.33)	0.343	

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća), *-Fisher Exact Probability Test

Tabela 31: Polimorfizam u genu za TNF-R1 i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - Adjusted Odds Ratio

Gen/Genotip	BCK		K		Adjusted OR (95% CI)	p	
	N	%	N	%			
TNF-R1 rs767455	AA	19	38.0	21	35.0	1.00	Ref.
	AG	29	58.0	31	51.6	1.32 (0.56-3.12)	0.526
	GG	2	4.0	8	13.4	0.28 (0.05-1.57)	0.149*
	AG+G	31	62.0	39	65.0	1.06 (0.46-2.42)	0.887
	G						

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća), *-Fisher Exact Probability Test

4.4.3. Analiza polimorfizma u genu za TNF-R2

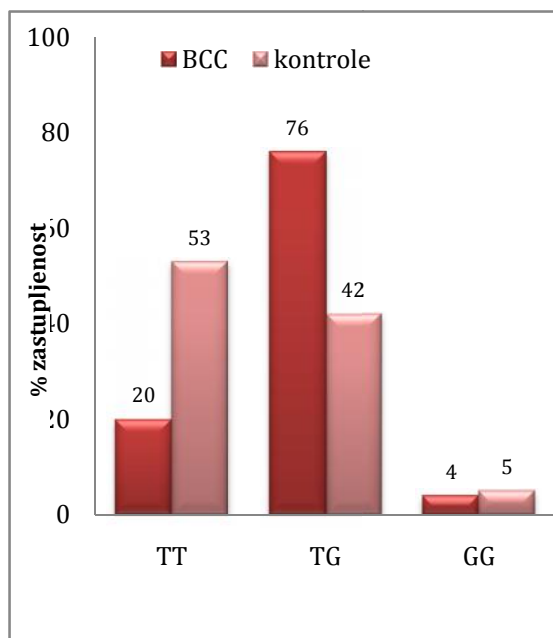
Analizom polimorfizama u egzonu 6, na poziciji +676 gena za TNF-R2 dobijene su distribucije učestalosti genotipova i alela, prikazane u *Tabeli 32*

Tabela 32: Distribucija učestalosti genotipova i alela u ispitivanim grupama u analizi polimorfizma gena za TNF-R2

Gen/SNP	Genotip	BCK	K	χ^2	p	
		N	N			
TNF-R2 rs1061622	TT	10	32	13.61	0.001*	
	TG	38	25			
	GG	2	3			
	Aleli				5.72	0.011*
	T	58	89			
	G	42	31			

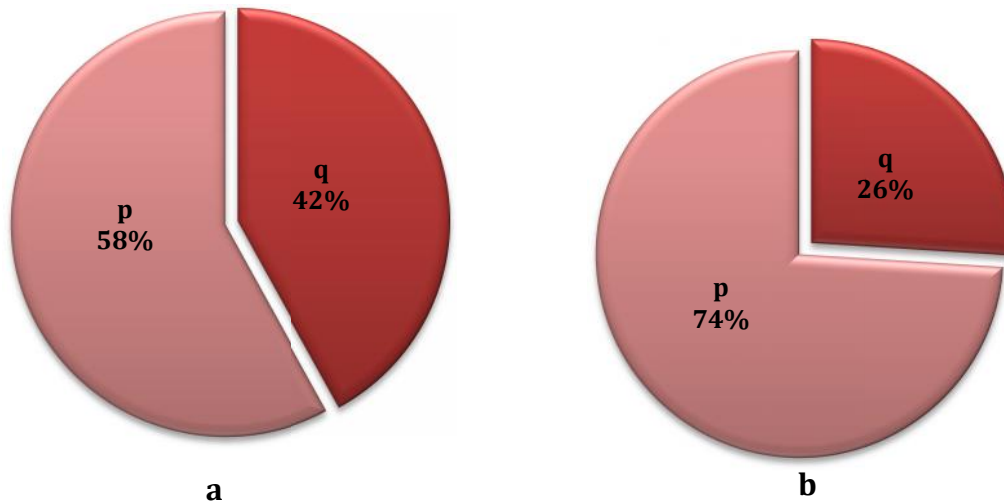
N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, χ^2 -hi-kvadrat vrednost, p-Pirsonov (Pearson's) koeficijent, * - statistička značajnost (p<0.05)

Najzastupljeniji genotip u grupi ispitanika obolelih od BCK-a je heterozigot, TG sa 76%, a za njim homozigot *wild type* sa 20% i na kraju mutirani homozigot,



Slika 39: Procentualna zastupljenost genotipova u ispitivanim grupama

GG 4%. U kontrolnoj grupi najzastupljeniji je *wt* homozigot sa 53.4%, zatim heterozigot sa 41.6%, a onda i GG genotip sa 5% (*Slika 39*). Iz ovih vrednosti izračunate su i učestalosti alela u obe analizirane grupe (*Tabela 32, Slika 40*). Hi-kvadrat testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u distribuciji učestalosti ispitivanih genotipova ($\chi^2=13.61$, $p=0.001$) i alela ($\chi^2=5.72$, $p=0.011$), *Tabela 32*, između grupe pacijenata sa bazocelularnim karcinomom i kontrolne grupe u genu za TNF-R2.



Slika 40: Procentualna zastupljenost alela TNF-R2 gena u grupi ispitanika i kontrolnoj grupi a) uzorci b) kontrole

Tabela 33: Polimorfizam u genu za TNF-R2 i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - crude Odds Ratio

Gen/Genotip	BCK		K		Crude OR (95% CI)	p	
	N	%	N	%			
TNF -R2 rs1061622	TT	10	20.0	32	53.4	1.00	Ref.
	TG	38	76.0	25	41.6	4.86 (2.03-11.62)	< 0.001**
	GG	2	4.0	3	5.0	2.13 (0.31-14.62)	0.379*
	TG+GG	40	80.0	28	46.6	4.57 (1.94-10.79)	< 0.001**
Aleli							
T	58	58.0	89	74.2	1.00	Ref.	
G	42	42.0	31	25.8	2.08 (1.17-3.67)	0.011**	

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća), * -Fisher Exact Probability Test, **-statistička značajnost (p<0.05)

Rezultati dati u Tabeli 33 pokazuju da alel G nosi čak 2.08 puta veći rizik za oboljevanje od BCK-a nego *wild type* alel T (OR=2.08, 95%CI=1.17-3.67) i ova vrednost je statistički značajna, p<0.05 i iznosi p=0.011. Najveći rizik za oboljevanje od BCK-a imaju heterozigotne osobe genotipa TG, čak 4.86 puta veći u poređenju sa *wild type* homozigotima TT (OR=4.86, 95%CI=2.03-11.62). Ova vrednost pokazuje statističku značajnost manju i od 0.01, Tabela 33.

Tabela 34: Polimorfizam u genu za *TNF-R2* i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - Adjusted Odds Ratio

Gen/Genotip	BCK		K		Adjusted OR (95% CI)	p	
	N	%	N	%			
TNF-R2 rs1061622	TT	10	20.0	32	53.4	1.00	Ref.
	TG	38	76.0	25	41.6	6.28 (2.43-16.25)	0.000**
	GG	2	4.0	3	5.0	2.26 (0.31-16.55)	0.422*
	TG+GG	40	80.0	28	46.6	5.76.(2.27-14.63)	0.000**

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća), * -Fisher Exact Probability Test, **-statistička značajnost (p<0.05)

Nakon izračunavanja *Adjusted OR* (Tabela 34), kada se u analizu uključe podaci o godinama ispitanika, njihovom polu i konzumaciji alkohola i cigareta, rizik za oboljevanje od BCK-a se još dodatno povećava. Heterozigoti imaju čak 6.28 puta veći rizik za oboljevanje od ovog tipa karcinoma u odnosu na osobe sa *wild type* genotipom, a kod mutiranih homozigota ovaj rizik jeste uvećan, ali neznatno.

4.4.4. Analiza polimorfizma u genu za *MMP-9*

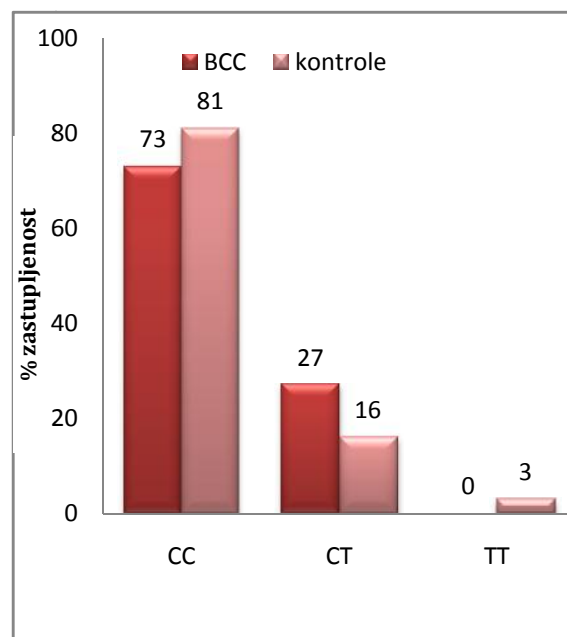
U Tabeli 35 prikazane su učestalosti genotipova i alela u grupi ispitanika oboljelih od BCK-a i u kontrolnoj grupi, koji su posledica C/T supstitucije na poziciji -1562 promotorskog regiona gena za *MMP-9*. Najzastupljeniji genotip u obe ispitivane grupe je *wild type* homozigot, CC sa 81.4% u kontrolnoj i 72.9% u grupi ispitanika, potom sledi heterozigot genotipa CT sa 15.7% u kontrolnoj i 27.1% u grupi ispitanika sa BCK-om, dok mutirani homozigot u grupi ispitanika izostaje, a u kontrolnoj je zastupljen sa 2.9% (Slika 41). Hi-kvadrat testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u distribuciji učestalosti analiziranih genotipova ($\chi^2=1.46$, p=0.227), Tabela 35.

Tabela 35: Distribucija učestalosti genotipova i alela u ispitivanim grupama u analizi polimorfizma gena za TNF-R2

Gen/SNP	Genotip	BCC	K	χ^2	p	
		N	N			
MMP-9 rs3918242	CC	51	57	4.47	0.107	
	CT	19	11			
	TT	/	2			
	Aleli				0.30	0.462
	C	121	125			
	T	19	15			

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, χ^2 -hi-kvadrat vrednost, p-Pirsonov (Pearson's) koeficijent

U tabeli 35 prikazane su i učestalosti alela, izračunate na osnovu učestalosti genotipova. Ova vrednost nije statistički značajna ($\chi^2=0.30$, $p=0.462$).



Slika 41: Procentualna zastupljenost genotipova u ispitivanim grupama

Rezultati prikazani u Tabeli 36 ukazuju da alel T ispoljava 1.31 puta veći rizik za oboljevanje od BCK-a u odnosu na alel C (OR=1.31, 95%CI=0.63-2.69), ali ta vrednost nije statistički značajna. Takođe, heterozigoti CT genotipa iskazuju 1.93 puta veći rizik za oboljevanje od BCK-a (OR=1.93, 95%CI=0.84-4.44), Tabela 36.

Tabela 36: Polimorfizam u genu za MMP-9 i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - crude Odds Ratio

Gen/Genotip	BCK		K		Crude OR (95% CI)	p	
	N	%	N	%			
MMP-9 rs3918242	CC	51	72.9	57	81.4	1.00	Ref.
	CT	19	27.1	11	15.7	1.93 (0.84-4.44)	0.118
	TT	/	0.0	2	2.9	0.00 (0.00-0.00)	0.285*
	CT+TT	19	27.1	13	18.6	1.63 (0.73-3.64)	0.227
Aleli							
C	121	86.4	125	89.3	1.00	Ref.	
T	19	13.6	15	10.7	1.31 (0.63-2.69)	0.462	

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća), * -Fisher Exact Probability Test

Rezultat logističke regresione analize sa uključenim podacima o ispitanicima o konzumaciji alkohola i cigaretama, *Adjusted OR*, njihovim godinama i polu pokazuje neznatno smanjenje rizika za oboljevanje od BCK-a u odnosu na *Crude OR* (Tabela 37).

Tabela 37: Polimorfizam u genu za MMP-9 i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - Adjusted Odds Ratio

Gen/Genotip	BCK		K		Adjusted OR (95% CI)	p	
	N	%	N	%			
MMP-9 rs3918242	CC	51	72.9	57	81.4	1.00	Ref.
	CT	19	27.1	11	15.7	1.81 (0.76-4.29)	0.177
	TT	/	0.0	2	2.9	0.00 (0.00-0.00)	0.999
	CT+TT	19	27.1	13	18.6	1.60 (0.70- 3.67)	0.269

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća)

4.4.5. Analiza polimorfizma u genu za survivin

Mutacija u promotorskom regionu na poziciji -31 gena za survivin dovodi do supstitucije citozina guaninom. Kao posledica te supstitucije u populaciji se mogu naći osobe sa tri različita genotipa: CC (*wild type*), GC heterozigot i GG mutirani homozigot.

Raspodela genotipova po ispitivanim grupama je sledeća: u grupi obolelih od bazocelularnog karcinoma od ukupno 70 ispitanika 9 ima CC genotip (13%), GC genotip 25 ispitanika (36%), 36 ima GG genotip (51%). U kontrolnoj grupi od takođe 70 ispitanika, 8 ima CC genotip (11%), 34 GC genotip (49%) i 28 ima GG genotip (40%), *Tabela 38, Slika 42.*

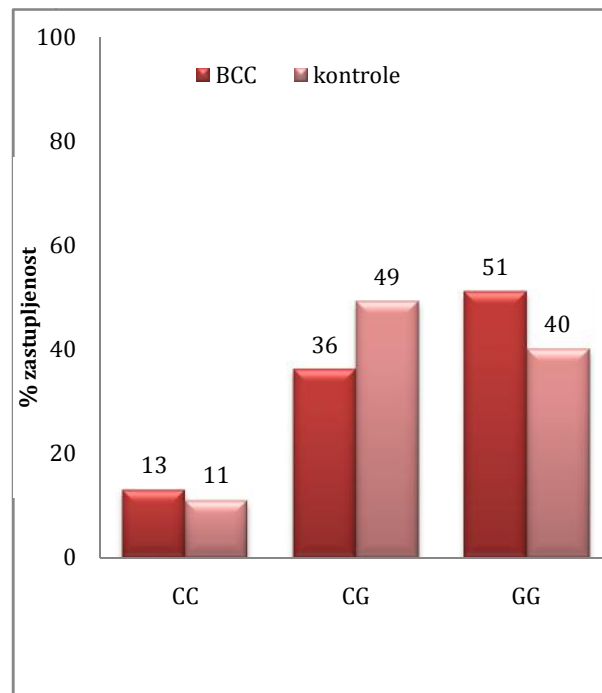
Na osnovu učestalosti genotipova izračunate su i učestalosti alela C i G gena za survivin i njihove vrednosti su: za alel C 35.7% u kontrolnoj i 30.7% u grupi ispitanika oboleloj od BCK-a, za mutirani alel G, 64.3% i 69.3% respektivno.

Tabela 38: Distribucija učestalosti genotipova i alela u ispitivanim grupama u analizi polimorfizma gena za survivin

Gen/SNP	Genotip	BCK	K	χ^2	p
		N	N		
Survivin rs9904341	CC	9	8	2.43	0.150
	GC	25	34		
	GG	36	28		
	Aleli			0.58	0.374
	C	43	50		
	G	97	90		

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, χ^2 -hi-kvadrat vrednost, p-Pirsonov (Pearson's) koeficijent

Hi-kvadrat testom je utvrđeno da nema statistički značajnih razlika ($p > 0,05$) u učestalostima ispitivanih alela i genotipova *gena za survivin* među ispitivanim grupama (*Tabela 38*).



Slika 42: Procentualna zastupljenost genotipova u ispitivanim grupama

U cilju ispitivanja postojanja asocijacije između određenog genotipa i rizika za razvoj BCK-a, računat je *Crude Odds Ratio* logističkom regresionom analizom (Tabela 39).

Tabela 39: Polimorfizam u genu za survivin i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - *crude Odds Ratio*

Gen/Genotip	BCK		K		Crude OR (95% CI)	p	
	N	%	N	%			
Survivin rs9904341	CC	9	12.9	8	11.4	0.87 (0.30-2.56)	0.807
	GC	25	35.7	34	48.6	0.57 (0.28-1.17)	0.125
	GG	36	51.4	28	40.0	1.00	Ref.
	CC+GC	34	48.6	42	60.0	0.63 (0.32-1.23)	0.175
Aleli							
C	43	30.7	50	35.7	0.79 (0.48-1.31)	0.374	
G	97	69.3	90	64.3	1.00	Ref.	

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća)

Tabela 40: Polimorfizam u genu za survivin i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - Adjusted Odds Ratio

Gen/Genotip	BCK		K		Adjusted OR (95% CI)	p	
	N	%	N	%			
Survivin rs9904341	CC	9	12.9	8	11.4	0.73 (0.24-2.28)	0.591
	GC	25	35.7	34	48.6	0.46(0.21-0.99)	0.047*
	GG	36	51.4	28	40.0	1.00	Ref.
	CC+CG	34	48.6	42	60.0	0.55 (0.27-1.13)	0.102

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća), *-statistička značajnost ($p < 0.05$)

Na osnovu rezultata iz *Tabele 39* se vidi da nosioci alela C imaju 1.26 puta manji rizik za oboljevanje od bazocelularnog karcinoma u odnosu na G alel (OR=0.79, 95%CI=0.48-1.31). Genotipovi CC i CG takođe imaju manji rizik oboljevanja od BCK-a u odnosu na GG genotip, ali vrednosti nisu statistički značajne. Međutim, *Adjusted Odds Ratio* kombinovan sa podacima o godinama, polu, konzumiranju alkohola i pušenju pokazao statistički značajan smanjen rizik za oboljevanje od BCK-a kod heterozigota CG u odnosu na homozigote GG (OR=0.46, 95%CI=0.21-0.99, $p=0.047$), *Tabela 40*.

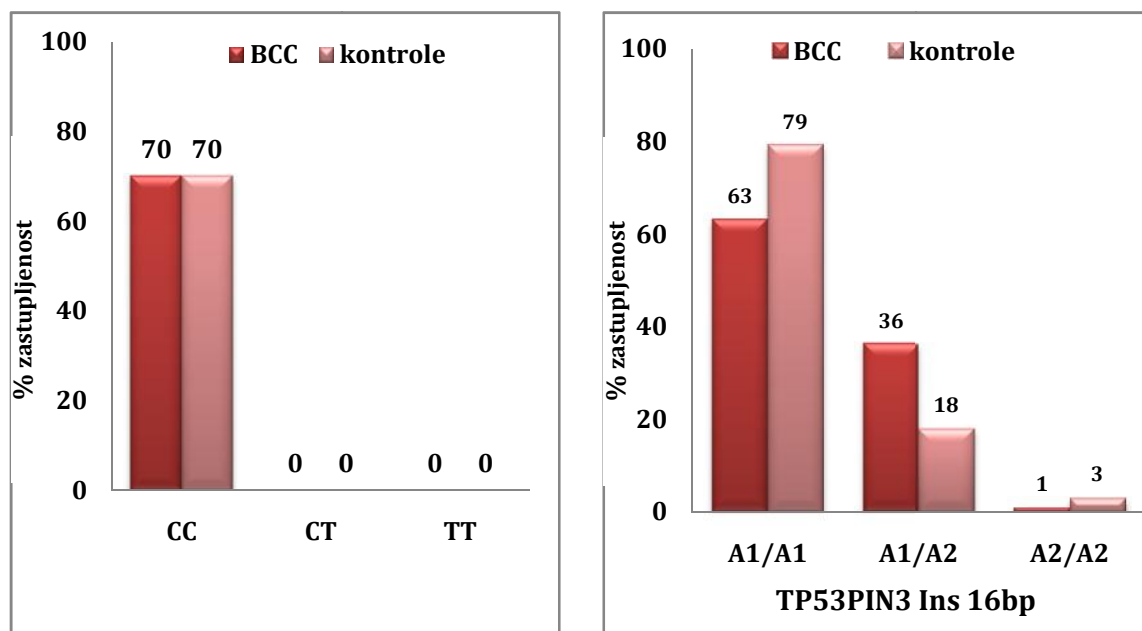
4.4.6. Analiza polimorfizma u TP53 genu

Kodon 47 u okviru egzona 4 kodira prolin (CCG) kod wild type varijante, ali kod malog broja ljudi, usled mutacije C/T, može da kodira i serin (TCG). Ser47 varijanta u populacijama je vrlo retka. U našem uzorku populacije pokazalo se da ova varijanta u potpunosti izostaje u obe ispitivane grupe, odnosno da se u našoj populaciji sreću samo *wild type* homozigoti sa 100% u obe analizirane grupe. Kao posledica toga, ne postoji statistički značajna razlika u učestalostima genotipova i alelela u grupi ispitanika u odnosu na kontrolnu grupu (*Tabela 41, Slika 43*).

Tabela 41: Distribucija učestalosti genotipova i alela u ispitivanim grupama u analizi polimorfizma Pro47Ser TP53 gena

Gen/SNP	Genotip	BCK	K	χ^2	p	
		N	N			
TP53 Pro47Ser	CC	70	70	0.00	1.000	
	CT	/	/			
	TT	/	/			
	Aleli				0.00	1.000
	C	140	140			
	T	/	/			

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, χ^2 -hi-kvadrat vrednost, p-Pirsonov (Pearson's) koeficijent



Slika 43: Procentualna zastupljenost genotipova u ispitivanim grupama za polimorfizam Pro47Ser (levo) i TP53PIN3 Ins 16bp (desno)

U Tabeli 42 prikazani su rezultati polimorfizma TP53PIN3 Ins 16bp, u intronu 3 TP53 gena, insercije 16bp. U odsustvu insercije, genotip je A1/A1. Ako je na jednom alelu prisutna insercija, a na drugom nije genotip je A1/A2, dok se prisustvo insercije na oba alela označava kao A2/A2 genotip. U grupi ispitanika obolelih od BCK-a najzastupljeniji su homozigoti bez pomenute insercije (A1/A1), sa 62.9%, a za njima heterozigoti sa 35.7%. Svega 1.4% čine homozigoti sa

insercijom od 16bp na oba alela. U kontrolnoj grupi takođe su najzastupljeniji homozigoti bez insercije, ali je njihova učestalost ovde veća i iznosi 78.6%, slede heterozigoti sa manjom zastupljenošću u odnosu na prethodnu grupu sa 18.6% i na kraju homozigoti sa insercijom, 2.8%. Hi-kvadrat test je pokazao da među učestalostima genotipova postoji statistički značajna razlika ($\chi^2=6.30$, $p=0.043$), dok nije uočena ($p>0.05$) pri analizi učestalosti alela (Tabela 42).

Tabela 42: Distribucija učestalosti genotipova i alela u ispitivanim grupama u analizi polimorfizma PIN3 Ins 16bp TP53 gena

Gen/SNP	Genotip	BCK	K	χ^2	p	
		N	N			
TP53 rs17878362	A1/A1	44	55	6.30	0.043*	
	A1/A2	25	13			
	A2/A2	1	2			
	Aleli				2.18	0.100
	A1	113	123			
	A2	27	17			

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, χ^2 -hi-kvadrat vrednost, p-Pirsonov (Pearson's) koeficijent, *- statistička značajnost

Tabela 43 prikazuje rezultate logističke regresione analize koja je rađena u cilju ispitivanja postojanja asocijacije između određenog genotipa i rizika za razvoj BCK-a, računat je *Crude Odds Ratio*, za polimorfizam PIN3 Ins 16bp TP53 gena. Za Pro47Ser polimorfizam ova analiza nije rađena, jer je u obe ispitivane grupe prisutan samo *wild type* homozigot. Ova analiza je pokazala da prisustvo insercije od 16bp u ovom polimorfizmu, nosi 1.73 puta veći rizik za oboljevanje od BCK-a, u odnosu na alel bez ove insercije, ova vrednost nije statistički značajna, ali je veoma blizu značajnosti (Tabela 43). Heterozigoti nose čak 2.40 puta veći rizik za oboljevanje od BCK-a u poređenju sa homozigotima bez insercije (OR=2.40, 95%CI=1.10-5.24), kao i udruženi heterozigoti sa homozigotima sa insercijom (OR=2.16, 95%CI=1.02-4.58), Tabela 43. Ove vrednosti su statistički značajne ($p=0.025$ i $p=0.041$).

Tabela 43: Polimorfizam PIN3 Ins 16bp u TP53 genu i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - crude Odds Ratio

Gen/Genotip	BCK		K		Crude OR (95% CI)	p	
	N	%	N	%			
TP53 rs17878362	A1/A1	44	62.9	55	78.6	1.00	Ref.
	A1/A2	25	35.7	13	18.6	2.40 (1.10-5.24)	0.027**
	A2/A2	1	1.4	2	2.8	0.63 (0.05-7.12)	0.588*
	A1/A2 A2/A2	26	37.1	15	21.4	2.16 (1.02-4.58)	0.041**
Aleli							
A1	113	80.7	123	87.9	1.00	Ref.	
A2	27	19.3	17	12.1	1.73 (0.90-3.34)	0.069	

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća), *-Fisher Exact Probability Test, ****-statistička značajnost**

Adjusted Odds Ratio, prikazan u Tabeli 44, pokazuje da kada u analizu uključimo podatke o godinama, polu, konzumaciji alkohola i cigareta, rizik za oboljevanje od BCK-a je manji nego u analizi *Crude OR*.

Tabela 44: Polimorfizam u genu za survivin i rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma - Adjusted Odds Ratio

Gen/Genotip	BCK		K		Adjusted OR (95% CI)	P	
	N	%	N	%			
TP53 rs17878362	A1/A1	44	62.9	55	78.6	1.00	Ref.
	A1/A2	25	35.7	13	18.6	2.00 (0.87-4.57)	0.100
	A2/A2	1	1.4	2	2.8	0.99 (0.08-12.04)	0.999
	A1/A2+ A2/A2	26	37.1	15	21.4	1.89 (0.85-4.19)	0.118

N-broj ispitanika, K-kontrolna grupa, OR-Odds Ratio, CI-Confidence Interval (interval poverenja), p-probability (verovatnoća)

5.DISKUSIJA

Bazocelularni karcinom predstavlja najčešći oblik karcinoma kože kod ljudi i njegova učestalost je u konstantnom porastu. Veoma retko metastazira, ali invazijom okolnih tkiva može da dovede do njihovog oštećenja. Rizik za nastanak bazocelularnog karcinoma povezan je sa mnogim endogenim i egzogenim faktorima, ali UV zračenje se izdvaja kao najznačajniji etiološki faktor za nastanak BCK-a. Zbog toga se ovaj karcinom najčešće pojavljuje na koži koja je izložena Suncu, posebno u regionu glave i vrata, a nešto ređe na trupu i ekstremitetima. Tačan mehanizam nastanka bazocelularnog karcinoma kože nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da postoji genetička predispozicija u sprezi sa faktorima sredine. Verovatnoća razvijanja ovog karcinoma raste sa godinama života.

U ovoj doktorskoj disertaciji analizirana je asocijacija nekoliko polimorfizama u različitim genima sa rizikom za nastanak bazocelularnog karcinoma. Uvidom u dostupnu literaturu, nisu pronađeni podaci o sličnim analizama za našu populaciju, a vrlo su oskudni i podaci o asocijaciji ovih polimorfizama sa bazocelularnim karcinomom u drugim svetskim populacijama.

5.1. Polimorfizam u genu za TNF-alpha, rs1800629

Citokini su mali sekretorni proteini ili proteini koji se vezuju za membranu i njihova je uloga u regulaciji imuniteta, posredovanju tokom inflamacije ili u hematopoezi. Multifunkcionalni citokin faktor nekroze tumora alfa (TNF-alpha) igra značajnu ulogu u patogenezi inflamatornih, autoimunih i malignih oboljenja. Ima širok spektar aktivnosti, uključujući anti-kancerogene i pro-kancerogene efekte. Produkovano od strane makrofaga, TNF-alpha ima važnu ulogu u regulaciji imunog odgovora i njegova povećana sekrecija nakon povrede indukuje citokinsku kaskadu koja rezultuje u aktivaciji, proliferaciji i hipertrofiji mononukleusnih i fagocitnih ćelija. Ovakav sled događaja impliciran je u patogenezu i progresiju određenih maligniteta.

UVB zračenje na koži izaziva imunosupresiju koja može dovesti do razvoja karcinoma kože. Mehanizam te imunomodulacije još uvek nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da TNF-alpha ima centralnu ulogu u tom procesu

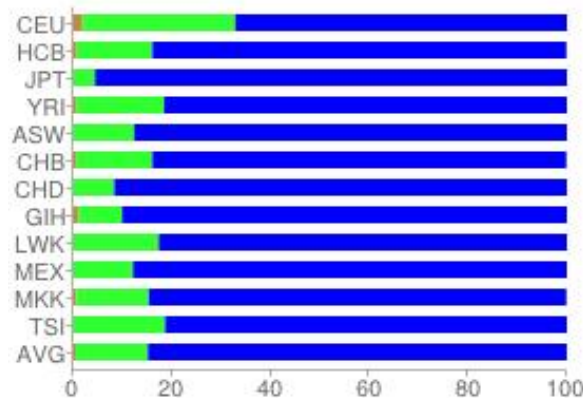
(Skov i sar., 2003). Pored toga što UVB zračenje indukuje oslobađanje TNF-alpha (Skov i sar., 1998), pokazano je i da samo ubrizgavanje TNF-alpha u kožu miša izaziva imunosupresivne efekte slične onim izazvanim UVB zračenjem. Takođe je pokazano da ovi negativni efekti na kožu miša mogu biti blokirani TNF-alpha antitelima (Kurimoto i Streilein, 1992; Hajeer i Hutchinson, 2000). S obzirom da je poznato da je UVB zračenje jedan od glavnih etioloških faktora u nastanku bazocelularnog karcinoma, delimično i preko povećanja koncentracije TNF-alpha, naša studija imala je za cilj da ispita asocijaciju funkcionalnog polimorfizma u genu za TNF-alpha sa razvojem bazocelularnog karcinoma.

Najinteresantnija zapažanja tiču se polimorfizama u promotorskom regionu za koje je pokazano da su odgovorni za povećanu transkripciju TNF-alpha gena (Magalhães i sar., 2010), u koje spada i SNP na poziciji -308. Ovaj polimorfizam povezan je sa velikom podložnošću različitim karcinomima: oralnom skvamocelularnom karcinomu (Liu i sar., 2005; Gupta i sar., 2008), nazofaringealnom karcinomu (Sousa i sar., 2011), karcinomu želuca (Lu PH i sar., 2010) itd. Guanin na poziciji -308 definiše TNF1 (G) alel, a adenin, manje zastupljen, TNF2 (A) alel koji je povezan sa visokom ekspresijom TNF-alpha (Bouma i sar., 1996; Louis i sar., 1998). Dosadašnja populaciona istraživanja su pokazala da je oko 60-70% zdrave populacije Kavkazijanaca G/G genotipa za TNF-alpha, 30-40% su heterozigotne osobe G/A genotipa, a 1.5-3% su A/A homozigoti (Demeter i sar., 1997; Lauten i sar., 2002). G/G genotip je dominantan u mnogim populacijama, ali njegove učestalosti dosta variraju: Velika Britanija 52% (Kirkpatrick i sar., 2004), Indija 91% (Kohar i sar., 2007), Švajcarska 83.3% (Ivanson i sar., 2008), Meksiko 94.5% (Zuniga i sar., 2001), Kina 90.8% (Liu i sar., 2010).

U našoj studiji u grupi obolelih od bazocelularnog karcinoma učestalost genotipa G/G bila je 58%, G/A genotipa 42%, dok uopšte nije zabeleženo prisustvo osoba sa A/A genotipom. U kontrolnoj grupi 65% ispitanika bilo je sa G/G genotipom, 35% sa G/A genotipom, a takođe su izostali mutirani homozigoti. Distribucija genotipova i alela u našoj studijskoj grupi je u saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima za populaciju Kavkazijanaca. Naši rezultati nisu

ukazali na postojanje značajne razlike među ispitivanim grupama, ali je pokazano da nosioci alela A (osobe genotipa G/A i A/A) imaju blago povećan rizik (1.34) za nastanak bazocelularnog karcinoma u odnosu na osobe sa G/G genotipom.

Iako našom studijom nije utvrđena značajna povezanost proučavanog polimorfizma TNF-alpha gena sa nastankom bazocelularnog karcinoma, treba napomenuti da su ovakvi rezultati u skladu sa podacima iz dostupne literature



Slika 44: Učestalost genotipova u analizi polimorfizma rs1800629 gena za TNF-alpha u različitim delovima sveta; A/A narandžasto, G/A zeleno, G/G plavo obojeno; prvi red CEU se odnosi na Evropski kontinent

preuzeto: <http://www.snpedia.com/index.php/Rs1800629>

(Slika 44), i gotovo su identični rezultatima dosadašnjih istraživanja za Evropski kontinent. Na Slici 44 se uočava da u udaljenijim populacijama sveta, u Japanu, Kini, Meksiku, itd. takođe nije zabeleženo prisustvo genotipa A/A, ali su distribucije G/A i G/G genotipa drugačije od rezultata naše studije. Još od vremena kada je ovaj polimorfizam prvi put opisan (Wilson i sar., 1992) do danas, utvrđeno je da je G alel zastupljeniji, što je slučaj i sa našom populacijom, odnosno prisutan je sa 79% u grupi pacijenata sa BCK-om i 82.5% u kontrolnoj grupi. Studija Skov i sar. (2003), kojom je ispitivana povezanost polimorfizma u genu za TNF-alpha na poziciji -308 i koncentracija oslobođenog TNF-alpha sa razvojem BCK-a, je pokazala odsustvo asocijacije ovog polimorfizma i BCK-a u populaciji Kavkazijanaca, ali da je bazocelularni karcinom povezan sa povećanom koncentracijom ovog citokina. Pored navedenog, u istoimenoj studiji je ispitivana povezanost ovog polimorfizma i

sklonost ka UVB indukovanoj imunosupresiji kod zdravih osoba (volontera) gde je takođe zabeleženo odsustvo asocijacije. Interesantno je da su Hajeer i sar. (2000), grupu pacijenata obolelih od BCK-a podelili u 4 grupe: (1) sa samo jednim BCK-om, (2) sa 2-5 BCK-a, (3) 6-10 BCK-a i (4) pacijenti sa više od 10 BCK-a i nisu pronašli povezanost sa navedenim polimorfizmom i rizikom za nastanak BCK-a, ali je utvrđena asocijacija između mikrosatelitskih polimorfizama i bazocelularnog karcinoma kože, kao i da su osobe sa većim brojem BCK-a bile GG genotipa. Slična studija, Ramachandran i sar. (2001), pokazala je da su osobe sa većim brojem BCK-a bile uglavnom GG genotipa i te vrednosti su bile statistički značajne. To ih je navelo na zaključak da pacijenti koji su imali barem jedan BCK nose povećan rizik za nastanak novih BCK-a i da je TNF-alpha izuzetno važan medijator u razvoju BCK-a i kao takav opravdava sva buduća istraživanja. Još ranije, Kahn i sar. (1998) su zaključili da pacijenti sa istorijom nekog od nemelanomskih karcinoma kože imaju povećan rizik za nastanak nekih drugih maligniteta, posebno limfoma.

Cilj studije Gambichler-a i saradnika (2006) bio je da se ispita nivo ekspresije iRNK TNF-alpha u delovima kože sa lezijama i bez lezija kod pacijenata sa bazocelularnim karcinomom, kao i u kontrolnoj grupi i nisu pronađene povezanosti, odnosno razlike u delovima kože sa lezijama, odnosno bez njih i poređenju sa kontrolnom grupom. Nedavno sprovedena studija Rizzato i saradnika (2011), koji su ispitivali povezanost polimorfizma TNF-alpha -308 sa rizikom za razvoj BCK-a utvrdila je da postoji asocijacija, ali u zavisnosti od stepena izloženosti kože Sunčevom zračenju. U grupi osoba koje su imale opekotine na koži od Sunca, združeni genotipovi G/A i A/A pokazuju čak 2.4 puta veći rizik za nastanak BCK-a u poređenju sa homozigotima G/G. U drugoj grupi, sa manjom izloženosti kože Sunčevom zračenju, taj rizik je manji i iznosi 1.18 puta, dok u trećoj grupi pacijenata koji svoju kožu nisu izlagali sunčevom zračenju u većoj meri imaju čak 1.1 puta manji rizik za oboljevanje od ovog tipa karcinoma. Sa druge strane, Marleen i saradnici (2011) nisu našli asocijaciju TNF-308 polimorfizma sa nemelanomskim karcinomima kože, a dobijene učestalosti genotipova su vrlo slične učestalostima dobijenim u našoj studiji. U navedenom istraživanju, osobe sa AA genotipom su zastupljene sa 1.9% u grupi pacijenata i 2.7% u kontrolnoj, dok

kod nas u potpunosti izostaju. Međutim, u ranije sprovedenim studijama je utvrđeno postojanje asocijacije navedenog polimorfizma i skvamocelularnog karcinoma oralne regije. Tako u okviru Azijske populacije, na Tajvanu, kod pacijenata lečenih od oralnog skvamocelularnog karcinoma (OSCK) dobijeni su prvi podaci o vezi između polimorfizma TNF-alpha -308 i rizika za nastanak OSCK. Uporedna studija asocijacije Vairaktaris-a i sar. (2008), na belcima nemačke i grčke nacionalnosti, tokom koje su ispitane potencijalne interakcije između sedam polimorfizama u genima za citokine i njihov kombinovani efekat na OSC kancerogenezu je pokazala da u svim modelima TNF-alpha ima jako bitan doprinos.

Studija Magalhães i saradnika (2010) na Brazilskoj populaciji ispitala je asocijaciju ovog polimorfizma sa rizikom za razvoj psorijaze, jer je ta veza prethodno u nekim populacijama uočena (Kavkazijanci), dok u drugima nije (u Azijskoj populaciji). Poznato je da je psorijaza kožno inflamatorno oboljenje sa vrlo složenom imunološkom osnovom, koja uključuje hiperproliferaciju keratinocita i aberantnu diferencijaciju epidermisa i kao takva je u interakciji sa mnogim proinflamatornim citokinima pa i TNF-alpha. Rezultati navedene studije su pokazali da asocijacija ne postoji. Dobijene učestalosti alela u pomenutoj studiji, slične su učestalostima alela u našoj populaciji (u našoj kontrolnoj grupi alel G zastupljen je sa 82.5%, a u brazilskoj kontrolnoj grupi sa 87.9%, dok je učestalost alela A iznosila u našoj populaciji 17.5%, u brazilskoj 12.1%).

U literaturi postoji jako puno podataka o odsustvu asocijacije polimorfizma TNF-alpha -308 sa mnogim bolestima i malignitetima, tako da naša studija apsolutno nije izuzetak. Na primer, nema statistički značajne asocijacije između TNF haplotipa i kliničkog ishoda kod dece sa limfoblastnom leukemijom (Takeuchi i sar., 2002). U studiji koja je uključivala 96 pacijenata sa karcinomom prostate, polimorfizam u promotorskom regionu TNF gena, na poziciji -308 ne korelira sa incidencom kancera (Wu i sar., 2004). Studija koja je obuhvatila stanovnike Severne Evrope, ukazuje na nepostojanje asocijacije između podložnosti kanceru dojke i polimorfizma -308 gena za TNF-alpha (Azmy i sar., 2004). Ahirwar i saradnici (2008) u Indiji ispitali su doprinos polimorfizama u genima za IL4, IL6

i TNF (-308) riziku za razvoj karcinoma bešike i utvrdili su izostanak asocijacije između prisustva TNF-308 A varijante gena i rizika od kancerogeneze. Ho i saradnici (2006) nisu uočili asocijaciju između ovog polimorfizma i nazofaringealnog karcinoma. Njihov zaključak je bio da se alelske forme promotora TNF-alfa gena ne mogu koristiti kao biomarkeri za podložnost nazofaringealnom karcinomu.

Sem ispitivanja TNF-alpha polimorfizma u tumorima glave i vrata brojne studije su se bavile i povezanošću ovog SNP-a sa raznim drugim malignitetima i nemalignim oboljenjima, kao i različitim kliničkim parametrima kao što su uspeh terapije, stopa preživljavanja, period preživljavanja bez progresije bolesti itd. Tako su npr. Warzocha i saradnici (1998) ustanovili da je visoko produktivni alel -308 TNF alpha polimorfizma (A) povezan sa bržim recidivom i progresijom kod pacijenata sa Non Hočkinovim limfomom. Prisustvo TNF2 alela (A/A homozigot) je takođe povezano sa povećanom susceptibilnošću i težom kliničkom slikom kod oboljenja kao što su reumatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus, Alchajmerova bolest, cerebralna malarija, itd. (Oppenheim, 2001). Duarte i sar. (2005) su utvrdili povezanost ovog polimorfizma i sa rizikom za invazivni kancer cerviksa (IKC) i utvrdili su da je kod žena nosilaca A alela ovaj rizik uvećan dva puta. Povećan rizik za oboljevanje od hepatocelularnog karcinoma (Ho i sar., 2004), kao i karcinoma bubrega (Baştürk i sar., 2005) takođe se mogu dovesti u vezu sa ovim polimorfizmom u TNF-alpha genu.

U literaturi takođe postoji jako puno podataka o odsustvu asocijacije između polimorfizma TNF-alpha -308 i različitih maligniteta, tako da naša studija ne predstavlja izuzetak. Na primer, nema statistički značajne asocijacije između TNF haplotipa i kliničkog ishoda kod dece sa limfoblastnom leukemijom (Takeuchi i sar., 2002). U studiji koja je uključivala 96 pacijenata sa karcinomom prostate, polimorfizam u promotorskom regionu TNF gena, na poziciji -308 ne korelira sa incidencom kancera (Wu i sar., 2004). Studija koja je obuhvatila stanovnike Severne Evrope, ukazuje na nepostojanje asocijacije između podložnosti kanceru dojke i polimorfizma -308 gena za TNF-alpha (Azmy i sar., 2004). Ahirwar i saradnici (Indija) istpitivali su doprinos polimorfizama u genima za IL4, IL6 i TNF

(-308) riziku za razvoj karcinoma beške i utvrdili su izostanak asocijacije između prisustva TNF-308 A varijante gena i rizika od kancerogeneze. Ho i saradnici nisu uočili asocijaciju između ovog polimorfizma i nazofaringealnog karcinoma. Njihov zaključak je bio da se alelske forme promotora TNF-alfa gena ne mogu koristiti kao biomarkeri za podložnost nazofaringealnom karcinomu.

Na osnovu gore iznetih rezultata različitih studija asocijacije, jasno je da polimorfizam – 308 G/A u genu za TNF-alpha može uticati na rizik oboljevanja od različitih tipova kancera. S obzirom da ovaj polimorfizam dovodi do povećane transkripcije TNF gena, na ovaj način uvećana produkcija TNF-alpha svakako indukuje potencijalno patološke procese u organizmu. S obzirom da je glavni sredinski faktor koji doprinosi patogenezi u slučaju bazocelularnog karcinoma UV-zračenje, izvestan je kombinovani efekat genotipa i sredine u patogenezi ovog karcinoma. Buduća istraživanja na našoj populaciji bi mogla da obuhvate i analizu ekspresije TNF-alpha gena. Takođe, bitno je proučiti i postojanje interakcije između gena, postojanje neravnoteže vezanosti i interakcije genotipa i sredinskih faktora, kao što je npr. fotoekspozicija.

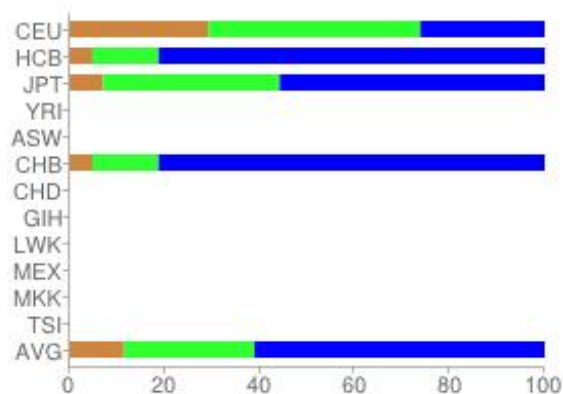
5.2. Polimorfizmi u genima za TNF receptore: TNF-R1, rs767455 i TNF-R2, rs1061622

Familija TNF receptora obuhvata TNF-R1 receptor koji je prisutan na svim ćelijama izuzev eritrocita i nestimuliranih limfocita i pripada grupi receptora koji poseduju domen smrti (*engl. Death Domain, DD*). Receptori koji poseduju unutarćelijski domen smrti (DD), adaptorni molekul, imaju sposobnost direktne aktivacije apoptoze i ćelijske proliferacije (Agrawal, 2003). Nijedan od ovih receptora ne pokazuje enzimsku aktivnost već se signal prenosi kroz uključivanje više različitih proteina, koji iniciraju signalnu kaskadu, koja vodi aktivaciji efektornih proteina kaspaza i protein kinaza.

Brojni eksperimenti dokazali su da je upravo TNF-R1 odgovoran za najveći deo bioloških aktivnosti TNF-alpha. U prvom egzonu TNF-R1 gena, na poziciji 36, nalazi se polimorfizam nastao tranzicijom adenina u guanin. Ovaj polimorfizam

predstavlja tihu mutaciju u kodonu 12 (CCA>CCG) nazvan Pro12Pro (Pitts, 1998) i ne utiče direktno na funkciju receptora (Tabor i sar., 2002).

Naši rezultati pokazuju da u grupi zdravih osoba učestalost alela A iznosi 60.8%, a G alela 39.2% što je u skladu sa podacima dobijenim u britanskoj populaciji (Barton i sar., 2001) i što je takođe u saglasnosti (sa manjim odstupanjima) sa studijom Pitts-a i saradnika (1998) koji su utvrdili učestalost alela A od 54% i alela G od 46% u slučajno odabranoj populaciji belaca. Kada posmatramo učestalosti genotipova u kontrolnoj grupi i uporedimo ih sa podacima iz literature, možemo zaključiti da su oni podudarni sa podacima za Evropski kontinent (Slika 45), A/A 35%, A/G 51.6% i G/G 13.4%, sa malo većom razlikom u učestalosti G/G genotipa. Kada je reč o studiji asocijacije između Pro12Pro polimorfizma i rizika za nastanak BCK, rezultati našeg istraživanja nisu pokazali značajne razlike učestalosti genotipova između pacijenata i kontrolne grupe, pa samim tim ni postojanje asocijacije između polimorfizma rs767455 u genu za TNF-R1 i pojave BCK-a. Slika 45 pokazuje da je ovaj polimorfizam slabo proučavan sa aspekta asocijacije sa kancerom. Pored podataka za Evropsku populaciju, prikazani su samo još rezultati za populacije Kine i Japana. Odsustvo učestalosti genotipova za druge populacije može da znači da ovaj polimorfizam nije ispitivan u tim populacijama, ili da HapMap-a nije ažurirana do ovog trenutka. Svakako, to samo potvrđuje značaj naših rezultata.



Slika 45: Učestalost genotipova u analizi polimorfizma rs767455 gena za TNF-R1 u različitim delovima sveta; A/A narandžasto, A/G zeleno, G/G plavo obojeno; prvi red CEU se odnosi na Evropski kontinent

preuzeto: <http://www.snpedia.com/index.php/Rs767455>

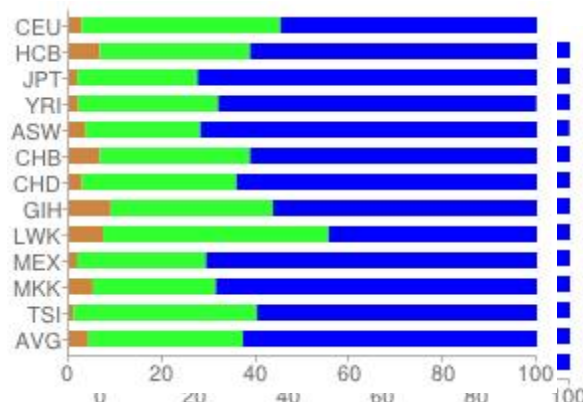
TNF-R2 receptor prisutan je na imunskim ćelijama, pre svega na limfocitima i pripada grupi receptora koji ne poseduju domen smrti, ali ipak može indukovati apoptozu preko receptor-interaktivnog proteina (RIP). Neoplastične B ćelije i aktivisani normalni B limfociti eksprimiraju TNF receptore na svojoj površini (Eriksen i sar., 1991). Izolovani iz periferne krvi i tonzila, B limfociti nakon aktivacije eksprimiraju više TNF- R2 u odnosu na TNF-R1 (Heilig i sar., 1991). Polimorfizam +676T/G karakteriše se zamenom timina guaninom što dovodi do zamene aminokiseline metionina u položaju 196 argininom (M196R) i kao takav utiče na strukturu receptora u regionu CRD4, ekstraćelijskog dela TNF-R2, ali ne i na vezivanje TNF. Više različitih egzona TNF-R2 gena kodira ekstraćelijski funkcionalni domen ovog receptora, a egzon 6 kodira deo transmembranskog regiona na kojem se nalazi proteolitičko mesto odgovorno za oslobađanje rastvorljive forme receptora (Beltinger i sar., 1996). Varijabilnost gena za TNF-R2 utiče na ekspresiju samog receptora i smatra se da ima ulogu u patogenezi velikog broja metaboličkih sindroma, kao što su hipertenzija, gojaznost, insulinska rezistencija, familijarna hiperlipidemija i koronarna arterijska bolest (Glenn i sar., 2000).

Rezultati dobijeni u našem istraživanju pokazuju da učestalost T alela iznosi 58% kod obolelih od BCK-a i 74.2% u kontrolnoj grupi, G alela 42% kod pacijenata sa BCK-om i 25.8% u kontrolnoj grupi. Ove razlike u učestalostima su statistički značajne. Takođe je pokazano da nosioci G alela imaju čak 2 puta veći rizik za nastanak BCK-a u poređenju sa osobama nosiocima T alela.

Ispitivanjem učestalosti T/T genotipa utvrđeno je da je u kontrolnoj grupi zastupljen sa 53.4%, a kod pacijenata sa 20%. Mutirani G/G genotip je nađen u kontrolnoj grupi sa učestalošću od 5%, a u grupi obolelih sa učestalošću od 4%. Heterozigoti T/G genotipa prisutni su sa učestalošću od 76% u grupi pacijenata, u odnosu na 41.6% u grupi zdravih ispitanika, a logistička regresiona analiza je pokazala da heterozigoti T/G iskazuju značajno povećan rizik za razvoj BCK-a. Dobijeni rezultati su time pokazali da ovaj polimorfizam može biti jedan od

markera za razvoj BCK-a. Statistički značajan povećan rizik za razvoj BCK-a imaju nosioci G alela, međutim, modifikovanom logističkom regresijom, ova značajnost se dodatno uvećava, što nam ukazuje da faktori sredine, kao što su pušenje, konzumacija alkohola, starost ispitanika mogu imati uticaja na povećanje rizika.

Kada uporedimo dobijene učestalosti genotipova sa učestalostima iz različitih studija na Evropskom kontinentu, možemo da konstatujemo da su one prilično usaglašene (<http://snpedia.com/index.php/Rs1061622>) Slika 46, gotovo identične. Slika 46 prikazuje raznovrsnost u učestalostima genotipova za navedeni polimorfizam u zavisnosti od regiona sveta, što je još jedna potvrda da postoje razlike u učestalostima alela i genotipova u zavisnosti od geografske odnosno



Slika 46: Učestalost genotipova u analizi polimorfizma rs1061622 gena za TNF-R2 u različitim delovima sveta; G/G narandžasto, T/G zeleno, T/T plavo obojeno; prvi red CEU se odnosi na Evropski kontinent

preuzeto: <http://www.snpedia.com/index.php/Rs1061622>

etničke pripadnosti.

U literaturi nema studije asocijacije navedenih polimorfizama u genima za receptore TNF-alpha sa BCK-om, ali postoje potvrde o asocijaciji sa drugim bolestima. Iste polimorfizme analizirali su Kammoun-Krichen i saradnici (2008) na tunižanskoj populaciji i njihovu povezanost sa autoimunim tireoidnim oboljenjem, uključujući i Gravesov sindrom i ustanovili da polimorfizam u genu za TNF-R1 nije pokazao značajnost, dok u genu za TNF-R2 postoji značajna razlika između grupe pacijenata i kontrola. Međutim, bitno je naglasiti za TNF-R1 kada su analizirani

haplotipovi sa mikrosatelitskim polimorfizmom, dva haplotipa su pokazala povezanost sa ovim bolestima što potvrđuje značaj i snagu haplotipskih analiza.

Studija koja je ispitala značaj TNF-R2 polimorfizma u leukemijama, ukazala je na činjenicu da kod pacijenata obolelih od akutne mijeloidne leukemije (AML) heterozigotni genotip T/G ima uticaja na preživljavanje obolelih (Bazzoni i sar., 2000).

Ovakvi rezultati ukazuju da polimorfizmi rs767455 i rs1061622 u receptorima TNF-R1 i TNF-R2 mogu da modulišu rizik oboljevanja od različitih maligniteta, pa i bazocelularnog karcinoma. U budućnosti bilo bi dobro proučiti interakcije između ova dva gena i postojanje neravnoteže vezanosti uvođenjem haplotipske analize. Analizom polimorfizma u genu za TNF-R2 je pokazano da faktori sredine uvećavaju rizik za razvoj bazocelularnog karcinoma, tako da bi bilo dobro ispitati uticaj još nekih sredinskih faktora, kao što je npr. izloženost Suncu, zato što je već potvrđen njegov uticaj na razvoj bazocelularnog karcinoma.

5.3. Polimorfizam u genu za MMP-9, rs3918242

Matriks metaloproteinaze (MMPs) predstavljaju grupu proteina koji igraju važnu ulogu u degradaciji i remodeliranju ekstraćelijskog matriksa i bazalne membrane, stoga modulišu deobu ćelija, migraciju, angiogenezu i tumorsku invaziju (Cotignola i sar., 2007). Za neke polimorfizme je pokazano da imaju uticaja na gensku ekspresiju, aktivnost proteina, stabilnost, različite međuproteinske interakcije, a povezane su sa tumorskim fenotipom i povećanim rizikom za progres kancera i drugih bolesti.

Poznato je da funkcionalna C/T supstitucija locirana u regionu promotora na poziciji -1562 utiče na transkripciju. Ređi T alel uslovljava dvostruko višu ekspresiju MMP-9 gena nego C alel. Učestalost T alela u populaciji belaca i Azijata iznosi oko 12-15%. U našoj studiji učestalost ovog alela je 10.3% u kontrolnoj grupi i nije značajno različita u odnosu na grupu pacijenata sa BCK-om (13%). Učestalosti genotipova u obe analizirane grupe takođe nisu pokazale značajnu

razliku, ali je utvrđeno da osobe C/T genotipa (heterozigoti) imaju 1.9 puta veći rizik za oboljevanje od BCK-a u poređenju sa CC genotipom.

Studija Zhang-a i saradnika (2012) na kineskoj populaciji koja je obuhvatila 4124 pacijenta obolelih od različitih tipova kancera i 4728 kontrola ispitala je navedeni polimorfizam u MMP-9 genu i njegovu povezanost sa malignitetima, ali nije utvrđeno postojanje asocijacije navedenog polimorfizma sa nekim od glavnih tipova kancera.

Kada su u pitanju karcinomi kože, Cotignola i saradnici (2007) su ispitali različite polimorfizme u genu za MMP-9, između ostalog i rs3918242 i njihovu povezanost sa malignim melanomom. Studija je obuhvatila 1002 pacijenta sa dijagnostifikovanim malignim karcinomom kože, a od toga 96% pripadalo je populaciji Kavkazijanaca. Ustanovili su da je ređi alel T bio prisutniji kod pacijenata koji su imali opekotine usled dugotrajnog izlaganja Suncu, imali porodičnu istoriju ove bolesti i viši melanomski stadijum, ali bez statističke značajnosti. Pored ovih, postoje i studije u kojima je analizirana ekspresija MMP-9 i njena uloga u razvoju melanoma. Ukazano je da ćelije invazivnog melanoma pokazuju višu ekspresiju MMP-9 u poređenju sa neinvazivnim tipom tumora (Zhao i sar., 2001; Shellman i sar., 2006). Isto tako i serumski nivoi MMP-9 mogu biti korisni u predviđanju toka bolesti kod pacijenata sa ovim oblikom karcinoma kože (Zucker i sar., 1999; Makowski i Ramsby, 2003; Nikkola i sar., 2005; Jung i sar., 2005). Ovakvi nalazi dobijeni za maligni melanom, ukazuju da bi proučavanje ekspresije MMP-9 gena kod bazocelularnih karcinoma dodatno rasvetlelo značaj prisustva raličitih alelskih varijanti -1562 C/T MMP-9 polimorfizma.

Najnovija studija Fu-a i saradnika (2012), koji su ispitali ekspresiju MMP-9 u nemelanomskim karcinomima kože pokazala je da ova matriksna metaloproteinaza može imati značajnu ulogu u razvoju, progresiji, invaziji i metastazama i skvamocelularnog i bazocelularnog karcinoma kože. Takođe, studija iz okruženja, Zlatarova-e i saradnika (2011) na bazocelularnim karcinomima očnih kapaka, utvrdila je da je povišen nivo ekspresije MMP-9 povezan sa lošijom

prognozom ovog tipa karcinoma i da ekspresija MMP-9 može poslužiti kao prognostički marker za ranu invazivnost tumora.

U analizama oralnog skvamocelularnog karcinoma značajno veća učestalost T alela je primećena među pacijentima pušačima, ali mali broj nepušača među pacijentima ne dozvoljava donošenje zaključaka o kombinovanom efektu duvanskog dima i visokih nivoa MMP-9. Sinergistički efekat pušenja i prekomernog konzumiranja alkohola je značajno bio udružen sa većom učestalošću T alela, mada je ova grupa pacijenata bila brojno ograničena. Ispitivani MMP-9 polimorfizam je u jakoj asocijaciji sa povećanim rizikom za razvoj oralnog kancera. Činjenica da nosioci T alela imaju povećanu sklonost ka razvoju oralnog karcinoma samo u inicijalnim stadijumima, ali ne i u odmaklim, može se objasniti učešćem MMP-9 u inhibiciji angiogeneze produkcijom angiostatina iz plazminogena (Vairaktaris i sar., 2008). Inače, koncentracije MMP-9 kod osoba koje puše su značajno više nego kod nepušača i povezane su sa dužinom pušačkog staža (Nakamura i sar., 1998).

Bez obzira na neosporan značaj MMP-9 kao pokazatelja patoloških procesa koji se događaju u organizmu, relativno je mali broj studija koje se bave polimorfizmom u ovom genu, a posebno u bazocelularnim karcinomima. Prekomerna ekspresija MMP-9 je detektovana u 39.5% ispitivanih pacijenata sa oralnim skvamocelularnim karcinomom u studiji Nagpal-a i Das-a (2003), dok je u studiji Tu-a i saradnika (2007) pokazano da ne postoji asocijacija ovog polimorfizma sa oralnim skvamocelularnim karcinomom, ali da postoje neke razlike među pacijentima zavisno kom starosnom dobu pripadaju. Takođe, jedna grčka studija (Vairaktaris i sar., 2007) jasno pokazuje vezu ovog polimorfizma sa skvamocelularnim karcinomom usne regije. Takođe, MMP-9 aktivnost je značajno povećana kod pacijenata sa laringealnim i orofaringealnim kancerom u poređenju sa kontrolnom grupom. Približno 78% pacijenata sa karcinomom larinksa i 85% pacijenata sa malignim tumorima orofarinksa su pokazali visoke vrednosti ovog enzima, dok učestalost kod zdravih osoba sa visokim vrednostima ne prelazi 20% (Ranuncolo i sar., 2002). Naša analiza genotipova ljudi obolelih od bazocelularnog karcinoma je isključila asocijaciju polimorfizma -1562 C/T sa ovim karcinomom. Ovakvi konfliktni rezultati o ulozi MMP-9 polimorfizma u različitim oboljenjima

mogu biti rezultat etničkih varijacija učestalosti -1562T alela. Prethodno izneti podaci ukazuju da polimorfizam -1562C/T MMP-9 gena može da moduliše rizik oboljevanja od nekih maligniteta, pa i bazocelularnog karcinoma. Takođe bitna je i sprega faktora sredine (duvanski dim, alkohol) sa ovim SNP. Sledi da u kancerogenezi, MMP-9 polimorfizam predstavlja paradigmu interakcije genotipa i sredine.

5.4. Polimorfizam u genu za survivin, rs9904341

Survivin, član familije inhibitora apoptoze, eksprimiran je tokom embrionalnog razvića dok kasnije izostaje u većini normalnih tkiva adultnih individua. Njegova prekomerna ekspresija javlja se u većem broju malignih i benignih tumora (Altieri, 2006, 2010, Andrić, 2012). Sa stanovišta problematike ove disertacije, jako bitan podatak je da je survivin prisutan u manjim količinama u keratinocitama bazalnih ćelija normalnog epidermisa. Zanimljivi su i najnoviji rezultati Al-Khalaf-a i Abussekharra-e (2012) koji su pokazali povećanu ekspresiju survivina u starijim ćelijama i organima, odnosno povećanje ekspresije survivina tokom procesa starenja. Ovo je veoma značajan podatak s obzirom da incidenca malignih tumora, pa i bazocelularnog karcinoma takođe raste sa godinama života.

Polimorfizam u genu za survivin, smešten na poziciji -31 u promotorskom regionu, predstavlja supstituciju guanina citozinom. Ovaj deo promotorskog regiona važan je za regulaciju ekspresije survivina, na način zavistan od faze ćelijskog ciklusa. Zato se danas sve više ispituju različiti polimorfizmi upravo u ovom regionu. Za ovaj polimorfizam je pokazano da doprinosi povećanju rizika oboljevanja od različitih tipova kancera, jer dovodi do derepresije, tj. povećane ekspresije survivina.

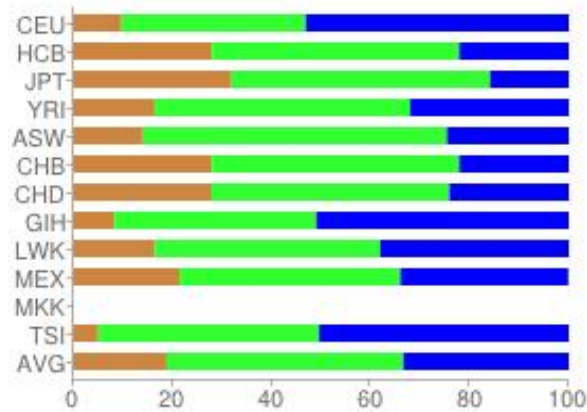
Prema našem saznanju, u dostupnoj literaturi ne postoje podaci o povezanosti polimorfizma -31G/C sa bazocelularnim karcinomom, ali ih ima u vezi sa drugim tipovima kancera. Cheng i saradnici (2008) su utvrdili da su učestalosti -31C alela i C/C genotipa značajno viši kod osoba obolelih od karcinoma želuca,

nego kod zdravih osoba, ali da s druge strane prekomerno eksprimirana iRNK za survivin u tumorskim tkivima ne pokazuje značajne razlike u odnosu na pojedine genotipove. Yang i sar. (2009) su, ispitujući takođe kinesku populaciju, ustanovili da nema statistički značajne veze između karcinoma želuca i varijantnih genotipova (G/G+G/C). U slučaju urotelijalnog karcinoma u jednoj tajvanskoj populaciji, pokazano je da C/C i C/G genotipovi u poređenju sa G/G genotipom više doprinose nastanku, kao i napredovanju ovog tipa tumora (Wang i sar., 2009). Han i sar. (2009) su utvrdili da genotip C/C u odnosu na G/G više doprinosi (ali bez statističke značajnosti) ranijem oboljevanju (u mlađoj životnoj dobi) od primarnog epitelijalnog karcinoma ovarijuma. U slučaju ezofagealnog skvamocelularnog karcinoma, Yang i sar. (2009) su proučavali više polimorfizama u genu za survivin, među njima i -31G/C, i utvrdili da alel -31C povećava rizik od oboljevanja, a da se alel -31G ponaša kao protektivni alel. Jang i sar. su ustanovili da G/G i C/G genotipovi u odnosu na C/C genotip pokazuju niži rizik od oboljevanja od kancera pluća. Borbely i sar. (2008) su ispitivali vezu između ovog polimorfizma i razvoja karcinoma grlića materice u populaciji Mađarske i rezultati nisu ukazali na postojanje veze.

S obzirom da se radi o kanceru koji obuhvata region glave i vrata, studija Upadhyay i saradnika (2011) je bila vrlo interesantna. Oni su se bavili ispitivanjem ovog polimorfizma i njegovom povezanošću sa kancerom jednjaka u populaciji severne Indije. Analiza je ukazala na vezu C/C genotipa i povećanog rizika za oboljevanje od kancera jednjaka. Takođe, pored indijske i u kineskoj populaciji, je pokazana asocijacija između skvamocelularnog karcinoma jednjaka i ovog SNP. U tajvanskoj populaciji je već ranije pokazano da je oralni kancer uglavnom uslovljen faktorima sredine, kao što je žvakanje duvana, a analiza Weng i sar. (2012), na 439 pacijenata i 424 kontrole koje su uključivale samo pripadnike muškog pola ustanovila je i značaj polimorfizma u survivinu kao faktora rizika. Našli su da -31GG homozigoti pokazuju statistički značajno viši rizik za oboljevanje od ovog kancera, kao i da je -31G alel prisutniji u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu.

Studija Andrića i saradnika (2012) ispitala je povezanost rs9904341 polimorfizma sa razvojem keratocističnih odontogenih tumora (KCOT) i utvrdila je postojanje asocijacije. U njihovoj studiji G alel je zastupljeniji u grupi pacijenata sa KCOT u poređenju sa kontrolnom grupom, a C/G heterozigoti imaju manji rizik za razvoj ovog tumora u poređenju sa G/G genotipom. Isto je potvrđeno i za C/G+C/C u poređenju sa G/G genotipom. Zaključak je da G/G genotip može biti faktor rizika za razvoj keratocističnih odontogenih tumora u populaciji Srbije.

Naša studija je pokazala da nosioci C alela imaju manji rizik za oboljevanje od bazocelularnog karcinoma u poređenju sa nosiocima G alela, kao i da C/C i C/G genotipovi u odnosu na G/G genotip imaju manji rizik za oboljevanje od ovog tipa karcinoma, što je u skladu sa rezultatima prethodno pomenute studije, ali te vrednosti nisu pokazale statističku značajnost. Međutim, kada se podaci učestalosti genotipova kombinuju sa podacima o starosti ispitanika, polu, konzumaciji alkohola i cigareta, heterozigoti C/G genotipa ispoljavaju statistički značajno smanjen rizik za oboljevanje od BCK-a u odnosu na homozigote G/G ($p=0.047$), kao i u prethodno pomenutoj studiji. U našoj studiji u kontrolnoj grupi C/C genotip je zastupljen sa 11.4%, C/G 48.6%, a G/G sa 40%. Sumirane studije o ovom polimorfizmu i njegovim učestalostima genotipova na Evropskom kontinentu dale su skoro identične rezultate: C/C oko 10%, C/G oko 40%, G/G oko 50%, dok sumirane vrednosti svih studija u svetu imaju drugačiju raspodelu: C/C oko 20%, C/G 45%, G/G 35%. Na dalekom istoku, u Kini i Japanu, te vrednosti daleko su drugačije: C/C oko 30%, C/G oko 55%, a G/G oko 15% kao najmanje zastupljen genotip. Ovi podaci jasno govore o velikim etničkim varijacijama učestalosti alela, pa tako ne iznenađuju često vrlo kontradiktorni podaci o značaju pojedinih polimorfizama i njihovoj povezanosti sa različitim patologijama. Rezultati naše studije uklapaju se u podatke koji postoje za različite Evropske populacije u pogledu učestalosti alela i genotipova.



Slika 47: Učestalost genotipova u analizi polimorfizma rs9904341 gena za survivin u različitim delovima sveta; C/C narandžasto, C/G zeleno, G/G plavo obojeno; prvi red CEU se odnosi na Evropski kontinent

preuzeto: <http://www.snpedia.com/index.php/Rs9904341>

Meta-analiza Weng-a i sar. iz 2012. godine, na 3485 pacijenata obolelih od različitih tipova kancera i 3964 kontrole pokazala je da ovaj polimorfizam ima značajnu ulogu u razvoju kancera, posebno u Azijskoj populaciji. Kada se analiza uradi prema tipovima kancera gubi se statistička značajnost. Zbog svega navedenog, Wang i sar. su zaključili da polimorfizam gena za survivin na poziciji -31 može da varira u svojoj ulozi zavisno od tipa kancera, ali i da zavisi od rase kao faktora za predispoziciju razvoja kancera. Svakako, dalje proširivanje ove studije bi trebalo da uključi ispitivanje ekspresije gena za survivin, kao i uticaj još nekih sredinskih faktora i interakciju genotipa i sredine.

5.5. Polimorfizmi u TP53 genu, Pro47Ser i rs17878362

Bazocelularni karcinom je najčešća neoplazma u populaciji Kavkazijanaca i uglavnom je uzrokovan UV zračenjem, odnosno akumulacijom mutacija indukovanih UV zračenjem. Čelija i njeni procesi opstaju i pored stalne izloženosti mutagenim događajima, zahvaljujući mogućnosti popravke nastalih DNK oštećenja kao i mogućnosti indukcije apoptoze, kojom se eliminišu oštećene ćelije. Zato mutacije u genima uključenim u reparacione mehanizme ili kontrolu ćelijskog ciklusa mogu da dovedu do abnormalne ćelijske proliferacije i razvoja kancera.

Činjenica da je gubitak funkcije TP53 gena zabeležen u više od polovine humanih kancera čini vrlo značajnim razmatranje uloge ovog gena u kancerogenezi. Mutacije ovog gena su nađene u skoro svim tipovima kancera, a njihova učestalost varira među različitim tipovima kancera. Ali, sem promena u strukturi ovih gena, značajna je i promena u njihovoj ekspresiji. Utvrđeno je da preko 80% pacijenata obolelih od bazocelularnog karcinoma imaju prekomernu ekspresiju p53 proteina (Shea i sar., 1992). Štaviše, pokazano je da su agresivnije forme BCK-a značajno povezane sa povećanom ekspresijom p53 proteina. Analiza Rajabi-a i saradnika (2006), bazirana na imunohistohemijским analizama, je pokazala prekomernu ekspresiju ovog proteina i u netumorskom epidermisu osoba sa BCK-om, što je značajno asocirano sa izloženošću kože sunčevom zračenju. Takođe, u njihovoj studiji je pokazano da je ekspresija p53 proteina zavisna od godina starosti pacijenata, tako da bi rana akumulacija ovog proteina mogla biti jedan od pokazatelja za detekciju nemelanomskog karcinoma kože. Treći zaključak njihove studije je da imunohemijske tehnike ne mogu da detektuju genomsku nestabilnost ili abnormalnosti nastale u ćelijskom ciklusu, pa stoga preporučuju molekularne tehnike za preciznu i ranu detekciju mutacija u TP53 genu.

Naša analiza je imala za cilj da ispita asocijaciju bazocelularnog karcinoma i polimorfizama u egzonu 4, kodona 47 koja indukuje zamenu aminokiseline prolin serinom i u intronu 3, inserciju od 16bp (rs17878362) i nastanak bazocelularnog karcinoma. Pro47Ser je redak polimorfizam, odnosno Ser47 varijanta vrlo je retka, sa alelskom učestalošću od 5% u populacijama Afričkog porekla, dok je u populaciji Kavkazijanaca 0%. Pretpostavlja se da ovaj polimorfizam smanjuje transaktivaciju proapoptotskih ciljnih gena, što bi potencijalno povećalo rizik za nastanak kancera (Feng i sar., 2006; Kurihara i sar., 2007). Međutim, Li i sar. (2005) su pokazali da se Ser47 i *wild type* protein ne razlikuju po sposobnosti vezivanja za DNK, prenosu u mitohondrije, regulaciji ekspresije većine TP53 ciljnih gena, ali funkcionalni dokazi u različitim eksperimentalnim sistemima pokazuju neusaglašenost. Studija Toledo i sar. (2006) na miševima je pokazala da blokirana Ser46 fosforilacija ima samo neznatne fenotipske posledice. To je navelo na zaključak Olivier i sar. (2010) da je

moguće da ovaj polimorfizam utiče na p53 funkciju samo pod specifičnim uslovima. U literaturi se mogu naći različiti rezultati analize ovog polimorfizma i njegovog uticaja na razvoj kancera. Jedino je studija Almeida i sar. (2009) pokazala asocijaciju Ser47 alela sa razvojem ekstra-aksijalnih tumora mozga. Sameer i sar. (2010) nisu pronašli asocijaciju ovog polimorfizma sa razvojem kolorektalnog kancera u populaciji iz Kašmira, kao ni Pinto i sar. (2008) koji su ispitivali vezu između ovog polimorfizma i razvoja glioma u Brazilskoj populaciji. Rezultati naše analize su pokazali potpuno odsustvo Ser47 varijante u našoj populaciji, odnosno u obe ispitivane grupe bili su prisutni samo *wild type* homozigoti. Iako nema asocijacije ovog polimorfizma sa rizikom za nastanak bazocelularnog karcinoma, ovaj rezultat potvrđuje podatke iz literature o učestalosti ove mutirane alelske varijante. S obzirom da nema puno studija o ovom polimorfizmu, ostaje da se njegov uticaj na predispoziciju za razvoj kancera dalje proučava.

Drugi analizirani polimorfizam TP53 gena, je insercioni polimorfizam od 16bp u intronu 3 (TP53PIN3 Ins 16bp), sa alelima koji se označavaju kao A1 i A2, pri čemu je alel A2 sa prisutnom insercijom. Biološki efekti ovog polimorfizma nisu razjašnjeni, ali je poznato da polimorfizmi u intronima mogu bitno da utiču na kodirajući region gena i da povećavaju verovatnoću nastanka štetnog fenotipa (Malkinson, 1994). Takođe, mutacije u intronskim sekvencama mogu da utiču na regulaciju genske ekspresije i interakcije DNK i proteina (Lozano i Levine, 1991; Shamsheer i Montano, 1996; Avigad i sar., 1997). Meta-analiza Hu i sar. (2010), koja je obuhvatila 9801 pacijenta obolelih od različitih tipova kancera i 10391 kontrola iz 26 studija, pokazala je povezanost ovog polimorfizma sa povećanim rizikom za nastanak kancera, što ga čini potencijalno važnim i klinički relevantnim genetičkim markerom.

Costa i sar. (2008) su utvrdili da žene sa A2/A2 genotipom imaju povećan rizik za razvoja kancera dojke, čak i bez familijarne istorije ove bolesti, kao i da je ovaj polimorfizam povezan sa pojavom metastaza u limfnim čvorovima. Takođe, studija sprovedena na populaciji Hrvatske potvrdila je povezanost ovog polimorfizma i sporadičnog kancera dojke kod žena (Bisof i sar., 2010), kao i studija Faghani i sar. (2011) na populaciji Irana, gde su žene heterozigoti A1/A2

imale povećan rizik za nastanak ovog tipa kancera. Suprotno ovim rezultatima, Hrtska i sar. (2009) na češkoj populaciji nisu uočili povezanost ovog polimorfizma i kancera dojke, i pripisuju tu razliku u odnosu na prethodne studije postojanju geografsko-rasnim razlikama. Međutim, oni su uočili povezanost sa većom incidencom metastaza limfnih čvorova, što pruža razloge za dalja ispitivanja. Isti rezultat su dobili i Trifa i sar. (2010) na tunižanskoj populaciji. Khaliq i sar. (2000) su ispitivali ovaj polimorfizam i njegovu povezanost sa kancerom dojke u 9 etničkih grupa Pakistana i pokazali da zaista postoje razlike u alelskim učestalostima. Odsustvo insercije 16bp bilo je uobičajeno za etničke grupe na severu, a najveća učestalost ove alelske varijante je među grupom Hazara.

U studiji na populaciji Nemačke, Wang-Gohrke i sar. (1999) su pokazali povezanost ovog polimorfizma sa povećanim rizikom za kancer ovarijuma, ali ne u slučaju nosilaca BRCA1 i BRCA2 naslednih mutacija. Do sada je samo jedna studija pokazala da PIN3 A2 alel smanjuje nivo iRNK i pokazala je moguću vezu ove alelske varijante TP53 sa rizikom za kolorektalni kancer (Gemignani i sar., 2004).

Znatno slabija prognoza kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća (*engl. Non-Small Cell Lung Carcinoma, NSCLC*) je takođe povezana sa ovim polimorfizmom (Boldrini i sar., 2008). Zbog toga što postoji razlika u riziku za razvoj kancera pluća među različitim etničkim grupama Wu i sar. (2002) su ispitivali povezanost između pripadnosti određenoj etničkoj grupi i ovog polimorfizma sa rizikom za kancer pluća. Takođe su ispitivali funkcionalnost TP53 varijanti u apoptozi i DNK reparaciji. Raspodela učestalosti genotipova i haplotipova je bila izuzetno zavisna od etničke grupe, ali u svim etničkim grupama je PIN3 Ins 16bp polimorfizam bio povezan sa povećanim rizikom za kancer pluća. Limfoblastoidne ćelijske linije sa *wt* alelima su imale značajno veće apoptotske indekse i sposobnost za reparaciju DNK nego ćelijske linije sa jednim mutiranim alelom.

U literaturi nismo naišli na podatke o asocijaciji ovog polimorfizma TP53 gena sa bazocelularnim karcinomom, što dodatno uvećava značaj našeg istraživanja. Rezultati naše analize su pokazali da heterozigoti nose čak 2.40 puta

veći rizik za oboljevanje od BCK-a u poređenju sa homozigotima bez duplikacije, kao i udruženi heterozigoti sa homozigotima sa insercijom, 2.16 puta veći rizik u odnosu na homozigote bez insercije. Obe vrednosti su statistički značajne, a kao zaključak se nameće činjenica da se u našoj populaciji TP53 PIN3 Ins 16bp polimorfizam može smatrati genetičkim markerom za razvoj bazocelularnog karcinoma. Meta-analiza na 26 populacija Hu-a i sar. (2010) je pokazala da alel sa insercijom A2 nosi povećan rizik za razvoj kancera, posebno kada se analiziraju združeno heterozigoti i homozigoti sa insercijom u poređenju sa A1/A1 homozigotima, OR=1.14, što znači da su podaci dobijeni u ovoj studiji u priličnoj saglasnosti sa podacima sličnih istraživanja urađenih na različitim tipovima kancera.

Svakako, kako bi se ovo istraživanje proširilo u budućnosti bi bilo dobro uzeti u razmatranje analizu ekspresije proučavanih gena, kao i uticaj još nekih spoljašnjih faktora, npr. izloženost UV zračenju.

6. ZAKLJUČCI

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

- ❖ Najveći broj pacijenata (84%) su stariji od 60 godina, što potvrđuje dosadašnje tvrdnje da je bazocelularni karcinom češći u starijem delu populacije i da se incidenca njegovog nastanka povećava sa godinama. Dobijeni rezultati pokazuju takođe da nema razlike među polovima u zastupljenosti bazocelularnog karcinoma u regionu glave i vrata. Istovremeno, najveći broj pacijenata je imao tumor na nosu, kao najisturenijem delu lica.
- ❖ Između grupe pacijenata sa bazocelularnim karcinomom i kontrolne grupe nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti alela i genotipova za -308 G/A promotorski polimorfizam u TNF alpha genu, pa se on ne može smatrati faktorom rizika za nastanak ovog karcinoma.
- ❖ Nije uočena statistički značajna razlika ni u distribuciji alela i genotipova između pacijenata i zdravih kontrola za polimorfizam +36 A/G u genu za TNF-R1, što znači da ni ovaj polimorfizam nije modulator rizika za nastanak bazocelularnog karcinoma u našoj populaciji.
- ❖ Analiza polimorfizma +676 T/G gena za TNF-R2 pokazala je statistički značajnu razliku učestalosti i genotipova i alela između grupe pacijenata sa bazocelularnim karcinomom i kontrolne grupe. Rezultati logističke regresione analize pokazali su postojanje značajano povećanog rizika za oboljevanje od BCK-a kod osoba nosiosa G alela.
- ❖ Podaci dobijeni analizom učestalosti alela i genotipova pacijenata sa bazocelularnim karcinomom kože, i njihovim poređenjem sa kontrolnom grupom zdravih individua pokazali su odsustvo asocijacije promotorskog polimorfizma -1562C/T MMP- 9 gena sa rizikom oboljevanja od ovog tipa kancera.

- ❖ Ispitivanje polimorfizma -31G/C u genu za survivin je pokazalo da heterozigoti imaju značajno smanjen rizik za oboljevanje od bazocelularnog karcinoma u poređenju sa G/G homozigotima kada su u analizu uključeni podaci o konzumaciji alkohola i cigareta, što ukazuje na jačinu kombinovanog efekta genotipa i sredine na krajnji ishod.
- ❖ Nije uočena razlika u distribuciji alela i genotipova između grupe pacijanata i kontrolne grupe za polimorfizam Pro47Ser u TP53 genu, pa se tako ovaj polimorfizam nukleotidne sekvence ne može smatrati faktorom rizika za pojavu bazocelularnog karcinoma.
- ❖ Insercioni polimorfizam u TP53 genu, PIN3 Ins 16bp, pokazao je značajnu razliku učestalosti genotipova u dve analizirane grupe. Heterozigoti A1/A2 pokazuju značajno smanjen rizik za razvoj bazocelularnog karcinoma u poređenju sa homozigotima bez insercije, tako da se ovaj polimorfizam takođe može smatrati modulatorom rizika za nastanak bazocelularnog karcinoma kože.
- ❖ Iako je ovo istraživanje bazirano na analizi polimorfizama nekoliko rezultati daju dobre smernice za buduća istraživanja koja bi mogla da obuhvate i analize ekspresije ovih gena, postojanje njihove interakcije, postojanje neravnoteže vezanosti i interakcije genotipova i nekih sredinskih faktora.

7. LITERATURA

A

Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR.: p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 8493-9497.

Aggrawal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double edge sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745-756.

Ahirwar D, Kesarwani P, Manchanda PK, Mandhani A, Mittal RD. Anti- and proinflammatory cytokine gene polymorphism and genetic predisposition: association with smoking, tumor stage and grade, and bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008 Jul;184(1):1-8.

Aksentjevich I, Galon J, Soares M, Mansfield E, Hull K, Oh HH, et al. The tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies, and evidence for future genetic heterogeneity of periodic feveres, *Am J Hum Genet* 2001;69(2):301-14.

Akyurek N, Yongsheng R, Rassidakis GZ, Schlette EJ, Medeiros LJ. Expression of inhibitor of apoptosis proteins in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *Cancer.* 2006; 107:1844-51.

Al-Khalaf HH, Aboussekhra A. Survivin expression increases during aging and enhances the resistance of aged human fibroblasts to genotoxic stress. *Age (Dordr).* 2012 Jan 15.

Almeida LO, Custódio AC, Pinto GR, Santos MJ, Almeida JR, Clara CA, Rey JA, Casartelli C. Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors. *Genet Mol Res.* 2009; 8(1):8-18.

Altieri DC. The molecular basis and potential role of surviving in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med.* 2001; 7:542-547.

Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3 (1): 46-54.

Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. 2003 Nov 24;22(53):8581-9.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-21.

Andric M, Nikolic N, Boskovic M, Milicic B, Skodric S, Basta Jovanovic G, Milasin J. Survivin gene promoter polymorphism -31G/C as a risk factor for keratocystic odontogenic tumor development. *Eur J Oral Sci*. 2012 Feb;120(1):9-13. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00919.x.

Asahina M, Yoshiyama Y, Hattori T: Expression of matrix metalloproteinase-9 and urinary-type plasminogen activator in Alzheimer's disease brain. *Clin Neuropathol*. 2001; 20: 60-63.

Atkinson JJ, Senior RM. Matrix Metalloproteinase 9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Jan;28(1):12-24.

Avigad S, Barel D, Blau O, Malka A, Zoldan M, Mor C, et al. A novel germ line p53 mutation in intron 6 in diverse childhood malignancies. *Oncogene* 1997;14:1541-5.

Azmy IA, Balasubramanian SP, Wilson AG, Stephenson TJ, Cox A, Brown NJ, et al. Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. *Breast Cancer Res*. 2004;6(4):R395-400.

Azmy IA, Balasubramanian SP, Wilson GA, Stephenson JT, Cox A, Brown JN, and Reed WM. Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. *Breast Cancer Res*. 2004; 6, R395-R400.

B

Baker E, Chen LZ, Smith CA, Callen DF, Goodwin R, Sutherland GR: Chromosomal location of the human tumor necrosis factor receptor genes. *Cytogenet Cell Genet*. 1991, 57:117-118.

Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H, Ng SC: Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood*. 2000; 96:4002-3.

Barnes PJ. New treatments for COPD. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Jun;1(6):437-46.

Baskic D., Aćimović Lj., Đurđević P., Đukić A., Arsenijević N. Apoptoza, programirana ćelijska smrt. *Medicus*. 2002; 3(2): 22-25.

Baştürk B, Yavaşcaoğlu I, Vuruşkan H, Göral G, Oktay B, Oral HB. Cytokine gene polymorphisms as potential risk and protective factors in renal cell carcinoma. *Cytokine*. 2005 Apr 7;30(1):41-5.

Bazzoni F, Gatto I, Lenzi L, Vinante F, Pizzolo G, Zanolin E, De Gironcoli M. Identification of novel polymorphisms in the human TNFR1 gene; distribution in acute leukemia patients and healthy individuals. *Immunogenetics*. 2000;51(2):159-63

Beltinger CP, White PS, Maris JM, Sulman EP, Jensen SJ, LePaslier D, Stallard BJ, Goeddel DV, de Sauvage FJ, Brodeur GM. Physical mapping and genomic structure of the human TNFR2 gene. *Genomics*. 1996 Jul 1;35(1):94-100.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*. 2000 Oct;2(10):737-44.

Birgander R, Sjölander A, Rannug A, Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegård J, Tornling G, Beckman G, Beckman L. P53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer. *Carcinogenesis*. 1995 Sep;16(9):2233-6.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(2):197-250.

Bisof V, Salihović MP, Narancić NS, Skarić-Jurić T, Jakić-Razumović J, Janićijević B, Turek S, Rudan P. TP53 gene polymorphisms and breast cancer in Croatian women: a pilot study. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2010; 31(5):539-44.

Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Greco G, Mussi A, Donati V, Fontanini G. Effect of the p53 codon 72 and intron 3 polymorphisms on non-small cell lung cancer (NSCLC) prognosis. *Cancer Invest.* 2008; 26(2):168-72.

Borbély AA, Murvai M, Szarka K, Kónya J, Gergely L, Hernádi Z, Veress G. Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 2007 Mar;60(3):303-6. Epub 2006 May 19.

Boukamp P. UV-induced skin cancer: similarities--variations. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2005 Jul;3(7):493-503.

Bouma G., Crusius J.B., Oudkerk P.M., Kolkman J.J., von Blomberg B.M., Kostense P.J., Giphart M.J., Schreuder G.M., Meuwissen S.G., Peña A.S. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand. J. Immunol.* 43 (1996) 456–463.

Boyd AS, Shyr Y, King LE Jr. Basal cell carcinoma in young women: an evaluation of the association of tanning bed use and smoking. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 46:706-9.

Brash DE, Ponten J. Skin precancer. *Cancer Surv.* 1998; 32:69-113.

Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer.* 2009 Oct;9(10):701-13.

Buchs N, di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes Immun.* 2001; 2:222–8.

C

Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM, Altura RA. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene*. 2005 Mar 17;24(12):1994-2007.

Cancer Council Australia and Australian Cancer Network. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma (and related lesions) . A guide to clinical management in Australia. Sydney, 2008.

Cheng ZJ, Hu LH, Huang SJ. Correlation of -31G/C polymorphisms of survivin promoter to tumorigenesis of gastric carcinoma. *Ai Zheng*. 2008 Mar;27(3):258-63.

Chung S. Basal Cell Carcinoma. *Arch Plast Surg*. 2012; 39: 166-70.

Costa S, Pinto DR, Pereira D, Rodrigues H, Gameselle-Teijeiro J, Medeiros R, Schmitt F. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer*. 2008; 8:32.

Cotignola J, Reva B, Mitra N, Ishill N, Chuai S, Patel A, Shah S, Vanderbeek G, Coit D, Busam K, Halpern A, Houghton A, Sander C, Berwick M, Orlow I. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. *BMC Med Genet*. 2007 Mar 8;8:10.

Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*. 2000 Oct 27;103(3):481-90.

D

De Vecchi G, Verderio P, Pizzamiglio S, Manoukian S, Bernard L, Pensotti V, Volorio S, Ravagnani F, Radice P, Peterlongo P. The p53 Arg72Pro and Ins16bp polymorphisms and their haplotypes are not associated with breast cancer risk in BRCA-mutation negative familial cases. *Cancer Detect Prev*. 2008;32(2):140-3.

Demeter J, Porzsolt F, Rämisch S, Schmid M, Messer G. Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in hairy cell leukaemia. *Br J Haematol.* 1997 Apr;97(1):132-4.

Denissenko MF, Pao A, Tang MS, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 1996; 274:430-2.

Detanac DŽ: Etiopatogeneza bazocelularnog karcinoma, *Med Čas:* 2010; 4: 25-29.

Devarajan P, Johnston JJ, Ginsberg SS, Van Wart HE, Berliner N. Structure and expression of neutrophil gelatinase cDNA. Identity with type IV collagenase from HT1080 cells. *J Biol Chem.* 1992 Dec 15;267(35):25228-32.

Dieude P, Osorio J, Petit-Teixeira E, Moreno S, Garnier S, Cailleau-Moindrault S, et al. A TNFR1 genotype with a protective role in familial rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:413–19.

Diffey BL. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Phys Med Biol.* 1991 Mar;36(3):299-328.

Dredge K, Marriott JB, Dalglish AG. Immunological effects of thalidomide and its chemical and functional analogs. *Crit Rev Immunol.* 2002;22(5-6):425-37.

Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A, Pereira D, Moutinho J, Canedo P, Machado JC, Medeiros R. G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Aug 26;334(2):588-92.

E

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002 Mar;2(3):161-74.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):817-25.

Epstein EH Jr. Basal cell nevus syndrome. In: Freedberg IM, ed. *Fitzpatrick's dermatology in general Medicine*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1999: 1862-5.

F

Fabris M, Di Poi E, D'Elia A, Damante G, Sinigaglia L, Ferraccioli G. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002 Jan;29(1):29-33.

Faghani M, Ghasemi FM, Nikhbakht M, Salehi M. TP53 PIN3 polymorphism associated with breast cancer risk in Iranian women. *Indian J Cancer*. 2011 Jul-Sep;48(3):298-302.

Felley-Bosco E, Weston A, Cawley HM, Bennett WP, Harris CC. Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. *Am J Hum Genet*. 1993 Sep;53(3):752-9.

Feng L, Hollstein M, Xu Y. Ser46 phosphorylation regulates p53-dependent apoptosis and replicative senescence. *Cell Cycle*. 2006 Dec;5(23):2812-9.

Ferrajoli A, Keating MJ, Manshoury T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z, Koller CA, Kurzrock R, Thomas DA, Faderl S, Lerner S, O'Brien S, Albitar M. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1215-9.

Foster PJ, Dunn EA, Karl KE, Snir JA, Nycz CM, Harvey AJ, Pettis RJ. Cellular magnetic resonance imaging: in vivo imaging of melanoma cells in lymph nodes of mice. *Neoplasia*. 2008 Mar;10(3):207-16.

Frazer K, Murray S, Schor N, Topol E. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 241-251.

Fu XR, Zhang C, Chen CY, Zhang L, Wang LX, Wang BH, Liu XY, Zhang MZ. Expression and significance of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in non-melanoma skin cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2012 May;34(5):369-73.

G

Gallagher RP, Bajdik CD, Fincham S, Hill GB, Keefe AR, Coldman A, McLean DI. Chemical exposures, medical history, and risk of squamous and basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996 Jun;5(6):419-24.

Gambichler T, Skrygan M, Hyun J, Bechara F, Tomi NS, Altmeyer P, Kreuter A. Cytokine mRNA expression in basal cell carcinoma. *Arch Dermatol Res*. 2006 Aug;298(3):139-41. Epub 2006 Jul 7.

Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol*. 2003 Oct 15;66(8):1403-8.

Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutiérrez-Enríquez S, Hall J, Guino E, Peinado MA, Capella G, Canzian F. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene*. 2004 Mar 11;23(10):1954-6.

Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*. 1998 Oct 1;12(19):2973-83.

Glenn CL, Wang WY, Benjafield AV, Morris BJ. Linkage and association of tumor necrosis factor receptor 2 locus with hypertension, hypercholesterolemia and plasma shed receptor. *Hum Mol Genet*. 2000 Aug 12;9(13):1943-9.

Gloster HM Jr, Brodland DG. The epidemiology of skin cancer. *Dermatol Surg*. 1996 Mar;22(3):217-26.

Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents

dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem.* 1992 Mar 5;267(7):4583-91.

Grabowski P, Kühnel T, Mühr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Höpfner M, Germer CT, Scherübl H. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2003 Jan 13;88(1):115-9.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1309-12.

Guan X, Liao Z, Ma H, Qian J, Liu Z, Yuan X, Gomez D, Komaki R, Wang LE, Wei Q. TNFRSF1B +676 T>G polymorphism predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with chemoradiotherapy. *BMC Cancer.* 2011 Oct 14;11:447.

Gupta R, Sharma SC, Das SN. Association of TNF-alpha and TNFR1 promoters and 3' UTR region of TNFR2 gene polymorphisms with genetic susceptibility to tobacco-related oral carcinoma in Asian Indians. *Oral Oncol.* 2008 May;44(5):455-63. Epub 2008 Feb 21.

H

Haider S, Knöfler M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta.* 2009 Feb;30(2):111-23. Epub 2008 Nov 22.

Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech.* 2000 Aug 1;50(3):216-28.

Hajeer AH, Lear JT, Ollier WE, Naves M, Worthington J, Bell DA, Smith AG, Bowers WP, Jones PW, Strange RC, Fryer AA. Preliminary evidence of an association of tumour necrosis factor microsatellites with increased risk of multiple basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 2000 Mar;142(3):441-5.

Han CH, Wei Q, Lu KK, Liu Z, Mills GB, Wang LE. Polymorphisms in the survivin promoter are associated with age of onset of ovarian cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2009 Oct 31;2(4):289-99.

Han YP, Nien YD, Garner WL. Tumor necrosis factor-alpha-induced proteolytic activation of pro-matrix metalloproteinase-9 by human skin is controlled by down-regulating tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and mediated by tissue-associated chymotrypsin-like proteinase. *J Biol Chem.* 2002 Jul 26;277(30):27319-27. Epub 2002 May 9.

Harris CC. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science.* 1993 Dec 24;262(5142):1980-1.

Harwood CA, Proby CM. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis.* 2002 Apr;15(2):101-14.

Heilig B, Mapara M, Brockhaus M, Krauth K, Dörken B. Two types of TNF receptors are expressed on human normal and malignant B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991 Nov;61(2 Pt 1):260-7.

Heljasvaara R, Nyberg P, Luostarinen J, Parikka M, Heikkilä P, Rehn M, Sorsa T, Salo T, Pihlajaniemi T. Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Exp Cell Res.* 2005 Jul 15;307(2):292-304.

Ho SL, Dogar GF, Wang J, Crean J, Wu QD, Oliver N, Weitz S, Murray A, Cleary PE, O'Brien C. Elevated aqueous humour tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol.* 2005 Feb;89(2):169-73.

Ho SY, Wang YJ, Chen HL, Chen CH, Chang CJ, Wang PJ, Chen HH, Guo HR. Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the -308 tumor necrosis factor-alpha promoter gene. *Cancer Causes Control.* 2004 Sep;15(7):657-63.

Ho SY, Wang YJ, Huang PC, Tsai ST, Chen CH, Chen HH, Chang CJ, Guo HR. Evaluation of the associations between the single nucleotide polymorphisms of the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha gene and nasopharyngeal carcinoma. *J Chin Med Assoc.* 2006 Aug;69(8):351-7.

Hrstka R, Beranek M, Klocova K, Nenutil R, Vojtesek B. Intronic polymorphisms in TP53 indicate lymph node metastasis in breast cancer. *Oncol Rep.* 2009 Nov;22(5):1205-11.

Hu Z, Li X, Qu X, He Y, Ring BZ, Song E, Su L. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of TP53 contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis. *Carcinogenesis.* 2010 Apr;31(4):643-7. Epub 2010 Jan 20.

Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem.* 1991 Sep 5;266(25):16485-90.

Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer.* 2007 Dec 1;121(11):2373-80.

Hurt EM, Thomas SB, Peng B, Farrar WL. Reversal of p53 epigenetic silencing in multiple myeloma permits apoptosis by a p53 activator. *Cancer Biol Ther.* 2006 Sep;5(9):1154-60. Epub 2006 Sep 6.

I

Hłzecka J, Stelmasiak Z, Dobosz B. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Neurochir Pol.* 2001 Nov-Dec;35(6):1035-43.

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature.* 1986 Mar 6-12;320(6057):84-5.

Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishima M. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Dec 1;172(11):1378-82. Epub 2005 Aug 26.

Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2000 May;31(5):1080-5.

Ivansson EL, Magnusson JJ, Magnusson PK, Erlich HA, Gyllensten UB. MHC loci affecting cervical cancer risk: distinguishing the effects of HLA-DQB1 and non-HLA genes TNF, LTA, TAP1 and TAP2. *Genes Immun*. 2008 Oct;9(7):613-23. Epub 2008 Jul 24.

J

Jackson C, Nguyen M, Arkell J, Sambrook P. Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibition in rheumatoid arthritis--targetting gelatinase A activation. *Inflamm Res*. 2001 Apr;50(4):183-6.

Jacob CO. Tumor necrosis factor alpha in autoimmunity: pretty girl or old witch? *Immunol Today*. 1992 Apr;13(4):122-5.

Jacobs GH, Rippey JJ, Altini M. Prediction of aggressive behavior in basal cell carcinoma. *Cancer*. 1982 Feb 1;49(3):533-7.

Jang JS, Kim KM, Kang KH, Choi JE, Lee WK, Kim CH, Kang YM, Kam S, Kim IS, Jun JE, Jung TH, Park JY. Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer. *Lung Cancer*. 2008 Apr;60(1):31-9. Epub 2007 Oct 24.

Javle MM, Tan D, Yu J, LeVea CM, Li F, Kuvshinoff BW, Gibbs JF. Nuclear survivin expression predicts poor outcome in cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2004 Nov-Dec;51(60):1653-7.

Joerger AC, Ang HC, Fersht AR. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 10;103(41):15056-61. Epub 2006 Oct 2.

Jung K, Meisser A, Bischof P. Blood sampling as critical preanalytical determinant to use circulating MMP and TIMP as surrogate markers for

pathological processes. *Int J Cancer*. 2005 Oct 10;116(6):1000-1; author reply 1002-3.

K

Kaelin WG Jr. The emerging p53 gene family. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Apr 7;91(7):594-8.

Kahn HS, Tatham LM, Patel AV, Thun MJ, Heath CW Jr. Increased cancer mortality following a history of nonmelanoma skin cancer. *JAMA*. 1998 Sep 9;280(10):910-2.

Kalo E, Buganim Y, Shapira KE, Besserglick H, Goldfinger N, Weisz L, Stambolsky P, Henis YI, Rotter V. Mutant p53 attenuates the SMAD-dependent transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) signaling pathway by repressing the expression of TGF-beta receptor type II. *Mol Cell Biol*. 2007 Dec;27(23):8228-42. Epub 2007 Sep 17.

Kammoun-Krichen M, Bougacha-Elleuch N, Makni K, Mnif M, Jouida J, Abid M, Rebai A, Ayadi H. A potential role of TNFR gene polymorphisms in autoimmune thyroid diseases in the Tunisian population. *Cytokine*. 2008 Aug;43(2):110-3. Epub 2008 Jun 20.

Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN; Leiden Skin Cancer Study. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol*. 2003 Jun;120(6):1087-93.

Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R, Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer*. 2003 Apr 7;88(7):1077-83.

Khaliq S, Hameed A, Khaliq T, Ayub Q, Qamar R, Mohyuddin A, Mazhar K, Qasim-Mehdi S. P53 mutations, polymorphisms, and haplotypes in Pakistani ethnic groups and breast cancer patients. *Genet Test*. 2000;4(1):23-9.

Kirkpatrick A, Bidwell J, van den Brule AJ, Meijer CJ, Pawade J, Glew S. TNFalpha polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. *Gynecol Oncol.* 2004 Feb;92(2):675-9.

Kohaar I, Thakur N, Salhan S, Batra S, Singh V, Sharma A, Sodhani P, Das BC, Sarkar DP, Bharadwaj M. TNFalpha-308G/A polymorphism as a risk factor for HPV associated cervical cancer in Indian population. *Cell Oncol.* 2007;29(3):249-56.

Körner H, Cretney E, Wilhelm P, Kelly JM, Röllinghoff M, Sedgwick JD, Smyth MJ. Tumor necrosis factor sustains the generalized lymphoproliferative disorder (gld) phenotype. *J Exp Med.* 2000 Jan 3;191(1):89-96.

Krajcik RA, Massardo S, Orentreich N. No association between serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) or the soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Sep;12(9):945-6.

Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell.* 1988 Apr 8;53(1):45-53.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:619-42.

Kurihara A, Nagoshi H, Yabuki M, Okuyama R, Obinata M, Ikawa S. Ser46 phosphorylation of p53 is not always sufficient to induce apoptosis: multiple mechanisms of regulation of p53-dependent apoptosis. *Genes Cells.* 2007 Jul;12(7):853-61.

Kurimoto I, Streilein JW. cis-urocanic acid suppression of contact hypersensitivity induction is mediated via tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1992 May 15;148(10):3072-8.

L

Lauten M, Matthias T, Stanulla M, Beger C, Welte K, Schrappe M. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia*. 2002 Aug;16(8):1437-42.

Lazar V, Hazard F, Bertin F, Janin N, Bellet D, Bressac B. Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene*. 1993 Jun;8(6):1703-5.

Lear W, Dahlke E, Murray CA. Basal cell carcinoma: review of epidemiology, pathogenesis, and associated risk factors. *J Cutan Med Surg*. 2007 Jan-Feb;11(1):19-30.

Lehner R, Lucia MS, Jarboe EA, Orlicky D, Shroyer AL, McGregor JA, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002 Jun;10(2):134-8.

Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer*. 2005 Apr 20;114(4):509-12.

Li X, Dumont P, Della Pietra A, Shetler C, Murphy ME. The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. *J Biol Chem*. 2005 Jun 24;280(25):24245-51. Epub 2005 Apr 25.

Lindelöf B, Sigurgeirsson B, Tegner E, Larkö O, Johannesson A, Berne B, Christensen OB, Andersson T, Törngren M, Molin L, et al. PUVA and cancer: a large-scale epidemiological study. *Lancet*. 1991 Jul 13;338(8759):91-3.

Liu C, Wang J, Zhou S, Wang B, Ma X. Association between -238 but not -308 polymorphism of Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)v and unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) in Chinese population. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010 Sep 28;8:114.

Liu CJ, Wong YK, Chang KW, Chang HC, Liu HF, Lee YJ. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005 Nov;34(10):608-12.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487-501.

Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol.* 1998 Sep;113(3):401-6.

Lozano G, Levine AJ. Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences. *Mol Carcinog.* 1991;4(1):3-9.

Lu B, Gonzalez A, Massion PP, Shyr Y, Shaktour B, Carbone DP, Hallahan DE. Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2004 Aug 2;91(3):537-40.

Lu PH, Tang Y, Li C, Shen W, Ji L, Guo YJ, Tao GQ. Meta-analysis of association of tumor necrosis factor alpha-308 gene promoter polymorphism with gastric cancer. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2010 Mar;44(3):209-14.

M

Magalhães RF, Biral AC, Pancoto JA, Donadi EA, Mendes CT Jr, Magna LA, Kraemer MH. Human leukocyte antigen (HLA) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) tumor necrosis factor (TNF)-alpha -238 and -308 as genetic markers of susceptibility to psoriasis and severity of the disease in a long-term follow-up Brazilian study. *Int J Dermatol.* 2010 Oct;49(10):1133-40.

Makowski GS, Ramsby ML. Use of citrate to minimize neutrophil matrix metalloproteinase-9 in human plasma. *Anal Biochem.* 2003 Nov 15;322(2):283-6.

Malkinson AM, You M. The intronic structure of cancer-related genes regulates susceptibility to cancer. *Mol Carcinog*. 1994 Jun;10(2):61-5.

Mandal M, Mandal A, Das S, Chakraborti T, Sajal C. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biochem*. 2003 Oct;252(1-2):305-29.

Massari LP, Kastelan M, Gruber F. Epidermal malignant tumors: pathogenesis, influence of UV light and apoptosis. *Coll Antropol*. 2007 Jan;31 Suppl 1:83-5.

Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J*. 1984 Dec 20;3(13):3257-62.

Menon R, Velez DR, Thorsen P, Vogel I, Jacobsson B, Williams SM, Fortunato SJ. Ethnic differences in key candidate genes for spontaneous preterm birth: TNF-alpha and its receptors. *Hum Hered*. 2006;62(2):107-18. Epub 2006 Oct 17.

Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer*. 2004 Jun 14;90(12):2312-6.

Mire-Sluis, Anthony R.; Thorpe, Robin, ed. (1998). *Cytokines (Handbook of Immunopharmacology)*. Boston: Academic Press. ISBN 0-12-498340-5.

Mitra S, Misra C, Singh RK, Panda CK, Roychoudhury S. Association of specific genotype and haplotype of p53 gene with cervical cancer in India. *J Clin Pathol*. 2005 Jan;58(1):26-31.

Mitra S, Sikdar N, Misra C, Gupta S, Paul RR, Roy B, Panda CK, Roychoudhury S. Risk assessment of p53 genotypes and haplotypes in tobacco-associated leukoplakia and oral cancer patients from eastern India. *Int J Cancer*. 2005 Dec 10;117(5):786-93.

Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Feb;16(1):35-53. Epub 2004 Dec 19.

Müller U, Jongeneel CV, Nedospasov SA, Lindahl KF, Steinmetz M. Tumour necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature*. 1987 Jan 15-21;325(6101):265-7.

N

Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, Koide H. Effect of cigarette smoking on plasma metalloproteinase-9 concentration. *Clin Chim Acta*. 1998 Aug 28;276(2):173-7.

Nagase H. and Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999; 274: 21491-94.

Nagpal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol*. 2003 Apr;39(3):213-21.

Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Kähäri VM, Pyrhönen S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2005 Jul 15;11(14):5158-66.

O

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jan;2(1):a001008.

Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, Harris CC. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ*. 2004;(157):247-70.

Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Pétré A, Mounawar M, Plymoth A, de Fromentel CC, Hainaut P. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther*. 2009 Jan;16(1):1-12. Epub 2008 Sep 19.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993 Aug 27;74(4):609-19.

Oppenheim JJ, Feldmann M. Cytokine reference. San Diego: Academic Press; 2001.

Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):657-72.

P

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):221-33.

Pantelidis P, Lympny PA, Foley PJ, Fanning GC, Welsh KI, du Bois RM. Polymorphic analysis of the high-affinity tumor necrosis factor receptor 2. *Tissue Antigens*. 1999 Dec;54(6):585-91.

Pašić A., Dobrić I., Paljan D. Maligni epidermalni tumori kože. u: Dobrić i i sar. *Dermatovenerologija*. 2. izd. Zagreb: grafoplast, 1998: 403–8.

Peart MJ, Prives C. Mutant p53 gain of function: the NF-Y connection. *Cancer Cell*. 2006 Sep;10(3):173-4.

Perfumo C, Bonelli L, Menichini P, Inga A, Gismondi V, Ciferri E, Percivale P, Bianchi Scarrà G, Nasti S, Fronza G, Varesco L. Increased risk of colorectal adenomas in Italian subjects carrying the p53 PIN3 A2-Pro72 haplotype. *Digestion*. 2006;74(3-4):228-35. Epub 2007 Mar 20.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007 Jun;28(6):622-9.

Pfeifer GP, Besaratinia A. Mutational spectra of human cancer. *Hum Genet*. 2009 Jun;125(5-6):493-506. Epub 2009 Mar 24.

Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene*. 2006 Mar 13;25(11):1602-11.

Pinto GR, Yoshioka FK, Silva RL, Clara CA, Santos MJ, Almeida JR, Burbano RR, Rey JA, Casartelli C. Prognostic value of TP53 Pro47Ser and Arg72Pro single nucleotide polymorphisms and the susceptibility to gliomas in individuals from Southeast Brazil. *Genet Mol Res*. 2008 Feb 26;7(1):207-16.

Pitts SA, Olomolaiye OO, Elson CJ, Westacott CI, Bidwell JL. An MspA1 I polymorphism in exon 1 of the human TNF receptor type I (p55) gene. *Eur J Immunogenet*. 1998 Apr-Jun;25(2-3):269-70.

R

Rajabi MA, Rajabi P, Afshar-Moghaddam N. Determination of p53 expression in basal cell carcinoma tissues and adjacent nontumoral epidermis from sun-exposed areas of the head and neck. *Arch Iran Med*. 2006 Jan;9(1):46-8.

Ramachandran S, Fryer AA, Smith AG, Lear JT, Bowers B, Hartland AJ, Whiteside JR, Jones PW, Strange RC. Basal cell carcinomas: association of allelic variants with a high-risk subgroup of patients with the multiple presentation phenotype. *Pharmacogenetics*. 2001 Apr;11(3):247-54.

Ranuncolo SM, Matos E, Loria D, Vilensky M, Rojo R, Bal de Kier Joffé E, Inés Puricelli L. Circulating 92-kilodalton matrix metalloproteinase (MMP-9) activity is enhanced in the euglobulin plasma fraction of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2002 Mar 1;94(5):1483-91.

Reed JC. Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell*. 1997 Nov 28;91(5):559-62.

Rhee JS, Matthews BA, Neuburg M, Logan BR, Burzynski M, Nattinger AB. The skin cancer index: clinical responsiveness and predictors of quality of life. *Laryngoscope*. 2007 Mar;117(3):399-405.

Rizzato C, Canzian F, Rudnai P, Gurzau E, Stein A, Koppova K, Hemminki K, Kumar R, Campa D. Interaction between functional polymorphic variants in cytokine genes, established risk factors and susceptibility to basal cell carcinoma of skin. *Carcinogenesis*. 2011 Dec;32(12):1849-54.

Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(22):7475-84. Epub 2007 Oct 16.

Rubin BY. TNF and viruses: multiple interrelationships. *Immunol Ser*. 1992;56:331-40.

S

Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Jun;3(6):401-10.

Sameer AS, Shah ZA, Syeed N, Banday MZ, Bashir SM, Bhat BA, Siddiqi MA. TP53 Pro47Ser and Arg72Pro polymorphisms and colorectal cancer predisposition in an ethnic Kashmiri population. *Genet Mol Res*. 2010 Apr 13;9(2):651-60.

Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Fukuda Y, Tamura K, Satomi M, Shimoyama T, Furuyama J. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics*. 2002 Mar;53(12):1020-7. Epub 2002 Feb 7.

Schwingshackl A, Duszyk M, Brown N, Moqbel R. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF-alpha. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Nov;104(5):983-9.

Scian MJ, Stagliano KE, Anderson MA, Hassan S, Bowman M, Miles MF, Deb SP, Deb S. Tumor-derived p53 mutants induce NF-kappaB2 gene expression. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(22):10097-110.

Shamsher M, Montano X. Analysis of intron 4 of the p53 gene in human cutaneous melanoma. *Gene*. 1996 Oct 17;176(1-2):259-62.

Shea CR, McNutt NS, Volkenandt M, Lugo J, Prioleau PG, Albino AP. Overexpression of p53 protein in basal cell carcinomas of human skin. *Am J Pathol.* 1992 Jul;141(1):25-9.

Shellman YG, Makela M, Norris DA. Induction of secreted matrix metalloproteinase-9 activity in human melanoma cells by extracellular matrix proteins and cytokines. *Melanoma Res.* 2006 Jun;16(3):207-11.

Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry.* 2001 Jan 30;40(4):1117-23.

Shriner DL, McCoy DK, Goldberg DJ, Wagner RF Jr. Mohs micrographic surgery. *J Am Acad Dermatol.* 1998 Jul;39(1):79-97.

Singh H, Jain M, Sachan R, Mittal B. Association of TNFA (-308G>A) and IL-10 (-819C>T) promoter polymorphisms with risk of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2009 Oct;19(7):1190-4.

Skov L, Allen MH, Bang B, Francis D, Barker JN, Baadsgaard O. Basal cell carcinoma is associated with high TNF-alpha release but not with TNF-alpha polymorphism at position--308. *Exp Dermatol.* 2003 Dec;12(6):772-6.

Skov L, Hansen H, Allen M, Villadsen L, Norval M, Barker JN, Simon J, Baadsgaard O. Contrasting effects of ultraviolet A1 and ultraviolet B exposure on the induction of tumour necrosis factor-alpha in human skin. *Br J Dermatol.* 1998 Feb;138(2):216-20.

Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004 Nov;10(6):311-8.

Sousa H, Breda E, Santos AM, Catarino R, Pinto D, Medeiros R. Genetic risk markers for nasopharyngeal carcinoma in Portugal: tumor necrosis factor alpha -308G>A polymorphism. *DNA Cell Biol.* 2011 Feb;30(2):99-103. Epub 2010 Sep 28.

Soussi T, Ishioka C, Claustres M, Bérourd C. Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jan;6(1):83-90.

Spates ST, Mellette JR Jr, Fitzpatrick J. Metastatic basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*. 2003 Jun;29(6):650-2.

Sprague BL, Trentham-Dietz A, Garcia-Closas M, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Hampton JM, Chanock SJ, Haines JL, Egan KM. Genetic variation in TP53 and risk of breast cancer in a population-based case control study. *Carcinogenesis*. 2007 Aug;28(8):1680-6. Epub 2007 Apr 21.

T

Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*. 2002 May;3(5):391-7.

Takeuchi S, Takeuchi N, Tsukasaki K, Bartram CR, Zimmermann M, Schrappe M, Taguchi H, Koeffler HP. Genetic polymorphisms in the tumour necrosis factor locus in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002 Dec;119(4):985-7.

Tan XL, Nieters A, Hoffmeister M, Beckmann L, Brenner H, Chang-Claude J. Genetic polymorphisms in TP53, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of colorectal cancer: evidence for gene-environment interaction? *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Aug;17(8):639-45.

Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol*. 1999 May;35(3):227-33.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.

Tilli CM, Van Steensel MA, Krekels GA, Neumann HA, Ramaekers FC. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2005 Jun;152(6):1108-24.

Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer.* 2006 Dec;6(12):909-23.

Trifa F, Karray-Chouayekh S, Mabrouk I, Baccouche S, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Haplotype analysis of p53 polymorphisms: Arg72Pro, Ins16bp and G13964C in Tunisian patients with familial or sporadic breast cancer. *Cancer Epidemiol.* 2010 Apr;34(2):184-8. Epub 2010 Mar 15.

Tu HF, Wu CH, Kao SY, Liu CJ, Liu TY, Lui MT. Functional -1562 C-to-T polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) promoter is associated with the risk for oral squamous cell carcinoma in younger male areca users. *J Oral Pathol Med.* 2007 Aug;36(7):409-14.

Turnpenny P.D., Ellard S. (2009) *Emerijevi Osnovi Medicinske Genetike*, 13. Izdanje, Data Status, Beograd.

Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebraniou N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Park SH, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature.* 2002 Jan 3;415(6867):45-53.

U

Upadhyay R, Khurana R, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. Role of survivin gene promoter polymorphism (-31G>C) in susceptibility and survival of esophageal cancer in northern India. *Ann Surg Oncol.* 2011 Mar;18(3):880-7.

V

Vairaktaris E, Vassiliou S, Nkenke E, Serefoglou Z, Derka S, Tsigris C, Vylliotis A, Yapijakis C, Neukam FW, Patsouris E. A metalloproteinase-9 polymorphism which

affects its expression is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2008 Apr;34(4):450-5. Epub 2007 May 11.

Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Avgoustidis D, Critselis E, Spyridonidou S, Vylliotis A, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, Patsouris E. Gene expression polymorphisms of interleukins-1 beta, -4, -6, -8, -10, and tumor necrosis factors-alpha, -beta: regression analysis of their effect upon oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Aug;134(8):821-32. Epub 2008 Feb 14.

Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2002 Dec;37(6):375-536.

Vantuchova Y, Curik R. Histological types of basal cell carcinoma. *Scripta Medica (Brno)* 2006, 79:261-70.

W

Wang YH, Chiou HY, Lin CT, Hsieh HY, Wu CC, Hsu CD, Shen CH. Association between survivin gene promoter -31 C/G polymorphism and urothelial carcinoma risk in Taiwanese population. *Urology*. 2009 Mar;73(3):670-4. Epub 2008 Nov 26.

Wang-Gohrke S, Weikel W, Risch H, Vesprini D, Abrahamson J, Lerman C, Godwin A, Moslehi R, Olipade O, Brunet JS, Stickeler E, Kieback DG, Kreienberg R, Weber B, Narod SA, Runnebaum IB. Intron variants of the p53 gene are associated with increased risk for ovarian cancer but not in carriers of BRCA1 or BRCA2 germline mutations. *Br J Cancer*. 1999 Sep;81(1):179-83.

Wang-Gohrke S, Becher H, Kreienberg R, Runnebaum IB, Chang-Claude J. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Pharmacogenetics*. 2002 Apr;12(3):269-72.

Warzocha K, Bienvenu J, Ribeiro P, Moullet I, Dumontet C, Neidhardt-Berard EM, Coiffier B, Salles G. Plasma levels of tumour necrosis factor and its soluble receptors correlate with clinical features and outcome of Hodgkin's disease patients. *Br J Cancer*. 1998 Jun;77(12):2357-62.

Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D, Coiffier B, Salles G. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3574-81.

Warzocha K, Ribeiro P, Renard N, Bienvenu J, Charlot C, Coiffier B, Salles G. Expression of genes coding for the tumor necrosis factor and lymphotoxin ligand-receptor system in non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2000 Nov;49(9):469-75.

Weisz L, Oren M, Rotter V. Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene*. 2007 Apr 2;26(15):2202-11.

Weng CJ, Hsieh YH, Chen MK, Tsai CM, Lin CW, Yang SF. Survivin SNP-carcinogen interactions in oral cancer. *J Dent Res*. 2012 Apr;91(4):358-63. Epub 2012 Feb 8.

Weston A, Pan CF, Ksieski HB, Wallenstein S, Berkowitz GS, Tartter PI, Bleiweiss IJ, Brower ST, Senie RT, Wolff MS. p53 haplotype determination in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997 Feb;6(2):105-12.

Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer*. 2009 Feb;9(2):95-107.

Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet*. 1992 Aug;1(5):353.

Wikonkal NM, Brash DE. Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1999 Sep;4(1):6-10.

Woelfelschneider A, Popanda O, Lilla C, Linseisen J, Mayer C, Celebi O, Debus J, Bartsch H, Chang-Claude J, Schmezer P. A distinct ERCC1 haplotype is associated with mRNA expression levels in prostate cancer patients. *Carcinogenesis*. 2008 Sep;29(9):1758-64. Epub 2008 Mar 10.

Wong CS, Strange RC, Lear JT. Basal cell carcinoma. *BMJ*. 2003 Oct 4;327(7418):794-8.

World Health Organization. Skin cancers. Available from URL: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/print.html>. [Accessed 2009 September 14].

Wu HC, Chang CH, Chen HY, Tsai FJ, Tsai JJ, Chen WC. p53 gene codon 72 polymorphism but not tumor necrosis factor-alpha gene is associated with prostate cancer. *Urol Int*. 2004;73(1):41-6.

Wu X, Zhao H, Amos CI, Shete S, Maman N, Hong WK, Kadlubar FF, Spitz MR. p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity. *J Natl Cancer Inst*. 2002 May 1;94(9):681-90.

Y

Yang L, Zhu H, Zhou B, Gu H, Yan H, Tang N, Dong H, Sun Q, Cong R, Chen G, Wang B. The association between the survivin C-31G polymorphism and gastric cancer risk in a Chinese population. *Dig Dis Sci*. 2009 May;54(5):1021-8. Epub 2008 Aug 21.

Yang X, Xiong G, Chen X, Xu X, Wang K, Fu Y, Yang K, Bai Y. Polymorphisms of survivin promoter are associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Oct;135(10):1341-9. Epub 2009 Apr 8.

Younes F, Quartey EL, Kiguwa S, Partridge M. Expression of TNF and the 55-kDa TNF receptor in epidermis, oral mucosa, lichen planus and squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 1996 Mar;2(1):25-31.

Z

Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. *Hum Genet*. 1999 Nov;105(5):418-23.

Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999 Apr 13;99(14):1788-94.

Zhao W, Liu H, Xu S, Entschladen F, Niggemann B, Zänker KS, Han R. Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. *Cancer Lett*. 2001 Jan;162 Suppl:S49-S55.

Zlatarova ZI, Softova EB, Dokova KG, Messmer EM. Expression of matrix metalloproteinase-1, -9, -13, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in basal cell carcinomas of the eyelid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012 Mar;250(3):425-31. Epub 2011 Sep 1.

Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi HM, Hurewitz AN, Matrisian L, Boyd D, Nicolson G, Montana S. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:212-27.

Zúñiga J, Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Portal-Celhay C, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun*. 2001 Nov;2(7):363-6.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Diplomirani biolog Marija Kostić (rođ. Bošković) rođena je 12.04.1984. godine u Kraljevu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija, upisala je školske 2003/2004. godine. Diplomirala je 2008. godine na usmerenju Primenjena genetika sa prosečnom ocenom 9.82. Školske 2008/2009. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Genetika. U periodu od 2009-2011. godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije u okviru projekata „*Adaptivni značaj genetičkog polimorfizma populacija Drosophila*“ (evidencioni broj 143014, u periodu od 2009. do 2010. godine) i „*Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije*“ (evidencioni broj 175075, u period od 2010. do 2011. godine).

Marija Kostić je u periodu od 2006-2008. godine bila stipendista Fondacije za razvoj talenata i naučnog podmlatka Republike Srbije, 2007. godine dobila je nagradu EFG banke za najbolje studente Srbije u okviru projekta „Investiramo u Evropske vrednosti“, iste godine dobila je nagradu “Najbolji najboljem Dr Zoran Đinđić” kao najbolji student na teritoriji opštine Vrnjačka Banja .

Tokom školske 2009/2010. godine je kao student doktorskih studija učestvovala u izvođenju praktične nastave na Katedri za genetiku i evoluciju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od oktobra 2011. godine je zaposlena na Fakultetu za hotelijerstvo i turizam u Vrnjačkoj Banji Univerziteta u Kragujevcu, kao asistent.

Marija Kostić je do sada bila autor i koautor 3 naučne publikacija u časopisima međunarodnog značaja i 5 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja iz uže naučne oblasti.

Uža naučna oblast interesovanja su: molekularna genetika kancera i humana populaciona genetika.

9.PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Костић

број индекса Б501/2008

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Варијабилност гена укључених у инфламаторне, имуномодулаторне и апоптотске процесе као фактор ризика за настанак базоцелуларног карцинома главе и врата

- 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, 25.10.2012.



Marija Kostić

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада


Име и презиме аутора Марија КостићБрој индекса Б501/2008Студијски програм Биологија, модул ГенетикаНаслов рада Варијабилност гена укључених у инфламаторне, имуномодулаторне и апоптотске процесе као фактор ризика за настанак базоцелуларног карцинома главе и вратаМентор Проф.др Марина Стаменковић-Радак, Проф.др Јелена МилашинПотписана Марија Костић

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, 25.10.2012.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Варијабилност гена укључених у инфламаторне, имуномодулаторне и апоптотске процесе као фактор ризика за настанак базоцелуларног карцинома главе и врата

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, 25.10.2012.



Марија Косић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.