

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје
Стоматолошки факултет



Антонио Љ. Кирков

ЕВАЛУАЦИЈА НА МОЛЕКУЛАРНИ МАРКЕРИ КАЈ ОРАЛЕН КАРЦИНОМ

Докторска дисертација

Ментор: Проф. д-р. Алберто Бенедети, др. сци

Ко-Ментор: Проф. д-р Александар Димовски, др.сци

Скопје, 2014

СОДРЖИНА

1. Вовед	1
1.1. Поим и епидемиологија на орален карцином	1
1.2. Етиологија и патогенеза (канцерогенеза) на орален карцином.....	4
1.3. Преглед од литература	11
1.3.1 TP53	11
1.3.2. EGFR	18
1.3.3. Bcl-2	25
1.3.4. ХПВ	30
1.3.5. LOH и MSI	35
2. Цел на трудот	49
3. Материјал и методи	50
4. Резултати	71
5. Дискусија	114
6. Заклучоци	142
7. Кратка содржина	144
8. Summary	147
9. Литература	150
10. Список на кратенки	169
11. Прилог	170

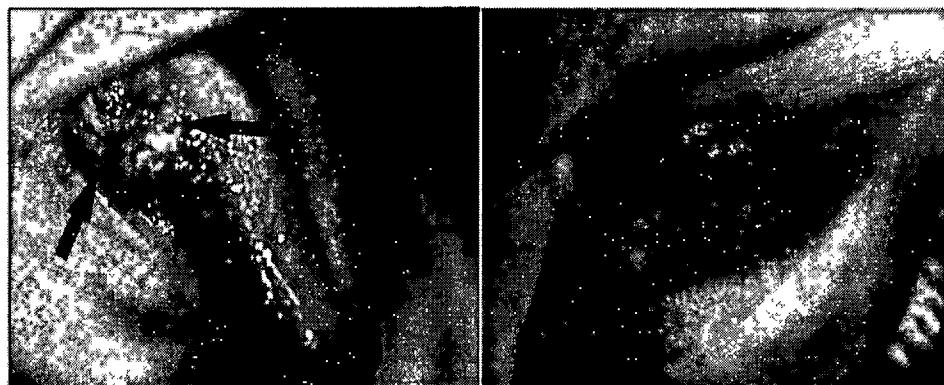
1. ВОВЕД

1.1. Поим и епидемиологија на оралниот карцином

Терминот орален карцином, широко интерпретиран, го означува секој карцином во усната шуплина, било тој да е примарен или секундарен. Повеќето од оралните карциноми ретко се јавуваат. Единствен исклучок е планоцелуларниот карцином кој се јавува често и кој доволно преовладува за оправдано да се нарече "орален карцином". Преку 90%⁵¹ од оралните карциноми се примарни планоцелуларни карциноми кои потекнуваат од слузницата на устата, најчесто на јазикот и подот на устата (слика бр.1), а според Менделсон тој процент е дури 97% (цитат по Štajner¹⁷⁹, 1988).

Горната и долната усна се составен дел на усната празнина, но разликата од клинички аспект помеѓу планоцелуларниот карцином на усна и планоцелуларниот карцином со интраорална локализација е толку значајна, што е причина да се говори за два различни енитата, односно наложува да се прави дистинкција на карцином на усна и орален карцином.

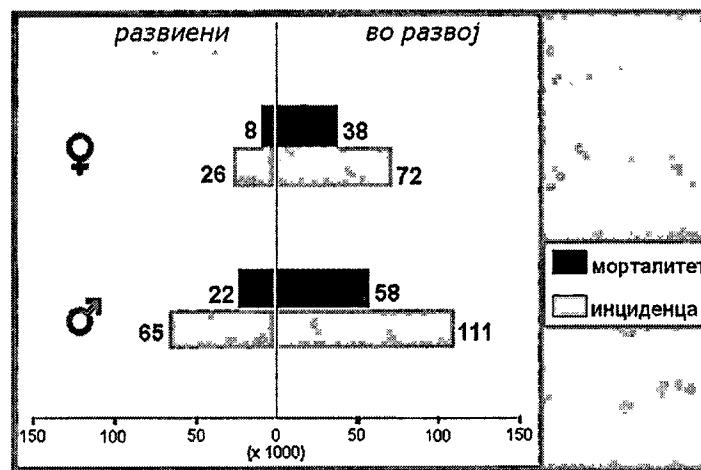
Затоа, кога се збори за орален карцином, се претпоставува дека тоа се однесува на планоцелуларен карцином со интраорална локализација, освен ако не се назначи поинаку.



Слика бр.1. Орален карцином на јазик и база на уста

Со годишна инциденца од 263900⁷⁹ нови случаи на светско ниво оралниот карцином е најчеста неоплазма на главата и вратот. Инциденцата

покажува забележителни варијации од социо-економски и географски аспект. Оралниот карцином е многу почет во земјите во развој отколку во развиените земји (слика бр.2). Тоа веројатно се должи на разликите во употреба на тутунот и алкохолот и фактори како што се оралната хигиена, исхраната и општата отпорност⁵¹.



Слика бр.2. Инциденца и морталитет на орален карцином во 2002 г. за развиени земји и земји во развој, според пол (во илјади).

Адаптирано по Parkin at all.; Global Cancer Statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55:79

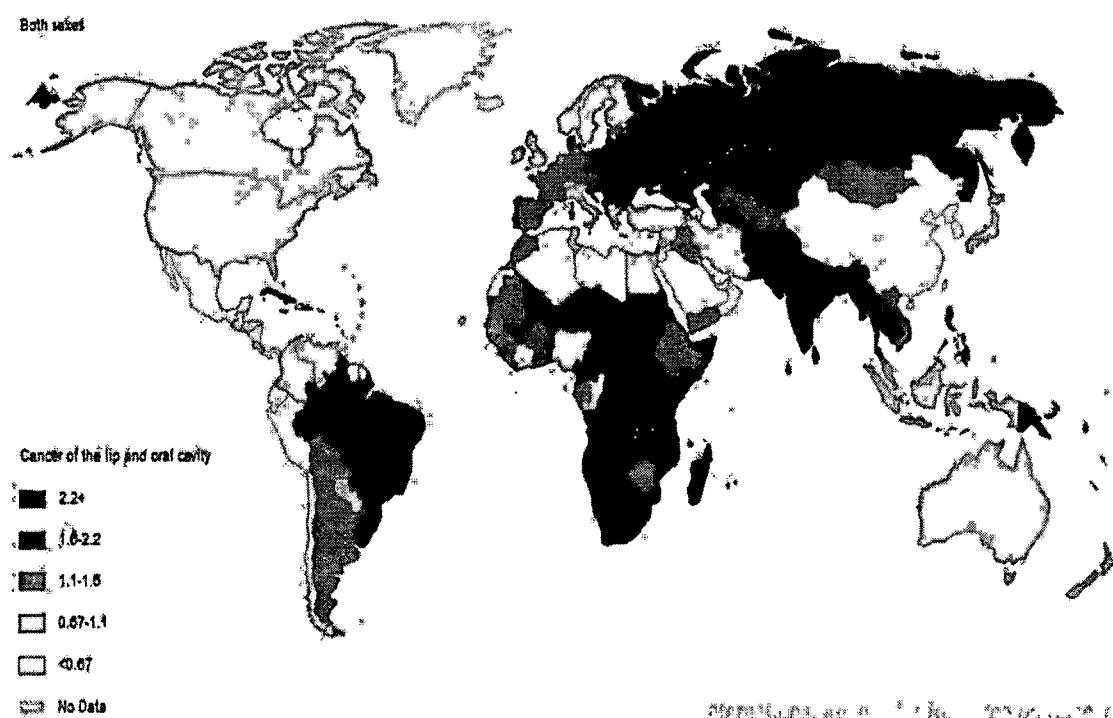
Географски регион на светско ниво со највисока инциденца на орален карцином е Меланезија (24/100000 за мажи и 12/100000 за жени). Процентот за мажи е висок во јужна и централна Азија (9,4/100000), централна и источна Европа (9,1/100000) а кај жени тој е релативно висок во јужна и Централна Азија (5,5/100000)⁷⁹. Во светски рамки, област со највисока инциденца за мажи е Bas-Rhin во Франција со 63,6% а за жени е Madras во Индија со 16%¹⁶¹. Овие показатели ја рефлектираат преваленцијата на специфични ризик-фактори, како употребата на тутун/алкохол во западна и јужна Европа, и џвакањето бетел во јужна Азија и Меланезија¹³⁵. Во јужна и югоисточна Азија концентрирани се 58%⁸⁸ од сите светски случаи со орален карцином а во Индија овој оралниот карцином е најчеста малигна неоплазма (20-30%)¹²⁵. Податоците од САД и Велика Британија покажуваат дека постојат етнички и расни разлики на инциденцата во самите држави¹⁶⁸,

најверојатно заради генетска предиспозиција и/или социо-економските фактори како што се пристапност и можност на здравствена заштита и лимитираност на методите за превенција и рана детекција на оралниот карцином. Кај американската популација од црна раса овој карцином е четврти по фрекфентност карцином¹⁷⁴.

Според Sol Silverman¹⁷⁴ (2001), и Parkin¹³⁵ (2005), соодносот мажи - жени со орален карцином на светско ниво апроксимативно изнесува 1,8:1, при што во одредени региони тој се движи од 1,3:1 до 2:1¹³⁴.

Во однос на возрастта, тоа е болест која ги зафаќа повозрасните лица. При дијагностицирање на болеста 95% од пациентите се над 40 годишна возраст, а средна возраст се 60-тите години од животот (мажи - 63,5 год.; жени - 60,6 год.)¹³⁴.

Петгодишното преживување, помало од 50%, е меѓу најниските за повеќето карциноми и се нема зголемено повеќе од две декади¹⁶³.



Слика бр.3. Морталитет кај оралниот карцином за двета пола (x/100000)

Извор: GLOBOCAN (IARC) 2012

1.2. Етиологија и патогенеза (канцерогенеза) на оралниот карином

Ракот е генетско заболување на соматските клетки. Тој претставува абнормален раст на клетките предизвикан од повеќе промени во генската експресија кои водат до дисбаланс на клеточната пролиферација и клеточната смрт и кои сигурно развиваат популација на клетки што може да ги инвадираат ткивата и да метастазираат на далечни места, предизвикувајќи значаен морбидитет и ако не се третира води до смрт на домашинот¹⁵⁴. Ракот се јавува кога клетките почнуваат да растат неконтролирано и инвазивно.

Кога гените се променети-мутирани, грешката во нивниот ДНК код може да биде причина тие да не функционираат правилно. Акумулацијата на бројни мутации на различни типови на гени во специфична група на клетки создава можност за малигни промени. Во однос на времето на настанување, мутациите може да се:

- **Наследни (хередитарни, зачетни) мутации** – овие мутации се конститутивни - промените во ДНК присутни се во сите клетки на телото вклучително и репродуктивните; конститутивна мутација може да се случи ако мутацијата се случи за време на фертилизација (или веднаш после неа) или може да е пренесена конститутивна мутација на еден од родителите; може да бидат пренесени од генерација на генерација; причина се за помал број на малигни тумори.
- **Стекнати (спорадични, соматски) мутации** – настануваат поради промени во ДНК кои се развиваат во текот на животот; не се наследни и не се пренесуваат генерациски, бидејќи отсуствуваат во репродуктивните клетки; започнуваат во една клетка на телото и се наоѓаат само во потомството (клетки ќерки) на таа клетка - туморските клетки; причина се за најголем број од малигните тумори.

Мутациите во клетките се случуваат постојано. Вообично, гените ги препознаваат оштетувањата и ги поправаат (рапарираат) неправилностите на ДНК. Ако тоа не се случи, клетката започнува процес на програмирана клеточна смрт - апоптоза (*apoptosis*). Апоптозата е клеточен суициден механизам за регулација на бројот на клетките во ткивата и елиминација на

непотребните и непоправливо оштетени клетки како и стари клетки, со најмала можна реакција на домаќинот. Апоптозата е активна клеточна смрт, различна од некрозата (пасивна смрт), каде меѓу останатото не настапува воспалителна реакција. Таа е енергетски зависен процес кој се одликува со брза појава на карактеристични морфолошки и биохемиски промени во клетката. Самот механизам е комплексен и зависен од интеракција на бројни интра и екстраклеточни како и про- и антиапоптотични сигнали. Инициацијата на апоптозата може да биде преку внатрешен (митохондријален) пат и надворешен пат, но и двата на крај ја активираат каспазата со која започнува ензимска деградација на протеините и ДНК (ендонуклеаза). Препознавањето и отстранувањето на мртвите клетки е од страна на фагоцитите^{95,114}.

Клетките растат, се делат и умираат на високо регулиран начин. Митозата е фундаментален процес во животот на секоја единка преку која клетките ја двојат целата своја содржина вклучувајќи ги и хромозомите (ДНК) и формираат две идентични клетки-ќерки. Овој процес за организмот е толку критичен што секоја негова фаза е надгледувана и контролирана од бројни гени. Кога митозата не е точно регулирана настапуваат пореметувања кои може да резултираат со појава на рак. Во човечкиот геном постојат различни типови на гени што го контролираат клеточниот раст преку многу систематичен и прецизен пат. Онкогените и тумор супресорските гени се двата главни типа на гени што денес се признати дека имаат улога кај оралниот карцином.

Онкогени (промотори на раст) се мутирани форми на прото-онкогените. Прото-онкогените преку своите протеински продукти се вклучени во нормалната регулација на клеточниот раст, забрзувајќи ја клеточната делба и диференцијација. Мутираниот алел наproto-онкогенот се однесува доминантно така што трансформација на клетката настапува и со само еден мутиран алел. Кога proto-онкогените мутираат во онкогени, нормалните клетки растат надвор од контрола, се делат пребрзо и ваквиот аберантен раст може да е причина за карцином. Откога тие ќе промовираат клеточен раст и пролиферација, нивната нерегулирана активност овозможува континуирана стимулација за клеточна делба. Карактеристика на онкогените

е што тие се постојано вклучени (*"turned on"*), односно се активни кога тоа не треба да се. Онкогените најчесто настапуваат поради стекнати мутации и карциномите предизвикани од онкогените не се наследуваат^{95,114}.

Тумор супресорски антигени (инхибитори на раст) се гени што преку своите протеински продукти ја забавуваат или стопираат клеточната делба, ги поправаат/репарираат ДНК грешките и ја иницираат програмираната клеточна смрт (апоптоза). Нормалните тумор супресорски гени всушност се анти-тумор гени. Кога мутира, мутираниот алел се однесува како рецесивен и колку долго клетката ќе има еден нормален алел, толку долго ќе постои функцијата на тумор супресорскиот ген. За да се случи трансформација потребно е двата алела да се променат. При мутации на тумор супресорските антигени, клетките растат надвор од контрола што може да води до карцином. Спротивно на онкогените, причината за карцином е што тумор супресорските антигени се неактивни, односно се исклучени (*"turned off"*). Абнормалностите кај тумор супресорските антигени може да се како поради хередитарни така и поради стекнати мутации. За формирање на повеќето видови рак кај човекот, поважна е загубата на тумор супресорски гени од прото-онкоген - онкоген активирањето^{207,95,114}.

Два сигнала (но секој со повеќе генетски контроли) се потребни за клеточната пролиферација и трансформација: еден кој забрзува клеточната пролиферација и втор што блокира клеточна смрт.

Карциногенезата е повеќефазен процес што се развива преку 3 фази.

Фаза на иницијација се карактеризира со претворање на нормална соматска клетка во иницирана - мутирана клетка. Иницијацијата вклучува една или повеќе стабилни клеточни промени кои настапуваат спонтано или се предизвикани од одреден канцероген. Ова се смета за првиот чекор во карциногенеза, каде што клеточниот геном се подложува на мутации, создавајќи потенцијал за неопластични развој.

Фаза на промоција се карактеризира со клонална експанзија на иницираната клетка и трансформација на иницираната клетка во популација на пренеопластични клетки кои се последица на промени во генската експресија и клеточната пролиферација.

Фаза на прогресија се карактеризира со трансформација на пренеопластичните клетки во неопластична клеточна популација како резултат на дополнителни генетски и хромозомски (анеуплоидија) промени и еволуција во неопластичен фенотип (ангиогенеза, инвазивност, метастази). Во оваа фаза зголемена е брзината на раст. Клинички манифестна фаза²⁰⁰.

Етиологијата и патогенезата на оралниот карцином како и кај поголемиот број на малигни тумори не е целосно позната и разјаснета но тековните сознанија зборуваат за мултикаузалност. Познати се повеќе фактори кои влијаат на патогенезата на болеста кои во литературата се среќаваат како ризик фактори за развој на орален карцином.

Ризик фактори за орален карцином

Тутун (пушчење). Употребата на тутунот и алкохолот се најчестите ризик фактори за развој на орален карцином. Тие содржат супстанци кои се карциногени или потпомагаат карцином.

Податоците за поврзаноста меѓу оралниот карцином и пушчењето произлегуваат од многу епидемиолошки испитувања а меѓу нив се и CPSI и CPSII (Cancer Prevention Study), кои се најголеми епидемиолошки испитувања било кога спроведени. Проценките за поврзаноста на ОК со пушчењето се прилично конзистенти и високи; главно се рангирани од 75% до 90%. Според CPSII, пушчењето цигари претставува многу висок ризик за развој на орален карцином, дури повисок отколку за белодробен карцином. Општо земено, употребата на тутун во сите негови форми - пушчење, џвакање (Индија и југоисточна Азија) и шмркање (Скандинавија и САД), е најчест етиолошки ризик фактор за развој на орален карцином. Ризикот за развој на орален карцином директно е поврзан со интензитетот од употребата на тутун - пушачи со над 20 испушени цигари дневно имаат 3 пати, а пушачи со над 40 испушени цигари дневно имаат скоро 6 пати зголемен ризик за развој на болеста споредено со непушачи. Испитувањата покажуваат дека ризикот за орален карцином се намалува за 50% после 3-5 години апстиненција од пушчење, а после 10 или повеќе години, ризикот е редуциран скоро на 1^{13,52,64,81}.

Хемиските анализи покажуваат дека чадот од цигарите содржи околу 3500 различни конституенти кои може да бидат фармаколошки активни, токсични, мутагени или канцерогени²⁰⁸. За повеќе од 60 од нив, од страна на Меѓународната агенција за истражување на ракот (IARC) проценето е дека постојат доволно докази за канцерогеност кај лабораториски животни или луѓе²¹⁴. Од тутун специфични N-нитрозамини (TSNA) како најмногу карциногени се издаваат N'-nitrosonornicotine (NNN) и 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) кои се докажани јаки карциногени за животните, способни да предизвикаат малигни тумори во оралната празнина. Тие две соединенија кои се најдени и во чадот и во тутунот за џвакање, како и РАН (полициклични ароматични јагленоводороди) кои се идентификувани само во чадот, изгледа имаат главна етиолошка улога кај оралниот карцином⁶⁹.

При хронична изложеност на комплексна мешавина на канцерогени, тумор промотори и ко-канцерогени како што е чадот од тутун, тешко е да се процени ефектот на индивидуалните егзогени агенси во тутунската карциногенеза на молекуларно ниво¹⁴². Најголем дел од истражувањата покажуваат дека пушењето е сигнификантно поврзано со зголемен ризик од мутации на генот p53 кај оралниот карцином³² и дека оптовареноста со мутација на p53 е пропорционална со степенот на пушење при што четирикратно е зголемувањето на мутацијата кај тешките пушачи во однос на непушачи¹⁷. Исто така, процентот на LOH на Зр и вкупниот просечен број на хромозомски загуби е значително поголем кај пушачите⁹⁰.

Алкохол. Одредени метаболити на алкохолот (ацет-алдехид и супероксид) се мутагени и тие може да се создадат под дејство на микрофлората од устата. Ниското ниво на орална хигиена кое така често се сретнува кај пациентите со орален карцином, обезбедува идеален медиум за таква хемиска реакција. Сепак ваквата конверзија на алкохолот во директен карциноген во устата е претпоставка и треба да се има предвид фактот дека не е докажано дека алкохолот е карциноген *per se*^{50,187,216}.

Тутун и алкохол. Употребата на комбинација - алкохол и тутун, има синергистички ефект и значајно го зголемува ризикот за орален карцином⁴⁵. Кај лица кои консумираат заедно алкохол и тутун, веројатноста за развој на орален карцином е 10 до 15 пати поголема во споредба со тие кои не

консумираат ниедно^{21,27}. Испитувањата во кои употребата на алкохол е најдена како фактор во оралната карциногенеза, покажуваат дека значајна е количината на конзумирање алкохол⁵² и дека сите форми на алкохол се поврзани со оралниот карцином⁸³. Зголемен ризик постои само ако консумираната просечна дневна количина е над 90/120г алкохол^{27,115}. Заедничка консумација на алкохол и тутун се среќава кај ¾ од пациентите со орален карцином¹³.

Вируси. Во 1983 год. од страна на истражувачки тим од Финска предводен од Kari Syrjänen,¹⁸⁴ во списанието *International Journal of Oral Surgery* за првпат е публикувана претпоставка за вирусно инволвирање во етио-патогенезата кај оралниот карцином.

Многуброните истражувања што следеле и фактите како: антителна реакција кон ХПВ, детектирана ХПВ-ДНК во тумори, како и со *in situ* хибридизација наоѓањето на ХПВ само во туморно и премалигно ткиво а не и во околна нормална слузница, ја утврдиле причинска врска со ХПВ^{167,15}.

За развој на инвазивен ХПВ-ДНК карцином потребна е инфекција со високоризичен (онкоген) ХПВ и негова последователните интеграции во геномот на епителните клетки на домаќинот. E5, E6 и E7 се вирусни онкогени и нивната експресија предизвикува имортализација и трансформација на клетката. E5 влијае антиапоптотично во кератиноцитите⁸⁴ (непозната е молекуларната основа) и придонесува за имунолошка евазија преку интеракција и намалување на класа I на HLA (Human Leukocyte Antigen)²¹². Посебно се значајни E6 и E7 чии онкопротеини водат до деактивирање на негативните регулатори на клеточниот циклус, p53 и pRb. Онкопротеинот E6 е најпознат по неговата способност да се врзува со тумор супресорскиот протеин p53 што води до понатамошна протеолитичка деградација на p53, што резултира со толеранција од ДНК грешки. Исто така, E6 индуцира експресија и активност на теломеразата со што овој онкопротеин е одговорен и за клеточна имортализација, иако точниот механизам со кој го постигнува овој ефект останува неразјаснет. Главен клеточен партнер на онкопротеинот E7 е тумор супресорскиот протеин pRb и при нивното врзување доаѓа до деградација на pRb. Протеинот *retinoblastoma* (Rb) со неговите фамилијарни членови p107 и p130, познати под колективното име “џепни” протеини, се

вклучени во регулација на клеточниот циклус преку модулација на E2F транскрипцискиот фактор. Во нормални услови овие протеини се транскрипциски репресори. Онкопротеинот E7 може да ги врзе и деградира и протеините p107 и p130. Со тоа настапува целосно губење на контролата над E2F транскрипцискиот фактор и прогресија на клеточниот циклус, што резултира со континуирано размножување Stengel¹⁸⁰.

Сумирано, онкопротеините на ХПВ во епителните клетки водат до²¹²:

- инхибиција на апоптоза
- геномска нестабилност
- оштетување на ДНК репарирачкиите механизми
- клеточната пролиферација и диференцијација
- имортализација

ХПВ-ДНК оралните карциноми прават етиопатогенетски различна подгрупа кај оралните карциноми^{57,67}. Во 2007 год., СЗО преку Меѓународната Агенција за истражување на рак (IARC) објави дека постојат доволно молекуларни и епидемиолошки докази од кои може да се заклучи дека ХПВ е етиолошки фактор кај оралниот карцином²¹³.

Врз основа на досегашните истражувања, постојат два вида на карциногенеза кај оралниот планоцелуларен карцином: еден, каде карциногенезата е промовирана од фактори на околината (пушење и консумирање алкохол) и втор, каде карциногенезата е промовирана од инфекција со високо-ризичен ХПВ¹⁶.

Карциногенезата е повеќефазен процес што се развива преку иницијација, промоција и прогресија, како последица на акумулација на различни сукцесивни генетски промени на епителната клетка за кои тековно се верува дека се 6 до 10 кај оралниот карцином. Овој развој е долготраен, вообичаено потребни се повеќе години до појава на клиничките абнормалности⁵⁰.

1.3. Преглед од литература

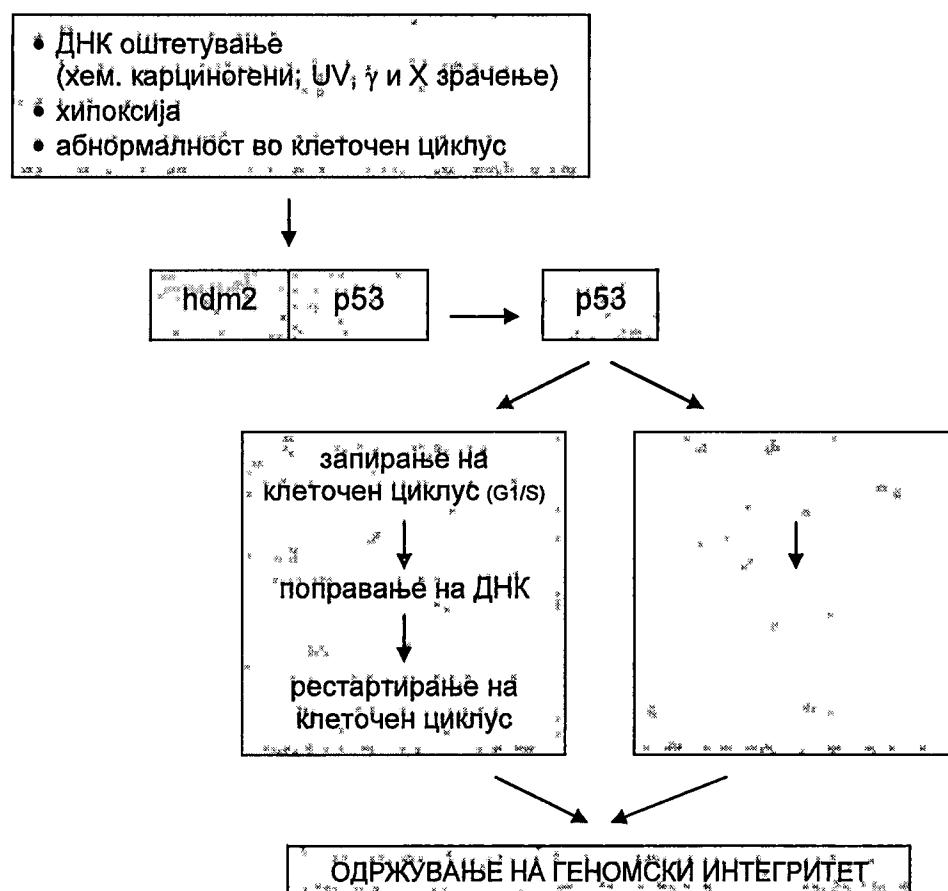
1.3. 1. TP53

Туморскиот протеин p53, исто така познат само како p53, делува како тумор супресор, така што учествува во регулирање на клеточната делба чувајќи ги клетките од пребрзо или неконтролирано растење и делење. Бидејќи неговата улога е да ја зачува стабилноста недозволувајќи геномска мутација, тој е описан како "чувар на геномот" ("*the guardian of the genome*")¹⁸². Овој протеин реално не е потребен при одвивање на нормален клеточно-делбен циклус. Односно, p53 не би бил потребен кај една совршена клетка, каде нема оштетување на ДНК и ДНК мутации.

Клеточното ниво на p53 протеинот е најважен фактор за неговата функција. Во нормална клетка, p53 е на многу ниско клеточно ниво поради континуирана деградација главно со посредство на протеинот hdm2 (human double minute-2) со кој е врзан во комплекс и кој е негативен регулатор (негативна повратна врска). После оштетување на ДНК или некои други стресни сигнали, доаѓа до дисоцијација на комплексот p53 и hdm2, настапува брза стабилизација и зголемување на клеточното ниво на p53 преку блокирање на неговата деградација а со тоа и активација на p53^{202,120}.

Активиран p53, индуцира запирање на клеточниот циклус (G1/S) овозможувајќи или поправка и опстанок на клетката, или апоптоза (apoptosis - програмирана клеточна смрт) со што се отстранува оштетената клетка. Фазата G1 од клеточниот циклус е фаза во која се одредува подготвеноста на клетката за репликација и не е за изненадување што p53 се наоѓа на излезната точка на фазата G1. Со запирањето на клеточниот циклус се спречува репликацијата на оштетената ДНК. Тука p53 игра клучна улога во одредувањето на тоа дали ДНК ќе се поправи или оштетената клетка ќе се самоуништи (апоптоза). Ако ДНК може да се поправи, p53 активира други гени за да го поправат оштетувањето. Ако ДНК не може да се поправи, тогаш овој протеин ја спречува клеточната делба и сигнализира самоуништување на клетката. Апоптозата останува последна опција со која може да се избегне размножувањето на клетки кои содржат абнормална ДНК. Како p53 го прави овој избор, тековно не е познато. Овој процес (слика бр.4) ја спречува

делбата на клетките што се мутирани или што се со оштетена ДНК, а со тоа спречува развој на тумори.^{1,120}



Слика бр.4. Шематски приказ на активирање на p53 и негови патеки за одржување на геномски интегритет.

Името на протеинот p53 е во врска со неговата молекуларна маса која изнесува 53 kDa.

Одговорен ген за кодирање на протеинот p53 е генот “тумор протеин p53”. Официјален симбол на овој ген е *TP53*. Негова цитогенетска локација е 17p13.1, односно *TP53* се наоѓа на краткиот (p) крак на хромозомот 17 на позиција 13.1. Поточно, генот *TP53* се наоѓа од базниот пар 7 668 401 до базниот пар 7 687 549 на хромозомот 17⁷⁴. Кај човекот овој ген содржи 11 егзони¹⁷⁸. Кодираната секвенца содржи пет региони кои покажуваат висок степен на конзервација, претежно во егзоните 2, 5, 6, 7 и 8¹⁰³. Повеќе од 95% од мутациите на туморите кај човекот се забележуваат во егзоните 5-9¹⁰².

Генот *TP53* е класифициран како тумор супресорки ген. Тој може да биде оштетен од страна на мутагени (хемикалии, радијација, вируси), при што настанува сериозно намалување на туморската супресија и појава на соматски мутации, со што се зголемува веројатноста за неконтролирана делба на клетката и појава на тумори. Сите овие мутации се стекнати. За разлика од нив, Li-Fraumeni²⁰¹ синдромот е наследен синдром за рак поврзан со мутации на генот *TP53* и е исклучително ретка автосомно доминантна наследна болест каде се наследува само една функционална копија од генот *TP53*. Со тоа се стекнува предиспозиција за рак со што се развиваат повеќе независни тумори во различни ткива во раните зрели години.

Мутации на *TP53* се наоѓаат во повеќето видови тумори а според некои истражувања, над 50%⁷⁰ од туморите кај човекот содржат мутација на овој ген.

Schneider-Stock¹⁶⁵ и сор. (2004) ја испитувале мутацијата на p53 кај 54 напреднати тумори на глава и врат ($T_2 = 27$, $T_3 = 13$, $T_4 = 14$). Инциденцата на мутацијата изнесувала 29,7%. Анализа покажала дека не постоела сигнификантна корелација помеѓу мутацијата на p53, од една страна, и возраст, полот, туморската диференцијација, туморската големина и регионалните метастази, од друга страна.

Tang¹⁸⁹ и сор. (2010) истражувајќи ја мутацијата на p53, откриле нејзина инциденца од 50% кај 30 ОК. Сите мутации биле во егзоните 5-8. Анализата покажала дека инциденцата на мутацијата не била асоцирана со возраст, пол, регионални метастази и туморскиот стадиум. Сигнификантна корелација постоела помеѓу мутацијата на p53 и големината на туморот.

Paterson¹³⁷ и сор. (1994) прават преглед на молекуларните промени кај оралниот карцином во "западните земји" (Европа, Америка, Австралија, Јапонија) каде мутациите на *TP53* се чести и "источни земји" (Индија и цела југоисточна Азија) каде мутациите се ретки.

Онфаќајќи повеќе региони од Јужна Америка, Szymańska¹⁸⁶ и сор. (2010) ја испитувале мутацијата на *TP53* кај 236 пациенти со тумори на горен аеро-дигестивен тракт. Инциденцата на мутацијата изнесувала 59% кај туморите од усната шуплина. Анализата покажала дека имало поврзаност на

мутацијата со пушењето а дека немало поврзаност на мутацијата со големината на туморот и регионалните метастази.

Во истражувањето кај 560 карциноми на глава и врат, Poeta¹⁴⁴ и сор. (2007) детектираат мутација на p53 кај 53, 3% од пациентите. Анализата утврдила дека немало асоцијација помеѓу мутацијата на p53 и пушењето. Значајна поврзаност постоела помеѓу мутацијата на p53 и намаленото преживување (секупно).

Atula⁷ и сор. (1996) ја испитуваат мутацијата на p53 и експресијата на Bcl-2 кај 39 сквамозни карциноми на јазик. Авторите откриле дека туморската големина и хистолошката диференцијација се во сигнификантна корелација со мутацијата на p53, при што мутациите се почести во слабо диференцираните и недиференцираните тумори отколку во добродиференцираните тумори. Инциденцата на мутацијата на p53 изнесувала 54%.

Ostwald¹³³ и сор. (2000) детектирале мутација на p53 кај 38% од 60 орални карциноми. Нивните резултати покажале дека не постоела било каква статистички сигнификантна корелација помеѓу p53 и преживувањето.

Lazarus⁹⁹ и сор. (1996), кај 48 пациенти со ОК ја испитувале мутацијата на p53 во однос на пушењето. Анализата ја правеле во егзоните 5-9. Кај 31% од ОК била забележана мутација во егзоните 5-9. Сигнификантно повисока инциденца на мутација на p53 била забележана кај пушачите во однос на непушачите.

Tsurusako¹⁹⁷ и сор. (2002) ја испитуваат мутацијата на p53 кај 28 нетретирани пациенти со карцином на јазик од Јапонија. Во однос на хистолошката диференцијацијата, 3 тумори биле со средна, 24 тумори биле со добра и 1 тумор бил со лоша диференцијација. Само кај 2 (7%) тумора откриле мутации на p53, при што единиот бил добро диференциран, а другиот лошо диференциран. Авторите заклучуваат дека мутацијата на p53 е поретка појава кај добро диференцираните карциноми на јазик.

Kashiwazaki⁸⁷ и сор. (1997) прават студија во која ја испитувале мутацијата на p53 кај ОК во два различни светски региона. Во Јапонија инциденцата на мутација на p53 изнесувала 79% од 33 ОК. Авторите не наоѓаат сигнификантна асоцијација на мутацијата на p53 со возраста, полот,

туморската големина, регионалните метастази и клеточната диференцијација. Во Шри Ланка инциденцата на мутација на p53 изнесувала 35% од 17 ОК. Авторите заклучуваат дека времето и значењето на мутацијата на p53 во прогресијата на ОК се разликуваат помеѓу различни етнички популации и области.

Во истражувањето на Yamazaki²²² и сор. (2003), била испитувана мутацијата на p53 кај 121 примарен ОК. Инциденцата на мутацијата изнесувала 42%. Авторите утврдиле дека освен со регионалните метастази, другите клиничко-патолошки параметри не биле сигнификантно поврзани со мутацијата на p53.

Во друга студија, Yamazaki²²¹ и сор. (2003) идентификувале инциденца од 55,1% кај 27 пациенти со ОК.

Hsieh⁷¹ и сор. (2001) ја истражувале мутацијата на p53 кај 187 ОК во Тајван. Инциденцата изнесувала 48,66% во егзоните 5-9. Редоследно, стапката на мутации по егзони изнесувала: егзон 5 – 34%, егзон 8 – 30%, егзон, егзон 7 – 21%, егзон 6 – 12% и егзон 9 – 3%. Анализата покажала дека инциденцата на мутацијата на p53 не е асоцирана со возраста, полот, туморскиот стадиум и пушчењето.

Во своето истражувањето, Nagai¹²⁴ и сор. (1995) ја испитуваат мутација на TP53 кај 47 пациенти со сквамозен карцином на горните респираторни патишта. Инциденцата на мутацијата изнесувала 49%. Распоредот на мутациите по егзони бил следен: егзон 4 – 5(22%), егзон 5 – 4(17%), егзон 6 – 6(27%), егзон 7 – 4(17%) и егзон 8 – 4(17%). Анализата не покажала поврзаност на мутацијата на TP53 со пушчењето, туморската големина, регионалните метастази и туморскиот стадиум. Авторите откриле зголемен број на мутации на TP53 кај недиференцираните тумори но поврзаноста е со гранична статистичка сигнификантност ($P = 0.0594$).

Кај 80 примарно дијагностицирани орални карциноми, Nylander¹²⁹ и сор. (1996), детектираат мутации на p53 кај 49%. Од тие мутации, 62% се наоѓаат во егзон 8.

Chiba²⁵ и сор. (1998) детектирале мутација на p53 кај 43% од 23 испитаници со ОК во Шри Ланка. При тоа, најголем дел (70%) од мутациите биле во егзон 5.

Во истражувањето на Alsner³ и сор. (2001) инциденцата на мутација на p53 изнесувала 39% од 114 карциноми на ларинкс, фаринкс и усна шуплина. Анализата на податоците покажала јака врска помеѓу мутацијата на p53 и зголемен смртен ризик. Авторите откриле дека постоела сигнификантна асоцијација помеѓу мутацијата на p53 и преживувањето (DFS).

Thomas¹⁹⁵ и сор. (1994) ја истражувале мутацијата на p53 во два региона во светот кои се различни во однос на ризик факторите кај ОК. При тоа биле користени исти постапки за подготовкa на ДНК и анализа на групите. Застапеноста на мутациите во Балтимор (САД) изнесувала 45% а во Папуа Нова Гвинеја 17%.

Huang⁷⁶ и сор. (2009) ја испитуваат мутацијата на p53 кај 351 ОК во Тајван. Преку универијантна анализа, авторите утврдиле дека мутацијата не е асоцирана со преживувањето (DFS) кај овие пациенти.

Dahse³³ и сор. (1999), ја анализираат мутацијата на p53 кај 66 примарни тумори на ларинкс, фаринкс и орална шуплина. Инциденцата на мутацијата на p53 изнесувала 36% и сите мутации биле во егзоните 5-8. Анализата покажала дека инциденцата на мутацијата на p53 не е во корелација со туморкиот стадиум и туморската локализација.

Во студијата на Chaves²² и сор. (2004) спроведена меѓу популацијата во јужен Бразил, анализата не покажала статистички сигнификантна поврзаност на мутација на p53 со пушчењето. Инциденцата на мутацијата на p53 кај пациентите со ОК изнесувала 40%.

Wong²¹⁰ и сор. (1998) детектираат мутација на p53 кај 22% од 36 ОК кај пушачи во Тајван.

Sorensen¹⁷⁷ и сор. (1997) ја испитувале мутацијата на p53 кај 11 пациенти со карцином на јазик кои се помлади од 40 години. При тоа 6 пациенти биле непушачи. Авторите детектирале само 2 (18%) мутации. Нивните резултати сугерираат дека мутациите на p53 се поретки кај оралните карциноми кај млади непушачи во споредба со млади пушачи или со општата популација. Заклучуваат дека оскудноста на p53 мутации се објаснува со неизложеноста на чад но укажуваат дека нивните резултати не даваат одговор за молекуларните механизми кај младите непушачи.

Tanuma¹⁹⁰ и сор. (2010) ја испитувале мутацијата на *TP53* во однос на пушчење, возраст, пол, туморска големина, регионални метастази и туморска локализација. Анализата покажала дека немало сигнификантна корелација помеѓу мутацијата на *TP53* со наведените клиничко-патолошки параметри. Инциденцата на мутацијата изнесувала 36,7% кај 150 пациенти со карцином на усна шуплина.

Во истражувањето на Каппан⁸⁶ и сор. (1999), инциденцата на мутациите на p53 изнесувала 21% кај 72 Индијци со ОК. Од вкупно 15 мутации, во егзон 8 биле откриени 8 мутации.

Помеѓу 37 нетретирани пациенти со ОК од Тајван, Куо⁹⁷ и сор. (1999) утврдиле дека инциденцата на мутација на p53 изнесувала само 5,4%.

Во студијата на Golusinski⁶⁰ и сор. (2011) биле опфатени 50 пациенти со примарни тумори на ларинкс, оро-фарингус и орална шуплина кај кои била испитувана мутацијата на *TP53*. Мутација била детектирана само кај 16% од пациентите. Анализата утврдила сигнификантна корелација помеѓу мутацијата на *TP53* со пушчењето. Локализацијата на туморот и хистолошката диференцијација исто така биле поврзани со мутацијата но не била постигната статистичка значајност. Кај големината на туморот и регионалните метастази не е утврдена корелација со мутацијата на *TP53*.

1.3.2. EGFR

Официјалното име на генот е "epidermal growth factor receptor" (рецептор на факторот за епидермален раст). Официјалниот симбол на овој ген е *EGFR*. Генот *EGFR* содржи 28 егзони¹⁴⁹. Неговата цитогенетска локација е 7p12, односно генот *EGFR* се наоѓа на краткиот (*p*) крак на хромозомот 7 на позиција 12. Поточно, генот *EGFR* се наоѓа од базниот пар 55 019 031 до базниот пар 55 207 337 на хромозомот 7⁷³.

Соодветниот протеин кодиран од страна на овој ген е рецептор на факторот за епидермален раст (EGFR). EGFR припаѓа на фамилијата ErbB. Идентификувани се четири члена на фамилијата ErbB:

- EGFR (ErbB1),
- ErbB2,
- ErbB3, и
- ErbB4.

EGFR е трансмембрански гликопротеин и на самата молекулата се разликуваат 3 региони:

- екстракелуларен - се наоѓа на површината, надвор од клетката и содржи домен за врзување лиганди;
- интрамембранозен - вграден во клеточната мембра; и
- интрацелуларен - во внатрешноста на клетката (во цитоплазмата)

EGFR и неговите лиганди се клеточни сигнални молекули кои се вклучени во различни клеточни функции, вклучувајќи клеточна пролиферација, диференцијација, подвижност, опстанок и развој на ткиво. EGFR се активира преку својот домен на површината на клетката со врзување на свои специфични лиганди, вклучително факторот за епидермален раст (EGF) и трансформирачкиот фактор за раст (TGFα). Врзувањето со лиганд иницира рецепторска хомо/хетеро-димеризација и автофосфорилација од страна на интрацелуларниот домен. Автофосфорилацијата предизвикува активирање на сигнална каскада со што започнуваат многу клеточни одговори кои резултираат со¹³⁰ (слика бр.5):

- клеточна пролиферација,
- отпорност на апоптоза,

- инвазија,
- метастази, и
- ангиогенеза



Слика бр.5. Активација на EGFR и нејзини крајни резултати

Факторот за епидермален раст (EGF) и неговиот рецептор (EGFR) се откриени од Stanley Cohen од универзитетот Вандербайлт (Vanderbilt University), за што 1986 година му е доделена Нобелова награда⁷⁵

Rössle¹⁵³ и сор. (2013) ги испитуваат пореметувањата на EGFR кај раниот орален карцином. Резултатите од истражувањето кај 120 испитаници покажуваат дека нема корелација помеѓу експресијата на EGFR со големината на туморот (T) или со метастазите во регионалните лимфни јазли (N). Во однос на експресијата на EGFR, најголем процент (57,1%) од испитаниците имале средна, следуваат тие со ниска (23,6%) а најмал процент (19,3%) се со висока експресија.

Dragomir⁴¹ и сор. (2012) во истражување кај 32 испитаници со ОК ја испитуваат корелација помеѓу експресијата на EGFR и клеточната диференцијација. Кај 72,7% од испитаниците реферираат за позитивна експресија. Нивните резултати покажуваат дека испитаниците со ниска

експресија на EGFR имаат слаба или средна клеточна диференцијација. Тие наоѓаат дека постои статистички сигнификантна корелација помеѓу EGFR и клеточната диференцијација.

Ulanovski⁹⁹ и сор. (2004), исто така ја испитуваат експресијата на EGFR во нивната студија кај 24 испитаници со ОК на јазик. Тие добиле зголемена експресија кај 34% од испитаниците. При тоа, статистички значајна корелација постоела помеѓу EGFR и туморската диференцијација но не е најдена асоцијација помеѓу EGFR и N - метастази во регионални лимфни јазли. Тие заклучуваат дека EGFR не може да послужи како прогностички фактор или индикатор за опстанок/преживување и успешен третман во ОК на јазик.

Во ретроспективната студија на Laimer⁹⁸ и сор.(2007) ја испитуваат експресијата на EGFR кај 109 пациенти со орален и оро-фарингеален карцином. Добиената Kaplan-Meier крива покажува значајно поврзување на високата експресија на EGFR со намалено севкупно преживување. Мултиваријантната анализа покажува дека високата експресија на EGFR е независен прогностички маркер кај пациенти со орален и оро-фарингеален карцином. Заклучуваат дека EGFR претставува привлечна цел за целна терапија со моноклонални антитела или специфични (тиrozин-киназа) инхибитори.

Diniz-Freitas⁴⁰ и сор. (2007) ја детерминираат експресијата на EGFR испитувајќи 47 пациенти со ОК при што 74,5% од нив имале средна и висока експресија. Во однос на клиничките и хисто-патолошките параметри, тие не наоѓаат статистички значајни асоцијации со експресијата на EGFR. Нивните наоди укажуваат дека EGFR не е корисен прогностички индикатор кај ОК и дека поради високата застапеност, зголемената експресија на EGFR заслужува понатамошно истражување за анти-EGFR терапија.

Во прелиминарна студија кај 19 испитаници со ОК, Bagan⁸ и сор. (2012) наоѓаат дека експресијата на EGFR е највисока во напреднатите стадиуми но без статистичка сигнификантност.

Hanabata⁶⁶ и сор. (2012) кај 52 пациенти со ОК на јазик ја истражуваат прекумерната експресија на EGFR и нејзините односи со 5 клинички и хистопатолошки параметри меѓу кои се туморската диференцијација и

напреднатиот туморски стадиум. Само кај туморската диференцијација наоѓаат обратна/инверзна поврзаност со EGFR, нагласувајќи дека се потребни понатамошни студии за разјаснување на клиничката значајност на EGFR во/кај малигната манифестација.

Tamás¹⁸⁸ и сор. (2011) испитуваат повеќе маркери меѓу кои и EGFR кај 124 планоцелуларни карциноми на глава и врат. При тоа, за експресијата на EGFR не откриваат било какви значајни разлики во однос на анатомската локација/локализација (супраглотична, тонзиларна, тонзило-јазична, усна шуплина, орофаринкс без тонзили, ларинкс без супраглотис и хипофаринксот).

Во неодамнешното испитување кај 113 испитаници со орален и орофарингеален карцином, Perisanidis¹⁴⁰ со сор. (2013) оценуваат дека експресијата на EGFR не може да се користи како прогностички показател.

Temam¹⁹² и сор. (2007) од M.D. Anderson Cancer Center – Хјустон, САД, го испитуваат EGFR кај 134 пациенти со планоцелуларен карцином на глава и врат. Кај 17% од пациентите наоѓаат зголемена експресија на EGFR. После 5 години од дијагностицирањето, смртноста кај пациентите со зголемена експресија кај OK е 91%. Авторите не наоѓаат мутација на EGFR кај ниту еден тумор.

Chiang²⁴ и сор. (2008) кај 20 испитаници со OK не наоѓаат мутација на EGFR. Нивните наоди укажуваат на висока експресија на EGFR кај пациенти кои долги години цвакаат арека.

Во студијата кај 52 пациенти со орален карцином, Hiraishi⁶⁸ и сор. (2006), ја истражуваат експресијата на EGFR меѓу другото/останатото и во однос на пол, возраст, големина на тумор, регионални метастази, стадиум на болеста и туморска диференцијација. Висока експресија на EGFR е присутна кај 63% од пациентите. Тие не наоѓаат значајна корелација помеѓу високата експресија и наведените клиничко-патолошки параметри.

Shiraki¹⁷³ и сор. (2005) ја истражуваат експресијата на EGFR во врска со туморската големина, регионалните метастази, клиничкиот стадиум, туморската диференцијација и преживувањето. Опфаќаат 140 пациенти со OK. Кај 46% од испитаниците имаат наод дека експресијата на EGFR е позитивна и дека таа значајно е асоцирана со слабо диференциирани

тумори. Во однос на преживувањето, пациентите во групата на тумори со позитивна експресија на EGFR имаат тенденција на полошо преживување во однос на групата на тумори со негативна експресија, иако оваа разликата не е со статистичка значајност. Тие реферираат дека кај преостанатите клиничко-патолошките фактори и експресијата на EGFR не постои значајна статистичка асоцијација.

Putti¹⁴⁶ и сор. (2001) спровеле опсежна студија за да го детерминираат нивото на експресија кај EGFR во азиско – пацифичкиот регион при што ги опфаќаат Сингапур, Хонг Конг, Тајван и Австралија. Вклучени биле 172 пациенти со карцином на глава и врат. Резултатите покажале повисока експресија на EGFR кај T4 тумори и во подоцните клинички стадиуми. Во однос на ризик факторите, примарна туморска локализација и етникумот, авторите не нашле значајна корелација со високата експресија на EGFR.

Sheikh¹⁷⁰ со сор. (2008) ги испитувале мутацијата и експресијата на EGFR кај 91 пациент со планоцелуларен карцином на глава и врат од јапонска националност а кај 65 од нив имала експресија на EGFR. Кај 26% од пациентите кај кои е испитувана експресијата наодите покажуавале дека таа била зголемена. Овие пациенти значајно биле асоцирани со слабата туморска диференцијација и позитивните регионални лимфни јазли. Ниту еден пациент не прикажал Мутација на EGFR.

Bergler¹¹ и сор. (1989) ја испитувале експресијата на EGFR кај

- испитаници со OK,
- испитаници без OK кои биле изразити пушачи, и
- Испитаници без OK кои не биле пушачи.

Наодите од студијата покажале зголемена експресија на EGFR во првите две групи а истата била сигнификантно намалена во третата група.

Thomas¹⁹⁴ и сор. (2012), ги истражувале HPV и EGFR преку нивната експресија кај 62 OK, кои доминантно (n=43) биле со туморски стадиум S1 и S2. Пет години после третманот, преживувањето кај пациентите со висока експресија изнесувало 81,1%, наспроти 100% преживување кај пациентите со ниска експресија.

Во ретроспективно истражување кај 40 туморски примероци на орален карцином, Sarkis¹⁶² и сор. (2010) вршат евалуација на експресијата на EGFR.

Тие наоѓаат зголемена експресија кај 15% примероците. Експресијата на EGFR не е во корелација со ниту еден од испитуваните клиничко-патолошки параметри: големина на туморот, туморски стадиум, метастази во лимфни јазли и туморска диференцијација.

Во студијата на Del Sordo³⁸ со сор. (2010), 65% од 40 пациенти со карцином на јазик имале висока експресија на EGFR. Не е најдена значајна корелација помеѓу експресијата на EGFR и клиничко-патолошките параметри.

И наредните две истражувања покажуваат релативно голема застапеност на висока експресија на EGFR. Во истражувањето на Vosoughhosseini²⁰³ таа изнесува 75% а кај Bernardes¹² е 50%.

Ongkeko¹³² и сор. (2005) ја испитувале зголемената експресија на 4 маркери меѓу кои е EGFR кај 38 пациенти со карцином на глава и врат. Кај 38% од пациентите експресијата на EGFR била зголемена. Нивниот наод не покажал корелација помеѓу зголемената експресија на EGFR и преживувањето.

Sauter¹⁶⁴ и сор. (1992) кај 20 пациенти со сквамозен карцином од горниот аеро-дигестивен тракт ја испитувале зголемената експресија на 3 маркери меѓу кои е EGFR. При тоа, 18 пациенти биле со S3/S4 туморски стадиум. Зголемена експресија на EGFR детектирале кај 60% од пациентите и при тоа не постоела корелација помеѓу зголемената експресија и преживувањето.

Xia²¹⁷ и сор. (1999), ја испитувале експресијата на EGFR кај 111 пациенти со ОК во однос на возраст, пол, туморската диференцијација, туморската големина, регионалните и далечните метастази. Кај 47 од пациентите тие ја анализирале и асоцијацијата помеѓу стапката на преживување и експресијата на EGFR. Нивните резултати покажале дека има значајна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и возраста и помеѓу експресијата на EGFR и присуството на регионални метастази кај ОК. Во однос на преживувањето, зголемената експресијата на EGFR била значајно поврзана со скратено преживување на пациентите. Кај полот, туморската големина и туморската диференцијација не регистрирале сигнификантна асоцијација.

Во својата студија Chandarana²⁰ и сор. (2013) ја испитувале експресијата на EGFR кај 36 пациенти со карцином на орофаринкс и 49 пациенти со ОК – сите хируршки третирани. Кај 63% од пациентите со ОК резултатите покажале зголемена експресија на EGFR. Нивниот наод покажал асоцијација/поврзаност на експресијата на EGFR и намалено/скратено преживување кај пациентите со карцином на орофаринкс, додека кај пациентите со ОК не утврдиле асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и преживувањето.

Во студијата која опфаќала 31 шпанец со планоцелуларен карцином на глава и врат, Lemos-González¹⁰¹ со сор. (2007) ги испитуваат мутациите на EGFR. Кај ниту еден од пациентите не е најдена мутација на EGFR.

Tushar¹⁹⁸ & Ramanathan (2013) ја испитувале мутацијата на EGFR тенот поточно на неговиот егзон 27 на група од 35 хируршки примероци со ОК. Не утврдиле мутација кај ниту еден примерок.

Loeffler-Ragg¹⁰⁸ со сор. (2006) ја истражуваат мутацијата на EGFR кај 100 кавкасици со карцином на глава и врат. Наоѓаат само една мутација (1%) на EGFR кај тумор на ларинкс.

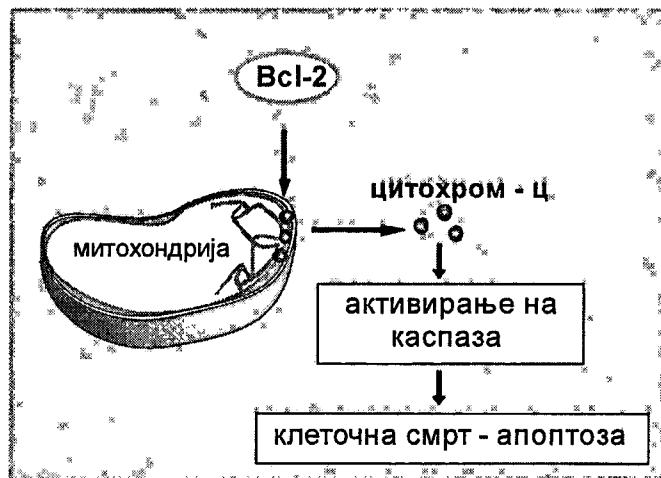
Испитувајќи 108 пациенти со планоцелуларен карцином на глава и врат, Na¹²³ и сор. (2007), кај 16% од нив откриваат мутации на EGFR. При тоа, нивните резултати покажуваат дека овие мутации не се повразани со полот, возрастта, пушењето и дека мутациите на EGFR не се значаен прогностички параметар кај карциномите на глава и врат.

Szymańska¹⁸⁶ и сор.(2010) ги истражувале мутациите на EGFR кај 44 пациенти со карцином на усна шуплина, фаринкс, ларинкс и езофагус, од различни делови на Јужна Америка. Во истражувањето наоѓаат мутации на EGFR кај 4% од пациентите.

Huang⁷⁷ и сор. (2009), ја испитувале експресијата и мутацијата на EGFR кај 172 испитаници со ОК. Зголемена експресија имале кај 27.9% од испитаниците а мутација регистрирале само кај 1 (0.58%) испитаник.

1.3.3. Bcl-2

Протеинот Bcl-2 се наоѓа на надворешноста на митохондријалната мембрана, во мемраната на ендоплазматскиот ретикулум и мемраната на јадрото. Bcl-2 е потентен инхибитор на програмираната клеточна смрт – апоптозата, односно има анти-апоптотична улога. Тој е „основачки“ член на Bcl-2 фамилијата која е составена од протеини кои ја регулираат апоптозата преку внатрешен (митохондријален) пат. Во рамки на оваа фамилија некои протеини имаат инхибиторен (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 и др.), а други стимулаторен (Bax, Bak, Bad, Bid, Bik и др.) ефект во апоптозата. Протеините од Bcl-2 фамилијата ја остваруваат својата регулаторна улога менувајќи ја пропустливоста на мемраната на митохондриите и ослободување на цитохром c (cytochrome c). Со тоа започнува апоптозата преку ланчана реакција во која централна улога има каспазата (caspase – цистеин-аспартат специфична протеаза)^{29, 106} (слика бр.6).



Слика бр.6. Шематски приказ на внатрешен пат на апоптоза

Протеинот Bcl-2 е откриен кај Б клеточниот лимфом од каде потекнува и неговото име (B-cell lymphomas). Генот кој ја одредува синтезата на Bcl-2 протеинот се наоѓа на долгот крак (q) на 18-от хромозом на позиција 21.3. (цитогенетска локација 18q21.3)²⁰⁴. Официјално име на генот е B-Cell CLL/Lymphoma, а симбол на генот е *BCL2*. Припаѓа на човечките прото-онкогени.

Зголемената експресија на Bcl-2 ја оневозможува реализацијата на апоптозата во клетките со оштетен наследен материјал, а со тоа ја промовира неконтролираната пролиферација на трансформираните клетки. Зголемено ниво на Bcl-2 генот се среќава кај 90% од карциномите на дебело црево, кај 60% од карциномите на желудник, кај 30%-60% од карциномите на простата, кај 30% од неуробластомите и во различен процент се забележува кај карциномот на штитната жлезда, меланомот и други тумори¹⁵⁵.

Влијанието на Bcl-2 во генезата на сквамозниот ОК, Rahmani¹⁴⁸ и сор. (2012) го истражуваат кај 60 тумори. Откриле дека постои ограничена експресија на Bcl-2 кај тумори со добра и умерена клеточна диференцијација. Висока експресија на Bcl-2 била забележана кај тумори со лоша клеточна диференцијација. Со зголемување на степенот на клеточна диференцијација, експресијата на Bcl-2 статистички значајно се зголемувала. Покрај тоа, авторите утврдиле сигнификантна поврзаност на експресијата на Bcl-2 со туморскиот стадиум и регионалните метастази, при што немало поврзаност на експресијата на Bcl-2 со возраста и полот.

Atula⁷ и сор. (1996) ја испитувале експресијата на Bcl-2 кај 39 сквамозни карциноми на јазик. Детектирале средна и висока експресија на Bcl-2 само кај 6 (15,5%) пациенти и сите тие биле пушачи. Помеѓу експресијата на Bcl-2 и пушењето откриле сигнификантна корелација.

Кај 56 карциноми на глава и врат, Dijkema³⁹ и сор. (2000) ја испитувале експресијата на Bcl-2 во однос на големина на туморот, регионалните метастази, локализација на туморот и туморската (клеточна) диференцијација. При тоа, не е најдена поврзаност на експресијата на Bcl-2 со ниту еден клиничко-патолошки параметар а исто така ниту со преживувањето на пациентите.

Jordan⁸² и сор. (1996) во истражувањето кај 30 ОК, идентификуваат средна и висока експресија кај 19 (60%) тумори. При тоа, кај лошо диференцираните тумори таа била највисока.

Во ретроспективно-проспективна студија која опфаќала 62 пациенти, Loncarević¹⁰⁹ со сор. (2012) ги истражувале експресијата на Bcl-2 и клиничко-патолошките параметри кај ОК. Авторите утврдиле статистички

високозначајна позитивна корелација помеѓу степенот на експресија на Bcl-2 и хистолошкиот градус на туморите.

Целта на студијата на Wilson²⁰⁹ била да се истражи влијанието на BCL-2 во голема серија на пациенти со рак на главата и вратот. Зголемена експресија на Bcl-2 била регистрирана кај 12,8% од 400 тумори. Авторите утврдиле дека кај туморите со зголемена експресија постојат значајни разлики во однос на локализацијата, така што назофарингеалните тумори покажале највисока инциденца (46,2%). Мултиваријантната анализа покажала дека Bcl-2 била силно поврзана со хистолошкото дедиференцирање, зголемениот степен на регионални метастази (N) и женскиот пол. Во униваријантната анализа, пациентите со зголемена експресија на Bcl-2 имале подобро преживување во споредба со пациенти со намалена експресија на Bcl-2.

Friedman⁵³ и сор (2001) во нивното истражување кај 69 пациенти откриле дека нема сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на Bcl-2 и преживувањето.

Leyva-Huerta¹⁰⁴ и сор. (2012) детектирале намалена експресија кај сите 16 ОК кои ги истражувале.

Во студијата кај 229 пациенти со ОК, Coutinho-Camillo³⁰ и сор. (2010) ја истражувале поврзаноста на протеините од Bcl-2 фамилијата со клиничко-патолошките карактеристики на туморот. За анти-апоптотичниот протеин Bcl-2 утврдиле поврзаност со локализација на туморот, односно зголемената експресија на Bcl-2 асоцирала со туморите кои се јавуват на база на устата.

Solomon¹⁷⁶ и сор. (2010), прават молекуларна анализа кај 30 примероци на докажани орални карциноми. Кај 25 (83,3%) била евидентирана позитивна експресија на Bcl-2. Нивните наоди покажуваат дека експресијата на Bcl-2 е инверзно поврзана со степенот на диференцијација, односно експресијата е повисока кај тумори со добра клеточна диференцијација.

Во студијата кај 20 орални карциноми, Ricieri Brito¹⁵⁰ со сор. (2010) истражуваат молекуларни маркери меѓу кои е Bcl-2. Кај 4(20%) пациенти детектирана е експресија на Bcl-2 и при тоа не е утврдена поврзаност помеѓу експресијата на bcl-2 и туморскиот стадиум.

Sahoo¹⁵⁹ и сор. (2009) спровеле студија кај 22 пациенти со примарен карцином на ларинкс. Авторите ја истражувале експресијата на Bcl-2 во однос на возраста, туморскиот стадиум и регионалните метастази. Нивната анализа утврдила сигнификантна инверзна корелација на туморскиот стадиум и регионалните метастази со експресијата на Bcl-2. Кај возраста не утврдила било каков сооднос.

Кај 24 пациенти со орален карцином Kummoona⁹⁶ и сор.(2008) ја истражувале експресијата на прото-онкогенот Bcl-2. Кај 14 (58,3%) пациенти детектирале позитивна експресија. Авторите утврдиле дека корелацијата на Bcl-2 со возраста, полот, туморската големина и регионалните метастази не е статистички сигнификантна, додека корелацијата со клеточните диференцијации G2 and G3 е статистички сигнификантна. Пациентите со ниска експресија манифестирале полошо преживување во споредба со пациентите кои имале средна или висока експресија но таа разлика статистички не е сигнификантна.

Во студија која опфаќала 28 пациенти, Popović¹⁴⁵ и сор. (2007) го анализирале анти-апоптотичниот протеин Bcl-2 кај оралниот карцином. Авторите не откриле разлика во експресијата помеѓу туморите со различни локализации како и помеѓу туморите од двата пола. Кај пациенти над 60 годишна возраст било утврдено статистички значајно зголемување на експресијата.

Во студијата на de Vicente³⁷ и сор. (2002), биле опфатени 37 пациенти со карцином на јазик кај кои е испитувана експресијата на Bcl-2. Авторите утврдиле сигнификантна поврзаност на Bcl-2 со регионалните метастази (N) и преживувањето. Пациентите со негативна експресија во туморите имале подолго преживување во однос на оние со позитивна експресија.

García-Montesinos-Perea⁵⁶ и сор. (2005), утврдиле многу ниска експресија на Bcl-2 во истражување кое опфаќало 79 пациенти. Експресија била позитивна кај 3,8%.

Sułkowska¹⁸³ и сор. (2003) ја испитувале експресијата на протеинот Bcl-2 во однос на возраста, полот, локализацијата на примарниот тумор и клеточната диференцијација на туморот кај 129 пациенти со ОК. Авторите

утврдиле статистички значајна позитивна корелација помеѓу експресијата на Bcl-2 и високиот туморски градус (тумори со лоша клеточна диференциација).

Во студијата која била спроведена кај 90 пациенти со ОК, Lo Muzio¹⁰⁷ и сор. (2003) ги истражувале клиничко-патолошки корелации на експресијата на Bcl-2. Кај 16 (17%) пациенти била детектирана позитивна експресија. Анализата покажала дека постоела статистичка значајна корелација помеѓу Bcl-2 и полот на пациентите, големина на туморот и регионалните метастази. Директна корелација помеѓу Bcl-2 и туморскиот стадиум била откриена, но без статистичка значајност. Поголем процент на позитивна експресија на Bcl-2 е утврдена кај туморите со G1 и G3 клеточна диференциација во однос на туморите со G2 и таа разлика била статистички значајна. Пациентите со ниска експресија на Bcl-2 имале полошо преживување во однос на пациентите со средна и висока експресија на Bcl-2, но разликата не била статистички значана.

Во истражување кое опфатило 73 пациенти, Yuen²²⁴ и сор. (2002) ги испитувале експресијата на Bcl-2 во однос на клиничко-патолошки карактеристики на карциномот на јазик. Експресија на Bcl-2 била позитивна кај 11% од пациентите. Анализата утврдила дека експресијата на Bcl-2 немала значајна корелација со туморскиот стадиум, регионалните метастази и клеточната диференцијација на туморот.

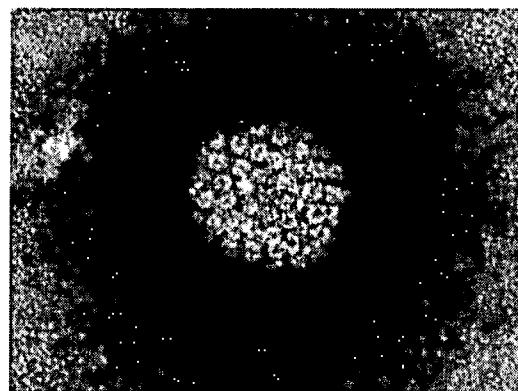
Teni¹⁹³ и сор. (2002) ја испитувале експресијата на Bcl-2 кај 63 пациенти со ОК. Зголемена експресија на Bcl-2 детектирале кај 56% од пациентите. Авторите утврдиле значајна корелација помеѓу зголемена експресија на Bcl-2 и присуство на регионални метастази.

Stoll¹⁸¹ и сор. (2000) во нивното испитување детектирале зголемена експресија на Bcl-2 кај 31,8% од 107 пациенти со сквамозен орален карцином.

Yao²²³ и сор. (1999) ја испитувале експресијата на Bcl-2 кај 52 примарни сквамозни карциноми на јазик. Тие идентификувале зголемена експресија кај 26 (50%) пациенти. Утврдиле дека постоела статистички сигнификантна зависност помеѓу застапеноста на експресијата на Bcl-2 и клеточна диференцијација на туморот. Помеѓу застапеноста на експресијата на Bcl-2 и регионалните метастази немало сигнификантна зависност.

1.3.4. ХПВ

Human Papillomavirus (HPV) припаѓа на фамилијата Papillomaviridae, која вклучува 16 различни родови. Од тие, за човекот најзначајни се алфа и бета родот. Алфа родот содржи вируси кои се поврзани со развојот на тумори на кожата и слузниците а бета родот содржи вируси кои се поврзани со развојот на кожни тумори. HPV е исклучиво епителiotропен вирус. Познати се преку 100 типа од овој вирус. Во однос на онкогениот потенцијал односно способноста да предизвикаат малигна трансформација на епителните клетки, тие се поделени на ниско ризични и високо ризични типови. И едните и другите може да предизвикаат туморски раст но само кај високо ризичните тој е инвазивен. Високо ризичните ХПВ типови се поврзани со инвазивните планоцелуларни карциноми и затоа се среќаваат уште и како онкогени ХПВ типови. Според Меѓународната агенција за истражување на рак (IARC) и Светската здравствена организација, постојат доволно докази дека за човекот се канцерогени следниве HPV типови: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59²¹².



Слика бр.7. Електронска микрографија на ХПВ (Извор: Laboratory of Tumor Virus Biology, NIH-Visuals Online# AV-8610-3067)

HPV се мали, без обвивка вируси, со икоzaедарна капсида, чија димензија е од 50 до 60 nm во дијаметар (слика бр.7). Овие вируси содржат затворен, циркуларен, двоверижен ДНК геном кој содржи 7000-8000 базни парови и кој постои во хроматинизирана состојба. Геномот на HPV е поделен на три функционални региони²¹³:

- E (early) регион - кодира протеини (E1, E2, E4, E5, E6 и E7) потребни за вирусна генска експресија, репликација и опстанок;
- L (late) регион - кодира структурни протеини (L1 и L2);
- LCR (long control region) регион – некодирачки регион, регулира вирусна генска експресија и репликација.

E5, E6 и E7 се вирусни онкогени и нивната експресија предизвикува имортализација и трансформација на клетката. Посебно се значајни онкопротеините E6 и E7 затоа што нивна цел е деактивирање на негативните регулатори на клеточниот циклус, p53 и pRb.

Онкопротеинот E6 е најпознат по неговата способност да се врзува со тумор супресорскиот протеин p53 што води до понатамошна протеолитичка деградација на p53, што резултира со толеранција од ДНК грешки. Исто така, E6 индуцира експресија и активност на теломеразата со што овој онкопротеин е одговорен и за клеточна имортализација, иако точниот механизам со кој то постигнува овој ефект останува неразјаснет.

Главен клеточен партнери на онкопротеинот E7 е тумор супресорскиот протеин pRb и при нивното врзување доаѓа до деградација на pRb. Протеинот retinoblastoma (Rb) со неговите фамилијарни членови p107 и p130, познати под колективното име “џепни” протеини, се вклучени во регулација на клеточниот циклус преку модулација на E2F транскрипцискиот фактор. Во нормални услови овие протеини се транскрипциски репресори. Онкопротеинот E7 може да ги врзе и деградира и протеините p107 и p130. Со тоа настанива целосно губење на контролата над E2F транскрипцискиот фактор и прогресија на клеточниот циклус, што резултира со континуирано размножување¹⁸⁰.

Сумирено, ХПВ протеините во епителните клетки водат до²¹²:

- имортализација
- геномска нестабилност
- оштетување на ДНК репарирачките механизми
- клеточната пролиферација и диференцијација
- Инхибиција на апоптоза

Пренесувањето на ХПВ инфекцијата на слузницата во ано-гениталната регија и горниот аеро-дигестивен тракт како и на кожата, можно е

само при директен контакт на епител со епител. Пристапот до базалните клетки ХПВ го прави преку микро-абразии веќе присутни во епителот¹⁸.

Сексуалната активност на човекот е најчестиот пат преку кои се врши хоризонтална пренесувањето на ХПВ. Начини на трансмисија на ХПВ во лезиите на слузниците на горниот аеро-дигестивен тракт се²¹³:

- оро-генитален контакт,
- перинатална трансмисија, и
- ауто-инфекција при оро-генитален контакт со раце при генитална ХПВ инфекција

Во заедничката студија на Cancer Center Karolinska од Стокхолм и Metaxas Cancer Hospital од Пиреа, предводена од Romanian и Näsman¹⁵² (2008), била истражувана застапеноста на ХПВ кај оралниот и орофарингеалниот карцином во Грција. Од 113 пациенти, 31 имале тонзиларен карцином, 38 имале карцином на јазик и 46 биле со орален карцином исклучувајќи карцином на јазик. Детекција на ХПВ била со PCR. Вкупната застапеност на ХПВ изнесуваја 13%, при што кај тонзиларниот карцином изнесувала 43% а кај оралниот карцином бил детектиран само еден 1 (3%) примерок со ХПВ. Кај оралниот карцином не бил детектиран ХПВ позитивен тумор. Во однос на генотипот, доминирал ХПВ16 - 69%.

Во студијата на Rushatamukayanunt¹⁵⁶ и сор. (2014), ХПВ бил испитуван кај две групи од по 40 испитаници од Јапонија – едната група била со испитаници помлади од 40 години а другата група била со испитаници постари од 40 години. ХПВ ДНК била детектирана со PCR базиран тест. Кај помладата група, ХПВ ДНК позитивни биле 2 (5%) испитаника и само 1 (2,5%) испитаник кај постарата група. Не постоела сигнификантна корелација помеѓу присуството на ХПВ ДНК со испитуваните клиничко-патолошки параметри - возраст, пол, локализација на примарен тумор, големина на тумор, регионални метастази и пушење.

Меѓународен тим од истражувачи од Канада, Шпанија и Сенегал, предводен од Ndiaye¹²⁷, во 2013 ја истражувале улогата на ХПВ кај карциномите на глава и врат во Сенегал. Групата броела 117 испитаници од кои 41 испитаник бил со орален карцином. ХПВ ДНК била детектирана (PCR)

вкупно кај 4 испитаници односно само кај еден (2,4%) испитаник со орален карцином. ХПВ35 бил детектиран кај оралниот карцином.

Во студија на IARC предводена од Herrero⁶⁷ (2003) бил испитуван ХПВ кај оралните карциноми и карциномите на орофаринкс. Студијата била спроведена во Италија, Шпанија, Северна Ирска, Полска, Индија, Канада, Австралија и Судан. Испитничката група броела 908 пациенти од кои 766 биле со орален карцином и 142 со карцином на орофаринкс. ХПВ ДНК била најдена кај 30 (3,9%) испитаници со орален карцином и кај 20 (18,3%) испитаници со карцином на орофаринкс. ХПВ ДНК била детектирана со PCR. Во однос на типот на ХПВ, најзастапен бил ХПВ16 со 89,3%. ХПВ16 бил заедно со ХПВ18 во 5,4%. Еден испитаник бил со ХПВ18, еден со ХПВ33 заедно со ХПВ35 и еден со ХПВ35.

Pathare¹³⁸ и сор. (2011) во својата студија за орален карцином меѓу другото ја испитувале (PCR) застапеноста на ХПВ. Истражувањето било спроведено во Tata Memorial Centre, Индија, и опфаќало 97 испитаници. За детекција на ХПВ ДНК била користена PCR метода. ХПВ ДНК не била најдена кај ниту еден тумор од испитаниците.

Kouvousi⁹¹ и сор. (2013) ја истражувале застапеноста на ХПВ кај 45 грчки испитаници со орален карцином. Со PCR детектирана е онкогена ХПВ ДНК кај 3 (6,7%) испитаници (јазик=2, база на уста=1). Кај два од случаите бил утврден генотипот ХПВ16 а кај преостанатиот еден - ХПВ18. Застапеноста на ХПВ помеѓу преживеаните (DFI) пациенти не била статистички сигнификантна.

Lingen¹⁰⁵ и сор. (2013) имале за цел да го проценат етиолошкиот дел на ХПВ кај оралните карциноми во 4 болници во Северна Америка, во периодот 2005-2011. ХПВ позитивни тумори со високоризичен тип биле 24 (5,9%) од 409 испитаници. Со ХПВ16 биле 3,7% а со ХПВ18 биле 2,2% од испитаниците. Во однос на локализацијата најзастапени биле туморите на база на уста (n=9) и преден јазик (n=6). ХПВ позитивните тумори биле сигнификантно асоциирани со машкиот пол, почетен туморски стадиум и слаба клеточно-туморска диференцијација.

Gah⁵⁴ и сор. (20014) ја испитувале застапеноста на ХПВ кај 200 испитаници со орален карцином од Кина и истата ја споредувала во однос на

клиничко-патолошките параметри. За идентификација на генотиповите на ХПВ биле употребени PCR и директно секвенционирање. Вкупната застапеност на ХПВ изнесувала 27,5% при што учеството на ХПВ16 било 19,5%, на ХПВ18 било 7,5% и 0,5% биле коинфекција од овие два типа на ХПВ. Анализата не утврдила асоцијација на присуството на ХПВ ДНК ниту со клиничкиот стадиум на туморот ниту со локализацијата на примарниот тумор.

Quintero¹⁴⁷ и сор. (2013) ја испитувале застапеноста и типовите на ХПВ кај 157 испитаници од Колумбија со карциноми на глава и врат. Вкупната застапеност на ХПВ ДНК изнесувала 18,9%, од кои 15,4% биле ХПВ16 и 3,42% биле ХПВ18. ХПВ бил детектиран кај 23,9%, 17,5% и 13,3% во оралната празнина, ларинкс и орофаринкс соодветно. Детекцијата на ХПВ ДНК била со PCR технологија.

Rivero¹⁵¹ и сор. (2006) ја истражувале застапеноста на ХПВ кај 40 пациенти со орален карцином во Бразил. Користејќи PCR, амплификација на ХПВ не била забележана кај ниту еден испитаник.

Falaki⁴⁶ и сор. (2011) во ретроспективна студија го истражувале ХПВ кај испитаници со орален карцином од Иран. Испитаничката група броела 158 пациенти и сите биле помлади од 40 години. Детектирањето на ХПВ било со PCR. Кај ниту еден од испитаниците не била пронајдена ХПВ ДНК.

Mitra¹¹⁸ и сор. (2007) ја испитувале интеракцијата помеѓу ХПВ и алтерациите на p53 кај карциномите на глава и врат. За таа цел во студијата вклучуваат 92 испитаника од источна Индија. Вкупната застапеност на ХПВ ДНК кај испитаниците изнесувала 69% а застапеноста на мутациите во кодирачкиот регион на p53 изнесувала 21%. Отсуство на мутација на p53 кај ХПВ позитивните тумори било статистички сигнификантно во споредба со ХПВ негативните тумори, но истото не било пронајдено за LOH на p53.

Dai³⁴ и сор. (2004) спроведуваат Мултицентрична студија на IARC, во која се истражувал генотипот ХПВ16 и мутациите на p53 кај оралниот и орофарингеалниот карцином. Вклучени биле 35 испитаници со ХПВ позитивни карциноми и 35 испитаници со ХПВ негативни карциноми. Анализата покажала дека постоела инверзна асоцијација помеѓу присуството на мутации на p53 и присуството на ХПВ ДНК кај оралниот и орофарингеалниот карцином.

1.3.5. LOH и MSI

За малигна транформација на клетките, непосредно се вклучени две главни класи на гени -protoонкогените и тумор супресорските гени. Карциногенеза е можна само ако клетката содржи два мутирани алела од одреден ген. За да се случат овие две мутации потребен е подолг временски период што (пак) е причина за развој на карциномите во понапредната возраст. Лицата пак, кои наследуваат еден мутиран алел, исто така мора да доживеат втора (овој пат соматска) мутација на преостанатиот алел и бидејќи таа е единствена, започнувањето на карциногенезата кај овие лица е во рана возраст.

Неопходноста од две мутации за започнување на карциногенеза е изнесена од Алфред Кнудсон⁸⁹ како "two-mutation" хипотеза, која денес е позната како Кнудсон-ова "two-hit" хипотеза. Веројатно поточен назив е теорија наместо хипотеза, затоа што многу покасно е и експериментално докажана со прикажување на LOH (loss of heterozygosity – губење на хетерозиготност) кај тумор супресорскиот ген RB1¹⁹. LOH е честа форма на алелна нерамнотежа (allelic imbalance - AI) и детекцијата на LOH е широко прифатен метод за идентификација и анализа на наведен тумор супресорски ген во одреден геномски регион¹⁷⁵.

LOH како поим значи загуба на еден алел на конститутивен хетерозиготен локус¹⁷⁵. Како израз/фраза LOH се користи за опис на процес кој доведува до инактивација на вториот алел на ТСГ. Загубата на алелот може да биде вториот и фатален удар за функционален "нокаут" на ТСГ, во кој првиот алел е мутиран претходно. Мутациите кои го инактивираат ТСГ, наречени се loss-of-function мутации и најчесто се точкести мутации и мали делеции²³.

LOH е многу честа генетска промена во човековите тумори. Кога LOH се појавува со висока фреквенција во одреден регион на хромозомот, генерално, тоа се смета за показател на локацијата на тумор супресорски ген чие деактивирање било поради "two-hit" механизмот. LOH укажува на делеција на сегмент од ДНК и губење на ТСГ кој се наоѓа во тој регион/сегмент¹⁴¹. Всушност, настанува загуба на геномски фрагмент со

соответна инактивација на ТСГ. LOH е крупен хромозомски настан и со анеуплоидијата (абнормален број на хромозоми во кариотипот) се претставници на хромозомската нестабилност.

За анализа на LOH се користат региони на ДНК, означени како микросателити. Микросателит претставува низа од репетирачка ДНК секвенца. Секвенцата може да содржи од 1 до 7 базни парови. Во зависност од бројот на базни парови на репетирачката секвенца, микросателитите се класифицирани како моно-, ди-, три-, тетра-, пента-, хекса-, хептаклуклеотиди. Поедноставено, класичен микросателит е само просто повторување на секвенцата (анг. simple sequence repeats - SSRs). Повторувањата на секвенцата може да бидат до 100 пати²⁸.

Микросателити се среќаваат по целиот геном. Со анализа на микросателитите во туморско ткиво може да се открие и MSI (microsatellite instability - микросателитска нестабилност). Инсерција или делеција на базни парови во микросателитите се нарекува микросателитска нестабилност. При тоа, бројноста на секвенците во микросателитите со микросателитска нестабилност е различен од бројноста на секвенците во микросателитите во конститутивната (вродената/нормалната) ДНК. Како појава, ова абнормално скратување или продолжување на микросателитите, забележана е и описана кај голем број тумори кај човекот¹¹¹.

Гените кои содржат Микросателити се повеќе ранливи на мутации од гените кои не содржат микросателити затоа што репетирачките секвенци (микросателити) посебно се склони кон грешки при репликацијата (инсерции и делеции). Вообично, овие грешки се поправаат од страна на MMR (mismatch repair) механизмот кој вклучува повеќе протеини/гени со кои се овозможува одржување на геномска верност на домаќинот. При тоа, MMR механизмот мора 1. да ја препознае грешката, 2. да ги отстрани грешните бази, и 3. да ресинтетизира ДНК. Ако не функционира ДНК поправката преку MMR механизмот, микросателитите стануваат нестабилни, имаат различни број на репетирачки секвенци и доаѓа до микросателитска нестабилност (MSI). MSI е маркер за неисправна ДНК поправка, односно преку детекција на микросателитска нестабилност откриваме постоење на дефект кај MMR

механизмот; рак се јавува кога погрешна ДНК поправка води до мутации во тумор супресорските гени или онкогените⁹⁴.

ДНК поправката преку MMR механизмот е високо конзервирали биолошки пат кој игра клучна улога во одржувањето на геномска стабилност. MMR механизмот е потребен за клеточниот циклус и / или програмираната клеточна смрт како одговор на различните видови на оштетувања на ДНК. Тој ја корегира неусогласеноста кај ДНК генерирана за време на репликацијата, со што не дозволува мутациите да станат постојани во делбените клетки. Бидејќи MMR механизмот ги редуцира грешките поврзани со репликацијата, дефектите во Истиот ќе водат до зголемена стапка на спонтана мутација. Инактивирањето на MMR гените во човековите клетки е поврзано со наследни и спорадични случаи на рак⁶³.

Преку микросателитските маркери може да се утврди постоење на одредени гени кои се вклучени во канцерогенезата на оралниот карцином. Детектирање на загуба на хетерозиготност и/или микросателитска нестабилност на одреден крак на хромозом, значи можна вклученост во канцерогенезата на гените кои се наоѓаат во тој регион. Со помош на овие методи се откриваат нови тумор супресорски гени или се потврдува/отфрла значењето на веќе постоечките гени. Хромозомски краци кои го привлекуваат истражувачкото внимание поради присуство на гени кои веројатно се вклучени во канцерогенезата на оралниот карцином се 3р, 7q, 8р, 9q, 9р, 11р, 13q, 17р и 18q.

На краткиот крак на 3-от хромозом се наоѓаат неколку гени кои може да имаат улога во канцерогенезата кај оралниот карцином:

- MLH1 (MutL Homolog 1) – учествува во поправката на ДНК.
- VHL (Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor) – клучен негативен регулатор на ангиогенезата.
- TGFBR2 (Transforming Growth Factor, Beta Receptor II) - ја регулира транскрипцијата на група гени поврзани со клеточната пролиферација.
- FHIT (Fragile Histidine Triad) – има улога во индукција на апоптозата преку повеќе сигнални патеки.
- Кластер од тумор супресорски гени во регионот 3р22-21.3.

На долгият крак на 7-от хромозом се наоѓа генот:

- TFPI-2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor 2) - тоа е ген кој има протеиназа инхибиторна активност за тромбин, плазмин и трипсин, кои се лачат од повеќе тумори.

На краткиот крак на 8-от хромозом се поцирани гените:

- MTUS1 (Microtubule Associated Tumor Suppressor 1) – ја забавува митозата со пролонгирање на метафазата и го редуцира растот на туморот.
- LZTS1 (Leucine Zipper, Putative Tumor Suppressor 1) – вклучен е во контрола на клеточниот циклус.
- NKX3-1 (NK3 Homeobox 1) – е транскрипциски фактор и може да се однесува како транскрипциски репресор.
- Cathepsin B (Cathepsin B) – учествува во туморската инвазија и метастази,
- DLC1 (Deleted in Liver Cancer 1) – има клучна улога во биолошки процеси како што се клеточната миграција и пролиферација,
- RHOBTB2 (Rho-Related BTB Domain Containing 2) – неопходен за клеточната делба; неговиот продукт е протеин кој го инхибира растот и ширењето на туморот,
- TNFSF10 (Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 10) – учествува во индукција на клеточната апоптоза.

На долгот крак на 9 хромозом се наоѓаат гените:

- PTCH (Patched 1) – ја инхибира митозата; тумор супресорски ген чиј продукт е трансмембрански протеин кој учествува во клеточната пролиферација,
- TSC1 (Tuberous Sclerosis1) – ја инхибира фосфорилацијата стимулирана од факторот за раст,
- Notch1 – влијае во спроведување на диференцијација, пролиферација и апоптотички програми; вклучен е во ангиогенезата и негативно ја регулира ендотелијалната клеточна пролиферација и миграција како и ангиогенетското 'ртење.

Најзначајните гени на краткиот крак на 9-от хромозом се :

- p14ARF – го активира тумор супресорскиот ген P53 преку инхибиција на неговиот негативниот регулатор Mdm2; инхибитор на клеточниот циклус.

- p16INK4a – го активира тумор супресорскиот ген RB преку негативна регулација на CDK4; инхибитор на клеточниот циклус.
- На овој крак се наоѓаат генот MTAP и интерферон-а генски кластер – IFN-а
На краткиот крак на 11-от хромозом се наоѓаат гените:
 - WT1 (Wilms Tumor 1) - генски продукт на WT1 е транскрипциски фактор со важна улога во клеточниот развој и преживувањето,
 - MEN1 (Multiple Endocrine Neoplasia 1) функционира како транскрипциски регулатор,
 - P57 (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C) функционира како негативен регулатор на клеточната пролиферација,
 - PAK1 (Protein Activated Kinase 1) е вклучен во интрацелуларните сигнални патеки. Тој игра важна улога во цитоскелетната динамика, клеточната атхезија, апоптозата и митозата.

На долгот крак на 13-от хромозом се наоѓаат гените:

- RB1 (Retinoblastoma 1) е прв пронајден и еден од најзначајните тумор супресорски гени, кој е и негативен регулатор на клеточниот циклус,
- BRCA2 (Breast Cancer 2) е вклучен во поправка на ДНК и/или хомологна рекомбинација.

На краткиот крак на 17-от хромозом се наоѓаат гените:

- TP53 (Tumor Protein P53) кој има значајно место во канцерогенезата и инхибиторни улоги во клеточниот циклус и во апоптозата,
- MAP2K4 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4) е ген кој се наоѓа во "сенка" на TP53 и негова улога е да кодира член во MPAK (митоген-активирани протеин киназа) фамилијата која е вклучена во повеќе клеточни процеси како пролиферација, диференцијација, транскрипциска регулација и развој.

Долгиот крак на 18 –от хромозом е резервиран за следните гени:

- DCC (Deleted In Colorectal Carcinoma) генот индуцира апоптоза и вклучен е во активација на MPAK
- SMAD2 (SMAD Family Member 2) посредува во TGF-beta сигнализацијата за регулирање на раст и диференцијација на клетката и

- SMAD4 (SMAD Family Member 4) создава хомо-олигомерски формации од SMAD4 протеини или хетеро-олигомерски формации од SMAD2/SMAD4 протеини што резултира со нарушување на TGF-бета сигнализација⁷².

Gross⁶² и сор. (2014) спровеле сеопфатна анализа на молекуларните и клиничките карактеристики на 378 испитаници со карцином на глава и врат. Меѓу другото испитувале LOH на 3р и мутација на TP53. Утврдиле дека мутацијата на TP53 често е придрожена со LOH на 3р и дека комбинацијата на овие 2 настани е асоцирана со изненадувачко намалено преживување – 1,9 години наспроти >5 години при само мутација на TP53.

Shiga¹⁷² и сор. (2012) ги истражувале разликите помеѓу оралниот, фарингеалниот и ларингеалниот планоцелуларен карцином на молекуларно ниво кај 121 испитаник. LOH е испитуван кај три хромозомски краци - 3р, 9р и 17р (3р22, 9р21 и 17р13).

Застапеноста на LOH на 3р21 кај фарингеалниот карцином била 66,7% и била сигнификантно повисока во однос на ОК (20%) и карциномот на јазик (14,8%). Кај карциномите на орофаринкс и хипофаринкс, застапеноста на LOH на 3р21 изнесувала 63% и 68% соодветно, и била сигнификантно повисока отколку кај ОК и карциномот на јазик.

Застапеноста на LOH на 9р21 кај карциномите на фаринкс (58,3%) и ларинкс (60,0%), сигнификантно била повисока во однос на застапеноста кај ОК (34,6%). Кај карциномите на орофаринкс и хипофаринкс, застапеноста на LOH на 9р21 (44,4% и 66,7%) била повисока отколку застапеноста на LOH на 9р21 кај карциномот на јазик (33,3%) но без статистичка сигнификантност.

Застапеноста на LOH на 17р13 кај фарингеалниот (71%) и кај ларингеалниот (73,1%) карцином, сигнификантно била повисока во однос на застапеноста кај ОК (36,1%). Кај фарингеалниот и кај ларингеалниот карцином, застапеноста на LOH на 17р13 сигнификантно била повисока во однос на застапеноста кај карциномот на јазик (37%). Исто така, статистички повисока била застапеноста на LOH на 17р13 кај карциномот на орофаринкс (81,8%) во однос на ОК.

Yamamoto²¹⁹ и сор. (2007) кај 26 испитаници со ОК, користеле 9 микросателитски маркери за испитување на LOH кај три хромозоми, меѓу кои и на краткиот крак на третиот хромозом (3р). Понатаму, LOH го испитувале

во однос на големината на примарниот тумор (T), туморскиот стадиум (S), клеточната диференцијација на туморот, џвакање тутун, полот и возраста на испитаниците. LOH на 3р, кај еден или повеќе локуси бил детектиран кај 84,6% од испитаниоците. Најзастапени локуси биле 3р25 (53,8%) и 3р21.3 (50%). Анализата покажала дека не постоела сигнификантна статистичка корелација помеѓу LOH и клиничко-патолошките параметри.

Студијата на Partridge¹³⁶ и сор. (1996) опфаќала 48 испитаници орален карцином а испитувањето на LOH на Ch3р било реализирано со 15 микросателитски маркери. LOH на Ch3р го анализирале во однос на туморскиот стадиум (S), регионалните метастази, клеточната диференцијација на туморот, локализација на туморот, пушење цигари, полот и возраста на испитаниците. Кај 34 (71%) испитаници бил детектиран LOH на 3р. Единечни LOH биле почести во раните туморски стадиуми додека мултипни LOH биле почести во касните туморски стадиуми. Анализата покажала дека постоела сигнификантна корелација помеѓу LOH на 3р од една страна и регионални метастази и туморскиот стадиум од друга страна. Покрај тоа, анализата открила дека LOH на 3р е поврзано со сигнификантно намалување на преживувањето. Кај преостанатите клиничко-патолошки параметри не е најдена поврзаност со LOH на 3р.

El-Naggar⁴³ и сор. (1995) ја истражувале загубата на хетерозиготност кај нормална слузница, напредната дисплазија/carcinoma *in situ* и инвазивен карцином на глава и врат кај 20 испитаници. Испитани биле 25 микросателитски региони кај повеќе хромозоми меѓу кои и 3р, 8р, 9р, 9q, 17р и 18q. Од примероците со карцином, 16(80%) имале LOH на најмалку еден микросателитски регион. LOH бил регистриран со следнава застапеност: 9р (72%), 8р (53%), 3р (47%), 9q (35%), 17р (22%), 18q (25%). Авторите ја испитувале корелацијата на тумори кои имаате LOH до 2 и над 2 локуса од една страна, со клиничко-патолошките параметри на туморите од друга страна. Анализата покажала дека LOH е статистички сигнификантно поврзан со понапреднати туморски стадиуми и слабата клеточна диференцијација.

Во студија која опфаќала 28 испитаници, Asakawa⁶ и сор. (2008) го истражувале LOH само кај планоцелуларен карцином на јазик. Студијата била концентрирано на краткиот крак на третиот хромозом (3р) и за таа цел

LOH е испитуван на повеќе локуси, вклучувајќи го и *von Hippel-Lindau* генот. LOH кај овој ген бил со релативно висока застапеност – 45,5%. Авторите ја испитувале поврзаноста на клиничко-патолошките карактеристики на туморските примероци со високата застапеност на LOH кај генот *von Hippel-Lindau* и на други локуси на Зр. Анализата открила дека во однос на возраста, LOH се среќава поретко кај испитаниците под 40 години (наодот бил со гранична статистичка сигнификантност). Во однос пак на туморскиот стадиум, туморско-клеточната диференцијација, пушењето и полот, не е пронајдена поврзаност со LOH на Зр.

Matsuura¹¹³ и спр. (1999) испитувале LOH на Ch3p и Ch9p кај 93 карциноми на глава и врат (1/3 се орални крциноми). Секој хромозомски крак бил испитуван со по еден микросателитски маркер. Застапеноста на LOH на Ch3p и Ch9p изнесувала 78% и 89% соодветно. Во однос на клиничко-патолошките карактеристики, анализата утврдила дека не постоела сигнификантна статистичка корелација помеѓу LOH на Ch3p и Ch9p од една страна, со возраста, полот, големината на туморот (T), регионалните метастази (N), туморскиот стадиум (S) и локализација на примарниот тумор, од друга страна. Во однос на преживувањето постоела статистички сигнификантна поврзаност и кај двата маркери.

Во студија за LOH кај планоцелуларните карциноми на глава и врат, Shiga¹⁷¹ и спр. (2004) опфаќаат 302 испитаници. Тие ја истражувале застапеноста на LOH на три хромозомски краци - 3p, 9p и 17p и таа соодветно испнесувала 54.5%, 57.4% и 57.1%. При тоа, авторите ја анализирале поврзаноста на LOH со следните клиничко-патолошки карактеристики: туморската големина (T), регионалните метастази (N), туморскиот стадиум (S), локализација на примарниот тумор, возраста и полот на испитаниците. Кај туморската локализација, покрај регионална поделба на орална празнина, фаринкс, и ларинкс, постои поделба кај оралната празнина на образ, база на уста, јазик, гингива и максила.

Анализата на LOH на 3p21, покажала дека застапеноста кај испитаници со присутни регионални метастази (N1,N2,N3) била сигнификантно повисока од испитаници каде што отсуствуваат регионални метастази (N0). Во однос на туморскиот стадиум, застапеноста на LOH на

3p21 кај испитаници со напреднати стадиуми била сигнификантно повисока отколку кај испитаници со почетни стадиуми (S1+S2). За останатите клиничко-патолошки карактеристики, анализата не покажала статистички сигнификантна поврзаност со LOH на 3p21.

Анализата на LOH на 9p21, покажала дека застапеноста кај испитаници со најголема туморска големина (T4) била сигнификантно повисока отколку кај испитаници со помала туморска големина (T2). Во однос на возраста, застапеноста на LOH на 9p21 кај испитаници со напредната возраст била ѕигнификантно повисока отколку кај помлади испитаници. За останатите клиничко-патолошки карактеристики, анализата не покажала статистички сигнификантна поврзаност со LOH на 9p21.

Анализата на LOH на 17p13, покажала дека застапеноста кај испитаници со најизразени туморски големини (T3+T4) била сигнификантно повисока отколку кај испитаници со почетни туморски големини (T1+T2). Во однос на туморскиот стадиум, застапеноста на LOH на 17p13 кај испитаници со напреднати стадиуми (S3+S4) била сигнификантно повисока отколку кај испитаници со почетни стадиуми (S1+S2). За останатите клиничко-патолошки карактеристики, анализата не покажала статистички сигнификантна поврзаност со LOH на 17p13.

Во студијата на Field⁴⁹ и сор. (1995) со 145 микросателитски маркери спровеле истражување за опсежна идентификација на региони од 39 хромозомски краци. Добиените податоци за LOH од 80 испитаници со карциноми на глава и врат биле анализирани во однос на клиничко-патолошки параметри. Најголема застапеност на LOH, над 45% била забележана на 3p (52%), 9p (62%), 17p (50%) и 18q (49%). Значајна застапеност на LOH, над 20% била забележана на 8p (35%), 9q (20%), 13q (27%), 17q (30%). LOH на 7q имало кај 7%. Анализата покажала дека постоела статистички сигнификантна корелација:

- помеѓу регионални метастази/позитивни лимфни јазли (N) и LOH на 9p.
- помеѓу клеточна диференцијација (G) и LOH на 13q.
- помеѓу локализација на примарниот тумор и LOH на 3p и LOH на 8p.
- помеѓу стадиумот (S) и LOH на 3p; помеѓу стадиумот (S) и LOH на 17p.
- Напреднати туморски стадиуми често имале LOH на повеќе локуси.

Weber²⁰⁶ со сор. (2007) спровел обемно истражување на LOH кај оралниот карцином, карциномот на оро-фаринкс и хипо-фаринкс. Во истражувањето биле вклучени 122 испитаници, исклучиво пушачи. Бил испитуван LOH кај/во целиот геном и за таа цел користел 366 микросателитски маркери. Добиените наоди за LOH биле споредувани со клиничко-патолошки карактеристики на туморот. Највисока застапеност на LOH, над 50%, постоела кај Ch3p, Ch9p (95%) и Ch17p. Анализата утврдила дека:

- постоела статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу LOH на 3p и 18p од една страна, во однос на регионалните метастази (N), од друга страна.
- непостоела статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу LOH на 3p, 11p и 18q од една страна, во однос на туморската големина (T), од друга страна.
- непостоела статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу LOH на 3p, 8p, 13q и 17p, од една страна, во однос на туморскиот стадиум (S), од друга страна.

Murali¹²² и сор. (2011) испитуваат LOH на Ch9p кај 81 пациент со орален карцином. Го испитувале локус 9p21 со два микросателитски маркери (D9S161 и D9S162) за кои застапеноста на LOH изнесувала 56% и 31% соодветно. Маркерот D9S162 бил поврзан со намалување на севкупното преживување на испитаниците.

За истражувањето на LOH и MSI на Ch9p, Xiao²¹⁸ и сор. опфатиле 24 пациенти со орален карцином. Во испитувањето користеле 8 микросателитски маркери. Застапеноста на LOH изнесувала 41,7% со најмалку еден маркер. Авторите не откриле статистички сигнификантна корелација помеѓу LOH на Ch9p со клиничко-патолошките параметри како што се големина на тумор и регионални метастази. Кај сите орални карциноми, MSI била ретка за сите 8 маркери при што авторите заклучиле дека MSI не е важен настан.

Miracca¹¹⁶ и сор. (1999) испитувале LOH кај вкупно 47 пациенти со карциноми на глава и врат. Цел на истражувањето бил генот p16 односно краткиот крак на деветиот хромозом Ch9p.21. Истражувањето го спровеле со

два микросателитски маркери. Добиените наоди од LOH на Ch9p ги споредувале со возраста и полот на испитаниците, како и со туморската големина (T), туморскиот стадиум (S), регионалните метастази (N), туморклеточната диференцијација (G) и локализацијата на примарниот тумор. Анализата покажала дека не постоела статистички сигнификантна корелација помеѓу LOH на Ch9p со клиничко-патолошките карактеристики како и со преживувањето на пациентите.

Sang-Hyuk Lee¹⁶⁰ и сор. (2011) испитувале LOH на повеќе хромозомски краци меѓу кои на 9p, 13q, и 17p односно цел од интерес им биле тумор супресорските гени p16, Rb и p53, соодветно. Во истражувањето во кое биле вклучени 30 испитаници со планоцелуларен карцином на фаринкс, авторите ги споредувале резултатите од LOH со клиничко-патолошките карактеристики на туморите. Највисока застапеност на LOH покажал 17p (p53) со 52,6%. Сигнификантно висока застапеност на LOH на 13q, 17p и LOH на 2 локуса биле откриени кај случаите кои имале регионални метастази. Споредено со туморите во почетни стадиуми (S1 и S2), туморите во понапреднати стадиуми (S3 и S4) имале сигнификантно повисока застапеност на LOH на 13q, 17p и LOH на 2 локуса. Во истражувањето не постоела сигнификантна корелација на присуството на LOH со преживувањето на испитаниците.

Rybicki¹⁵⁷ и сор. (2003) истражувале LOH кај 139 пациенти со карцином на глава и врат. LOH го испитувале на повеќе хромозомски региони, вклучувајќи ги 3p, 8p, 9p и 18q. Авторите откриле сигнификантни разлики во однос на анатомската локализација на примарниот тумор, при што туморите во фаринкс и ларинкс споредено со туморите во оралната празнина имале значајно повисока застапеност на LOH на 3p и 18q. Статистички сигнификантна поврзаност постела помеѓу вкупниот туморски градус (клеточната диференцијација) и LOH на 3p.

Miracca¹¹⁷ и сор. (2000) испитувале LOH кај 81 пациент со карциноми на глава и врат. Во истражувањето користеле 6 микросателитски маркери за следниве хромозоми 3p, 6q, 9p, 11p, 17p и 17q. Највисока застапеност на LOH постоела кај 17p (54%), 9p (48%) и 3p (41%). Авторите откриле сигнификантна асоцијација помеѓу:

- LOH на 3р и LOH на 9р;
- LOH на 9р и LOH на 11р;
- LOH на 9р и LOH на 17р.

Помеѓу LOH на 9р и 17р од една страна и пушењето цигари од друга страна, постоела јака корелација.

Arai⁴ и сор. (2002) ги испитувале MSI и LOH на краткиот крак на третиот хромозом. Истражувањето го спровеле кај 40 примарни орални карциноми. MSI бил детектиран кај 6 (15%) испитаници, додека LOH бил детектиран кај 24 (60%) испитаници. Авторите не утврдиле поврзаност на MSI и LOH со клиничко-патолошките параметри.

Сличен податок во однос на застапеноста на MSI изнесуваат Ng¹²⁸ со сор. (2000). Во нивното истражување застапеноста на MSI и LOH изнесувала 13% и 30% соодветно. Ги истражувале 3р, 4q, 7q, 9р, 17р и 18q со 17 микросателитски маркери кај 30 испитаници со карцином на глава и врат.

Field⁴⁸ и сор. (1995) ја истражувале MSI преку 34 микросателитски маркери кај 56 испитаници со карциноми на глава и врат. MSI била испитувана во однос на ТНМ стадиумот, преживувањето, локализација на примарниот тумор, клеточната диференцијација, присутни регионални метастази и пушењето. Застапеноста на MSI изнесувала 28%. Не била утврдена корелација помеѓу MSI и клиничко-патолошките карактеристики, освен со пушењето каде постоела негативна корелација.

Jin⁸⁰ и сор. (1999) испитувале LOH и MSI кај 36 пациенти со карциноми на глава и врат. Сите испитаници биле под 40 годишна возраст. Највисока застапеност на LOH постоела на Ch9 и Ch17 и инциденцата на LOH кај поимлади била слична на инциденцата што се сретнува кај возрасни испитаници. Анализата покажала дека не постоела корелација на LOH на Ch3р, Ch9р и Ch17р со клиничко-патолошките параметри. MSI бил детектиран кај 6 тумори, односно кај <17%, додека LOH за најмалку еден маркер бил детектиран кај 30 тумори, односно 83%.

Уште пониска застапеност на MSI утврдиле Koy⁹² со сор. (2008), испитувајќи ги LOH и MSI кај 91 испитаник со карциноми на глава и врат. Застапеноста на MSI и LOH во нивното истражување изнесувала 7,7% и 57% соодветно.

De Schutter³⁵ и сор. (2006) ги испитувале LOH и MSI во самиот туморот и неговата микросредина кај 48 испитаници со карциноми на глава и врат. Највисока застапеност на LOH манифестирале 3р, 9р и 17р. MSI не бил детектиран кај ниту еден испитаник.

Истиот автор (De Schutter)³⁶, утврдува сличен резултат во наредно истражување во 2009 година. Кај 80 испитаници со карциноми на глава и врат, детектира MSI само кај еден испитаник.

Glavac⁵⁹ и сор. (2003) ги испитувале LOH и MSI кај 153 испитаници со карцином на глава и врат. Испитувале со 14 микросателитски маркери на следниве хромозомски краци: 3р, 9р, 11q, и 17р. И покрај високата застапеност на LOH (78%) мутацији на MMR гените не биле утврдени при што авторите заклучуваат дека тумор супресорскиот пат има доминантна улога во развојот на карциногенезата на карциномите на глава и врат.

Piccinin¹⁴³ и сор. (1998), преку LOH и MSI го истражувале феноменот "field cancerization" кај 67 испитаници со карциноми на глава и врат (45 со еден примарен тумор и 22 со повеќе примарни тумори). Користеле 20 микросателитски маркери за шест хромозомски краци - 1р. 3р. 3q. 9р. 13q и 19р. Анализата не утврдила корелација помеѓу MSI и клиничко-патолошките параметри (туморски стадиум, пол, возраст и пушење). MSI бил детектиран кај 2(9%) испитаника со повеќе примарни тумори и кај 3(7%) испитаници со еден примерен тумор поради што авторите заклучуваат дека MMR генетската нестабилност има минимална улога во развојот на канцерогенезата кај карциномите на глава и врат.

Спротивно на претходните автори, Ha⁶⁵ со сор. (2002) и El-Naggar⁴² со сор. (1996) испитувајќи MSI во своите истражувања утврдуваат дека таа била поврзана со инвазивните и агресивните карактеристики на туморите. Застапеноста на MSI била поврзана со повисоките туморски стадиуми, одредувајќи ја за доцен настан во развој на туморската прогресија.

Nawroz¹²⁶ и сор. (1994), користејќи 58 микросателитски маркери ја испитувале застапеноста на LOH кај 29 пациенти со карцином на глава и врат. Најголема застапеност (>50%) детектирале кај следните хромозомски краци: 3р (67%), 9р (72%), 13q (54%) и 17р (52%). Кај преостанатите, застапеноста била: 7q (29%), 8р (40%), 9q (13%), 11р (17%), 18q (23%).

Beder¹⁰ и сор (1995) користеле широк геномски панел од 191 микросателитски маркер за испитување на LOH кај 22 испитаници со карцином на глава и врат. Кај 53 маркери застапеноста била над 30%. Најголема застапеност на LOH имало на следниве хромозомски краци - 3р (53%), 9р (73%), 13q (50%) и 17р (71%). Кај дел од преостанатите маркери била регистрирана следнава застапеност на LOH: 7q - 7%, 8р - 28%, 9q - 30%, 11р - 27%, 18q - 16%.

Gao⁵⁵ и сор. (2007) истражувајќи ја загубата на хетерозиготност на хромозомскиот крак 9р кај 34 испитаници со орален карцином, утврдиле застапеност на LOH од 29%.

El-Naggar⁴⁴ и сор. (1996) испитувале LOH на краткиот крак на 11-от хромозом кај 56 испитаници со планоцелуларен карцином на глава и врат. Застапеноста на LOH била 50,9%. Анализата покажала дека постоела статистички сигнификантна асоцијација помеѓу LOH на 11р и слабата (лоша) клеточна диференцијација. Кај туморскиот стадиум, полот и возрастта не била утврдена асоцијација со LOH на 11р.

Sabbir¹⁵⁸ и сор. (2006) испитувале LOH на долгот крак на 13-от хромозом кај 55 испитаници со карцином на глава и врат. Застапеноста на LOH изнесувала 39%. Анализата утврдила дека постоела асоцијација на LOH на 13q со клиничкиот стадиум и хистолошкиот градус.

Pearlstein¹³⁹ и сор. (1998) испитувале LOH на кракот 18q кај 67 испитаници со карцином на глава и врат. Застапеноста на LOH изнесувала 40%. Анализата утврдила дека испитаниците со LOH на 18р имале статистички сигнификантно полошо преживување споредено со испитаниците без LOH на 18р.

2. ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Сакајќи да дадеме свој придонес во проширување и подигање на сознанијата за молекуларните маркери кај оралниот карцином, како и за нивната поврзаност со клиничко-патолошките параметри кои се значајни во хируршкиот план и третман на болеста си ги поставивме следните цели:

1. Да се детерминира застапеноста на ХПВ кај оралните карциноми и кој тип е најчест.
2. Да се испитаат:
 - промените (мутациите) во p53 и EGFR кај оралниот карцином
 - промените на ниво на експресија кај p53, bcl-2, EGFR и дисбалансот во сет од микросателитски маркери кај оралниот карцином,
а сите тие во однос на клинички непроменетата слузница.
3. Да се испита корелацијата помеѓу промените во p53, bcl-2, EGFR и микросателитските маркери со клиничките и патолошките параметри на оралниот карцином.
4. Да се утврди кој од маркерите поединечно или со некој друг/и, има прогностичка важност за оралниот карцином.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

За остварување на зададените цели беше спроведено проспективно истражување кај пациенти со орален карцином кои беа оперативно третирани во периодот од 29.01.2010 год. до 06.11.2012 год. Влезен критериум за испитаничката група беше хистопатолошки верификуван планоцелуларен карцином со орална локализација кај испитаникот и истиот да не бил под радиотерапија и/или хемотерапија.

Истражувањето се изведуваше во следните институции:

- J.Z.U. Универзитетска клиника за максилофацијална хирургија – Скопје
- Центар за биомолекуларни фармацевтски анализи, УКИМ – Фармацевтски факултет, Скопје.
- Институтот за патолошка анатомија, УКИМ – Медицински факултет, Скопје.

1. Испитаници и биолошки материјал:

Во студијата беа вклучени 37 испитаници. Од секој пациент непосредно при оперативниот зафат беа земани 4 примероци од биолошки материјал:

1. оперативно отстрането ткиво (тумор) за хистопатолошка верификација
2. туморското ткиво (~5mm³), за молекуларни анализи
3. здрава слузница од контраплатерална страна (~5mm³), за молекуларни анализи
4. периферна крв земена во вакутанипер епрувети со EDTA како антикоагуланс (3 мл), за молекуларни анализи

Оперативниот материјал за хистопатолошка верификација беше по стандардна процедура доставуван во Институтот за патологија.

Примероците од туморското ткиво и здравата слузница (понатаму означено како нормално ткиво) беа ставани во стерилни пластични тубички и истите со крвта во епруветите веднаш беа транспортирани во лабораторијата на Фармацевтскиот факултет.

2. Методи

Базата на податоци за клиничко-патолошките карактеристики/параметри на испитаниците ја сочинуваа:

- големина на туморот,
- присутни/отсутни метастази во регионални вратни лимфни јазли,
- стадиум на туморската болест,
- клеточна диференцијација на тумор,
- локализација на примарен тумор,
- дали е жив,
- треживување во Месеци после третман,
- пушење,
- пол, и
- возраст.

Податоците за клиничко-патолошките карактеристики беа добивани од:

- анамнеза,
- физикален преглед,
- медицинска документација, и
- хисто-патолошкиот наод

Во однос на клиничко-патолошките карактеристики испитаниците беа поделени на следниов начин:

- Возраст:
 - 30 - ≤ 40 год.
 - 40 - ≤ 50 год.
 - 50 - ≤ 60 год.
 - 60 - ≤ 70 год.
 - 70 - ≤ 80 год.
 - 80 - ≤ 90 год.
- Пол:
 - мажи
 - жени
- Локализација на примарен тумор:
 - јазик

- тврдо непце
- ретромоларно
- сублингвално
- образ
- меко непце
- Пушење:
 - пушачи
 - непушачи
- Дали испитаникот е жив:
 - жив
 - починат
- Преживувањето беше нотирано во месеци поминати од третманот

За клиничко-патолошките карактеристики големина на тумор (T), регионални вратни лимфни јазли (N) и стадиум на туморската болест (S), поделбата беше според *Tumor-Node-Metastasis* класификациониот систем (*AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed.*) а врз основа на хистопатолошки наод (Слика бр.8):

- Големина на примарен тумор (T)
 - TX - не може да се одреди примарен тумор
 - Tis - Carcinoma *in situ*
 - T1 - тумор со големина до 2cm во најголемата димензија
 - T2 - тумор со големина од 2cm но не повеќе од 4 cm во најголемата димензија
 - T3 - тумор со големина над 4 cm во најголемата димензија
 - T4a - тумор кој зафатил соседни структури (низ кортикална коска, во длабочина на надворешните мускули на јазик (*genioglossus, hyoglossus, palatoglossus* и *styloglossus*), максиларен синус, кожа.
 - T4b - тумор кој навлегува во мастиаторниот простор, ламините на птеригоидниот продолжеток, или базата на черепот и/или ја опкружува внатрешната каротидна артерија.
- T4a и T4b беа подредени во T4.

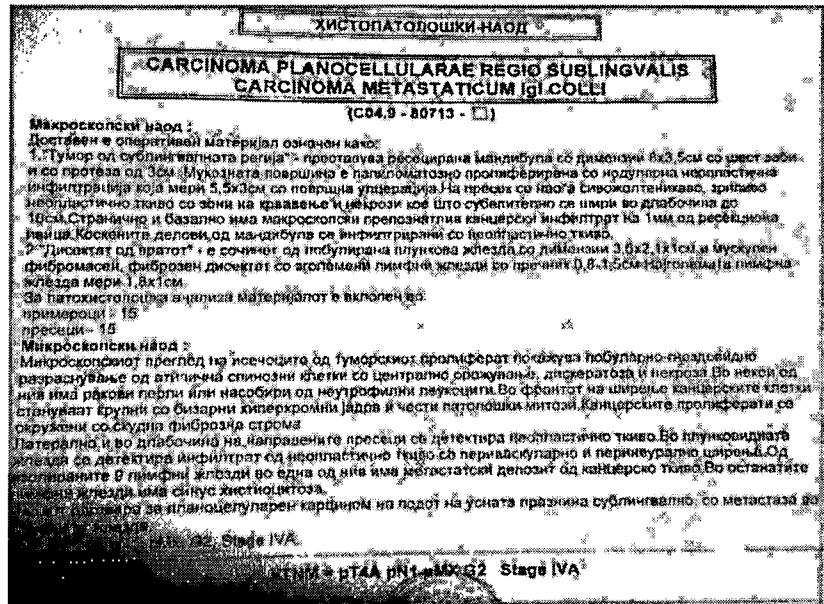
- Регионални лимфни јазли (N)
 - NX - регионални метастази не може да се одредат
 - N0 - нема регионални метастази
 - N1 - метастази во еден, ипсолатерален лимфен јазол, со големина до 3 см
 - N2a: - метастази во еден, ипсолатерален лимфен јазол, со големина од 3 до 6 см
 - N2b: - метастази во повеќе ипсолатерални лимфни јазли, со големина до 6 см
 - N2c: - метастази во билатерални или контрапатерални лимфни јазли, со големина до 6 см
 - N3 - метастаза во еден, ипсолатерален лимфен јазел, со дијаметар над 6 см

N2a, N2b и N2c беа подредени во N2.
- Далечни метастази (M)
 - MX - далечни метастази не може да се одредат
 - M0 - нема далечни метастази
 - M1 - има далечни метастази
- Стадиуми на болеста (S)
 - S0 - Tis,N0,M0
 - SI - T1,N0,M0
 - SII - T2,N0,M0
 - SIII - T3,N0,M0; T1,N1,M0; T2,N1,M0; T3,N1,M0;
 - SIVA - T4a,N0,M0; T4a,N1,M0; T1,N2,M0; T2,N2,M0;
T3,N2,M0; T4a,N2,M0
 - SIVB - било кое T,N3,M0; T4b,било кое N,M0;
 - SIVC - било кое T,било кое N,M1;

SIVA, SIVB, SIVC беа подредени во S4.

➤ Клеточна диференцијација на туморот беше според AJCC:

- G1 - добро диференциран
- G2 - средно диференциран
- G3 - слабо диференциран
- G4 - недиференциран



Слика бр.8. Хистопатолошки наод со TNM, стадиум и градус на карциномот.

➤ Изолација на геномска ДНК од периферна крв

Примероците со периферна крв најпрво беа подложени на центрифугирање 5 минути на 3000 грт на температура од 4C . Плазмата беше отстранета со аспирација, а исталожените клетки беа подложени на двократно промивање со физиолошки раствор (0.9% NaCl). На седиментот на клеточни елементи беа додадени 10ml 1XRCLB раствор (1.55M NH₄Cl 0.1M NH₄HCO₃, 1ml EDTA pH7.4) со цел за лизирање на еритроцитите. Лизирањето се одвиваше 20 мин на 4C со повремено промешување и потоа примероците беа центрифугирани 5 минути на 3000грт на температура од 4C . По центрифугирањето талогот од леукоцити беше ресуспендиран во 2.5ml STE раствор со благо промешување и беа додадени 125μl 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) и 30 μl протеиназа K со концентрација 20 mg/ml. Смесата беше инкубирана на 37° преку ноќ до потполна дигестија на клеточните структури. Наредниот ден на вискозниот раствор беше додаден еднаков волумен на фенол заситет со 20mM Tris pH8 по што следеше екстракција со благо промешување на растворот од 5 мин, по што истиот беше центрифугиран 5 минути на 3000грт на температура од 4C Водената фаза беше префрлена во чиста епрувата и на истата беше додаден еднаков волумен на

хлороформ/изоамил алкохол (24:1 вол/вол). По промешување и центрифугирање под горе споменатите услови, водената фаза беше префрлена во стерилен Ерленмаер-ов сад од 50мл и на истата беше додаден 25 мл ладен апсолутен етанол што резултираше со перципитација на геномската ДНК. Добиена геномската ДНК беше префрлена во стерилна пластична тубичка, промиена со 70% етанол, исушена на собна температура и растворена во 100-250 μ l TE (10mM Tris-HCL pH7.5, 1mM EDTA) пуфер. Растворената геномска ДНК беше инкубирана на 37 С преку ноќ за добивање на хомоген раствор и чувана на 4С до почеток на анализите.

➤ *Изолација на геномска ДНК и РНК од свежо ткиво*

Свежите примероци од туморно и нормално ткиво добиени по хируршката ресекција беа чувани на температура од -80 С до почеток на изолацијата на нуклеинските киселини.

За изолација на ДНК и РНК најпрво ткивата беа прочистени со физиолошки раствор а потоа секое ткиво беше поделено на два дела, едниот дел од кој беше изолирана геномска ДНК, додека другиот дел од ткивото беше хомогенизиран во *Tri Reagent® solution* (Life Technologies) за последователна изолација на РНК. Изолацијата на геномска ДНК се одвиваше со истата постапка како и изолацијалата на ДНК од периферна крв со единствена разлика што во овој случај ткивото беше веднаш инкубирано за дигестија без предходна лиза на еритроцитите. Изолацијата на вкупна РНК од ткивата хомогенизирали во *Tri Reagent® solution* се одвиваше според протоколот од производителот кој вклучува екстракција со кисел фенол, преципитација со изоамил алкохол, испирање со 70% етанол и конечно растворавање во 20-50 μ l стерилна вода. Вака изолираната РНК беше складирана на -80C° до почетока на анализите.

Евалуација на квалитетот и квантитетот на изолиранот генетски материјал.

➤ *Хоризонтална гел електрофореза*

Изведувањето на хоризонталната гел електрофореза за квалитативна евалуација на ДНК примероците се одвиваше на 1.5% агарозен гел. За

изработка на агарознит гел агарозата со молекуларна чистота беше растворена во 1XTBE (89mM NH₄Cl 89mM NH₄HCO₃, 2mM EDTA pH8) пуфер кој содржи 0.1% етидиум бромид. Смесата беше загреана се до потполно растопување на агарозата и така затопленниот раствор беше излеан во соодветен УВ транспарентен калап со поставени чешлиња за да се формираат бунарчиња за апликација. По полимеризацијата на гелот истиот беше префрлен и монтиран на системот за хоризонтлна електрофореза, ДНК примероците беа промешани со Orange G боја (5:1) и аплицирани во бунарчињата. Електрофореза на агарозен гел течеше на константна јачина на струја од 100V во тек на 1 час, а за одредување на интактноста на ДНК примероците по завршување на електрофорезата се изврши УВ детекција на *VersaDoc™/Imaging System(BIORAD)*.

➤ **Спектрофотометриско определување на концентрацијата на ДНК/РНК растворите**

Определување на концентрацијата на ДНК/РНК растворите се изврши на автоматски спектрофотометар *Thermo Scientific NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer* на кој беа аплицирани по 2 µl од растворите на ДНК и РНК при што беа користени 2 µl од ТЕ пуферот како слепа проба. Освен концентрацијата која беше добиена во ng/ µl според абсорбантата на 260nm бранова должина, беа детектирани и вредностите за односите помеѓу A260/A280 и A260/230 кои даваат информации за чистотата на препараторот во однос на контаминација со протеини и соли, соодветно.

➤ **Полимераза верижна реакција (PCR)**

За изведување на молекуларните анализи применета е амплификација на регионите од интерес со стандардна полимераза верижна реакција, флуоресцентна мултиплекс и RT-PCR метода. Изведувањето на PCR реакциите беше изведено на *Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®)*

➤ ***Евалуација на микросетелитска нестабилност и губиток на хетерозиготност***

Се анализираа MSI и LOH на 3р, 8р, 7q, 9р, 9q, 11q, 13q, 17р, 18q, со методот на флуоросцентен multiplex PCR и капиларна електрофореза на автоматски DNA анализатор според методологија која рутински се употребува во Центарот за биомолекуларни фармацевтски анализи на Фармацевтскиот факултет.

За изведба на овие анализи беше користена геномска ДНК од туморно и нормално ткиво од секој пациент. Анализите беа изведени со помош на флуоресцентна мултиплекс PCR реакција и последователна анализа на амплифицираните продукти со фрагмент анализа на автоматски DNA анализатор.

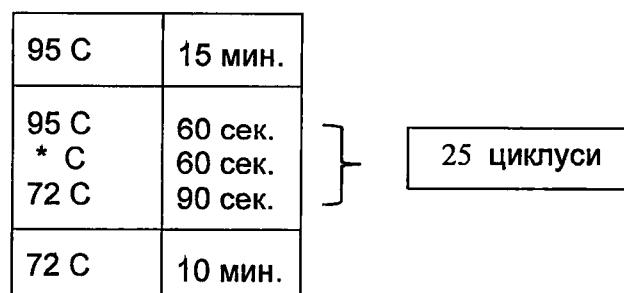
Флуоресцентна мултиплекс PCR реакција

Со оваа метода, во една реакција се постигнува амплификација на повеќе фрагменти од интерес. За таа цел едниот од олигонуклеотидните прајмери од соодветниот пар е обележан со флуоресцентна боја (6-FAM,VIC,NED или PET) така што секој амплифициран продукт носи соодветна флуоресцента боја која служи за негова квалитативна и квантитативна идентификација при последователните анализи. За анализа на 13-те полиморфни динуклеотидни маркери кои беа предмет на евалуација, беа дизајнирани 4 различни мултиплекс ПЦР реакции. Комбинациите на прајмерите во секоја реакција, секвенците на поедините прајмери, користените бои за обележување како и големината на добиените фрагменти од секоја поединечна ПЦР реакција се дадени во табела број 1. За изведување на секоја од 4-те реакции се подготвуваше смеса во вкупен волумен од 25 µl кој содржеше 250ng геномска ДНК (од нормалното или туморското ткиво од секој пациент), 2.5 µl 10XPCR Gold buffer, 2 µl 2.5 mM MgCl₂, 2 µl 2.5 mmol dNTP, 0.25 µl од 10mM раствор од секој прајмер од соодветната реакција и 1U TAQ полимерза (Ampitaq Gold, Life Technologies, USA).

Табела бр.1. Нуклеотидни секвенци на прајмерите и големина на добиените фрагментите за анализираните генетски маркери во 4-те мултиплекс ПЦР реакции за одредување на LOH и MSI.

MSI и LOH Маркер	Локација		Нуклеотидна секвенца и обележување на прајмерите (5'-3')	Големина на продукт (bp)
Реакција 1				
D3S1038	3p25.3	F	FAM TCCAGTAAGAGGCTTCCTAG	115
		R	AAAGGGGTTCAGGAAACCTG	
D9S63	9q34	F	VIC CCGGAAGTTACTCTAGTCTA	116
		R	TTATAATGCCGGTCAACCTT	
D13S158	13q33.1	F	PET GTACCCACGGAGTGAAAGAA	99-113
		R	GCTTTGACAATTAGCAGCA	
D7S522	7q31.1	F	FAM GCCAAACTGCCACTTCTC	217-229
		R	ACGTGTTATGCCACTCCCC	
Реакција 2				
D3S1270	3p26	F	FAM TGGAACCTGTATCAAAGGCTC	164-186
		R	TTGCATTAGNATTCTCCAGA	
D8S552	8p22	F	VIC AGGATTGTAAATTCTCTTGC	168-182
		R	GGGACTTTTGAAGGTTTG	
D9S288	9p24.2	F	NED AGCAACCTCAACAGGG	124-140
		R	AATCATCCAGAAAGGCCA	
Реакција 3				
D3S158	3p23	F	NED ACTGCAGTCCAATCTGGGT	
		R	ATGCATTAGNATTCTCCAGA	
D11S4190	11p15	F	PET GATAATGGTTGTGGTTGC	174-214
		R	ACTCTCTATGGAACCCCC	
D18S474	18q21.1	F	PET TGGGGTGTTTACCAAGCATT	119-139
		R	TGGCTTCAATGTCAGAAGG	
Реакција 4				
D9S286	9p24.1	F	VIC TGGAGTGCCTACATAC	139-165
		R	CCACCACCTACATGGC	
D17S799	17p11.2	F	NED ATTGCCAGCCGTCAAGTT	185-200
		R	GACCAGCATATCATTATAGACAAGC	
D18S58	18q22.3- 23	F	FAM GCTCCGGCTGGTTT	144-160
		R	GCAGGAAATCGCAGGAACCTT	

Мултиплекс PCR реакциите се изведуваа во автоматски термоциклир со следните услови:



*Реакција 1 и 3 = 58 C ; реакција 2 и 4 = 52 C ;

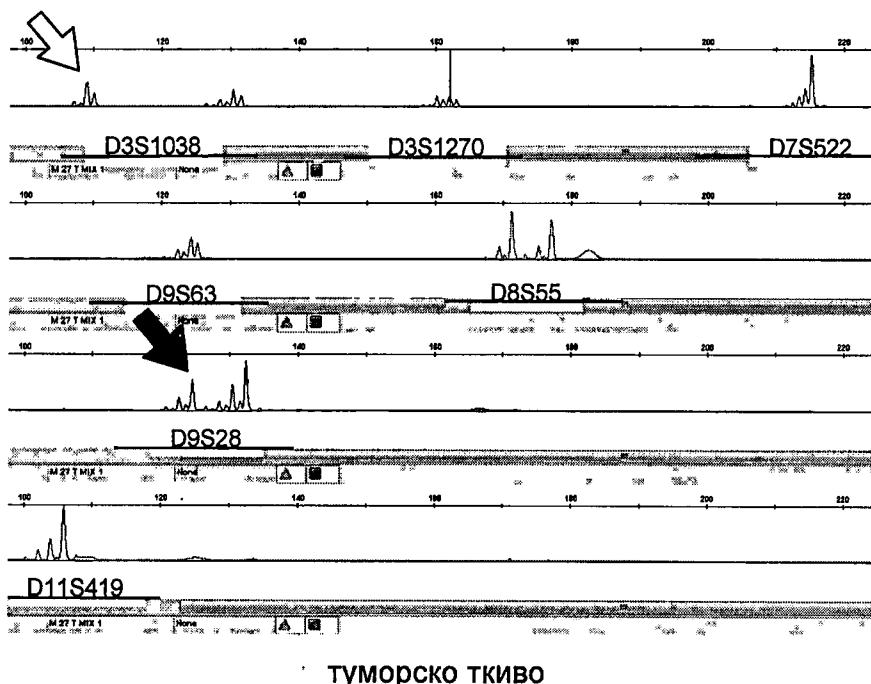
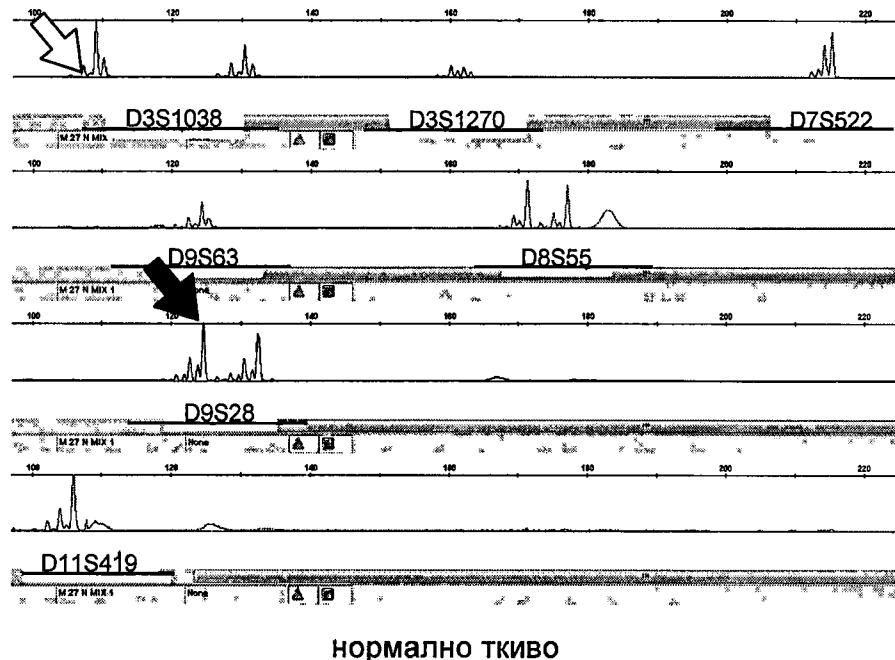
Фрагмент-анализа на автоматски ДНК-анализатор

За анализа и идентификација на ампликоните добиени од флуоресцентните мултиплекс PCR реакции беше користена капиларна гел електрофореза на автоматски ДНК-анализатор 3500 *Genetic Analyzer for resequencing & fragment analysis (Applied Biosystems®)*. Амплионите од четирите посебни PCR реакции беа подложени на две одделни капиларни гел електрофорези. За таа цел 0,5 µl од реакција 1 заедно со 0,5 µl од реакција 3 беа растворени во 9 µl Формамид кој содржи 0,05 µl LYZ 500 маркер за идентификација на големината на фрагментите. Овие смеси беа инкубиирани 3 минути на 95 С за денатурација на ПЦР фрагментите и потоа истите беа чувани 2 минути на лед. По извршената денатурација ДНК фрагментите од секоја смеса беа раздвоени со капиларната гел електрофореза на автоматски ДНК-анализатор под улови кои ги содржи протоколот FragmentAnalysisPA_POP7_1 од софтверот 3500 Data Collection Software. Резултатот од оваа реакција е во вид на хроматограм при што за секој маркер се добиваат по 2 пика во случај на постоење на 2 алели со различна големина. Детекцијата на губиток на хетерозиготност беше извршена со примена на софтверскиот програм Gene Mapper v4.1. За таа цел кај сите примероци беше извршена споредба на површината под крива за секој од маркерите одделно во туморното во однос на површината под крива кај нормалното ткиво според следната формула:

ЛОХ индекс = (Алел 1 Тумор/Алел 2 Тумор) / (Алел 1 Нормално ткиво / Алел 2 нормално ткиво).

Алелен дисбаланс беше детектирана кај оние маркери кај кој овој сооднос беше надвор од нормалниот ранг (0,7-1,3). Истата анализа беше искористена и за испитување на присуство на микросателитска нестабилност во туморското ткиво. За таа цел беше евалуиран изгледот на пиковите од секој маркер во туморското ткиво во споредба со нормалното ткиво при што присуство на микросателитска нестабилност во одреден маркер беше дефинирано во случај кога ќе се детектира присуство на повеќе пикови од еден алел во туморското ткиво во споредба со истиот алел во нормалното ткиво. На слика бр. 9 се прикажани електрофореграми од нормално и

туморско ткиво кај кои е најден нормален наод и наод за загуба на хетерозиготност на маркерите D9S288 и D3S1038.



Слика бр. 9. LOH во D9S288 (црна стрелка) и D3S1038 (бела стрелка) во туморско ткиво и отсуство на LOH за истите маркери во нормално ткиво

➤ Одредување на присуство на мутации во EGFR и TP53 гените во туморското ткиво

Анализата за присуство на мутации во EGFR и TP53 гените беше извршено со стандардна полимераза верижна реакција и последователно ДНК секвенционирање по методата на Сангер.

Стандардна полимераза верижна реакција

Оваа метода е искористена за амплификација на кодирачките секвенци од EGFR (егзон 18, 19,20 и 21) и TP53 (егзон 5,6,7,8 и 9) гените. Секој од овие егзони е амплифициран во посебна PCR реакција која беше изведена во смеша во вкупен волумен од 25 µl која содржеше 250ng геномска ДНК од туморското ткиво, 2.5 µl 10XPCR Gold buffer, 2 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 2.5 mmol dNTP, 0.25 µl од 10mM раствор од секој прајмер од соодветната реакција и 1U TAQ полимерза (табела бр.2.).

Амплификацијата се одвиваше во автоматски ПЦР апарат под следните услови:

95 C	10 мин.
95 C * C 72 C	60 сек. 60 сек. 90 сек.
72 C	10 мин.

} 35-40 циклуси

*TP53 егзон 5,6,7,8 и 9 = 60 C ; EGFR егзон 18 и 20 = 58 C ; EGFR егзон 19 и 21 = 62 C ;

Табела бр.2. Секвенци на користените прајмери и големина на PCR фрагментите на одделни егзони од EGFR и TP53 гените

EGFR		Нуклеотидна секвенца на прајмери (5'-3')	Големина на продукт (bp)
Егзон 18	F	CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC	400
	R	CAGTTTCCCAAACACTCAGTGAAAC	
Егзон 19	F	GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC	372
	R	CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG	
Егзон 20	F	CCATGAGTACGTATTTGAAACTC	408
	R	CATATCCCCATGGCAAACCTTTGC	
Егзон 21	F	CTAACGTTGCCAGCCATAAGTCC	415
	R	GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTCG	

TP53		Нуклеотидна секвенца на прајмери (5'-3')	Големина на продукт (bp)
Егзон 5	F	GCCGTGTTCCAGTTGCTTTAT	397
	R	CCAAATACTCCACACGCAAAT	
Егзон 6	F	CATGAGCGCTGCTCAGATAG	347
	R	TGCACATCTCATGGGGTTATAG	
Егзон 7	F	CTTGGGCCTGTGTTATCTCCT	263
	R	CCGGAAATGTGATGAGAGGT	
Егзон 8-9	F	TTTCCTTACTGCCTCTTGCTTC	439
	R	CCCCAATTGCAGGTAAAACA	

По извршената амплификација фрагментите од интерес беа идентификувани и прочистени на 1,5% агарозен гел со хоризонтална гел електрофореза според методот на *Haoy Ma и сор* (*BioTechniques* (2008).44:921-923). Генералните принципи за подготовка и изведување на електрофорезата се објаснета погоре во текстот. Единствената разлика во изведување на оваа електрофорезата беше сечењето на прозорче во долниот дел од гелот во должина од 3 см каде беше излеана 0,15% лесно топлива агароза (Low melt agarose) растопена во 1XTBE(89mM NH₄Cl 89mM NH₄HCO₃, 2mM EDTA pH8). По завршување на електрофорезата фрагментите од интерес беа собрани директно од лесно топливата агароза и чувани на 4°C се до следниот чекор од изведување на анализата.

Секвенционирање на амплифициран ДНК фрагмент

Техниката на ДНК секвенционирање беше изведена со примена на комерцијалниот кит Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit при што беа направени мали измени во однос на протоколот од производителот. За изведување на реакцијата на секвенционирање беа користени 6 µl од PCR-продуктот собран од агарозниот гел, 2 µl 2,5 X Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing и 1 µl 5 X BigDye Sequencing Buffer во вкупен волумен од 10 µl. Реакцијата беше изведена на Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®) под следните услови:

96 С	10 мин.
96 С	10 сек.
50 С	5 сек.
60 С	4 мин.

} 25 циклуси

По завршување на реакцијата на секвенционирање продуктите беа прочистени од резидуалните соли и неинкорпорираните "Dye terminators" со користење на комерцијалниот кит BigDye XTerminator® Purification Kit(Applied Biosystems®) според протоколот на производителот. Прочистената смеша потоа беше подложена на капиларна гел електрофореза на автоматски генетски анализатор под условите на модулот BDx_Rapid_Seq_Assay_POP7. Продуктите од електрофорезата беа последователно анализирани за присуство на мутации со протоколот BDTv3.1_PA_Protocol-POP7 преку софтверот Sequencing Analysis v5.4.

Пребарување на мутации во EGFR и TP53 гените беше дополнително потврдено и преку софтверот SeqScape v2.7 при што како референтни секвенци беа користени NM_0005228.3 и NM_000546, соодветно. Потврда за патогеноста на откритите мутации беше правена по проверка во:

- www.cityofhope.org/egfr-mutation-database за EGFR, и
- www.p53.iarc.fr за TP53 варијантите.

➤ Детекција на Хуман папилома вирус (*Human Papiloma Virus-HPV*) во туморно ткиво

За детекција на ХПВ вирусот беше користен квалитативан *Real-Time PCR* метод според *Nichols et al. Journal of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 2013, 42:9. Детекцијата беше извршена во 3 посебни ПЦР реакции со кои се детектира присуството на ХПВ тип 16, ХПВ тип 18 и сите патогени ХПВ типови (вклучително ХПВ типовите 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68), соодветно. Локацијата на прајмерите и 5'FAM обележените TaqMan проби за детекција на ХПВ типовите 16 и 18 (реакција 1 и 2) беше во во регионот E6-E7 од ХПВ вирусот додека локацијата на прајмерите и пробата од реакцијата 3 беше во регион Е1 кој има висока хомологија со сите патогени ХПВ типови. Во додаток на прајмерите и пробите специфични за детекција на ХПВ вирусот, во секоја реакција беа додадени и прајмери и 5'VIC обележена TaqMan проба специфични за егзон 6 од GAPDH генот кои служат како интерна контрола за квалитетот на испитуваната ДНК и условите на ПЦР реакцијата. Секвенците на прајмерите и пробите користени за детекција на ХПВ вирусот се дадени во Табела бр.3. Секоја од 3-те ПЦР реакции беше изведувана во вкупен волумен од 25 μl кој содржеше 250ng геномска ДНК од туморското ткиво од секој пациент поединечно, 2.5 μl 10XPCR Gold buffer, 2 μl 2.5 mM MgCl₂, 2 μl 2.5 mmol dNTP, 0.25 μl од 10mM раствор од ХПВ специфичните прајмери од соодветната реакција, 0.25 μl од 10mM раствор од GAPDH специфичните прајмери, 0.10 μl од 10mM раствор од ХПВ специфична TaqMan проба од соодветната реакција, 0.10 μl од 10mM раствор од GAPDH специфичната TaqMan проба и 1U TAQ полимерза (Ampitaq Gold, Life Technologies, USA). Сите реакции беа извршени на StratageneMx3000P со континуирана детекција на флуоресценцијата во секој циклус од амплификацијата за FAM (ХПВ специфичен сигнал) и VIC (GAPDH специфичен сигнал) флуорофорите. Во секој сет на анализи беа исто така вклучени и ДНК примероци кои предходно беа потврдени дека се позитивни за присуство на ХПВ тип 16, 18, 31, 45 или 68 (позитивни контроли) и ДНК примероци кај кои предходно беше утврдено дека нема присуство на ХПВ вирус (негативни контроли).

Реакциите беа изведени под следниве услови:

95 C	15 мин.	50 циклуси
94 C 60 C	60 сек. 90 сек.	

Позитивен наод за присуство на ХПВ во испитуван примерок се смета во случај на добивање на сигнал од FAM флуорофорот (во реакциите 1 и 3 за ХПВ тип 16, во реакциите 2 и 3 за ХПВ тип 18 и реакција 3 за останатите патогени ХПВ типови) и сигнал на VIC флуорофорот (базната линија $\Delta Ct=0.5$). Негативен наод за присуство на ХПВ во испитуван примерок се смета во случај отсуство на сигнал од FAM флуорофорот во сите 3 реакции и присуство на сигнал на VIC флуорофорот над базната линија. Примероците кај кои не е детектиран сигнал со двата флуорофори се сметаат за непогодни за анализа за присуство на ХПВ вирус.

Табела бр.3. Секвенци на прајмери и TaqMan проби користени за детекција на присуство ХПВ вирусот во туморското ткиво

Прајмер/проба	Секвенца (5' - 3')
Реакција 1 (HPV 16)	
HPV 16 Forward	TTGCAGATCATCAAGAACACGTAGA
HPV 16 Reverse	GTAGAGATCAGTTGTCTGGTTGC
HPV 16 Probe	FAM - AATCATGCATGGAGATAACACCTACATTGCATGA -BHQ1
Реакција 2 (HPV 18)	
HPV 18 Forward	CAACCGAGCACGACAGGAACG
HPV 18 Reverse	TAGAAGGTCAACCGGAATTTCAT
HPV 18 Probe	FAM - AATATTAAGTATGCATGGACCTAAGGCAACATTGCAA - BHQ2
Реакција 3 (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68)	
HPV all Forward (E1)	CCTATAGTACATTTAAAAGGTG
HPV all Reverse (E1)	CNTGTCCAATGCCAGGTAGATG
HPV all Probe (E1)	FAM - AATAGTTAAAATGTTAAGATATAG-BHQ1
Интерна контрола (Реакција 1,2 и 3)	
GAPDH Forward	GCTCATTGCAAGGGGGAGCC
GAPDH Reverse	CTGATGATCTTGAGGCTGTTG
	JOE
GAPDH Probe	TCTGCCCTCTGCTGATGCCCATGTTCGTCATGGGA - BHQ2

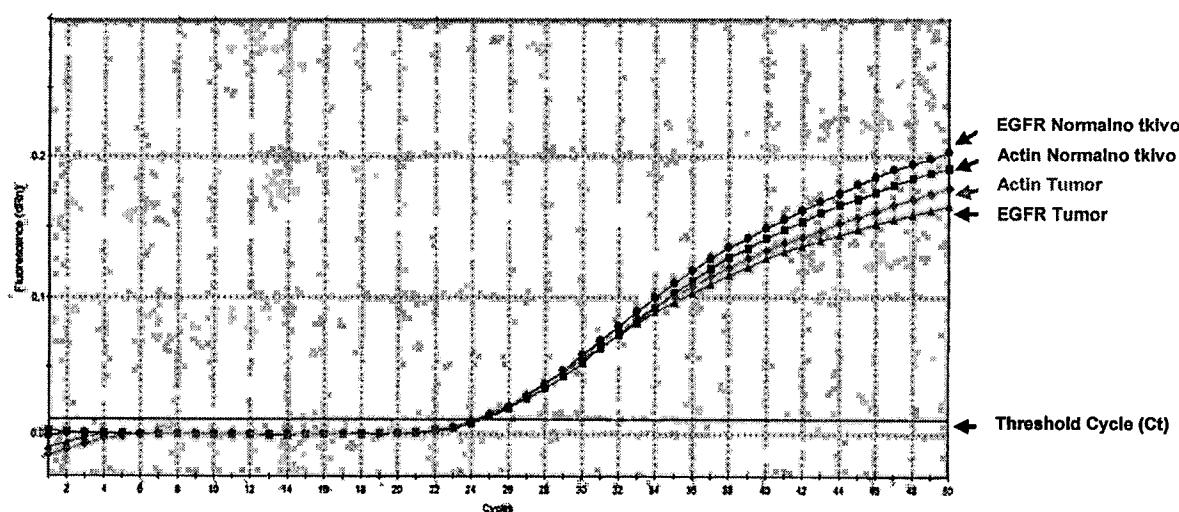
➤ Детекција на експресија на *B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2)* и *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)* гените

Испитувањето за промена на ниво на експресијата на BCL-2 и EGFR гените беше изведена на РНК примероци кои беа изолирани од туморско и од нормално ткиво од секој пациент со методата на квантитативна флуоресцентна ПЦР анализа во реално време (RealTime PCR). На почеток, аликвот од секој РНК примерок беше конвертиран во комплементарна ДНК со реакција на реверзna транскрипција. За оваа реакција се подготвуваше реакционна смеса во вкупен волумен од 20 μL која содржи 3 μL РНК, 2 μL 10xBuffer, 4 μL 2.5mM MgCl₂, 4 μL 2.5mM dNTP, 1 μL 2,5 μM случајни хексамери, 3U Reverse transcriptase и 2U RNase inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Реакционите смеси беа инкубирали во RealTime Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) термоциклиер на следните услови: 15 min 21°C, 90 min 42°C, 5 min 99°C.

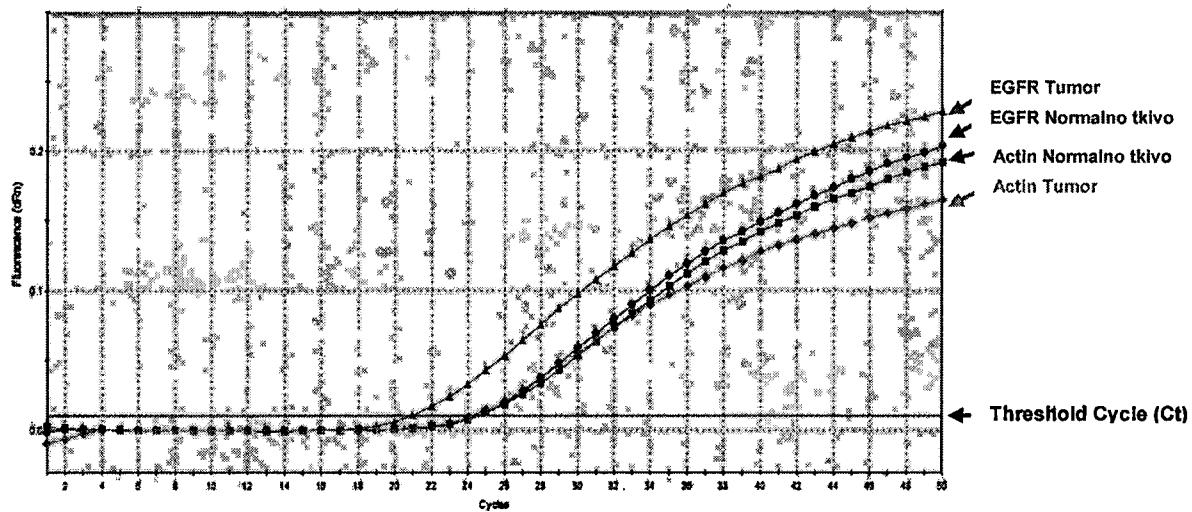
За детекција на експресија на BCL2 и EGFR гените беа користени комерцијални реагенси од фирмата Applied Biosystems кои се стандардизирани за оваа намена (BCL2 gene expression assay, EGFR gene expression assay и ACTB1 gene expression assay како внатрешна контрола-нормализатор). Секој assay содржи специфични прајмери лоцирани во два соседни егзони со што се оневозможува амплификација на геномска ДНК како и една TaqMan проба обележена со FAM (BCL2 gene expression assay, EGFR gene expression assay) или VIC (ACTB1 gene expression) флуорофорите. Реакциите за PCR се изведуваше во дупликат за сите примероци во вкупен волумен од 10 μL од кои 2 μL комплементарна ДНК од туморско или нормално ткиво од секој пациент, 1 μL GE ACTB1 assay, 1 μL EGFR assay или 1x BCL2 assay, 5 μL од 2xKlear Kall Master Mix (KBioscience, LGS genomics, United Kingdom) и ампуларна вода до 10 μL . PCR реакцијата беа изведувани на RealTime Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) термоциклиер на следните услови: 95°C 10 минути, и последователни 50 циклуси на 95°C 15 секунди и 60°C 1 минута. Во текот на реакцијата беа перманенто колектирани податоци за интензитетот на флуоресценција која одговара на FAM и VIC флуорофорите кои даваат

информација за генерирање на PCR продукти специфични за BCL2 /EGFR и ACTB1, соодветно. Циклусот од ПЦР реакцијата во кој се добиваше флуоресцентен од сигнал FAM и VIC флуорофорите кој е со интензитет поголем од базната линија ($\Delta Ct=0.5$) се земаше за вредност за пресметка на експресијата на BCL2 (или EGFR) и ACTB1, соодветно.

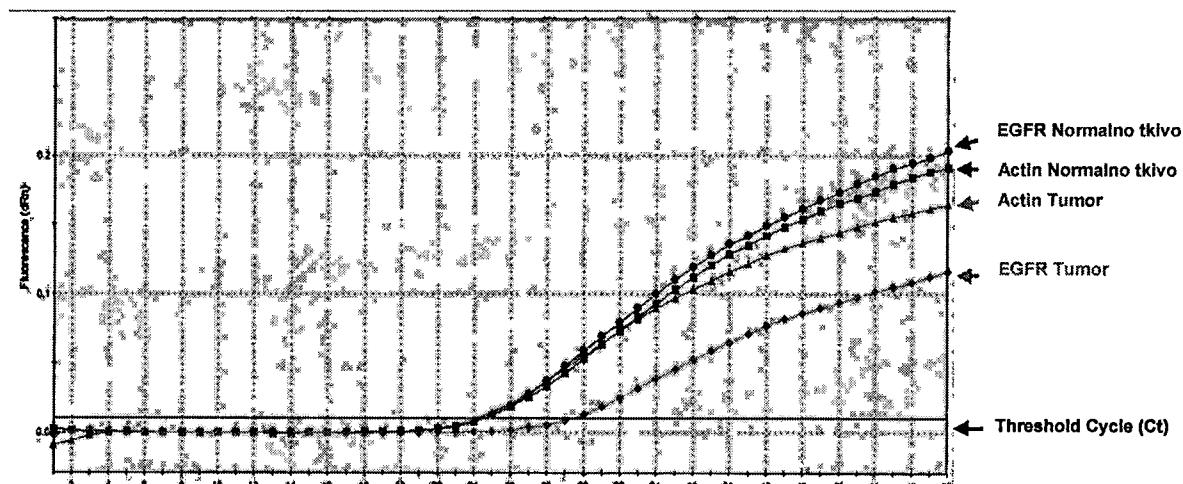
Пресметувањето за нивото на експресија беше изведен со $\Delta\Delta Ct$ методата преку која се мери релативната разликата на експресијата на BCL2 (или EGFR) генот во туморското ткиво во однос на експресијата во нормалното ткиво. Експресијата на ACTB1 во туморското и нормалното ткиво служеше како коректор (нормализатор) за количината на РНК која е присутна во секоја поедина реакција бидејќи предходно е покажано дека нивото на експресија на овој ген во текот на туморогенезата останува непроменет. За зголемена или намалена експресија на овие гени беше сметано во случај кога $\Delta\Delta Ct$ вредноста изнесуваше >3 или <0.3 , соодветно, што означува дека во испитуваното туморско ткиво има за најмалку 3 пати поголема или 3 пати помало ниво на експресија на испитуваниот ген во однос на неговата експресија во нормалното ткиво. На слика бр.10 е прикажан резултатот од анализа на 3 примероци од нормално ткиво и тумор кај кој е добиен нормално, намалено и зголемено ниво на експресија на EGFR во туморот споредено со нормалното ткиво.



нема променета експресија



зголемена експресија



намалена експресија

Слика бр.10. Нормално, намалено и зголемено ниво на експресија на EGFR во туморот споредено со нормалното ткиво

Во однос на експресијата на EGFR и Bcl-2, пациентите беа поделени во три групи:

- нормална експресија $>0,3 <3$
- зголемена експресија >3
- намалена експресија $< 0,3$

Сите групи со клиничко-патолошки карактеристики понатаму беа анализирани во однос на промените на p53, Bcl-2, EGFR, HPV и LOH со MSI за хромозомските краци – 3p, 7q, 8p, 9q, 9p, 11p, 13q, 17p и 18q. Испитаниците во однос на загубата на хетерозиготност (LOH) беа анализирани двојно:

1. по соодветниот хромозомски крак, и
2. беа поделени на две групи:

- LOH ≤ 2 - испитаници кои немаат LOH или имаат на еден односно два хромозомски крака,
- LOH ≥ 3 – испитаници кои имаат LOH на 3 или повеќе хромозомски краци.

➤ Статистичка обработка

Статистичката анализа е изработена во статистички програми: STATISTICA 7.1; SPSS 17.0; Собраниите податоци се обработени со помош на следните статистички методи:

- Базите на податоците се формирани со примена на специфични компјутерски програми за таа намена. Нивната обработка е извршена со помош на стандардни дескриптивни и аналитички биваријатни и мултиваријатни методи.

- Атрибутивните статистички серии се анализирани со одредување на коефициент на односи, пропорции, стапки и со утврдување на статистичката значајност меѓу откриените разлики - Pearson Chi-square и Тест на разлики.
- Нумеричките серии се анализирани со мерки на централна тенденција и со мерки на дисперзија на податоците. Кај нумеричките серии кај кои не постои одстапување од нормалната дистрибуција, сигнификантноста на разликата се тестира со Тест на разлики.
- За поврзаноста на варијаблите изработен е Spearman-овиот ранг коефициент на корелација.
- За одредување на предикторните фактори користени се Униваријантната логистичка регресиона анализа и Мултиваријантна логистичка регресиона анализа
- Преживувањето е пресметано со Survival анализа - Сох-ова регресија и Kaplan-Meier-овата крива.
- Сигнификантноста кај компарирањето на два примероци кај Survival анализата користен е Log-Rank тестот
- За CI (confidence интервал $\pm 95\% \text{ CI}$) е дефинирана статистичката значајност за ниво на грешка помало од 0,05 (p).
- Резултатите се прикажани табеларно и графички.

4. РЕЗУЛТАТИ

Табела бр.4. Клиничко-патолошки карактеристики кај испитаниците

	п о л	г о д	п у ш и	локал	pTNM	S	G	ех./ жив	прежи- вување
M 03	♂	58	да	јазик	T3N3M0	S IV	G3	ех	9 м.
M 04	♂	85	не	јазик	T2N1M0	S III	G3	ех	20 м.
M 05	♂	60	да	јазик	T3N0M0	S III	G2	жив	45 м.
M 06	♂	59	да	јазик	T3N2M0	S IV	G2	ех	12 м.
M 07	♀	73	не	т.непце	T2N0M0	S II	G2	ех	30 м.
M 08	♀	62	не	јазик	T1N0M0	S I	G2	жив	44 м.
M 09	♂	44	да	рет-мол.	T4N0M	S IV	G2	ех	12 м.
M 10	♂	67	да	рет-мол.	T1N2M0	S I	G2	жив	42 м.
M 11	♂	64	да	јазик	T2N1M0	S III	G3	ех	12 м.
M 12	♂	57	не	суб.линг.	T4N0M0	S IV	G2	жив	41 м.
M 13	♂	61	да	суб.линг.	T1N0Mx	S I	G3	ех	27 м.
M 14	♂	59	не	јазик	T4N1Mx	S IV	G2	ех	15 м.
M 15	♂	71	да	јазик	T1N1Mx	S I	G2	жив	40 м.
M 16	♂	63	да	образ	T1N0M	S I	G3	жив	39 м.
M 17	♂	56	да	јазик	T1N0Mx	S I	G2	ех	17 м.
M 18	♂	73	да	суб.линг.	T2N0M0	S II	G2	жив	39 м.
M 19	♂	57	да	м. непце	T2N1M0	S III	G2	ех	21 м.
M 20	♀	40	да	суб.линг.	T4N1Mx	S IV	G2	ех	10 м.
M 21	♀	82	не	јазик	T2N2Mx	S IV	G3	ех	12 м.
M 22	♂	67	не	јазик	T1N0M0	S I	G2	жив	38 м.
M 23	♂	73	да	м. непце	T2N0M0	S II	G2	ех	21 м.
M 24	♂	50	да	јазик	T2N0M0	S II	G3	ех	20 м.
M 25	♂	58	да	рет.мол.	T3N0M0	S III	G2	жив	35 м.
M 27	♂	72	да	јазик	T2N0M0	S II	G2	жив	35 м.
M 28	♂	57	да	суб.линг.	T2N0M0	S II	G2	жив	35 м.
M 29	♂	64	да	рет.мол.	T1N0M0	S I	G3	ех	25 м.
M 30	♂	63	да	суб.линг.	T2N2M0	S IV	G1	ех	17 м.
M 31	♂	53	да	м. непце	T1N1M0	S III	G2	жив	31 м.
M 32	♂	60	да	суб.линг.	T2N1M0	S III	G3	ех	16 м.
M 33	♂	49	да	суб.линг.	T4N0M0	S IV	G1	ех	12 м.
M 35	♀	72	не	јазик	T1N0M0	S I	G2	ех	12 м.
M 36	♂	38	да	јазик	T4N2M0	S IV	G3	ех	10 м.
M 37	♂	65	да	јазик	T1N0Mx	S I	G2	жив	23 м.
M 38	♀	50	да	јазик	T2N2Mx	S IV	G2	жив	21 м.
M 40	♂	56	да	јазик	T1N0Mx	S I	G3	ех	14 м.
M 44	♂	68	да	суб.линг.	T1N2Mx	S IV	G3	ех	10 м.
M 45	♀	38	не	суб.линг.	T1N0M0	S I	G2	жив	20 м.

Табела бр.5. Дистрибуција на LOH по хромозомски краци кај испитаниците

	LOH								
	Ch 3p	Ch 7q	Ch 8p	Ch 9q	Ch 9p	Ch 11p	Ch 13q	Ch 17p	Ch 18q
M 03	x x	x x	x x			x x	x x	x x	
M 04						x x			
M 05				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 06	x x	x x	x x	x x	x x	x x		x x	x x
M 07				x x	x x	x x	x x		
M 08				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 09				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 10	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 11				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 12		x x	x x						
M 13		x x	x x			x x			
M 14			x x						
M 15				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 16	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 17				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 18				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 19				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 20									
M 21			x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 22		x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 23				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 24				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 25				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 27		x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 28		x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 29				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 30		x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 31				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 32		x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 33	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 35			x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 36			x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 37				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 38	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 40				x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 44		x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
M 45									

има LOH
нема LOH
неинформативно - хомозигот

Табела бр.6. Дистрибуција на мутација на *TP53* по егзони кај испитаниците

	TP53 - Мутација				
	EXON 5	EXON 6	EXON 7	EXON 8	EXON 9
M 03					
M 04					
M 05					
M 06					
M 07					
M 08					
M 09					
M 10					
M 11					
M 12					
M 13					
M 14					
M 15					
M 16					
M 17					
M 18					
M 19					
M 20					
M 21					
M 22					
M 23					
M 24					
M 25					
M 27					
M 28					
M 29					
M 30					
M 31					
M 32					
M 33					
M 35					
M 36					
M 37					
M 38					
M 40					
M 44					
M 45					

има мутација	има мутација
нема мутација	нема мутација

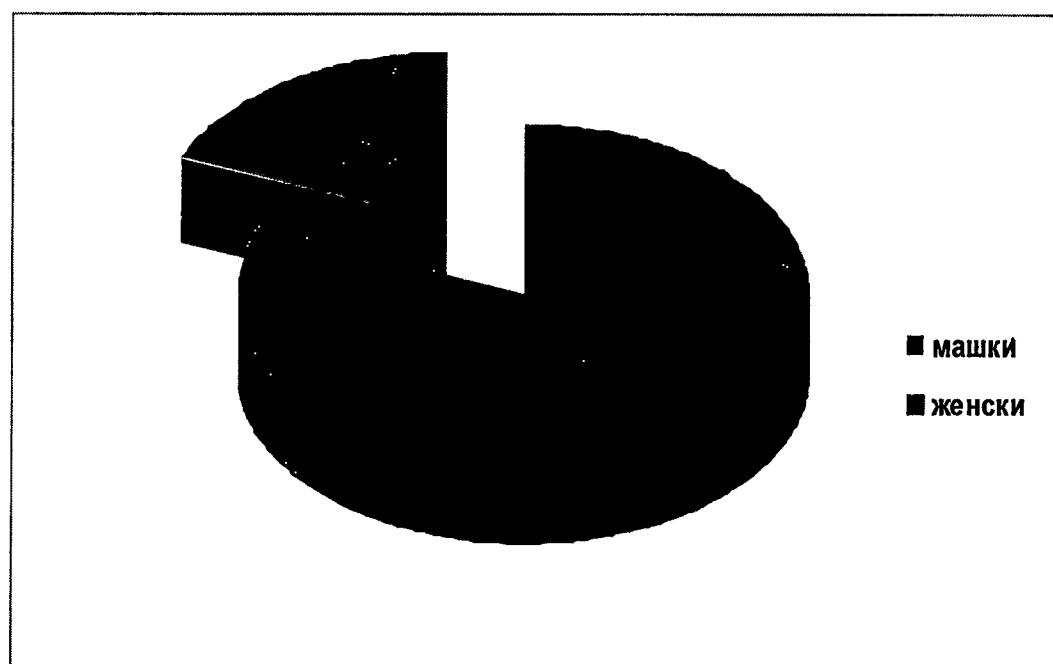
Табела бр.7. Експресија на Bcl-2 и EGFR кај испитаниците

	Експресија на BCL2*	Експресија на EGFR*
M 03	0,01	0,05
M 04	0,03	0,50
M 05	0,00	0,00
M 06	0,21	0,16
M 07	0,32	9,95
M 08	0,04	0,08
M 09	0,20	2,45
M 10	2,70	4,56
M 11	0,23	0,59
M 12	1,32	0,40
M 13	111,00	1,11
M 14		
M 15	0,43	0,08
M 16	0,48	0,92
M 17	0,09	0,88
M 18	0,07	0,44
M 19	1,44	1,33
M 20	0,12	10,37
M 21	0,04	0,51
M 22	0,04	0,37
M 23		
M 24	0,92	8,66
M 25	1,27	5,21
M 27	0,02	1,13
M 28	0,10	0,72
M 29	1,93	6,75
M 30	0,60	36,13
M 31	0,05	0,17
M 32	0,05	0,20
M 33	0,03	0,00
M 34		
M 36	0,14	0,39
M 37	0,02	0,11
M 38	0,05	0,12
M 40	0,16	0,10
M 44	0,08	0,07
M 45		

Во студијата учествуваа 37 пациенти со орален карцином од кои 30 (81.1%) се од машкиот пол и 7 (18.9%) се од женскиот пол (табела бр.8 и слика бр.11). Просечната возраст на пациентите е 60.6 ± 10.9 години, во ранг од минимум 38 години, а максимум 85 години. Просечната возраст на пациентите од машкиот пол изнесува 60.9 ± 9.3 години, во ранг од минимум 38 години, а максимум 85 години. Просечната возраст на пациентите од женскиот пол изнесува 59.6 ± 17.2 години, во ранг од минимум 38 години, а максимум 82 години (табела бр.9. и слика бр.12).

Табела бр.8. Дистрибуција на пациентите со орален карцином според полот

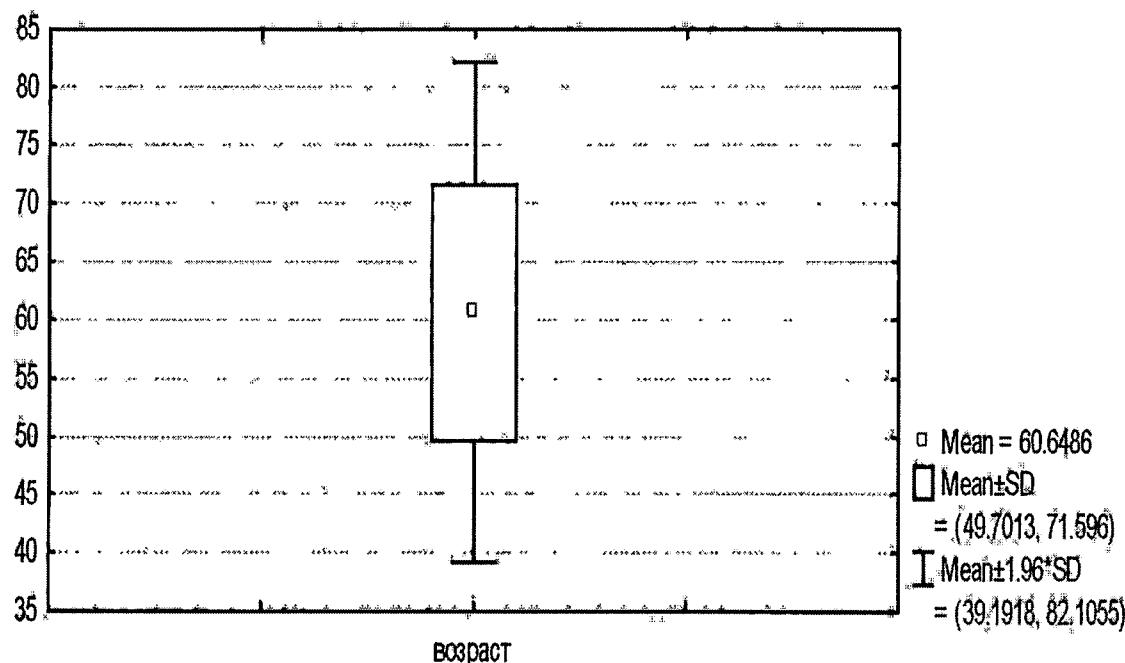
пол	број	%
машки	30	81.1
женски	7	18.9
вкупно	37	100.0



Слика бр.11. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином според полот (во%)

Табела бр. 9. Приказ на просечната возраст на пациентите

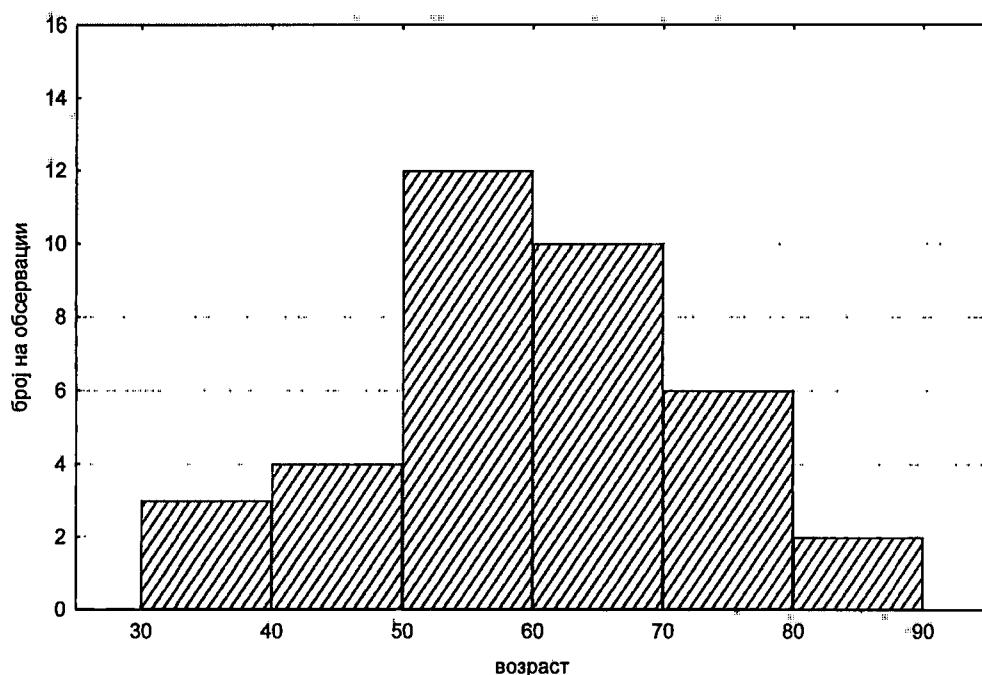
возраст	број	просек	минимум	максимум	Стд.Дев
вкупно	37	60.6	38.0	85.0	10.9
мажи	30	60.9	38.0	85.0	9.3
жени	7	59.6	38.0	82.0	17.2



Слика бр. 12. Графички приказ на просечната возраст на пациентите со орален карцином според полот

Табела бр. 10. Приказ на возрасните групи на пациентите

години	број	%
30 - < 40	3	8.1
40 - < 50	4	10.8
50 - < 60	12	32.4
60 - < 70	10	27.0
70 - < 80	6	16.2
80 - < 90	2	5.4
вкупно	37	100.0

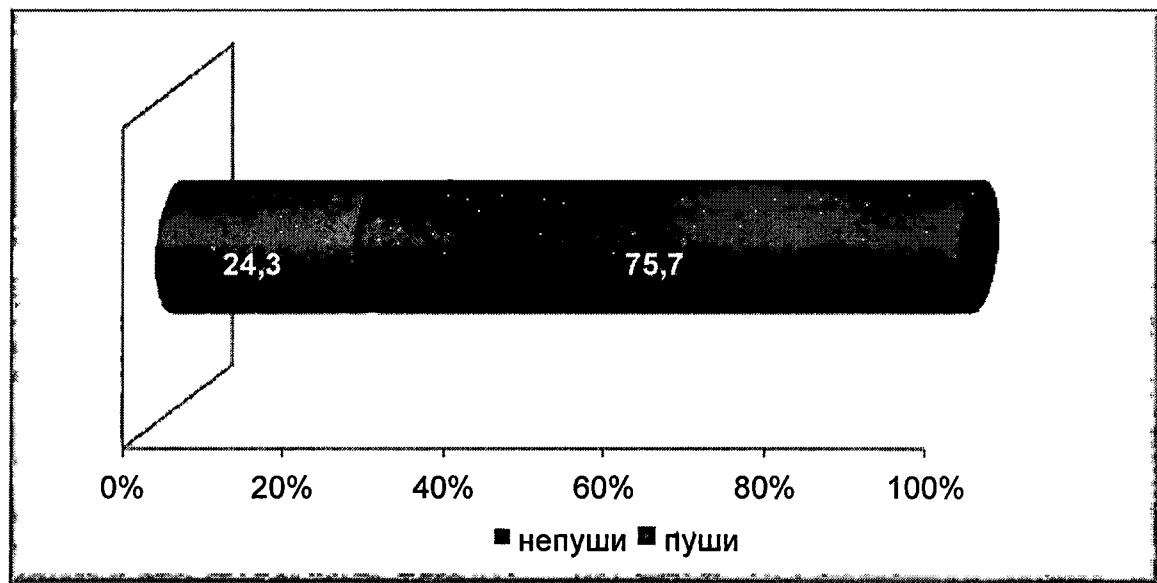


Слика бр. 13. Графички приказ на возрасните групи на пациентите со орален карцином

Најголем процент пациентите со орален карцином се на возраст од 50 до 60 години - 32.4%, 27.0% се на возраст над 60 до 70 години, 21.5% се над 70 години и т.н. (табела бр. 10 и слика бр.13).

Табела бр.11. Дистрибуција на пациентите со орален карцином според пушењето

пушат	број	%
не	9	24.3
да	28	75.7
вкупно	37	100.0



Слика бр.14. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином според пушчењето

75.7% од пациентите со орален карцином се пушачи, а 24.3% не (табела бр.11 и слика бр.14). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу пациентите кои пушат верзус оние кои не пушат е статистички сигнификантна за $p=0.0002$.

Табела бр. 12. Застапеност на клиничко - патолошките параметри кај пушачи и непушачи

клин.-патол. параметри	пушачи N=28	непушачи N=9
Мажи	26-92.9%	4- 44.4%
женки	2-7.1%	5-55.6%
возраст->50<=70г	18-64.3%	4-44.4%
локализ. јазик	12- 42.9%	6 - 66.7%
T1+T2-рана фаза	20-71.4%	7- 77.8%
N0	75.0%	88.8%
stage -I+II	46.4%	55.6%
stage -III+IV	53.6%	44.4%
G2-клеточна диференцијација	57.1%	77.5%
G3-клеточна диференцијација	35.7%	0

Од 28 пациенти кои се пушачи, 26 - 92.9% се од машкиот пол, а женскиот пол е застапен со 2 пациентки - 7.1%, односно процентуалната разлика во застапеноста на половите е статистички сигнификантна за $p<0.05$.

Инциденцата е повисока на женскиот пол кај непушачи - 55.6%, а машкиот пол 44.4%; наодот е статистички не сигнификантен во однос на полот за $p>0.05$.

Најзастапена возрастна група кај пушачи и непушачи е возраста - $>50\leq70$ години - 64.3% и 44.4%.

Најзастапена локализација кај пушачи и непушачи е јазикот - 42.9% и 66.7% (соодветно).

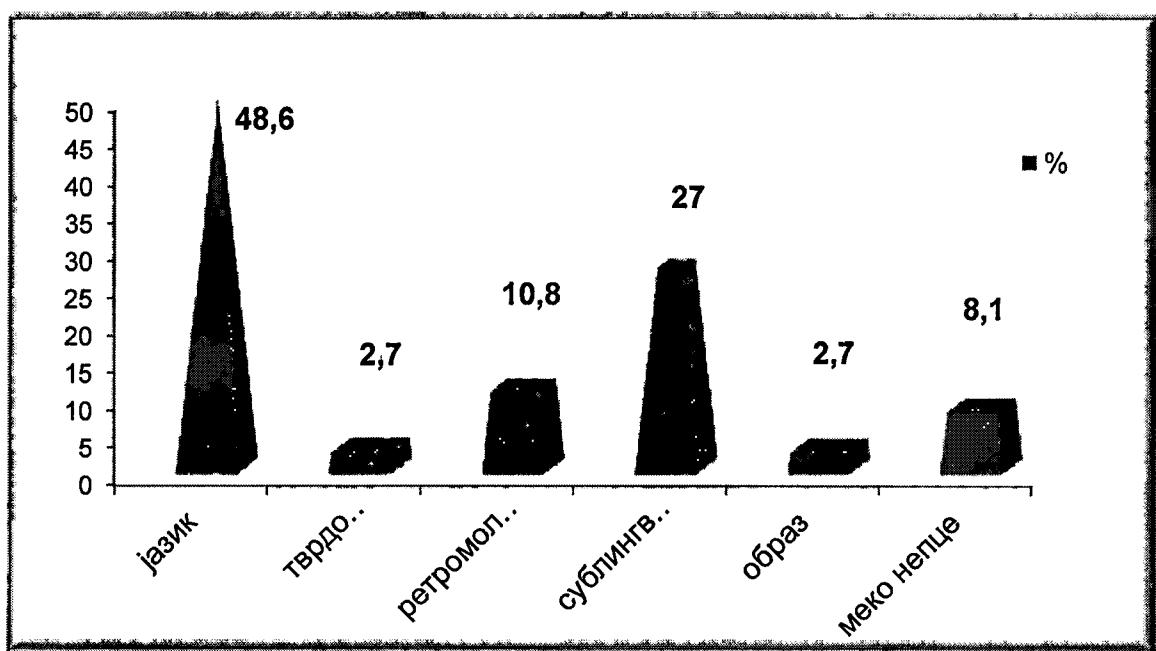
Најзастапена фаза кај пушачи и непушачи е раната фаза (T1+T2) - 71.4% и 77.8%.

Stage - I+II е застапен кај непушачите во поголем процент 55.6%, а Stage - III+IV кај пушачите со 53.6%.

G3-клеточна диференцијација е застапена само кај пушачите со 35.7% (табела бр.12).

Табела бр. 13. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на локализацијата

локализација	број	%
јазик	18	48.6
тврдо непце	1	2.7
ретромоларно	4	10.8
сублингвално	10	27.0
образ	1	2.7
меко непце	3	8.1
вкупно	37	100.0

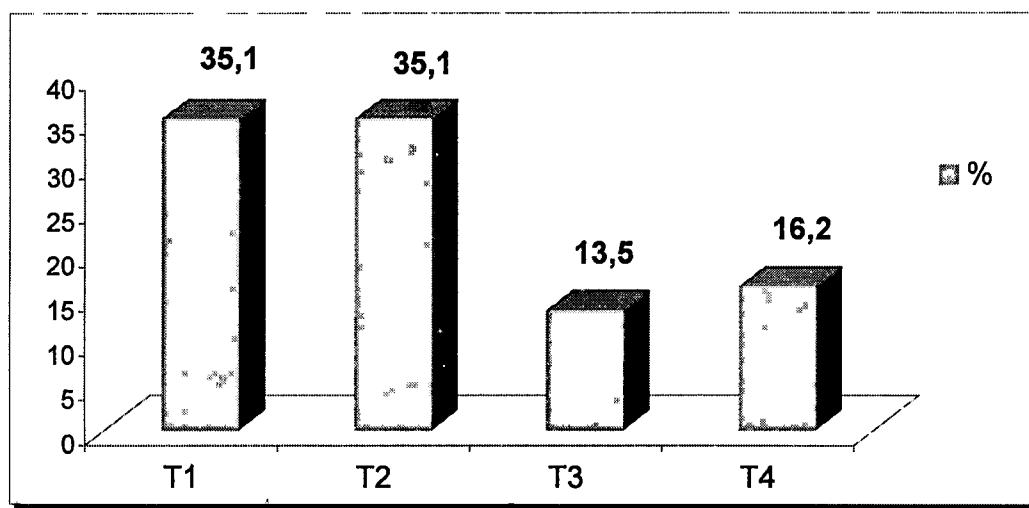


Слика бр.15. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на локализацијата

Со 48.6% најчеста локализација кај пациентите со орален карцином е на јазик, потоа следи 27.0% сублингвално, 10.8% ретромоларно, 8.1% на меко непце, останатите локализации се под 2.0% (табела бр. 13 и слика бр.15).

Табела бр. 14. Дистрибуција на пациентите во однос на големината на туморот

	број	%
T1	13	35.1
T2	13	35.1
T3	5	13.5
T4	6	16.2
вкупно	37	100.0

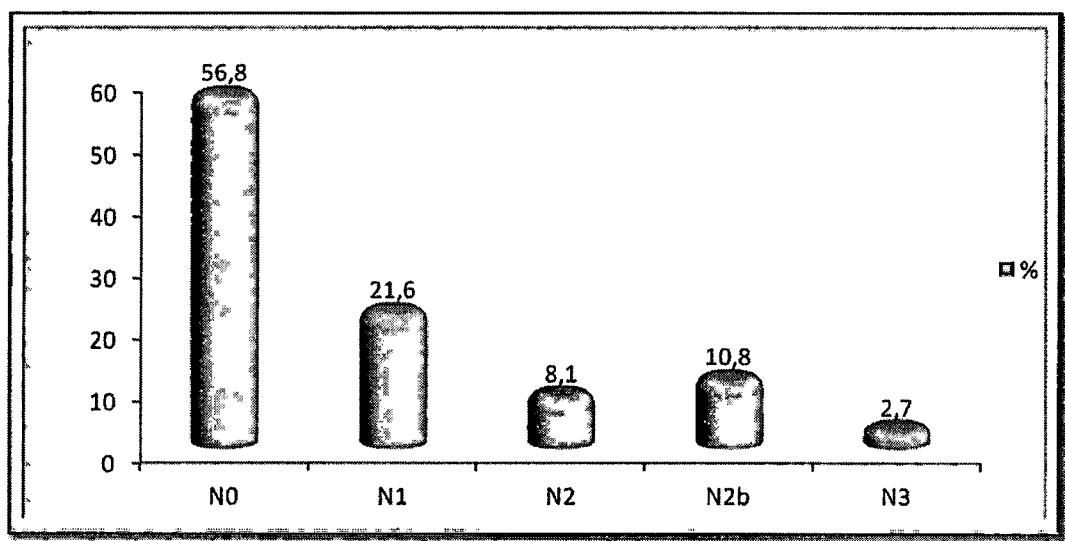


Слика бр.16. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на големината на туморот (T)

Кај пациентите со орален карцином во најголем процент се застапени T1 и T2 со 70.2% (рана фаза), T3 со 13.5%, T4 се застапени со 16.2% (табела бр. 14 и слика бр.16). Процентуалната разлика помеѓу T1 и T2 (рана фаза), во однос на останатите модалитети на Т е статистички сигнификантна за $p=0.0336$.

Табела бр. 15. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на N

	број	%
N0	21	56.8
N1	8	21.6
N2	7	18.9
N3	1	2.7
вкупно	37	100.0

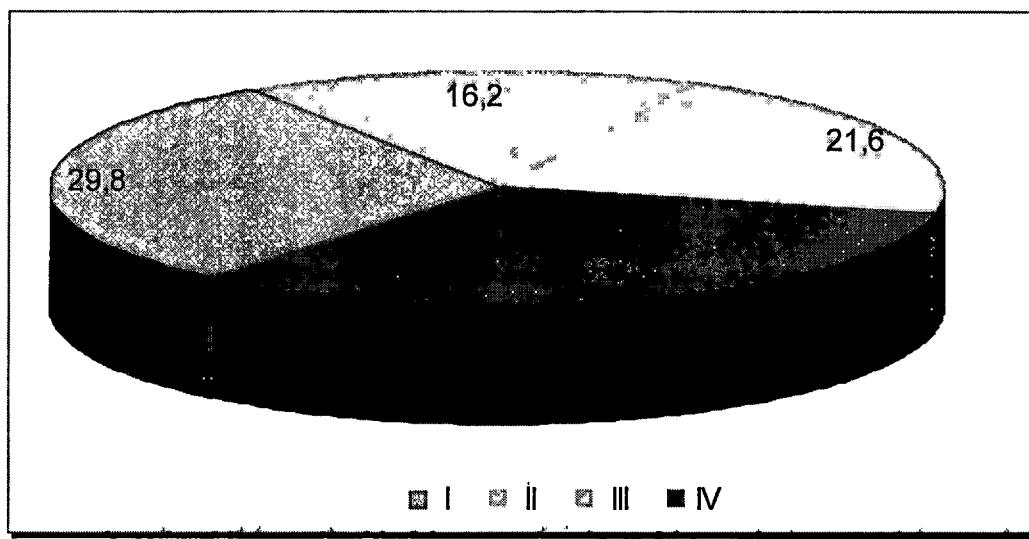


Слика бр.17. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на N

Кај пациентите со орален карцином во најголем процент во однос на N е застапен N0 со 56.8%, N1 со 21.6%, и N2 со 18.9% и т.н. (табела бр.15 и слика бр.17) Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу N0 и останатите модалитети на N е статистички сигнификантна за $p<0.002$.

Табела бр. 16. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на стадиумот

STAGE	број	%
I	11	29.7
II	6	16.2
III	8	21.6
IV	12	32.4
вкупно	37	100.0

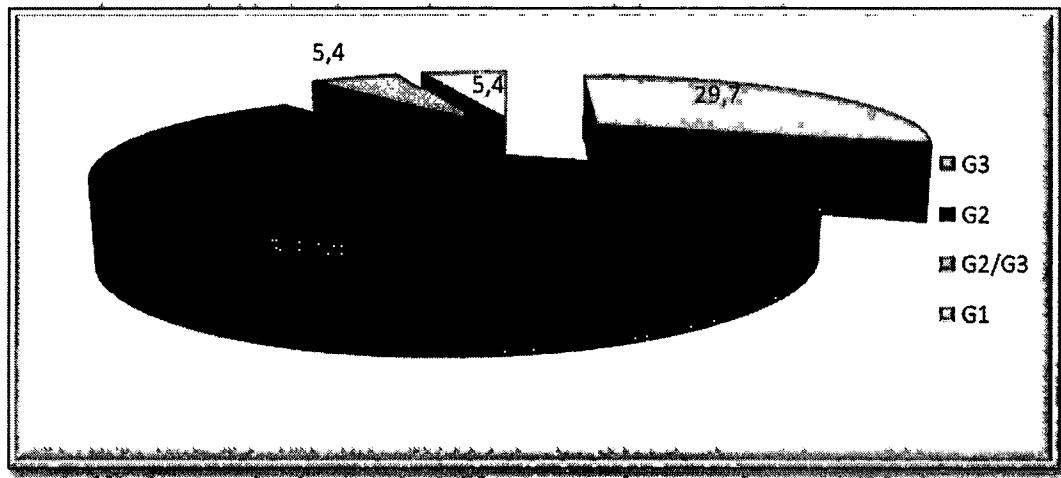


Слика бр.18. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на stage-от

Кај пациентите со орален карцином во најголем процент во однос на stage-от е застапен I со 29.8%, IV со 32.4%, III со 21.6%, II со 16.2% и т.н. (табела бр.16 и слика бр.18). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу степените на stage-от е статистички несигнификантна за $p>0.05$.

Табела бр. 17. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на клеточната диференцијација

клеточната диференцијација	број	%
G3	12	32.4
G2	23	62.2
G1	2	5.4
вкупно	37	100.0



Слика бр.19. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на клеточната диференцијација

Кај пациентите со орален карцином во најголем процент во однос на клеточната диференцијација е застапена е G2 со 62.2%, G3 со 32.4%, и G1 диференцијација - со 5.4% (табела бр.17 и слика бр.19). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу клеточната диференцијација G2 верзус останатите модалитети е статистички сигнификантна за $p<0.01$.

Кај пациентите со орален карцином најголем процент на LOH се регистрира кај Ch 9p - 75.7% и Ch3p - 70.3% (табела бр.18 и графикон бр. 13). Процентуалната разлика на LOH која се регистрира помеѓу Ch 9p и Ch3p верзус останатите модалитети на Ch е статистички сигнификантно за $p<0.05$ ($p<0.00$; $p<0.02$) .

Кај пациентите со орален карцином најголем процент на отсуство на LOH се регистрира кај Ch11p - 75.7% (табела бр.18 и графикон бр. 13). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу Ch 11p верзус останатите модалитет на Ch е статистички сигнификантно за $p<0.00$.

Кај пациентите со орален карцином најголем процент на неинформативност се регистрира кај Ch 13q -70.3% (табела бр.18 и слика

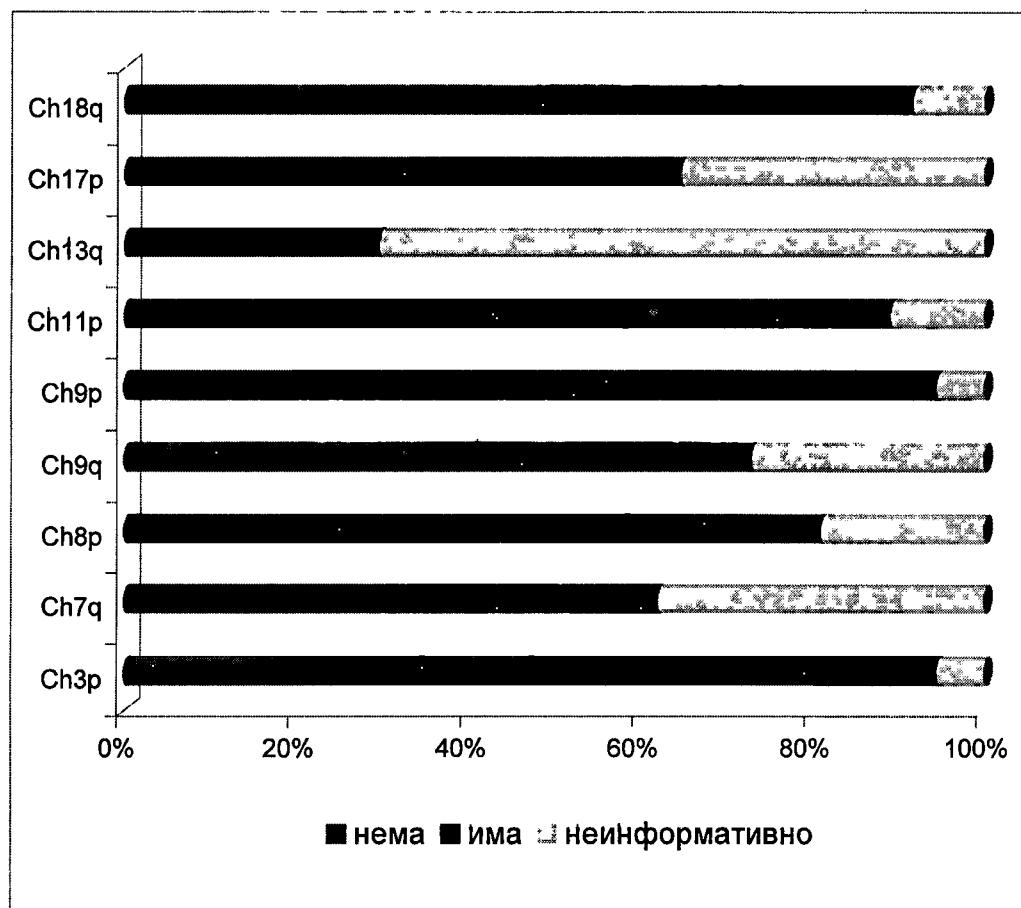
бр.20). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу Ch 13q верзус останатите модалитети на Ch е статистички сигнификантно за $p<0.02$.

Табела бр. 18. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на LOH

LOH	Ch 3p		Ch 7q		Ch 8p	
	број	%	број	%	број	%
нема	9	24.3	11	29.7	14	37.8
има	26	70.3	12	32.4	16	43.2
неинформативно	2	5.4	14	37.8	7	18.9
вкупно	37	100.0	37	100.0	37	100.0

LOH	Ch 9q		Ch 9p		Ch 11p	
	број	%	број	број	%	број
нема	13	35.1	7	18.9	28	75.7
има	14	37.8	28	75.7	5	13.5
неинформативно	10	27.0	2	5.4	4	10.8
вкупно	37	100.0	37	100.0	37	100.0

LOH	Ch 13q		Ch 17p		Ch 18q	
	број	%	број	%	број	%
нема	6	16.2	12	32.4	18	48.6
има	5	13.5	12	32.4	16	43.2
неинформативно	26	70.3	13	35.2	3	8.2
вкупно	37	100.0	37	100.0	37	100.0



Слика бр.20. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на LOH

Во текот на истражувањето се регистрира статистички сигнификантна асоцијација - зависност помеѓу LOH на Ch3p и LOH на Ch9q - Pearson Chi-square: 14.6930, p=0.005384.

Во текот на истражувањето се регистрира статистички сигнификантна асоцијација - зависност помеѓу LOH на Ch3p и LOH на Ch18q - Pearson Chi-square: 25.0916, p=0.000048.

Во текот на истражувањето се регистрира статистички сигнификантна асоцијација - зависност помеѓу LOH на Ch7q и LOH на Ch13q - Pearson Chi-square: 11.1103, p=0.025358.

Во текот на истражувањето се регистрира статистички сигнификантна асоцијација - зависност помеѓу LOH на Ch9q и LOH на Ch17p - Pearson Chi-square: 9.69334, p=0.045930.

Во текот на истражувањето се регистрира статистички сигнификантна асоцијација - зависност помеѓу LOH на Ch9p и LOH на Ch13q - Pearson Chi-square: 14.0952, p=0.007000.

За останатите меѓусебни односи на модалитетите -варијабли на LOH се прифаќа нултата хипотеза дека се независни и р – вредноста е поголема од 0.05.

Во текот на истражувањето се регистрира статистички сигнификантна асоцијација - зависност помеѓу LOH на Ch9p и N - зафатеност на регионални лимфни јазли - Pearson Chi-square: 14.8958, p=0.004924.

Во текот на истражувањето не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација-зависност помеѓу LOH на Ch9p и останатите клиничко-патохистолошките наоди за $p>0.05$.

Во раната фаза (T1 и T2) LOH на Ch9p се регистрираат кај 18-64.3% пациенти (од 28 пациенти кај кои се регистрира LOH на Ch9p). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch9p во раната фаза и останатиот модалитет е статистички сигнификантно за $p<0.05$.

Кај N0 се регистрираат најголем процент на LOH на Ch9p кај 18 - 64.3% пациенти (од 28 кај кои се регистрира LOH на Ch9p). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch9p кај stage I и II и останатите модалитети на stage е статистички несигнификантно за $p>0.05$.

Кај пушачите се регистрираат најголем процент на LOH на Ch9p кај 21-75.0% пациенти (од 28 кај кои се регистрира LOH на Ch9p).

Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch9p кај пушачи и непушачи статистички сигнификантно за $p<0.05$.

Кај G2 се регистрираат најголем процент на LOH на Ch9p кај 15 - 53.6% пациенти (од 26 кај кои се регистрира LOH на Ch9p). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch9p кај G2 и останатите модалитети на клеточната диференцијација е статистички несигнификантно за $p>0.05$.

LOH на Ch9p се регистрираат кај 85.7% пациентите од машкиот пол и 14.3% кај женскиот пол. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch9p помеѓу половите е статистички сигнификантно за $p<0.05$.

LOH на Ch9p се регистрираат кај 60.7% од пациентите на возраст од 50 до 70 год. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch9p помеѓу возраста од 50 до 70г. верзус останатите возрасни модалитети е статистички сигнификантно за $p<0.05$.

LOH на Ch9p се регистрираат кај 42.6% на јазик кај пациентите, потоа 35.7% сублингвално, 10.7% - ретромоларно, останатите локализации се под 10.0%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch3p на јазик и сублингвално кај пациентите верзус останатите модалитети ретромоларно, меко непце, образ и тврдо непце е статистички сигнификантно за $p<0.05$.

Во текот на истражувањето се регистрира статистички сигнификантна асоцијација - зависност помеѓу LOH на Ch3p и TP53 - Pearson Chi-square: 13,2060, $p=0,000279$.

Во текот на истражувањето не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација - зависност помеѓу LOH на Ch3p и клиничко-патолошките наоди за $p>0,05$.

Во раната фаза (T1 и T2) LOH на Ch3p се регистрираат кај 18 - 69.2% пациенти (од 26 кај кои се регистрира LOH на Ch3p). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch3p во раната фаза и останатиот модалитет е статистички сигнификантно за $p<0.05$.

Кај N0 и G2 се регистрираат најголем процент на LOH на Ch3p кај 16-61.5% пациенти (од 26 кај кои се регистрира LOH на Ch3p). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch3p кај N0 и останатите модалитети на N е статистички сигнификантно за $p<0.05$. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch3p кај G2 и останатите модалитети на G е статистички сигнификантно за $p<0.05$.

Кај stage IV и III се регистрираат најголем процент на LOH на Ch3p кај 16 - 61.5% пациенти (од 26 кај кои се регистрира LOH на Ch3p). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста Ch3p кај stage IV и III и останатите модалитети на stage I и II е статистички несигнификантно за $p>0.05$.

Кај пушачите се регистрираат најголем процент на LOH на Ch3p кај 20 - 76.9% пациенти (од 26 кај кои се регистрира LOH на Ch3p). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста Ch3p кај пушачи и непушачи статистички сигнификантно за $p<0.05$.

LOH на Ch3p се регистрираат кај 23 - 88.5% пациентите од машкиот пол и 3 - 11.5% кај женскиот пол. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch3p помеѓу половите е статистички сигнификантно за $p<0.05$.

LOH на Ch3p се регистрираат кај 73.1% од пациентите на возраст од 50 до 70 години. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch3p помеѓу возраста од 50 до 70г. верзус останатите возрасни модалитети е статистички сигнификантно за $p<0.05$.

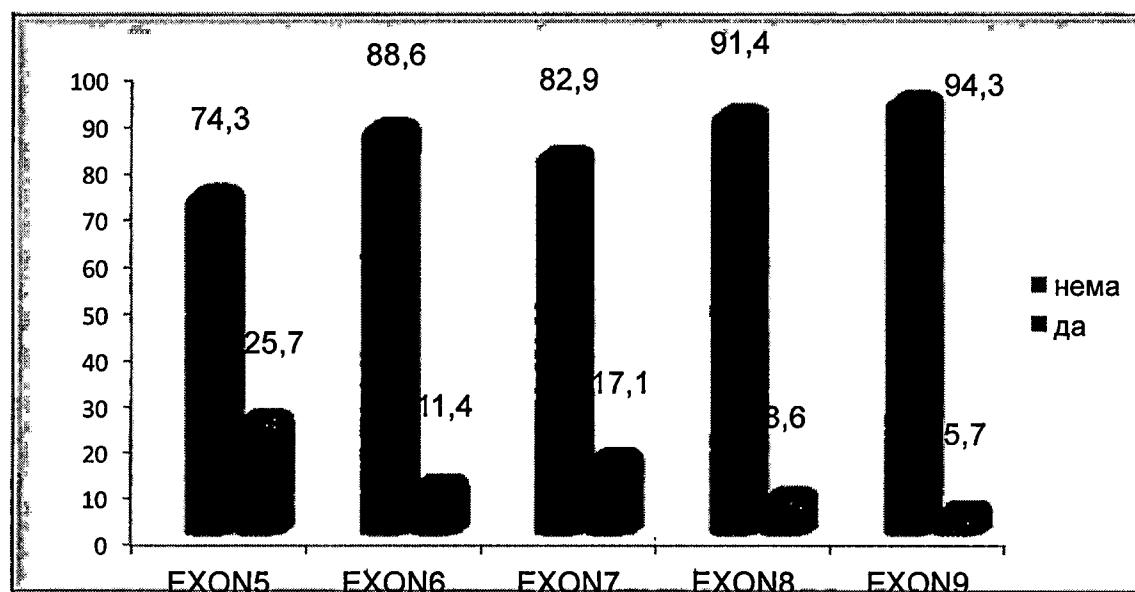
LOH на Ch3p се регистрираат кај 46.2% на јазик кај пациентите, потоа 30.8% сублингвално, 11.5% - ретромоларно, останатите локализации се под 10.0%. Пробентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch3p на јазик кај пациентите верзус останатите модалитети ретромоларно, меко непце, образ и тврдо непце е статистички сигнификантно за $p<0.05$.

Генерално земено студијата не покажува асоцијација - зависност на LOH на Ch3p и Ch9p во однос на пушењето, N0 и G2, раната фаза (T1 и T2), stage-от иако значително т.е. најголем дел се регистрираат кај случаите.

Во текот на истражувањето не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација- зависност помеѓу LOH на 7q, 8p, 9q, 11p, 13q, 17p, 18q и останатите клиничко- патохистолошките наоди за $p>0,05$.

Табела бр. 19. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на TP53 мутација

мутација TP53	EXON 5		EXON 6		EXON 7		EXON 8		EXON 9	
	број	%								
нeMa	26	74.3	31	88.6	29	82.9	32	91.4	33	94.3
да	9	25.7	4	11.4	6	17.1	3	8.6	2	5.7
вкупно	35	100.0	35	100.0	35	100.0	35	100.0	35	100.0



Слика бр. 21. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на TP53 мутација

Во однос на TP53 EXON 5, 6, 7, 8 и 9 во најголем процент се регистрира отсуство на мутација (74.3%; 88.6%; 82.9%; 91.4%; 94.3%).

Мутација во најголем процент се регистрира кај TP53 EXON 5 - 25.7%, потоа следи TP53 EXON 7 - 17.1%, TP53 EXON 6 - 11.4%, TP53 EXON 8 - 8.6% и TP53 EXON 9 - 5.7% (табела бр. 19 и слика бр. 21). Процентуалната разлика која се регистрира е статистички несигнификантна помеѓу EXON 5, 6, 7, 8 и 9 за $p < 0.05$.

Мутација на TP53 генот е идентифицирана кај 24 - 68.6% пациентите со орален карцином (табела бр. 20).

Табела бр. 20. Клиничко - патолошки параметри кај испитаниците со мутација на *TP53*

пол	возраст	локализација	T	N	Stage	G	пушчење
м	60	јазик	T3	N0	S III	G2	да
м	59	јазик	T3	N2	S IV	G2	да
ж	73	тврдо непце	T2	N0	S II	G2	не
ж	62	јазик	T1	N0	S I	G2	не
м	44	ретромоларно	T4	N0	S IV	G2	да
м	64	јазик	T2	N1	S III	G3	да
м	57	сублингвално	T4	N0	S IV	G2	не
м	61	сублингвално	T1	N0	S I	G3	да
м	56	јазик	T1	N0	S I	G2	да
м	73	сублингвално	T2	N0	S II	G2	да
ж	40	сублингвално	T4	N1	S IV	G2	да
м	67	јазик	T1	N0	S I	G2	не
м	73	меко непце	T2	N0	S II	G2	да
м	50	јазик	T2	N0	S II	G3	да
м	58	ретромоларно	T3	N0	S III	G2	да
м	72	јазик	T2	N0	S II	G2	да
м	57	сублингвално	T2	N0	S II	G2	да
м	53	меко непце	T1	N1	S III	G2	да
м	60	сублингвално	T2	N1	S III	G3	да
м	38	јазик	T4	N2	S IV	G3	да
м	65	јазик	T1	N0	S I	G2	да
ж	50	јазик	T2	N2	S IV	G2	да
м	56	јазик	T1	N0	S I	G3	да
м	68	сублингвално	T1	N2	S IV	G3	да

Инциденцата на мутација на генот TP53 се регистрира во најголем дел од клиничкопатолошки параметри кај испитаниците кај машкиот пол - 83.3%, локализацијата е најчеста на јазик - 50.0%, најзастапена возрасна група е од

50 до 60 години - 33.3%, T2 - 37.5%, N0 - 66.7%, stage IVa - 29.2%, клеточна диференцијација - G2 - 70.8% и 83.3% се пушачи. Пушачите, машкиот пол, N0, клеточна диференцијација - G2 имаат сигнификантно повисока инциденца на TP53 мутација во однос на останатите модалитети за $p<0.05$.

Мутација на TP53 генот не асоцира со полот на пациентите - Pearson Chi-square: 0.530303, $p=0.466481$.

Мутација на TP53 генот не асоцира со локализацијата на карциномот кај на пациентите - Pearson Chi-square: 2.69181, $p=0.747370$.

Мутација на TP53 генот не асоцира со T кај пациентите - Pearson Chi-square: 2.07277, $p=0.722376$.

Мутација на TP53 генот не асоцира со N кај пациентите - Pearson Chi-square: 4.46338, $p=0.346918$.

Мутација на TP53 генот не асоцира со stage-от кај пациентите - Pearson Chi-square: 8.49824, $p=0.130842$.

Мутација на TP53 генот не асоцира со G - клеточна диференцијација кај пациентите - Pearson Chi-square: 6.51831, $p=0.088950$.

Мутација на TP53 генот не асоцира со пушењето кај пациентите - Pearson Chi-square: 1.65965, $p=0.197653$.

Мутација на TP53 генот не асоцира со возраста на пациентите - Pearson Chi-square: 5.36630, $p=0.372836$.

Генерално земено студијата не покажува асоцијација - зависност TP53 генот во однос на пушењето, полот, возраста, N, G, T, локализацијата и stage-от иако значително т.е. најголем дел се регистрираат кај случаите.

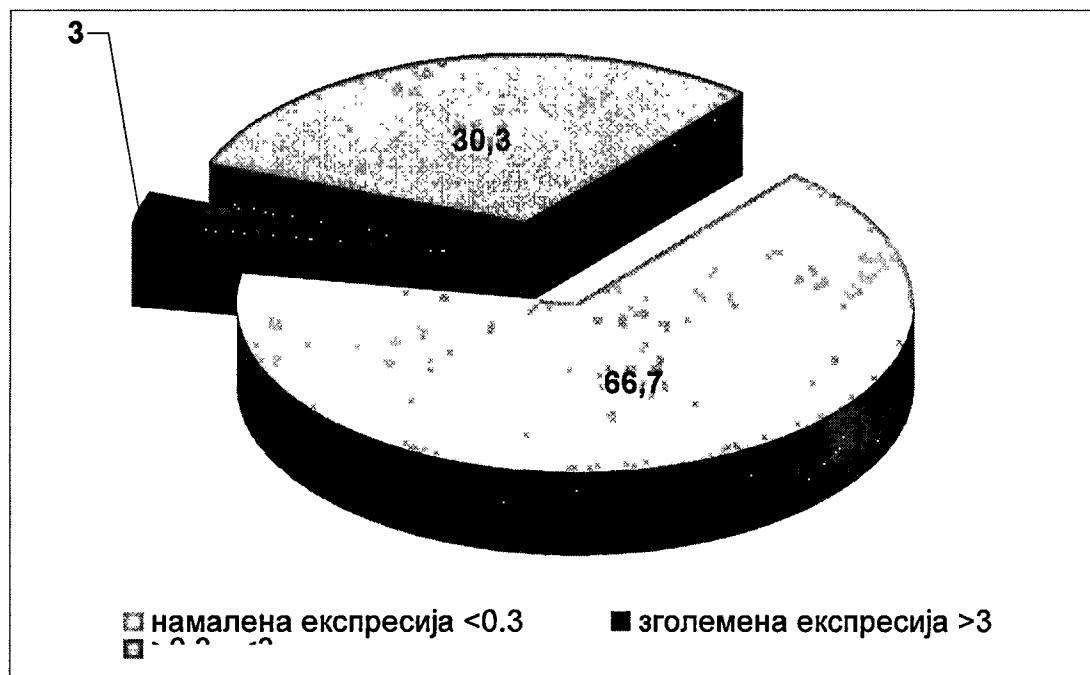
Кај пациентите со орален карцином не се регистрира мутација на EGFR кај ниту еден пациент.

Кај пациентите со орален карцином ХПВ ДНК не се регистрира кај ниту еден пациент.

Кај пациентите со орален карцином MSI не се регистрира кај ниту еден пациент.

Табела бр. 21. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на експресијата на BCL2

BCL2	број	%
намалена експресија <0.3	22	66.7
зголемена експресија >3	1	3.0
>0.3 - <3	10	30.3
вкупно	33	100.0



Слика бр. 22. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на експресијата на BCL2 (во%)

Намалена експресија на BCL2 се регистрира кај 66.7% од пациентите со орален карцином, додека зголемена експресија на BCL2 се регистрира кај еден пациент со орален карцином (табела бр.21 и слика бр. 22). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу намалена и зголемена експресија е статистички сигнификантна за $p=0.0000$.

Инциденцата на намалена експресија на BCL2 се регистрира во најголем дел од клиничкопатолошки параметри кај испитаниците кај машкиот пол - 81.8%, локализацијата е најчеста на јазик - 63.6%, најзастапена возрасна група е од 50 до 60 години - 36.4%, рана фаза (T1 и T2) - 68.2%, N0 - 50.0%, stage III и IV - 63.6%, клеточна диференцијација - G2 - 59.1% и 81.8% се пушачи. Пушачите, машкиот пол, локализација на јазик, рана фаза (T1 и T2) N0, имаат сигнификантно повисока инциденца на намалена експресија на BCL2 во однос на останатите модалитети за $p<0.05$.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу Ch3р и експресијата на BCL2 - Pearson Chi-square: 0.058642, $p=0.808656$, но најголем процент на LOH на Ch3р - 65.4% се регистрираат кај намалена експресија на BCL2. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch3р - кај намалената експресија на BCL2 во однос на застапеноста во останатите модалитети на експресија на BCL2 е статистички сигнификантна за $p<0.05$.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу Ch9р и експресијата на BCL2 - Pearson Chi-square: 0.062284, $p=0.802923$, но над половина од LOH на Ch9р - 57.1% се регистрираат кај намалена експресија на BCL2. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch9р - кај намалената експресија на BCL2 во однос на застапеноста во останатите модалитети на експресија на BCL2 е статистички несигнификантна за $p>0.05$.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу TP53 и експресијата на BCL2 - Pearson Chi-square: 0.220096, $p=0.638968$, но во најголем дел мутациите на TP53 - 75.0% се регистрираат кај намалена експресија на BCL2. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на мутациите на TP53 - кај намалената експресија на BCL2 во однос на застапеноста во останатите модалитети на експресија на BCL2 е статистички сигнификантна за $p<0.05$.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу фазите на Т и експресијата на BCL2 - Pearson Chi-square: 0.457386, $p=0.498850$.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на BCL2 и N - Pearson Chi-square: 0.958333, p=0.916046.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на BCL2 и stage-овите Pearson Chi-square: 1.62626, p=0.202224.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на BCL2 и локализација на оралниот карцином Pearson Chi-square: 19.8347, p=0.178394.

Се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на BCL2 и клеточната диференцијација Pearson Chi-square: 23.0000, p=0.000040.

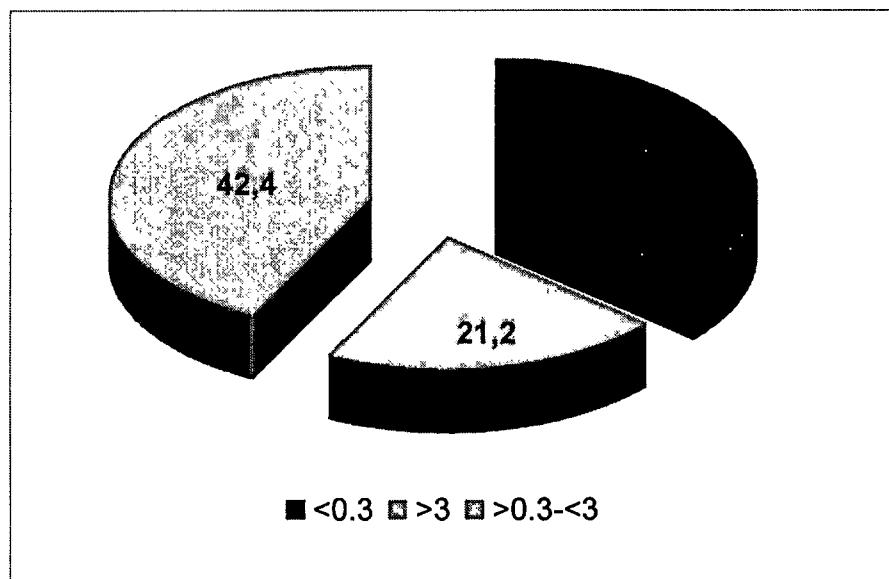
Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на BCL2 и пушењето Pearson Chi-square: 0.220096, p=0.638968.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на BCL2 и возраста - Pearson Chi-square: 2.96212, p=0.705826.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на BCL2 и полот - Pearson Chi-square: 1.38709, p=0.708565.

Табела бр.22. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на експресијата на EGFR

EGFR	број	%
намалена експресија <0.3	12	36.4
зголемена експресија >3	7	21.2
>0.3 - <3	14	42.4
вкупно	33	100.0



Слика бр. 23. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на експресијата на EGFR

За четири пациенти нема податоци. Намалена експресија на EGFR се регистрира кај 36.4% од пациентите со орален карцином, зголемена експресија на EGFR се регистрира кај 21.2% од пациентите со орален карцином (табела бр. 22 и слика бр. 23). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу намалена и зголемена експресија е статистички несигнификантна за $p>0.5$.

Инциденцата на намалена експресија на EGFR се регистрира во најголем дел од клиничкопатолошки параметри кај испитаниците кај машкиот пол - 83.3%, локализацијата е најчеста на јазик - 66.7%, најзастапена возрасна група е од 50 до 60 години - 50.0%, рана фаза (T1 и T2) - 66.7%, N0 - 41.7%, stage III и IV - 66.7%, клеточна диференцијација - G2 - 58.3% и 91.7% се пушачи.

Инциденцата на зголемена експресија на EGFR се регистрира во најголем дел од клиничкопатолошки параметри кај испитаниците кај машкиот пол - 71.4%, локализацијата е најчеста на ретромоларно - 42.9%, најзастапена возрасна група е од од 60 до 70 години - 42.9%, рана фаза (T1 и T2) - 71.4%, N0 - 57.1%, stage I и II - 57.1%, клеточна диференцијација - G2 - 57.1% и 85.7% се пушачи.

Разликата во инциденцата не е сигнификантна за $p>0.05$, помеѓу намалена и зголемена експресија на EGFR во однос на клиничкопатолошките параметри - пол, клеточна диференцијација - G2, N0, рана фаза (T1 и T2) и пушачи.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу Ch3р и експресијата на EGFR - Pearson Chi-square: 1.56250, $p=0.457836$. Процент на LOH на Ch3р - 34.6% се регистрираат кај намалена експресија на EGFR и 23.1% се регистрираат кај зголемена експресија на EGFR. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch3р - кај намалената експресија на EGFR во однос на зголемената експресија на EGFR е статистички несигнификантна за $p>0.05$.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу LOH на Ch9р и експресијата на EGFR - Pearson Chi-square: 2.52778, $p=0.282558$. Процент на LOH на Ch9р 32.1% се регистрираат кај намалена експресија на EGFR и 17.9% се регистрираат кај зголемена експресија на EGFR. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на LOH на Ch9р - кај намалената експресија на EGFR во однос на зголемената експресија на EGFR е статистички несигнификантна за $p>0.05$.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу TP53 и експресијата на EGFR - Pearson Chi-square: 0.139867, $p=0.932456$. Процент на мутациите на TP53 - 37.5% се регистрираат кај намалена експресија на EGFR и 16.7% се регистрираат кај зголемена експресија на EGFR. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу застапеноста на мутациите на TP53 - кај намалената експресија на EGFR во однос на зголемената експресија на EGFR е статистички несигнификантна за $p>0.05$.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и возраста - Pearson Chi-square: 7.33750, $p=0.693242$.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу фазите на T(T1+T2 и T3+T4) и експресијата на EGFR - Pearson Chi-square: 0.469246, $p=0.790869$.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и N - Pearson Chi-square: 4.90448, p=0.767732.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и stage-овите (C1+C2 и C3+C4) Pearson Chi-square: 1.21349, p=0.545124.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и клеточната диференцијација Pearson Chi-square: 3.16259, p=0.788179

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и локализација на оралниот карцином Pearson Chi-square: 15.3705, p=0.119144.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и пушењето Pearson Chi-square: 1.86971, p=0.392646.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и полот Pearson Chi-square: 1.24462, p=0.26458

Табела бр.23. Дистрибуција помеѓу клеточната диференцијација и експресијата на EGFR

	G1	G2	G3			
	број	%	број	%	број	%
EGFR <0.03	1	50.0	7	36.8	4	33.3
EGFR>0.3 - <3			8	42.1	6	50.0
EGFR >3	1	50.0	4	21.1	2	16.7
вкупно	2	100.0	19	100.0	12	100.0

Пациентите со слаба клеточна диференцијација (G3) имаат средна и ниска експресија на EGFR т.е. 83.3% (табела бр. 23).

Пациентите со умерена клеточна диференцијација (G2) имаат средна и ниска експресија на EGFR т.е. 78.9% (табела бр. 23).

Пациентите со добра клеточна диференцијација (G1) имаат висока и ниска експресија на EGFR по 50.0% (табела бр. 23).

Табела бр. 24. Приказ на Spearman-овиот ранг коефициент на корелација помеѓу мутацијата на Ch 3p и stage-от I, II, III и IV

	број	Spearman Rank Order Correlations	t(N-2)	p-level
Ch 3p & Stage	26	0.406541	2.179907	0.039304

Според Spearman-овиот ранг коефициент на корелација се регистрира позитивна статистички сигнификантна корелација помеѓу LOH на Ch3p и stage-от I, II, III и IV на пациентите со орален карцином (табела бр. 24), $p<0.05$.

Според Spearman-овиот ранг коефициент на корелација не се регистрира статистички сигнификантна корелација помеѓу LOH на Ch9p, TP53, BCL2, EGFR во однос на stage-от I, II, III и IV на пациентите со орален карцином, $p>0.05$.

На табелата бр. 25 се прикажани резултатите од униваријантната регресиона анализа за маркерите кои имаат предикторна улога, односно предиктивно влијаат во настанувањето на метастазите кај орален карцином.

Табела бр. 25. Униваријантна логистичка регресиона анализа на влијанието на одредени предиктивни фактори за појава на орален карцином

маркер	Sig. p	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)	
			Lower	Upper
референтна категорија/ Ch3p-нема мутација				
Ch3p-има	0.694	0.629	0.062	6.328
референтна категорија/ Ch9p нема мутација				
Ch9p-има	0.014*	11.111	1.634	75.564
референтна категорија/ Нема мутација				
TP53-има	0.015*	14.000	1.713	82.430
Вредности>0.3-<3/референтна категорија				
BCL2 <0.3	0.372	0.354	0.36	3.455
Вредности>0.3-<3/референтна категорија				
EGFR<0.3	0.44	0.417	0.045	3.838
EGFR>3	0.865	0.833	0.102	6.783

Зависна варијабла: има метастази

* $p<0.05$

Униваријантна логистичка регресиона анализа како сигнификантни предиктори за појава на метастази кај орален карцином ги потврди: постоење на LOH кај Ch9p и постоење на мутација кај TP53.

Постоењето на LOH кај Ch9p за 11.11 [CI 95% (1.634 - 75.564)] пати сигнификантно го зголемува ризикот за појава на метастази кај орален карцином во однос на немањето на LOH на Ch9p.

Постоењето на мутацијата кај TP53 за 14 [CI 95% (1.713 - 82.430)] пати сигнификантно го зголемува ризикот за појава метастази кај орален карцином во однос со TP53 каде нема мутации.

Со мултиваријантниот модел на логистичка регресиона анализа како сигнификантни фактори, односно предиктори на појавата на N(метастази) кај орален карцином ги потврди варијаблите - маркерите LOH на Ch9p и мутација на TP53 кај пациентите со орален карцином (табела бр. 26).

Табела бр. 26. Мултиваријантна логистичка регресиона анализа на влијанието на одредени предиктивни фактори за појава на орален карцином

маркери	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
TP53-има	3.016	1.421	4.503	1	0.034*	20.408	1.259	330.796
Ch9p- има	2.747	1.317	4.351	1	0.037*	15.601	1.180	206.217
BCL2			1.129	2	0.569			
BCL2<0.03	2.064	1.943	1.129	1	0.288	7.880	0.175	354.983
BCL2->3	-15.813	40192.970	.000	1	1.000	0.000	0.000	.
EGFR			.997	2	0.607			
EGFR<0.03	.497	1.348	.136	1	0.712	1.644	0.117	23.074
EGFR->3	2.074	2.081	.993	1	0.319	7.958	0.135	470.141
Constant	-5.390	2.562	4.425	1	0.035	0.005		

Зависна варијабла метастази

Табела бр. 27. Униваријантна логистичка регресиона анализа

маркер	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
			Lower	Upper
Нема LOH/референтна категорија				
Ch3р-има	0.927	0.929	0.192	4.5
Нема LOH/референтна категорија				
Ch9р-има	0.049	2.885	0.477	17.454
Нема мутација/референтна категорија				
TP53-има	0.803	0.833	0.199	3.487
Вредности>0.3-<3/референтна категорија				
BCL2 <0.3	0.218	0.381	0.082	1.768
Вредности>0.3-<3/референтна категорија				
EGFR<0.3	0.758	1.333	0.214	8.288
EGFR>3	0.316	2.667	0.391	18.166

Зависна варијабла: stage

* p>.05

Униваријантна логистичка регресиона анализа не регистрира сигнификантни предиктори за ризик за регистрацијата на stage-овите кај орален карцином за маркерите Ch9p, EGFR, BCL2 и TP53 (табела бр. 27).

Табела бр. 28. Survival анализа- Сох-ова регресија

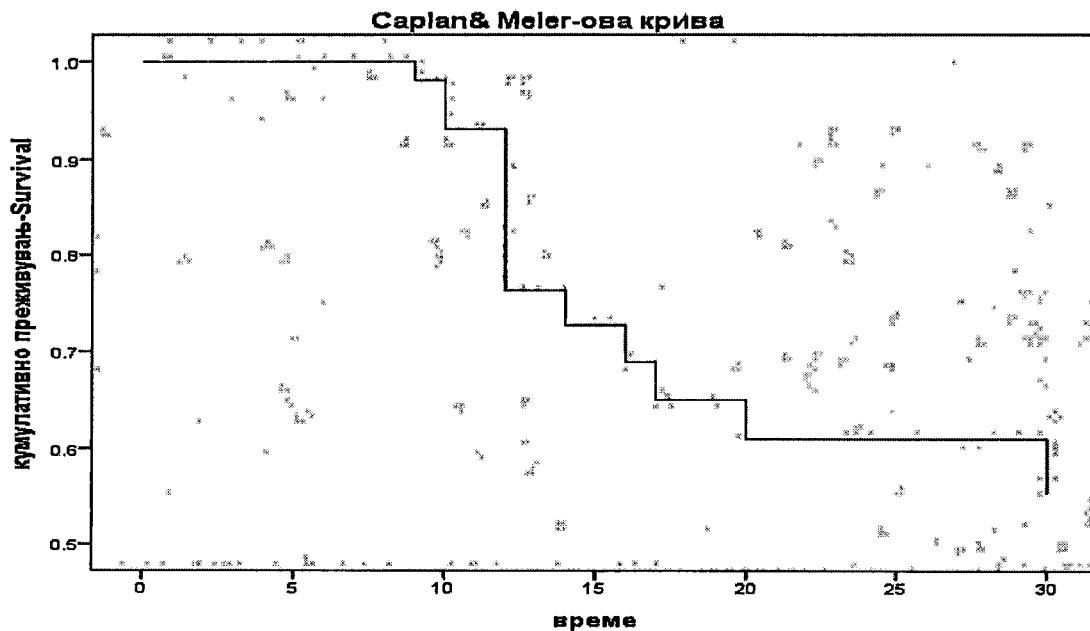
маркери	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
Ch3p	-.232	.892	.068	1	0.795	0.793	.138	4.555
Ch9p	-.235	.705	.111	1	0.739	0.791	.199	3.147
TP53	1.044	.742	1.978	1	0.160	2.839	.663	12.159
BCL2	-3.219	1.308	6.055	1	0.014*	0.040	0.003	0.519
EGFR			6.852	2	0.033*			
EGFR<0.03	-3.312	1.265	6.852	1	0.009*	0.036	0.003	0.435
EGFR->3	-2.478	1.165	4.527	1	0.033*	0.084	0.009	0.823

Во Сох-ова регресија зависната варијабла е настанот, временскиот период е во Месеци, а предикторни варијабли се маркерите (табела бр.28).

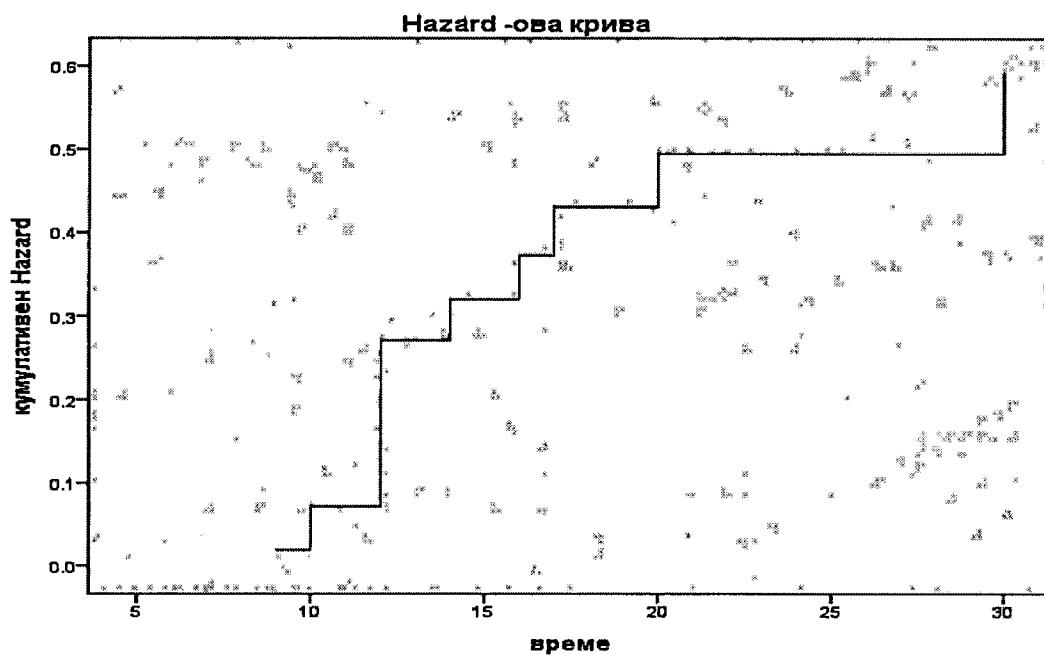
Вредноста на Exp (B) која изнесува 0.040 за предикторска варијабла BCL2 - <0.03 регистрира намалување на веројатноста за преживување во однос на BCL2 - >0.3-<3 (табела бр. 28).

Вредноста на Exp (B) која изнесува 0.036 предикторска варијабла EGFR<0.03 регистрира намалување на веројатноста за преживување во однос на EGFR - >0.3-<3 (табела бр. 28).

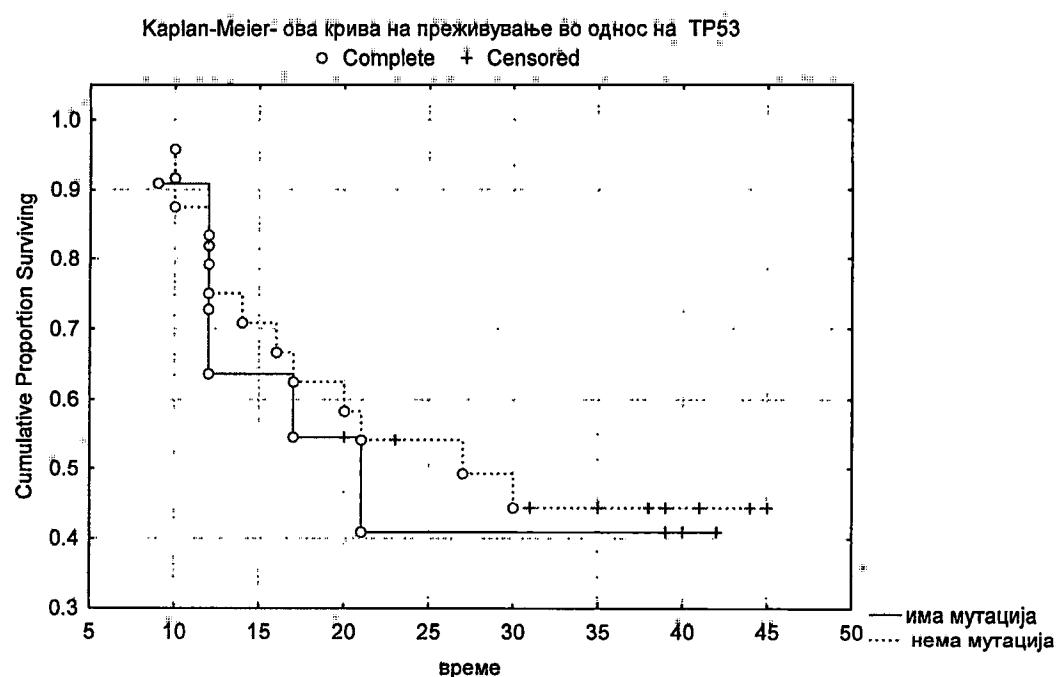
Вредноста на Exp (B) која изнесува 0.084 предикторска варијабла EGFR>3 регистрира намалување на веројатноста за преживување во однос на EGFR - >0.3-<3 (табела бр. 28).



Слика бр.24. Caplan&Meier-ова крива кај Сох-овата регресија

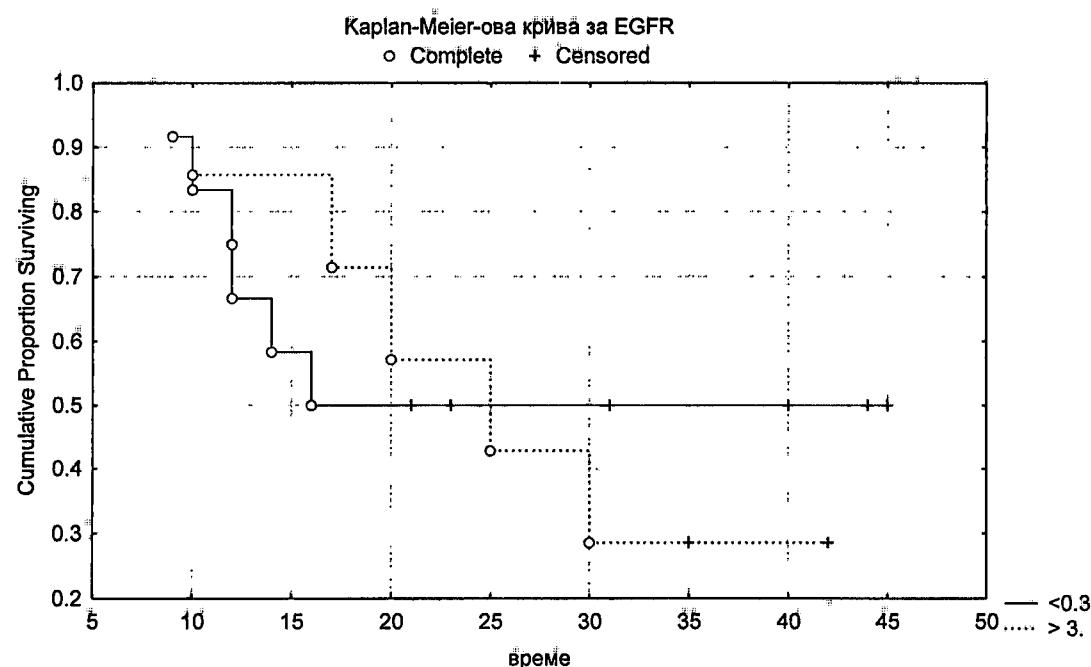


Слика бр.25. Hazard-ова крива



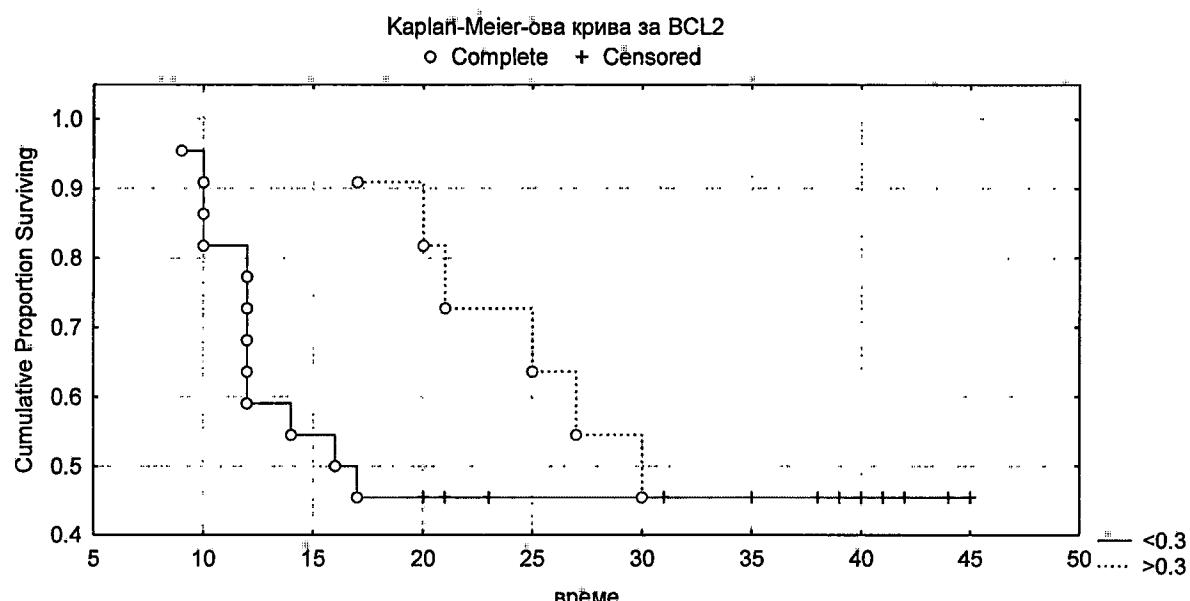
Слика бр.26. Kaplan-Meier-овата крива за мутација на TP53

Според Kaplan-Meier-овата крива 30 месечното преживување кај пациентите со орален карцином кај кои TP53 нема мутација изнесува 45%, а кај пациентите со орален карцином кои кај TP53 има мутација изнесува 40%. Разлика која се регистрира во преживувањето помеѓу има и нема мутација кај TP53 според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.79116$ (слика бр.26).



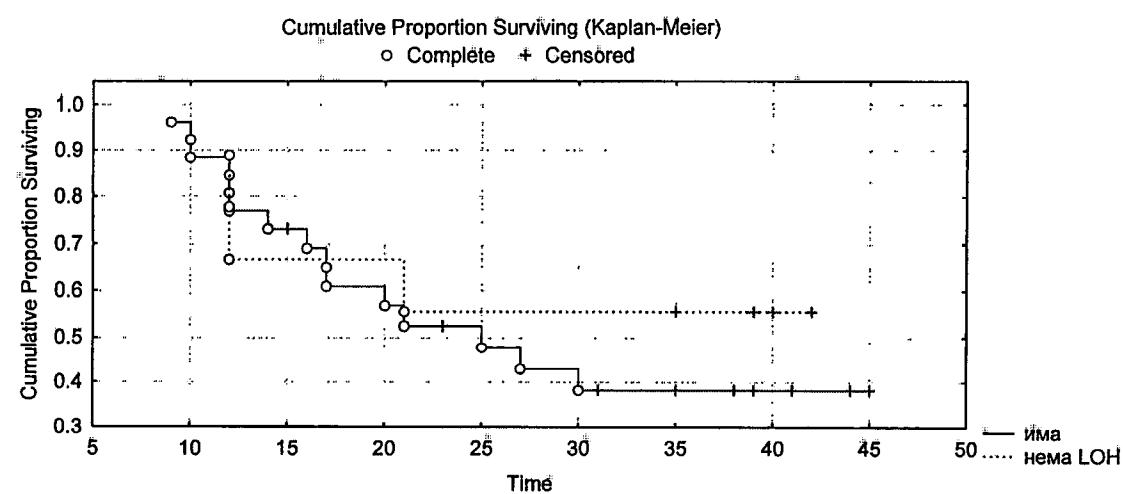
Слика бр.27. Kaplan-Meier-овата крива за LOH на EGFR

Според Kaplan-Meier-овата крива пациентите со орален карцином кај кои EGFR изнесува >3 , 30 месечното преживување се регистрира кај 29.0%, а кај пациентите со орален карцином кај кои EGFR изнесува <0.3 преживување се регистрира кај 50.0%. Разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу EGFR над и под 0.3 според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.83198$. (слика бр.27).



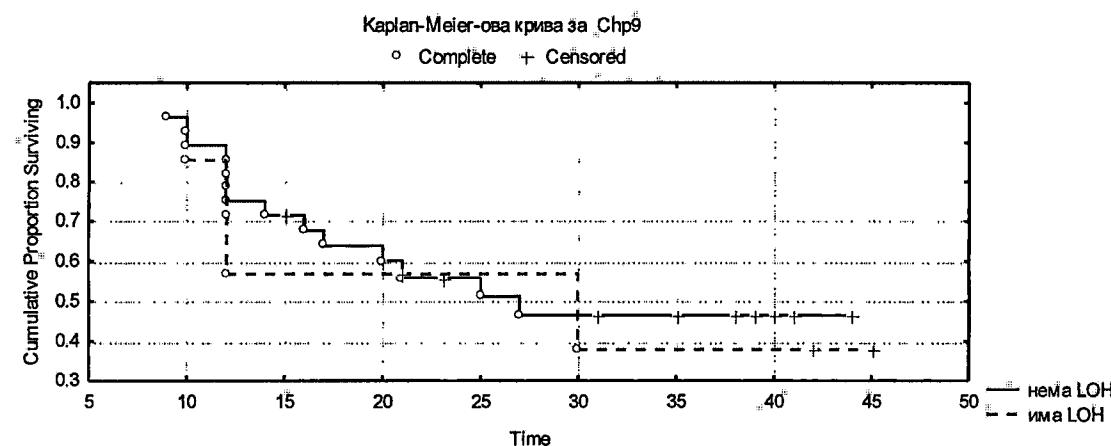
Слика бр.28. Kaplan-Meier-овата крива за LOH на BCL2

Според Kaplan-Meier-овата крива пациентите со орален карцином кај кои BCL2 изнесува <0.3 , 25 месечното преживување се регистрира кај 63.0%, а кај пациентите со орален карцином кај кои BCL2 изнесува >0.3 преживување се регистрира кај 45.0%. Разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу BCL2 над и под 0.3 според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.38027$. Во преживувањето над 30 месеци кај пациентите со BCL2 <0.3 и BCL2 >0.3 преживувањето се изедначува т.е. преживуваат 45.0% (слика бр.28).



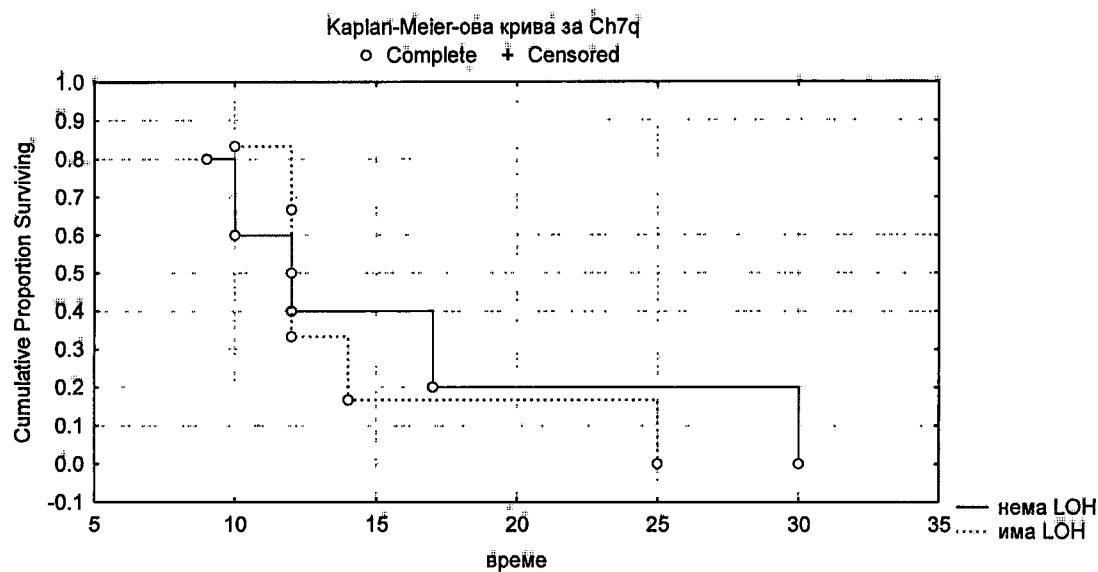
Слика бр.29. Kaplan-Meier-овата крива за LOH на Ch3p

Според Kaplan-Meier-овата крива 30 месечното преживување кај пациентите со орален карцином кај кои нема LOH на Ch3p изнесува 56%, а кај пациентите со орален карцином кои кај има LOH на Ch3p изнесува 39%. Разлика која се регистрира во преживувањето помеѓу има и нема LOH кај Ch3p според според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.49284$ (слика бр.29).



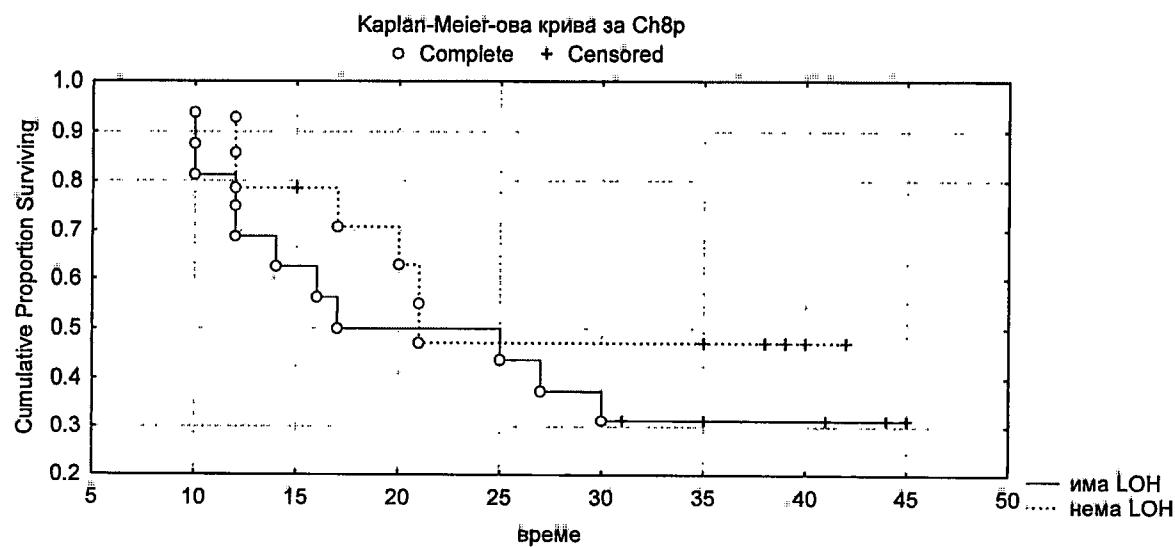
Слика бр.30. Kaplan-Meier-овата крива за LOH на Chp9

Според Kaplan-Meier-овата крива 30 месечното преживување кај пациентите со орален карцином кај кои нема LOH на Ch9p изнесува 36%, а кај пациентите со орален карцином кај кои има LOH на Ch9p изнесува 39%. Разлика која се регистрира во преживувањето помеѓу има и нема LOH на Ch9p според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.78342$ (слика бр.30).



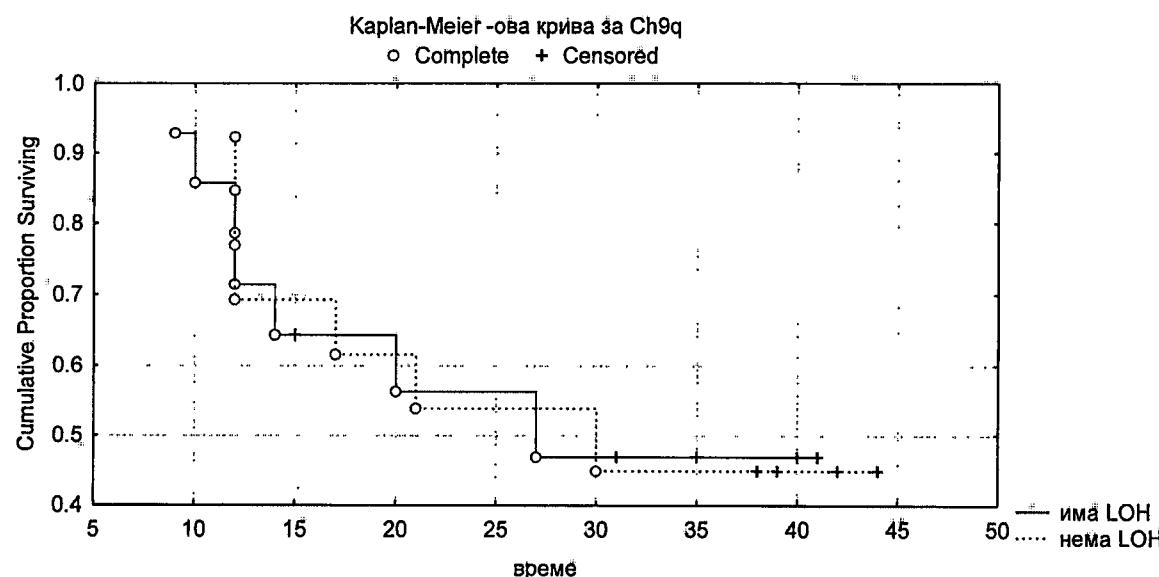
Слика бр.31. Kaplan-Meier-овата крива за LOH на Ch7q

Според Kaplan-Meier-овата крива пациентите со орален карцином кај кои нема LOH на Ch7q над 25 месечното преживување се регистрира кај 20%, а кај пациентите со орален карцином кај кои има LOH на Ch7q над 25 месечното преживување се регистрира кај 0.0%. Разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу има и нема LOH на Ch7q според според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.75035$ (слика бр.31).



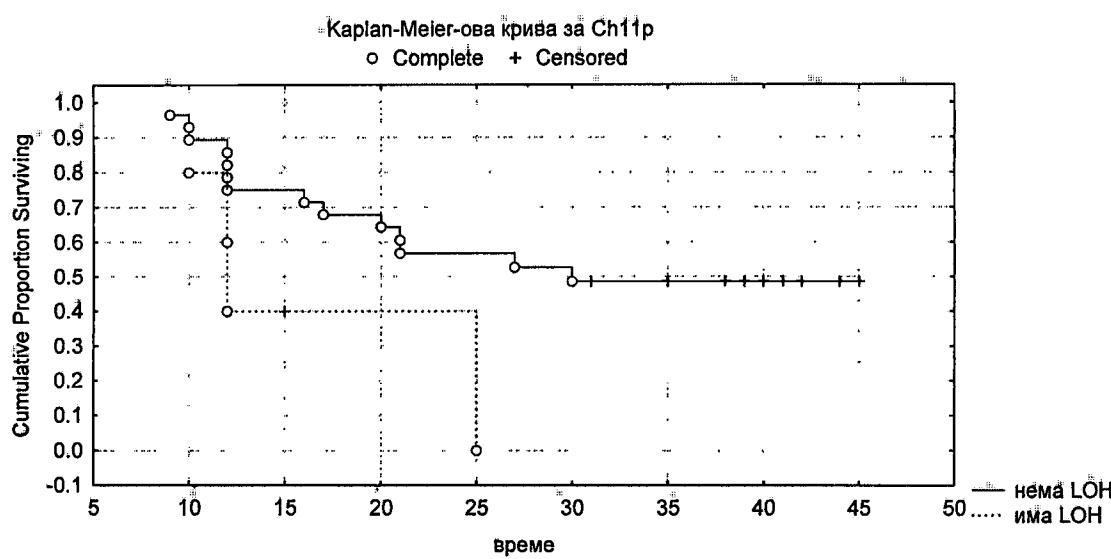
Слика бр. 32. Kaplan-Meier-овата крива за LOH на Ch8p)

Според Kaplan-Meier-овата крива пациентите со орален карцином кај кои нема LOH на Ch8p над 30 месечното преживување се регистрира кај 49%, а кај пациентите со орален карцином кај кои има LOH на Ch8p над 30 месечното преживување се регистрира кај 30.0%. Разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу има и нема LOH на Ch8p според според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.33194$ (слика бр.32).



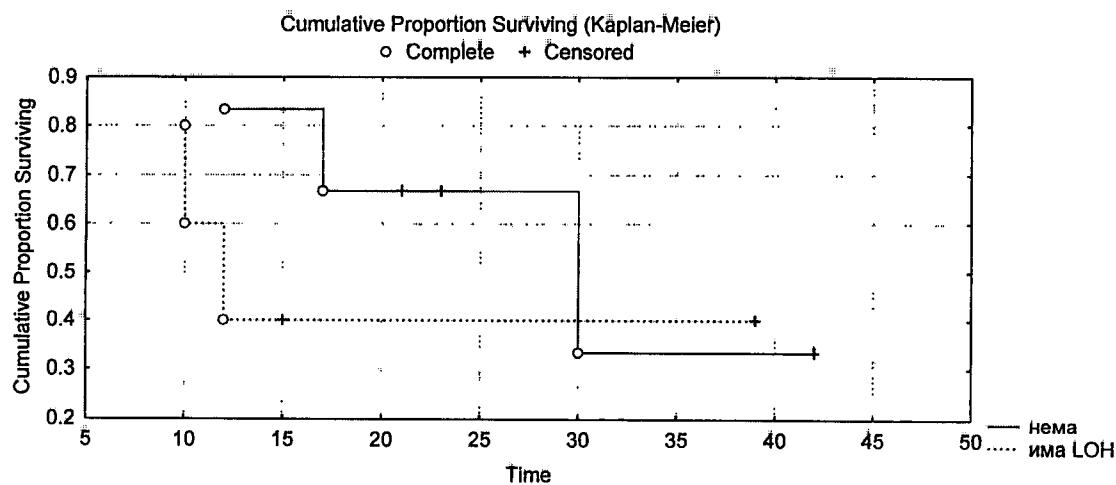
Слика бр.33. Kaplan-Meier-овата крива за LOH на Ch9q

Според Kaplan-Meier-овата крива пациентите со орален карцином кај кои нема LOH на Ch9q над 30 месечното преживување се регистрира кај 45.0%, а кај пациентите со орален карцином кај кои има LOH на Ch9q над 30 месечното преживување се регистрира кај 46.0%. Разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу има и нема LOH на Ch9q според според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.90035$ (слика бр.33).



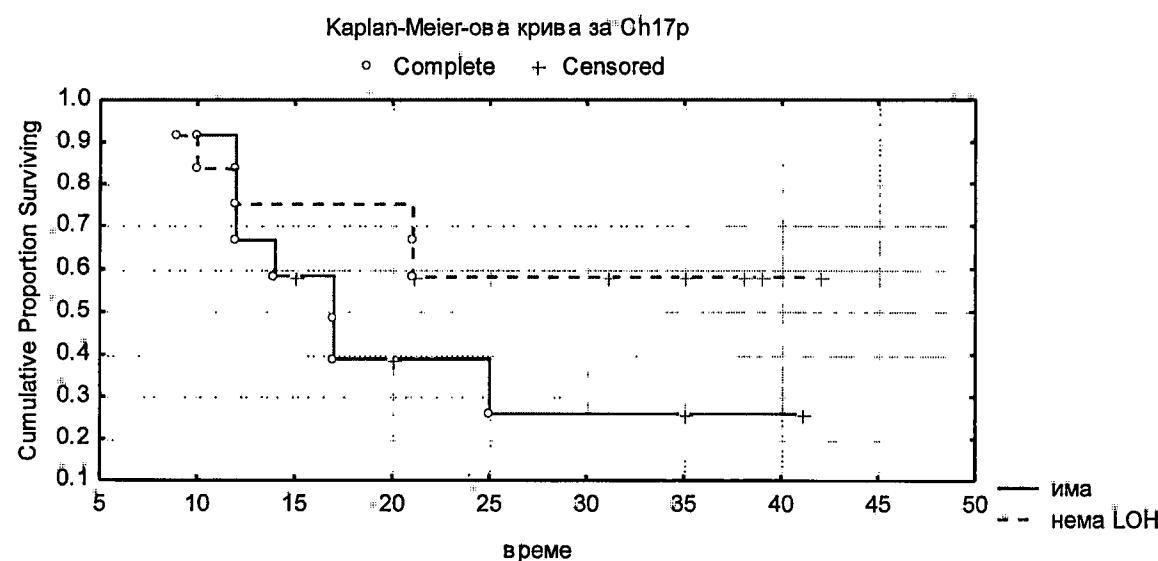
Слика бр.34. Kaplan-Meier-овата крива за LOH на Ch11p

Според Kaplan-Meier-овата крива пациентите со орален карцином кај кои нема LOH на Ch11p над 25 месечното преживување се регистрира кај 58.0%, а кај пациентите со орален карцином кај кои има LOH на Ch11p над 25 месечното преживување се регистрира кај 0.0%. Разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу има и нема LOH на Ch11p според според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.12394$ (слика бр.34).



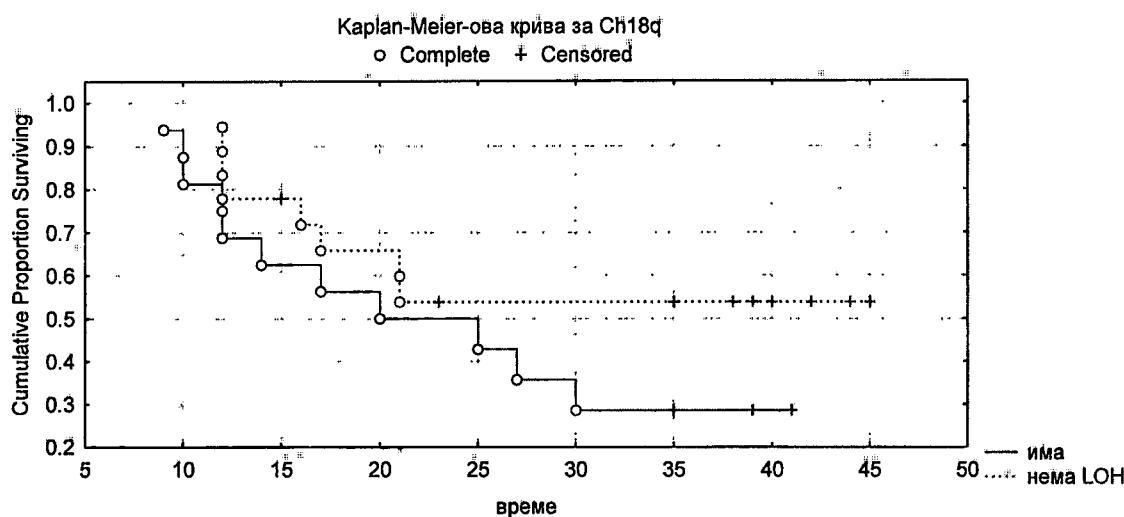
Слика бр.35. Kaplan-Meier-овата крива за LOH на Ch13q

Според Kaplan-Meier-овата крива пациентите со орален карцином кај кои нема LOH на Ch13q над 30 месечното преживување се регистрира кај 32.0%, а кај пациентите со орален карцином кај кои има LOH на Ch13q над 30 месечното преживување се регистрира кај 40.0%. Разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу има и нема LOH на Ch13q според според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.41390$ (слика бр.35).



Слика бр.36. Kaplan-Meier-овата крива за LOH на Ch17p

Според Kaplan-Meier-овата крива пациентите со орален карцином кај кои нема LOH на Ch17p над 30 месечното преживување се регистрира кај 59.0%, а кај пациентите со орален карцином кај кои има LOH на Ch17p над 30 месечното преживување се регистрира кај 27.0%. Разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу има и нема LOH на Ch17p според според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.18766$ (слика бр.36).



Слика бр.37. Kaplan-Meier-овата крива за LOH на Ch18q

Според Kaplan-Meier-овата крива пациентите со орален карцином кај кои нема LOH на Ch18q над 30 месечното преживување се регистрира кај 54.0%, а кај пациентите со орален карцином кои кај има LOH на Ch18q над 30 месечното преживување се регистрира кај 30.0%. Разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу има и нема LOH на Ch18q според според Log-Rank тестот е статистички несигнификантна за $p = 0.19275$ (слика бр.37).

Табела бр. 29. Приказ на инциденцата на LOH на Ch3p и Ch9p, мутација на p53, BCL2 (намалена експресија) и EGFR (зголемена експресија) пушачи и непушачи со орален карцином

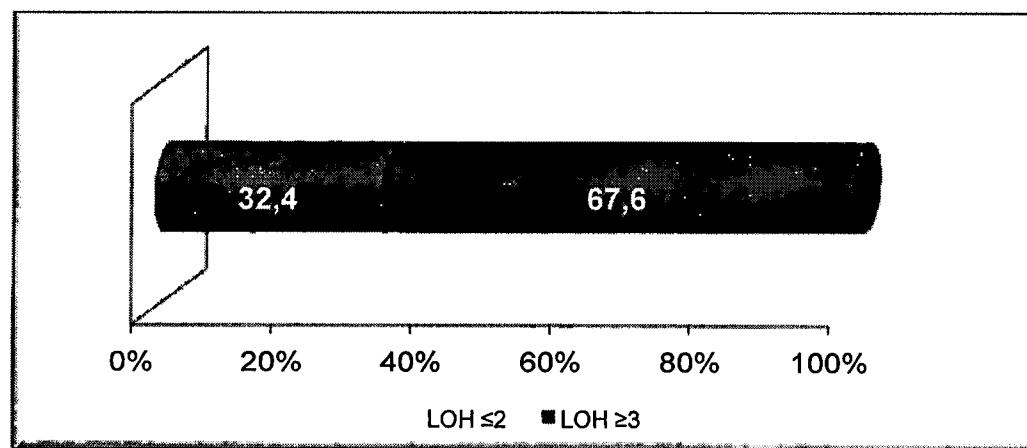
маркери	пуши		непуши	
	%	%	%	%
Ch3p	Има LOH	76.9		23.1
Ch9p	Има LOH	75.0		25.0
P53	Има Мутација	83.3		16.7
BCL2	<0.3	81.8		18.2
EGFR	>3	85.7		14.3

Инциденцата на LOH на Ch3р изнесува 76.9% кај пациентите со орален карцином кои се пушачи, инциденцата на LOH на Ch9р изнесува со 75.0% кај пациентите со орален карцином кои се пушачи, инциденцата на мутациите на P53 изнесува со 83.3% кај пациентите со орален карцином кои се пушачи, инциденцата на намалената експресија на BCL2 изнесува со 81.8% кај пациентите со орален карцином кои се пушачи и инциденцата на зголемена експресија на EGFR изнесува 81.8% кај пациентите со орален карцином кои се пушачи (табела бр. 43). Инциденцата на LOH на Ch3р, Ch9р и P53, намалена експресија - BCL2, зголемена експресија - EGFR кај пушачи верзус процентуалниот наод кај непушачи е статистички сигнификантен за $p<0.5$.

Инциденцата на три најзастапени маркери кај пациентите со орален карцином кај оние кои се пушачи се: зголемена експресија на EGFR, мутација на P53 и намалена експресија на BCL2.

Табела бр. 30. Приказ на дистрибуцијата на пациенти со
LOH ≤ 2 и пациенти со LOH ≥ 3

12	32.4
25	67.6
37	100.0



Слика бр. 38. Графички приказ на дистрибуцијата на пациенти кои имаат LOH ≤ 2 и оние кои имаат LOH ≥ 3

Кај 67.6% од пациентите со орален карцином се регистрира LOH на 3 или повеќе хромозомски краци. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу $\text{LOH} \geq 3$ верзус $\text{LOH} \leq 2$ (32.4%) е статистички сигнификантна за $p < 0.05$ (табела бр. 30 и графикон бр. 31).

Инциденцата на $\text{LOH} \leq 2$ хромозомски крака се регистрира во најголем дел од клиничкопатолошки параметри кај испитаниците кај машкиот пол - 75.0%, локализацијата е најчеста на јазик - 50.0%, најзастапена возрасна група е од 51 до 60 години - 31.7%, рана фаза (T1 и T2) - 83.3%, N0 - 50.0%, stage I - 50.0%, клеточна диференцијација - G2 - 66.7% и 75.0% се пушачи. Пушачите, машкиот пол, рана фаза (T1 и T2), N0, stage I имаат сигнификантно повисока инциденца на $\text{LOH} \leq 2$ хромозомски крака во однос на останатите модалитети за $p < 0.05$.

Инциденцата на $\text{LOH} \geq 3$ хромозомски крака се регистрира во најголем дел од клиничкопатолошки параметри кај испитаниците кај машкиот пол - 84.0%, локализацијата е најчеста на јазик - 48.0%, најзастапена возрасна група е од 51 до 60 години - 40.0%, рана фаза (T1 и T2) - 68.0% и 32.0% касна фаза (T3 и T4), N0 - 60.0%, stage IV - 32.0%, клеточна диференцијација - G2-60.0% и G3 -36.0%, и 76.0% се пушачи. Пушачите, машкиот пол, рана фаза (T1 и T2), N0, stage IV имаат сигнификантно повисока инциденца на $\text{LOH} \geq 3$ хромозомски крака во однос на останатите модалитети за $p < 0.05$.

Генерално земено студијата не покажува асоцијација – зависност на $\text{LOH} \leq 2$ хромозомски крака и $\text{LOH} \geq 3$ хромозомски крака во однос на пушењето, N и G, T, stage-от иако значително т.е. најголем дел се регистрираат кај случаите.

5. ДИСКУСИЈА

p53

Нашите резултати покажуваат дека инциденцата на мутациите на *TP53* изнесува 68,6%. Компарирано со наодите од други автори, овој наш наод спаѓа во повисоките инциденци. Највисока застапеност за мутација (на *TP53*) која ја забележавме во литературата изнесува 79% (Kashiwazaki⁸⁷), додека најниската инцеденца е 5,4% (Kuo⁹⁷)

Во однос на застапеноста на мутацијата на *TP53* кај оралниот карцином, во литературата (Paterson¹³⁷, Thomas¹⁹⁵) се среќава поделба на “западни земји” (Европа, Америка, Австралија, Јапонија) каде мутациите се чести (Szymańska¹⁸⁶, Yamazaki²²¹, Tang¹⁸⁹, Nylander¹²⁹, Hsieh⁷¹) и “источни земји” (Индија и цела југоисточна Азија) каде мутациите се ретки (Kuo⁹⁷, Tsurusako¹⁹⁷, Sorensen¹⁷⁷, Kannan⁸⁶, Wong²¹⁰). Поточно, оралните карциноми во “западните земји” се ретки (Kashiwazaki⁸⁷, Paterson¹³⁷) но со чести мутации на *TP53*, додека ОК во “источните земји” се чести (Arya⁵), но со ретки мутации на *TP53*.

Овие генетски разлики кај ОК може да се последица на различни применети техники во испитување на мутацијата на *TP53*, различно етничкото потекло и/или различен етиолошкиот (ризик) фактор. Постоењето на регионално различни наоди за застапеноста на мутациите во истражувања кои истовремено ги опфаќале двата региони а при тоа биле користени исти постапки за подготовкa на ДНК и анализа на групите, ја отфрлаат можноста нейдентичните техники во истражувањето да се причинат за различната географска застапеност на мутацијата на *TP53* (Kashiwazaki⁸⁷, Thomas¹⁹⁵). Географските различности укажуваат дека времето и значењето на мутацијата на *TP53* во прогресијата на ОК се разликуваат помеѓу различни етнички популации и области⁸⁷. Туморите од “источните земји” се карактеризираат и со вклучување на ras онкогени - мутација, губење на хетерозиготност (H-Ras) и амплификација (K- и N- Ras)¹³⁷, настани кои се неовообичаени во “западните земји” и каде се карактеристични мутациите на *TP53*. Највпечатлива разлика помеѓу географските регии е во доминантната употреба на ризик факторите - пушчење тутун во “западните земји” и џвакање

бетел (*Piper betle*) во "источните земји", и двата признати канцерогени фактори^{81,211,215}.

Процентуалната разлика во застапеноста на мутацијата на TP53 по егзони е статистички несигнификантна во нашето истражување. Застапеноста на мутациите по егзони е релативно рамномерна и соодветни наоди среќаваме кај Hsieh⁷¹ и Nagai¹²⁴. Спротивно на нашиот наод, каде мутациите се доминантно (50-70%) во 1 егзон најдовме кај Kannan⁸⁶, Nylander¹²⁹ и Chiba²⁵.

Пушачите во нашето истражување имаат сигнификантно повисока инциденца на TP53 мутација во однос на непушачите. Анализата покажа дека асоцијацијата помеѓу мутација на TP53 генот и пушењето не е значајна. Причина за тоа можеби е дизајнот на прашалникот за собирање податоци во нашето истражување, кој не разликува поранешни пушачи и непушачи. Нашиот наод се совпаѓа со наодите на Hsieh⁷¹, Nagai¹²⁴, Chaves²², Tanuma¹⁹⁰ и Poeta¹⁴⁴, додека во спротивност е со наодите на Szymańska¹⁸⁶, Golusinski⁶⁰ и Lazarus⁹⁹.

Анализата на нашите резултати покажаа дека ниту една од големините на туморот нема сигнификантно повисока инциденца на TP53 мутација и дека мутацијатата на TP53 генот не асоцира со големината на туморот. Овој наш наод се совпаѓа со наодите на Kashiwazaki⁸⁷, Nagai¹²⁴, Schneider-Stock¹⁶⁵, Szymańska¹⁸⁶ и Tanuma¹⁹⁰ додека во спротивност е со наодите на Atula⁷ и Tang¹⁸⁹.

Во нашето Истражување средно (умерено) клеточната диференцијација на туморот има сигнификантно повисока инциденца на TP53 мутација во однос на останатите модалитети. Анализата покажа дека мутација на TP53 генот, не асоцира со клеточната диференцијација на туморот. Овој наш наод се совпаѓа со наодите на Kashiwazaki⁸⁷, Schneider-Stock¹⁶⁵ и Golusinski⁶⁰, а во спротивност со наодите на Atula⁷ и Tsurusako¹⁹⁷.

Во однос на возрастта нашите резултатите за најзастапена ја посочуваат возрастната група во 6-та декада. Анализата не најде сигнификантна асоцијација помеѓу мутација на TP53 генот и возраста. Овој наш наод се совпаѓа со наодите на Kashiwazaki⁸⁷, Hsieh⁷¹, Schneider-Stock¹⁶⁵, Tanuma¹⁹⁰ и Tang¹⁸⁹, а не најдовме наод со кој нашиот не е во согласност.

Машкиот пол во нашето истражување има сигнификантно повисока инциденца на мутација на TP53 во однос на женскиот пол. Сепак не утврдивме сигнификантност во асоцијацијата помеѓу мутација на TP53 генот и полот. Нашиот наод се совпаѓа со наодите на Kashiwazaki⁸⁷, Hsieh⁷¹, Schneider-Stock¹⁶⁵, Tanuma¹⁹⁰, Tang¹⁸⁹, а не најдовме автор чиј наод не е во согласност со нашиот.

Резултатите покажуваат сигнификантно повисока инциденца на мутација на TP53 кај пациентите без регионални метастази во однос на останатите модалитети. Со анализата не најдовме сигнификантна асоцијација помеѓу мутација на TP53 и регионалните метастази. Овој наш наод е во согласност со наодите на Kashiwazaki⁸⁷, Nagai¹²⁴, Schneider-Stock¹⁶⁵, Szymańska¹⁸⁶, Tanuma¹⁹⁰, Golusinski⁶⁰ и Tang¹⁸⁹ а во спротивност е со наодот на Yamazaki²²².

Во нашето истражување ниту еден стадиум на болеста нема сигнификантно повисока инциденца на TP53 мутација и анализата покажа дека мутацијатата на TP53 генот не е асоцирана со големината на туморот. Нашиот наод се совпаѓа со наодите на Dahse³³, Hsieh⁷¹, Nagai¹²⁴ и Tang¹⁸⁹ а не најдовме наод со кој нашиот не е во согласност.

Ниту една локализација на туморите во нашето Истражување нема сигнификантно повисока инциденца на TP53 мутација. Анализата не утврди постоење на значајна асоцијација помеѓу мутација на TP53 генот и големина на туморот. Овој наш наод се совпаѓа со наодите на Dahse³³, Tanuma¹⁹⁰ и Chaves²² а не е во согласност со наодот на Golusinski⁶⁰.

Нашето истражување покажа дека нема сигнификантна асоцијација помеѓу мутација на TP53 генот и преживувањето на пациентите. Нашиот наод се совпаѓа со наодите на Ostwald¹³³ и Huang⁷⁶ а во спротивност е со наодите Alsner³ и Poeta¹⁴⁴.

Преку униваријантна логистичка регресиона анализа и мултиваријантниот модел на логистичка регресиона анализа на нашите резултати утврдивме дека постоењето на мутација на TP53 е сигнификантен предиктор за појава на регионални метастази. Постоењето на мутација на TP53, за 14 пати сигнификантно го зголемува ризикот за појава метастази кај оралниот карцином во однос на TP53 каде нема мутации. Во

пребараната/достапната литература предиктивноста на p53 во однос на регионални метастази беше утврдувана преку експресија на p53, а не преку негова мутација како во нашето истражување. Тоа беше причината што овој наш наод не можевме да го споредиме со наодите на други автори. Различните лабораториски техники ги прават тешки за интерпретација а особено за компарација објавените резултати што во голема мерка е причина за не целосно утврдување на значењето на p53 како прогностички маркер. Најупотребувана но не и најточна метода за идентификација на промени на p53 е имуноистохемиската анализа. Мерењето на експресијата на p53 (имуноистохемиското откривање на p53 протеин се користи како сурогат за TP53 мутација) дава неконзистентни заклучоци заради променливата дефиниција за "прекумерна експресија"¹⁹¹. Овде мора да се има предвид и инсуфициентноста на имуноистохемиските техники во споредба на директното секвенционирање на PCR амплифицирани фрагменти од p53 генот кое беше спроведено во нашето истражување за утврдување на мутација на истиот (Poeta¹⁴⁴).

EGFR

Нашите наоди покажуваат дека висока односно зголемена експресија на EGFR постои кај 21,2% од пациентите. Ваква релативно ниска застапеност на зголемена експресија на EGFR поретко се среќава во литературата, имајќи предвид дека најголем број од авторите реферираат повеќе од двојна па и тројна застапеност во однос на нашата. Според тоа нашиот наод значајно се разликува од наодите на Shiraki¹⁷³, Bernardes¹², Chandarana²⁰, Sauter¹⁶⁴, Hiraishi⁶⁸, Del Sordo³⁸, Dragomir⁴¹, Diniz-Freitas⁴⁰ и Vosoughhosseini²⁰³. Експресијата од нашето истражување е многу блиска со наодите на една помала група на истражувачи кои реферираат зголемена експресија на EGFR до ~30% од испитаниците (Sarkis¹⁶², Temam¹⁹², Rössle¹⁵³, Sheikh¹⁷⁰, Ulanovski¹⁹⁹ и Ongkeko¹³²).

Инциденцата на зголемена и намалена експресија на EGFR се регистрира во најголем дел кај испитаниците од машкиот пол. Разликата во инциденцата не е сигнификантна помеѓу намалена и зголемена експресија на

EGFR во однос на полот на пациентите. Во истражувањето не регистрираме статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и полот на испитаниците. Овој наш наод е во согласност со наодот на Hiraishi⁶⁸ и Xia²¹⁷.

Најголема инциденца на зголемена експресија на EGFR се регистрира кај возрасната група од 60 до 70г. Не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и возраста и овој наш наод е во согласност со наодот на Hiraishi⁶⁸ а не е во согласност со наодот на Xia²¹⁷.

Во однос на пушењето, во групата со намалена и во групата со зголемана експресија на EGFR, најзастапени се пациентите кои пушат, а разликата во инциденцата помеѓу групите не е сигнификантна. Анализирајќи ја асоцијацијата помеѓу експресијата на EGFR и пушењето, не регистрираме статистички сигнификантна зависност. Овој наод од нашето истражување е во согласност со наодот на Putti¹⁴⁶ а во спротивност е со наодот на Bergler¹¹.

Во однос на локализацијата на примарниот тумор, не регистрираме статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и локализација на оралниот карцином. Овој наш наод е во согласност со наодите на Tamás¹⁸⁸ и Putti¹⁴⁶.

Во однос на туморската големина (T), во групата со намалена и во групата со зголемана експресија на EGFR најзастапени се пациентите со почетни големини на тумор (T1+T2) а разликата во инциденцата помеѓу групите не е сигнификантна. Анализата не покажа статистички сигнификантна асоцијација помеѓу почетните (T1+T2) и напреднати (T3+T4) големини на туморот со експресијата на EGFR. Овој наш наод е во согласност со наодите на Rössle¹⁵³, Hiraishi⁶⁸, Shiraki¹⁷³, Sarkis¹⁶² и Xia²¹⁷ а не е во согласност со наодот на Putti¹⁴⁶ што се однесува на напреднати туморски големини – T4.

Во однос на регионалните метастази (N), во групата со намалена и во групата со зголемана експресија на EGFR најзастапени се пациентите без метастази во регионалните лимфни јазли (N0), а разликата во инциденцата помеѓу групите не е сигнификантна. Анализирајќи ја асоцијацијата помеѓу експресијата на EGFR и регионалните метастази, не регистрираме статистички сигнификантна зависност и тоа е во согласност со наодите на

Rössle¹⁵³, Ulanovski¹⁹⁹, Hiraishi⁶⁸, Shiraki¹⁷³, Sarkis¹⁶² а не е во согласност со наодите на Sheikh¹⁷⁰ и Xia²¹⁷.

Во однос на туморскиот стадиум (S), во групата со зголемана експресија на EGFR најзастапени се пациентите со почетен туморски стадиум (S3+S4) додека во групата со намалена експресија на EGFR најзастапени се пациентите со напреднат туморски стадиум. Анализата не регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу експресијата на EGFR и туморските стадиуми (S). Овој наш наод се совпаѓа со наодите на Hiraishi⁶⁸, Shiraki¹⁷³, Sarkis¹⁶², Hanabata⁶⁶ а во спротивност е со наодите на Bagan⁸ и Putti¹⁴⁶.

Во однос на клеточната диференцијација (G), во групата со намалена и во групата со зголемана експресија на EGFR, најзастапени се пациентите со средно/умерено диференцирани тумори а разликата во инциденцата помеѓу групите не е сигнификантна. Анализирајќи ја асоцијацијата помеѓу експресијата на EGFR и клеточната диференцијација, не регистрираме статистички сигнификантна зависност и тоа е во согласност со наодите на Hiraishi⁶⁸, Xia²¹⁷ и Sarkis¹⁶². а не е во согласност со наодите на Hanabata⁶⁶, Shiraki¹⁷³ и Sheikh¹⁷⁰. Кај последните три автори заедничко е што реферираат дека зголемената експресијата на EGFR значајно е асоцирана со слабо диференцираниите тумори односно дека меѓу нив постои обратна/инверзна поврзаност.

Што се однесува до ниската експресија на EGFR во нашето истражување, анализата покажува дека туморите со ниска експресија имаат слаба или средна клеточна диференцијација. Овој наш наод се совпаѓа со наодот на Dragomir⁴¹.

Во нашето истражување разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу пациентите со висока и пациентите со ниска експресија на EGFR, статистички е несигнификантна (според Log-Rank тест). Овој наш наод е во согласност со наодите на Chandarana²⁰, Sauter¹⁶⁴ и Ongkekko¹³² а не е во согласност со наодите на Shiraki¹⁷³, Xia²¹⁷ и Laimer⁹⁸.

Кај пациентите од нашето испитување кои имаат зголемена експресија на EGFR, три години после примарната хируршка интервенција, смртноста изнесува 71%. Овој процент е навистина висок и со тоа веќе е

надмината просечната смртност на 5 години од примарниот третман. Потврда за многу голема смртност (91%) на 5 години кај пациентите со висока EGFR експресија е наодот на Temam¹⁹². Спротивно на ова е наодот на Thomas¹⁹⁴ од 81,1% преживување после 5 години од третманот кај пациентите со висока експресија на EGFR. Тука мора да го изнесеме податокот кој и самиот автор го нагласува во неговото истражување – во испитаничката група диминирале (70%) пациенти со S1/S2 туморски стадиум. Во нашето истражување доминираат (54%) пациенти со S3/S4 туморски стадиум. Најверојатно е дека спротивственоста на наодите во најголем дел лежи во претходно изнесеното.

Во однос на прогностичко значење, анализата преку Коксовата регресија покажа дека предикторската варијабла зголемена експресија на EGFR регистрира намалување на веројатноста за преживување во однос на намалена експресија на EGFR.

Овој наш наод е во согласност со наодите на Laimer⁹⁸, а не е во согласност со наодот на Perisanidis¹⁴⁰.

Во нашето истражување не регистрираме мутација кај генот *EGFR* во ниту еден орален карцином. Нашиот наод е во согласност со наодите на Temam¹⁹², Chiang²⁴, Tushar¹⁹⁸, Sheikh¹⁷⁰ и Lemos-González¹⁰¹, а не е во согласност со наодите на Loeffler-Ragg¹⁰⁸, Na¹²³, Szymańska¹⁸⁶, Huang⁷⁷ кои регистрирале ретки мутации. Отсъството на мутации на *EGFR* кај нашите испитаници се вклопува/ надополнува со резултатите на студии за *EGFR* спроведени во различни региони низ светот опфаќајки повеќе раси (Јапонија, Шпанија, Тајван, Индија, Јужна Америка) Sheikh¹⁷⁰, Huang⁷⁷, Chiang²⁴, Tushar¹⁹⁸, Loeffler-Ragg¹⁰⁸, Lemos-González¹⁰¹, Szymańska¹⁸⁶, кои наведуваат дека отсуствуваат или се ретки мутациите на *EGFR*. кои наведуваат дека мутациите се ретки или отсуствуваат. Овој наш наод дава потврда дека мутацијата на *EGFR* како појава е ретка или отсуствува и која не е поврзана со одреден географски регион и етничка припадност.

Bcl-2

Во нашето истражување, пациентите со намалена експресија на Bcl-2 доминираат во однос на пациентите со зголемена експресија на Bcl-2.

Разликата која се регистрира помеѓу застапеноста на намалена и зголемена експресија е статистички сигнификантна.

Нашите резултати покажуваат дека застапеноста на зголемена експресија на Bcl-2 изнесува само 3%. Податоците од литературата кои се однесуваат на застапеноста на зголемена експресија на Bcl-2 кај оралниот карцином, не се униформни. Анализата покажува дека застапеноста на зголемена експресија на Bcl-2 се движи во широк распон од 3,8% до 83,3%.

Едно од објаснувањата за неуниформноста во застапеноста на зголемената експресија на Bcl-2 е не-преклопувањето на експресиите на Bcl-2 и p53, односно инверзната корелација помеѓу експресиите на Bcl-2 и p53. Ова укажува дека еден од овие протеини би можел да го замени другиот во тек на карциногенезата и дека генот TP53 Може ја намалува експресијата на генот BCL2 во тек на апоптозата (Leyva - Huerta¹⁰⁴, Kannan⁸⁵, Miyashita¹¹⁹). Испитувањето на протеинот p53 во нашето истражување беше преку мутација на неговиот ген, а не преку неговата експресија, поради што не може да се провери горенаведената претпоставка која би барала висока стапка на зголемена експресија на p53 во нашето истражување. Нашите резултати покажаа висока стапка на мутација на TP53 која е откриена кај повеќе од 2/3 од пациентите.

Во нашето истражување застапеноста на намалената експресија на Bcl-2 изнесува 66,7%. Од податоците во литературата кои се однесуваат на застапеноста на намалена експресија кај оралните карциноми, се издвојува истражувањето каде сите испитаници (100%) биле со намалена експресија на Bcl-2 (Leyva - Huerta¹⁰⁴).

Нашите резултатите покажуваат дека пушачите, имаат сигнификантно повисока инциденца на намалена експресија на Bcl-2 во однос на непушачите.

Во нашето истражување утврдивме дека помеѓу експресијата на Bcl-2 и пушењето нема статистички сигнификантна асоцијација. Овој наш наод не е во согласност со наодот на Atula⁷ кој од достапната литература беше единствен за споредба во однос на пушењето.

Во однос на големина на туморот, испитаниците со помали тумори имаат сигнификантно повисока инциденца на намалена експресија на Bcl-2 во однос на испитаниците со поголеми тумори.

Во нашето истражување утврдивме дека помеѓу големината на туморот и експресијата на Bcl-2 не постои статистички сигнификантна асоцијација. Овој наш наод е во согласност со наодите на Dijkema³⁹ и Kummoona⁹⁶, а не е во согласност со наодот на Lo Muzio¹⁰⁷.

Во однос на регионалните метастази, испитаниците без регионални метастази имаат сигнификантно повисока инциденца на намалена експресија на Bcl-2 во однос на испитаниците со присутни регионални метастази.

Во нашето истражување утврдивме дека помеѓу регионалните метастази и експресијата на Bcl-2 не постои статистички сигнификантна асоцијација. Овој наш наод е во согласност со наодите на Dijkema³⁹, Kummoona⁹⁶, Lo Muzio¹⁰⁷, Yuen²²⁴ и Yao²²³, а не е во согласност со наодите на Rahmani¹⁴⁸, Wilson²⁰⁹, Sahoo¹⁵⁹, de Vicente³⁷ и Tene¹⁹³.

Во однос на клеточната диференцијација на туморите, испитаниците со средна (умерена) диференцијација имаат несигнификантно повисока инциденца на намалена експресија на BCL2 во однос на испитаниците од другите модалитети на диференцијација.

Во нашето истражување утврдивме дека помеѓу клеточната диференцијација на туморите и експресијата на Bcl-2 постои статистички сигнификантна асоцијација. Овој наш наод е во согласност со наодите на Jordan⁸², Rahmani¹⁴⁸, Loncarević¹⁰⁹, Wilson²⁰⁹, Solomon¹⁷⁶, Kummoona⁹⁶, Sulkowska¹⁸³, Lo Muzio¹⁰⁷, и Yao²²³, а не е во согласност со наодите на Dijkema³⁹ и Yuen²²⁴.

Во однос на локализација на оралниот карцином, испитаниците чија локализација на туморот е на јазик, имаат сигнификантно повисока инциденца на намалена експресија на Bcl-2 во однос на испитаниците од другите модалитети на локализација.

Во нашето истражување утврдивме дека помеѓу локализацијата на оралниот карцином и експресијата на Bcl-2 не постои статистички сигнификантна асоцијација. Овој наш наод е во согласност со наодите на Popović¹⁴⁵ а не е во согласност со наодите на Wilson²⁰⁹ и Coutinho-Camillo³⁰.

Во однос на туморскиот стадиум, испитаниците во напреднати туморски стадиуми имаат несигнификантно повисока инциденца на намалена експресија на Bcl-2 во однос на испитаниците во почетни туморски стадиуми.

Во нашето истражување утврдивме дека помеѓу туморскиот стадиум и експресијата на Bcl-2 не постои статистички сигнификантна асоцијација. Овој наш наод е во согласност со наодите на Ricieri Brito¹⁵⁰ и Yuen²²⁴ а не е во согласност наодите на Rahmani¹⁴⁸ и Sahoo¹⁵⁹.

Во однос на полот, машките испитаниците имаат сигнификантно повисока инциденца на намалена експресија на Bcl-2 во однос на испитаниците од женскиот пол.

Во нашето истражување утврдивме дека помеѓу полот на испитаниците и експресијата на Bcl-2 не постои статистички сигнификантна асоцијација. Овој наш наод е во согласност со наодите на Rahmani¹⁴⁸, Kummoona⁹⁶ и Popović¹⁴⁵, а не е во согласност наодите на Wilson²⁰⁹ и Lo Muzio¹⁰⁷.

Во однос на возрастта, испитаниците во возрасна група од 50г. до 60г. имаат несигнификантно повисока инциденца на намалена експресија на Bcl-2 во однос на испитаниците од другите возрасни групи.

Во нашето истражување утврдивме дека помеѓу возрастта на испитаниците и експресијата на Bcl-2 не постои статистички сигнификантна асоцијација. Овој наш наод е во согласност со наодите на Rahmani¹⁴⁸, Kummoona⁹⁶ и Sahoo¹⁵⁹ а не е во согласност наодите на Popović¹⁴⁵.

Во нашето истражување разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу пациентите со средна и пациентите со ниска експресија на Bcl-2, статистички е несигнификантна (според Log-Rank тест). Овој наш наод е во согласност со наодите на Dijkema³⁹, Friedman⁵³ а не е во согласност со наодите на Wilson²⁰⁹, de Vicente³⁷, Lo Muzio¹⁰⁷.

Во однос на прогностичко значење, анализата преку Коксовата регресија покажа дека предикторската варијабла намалена експресија на Bcl-2 регистрира намалување на веројатноста за преживување во однос на нормална експресија на Bcl-2. Во достапната литература, за нашиот наод не најдовме соодветни податоци за компарација.

Овој наод каде предикторска варијабла е намалената експресија на Bcl-2 и наодот каде доминираат испитаници со намалената експресија на Bcl-2 (наспроти само еден испитаник со зголемена експресија) го оправдуваат овој маркер за "енигматичен"²⁰⁹.

ХПВ

Кај ниту еден од испитаниците во нашето истражување не беше детектирана ХПВ ДНК. Овој наш наод се совпаѓа со наодите на Romanitan и Näsman¹⁵², Rivero¹⁵¹, Falaki⁴⁶ и Pathare¹³⁸. Според податоците од литературата, застапеноста на високоризична односно онкогена ХПВ ДНК кај оралниот карцином се движи од 0% до 28%:

- Romanitan и Näsman¹⁵² - 0%
- Rivero¹⁵¹ - 0%
- Falaki⁴⁶ - 0%
- Pathare¹³⁸ - 0%
- Ndiaye¹²⁷ - 2,4%
- Rushatamukayanunt¹⁵⁶ - 2,5%
- Herrero⁶⁷ - 3,9%
- Lingen¹⁰⁵ - 5,9%
- Kouvousi⁹¹ - 6,7%
- Quintero¹⁴⁷ - 23,9%
- Gan⁵⁴ - 27,5%

Сепак, најголемиот дел авторите изнесуваат застапеност под 10% а исто така не е мал бројот на автори кои не детектирале ХПВ ДНК во оралните карциноми.

Отсъството на ХПВ ДНК кај нашите испитаници е показател дека во развојниот пат на канцерогенезата на оралните карциноми во нашето истражување не биле вклучени вирусните онкопротеини E6 и E7, односно алтернативните патеки на p53 и pRb, соодветно. Поради тоа не бевме во можност да го анализираме соодносот помеѓу на ХПВ и мутациите на p53, за кој податоците од литературата кажуваат дека се во инверзна асоцијација односно дека отсуствуваат мутациите на p53 кај ХПВ позитивните тумори (Mitra¹¹⁸, Dai³⁴). Токму тоа отсуство на мутации на p53 кај ХПВ позитивните

тумори се смета дека е причина за сигнификантно подобра прогноза во споредба со ХПВ негативните тумори кои имаат поголема застапеност на мутација на p53 (Leemans¹⁰⁰), а која висока застапеност се покажа и во нашето истражување.

Отсъството на ХПВ тумори во нашето истражување укажува дека онкогените ХПВ-и редовно не учествуваат во етиопатогенезата на оралните карциноми, а кога учествуваат, тогаш нивната застапеност според консултираната литературата најчесто е ниска. Независно дали застапеноста на ХПВ е како во нашето истражување или е поголема, таа кај оралниот карцином е најниска од планоцелуларните карциноми на глава и врат. Компаративно, застапеноста на ХПВ е највисока кај орофарингеалниот карцином, односно кај тонзиларните карциноми (Herrero⁶⁷, Romanian и Näsman¹⁵², Kreimer⁹³). Во консултираната литература најдовме и сосема спротивни наоди, но тие се многу ретки (Quintero¹⁴⁷).

Отсъството на ХПВ ДНК од карциномите не ја исклучува теоретската можност ХПВ инфекциите кои се често минливи сепак да имаат улога во започнувањето на малигната транформација Mork¹²¹. Во една таква "hit & run" ситуација, ХПВ би можел да поттикне почетна трансформација во клетките кои потоа ги губат своите ХПВ ДНК секвенци за време на карциногенезата Syrjänen¹⁸⁵. Веројатно ова е тешко остварливо, имајќи предвид дека нема докази за "hit & run" функционирање на ХПВ кај човечките тумори Gillison⁵⁸, како и дека за хистопатолошка прогресија и малигнен фенотип кај ХПВ позитивните карциноми, неопходна е континуираната експресија на вирусните онкогени Crook³¹.

MSI

Во нашето истражување микросателитската нестабилност (MSI) беше испитувана преку 13 микросателитски маркери на 9 хромозомски краци. Резултатите покажаа дека не постои MSI кај ниту еден од 37-те испитаници. Во објавените податоци за застапеноста на MSI кај оралниот карцином, во целина инциденцата се движи во ниски граници до целосно отсуство. Во однос на хромозомските региони кои беа испитувани во нашето истражување, во литературата таа се движи од 0% до 28%:

- De Schutter³⁵ - 0%
- De Schutter³⁶ – 1,25%
- Koy⁹² - 7,7%
- Ng¹²⁸ - 13%
- Arai⁴ – 15%
- Jin⁸⁰ - <17%
- Field⁴⁸- 28%

Нашиот наод за отсуство на MSI се совпаѓа со наодот на De Schutter³⁵.

Застапеноста на MSI во нашето истражување е пониска од застапеноста на LOH. Овој наш наод за соодносот MSI/LOH се совпаѓа со наодите на Arai⁴, Ng¹²⁹, Jin⁸⁰, Koy⁹² и De Schutter³⁵. Во консултираната литература не сретнавме податок за обратен сооднос - застапеноста на MSI да е повисока од застапеноста на LOH.

Една од карактеристиките во нашето истражување е поголемата застапеност (54%) на испитаници со напреднати туморски стадиуми (S3+S4). Во таа група на испитаници, побројни се испитаниците со S4 туморски стадиум. Нашиот наод на отсуството на MSI кај напреднатите стадиуми е во спротивност со наодите на El-Naggar⁴² и Ha⁶⁵ за кои MSI е доцен настан во туморскиот развој (нивните студии укажуваат на прогресивна акумулација на MSI во тек на туморскиот развој).

Отсуството на MSI кај сите наши испитаници укажува дека во развојниот пат на нивната орална канцерогенеза не е вклучен MMR (mismatch repair) механизмот/системот, односно MMR гените немаат улога во развојот на оралниот карцином. Овој наш наод е во согласност со наодите на Glavac⁵⁹ и Piccinin¹⁴³. MSI се смета за посебен патогенетски механизам во развојот на оралниот карцином (Field⁴⁸).

LOH

Во нашето истражување најголем процент на LOH се регистрира на краткиот крак на третиот хромозом (Ch3p) и на краткиот крак на деветиот хромозом (Ch9p). Поради издвојувањето со нивната застапеност за LOH,

овие два хромозомски крака (Ch3p и Ch9p), односно нивните соодветни региони ќе бидат дискутирани пред преостанатите хромозоми.

LOH - Ch3p

Во нашето истражуавње застапеноста на LOH на краткиот крак на третиот хромозом (Ch3p) изнесува 70,3%. Разликата која се јавува во застапеноста на LOH помеѓу Ch3p наспроти останатите хромозоми (исклучок е Ch9p) е статистички сигнификантна. Споредено со податоците од други истражувања, LOH на Ch3p кај нашите испитаници припаѓа во групата со висока застапеност. Во консултираната литература застапеноста се движи од 20% до 80%:

- Shiga¹⁷² – 20%
- Asakawa⁶ – 45%
- Field⁴⁹ – 52%
- Yamamoto²¹⁹ – 53,8%
- Shiga¹⁷¹ – 54%
- Partridge¹³⁶ – 71%
- Matsuura¹¹³ – 78%
- El-Naggar⁴³ – 80%

Ова е збирна застапеност од три региони/микросателитски маркери преку кој го испитувавме Ch3p. Гледано поединечно, секој од трите региони/маркери исто така покажува висока застапеност на LOH:

- 3p23 / D3S158 – 62,2% (23)
- 3p25.3 / D3S1038 – 54% (20)
- 3p26 / D3S1270 – 51,4% (19)

Доминираат пациентите кои имаат LOH на сите 3 маркери – 14 (58%), следат со LOH на 2 маркери (билоки) – 10 (38,5%) а само 2 (7,7%) пациенти имаат LOH на 1 маркер.

Во однос на пушењето, LOH на 3p кај нашите испитаници најмногу е застапен кај пушачи и разликата во застапеноста помеѓу пушачи и непушачи е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички

сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на Зр во однос на пушењето. Овој наш наод е во согласност со наодите на Yamamoto²¹⁹ и Asakawa⁶.

Во однос на туморската големина, LOH на Зр во нашето истражување најмногу е застапен кај помалите тумори и разликата во застапеноста помеѓу помалите и поголемите тумори е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на Зр во однос на туморската големина. Овој наш наод е во согласност со наодите на Yamamoto²¹⁹, Shiga¹⁷¹, Weber²⁰⁶ и Matsuura¹¹³.

Во однос на регионални метастази, LOH на Зр во нашето истражување најмногу е застапен кај туморите кои се без регионални метастази. Разликата во застапеноста помеѓу туморите кои се без регионални метастази и туморските модалитети кои се со регионални метастази е статистички сигнификантна. Анализата не покажа статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на Зр во однос на регионалните метастази. Овој наш наод е во согласност со наодот на Matsuura¹¹³ а не е во согласност со наодите на Weber²⁰⁶ и Shiga¹⁷¹.

Во однос на туморскиот стадиум, LOH на Зр во нашето истражување најмногу е застапен кај напредни туморски стадиуми. Разликата во застапеноста помеѓу туморите во напреден и туморите во почетен стадиум е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на Зр во однос на туморскиот стадиум. Овој наш наод е во согласност со наодот на Asakawa⁶. Понатаму, анализата преку Spearman-овиот ранг коефициент на корелација регистрира позитивна статистички сигнификантна корелација помеѓу LOH на Зр и туморските стадиуми на испитаниците со орален карцином. Овој наш наод е во согласност со наодите на Partridge¹³⁶, Field⁴⁹ и El-Naggar⁴³, а не е во согласност со наодите на Weber²⁰⁶ и Yamamoto²¹⁹.

Во однос на клеточната диференцијација, LOH на Зр во нашето истражување најмногу е застапен кај тумори со средна клеточна диференцијација. Разликата во застапеноста помеѓу туморите со средно клеточна диференцијација и останатите туморските модалитети на клеточна диференцијација, е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на Зр

во однос на клеточната диференцијација. Овој наш наод е во согласност со наодите на Yamamoto²¹⁹, Partridge¹³⁶, Asakawa⁶ а не е во согласност со наодот на El-Naggar⁴³.

Во однос на полот на пациентите, LOH на Зр во нашето истражување најмногу е застапен кај машките пациенти. Разликата во застапеноста помеѓу половите е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на Зр во однос на полот на испитаниците. Овој наш наод е во согласност со наодите на Yamamoto²¹⁹, Partridge¹³⁶, Asakawa⁶, Shiga¹⁷¹ и Matsuura¹¹³.

Во однос на возрастта на пациентите, LOH на Зр во нашето истражување најмногу е застапена кај пациентите на возраст од 50 до 70 год. Разликата во застапеноста помеѓу испитаниците од возрасната група од 50 до 70 години и останатите возрасни модалитети е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на Зр во однос на возраста на испитаниците. Овој наш наод е во согласност со наодите на Yamamoto²¹⁹, Partridge¹³⁶, Shiga¹⁷¹ и Matsuura¹¹³ а не е во согласност со наодот Asakawa⁶ каде сепак не била постигната статистичка сигнификантност.

Во однос на локализација на примарниот тумор, LOH на Зр во нашето истражување најмногу е застапен кај тумори на јазикот. Разликата во застапеноста помеѓу туморите на јазикот и останатите локализациони модалитети е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на Зр во однос локализација на примарниот тумор. Овој наш наод е во согласност со наодите на Partridge¹³⁶, Shiga¹⁷¹ и Matsuura¹¹³ а не е во согласност со наодот на Field⁴⁹.

Во нашето истражување, разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу пациентите со LOH на Зр и пациентите без LOH на Зр, статистички е несигурирана (според Log-Rank тест). Овој наш наод не е во согласност со наодот на Partridge¹³⁶ кој беше единствениот со кој можевме да го споредиме нашиот наод.

LOH - Ch9p

Во нашето истражуавање застапеноста на LOH на краткиот крак на деветиот хромозом (Ch9p) изнесува 75,7%. Разликата која се јавува во застапеноста на LOH помеѓу Ch9p наспроти останатите хромозоми (исклучок е Ch3p) е статистички сигнификантна. Споредено со податоците од други истражувања, LOH на Ch9p кај нашите испитаници припаѓа во групата со висока застапеност. Овој податок го потврдува консултираната литература, каде застапеноста се движи од 34% до 89%:

- Shiga¹⁷² - 34,6%
- Xiao²¹⁸ - 41,7%
- Shiga¹⁷¹ - 57.4%
- Field⁴⁹ - 62%
- El-Naggar⁴³ - 72%
- Matsuura¹¹³ - 89%

Во податоците од литература највисока застапеност за LOH на 9p од 95% сретуваме кај Weber²⁰⁶, но истиот бил одреден во истражување со селектирани испитаници – исклучиво пушачи.

Ова е збирна застапеност од два региони/микросателитски маркери преку кој го испитувавме Ch9p. Гледано поединечно, секој од двата региони/маркери исто така покажува висока застапеност на LOH:

- 9p24.1 / D9S286 – 51% (19)
- 9p24.2 / D9S228 – 56,8% (21)

Краткиот крак на деветиот хромозом (Ch9p) покажува највисока застапеност на LOH од сите испитувани хромозоми во нашето истражување. Во голем број на истражувања при испитување на повеќе маркери, меѓу многу високите се изнесува застапеноста на LOH на 9p заедно со 3p и 17p, а често застапеноста на LOH на 9p е и највисока (El-Naggar⁴³, Matsuura¹¹³, Field⁴⁹, Miracca¹¹⁷)

Во однос на пушењето, LOH на 9p кај нашите испитаници најмногу е застапен кај пушачи и разликата во застапеноста помеѓу пушачи и непушачи е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички

сигнификантна асоцијација-зависност на LOH на 9р во однос на пушењето. Овој наш наод не е во согласност со наодот на Miracca¹¹⁷ кој беше единствен во достапната литература за споредба.

Во однос на туморската големина, LOH на 9р во нашето истражување најмногу е застапен кај помалите тумори и разликата во застапеноста помеѓу помалите и поголемите тумори е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на 9р во однос на туморската големина. Овој наш наод е во согласност со наодите на Matsuura¹¹³, Xiao²¹⁸ и Miracca¹¹⁶, а не е во согласност со наодот на Shiga¹⁷¹.

Во однос на регионални метастази, LOH на 9р во нашето истражување најмногу е застапен кај туморите кои се без регионални метастази. Разликата во застапеноста помеѓу туморите кои се без регионални метастази и туморските модалитети кои се со регионални метастази е статистички сигнификантна. Покрај тоа, со анализата утврдивме дека постои статистички сигнификантна асоцијација- зависност помеѓу LOH на 9р и позитивни регионални лимфни јазли. Овој наш наод е во согласност со наодот на Field⁴⁹, а не е во согласност со наодите на Shiga¹⁷¹ и Miracca¹¹⁶.

Во однос на туморскиот стадиум, LOH на 9р во нашето истражување најмногу е застапен кај почетните туморски стадиуми. Разликата во застапеноста помеѓу туморите во напреден и туморите во почетен стадиум не е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на 9р во однос на туморскиот стадиум. Овој наш наод е во согласност со наодите на Shiga¹⁷¹, Matsuura¹¹³, Miracca¹¹⁶, а не е во согласност со наодот на El-Naggar⁴³.

Во однос на клеточната диференцијација, LOH на 9р во нашето истражување најмногу е застапен кај тумори со средна клеточна диференцијација. Разликата во застапеноста помеѓу туморите со средно клеточна диференцијација и останатите туморските модалитети на клеточна диференцијација, статистички е несигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на 9р во однос на клеточната диференцијација. Овој наш наод е во согласност со наодите на Miracca¹¹⁶ а не е во согласност со наодот на El-Naggar⁴³.

Во однос на полот на пациентите, LOH на 9р во нашето истражување најмногу е застапен кај машките пациенти. Разликата во застапеноста помеѓу половите е статистички сигнификантна. Со анализата пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на 9р во однос на полот на испитаниците. Овој наш наод е во согласност со наодите Shiga¹⁷¹, Matsuura¹¹³ и Miracca¹¹⁶.

Во однос на возраста на пациентите, LOH на 9р во нашето истражување најмногу е застапена кај пациентите на возраст од 50 до 70 год. Разликата во застапеноста помеѓу испитаниците од возрасната група од 50 до 70 години и останатите возрасни модалитети е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на 9р во однос на возраста на испитаниците. Овој наш наод е во согласност со наодите на Matsuura¹¹³ и Miracca¹¹⁶, а не е во согласност со наодот Shiga¹⁷¹.

Во однос на локализација на примарниот тумор, LOH на 3р во нашето истражување најмногу е застапен кај тумори на јазикот и подот на усната празнина. Разликата во застапеноста помеѓу туморите на јазикот и подот на усната празнина од една страна во однос на останатите локализациони модалитети е статистички сигнификантна. Со анализата не пронајдовме статистички сигнификантна асоцијација- зависност на LOH на 3р во однос локализација на примарниот тумор. Овој наш наод е во согласност со наодите на Matsuura¹¹³ и Miracca¹¹⁶, а не е во согласност со наодот на Shiga¹⁷¹.

Во нашето истражување, разликата која се регистрира во преживувањето помеѓу пациентите со LOH на 9р и пациентите без LOH на 9р, статистички е несигнификантна (според Log-Rank тест). Овој наш наод не е во согласност со наодот на Sang-Hyuk Lee¹⁶⁰, а не е во согласност со наодот на Matsuura¹¹³.

Преку униваријантна логистичка регресиона анализа и мултиваријантниот модел на логистичка регресиона анализа на нашите резултати се утврди дека постоењето на LOH на 9р е сигнификантен предиктор за појава на регионални метастази кај оралниот карцином. Постоењето на LOH на 9р за 11 пати сигнификантно го зголемува ризикот за

појава метастази кај оралниот карцином во однос на отсуство на LOH на 9р. Во однос на прогностичкото значење, општо земено, постоење на LOH на повеќе локуси е поврзан со лош клинички курс, како што се позитивни регионални лимфни јазли Ogawara¹³¹. Покрај тоа, неколку истражувања утврдиле негативно прогностичко значење на LOH дури и во мултиваријантната анализа Field⁴⁹, Yamamoto²²⁰, Choi²⁶. Оваа прогностичка улога најчесто е поврзана со LOH на 3р, 8р, 11q, 13q, 17р и 18q. И во двата случаи, LOH на 9р не се посочува за прогностички маркер. Од друга страна, истражувањата каде е утврдено прогностичкото значење на LOH на 9р се однесуваат за повторување на болеста Bazan⁹, Matsuura¹¹², Lydiatt¹¹⁰ и за високиот туморски градус (клеточна диференцијација) Bockmühl¹⁴. Сепак, за прогностичко значење на LOH на 9р во однос на појава на регионални метастази во прегледаната литература не најдовме податок.

LOH 3р-9р

Во нашето истражуавање најголема застапеност на LOH се регистрира на краткиот крак на третиот хромозом (Ch3р) – 70,3% и на краткиот крак на деветиот хромозом (Ch9р) – 75,7%. Овој наш наод е во согласност со голем број на наоди од студии кои го истражувале LOH кај карциномите на глава и врат, независно дали користеле еден или повеќе микросателитски маркери за соодветниот крак од хромозомот (Shiga¹⁷², El-Naggar⁴³, Field⁴⁹),

Во однос на застапеноста на LOH на хромозомските краци 3р и 9р во нашата студија, постои уште еден момент што треба да се истакне а тоа е дека застапеноста на испитаници кои имаат LOH на двата хромозомски крака истовремено, односно преклопувањето на овие два крака, исто така е високо и изнесува 60%. Сето ова укажува дека гените што се наоѓаат на овие два крака не само што поединечно се најчесто вклучени во патогенезата на оралниот планоцелуларен карцином туку и дека безмалку кај 2/3 од нашите испитаниците, тие гени имаат заедничко учество.

LOH - 7q, 8p, 9q, 11p, 13q, 17p и 18q

Преостанатите хромозомски краци (7q, 8p, 9q, 11p, 13q, 17p и 18q) во нашето истражување покажуваат различна застапеност на LOH. Висока застапеност од 43,2% се забележуа кај 8p и 18q, а средна застапеност со 32,4% кај 7q и 17p како и кај 9q со 37,8%. Најниска застапеност со 13,5% постои кај 11p и 13q.

Застапеноста на LOH на 8p во нашата студија е во ранг на наодите на El-Naggar⁴³ (53%) и Nawroz¹²⁶ (40%), Field⁴⁹ (35%) додека отстапува во однос на наодите на и Beder¹⁰ (28%). Овој хромозомски крак редовно покажува солидна застапеност на LOH во испитувањата за планоцелуларните карциноми на глава и врат, што укажува на можна инволвираност на неговите гени во канцерогенезата кај оралниот карцином.

Споредбата за застапеноста на LOH на 18q е многу слична со претходната. Нашиот наод е во ранг на наодите на El-Naggar⁴⁴ (53%) и Field⁴⁹ (49%) а отстапува во однос на наодот на Nawroz¹²⁶ (23%). LOH на 18q исто така покажува добра застапеност, што наметнува можна вклученост на гените од овој крак во канцерогенезата на оралниот планоцелуларен карцином.

Застапеноста на LOH на 9q во нашата студија е во ранг на наодите на Gao⁵⁵ (29%), Beder¹⁰ (30%) и El-Naggar⁴³ (35%), додека отстапува од наодите на Nawroz¹²⁶ (13%) и Field⁴⁹ (20%). Според прикажаното, 9p покажува релативно висока застапеност на LOH кое иде во прилог за можна вклученост на гените од овој хромозомски крак во патогенезата на оралниот планоцелуларен карцином.

Нашиот наод за застапеноста на LOH кај 7q е во ранг со наодот на Nawroz¹²⁶ (29%) додека пак бележи отстапување во однос на наодите на Field⁴⁹ и Beder¹⁰ кои добиле идентична застапеност – 7%.

Застапеноста на LOH на 17p во нашата студија покажа пониска застапеност од реферираната за овој хромозомски крак – Nawroz¹²⁶ (52%), Field⁴⁹ (40%) и Beder¹⁰ (71%). Вообично, кај планоцелуларните карциноми на глава и врат, застапеноста на LOH на овој крак е меѓу највисоките со застапеноста на LOH на 3p и 9p или пак е веднаш после нив. Отстапувањето

на нашиот наод во тој поглед не е единствен исклучок. Во консултираната литература сретнавме и пониска застапеност од нашата – 22%, реферирано од El-Naggar⁴⁴. Нашиот наод за LOH на 17p е во согласност со наодот на Shiga¹⁷² (36%). За одбележување е неговиот наодот затоа што утврдил дека застапеноста на LOH на 17p кај оралниот планоцелуларен карцином е двојно помала во однос на планоцелуларниот карцином на фаринкс и ларинкс. Овие ниски застапености на LOH на 17p кај оралниот карцином, веројатно укажуваат дека LOH на 17p кај планоцелуларните карциноми на глава и врат се поврзани со примарната локализација на туморот.

Нашиот наод за застапеноста на LOH на 11p е во ранг со наодите на Nawroz¹²⁶ (17%), Field⁴⁹ (20%), Beder¹⁰ (27%). Според тоа, 11p покажува ниска застапеност на LOH што само по себе значи дека овие гени најверојатно не учествуваат во патогенезата на оралниот карцином. Исклучок за релативно висок наод соопштува. Наодот на El-Naggar⁴⁴, каде нешто повеќе од половина испитаници се со LOH на 11p е единствениот во стручната литература со релативно висок процент на LOH.

Застапеноста на LOH на 13p во нашата студија е во ранг со наодот на Field⁴⁹ (20%) а отстапува од наодите на Sabbir¹⁵⁸ (39%), Beder¹⁰ (50%) и Nawroz¹²⁶ (54%). Овој хромозомски крак многу често покажува релативно висока застапеност на LOH кај планоцелуларните карциноми на глава и врат. Ние сепак не може да посочиме инволвираност на гените од овој крак во патогенезата на споменатите карциноми.

Сите испитувани хромозомски краци во нашата студија беа споредувани со клиничко-патолошките параметри на испитаните. Со исклучок на 3p и 9p за кои е претходно дискутирано, анализата не утврди сигнификантна поврзаност на овие параметри со застапеноста на LOH на 7q, 8p, 9q, 11p, 13q, 17p и 18q.

Генерално, во литературата овие хромозомски краци се испитувани пред се во однос на застапеноста, додека ретки се анализите во однос на клиничко-патолошките параметри.

Нашиот наод за отсуство на поврзаност на LOH на 11p со туморскиот стадиум, возраста и полот, е во согласност со наодите на El-Naggar⁴⁴.

Наодот на нашата студија за отсуство на поврзаност на LOH на 13q и 17p со туморскиот стадиум не е во согласност со наодите на Sabbir¹⁵⁸ и Field⁴⁹ соодветно.

LOH 17p - мутација на TP53

Во однос пак на тумор супресорскиот ген TP53, не утврдивме корелација помеѓу мутација на генот p53 и LOH на 17 хромозом (p53 локус). Тргнувајќи како се одвива инактивацијата на класичен ТСГ, очекувано е LOH на p53 при постоење на мутација на p53 кај 70% од испитаниците. Во нашето истражување LOH на p53 локусот постои кај една третина од испитаниците кои имаат мутација на генот p53. Тоа значи дека кај нив инактивацијата на генот p53 се случува со мутација на еден алел и губење (делеција) на хромозомски сегмент кој го содржи другиот алел, кое се детектира како LOH. Ова е начинот на инактивација кај класичен тумор супресорски ген. Така, кај некои туморски видови како што е карциномот на дебелото црево, LOH на p53 локусот е во корелација со мутацијата на p53 што укажува дека е потребно инактивација на двата алели на генот p53. Но кај карциномот на дојка двата алели не се секогаш инактивирани. Уште во 1992, Thompson¹⁹⁶ и спр. утврдиле дека немало корелација помеѓу LOH на p53 локусот и мутација на генот p53, укажувајќи дека само еден алел е доволен за развој на карцином на дојка. Се смета дека генот p53 функционира како доминантен негативен ген, односно "доминантен супресор" во многу системи, затоа што клетките со еден мутиран и еден див-тип (wild-type) на алели изразуваат/манифестираат трансформиран фенотип (ова се случува затоа што функционалниот p53 протеин е хомодимер, додека кај „доминантниот супресор“, мутираниот и дивиот тип пептид се комбинираат формирајќи неактивен хетеродимер). Ова е објаснувањето за начинот на инактивација на генот p53 кај испитаниците со мутација на p53 а кои немаат LOH на p53 локусот. Од друга страна, постоење на LOH на p53 локусот а отсуство на мутација на p53 имавме кај 4 испитаника. Толкувањето е дека кај нив мутацијата се случила во непосредна близина на генот p53 Deng. Дури кога и

вториот алел е изгубен, не може да се претпостави дека p53 а не некој друг ген во близина на p53 е возечки ген.

Во нашето истражување 24 испитаници се со мутација на p53 и 4 испитаници се со LOH на p53 локусот. При тоа, 8 испитаници со мутација на p53 имаат и LOH на p53 локусот. Според тоа, вкупниот број на испитаниците кај кои TP53 е вклучен во развојот на нивната канцерогенеза изнесува 28 односно 75,7%. Оваа многу висока застапеност е доказ дека инактивацијата на TP53 е главен настан преку кој се одвива развојот на канцерогенезата кај оралниот карцином во нашето истражување.

Високата застапеност на TP53 во преку $\frac{3}{4}$ од испитаниците и високата застапеност на LOH на 3р и 9р, како поединечна така и истовремена, дефинитивно укажува на доминантна инволвираност на тумор супресорките гени во канцерогенезата на оралниот карцином во нашата студија.

LOH на повеќе од 2 локуса

Во нашата студија направивме поделба на пациенти кои немаат LOH или имаат LOH на еден или два хромозомски крака и пациенти кои имаат LOH на 3 и повеќе хромозомски краци. Овие две групи беа анализирани во однос на клиничко-патолошките параметри на испитанците. Во студијата статистички сигнификантно преовладуваат испитаници со LOH на 3 и повеќе хромозомски краци. Не утврдивме постоење на сигнификантна асоцијација – зависност на овие две групи со клиничко-патолошките параметри на испитаниците. Од вкупно 9 клиничко-патолошки параметри што ги испитувавме, само за 2 најдовме податоци во литературата за компарација. Нашиот наод во однос на туморскиот стадиум не е во согласност со наодите El-Naggar⁴³ и Field⁴⁹ кои утврдиле корелација со напредни тумори со присутни регионални вратни метастази. Во однос на клеточната диференцијација нашиот наод не е во согласност со наодот на El-Naggar⁴³ кој утвдил корелација со слабо (лошо) диференцираните тумори (овој негов наод во однос на сигнификантност е на статистичка граница). Во нашата

студија испитаниците со stage I (ран туморски стадиум) имаат сигнификантно повисока инциденца на LOH ≤ 2 , додека испитаниците со stage IV имаат сигнификантно повисока инциденца на LOH ≥ 3 . Сметаме дека ова е кореспондира со неопходноста од акумулација на поголем број на генетски промени во развојот на канцерогенезата кај оралниот карцином.

Достигнување на последната фаза (фаза на прогресија) од канцерогенезата која е неопходна за клиничка манифестија на карциномот, не значи запирање на генетските промени и едноставно продолжување со понатамошен раст на веќе трансформираната пренеопластична во неопластична клетка. Токму спротивното се случува, како расте туморот во големина, клетките подлежат на понатамошни мутации. Карактеристика на оваа фаза е зголемената брзина на раст која во комбинација со мутациите кој продолжуваат да се случуваат резултира со зголемување на хетерогеноста во туморската клеточна популација. Покрај генетските, оваа фаза е пратена и со хромозомски промени, најчесто со анеуплоидија²⁰⁰.

Мутација на p53 - LOH Зр

Во нашето истражување утврдивма дека постои статистички сагнификантна асоцијација – зависност помеѓу мутација на p53 и LOH на Зр. Во пребаруваната литература не постои податок кој се однесува за асоцијација-зависност на Зр и p53. Од вкупно 37 испитаници во нашето истражување, кај 21 (57%) испитаник постои истовремено мутација на p53 и LOH на Зр. Податоците покажуваат дека смртноста кај овие испитаници е многу висока, така што после 2 години од примарната хируршка интервенција таа изнесува 57,1%. Овој наш наод се совпаѓа со наодот на Gross⁶² и спр. (2014) кои се единствените кои имаат истражувано и публикувано наод за релацијата на мутација на p53 со LOH на Зр.

Предиктивност

Преку униваријантна логистичка регресиона анализа и мултиваријантниот Модел на логистичка регресиона анализа на нашите

резултати се утврди дека постоењето на LOH на 9р и мутација на TP53 се сигнификантен предиктори за појава на регионални метастази кај оралниот карцином. Постоењето на LOH на 9р за 11 пати а постоењето на мутација на TP53 за 14 пати сигнификантно го зголемува ризикот за појава метастази кај оралниот карцином во однос на отсуство на истите. Овој податок покрај научно-истражувачко треба да има и апликативно значење.

Пред подетално објаснување за апликативноста на LOH на 9р и мутацијата на TP53 кај оралниот карцином, сакаме да потенцираме дека:

- најчесто користената, Т категоријата од широко прифатениот TNM систем, не е доволно сензитивен индикатор за појава на метастази во вратните лимфни јазли (Warburton²⁰⁵, Al-Rajhi²).
- присуството на метастази во вратни лимфни јазли е постојано јака детерминанта за преживувањето кај пациенти со орален карцином (Greenberg⁶¹)

LOH на 9р и мутацијата на TP53 како предиктори за појава на регионални метастази кај оралниот карцином, на мислење сме дека треба да припаѓаат во групата на негативните (ризик) карактеристики за овој карцином. Оваа група ја сочинуваат: екстракапсуларно ширење од лимфни јазли, позитивни ивици, pT3 или pT4 примарен тумор, N2 или N3 лимфни јазли, зафатени лимфни јазли од IV или V ниво, перинеурална инвазија, васкуларен емболизам. Значењето на оваа група е во детерминирање на правецот на терапевтскиот план според упатството/протоколот за терапија на оралниот карцином (види прилог). Според упатството/протоколот, ако после реализиран примарен хируршки третман се утврди постоење на некоја од негативните карактеристики, тогаш, по процедура примарната хируршка интервенција се надополнува со рексизија или хемотерапија/радиотерапија или радиотерапија.

Понатаму, LOH на 9р и мутација на TP53, како предиктори за појава на регионални метастази кај оралниот карцином, сметаме ека во дадени околности, треба да го одредуваат и опсегот на примарната хируршка интервенција кај пациентите со T1/T2 - N0. Значајна е застапеноста на туморските големини T1 и T2 кај оралниот карцином и интенција е токму овие да преовладуваат при дијагностицирање на болеста. Присутноста на

окултните метастази е најчеста токму во овие почетни туморски големини. Окултните метастази може да бидат присутни од 27% до дури 40% кај клинички и рендгенолошки негативни регионални лимфни јазли Huang⁷⁸. Интегриран PET-CT scan не е супериорен во однос на MRI а поради лимитираната сензитивност кај мали метастатски депозити, не е соодветен за употреба за иницијална евалуација на оралниот карцином^{166,169}. Недостатокот на доволно сензитивен индикатор за појава на метастази во вратните лимфни јазли е причина што дисекциите на вратот се изведуваат елективно кај почетните големини на оралниот карцином (покрај ексцизија на примарниот тумор). Всушност, кај пациенти со орален карцином T1/T2 – N0, терапевтот-хирург е соочен со одлука помеѓу два стратешки избора:

- дисекција на врат, или
- следење на регионалните вратни лимфни јазли.

И двете стратегии имаат свое оправдување. Протагонистите на вратна дисекција, истата ја оправдуваат поради отстранување на микрометастази во регионалните лимфни јазли со што се оневозможува нивно повторно појавување, како и спречување на далечни метастази. Понатаму, дисекцијата на врат овозможува точно верификување на стадиумот за прогноза на болеста како и одредување на потреба од адјувантна терапија. Протагонистите на стратегијата за следење на вратните лимфни јазли, истото го оправдуваат со тоа што поголем дел од овие пациенти ниту имаат, ниту ќе имаат развој на регионални метастази. На тој начин, значаен дел од пациентите со T1/T2 – N0, се поштедени од прекумерен и непотребен третман кој со себе носи хируршки ризици и потенцијален морбидитет во врска со дисекција на врат.

Според упатството/протоколот, кај пациенти со T1/T2 – N0, при примарна хируршка интервенција, покрај ексцизијата на примарниот тумор, наведена е, но само како избор на терапевтот - селективна дисекција на вратот (види прилог). Во околности на предоперативно потврдено постоење (пункциона биопсија) на LOH на 9р и/или мутација на TP53, сметаме дека треба по процедура да биде изведена селективна дисекција на вратот. На тој начин, значаен дел од пациентите со T1/T2 – N0, ќе бидат поштедени од прекумерен и непотребен третман кој со себе носи хируршки ризици и

потенцијален морбидитет во врска со дисекција на врат. Сметаме дека употребата на LOH на 9р и/или Мутација на TP53 како маркери предиктори за појава на регионални метастази е рационален и критички пристап наспроти некои неодамнешни истражувања каде се предлага изведувањето на дисекција на врат кај сите пациенти со N0, што de facto значи дисекција на врат кај сите пациенти со орален карцином Fasunla⁴⁶.

Кај пациентите кај кои е изведена само ексцизија на примарниот тумор и од одредени причини не е изведена селективна дисекција на вратот (хируршка/анестезиолошка контраиндикација, одбивање од страна на пациентот и сл.), потребно е надополнување на третманот со хемотерапија/радиотерапија или радиотерапија, ако постоперативно имаат наод за постоење на LOH на 9р и мутација на TP53.

Овие смерници може да функционираат и најдат свое место во дијагностиката и третманот на оралниот карцином, само ако одредувањето и анализирањето на молекуларните маркери биде редовна постапка. Во моментов, сознанијата за молекуларните маркери кај оралниот карцином не се на ниво на сознанијата за некои други карциноми за да овозможат персонализиран третман на оралниот планоцелуларен карцином, како што е со ракот на дојка и дебело црево. Токму придобивките во дијагностиката и терапијата на овие карциноми, базирани на молекуларните маркери се spiritus movens за продлабочување и проширување на сознанијата за постоечките маркери, како и откривање на нови во канцерогенезата на оралниот карцином. Сознанијата за вклученоста на молекуларните маркери во развојот на канцерогенезата, нивното поединечно функционирање, како и нивната интеракција се предуслов за развивање на биолошки темелени, успешни тераписки решенија за оралните карциноми.

6. ЗАКЛУЧОЦИ

- ✓ Мутациите во *TP53* генот се присутни кај повеќе од 2/3 (69%) од оралните карциноми кај пациентите од Република Македонија.

- ✓ Хромозомската нестабилност дефинирана како губиток на хетерозиготност е присутна кај 92% од нашите пациенти при што најзастапени се губитокот на хетерозиготност на 9p24.1-2 регионот од краткиот крак на 9-от хромозом (75.7%) и 3p23-6 регионот на краткиот крак на 3-от хромозом (70.3%).

- ✓ Промените во експресијата на EGFR и Bcl-2 гените се ретки што укажува дека истите немаат значајна улога во развојниот пат на канцерогенезата на оралниот карцином кај нашите пациенти..

- ✓ Кај нашите пациенти со орален карцином постои сигнификантна корелација помеѓу:
 - загубата на хетерозиготност на краткиот крак на 3-от хромозом и понапреден стадиум на оралниот карцином.
 - загубата на хетерозиготност на краткиот крак на 3-от хромозом и мутацијата на *TP53* генот.
 - загубата на хетерозиготност на краткиот крак на 9-от хромозом и проширување на болеста во регионалните лимфни јазли.

- ✓ Сигнификантни предиктори за појава на метастази кај нашите пациенти со орален карцином се постоење на загуба на хетерозиготност на краткиот крак на 9-от хромозом (11 пати поголем ризик) и постоење на мутација на *TP53* генот (14 пати зголемен ризик)

- ✓ Развојниот пат на канцерогенезата на оралниот карцином кај нашата популација:
 - не го вклучува Human Papilloma вирусот
 - најчесто вклучува инактивирање на *TP53* генот
 - пропратен е со драстична хромозомска нестабилност која во голем процент ги вклучува гените лоцирани на 9p24.1-2 и 3p23-6.

- ✓ Испитувањата на загуба на хетерозиготност на краткиот крак на 9-от хромозом и на мутација на *TP53* генот, се потенцијални прогностички маркери кои може да помогнат во донесување на одлука за обемот на хируршката интервенција и понатамошниот третман и следење на пациентите со орален карцином.

7. КРАТКА СОДРЖИНА

Кога се збори за орален карцином, се претпоставува дека тоа се однесува на планоцелуларен карцином со интраорална локализација. Најчесто е локализиран на јазикот и подот на устата. Тој е најчеста неоплазма од карциномите на главата и вратот. Инциденцата е со забележителни варијации од социо-економски и географски аспект. Соодносот мажи - жени со орален карцином на светско ниво изнесува 1,8:1, а средна возраст се 60-тите години од животот. Петгодишното преживување е помало од 50%.

Ризик фактори за орален карцином: 1. Тутун (пушење), особено во комбинација со алкохол, значајно го зголемува ризикот за орален карцином, 2. Вируси – ХПВ (Human Papillomavirus).

Карциногенезата кај оралниот карцином е повеќефазен процес што се развива преку иницијација, промоција и прогресија, како последица на акумулација на различни сукцесивни генетски промени во епителната клетка за кои тековно се верува дека се 6 до 10. Овој развој е долготраен, вообичаено потребни се повеќе години до појава на клиничките абнормалности.

Етио-патогенезата на оралниот карцином не е целосно позната и разјаснета а сознанија за молекуларните маркери заостануваат од тие за повеќето карциноми (рак на дојка и дебело црево). Сакајки да дадеме свој придонес во проширување и подигање на сознанијата за молекуларните маркери кај оралниот карцином, како и за нивната поврзаност со клиничко-патолошките параметри кои се значајни во хируршкиот план и третман на болеста, си ги поставивме следните цели:

1. Да се детерминира застапеноста на ХПВ кај оралните карциноми и кој тип е најчест.
2. Да се испитаат:
 - промените (мутациите) во p53 и EGFR кај оралниот карцином
 - промените на ниво на експресија кај p53, bcl-2, EGFR и дисбалансот во сет од микросателитски маркери кај оралниот карцином,a сите тие во однос на клинички непроменетата слузница.

3. Да се испита корелацијата помеѓу промените во p53, bcl-2, EGFR и микросателитските маркери со клиничките и патолошките параметри на оралниот карцином.
4. Да се утврди кој од маркерите поединечно или со некој друг/и, има прогностичка важност за оралниот карцином.

За остварување на зададените цели беше спроведено проспективно истражување кај 37 пациенти со орален карцином кои беа оперативно третирани. Од секој пациент при оперативниот зафат беа земани 4 примероци од биолошки материјал:

1. оперативно отстрането ткиво (тумор) за хистопатолошка верификација
2. туморското ткиво (~5мм³), за молекуларни анализи
3. здрава слузница (~5мм³), за молекуларни анализи
4. периферна крв земена во вакутаниер епрувети со EDTA како антикоагуланс (3 мл), за молекуларни анализи

Базата на податоци за клиничко-патолошките параметри на испитаниците ја сочинуваа: големина на туморот, присутни/отсутни метастази во регионални вратни лимфни јазли, стадиум на туморската болест, клеточна диференцијација на тумор, локализација на примарен тумор, дали е жив, преживување во месеци после третман, пушење, пол и возраст.

ДНК и РНК се изолираа од свежо туморско ткиво, здрава слузница, леукоцити од периферна крв и serum од сите пациенти користејќи комерцијални китови од QIAGEN. Се анализираа микросателитска нестабилност (MSI) и загуба на хетерозиготност (LOH) на 9 хромозомски краци - 3p, 7q, 8p, 9q, 9p, 11p, 13q, 17p и 18q, со методот на флуоросцентен multiplex PCR и капиларна електрофореза на автоматски ДНК анализатор. За одредување на мутациите во EGFR и p53 се користеше метод на директно секвенционирање на PCR амплифицирани фрагменти од егзоните 5 - 9 од p53 генот. За одредување на нивото на експресија на bcl-2 и EGFR се користеше Real – time PCR анализа користејќи прајмери и проби од базата на Applied Biosystems. Нивото на секој од испитуваните транскрипти се споредуваше помеѓу здрава слузница и тумор по нормализирање со интерен стандарден транскрипти (актин за bcl-2 и EGFR).

Сите групи со клиничко-патолошки карактеристики понатаму беа статистички анализирани во однос на промените на p53, Bcl-2, EGFR, HPV, LOH и MSI.

Во текот на истражувањето утврдивме мутација на генот *TP53* кај повеќе од 2/3 (69%) од оралните карциноми. Не пронајдовме мутација на генот *EGFR* во оралниот карцином кај ниту еден испитаник.

Кај истражуваните хромозомски краци утврдивме постоење на LOH кај 92% од испитаниците. Не утврдивме постоење на MSI. Најголема застапеност на LOH кај оралниот карцином утврдивме на Ch9p (75.7%) и на Ch3p (70.3%).

Утврдивме позитивна сигнификантна корелација помеѓу загубата на хетерозиготност на краткиот крак на 3-от хромозом и стадиумите на оралниот карцином.

Кај нашите испитаници ретки се промените во експресијата на EGFR и Bcl-2 кај оралниот карцином.

Во нашата студија утврдивме сигнификантна асоцијација помеѓу:

- LOH на Ch9p и регионалните лимфни јазли.
- експресијата на BCL2 и клеточната диференцијација
- LOH на Ch3p и мутацијата на генот *TP53*.

Пронајдовме дека сигнификантни предиктори за појава на метастази кај орален карцином се постоење на LOH на 9p и постоење на мутација на генот *TP53* – првиот предиктор за 11 пати а вториот за 14 пати го зголемуваат ризикот за појава на метастази.

Во нашето истражување не пронајдовме присуство на ХПВ ДНК во оралниот карцином кај ниту еден испитаник.

Развојниот пат на канцерогенезата на оралниот карцином кај нашите испитаници:

- не вклучува мутации на *EGFR* и *HPV*
- најчесто е резултат на мутации на *TP53*
- вклучува доминантно тумор супресорски гени
- пратена е со драстична хромозомска нестабилност

Клучни зборови: орален карцином, *TP53*, *EGFR*, *Bcl-2*, *HPV*, *LOH*, *MSI*.

8. SUMMARY

When one refers to an "oral cancer", it usually means a squamous cell carcinoma with an intra oral localization. The most frequent site in the tongue and the floor of the mouth. It is by far the most frequently encountered head and neck malignancy. The global incidence shows significant variations due to socio-economic and geographic aspects. The ratio of men to women is approximately 1,8:1 worldwide, mid age range being the 7-th decade. Five year survival is less than 50 %.

Risk factors for oral cancer:

1. Tobacco (smoking), especially if combined with alcohol use (abuse)
2. Viruses – HPV (Human Papillomavirus)

Carcinogenesis is a multistep process, beginning with initiation, then promotion and progression, as a consequence of accumulated number of successive generic changes in the epithelial cell, believed to be between 6 and 10. This is a long-term development, thought to necessitate several years for clinical abnormalities to appear.

Etiology and pathogenesis of oral cancer is not fully understood, and discoveries about molecular markers tale those for most other cancers (breast, colon). The wish for broadening the understanding of molecular markers in oral cancer, as well as their connection with the parameters relevant to the surgical planning, gave us this set of aims (made us set the following sims/goals) :

1. To determine the presence of HPV in oral cancers, as well as the most frequent type/s
2. To investigate:
 - Changes (mutations) in p53 and EGFR in oral cancer
 - Changes in expression of p53, bcl-2, EGFR and the dissbalance in a set of microsatellite markers in oral cancer,
all in relation to unchanged mucosa
3. To analyze the correlation between changes in p53, bcl-2, EGFR and microsatellite markers, with clinical and histo-pathological parameters in oral cancer

4. To determine which of the markers on its own, or combined, have prognostic value in oral cancer

We conducted a prospective study in 37 patients with oral cancer who were treated operatively. At surgery, four specimens of biological material were obtained from each patient:

1. Surgically removed tissue (tumor) for histo-pathological verification
2. Tumor tissue (~5mm³) for molecular analyses
3. Healthy mucosa (~5mm³) for molecular analyses
4. Peripheral blood, obtained in vacutainer vials with EDTA as an anticoagulant (3ml) for molecular analyses.

The data base for clinical and pathological parameters consisted of: the size of the primary tumor, the presence/absence of regional neck lymphatic metastases, stage of the disease, cellular differentiation of the tumor, localization of the primary, status of patient, survival time after treatment, smoking, sex and age.

DNA and RNA were isolated from fresh tumor tissue, healthy mucosa, leucocytes from the blood in all patients, using commercial QIAGEN kits. We analyzed microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) in 9 chromosome arms 3p, 7q, 8p, 9q, 11p, 13q, 17p and 18q, using fluorescent multiplex PCR and capillary electrophoresis in an automated DNA analyzer. For determination of the mutations in EGFR and p53, we used a method of direct sequencing of PCR-amplified fragments of exons 5-9 from the p53 gene. For the level of expression of bcl-2 and EGFR, we used real-time PCR analysis, using primers and tests from the base of Applied Biosystems. The level of each of examined transcripts was compared to the one of healthy mucosa, after normalization with an internal standard transcript (actin for bcl-2 and EGFR).

All groups of clinical and pathological characteristics were further statistically analyzed with regards to the changes in p53, bcl-2, EGFR, HPV, LOH and MSI.

Mutation of p53 gene was found in more than 2/3 of the oral cancers (69%). No mutations were found in EGFR gene in any of the patients.

The examined chromosome arms, revealed presence of LOH in 92% of the patients. We did not find presence of MSI. Greatest presence of LOH in oral cancers was found on Ch9p (75,7%) and on Ch3p (70,3%).

We established a significant positive correlation between LOH on 3p and stages of oral cancer.

Changes in expression of EGFR and Bcl-2 were rare in our patients with oral cancer.

We established a significant association – dependence between:

- LOH on Ch9p and presence of lymph node metastases
- Expression of Bcl-2 and cellular differentiation
- LOH on Ch3P and mutation of TP53 gene

We found that presence of LOH on 9p and mutation of TP53 gene are significant predictors for presence of metastases in oral cancer, the first one 11 fold, while the second showed 14 fold increase of the risk for development of cervical lymph node metastases.

In our research, no presence of HPV was found in any of the examinees.

The development of carcinogenesis in our patients:

- Does not include mutation in EGFR and presence of HPV
- Most frequently is a result of mutation in TP53
- Includes predominantly tumor suppressor genes
- Is followed with a drastic chromosome instability

Key words: oral cancer, TP53, EGFR, Bcl-2, HPV, LOH, MSI.

9. ЛИТЕРАТУРА

1. Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis*. 2002 Apr;23(4):541-7.
2. Al-Rajhi N, Khafaga Y, El-Husseiny J, et al. Early stage carcinoma of oral tongue: prognostic factors for local control and survival. *Oral Oncol*. 2000; 36: 508-514.
3. Alsner J, Sørensen SB, Overgaard J. TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol*. 2001 May;59(2):179-85.
4. Arai K, Shibahara T, Yamamoto N, Noma H. The presence of candidate tumor suppressor gene loci at chromosome 3p for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2002 Dec;38(8):763-71.
5. Arya S, Chaukar D, Pai. Imaging in oral cancers. *Indian J Radiol Imaging*. 2012 Jul-Sep; 22(3): 195-208.
6. Asakawa T, Esuhi M, Endo S, Kida A, Ikeda M. Tongue cancer patients have a high frequency of allelic loss at the von Hippel-Lindau gene and other loci on 3p. *Cancer*. 2008 Feb 1;112(3):527-34.
7. Atula S, Kurvinen K, Grénman R, Syrjänen S. SSCP pattern indicative for p53 mutation is related to advanced stage and high-grade of tongue Cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996 Jul;32B(4):222-9.
8. Bagan JV, Mata-Roig M, Cortio-Gimeno J, Murillo-Cortes J, Hens-Aumente E, Poveda-Roda R, Bagan L. Epidermal growth factor receptor copy number in potentially malignant oral disorders and oral squamous cell carcinoma: a short communication and preliminary study. *J Oral Pathol Med*. 2012 Oct;41(9):662-6.
9. Bazan V, Zanna I, Migliavacca M, Sanz-Casla MT, Maestro ML, Corsale S, Macaluso M, Dardanoni G, Restivo S, Quintela PL, Bernaldez R, Salerno S, Morello V, Tomasino RM, Gebbia N, Russo A. Prognostic significance of p16INK4a alterations and 9p21 loss of heterozygosity in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol*. 2002 Sep;192(3):286-93.
10. Beder LB, Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, Gunduz E, Ito S, Sakai A, Nagai N, Nishizaki K, Shimizu K. Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinomas. *Lab Invest*. 2003 Jan;83(1):99-105.
11. Bergler W, Bier H, Ganzer U. The expression of epidermal growth factor receptors in the oral mucosa of patients with oral cancer. *Arch Otorhinolaryngol*. 1989;246(3):121-5.

- 12.** Bernardes VF, Gleber-Netto FO, Sousa SF, Silva TA, Aguiar MC. Clinical significance of EGFR, Her-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: a case control study. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010 Apr 29;29:40.
- 13.** Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research* 1988;48:3282-3287.
- 14.** Bockmühl U, Schwendel A, Dietel M, Petersen I. Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 1996 Dec 1;56(23):5325-9.
- 15.** Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoli E, Danassis-Afentaki D, Foukas P, Kyroudi A, Laskaris G, Herrington CS, Kittas C. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol.* 2000 Jun;13(6):644-53.
- 16.** Braakhuis BJM, Snijders PJF, Keune W-JH, Meijer CJLM, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Genetic Patterns in Head and Neck Cancers That Contain or Lack Transcriptionally Active Human Papillomavirus. *Journal of the National Cancer Institute*, July 2004, Vol. 96, No.13;998-1006.
- 17.** Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 1995 Mar 16;332(11):712-7.
- 18.** Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine.* 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/52-61.
- 19.** Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983; 305:779–84.
- 20.** Chandarana SP, Lee JS, Chanowski EJ, Sacco AG, Bradford CR, Wolf GT, Prince ME, Moyer JS, Eisbruch A, Worden FP, Giordano TJ, Kumar B, Cordell KG, Carey TE, Chepeha DB. Prevalence and predictive role of p16 and epidermal growth factor receptor in surgically treated oropharyngeal and oral cavity cancer. *Head Neck.* 2013 Aug;35(8):1083-90.
- 21.** Chandran R, Laloo R, Myburgh NG, Chandran TM. Risk of intraoral cancer associated with tobacco and alcohol—a case-control study. *SADJ.* 2005 Sep;60(8):326-8.
- 22.** Chaves AC, Cherubini K, Herter N, Furian R, Santos DS, Squier C, Domann FE. Characterization of p53 gene mutations in a Brazilian population with oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol.* 2004 Feb;24(2):295-303.
- 23.** Chial H. Tumor suppressor (TS) genes and the two-hit hypothesis. *Write Science Right © 2008 Nature Education* 1(1):177

- 24.** Chiang WF, Liu SY, Yen CY, Lin CN, Chen YC, Lin SC, Chahg KW. Association of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number amplification with neck lymph node metastasis in areca-associated oral carcinomas. *Oral Oncol.* 2008 Mar;44(3):270-6.
- 25.** Chiba I, Muthumala M, Yamazaki Y, Uz Zaman A, Iizuka T, Amemiya A, Shibata T, Kashiwazaki H, Sugiura C, Fukuda H. Characteristics of mutations in the p53 gene of oral squamous-cell carcinomas associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. *Int J Cancer.* 1998 Sep 11;77(6):839-42.
- 26.** Choi HR, Roberts DB, Johnigan RH, Sturgis EM, Rosenthal DI, Weber RS, Luna MA, Batsakis JG, El-Naggar AK. Molecular and clinicopathologic comparisons of head and neck squamous carcinoma variants: common and distinctive features of biological significance. *Am J Surg Pathol.* 2004 Oct;28(10):1299-310.
- 27.** Choi SY, Kahyo H. Effect of cigarette smoking and alcohol consumption in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *Int J Epidemiol.* 1991 Dec;20(4):878-85.
- 28.** Christian Schlötterer, Bettina Harr. Microsatellite Instability. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001 Nature Publishing Group / .*
- 29.** Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003 Nov 24;22(53):8590-607.
- 30.** Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2010 Aug;57(2):304-16
- 31.** Crook T, Morgenstern JP, Crawford L, Banks L. Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-ras. *EMBO J.* 1989 Feb;8(2):513-9.
- 32.** Cruz I, Snijders J, Van Houten V, Vosjan M, Van der Waal I, Meijer J. Specific p53 immunostaining patterns are associated with smoking habits in patients with oral squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol.* 2002 Nov;55(11):834-40.
- 33.** Dahse R, Fiedler W, von Eggeling F, Schimmel B, Koscielny S, Beleites E, Claussen U, Ernst G. P53 genotyping - an effective concept for molecular testing of head and neck cancer? *Int J Mol Med.* 1999 Sep;4(3):279-83.
- 34.** Dai M, Clifford GM, le Calvez F, Castellsagué X, Snijders PJ, Pawlita M, Herrero R, Hainaut P, Franceschi S; IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. Human papillomavirus type 16 and TP53 mutation in oral cancer: matched analysis of the IARC multicenter study. *Cancer Res.* 2004 Jan 15;64(2):468-71.
- 35.** De Schutter H, Barbé B, Spaepen M, Begg AC, Balm A, Gregoire V, Haustermans K, Mahy P, Vander Poorten V, Nuyts S. Microsatellite alterations

in head and neck squamous cell carcinoma and relation to expression of pimonidazole, CA IX and GLUT-1. *Radiother Oncol.* 2006 Aug;80(2):143-50.

36. De Schutter H, Spaepen M, Van Opstal S, Vander Poorten V, Verbeken E, Nuys S. The prevalence of microsatellite instability in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009 Mar;135(3):485-90.
37. de Vicente JC, Olay S, Lequerica-Fernandez P, Sánchez-Mayoral J, Junquera LM, Fresno MF. Expression of Bcl-2 but not Bax has a prognostic significance in tongue carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2006 Mar;35(3):140-5.
38. Del Sordo R, Angiero F, Bellezza G, Cavaliere A, Mameli MG, Stefani M, Dessy E, Sidoni A. HER family receptors expression in squamous cell carcinoma of the tongue: study of the possible prognostic and biological significance. *J Oral Pathol Med.* 2010 Jan;39(1):79-86.
39. Dijkema IM, Struikmans H, Dullens HF, Kal HB, van der Tweel I, Battermann JJ. Influence of p53 and bcl-2 on proliferative activity and treatment outcome in head and neck cancer patients. *Oral Oncol.* 2000 Jan;36(1):54-60.
40. Diniz-Freitas M, García-Caballero T, Antúnez-López J, Gándara-Rey JM, García-García A. Pharmacodiagnostic evaluation of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2007 May;13(3):285-90.
41. Dragomir LP, Mărgăritescu C, Florescu A, Olimid AD, Dragomir M, Popescu MR. The immunoexpression of EGFR and Her2/neu in oral squamous carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(3):597-601.
42. El Naggar AK, Hurr K, Huff V, Clayman GL, Luna MA, Batsakis JG. Microsatellite instability in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Am J Pathol.* 1996 Jun;148(6):2067-72.
43. El-Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, Luna MA, Goepfert H, Huff V. Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res.* 1995 Jun 15;55(12):2656-9.
44. El-Naggar AK, Hurr K, Huff V, Luna MA, Goepfert H, Batsakis JG. Allelic loss and replication errors at microsatellite loci on chromosome 11p in head and neck squamous carcinoma: association with aggressive biological features. *Clin Cancer Res.* 1996 May;2(5):903-7.
45. Elwood JM, Pearson JCG, Skippen DH, Jackson SM. Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *International Journal of Cancer* 1984;34:603-612.
46. Falaki F, Dalirsani Z, Pakfetrat A, Falaki A, Saghrevanian N, Nosratzehi T, Pazouki M. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: a retrospective study and review of literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 Jul 1;16(4):e473-7.

- 47.** Fasunla AJ, Greene BH, Timmesfeld N, Wiegand S, Werner JA, Sesterhenn AM. A meta-analysis of the randomized controlled trials on elective neck dissection versus therapeutic neck dissection in oral cavity cancers with clinically node-negative neck. *Oral Oncol.* 2011;47:320–4.
- 48.** Field JK, Kiaris H, Howard P, Vaughan ED, Spandidos DA, and Jones AS. Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer.* May 1995; 71(5): 1065–1069.
- 49.** Field JK, Kiaris H, Risk JM, Tsiriyotis C, Adamson R, Zoumpourlis V, Rowley H, Taylor K, Whittaker J, Howard P, et al. Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. *Br J Cancer.* 1995 Nov;72(5):1180-8.
- 50.** Fonseca R. Oral and maxillofacial surgery. W.B. Saunders Co, Juli 2001, Vol.5:165-175.
- 51.** Fossion E, De Coster D, Ehlinger P. Oral cancer: epidemiology and prognosis. *Rev Belge Med Dent.* 1994;49(1):9-11
- 52.** Franceschi S, Talameni R, Barra S, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx and esophagus in Northern Italy. *Cancer Research* 1990; 50:6502-7.
- 53.** Friedman M, Lim JW, Manders E, Schaffner AD, Kirshenbaum GL, Tanyeri HM, Caldarelli DD, Coon JS. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2001 Apr;23(4):280-5.
- 54.** Gan LL, Zhang H, Guo JH, Fan MW. Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Oral Squamous Cell Carcinoma: a Case-control Study in Wuhan, China. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(14):5861-5.
- 55.** Gao S, Krogdahl A, Eiberg H, Liu CJ, Sørensen JA. LOH at chromosome 9q34.3 and the Notch1 gene methylation are less involved in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2007 Mar;36(3):173-6.
- 56.** García-Montesinos-Perea B, Val-Bernal JF, Saiz-Bustillo R. Epidermoid carcinoma of the lip: an immunohistochemical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005 Nov-Dec;10(5):454-61
- 57.** Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709–20.
- 58.** Gillison ML, Shah KV. Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):57-65.
- 59.** Glavac D, Volavsek M, Potocnik U, Ravnik-Glavac M, Gale N. Low microsatellite instability and high loss of heterozygosity rates indicate dominant

role of the suppressor pathway in squamous cell carcinoma of head and neck and loss of heterozygosity of 11q14.3 correlates with tumor grade. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 Oct 1;146(1):27-32.

60. Golusinski P, Lamperska K, Pazdrowski J, Golusinski W. Analysis of mutations within the TP53 gene in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Pol.* 2011 Mar-Apr;65(2):114-21.
61. Greenberg JS, El Naggar AK, Mo V, Roberts D, Myers JN. Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making. *Cancer.* 2003; 98: 508-515.
62. Gross AM, Orosco RK, Shen JP, Egloff AM, Carter H, Hofree M, Choueiri M, Coffey CS, Lippman SM, Hayes DN, Cohen EE, Grandis JR, Nguyen QT, Ideker T. Multi-tiered genomic analysis of head and neck cancer ties TP53 mutation to 3p loss. *Nat Genet.* 2014 Aug 3.
63. Guo-Min Li. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research* (2008) 18:85–98.
64. Gupta PC, Murti PR, Bhonsle RB. Epidemiology of cancer by tobacco products and the significance of TSNA. International Cancer Congress N°15, Hamburg, ALLEMAGNE, 1996, vol. 26, n° 2 (81 ref.):183-198.
65. Ha PK, Pilkington TA, Westra WH, Sciubba J, Sidransky D, Califano JA. Progression of microsatellite instability from premalignant lesions to tumors of the head and neck. *Int J Cancer.* 2002 Dec 20;102(6):615-7.
66. Hanabata Y, Nakajima Y, Morita K, Kayamori K, Omura K. Coexpression of SGLT1 and EGFR is associated with tumor differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Odontology.* 2012 Jul;100(2):156-63.
67. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pihtos J, Fernández L, Idris A, Sánchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJF, Meijer CJLM, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 2003, Vol. 95, No. 23:1772-1783.
68. Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2006;12(2):87-91.
69. Hoffman DD, Hecht SS. Advances in tobacco carcinogenesis. In: Cooper CS, Grover P. (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol.94/1; Heidelberg (Germany); 1990; Springer Verlag: 63-102.
70. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991;253(5015):49–53

71. Hsieh LL, Wang PF, Chen IH, Liao CT, Wang HM, Chen MC, Chang JT, Cheng AJ. Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese. *Carcinogenesis*. 2001 Sep;22(9):1497-503.
72. <<http://www.genecards.org/>>, доступно на 08.07.2014 г.
73. <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/EGFR>>, доступно на 02.08.2014 г.
74. <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>>, доступно на 27.06.2014 г.
75. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1986/cohen-lecture.html>, доступно на 04.03.2014 г.
76. Huang SF, Chen IH, Liao CT, Wang HM, Liou SH, Hsieh LL. Combined effects of MDM2 SNP 309 and p53 mutation on oral squamous cell carcinomas associated with areca quid chewing.
77. Huang SF, Chuang WY, Chen IH, Liao CT, Wang HM, Hsieh LL. EGFR protein overexpression and mutation in areca quid-associated oral cavity squamous cell carcinoma in Taiwan. *Head Neck*. 2009 Aug;31(8):1068-77.
78. Huang SH, Hwang D, Lockwood G, Goldstein DP, O'Sullivan B. Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity: a meta-analysis of reported studies. *Cancer*. 2009 Apr 1;115(7):1489-97.
79. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2011;61:69–90
80. Jin YT, Myers J, Tsai ST, Goepfert H, Batsakis JG, el-Naggar AK. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma of young adults. *Oral Oncol*. 1999 May;35(3):251-6.
81. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J. Dent. Educ.* 2001;65:328–339.
82. Jordan RC, Catzavelos GC, Barrett AW, Speight PM. Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996 Nov;32B(6):394-400.
83. Kabat GC, Wynder EL. Type of alcoholic beverage and oral cancer. *Int J Cancer* 1989;43:190-4.
84. Kabsch K & Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol*, 2002, 76: 12162–12172.
85. Kannan K, Latha PN, Shanmugam G. Expression of bcl-2 oncoprotein in Indian oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 1998 Sep;34(5):373-6.

- 86.** Kannan K, Munirajan AK, Krishnamurthy J, Bhavarahamurthy V, Mohanprasad BK, Panishankar KH, Tsuchida N, Shanmugam G. Low incidence of p53 mutations in betel quid and tobacco chewing-associated oral squamous carcinoma from India. *Int J Oncol*. 1999 Dec;15(6):1133-6.
- 87.** Kashiwazaki H, Tonoki H, Tada M, Chiba I, Shindoh M, Totsuka Y, Iggo R, Moriuchi T. High frequency of p53 mutations in human oral epithelial dysplasia and primary squamous cell carcinoma detected by yeast functional assay. *Oncogene*. 1997 Nov 27;15(22):2667-74.
- 88.** Khawaja MI, Shafiq, Nusrat R, Khawaja MR. Preventing the oral cavity cancer epidemic. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005 Jul-Sep;6(3):420
- 89.** Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68:820-823.
- 90.** Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope*. 1999, Oct;109(10):1544-51.
- 91.** Kouvousi M, Xesfyngi D, Tsimplaki E, Argyri E, Ioannidou G, Ploxorou M, Lazaris AC, Patsouris E, Panotopoulou E. Prevalence of human papillomavirus in 45 greek patients with oral cancer. *J Oncol*. 2013;2013:756510.
- 92.** Koy S, Plaschke J, Luksch H, Friedrich K, Kuhlisch E, Eckelt U, Martinez R. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2008 Aug;30(8):1105-13.
- 93.** Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, 14(2):467-475.
- 94.** Kristen M. Drescher, Poonam Sharma, Henry T. Lynch. Current Hypotheses on How Microsatellite Instability Leads to Enhanced Survival of Lynch Syndrome Patients. *Journal of Immunology Research*. Volume 2010 (2010), Article ID 170432, 13 pages.
- 95.** Kumar V., Abbas A., Aster J. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th ed. Elsevier/Saunders, Philadelphia, 2014.
- 96.** Kummoona R, Mohammad Sámi S, Al-Kapitan I, Al-Muala H. Study of antiapoptotic gene of oral carcinoma by using Bcl-2 oncogene. *J Oral Pathol Med*. 2008 Jul;37(6):345-51.
- 97.** Kuo MY, Huang JS, Hsu HC, Chiang CP, Kok SH, Kuo YS, Hong CY. Infrequent p53 mutations in patients with areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med*. 1999 May;28(5):221-5.
- 98.** Laimer K, Spizzo G, Gastl G, Obrist P, Brunhuber T, Fong D, Barbieri V, Jank S, Doppler W, Rasse M, Norer B. High EGFR expression predicts poor prognosis

- in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol.* 2007 Feb;43(2):193-8.
99. Lazarus P, Stern J, Zwiebel N, Fair A, Richie JP Jr, Schantz S. Relationship between p53 mutation incidence in oral cavity squamous cell carcinomas and patient tobacco use. *Carcinogenesis.* 1996 Apr;17(4):733-9.
100. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011 Jan;11(1):9-22.
101. Lemos-González Y, Páez de la Cadena M, Rodríguez-Berrocal FJ, Rodríguez-Piñeiro AM, Pallas E, Valverde D. Absence of activating mutations in the EGFR kinase domain in Spanish head and neck cancer patients. *Tumour Biol.* 2007;28(5):273-9. Epub 2007 Oct 26.
102. Levine AJ. Tumor suppressor genes. *Bioessays.* 1990 Feb;12(2):60-6.
103. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7621-36.
104. Leyva-Huerta ER, Ledesma-Montes C, Rojo-Botello RE, Vega-Memije E. P53 and bcl-2 immunoexpression in patients with oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012 Sep 1;17(5):e745-50.
105. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, Perez-Ordonez B, Jordan RC, Gillison ML. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2013 Jan;49(1):1-8.
106. Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ.* 1994 Apr;5(4):411-7.
107. Lo Muzio L, Mignogna MD, Pannone G, Rubini C, Grassi R, Nocini PF, Ferrari F, Setpico R, Favia G, De Rosa G, Maiorano E. Expression of bcl-2 in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of 90 cases with clinico-pathological correlations. *Oncol Rep.* 2003 Mar-Apr;10(2):285-91
108. Loeffler-Ragg J, Witsch-Baumgartner M, Tzankov A, Hilbe W, Schwentner I, Sprinzl GM, Utermann G, Zwietzina H. Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2006 Jan;42(1):109-11.
109. Loncarević S, Vignjević S, Jović N, Aćimović L, Gardasević M, Todorović V, Dimitrijević J.. Significance of pathohistological findings and the expression of Bcl-2 in diagnosis and treatment of oral planocellular carcinoma. *Vojnosanit Pregl.* 2012 Apr;69(4):314-9

- 110.** Lydiatt WM, Davidson BJ, Schantz SP, Caruana S, Chaganti RS. 9p21 deletion correlates with recurrence in head and neck cancer. *Head Neck* 1998; 20: 113–118.
- 111.** Manisha Tijare, Vidhi Mathur. Genomic instability in Oral Cancer: An update and Review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF DENTAL CLINICS* 2011;3(2): 65-67
- 112.** Matsuura K, Shiga K, Yokoyama J, Saijo S, Miyagi T, Takasaka T. Loss of heterozygosity of chromosome 9p21 and 7q31 is correlated with high incidence of recurrent tumor in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1998; 18: 453–458.
- 113.** Matsuura K, Shiga K, Yokoyama J, Tateda M, Nakano H, Saijo S, Takasaka T. Loss of heterozygosity of 3p21 and 9p21 in head and neck squamous cell carcinomas and its prognostic implication. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 1999 May;102(5):613-21.
- 114.** Mendelsohn J., Howley P.M., Israel M.A., Gray J.W., Thompson C.B. THE MOLECULAR BASIS OF CANCER 4th ed. Elsevier/Saunders, Philadelphia, 2014.
- 115.** Merletti F, Boffetta P, Ciccone G, Mashberg A, Terracini B. Role of tobacco and alcoholic beverages in the aetiology of cancer of the oral cavity/oropharynx in Torino, Italy. *Cancer Res* 1989;49:4919-24.
- 116.** Miracca EC, Kowalski LP, Nagai MA. High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumours. *Br J Cancer*. 1999 Oct;81(4):677-83.
- 117.** Miracca EC, Yamamoto L, Contado D, de Souza Silva Takimoto M, Kowalski LP, Nagai MA. Distinct chromosomal deleted regions defining different subsets of head and neck tumors. *Diagn Mol Pathol*. 2000 Dec;9(4):229-33.
- 118.** Mitra S, Banerjee S, Misra C, Singh RK, Roy A, Sengupta A, Panda CK, Roychoudhury S. Interplay between human papilloma virus infection and p53 gene alterations in head and neck squamous cell carcinoma of an Indian patient population. *J Clin Pathol*. 2007 Sep;60(9):1040-7. Epub 2006 Nov 1.
- 119.** Miyashita T1, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Lieberman DA, Hoffmann B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994 Jun;9(6):1799-805.
- 120.** Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res*. 2003 Dec;1(14):1001-8.
- 121.** Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Møller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001 Apr 12;344(15):1125-31.

- 122.** Murali A, Sailsree R, Sebastian P, Rejnish Kumar R, Varghese BT, Kannan S. Loss of heterozygosity of D9S162: molecular predictor for treatment response in oral carcinoma. *Oral Oncol.* 2011 Jul;47(7):571-6.
- 123.** Na II, Kang HJ, Cho SY, Koh JS, Lee JK, Lee BC, Lee GH, Lee YS, Yoo HJ, Ryoo BY, Yang SH, Shim YS. EGFR mutations and HPVs in squamous cell carcinoma of tongue and tonsil. *Eur J Cancer.* 2007 Feb;43(3):520-6.
- 124.** Nagai MA, Miracca EC, Yamamoto L, Kowalski LP, Brentani RR. TP53 mutations in upper aerodigestive squamous cell carcinomas from a group of Brazilian patients. *Am J Surg.* 1995 Nov;170(5):492-4.
- 125.** Nair UJ, Friesen M, Richard I, MacClennan R, Thomas S, Baitsch H. Effect of lime composition on the formation of reactive oxygen species from the areca nut extract in vitro. *Carcinogenesis* 1990;11:2145-2148.
- 126.** Nawroz H, van der Riet P, Hruban RH, Koch W, Ruppert JM, Sidransky D. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1994 Mar 1;54(5):1152-5.
- 127.** Ndiaye C, Alemany L, Diop Y, Ndiaye N, Diémé MJ, Tous S, Klaustermeier JE, Alejo M, Castellsagué X, Bosch FX, Trottier H, Sahjosé Sd. The role of human papillomavirus in head and neck in Senegal. *Infect Agent Cancer.* 2013 Apr 17;8(1):14.
- 128.** Ng IO, Xiao L, Lam KY, Yuen PW, Ng M. Microsatellite alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck - clustering of loss of heterozygosity in a distinct subset. *Oral Oncol.* 2000 Sep;36(5):484-90.
- 129.** Nylander K, Schildt EB, Eriksson M, Magnusson A, Mehle C, Roos G. A non-random deletion in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 1996 Jun;73(11):1381-6.
- 130.** Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, H.A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signalling. *Mol Syst Biol.* 2005; 1: 2005.0010.
- 131.** Ogawara K, Miyakawa A, Shiba M, Uzawa K, Watanabe T, Wang XL, Sato T, Kubosawa H, Kondo Y, Tanzawa H. Allelic loss of chromosome 13q14.3 in human oral cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer.* 1998 Aug 21;79(4):312-7.
- 132.** Ongkeko WM, Altuna X, Weisman RA, Wang-Rodriguez J. Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2005 Jul;124(1):71-6.
- 133.** Ostwald C, Gogacz P, Hillmann T, Schweder J, Gundlach K, Kundt G, Barten M. P53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. *Int J Cancer.* 2000 Oct 1;88(1):82-6.

- 134.** Park BZ, Kohn WG, Malvitz DM. Preventing and controlling oral and pharyngeal cancer - recommendations from a national strategic planning conference. *Morbidity & Mortality Weekly Report* 1998;47:1-12.
- 135.** Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:98.
- 136.** Partridge M, Emilion G, Langdon JD. LOH at 3p correlates with a poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1996 Feb;73(3):366-71.
- 137.** Paterson IC, Eveson JW, Prime SS. Molecular changes in oral cancer may reflect aetiology and ethnic origin. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996 May;32B(3):150-3.
- 138.** Pathare SM, Gerstung M, Beerenswinkel N, Schäffer AA, Kannan S, Pai P, Pathak KA, Borges AM, Mahimkar MB. Clinicopathological and prognostic implications of genetic alterations in oral cancers. *Oncol Lett*. 2011 May;2(3):445-451.
- 139.** Pearlstein RP¹, Benninger MS, Carey TE, Zarbo RJ, Torres FX, Rybicki BA, Dyke DL. Loss of 18q predicts poor survival of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998 Apr;21(4):333-9.
- 140.** Perisanidis C, Wrba F, Brandstetter A, Kornek G, Mitchell D, Seemann R, Selzer E, Ewers R, Filipits M. Impact of epidermal growth factor receptor, mesenchymal-epithelial transition factor, and insulin-like growth factor receptor 1 expression on survival of patients with oral and oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Apr;51(3):234-40.
- 141.** Petrović B, Perović M, Novaković I, Atanacković J, Popović B, Luković L, Petković Š. Analysis of loss of heterozygosity of the tumor suppressor genes p53 and BRCA1 in ovarian carcinomas. *Vojnosanit Pregl*. 2006 Sep;63(9):813-8.
- 142.** Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002 Oct 21;21(48):7435-51.
- 143.** Piccinin S, Gasparotto D, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S, Maestro R, Boiocchi M. Microsatellite instability in squamous cell carcinomas of the head and neck related to field cancerization phenomena. *Br J Cancer*. 1998 Nov;78(9):1147-51.
- 144.** Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2007 Dec 20;357(25):2552-61.
- 145.** Popović B, Jekić B, Novaković I, Milašin J. Analysis of the anti-apoptotic protein bcl-2 in oral squamous cell carcinoma. *Serbian Dental J*, 2007, 54:153-9

- 146.** Putti TC, To KF, Hsu HC, Chan AT, Lai GM, Tse G, Lee YS, Whang-Peng J, Millward M, Lin L, Lin X, Lee CS. Expression of epidermal growth factor receptor in head and neck cancers correlates with clinical progression: a multicentre immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. *Histopathology*. 2002 Aug;41(2):144-51.
- 147.** Quintero K, Giraldo GA, Uribe ML, Baena A, Lopez C, Alvarez E, Sanchez GI. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013 May-Jun;79(3):375-81.
- 148.** Rahmani A Alzohairy M, Babiker AY, Rizvi MA, Elkarimahmad HG. Epub 2012 Oct 20. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(9):965-71.
- 149.** Reiter, J. L., Threadgill, D. W., Eley, G. D., Strunk, K. E., Dahlelsen, A. J., Sinclair, C. S., Pearsall, R. S., Green, P. J., Yee, D., Lampland, A. L., Balasubramaniam, S., Crossley, T. D., Magnuson, T. R., James, C. D., Maihle, N. J. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms.. *Genomics*. Jan 2001; 71(1): 1-20.
- 150.** Ricieri Brito JA, Gomes CC, Santos Pimenta FJ, Barbosa AA, Prado MA, Prado VF, Gomez MV, Gomez RS. Reduced expression of mir15a in the blood of patients with oral squamous cell carcinoma is associated with tumor staging. *Exp Ther Med*. 2010 Jan;1(1):217-221.
- 151.** Rivero ER, Nunes FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. *Braz Oral Res*. 2006 Jan-Mar;20(1):21-4. Epub 2006 May 22.
- 152.** Romanitan M, Näsmann A, Ramqvist T, Dahlstrand H, Polykretis L, Vogiatzis P, Vamvakas P, Tasopoulos G, Valavanis C, Arapantoni-Dadioti P, Banis K, Dalianis T. Human papillomavirus frequency in oral and oropharyngeal cancer in Greece. *Anticancer Res*. 2008 Jul-Aug; 28(4B):2077-80.
- 153.** Rössle M, Weber CS, Züllig L, Graf N, Jochum W, Stöckli SJ, Moch H, Huber GF. EGFR expression and copy number changes in low T-stage oral squamous cell carcinomas. *Histopathology*. 2013 Aug;63(2):271-8.
- 154.** Ruggen, Raymond W. *Cancer Biology*, 4th edition. Oxford University Press, Inc., New York; Apr 2007.
- 155.** Ruffolo RR, Poste G, Metcalf WB (eds). *Cell Cycle Regulation, New Horizons in Therapeutics (Book 1)*. Harwood Academic Publishers; CRC Press; Dec,1997:151-63
- 156.** Rushatamukayanunt P, Morita K, Matsukawa S, Harada H, Shimamoto H, Tomioka H, Omura K. Lack of association between high-risk human papillomaviruses and oralsquamous cell carcinoma in young Japanese patients. *Asian Pac J Cancer Prev*; 2014, 15(10): 4135-41.

- 157.** Rybicki BA, Savera AT, Gomez JA, Patel SC, Ballard NE, Benninger MS, Zarbo RJ, Van Dyke DL. Allelic loss and tumor pathology in head and neck squamous cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2003 Oct;16(10):970-9.
- 158.** Sabbir MG, Roy A, Mandal S, Dam A, Roychoudhury S, Panda CK. Deletion mapping of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients: correlation with prognosis of the tumour. *Int J Exp Pathol.* 2006 Apr;87(2):151-61.
- 159.** Sahoo R, Chittibabu V, Patil G, Rao S, Thakur S, Dhondalay G, Kulkarni AJ, Banerjee A, Ajaikumar BS, Korlimarla A, Nargund A, Niti RN, Gopinath KS, Prabhudesai S, Raghavendra RM. Relationship between molecular markers and treatment response in a retrospective cohort of Indian patients with primary carcinoma of the larynx. *Oral Oncol.* 2009 Dec;45(12):e216-21.
- 160.** Sang-Hyuk Lee SH, Lee NH, Jin SM, Rho YS, Jo SJ. Loss of heterozygosity of tumor suppressor genes (p16, Rb, E-cadherin, p53) in hypopharynx squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011 Jul;145(1):64-70.
- 161.** Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res.* 1998 Nov-Dec;18(6B):4779-86.
- 162.** Sarkis SA, Abdullah BH, Abdul Majeed BA, Talabani NG. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma in relation to proliferation, apoptosis, angiogenesis and lymphangiogenesis. *Head Neck Oncol.* 2010 Jun 25;2:13.
- 163.** Sasahira T, Kirita T, Kuniyasu H. Update of molecular pathobiology in oral cancer: a review. *Int J Clin Oncol.* 2014 Jun;19(3):431-6.
- 164.** Sauter ER, Ridge JA, Gordon J, Eisenberg BL. p53 overexpression correlates with increased survival in patients with squamous carcinoma of the tongue base. *Am J Surg.* 1992 Dec;164(6):651-3.
- 165.** Schneider-Stock R, Mawrin C, Motsch C, Boltze C, Peters B, Hartig R, Buhtz P, Giers A, Rohrbeck A, Freigang B, Roessner A. Retention of the arginine allele in codon 72 of the p53 gene correlates with poor apoptosis in head and neck cancer. *Am J Pathol.* 2004 Apr;164(4):1233-41.
- 166.** Schöder H, Carlson DL, Kraus DH, Stambuk HE, Gönen M, Erdi YE, Yeung HW, Huvos AG, Shah JP, Larson SM, Wong RJ. 18F-FDG PET/CT for detecting nodal metastases in patients with oral cancer staged N0 by clinical examination and CT/MRI. *J Nucl Med.* 2006 May;47(5):755-62.
- 167.** Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol.* 2002 Apr;38(3):227-34.
- 168.** Scully C, Bedi R. Ethnicity and oral cancer. *Lancet Oncology* 2000; 1:37-42.

- 169.** Seitz O, Chambron-Pinho N, Middendorp M, Sader R, Mack M, Vogl TJ, Bisdas S. 18F-Fluorodeoxyglucose-PET/CT to evaluate tumor, nodal disease, and gross tumor volume of oropharyngeal and oral cavity cancer: comparison with MR imaging and validation with surgical specimen. *Neuroradiology*. 2009 Oct;51(10):677-86.
- 170.** Sheikh Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, Beder LB, Demircan K, Fujii M, Yamanaka N, Shimizu K, Grenman R, Nagai N. Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2008 Aug;99(8):1589-94.
- 171.** Shiga K, Matsuura K, Tateda M, Saijo S, Ogawa T, Miyagi T, Kobayashi T. Allelic loss correlated with tissue specificity in head and neck squamous cell carcinomas and the clinical features of patients. *Tohoku J Exp Med*. 2004 Oct; 204(2):163-72.
- 172.** Shiga K, Ogawa T, Katagiri K, Yoshida F, Tateda M, Matsuura K, Kobayashi T. Differences between oral cancer and cancers of the pharynx and larynx on a molecular level. *Oncol Lett*. 2012 Jan;3(1):238-243.
- 173.** Shiraki M, Odajima T, Ikeda T, Sasaki A, Satoh M, Yamaguchi A, Noguchi M, Nagai I, Hiratsuka H. Combined expression of p53, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor improves estimation of prognosis in curatively resected oral cancer. *Mod Pathol*. 2005 Nov;18(11):1482-9.
- 174.** Silverman S. JR. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. *JADA*, November 2001; Vol.132:9,10.
- 175.** Skotheim RI, Diep CB, Kragerud SM, Jakobsen KS, Lothe RA. Evaluation of loss of heterozygosity/allelic imbalance scoring in tumor DNA. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001 May;127(1):64-70.
- 176.** Solomon MC, Cornelio S, Gudattu V. Molecular analysis of oral squamous cell carcinoma: a tissue microarray study. *Indian J Cancer*. 2010 Apr-Jun;47(2):166-72.
- 177.** Sorensen DM, Lewark TM, Haney JL, Meyers AD, Krause G, Franklin WA. Absence of p53 mutations in squamous carcinomas of the tongue in nonsmoking and nondrinking patients younger than 40 years. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997 May;123(5):503-6.
- 178.** Soussi T & May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol*. 1996; 260: 623-637.
- 179.** Štajner, A. Tumori maksilofacijalnog područja. *Dečje novine* 1988; 272.
- 180.** Stengel KR, Thangavel C, Solomon DA, Angus SP, Zheng Y, Knudsen ES. Retinoblastoma/p107/p130 pocket proteins: protein dynamics and interactions with target gene promoters. *J Biol Chem*. 2009 Jul 17;284(29):19265-71.

- 181.** Stoll C, Barettton G, Ahrens C, Löhrs U. Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2000 Feb;436(2):102-8.
- 182.** Strachan T & Read AP. Human Molecular Genetics, 2nd edition. New York: Wiley-Liss; 1999; Chapter 18: Cancer Genetics.
- 183.** Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S, Reszeć J, Koda M, Baltaziak M, Kańczuga-Koda L. Correlation between Bcl-2 protein expression and some clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma. *Pol J Pathol.* 2003;54(1):49-52
- 184.** Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983 Dec;12(6):418-24.
- 185.** Syrjänen S. Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol.* 2003 Aug;192(3):123-8. Epub 2003 Jan 18.
- 186.** Szymańska K, Levi JE, Menezes A, Wünsch-Filho V, Eluf-Neto J, Koifman S, Matos E, Daudt AW, Curado MP, Villar S, Pawlita M, Waterboer T, Boffetta P, Hainaut P, Brennan P. TP53 and EGFR mutations in combination with lifestyle risk factors in tumors of the upper aerodigestive tract from South America. *Carcinogenesis.* 2010 Jun;31(6):1054-9.
- 187.** Talamini R, Favero A, Franceschi S. Cancer of the Oral Cavity and Pharynx in Nonsmokers Who Drink Alcohol and in Nondrinkers Who Smoke Tobacco. *JNCI J Natl Cancer Inst* (1998) 90(24):1901-3.
- 188.** Tamás L, Szentkuti G, Eros M, Dániel K, Brauswetter D, Szende B, Zsákóvics I, Krenács T. Differential biomarker expression in head and neck cancer correlates with anatomical localization. *Pathol Oncol Res.* 2011 Sep;17(3):721-7.
- 189.** Tang S, Xu D, Zhou B. Analysis of P53 mutation and invasion front grading in oral squamous cell carcinomas. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2010 Aug;30(4):525-9.
- 190.** Tanuma J, Izumo T, Hirano M, Oyazato Y, Hori F, Umemura E, Shisa H, Hiai H, Kitano M. FGFR4 polymorphism, TP53 mutation, and their combinations are prognostic factors for oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2010 Mar;23(3):739-44.
- 191.** Taylor D, Koch WM, Zahurak M, Shah K, Sidransky D, Westra WH. Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. *Hum Pathol.* 1999;30:1221-5.
- 192.** Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa JP, Lee JJ, Mao L. Epidermal growth factor receptor copy number

- alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol.* 2007 Jun 1;25(16):2164-70.
193. Teni T, Pawar S, Sanghvi V, Saranath D. Expression of bcl-2 and bax in chewing tobacco-induced oral cancers and oral lesions from India. *Pathol Oncol Res.* 2002;8(2):109-14.
194. Thomas L, Moore EJ, McGree ME, Olsen KD, Kasperbauer JL, Erickson LA, Schembri-Wismayer DJ. Prognostic features, human papillomavirus status, and epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cell carcinoma in young adults. *Am J Otolaryngol.* 2012 Nov-Dec;33(6):650-6.
195. Thomas S., Brennan J., Martel G., et al. Mutations in the Conserved Regions of p53 Are Infrequent in Betel-associated Oral Cancers from Papua New Guinea. *Cancer Res* 1994;54:3588-3593.
196. Thompson, A. M., Anderson, T. J., Condie, A., Prosser, J., Chetty, U., Carter, D. C., Evans, H. J., and Steel, C. M. p53 allele losses, mutations, and expression in breast cancer and their relationship to clinico-pathological parameters. *Int. J. Cancer,* 50: 528-532, 1992.
197. Tsurusako S, Tanaka H, Hayashi Y, Tohnai I, Ueda M, Ishizaki K. Low incidence of p53 mutations in well-differentiated tongue squamous cell carcinoma in Japan. *Jpn J Clin Oncol.* 2002 Sep;32(9):327-31.
198. Tushar MD, Ramanathan A. Tyrosine 1045 codon mutations in exon 27 of EGFR are infrequent in oral squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(7):4279-82.
199. Ulanovski D, Stern Y, Roizman P, Shpitzer T, Popovtzer A, Feinmesser R. Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue. *Oral Oncol.* 2004 May;40(5):532-7.
200. Uma Devi, P. Basics of carcinogenesis. *Health Administrator* Vol: XVII, Number 1: 16-24.
201. Varley J. M. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum. Mutat.* March 2003.21 (3): 313-20.
202. Vogelstein B, Lane D & Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000; 408: 307-310.
203. Vosoughhosseini S, M Lotfi, Fakhrijou A, Aghbali A, Moradzadeh M, Sina M, Emamverdizadeh P. Analysis of epidermal growth factor receptor in histopathologically tumor-free surgical margins in patients with oral squamous cell carcinoma. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(2), pp. 516-520, 5.
204. Walton MI, Whysong D, O'Connor PM, Hockenberry D, Korsmeyer SJ, Kohn KW. Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993 Apr 15;53(8):1853-61.

- 205.** Warburton G, Nikitakis NG, Roberson P, et al. Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65: 475-484.
- 206.** Weber F, Xu Y, Zhang L, Patocs A, Shen L, Platzer P, Eng C. Microenvironmental genomic alterations and clinicopathological behavior in head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA*. 2007 Jan 10;297(2):187-95.
- 207.** Weinberg, Robert A. *The Biology of Cancer* (2014). Garland Science: 231.
- 208.** West KA, Brognard J, Clark AS, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S, Dennis PA. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest*. 2003; 111: 81-90.
- 209.** Wilson GD, Saunders MI, Dische S, Richman PI, Daley FM, Bentzen SM. bcl-2 expression in head and neck cancer: an enigmatic prognostic marker. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 Feb 1;49(2):435-41.
- 210.** Wong YK, Liu TY, Chang KW, Lin SC, Chao TW, Li PL, Chang CS. p53 alterations in betel quid- and tobacco-associated oral squamous cell carcinomas from Taiwan. *J Oral Pathol Med*. 1998 Jul;27(6):243-8.
- 211.** World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Vol.85. Betel-quid and Areca-nut Chewing and Some Areca-nut-derived Nitrosamines. France. 2005.
- 212.** World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Vol.100B. Biological Agents, Lyon, France, 2012.
- 213.** World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Vol. 90. Human Papillomavirus, Lyon, France, 2007.
- 214.** World Health Organization, International Agency For Research On Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 83. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Lyon, France, 2004.
- 215.** World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol.37. Tobacco Habits Other than Smoking; Betel-Quid and Areca-Nut Chewing; and Some Related Nitrosamines, Lyon, France, 1985
- 216.** World Health Organization, International Agency For Research On Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol.44. Alcohol drinking. Lyon, France, 1988

- 217.** Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, Li L, Katz RL, Hung MC. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res.* 1999 Dec;5(12):4164-74.
- 218.** Xiao L, Ng IO, Luo ZC. Allele-specific chromosome 9p deletion in oral cancer. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2001 Oct;19(5):275-7.
- 219.** Yamamoto N, Kuroiwa T, Katakura A, Shibahara T, Choudhury C. Loss of heterozygosity (LOH) on chromosomes 2q, 3p and 21q in Indian oralsquamous cell carcinoma. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2007 Aug;48(3):109-17.
- 220.** Yamamoto N, Mizoe Je, Numasawa H, Tsujii H, Shibahara T, Noma H. Allelic loss on chromosomes 2q, 3p and 21q: possibly a poor prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2003 Dec;39(8):796-805.
- 221.** Yamazaki Y, Chiba I, Hirai A, Notani K, Kashiwazaki H, Tei K, Totsuka Y, Iizuka T, Kohgo T, Fukuda H. Radioresistance in oral squamous cell carcinoma with p53 DNA contact mutation. *Am J Clin Oncol.* 2003 Oct;26(5):e124-9.
- 222.** Yamazaki Y, Chiba I, Hirai A, Sugiura C, Notani K, Kashiwazaki H, Tei K, Totsuka Y, Fukuda H. Specific p53 mutations predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2003 Feb;39(2):163-9.
- 223.** Yao L, Iwai M, Furuta I. Correlations of bcl-2 and 53 expression with the clinicopathological features in tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 1999 Jan;35(1):56-62.
- 224.** Yuen AP, Lam KY, Choy JT, Ho WK, Wong LY, Wei WI. Clinicopathologic significance of bcl-2 expression in the surgical treatment of oral tongue carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2002 Sep;28(6):667-72

10. СПИСОК НА КРАТЕНКИ

- TP53 (p53) – туморски протеин 53.
- EGFR – рецептор на епидермалниот фактор за раст
- Bcl-2 – Б клеточен лимфом-2
- ХПВ (HPV) – човечки папилома вирус
- LOH – загуба на хетерозиготност
- MSI – микросателитска нестабилност
- Т – големина на тумор
- N – регионални лимфни јазли/регионални метастази
- M – далечни метастази
- S – стадиум (туморски)
- G – хистолошки градус (клеточна диференцијација)
- Ch – хромозом
- q – долг крак на хромозом
- p – краток крак на хромозом
- ДНК – деоксирибонуклеинска киселина
- РНК – рибонуклеинска киселина
- MMR – поправка при несогласување (поправка на ДНК при несогласување на нуклеотидните бази)
- ТСГ – тумор супресорки ген
- PCR – полимераза ланчана реакција
- IARC – меѓународна агенција за истражување на рак (СЗО)

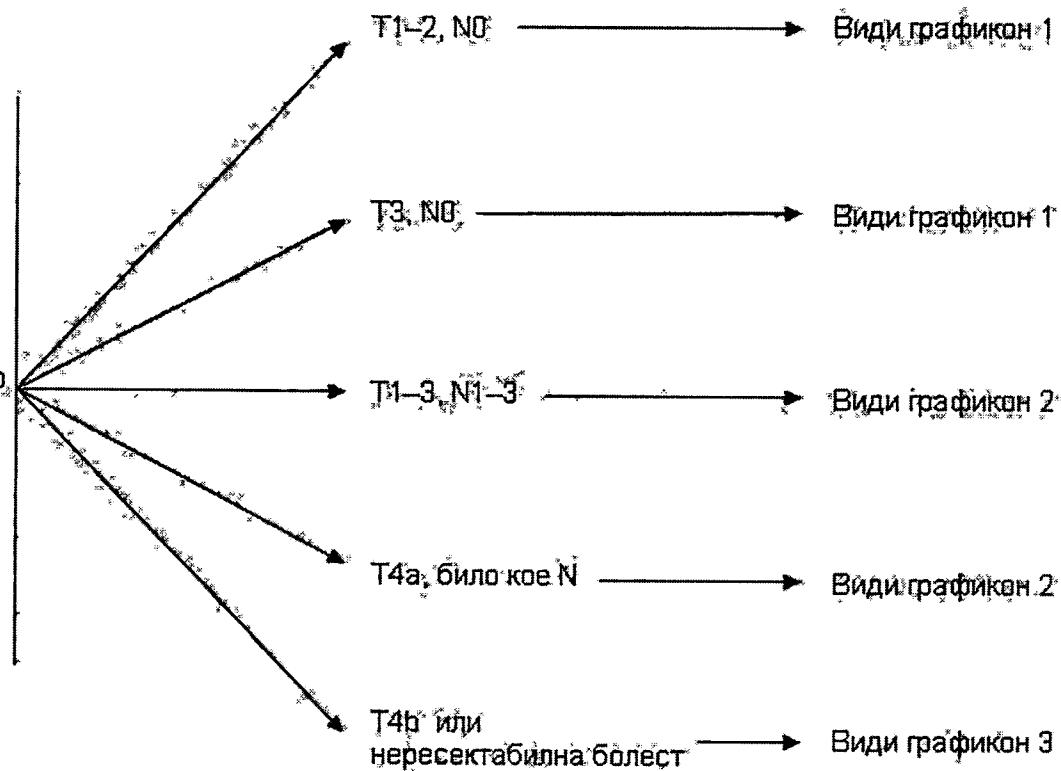
11. ПРИЛОГ

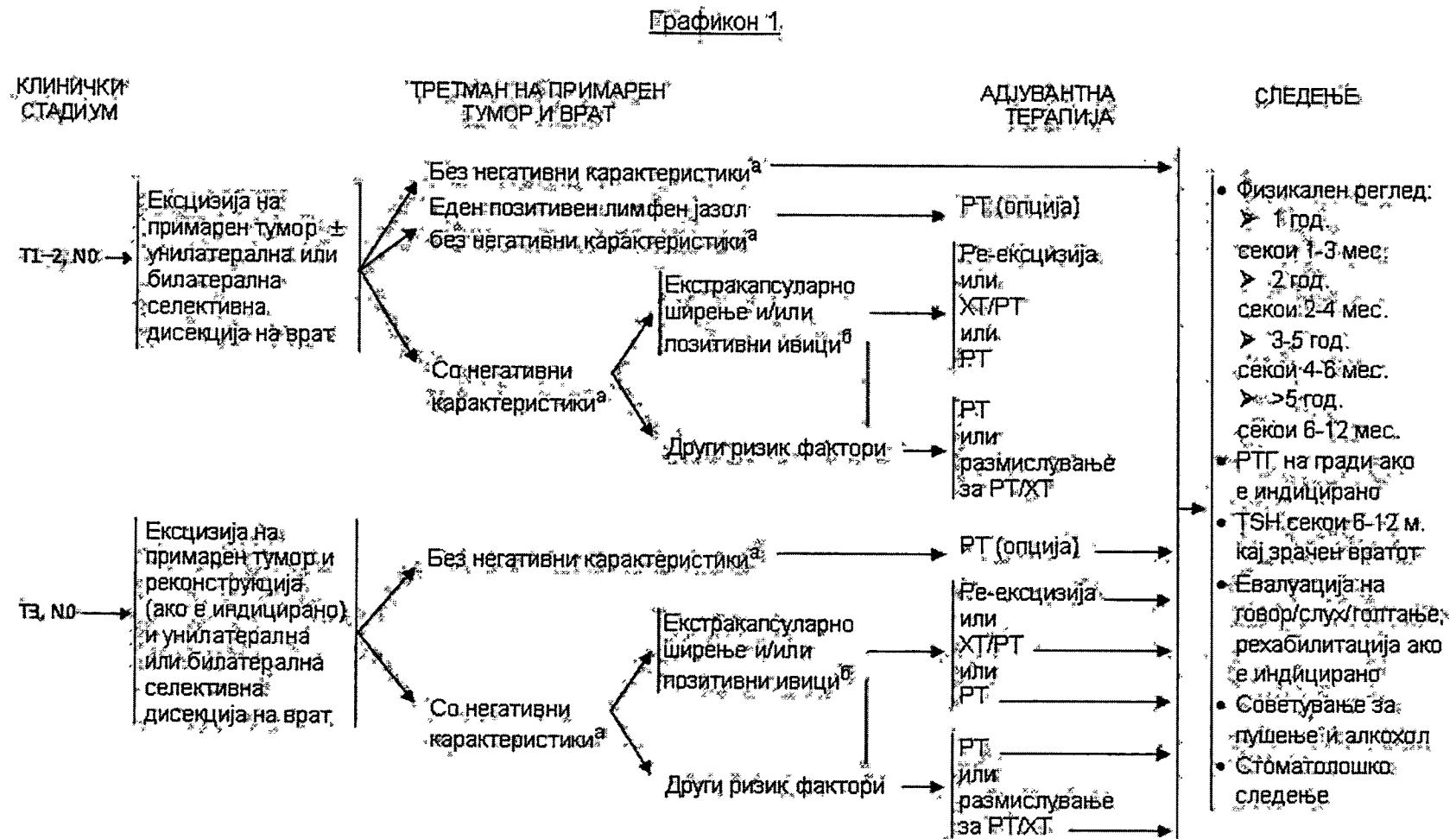
КЛИНИЧКО УПАТСТВО ЗА ХИРУРШКИ ТРЕТМАН НА РАК НА УСНАТА ПРАЗНИНА

ДИАГНОСТИЧКИ ПРОЦЕДУРИ

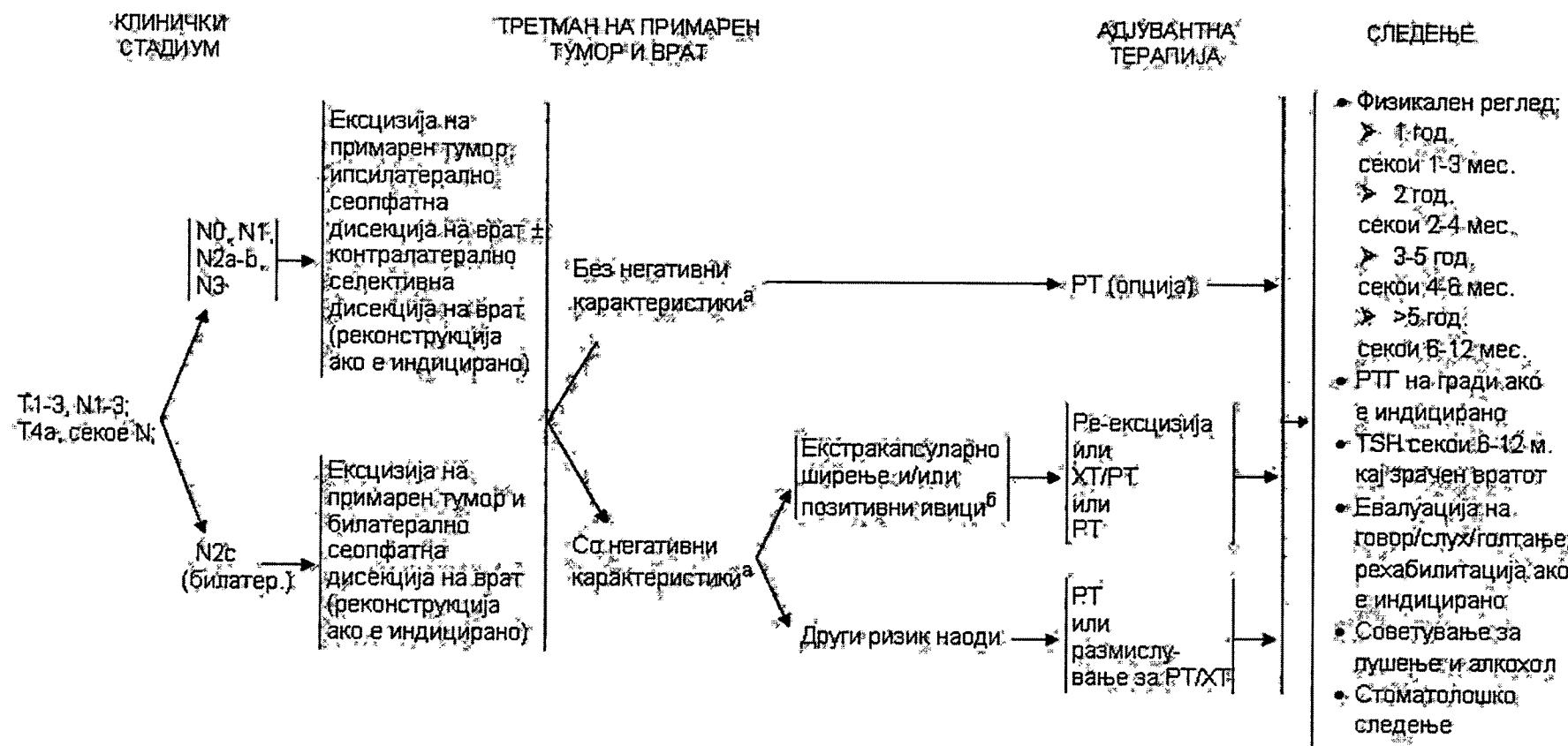
- Аамнеза и физикален преглед
- Биопсија
- Снимање на гради
- КТ/МНР ако е потребно
- Преглед под анестезија ако је потребно
- Преданестетички испитувања
- Процена на забите вклучувајќи Панорамикс ако е потребно
- Мултидисциплинарни консултации ако е потребно

КЛИНИЧКИ СТАДИУМ





Графикон 2



^a Ризик фактори: екстракапсуларно ширење од лимфни јазли, позитивни ивици, рT3 или рT4 примарен тумор, N₂ или N₃ лимфни јазли; зафатени лимфни јазли од IV или V ниво, перинеурална инвазија, васкуларен емболизам.

^b Само за позитивни ивици, ре-ексцизија ако технички е можна.

Графикон 3

КЛИНИЧКИ СТАДИУМ

ТРЕТМАН НА ПРИМАРЕН
ТУМОР И ВРАТ

T4b: билоков N,
или
нересектабилен N+;
Ново дијагностициран
нересектабилен (M0)

Клинички студии

Стандардна терапија

