

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET**

Dragan M. Stanimirović

**”UDRUŽENOST POLIMORFIZMA GENA TLRs  
2,3,4 i CD14 KOD BOLESNIKA SA ORALNIM  
LIHEN PLANUSOM (OLP).”**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

## **PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE**

### **MENTOR**

**Prof. Ljiljana Janković**, redovni profesor, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

### **ČLANOVI KOMISIJE**

**Prof. Saša Čakić**, redovni profesor, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

**Doc. Dr Mилош Hadži-Mihajlović**, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

**Dr. sc. med. Zvonko Magić**, redovni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

Datum odbrane: 17.07.2014. godine

## ZAHVALNICA

*Prof. dr. Ljiljani Janković, mom mentoru, izražavam veliku zahvalnost jer je svojim stručnim znanjem i pedagoškim delovanjem imala značajan uticaj na postavku, izradu i konačan oblik ovog rada. Svojom voljom, željom da pomogne, korisnim savetima, ličnim angažovanjem i kreativnošću usmeravala me je tokom izrade ovog rada i omogućila mi da rešim mnoge probleme na koje sam nailazio i da ovaj rad dovedem do kraja.*

*Prof. dr. Saši Čakiću na izuzetnoj saradnji, iskrenoj želji da pomogne, dobronamernim sugestijama i edukativnom pristupu.*

*Prof. Dr Zvonku Magiću na nesebičnoj pomoći, rasvetljavanju problema iz oblasti genetike, angažovanju, podršci i konkretnim savetima, kao i doprinos u definitivnom izgledu ovog rada.*

*Doc dr Milošu-Hadžimihajloviću, na spremnosti da pomogne, podršci, volji koju je pokazao i u trenutcima kada smo se suočavali sa problemima kao i prevazilaženju istih.*

*Zahvaljujem se svim članovima kolektiva Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao i VMA, odseku humane genetike, jer su imali razumevanja za probleme na koje sam nailazio u toku izrade doktorske disertacije.*

*Najveću podršku u toku izrade ovog rada mi je pružala moja porodica, na ogromnoj pomoći i razumevanju, podršci i ljubavi koju mi je pružila kada je bilo najpotrebnije.*

*Izuzetnu zahvalnost dugujem svom pokojnom ocu koji je svojim ličnim primerom, vaspitanjem i ljubavlju naučio da istrajem na putu ka ličnom i profesionalnom usavršavanju.*

*Dugujem zahvalnost svim svojim prijateljima koji su imali strpljenja za mene i koji su željno iščekivali završetak ovog rada i ponovna druženja do zore.*

**Autor**

## **”UDRUŽENOST POLIMORFIZMA GENA TLRs 2,3,4 i CD14 KOD BOLESNIKA SA ORALNIM LIHEN PLANUSOM (OLP).”**

### **Rezime**

**Uvod.** Oral lihen planus (OLP) predstavlja hroničnu inflamatornu bolest oralne mukoze sa nepotpuno rasvetljenom etiologijom. Bolest pogađa oko 2-4% svetske populacije i češće se javlja kod žena. Faktori koji su asocirani sa nastankom OLP-a su: stres, dentalni materijali, dijabetes, autoimunske bolesti, prisustvo *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, *Hepatitis C* virus itd. Prethodne studije sprovedene unutar porodice su ukazale na postojanje genetičke predispozicije za razvoj OLP-a. Dodatno, OLP se često smatra i premalignom oralnom lezijom, iako je asocijacija sa nastankom oralnog karcinoma kontroverzna prema literaturnim podacima. Receptori slični Toll-u (Engl. Toll-Like Receptors - TLRs) predstavljaju veliku klasu receptora koji su uključeni u urođeni i adaptivni imuni odgovor. TLRs vezuju brojne egzogene i endogene antigene prepoznavanjem konzerviranih molekularnih obrazaca patogena (Engl. Pathogen Associated Molecular Patterns - PAMPs). Nakon aktivacije TLR, pokreću se nishodni molekulni u signalnom putu, što dovodi do ekspresije pro-inflamatornih gena. Prethodne studije su ukazale na značajnu ulogu koju TLR receptori imaju u patogenezi infekcije, inflamacije, oštećenja tkiva i nastanka kancera. U TLR genima je identifikovan veliki broj polimorfizama nukleotidne sekvence (Engl. Single Nucleotide Polymorphism – SNP). Moglo bi se pretpostaviti da polimorfizmi mogu uticati na funkcionalnost TLR receptora i povišavati/snižavati rizik za nastanak hronične infekcije. Kako je oralna mukoza direktno izložena mikroorganizmima koji mogu biti prepoznati od strane TLR-ova, prisustvo SNP-ova u TLR genima bi moglo imati važnu ulogu u patogenezi oralnog lihen planusa.

**Cilj.** Cilj ove doktorske disertacije je bilo utvrđivanje postojanja asocijacije između polimorfizama TLR2 (rs3804099), TLR3 (rs3775291, rs5743312), TLR4 (rs4986791, rs4986790) i CD14 (rs2569190) gena sa rizikom za razvoj i kliničkim formama oralnog lihen planusa, kao i etiološkim faktorima. Dodatno, cilj je bila i identifikacija haplotipskih blokova u studijskoj grupi i asocijacije između registrovanih haplotipova sa rizikom za nastanak oralnog lihen planusa.

**Materijal i metode.** Studijska grupa se sastojala od 101 pacijenta sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom i 104 zdrave kontrole, odgovarajuće polne i starosne strukture, bez sistemskih i bolesti oralne duplje. Polimorfizmi u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima su genotipizirani Real-Time PCR ili PCR-RFLP metodom.

**Rezultati.** Mutirani genotip polimorfizma rs5743312 TLR3 genas je bio asociran sa povišenim rizikom za razvoj oralnog lihen planusa u poređenju sa *wild type* genotipom (OR=15.984, p=0.011). Analizirani polimorfizmi rs5743312 i rs3775291 u TLR3 genu su se nalazili u gametskoj neravnoteži vezanosti (Engl. Linkage Disequilibrium – LD) ( $D'=1$ ,  $r^2=0.1$ ), kao i proučavani polimorfizmi rs4986791 i rs4986790 ( $D'=0.52$ ,  $r^2=0.26$ ). Identifikovani haplotipovi u TLR3 genu nisu bili asocirani sa rizikom za nastanak OLP-a. Haplotip TA TLR4 gena je bio asociran sa sniženim rizikom za razvoj OLP-a u poređenju sa CA haplotipom. Ni jedan od analiziranih polimorfizama nije bio asociran sa etiološkim faktorima kao ni različitim kliničkim formama oralnog lihen planusa.

**Zaključak.** Rezultati naše studije ukazuju da polimorfizam TLR3 gena može imati značajnu ulogu u etiologiji oralnog lihen planusa. Dodatno, identifikovani TA haplotip bi mogao biti razmatran kao potencijalni molekularni indikator sniženog rizika za nastanak i razvoj oralnog lihen planusa. Dalja istraživanja na većoj studijskoj grupi i uključivanje podataka o genskoj ekspresiji, nivou citokina, gensko-genskih i gensko-sredinskih interakcija mogu biti od posebne važnosti za razumevanje etiologije oralnog lihen planusa.

**Ključne reči.** Oralni lihen planus, polimorfizmi nukeotidne sekvence, TLR, CD14.

**Naučna oblast:** stomatologija

**Uža neučna oblast:** spec. Parodontologije i oralne medicine

**UDK:**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Istorijat.....	2
1.2. Epidemiologija .....	3
1.3. Etiologija .....	3
1.3.1. Genetički aspekti.....	5
1.3.1.1. Polimorfizmi nukleotidne sekvence .....	8
1.3.2. Stres.....	9
1.3.3. Infekcija.....	10
1.3.4. Stomatološki materijali .....	13
1.3.5. Lekovi .....	14
1.3.6. Deklanširajući faktori i loše navike.....	15
1.3.7. Dijabetes i hipertenzija.....	16
1.3.8. Maligne neoplazme .....	16
1.3.9. Raznovrsni uticaji.....	17
1.4. Imunopatogeneza.....	17
1.5. Klinička slika.....	30
1.5.1. Podela LP po lokalizaciji .....	32
1.5.1.1. Lichen planus mucosae.....	32
1.5.1.2. Oralni Lihen Planus (OLP).....	33
1.5.2. Kožni LP .....	37
1.5.2.1. Genitalni LP (lichen planus genitalium).....	38
1.5.2.2. Ungualni LP (lichen planus unguium).....	38
1.5.2.3. Plantarni LP (lichen planus palmaris et plantaris).....	39
1.5.3. Podela LP-a po morfologiji .....	39
1.5.3.1. Hipertrofični LP (lichen hypertrophicus) .....	39
1.5.3.2. Folikularni lihen planus (lichen planus follicularis).....	39
1.5.3.3. Vezikulozni i bulozni lihen planus(lichen planus vesiculosus et bullosus)	40
1.5.3.4. Erozivno-ulcerozni lihen planus (lichen planus erisivus et ulcerosus).....	40
1.5.3.5. Atrofični lihen planus (Lichen atrophicus).....	41
1.5.3.6. Aktinična lihenoidna erupcija (lichen planus actinicus).....	41
1.5.3.7. Eritematozni lihen (lichen planus erytematosus).....	41
1.5.3.8. Gutatni lihen planus (lichen planus guttatus) .....	41
1.5.3.9. Eksfolijativni lihen planus (lichen plannus exfoliativus) .....	41
1.5.3.10. Pigmentni lihen planus (lichen planus pigmentosus).....	42
1.5.3.11. Lichen planus mixtus typus erytematodsus .....	42
1.5.4. Podela LP po rasporedu lezija:.....	42
1.5.4.1. Anularni lihen planus .....	42
1.5.4.2. Linearni lihen planus (lichen planus linearis) .....	42
1.5.5. Posebni oblici LP-a .....	43
1.5.5.1. Porodični LP.....	43
1.5.5.2. Lihenoide reakcije .....	43
1.5.6. Pridružene bolesti.....	44
1.5.6.1. Maligniteti .....	44
1.5.6.2. Oboljenja digestivnog trakta.....	44

1.5.6.3. Diabetes mellitus (DM) .....	45
1.5.6.4. Ostale bolesti .....	46
1.6. Dijagnoza.....	47
1.6.1. Histopatologija .....	47
1.6.2. Imunofluorescencija (IF).....	51
1.6.2.1. Direktna IF .....	51
1.6.2.2. Indirektna IF .....	51
1.6.3. Imunohistohemija.....	52
1.6.3.1. Apoptoza.....	53
1.7. Maligni potencijal OLP-a .....	60
1.8. Terapija.....	62
1.8.1. Kortikosteroidi .....	63
1.8.1.1. Površinski kortikosteroidi.....	63
1.8.1.2. Sistemski kortikosteroidi .....	63
1.8.1.3. Retinoidi .....	65
1.8.1.4. Imunosupresivni agensi .....	66
1.8.1.5. Psoralen i ultravioletozračenje (PUVA).....	67
1.8.1.6. Druga terapijska sredstva .....	67
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>68</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>70</b>
3.1. Izvođenje istraživanja-merenja i procene .....	72
3.2. Metode .....	74
3.3. Biološki uzorci i izolacija DNK .....	75
3.4. Provera kvaliteta i koncentracije izolovane DNK .....	76
3.5. Lančana reakcija polimerizacije .....	77
3.6. Analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata .....	78
3.7. Real-Time PCR alelska diskriminacija.....	79
3.8. Analiza haplotipova.....	82
3.9. Statistička analiza .....	82
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>83</b>
4.1. Rezultati kliničkog istraživanja .....	84
4.1.1. Opšte karakteristike ispitanika studijske grupe .....	84
4.1.2. Zastupljenost kliničkih formi oralnog lihen planusa.....	92
4.2. Rezultati genetičkog istraživanja.....	98
4.2.1. Distribucija genotipova i alela ispitivanih polimorfizama u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima .....	98
4.2.2. Etiološke i kliničko-patološke odlike ispitivane grupe pacijenata .....	105
4.2.3. Asocijacija genotipova proučavanih polimorfizama sa rizikom za razvoj oralnog lihen planusa .....	106
4.2.4. Analiza haplotipova .....	110



<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>120</b>
5.1. Podaci kliničkog istraživanja.....	122
5.2. TLR2 rs3804099.....	124
5.3. TLR3 rs5743312.....	127
5.4. TLR rs3775291.....	129
5.5. Analiza haplotipova TLR3 rs5743312 i TLR3 rs3775291 .....	131
5.6. TLR4 rs4986791.....	132
5.7. TLR4 rs4986790.....	134
5.8. Analiza haplotipova TLR4 rs4986791 i TLR4 rs4986790.....	136
5.9. CD14 rs2569190.....	138
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>141</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>145</b>
<b>8. BIOGRAFIJA AUTORA .....</b>	<b>170</b>
<b>9. PRILOZI.....</b>	<b>172</b>

# ***1. UVOD***

## 1.1. Istorijat

Lichen planus (LP) je benigna, hronična dermatoza pri kojoj se javljaju karakteristične efflorescence u obliku takozvane "lihenske papule" (Meir Gorsky. "Oral lichen planus: malignant transformation and human papilloma virus"). Termin "lichen" potiče još iz antičkog doba, kada je bio korišćen za označavanje papulozne erupcije na koži (Lepoivre i Vyjver, 1971).

Početkom XIX veka problematikom LP-a bavili su se Bateman, Bazin a naročito Hebra („lichen rubber exudativus"). Nešto kasnije je ovu bolest precizno opisao Wilson (1869), nazvavši je „Lichen Planus" (Wilson, 1869). Wilson je ustanovio da je LP identično oboljenje kao i „Leichen rubber", ali je dodao da promene mogu biti identifikovane i na sluzokoži usne duplje. Opis promena u vidu belih papula na obraznoj i jezičnoj sluzokoži dao je Thibierge 1885 godine (Thibierge, 1885), dok je Kaposi 1892. ustanovio jednu varijantu LP-a, koju je nazvao „lichen rubber pemphigoides" (Kaposi, 1892). Tri godine kasnije Wickham je zapazio prisustvo beličastih tačkica i linija u predelu patološki promenjene oralne mukoze (Wickham, 1895). Ove promene i danas nose naziv po naučniku koji ih je prvi identifikovao – „Wickham-ove strije". Prvi klinički oblici oralnog LP-a (OLP-a) otkriveni su 1905., kada je ustanovljeno postojanje dve kliničke forme OLP-a – ulcerativna i bulozna (Poor, 1905).

Darier je 1909 godine histopatološki opisao LP (Darier, 1909), a veliki doprinos savremenoj kliničkoj i histopatološkoj slici ove bolesti dali su francuski naučnici Hallopeau, Lavergne, Gougerot, Civatte i drugi (Lepoivre i Vyjver, 1971).

U novijoj istoriji naučnici su došli do brojnih rezultata na osnovu kojih se LP može svrstati u bolesti sa autoimunim patogenetičkim mehanizmom. Prve dokaze vezane za autoimunu etiopatogenezu LP-a dali su Sarkany & Gaylarde 1972 godine (Sarkany & Gaylarde, 1972).

Danas se LP smatra relativno čestom hroničnom inflamatornom bolešću nepoznate etiologije, koja zahvata sluzokožu i/ili kožu.

## 1.2. Epidemiologija

Lichen planus je rasprostranjen u celom svetu, podjednako kod svih „rasa“. U opštoj populaciji prevalenca oralnog lichen planus-a se kreće od 1-4% prema najnovijim istraživanjima, što je sa manjim ili većim odstupanjima, utvrđeno u različitim studijama (Carcassi i sar., 1994).

Prave vrednosti učestalosti lichen planus-a je teško utvrditi jer se veliki broj bolesnika sa ovim oboljenjem javlja kod dermatologa gde dobija terapiju. Kada je reč o distribuciji među polovima, poznato je da žene dva puta češće podležu oboljenju (63-67%) (Sondell i sar., 1996). Kod muškaraca se lichen planus najčešće razvija početkom tridesetih, a kod žena u pedesetim godinama života. Lichen planus je oboljenje srednje životne dobi, i na osnovu rezultata mnogih studija najčešće se javlja između 50 – 55 godine života (Carcassi i sar., 1994, Chaiyarit i sar., 1999). Lezije se kod ove bolesti učestalije javljaju na oralnoj sluzokoži nego na koži (Smoller & Glusac, 1994). Zabeleženi su i slučajevi da se javlja kod dece mlađe od deset godina. Najmlađa osoba kod koje je dijagnostikovana lichen planus je imala sedam godina.

Lichen planus ima mali premaligni potencijal (1% ± posle 10 godina) ili 0,4-3.3% (Sugerman i sar., 1995). Zapaženo je i porodično javljanje lichen planusa. Tako je Mahood opisao devet članova obolelih od LP-a iz četiri familije (Mahood, 1983). Pošto je lichen planus opisan kod monozigotnih blizanaca, a nađena je i češća zastupljenost HLA-A3, HLA-B5 i HLA-B8 antigena kod obolelih od LP-a u odnosu na zdravu populaciju. Dodatno, primećeno je da se LP češće javlja u zimskim mesecima (Sugerman i sar., 2000).

Uzrok ovog oboljenja nije poznat. Lichen planus predstavlja multifaktorijalnu bolest gde se spominju brojni mehanizmi i njihove interakcije.

## 1.3. Etiologija

Mehanizam nastanka Lichen planusa je još uvek nejasan. Uzrok i patogeneza ovog oboljenja su nepoznati. Kao mogući etiopatogenetički faktor OLP-a se najčešće pominje **autoimunitet**, zbog različitih autoimunih karakteristika ove bolesti kao što su:

veza OLP-a sa drugim autoimunim bolestima, izražena depresija imuno-supresorne aktivnosti, prisustvo autocitotoksičnih T-ćelijskih klonova na mestu lezije itd (Bramanti i sar., 1995). Široko je prihvaćeno stanovište da je u pitanju ćelijski posredovan imunski odgovor na spoljne antigene ili unutrašnje antigene koji izazivaju promene na epitelnim ćelijama. U većini slučajeva precipitirajući faktor je nepoznat i bolest je idiopatska. Pored detekcije CD14 limfocita, kod OLP-a se mogu detektovati i neki Toll-like receptori (TLRs) koji nam ukazuju na moguću etiopatogenezu bolesti. Oni kontrolišu pojavu akutnog inflamatornog odgovora i od ključnog su značaja za nastanak adaptibilnog imuniteta.

Receptori koje urođeni imunski sistem koristi da reaguje protiv mikroorganizama, eksprimirani su na fagocitima, dendritskim ćelijama i mnogim drugim ćelijama, uključujući limfocite, epitelne i endotelne ćelije, pri čemu sve te ćelije učestvuju u odbrani od različitih klasa mikroorganizama. Ti receptori su eksprimirani u različitim ćelijskim odeljcima u kojima mikroorganizmi mogu da se nađu. Neki od receptora se nalaze na površini ćelije. Drugi receptori su smešteni u endoplazmatskom retikulumu i brzo prelaze u vezikule (endosome), u koje produkti mikroorganizama dospevaju ingestijom. Takođe, neki od receptora se nalaze u citoplazmi, gde funkcionišu kao senzori za citoplazmatske mikroorganizme. Identifikovano je nekoliko klasa tih receptora i oni su specifični za različite tipove produkata mikroorganizama (molekulske obrasce) (Chaiyarit i sar., 1999).

**Receptori slični Tollu (Engl. Toll-Like Receptors-TLRs)**, su homologu proteinu *Drosophila* nazvanom Toll, koji je otkriven zbog svoje uloge u odbrani od infekcija. TLR su specifični za različite komponente mikroorganizama. Na primer, TLR-2 je odgovoran za nekoliko lipoglikana bakterija, TLR-3, -7 i -8 za virusne nukleinske kiseline (kao što je dvolančana RNK), TLR-4 za bakterijski lipopolisaharid (endotoksin), TLR-5 za komponentu bakterijskih flagela nazvanu flagelin, a TLR-9 za oligonukleotide bogate nemetilovanim CG dinukleotidima (CpG), koji su zastupljeniji u bakterijama nego u ćelijama sisara (Chaiyarit i sar., 1999).

Neki od TLR-ova se nalaze na površini ćelije, gde prepoznaju produkte ekstracelularnih mikroorganizama, a drugi u endozomima u koje mikroorganizmi bivaju ingestirani. Signali koji nastaju angažovanjem TLR-a aktiviraju transkripcione faktore koji stimulišu ekspresiju gena koji kodiraju citokine, enzime i druge proteine uključene

u antimikrobne funkcije aktiviranih fagocita i dendritskih ćelija. Neki od najvažnijih transkripcionih faktora koje aktiviraju TLR su NF- $\kappa$ B (nukleusni faktor kapa B), koji stimuliše ekspresiju različitih citokina i endotelnih adhezivnih molekula i faktor odgovora na interferon (Engl. Interferon Response Factor 3, IRF-3), koji stimuliše produkciju interferona tip I, citokina koji blokiraju virusnu replikaciju. Mnogi drugi tipovi receptora učestvuju u urođenom imunskom odgovoru na mikroorganizme. Jedan koji se nalazi na površini ćelije, prepoznaje peptide koji počinju sa N- formilmetioninom, što je specifično svojstvo bakterijskih proteina. Receptor za terminalne rezidue manoze uključen je u fagocitozu bakterija.

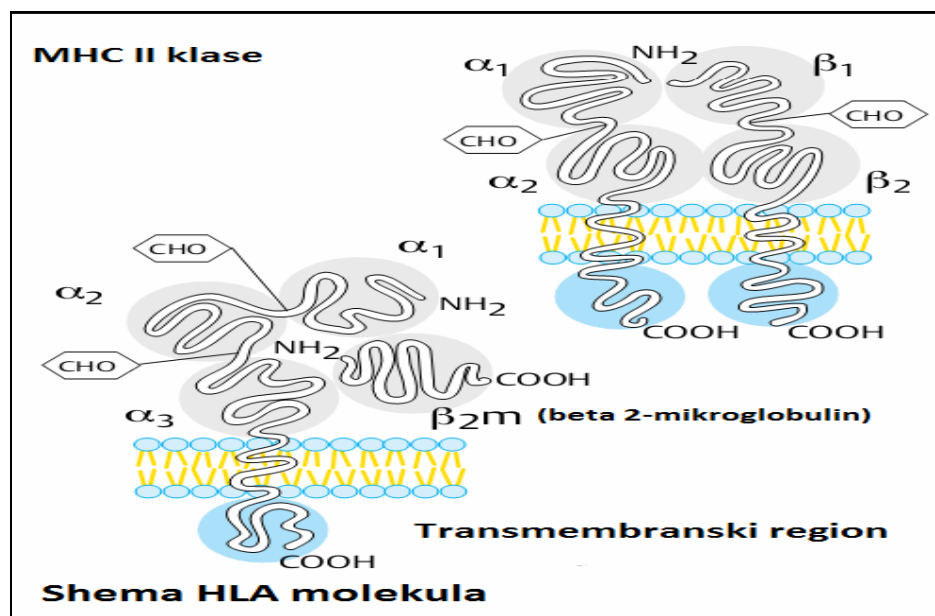
Nekoliko citoplazmatskih receptora prepoznaje virusne nukleinske kiseline ili bakterijske peptide. Drugi receptori koji učestvuju u urođenom imunskom odgovoru ne prepoznaju produkte mikroorganizama, već citokine koji se stvaraju u odgovoru na mikroorganizme. Ti citokini obuhvataju i hemokine, koji stimulišu migraciju ćelija ka mikroorganizmima i interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), koji pojačava sposobnost fagocita da ubijaju ingestirane mikroorganizme. Sa druge strane, neki drugi receptori prepoznaju antitela i proteine komplementa vezane za mikroorganizme.

Različite genetičke i razvojne varijacije mogu uticati na predispoziciju pojedinca kada su u pitanju infekcije bilo kog tipa i mogu doprineti pojavi nekih autoimunih bolesti u kasnijoj životnoj dobi.

### 1.3.1. Genetički aspekti

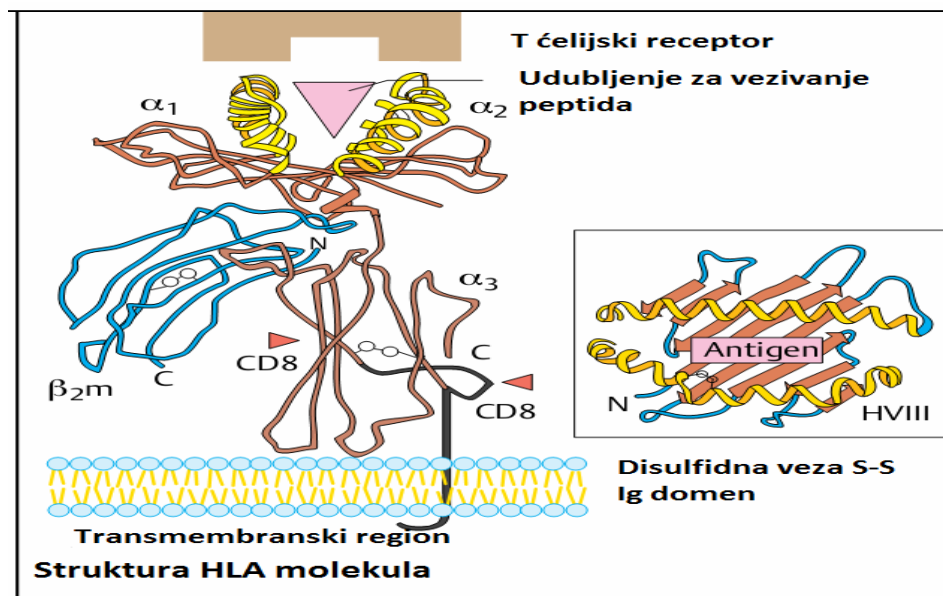
OLP se u pojedinim studijama opisuje kao genetički uslovljeno oboljenje, ali ne postoji precizna genetička potvrda za to. Poznato je da je osetljivost na autoimunske bolesti povezana sa genetičkim faktorima. Najbolje je proučena veza između pojave autoimunskih bolesti i ispoljavanja određenih MHC (HLA) genotipova (Slika 1). Ova povezanost se može utvrditi poređenjem učestalosti određenih HLA alela kod obolelih od neke autoimunske bolesti sa učestalošću u zdravoj populaciji. Neka istraživanja su pokazala da braća i sestre obolele od iste autoimune bolesti imaju isti HLA-haplotip značajno češće od očekivanog.

Poznato je da je pojava lihen udružena sa ekspresijom HLA-DR 1 antigena (Lee i sar., 1996, Regezi i sar., 1994). Grupa italijanskih autora je identifikovala alel HLA-DRB1\*0101 koji na 85-om položaju sadrži valin, a na 86-om glicin, koji je povezan sa predispozicijom za idiopatski kutani lihen (Rojo-Moreno i sar., 1998).



**Slika 1.** Shema HLA molekula (Preuzeto iz „Color atlas of imunology“  
Burmeister G, Pezzutto A, 2003, strana 51).

Prethodno opisana zapažanja o izvesnom stepenu oligoklonalnosti T-ćelija i selektivnoj ekspresiji HLA-DRB1 molekula kod obolelih sa lihenom potvrđuju središnje mesto za sada nepoznatih antigena u započinjanju i održavanju patološkog procesa (Slika 2). Pretpostavlja se da ovih antigena ima više, ali je njihov broj ograničen, a struktura slična.



**Slika 2.** Struktura HLA molekula (Preuzeto iz „Color atlas of imunology“  
Burmeister G, Pezzutto A, 2003, strana 51).

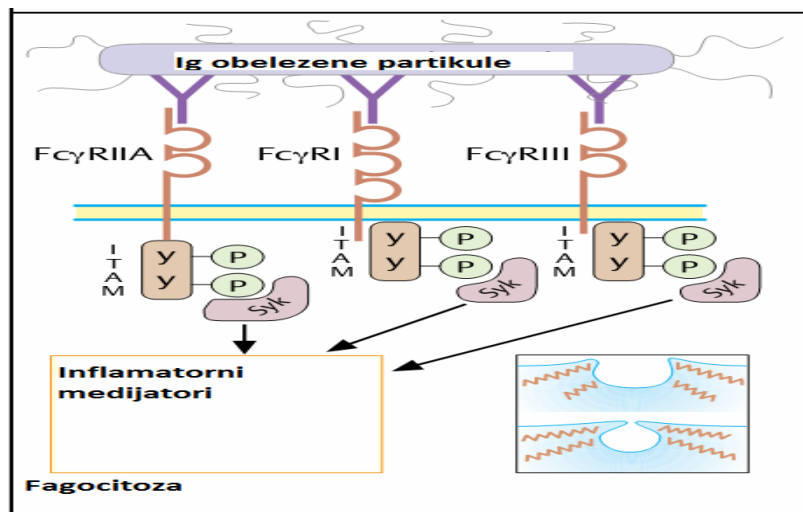
Histološki posmatrano, za OLP su karakteristične lezije koje sadrže ogromnu količinu infiltrata makrofaga koje u lezijama pokazuju Fc $\gamma$ RIIA i Fc $\gamma$ RIIA. Receptor IgA i MMP geni takođe imaju važnu ulogu u imunitetu sluzokože. Uz to, polimorfnost Fc $\gamma$ R, Fc $\alpha$ R i MMP gena treba proučavati u cilju razjašnjenja genetičkog doprinosa OLP-u.

Rezultati izvesnih studija su pokazali da se učestalost alela Fc $\gamma$ RIIIB blago, ali ne značajno razlikuje između pacijenata i kontrolne grupe. Fc $\gamma$ RIIIB je neutrofilno-specifičan IgG receptor, a polimorfnost Fc $\gamma$ RIIIB NA 1/NA2 utiče na afinitet ka IgG1 i IgG3 (Slika 3). Smatra se da genotipovi Fc $\gamma$ RIIIB regulišu neutrofilne funkcije kao što su aktivnost fagocita i aktivna sposobnost stvaranja kiseonika, te mogu biti faktori rizika različitih infekcija (agresivni periodontitis i hronični periodontitis) i autoimunih bolesti (SLE).

Činjenica da su nivoi potklase IgG u pljuvački povećani kod pacijenata sa OLP-om sugerise da interakcija između Fc $\gamma$ R i IgG potklasa igra važnu ulogu u patogenezi OLP-a. Autoimuni mehanizmi takođe mogu učestvovati u patogenezi OLP. Prethodne studije su dokazale da su četiri FC $\gamma$ R gena (Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIIB) blisko locirani na hromozomu 1q23-24.



Kombinacija Fc $\gamma$ R genotipova se smatra potencijalnim markerom rizika za SLE i periodontitis kod japanskih pacijenata. Pretpostavka da polimorfnost Fc $\gamma$ RIIB predstavlja navodni faktor rizika za nastanak OLP-a može iziskivati testiranja većih grupa pacijenata sa dijagnostikovanim OLP-om.



Slika 3. IgG receptor (Preuzeto iz „Color atlas of imunology“ Burmeister G, Pezzutto A, 2003, strana 41)..

### 1.3.1.1. Polimorfizmi nukleotidne sekvence

Genetički polimorfizam je alelska varijanta koja postoji stabilno u populaciji u učestalosti koja je dovoljno visoka da se ne smatra proizvodom mutacija i veća je od 1% (Frazer i sar., 2009). Polimorfizam nukleotidne sekvence (Engl. Single Nucleotide Polymorphism- SNP) predstavlja genetičku promenu u sekvenci molekula DNK u samo jednom od četiri nukleotida u genomu. U humano DNK se na svakih 500-1 000 baza može identifikovati jedan SNP (Frazer i sar., 2009). Imajući u vidu da veličina humanog genoma iznosi oko 3,2 milijarde baznih parova, procenjeno je da oko milion razlika koje postoje između dva genoma predstavljaju rezultat postojanja SNP-ova, što čini oko 85% ukupne humane genetičke varijacije.

Polimorfizmi nukleotidne sekvence se mogu nalaziti unutar kodirajućeg regiona gena-egzona, nekodirajućeg regiona-introna ili intergenskih regiona. Najčešći su SNP-ovi identifikovani unutar regiona promotora gena. Za razliku od SNP-ova koji se nalaze

unutar intronskih regiona, za koje se smatra da imaju relativno mali biološki efekat, zbog čega su i slabije proučavani u studijama asocijacije, SNP-ovi unutar kodirajućeg regiona gena su najčešće predmet naučnih proučavanja. Smatra se da SNP-ovi koji se nalaze u kodirajućem regionu verovatnije menjaju funkciju proteina. Ipak, treba imati u vidu da zbog izrođenosti genetičkog koda, iako su smešteni u kodirajućem regionu, takvi polimorfizmi nuleotidne sekvence ne moraju imati biološki efekat.

SNP-ovi se najčešće u literaturi obeležavaju svojim jedinstvenim “rs” brojem (Engl. Reference SNP ID), uz pomoć kog se polimorfizam od interesa može lako pretraživati u dostupnim bazama podataka. Dugogodišnje interesovanje istraživača za proučavanje SNP-ova leži u činjenici da postojanje različitih varijacija sekvence DNK kod ljudi može imati izvesne posledice po pitanju podložnosti bolestima, odgovoru na patogene, hemikalije, lekove, vakcine i druge agense. Genetičke studije asocijacije imaju za cilj da prouče eventualno postojanje asocijacije između kandidat gena, uključujući i genetičke varijante identifikovane u datom genu, sa podložnošću nastanka određenog fenotipa, najčešće bolesti. Obzirom da se medicina XXI veka razvija u smeru individualnog pristupa lečenju, nasuprot tradicionalno uspostavljenom populacionom pristupu lečenja, smatra se da će proučavanje SNP-ova genetičkim studijama asocijacije omogućiti realizaciju koncepta personalizovane medicine.

### **1.3.2. Stres**

Poznato je da pacijenti sa OLP-om pokazuju veće znake anksioznosti, depresije i povećane podložnosti psihološkim poremećajim (Burkhart i sar., 1997). Pacijenti koji boluju od oralnog lichen planusa mogu primetiti pogoršanje stanja u toku perioda stresa, dok drugi uočavaju i pojavu zamora. Pogoršanje se uglavnom uočava 1 do 2 nedelje nakon stresnog perioda.

Kod pacijenata sa erozivnim LP-om znaci depresije su veći nego kod bolesnika sa neerozivnom formom (Koray i sar., 2003). Uz hronične neprijatnosti koje mogu dovesti do stresa, pacijenti sa OLP-om su zabrinuti zbog mogućnosti malignizacije, zarazne prirode oboljenja i vidnog nedostatka dostupnosti edukativnog materijala za pacijente (Ulevitch, 1999).

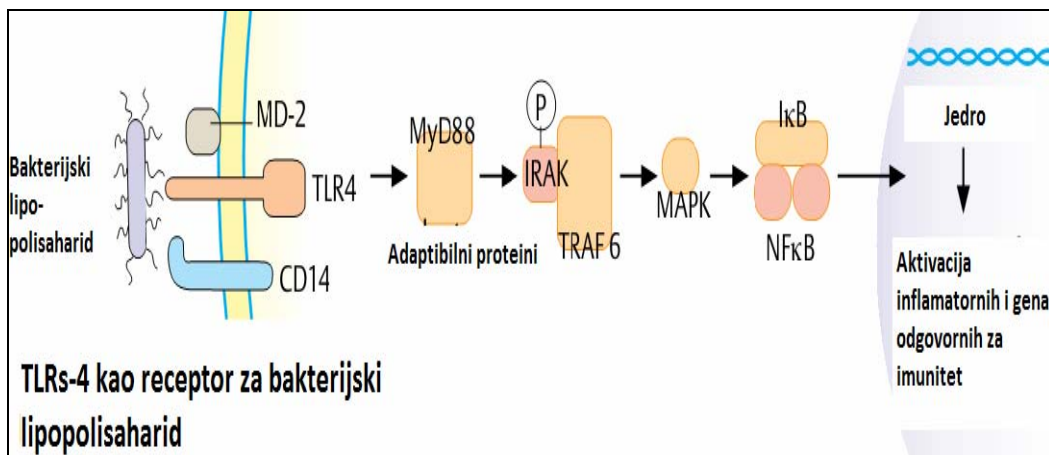
Psihološka terapija kod obolelih od OLP-a je neophodna, uzimajući u obzir činjenicu da je nivo anksioznosti kod ove grupe bolesnika daleko veći, kao i povećan nivo kortizola u salivi. Navedeni podaci nam ukazuju na nesumnjivu povezanost stresnih situacija i razvoja OLP-a (Takeuchi i sar., 1999).

### **1.3.3. Infekcija**

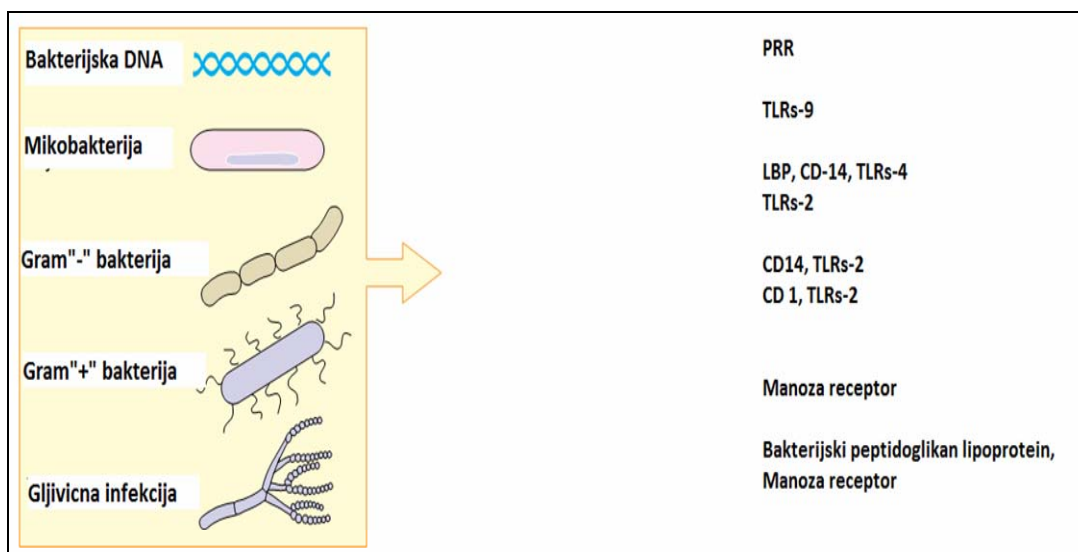
Bakterije kao što su Gram-negativni anaerobni bacili i spirohete često se dovode u vezu sa pojavom LP-a, ali njihov uticaj nikada nije bio jasno potvrđen. Uzimajući u obzir povremen odgovor tkiva obolelih od OLP-a na dejstvo različitih antibiotika, hipoteza o uticaju infektivnih agenasa na razvoj ove bolesti sve više dobija na značaju.

Nešto što dovodi u vezu OLP sa bakterijskim infekcijama je i pojava Toll-like receptora tipa 4 (TLR-4) (Slika 4). Reč je transduktornom receptoru koji se aktivira nakon vezivanja bakterijskih lipopolisaharida (LPS) i lipo-teihoične kiseline (LTA).

Na mestu prodora antigena, LPS i LTA se najpre vezuju za CD14 receptor koji vrši pokretanje reakcije preko TLR-4 receptora. Receptor tada homodimerizuje i formira kompleks sa MD2 proteinom koji se potom transportuje na površinu ćelije. Za razliku od LTA koji se može direktno povezati sa CD14 receptorom, LPS mora biti dostavljen od strane lipopolisaharid vezujućeg proteina (Engl. Lipopolysaccharide Binding Protein - LBP). U prenošenju signala učestvuju i drugi adaptabilni proteini kao što su MyD88 (mijeloidni diferentovani primarni protein 88), TIRAP, TRIF i TRAM.



**Slika 4.** TLRs-4 kao receptor za LPS (Preuzeto iz „Color atlas of imunology“ Burmeister G, Pezzutto A, 2003, strana 63).



**Slika 5.** Receptori za različite vrste infektivnih agenasa (Preuzeto iz „Color atlas of imunology“ Burmeister G, Pezzutto A, 2003, strana 63)..

Pojedine studije prikazuju porast prevalence *Candidae albicans* kod obolelih od OLP-a, čije se kliničko poboljšanje može uočiti nakon primene antifungalne terapije.

Na mestu prodora antigena (**gljivična infekcija**) može se detektovati prisustvo receptora TLR-2. TLR-2 je odgovoran za prepoznavanje gljivične infekcije preko ćelijskih delova Zymosan-a (Slika 5), koji se vezuje za CD14 receptor i utiče na TLR-2. Nakon ove interakcije dolazi do produkcije TNF- $\alpha$ . Receptor TLR-2 zajedno sa TLR-6

prepoznaje MALP 2 (mikoplazmalni makrofagni aktivirajući lipopeptid 2). Dva navedena receptora pored uloge u pokretanju odgovora na gljivičnu infekciju mogu učestvovati i u aktivaciji makrofaga od strane Gram-pozitivnih bakterija.

Kada se govori o uticaju **virusnih infekcija** na OLP može se reći da mogu biti okidač za nastanak ovog oboljenja. U prilog tome govori i činjenica brojnih radova o prisustvu TLR-3 na mestu infekcije. Ovaj receptor aktivira imune ćelije u odgovoru na virusnu RNK. Njegovom aktivacijom dolazi do sekrecije interferona alfa (Ifn-Alpha) kao i interferona beta (Ifn-Beta) kao odgovor na virusnu infekciju.

Potvrđeno je i prisustvo humanog papiloma virusa (HPV) u nekim lezijama kod obolelih od lichen planusa. Virusni antigeni bi mogli biti prisutni na membrani keratinocita, baš kao što su prisutni glavni humani histokompatibilni antigeni. Tako je na keratinocitima kod LP lezija povećana ekspresija receptora (CD 21) za Epstein-Barr virus (EBV), što ide u prilog teoriji da je infekcija niskog stepena i/ili perzistentna infekcija epitelnih ćelija herpes virusom moguć etiološki faktor LP-a.

Virus hepatitisa C (HCV) se može javiti u okviru lichen planusa. Sekvence virusa pronađene su u serumu pacijenata koji boluju od LP-a. Kod obolelih je takođe moguće identifikovati neki od tri glavna HCV genotipa (Koch & Bahmer, 1999). LP se može javiti zajedno sa oboljenjem jetre koje je praćeno HCV infekcijom. Etiopatogeneza LP-a koji je praćen HCV infekcijom je nejasna. Moguće je da postoji ćelijski posredovana citotoksičnost prema epitopu koji je zajednički za HCV i alterisane keratinocite.

Pacijenti inficirani virusom hepatitisa C često imaju ekstrahepatične manifestacije koje značajno doprinose stopi oboljenja vezanoj za HCV. Mnoga istraživanja su pokazala povezanost HCV i LP u južnoj Evropi i Aziji (Carrozzo i sar., 1996, Chuang i sar., 1999, Klanrit i sar., 2003, Jubert i sar., 1994, Arrieta i sar., 2000). HCV infekcija je češće prisutna kod pacijenata sa erozivnom formom OLP-a u odnosu na pacijenate sa neerozivnim OLP-om (Roy i sar., 2000). Povezanost HCV-a i OLP-a potkrepljuje činjenica da su virusne sekvence HCV-a pronađene u serumu pacijenata sa OLP-om, a pokazano je da se HCV povremeno umnožava u tkivu oralnog planusa, verovatno doprinoseći tako patogenezi oštećenja sluzokože (Pilli i sar., 2002, Carrozzo i sar., 2001, Petruzzi i sar., 2004). Noviji podaci su pokazali da se HCV specifične T ćelije mogu naći u usnoj sluzokoži pacijenata sa hroničnim hepatitisom C i OLP (del Olmo i sar., 1990).

Čini se da je OLP veza za HCV takođe u vezi sa HLA II klasom alela HLA-DR6, što bi delimično objasnilo neobičnu geografsku heterogenost veze između OLP i HCV (Yiannias i sar., 2000, Hietanen i sar., 1987). Čak i zemljama u kojima izgleda HCV infekcija igra etiološku ulogu u patogenezi OLP-a, većina pacijenata sa OLP-om nisu inficirani HCV-om (Koch & Bahmer, 1999).

#### **1.3.4. Stomatološki materijali**

Kod obolelih od lichen planusa vrlo često se spominje uticaj materijala koji se koriste u stomatologiji kao što su amalgam i zlato. Ipak, veliki broj obolelih nema međuzavisnost kliničkih simptoma bolesti sa prisutnim stomatološkim materijalima.

Stomatološki materijali za popravku uključujući amalgame, smolu za izlivanje, kobalt i zlato, navođeni su kao uzroci oralnih lihenoidnih reakcija. Čak i sastavne komponente i plastika mogu biti važni u patogenezi i tretiranju pacijenata sa OLR (oralnim lihenoidnim reakcijama) (Thornhill i sar., 2003).

Neki autori govore o slaboj učestalosti osetljivosti na živu i ne javljanju poboljšanja usled uklanjanja amalgamskih punjenja (Wong & Freeman, 2003), dok drugi tvrde da je osetljivost na živu važan uzrok svih oblika OLR-a (Skoglund, 1994). Iako nisu tipične, ove tvrdnje treba dovesti u pitanje kada su lezije ograničene na područje oralne sluzokože gde su u bliskom kontaktu i blizini materijala za plombiranje. Pozitivan test reakcije na maloj površini na više alergena žive i čvrsta klinički ustanovljena povezanost između lezija i amalgamskog materijala može povećati stepen verovatnoće tačne dijagnoze i opravdati uklanjanje i zamenu svih amalgamskih plombi onima koje su napravljene od drugih materijala (Ostman i sar., 1996). U slučajevima gde se stanje pacijenata sa negativnim testom na maloj površini poboljšava zamenom plombi, živa može da deluje iritantno u patogenezi OLR-a (Thompson & Skaehill, 1994).

Ipak, amalgam i drugi materijali mogu dovesti do pojave promena lihenoidnog tipa, odnosno lezija koje klinički i histološki liče na lichen planus, ali imaju prepoznatljivu etiologiju. Kod pojedinih lezija ovog tipa može doći do potpune rezolucije promena nakon zamene amalgamskih ispuna drugim materijalima (Potts i sar., 1987, Robertson & Wray, 1992). Uzimajući u obzir rezultate brojnih istraživanja,

uočljivo je da lezije oralne mukoze lihenoidnog karaktera mogu nastati, ne kao posledica alergije na živu, već kao posledica uticaja mehaničkih iritacija i galvanskih struja.

### 1.3.5. Lekovi

Veliki broj lekova se navodi kao mogući etiološki faktor u nastanku lihenoidnih lezija na koži i oralnoj mukozii. Medikamenti koji se najčešće pominju u vezi sa lichen planusom su nesteroidni antiinflamatorni lekovi i inhibitori angiotenzin–konvertirajućeg enzima (ACE inhibitori), oralni hipoglikemici, penicilamin, neki diuretici, soli zlata, antimalarici. Oralne lezije ovog tipa su u najvećem broju slučajeva erozije, koje imaju tendenciju unilateralnog javljanja, na šta ukazuju rezultati mnogih studija.

Najpouzdaniji način za dijagnozu lihenoidne reakcije je nestanak lezija nakon prekida terapije medikamentom koji je potencijalni pokretač lihenoidnih reakcija, i pojava novih lezija nakon ponovnog uvođenja istog leka. U praksi se ova metoda najčešće ne izvodi usled posledica koje pacijent može imati u toku njenog sprovođenja.

Ponovno razmatranje ove teme sugerise da su dokazi za povezanost lekova i OLR-a najčvršći kada je reč o beta blokatorima, metildopu, penicilaminu i agensima lekova bez steroida i sa protiv-upalnim dejstvom (Lamey i sar., 1995, McCartan & McCreary, 1997, Conklin & Blasberg, 1987). Iako su brojni lekovi dovođeni u vezu sa OLR-om, takvi nalazi su bili zasnovani na pojedinačnim slučajevima ili oskudnoj dokumentaciji.

Klinička identifikacija lihenoidnih reakcija na lekove bazirana je uglavnom na subjektivnim kriterijumima iako ponekad postoji tendencija lezija da budu jednostrane (Eisen, 1994) i erozivne (McCartan & McCreary, 1997).

Najpouzdaniji metod za otkrivanje lihenoidnih reakcija na lekove je praćenje povlačenja reakcije ukoliko se odstrane štetni lekovi i njenog vraćanja ukoliko pacijent ponovo uzme dati lek. S obzirom da je ovaj metod nepraktičan i nesiguran, garancija može biti zabrana uzimanja štetnog leka i njegova zamena drugim agensom. Nakon što je štetni lek izuzet iz upotrebe, mogu proteći meseci pre nego što se reakcije povuku. OLR se može pojaviti mesecima ili godinama nakon uzimanja leka, i srećom, nalazi

OLR-a su ređi nego lekovima izazvana kožnom lichenoidnom reakcijom (Ramon-Fluixa i sar., 1999).

### 1.3.6. Deklanširajući faktori i loše navike

Jedan od faktora koji može uticati na pojavu lichen planusa je i pušenje. Kod pušača su značajno više izražene lezije plakoznog tipa, a manje retikularne i atrofične forme ovog oboljenja. Povezanost ove bolesti sa konzumiranjem cigareta nije dokazana, iako pušenje može doprineti alteraciji već postojećih lezija.

Kebnerov fenomen koji je karakterističan za LP gde lezije nastaju kao reakcija na traumu zapažen je takođe i u usnoj duplji. Mehanička trauma tokom stomatoloških intervencija, toplota i iritacija od duvanskih proizvoda, iritacija oralne sluzokože od oštrih ivica zuba, grubih stomatoloških popravki i neadekvatnih proteza, kao i navike grizenja usana i obraza, predstavljaju pogoršavajuće faktore (Katz i sar., 1988). Kebnerov fenomen može objasniti zašto se erozivne lezije javljaju u oblastima podložnim traumi, kao što su sluzokoža usta i obraza i lateralne površine jezika. Ukoliko su takvi faktori umanjeni ili eliminisani, oralne lezije se ili preobraćaju u manje ozbiljne oblike bolesti ili potpuno iščezavaju (Holmstrup i sar., 1988).

Uслед prisustva atrofično-erozivnih lezija, naročito u slučaju deskvamativnog gingivitisa, javljaju se posebni problemi jer pranje zuba može biti otežano bolom i krvarenjem. Posledica ovakve situacije je često akumulacija zubnih naslaga koje mogu negativno uticati na razvoj OLP-a. Zubne naslage i kamenac mogu dovesti do pogoršanja oralnog lichen planusa i vezuju se za znatno veću učestalost eritematoze i erozivnih gingivalnih lezija (Bagan i sar., 1993).

Na kraju OLP može dovesti do recesije gingive, uznapredovalog parodontološkog oboljenja, i retko, do gubitka zuba. Parodontološke hirurške procedure koje su neophodne za korekciju ovakvih nedostataka, mogu pogoršati stanje (Boyd & Neldner, 1991). Održavanje oralne higijene kod bolesnika sa OLP-om se sprovodi korišćenjem adekvatnih mekanih četkica za pranje zuba uz primenu lokalnih antiseptika bez alkohola kako bi se izbegla dodatna iritacija oralne sluzokože (Tank i Joost, 1997).



### 1.3.7. Dijabetes i hipertenzija

Još jedan od dovoljno ispitanih favorizujućih faktora u nastanku LP-a je dijabetes melitus. Iako se čini da pacijenti sa OLP-om nemaju povećan rizik od dijabetesa, dijabetičari koji obole od OLP-a imaju povećanu učestalost atrofično-erozivnih lezija i veće razmere lezija na jeziku (Lee i sar., 1996).

Pojedini autori su utvrdili poremećaj metabolizma glukoze kod većine obolelih od LP-a, što istovremeno ne znači da te osobe boluju od šećerne bolesti. Na osnovu rezultata brojnih studija utvrđena je niska prevalencija OLP-a u velikoj grupi ispitanika, što dovodi do zaključka da je svaka veza između dijabetesa melitusa i OLP-a slučajna ili prouzrokovana primenom anti-dijabetika.

Grinspan je opisao sedam slučajeva OLP-a povezanih sa dijabetesom i hipertenzijom, tj. trijas simptoma poznatih kao Grispanov sindrom. Ovaj sindrom najverovatnije predstavlja slučajnu kombinaciju tri veoma česta poremećaja ili lihenoidnu reakciju prouzrokovanu lekovima korišćenim u cilju kontrole hipertenzije ili dijabetesa.

### 1.3.8. Maligne neoplazme

Lihenoidne lezije opisane su na koži i/ili sluzokoži pacijenata sa velikim brojem različitih neoplazmi. Kliničke manifestacije LP-a povezane sa malignitetima najčešće se ispoljavaju u vidu buloznih promena, ponekad kao lichen – planus pemphigoides, a u retkim slučajevima mogu podsećati na paraneoplastičnu formu pemfigusa.

Od prvog izveštaja Hallopea 1910. godine o malignoj transformaciji OLP-a, brojne studije su se bavile, a i danas se bave ovom problematikom. U većini od njih opisana je visoka incidenca maligne transformacije OLP-a, što je verovatno bila posledica pogrešno postavljene dijagnoze. Zbog toga je naglašena potreba ka formiranju jasnih kriterijuma za postavljanje dijagnoze ove bolesti.

Generalno, problemi sa kojima se naučnici susreću, kada je u pitanju maligni potencijal OLP-a su neusaglašenost kriterijuma za:

- dijagnozu OLP-a,

- identifikaciju istinskih slučajeva maligne transformacije OLP-a identifikaciju faktora rizika za nastanak maligne transformacije OLP-a.

Bilateralno prisustvo belih mrežastih formacija na obraznoj sluzokoži je najprominentniji klinički dijagnostički parametar OLP-a. Kod svih kliničkih oblika OLP-a moguće je identifikovati Wickhama-ove strije, što olakšava postavljanje kliničke dijagnoze bolesti.

Ipak, sve to nije dovoljno da bi se postavila definitivna dijagnoza. Esencijalni histopatološki kriterijumi za dijagnozu OLP-a su:

- prisustvo guste limfocitne infiltracije u submukozi u vidu trake,
- znaci likvefakcione degeneracije bazalnih ćelija epitela,
- i odsustvo epitelne displazije.

Postoje lezije koje po histopatološkim karakteristikama odgovaraju lichen planusu, ali istovremeno poseduju elemente epitelne displazije. Eisenberg je 2000. godine ove lezije opisao kao posebnu patološku nišu, kod koje se primarno javljaju poremećaji u maturaciji epitela, što potencira razvoj maligniteta. Ovakve promene bi trebalo isključiti iz dijagnoze OLP-a, ali ne uvek. Moguće je da se epitelna displazija razvije u toku etiopatogeneze OLP-a, i tada dijagnozu bolesti postavljamo na osnovu združenih kliničkih i histopatoloških karakteristika OLP-a, kao i direktne imunofluorescence

### **1.3.9. Raznovrsni uticaji**

Pored prethodno navedenog, LP se povezuje i sa nekim stanjima kao što su psorijaza, lichen sclerosis, urolithiasis, mezangioproliferativni glomerulonefritis, Turnerov sindrom sa endokrinopatijama, itd.

## **1.4. Imunopatogeneza**

Brojni faktori se pominju u etiologiji lichen planusa, ali većina od njih predstavlja samo deklanširajuće to jest favorizujuće faktore, koji doprinose alteraciji već postojećih

LP lezija. Dokazi, iznešeni u velikom broju studija, najviše upućuju na autoimunu etiopatogenezu bolesti. Da je LP autoimuna bolest potvrđuju sledeće činjenice:

- njegova povezanost sa drugim autoimunim bolestima,
- izražena depresija imuno-supresorne aktivnosti,
- prisustvo autocitotoksičnih T-ćelijskih klonova na mestu lezije.

Glavne promene su vezane su za celularni imunitet. Rezultati različitih studija koje se bave problematikom LP-a pokazuju određene kontradiktornosti vezane za nivo imunoglobulina u serumu obolelih:

- smanjenje serumskih IgM i IgA i povećanje serumskog IgA (Abbas i sar., 1997)(Kolde i sar., 1997) i
- normalne vrednosti serumskih IgA, IgG, IgM i IgD (Shimizu i sar., 1997, Rojo-Moreno i sar., 1998) itd.

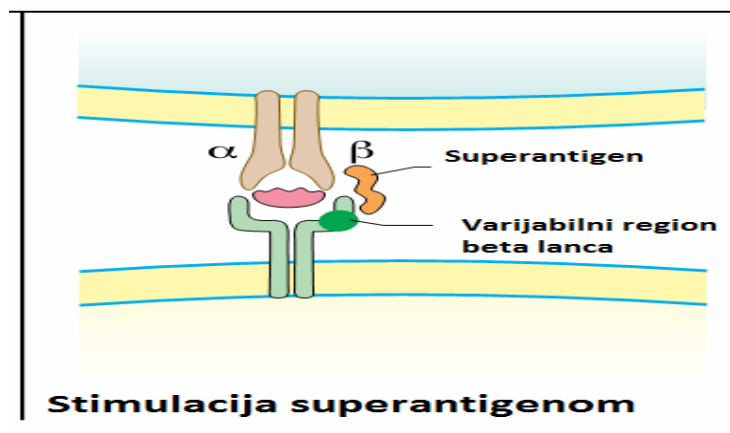
Uloga serumskih imunoglobulina u patogenezi LP-a je diskutabilna. Izgleda da je LP u slabijoj korelaciji sa humoralnim nego sa celularnim imunim odgovorom. Kao mogući etiološki faktor OLP-a najčešće se pominje autoimunitet, zbog različitih autoimunih karakteristika ove bolesti kao što su: veza OLP-a sa drugim autoimunim bolestima, izražena depresija imuno-supresorne aktivnosti, prisustvo autocitotoksičnih T-ćelijskih klonova na mestu lezije itd.

Istovremeno, brojnim histološkim i imunohistohemijskim studijama, ispitivanjem profila citokina u oboleloj koži i limfocitima izolovanim iz lezija i profila V $\beta$  porodica receptora za antigen T-ćelija, pokazano je da T-limfociti zauzimaju središnje mesto u patogenezi lihena (Regezi i sar., 1994, Farthing i sar., 1992). Pominjani su mnogobrojni etiološki činioci i mehanizmi, ali ni jedan od njih ne pruža zadovoljavajuće i jedinstveno rešenje o antigenu ili antigenima koji pokreću imunsku reakciju i dovode do karakterističnih histopatoloških promena.

U lezijama lihena povećan je broj antigen-prezentujućih ćelija na prvom mestu Langerhansovih ćelija i dermnih dendrocita (Farthing i sar., 1992, McCartan & McCreary, 1997, Walton i sar., 1996) Langerhansove ćelije iskazuju povećane koncentracije MHC molekula II klase što olakšava prezentovanje antigena T-ćelijama (Sugerman i sar., 1995, Simark-Mattsson i sar., 1994). Kako se radi o autoimunoj

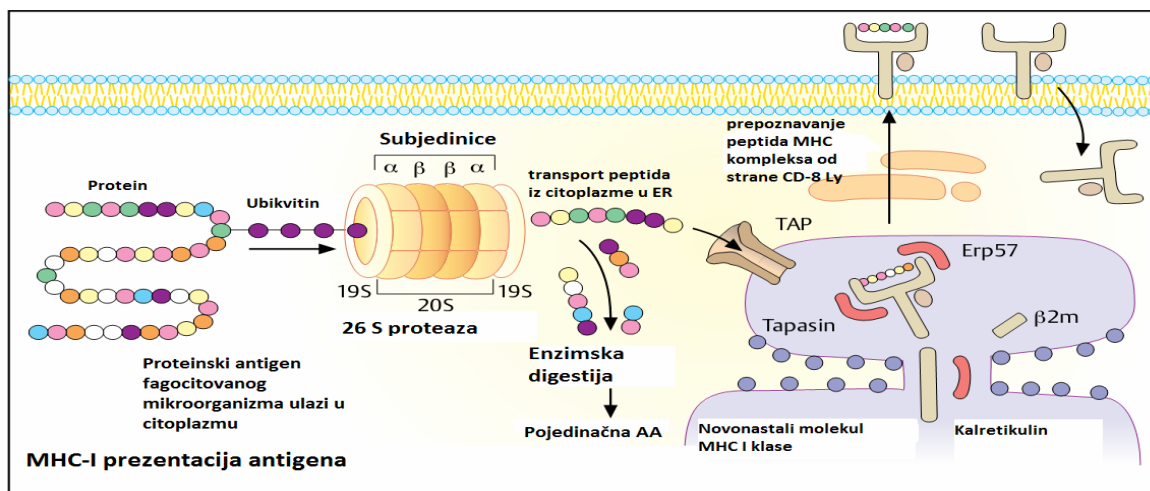
reakciji kada je u pitanju lihen planus imunohistohemijskim ispitivanjima je utvrđeno prisustvo povećanog broja intraepitelnih T limfocita u oralnoj sluznici (Zhou i sar., 1996). Istom tehnikom ispitana je učestalost ekspresije 11 V $\alpha$  i V $\beta$  porodica receptora za antigen T-ćelija (TCR) u lezijama oralnog lihena (Kainulainen i sar., 1997). Između 18-40% svih limfocita u infiltratu iskazivalo je TCR sa V $\alpha$ 2 i V $\beta$ 3 segmentima. Iako se radi o relativno ograničenom broju porodica V segmenata, autori su zaključili da ovi rezultati upućuju na stimulaciju T-ćelija **superantigenom** (Kainulainen i sar., 1997) (Slika 6). Sugerman i sar. (Sugerman i sar., 1995) su ustanovili povećanu ekspresiju protein toplotnog šoka (hsp 70) u lezijama oralnog lihena i visok indeks proliferacije lezijskih T limfocita stimuliranih PPD koji sadrži hsp 70. Moguće je da različiti egzogeni agensi podstiču ekspresiju hsp u keratinocitima oralne sluzokože koji zatim postaju meta citotoksičnih T-ćelija.

Koristeći znatno osetljiviju tehniku lančane reakcije polimeraze (PCR) sa revernom transkripcijom, Zhou i sar. (Zhou i sar., 1996) i Thomas i sar. (Thomas i sar., 1997) su ustanovili izvestan stepen oligoklonalnosti T-limfocita u infiltratu. Međutim, neujednačenost u ekspresiji ograničenog repertoara V $\beta$  porodica TCR među bolesnicima isključuje mogućnost superantigena u etiopatogenezi i potvrđuje heterogenost bolesti u pogledu prirode antigenskog stimulusa (Shimizu i sar., 1997).

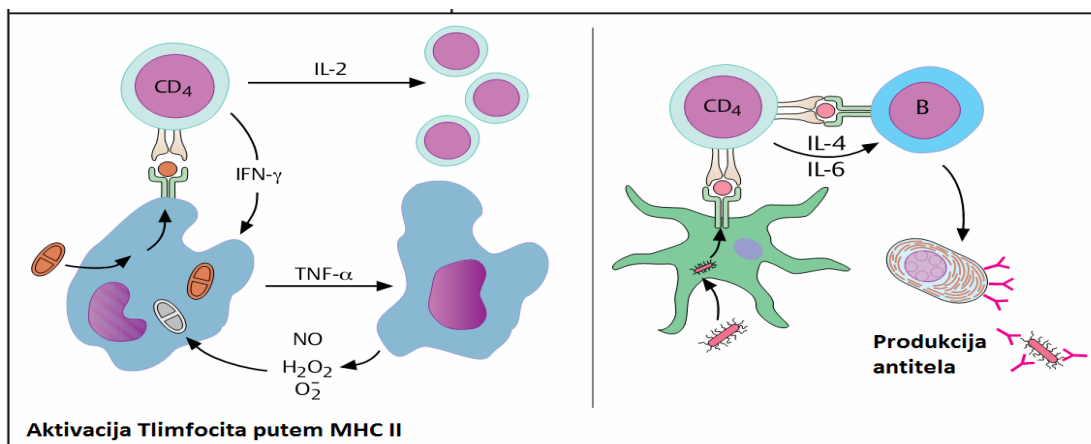


**Slika 6.** Stimulacija superantigenom T-limfocita (Preuzeto iz „Color atlas of immunology“ Burmeister G, Pezzutto A, 2003, strana 37).

Pretpostavlja se da T limfociti, nađeni u subepitelijalnoj zoni iniciraju ili stimulišu patogenetska zbivanja odgovorna za nastanak LP-a. Inflatatorne ćelije i keratinociti eksprimuju membranske receptore i proizvode citokine koji zajedno indukuju signalnu mrežu, krucijalnu u patogenezi OLP-a. Ova mreža je uglavnom sastavljena od pro- i antiapoptotičkih signala. Većina T ćelija unutar epitelijuma predstavlja aktivirane CD8+ limfocite, koji su uglavnom citotoksični, i prepoznaju antigen koji je vezan za lezijske keratinocite MHC I klase. Limfociti lamine proprije mukoze su uglavnom CD4+ T helper ćelije, i prepoznaju antigen MHC II klase, prezentovan od strane LC ili keratinocita. Da bi se razvila perzistentna T ćelijska infiltracija i CD8+ T ćelijska citotoksična aktivnost i apoptoza kod OLP-a, izgleda da je neophodna istovremena antigena prezentacija MHC I i MHC II klase antigena CD8+ i CD4+ T ćelijama (Slika 7 i 8).



**Slika 7.** MHC-I prezentacija antigena (Preuzeto iz „Color atlas of imunology“ Burmeister G, Pezzutto A, 2003, strana 57).

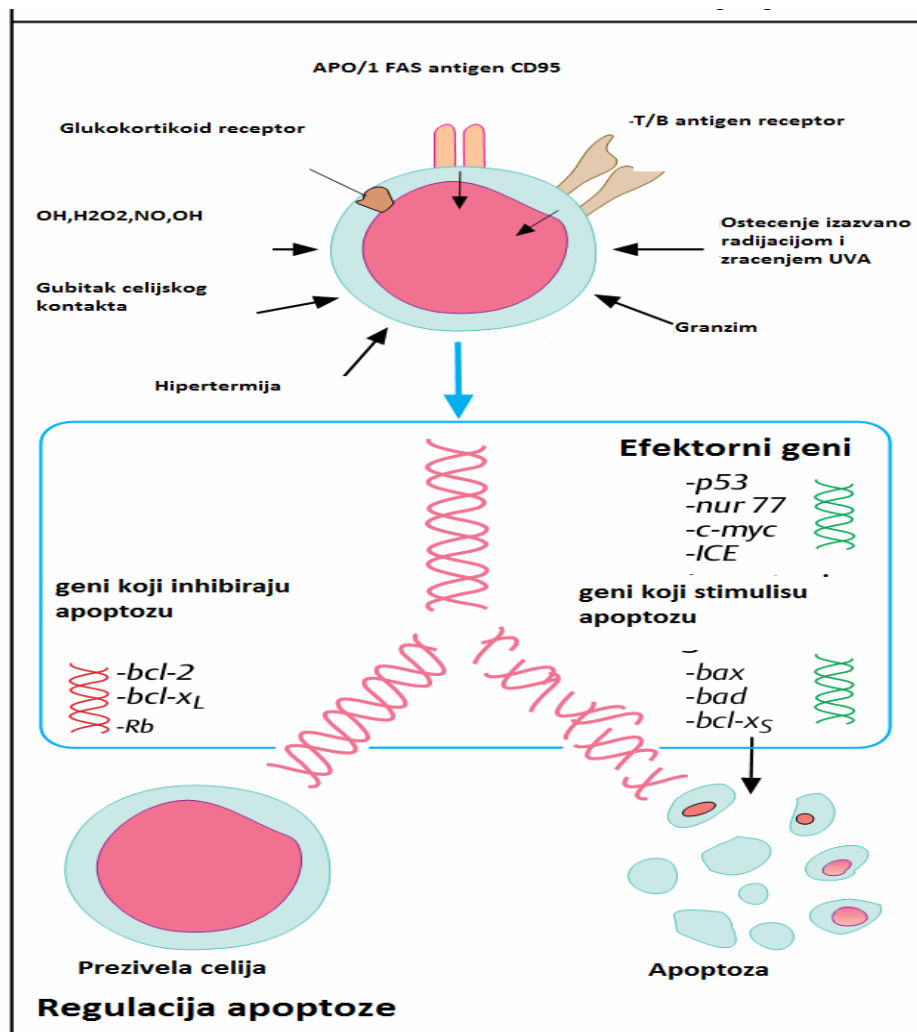


**Slika 8.** Aktivacija T-limfocita putem MHC II (Preuzeto iz „Color atlas of imunology“ Burmeister G, Pezzutto A, 2003, strana 55).

Najupadljiviju histopatološku osobenost lihenских reakcija u celini predstavlja oštećenje bazalnih keratinocita združeno sa infiltracijom mononuklearnih ćelija u papilarnom dermu i manjim ili većim stepenom egzocitoze (Regezi i sar., 1994, Farthing i sar., 1992).

Ultrastrukturnim ispitivanjima je potvrđeno da bazalni keratinociti podležu procesu **apoptoze** tj, programirane smrti (Regezi i sar., 1994, Farthing i sar., 1992, Simark-Mattsson i sar., 1994, Matthews i sar., 1984) (Slika 9). Morfološki izraz apoptoze u lihenу su koloidna tela, po pravilu prisutna u grupama u papilarnom dermu. Dva osnovna načina indukcije apoptoze posredovana su interakcijom membranskog Fas liganda sa odgovarajućim receptorom (Fas; CD95) na ciljnoj ćeliji i delovanjem perforina i grenzima koje iz granula oslobađaju citotoksični T limfociti i NK ćelije (Ishii, 1987).

Neki autori smatraju da ne postoje značajne razlike u ekspresiji Fas/FasL na keratinocitima kod oralnog lihen planusa u korelaciji sa zdravim osobama.



**Slika 9.** Regulacija apoptoze (Preuzeto iz „Color atlas of imunology“ Burmeister G, Pezzutto A, 2003, strana 57).

Nasuprot tome Shimizu i sar. (Shimizu i sar., 1997) su imunohistohemijskim ispitivanjima pokazali da većina CD8<sup>+</sup> T- limfocita u dermnom infiltratu i epidermu bolesnika sa lihen planusom kože sadrži perforin i grenzim B. Imunoelektronskom mikroskopijom je utvrđeno da limfociti izlučuju molekule grenzima B koji se vezuju za okolne keratinocite sa znacima apoptoze (Zhou i sar., 1996).

Perforin i grenzimi izazivaju apoptozu ciljnih ćelija aktivišući enzim koji konvertuje interleukin 1 i srodne cisteinske proteaze koje pokreću proces apoptoze

(Ishii, 1987). Citotoksični CD8<sup>+</sup> T- limfociti, putem perforina i grenzima direktno

izazivaju apoptozu keratinocita u koži kod obolelih sa lihenom.

Većina limfocita lamine proprije mukoze su CD4<sup>+</sup> T pomoćne ćelije i oni uglavnom nisu citotoksični. U ranim fazama razvoja oboljenja MHC II klasa antigena može biti prezentovana CD4<sup>+</sup> T pomoćnim ćelijama, posredstvom Langerhansovih ćelija (LC) ili posredstvom keratinocita (Sugerman i sar., 2000, Bramanti i sar., 1995).

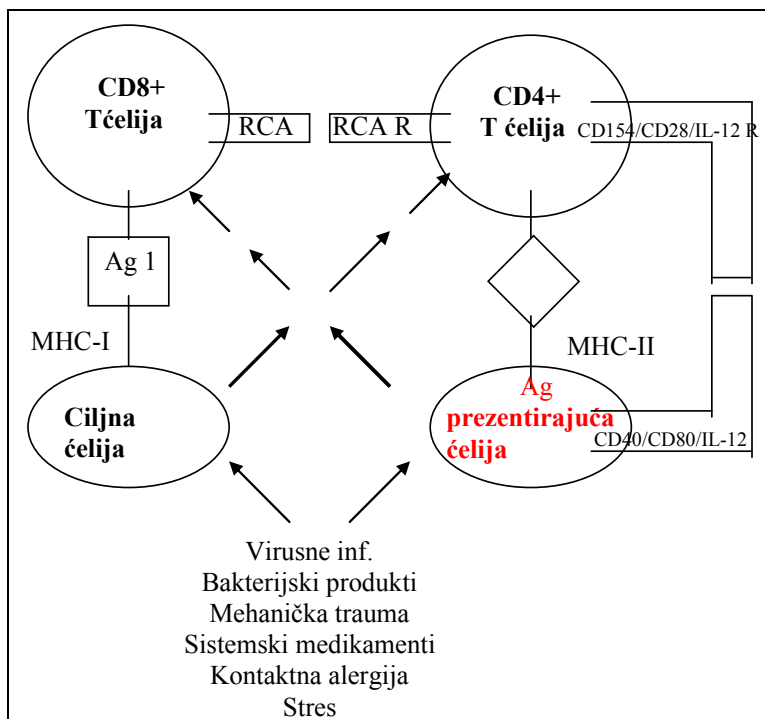
LC i keratinociti su takođe sposobni za produkciju IL-12 (Chaiyarit i sar., 1999). Antigena prezentacija i sekrecija IL-12 od strane LCs i keratinocita, može uticati na CD4<sup>+</sup> T pomoćne ćelije da sekretuju Th1 citokine - IL-2 i IFN-  $\gamma$  (Sugerman i sar., 1995). Shodno tome CD8<sup>+</sup> citotoksične T ćelije mogu biti aktivirane kombinovanim dejstvom:

- a) antigena udruženih sa MHC I klasom na bazalnim keratinocitima i
- b) Th1 CD4<sup>+</sup> T ćelija koje oslobađaju IL-2 i IFN gama.

Da bi se razvila perzistentna T ćelijska infiltracija i CD8<sup>+</sup> T ćelijska citotoksična aktivnost kod OLP-a, izgleda da je neophodna istovremena antigena prezentacija MHC I i MHC II klase antigena CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T ćelijama (Slika 10). Antigen za LP je nepoznat, iako može biti i sam peptid, ali je velika verovatnoća da keratinociti eksprimuju LP antigen samo na mestu lezije. Klinička rasprostarnjenost i raspored LP lezija u mnogome zavise od distribucije LP antigena.

Rani stupanj formiranja lezije lihen planusa može biti pojava antigena keratinocita ili njihovo otkrivanje u narednim lezijama prouzrokovano sistemskim lekovima (reakcija na lihenoidne lekove), kontaktom sa alergenima u stomatološkom materijalu za popravke ili pasti za zube (hipersenzitivna reakcija na kontakt), mehaničkom traumom (Kebnerov fenomen), bakterijskom ili virusnom infekcijom, ili nepoznatim uzročnikom, mogu biti pokretač mehanizma koji će na mestu buduće LP lezije izvršiti demaskiranje antigena na membrani keratinocita.





**Slika 10.** Teorija patogeneze OLP-a (Preuzeto i modifikovano prema Sugerman PB i sar. 1995).

Mnogi istraživači su identifikovali povećanu ekspresiju **“heat-shock” proteina (HSP)** na OLP lezijskim keratinocitima *in situ* (Thomas i sar., 1997, Sondell i sar., 1996, Smoller & Glusac, 1994). Moguće je da povećana HSP ekspresija od strane oralnih keratinocita predstavlja ključnu pojavu u patogenezi LP-a, koja povezuje brojne egzogene faktore (sistemske lekove, kontaktne alergene, mehaničku traumu, bakterijske i virusne infekcije) sa endogenim genetskim i imunološkim mehanizmima koji se razvijaju kod ove bolesti. HSP ekspresija od strane oralnih keratinocita bi mogla biti auto antigena za bolesnike sa OLP-om (Thomas i sar., 1997).

Podložnost OLP može prosteći iz poremećene regulacije HSP gena od strane uzdrmanih oralnih keratinocita ili iz nesposobnosti supresije imune reakcije koja sledi nakon samoreprodukcije HSP, što je verovatnije usled smanjene imune reakcije.

Ipak, značajan deo OLP lezijskih ćelija ne pripada istom klonu ćelija (Chaiyarit i sar., 1999) i nisu svi klonovi CD8+T ćelija, izolovanih iz LP lezija, citotoksični prema autolognim lezijskim keratinocitima *in vitro* (Sugerman i sar., 1995). Analiza ovih

podataka govori u prilog tome da je jedan deo T ćelija u OLP limfocitnom infiltratu neaktiviran i nespecifičan za LP antigen.

Promene na bazalnoj membrani kod LP-a su česte i podrazumevaju prekide kontinuiteta membrane, njeno grananje i duplikature (Zhao i sar., 2001, Fukaura i sar., 1996). Intrigantno pitanje vezano za LP je šta se javlja prvo - apoptoza keratinocita ili propadanje bazalne membrane. Oba mehanizma mogu biti povezana sa patogeneom OLP-a. Oštećenje bazalne membrane može podstaći apoptozu keratinocita i takvi keratinociti mogu postati nesposobni za obnovu oštećene bazalne membrane.

Oštećenje bazalnih keratinocita je praćeno promenama u kinetici i diferencijaciji epiderma u celini tako da se prilikom histološkog pregleda uočavaju hiperplazija granuloznog sloja i ortohiperkeratoza (Regezi i sar., 1994). Povećana keratinizacija se ogleda u ekspresiji himotripsinskog enzima (SCCE) koji, u fiziološkim uslovima, nije iskazan u epitelu bukalne sluznice (Giannelli i sar., 1996).

Značajne promene kod obolelih od lihenia trpi i zona bazalne membrane epitela, posebno u predelima subepidermnih rasepa koji su najčešće lokalizovani u predelu lamine lucide (Zhao i sar., 1997). Povećana je sinteza laminina-5 i poremećena je njegova distribucija (Zhou i sar., 2002). U akutnom liheni smanjena je ekspresija laminina, kolagena tipa IV i tkivnog inhibitora matriksnih metaloproteinaza (TIMP)-2, dok je povećana aktivnost gelatinaza A i B koje razaraju komponente zone bazalne membrane (Bischoff i sar., 1993).

**Matriks metaloproteinaza-9 (MMP-9)**, koju sekretuju T ćelije, može doprineti oštećenju bazalne membrane kod OLP-a (Kainulainen i sar., 1997). Matriks metaloproteinaze predstavljaju familiju od približno 20 endoproteinaza koje sadrže cink. MMP-2 i MMP-3 su uglavnom prisutne u epitelu bolesnika sa OLP-om, dok je MMP-9 identifikovan unutar inflamatornog infiltrata lamine proprije mukoze. Matriks metaloproteinaze imaju slične biohemijske osobine, ali svaka ponaosob zadržava jasne specifičnosti supstrata. Proteoliza MMP-a je regulisana endogenim inhibitorima, uključujući i tkivne inhibitore metaloproteinaza (TIMP). TNF-alfa može stimulisati T ćelije na sekreciju MMP-9 (Fukaura i sar., 1996). Kod obolelih od LP-a oštećena bazalna membrana više ne šalje signale za revitalizaciju keratinocita, što može delovati kao podsticaj za njihovu apoptozu. U skladu sa tim, oštećenje bazalne membrane

indukovano aktivnošću MMP-9 može olakšati prolaz antigen specifičnih CD8+ T citotoksičnih ćelija unutar OLP-om zahvaćenog epitela.

Na uzorcima OLP lezija je ustanovljena povećana gustina mast ćelija (Zhao i sar., 2001). Njihovom degranulacijom oslobađa se čitav niz zapaljenskih medijatora kao što su TNF-  $\alpha$ , *chymas*-a i *tryptas*-a. Mast ćelijska proteaza - *chymas*-a, poznati je aktivator MMP-9.

Matriks metaloproteinaze se, inače sekretuju kao inaktivni proenzimi, koji se nakon aktivacije ubrzano razgrađuju. Na mestu oštećenja bazalne membrane kod OLP-a mogu se identifikovati grupe mast i intraepitelnih CD8+ T ćelija (Fukaura i sar., 1996). Ovi podaci nas navode na pretpostavku da mast ćelije kod OLP-a igraju važnu ulogu u procesu oštećenja bazalne membrane. Takođe je bitno istaći i mogućnost migracije CD8+ T ćelija u epitel kroz stvorene pukotine u membrani.

Glavna funkcija MMP je proteolitička degradacija proteina u matriksu vezivnog tkiva. MMP dele biohemijske karakteristike, ali zadržavaju specifičnosti po pitanju različitih supstrata.

Želatinaze (npr. MMP-2 i -9) cepaju kolagen IV, a stromelizini (npr. MMP-3 i -10) cepaju kolagen IV i laminin. MMP proteoliza je regulisana aktiviranjem endogenih inhibitora, uključujući i inhibitore metaloproteinaze u tkivima (TIMP), što stvara neaktivne komplekse enzimskih inhibitora sa MMP ili proMMP.

Odgajani plutajući materijal iz OLP lezionih T ćelija sadržao je veće koncentracije MMP-9 od onog kod OLP ili onih T ćelija u zdravoj perfernoj krvi, što upućuje na prisustvo dodatnih MMP-9 aktivatora u plutajućem materijalu OLP lezionih T ćelija.

MMP-9 aktivatori oslobođeni iz T ćelija pomažu u aktiviranju pro MMP-9 što dovodi do oštećenja bazalne membrane.

**Hemokini** predstavljaju superfamiliju proinflamatornih citokina koje proizvode gotove sve somatske ćelije (aktivirani T limfociti, keratinociti, mast ćelije, epitelne bronhijalne ćelije i drugo). Oni pokreću procese migracije i degranulacije mast ćelija (Bridoux i sar., 1997). RANTES (medijatori čije je aktivacija regulisana T ćelijskom ekspresijom i sekrecijom), sekretovani od strane lezijskih T ćelija, mogu takođe prolongirati opstanak inflamatornih ćelija kod OLP-a i na taj način doprineti hronicitetu oboljenja. RANTES igraju ključnu ulogu u obnavljanju limfocita, monocita, prirodnih ćelija ubica, eozinofila, bazofila i mast ćelija. Sekrecija T ćelijskih RANTES kod OLP-a

se povećava stimulacijom TNF- $\alpha$  *in vitro* (Khan i sar., 2003). Kod OLP su identifikovani sledeći receptori na površini ćelija CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR9 i CCR10.

RANTES koji izlučuju OLP leziona T ćelija može privući mastocite u toku razvoja OLP lezija i potom stimulisati razgrušavanje mastocita. Razgrušane mastocite u OLP oslobađaju TNF- $\alpha$  i himazu koji naizmenično povećavaju koncentraciju izlučivanja RANTES-a od strane OLP lezionih T ćelija. Ovakav ciklični mehanizam može biti u suštini hroničnog karaktera bolesti.

**TGF- $\beta$  sekretujuće T ćelije** predstavljaju posebnu populaciju specifičnih CD4+ T regulatornih ćelija označenih kao Th<sub>3</sub> (Simon & Gruschwitz, 1997). Ove ćelije vrše supresiju imunog odgovora na auto-antigene i tako sprečavaju autoimunu reakciju (Luger i sar., 1997). TGF- $\beta$ <sub>1</sub> utiče na smanjenje produkcije APC (antigen prezentirajućih ćelija) i IL12, i na taj način blokira Th<sub>1</sub> diferencijaciju CD4+ T ćelija, sekreciju IFN- $\gamma$  i odgovor citotoksičnih T ćelija. Imajući to u vidu, moglo bi se reći da je hronicitet kod OLP-a posledica izostanka adekvatnog TGF- $\beta$ <sub>1</sub> imunosupresivnog odgovora, što podrazumeva:

1. nedovoljan broj TGF- $\beta$ <sub>1</sub> sekretujućih Th<sub>3</sub> regulatornih T ćelija
2. blokiranje sekrecije TGF- $\beta$ <sub>1</sub>
3. sekrecija nefunkcionalnih TGF- $\beta$ <sub>1</sub>
4. defektna ili neadekvatna ekspresija receptora za TGF- $\beta$ <sub>1</sub> ili
5. defektna intracelularna signalizacija nishodno od  $\beta$ <sub>1</sub> receptora

Balans između TGF- $\beta$ <sub>1</sub> i IFN- $\gamma$  signalizacije može odrediti nivo imunoloških aktivnosti u OLP lezijama. Prevelika produkcija IFN- $\gamma$  od strane Th<sub>4</sub> T ćelija na lokalnom nivou u OLP lezijama može smanjiti imunosupresivno dejstvo TGF- $\beta$ <sub>1</sub> i povećati prisustvo keratinocita MHC klase II i aktivnosti CD8+ citotoksičnih T ćelija.

**TNF- $\alpha$**  poreklom iz keratinocita ili CD95L (Fas ligand) mogu inicirati apoptozu T ćelija posredstvom TNF R1, ili CD95 (Fas), čija se ekspresija kod OLP-a potencira T ćelijskom infiltracijom. Ipak, citotoksično dejstvo se uglavnom ograničava na imunosupresivne T ćelije kao što su one koje proizvode TGF- $\beta$ <sub>1</sub>. Imajući u vidu činjenicu da intraepitelne T ćelije kod OLP-a ne proizvode imunosupresivni citokin TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, nekontrolisana imunološka aktivnost OLP lezijskog epitela bi mogla biti očekivana (Jonuleit i sar., 1996).

Aktivirane citotoksične T ćelije ubijaju bazalne keratinocite. Pretpostavlja se da je apoptoza mehanizam ćelijske smrti keratinocita. Citotoksične T ćelije luče TNF- $\alpha$  koji pokreće apoptozu keratinocita. Precizan mehanizam je i dalje nejasan. Mogući mehanizmi apoptoze keratinocita su:

1. vezivanje TNF- $\alpha$  koji luče T ćelije za TNF- $\alpha$  R1 receptora na površini keratinocita.
2. Jon CD95L (Fasov jon) sa površine T ćelija se vezuje sa CD95 sa površine keratinocita.
3. Granzim B koji luče T ćelije ulazi u keratinocite preko perforinom prouzrokovanih pora membrane.

Na keratinocitima lihenških lezija, naročito u bazalnom sloju, ustanovljena je povećana ekspresija receptora za faktor nekroze tumora (TNF- $\alpha$ ) (Sugermann i sar., 1996). TNF- $\alpha$  je proinflamatorni citokin koji može da indukuje apoptozu nakon vezivanja za odgovarajući receptor na ciljnoj ćeliji (Yamamoto i sar., 1994). Ovaj citokin menja antigen prezentujuću funkciju i varijabilnost Langerhansovih ćelija u epidermu, podstiče ekspresiju adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama derma omogućavajući na taj način priliv leukocita i menja ekspresiju drugih citokina (Yamamoto i sar., 1994, Eversole i sar., 1994). Takođe u bazalnim keratinocitima lihenške lezije povećana je ekspresija p53 i bcl-x protein koji učestvuju u različitim fazama apoptoze.

Kod pojedinih osoba, nosioca autoreaktivnih T ćelija može doći do nastanka autoimunog oboljenja, dok se kod drugih autoimuno oboljenje neće razviti, što u najvećoj meri zavisi od stepena aktivacije antigen prezentirajućih ćelija (APC). Da bi stimulisale T ćelijski odgovor, dendritične (DCs) i Langerhansove ćelije (LC) se moraju podvrgnuti procesu terminalne diferencijacije nazvanom "maturacija". Stimulusi za DC i LC maturaciju podrazumevaju različite citokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , itd), koji se proizvode i oslobađaju uz pomoć aktiviranih T ćelija, nekrotičnih ćelija, HSP-a, MMP-9, različitih alergena, virusne RNA, bakterijskih lipopolisaharida itd. Lokalni poremećaj citokinske mreže bez sumnje predstavlja važan činilac u prvim stadijumima nastanka lihenške lezije i akumulacije limfocita i drugih ćelija periferne krvi na mestu lezije (Regezi i sar., 1994, Farthing i sar., 1992, Regezi i sar., 1996).

Ističe se značaj IL-1, interferona IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i IL-6. IL-1 je među prvim citokinima koje proizvode Langerhansove ćelije i keratinociti pod delovanjem raznovrsnih stimulusa (antigeni, UV zračenje, mehaničko oštećenje kože i drugo) (Farthing i sar., 1992, Yamamoto i sar., 1994)(Murphy i Liu, 1997).

U sadejstvu sa IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , IL-1 ne endotelnim ćelijama krvnih sudova derma podstiče ekspresiju adhezivnih molekula ICAM-1, E-selektina (CD26 E) i CD31 koji su neophodni za transendotelnu migraciju i pristizanje leukocita u leziju (Yamamoto i sar., 1994) (Wilson, 1896). Ovi citokini indukuju ekspresiju MHC molekula II klase (HLA-DR) i ICAM-1 na keratinocitima i antigen prezentujućim ćelijama epiderma i derma, podstičući tako aktivaciju i efektorske funkcije T-limfocita.

U lezijama lihen planusa potvrđena je značajna ekspresija adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama, Langerhansovim ćelijama i makrofagima koji su neophodni za interakciju sa leukocitima i drugim efektorskim ćelijama (Steinman i sar., 2000, Gallucci & Matzinger, 2001).

U regionalnim limfnim žlezdama zrele LC, koje su endocitovale apoptotične oralne keratinocite, vrše aktivaciju keratinocito-specifičnih CD4+ T ćelija. CD4+ T ćelijska aktivacija može zavisiti od prirode maturacionog stimulusa koji je usmeren ka LC ćelijama. Th<sub>1</sub> ili Th<sub>2</sub> citokini oslobođeni iz aktiviranih keratinocito-specifičnih CD4+ T helper ćelija stimulišu keratinocito-specifične CD8+ T citotoksične ćelije ili B ćelije, što sve vodi ka ćelijski ili antitelom posredovanoj, anti-keratinocitnoj, autoimunoj inflamaciji. U tom smislu, peptidi bazalnih keratinocita, inicirajući Th<sub>1</sub> odgovor, mogu aktivirati anti-keratinocitne, auto-reaktivne CD8+ T citotoksične ćelije, što će rezultirati OLP-om.

Pod normalnim okolnostima, APC koje sadrže peptide, koje vode poreklo od apoptotičnih ćelija, ne primaju stimulus za maturaciju i stoga ne pokreću autoreaktivni T ćelijski odgovor (Thorn i sar., 1988, Miyagawa i sar., 1985). Virusna infekcija oralne mukoza utiče na nastanak T ćelijskog odgovora koji obično ne progredira u OLP. Slično tome, mehanička trauma oralne mukoze može uzrokovati degranulaciju mast ćelija koja takođe obično ne progredira u OLP.

Dakle, šta utiče na predispoziciju prema OLP-u? To može biti kombinacija različitih faktora, kao što su poremećena regulacija oralnih keratinocita, antigena

ekspresija, perzistencija zrelih oralnih LC-a, cirkulišuće autoreaktivne T ćelije i poremećena imunosupresivna aktivnost nakon autoantigenog prepoznavanja.

Identifikovana su dva tipa TNF $\alpha$  receptora: 55-kD TNFR1 i 75-kD TNFR2. Oba tipa vezuju TNF $\alpha$  i njegov homotrimer limfotoksin- $\alpha$ 3 (LT $\alpha$ 3) kao LIGAND, aktivirajući na taj način NF-kB i mitogeno-aktiviranu proteinsku kinazu (MAPK). TNFR1 tip je široko rasprostranjen u tkivima uključujući epitelne ćelije, dok je TNFR2 tip zastupljen u hematopoetičnim tkivima, naročito kod aktiviranih T i B ćelija. Smanjena otpornost na infekcije kandidom i listerijom, kao i nepravilnosti u produkciji antitela, potvrđeni su kod tipa TNF $\alpha$ , TNFR1, i TNFR2 kod onesvešćenih miševa.

Funkcionalna analiza je pokazala da mutacija T u G na poziciji +587 TNFR2 tipa ima za rezultat zamenu metionina argininom, što dovodi do smanjene aktivacije NF-kB posredstvom TNFR2, utičući tako na apoptozu podstaknutu TNF- $\alpha$  receptorima.

Još jedna studija sugerise da zamena amino-kiselina (TNFR2 +587 G) može uzrokovati gubitak funkcije, što ima za posledicu preteranu proizvodnju upalnih citokina. Pokazano je da su TNF $\alpha$ 3 signali efektivniji kod TNFR2+587 G nego kod TNFR2+587 T, što vodi ka povećanoj produkciji IL-6 bez uticaja na afinitet TNF- $\alpha$  prema TNFR2.

Ovi rezultati sugrišu da je prekomerna produkcija TNF- $\alpha$  posredstvom TNFR2 povezana sa početkom ili napretkom oboljenja planusa kod japanskih ispitanika sa TNFR2 +587 G. Dokazano je da geni koji unapređuju TNF- $\alpha$  regulišu njihove nivoe, doprinoseći podložnosti planusu. Bilo bi zanimljivo proučavati polimorfnost gena TNF- $\alpha$  u kombinacijama.

## **1.5. Klinička slika**

Osnovna eflorescencija kod lihen planusa je poligonalna papula. Prema okolini jasno je ograničena, ravne površine, okomitih strana, voštano sjajnog izgleda, što se najbolje vidi ukoliko se posmatra sa strane. U početku, na mestu buduće papule uočava se mrlja veličine čiodine glave, koja brzo prerasta u solidnu papulu, nekada do prečnika 1cm, retko više. Boja papula je bledoružičasta do ljubičastocrvene. Tamnija boja je izrazitija kod starijih lezija, naročito hipertrofičnih. Na površini razvijene lihenske papule postoji beličasta mrežica koja predstavlja izraz gomilanja keratohijalinskih

zrnaca i jake granuloze, takozvane. Wickhmanove strije. Površina papule se ne ljušti, a prašinstvo deskvamacija može se videti samo ako se zagrebu lihenske ploče, tj. Konfluentne papule. Papule mogu biti pojedinačne ili grupisane u vidu linija, plakova i slično. Često, ali ne uvek lihenska papula pokazuje u centru ispupčenje.

Lihen planus se može ispoljiti na koži celog tela, lezije su obično simetrične, bilateralne. Predilekciona mesta su mu: podlaktice, bočne strane vrata, predeo pojasa, butine, potkolenice. Sluzokoža usne duplje i genitalije su takođe zahvaćeni. Na dlanovima, licu i tabanima nije uobičajena pojava LP.

Akutna erupcija lihena brzo se ispoljava na većim površinama tela. Češća je pojava inicijalnih lezija nakon kojih nastaje interval od jedne ili više nedelja kada ne izbijaju nove lezije. Inicijalne lezije su najčešće lokalizovane na ekstremitetima (Slika 11, Slika 12). U vreme akutne erupcije lihena trauma tipa linearne ogrebotine može izazvati pojavu izomornog nadražajnog efekta- Koebnerov fenomen, to jest pojavu lihenskih papula duž ogrebotine.

Lihenske papule traju nekoliko nedelja do meseci, retko duže, posle čega započinje njihova regresija. Na mestu papula duže vreme zaostaje hiperpigmentacija, što omogućava postavljanje dijagnoze i nakon prestanka oboljenja. Svrab je obavezan simptom LP-a.



**Slika 11.** OLP na ekstremitetima.





**Slika 12.** OLP na ekstremitetima.

Retki su bolesnici koji nemaju svrab. Intenzitet svraba varira od blagog do intenzivnog. LP se ubraja u monomorfne dermatoze ali se može ispoljiti različito u pogledu *morfologije, rasporeda i lokalizacije*. Morfološke specifičnosti su vezikule i bule. Erozije i ulceracije su retke, na bukalnoj sluzokoži i tabanima. Na mestu lihenskih lezija koje dugo traju može se javiti maligna alteracija, naročito na sluzokožama.

### **1.5.1. Podela LP po lokalizaciji**

#### **1.5.1.1. Lichen planus mucosae**

Ovaj oblik lihena čini 15-25% svih bolesnika. Može se javiti na sluzokožama izolovano ili zajedno sa promenama na koži (Silverman i sar., 1991). Tipične su promene na bukalnoj sluzokoži u vidu beličaste ili sivkaste mreže. Beličasta boja potiče od pojačane keratinizacije.

Grupice malih ovalnih papula mogu se naći odvojeno od mreže. Lihenske lezije se mogu naći na usnama, jeziku, nepcu, tonzilama, ezofagusu i celom dužinom gastrointestinalnog trakta, sve do rektuma i analne sluzokože (Slika 13).

#### **1.5.1.2. Oralni Lihen Planus (OLP)**

Za razliku od Lihen Ruber Planusa koji se manifestuje na koži i koji u velikom broju slučajeva ima spontane remisije (Altman & Perry, 1961), OLP se odlikuje izraženijim hronicitetom. Kod 15-35% bolesnika ovo oboljenje se javlja isključivo na oralnoj sluzokoži (Kaplan & Barnes, 1985).

OLP pokazuje ciklični obrazac egzacerbacija nakon perioda mirovanja, što može biti potencirano začinjenom hranom, stresom i drugim favorizujućim faktorima. Pacijentima bi trebalo skrenuti pažnju da izbegavaju hranu koja može inicirati pojavu oboljenja i na važnost održavanja dobre oralne higijene.

Promene se mogu javiti u bilo kom delu usne duplje, ali u najvećem broju slučajeva zahvaćeni su posteriorni delovi obrazne sluzokože. Lezije su najčešće bilateralne, mada se mogu javiti i unilateralno. Osim na sluzokoži obraza, najčešće lokacije lezija su na gingivi, jeziku, nepcu, usnama i podu usta (Cram & Muller, 1966).



**Slika 13.** OLP na tvrdom nepcu.

OLP se klinički manifestuje u više oblika. Opisano je šest različitih tipova oralnih lezija: retikularni, plakozni, atrofični, papularni, erozivni i bulozni.

a) Retikularni OLP

Retikularna forma OLP-a može imati prstenast ili trakast oblik (Wickham-ove strije). Uglavnom je bilateralna i javlja se na zadnjim delovima obrazne sluzokože, ali se može javiti na bilo kom delu usne duplje i protezati se do vermilionusa usana. Uglavnom je asimptomatska, tako da je mnogi bolesnici i ne primete. Retikularna forma OLP-a je forma koja se najčešće javlja (Altman & Perry, 1961) (Slika 14, Slika 15).



**Slika 14.** Retikularna forma OLP-a.



**Slika 15.** Retikularna forma OLP-a.

b) Erozivni OLP

Erozivni OLP je forma bolesti sa najizraženijom kliničkom simptomatologijom (Cram & Muller, 1966). Ovu formu OLP-a karakterišu manje ili veće regije jasno ograničenih erozija i ulceracija prekrivene pseudomembranama. Eritematozna zona, zajedno sa retikularnom komponentom, takođe može biti prisutna. Erozivni OLP se može javiti u bilo kom delu usne duplje, ali se najčešće viđa u posteriornim delovima sluzokože obraza, dorzumu i bočnim stranama jezika i na gingivi (Slika 16). Erozivne lezije mogu provocirati bolne i žareće senzacije. (Tydsley, 1974). Neki pacijenti opisuju i metalni ukus u ustima (Fellner, 1980).

Kod starijih bolesnika postoji tendencija javljanja erozija u inicijalnom periodu (Scully i sar., 1998). Ovu formu oboljenja je često teško tretirati i uglavnom su prisutni vrlo jaki bolovi. U pojedinim slučajevima kliničke promene kod erozivnog OLP-a mogu ličiti na oboljenja kao što su *erythema multiforme*, *pemphigoid cikatricialis*, *pemphigus vulgaris* ili *lupus discoides chronicus*.



**Slika 16.** Erozivna forma OLP-a.

### c) Atrofični OLP

OLP atrofičnog tipa se najčešće javlja na gingivi. Simptomi koji karakterišu ovaj oblik OLP-a podrazumevaju osetljivost na začinjenu hranu i iritaciju prilikom pranja zuba, što može doprineti lošem održavanju oralne higijene i eventualno dovesti do parodontopatije. Atrofični OLP-a često se pogrešno dijagnostikuje kao oboljenje parodonticijuma ili cikatricijalni pemfigoid, ili što je još gore, ostaje nedijagnostikovano.

### d) Papularni OLP

Papularni OLP sastoji se od sitnih papula nalik čiodinoj glavi (0.5 – 1 mm) koje se ponekad na ivicama spajaju u trake. Ova forma OLP-a takođe je asimptomatska.

### e) Plakozni OLP

Lezije plakoznog tipa su blago izdignute i najvećim delom homogeno bele, a svojim izgledom podsećaju na leukoplakiju. Pacijenti uglavnom nisu svesni njihovog postojanja. Ove lezije nestaju u potpunosti samo u 7% slučajeva.

### f) Bulozni OLP

Bulozni OLP manifestuje se u vidu malih bula, koje mogu biti bolne nakon rupturiranja. Ovaj oblik oboljenja je relativno redak (Scully i sar., 1998).

## **1.5.2. Kožni LP**

Lezije na koži se mogu pojaviti pre mukoznih ili, ponekad, zajedno sa njima (Lewis i sar., 1996). Lezije se obično javljaju na zglobovima i/ili potkolenicama, ali se u principu mogu javiti bilo gde na koži. Kod klasičnog LP-a promene obično nisu prisutne na licu i poglavini. Oboljenje se karakteriše purpurnim, poligonalnim i pruritičnim papulama. Papule su ugaonog oblika, u nivou kože, a na površini mogu biti

izražene beličaste linije (Wickham-ove strije). Lezije na koži se, za razliku od oralnih, obično povuku nakon dve godine (Lewis i sar., 1996). Kod 20% bolesnika oboljenje protiče bez simptoma (Edwards & Friedrich, 1988). Ukoliko postoji, hiperpigmentacija je jasno ograničena i privremena (Eisen, 1994).

#### **1.5.2.1. Genitalni LP (lichen planus genitalium)**

Lihen na genitalijama je češći kod muškaraca nego kod žena, i javlja se kod 25% obolelih. Lezije na muškim genitalijama se manifestuju u vidu papula, većinom na glansu penisa, sa mogućim pojavljivanjem na prepucijumu, skrotumu i perineumu. Simptomi kao što su svrab, žarenje i bol, mogu biti prisutni u toku seksualnog odnosa (Eisen, 1994).

Lezije na ženskim polnim organima manje su specifične i odlikuju se leukoplakičnim ili eritroplakičnim promenama sa različitim stepenom atrofije. Ove lezije na vagini i vulvi su slične kao na bukalnoj sluznici. Vulva je često zahvaćena kod žena sa LP-om, čak u 51% slučajeva (Pelisse, 1989). Lihen se na genitalijama može javiti izolovano, zajedno sa lezijama u ustima ili drugim mestima. Deskvamativni vaginitis je često posledica LP-a i može predstavljati osnovnu promenu kod ovog oboljenja (Scott & Scott, 1979). Ako su promene prisutne na vulvi vagine i gingivi, radi se o vulvo-vaginalno-gingivalnom sindromu (Mahood, 1983). Neprijatno žarenje i dyspareunia se pominju kao glavni subjektivni simptomi (Altman & Perry, 1961). Vaginalne priraslice mogu otežati polni odnos (Scott & Scott, 1979).

#### **1.5.2.2. Ungualni LP (lichen planus unguium)**

Tipične kožne i oralne lezije mogu biti praćene promenama na noktima u 1-16% pacijenata (Miyagawa i sar., 1985). Karakteristične promene na noktima su uzdužne pruge, pukotine i žlebovi, trošne ivice, gubitak distalnog dela nokta, odsustvo nokta, podnokatna hiperkeratoza i istanjenje nokatne ploče. Nokatne promene mogu se javiti samostalno kada se govori o idiopatskoj atrofiji kod dece, zatim zajedno sa lezijama sluzokože ili promenama na koži. Većina promena na noktima zavisi od stanja nokatnog matriksa (Miyagawa i sar., 1985).

### **1.5.2.3. Plantarni LP (lichen planus palmaris et plantaris)**

Lezije na dlanovima i tabanima se razlikuju po onima koje su na drugim lokalizacijama po obliku i boji lihenskih papula. Smeštene su bliže ivicama dlanova i tabana nego centru. Čine ih tvrde papule i nodulusi žućkaste boje. Retko se ispoljava ulceracijama, koje teško zarastaju, a zbog dužeg trajanja mogu dovesti do deformacije stopala. Svrab je u najvećem broju slučajeva odsutan.

## **1.5.3. Podela LP-a po morfologiji**

### **1.5.3.1. Hipertrofični LP (lichen hypertrophicus)**

Ovaj oblik lihena se uglavnom javlja na potkolenicama, što se dovodi u vezu sa venskom stazom. Na rukama i ostalim područjima je redak. Ispoljava se u obliku tvrdih verukoznih izraštaja koji često međusobno konfluiraju gradeći ploče. Dugo traju, ponekad i godinama. Odlikuju se intenzivnim svrabom, površina lezije je obično razgrebana sa krvavim krustama, ali je piodermija retka. Na mestu nekadašnjih lezija zaostaje hiperpigmentacija. Sličan izgled imaju lezije lichen simplex chronicus i lichen amyloidosus. Lezije mogu menjati boju od ljubičaste do zelene ili crne. Mogu biti pojedinačne ili multiple. Ovaj oblik je često prisutan kod bolesnika sa pozitivnom porodičnom anamnezom LP-a (Kaur i sar., 1987).

### **1.5.3.2. Folikularni lihen planus (lichen planus follicularis)**

Folikularne lihenske papule javljaju se u sklopu ostalih lezija na koži ali mogu se javiti i izolovano, pa je tada dijagnoza otežana. Ove vrste lezija se najčešće javljaju na pogravini, pazuhu i pubisu. Praćene su blagom deskvamacijom nakon čega ostaje ožiljna alopecija.



### 1.5.3.3. **Vezikulozni i bulozni lihen planus(lichen planus vesiculosus et bullosus)**

LP sa praćen pojavom plikova nije uobičajen i primećen je u samo 3.5% pacijenata (Okochi i sar., 1990). Mogu se razlikovati dva tipa vezikulobuloznog LP-a: bulozni LP i pemfigoidni LP.

Prvi, kojeg odlikuje pojava malih vezikula ili bula koje su u direktnoj vezi sa predjašnjim ili sadašnjim lihenskim plakovima. Bulozni LP se odlikuje pojavom vezikula i bula na već postojećim lezijama LP-a (Mora i sar., 1983). Bule se nalaze pod tenzijom, sa neznatno izraženom zapaljenskom reakcijom oko njih. *Nikolsky* i *Asboe-Hansen* znaci su pozitivni. Histopatološkom analizom otkriva se kompatibilnost sa tipičnim LP-om, kao i postojanje subepidermalne bule (Allen i sar., 1987).

Pemfigoidni LP se odlikuje buloznim promenama na koži, koja može i ne mora biti zahvaćena papuloznim lihenskim lezijama (Mora i sar., 1983). Smatra se da ova klinička varijanta oboljenja predstavlja asocijaciju LP-a i buloznog pemfigoida (BP). Istraživanja su, ipak pokazala da se antigen prisutan kod pemfigoidnog LP-a , razlikuje od onog kod BP-a (Cram & Muller, 1966). Na ekstremitetima se uglavnom javljaju bule pod tenzijom.<sup>133</sup> Kod pemfigoidnog LP-a su takođe opisane i oralne vezikule (Arndt i sar., 1987).

Kada je u pitanju histološka slika imunofluorescentni nalaz je tipičan za lihen ali se nalaze i depoziti IgG, IgM, C3 u izmenjenoj koži što odgovara histološkom nalazu kod pemfigoida. Pored toga u serumu kod obolelih od ovog oblika lihena se nalaze i antitela usmerena ka bazalnoj membrani. Verovatno se radi o postojanju oba entiteta

### 1.5.3.4. **Erozivno-ulcerozni lihen planus (lichen planus erisivus et ulcerosus)**

Ove lezije se najčešće javljaju na oralnoj sluzokoži, na mestu lihenskih lezija a nešto ređe na tabanima.

#### **1.5.3.5. Atrofični lihen planus (Lichen atrophicus)**

Atrofija nastaje kao posledica iščezavanja anularnih ili regresije hipertrofičnih lezija, a javlja se kod folikularne i bulozne forme lihena. Najčešća lokalizacija atrofične forme je na potkolenicama.

#### **1.5.3.6. Aktinična lihenoidna erupcija (lichen planus actinicus)**

Aktinični LP je dermatoza koja se najčešće javlja na delovima koji su izloženi sunčevim zracima i teoretski se smatra varijantom pigmentnog LP-a (Almukahal, 1996).

Ispoljava se na otkrivenim površinama obično na licu. Oboljenje je opisano kod mladih osoba sa srednjeg i dalekog istoka i istočne Afrike. Nokti nisu zahvaćeni, a poglavina i sluzokoža usne duplje retko.

#### **1.5.3.7. Eritematozni lihen (lichen planus erytematosus)**

Eritematozni LP je forma LP-a koja se retko javlja. Lezije kod ovog oblika lihena čine svetlocrvene meke papule, koje ne svrbe. Mogu biti prisutne lezije na sluzokoži i noktima. Asimptomatske papule se mogu javiti na trupu i ekstremitetima. One su jarko crvene, mekane, a na pritisak pobele (Black, 1992). Histopatološke karakteristike su u skladu sa klasičnim LP-om (Kofoed & Wantzin, 1985).

#### **1.5.3.8. Gutatni lihen planus (lichen planus guttatus)**

Lezije su male, 1-2mm u prečniku, jedva vidljive, ali mogu biti i veće, pa podsećaju izgledom na gutatnu psorijazu. Histološka slika je tična za lihen planus.

#### **1.5.3.9. Eksfolijativni lihen planus (lichen plannus exfoliativus)**

Retko, lihen se može ispoljiti eritrodermijom. Nekad, lezije mogu konfluirati kod akutnog i subakutnog lihen planusa.

#### **1.5.3.10. Pigmentni lihen planus (lichen planus pigmentosus)**

Makulozna hiperpigmentacija uglavnom zahvata lice i ruke, mada može zahvatiti i druge delove tela. Sluzokože, dlanovi i tabani nikada nisu zahvaćeni.

#### **1.5.3.11. Lichen planus mixtus typus erytematodusus**

Do sada je objavljeno više radova o bolesnicima koji su imali promene na koži sa odlikama eritemskog lupusa i lihen planusa. Svi su imali hronične atrofične lezije, kao kod diskoidnog i eritemskog lupusa, na licu, vratu, i gornjem delu grudnog koša a većina njih retikularno raspoređene beličaste lezije u usnoj duplji.

Neki su imali verukozne lezije (Lin i sar., 1986). Kod njih su imunofluorescentnim pregledom nađeni zrnasti depoziti IgG u zoni bazalne membrane (Feurman & Sandbank, 1971).

Indirektnim imunofluorescentnim pregledom nađen je za lihen planus specifični antigen u zrnastom sloju. Još uvek nije potpuno jasno da li se radi o specifičnoj varijanti lihena ili o koegzistenciji diskoidnog i eritemskog lupusa i lihen planusa.

### **1.5.4. Podela LP po rasporedu lezija:**

#### **1.5.4.1. Anularni lihen planus**

Anularni LP se karakteristično javlja na penisu i skrotumu, a odlikuje se papulama koje se uvećavaju ka periferiji, dok u centralnom delu one nisu prisutne. Anularne lezije se češće javljaju kod pripadnika crne rase (Black, 1992).

#### **1.5.4.2. Linearni lihen planus (lichen planus linearis)**

Linearne lezije nastaju ili kao Koebnerov fenomen ili su papule raspoređene u vidu tanke linije koja se može prostirati duž ekstremiteta, što je retko, češće se javljaju kod dece. Zosteriformne lezije duž nerva opisane su u predelu grudi i ekstremiteta. Ovaj oblik lihena treba razlikovati od linearne psorijaze i linearnih nevusa.

## 1.5.5. Posebni oblici LP-a

### 1.5.5.1. Porodični LP

Razvoj tipičnih lihenskih promena među članovima jedne familije predstavlja familijarni ili porodični LP. U najvećem broju slučajeva javlja se kod sestara (Magnusson, 1955). Klinički, ovaj tip izgleda identično kao i klasični LP. Porodični LP ima tendenciju učestale spontane regresije (Cottoni i sar., 1988). Primećeno je da se kod skoro 40% bolesnika prvi znaci bolesti javljaju pre dvadesete godine života.

### 1.5.5.2. Lihenoidne reakcije

Mnogi lekovi i supstancije kod osoba koje razvijaju kolor filmove mogu izazvati erupcije na koži identične ili slične LP-u. Reakcije mogu biti blage ili jako izražene, a posle obustave leka ili prestanka korišćenja sporo se povlače. Hiperpigmentacija na mestu lezija dugo traje, a može ostati čak i atrofija sa anhidrozom (zbog atrofije znojnih žlezda). Histološki se u lezijama nalaze fokusi parakeratoze, koloidna tela, a infiltrati sadrže eozinofile ili plazma ćelije. Prema Arndtu postoji grupa lekova koja indukuje stvaranje lezija vrlo slične lihenu a to su:

- 1) inhibitori angiokonvertujućeg enzima-kaptopril i enalapril,
- 2) antiartrici- zlato,
- 3) antibiotici- streptomycin, tetraciklin,
- 4) antimalarici- kvinakrin, hlorokvin, kinidin,
- 5) antituberkulotici- PAS,
- 6) helirajuća sredstva- penicilamin,
- 7) diuretici- hlorotiazid, hidrohlorotiazid,
- 8) hipoglikemici- hlorpropamid, tolazamid i
- 9) respiracijski stimulatori- amifenazol.

### **1.5.6. Pridružene bolesti**

Uočeno je da je LP povezan sa čitavim nizom različitih oboljenja. Teško je reći da li je to slučajna ili jasno određena asocijacija. Moguće je da pojava LP-a uz već prisutna oboljenja ne predstavlja ništa više od lihenoidne reakcije na lekove. Kod takvih bolesnika koji su i imunodeficijentni, verovatno jedan uzrok dovodi do nastanka oba oboljenja.

#### **1.5.6.1. Maligniteti**

LP, i to najčešće njegova bulozna i plakozna forma, se često javljaju kod bolesnika sa postojećim malignitetom. Pituitarni adenom uočen je kod pedesetogodišnjeg pacijenta sa buloznim LP-om (Monk, 1985). Pemfigoidni LP je opisan zajedno sa rakom stomaka (Kark & Litt, 1980), limfosarkomom (Graham-Brown i sar., 1982), neuroblastomom (Powell i sar., 1983) i sl. Opisana je takođe povezanost LP-a i timoma (van de Staak i sar., 1975).

#### **1.5.6.2. Oboljenja digestivnog trakta**

Postoji potencijalna, ali još nedokazana veza, između LP-a i gastrointestinalnih oboljenja.

Kod 7-52% pacijenata sa LP-om je uočeno znatno povećanje nivoa hepatičkih enzima, a prema jednoj studiji, kod 52% pacijenata sa erozivnim LP-om došlo je do razvoja ciroze (Rebora & Rongioletti, 1984).

##### ***1.5.6.2.1. Primarna bilijarna ciroza (PBC)***

U nekoliko radova opisuje se povezanost LP-a i PBC-a (Ciaccio & Rebora, 1990, Wyatt, 1975). D-Penicilamin, čime se tretiraju oboleli od PBC-a, može prouzrokovati lihenoidnu reakciju na medikamente (Lundstrom, 1983). Powell i saradnici došli su do zaključka da postoji veza između LP-a i PBC-a nezavisno od administracije D-Penicilamina (Powell i sar., 1983).

#### **1.5.6.2.2. Hronični aktivni hepatitis (CAH)**

Incidenca CAH-a kod obolelih od LP-a varira između 9,5 i 13,5% (van de Staak i sar., 1975), sa nešto većom prevalencom u zemljama južne Evrope (Bagan-Sebastian i sar., 1992). Pojedini autori smatraju da LP može biti signifikantan faktor rizika za cirozu jetre (van de Staak i sar., 1975). LP je takođe opisan kod bolesnika koji su primili vakcinu protiv hepatitisa B (Skully i Ej-Kom, 1985).

#### **1.5.6.2.3. Ulcerozni kolitis**

U nekoliko studija opisani su bolesnici sa ulceroznim kolitisom kod kojih je zapažena pojava LP-a (van de Staak i sar., 1975). Kod nekih je čak utvrđena istovremena pojava kliničkih simptoma OLP-a i crevnog oboljenja (Halevy i Feuennan, 1983).

#### **1.5.6.3. Diabetes mellitus (DM)**

Prema rezultatima većine autora, bolesnici sa DM-om imaju nižu stopu javljanja OLP-a, dok drugi smatraju da je incidenca DM-a kod OLP-a od 16-37.7% (Petrou-Americanou, 1998). Ovakve razlike u dobijenim rezultatima verovatno su posledica korišćenja različitih metoda i kriterijuma prilikom istraživanja. Bagan, Sebastian i saradnici su ispitali 205 pacijenata sa OLP-om i kod 13.9% DM je bio prisutan (Bagan-Sebastian i sar., 1992). Oni su, takođe, uočili da je pojava dijabetesa učestalija kod bolesnika sa ulcero-erozivnim lezijama, nego kod onih sa retikularnom formom OLP-a. Veliki broj istraživanja je pokazao visoki procenat intolerancije na glukozu kod obolelih od LP-a (Petrou-Americanou, 1998). Mnogo je teorija, ali je pravi razlog tog povećanja i dalje nerazjašnjen.

Razultati jedne studije utvrdili su povećanu prevalencu OLP-a kod insulin zavisnih (tip I) u poređenju sa insulin nezavisnim (tip II) bolesnicima (Challacombe, 1986).

Obzirom na to da mnogi bolesnici sa DM-om koriste medikamentnu terapiju, postavlja se pitanje da li je to zapravo uzrok lihenoidne reakcije. Lekovi kao što su

nesteroidni antiinflamatorni preparati, antihipertenzivi i oni koji se koriste kod hipoglikemije, mogu dovesti do pojave lihenoidne reakcije koja klinički podseća na OLP (Jacyk, 1978).

#### **1.5.6.4. Ostale bolesti**

##### ***1.5.6.4.1. Autoimunost***

LP je udružen sa velikim brojem autoimunih poremećaja (Alopecia areata, Dermatomiozitis, Mijastenija gravis, Pemfigus vulgaris, Sistemska skleroza, Vitiligo i sl.) Nije poznato da li su pacijenti sa LP-om podložniji pojavi ovih oboljenja ili su autoimuna oboljenja, na neki način, etiološki povezana sa LP-om.

##### ***1.5.6.4.2. Hipertenzija***

Trijas koji čine hipertenzija, diabetes mellitus i LP poznat je pod nazivom Grinspanov sindrom (Choudhury, 1979). Ipak, opsežnim istraživanjem oralnih i kutanih oboljenja, došlo se do zaključka da ne postoji njihova međusobna povezanost.

##### ***1.5.6.4.3. Urolitijaza***

Postoje nalazi koji pokazuju 6-12 puta veću prevalenciju pojave bubrežnog kamenca kod bolesnika sa LP-om u odnosu na zdravu populaciju (Darier, 1909), što bi se moglo dovesti u vezu sa sličnim metaboličkim disfunkcijama koje dovode do oba poremećaja.

##### ***1.5.6.4.4. Metabolički poremećaji***

Kod bolesnika sa OLP-om je utvrđen i deficit gvožđa i folata (Sabouraud, 1910), smanjenje eritrocitne glukozo-6-fosfat dehidrogenaze (Sarkany, 1971), kao i visoku prevalencija nulte krvne grupe (Barnett, 1976).

## **1.6. Dijagnoza**

Karakteristični klinički simptomi OLP-a mogu biti dovoljni za postavljanje tačne dijagnoze ako su prisutne i klasične lezije na koži. Za potvrdu dijagnoze koristi se oralna biopsija sa histopatološkom analizom. Imunofluorescentna i imunohistohemijska ispitivanja pomažu pri utvrđivanju dijagnoze u nejasnim slučajevima i koriste nam za isključivanje malignih procesa.

### **1.6.1. Histopatologija**

Klasičan histopatološki nalaz LP-a prvi put je opisan početkom XX veka (Rivers i sar., 1986) i podrazumeva: hiperkeratozu ili hiperparakeratozu, akantozu, zadebljane granularnog sloja ćelija, likvefacionu degeneraciju bazalnog sloja ćelija, nazubljenu konfiguraciju spinoznog sloja ćelija u vidu "ajkulinih zuba", kao i gust zapaljenski ćelijski infiltrat u vidu trake, u gornjim partijama lamine proprije mukoze. Iako se na početku pretpostavljalo da je LP primarno mezenhimno oboljenje sa sekundarnim promenama u epitelu (Fernandez-Bussey i sar., 1983), danas je evidentno da se promene karakteristične za pojavu LP-a javljaju u ili u neposrednoj blizini bazalne membrane (Medenica i Lorincz, 1977) i da te promene mogu biti izražene čak i ako nema vidljivih promena u gornjim delovima submukoznog tkiva (Johnson i Fry, 1967).

Rožasti sloj (stratum korneum) obično pokazuje zadebljanje sa orto- ili parakeratozom. Ovaj deo epitela najčešće sadrži povećan broj slojeva ćelija i gušće pakovane filamente, mada u slučaju atrofične forme oboljenja dolazi do smanjena keratoze, a prisutan je i manji broj ćelijskih slojeva u poređenju sa normalnim epitelom.

Granulacioni sloj epitela je zadebljan, sa mnoštvom granula koje prominiraju, tako da podsećaju na brojanicu. Pojava "Wickham-ovih strija" se, prema nekim istraživanjima, dovodi u vezu sa zadebljanjem granulacionog sloja ćelija (Eady i Cowen, 1978). Često je izražena iregularna akantozna, tako da granični greben u predelu bazalne membrane (BM) podseća na zupce od testere.



Ćelije Malpigijevog sloja pokazuju povećanje filamentoznog materijala, kao i broja keratinozoma. Keratinohijalinske granule su donekle umanjene i imaju okrugao ili ovalan, umesto zvezdastog oblika. Broj tonofilamenata vezanih za granule je smanjen. Najuočljivije promene se mogu identifikovati u nižim slojevima epitela, gde može biti prisutna spongioza. Spongioza se odlikuje proširenjem intercelularnih prostora, zategnutošću inter-ćelijskih veza, koje lako mogu rupturirati na bazi dezmozoma (Taafe, 1978). Sa napredovanjem oboljenja dolazi do smanjenja broja dezmozoma. U ranim i intermedijarnim stadijumima bolesti, određen broj dezmozoma zadržava normalne karakteristike, dok kod ostalih dolazi do manjeg ili većeg stepena dezintegracije. U kasnijim fazama bolesti intercelularni prostori postaju izrazito dilatirani, moguće je uočiti veliki broj tonofilamenata u neposrednoj blizini bazalne membrane. Ove mase tonofilamenata su jedini preostali dokaz nekadašnjeg prisustva dezmozoma na ovim mestima, obzirom da je gust intercelularni materijal sada nestao (Ebneri Gebhart, 1977).

Neke ćelije pokazuju znatne degenerativne promene koje se manifestuju u vidu: degeneracije organela, iščezavanja nukleusa i zgušnjavanja tonofilamenata. Ove nespecifične promene su najverovatnije sporedne manifestacije nastale usled povrede tkiva, a u vezi sa prisutnim zapaljenskim infiltratom.

U regijama u kojima epitel ne pokazuje ovako izražene promene, pojedine ćelije mogu biti vidno uvećane. Jedra ovih ćelija su takođe uvećana i pokazuju delimičan ili potpun gubitak nuklearne membrane i nestanak nukleolusa. Na svakom od krajeva uzdužne ose ovih ćelija je uočljivo uvećanje perinuklearnog endoplazmatskog retikuluma, kao i prisustvo ribozoma. Pomenute ćelije su nalik ćelijama u kasnoj profazi mitotičkog ciklusa, sem što agregacija hromozoma nije izražena.

Ćelije sa uznapredovalim promenama pokazuju postepenu fibrilarnu transformaciju citoplazme. Često se mogu identifikovati fibrilarna telašca koja nisu vezana za membranu, a sadrže manji ili veći broj citoplazmatskih organela. Deo citoplazme ovih telašaca poseduje ćelijske organele, dok je drugi deo ispunjen hrpom filamenata. Ove ćelije se retko sreću i nazvane su "pola-pola ćelije" (Ebneri Gebhart, 1976).

Telašca koja sadrže gusto pakovane fibrile širine 80-100Å su takozvana civatna tela (fibrilarna, hijalina, koloidna, citoidna tela). Civatna tela predstavljaju diskeratotične bazalne keratinocite, koji podležu procesu keratinizacije pre sazrevanja, i

bivaju istisnuta u papilarni dermis (apoptoza) (Shklar i sar., 1978). Najčešće su prisutna u epitelnom malpigijevom sloju, između naizgled normalnih ćelija, kao izrazito prebojen intracelularni materijal. Koloidni materijal obično ispunjava ćelije i jedro iščezava ili je smanjeno i piknotično. Mnoga civatna tela sadrže bazofilne tačke ili mase koje liče na piknotička ili fragmentisana jedra. Elektronska mikroskopija pokazuje filamentnu strukturu koloidnih tela, sastavljenu od gusto pakovanih snopova ujednačenih filamenata prosečne debljine 9 nm, koji su manje elektronske gustine od normalnih tonofilamenata (Ellis, 1967). Među filamentima se uvek može naći nekolicina malih vakuola. Granična membrana nedostaje, a u retkim slučajevima filamentu su umetnuti u perifernu strukturu nalikujući oštećenim dezmosomima (Taaffe, 1978). Formacije koloidnih tela smatraju se jednom od najranijih patoloških promena LP-a.

Brojne degenerativne ćelije (diskeratotične, nekrotične ćelije) su prisutne u donjim delovima spinoznog i bazalnog sloju. Karakteriše ih masivna akumulacija snopova tonofilamenata velike elektronske gustine, pomešanih sa lipidnim kapima, vakuolama i različitim citoplazmatskim organelama nepromenjenog izgleda. Ponekad su ovi keratinociti odvojeni rascepima od ćelija koje ih okružuju (Ellis, 1967).

Langerhansove ćelije i melanociti izgledaju normalno, iako se često javlja porast njihovog broja (Eady, 1978). Histiociti i limfociti (Ly) se povremeno mogu naći u epitelu. Zapravo, veliki broj Ly je smešten ispod zone bazalne membrane (BMZ), a neki od njih penetriraju kroz BM u niže partije epitela. Ovaj proces poznat je pod nazivom "egzocitoza", što je u skladu sa promanjenoj pozicijom Ly.

Likvefakcija bazalnih ćelija je sastavni deo patohistološke slike LP-a. Različiti broj bazalnih ćelija biva oštećen i vakuoliziran. Ova pojava može rezultirati gubitkom kohezivnosti između pojedinih bazalnih ćelija, kao i između epitela i dermisa. Uobičajena morfologija BM se gubi. Na osnovu elektronske mikroskopije kod bolesnika sa LP-om utvrđena je smanjena gustina ćelija bazalnog sloja u poređenju sa normalnim bazalnim ćelijama. Ćelije pokazuju zjapove u citoplazmi i dezintegraciju plazma membrane. Lokalizovana degeneracija pojedinačnih ćelija u regionu BM dovodi do pojave mehurića u citoplazmi i gubitka organela. Istovremeno kod ostalih ćelija bazalnog sloja ne dolazi do značajnijih promena. Usled propadanja bazalnih ćelija formiraju se mali intraepitelijalni prazni prostori. Za preostali deo BM, koji može, a i ne

mora biti promjenjen, adheriraju se ostaci rupturiranih bazalnih ćelija (Jungell i sar., 1987).

Alteracija BM se kod OLP-a može javiti na tri različita načina, i to u vidu: prekida, grananja i zadebljanja.

### 1) Prekidi BM

Prekidi bazalne membrane su česti. Moguće je primetiti i ogranke BM, koji se prostiru 1-2  $\mu\text{m}$  u vezivno tkivo. U pojedinim slučajevima izražena je duplikatura BM sa sekundarnom BM, koja se širi u vezivno tkivo na prosečnoj udaljenosti od 1  $\mu\text{m}$  u odnosu na bazalne ćelije. Hemi-dezmozomi i vlakna sidrenja su normalanog izgleda, ali im je broj smanjen.

### 2) Grananje bazalne membrane

Bazalna membrana je veoma razgranata. Ponekad se može primetiti ekstenzija ogranaka bazalne membrane i do 10  $\mu\text{m}$  u region lamine proprije mukoze. Prisutno je smanjenje broja hemi-dezmozoma, koji su razdvojeni od ogranaka BM

### 3) Zadebljanje bazalne membrane

Bazalna membrana je umnožena i formira zadebljanja u vidu zakrpe, debljine nekoliko  $\mu\text{m}$ . Na mnogim mestima lamina lucida nedostaje u potpunosti i na tim delovima je bazalna membrana u direktnom kontaktu sa bazalnim ćelijama. Broj hemidezmozoma je znatno redukovano ili oni u potpunosti nedostaju, dok su vezivne fibrile nepravilne i broj im je smanjen.

Fragmenti bazalne membrane u vidu ostrvaca se mogu videti na određenoj udaljenosti od bazalnih epitelih ćelija. Veza kojom hemidezmozomi spajaju bazalne ćelije sa bazalnom laminom progresivno se gubi, a BM biva odvojena od epitela (Helander i Rogers, 1994).

Vakuolizacija bazalne membrane vodi ka sakupljanju tečnosti i formiranju rascepa, poznatih kao Max-Josephov-ovi prostori. Smatra se da ovi prostori prethode pojavi bula, koje se javljaju kod buloznog LP-a (Davies i sar., 1977).

Jedno od glavnih obeležja LP-a je subepitelni inflamatorni infiltrat u vidu trake, sastavljen uglavnom od T-limfocita i histiocita. U različitim delovima gornje terećine lamine proprije mukoze inflamatorne ćelije nisu prisutne, uprkos odvajanju bazalne membrane od epitela. U preostalim regijama postoje brojne ćelije zapaljenja direktno ispod bazalnog sloja epitela. Limfociti male do srednje veličine čine oko 80% svih

mononuklearnih ćelija lamine proprije. Limfociti srednje veličine imaju brojnije mitohondrije i veći Golgijev kompleks u odnosu na manje limfocite. Plazma ćelije čine oko 5% od ukupnog broja inflamatornih ćelija *in situ*. Ove ćelije su ovoidne sa ravnom površinom koja sadrži svega nekoliko mikrovila. Slobodni makrofagi formiraju oko 10% od svih inflamatornih ćelija, uključujući i nekolicinu mast ćelija. Makrofagi su okruglog ili ovalnog oblika. Površina ćelija sadrži brojne mikrovile i pseudopode. Makrofagi se često vide u neposrednoj blizini limfocita. Mast ćelije su karakteristične, jer sadrže sekretorne granule vezane za membranu, koje ispunjavaju veliki deo citoplazme (Olsen i sar., 1984).

## **1.6.2. Imunofluorescencija (IF)**

### **1.6.2.1. Direktna IF**

Direktna IF je koristan metod za postavljanje dijagnoze OLP-a, kao i za razlikovanje ove bolesti od drugih imunološki posredovanih oboljenja oralne mukoze, kao što su pemphoid, pemphigus vulgaris i lupus eritematodes (LE). Čupaste depozicije fibrinogena duž BMZ i/ili civatna tela sa pozitivnim nalazom IgM, IgG i IgA predstavljaju reprezentativne elemente za dijagnozu OLP-a, naročito kada se analiziraju zajedno sa rutinskom histološkim slikom (Camisa i sar., 1984). Dokazano je da se fibrinogen deponuje najpre u zoni BM u vidu ćelijskih depozita ili u širokoj osnovi duž BM.. Imunoglobulin koji se najčešće nalazi na membrani civatnih tela je IgM.

### **1.6.2.2. Indirektna IF**

Direktna IF ne predstavlja definitivno dijagnostičko sredstvo za dokazivanje OLP-a. U pojedinim slučajevima OLP može, klinički i histološki, ličiti na LE-u, pogotovo kada je zapaljenski infiltrat postavljen bliže BM i u vidu traka (Baumal i sar., 1984). Ova nedoumica se može izbeći upotrebom indirektna IF.

Korišćenjem ove metode, kod 80% bolesnika sa tipičnim kožnim manifestacijama LP-a, može se uočiti specifičan šablon po kome se boje imunoglobulini (IgG, IgA i/ili

IgM) u stratumu granulosumu i stratumu spinosumu, kada se kao supstrat koristi autologno tkivo lezije (Wick i sar., 1999). Pokazalo se da je pomenuti način bojenja Ig karakterističan za LP, te je stoga logično pretpostaviti da je antigeni materijal, lokalizovan u stratumu granulozumu i gornjim partijama stratuma spinozuma, u specifičnoj vezi sa LP-om.

Ova, još uvek neidentifikovana supstanca označena je kao lihen planus specifični antigen (LPSA) (Wick i sar., 1999). Imajući u vidu mogućnost postavljanja definitivne dijagnoze na osnovu histopatoloških rezultata i rezultata direktne IF, upotreba indirektna IF se preporučuje samo u slučajevima diferencijalno dijagnostičkih nedoumica između LP i drugih lihenoidnih i buloznih dermatosa (Neppelberger i sar., 2001).

### 1.6.3. Imunohistohemija

Imunohistohemija predstavlja tehniku identifikacije ćelijskih ili tkivnih elemenata (antigeni), pomoću interakcije antigen-antitelo.

Mesto vezivanja antitela može se identifikovati ili direktnim označavanjem antitela, ili metodom sekundarnog označavanja. Vizualizacija antitela postiže se upotrebom markera kao što su fluorescentna boja, enzimi, radioaktivni elementi ili koloidalno zlato. Dostupnost poliklonalnih i monoklonalnih antitela omogućava patolozima korišćenje imunohistohemijske procedure u cilju postavljanja definitivne dijagnoze, kod slučajeva koji nakon patohistološkog ispitivanja tkiva ostaju nejasni (Dekker i sar., 1997).

Obzirom da imunohistohemijska metoda obuhvata i specifične reakcije antigen-antitelo, evidentna je njena prednost nad tradicionalnim tehnikama koje koriste specijalna i enzimsko bojenja, i detektuju samo ograničen broj proteina, enzima i tkivnih struktura.

Zbog toga se imunohistohemijska ispitivanja primenjuju u mnogim istraživačkim laboratorijama, kao i u kliničkoj dijagnostici (Hirota i sar., 2002).

Što se LP-a tiče, imunohistohemija predstavlja jednu od najčešće korišćenih metoda u okviru naučnih istraživanja, a takođe ima i veliki značaj u dijagnostici. Ova tehnika se često koristi za:

1. identifikaciju ćelijskih populacija u infiltratu (T ćelija – CD3+, CD4+, CD8+, mast ćelija i Langerhansovih ćelija) (Gerdes i sar., 1984),
2. opis ekspresije molekula koji regulišu apoptozu (Fas, Fas-L, Bcl-2, Bax, p-53) (Gerdes i sar., 1984, Sherr i Roberts, 1999),
3. utvrđivanje proliferativne (mitotičke) aktivnosti bazalnih i parabazalnih ćelija (Ki-67, p-16, ciklini) (Serrano i sar., 1993),
4. procenu moguće uloge heat shock proteina (HSP) (Thomas i sar., 1997).

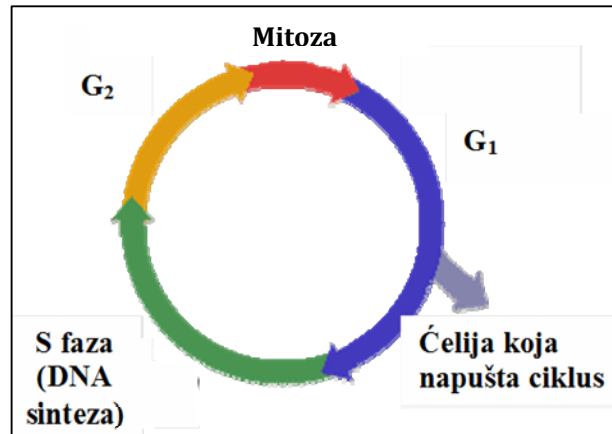
Identifikacija molekula koji regulišu apoptozu bi mogla predstavljati značajan faktor u rešavanju problema vezanih za patogenezu OLP-a. Osim toga, izražena ekspresija ovih molekula, kao i intenzivna mitotička aktivnost bazalnih i ćelija infiltrata, često je prisutna kod karcinoma. Dakle, na bazi rezultata imunohistohemijskih ispitivanja, moguće je predvideti maligni potencijal LP-a.

#### **1.6.3.1. Apoptoza**

Apoptoza predstavlja mehanizam pomoću koga normalna, kao i ledirana tkiva regulišu populaciju ćelija u smislu kontrolisane ćelijske eliminacije. Kod normalnog tkiva, apoptoza deluje kao kompenzatorni mehanizam i blokira ćelijski ciklus u slučaju oštećenja DNA.

##### ***1.6.3.1.1. Ćelijski ciklus***

Ćelijski ciklus predstavlja programirani sled događaja, čija je kulminacija rast ćelije i ćelijska deoba u dve ćerke ćelije. Podeljen je u 4 različite faze: Gap 0 (G0), Gap 1 (G1), S (sinteza) i Gap 2 (G2) (Slika 17).



**Slika 17.** Faze ćelijskog ciklusa (Preuzeto i modifikovano prema Cawson RA i sar., 1975)

- Gap 0 (G<sub>0</sub>): faza G<sub>0</sub> predstavlja period mirovanja ćelija
- Gap 1 (G<sub>1</sub>): faza G<sub>1</sub> označava početak rasta. Važan mehanizam koji biva aktiviran tokom ovog perioda (G<sub>1</sub> kontrola) omogućava sve ono što je neophodno za sintezu DNK molekula.
- S faza: u toku ovog perioda dolazi do replikacije DNK.
- Gap 2 (G<sub>2</sub>): u fazi G<sub>2</sub> ćelija nastavlja rast i produkciju novih proteina. Na kraju ove faze, postoji drugo kontrolno mesto (G<sub>2</sub> kontrola) kojim se određuje mogućnost ćelijskog prelaska u M (mitoza) fazu
- M faza (Mitoza): ćelijski rast i produkcija proteina se zaustavljaju na ovoj tački ciklusa. Sva ćelijska energija usmerava se na deobu i nastanak dve ćerke ćelije.

CDK (ciklin zavisna kinaza), zajedno sa ciklinima, predstavlja glavni kontrolni okidač kojim se pokreće ćelijski ciklus, stimulišući ćelije da pređu iz faze G<sub>1</sub> u S ili iz faze G<sub>2</sub> u M. CDK integriše mitogene signale i signale za inhibiciju rasta i koordinira ih u toku ćelijskog ciklusa. CDK inhibitori kod sisara pripadaju dvema velikim familijama: p21 familiji (p21, p27 i p 57) i INK4 familiji (p15, p16, p18 i p19).

Poremećaji u kontroli ćelijskog ciklusa igraju važnu ulogu u patogenezi premalignih lezija i karcinoma, rezultirajući povećanom i nekontrolisanom proliferacijom ćelija.

#### 1.6.3.1.2. KI-67

**Ki-67 antigen** (MIB-1) je pouzdan marker ćelijske proliferacije. Njegova ekspresija se povećava sa napredovanjem ćelijskog ciklusa, a svoj vrhunac dostiže tokom G<sub>2</sub> i M faze. Pomoću MIB-1 detektuju se samo one ćelije koje su u fazi aktivne proliferacije, ali ne i ćelije koje su van ciklusa.

Monoklonalno antitelo Ki-67 se vezuje za jedarni antigen koji je prisutan samo u proliferativnim ćelijama. Ki-67 jedarni antigen je prisutan u G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> i M fazi ćelijskog ciklusa, dok je odsutan u G<sub>0</sub> fazi, tako da antigen iščezava kada proliferišuće ćelije započnu diferencijaciju u ćelije mirovanja. Jednostavna i brza proliferacija određenih ćelijskih podtipova, postaje moguća uz pomoć monoklonalnog antitela Ki-67, što je od naročitog značaja u analizi proliferacije malignih tumora (Ligget i Sidransky, 1998).

Među proteinima koji učestvuju u kontroli ćelijskog ciklusa, p16, retinoblastoma protein (pRb) i ciklin D1, se svrstavaju među najvažnije (Akanuma i sar., 1999).

#### 1.6.3.1.3. p16

**p16<sup>INK4A</sup>**, proteinski produkt gena - CDK<sub>2</sub> inhibitora (CDKN2), vezuje i inhibira CDK<sub>4</sub> i/ili CDK<sub>6</sub>, čija je aktivnost značajna u procesu regulacije napredovanja normalnog ćelijskog ciklusa. Za razliku od familije p21 - inhibitora ciklin zavisne kinaze, p16 specifično inhibira ciklin D-zavisnu kinazu *in vitro* (Wu i sar., 1996). Ovaj protein indirektno vrši redukciju fosforilacije pRb-a i usled toga se javlja zastoj ćelijskog ciklusa u fazi G<sub>1</sub> (Weinberg, 1995). U normalnim ćelijama, sinteza p16 proteina je na niskom nivou. Poremećaj regulacije ćelijskog ciklusa koji uključuje p16-pRb mehanizam, može dovesti do nekontrolisane proliferacije i nastanka tumora (Musgrove, 1994).

#### 1.6.3.1.4. pRb

**Retinoblastoma protein (pRb)**- je jedarni fosfoprotein koji reguliše rast u G<sub>1</sub> fazi ćelijskog ciklusa. PRb delimično potencira svoje inhibitorne efekte vezane za ćelijski rast, vezujući se za i inhibirajući regulatorne proteine, uključujući i članove E<sub>2</sub>F familije



transkripcijskih faktora ( $E_2F$  aktivacija je neophodna za prelaz iz  $G_1$  u S fazu) (Lee i sar., 1999).

Izgleda da pRb fosforilacijom oslobađa  $E_2F$  od inhibitorynog kompleksa, omogućivši, na taj način, transkripciju neophodnu za prelazak ćelije iz kasne  $G_1$  u S fazu (Kerr i sar., 1972).

Kompleksi sposobni za fosforilaciju pRb proteina mogu se formirati uz pomoć ciklina D tipa (ciklini  $D_1$ ,  $D_2$ , i  $D_3$ ) u kombinaciji sa  $CDK_4$  ili  $CDK_6$ , ciklinom E u kombinaciji sa  $CDK_2$  ili ciklinom A u kombinaciji sa  $CDK_2$  ili  $CDC_2$  ( $CDK_1$ ).

#### 1.6.3.1.5. *Ciklin D1*

**Ciklin D1 (kodiran pomoću PRAD<sub>1</sub> ili Bcl-1 gena)**- pripada ciklinima tipa D i formira kompleks sa svojim  $CDK_4$  parom. Smanjenje D1 ekspresije vodi ka smanjenju formiranja ciklin D- $CDK_4$  kompleksa. Akumuliranje ciklin D<sub>1</sub>- $CDK_{4/6}$  kompleksa u ranoj ili srednjoj  $G_1$  fazi, vodi ka aktivaciji kinaza koje vrše fosforilaciju i inaktivaciju tumorskog supresornog Rb-a, koji je, kao što je već rečeno, neophodan za prelazak iz  $G_1$  u S fazu ćelijskog ciklusa (Kerr i sar., 1971). Povećana ekspresija ciklina  $D_1$  primećena je kod tumora većih gradusa (Miura i sar., 1993), kod bolesnika mlađih od 40 godina i kod osoba muškog pola.

Apoptozu, kao oblik smrti ćelije, karakterišu morfološki i biohemijski kriterijumi koji su u potpunoj suprotnosti sa procesom ćelijske mitoze (Shresta i sar., 1995).

Morfološki, ćelija biva istanjena, dok je citoplazma gušće konzistencije. Hromatin postaje piknotičan i zbijen u glatku masu koja se nalazi suprotno od jedarne membrane. Nukleus se može dezintegrirati (karyorexis), dok ćelija emituje produžetke (fenomen pupoljka). Ovi procesi imaju tendenciju da se odvoje i postanu apoptotička telašca, koja mogu biti fagocitovana od strane makrofaga ili ostati slobodna (Fesus i sar., 1987). Neka apoptotička telašca sadrže nuklearne fragmente, a neka ne. Citoplazmatske organele novoformiranih telašaca ostaju dobro očuvana. Apoptotička telašca bivaju brzo fagocitovana od strane makrofaga ili susednih ćelija i eliminisana njihovim lizozomima.

Biohemijski, DNA se rezgrađuje u manje oligonukleosomalne fragmente. Nastaje rascep DNA spirale na vezivnim regijama između nukleozoma, što dovodi do formiranja fragmenata koji poseduju 180-200 parova baza. Citoplazmatske proteinaze,

kao što su interleukin-1 $\beta$ -konvertujući enzim (ICE) (Ashkenazi i Dixit, 1998) i granzim B (Nagata, 1997), učestvuju u nastajanju prominentnih apoptotičnih ćelijskih promena, dok tkivne transglutaminaze, koje bivaju aktivirane u kasnijim fazama apoptoze, preveniraju oslobađanje potencijalno štetnih intracelularnih enzima iz apoptotičkih telašaca pre nego što oni budu fagocitovani (Huang i sar., 1997). Najbolje objašnjen apoptotički mehanizam, na molekularnom nivou, vezuje se za apoptozu izazvanu "receptorima smrti", uključujući Fas/CD95 receptor, TNF receptor tip 1 (TNFR<sub>1</sub>), DR<sub>3</sub>, DR<sub>4</sub> i DR<sub>5</sub> (Medema i sar., 1997).

#### **1.6.3.1.6. Fas/FasL**

**Fas (CD95/APO-1)**- je predstavnik membranskih receptora iz superfamilije tumor nekrosis faktora (TNF), koji stimuliše apoptozu posredstvom svog liganda-FasL (Chinnaiyan i sar., 1995). Fas je široko rasprostranjen u različitim tipovima ćelija organizma, dok je ekspresija FasL specifičnija. Nakon aktivacije, različiti tipovi ćelija imunog sistema ispoljavaju FasL, uključujući T i B ćelije. Apoptoza indukovana FasL-om ima i regulatornu i efektornu funkciju u imunom sistemu, a izgleda da doprinosi i razvoju inflamatornog procesa. Regulacija ekspresije Fas receptora se, barem delimično, vrši posredstvom članova Bcl-2 familije (O'Connell, 2001).

Izgleda da FasL formira trimere, što se dešava i prilikom njegovog vezivanja za Fas receptor. Nakon aktiviranja posredstvom FasL-a, različiti proteini se raspoređuje na tzv. domene smrti Fas receptora, pri čemu se stvara signalni kompleks koji indukuje smrt ćelije (DISC) (Mateyak i sar., 1997). Sem toga, aktiviranjem Fas receptora dolazi do direktne aktivacije intracelularne proteolitičke kaskade, posredstvom kaspaze iz familije proteaza. DISC, protein adaptacije i protein koji je u vezi sa domenom smrti na Fas receptoru (FADD) predstavljaju vezu između stimulisano Fas-a i pro-kaspaze-8. Funkcionalna kaspaza-8, poznata i kao interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-konvertujuća enzimaska proteaza vezana za Fas receptor (FLICE), stimuliše aktivaciju intracelularnih elemenata iz porodice kaspaza (Wyllie, 1992). Kaspazna proteoliza specifičnih proteinskih meta je ključni egzekutivni element apoptoze.

Postoje dokazi da FasL sprečava inflamatorne reakcije na tzv. "imunološki privilegovanim" mestima, inicirajući Fas-posredovanu apoptozu infiltrirajućih pro-inflamatornih ćelija.

Sposobnost FasL-a da slabi imuni odgovor, mogla bi se iskoristiti u svrhu sprečavanja imunološke reakcije odbacivanja transplantiranog tkiva (Bissonete i sar., 1992).

Apoptoza se nalazi pod genetskom kontrolom, a može biti inicirana unutrašnjim ili ekstracelularnim agensima kao što su hormoni, citokini, ćelije ubice, kao i niz hemijskih, fizičkih i virusnih činilaca. Nešto bolje proučeni geni koji učestvuju u kontroli apoptoze su c-myc, Bcl-2 i p53.

#### **1.6.3.1.7. C-myc**

**C-myc**- su celularni proteini vezani za DNK, kodirani od strane c-myc gena. Oni su uključeni u metabolizam nukleinskih kiselina, a učestvuju i u regulaciji ćelijskog odgovora na faktore rasta. Povećana i nekontrolisana ekspresija c-myc proteina može uzrokovati razvoj tumora. Ključna uloga c-myc proteina ogleda se u regulaciji ćelijske proliferacije (Kinokawa i sar., 1996). Povećana ekspresija c-myc proteina može rezultirati mitozom ili apoptozom, što zavisi od prisustva ili odsustva stimulatora ćelijskog rasta (Lu i sar., 1996). U prisustvu takvih stimulusa, c-myc se ponaša kao klasični proto-onkogen stimulator mitoze; u njihovom odsustvu, inicira apoptozu. Simultana prenaplašena ekspresija Bcl-2 proto-onkogeno smanjuje mogućnost da povećana ekspresija c-myc proteina indukuje apoptozu, što može biti od velikog značaja za sinergizam ovih gena u procesu onkogeneze (Lauwers, 1997).

#### **1.6.3.1.8. Bcl-2**

**Bcl-2 proto-onkogen** je poznati inhibitor apoptoze. Ovaj protein je inicijalno otkriven, i najčešće udružen, sa folikularnim limfomom B ćelija, hromozomske translokacije t(14,18) (Farrow i Brown, 1996). Bcl-2 gen kodira sintezu integralnog membranskog proteina lokalizovanog na spoljnoj mitohondrijskoj membrani, nuklearnom omotaču, plazma membrani i endoplazmatskom retikulumu. Shodno tome,

pronađen je i kod drugih limfoproliferativnih oboljenja bez t(14,18), u normalnom epitelu sa aktivnom proliferacijom i kod raličitih epitelnih neoplazmi (Antonsson, 2001).

Osim toga, povezanost Bcl-2 molekula sa prekanceroznim lezijama, upućuje na značaj ovog proteina u ranim stadijumima karcinogeneze (Salgame i sar., 1991).

Primećeno je da je bcl-2 član grupe gena sa izraženom homologijom na pojedinim sekvencama, poznate kao bcl-2 familija gena, koja reguliše opstanak ćelije i njenu smrt. Sekvencijalna homologija, među članovima Bcl-2 familije, ograničena je na četiri specifične regije poznate kao Bcl-2 homologne (BH) oblasti (BH<sub>1-4</sub>). Pokazalo se da BH oblasti imaju ulogu medijatora proteinskih interakcija i ključno mesto u procesima aktivacije i supresije apoptoze (Vousden, 2000). Pripadnici Bcl-2 familije se mogu podeliti u dve podgrupe:

- sa anti-apoptotičkim (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) i
- sa pro-apoptotičkim sposobnostima (Bcl-X<sub>S</sub>, Bax).

Izražena ekspresija anti-apoptotičkih proteina (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) može inhibirati aktivnost pro-apoptotičkih proteina (Bcl-X<sub>S</sub>, Bax) (Ralhan i sar., 1998).

#### **1.6.3.1.9. p53**

**p53**- je tumorski supresorni protein, koji igra važnu ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa i apoptozi. p53 može inicirati zaustavljanje ćelijskog ciklusa u fazama G<sub>1</sub> ili G<sub>2</sub>. Defektnost p53 proteina može dovesti do abnormalne ćelijske proliferacije koja rezultira kancerom. Kod normalnih ćelija, nivo p53 proteina je nizak. Oštećenje DNK, hipoksija, onkogeni i drugi stresni signali, mogu dovesti do porasta nivoa p53 proteina, koji ima tri glavne funkcije: zaustavljanje ćelijskog rasta, popravku oštećene DNK molekule i apoptozu. Zaustavljanjem ćelijskog rasta stopira se ćelijski ciklus, čime se onemogućuje replikacija oštećene DNK. Tokom zastoja u rastu, p53 može da aktivira transkripciju proteina uključenih u reparaciju DNK. Apoptoza je poslednje sredstvo za zaustavljanje proliferacije ćelija sa oštećenom DNK.

Ćelijska koncentracija p53 mora biti regulisana. Glavni regulator je Mdm2, koji može pokrenuti razgradnju p53 pomoću sistema koji je prisutan u svim ćelijama (Hashimoto, 1976).

Transkripciona aktivnost p53, reguliše ekspresiju Mdm2 (u cilju sopstvene regulacije), kao i gene uključene u zaustavljanje ćelijskog rasta (p21), DNK reparaciju (p53 R<sub>2</sub>) i apoptozu (Bax, Apaf-1, PUMA i NoxA).

p53 igra važnu ulogu u apoptozi ćelija mukoze kod OLP-a (Pindborgh i sar., 1997). Ovaj protein se indukuje u povređenim keratinocitima i održava genomski integritet pomoću multiplih nishodnih meta koje aktiviraju mehanizam zaustavljanja ćelijskog ciklusa, reparativne procese u ćelijama i apoptotičnu smrt ćelije. p21, jedna od nishodnih meta p53 molekule, je CDK inhibitor (CDKI), koji onemogućava aktivnost ciklin-CDK kompleksa da izvrši prekid ćelijskog ciklusa. Na taj način, regulacija ćelijskog ciklusa indukovana mehanizmima p53 i p21, osigurava održavanje genomske stabilnosti (Pindborgh i sar., 1997).

Gubitak funkcije p53 proteina dokazan je u približno 50% ispitanih humanih kancera, uključujući i oralni karcinom skvamoznih ćelija (Barnard i sar., 1993).

Odnos između benignih i malignih stanja predstavlja neku vrstu ravnoteže između apoptoze i mitoze. Diskeratotične ćelije se mogu smatrati predstavnikom apoptotičkog procesa, odnosno reakcijom domaćina sprovedenom u cilju eliminacije tumorskih ćelija procesom ubrzane keratinizacije. Ako apoptoza nadjača mitotozu, tumor ostaje benignan (Cawson, 1975).

## **1.7. Maligni potencijal OLP-a**

Oralni lihen planus (OLP) se, prema nekim autorima, svrstava u premaligna stanja, dok drugi smatraju da su samo lihenoidne lezije sa displazijom prekancerozne. Prema skorašnjoj histološkoj klasifikaciji kancera i prekanceroza oralne mukoze Svetske zdravstvene organizacije (WHO), termin lihenoidna displazija nije uvršten. Umesto toga, navodi se da se kod lihen planusa ponekad viđaju displastične promene (WHO, 1972).

Prevalencija maligne alteracije OLP-a, prema navodima u literaturi, varira između 0.1 i 3% (Marder i Deesen, 1982). Argumenti pomoću kojih pojedini autori negiraju mogućnost maligne transformacije OLP-a, uključuju koincidenciju, pogrešno postavljenu dijagnozu, i nedostatak dokaza da je u pitanju prekanceroza (Holmstrup i

Pindborg, 1979). Danas i dalje postoje brojne kontraverze vezane za pitanje da li je OLP premaligno stanje, ili ne.

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji prekancerozno stanje se definiše kao "opšte stanje organizma kod koga je značajno povećan rizik od nastanka kancera", dok su prekancerozne lezije definisane kao "morfološki alterisana tkiva kod kojih je povećana incidenca razvitka kancera u odnosu na tkiva sa očuvanim morfološkim integritetom" (Krutchkoff i sar., 1985).

Različiti faktori modifikuju mogućnost i brzinu potencijalne maligne transformacije, kao što su imunološki status domaćina (koji može biti modifikovan bolešću ili primenjenom terapijom), prekancerozna aktivnost (konzumacija cigareta i alkohola) i delovi oralne sluzokože visokog rizika (donja usna, ventrolateralna ivica jezika i pod usne duplje) (Krogh i sar., 1987). Postoje mišljenja da je oralna mukoza kod OLP-a podložnija uticajima karcinogenih agenasa u poređenju sa normalnom mukozom. Na osnovu toga moglo bi se zaključiti da lezije kod OLP-a nisu same po sebi premaligne, već se radi o premalnim stanjima.

Erozivna, atrofična i plakozna forma bolesti, sa ili bez prisutnih retikularnih formacija, su češće povezane sa malignom transformacijom. Kod ovih oblika bolesti se u velikom broju slučajeva postavlja pogrešna klinička i histopatološka dijagnoza. Plakozna forma OLP-a, a često i erozivni OLP, klinički se teško razlikuju od homogene i nehomogene leukoplakije. Postoji mogućnost sinhronog prisustva OLP-a i oralne eritroplakije, i takva kombinacija izgleda da ima veliki prekancerozni potencijal (McCartan i McCreary, 1999).

Kod OLP-a je utvrđen relativno visok procenat epitelijalne displazije, koji prema različitim nalazima, varira od 25-57%, dok je na drugoj strani kod ove bolesti izražen nizak stepen maligne transformacije (Carrozzo i Gandolfo, 1999). Uzroci odgovorni za malignu transformaciju OLP-a su nepoznati, ali oni mogu biti povezani sa hronicitetom oralnih lezija, konzumiranjem duvana i gljivičnom kolonizacijom oralnih tkiva (Tyldesley W, Harding, 1977).

Postoji mnogo pitanja vezanih za potencijalni malignitet OLP-a. Da li se oralni kancer razvija na prethodno postojećoj OLP leziji, ili nezavisno od nje? Da li je biopsija bila pravilno interpretirana? Koji su to ključni elementi koji utiču na razvoj kancera kod

bolesnika sa OLP-om? Da li je to sam OLP, imuni sistem bolesnika ili njegova genetska osnova?

U svakom slučaju, kliničari bi morali biti svesni potencijalne povezanosti OLP-a sa oralnim kancerom. Pažljiv oralni pregled, striktni dijagnostički kriterijumi i rutinske kontrole se obavezno moraju sprovoditi kod bolesnika sa dijagnostikovanim OLP-om.

## **1.8. Terapija**

Sem retkih slučajeva moguće maligne transformacije, OLP je benigno i samo-ograničavajuće oboljenje, iako se faze rekurencije i egzacerbacije mogu ponavljati godinama. Svaka terapijska strategija mora biti bezbedna, i ne sme nikako svojim uticajem pogoršati postojeće simptome bolesti. U terapiji OLP-a danas se pominje veliki broj medikamenata, koji svojim dejstvom dovode do privremenog olakšanja kliničkih simptoma bolesti, no usled dugotrajne primene mogu izazvati negativne posledice. Takvi su pre svih sistemski kortikosteroidi i imunosupresivni lekovi, pa stoga njih treba koristiti samo u slučajevima kada je to zaista neophodno.

Koji bi to slučajevi, zapravo bili, i kako uopšte isplanirati lečenje obolelih od OLP-a? Od čega će zavisiti koju vrstu medikamenata primeniti, i da li je uopšte bilo kakva terapija potrebna?

Klinička terapija LP-a mora biti usmerena ka oslobađanju od bolova, sanaciji erozija/ulceracija ili redukciji rizika koji bi mogli dovesti do maligne alteracije LP lezija (Carbone i sar., 1999). Vrsta lekova, njihova doza i način primene u mnogome zavise od ozbiljnosti kliničkih simptoma bolesti.

Zbog osnovnih karakteristika OLP-a (inflamatorno ćelijski-posredovan odgovor), većinu agenasa, koji se koriste za kontrolu znakova i simptoma bolesti, čine kortikosteroidi i imunosupresivni lekovi, a mogu se koristiti, mada ređe i druge vrste medikamenata kao što su retinoidi (derivati vitamina A).

Način terapije OLP-a koji se preporučuje prikazan je na šemi 3 (Silverman i sar., 1985).

### 1.8.1. Kortikosteroidi

Glavni medikamenti u terapiji OLP-a i dalje su kortikosteroidi. Oni se mogu koristiti površinski, intralezijski i sistemski.

#### 1.8.1.1. Površinski kortikosteroidi

Kortikosteroidi se mogu aplikovati površinski kao uljani rastvori, paste, vode za ispiranje usta ili čak kao inhalatori sa specijalnim adapterom. Betamethazone valerate aerosol - 800 $\mu$ g/dan u toku 2 meseca) je jedan od najčešće korišćenih površinskih kortikosteroida (Lozada-Nur i sar., 1984). Veliki je problem njihove adherencije u usnoj duplji u dužem vremenskom intervalu.

Iz tog razloga koriste se adhezivne paste pomoću kojih se obezbeđuje dugotrajna aplikacija bez sistemskih neželjenih efekata.

Značajan je broj površinskih kortikosteroida koji se danas primenjuju u vidu adhezivnih pasta, kao što su na primer: betamethazone valerate 0.1mg, triamcinolone acetonide 0.1%, fluocinolone acetonide 0.1%, fluocinonide 0.05%, clobetasol propionate 0.05% (Vincent i sar., 1990).

Nakon primene površinskih kortikosteroida može se pojaviti sekundarna oralna kandidijaza. Ova pojava se lako može prevenirati primenom antimikotične terapije (miconazole gel pojedinačno ili u kombinaciji sa chlorhexidine rastvorom za ispiranje usta). Dugotrajna perzistencija erozija, naročito na jeziku, može se veoma uspešno tretirati intralezijskim injekcijama triamcinolone acetonida – 10-20mg/ml (Bechade i sar., 1996).

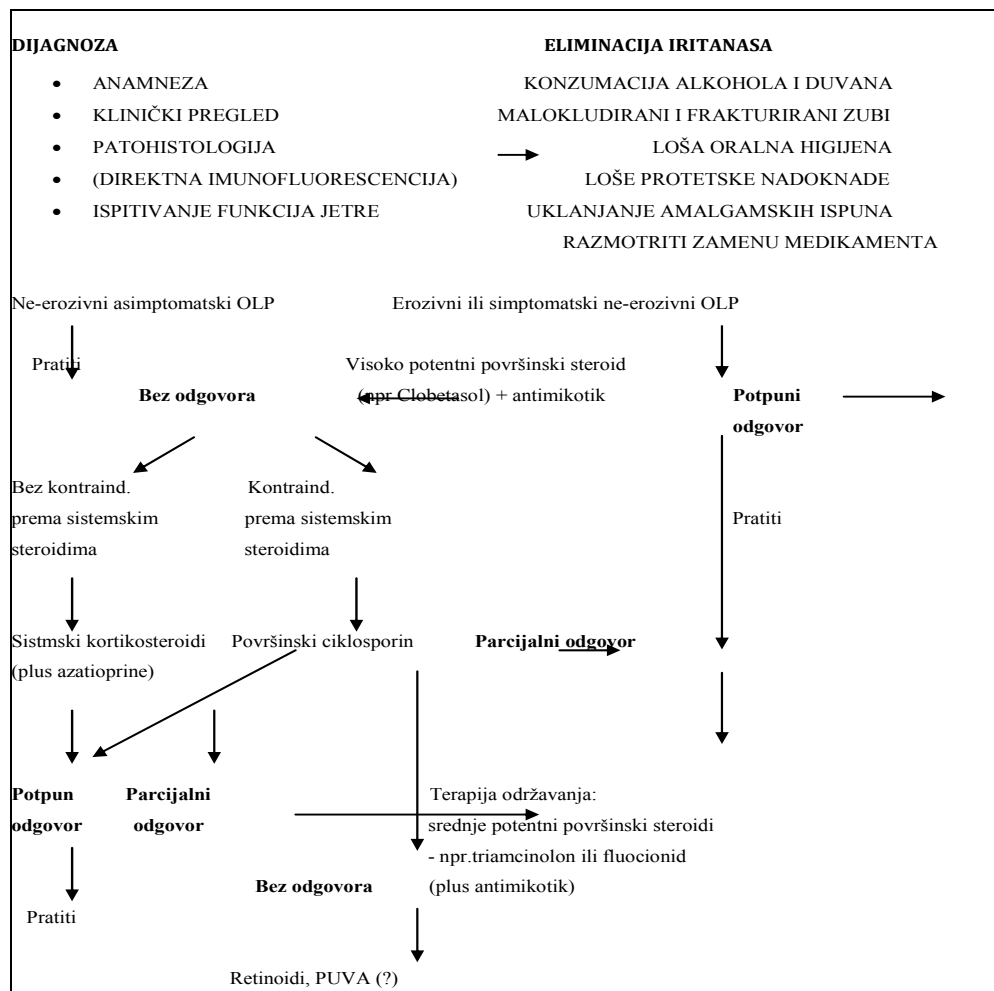
#### 1.8.1.2. Sistemski kortikosteroidi

Mnogi autori smatraju sistemske kortikosteroide najefikasnijim terapijskim modalitetom za kontrolu OLP-a. Sistemski prednizon može biti indikovano u slučaju uznapredovalog erozivnog OLP-a otpornog na lečenje ili difuzne mukokutane forme bolesti u inicijalnoj dozi od 40 – 80 mg/dan (Silverman i sar., 1991). Većina bolesnika reaguje pozitivno na primenjenu terapiju, lezije se smanjuju za 50 do 75% od primarne



veličine, nakon čega se doze leka smanjuju do intermedijarnih vrednosti od 30 – 50mg/dan. Ukoliko se prednizon primenjuje više od 2 nedelje mogući su neželjeni efekti (Silverman i sar., 1991). Alternativni pristup, u cilju izbegavanja neželjenih dejstva, podrazumeva kratkotrajno korišćenje visokih doza sistemskog prednizona (40mg na dan u toku 5 dana), zatim smanjenje doze na 10-20mg dnevno u toku sledeće dve nedelje i na kraju prelazak na primenu površinskih kortikosteroida (Lear i sar., 1996).

Sistemski steroidi mogu potencirati HCV viremiju, što utiče na pogoršanje već postojećeg oštećenja jetre (Lozada-Nur, 1981). Štetni efekti su česti, čak i u slučaju kratkotrajne primene sistemskih steroida i najčešće podrazumevaju: promenu raspoloženja, retenciju tečnosti, insomniju i gastro-intestinalne tegobe. Usled dugotrajne primene ovih lekova moguć je nastanak hematoma, gojaznosti, "mesečevog izgleda" lica i specifične redistribucije masti (u vidu grbe od bika). Mnogi štetni efekti dugotrajne primene sistemskih kortikosteroida se mogu izbeći ukoliko se, što je ranije moguće, započne sa kombinovanom terapijom površinskim kortikosteroidima (McDonald, 1997).



Slika 18. Predlog postupaka u terapiji obolelih od OLP-a (Preuzeto i modificirano prema Lindelof B i sar., 1991.).

Legenda: *potpuni odgovor* - nestanak svih lezija, uz eventualno prisutnu mrežastu formaciju na oralnoj mukozi, *parcijalni odgovor* - nepotpuno izlječenje sa perzistencijom erozivno-ulceroznih lezija. *bez odgovora* - pogoršanje postojećih lezija ili odsustvo bilo kakvog poboljšanja.

### 1.8.1.3. Retinoidi

Sistmski retinoidi se veoma retko koriste u terapiji OLP-a zbog velikog broja neželjenih efekata, kao što su: hejlitis, konjuktivitis, suvoća očiju i usta, gubitak kose, glavobolje itd). Od površinskih retinoida koriste se:

- tretionin 0.1% u vidu adhezivnog gela – 4 puta dnevno u toku 2 meseca
- isotretionin 0.1% - 2 puta dnevno u toku 2 meseca

- retinoična kiselina 0.05% u orabazi, koja ne daje neželjene pojave, ali postiže parcijalna poboljšanja kod bolesnika sa erozivnim OLP-om
- fenretinide – 200mg/dan u toku 1 meseca, retinoid za koga je dokazano da je bezbedniji i efektivniji od drugih, ali još uvek nije široko dostupan

#### 1.8.1.4. Imunosupresivni agensi

Imunosupresivni lekovi se mogu uspešno primenjivati u kombinaciji sa sistemskim prednizonom, a kao monoterapijsko sredstvo mogu predstavljati alternativni izbor ukoliko postoji rizik od upotrebe steroida (Lozada-Nur, 1997).

Azathioprine – Imuran 75-100mg/dan je jedan od najčešće korišćenih imunosupresivnih agenasa. Ovaj medikament ima potentno imunosupresivno dejstvo, koje obuhvata i supresiju mitoze stimuliranih limfoidnih ćelija, uticajem na sintezu nukleotida. Glavni sporedni efekat Imurana je uznapredovala leukopenija, koja nastaje usled supresije koštane srži. Ipak u dozama koje se koriste u terapiji vezikulobuloznih oboljenja, kakav je OLP, sporedni efekti Azatioprina su minimalni i uglavnom ograničeni na glavobolje i gastro-intestinalne tegobe kao što su muka i prolivi (Lindelof i sar., 1991).

Ciklosporin je efikasan imunosupresiv koji utiče na aktivnost B i T limfocita. Njegovo osnovno dejstvo usmereno je ka funkciji T-helper ćelija, a ogleda se u inhibiciji transkripcije IL-2 gena i oslobađanja IL-2 proteina od strane aktiviranih T ćelija. Ciklosporin takođe inhibira transkripciju IL-3, IL-4, stimulativnog faktora granulocitno-makrofagnih kolonija, TNF- $\alpha$  i interferona- $\gamma$ .

Štetni efekti ciklosporina su česti i uključuju nefrotoksičnost, holestazu, hipertenziju i neuropatiju. Takođe postoji predispozicija za limfoproliferativna oboljenja B ćelija (Beck i Brandrup, 1986). Zbog komplikacija koje sistemski ciklosporini mogu da izazovu, pribegava se alternativnijim metodama, kao što je lokalna aplikacija površinskih ciklosporina.

Ciklosporin A – 6mg/kg/dan. indukuje smanjenje broja T ćelija, najverovatnije preko inhibicije sinteze  $\gamma$ -interferona. Najvažniji neželjeni efekat je renalna disfunkcija.

Može se primeniti u vidu:

- a) rastvora za ispiranje (450-1500mg/dan u toku 8-12 nedelja)

b) orabaze (48mg/dan u toku 8 nedelja).

Ovako primenjen ciklosporin A dovodi do značajnog poboljšanja kliničkih simptoma kod OLP-a, neželjenih efekata gotovo i da nema, dok je sistemska resorpcija leka neznatno izražena. Rezultati korišćenja i efektivnost primene površinskih ciklosporina su kontraverzni. Upotreba ovog leka preporučuje se samo onda kada su sva ostala terapijska sredstva iscrpljena, uključujući i sistemske steroide (Matthews i Scully, 1992).

#### **1.8.1.5. Psoralen i ultravioletno zračenje (PUVA)**

Kombinacija psoralena i ultravioletnog zračenja (PUVA) može uticati imunosupresorno na ćelijski posredovanu imunoreaktivnost. PUVA terapija obično počinje sa methoxsoralen-om – 0.6mg/kg uzetim 2h pre UV radijacije. Smatra se da PUVA ima onkogeni potencijal, pa su mišljenja oko primene ove metode u lečenju OLP-a kontraverzna (Lu i sar., 1995).

#### **1.8.1.6. Druga terapijska sredstva**

Još neki medikamenti se pominju u terapiji OLP-a., kao na primer:

- Dapsone, koji nije uvek efikasan (Ronbeck i sar., 1990)
- Griseofulvin – (antimikotik) ima ograničen terapijski učinak<sup>240</sup>
- Levamisole – 150mg/dan u toku 6 nedelja, koristi se kao dodatno sredstvo uz sistemsku terapiju kortikosteroidima<sup>241</sup>
- Hidroxychloroquine sulphate – 200-400mg/dan. Postoji sumnja u njegovu efikasnost obzirom da antimalarici mogu uticati na razvoj lihenoidnih reakcija<sup>242</sup>

## ***2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA***

Predmet doktorske disertacije je analiza povezanosti polimorfizama nukleotidne sekvence u genima za TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 receptore sa rizikom za razvoj oralnog lihen planusa, etiološkim i kliničko-patološkim odlikama bolesti. Sa tim u vezi su definisani sledeći ciljevi istraživanja:

1. Utvrđivanje karakteristika ispitanika sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom;
2. Genotipizacija i utvrđivanje distribucije, odnosno učestalosti alela i genotipova polimorfizama TLR2 (rs3804099), TLR3 (rs5743312, rs3775291), TLR4 (rs4986790, rs4986791) i CD14 (rs2569190) gena u grupi ispitanika sa oralnim lihen planusom i u kontrolnoj grupi;
3. Utvrđivanje eventualnog postojanja asocijacije polimorfizama navedenih gena sa rizikom za pojavu oralnog lihen planusa, kao i kliničkom formom OLP-a;
4. Ispitivanje eventualnog postojanja asocijacije između genotipova ispitivanih polimorfizama i etioloških odlika grupe ispitanika;
5. Analiza haplotipova: identifikacija LD blokova i određivanje učestalosti haplotipova u celokupnoj studijskoj grupi, grupi ispitanika i u kontrolnoj grupi;
6. Ispitivanje eventualnog postojanja asocijacije identifikovanih haplotipova i rizika za nastanak oralnog lihen planusa.

### **HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

Određeni genotipovi ispitivanih polimorfizama u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima mogu predstavljati faktor rizika (ili imati pretektivnu ulogu) u patogenezi oralnog lihen planusa.

### ***3. MATERIJAL I***

## ***METODE***

Istraživanje je sprovedeno na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Institutu za mikrobiologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalni deo doktorske disertacije je realizovan u Laboratoriji za molekulska medicinu Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu.

Studija je obuhvatila 101 pacijenta sa dijagnostikovanom oralnim lihen planusom. Od ukupnog broja pacijenata, 27 (27%) su činili muškarci, a 74 ispitanika (73%) su bile žene. Medijana godina je bila 59.

Kontrolnu grupu je činilo 104 osobe, dobrovoljnih davaoca krvi, koji su se javili Institutu za transfuziologiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Osobe koje su činile kontrolnu grupu su iste populacije sa teritorije Srbije, odgovarajuće starosne i polne distribucije, bez prethodno dijagnostikovanog oralnog lihen planusa u istoriji bolesti.

Istraživanje je bilo podeljeno na klinički i laboratorijski deo. **Klinički deo** je obuhvatao popunjavanje istraživačkog kartona i klinički pregled. Istraživački karton je sadržao sledeće podatke o bolesniku: pol, uzrast, klinički oblik bolesti, trajanje bolesti, subjektivni simptomi, postojanje drugih oboljenja, medikamenti primenjeni u terapiji različitih patoloških stanja, kao i period njihovog korišćenja.

Dijagnoza OLP-a je postavljana na osnovu anamneze i analize kliničkih promena.

Bolesnici su bili razvrstani, u zavisnosti od kliničkih karakteristika oralnih promena, u grupe sa: retikularnom, papularnom, atrofičnom, erozivno-ulceroznom, buloznom i plakoznom formom OLP-a.

Da bi pacijent bio uključen u ispitivanje morao je da ispuni određene kriterijume:

- Da je stariji od 18 godina, a mlađi od 75 godina,
- Da ima neku formu OLP-a i
- Da je pročitao i shvatio informaciju o ispitivanju kao i da je potpisao pristanak za učestvovanje u ispitivanju

U istraživanje nisu bili uključeni pacijenti koji su bili:

- Gravidni ili dojili, kao i
- Osobe sa malignitetom i psihičkim poremećajem.



Iz kliničkog ispitivanja su bili isključeni pacijenti kod kojih je postoji jedan od sledećih kriterijuma:

- Medicinski značajan neželjeni događaj ili istovremeno oboljenje gde nastavak ispitivanja predstavlja ozbiljan rizik,
- Značajno ne pridržavanje postupka u ispitivanju,
- Pojava nekih od kriterijuma za neuključivanje,
- Odluka pacijenta da prekine dalje učešće u ispitivanju i
- Trudnoća.

### **3.1. Izvođenje istraživanja-merenja i procene**

#### **Evaluacija bolesti**

Svaki bolesnik je tokom kliničkog ispitivanja dolazio četiri puta na pregled.

#### **Bazna poseta (0 dan ispitivanja)**

Posle provere kriterijuma za izbor ispitanika, upoznavanja pacijenta sa svrhom, tokom i načinom ispitivanja, u test listu (Istraživački karton) su unošeni sledeći podaci:

- a) lični podaci,
- b) anamneza,
- c) sadašnja bolest,
- d) prisustvo simptoma bolesti kao i njegove karakteristike
- e) klinički pregled,
- f) uzimanje materijala za mikrobiološku kulturu,
- g) obučavanje bolesnika u održavanju oralne higijene i
- h) vršena je evaluacija skorova plak indeksa i indeksa zubnog kamenca na osnovu čega je procenjivan nivo oralne higijene.

Procena oralne higijene je vršena na osnovu indeksa oralne higijene koji se sastoji iz dva dela: prvog dela, koji se i naziva plak indeks, utvrđuje se prisustvo mekih naslaga na zubima. Drugi deo ovog indeksa naziva se i indeks zubnog kamenca i služi za utvrđivanje tvrdih naslaga na površini zuba. Za određivanje ovog indeksa je korišćeno šest zuba koji predstavljaju reprezentativni uzorak za celu denticiju. To su vestibularne

površine prvih gornjih molara sa desne i leve strane, prvog gornjeg sekutića sa desne strane i prvog donjeg sekutića sa leve strane.

Prisustvo mekih naslaga je mereno na oralnoj površini prvih donjih molara sa leve i desne strane.

**Stanje oralne higijene to jest prisustvo mekih naslaga boduje se na sledeći način:**

- 0- nema mekih naslaga
- 1- meke naslage prekrivaju do 1/3 površine zuba
- 2- meke naslage pokrivaju do 2/3 površine zuba i
- 3-meke naslage pokrivaju više od 2/3 zuba.

**Stanje oralne higijene odnosno prisustvo čvrstih naslaga se boduje:**

- 0- nema čvrstih naslaga
- 1- zubni kamenac pokriva manje od 1/3 površine zuba
- 2-zubni kamenac pokriva više od 1/3 a manje od 2/3 zuba, ili su samo mestimično prisutni subgingivalni konkrementi
- 3-zubni kamenac pokriva više od 2/3 površine zuba, ili subgingivalni konkrementi pokrivaju vrat zuba po celom obimu.

Učesnici studijske grupe su intervjuisani usmenim putem (tako što su pacijenti popunjavali anketu), čime su dobijene informacije o njihovom pušačkom statusu odnosno korišćenju alkohola.

Kada su u pitanju **pacijenti koji su konzumirali cigarete** svrstali smo ih u četiri grupe:

- a) nepušači- oni pacijenti koji nikada nisu pušili,
- b) pušači- koji puče do 1 paklu na dan
- c) pušači koji puše više od 1 pakle na dan i
- d) bivši pušači-koliko su pušili pakla/godina ( pakla/godina-se dobija množenjem broja godina sa prosečnim brojem popušanih cigareta dnevno).

Kada se radi o **pacijentima koji konzumiraju alkohol** podelili smo ih u tri grupe:

- a) oni koji nikada nisu pili alkohol,

b) umereni konzumenti- oni koji dnevno konzumiraju do 35ml žestokog pića, 220ml vina ili 330ml piva,

c) konzumenti- koji uzimaju više od 35ml žestokog pića, 220ml vina ili 330ml piva.

#### **Druga poseta (3-4 dan ispitivanja)**

Prilikom ove posete vršila se analiza mikrobiološkog nalaza, urađen je test kserostomije, uklonjene su lokalne iritacije oralne sluzokože i uzimana je krv za ispitivanje. Analiza rezultata mikrobiološkog ispitivanja pružala je dve mogućnosti:

a.1) pozitivan nalaz-ordiniranje terapije

2) negativan nalaz mikrobiološke kulture, nastaviti dalje istraživanje.

b. uzimanje krvi za laboratorijsko ispitivanje

c. ordiniranje terapije

#### **Treća poseta (7 dan ispitivanja)**

Tokom ove posete određivan je efekat ordinirane terapije i vršen nastavak lečenja ukoliko je to neophodno.

#### **Četvrta poseta (15 dan ispitivanja)**

Četvrta poseta je obuhvatala kontrolni pregled

### **3.2. Metode**

U ovom istraživanju vršila su se uporedna mikrobiološka, klinička, laboratorijska ispitivanja bolesnika kod kojih je dijagnostikovano oralni lihen planus. Prilikom prve posete pacijenta i nakon popunjavanja istraživačkog kartona vršilo se uzimanje mikrobiološkog materijala brisom. Bris je uziman sa jezika u jutarnjim časovima, pre doručka. Nakon uzimanja brisa materijal je poslat u laboratoriju Instituta za mikrobiologiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu gde je vršena njegova analiza.

Nakon izvršene analize mikrobiološkog nalaza pacijentu je određena terapija ukoliko je to bilo neophodno ili je odmah započeta sledeća faza ispitivanja koja podrazumeva uzimanje krvi za ispitivanje polimorfizma gena CD14 i TLR2, TLR3 i TLR4. Krv je uzimana iz kubitalne vene u jutarnjim časovima, pre doručka, vakutajner

metodom. Uzimane su dve epruvete po 5ml krvi. Brzina sedimentacije je rađena u Laboratoriji za biohemiju i hematologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu tako što se 4.5ml uzete krvi pomeša sa 0.5ml natrijum citrata koncentracije 0.105mmol/L. Određivanje genotipa polimorfizma gena CD14, TLR2, TLR3 i TLR4 rađeno je u Laboratoriji za molekulsku medicinu Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu, što je detaljnije opisano u predstojećem tekstu.

**Etički aspekti.** Osobe čiji je biološki materijal korišćen u istraživačke svrhe su dale informisani pristanak za učešće u studiji. Etički komitet Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je odobrio izvođenje ove studije u skladu sa Helsinškom deklaracijom (2008).

### **3.3. Biološki uzorci i izolacija DNK**

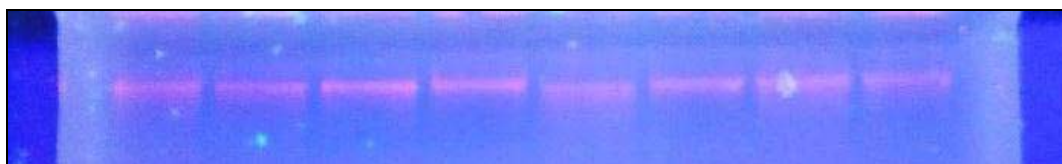
Od učesnika studije, pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom kao i kontrolne grupe, korišćena je periferna krv, koja je nakon uzimanja čuvana na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$ , uz prisustvo antikoagulansa heparina, do početka izolacije DNK.

Iz uzoraka periferne krvi, DNK je izolovana na aparatu AbiPrism 6 100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, SAD) uz korišćenje BloodPrep kita (Applied Biosystems, SAD), prema pratećem protokolu. Nakon pripreme uzoraka i inkubacije sa digestionim puferom i proteinazom K na  $65^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 10 min, uzorci se nanose na odgovarajuću ploču za izolaciju. Aparat za izolaciju DNK radi po principu vakuma koji povlači sadržaj bunarića na ploči i odbacuje ga, pri čemu DNK zaostaje i vezuje se za specijalno dizajniranu membranu od staklenih vlakana, koja se nalazi u osnovi bunarića. Nakon dodavanja rastvora koji sadrži etanol i precipitiranja izolovane DNK na membrani, vrši se eluiranje odgovarajućim puferima, nakon čega se konačno dobija izolovana DNK u visokom prinosu.

Izolovana DNK je nakon provere kvaliteta i čistoće i određivanja koncentracije čuvana na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$ , do početka daljeg rada.

### 3.4. Provera kvaliteta i koncentracije izolovane DNK

Kvalitet izolovane genomske DNK je proveravan na 1% agarozni bojenoj etidijumbromidom čija je finalna koncentracija u rastvoru bila 5µg/ml. Elektroforeza se odvijala u 0.5 TBE puferu pri struji od 40 mA i naponu od 80 V u trajanju od 20 min. Intaktnost i kvalitet genomske DNK je analizirana pod UV svetlošću transiluminatora (Pharmacia LKB, Švedska) (Slika 19).



**Slika 19.** Provera kvaliteta genomske DNK na 1% agaroznom gelu.

Koncentracija DNK u uzorku, kao i čistoća izolata je određena korišćenjem Gene Quant spektrofotometra (Pharmacia LKB, Švedska) merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 260 nm. Koncentracija DNK je računata primenom formule:

$$c[\mu\text{g} / \mu\text{l}] = \frac{A_{260} \times R \times F \times OP}{1000}$$

gde je:

A<sub>260</sub> - apsorbance uzorka na 260 nm

R-razblaženje (100 puta)

F- faktor konverzije za dvolančanu DNK (F=50)

OP- optički put svetlosti (debljina zid kivete, u našem slučaju 1 cm)

Čistoća izolovane DNK je procenjena odnosom apsorbanci (R) merenih na 260 nm i 280 nm. U svim uzorcima, odnos apsorbanci je bio  $R \geq 1.6$ , što ukazuje na relativno visok stepen čistoće izolovane DNK koja nije kontaminirana proteinima.

### 3.5. Lančana reakcija polimerizacije

Lančanom reakcijom polimerizacije (Engl. Polymerase Chain Reaction- PCR) je amplifikovan ciljni region CD14 gena, koji sadrže polimorfizam nukleotidne sekvence od interesa. Sekvence prajmera su predstavljene Tabelom 1.

**Tabela 1.** Sekvenca korišćenih prajmera za amplifikaciju ciljnog regiona CD14 gena koji sadrži SNP od interesa

Gen	Polimorfizam	Sekvence <i>forward</i> i <i>reverse</i> prajmera
CD14	C/T (rs2569190)	F: 5'-TGC CAG GAG ACA CAG AAC CC-3' R: 5'-TGT CAT TCA GTT CCC TCC TC-3'

U PCR reakciju je dodavano 200ng izolovane genomske DNK. Korišćen je 2x AmpliTaqGold Master Mix (Applied Biosystems, SAD). Temperaturni profil PCR reakcije za CD14 gen je predstavljen Tabelom 2 .

**Tabela 2.** Temperaturni PCR profil za umnožavanje rs2569190 polimorfizma CD14 gena

	Temperatura (C <sup>0</sup> )	Trajanje	Broj ciklusa
<b>Denaturacija DNK</b>	96	3 min	1
<b>Elongacija</b>	96	40 sec	38
	56	40 sec	
	72	50 sec	
<b>Finalna elongacija</b>	72	10 min	1

Uspešnost amplifikacije ciljnog regiona je proveravana na 2% agarozu visoke rezolucije (Serva, Nemačka), bojenoj etidijum-bromidom.

Elektroforeza se odvijala u 0.5 TBE puferu, pri struji od 40 mA i naponu od 80 V u trajanju od 15 minuta. Gel je analiziran pod UV svetlošću transiluminatora (Pharmacia LKB, Švedska).

### **3.6. Analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata**

Konvencionalna PCR reakcija je praćena analizom polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (Engl. Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP). Nakon amplifikacije gena, u cilju utvrđivanja genotipa analiziranih polimorfizama nukleotidne sekvence, dobijeni amplifikati su tretirani odgovarajućim restrikcionim enzimom BsmRI (Fermentas, Nemačka) prema priloženom uputstvu proizvođača.

Polimorfizam u CD14 genu (rs2569190) je genotipiziran RFLP metodom. Nakon inkubacije na optimalnoj temperaturi, specifičnoj za primenjeni restrikcioni enzim BsmRI (37<sup>0</sup>C), restrikcioni fragmenti su analizirani na 10% poliakrilamidnom gelu. Elektroforeza se odvijala u 0.5 TBE puferu pri struji 10-20 mA i naponu 150-200 V, u trajanju od 90 min. Po isteku elektroforeze, poliakrilamidni gel je bojen srebro nitratom.

Ukratko: nakon završene elektroforeze gel se najpre fiksira 10% etanolom nakon čega se vrši obezbojavanje 1% azotnom kiselinom. Nakon ispiranja u destilovanoj vodi, za bojenje gela se koristi 0.2% rastor srebra nitrata, a kao razvijatelj boje 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sa 0.02% formaldehidom. Nakon bojenja u trajanju od 20 min na tamnom, vrši se ispiranje destilovanom vodom. Konačno, gel se fiksira 10% sirćetnom kiselinom.

Na osnovu dužine restrikcionih fragmenata je određivan genotip analiziranog polimorfizma. Za određivanje veličine restrikovanih fragmenata su korišćeni molekularni markeri (BioRAD, SAD).

Detalji o analiziranom polimorfizmu u CD14 genu, kao i veličina restrikcionih fragmenata je predstavljena tabelom 3.

**Tabela 3.** Detalji o polimorfizmu u CD14 genu genotipiziranom RFLP metodom

Gen	Lokacija	Polimorfizam (Ref SNP)	Enzim	Alel/veličina
CD14	Promotor	T/C (rs2569190)	BsmRI	wt: 120 bp + 46 bp het: 166 bp + 120 bp + 46 bp mut: 166 bp

wt: divlji homozigot; het: heterozigot; mut: mutirani homozigot

### 3.7. Real-Time PCR alelska diskriminacija

Polimorfizmi u TLR genima: TLR2 (rs3804099), TLR3 (rs5743312 i rs3775291) i TLR4 (rs4986791 i rs4986790) su genotipizirani alelskom diskriminacijom na Real-Time PCR 7300 (Applied Biosystems, SAD). Korišćeni su komercijalno dostupni eseji: TaqMan SNPs Genotyping Assay (Applied Biosystems, SAD) u koncentraciji 40x i 2x Universal TaqMan MasterMix (Applied Biosystems, SAD).

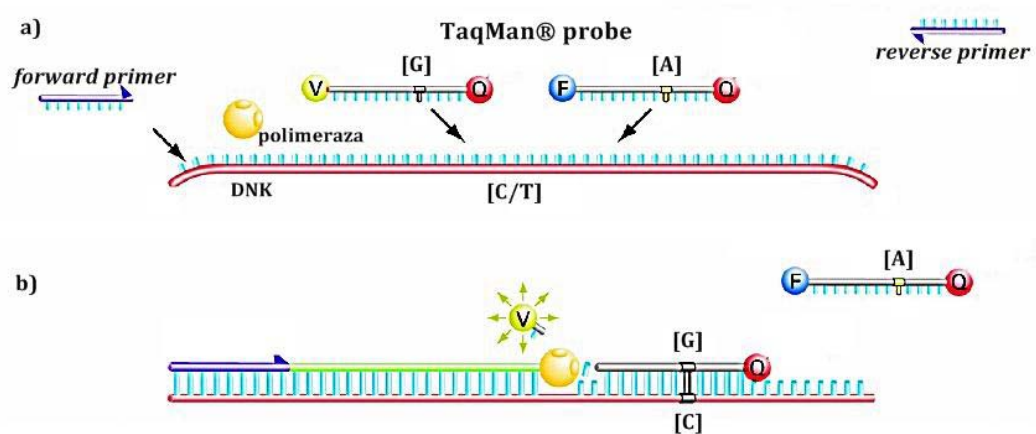
Svaki TaqMan esej pored odgovarajućih prajmera sadrži i dve probe, komplementarne sa ciljnom sekvencom genomske DNK koja sadrži SNP od interesa, pri čemu se dve probe međusobno razlikuju za samo jedan nukleotid koji je komplementaran *wild type*, odnosno mutiranom alelu. TaqMan probe su na 5' kraju obeležene fluorescentnim bojama VIC i FAM, koje ne fluoresciraju u intaktnom stanju zahvaljujući energetsom prihvatanju fluorescence od strane „prigušivača“ (Engl. quencher) koji se nalazi na 3' kraju probe (Slika 20).

Nakon hibridizacije prajmera i komplementarnog sparivanja probe sa ciljnom sekvencom, Taq polimeraza vrši ekstenziju i istovremeno iseca komplementrno sparenu TaqMan probu, čime se fluorescentna boja kojom je proba bila obeležena oslobađa u rastvor.



Obzirom da se nakon isecanja proba više ne nalazi u intaktnom stanju i pod uticajem prigušivača na 3' kraju, počinje da fluorescira u rastvoru. Intenzitet fluoresciranja odgovara količini amplifikata u reakciji.

Dakle, tokom odvijanja PCR-a u realnom vremenu meri se promena intenziteta fluorescence boja kojima su probe obeležene. Prisustvo divljeg ili mutiranog homozigota rezultira detektovanjem samo jedne fluorescentne boje u uzorku, dok se u slučaju heterozigota registruju obe fluorescentne boje. Alel specifične fluorescentne krive su detektovane i analizirane korišćenjem 7 500 System SDS softvera (Applied Biosystems, SAD).



**Slika 20.** TaqMan SNP probe. (V,F- fluorescentni reporterski molekuli VIC i FAM; Q- quencher, prigušivač; Preuzeto i modifikovano: <http://www.dnvision.com/taqman-genotyping-assays.php>)

Detalji o polimorfizmima analiziranim Real-Time PCR alelskom diskriminacijom su predstavljani u Tabeli 4.

**Tabela 4.** Detalji o polimorfizmima u TLR genima genotipiziranih Real Time PCR metodom

<b>Gen</b>	<b>Lokacija</b>	<b>Polimorfizam (Ref SNP)</b>	<b>ID TaqMan Assay</b>
<b>TLR2</b>	Egzon 3	C/T (rs3804099)	C_22274563_10
<b>TLR3</b>	Intron 3	C/T (rs5743312)	C_447407_10
<b>TLR3</b>	Egzon 4	G/A (rs3775291)	C_1731425_10
<b>TLR4</b>	Egzon 3	C/T (rs4986791)	C_11722237_20
<b>TLR4</b>	Egzon 3	A/G (rs4986790)	C__11722238_20

ID TaqMan Assay-identifikacioni broj eseja

### **3.8. Analiza haplotipova**

Vrednosti gametske neravnoteže vezanosti (Engl. Linkage Disequilibrium-LD) su računane i grafički predstavljene za sve analizirane parove polimorfizama u ispitivanim TLR genima pomoću programa Haploview 4.2. (Barrett i sar., 2005). Opcija „*Solid spine block definition*“ je korišćena za identifikaciju haplotipskog bloka. Učestalosti identifikovanih haplotipova u analiziranoj grupi- populaciji nesrodnika, su određene programom Haploview, primenom matematičkog *Expectation Maximisation* (EM) algoritma.

Asocijacije haplotipova sa kliničko patološkim odlikama pacijenata je rađena pomoću programa Thesias 3.1. (Tregouet & Garelle, 2007) U osnovi se koristi matematički *Stochastic Expectation Maximisation* (SEM) algoritam (Tregouet & Garelle, 2007).

### **3.9. Statistička analiza**

Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim programom SPSS (verzija 20.00, IBM SPSS Inc., SAD). Tablice kontingencije su analizirane primenom chi-kvadrat ( $\chi^2$ ) ili Fisher testa u slučaju kada je očekivana učestalost bila manja od 5%. Primenom logističke regresije je računat *Odds Ratio* (OR) sa intervalom poverenja (Engl. Confidence Interval- CI) od 95%.

Sve prikazane p vrednosti su bile „*two-sided*“ i asocijacije su smatrane statistički značajnim ukoliko je p vrednost bila manja od 0.05.

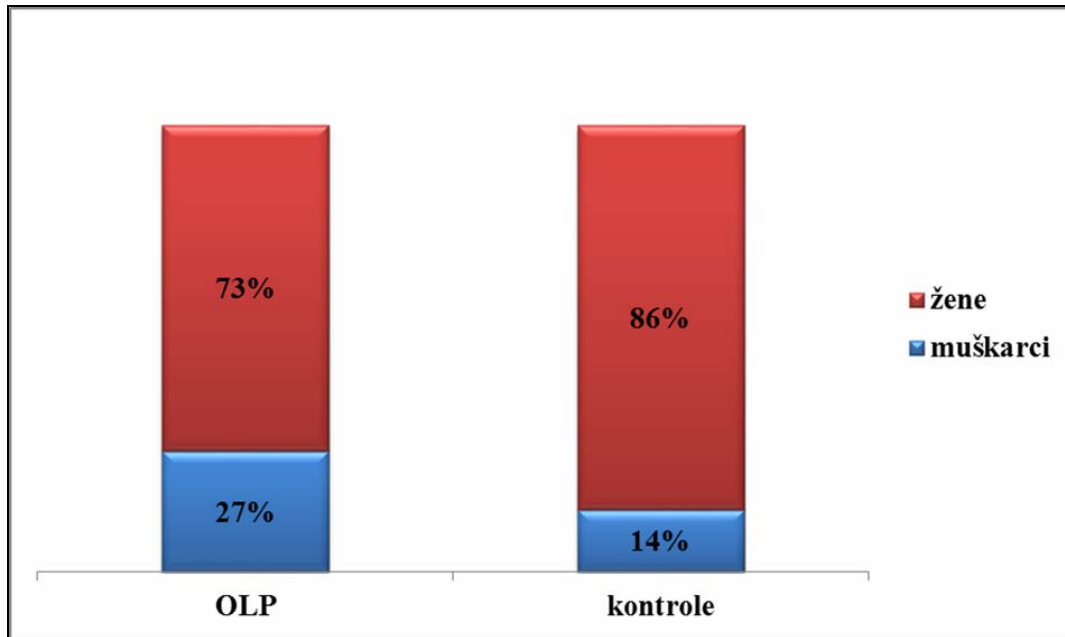
## ***4. REZULTATI***

Rezultati su podeljeni u dve celine koji se odnose na rezultate kliničkog i genetičkog istraživanja. Celine su podeljene u nekoliko delova. U prvom delu su predstavljene opšte karakteristike ispitivanih pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom, kao i povezanosti odlika pacijenata sa etiološkim faktorima. Drugi deo se odnosi na povezanosti odlika ispitanika sa oralnim lihen planusom sa kliničkim formama OLP-a. U trećem delu su prikazani rezultati genetičkih ispitivanja, preciznije distribucija alela i genotipova proučavanih polimorfizama u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima u grupi pacijenata i kontrolnoj grupi, dok je u četvrtom delu predstavljena povezanost ispitivanih polimorfizama sa etiološkim i kliničkim odlikama grupe pacijenata. U petom delu je prikazana asocijacija genotipova proučavanih polimorfizama sa rizikom za razvoj oralnog lihen planusa, a u šestom rezultati analize haplotipova.

## **4.1. Rezultati kliničkog istraživanja**

### **4.1.1. Opšte karakteristike ispitanika studijske grupe**

Studijom je bio obuhvaćen 101 pacijent sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom, dok je kontrolnu grupu činilo 104 zdrave osobe, odgovarajuće polne i starosne distribucije. Od ukupnog broja pacijenata sa OLP-om, 74 (73.27%) su bile osobe ženskog pola, dok je 27 ispitanika (26.73%) bilo muškog pola (Slika 21). Kontrolnu grupu je činilo 76 (86%) žena i 28 (14%) muškaraca (Slika 21).



Slika 21. Polna struktura studijske grupe.

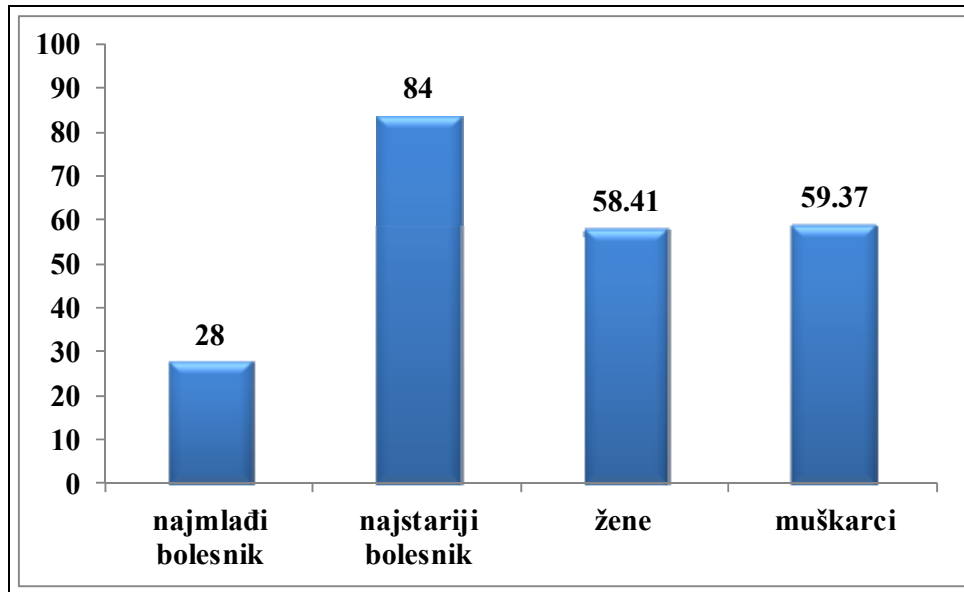
Podaci o srednjoj vrednosti, medijani i rangu (minimum-maksimum) godina studijske grupe su predstavljeni tabelom 5. Medijana starosti osoba u grupi ispitanika sa OLP-om je iznosila 59 godina, za razliku od kontrolne grupe gde je medijana bila nešto niža i iznosila 51 godinu (Tabela 5).

Tabela 5. Struktura prosečne starosti studijske grupe

	Broj ispitanika	Srednja vrednost	Medijana	Min	Max
<b>OLP grupa</b>	101	58.67	59	28	84
<b>Kontrolna grupa</b>	104	51.9	51	35	68

U grupi pacijenata sa oralnim lihen planusom, najmlađi pacijent je imao 28, a najstariji 84 godine (Slika 22).

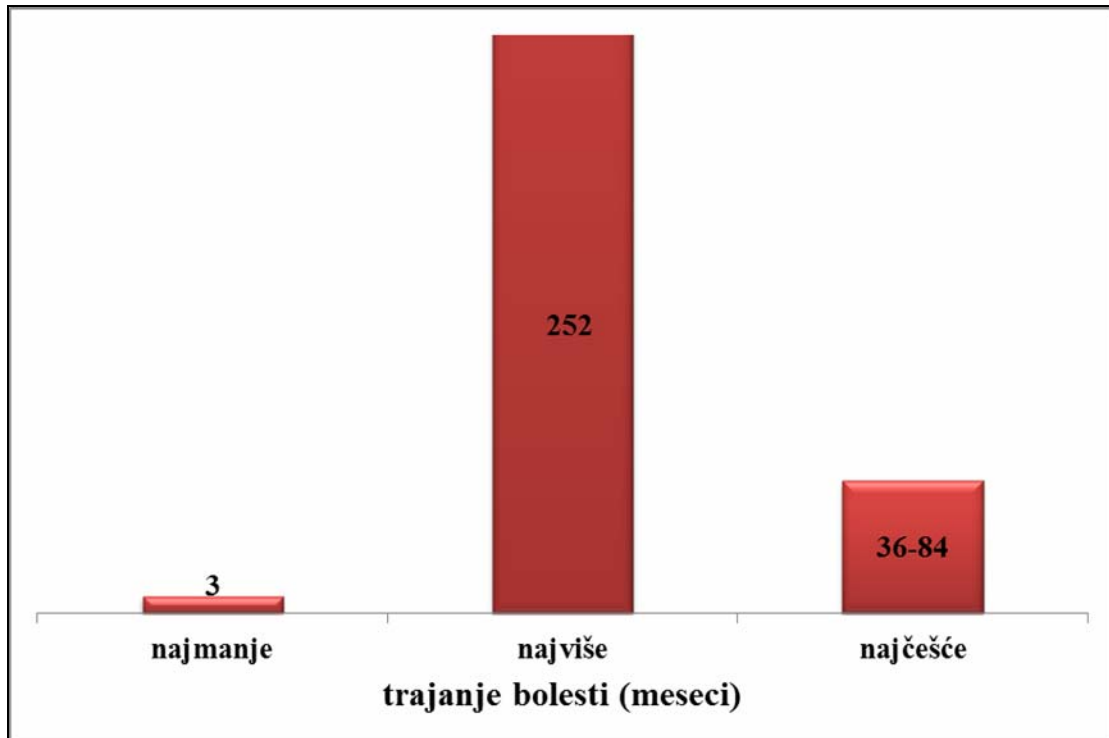
Prosečna starost žena je bila 58.41 godina (najstarija osoba ženskog pola je imala 84, a najmlađa 28 godina), dok je kod muškaraca prosečna starost iznosila 59.37 godina (najstariji muškarac sa OLP-om je imao 73, a najmlađi 42 godine) (Slika 22).



**Slika 22.** Starosna struktura grupe pacijenata sa oralnim lihen planusom.

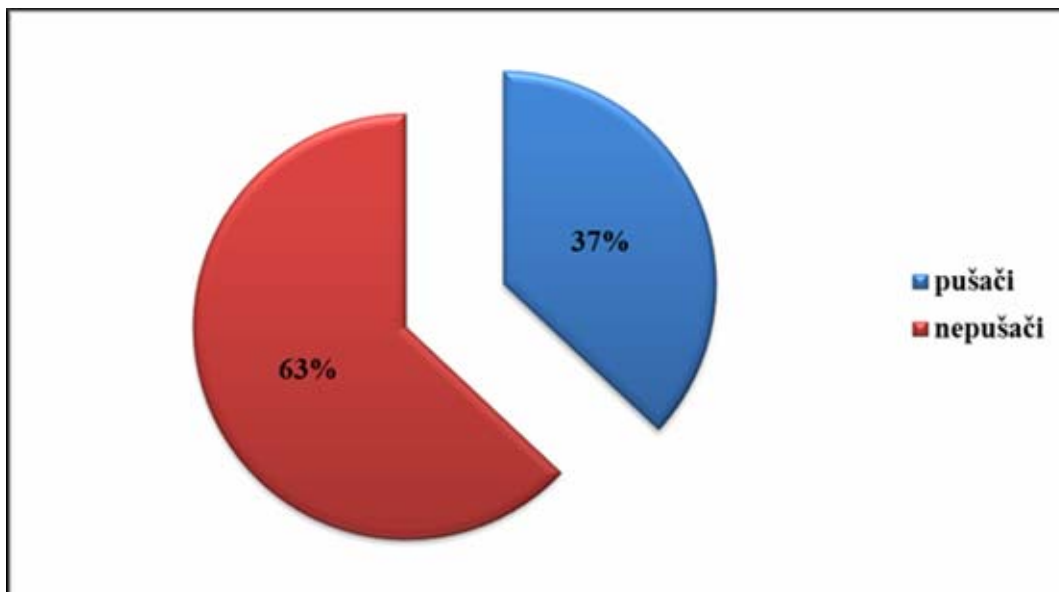
Najveći broj pacijenata je bio između 55-65 godina starosti. Može se uočiti da sa povećanjem starosti broj obolelih raste.

Na osnovu analize anamnestičkih podataka konstatovali smo da je bolest trajala najmanje tri meseca, a najviše 21 godinu. Kod najvećeg broja bolesnika bolest je trajala od 3-7 godina (Slika 23).



Slika 23. Dužina trajanja bolesti u OLP grupi.

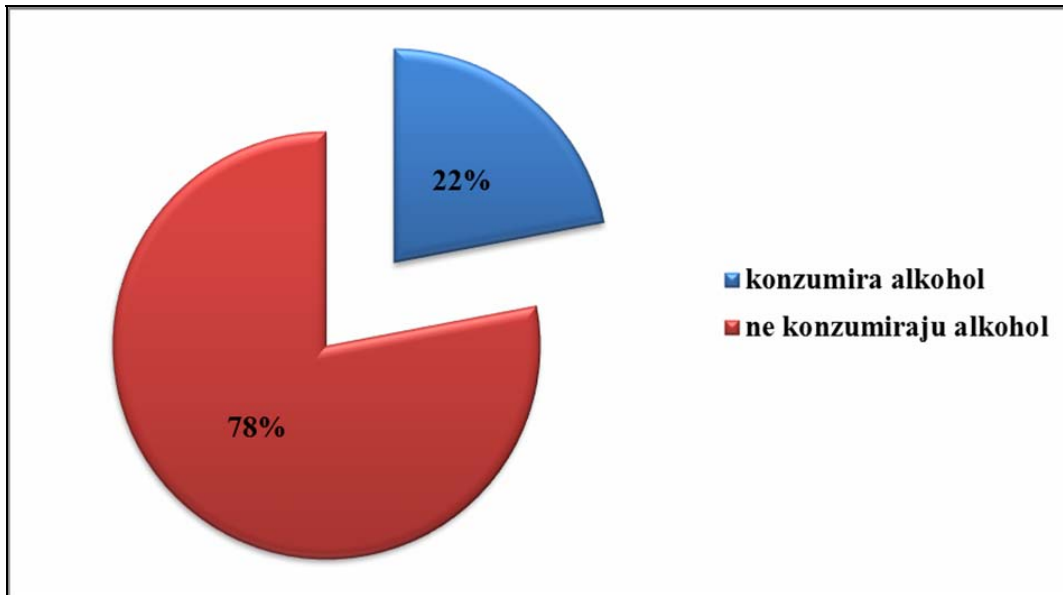
Analizom anamnestičkih podataka o navikama pacijenata sa OLP-om, konstatovano je da je od ukupnog broja pacijenata uključenih u studiju, 37% bilo pušača, dok je 63% bilo nepušača (Slika 24).



Slika 24. Procentualna zastupljenost pušača i nepušača u grupi ispitanika sa OLP-om.

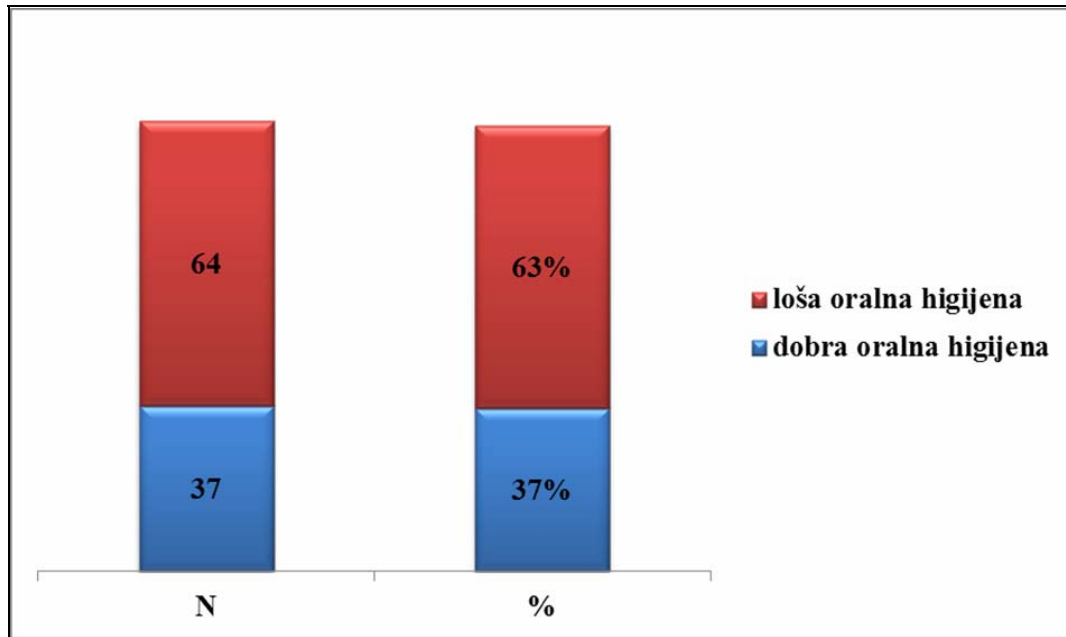


Kada je reč o konzumaciji alkohola, 22 pacijenta sa oralnim lihen planusom (21.78%) je konzumiralo alkohol svakodnevno, dok se 79 pacijenata (78.22%) izjasnilo da ne konzumira alkohol (Slika 25).



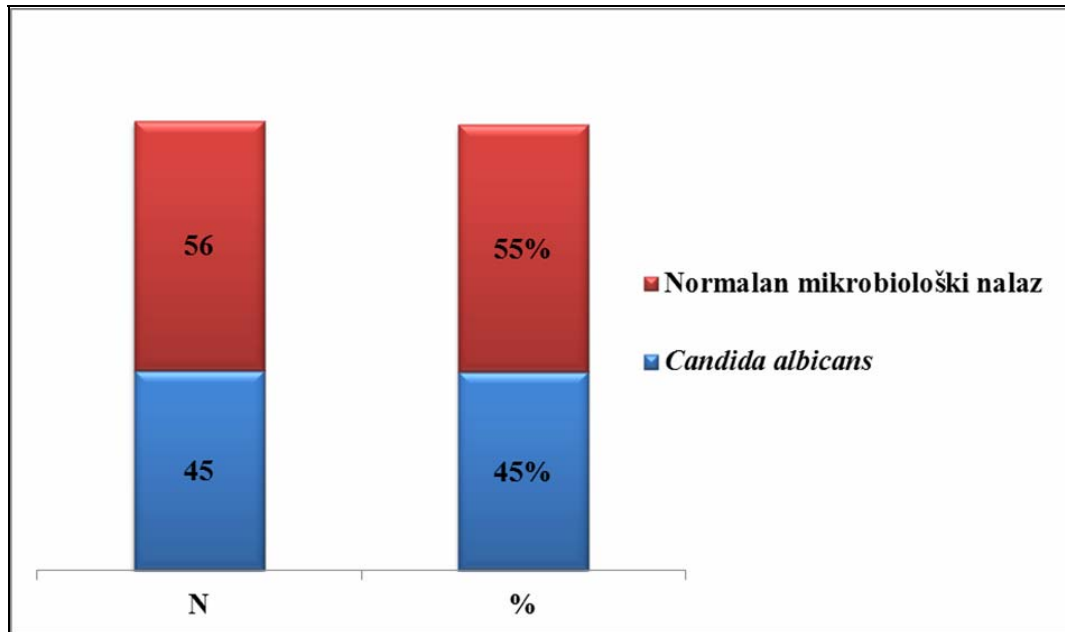
**Slika 25.** Procentualna zastupljenost osoba koje (ne)konzumiraju alkohol u grupi ispitanika sa OLP-om.

Prilikom kliničkog pregleda pacijenata vršena je procena oralne higijene plak indeksom i indeksom zubnog kamenca. Od ukupnog broja ispitanika sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom, 37 pacijenata (37%) je imalo dobru oralnu higijenu, dok je veći procenat ispitanika, 64 (63%) imalo lošu oralnu higijenu (Slika 26).



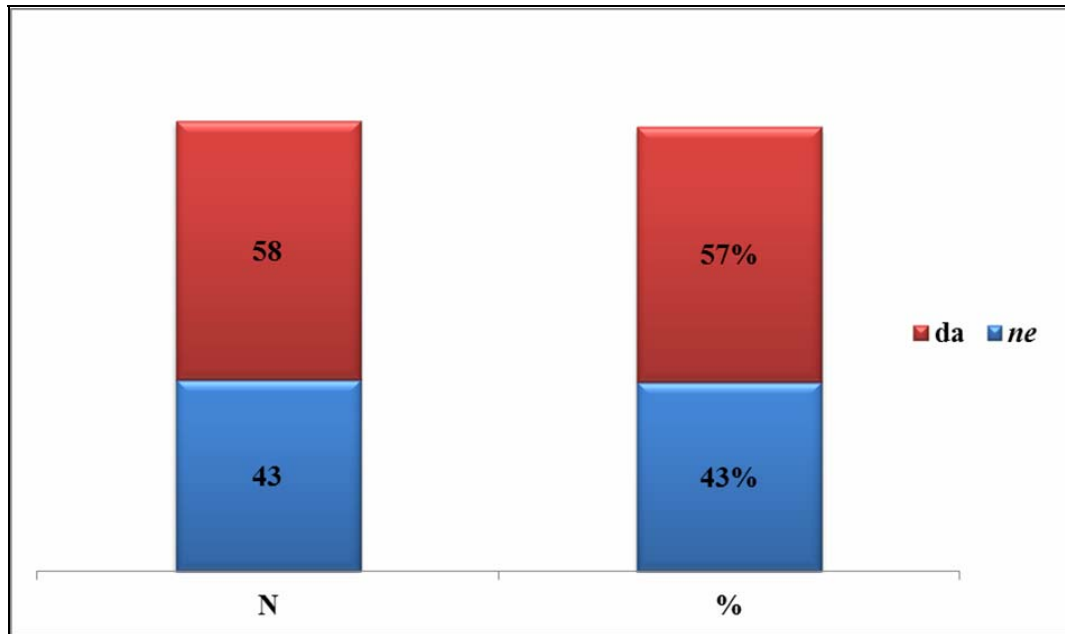
**Slika 26.** Zastupljenost pacijenata OLP grupe sa dobrom *versus* lošom oralnom higijenom.

Prilikom pregleda pacijenata je uziman i bris oralne sluzokože za potrebe mikrobioloških analiza. Rezultati mikrobioloških nalaza su pokazali da je od ukupnog broja pacijenata sa OLP-om, normalna saprofitna flora izolovana u 55% slučajeva, dok je kod 45% ispitanika izolovana *Candida albicans* (Slika 27).

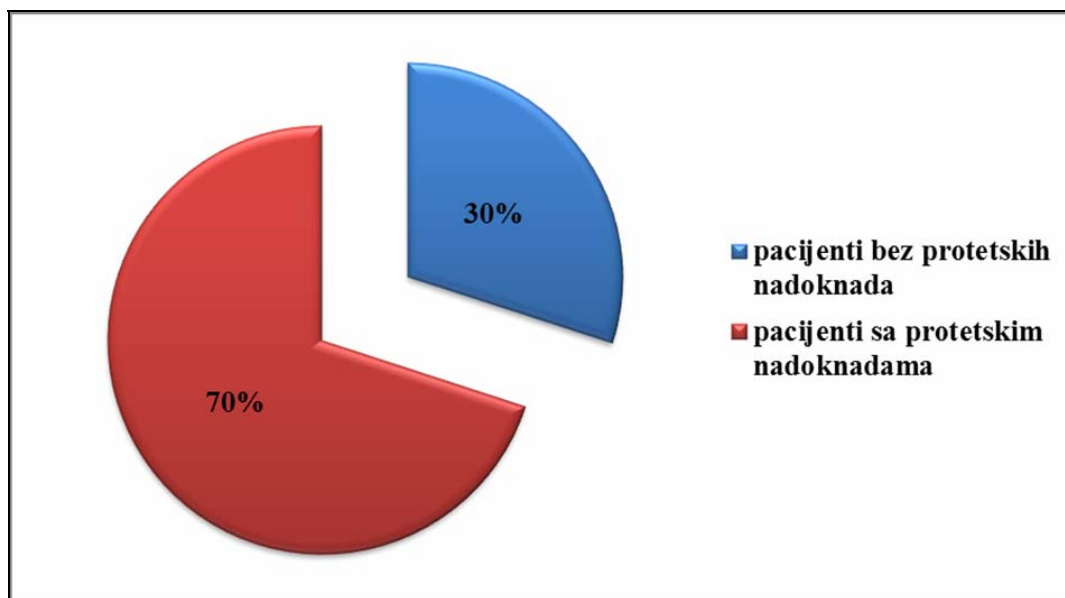


**Slika 27.** Zastupljenost *Candida albicans* kod pacijenata sa OLP-om.

Kako grupu ispitanika sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom uglavnom čine osobe starije životne dobi, prikupljeni su podaci o protetskim nadoknadama koje pacijenti nose i broju osoba koji su imali više različitih tipova metala u ustima. Od ukupnog broja pacijenata, 70% je imalo neke protetske nadoknade, od čega je 57.43% imalo više različitih metala u ustima (Slika 28, Slika 29).



**Slika 28.** Prisustvo različitih metala u ustima kod pacijenata sa OLP-om.



**Slika 29.** Procentualna zastupljenost OLP pacijenata sa i bez protetskih nadoknada.

#### 4.1.2. Zastupljenost kliničkih formi oralnog lihen planusa

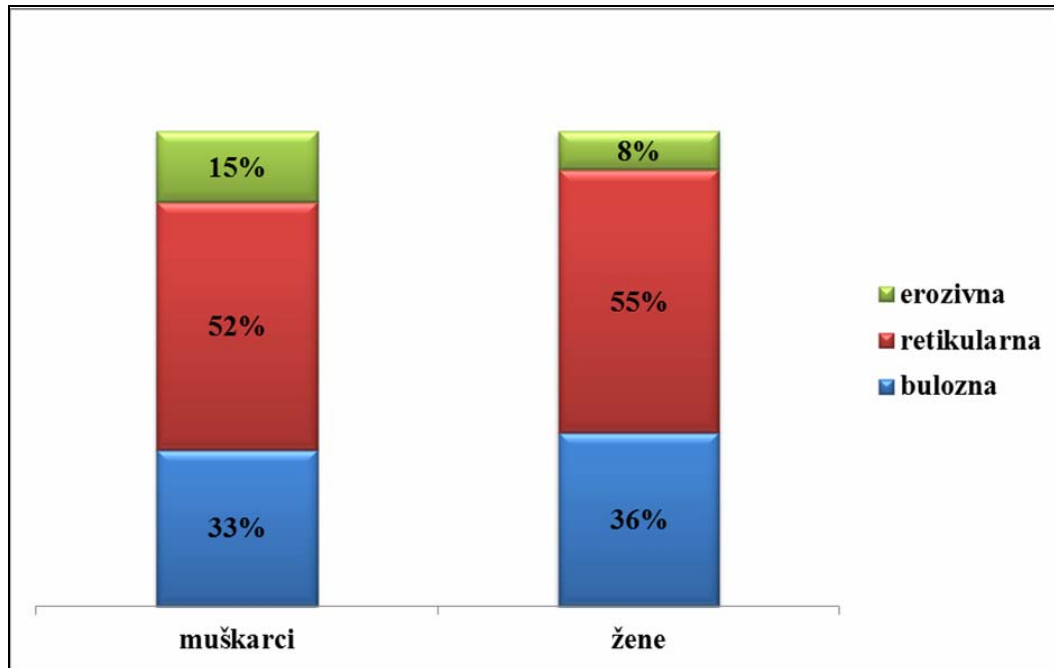
Prilikom kliničkog pregleda vršena je evaluacija kliničkih formi OLP (Tabela 6). Kod najvećeg broja bolesnika (55) je dijagnostikovana erozivna forma oralnog lihen planusa, zatim retikularna kod 36 i bulozna kod desetoro pacijenata. U tabeli 6. je dodatno predstavljena srednja vrednost, medijana, kao i rang (minimum-maksimum) godina pacijenata u zavisnosti od kliničke forme OLP-a.

**Tabela 6.** Zastupljenost različitih kliničkih formi oralnog lihen planusa.

	<b>Broj ispitanika</b>	<b>Srednja vrednost</b>	<b>Medijana</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>Bulozna forma</b>	10	68	68	49	79
<b>Erozivna forma</b>	55	59.78	58	30	84
<b>Retikularna forma</b>	36	54.39	53	28	78

Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike između godina starosti i različitih kliničkih formi OLP-a ( $p=0.008$ , Kruskal-Wallis test).

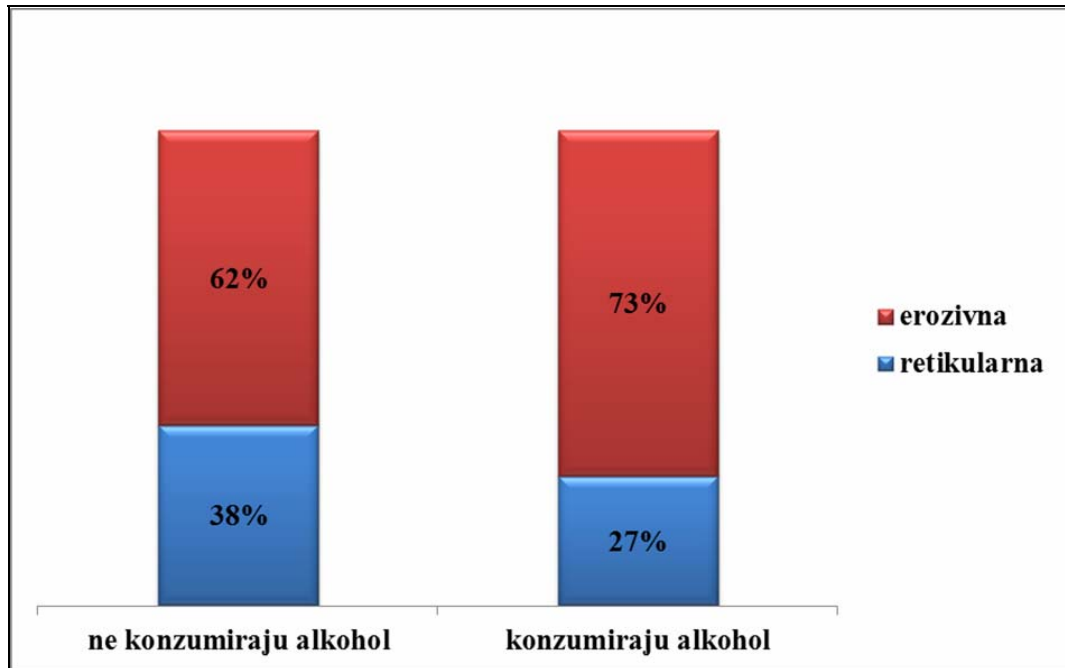
Distribucija kliničkih formi OLP-a po polovima je skoro identična, što je prikazano Slikom 30. Najzastupljenija je erozivna forma u oba pola (51-56%), dok je bulozna dosta ređa (8-15%) (Slika 30).



**Slika 30.** Procentualna zastupljenost različitih kliničkih formi OLP-a među pripadnicima muškog i ženskog pola.

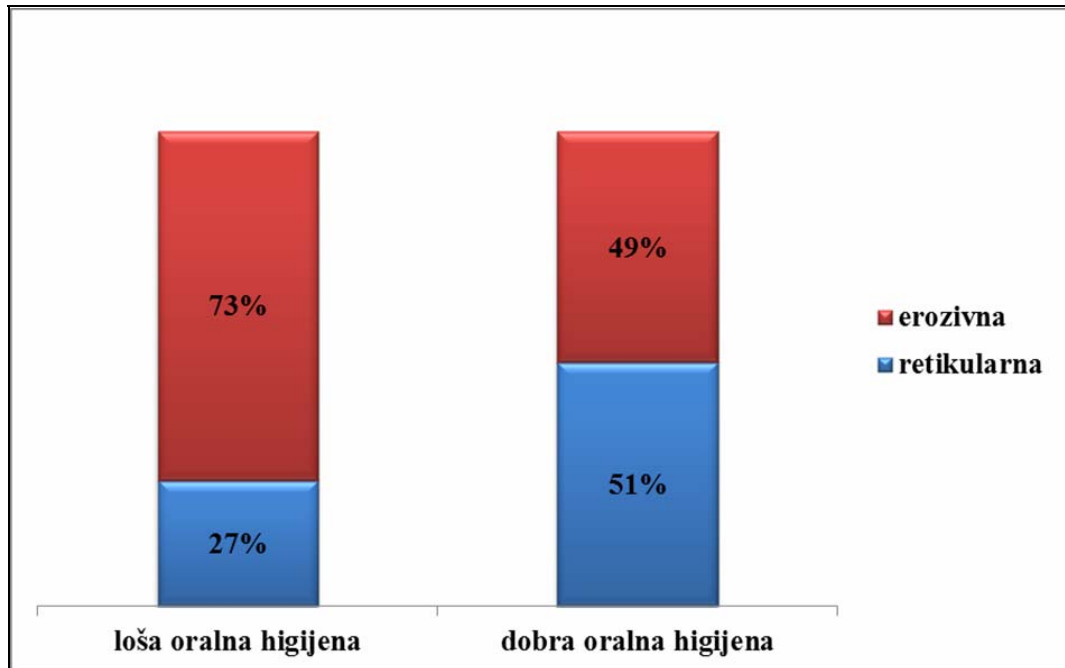
Nije uočeno postojanje statistički značajne razlike u zastupljenosti različitih kliničkih formi OLP-a u zavisnosti od pola pacijenata ( $p=0.635$ , Fisher Exact test).

Kada je reč o distribuciji različitih kliničkih formi OLP-a u zavisnosti od konzumacije alkohola ispitanika, uočava se da se erozivne forme OLP-a, erozivna i bulozna, javljaju dva i po puta češće kod pacijenata koji konzumiraju alkohol svakodnevno u poređenju sa osobama koje ne piju i data razlika je statistički značajna ( $p=0.035$ ,  $\chi^2$  test) (Slika 31).



**Slika 31.** Procentualna zastupljenost različitih kliničkih formi OLP-a među ispitanicima koji konzumiraju i ne konzumiraju alkohol.

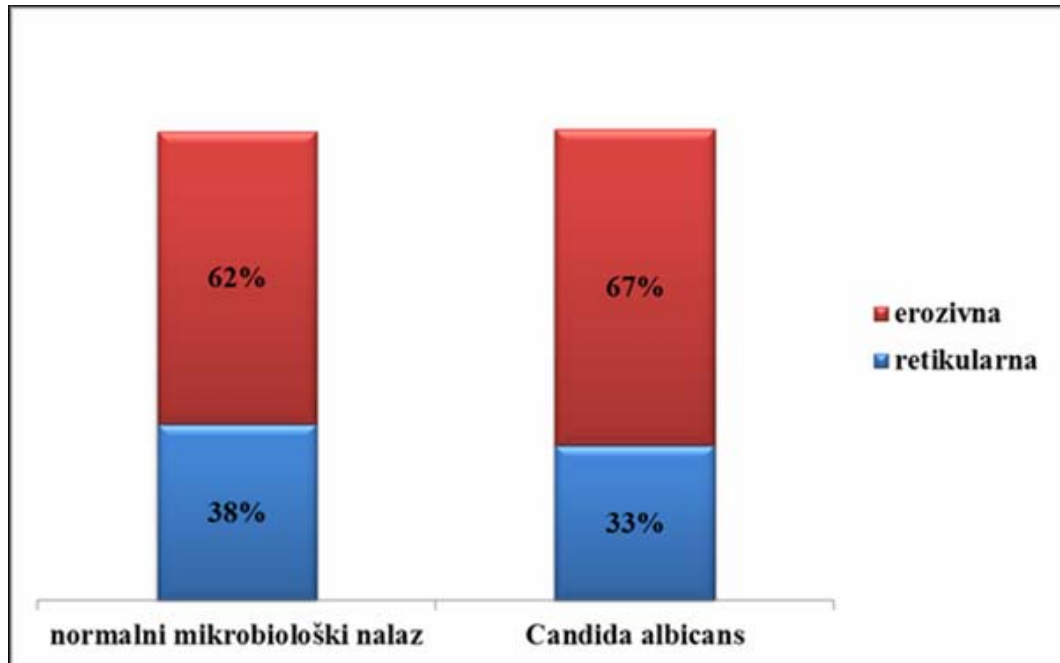
Javljanje bola kod pacijenata sa erozivnom formom oralnog lihen planusa najčešće onemogućava održavanje dobre oralne higijene. Od ukupnog broja pacijenata, samo njih 37-oro je imalo dobru oralnu higijenu. Rezultati statističke analize su pokazali da se kod pacijenata sa lošom oralnom higijenom erozivne forme oralnog lihen planusa dva puta češće javljaju u poređenju sa pacijentima koji imaju dobru oralnu higijenu ( $p=0.012$ ,  $\chi^2$  test) (Slika 32).



Slika 32. Zastupljenost kliničkih formi OLP-a u odnosu na oralnu higijenu.

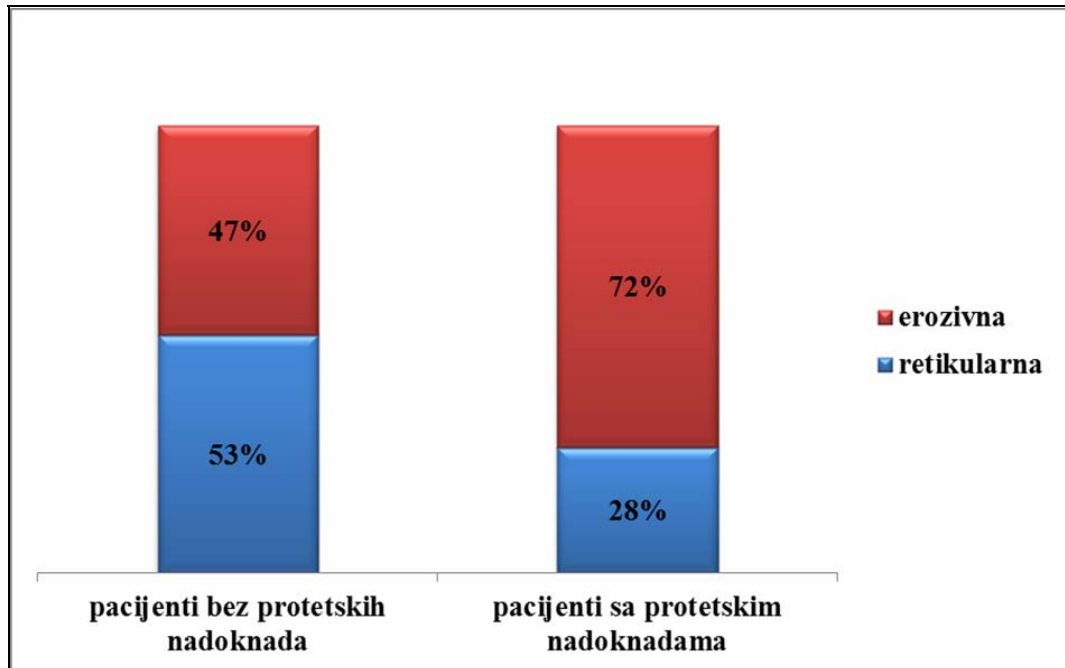
Kod 45 pacijenata je detektovano prisustvo *Candida albicans*. Od tog broja pacijenata, 33% je imalo retikularnu formu, a 67% erozivnu formu oralnog lihen planusa (Slika 33). Uredan mikrobiološki nalaz je imalo 56 pacijenata sa OLP-om, od čega je retikularna forma bila dijagnostikovana kod 38% pacijenata, a erozivna forma kod 62% pacijenata. Nije utvrđeno postojanje statističke značajnosti u distribuciji različitih kliničkih formi OLP-a u zavisnosti od mikrobiološkog nalaza, odnosno prisustva *Candida albicans* ( $p=0.663$ ,  $\chi^2$  test).





**Slika 33.** Zastupljenost kliničkih formi OLP-a u odnosu na mikrobiološki nalaz.

Grupu pacijenata sa oralnim lihen planusom uglavnom čine osobe koje su pripadnici starijeg dela populacije u prilog čemu govori i činjenica da je veliki procenta, 70% pacijenata imalo neke od protetskih nadoknada. Od tog broja pacijenata, kod 28% je dijagnostikovana retikularna, a kod 72% erozivna forma OLP-a. U podgrupi pacijenata koji nisu imali protetske nadoknade, 53% je imalo retikularnu formu, a 47% erozivnu formu OLP-a (Slika 34)



**Slika 34.** Zastupljenost kliničkih formi OLP-a u zavisnosti od prisustva/odsustva protetskih nadoknada kod pacijenata.

Može se uočiti da se erozivna forma OLP-a javlja oko 1.5 put češće u grupi pacijenata sa protetskim nadoknadama u poređenju sa pacijentima bez protetskih nadoknada. Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u distribuciji kliničkih formi OLP-a između grupe pacijenata sa i bez protetskih nadoknada ( $p=0.015$ ,  $\chi^2$  test).

## 4.2. Rezultati genetičkog istraživanja

### 4.2.1. Distribucija genotipova i alela ispitivanih polimorfizama u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima

Učestalosti genotipova i alela analiziranih polimorfizama u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima u grupi pacijenata sa dijagnostikovanim oranim lihen planusom i u kontrolnoj grupi su predstavljeni tabelarno i/ili slikama.

**Tabela 7.** Zastupljenost genotipova proučavanih polimorfizama u grupi pacijenata sa oralnim lihen planusom i u kontrolnoj grupi.

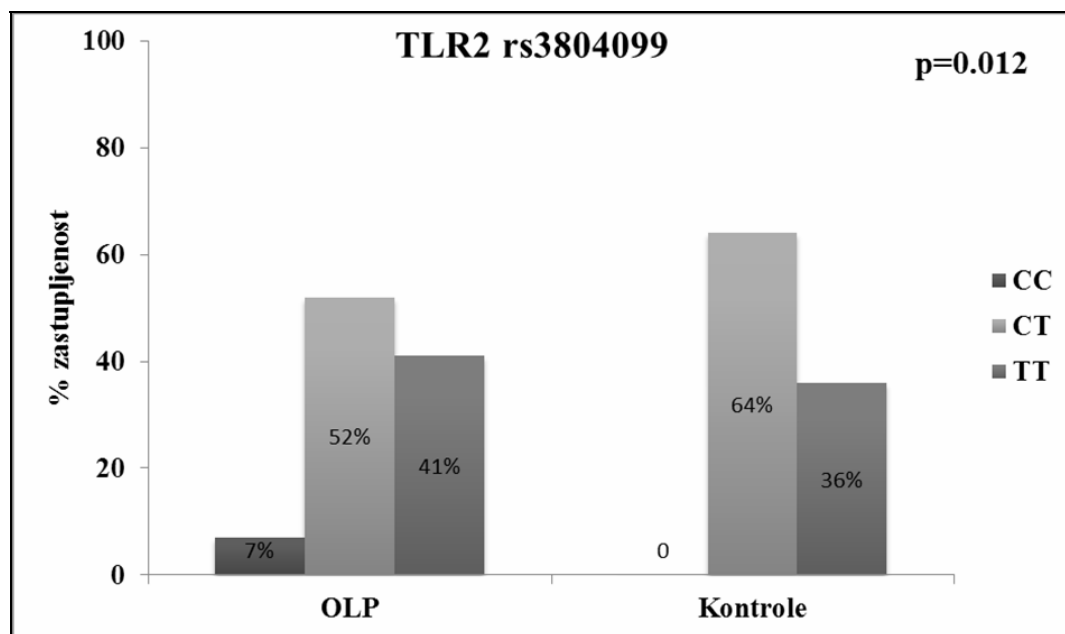
Gen/SNP	Genotip	OLP		Kontrole	p*
		N	N	N	
TLR2 rs3804099	CC	7	0		<b>0.01</b>
	CT	53	67		
	TT	41	37		
TLR3 rs5743312	CC	70	78		0.085
	CT	22	24		
	TT	9	2		
TLR3 rs3775291	GG	51	43		0.328
	GA	41	53		
	AA	9	8		
TLR4 rs4986791	CC	92	90		0.426
	CT	9	13		
	TT	0	1		
TLR4 rs4986790	AA	91	93		0.873
	AG	10	11		
	GG	0	0		
CD14 rs2569190	CC	33	37		0.573
	CT	46	40		
	TT	22	27		

N-ukupan broj pacijenata/kontrola  
p\* < 0.05 su predstavljene zatamnjeno

Na osnovu dobijenih rezultata proučavanih polimorfizama uočeno je postojanje statistički značajne razlike u distribuciji genotipova polimorfizma rs3804099 u TLR2 genu ( $p=0.012$ ,  $\chi^2$  test) (Slika 35, Tabela 7).

Interesantno je zapaziti da je u kontrolnoj grupi zabeleženo odsustvo *wild type* CC genotipa, koji se u grupi pacijenata javljao sa učestalošću od 7%.

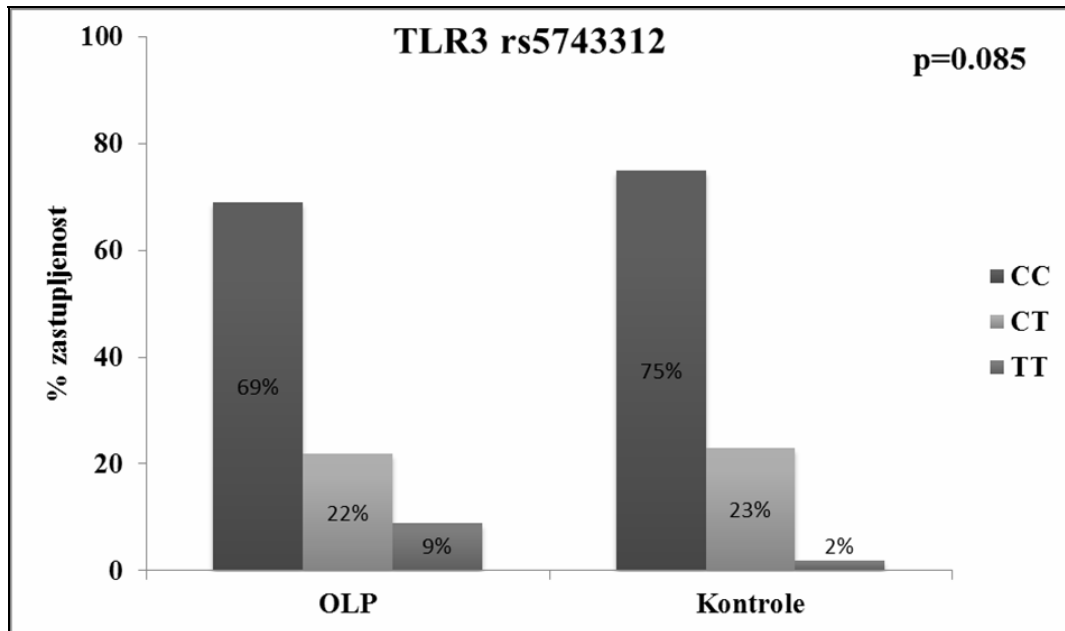
Kao najučestaliji genotip se javljao heterozigot CT u obe grupe sa učestalošću od 64% u kontrolnoj, odnosno 52% u grupi pacijenata sa oralnim lihen planusom (Slika 35, Tabela 7).



**Slika 35.** Zastupljenost genotipova polimorfizma rs3804099 TLR2 gena u grupi pacijenata sa oralnim lihen planusom i kontrolnoj grupi.

Izvesni trend ka postojanju razlike u distribuciji genotipova TLR3 rs5743312 polimorfizma je zabeležen, iako ta vrednost nije dostigla statističku značajnost ( $p=0.085$ ,  $\chi^2$  test) (Tabela 7).

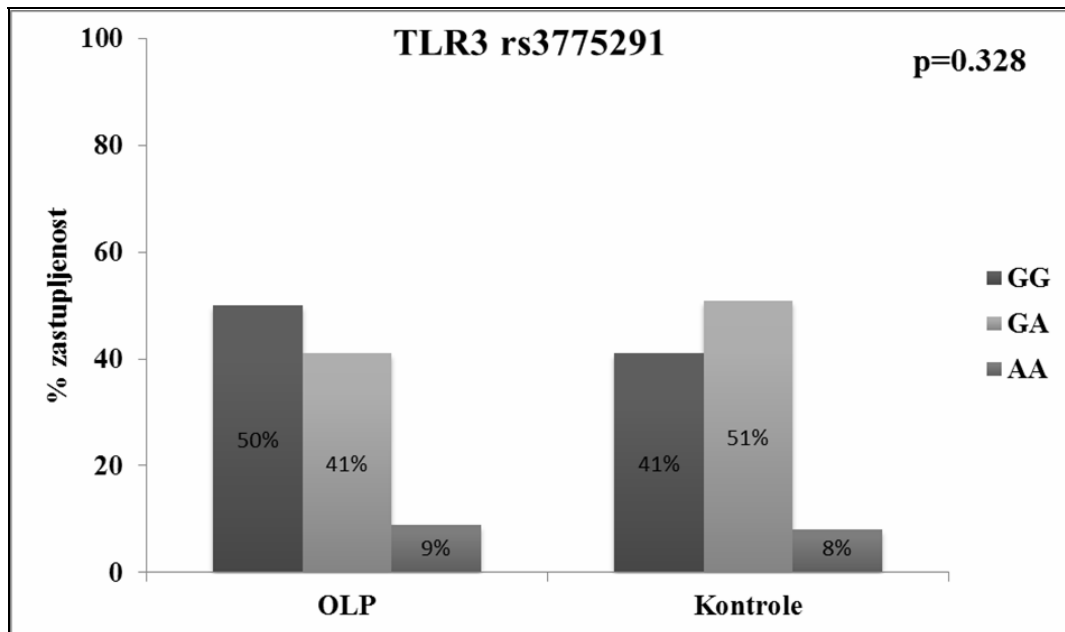
*Wild type* CC genotip se javljao sa najvišom učestalošću u grupi pacijenata, ali i kontrolnoj grupi (69%, 75%, redom), potom heterozigotni CT genotip i konačno mutirani genotip sa najnižom učestalošću u obe grupe (Slika 36, Tabela 7).



**Slika 36.** Zastupljenost genotipova polimorfizma rs5743312 TLR3 gena u grupi pacijenata sa oralnim lihen planusom i kontrolnoj grupi.

Kada je reč o drugom proučavanom polimorfizmu rs3775291 u TLR3 genu, nije uočeno postojanje razlike u distribuciji genotipova između kontrolne i grupe pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom ( $p=0.328$ ,  $\chi^2$  test) (Tabela 7).

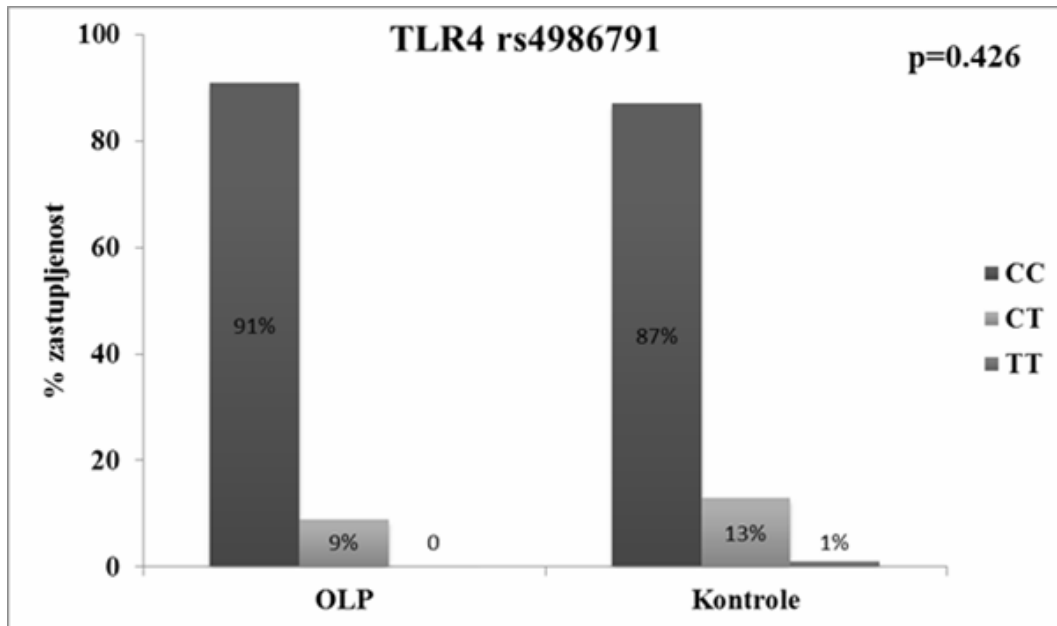
Najučestaliji u grupi pacijenata je bio *wild type* GG genotip (50%), dok je u kontrolnoj grupi zabeležena najviša učestalost heterozigotnih GA genotipa (51%) (Slika 37).



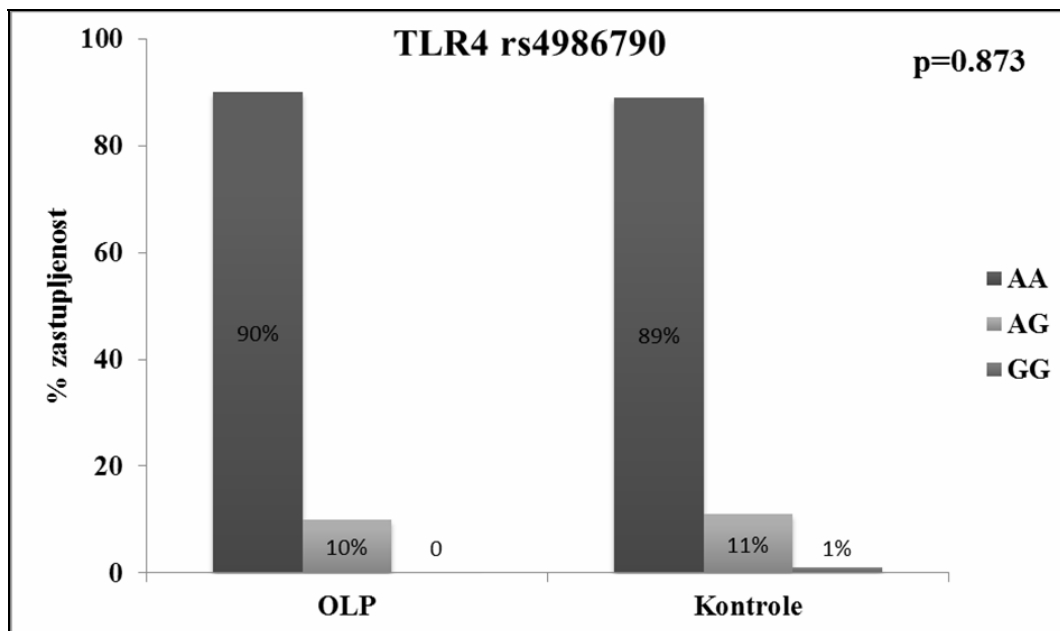
**Slika 37.** Zastupljenost genotipova polimorfizma rs3775291 TLR3 gena u grupi pacijenata sa oralnim lihen planusom i kontrolnoj grupi.

Odsustvo mutiranog TT genotipa TLR4 rs4986791 polimorfizma je uočeno u grupi pacijenata, dok je isti genotip u kontrolnoj grupi bio zabeležen samo kod 1% ispitanika (Slika 38, Tabela 7).

Dodatno, u slučaju polimorfizma rs4986790 u TLR4 genu, nije zabeleženo prisustvo mutiranog GG genotipa u grupi pacijenata niti kontrolnoj grupi (Slika 39, Tabela 7).

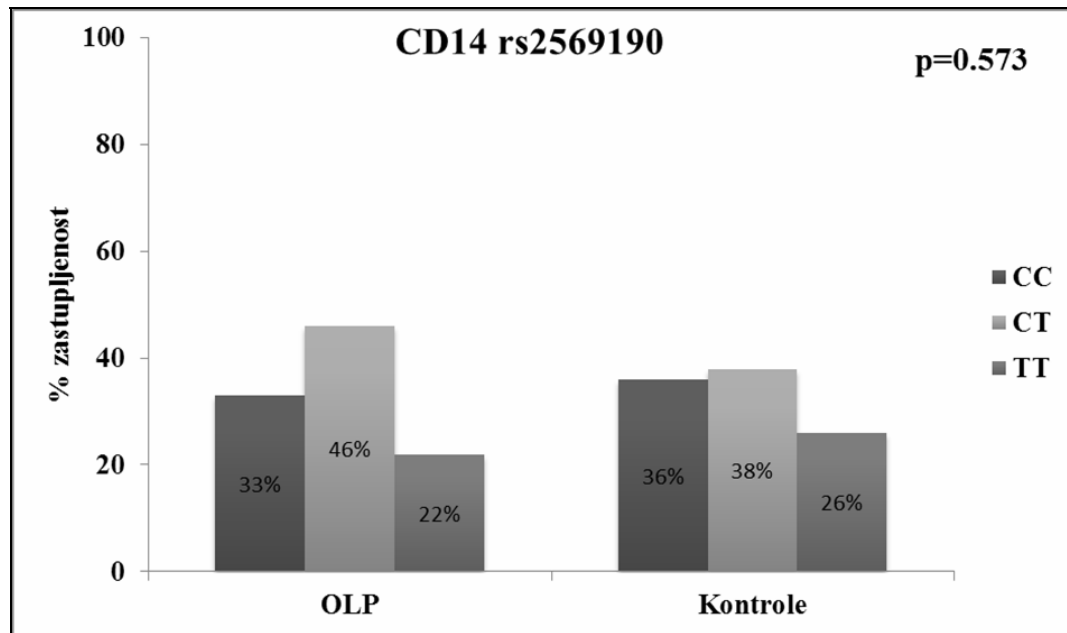


**Slika 38.** Zastupljenost genotipova polimorfizma rs4986791 TLR4 gena u grupi pacijenata sa oralnim lihen planusom i kontrolnoj grupi.



**Slika 39.** Zastupljenost genotipova polimorfizma rs4986790 TLR4 gena u grupi pacijenata sa oralnim lihen planusom i kontrolnoj grupi

Za analizirani SNP rs2569190 u CD14 genu, nije uočeno postojanje značajne razlike u učestalostima genotipova između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom ( $p=0.573$ ,  $\chi^2$  test) (Tabela 7, Slika 40). Interesantno je zapaziti da je heterozigotni genotip CT imao najvišu učestalost u OLP i kontrolnoj grupi (46%, 38%, redom) (Slika 40).



**Slika 40.** Zastupljenost genotipova polimorfizma rs2569190 CD14 gena u grupi pacijenata sa oralnim lihen planusom i kontrolnoj grupi.

Učestalosti alela analiziranih polimorfizama u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genu su predstavljeni tabelom 8. Postojanje statističke razlike u distribuciji alela je zabeleženo samo u slučaju polimorfizma rs4986791 TLR4 gena ( $p<0.0001$ ,  $\chi^2$  test) (Tabela 8). Statistički trend za postojanje razlike u distribuciji alela između grupa je uočen za SNP rs5743312 TLR3 gena, iako ta vrednost nije dostiglaa nivo statističke značajnosti ( $p=0.084$ ,  $\chi^2$  test) (Tabela 8). Za preostale proučavane polimorfizme u studiji nije zabeleženo postojanje razlike u distribuciji alela između grupe pacijenata sa oralnim lihen planusom i kontrolne grupe (Tabela 8).



**Tabela 8.** Zastupljenost alela proučavanih polimorfizama u grupi pacijenata sa oralnim lihen planusom i u kontrolnoj grupi.

Gen/SNP	Alel	OLP	Kontrole	p*
		N	N	
TLR2 rs3804099	C	67	67	0.836
	T	135	141	
TLR3 rs5743312	C	162	180	0.084
	T	40	28	
TLR3 rs3775291	G	143	139	0.386
	A	59	69	
TLR4 rs4986791	C	193	193	<0.0001
	T	9	15	
TLR4 rs4986790	A	192	197	0.877
	G	10	11	
CD14 rs2569190	C	112	114	0.897
	T	90	94	

N-ukupan broj pacijenata/kontrola  
p\* < 0.05 su predstavljene zatamnjeno

#### 4.2.2. Etiološke i kliničko-patološke odlike ispitivane grupe pacijenata

Asocijacija proučavanih polimorfizama u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima sa etiološkim faktorima kao i sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitivane grupe pacijenta sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom predstavljena je u tabeli 9. Ni jedan od polimorfizama nije bio značajno povezan sa proučavanim odlikama grupe ispitanika: polom, godinama, pušačkim navikama, konzumiranjem alkohola, prisustvom *Candida albicans*, postojanjem protetskih nadoknada, oralne higijene, kao i kliničke forme oralnog lihen planusa (Tabela 9).

**Tabela 9.** Asocijacija polimorfizama TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 gena sa etiološkim i kliničko- patološkim odlikama pacijenata.

Varijable	N	TLR2	TLR3	TLR3	TLR4	TLR4	CD14	
		rs3804099	rs5743312	rs3775291	rs4986791	rs4986790	rs2569190	
<i>Wild type/heterozigot/mutirani genotip</i>								
<b>Pol</b>	muški	27	0/15/12	21/4/2	10/13/4	25/2/0	25/2/0	8/19/0
	ženski	74	7/38/29	49/18/7	41/28/5	67/7/0	66/8/0	25/49/0
	p		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Godine</b>	<59	55	3/33/19	37/14/4	30/20/5	51/4/0	51/4/0	21/34/0
	>59	46	4/20/22	33/8/5	21/21/4	41/5/0	40/6/0	12/34/0
	p		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Pušenje</b>	nikada/bivši	64	5/34/25	43/15/6	33/28/3	57/7/0	56/8/0	24/40/0
	sadašnji	37	2/19/16	27/7/3	18/13/6	35/2/0	35/2/0	9/28/0
	p		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Alkohol</b>	nikada/bivši	79	5/43/31	57/17/5	39/33/7	71/8/0	70/9/0	26/53/0
	sadašnji	22	2/10/10	13/5/4	12/8/2	21/1/0	21/1/0	7/15/0
	p		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Oralna higijena</b>	dobra	37	4/22/11	23/11/3	20/13/4	35/2/0	33/4/0	12/25/0
	loša	64	3/31/30	47/11/6	31/28/5	57/7/0	58/6/0	21/43/0
	p		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Candida albicans</b>	negativno	56	2/35/19	37/12/7	27/24/5	52/4/0	52/4/0	20/36/0
	pozitivno	45	5/18/22	33/10/2	24/17/4	40/5/0	39/6/0	13/32/0

	p	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Amalgami i teški metali</b>							
ne	43	2/21/20	29/11/3	22/17/4	39/4/0	38/5/0	17/26/0
da	58	5/32/21	41/11/6	29/24/5	53/5/0	53/5/0	16/42/0
	p	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Protetske nadoknade</b>							
ne	30	3/19/8	21/6/3	14/11/5	27/3/0	27/3/0	9/21/0
da	71	4/34/33	49/16/6	37/30/4	65/6/0	64/7/0	24/47/0
	p	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
<b>Klinička forma</b>							
retikularna	36	3/22/11	25/6/5	19/13/4	31/5/0	30/6/0	14/22/0
erozivna	55	4/29/22	37/15/3	28/23/4	52/3/0	52/3/0	16/39/0
bulozna	10	0/2/8	8/1/1	4/5/1	9/1/0	9/1/0	3/7/0
	p	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ

N-ukupna broj pacijenata/kontrola

NSZ-nije statistički značajno

#### 4.2.3. Asocijacija genotipova proučavanih polimorfizama sa rizikom za razvoj oralnog lihen planusa

Logističkom regresionom analizom je ispitivano postojanje asocijacije genotipova proučavanih polimorfizama u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima sa rizikom za razvoj oralnog lihen planusa. *Wild type* genotip je za sve proučavane polimorfizme korišćen kao referentna vrednost u odnosu na koju je procenjivan rizik za razvoj OLP-a u slučaju heterozigotnog i mutiranog genotipa.

Testirani su i različiti modeli nasleđivanja polimorfizama i to: dominantni, recesivni i log-aditivni. Rezultati *crude Odds Ratio* analize su prikazani Tabelom 10.

Statistički značajno smanjenje rizika za razvoj OLP-a je uočeno u slučaju heterozigotnog i mutiranog genotipa TLR2 rs3804099 polimorfizma u odnosu na *wild type* genotip (**OR=0.08, p=0.008; OR=0.1, p=0.029**, redom) (Tabela 10). Dominantni model nasleđivanja je bio statistički značajno povezan sa sniženim rizikom za razvoj OLP-a (**OR=0.09, p=0.012**) (Tabela 10).

Bitno je napomenuti da dominantni model podrazumeva testiranje združenog efekta heterozigotnog i mutiranog genotipa nasuprot *wild type* genotipu.

Mutirani genotip je bio značajno povezan sa povišenim rizikom za razvoj oralnog lihen planusa u odnosu na *wild type* genotip u slučaju rs5743312 polimorfizma TLR3 gena (**OR=5.000, p=0.044**) (Tabela 10).

Očekivano, recesivni model kojim se testira efekat mutiranog genotipa spram združeno heterozigotnog i *wild type* genotipa je bio značajno povezan sa povišenim rizikom za razvoj OLP-a (**OR=4.9, p=0.043**) (Tabela 10).

Rezultati *crude Odds Ratio* analize su pokazali da preostali analizirani polimorfizmi u studiji nisu bili asocirani sa rizikom za razvoj OLP-a (Tabela 10).

**Tabela 10.** Asocijacija polimorfizama TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 gena sa rizikom za razvoj oralnog lihen planusa-*crude Odds Ratio*.

Gen/SNP	Genotip	OLP		Kontrole		Crude OR (95% CI)	p <sup>#</sup>
		N	%	N	%		
<b>TLR2</b> rs3804099	CC	7	7	0	0	1.0	Referentna
	CT	53	52	67	64	0.08 (0-0.5)	<b>0.008</b>
	TT	41	41	37	36	0.1 (0-0.8)	<b>0.029</b>
	Dominantno <sup>a</sup>	94	93	104	100	0.09 (0-0.6)	<b>0.012</b>
	Recesivno <sup>b</sup>	60	59	67	64	1.2 (0.7-2.1)	0.460
	Log-aditivno	/	/	/	/	1.0 (0.6-1.7)	0.800
<b>TLR3</b> rs5743312	CC	70	69	78	75	1.0	Referentna
	CT	22	22	24	23	1.0 (0.5-1.9)	0.950
	TT	9	9	2	2	5.0 (1.0-24.0)	<b>0.044</b>
	Dominantno <sup>a</sup>	31	31	26	25	1.3 (0.7-2.4)	0.364
	Recesivno <sup>b</sup>	92	91	102	98	4.9 (1.0-23.6)	<b>0.043</b>
	Log-aditivno	/	/	/	/	1.4 (0.9-2.4)	0.110
<b>TLR3</b> rs3775291	GG	51	50	43	41	1.0	Referentna
	GA	41	41	53	51	0.6 (0.3-1.1)	0.145
	AA	9	9	8	8	0.9 (0.3-2.6)	0.920
	Dominantno <sup>a</sup>	50	50	61	59	0.6 (0.3-1.2)	0.198
	Recesivno <sup>b</sup>	92	91	96	92	1.1 (0.4-3.1)	0.752
	Log-aditivno	/	/	/	/	0.8 (0.5-1.2)	0.370
<b>TLR4</b> rs4986791	CC	92	91	90	87	1.0	Referentna
	CT	9	9	13	13	0.6 (0.2-1.6)	0.395
	TT	0	0	1	1	0.9 (0-38.5)	0.994
	Dominantno <sup>a</sup>	9	9	14	13	0.6 (0.2-1.5)	0.305
	Recesivno <sup>b</sup>	101	100	103	99	1.0 (0-40.1)	1.000
	Log-aditivno	/	/	/	/	0.6 (0.2-1.1)	0.240
<b>TLR4</b>	AA	91	90	93	89	1.0	Referentna

rs4986790	AG	10	10	11	11	0.9 (0.3-2.2)	0.873
CD14	CC	33	33	37	36	1.0	Referentna
	CT	46	46	40	38	1.2 (0.6-2.4)	0.431
rs2569190	TT	22	22	27	26	0.9 (0.4-1.9)	0.809
	Dominantno <sup>a</sup>	68	67	67	64	1.1 (0.6-2.0)	0.661
	Recesivno <sup>b</sup>	79	79	77	74	0.7 (0.4-1.5)	0.483
	Lod-additive	/	/	/	/	0.9 (0.6-1.4)	0.900

N-ukupan broj pacijenata/kontrola; OR-Odds Ratio

95% CI-95% Interval poverenja

p<sup>#</sup><0.05 su predstavljene zatamnjeno

<sup>a</sup> Heterozigotni i mutirani genotip združeno *versus wild type* genotip

<sup>b</sup> Mutirani genotip *versus* heterozigotni i *wild type* genotipovi združeno

Rezultati *adjusted Odds Ratio* analize, koja podrazumeva uključivanje podataka o tzv. *confounding* faktorima, kao što su:

- I. pol,
- II. godine,
- III. pušenje i
- IV. korišćenje alkohola u logističku regresionu analizu predstavljeni su Tabelom 11.

Kada je reč o rs3804099 SNP-u u TLR2 genu, nakon uvođenja navedenih *confounding* faktora u analizu, prethodno zapažena veza *crude Odds Ratio* analizom sa sniženim rizikom za razvoj OLP-a u slučaju heterozigotnog i mutiranog genotipa je izgubljena (OR=0.2, p=0.306; OR=0.6, p=0.731, redom) (Tabela 11).

U slučaju TLR3 rs5743312 polimorfizma, *adjusted Odds Ratio* analizom je pokazano da nosioci mutiranog genotipa imaju 15.9 puta viši rizik za razvoj oralnog lihen planusa u odnosu na nosioce *wild type* genotipa (**OR=15.9, p=0.011**) (Tabela 11).

Isti trend je zabeležen i u slučaju recesivnog tipa nasleđivanja (**OR=15.6, p=0.008**) (Tabela 11).

Ni jedan od preostalih proučavanih polimorfizama nije bio asociran sa rizikom razvoja oralnog lihen planusa (Tabela 11).

**Tabela 11.** Asocijacija polimorfizama TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 gena sa rizikom za razvoj oralnog lihen planusa-*adjusted Odds Ratio*.

Gen/SNP	Genotip	OLP		Kontrola		Adjusted OR* (95% CI)	p <sup>#</sup>
		N	%	N	%		
<b>TLR2</b> <b>rs3804099</b>	CC	7	7	0	0	1.0	Referentna
	CT	53	52	67	64	0.2 (0-3.6)	0.306
	TT	41	41	37	36	0.6 (0-9.4)	0.731
	Dominantno <sup>a</sup>	94	93	104	100	0.2 (0-4.2)	0.368
	Recesivno <sup>b</sup>	60	59	67	64	2.1 (0.7-6.5)	0.160
	Log-aditivno	/	/	/	/	0.6 (0.2-1.8)	0.450
<b>TLR3</b> <b>rs5743312</b>	CC	70	69	78	75	1.0	Referentna
	CT	22	22	24	23	0.9 (0.2-3.2)	0.905
	TT	9	9	2	2	15.9 (1.9-134.2)	<b>0.011</b>
	Dominantno <sup>a</sup>	31	31	26	25	1.6 (0.5-4.9)	0.332
	Recesivno <sup>b</sup>	92	91	102	98	15.6 (2.0-120.7)	<b>0.008</b>
	Log-aditivno	/	/	/	/	2.2 (0.9-5.0)	0.064
<b>TLR3</b> <b>rs3775291</b>	GG	51	50	43	41	1.0	Referentna
	GA	41	41	53	51	0.8 (0.2-2.5)	0.770
	AA	9	9	8	8	2.1 (0.2-15.2)	0.453
	Dominantno <sup>a</sup>	50	50	61	59	0.9 (0.3-2.7)	0.943
	Recesivno <sup>b</sup>	92	91	96	92	1.8 (0.3-10.7)	0.494
	Log-aditivno	/	/	/	/	1.1 (0.4-2.5)	0.820
<b>TLR4</b> <b>rs4986791</b>	CC	92	91	90	87	1.0	Referentna
	CT	9	9	13	13	0.3 (0.03-4.2)	0.442
	TT	0	0	1	1	9.8 (0-384.5)	1.000
	Dominantno <sup>a</sup>	9	9	14	13	0.3 (0.03-3.9)	0.414
	Recesivno <sup>b</sup>	101	100	103	99	10.9 (0-425.6)	1.000
	Log-aditivno	/	/	/	/	0.3 (0.04-3.8)	0.360
<b>TLR4</b> <b>rs4986790</b>	AA	91	90	93	89	1.0	Referentna
	AG	10	10	11	11	0.2 (0.01-3.0)	0.266
<b>CD14</b> <b>rs2569190</b>	CC	33	33	37	36	1.0	Referentna
	CT	46	46	40	38	2.1 (0.6-7.3)	0.206
	TT	22	22	27	26	0.6 (0.1-2.8)	0.540
	Dominantno <sup>a</sup>	68	67	67	64	1.4 (0.4-4.3)	0.520
	Recesivno <sup>b</sup>	79	79	77	74	0.4 (0.1-1.8)	0.276
	Log-aditivno	/	/	/	/	0.9 (0.4-1.8)	0.840

N-ukupan broj pacijenata/kontrola; OR-Odds Ratio

95% CI-95% Interval poverenja

\**Adjustment* prema polu, godinama, pušenju i korišćenju alkohola

p<sup>#</sup><0.05 su predstavljene zatamnjeno

<sup>a</sup> Heterozigotni i mutirani genotip združeno *versus wild type* genotip

<sup>b</sup> Mutirani genotip *versus* heterozigotni i *wild type* genotipovi združeno

#### 4.2.4. Analiza haplotipova

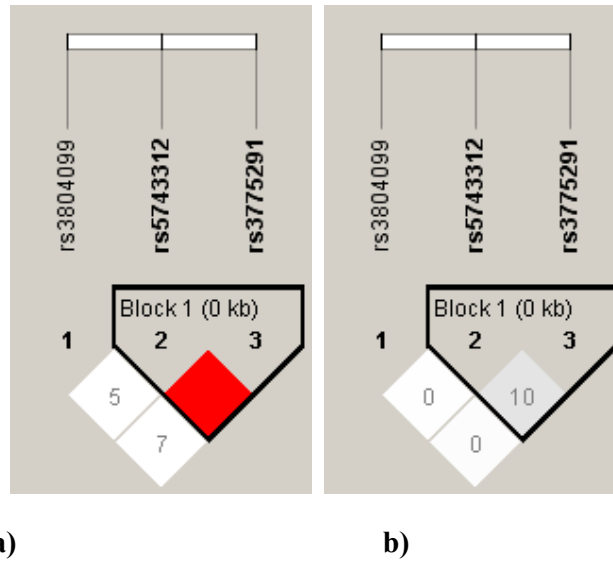
Uzimajući u obzir činjenicu da se analizirani polimorfizmi TLR2 i TLR3 gena nalaze na dugom kraku hromozoma 4, moglo bi se pretpostaviti da se proučavani polimorfizmi mogu nalaziti u gametskoj neravnoteži vezanosti (Engl. Linkage Disequilibrium-LD).

Analiza haplotipova je urađena korišćenjem softverskog programa Haploview (verzija 4.2). Koeficijent gametske neravnoteže vezanosti (LD) je računat i predstavljen parametrima  $D'$  i  $r^2$  (Slika 41).

$D'$  i  $r^2$  vrednosti su prikazane u kvadratićima i predstavljene u procentima za celokupnu studijsku grupu, kao i pojedinačno za grupu pacijenata sa dijagnostikovanim OLP-om i kontrolnu grupu (Slika 41, Slika 42, Slika 43).

Haplotipski blok je definisan korišćenjem opcije *solid spine block definition*. U sva tri navedena slučaja (celokupnoj studijskoj grupi, grupi pacijenata i kontrolnoj grupi (Slika 41, Slika 42, Slika 43) analizirani polimorfizmi u TLR3 genu su bili u gametskoj neravnoteži vezanosti, dok je ispitivani polimorfizam TLR2 gena bio fizički udaljen u odnosu na identifikovani haplotipski blok.

Relativno niske vrednosti  $r^2$  koeficijenta ukazuju da ni jedan od analiziranih polimorfizama nije suvišan za studije asocijacije.



**Slika 41.** Grafički prikaz gamtske neravnoteže vezanosti (Linkage Disequilibrium-LD) analiziranih polimorfizama u TLR2 i TLR3 genima za celokupnu studijsku grupu a)  $D'$  vrednosti b)  $r^2$  vrednosti.

$D'$  i  $r^2$  vrednosti su prezentovane u procentima.

Polja osenčena crvenom bojom odgovaraju  $D'$  vrednostima između polimorfizama nukleotidne sekvence.

Nijanse roze:  $LOD > 2$ ,  $D' > 1$ ;

Crveno:  $LOD > 2$ ,  $D' = 1$ ;

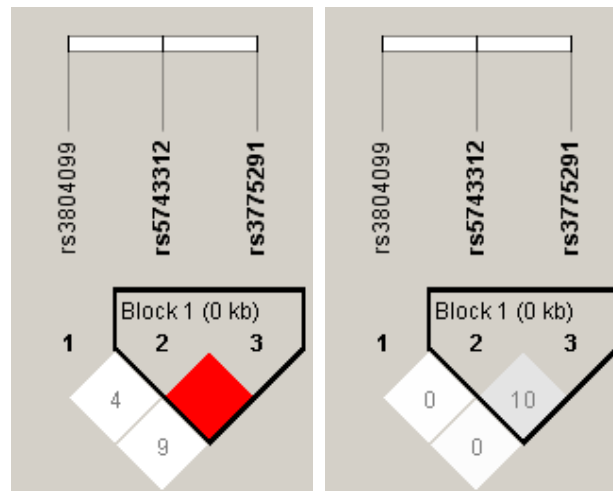
bela:  $LOD < 2$ ,  $D' < 1$ .  $LOD$ - logarithm of odds.

Polja osenčena sivim odgovaraju  $r^2$  vrednostima između SNP-ova: Belo:  $r^2 = 0$ ;

Nijanse sive:  $0 < r^2 < 1$ ;

Crno:  $r^2 = 1$





a)

b)

**Slika 42.** Grafički prikaz gamtske neravnoteže vezanosti (Linkage Disequilibrium-LD) analiziranih polimorfizama u TLR2 i TLR3 genima za grupu pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom a)  $D'$  vrednosti b)  $r^2$  vrednosti

*$D'$  i  $r^2$  vrednosti su prezentovane u procentima.*

*Polja osenčena crvenom bojom odgovaraju  $D$  vrednostima između polimorfizama nukleotidne sekvence.*

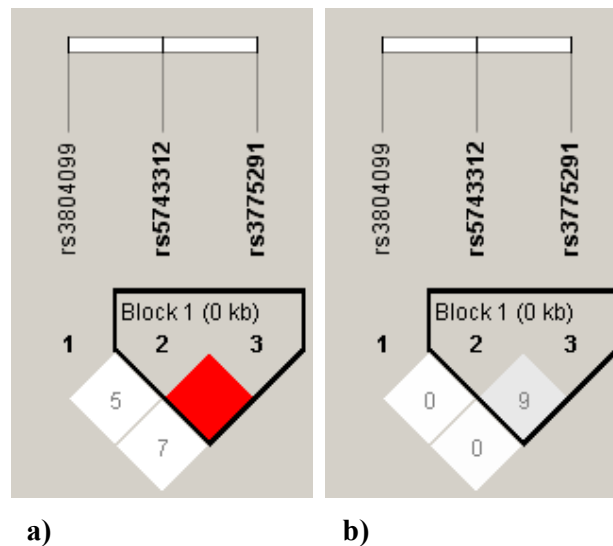
*Nijanse roze:  $LOD > 2$ ,  $D' > 1$ ;*

*Crveno:  $LOD > 2$ ,  $D' = 1$ ;*

*bela:  $LOD < 2$ ,  $D' < 1$ .  $LOD$ - logarithm of odds.*

*Polja osenčena sivim odgovaraju  $r^2$  vrednostima između SNP-ova: Belo:  $r^2 = 0$ ;*

*Nijanse sive:  $0 < r^2 < 1$ ; Crno:  $r^2 = 1$*



**Slika 43.** Grafički prikaz gamtske neravnoteže vezanosti (Linkage Disequilibrium-LD) analiziranih polimorfizama u TLR2 i TLR3 genima u kontrolnoj grupi a)  $D'$  vrednosti b)  $r^2$  vrednosti

$D'$  i  $r^2$  vrednosti su prezentovane u procentima.

Polja osenčena crvenom bojom odgovaraju  $D'$  vrednostima između polimorfizama nukleotidne sekvence.

Nijanse roze:  $LOD > 2$ ,  $D' > 1$ ;

Crveno:  $LOD > 2$ ,  $D' = 1$ ;

bela:  $LOD < 2$ ,  $D' < 1$ .  $LOD$ - logarithm of odds.

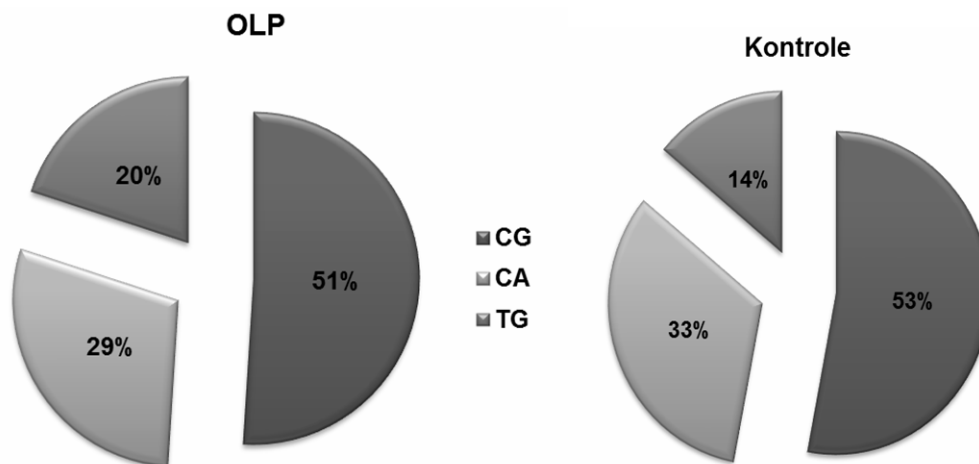
Polja osenčena sivim odgovaraju  $r^2$  vrednostima između SNP-ova: Belo:  $r^2 = 0$ ;

Nijanse sive:  $0 < r^2 < 1$ ;

Crno:  $r^2 = 1$

Programom Haploview je računata i procentualna zastupljenost identifikovanih haplotipova u celokupnoj studijskoj grupi, kao i u kontrolnoj i grupi pacijenata. Distribucija identifikovanih haplotipova kao i postojanje razlike u distribuciji između grupe pacijenata sa oralnim lihen planusom i kontrolne grupe je predstavljena u Tabeli 12 i Slici 44.

Prikazane su *raw* p vrednosti, kao i vrednosti koje se dobijaju nakon simulacije 1 000 permutacija (Tabela 12). *Raw* i *permutation* p vrednosti pokazuju da ne postoji značajna razlika u učestalosti identifikovanih haplotipova između grupe pacijenata i kontrolne grupe (Tabela 12).



**Slika 44.** Zastupljenost identifikovanih haplotipova proučavanih polimorfizama TLR3 gena u grupi pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom i kontrolnoj grupi.

Najčešće zastupljen CG haplotip je korišćen kao referentna vrednost za određivanje postojanja rizika za razvoj OLP-a. Rezultati haplotipske *Odds Ratio* analize, prikazani u Tabeli 12, pokazuju da detektovani haplotipovi nisu asocirani sa rizikom za nastanak oralnog lihen planusa.

**Tabela 12.** Distribucija haplotipova i haplotipska Odds Ratio analiza za polimorfizme rs5743312 i rs3775291 u TLR3 genu.

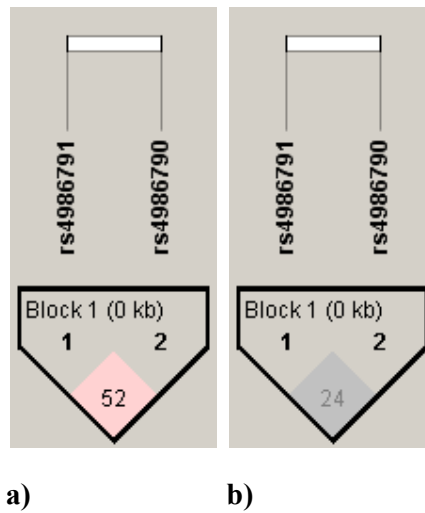
Haplotipovi	Ukupno		OLP		Kontrole		p vrednost		OR (CI 95%)	p
	N	%	N	%	N	%	Raw	Permutation		
CG	107	52	52	51	55	53	0.630	0.239	Referentna	
CA	63	31	29	29	35	33	0.386	0.731	0.9 (0.5-1.4)	0.686
TG	35	17	20	20	14	14	0.084	0.239	1.4 (0.8-2.4)	0.194

N-ukupan broj pacijenata/kontrola  
95% CI-95% interval poverenja

Imajući u vidu podatak da se polimorfizmi rs4986791 i rs4986790 TLR4 gena nalaze blisko locirani na dugom kraku hromozoma 9 i da u 98% slučajeva kosegregiraju zajedno, moglo bi se pretpostaviti da se navedeni polimorfizmi takođe nalaze u gametskoj neravnoteži vezanosti. Stoga je urađena analiza haplotipova korišćenjem programa Haploview i haplotipovi su identifikovani korišćenjem opcije *Solid spine block definition*. Proučavani polimorfizmi su se nalazili u neravnoteži vezanosti u našoj celokupnoj studijskoj grupi ( $D'=0.52$ ,  $r^2=0.24$ ) (Slika 45), kao i u grupi pacijenata ( $D'=0.88$ ,  $r^2=0.69$ ) (Slika 46) i kontrolnoj grupi ( $D'=0.26$ ,  $r^2=0.05$ ) (Slika 47).

Utvrđena je i procentualna zastupljenost identifikovanih haplotipova i predstavljena je Slikom 48 i Tabelom 13. Od identifikovana četiri, najzastupljeniji haplotip je bio CA u obe proučavane grupe (Slika 48, Tabela 13). Potvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u distribuciji haplotipova između grupe pacijenata sa dijagnostikovanom oralnim lihen planusom i kontrolne grupe, što je potvrđeno *raw*, ali i *permutation* p vrednostima, koje se dobijaju nakon simulacije 1000 permutacija (*raw*  $p=0.004$ , *permutation*  $p=0.019$ ,  $\chi^2$  test) (Tabela 13).

U cilju utvrđivanja postojanja asocijacije između identifikovanih haplotipova i rizika za nastanak oralnog lihen planusa, urađena je haplotipska *Odds Ratio* analiza (Tabela 13). Pokazano je da je TA haplotip statistički značajno asociiran sa 0.099 puta sniženim rizikom za razvoj oralnog lihen planusa ( $p=0.030$ ).



**Slika 45.** Grafički prikaz gamtske neravnoteže vezanosti (Linkage Disequilibrium-LD) analiziranih polimorfizama u TLR4 genu za celokupnu studijsku grupu a)  $D'$  vrednosti b)  $r^2$  vrednosti.

*$D'$  i  $r^2$  vrednosti su prezentovane u procentima.*

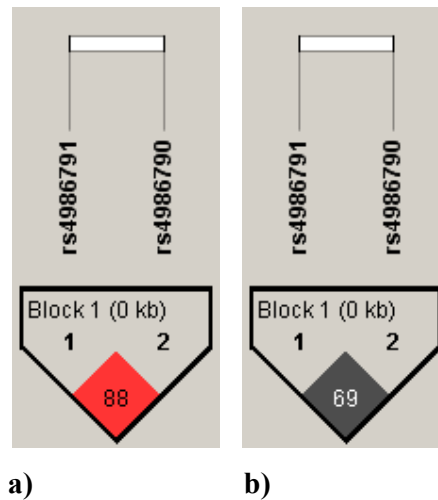
*Polja osenčena crvenom/roze bojom odgovaraju  $D'$  vrednostima između polimorfizama nukleotidne sekvence.*

*Nijanse roze:  $LOD > 2$ ,  $D' > 1$ ;*

*LOD- logarithm of odds.*

*Polja osenčena sivim odgovaraju  $r^2$  vrednostima između SNP-ova:*

*Nijanse sive:  $0 < r^2 < 1$ ;*



**Slika 46.** Grafički prikaz gamtske neravnoteže vezanosti (Linkage Disequilibrium-LD) analiziranih polimorfizama u TLR4 genu za grupu pacijenata sa oralnim lihen planusom a)  $D'$  vrednosti b)  $r^2$  vrednosti.

*$D'$  i  $r^2$  vrednosti su prezentovane u procentima.*

*Polja osenčena crvenom bojom odgovaraju  $D'$  vrednostima između polimorfizama nukleotidne sekvence.*

*Nijanse roze:  $LOD > 2$ ,  $D' > 1$ ;*

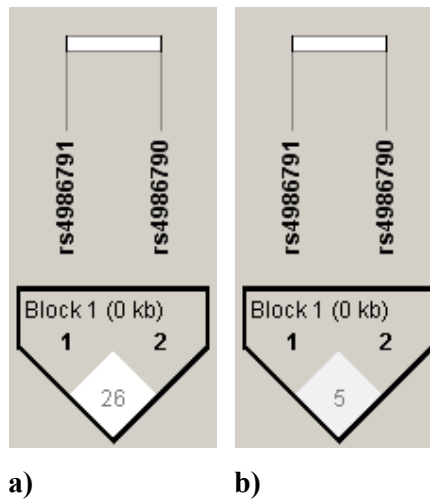
*Crveno:  $LOD > 2$ ,  $D' = 1$ ;*

*bela:  $LOD < 2$ ,  $D' < 1$ .  $LOD$ - logarithm of odds.*

*Polja osenčena sivim odgovaraju  $r^2$  vrednostima između SNP-ova: Belo:  $r^2 = 0$ ;*

*Nijanse sive:  $0 < r^2 < 1$ ;*

*Crno:  $r^2 = 1$*



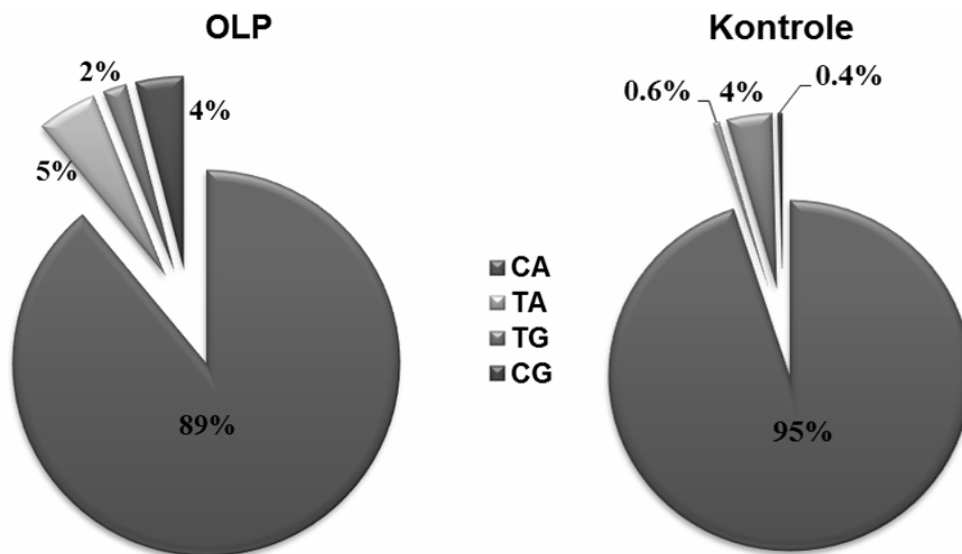
**Slika 47.** Grafički prikaz gamtske neravnoteže vezanosti (Linkage Disequilibrium-LD) analiziranih polimorfizama u TLR4 genu u kontrolnoj grupi a)  $D'$  vrednosti b)  $r^2$  vrednosti.

$D'$  i  $r^2$  vrednosti su prezentovane u procentima.

bela:  $LOD < 2$ ,  $D' < 1$ .  $LOD$ - logarithm of odds.

Polja osenčena sivim odgovaraju  $r^2$  vrednostima između SNP-ova: Belo:  $r^2 = 0$ ;

Nijanse sive:  $0 < r^2 < 1$ ;



**Slika 48.** Zastupljenost identifikovanih haplotipova proučavanih polimorfizama TLR3 gena u grupi pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom i kontrolnoj grupi.

**Tabela 13.** Distribucija haplotipova i haplotipska Odds Ratio analiza za polimorfizme rs4986791 i rs49986790 u TLR4 genu.

Haplotipovi	Ukupno		OLP		Kontrole		p vrednost		OR (CI 95%)	p
	N	%	N	%	N	%	Raw	Permutation		
CA	189	92	90	89	98	95	0.059	0.139	Referentna	
TA	6	3	5	5	1	0.6	<b>0.004</b>	<b>0.019</b>	0.099 (0.012-0.803)	<b>0.030</b>
TG	6	3	2	2	4	4	0.227	0.565	2.013 (0.949-7.438)	0.290
CG	4	2	4	4	1	0.4	0.114	0.441	0.263 (0.053-1.302)	0.101

N-ukupan broj pacijenata/kontrola  
95% CI-95% interval poverenja



## ***5. DISKUSIJA***

Oralni lihen planus je hronična inflamatorna bolest oralne mukoze sa kompleksnom i nepotpuno razjašnjenom etiologijom (Boorghani i sar., 2010, Dan i sar., 2010, Janardhanam i sar., 2012, Kimkong i sar., 2011). Pored faktora koji su često asocirani sa nastankom oralnog lihen planusa, kao što su stres, dentalni materijali, dijabetes, autoimunske bolesti, prisustvo *Helicobacter pylori* i *Hepatitis C* virusa, dosadašnja ispitivanja su ukazala na značaj postojanja genetičke osnove u razvoju OLP-a (Boorghani i sar., 2010, Janardhanam i sar., 2012, de Carvalho Fraga i sar., 2013, Carrozzo & Thorpe, 2009, Wang i sar., 2011). Velikim brojem studija je pokazana značajna uloga imunoloških i genetičkih promena u nastanku OLP-a. Pored toga, oralni lihen planus se često navodi kao oralna premaligna lezija, iako je povezanost sa nastankom oralnog karcinoma još uvek kontroverzna tema u naučnoj literaturi. Generalno gledano, etiologija oralnog lihen planusa nije u potpunosti razjašnjena, što ukazuje na značaj i potrebu identifikacije novih molekularnih biomarkera koji bi imali ulogu u proceni podložnosti nastanka ove bolesti. Prema našem saznanju, ova doktorska disertacija predstavlja prvu opsežnu studiju ispitivanja postojanja eventualne povezanosti između polimorfizama u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima sa rizikom za nastanak oralnog lihen planusa u populaciji Srbije, ali i u dosadašnjoj biomedicinskoj literaturi. Uvidom u dostupnu naučnu literaturu uočava se vidan nedostatak genetičkih studija asocijacije sa nastankom OLP-a. Ipak, imajući u vidu mogući maligni potencijal oralnog lihen planusa (Mithani, 2007), ali i činjenicu da je incidenca oralnog karcinoma na svetskom nivou u porastu, sve je veći interes naučne zajednice da ulaže u ispitivanja koja imaju za cilj molekularnu karakterizaciju različitih patologija usne duplje, uključujući i oralni lihen planus.

U ovoj doktorskoj disertaciji je analizirano ukupno šest polimorfizama u četiri gena, koja imaju značajnu ulogu u urođenom imunskom odgovoru. Uočeno postojanje statistički značajne razlike u distribuciji alela i genotipova analiziranih polimorfizama ukazuje na eventualno postojanje veze sa rizikom za nastanak oralnog lihen planusa.

U predstojećem tekstu će biti prodiskutovani rezultati dobijeni ovom doktorskom disertacijom u svetlu dosadašnjih naučnih saznanja.

## **5.1. Podaci kliničkog istraživanja**

Medijana starosti naše grupe pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom je bila 59 godina. Najmlađi pacijent naše grupe ispitanika imao 28 godina, a najstariji 84, što je u skladu sa poznatim podacima da se OLP javlja uglavnom između treće i pete decenije života i u kasnijem životnom dobu (Boorghani i sar., 2010). Takođe, naša grupa je imala višu procentualnu zastupljenost žena u poređenju sa muškarcima. U literaturi je poznato da se OLP javlja češće među pripadnicama ženskog pola (Boorghani i sar., 2010), čime se naša grupa pacijenata uklapa u dosadašnju epidemiološku zastupljenost oralnog lihen planusa među polovima.

Ovom doktorskom disertacijom je analizirano postojanje veze između etioloških karakteristika grupe pacijenata i kliničkih formi oralnog lihen planusa. Uočeno je da se erozivne forme OLP-a, erozivna i bulozna, javljaju dva i po puta češće među osobama koje konzumiraju alkohol u poređenju sa pacijentima koji ne koriste alkohol i ta razlika je bila statistički značajna ( $p=0.035$ ). Ovakav nalaz bi se mogao objasniti štetnim dejstvom koje alkohol ima na oralnu mukozu (Carrozzo & Thorpe, 2009). Pored toga, erozivna forma OLP-a se statistički značajno češće javljala među pacijentima koji imaju lošu oralnu higijenu u poređenju sa pacijentima koji su održavali dobru oralnu higijenu ( $p=0.012$ ). U poglavlju 1.3.6. ove disertacije je navedeno da se usled prisustva atrofično-erozivnih lezija, naročito u slučaju deskvamativnog gingivitisa, javljaju problemi jer pranje zuba može biti otežano usled gingivalnog bola i pojave krvarenja. Posledica ovakve situacije je često akumulacija zubnih naslaga koje mogu negativno uticati na razvoj OLP-a. Zubne naslage i kamenac mogu dovesti do pogoršanja gingivalnog planusa i vezuju se za znatno veću učestalost eritematoze i erozivnih gingivalnih lezija, što je i potvrđeno našim rezultatima da se erozivne forme OLP-a češće javljaju kod pacijenata sa lošom oralnom higijenom.

U našoj studiji je pokazano postojanje statistički značajne veze između godina pacijenata i kliničke forme oralnog lihen planusa ( $p=0.008$ ). Obzirom na podatak da se oralni lihen planus uglavnom javlja između treće i pete decenije života, a da stariji pacijenti daleko češće imaju protetske nadoknade, koje mogu biti jedan od uzročnika stvaranja mehaničkih ozleda u oralnoj duplji i posledično mogu doprineti razvoju oralnog lihen planusa, posebno erozivne forme OLP-a, mogli bismo pretpostaviti da

uočena značajnost ne potiče zapravo od direktne veze između godina i kliničke forme OLP-a, već od prisustva protetskih nadoknada.

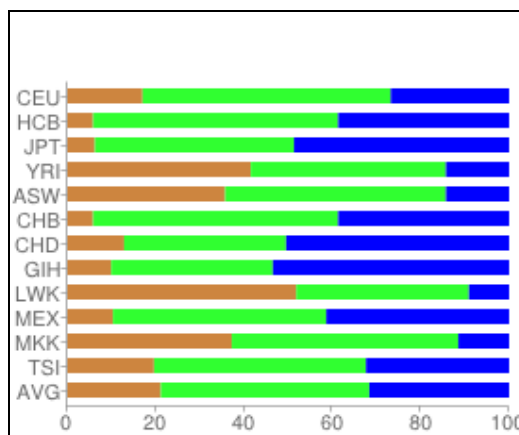
Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na postojanje statistički značajne razlike u kliničkoj formi oralnog lihen planusa između grupe pacijenata koji imaju odnosno nemaju protetske nadoknade ( $p=0.015$ ). Naime, utvrđeno je da se erozivna forma javlja oko jedan i po put češće u grupi pacijenata sa protetskim nadoknadama u odnosu na pacijente bez protetskih nadoknada. Prema literaturnim podacima, smatra se da protetske nadoknade mogu predstavljati faktor koji je asociran sa nastankom oralnog lihen planusa, što bi bilo u skladu sa našim rezultatima. Ovakav nalaz bi mogao biti objašnjen Kebnerovim fenomenom, koji ukazuje na nastanak lezija u usnoj duplji kao posledica reakcija na traumu. Naime, poznato je da mehaničke traume uzrokovane stomatološkim procedurama, kao i posekotine od oštih vrhova, grubih stomatoloških popravki i neadekvatnih proteza, predstavljaju faktore koji mogu dodatno pogoršati nastanak lezija. Dodatno, kao što je navedeno u uvodu doktorske disertacije (poglavlje 1.3.6.) Kebnerov fenomen može objasniti zašto se erozivne lezije javljaju u oblastima podložnim traumama, kao što su sluzokoža usta i obraza i lateralne površine jezika. Obzirom da je našom studijom zapaženo češće javljanje erozivne forme oralnog lihen planusa kod pacijenata sa protetskim nadoknadama u odnosu na pacijente koji ih nemaju, evidentna je potvrda prethodno navedenog Kebnerovog fenomena.

Prema literaturnim podacima, prisustvo *Candida albicans* se smatra jednim od potencijalnih faktora rizika za nastanak oralnog lihen planusa. Ovom doktorskom disertacijom nije utvrđeno postojanje statističke značajnosti u distribuciji različitih kliničkih formi OLP-a u zavisnosti od mikrobiološkog nalaza pacijenta, odnosno prisustva *Candida albicans*.

## 5.2. TLR2 rs3804099

TLR2 gen se nalazi na dugom kraku hromozomu 4, poziciji 4q32. Polimorfizam rs3804099 je identifikovan u kodirajućem delu TLR2 gena, trećem egzonu i predstavlja sinonimnu zamenu citozina timinom (C/T) na poziciji 597 (ili 816 prema nekim literaturnim izvorima). Kao posledica zamene citozina timinom, ne dolazi do promene amino kiseline Asn na poziciji 199 polinukleotidnog lanca.

Pretragom SNP baza podataka ([www.snpedia.com](http://www.snpedia.com) ; [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)) i uvidom u procentualnu zastupljenost genotipova polimorfizma rs3804099 TLR2 gena u različitim populacijama u svetu, evidentno je postojanje slične učestalosti naše populacije sa analiziranom grupom Kavkazoida (Slika 49) (CEU na slici). Heterozigotni CT genotip se javlja sa najvišom učestalošću u najvećem broju populacija u svetu (Slika 49).



**Slika 49.** Procentualna zastupljenost genotipova polimorfizma rs3804099 TLR2 gena u različitim populacijama sveta. (Braon-CC genotip, zeleno-CT genotip, plavo- TT genotip, Preuzeto: <http://snpedia.com/index.php/Rs3804099>)

U ovoj studiji je primećeno postojanje statistički značajne razlike u distribuciji genotipova rs3804099 polimorfizma TLR2 gena između grupe pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom i zdrave kontrolne grupe ( $p=0.012$ ). Uočena razlika u distribuciji ukazuje na moguću asocijaciju i važnu ulogu TLR2 gena u procesu nastanka OLP-a. Interesantno je uočiti da u našoj kontrolnoj grupi nije zabeleženo

prisustvo *wild type* CC genotipa, na osnovu čega bi se moglo posumnjati da heterozigotni i mutirani genotip rs3804099 polimorfizma u TLR2 genu mogu imati protektivnu ulogu u nastanku oralnog lihen planusa. Slični rezultati su dobijeni i u nedavno sprovedenoj studiji na našoj populaciji među pacijentima sa dijagnostikovanim oralnim skvamocelularnim karcinomom (Zeljic i sar., 2013). U istoimenoj studiji je pronađeno postojanje razlike u distribuciji genotipova između grupe pacijenata sa oralnim karcinomom i zdrave kontrolne grupe, što je u skladu sa našim nalazima. Nedavno sprovedena meta analiza povezanosti određenih polimorfizama TLR2 gena sa podložnošću nastanka kancera, navodi da heterozigotni i mutirani genotip (dominantni model nasleđivanja) rs3804099 polimorfizma ima ulogu protektivnog faktora za nastanak kancera, posebno među Azijatima (Wang i sar., 2013). U cilju provere inicijalne hipoteze da bi u našem istraživanju heterozigotni i mutirani genotip mogli imati protektivni efekat, odnosno smanjivati rizik za nastanak oralnog lihen planusa u poređenju sa *wild type* genotipom, sprovedena je *Odds Ratio* analiza. Rezultati *crude Odds Ratio* analize u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da su heterozigotni CT i mutirani TT genotip proučavanog polimorfizma TLR2 gena asocirani sa značajno sniženim rizikom za nastanak OLP-a u poređenju sa *wild type* CC genotipom. Kada je reč o različitim testiranim genetičkim modelima nasleđivanja, dominantnom, recesivnom i log-aditivnom, pokazano je da je dominantni genetički model nasleđivanja datog polimorfizma statistički značajan, što je u skladu sa nalazima asocijacije rs3804099 polimorfizma sa nastankom kancera (Wang i sar., 2013). Nakon urađene *adjusted Odds Ratio* analize u koju su uključeni takozvani *confounding* faktori, kao što su pol, godine, konzumacija alkohola i pušenje, nije pokazano postojanje asocijacije sa rizikom za razvoj oralnog karcinoma, odnosno, izgubljena je statistička značajnost. Ovakvi rezultati ukazuju na značaj uključivanja faktora rizika u genetičke studije asocijacije, koji dodatno mogu uticati na razik za nastanak oralnog lihen planusa. Isti nalaz je predstavljen i u slučaju grupe pacijenata sa oralnim karcinomom iz Srbije (Zeljic i sar., 2013). Ukoliko se uzme u obzir pretpostavka da se, prema nekim naučnim shvatanjima, OLP smatra i prekancerogenom lezijom, ovako podudaranje dobijenih podataka za grupe ispitanika iz Srbije bi moglo da ukazuje na isti efekat koji analizirani polimorfizam u TLR2 genu ima u slučaju OLP-a, ali i oralnog karcinoma.

Obzirom da je reč o sinonimnoj izmeni smeštenoj u egzonu TLR2 gena, iz literature je poznato da ovakve izmene mogu menjati obrazac obrade primarnog transkripta informacione RNK (iRNK), menjati stabilnost iRNK, ali i imati uticaj na strukturu proteina (Junjie i sar., 2012). Dodatno, moglo bi se pretpostaviti da dati polimorfizam u TLR2 genu može uticati na nivo ekspresije samog gena. Ranijim istraživanjima je pokazano da je ekspresija TLR2 gena bila značajno povišena u salivi i krvi pacijenata sa dijagnostikovanim OLP-om u poređenju sa kontrolnom grupom (Wu i sar., 2013, Ohno i sar., 2011). Međutim, u navedenoj studiji nije ispitivan efekat polimorfizma rs3804099, te ne postoje nesumnjivi dokazi da uočena razlika u ekspresiji gena ima veze sa konkretno proučavanim polimorfizmom u našoj studiji. Nedavno objavljenim istraživanjem nije utvrđeno postojanje razlike u ekspresiji TLR2 gena između grupe pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom i sindromom gorućih usta (Engl. *burning mouth syndrome*) (Kho i sar., 2013). U istoj studiji je pokazano da je nivo ekspresije TLR2 gena 0.504 puta niži u grupi pacijenata sa OLP-om u poređenju sa kontrolnom grupom, iako navedeni nalaz nije bio statistički značajan (Kho i sar., 2013). Dalje studije u našoj populaciji bi trebale da uključe izučavanje ekspresije TLR2 gena, kao i nivoa citokina i njihovu potencijalnu asocijaciju sa rs3804099 polimorfizmom, što je predviđeno realizovati u predstojećem periodu.

Proučavani polimorfizam nije bio asociiran sa etiološkim faktorima za nastanak oralnog lihen planusa, kao što su pušenje, konzumacija alkohola, oralna higijena, prisustvo *Candida albicans*, prisustvo amalgama i teških metala, kao i protetskih nadoknada. Pored toga, nije utvrđeno postojanje asocijacije rs3804099 TLR2 polimorfizma sa kliničkim formama OLP-a: erozivnom, retikularnom i buloznom. Rezultati prethodnog istraživanja ukazuju na postojanje interakcije proučavanog polimorfizma u TLR2 genu sa polimorfizmima rs3775291 TLR3 gena i rs2569190 CD14 gena (Zeljic i sar., 2013). Dato ispitivanje postojanja interakcije nije rađeno u ovoj studiji.

Ranijim istraživanjima je pokazano da se polimorfizam rs3804100 TLR2 gena i SNP rs3804099 proučavan u našoj studiji nalaze u jakoj gametskoj neravnoteži vezanosti (Bjornvold i sar., 2009, Junjie i sar., 2012). Pokazano je i da određeni haplotipovi dva navedena polimorfizma značajno snižavaju rizik za razvoj hepatocelularnog karcinoma (Junjie i sar., 2012). Ovakve nalaze bi trebalo imati u vidu

prilikom planiranja daljeg nastavka istraživanja povezanosti polimorfizama TLR2 gena sa nastankom oralnog lihen planusa.

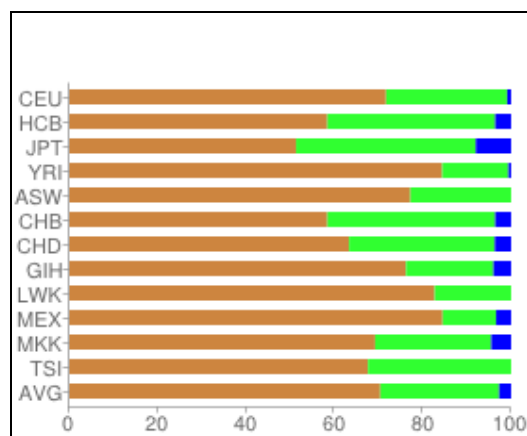
TLR2 rs3804099 polimorfizam je proučavan u genetičkim studijama asocijacije sa različitim tipovima karcinoma (oralnog karcinoma, karcinoma želuca, kolorektalnog karcinoma i malignog melanoma), ali i infektivnih bolesti kao što je sepsa. Pretraživanjem PubMed baze ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)), primetno je nepostojanje radova na temu izučavanja veze polimorfizama u TLR2 genu sa rizikom za nastanak oralnog lihen planusa. Rezultati dobijeni ovom doktorskom disertacijom predstavljaju prvi rad na temu povezanosti rs3804099 polimorfizma TLR2 gena sa OLP-om u naučnoj literaturi (Stanimirovic i sar., 2013).

### **5.3. TLR3 rs5743312**

TLR3 receptor ima ulogu u prepoznavanju dvolančanog molekula RNK. Kodiran je TLR3 genom, koji se nalazi na dugom kraku hromozoma 4, poziciji 4q35. Polimorfizam rs5743312 predstavlja sinonimnu izmenu citozina timinom (C/T), smešten u nekodirajućem delu TLR3 gena, drugom intronu, na poziciji 9948.

Nismo uočili postojanje značajne razlike u distribuciji genotipova rs5743312 polimorfizma između grupe pacijenata sa oralnim lihen planusom i kontrolne grupe, ali se može reći da je uočen izvesni statistički trend ( $p=0.085$ ). Učestalosti genotipova rs5743312 polimorfizma u našoj ispitivanoj grupi su u skladu sa podacima iz dostupnih baza podataka, gde je učestalost *wild type* CC genotipa najviša, za kojom slede učestalosti heterozigotnog i mutiranog genotipa (Slika 50). Ovakva distribucija genotipova je ista u do sada analiziranim humanim populacijama širom sveta (Slika 50).





**Slika 50.** Procentualna zastupljenost genotipova polimorfizma rs5743312 TLR3 gena u različitim populacijama sveta (Braon-CC Zeleno-CT, Plavo-TT, Preuzeto: <http://www.snpedia.com/index.php/Rs5743312>)

Rezultati *Odds Ratio* analize pokazuju da je mutirani TT genotip bio značajno asociran sa povišenim rizikom za nastanak oralnog lihen planusa u poređenju sa *wild type* CC genotipom. Postojanje statistički značajne asocijacije je pored *crude Odds Ratio* analize potvrđeno i nakon udružene analize koja je uključivala takozvane *confounding* faktore i to: pol, godine, pušenje i konzumaciju alkohola. Naime, prema *adjusted Odds Ratio* analizi, mutirani TT genotip je asociran sa 15.9 puta višim rizikom za razvoj oralnog lihen planusa u poređenju sa CC *wild type* genotipom. Recesivni genetički model je pretpostavljen kao najbolji genetički model nasleđivanja, a koji ukazuje da mutirani i heterozigotni genotip združeno imaju povišeni rizik za razvoj oralnog lihen planusa u poređenju sa *wild type* genotipom. Obzirom da za proučavani polimorfizam nije potvrđeno postojanje funkcionalnog efekta, tačan mehanizam koji dovodi do povećanja rizika za OLP nije u potpunosti razjašnjen i poznat. Moglo bi se pretpostaviti da se dati polimorfizam nalazi u gametskoj neravnoteži vezanosti sa nekim od funkcionalnih polimorfizama u TLR3 genu ili sa nekim od polimorfizama na susednim genima koji se nalaze na hromozomu 4. Analizom haplotipova je pokazano da se polimorfizam rs5743312 TLR3 gena nalazi u gametskoj neravnoteži vezanosti sa rs3775291 SNP-om, što je posebno diskutovano u poglavlju 5.5. Pored toga, mogući način na koji bi rs5743312 polimorfizam mogao povećavati rizik za nastanak OLP-a je pretpostavka da sam polimorfizam ima funkcionalni efekat ili da može uticati na nivo ekspresije TLR3 gena. Prema našem saznanju, studije koje bi testirale navedene

pretpostavne nisu izvođene. Dodatno, postoji mogućnost da dati polimorfizam TLR3 gena dovodi do promene u odnosu između anti-inflamatornih i pro-inflamatornih citokina, što bi moglo rezultovati razvojem oralnog lihen planusa. U ovoj doktorskoj disertaciji nedostaju podaci o nivou ekspresije TLR3 gena, kao i nivou anti i pro-inflamatornih citokina, kao i asocijacije navedenih parametara sa proučavanim polimorfizmom rs5743312, koji bi nam dali dodatne podatke na osnovu kojih bismo mogli dati sigurne zaključke o ulozi i mehanizmu analiziranog polimorfizma TLR3 gena sa rizikom za nastanak OLP-a. Nalazi ove doktorske disertacije koji ukazuju na povezanost rs5743312 polimorfizma sa rizikom za nastanak oralnog lihen planusa su suprotni rezultatima istraživanja u slučaju nazofaringealnog i oralnog karcinoma (He i sar., 2007, Zeljic i sar., 2013), što nam govori da navedeni polimorfizam TLR3 gena može imati potpuno drugačije uloge u nastanku različitih bolesti.

Proučavani polimorfizam TLR3 gena nije bio asociiran sa etiološkim faktorima niti kliničkom formom oralnog lihen planusa. U nedavno publikovanoj studiji koja je uključivala pacijente sa oralnim karcinomom, pokazano je da rs5743312 polimorfizam TLR3 gena može biti razmatran kao potencijalni prediktor lošijeg preživljavanja u slučaju uznapredovalog stadijuma oralnog karcinoma (Zeljic i sar., 2013). Ovakav nalaz bi mogao da ukazuje na postojanje funkcionalne uloge navedenog polimorfizma, što bi bilo neophodno dodatno ispitati i u slučaju oralnog lihen planusa.

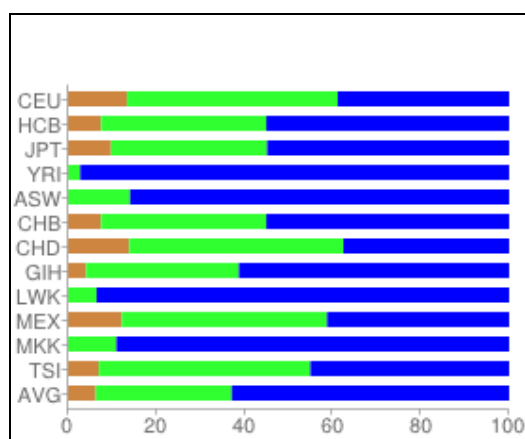
Bitno je napomenuti da u dosadašnjoj naučnoj literaturi ne postoje radovi koji su izučavali povezanost rs5743312 polimorfizma sa rizikom za nastanak OLP-a. Rezultati dobijeni ovom doktorskom disertacijom, publikovani u časopisu *European Journal of Oral Sciences*, u tom smislu predstavljaju pionirske rezultate u ovoj oblasti (Stanimirovic i sar., 2013).

#### **5.4. TLR rs3775291**

Polimorfizam rs3775291 TLR3 gena je smešten u egzonu 4 na poziciji 13909 i predstavlja supstituciju guanina adeninom (G/A). Navedeni polimorfizam rezultuje izmenom amino kiseline leucina fenilalaninom (Phe412Leu) na 412 mestu u polipeptidnom lancu, što dovodi do promene strukture visoko konzervisanih rezidua na

površini TLR3 receptora. Neke *in vitro* studije su pokazale da TLR3 receptor koji na 412 mestu u polipeptidnom lancu ima adenin umesto guanina ima sniženu aktivaciju nakon stimulacije TLR3 antagonistom poly I:C (Sironi i sar., 2012).

Distribucija genotipova polimorfizma rs3775291 TLR3 gena u našoj studijskoj grupi je u skladu sa učestalostima koji su navedeni u bazama podataka za grupu Kavkazoida (Slika 51). Izvesna odstupanja se mogu uočiti u poređenju sa drugim humanim populacijama, što se može objasniti različitim evolucionim istorijama izučavanih grupa.



**Slika 51.** Procentualna zastupljenost genotipova polimorfizma rs3775291 TLR3 gena u različitim populacijama sveta. (Braon-GG, Zeleno-GA, Plavo-AA, Preuzeto: <http://www.snpedia.com/index.php/Rs3775291>)

U slučaju rs3775291 polimorfizma TLR3 gena nije zabeleženo postojanje razlike u distribuciji genotipova između grupe pacijenata i kontrolne grupe ( $p=0.328$ ). *Crude*, kao i *adjusted Odds Ratio* analizom je pokazano odsustvo asocijacije analiziranog polimorfizma sa rizikom za razvoj oralnog lihen planusa. Ovakav nalaz nije u skladu sa rezultatima dobijenim za oralni karcinom u grupi pacijenata iz Srbije (Zeljic i sar., 2013), što nam dodatno može ukazivati na različitu ulogu koju ovaj polimorfizam TLR3 gena može imati u nastanku različitih patologija.

Haplotipskom analizom pomoću programa *Haploview*, pokazano je da se proučavani polimorfizam nalazi u jakoj neravnoteži vezanosti sa rs5743312

polimorfizmom TLR3 gena, što je potvrđeno i u našoj studiji. Detaljnije objašnjenje dobijenih rezultata koji proističu iz analize haplotipova je dato u poglavlju 5.5.

### **5.5. Analiza haplotipova TLR3 rs5743312 i TLR3 rs3775291**

Uočeno postojanje statistički značajne veze između polimorfizma nukleotidne sekvence određenog gena i nekog fenotipa, najčešće bolesti, može predstavljati odraz, ne samo direktne veze između proučavanog polimorfizma i njegove uloge u razvijanju proučavanog fenotipa, već i indirektne veze koja potiče od činjenice da dati polimorfizam možda nema funkcionalni efekat, ali može biti u gametskoj neravnoteži vezanosti sa blisko lociranim polimorfizmima istog gena ili drugih blisko lociranih gena na istom hromozomu. Intenzivno proučavanje haplotipova je rezultiralo i realizacijom velikog HapMap projekta ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) koji je imao za cilje identifikaciju i određivanje rasporeda haplotipova u humanom genomu u različitim populacijama u svetu. Pristup analizi haplotipova omogućava identifikaciju i praćenje dovoljno samo jednog, takozvanog *tag* SNP-a u okviru bloka većeg broja polimorfizama, koji može biti informativan za proučavanje povezanosti sa rizikom za razvoj određene bolesti koja se proučava. Dodatno, postoje brojni pokazatelji koji ukazuju na veću statističku jačinu studija koja se bavi izučavanjem asocijacije haplotipova u poređenju sa izučavanjem efekata pojedinačnih polimorfizama (Bader, 2001). Imajući sve prethodno navedeno u vidu, u ovoj doktorskoj disertaciji smo se, pored klasičnog pristupa izučavanju genetičkih studija asocijacije, opredelili i za analizu haplotipova. Iz literature je poznato da se blisko locirani polimorfizmi mogu nalaziti u *Linkage Disequilibriumu*, odnosno LD-u (Frazer i sar., 2009). Obzirom da se proučavani polimorfizmi rs5743312 i rs3775291 u TLR3 genu i rs3804099 u TLR2 genu nalaze na dugom kraku hromozoma 4, pretpostavili smo da bi dati polimorfizmi mogli biti vezani. Haplotipskom analizom, korišćenjem programa Haploview, utvrđeno je da su analizirani polimorfizmi u TLR3 genu vezani i da se nalaze u jakoj neravnoteži vezanosti, što je potvrđeno i u grupi ispitanika sa dijagnostikovanom OLP-om, kontrolnoj grupi, ali i u celokupnoj studijskoj grupi sa objedinjenim pacijentima i kontrolama. Polimorfizam u TLR2 genu se nalazi fizički udaljen od navedenog LD bloka, što je u skladu sa literaturnim podacima. Najzastupljeniji haplotip i u grupi ispitanika i kontrolnoj grupi je bio CG haplotip,

potom CA i TG haplotipovi, što je u skladu sa učestalostima dobijenim u prethodnoj studiji na grupi ispitanika iz Srbije (Zeljic i sar., 2013). Ovom doktorskom disertacijom nije zabeleženo postojanje asocijacije između identifikovanih haplotipova naše studijske grupe i rizika za nastanak oralnog lihen planusa. Dodatno, nije uočeno postojanje veze sa etiološkim faktorima i kliničkim formama OLP-a. U slučaju oralnog karcinoma, TG haplotip je bio statistički značajno povezan sa lošijim preživljavanjem pacijenata u poređenju sa najučestalijim CG haplotipom (Zeljic i sar., 2013). Diskrepanca rezultata naše i prethodno navedene studije, najverovatnije odslikava drugačiju ulogu koju TG haplotip ima u različitim patologijama.

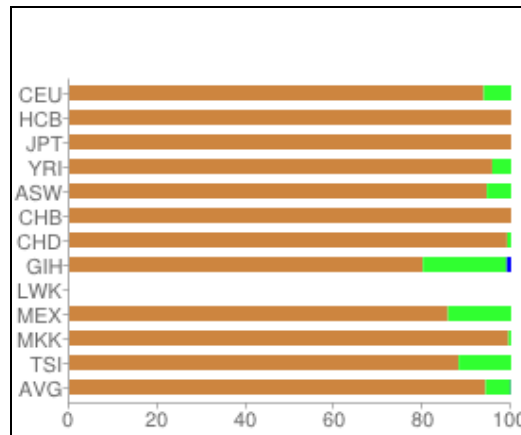
Navedeni rezultati predstavljaju prve nalaze u vezi sa analizom haplotipova TLR3 gena i rizika za nastanak oralnog lihen planusa, obzirom da do sada, prema našem znanju, nisu zabeležene studije ovog tipa u literaturi.

## **5.6. TLR4 rs4986791**

TLR4 gen se nalazi na devetom hromozomu 9q33.17. Sekvenciranjem TLR4 gena je pokazano da se najveći broj polimorfizama nukleotidne sekvence nalazi u egzonu 3. Iako je broj SNP-ova u ovom regionu veliki, najveći broj se javlja u učestalosti koja je manja od 1% u populaciji, za razliku od rs4986791 polimorfizma čija je učestalost *minor* alela viša od 5%. Polimorfizam rs4986791 predstavlja nesinonimnu zamenu, to jest tranziciju citozina timinom (C/T) na poziciji 1487 (ili 1320 prema nekim izvorima). U literaturi se još označava i kao Thr399Ile, obzirom da navedeni polimorfizam dovodi do zamene amino kiseline treonina izoleucinom na poziciji 399 u polipeptidnom lancu. Navedena amino-kiselinska zamena rezultuje promenom normalne strukture ekstracelularnog regiona TLR4 receptora, što dovodi do smanjenja odgovora na vezivanje lipopolisaharida Gram negativnih bakterija. Kao posledica dolazi do smanjene produkcije inflamatornih citokina i povećane osetljivosti na bakterijske infekcije (El-Omar i sar., 2008).

U našoj studiji nije uočeno postojanje statistički značajne razlike u distribuciji alela i genotipova proučavanog polimorfizma TLR4 gena između grupe pacijenata sa OLP-om i kontrolne grupe. Najviša zastupljenost je zabeležena u slučaju *wild type* CC genotipa u obe grupe u našoj studiji, što je u saglasnosti sa učestalošću genotipova

rs4986791 polimorfizma u drugim proučavanim populacijama širom sveta (Slika 52). Prema bazi podataka ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/rs4986791](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/rs4986791)), zapaža se odsustvo mutiranog TT genotipa kod Evropljana. Odsustvo mutiranog TT genotipa TLR4 rs4986791 polimorfizma je uočeno u našoj grupi pacijenata sa oralnim lihen planusom, dok je isti genotip u kontrolnoj grupi bio zabeležen samo kod 1% ispitanika.



**Slika 52.** Procentualna zastupljenost polimorfizma rs4986791 TLR4 gena u različitim populacijama sveta. (Braon-CC, Zeleno-CT, plavo-TT, Preuzeto: <http://snpedia.com/index.php/Rs4986791>)

Analiza povezanosti genotipova proučavanog polimorfizma rs4986791 TLR4 gena sa rizikom za razvoj oralnog lihen planusa, *crude Odds Ratio*, pokazuje da ni jedan od genotipova nije značajno asociran sa nastankom OLP-a. Odsustvo asocijacije je potvrđeno i nakon unošenja *confounding* faktora u *adjusted Odds Ratio* analizu. Pored navedenog, proučavani polimorfizam nije bio povezan sa poznatim etiološkim faktorima niti kliničkom formom oralnog lihen planusa. Ovako dobijeni rezultati su u skladu sa nedavno publikovanim nalazima za oralni karcinom (Zeljic i sar., 2013). Sa druge strane, rs4986791 polimorfizam je bio asociran sa povišenim rizikom za razvoj nazofaringealnog karcinoma u Kineskoj populaciji (Yang i sar., 2012) i karcinoma želuca u Italijanskoj populaciji (Santini i sar., 2008). Obzirom da su rezultati dobijeni ovom doktorskom disertacijom, prema našem saznanju, prvi u naučnoj literaturi koji se

bave povezanošću navedenog polimorfizma sa oralnim lihen planusom, jedino je dobijene rezultate bilo moguće upoređivati sa različitim studijama koje se bave različitim patologijama. Bitno je zapaziti odsustvo asocijacije rs4986791 SNP-a TLR4 gena sa rizikom za nastanak OLP-a, kao i u slučaju prethodno navedene studije koja je uključivala pacijente iz Srbije sa oralnim karcinomom. Reč je o konzistentnom nalazu koji ukazuje na jednaku distribuciju polimorfizma rs4986791 u grupi pacijenata/kontrola iz Srbije. Zapažena odstupanja u odnosu na druge studije se mogu objasniti različitošću proučavanih populacija, veličinom korišćenog uzorka, ali svakako i heterogenošću proučavanih patologija.

Određeni broj studija, mada ne sve, su utvrdile postojanje veze između rs4986791 polimorfizma TLR4 gena i podložnosti kandidijazi (Agnese i sar., 2002, Lorenz i sar., 2002, Van der Graaf i sar., 2006). Našom studijom nije uočeno postojanje asocijacije između proučavanog polimorfizma i prisustva *Candida albicans*.

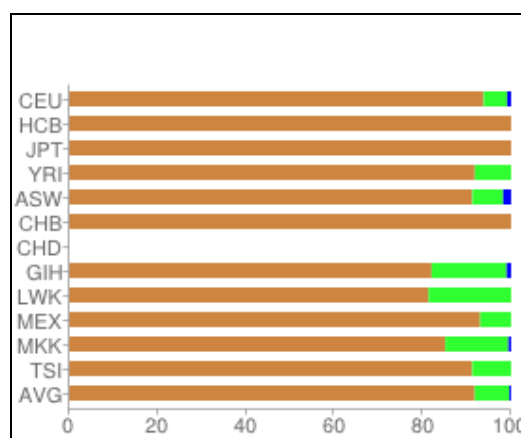
Ranije je navedeno da polimorfizam rs4986791 dovodi do promene ekstracelularne strukture TLR4 receptora, što rezultuje smanjenim afinitetom vezivanja antigena Gram-negativnih bakterija i dovodi do smanjene produkcije inflamatornih citokina i povećane osetljivosti na bakterijske infekcije (El-Omar i sar., 2008). Prethodne studije su utvrdile da heterozigotni CT i mutirani TT genotipovi imaju povišenu ekspresiju IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  i IL-10, u slučaju pacijenata sa nazofaringealnim karcinomom (Yang i sar., 2012). Pored toga, pokazano je da je nivo ekspresije TLR4 gena značajno viši u OLP lezijama u poređenju sa normalnom oralnom mukozom (Siponen i sar., 2012). Imajući sve navedeno u vidu, bilo bi dobro u predstojećim istraživanjima odrediti nivo ekspresije TLR4 gena, kao i nivo odgovarajućih citokina kod pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom. Dodatni podaci o nivou ekspresije samog gena i/ili citokina bi nam mogli dati značajne informacije u čijem svetlu bi se dobijeni rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji mogli jasnije protumačiti.

## **5.7. TLR4 rs4986790**

Polimorfizam rs4986790 u TLR4 genu predstavlja supstituciju nukleotida, po tipu tranzicije, adenina u guanin (A/G). Kao posledica postojanja datog polimorfizma nukleotidne sekvence dolazi do zamene asparaginske aminokiseline (Asp) glicinskom

aminokiselinom (Gly) na poziciji 299 polipeptidnog lanca. Dati polimorfizam se vrlo često u literaturi navodi kao Asp299Gly, mada je u današnje vreme daleko zastupljenije pretraživanje navedenog polimorfizma prema „rs“ identifikacionom broju, što generalno važi za sve polimorfizme.

Učestalost genotipova analiziranog polimorfizma rs4986790 TLR4 gena u našoj studijskoj grupi je u skladu sa učestalostima drugih humanih populacija u svetu (Slika 53). Kao što se može uočiti na Slici 53, tako i u našoj grupi pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom, ali i u kontrolnoj grupi, *wild type* AA genotip se javlja sa najvišom učestalošću, za kojim sledi heterozigotni AG genotip. U našoj grupi pacijenata, kao i među kontrolama, nije zabeleženo prisustvo ni jednog ispitanika sa mutiranim GG genotipom, što može govoriti u prilog postojanja jakog selekcionog mehanizma protiv mutirane genotipske forme proučavanog polimorfizma. Zanimljiv je podatak da je uočena viša zastupljenost Asp299Gly u subsaharskim populacijama posledica korisnosti koji nosioci polimorfizma imaju u zaštiti protiv malarije, dok je na prostorima Evrope isti polimorfizam rezultovao hendikepom usled povećavanja smrtnost kod obolelih od sepse (Ferwerda i sar., 2007). Stoga se može zaključiti da je ovakva distribucija polimorfizama posledica evolucionog pritiska tokom migracije modernog čoveka iz Afrike na susedne kontinente i uticaja spoljašnjih faktora, pre svega infekcija (El-Omar i sar., 2008, Ferwerda i sar., 2007).



**Slika 53.** Procentualna zastupljenost polimorfizma rs4986790 TLR4 gena u različitim populacijama sveta. (Braon-AA, zeleno-AG, plavo-GG, Preuzeto: <http://snpedia.com/index.php/Rs4986790>)



Kada je reč o distribuciji genotipova i alela rs4986790 polimorfizma TLR4 gena, nije uočena statistički značajna razlika između grupe pacijenata sa OLP-om i odgovarajuće zdrave kontrolne grupe. Dodatno, nije zabeleženo postojanje značajne veze datog rs4986790 polimorfizma u TLR4 genu i rizika za nastanak OLP-a, što je utvrđeno *crude Odds Ratio*, kao i *adjusted* analizom, koja je uključivala podatke o polu, godinama, pušenju i konzumaciji alkohola, što je potvrđeno i za oralni karcinom (Zeljic i sar., 2013).

Ranije studije su pokazale da dati polimorfizam utiče na ekspresiju inflamatornih citokina i hemokina (Yang i sar., 2012). Pored toga, za isti polimorfizam je pokazano da je u vezi sa progresijom karcinoma glave i vrata (Bergmann i sar., 2011).

Prethodne sprovedene studije ukazuju na postojanje značajno povišene ekspresije TLR4 gena u OLP lezijama u odnosu na normalnu oralnu mukozu (Siponen i sar., 2012). Ovakvi podaci proistekli iz pređašnjih studija, impliciraju da bi bilo od posebnog značaja izučiti eventualno postojanje povezanosti između analiziranog polimorfizma u TLR4 genu sa nivoom ekspresije datog gena kod pacijenata sa dijagnostikovanim OLP-om, ali i nivoa citokina i hemokina, što je planirano sprovesti u predstojećim istraživanjima.

Prema podacima iz literature, u 98% slučajeva polimorfizmi rs4986790 i rs4986791 kosegregiraju zajedno, što je potvrđeno i u našoj studijskoj grupi. Naime, dva proučavana polimorfizma TLR4 gena su se nalazila u gametskoj neravnoteži vezanosti. Diskusija dobijenih rezultata identifikovanih haplotipova TLR4 gena je data u predstojećem poglavlju 5.8.

## **5.8. Analiza haplotipova TLR4 rs4986791 i TLR4 rs4986790**

Kao što je prethodno navedeno, TLR4 gen se nalazi smešten na dugom kraku hromozoma 9. Najveći broj identifikovanih polimorfizama nukleotidne sekvence se nalazi smešteno u kodirajućim delovima gena, egzonima. U egzonu broj 3 su smeštena dva proučavana polimorfizma rs4986791 i rs4986790 TLR4 gena i na osnovu podataka o njihovoj bliskoj poziciji, moglo se pretpostaviti da se dva polimorfizma nalaze u gametskoj neravnoteži vezanosti. Dodatno, poznato je iz literature da navedeni SNP-ovi kosegregiraju zajedno. Analiza haplotipova, korišćenjem Haploview programa, je

utvrdila postojanje neravnoteže vezanosti između rs4986791 i rs4986790 polimorfizama u celokupnoj studijskoj grupi, kao i grupi pacijenata i kontrolnoj grupi posebno. Dobijeni rezultat je u skladu sa literaturnim podacima. Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u distribuciji haplotipova između grupe pacijenata sa identifikovanim oralnim lihen planusom i kontrolne grupe, što je potvrđeno i nakon simulacije hiljadu permutacija (videti poslednji deo poglavlja 4.2.4.). Haplotipska *Odds Ratio* analiza je ukazala da je TA haplotip asociiran sa 0.099 nižim rizikom za razvoj oralnog lihen planusa u poređenju sa najučestalijim haplotipom CA u našoj studijskoj grupi. Mogli bismo pretpostaviti da TA haplotip ima relativno slab protektivni efekat za razvoj oralnog lihen planusa, što ipak ne treba zanemariti kao rezultat. Moguće je da je identifikovani haplotip samo deo većeg haplotipskog bloka TLR4 gena, koji ima daleko veću predikcionu moć kada je u pitanju podložnost OLP-u. Ovu tvrdnju bi trebalo proveriti u nastupajućem periodu.

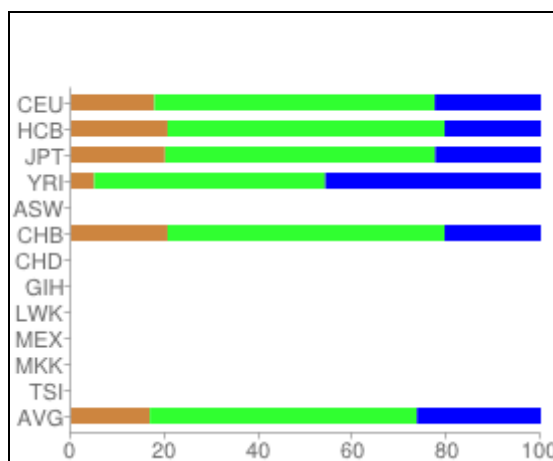
Izvesnom studijom je dat model kojim se opisuje funkcionalni efekat dva polimorfizma na strukturu ektodomena TLR4 receptora (Rallabhandi i sar., 2006). Po pretpostavljenom modelu, rs4986791 i rs4986790 polimorfizmi se nalaze sa iste strane površine molekula LRR domena i učestvuju u formiranju ukotvljavajućeg mesta za koje se vezuje ligand ili koreceptor, MD2. Izmena rs4986790 dovodi do uklanjanja negativnog naelektrisanja i povećava rotacionu slobodu oko peptidne veze, što utiče na sekundarnu strukturu okolnog regiona. Izmena rs4986791 povećava sterne smetnje u tom regionu i ometa interakciju između liganda i receptora. Prisustvo obe izmene može da ima za posledicu nemogućnost vezivanja liganda ili gubitak vezivnog mesta, što je u saglasnosti sa opažanjima, da kod dvostrukog polimorfizma, postoji znatno slabiji odgovor na stimulaciju receptora, nego što je u slučaju prisustva jednog ili drugog polimorfizma (Rallabhandi i sar., 2006).

U dostupnoj naučnoj literaturi nije zabeleženo izučavanje haplotipova rs4986791 i rs4986790 polimorfizama u vezi sa oralnim lihen planusom, što naše rezultate čini jedinim u ovom trenutku o vezi i sniženom riziku TA haplotipa sa razvojem OLP-a.

## 5.9. CD14 rs2569190

CD14 receptor ima ulogu u prepoznavanju širokog spektra antigena različitih mikroorganizama, a pre svega lipopolisaharida Gram negativnih bakterija. Obzirom da CD14 receptor nema citoplazmatski deo, u cilju inicijacije signalne transdukcije neophodno je vezivanje sa TLR4 receptorom. Upravo je to bio razlog za uključivanje polimorfizama u CD14 genu u predmet proučavanja ove doktorske disertacije. Gen koji kodira za CD14 receptor se nalazi na hromozomu 5, poziciji q21-23. U promotorskom regionu CD14 gena je identifikovan polimorfizam rs2569190, koji predstavlja izmenu citozina timinom (C/T) i nalazi se na 159-oj poziciji uzvodno od glavnog mesta transkripcije. Dati polimorfizam je pozicioniran u blizini SP1 vezujućeg mesta koje ima glavni uticaj na ekspresiju CD14 receptora na monocitima, ali i u blizini CCAAT vezujućeg mesta pojačivača transkripcije (Holla i sar., 2002). Ovakva pozicija rs2569190 polimorfizma ukazuje na potencijalno važnu ulogu u promotorskoj aktivaciji CD14 gena.

Genotipizacijom rs2569190 polimorfizma CD14 gena u našoj studijskoj grupi, utvrđena je najviša učestalost heterozigotnog CT polimorfizma u grupi ispitanika sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom, kao i u kontrolnoj grupi. Najviša učestalost heterozigotnog genotipa potencijalno ukazuje na selekciono favorizovanje „srednjeg“ genotipa, takozvani heterozis. Moglo bi se pretpostaviti da je heterozigotni genotip imao najvišu adaptivnu vrednost u odgovoru na sredinske faktore, pre svega interakcije sa patogenima (Mason i sar., 2010), što je uslovalo delovanje balansirane selekcije i favorizovanja heterozigotnog genotipa, koji se u humanim populacijama javlja sa najvišom učestalošću. Kada se podaci o zastupljenosti genotipova proučavanog polimorfizma CD14 gena u našoj studijskoj grupi uporede sa podacima zastupljenosti genotipova u Evropskoj populaciji (Slika 54), uočava se isti trend po pitanju učestalosti. Najviša zastupljenost heterozigotnog genotipa je zabeležena i u ostalim populacijama širom sveta (Slika 54).



**Slika 54.** Procentualna zastupljenost genotipova polimorfizma rs2569190 CD14 gena u različitim populacijama sveta. (Braon-CC, zeleno-CT, plavo-TT, Preuzeto: <http://snpedia.com/index.php/Rs2569190>)

U našoj studiji nije uočeno postojanje statistički značajne razlike u distribuciji genotipova, kao ni alela između grupe pacijenata i kontrolne grupe, što je u skladu sa nedavno objavljenim rezultatima u slučaju oralnog karcinoma (Zeljic i sar., 2013). Dodatno, proučavani polimorfizam nije bio u asocijaciji sa etiološkim i kliničko-patološkim odlikama grupe pacijenata. Rezultati *adjusted* i *crude Odds Ratio* analize su zabeležili odsustvo povezanosti datog polimorfizma CD14 gena sa rizikom za razvoj oralnog lihen planusa. Ovakvi rezultati su u skladu sa nedavno sprovedenom studijom na grupi ispitanika sa dijagnostikovanim oralnim karcinomom iz Srbije (Zeljic i sar., 2013), što ukazuje na populacionu uniformnost u distribuciji genotipova i alela rs2569190 polimorfizma CD14 gena. Uz činjenicu da se oralni lihen planus može razmatrati i kao premaligna lezija, podudarnost rezultata dobijenih za OLP i oralni karcinom potvrđuju da polimorfizam rs2569190 CD14 gena ne predstavlja faktor rizika za razvoj navedenih oralnih patologija.

Utvrđeno je postojanje značajne interakcije između polimorfizama rs3804099 TLR2 gena, rs37715291 TLR3 gena i rs2569190 u CD14 genu, što ne mora nužno da odslikava postojanje biološke interakcije (Zeljic i sar., 2013). U ovoj doktorskoj disertaciji nije razmatrana interakcija između proučavanih polimorfizama, što bi moglo biti testirano u predstojećim istraživanjima.

Prema podacima iz literature, poznato je da rs2569190 polimorfizam u CD14 genu može uticati na nivo ekspresije (Mason i sar., 2010, Hold i sar., 2009). Dodatno, pokazano je da osobe, koje su nosioci T alela imaju značajno viši nivo solubilnog CD14 receptora u poređenju sa nosiocima *wild type* C alela (Gibot i sar., 2002). Izučavanje ekspresije CD14 gena kod pacijenata sa OLP-om bi trebalo imati u vidu prilikom planiranja budućih istraživanja, kao i utvrđivanje postojanja veze između rs2569190 polimorfizma i nivoa ekspresije CD14 gena.

Uvidom u literaturu nalazimo da je rs2569190 polimorfizam CD14 gena slabo proučavan u genetičkim studijama asocijacije generalno, pri čemu je najviše proučavan u studijama povezanosti sa razvojem sepse i različitih tipova kancera (oralni karcinom, karcinom želuca). Bitno je napomenuti da je ovo prva studija u kojoj je proučavana povezanost datog polimorfizma CD14 gena i razvoja OLP-a (Stanimirovic i sar., 2013).

## ***6. ZAKLJUČAK***

Iz rezultata dobijenih ovom doktorskom disertacijom se mogu izvesti sledeći zaključci:

- ✓ Erozivne forme oralnog lihen planusa, erozivna i bulozna, se javljaju dva i po puta češće među osobama koje konzumiraju alkohol u poređenju sa pacijentima koji ne koriste alkohol. Ovakav nalaz bi se mogao objasniti štetnim dejstvom koje alkohol ima na oralnu mukozu i stvaranje lezija koje mogu predstavljati dodatni faktor rizika za nastanak OLP-a.
- ✓ Kod pacijenata koji imaju lošiju oralnu higijenu se erozivna forma oralnog lihen planusa javlja oko dva puta češće u poređenju sa pacijentima sa dobrom oralnom higijenom. Moguće objašnjenje je pojava deskvamativnog gingivitisa usled čega pranje zuba može biti otežano zbog gingivalnog bola i pojave krvarenja. Posledica ovakve situacije je često akumulacija zubnih naslaga koje mogu negativno uticati na razvoj OLP-a.
- ✓ Erozivna forma oralnog lihen planusa se češće javlja kod pacijenata koji imaju protetske nadoknade u poređenju sa pacijentima koji nemaju protetske nadoknade, što može biti objašnjeno Kebnerovim fenomenom.
- ✓ Utvrđeno je postojanje statistički značajne veze između godina pacijenata i kliničke forme oralnog lihen planusa. Mogli bismo pretpostaviti da uočena značajnost ne potiče zapravo od direktne veze između godina i kliničke forme OLP-a, već od prisustva protetskih nadoknada, koje češće imaju stariji pacijenti. Protetske nadoknade mogu biti jedan od uzročnika stvaranja mehaničkih ozleda u oralnoj duplji i posledično mogu doprineti razvoju oralnog lihen planusa, posebno erozivne forme OLP-a.
- ✓ Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u distribuciji genotipova rs3804099 polimorfizma TLR2 gena između grupe pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom i kontrolne grupe. Navedeni nalaz bi mogao da ukaže na potencijalnu ulogu rs3804099 polimorfizma u podložnosti nastanka oralnog lihen planusa.

- ✓ Distribucija genotipova analiziranih polimorfizama u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima u ovoj studiji, je u skladu sa učestalošću genotipova polimorfizama u proučavanim različitim populacijama sveta.
- ✓ Postojanje statistički značajne razlike u distribuciji alela je uočeno samo u slučaju rs4986791 polimorfizma TLR4 gena.
- ✓ Polimorfizam rs3804099 u TLR2 genu je asociran sa povišenim rizikom za razvoj oralnog lihen planusa. Unošenjem *confounding* faktora, kao što su pol, godine, pušenje i konzumacija alkohola u *adjusted Odds Ratio* analizu, statistička značajnost je izgubljena, što ukazuje na značaj koji *confounding* faktori imaju u razvoju oralnog lihen planusa, a koje ne bi trebalo zanemariti u genetičkim studijama asocijacije.
- ✓ Analizirani polimorfizmi u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima nisu asocirani sa etiološkim faktorima (pol, godine, pušenje, konzumacija alkohola, prisustvo protetskih nadoknada, prisustvo amalgama i drugih metala, *Candida albicans*), kao ni kliničkom formom oralnog lihen planusa.
- ✓ Mutirani genotip TT proučavanog polimorfizama rs5743312 u TLR3 genu je bio asociran sa 15.9 puta povišenim rizikom za razvoj oralnog lihen planusa. Predviđeni genetički model nasleđivanja je recesivni, gde su heterozigotni CT i mutirani TT genotip združeno imali 15.6 puta viši rizik za razvoj OLP-a u poređenju sa *wild type* CC genotipom. Navedeni polimorfizam bi se mogao razmatrati kao potencijalni molekularni biomarker od značaja za nastanak OLP-a.
- ✓ TLR3 rs5743312 i rs3775291 polimorfizmi se nalaze u gametskoj neravnoteži vezanosti u našoj celokupnoj studijskoj grupi, kao i u kontrolnoj i grupi pacijenata sa dijagnostikovanom oralnim lihen planusom.
- ✓ Identifikovani haplotipovi dvolokusnog sistema (rs5743312 i rs3775291) nisu asocirani sa rizikom za nastanak oralnog lihen planusa, kao ni sa etiološkim faktorima i kliničkom formom oralnog lihen planusa.



- ✓ TLR4 rs4986791 i rs4986790 polimorfizmi se nalaze u gametskoj neravnoteži vezanosti u celokupnoj studijskoj grupi, kao i u kontrolnoj i grupi pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim lihen planusom.
  
- ✓ Od ukupno četiri identifikovana haplotipa dvolokusnog sistema (rs4986791 i rs4986790), haplotip TA je statsistički značajno asociran sa 0.099 sniženim rizikom za razvoj oralnog lihen planusa u poređenju sa najzastupljenijim CA haplotipom. Ovakav nalaz ukazuje na skroman protektivni efekat koji TA haplotip ima u razvijanju oralnog lihen planusa, ali efekat koji ne treba zanemariti, posebno u daljim opsežnijim analizama haplotipova TLR4 gena.
  
- ✓ Dalja istraživanja koja bi obuhvatila ispitivanje ekspresije gena i citokina, interakcije gena, kao i gena i spoljašnje sredine će u predstojećem periodu dati dodatne podatke uz koje bi se još jasnije rasvetlila uloga koju polimorfizmi nukleotidne sekvence u TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 genima imaju u etiologiji i patogenezi oralnog lihen planusa.

Sagledavajući sveukupne rezultate iznešene ovom doktorskom disertacijom, može se zaključiti da proučavanje polimorfizama gena, čiji su produkti uključeni u urođeni imunski odgovor, predstavlja značajan izvor informacija o razvoju oralnog lihen planusa, koji može dodatno rasvetliti etiopatologiju ove bolesti. Takođe, bitno je napomenuti da u dosadašnjoj naučnoj literaturi nije zabeleženo ispitivanje povezanosti polimorfizama proučavanih gena sa oralnim lihen planusom, što ovu doktorsku disertaciju čini pionirskom u datoj oblasti.

Prilikom planiranja nastavka ovog istraživanja, bilo bi potrebno analizirati nivo ekspresije TLR2, TLR3, TLR4 i CD14 gena, kao i nivo citokina i povezanosti sa do sada proučavanim polimorfizmima navedenih gena. Pored toga, istraživanja bi trebalo usmeriti i ka proučavanju interakcije gena odnosno polimorfizama, kao i interakcije gena sa faktorima spoljašnje sredine, ali i analizirati druge gene koji su uključeni u urođeni imunski odgovor. Dodatna istraživanja koja bi uključila navedene faktore će doprineti razumevanju uloge koji navedeni geni od značaja u urođenom imunskom sistemu imaju u etiologiji oralnog lihen planusa.

## ***7. LITERATURA***

## A

Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS (1997). *Cellular and molecular immunology*, Saunders: Philadelphia.

Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE and Lowry SF (2002). Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* **186**: 1522-5.

Akanuma D, Uzawa N, Yoshida MA, Negishi A, Amagasa T, Ikeuchi T (1999). Inactivation patterns of the p16(INK4A) gene in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **35**:476-483.

Allen CM, Camisa C, Grimwood R (1987). Lichen planus pemphigoides: report of a case with oral lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **63**: 184-8.

Almukahal I. Dijagnostički značaj depozita imunoreaktanata u koži i oralnoj mukozi obolelih od lichen planusa. {Magistarski rad}, Beograd: Vojnomedicinska akademija, 1996.

Altman J and Perry HO (1961). The variations and course of lichen planus. *Arch Dermatol* **84**: 179-91.

Antonsson B (2001). Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family killer-proteins and their victim, the mitochondrion *Cell Tissue Res* **306**:347 – 361.

Arndt KA, Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K et al (1987). Lichen planus. *Dermatology in general medicine* **3**:967-973.

Arrieta JJ, Rodriguez-Inigo E, Casqueiro M, Bartolome J, Manzarbeitia F, Herrero M, Pardo M and Carreno V (2000). Detection of hepatitis C virus replication by In situ hybridization in epithelial cells of anti-hepatitis C virus-positive patients with and without oral lichen planus. *Hepatology* **32**: 97-103.

Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signalling and modulation. *Science* **281**:1305-1308.

## B

Bader JS (2001). The relative power of SNPs and haplotype as genetic markers for association tests. *Pharmacogenomics* **2**: 11-24.

Bagan JV, Donat JS, Penarrocha M, Milian MA and Sanchis JM (1993). Oral lichen planus and diabetes mellitus. A clinico-pathological study. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* **36**: 3-6.

Bagan-Sebastian JV, Milian-Masanet MA, Penarrocha-Diago M and Jimenez Y (1992). A clinical study of 205 patients with oral lichen planus. *J Oral Maxillofac Surg* **50**: 116-8.

Barnard NA, Scully C, Eveson JW, Cunningham S, Porter SR (1993). Oral cancer development in patients with OLP. *J Oral Pathol Med* **22**:421-424.

Barnett M. L (1976). The non keratinocyte intraepithelial cell population in lichen planus. An ultrastructural characterization of cells in gingival lesions. *Oral Surg* **41**: 338.

Barrett JC, Fry B, Maller J and Daly MJ (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**: 263-5.

Baumal R, Kahn HJ, Bailey D, Phillips MJ, Hanna W (1984). The value of immunohistochemistry in increasing diagnostic precision of undifferentiated tumours by the surgical pathologist. *Histochem J* **16**:1061-1078.

Bechade D, Oui B, Mayet F, Trouette H, Schouler L, Jouglen J, Raymond JM, Couzigou P (1996). Appearance of hepatitis C virus replication and increase of aminotransferase activity after corticoid treatment of presumed autoimmune hepatitis. 2 cases. *Gastroenterol Clin Biol* **20**:696-699.

Beck HI, Brandrup F (1986). Treatment of erosive lichen planus with dapsone. *Acta Derm Venereol* **66**:366-367.

Bergmann C, Bachmann HS, Bankfalvi A, Lotfi R, Putter C, Wild CA, Schuler PJ, Greve J, Hoffmann TK, Lang S, Scherag A and Lehnerdt GF (2011). Toll-like receptor 4 single-nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in head and neck squamous cell carcinomas. *J Transl Med* **9**: 139.

Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Rot A, von Tscherner V, Baggiolini M and Dahinden CA (1993). RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *Eur J Immunol* **23**: 761-7.

Bissonette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR (1992). Apoptotic cell death induced by *c-myc* is inhibited by *bcl-2*. *Nature* **4**:359 – 552.

Bjornvold M, Munthe-Kaas MC, Egeland T, Joner G, Dahl-Jorgensen K, Njolstad PR, Akselsen HE, Gervin K, Carlsen KC, Carlsen KH and Undlien DE (2009). A TLR2 polymorphism is associated with type 1 diabetes and allergic asthma. *Genes Immun* **10**: 181-7.

Black MM. Lichen planus and lichenoid disorders. In: Champion RH, Burton JL, Ebling FJG, editors. Rook/Wilkinson/Ebling textbook of dermatology. Oxford: Blackwell Sci Publ, 1992: 1675-98.

Boorghani M, Gholizadeh N, Taghavi Zenouz A, Vatankhah M and Mehdipour M (2010). Oral lichen planus: clinical features, etiology, treatment and management; a review of literature. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* **4**: 3-9.

Boyd AS and Neldner KH (1991). Lichen planus. *J Am Acad Dermatol* **25**: 593-619.

Bramanti TE, Dekker NP, Lozada-Nur F, Sauk JJ and Regezi JA (1995). Heat shock (stress) proteins and gamma delta T lymphocytes in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **80**: 698-704.

Bridoux F, Badou A, Saoudi A, Bernard I, Druet E, Pasquier R, Druet P and Pelletier L (1997). Transforming growth factor beta (TGF-beta)-dependent inhibition of T helper cell 2 (Th2)-induced autoimmunity by self-major histocompatibility complex (MHC) class II-specific, regulatory CD4(+) T cell lines. *J Exp Med* **185**: 1769-75.

Burkhart NW, Burkes EJ and Burker EJ (1997). Meeting the educational needs of patients with oral lichen planus. *Gen Dent* **45**: 126-32; quiz 143-4.

Camisa C, Neff JC, Olsen RG (1984). Use of indirect immunofluorescence in the lupus erythematosus/lichen planus overlap syndrome: an additional diagnostic clue. *J Am Acad Dermatol* **31**:1050.

Carbone M, Conrotto D, Carrozzo M, Broccoletti R, Gandolfo S, Scully C (1999). Topical corticosteroids in association with miconazole and chlorhexidine in the long management of atrophic-erosive oral lichen planus: a placebo-controlled and comparative study between clobetasol and fluocinonide. *Oral diseases* **5**:41-49.

Carcassi C, Cottoni F, Floris L, La Nasa G, Mulargia M, Baldini G, Senes G, Orru S, Montesu MA, Cerimele D and i sar. (1994). The HLA-DRB1\*0101 allele is responsible for HLA susceptibility to lichen ruber planus. *Eur J Immunogenet* **21**: 425-9.

Carrozzo M and Thorpe R (2009). Oral lichen planus: a review. *Minerva Stomatol* **58**: 519-37.

Carrozzo M, Francia Di Celle P, Gandolfo S, Carbone M, Conrotto D, Fasano ME, Roggero S, Rendine S and Ghisetti V (2001). Increased frequency of HLA-DR6 allele in Italian patients with hepatitis C virus-associated oral lichen planus. *Br J Dermatol* **144**: 803-8.

Carrozzo M, Gandolfo S, Carbone M, Colombatto P, Broccoletti R, Garzino-Demo P and Ghisetti V (1996). Hepatitis C virus infection in Italian patients with oral lichen planus: a prospective case-control study. *J Oral Pathol Med* **25**: 527-33.

Carrozzo M, Gandolfo S (1999). The management of oral lichen planus. *Oral diseases* **5**:196-205.

Cawson RA (1975). Premalignant lesions in the mouth. *Br Med Bull* **31**:164-168.

Chaiyarit P, Kafrawy AH, Miles DA, Zunt SL, Van Dis ML and Gregory RL (1999). Oral lichen planus: an immunohistochemical study of heat shock proteins (HSPs) and

cytokeratins (CKs) and a unifying hypothesis of pathogenesis. *J Oral Pathol Med* **28**: 210-5.

Challacombe SJ (1986). Haematological abnormalities in oral lichen planus, candidiasis, leukoplakia and non-specific stomatitis. *Int J Oral Maxillofac Surg* **15**: 72-80.

Chinnaiyan, AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**:505-512.

Choudhury SD, Gupta LC (1979). ABO blood groups in lichen planus. *Indian J Dermatol* **24**:27-29.

Chuang TY, Stitle L, Brashear R and Lewis C (1999). Hepatitis C virus and lichen planus: A case-control study of 340 patients. *J Am Acad Dermatol* **41**: 787-9.

Ciaccio M and Rebora A (1990). Lichen planus following HBV vaccination: a coincidence? *Br J Dermatol* **122**: 424.

Conklin RJ and Blasberg B (1987). Oral lichen planus. *Dermatol Clin* **5**: 663-73.

Cottoni F, Solinas A, Piga MR, Tocco A, Lissia M and Cerimele D (1988). Lichen planus, chronic liver diseases, and immunologic involvement. *Arch Dermatol Res* **280 Suppl**: S55-60.

Cram DL and Muller SA (1966). Unusual variations of lichen planus. *Mayo Clin Proc* **41**: 677-88.

## **D**

Dan H, Liu W, Zhou Y, Wang J, Chen Q and Zeng X (2010). Association of interleukin-8 gene polymorphisms and haplotypes with oral lichen planus in a Chinese population. *Inflammation* **33**: 76-81.

Darier J (1909). *Precis de Dermatologie Paris. Ed Mason* 118.

Darier J (1909). *Precis de dermatologie. Masson et Cie* 118.

Davies MG, Gorkiewicz A, Knight A, Marks R (1977). Is there a relationship between lupus erythematosus and lichen planus? *Br J dermatol* **96**:145-153.

de Carvalho Fraga CA, Alves LR, Marques-Silva L, de Sousa AA, Jorge AS, de Jesus SF, Vilela DN, Pinheiro UB, Jones KM, de Paula AM and Guimaraes AL (2013). High HIF-1alpha expression genotypes in oral lichen planus. *Clin Oral Investig.*

Dekker NP, Lozada-Nur F, Lagenaur LA, MacPhail LA, Bloom CY, Regezi JA (1997). Apoptosis-associated markers in oral lichen planus *J Oral Pathol Med* **26**:170-175.

del Olmo JA, Llovet F, Rodrigo JM, Molina J, Aparisi L, Serra MA, Wassel A and Bixquert MA (1990). Prevalence of liver disease and infection by hepatitis B, delta virus, and human immunodeficiency virus in two Spanish penitentiaries. *Med Microbiol Immunol* **179**: 43-8.

## E

Eady RAJ, Cowen T (1978). Half-and-half cells in lichen planus. *Br J Dermatol* **98**:417.

Ebner H, Gebhart W (1976). Epidermal changes in lichen planus. *J Cutan Pathol* **3**:167 – 174.

Ebner H, Gebhart W (1977). Light and electron microscopic studies on colloid and other cytooid bodies. *Clin Exp Derm* **2**:311.

Edwards L and Friedrich EG, Jr. (1988). Desquamative vaginitis: lichen planus in disguise. *Obstet Gynecol* **71**: 832-6.

Eisen D (1994). The vulvovaginal-gingival syndrome of lichen planus. The clinical characteristics of 22 patients. *Arch Dermatol* **130**: 1379-82.

Ellis FA (1976). Histopathology of lichen planus based on analysis of one hundred biopsy specimens. *J Invest Dermatol* **48**:143 – 148.



El-Omar EM, Ng MT and Hold GL (2008). Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene* **27**: 244-52.

Eversole LR, Dam J, Ficarra G and Hwang CY (1994). Leukocyte adhesion molecules in oral lichen planus: a T cell-mediated immunopathologic process. *Oral Microbiol Immunol* **9**: 376-83.

## F

Farrow SN, Brown R (1996). New member of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Gen Dev* **6**:45– 49.

Farthing PM, Matear P and Cruchley AT (1992). Langerhans cell distribution and keratinocyte expression of HLADR in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **21**: 451-5.

Fellner MJ (1980). Lichen planus. *Int J Dermatol* **19**: 71-5.

Fernandez-Bussey RA, Schmitt D, Gaucherand M, Maudutt G, Gomes MA, Brochier J, Thivolet J (1983). Lichen planus: evaluation of cells in skin lesions and of T-lymphocyte subset in blood. *J Dermatol* **10**:17 – 24.

Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S, ElGhazali G, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Hermsen CC, Stalenhoef AF, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Rúa C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW and Netea MG (2007). TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 16645-50.

Fesus L, Thomazy V, Falus A (1987). Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS lett* **224**:104 – 108.

Feurman EJ and Sandbank M (1971). Lichen planus pemphigoides with extensive melanosis. Occurrence in a patient with malignant lymphoma. *Arch Dermatol* **104**: 61-7.

Frazer KA, Murray SS, Schork NJ and Topol EJ (2009). Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* **10**: 241-51.

Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL and Hafler DA (1996). Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* **98**: 70-7.

## G

Gallucci S and Matzinger P (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* **13**: 114-9.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* **133**:1710-1715.

Giannelli G, Brassard J, Foti C, Stetler-Stevenson WG, Falk-Marzillier J, Zamboni-Zallone A, Schiraldi O and Quaranta V (1996). Altered expression of basement membrane proteins and their integrin receptors in lichen planus: possible pathogenetic role of gelatinases A and B. *Lab Invest* **74**: 1091-104.

Gibot S, Cariou A, Drouet L, Rossignol M and Ripoll L (2002). Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med* **30**: 969-73.

Graham-Brown RA, Sarkany I and Sherlock S (1982). Lichen planus and primary biliary cirrhosis. *Br J Dermatol* **106**: 699-703.

## H

Halevy S, Feuennan EJ. Urolithiasis in Lichen planus. *Arch Dermatol* 19:364, 1983

Hashimoto K (1976). Apoptosis in lichen planus and several other dermatoses. *Acta Dermatovener* **56**:187-210.

He JF, Jia WH, Fan Q, Zhou XX, Qin HD, Shugart YY and Zeng YX (2007). Genetic polymorphisms of TLR3 are associated with Nasopharyngeal carcinoma risk in Cantonese population. *BMC Cancer* **7**: 194.

Helander SD, Rogers RS (1994). The sensitivity and specificity of direct immunofluorescence testing in disorders of mucous membranes. *J Am Acad Dermatol* **30**:65-75.

Hietanen J, Pihlman K, Forstrom L, Linder E and Reunala T (1987). No evidence of hypersensitivity to dental restorative metals in oral lichen planus. *Scand J Dent Res* **95**: 320-7.

Hirota M, Ito T, Okudela K, Kawabe R, Yazawa T, Hayashi H, Nakatani Y, Fujita K, Kitamura H (2002). Cell proliferation activity and the expression of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **31**:204-212.

Hold GL, Rabkin CS, Gammon MD, Berry SH, Smith MG, Lissowska J, Risch HA, Chow WH, Mowat NA, Vaughan TL and El-Omar EM (2009). CD14-159C/T and TLR9-1237T/C polymorphisms are not associated with gastric cancer risk in Caucasian populations. *Eur J Cancer Prev* **18**: 117-9.

Holla LI, Buckova D, Fassmann A, Halabala T, Vasku A and Vacha J (2002). Promoter polymorphisms in the CD14 receptor gene and their potential association with the severity of chronic periodontitis. *J Med Genet* **39**: 844-8.

Holmstrup P, Pindborg JJ (1979). Erythroplakic lesions in relation to oral lichen planus. *Acta Dermatovener* **59**:77-84.

Holmstrup P, Thorn JJ, Rindum J and Pindborg JJ (1988). Malignant development of lichen planus-affected oral mucosa. *J Oral Pathol* **17**: 219-25.

Huang DC, Cory S, Strasser A (1997). Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene* **14**:405-414.

**I**

Ishii T (1987). Immunohistochemical demonstration of T cell subsets and accessory cells in oral lichen planus. *J Oral Pathol* **16**: 356-61.

**J**

Jacyk WK (1978). Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase in lichen planus. *Arch Dermatol Res* **261**:331-332.

Janardhanam SB, Prakasam S, Swaminathan VT, Kodumudi KN, Zunt SL and Srinivasan M (2012). Differential expression of TLR-2 and TLR-4 in the epithelial cells in oral lichen planus. *Arch Oral Biol* **57**: 495-502.

Johnson FR, Fry L (1967). Ultrastructural observation on lichen planus. *Arch Derm* **95**:596 – 607.

Jonuleit H, Knop J and Enk AH (1996). Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* **289**: 1-8.

Jubert C, Pawlotsky JM, Pouget F, Andre C, DeForges L, Bretagne S, Mavier JP, Duval J, Revuz J, Dhumeaux D and i sar. (1994). Lichen planus and hepatitis C virus--related chronic active hepatitis. *Arch Dermatol* **130**: 73-6.

Jungell P, Malmstrom M, Wartiovaara J, Konttinen Y, Sane J (1987). Ultrastructure of oral leukoplakia and lichen planus. I. Basal region and inflammatory cells. *J Oral Pathol* **16**:170 – 178.

Junjie X, Songyao J, Minmin S, Yanyan S, Baiyong S, Xiaying D, Jiabin J, Xi Z and Hao C (2012). The association between Toll-like receptor 2 single-nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma susceptibility. *BMC Cancer* **12**: 57.

**K**

Kainulainen T, Autio-Harmainen H, Oikarinen A, Salo S, Tryggvason K and Salo T (1997). Altered distribution and synthesis of laminin-5 (kalinin) in oral lichen planus, epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Br J Dermatol* **136**: 331-6.

Kaplan B and Barnes L (1985). Oral lichen planus and squamous carcinoma. Case report and update of the literature. *Arch Otolaryngol* **111**: 543-7.

Kaposi M. Lichen ruber pemphigoides. *Arch Dermatol Syph (Berl)* 24:343 – 6, 1892

Kark EC and Litt JZ (1980). Ashy dermatosis--a variant of lichen planus? *Cutis* **25**: 631-3.

Katz J, Goultschin J, Benoliel R, Rotstein I and Pisanty S (1988). Lichen planus evoked by periodontal surgery. *J Clin Periodontol* **15**: 263-5.

Kaur S, Singh M, Radotra BD and Sehgal S (1987). Positive Nikolsky's and bulla-spread signs in acute bullous lichen planus. *Arch Dermatol* **123**: 1122-3.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**:239.

Kerr JFR (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J pathol* **105**:13 – 20.

Khan A, Farah CS, Savage NW, Walsh LJ, Harbrow DJ and Sugerman PB (2003). Th1 cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **32**: 77-83.

Kho HS, Chang JY, Kim YY and Kim Y (2013). MUC1 and toll-like receptor-2 expression in burning mouth syndrome and oral lichen planus. *Arch Oral Biol* **58**: 837-42.

Kimkong I, Hirankarn N, Nakkuntod J and Kitkumthorn N (2011). Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and susceptibility to oral lichen planus. *Oral Dis* **17**: 206-9.

Kinokawa S, Akazawa K, Kinukawa N, Yao T, Tsuneyoshi M (1996). Inverse correlation between the expression of bcl-2 and p53 proteins in primary gastric lymphoma. *Hum Pathol* **27**:225-233.

Klanrit P, Thongprasom K, Rojanawatsirivej S, Theamboonlers A and Poovorawan Y (2003). Hepatitis C virus infection in Thai patients with oral lichen planus. *Oral Dis* **9**: 292-7.

Koch P and Bahmer FA (1999). Oral lesions and symptoms related to metals used in dental restorations: a clinical, allergological, and histologic study. *J Am Acad Dermatol* **41**: 422-30.

Kofoed ML and Wantzin GL (1985). Familial lichen planus. More frequent than previously suggested? *J Am Acad Dermatol* **13**: 50-4.

Kolde G, Henseleit U, Rosenbach T. Programmed cell death in cutaneous immunopatology. In: Bos JD editor. . Skin immune system(SIS) Boca Raton: CRC Press, 1997:327-38.

Koray M, Dulger O, Ak G, Horasanli S, Ucok A, Tanyeri H and Badur S (2003). The evaluation of anxiety and salivary cortisol levels in patients with oral lichen planus. *Oral Dis* **9**: 298-301.

Krogh P, Holmstrup P, Thorn JJ, Vedtofte P, Pindborg JJ (1987). Yeast species and biotypes associated with oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **63**:48-54.

Krutchkoff DJ, Eisenberg E (1985). Lichenoid dysplasia: A distinct histopathologic entity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **30**:308-315.

## L

Lamey PJ, McCartan BE, MacDonald DG and MacKie RM (1995). Basal cell cytoplasmic autoantibodies in oral lichenoid reactions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **79**: 44-9.

Lauwers GY, Kandemir O, Kulbilis P, Scott GV (1997). Cellular kinetics in Barrett's epithelium carcinogenic sequence: roles of apoptosis, bcl-2 protein, and cellular proliferation. *Mod Pathol* **10**:1201-1208.

Lear JT, English JS et al (1996). Erosive and generalized lichen planus responsive to azathioprine. *Clin Exp Dermatol* **21**:56-57.

Lee MS, Wilkinson B, Doyle JA and Kossard S (1996). A comparative immunohistochemical study of lichen planus and discoid lupus erythematosus. *Australas J Dermatol* **37**: 188-92.

Lee, R.J, Albanese, C, Stenger, R.J, Watanabe, G, Inghirami, G, Haines G.K et al (1999). 60(v-src) induction of cyclin D1 requires collaborative interactions between the extracellular signal-regulated kinase, p38, and Jun kinase pathways. A role for cAMP response element-binding protein and activating transcription factor-2 in pp60(v-src) signaling in breast cancer cells. *J Biol Chem* **274**:7341-7350.

Lepoivre M, Vyjver VD. Le Lichen plan buccal. *Revue de Stomatologie* 72:2, 214 – 233, 1971

Lewis FM, Shah M and Harrington CI (1996). Vulval involvement in lichen planus: a study of 37 women. *Br J Dermatol* **135**: 89-91.

Liggett WH, Sidransky D (1998). Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* **16**:1197-1203.

Lin AN, Srolovitz H and Billick RC (1986). Familial lichen planus. *Cutis* **37**: 135-6.

Lindelof B, Sigurgeirsson B, Tegner E, Larkö O, Johannesson A, Berne B, Christensen OB, Andersson T, Törngren M, Molin L, i sar. (1991). PUVA and cancer: a large-scale epidemiological study. *Lancet* **338**:91-93.

Lorenz E, Mira JP, Frees KL and Schwartz DA (2002). Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* **162**: 1028-32.

Lozada-Nur F, Silverman S, Migliorati C (1984). Adverse side effects associated with prednisone in the treatment of patients with oral inflammatory ulcerative diseases. *J Am Dent Assoc* **109**:269-270.

Lozada-Nur F. P (1997). Oral lichen planus: topical and systemic therapy. *Sem Cut Med Surg* **16**:295-300.

Lozada-Nur F. P (1981). Prednisone and azathioprine in the treatment of patients with vesiculoerosive oral diseases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **52**:257-260.

Lu QL, Abel P, Foster C, Foster CS, Lalani EN (1996). Bcl-2: Role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* **27**:102-110.

Lu SY, Chen WJ, Eng HL (1995). Dramatic response to levamisole and low-dose prednisolone in 23 patients with oral lichen planus: a 6-year prospective follow-up study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral radiol Endo* **80**:705-709.

Luger TA, Beissert S, Schwartz T. The epidermal cytokine network. . In: Bos JD editor. Skin immune system(SIS) Boca Raton: CRC Press, 1997:271-310.

Lundstrom IM (1983). Incidence of diabetes mellitus in patients with oral lichen planus. *Int J Oral Surg* **12**: 147-52.

## M

Magnusson B. Lichen ruber and syphaticoblastoma. *Acta Derm Venereol* **35**:74, 1955

Mahood JM (1983). Familial lichen planus. A report of nine cases from four families with a brief review of the literature. *Arch Dermatol* **119**: 292-4.

Marder MZ, Deesen KC (1982). Transformation of OLP to squamous cell carcinoma: a literature review and report of case. *JADA* **105**:55-60.

Mason TE, Ricks-Santi L, Chen W, Apprey V, Joykutty J, Ahaghotu C, Kittles R, Bonney G and Dunston GM (2010). Association of CD14 variant with prostate cancer in African American men. *Prostate* **70**: 262-9.

Mateyak MK, Obaya AJ et al (1997). Phenotypes of c-myc deficient rat fibroblast isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ* **8**:1039 – 1048.

Matthews JB, Scully CM and Potts AJ (1984). Oral lichen planus: an immunoperoxidase study using monoclonal antibodies to lymphocyte subsets. *Br J Dermatol* **111**: 587-95.



- Matthews RW, Scully C (1992). Griseofulvin in the treatment of oral lichen planus: adverse drug reactions, but little beneficial effect. *Ann Dent* **51**:10-11.
- McCartan BE and McCreary CE (1997). Oral lichenoid drug eruptions. *Oral Dis* **3**: 58-63.
- McCartan BE, McCreary CE (1999). What is rationale for treating oral lichen planus? *Oral diseases* **5**:181-182.
- McDonald CJ (1997). Immunomodulatory and cytotoxic agents in dermatology. *New York, NY, Marcel Dekker* pp:149-155.
- Medema J.P., Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* **16**:2794-2804.
- Medenica M, Lorincz A (1977). Lichen planus: an ultrastructural study. *Acta Dermatovener* **57**:55 – 62.
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C.elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* **75**:653 – 660.
- Miyagawa S, Ohi H, Muramatsu T, Okuchi T, Shirai T and Sakamoto K (1985). Lichen planus pemphigoides-like lesions induced by cinnarizine. *Br J Dermatol* **112**: 607-13.
- Monk B (1985). Lichen planus and the liver. *J Am Acad Dermatol* **12**: 122-4.
- Mora RG, Nesbitt LT, Jr. and Brantley JB (1983). Lichen planus pemphigoides: clinical and immunofluorescent findings in four cases. *J Am Acad Dermatol* **8**: 331-6.
- Murphy GF, Liu V. The dermal immune system. . In: Bos JD editor. . Skin immune system(SIS) Boca Raton: CRC Press, 1997:347-64.
- Musgrove EA. et al (1994). Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G<sub>1</sub> and is sufficient for cells arrested in G<sub>1</sub> to complete the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:8022-8026.

Nagata, S (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**:355-365.

Neppelberg E, Johannessen AC, Jonsson R (2001). Apoptosis in oral lichen planus *Eur J Oral Sci* **109**:361-364.

## O

O'Connell J (2001). Role of Fas–FasL in inflammatory diseases. *Exp Rev Mol Med* 1-18.

Ohno S, Tateishi Y, Tatemoto Y, Morishita K, Sasabe E and Yamamoto T (2011). Enhanced expression of Toll-like receptor 2 in lesional tissues and peripheral blood monocytes of patients with oral lichen planus. *J Dermatol* **38**: 335-44.

Okochi H, Nashiro K, Tsuchida T, Seki Y and Tamaki K (1990). Lichen planus pemphigoides: case report and results of immunofluorescence and immunoelectron microscopic study. *J Am Acad Dermatol* **22**: 626-31.

Olsen RG, Du Plessis DP et al (1984). Indirect immunofluorescence microscopy of lichen planus. *Br J Dermatol* **110**:9.

Ostman PO, Anneroth G and Skoglund A (1996). Amalgam-associated oral lichenoid reactions. Clinical and histologic changes after removal of amalgam fillings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **81**: 459-65.

## P

Pelisse M (1989). The vulvo-vaginal-gingival syndrome. A new form of erosive lichen planus. *Int J Dermatol* **28**: 381-4.

Petrou-Americanou C, Markopoulos AK et al (1998). Prevalence of oral lichen planus in diabetes mellitus according to the type of diabetes. *Oral Diseases* **4**:37-40.

Petruzzi M, De Benedittis M, Loria MP, Dambra P, D'Oronzio L, Capuzzimati C, Tursi A, Lo Muzio L and Serpico R (2004). Immune response in patients with oral lichen planus and HCV infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* **17**: 93-8.

Pilli M, Penna A, Zerbini A, Vescovi P, Manfredi M, Negro F, Carrozzo M, Mori C, Giuberti T, Ferrari C and Missale G (2002). Oral lichen planus pathogenesis: A role for the HCV-specific cellular immune response. *Hepatology* **36**: 1446-52.

Pindborg JJ, Reichart PA et al (1997). WHO International Histological Classification of Tumours. Histological typing of cancer and precancer in the oral mucosa. *Berlin Springer*.

Poor V (1905). Zur anatomie der Schleimhaut Affectionen bei Lichen Planus. *Wilson Dermat.Ztschr* **12**:603.

Potts AJ, Hamburger J and Scully C (1987). The medication of patients with oral lichen planus and the association of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with erosive lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **64**: 541-3.

Powell FC, Rogers RS, 3rd and Dickson ER (1983). Primary biliary cirrhosis and lichen planus. *J Am Acad Dermatol* **9**: 540-5.

## R

Ralhan R, Swain RK et al (1998). p-glycoprotein is positively correlated with p53 in human oral pre-malignant and malignant lesions and is associated with poor prognosis. *Int J Cancer* **84**:80 – 85.

Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditi M, Hemming VG, Blanco JC, Segal DM and Vogel SN (2006). Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol* **177**: 322-32.

Ramon-Fluixa C, Bagan-Sebastian J, Milian-Masanet M and Scully C (1999). Periodontal status in patients with oral lichen planus: a study of 90 cases. *Oral Dis* **5**: 303-6.

Rebora A and Rongioletti F (1984). Lichen planus and chronic active hepatitis. A retrospective survey. *Acta Derm Venereol* **64**: 52-6.

Regezi JA, Daniels TE, Saeb F and Nickoloff BJ (1994). Increased submucosal factor XIIIa-positive dendrocytes in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **23**: 114-8.

Regezi JA, Dekker NP, MacPhail LA, Lozada-Nur F and McCalmont TH (1996). Vascular adhesion molecules in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **81**: 682-90.

Rivers JK, Jackson R, Orizaga M (1986). Who was Wickham and what are his striae? *Int J Dermatol* **25**:611 – 613.

Robertson WD and Wray D (1992). Ingestion of medication among patients with oral keratoses including lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **74**: 183-5.

Rojo-Moreno JL, Bagan JV, Rojo-Moreno J, Donat JS, Milian MA and Jimenez Y (1998). Psychologic factors and oral lichen planus. A psychometric evaluation of 100 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **86**: 687-91.

Ronbeck BA, Lind PO i sar. Desquamative gingivitis: preliminary observations with tetracycline treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 69(6):694-697, 1990

Roy KM, Dickson EM, Staines KS and Bagg J (2000). Hepatitis C virus and oral lichen planus/lichenoid reactions: lack of evidence for an association. *Clin Lab* **46**: 251-4.

## S

Sabouraud, R (1910). Sur quelques points de l'anatomie pathologique du lichen plan de Wilson. *Ann Derm Syph* **1**:491.

Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR (1991). Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* **254**:279 – 282.

Santini D, Angeletti S, Ruzzo A, Dicuonzo G, Galluzzo S, Vincenzi B, Calvieri A, Pizzagalli F, Graziano N, Ferraro E, Lorino G, Altomare A, Magnani M, Graziano F and Tonini G (2008). Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in gastric cancer of intestinal and diffuse histotypes. *Clin Exp Immunol* **154**: 360-4.

Sarkany I and Gaylarde PM (1972). The pathogenesis of lichen planus. *Br J Dermatol* **87**: 81.

- Sarkany I, Gaylarde P.M (1971). Ultra structural and light microscopic changes of the epidermo-dermal junction. *Trans St Johns Hosp Derm Soc* **57**:139.
- Scott MJ, Jr. and Scott MJ, Sr. (1979). Ungual lichen planus. Lichen planus of the nail. *Arch Dermatol* **115**: 1197-9.
- Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, Holmstrup P, Mutlu S, Porter S and Wray D (1998). Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med* **9**: 86-122.
- Scully C, EJ-Kom M. Lichen planus: review and update on pathogenesis. *J Oral Pathol* **14**:431-458, 1985
- Serrano, M., G. J. Hannon, D. Beach (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**:704-707.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**:1501–1512.
- Shimizu M, Higaki Y, Higaki M and Kawashima M (1997). The role of granzyme B-expressing CD8-positive T cells in apoptosis of keratinocytes in lichen planus. *Arch Dermatol Res* **289**: 527-32.
- Shklar G, Flynn BA, Szabo G (1978). Basement membrane alteration in lichen planus. *J Invest Dermatol* **70**:45 – 50.
- Shresta S, Heusel JW, Macivor DM, Wesselschmidt RL, Russell JH, Ley TJ (1995). Granzyme B plays a critical role in cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis. *Immunol Rev* **146**:211 – 221.
- Silverman S, Gorsky M, Lozada-Nur F, Giannotti K. (1991). A prospective study of findings and management in 214 patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **72**:665-670.

Silverman S, Jr., Gorsky M, Lozada-Nur F and Giannotti K (1991). A prospective study of findings and management in 214 patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **72**: 665-70.

Silverman S, Lozada-Nur F, Migliorati C. (1985). Clinical efficacy of prednisone in the treatment of patients with oral inflammatory-ulcerative diseases. A study of 55 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **59**:360-363.

Simark-Mattsson C, Bergenholtz G, Jontell M, Tarkowski A and Dahlgren UI (1994). T cell receptor V-gene usage in oral lichen planus; increased frequency of T cell receptors expressing V alpha 2 and V beta 3. *Clin Exp Immunol* **98**: 503-7.

Simon M, Jr. and Gruschwitz MS (1997). In situ expression and serum levels of tumour necrosis factor alpha receptors in patients with lichen planus. *Acta Derm Venereol* **77**: 191-3.

Siponen M, Kauppila JH, Soini Y and Salo T (2012). TLR4 and TLR9 are induced in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **41**: 741-7.

Sironi M, Biasin M, Cagliani R, Forni D, De Luca M, Saulle I, Lo Caputo S, Mazzotta F, Macias J, Pineda JA, Caruz A and Clerici M (2012). A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection. *J Immunol* **188**: 818-23.

Skoglund A (1994). Value of epicutaneous patch testing in patients with oral, mucosal lesions of lichenoid character. *Scand J Dent Res* **102**: 216-22.

Smoller BR and Glusac EJ (1994). Immunofluorescent analysis of the basement membrane zone in lichen planus suggests destruction of the lamina lucida in bullous lesions. *J Cutan Pathol* **21**: 123-8.

Sondell B, Dyberg P, Anneroth GK, Ostman PO and Egelrud T (1996). Association between expression of stratum corneum chymotryptic enzyme and pathological keratinization in human oral mucosa. *Acta Derm Venereol* **76**: 177-81.

Stanimirovic D, Zeljic K, Jankovic L, Magic M, Hadzi-Mihajlovic M and Magic Z (2013). TLR2, TLR3, TLR4 and CD14 gene polymorphisms associated with oral lichen planus risk. *Eur J Oral Sci* **121**: 421-6.

Steinman RM, Turley S, Mellman I and Inaba K (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* **191**: 411-6.

Sugerman PB, Satterwhite K and Bigby M (2000). Autocytotoxic T-cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* **142**: 449-56.

Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ and Seymour GJ (1995). Heat shock protein expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **24**: 1-8.

Sugermann PB, Savage NW, Seymour GJ and Walsh LJ (1996). Is there a role for tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in oral lichen planus? *J Oral Pathol Med* **25**: 219-24.

## T

Taafé A (1979). Current concept in lichen planus. *Int J Dermatol* **18**:533 – 538.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K and Akira S (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**: 443-51.

Tank B, Van Joost T. Lichen planus and graft-vs.-host disease. In: Bos JD, editor. Skin immune system(SIS) Boca Raton: CRC Press, 1997:531-41.

Thibierge G. Des lésions de la muqueuse buccale dans le lichen plan.. *Ann. de Dermatol* **2**:65, 1885

Thomas DW, Stephens P, Stephens M, Patten DW and Lim SH (1997). T-cell receptor V beta usage by lesional lymphocytes in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **26**: 105-9.

Thompson DF and Skaehill PA (1994). Drug-induced lichen planus. *Pharmacotherapy* **14**: 561-71.

Thorn JJ, Holmstrup P, Rindum J and Pindborg JJ (1988). Course of various clinical forms of oral lichen planus. A prospective follow-up study of 611 patients. *J Oral Pathol* **17**: 213-8.

Thornhill MH, Pemberton MN, Simmons RK and Theaker ED (2003). Amalgam-contact hypersensitivity lesions and oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **95**: 291-9.

Tregouet DA and Garelle V (2007). A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. *Bioinformatics* **23**: 1038-9.

Tydsley WR. Oral lichen planus. *Br J Oral Surg.* 11:187, 1974

Tyldesley W, Harding SM (1977). Bethamethasone valerate aerosol in the treatment of oral lichen planus. *Br J Dermatol* **96**:652-662.

## U

Ulevitch RJ (1999). Toll gates for pathogen selection. *Nature* **401**: 755-6.

## V

van de Staak WJ, Cotton DW, Jonckheer-Venneste MM and Boerbooms AM (1975). Lichenoid eruption following penicillamine. A case report with some biochemical observations. *Dermatologica* **150**: 372-4.

Van der Graaf CA, Netea MG, Morre SA, Den Heijer M, Verweij PE, Van der Meer JW and Kullberg BJ (2006). Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for Candida bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw* **17**: 29-34.

Vincent ABE, Fotos PG et al (1990). Oral lichen planus: the clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **70**:165-171.

Vousden KH (2000). p53:death star. *Cell* **103**:691 – 694.



**W**

Walton LJ, Thornhill MH and Farthing PM (1996). T cell antigen receptor expression by intra-epithelial lymphocytes in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **25**: 534-7.

Wang X, Li J, Xie W, Zhang W and Chang Y (2013). Toll-like receptor 2 gene polymorphisms and cancer susceptibility: a meta-analysis. *Neoplasma* **60**: 459-67.

Wang Z, Yao H, Cui B, Ning G and Tang GY (2011). Genetic linkage analysis of oral lichen planus in a Chinese family. *Genet Mol Res* **10**: 1427-33.

Weinberg RA (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**:323-330.

Wick MR, Ritter JH, Swanson PE (1999). The impact of diagnostic immunohistochemistry on patient outcomes. *Clin Lab Med* **19**:797-814.

Wickham LF (1895). Sur un signe pathognomonique de Lichen du Wilson (lichen plan) stries et ponctuations grisâtres. *Ann Dermatol Syph* **6**:517 – 20.

Wilson E (1896). On leichen planus. *J cutan Med Dis skin* **3**:117 – 32.

Wong L and Freeman S (2003). Oral lichenoid lesions (OLL) and mercury in amalgam fillings. *Contact Dermatitis* **48**: 74-9.

World Health Organization. Meeting of Investigators on the Histological Definition of Precancerous Lesions. Geneva, 1972. Report to the Director-General

Wu CL, Classon M., Dyson N, Harlow E (1996). Expression of dominant-negative mutant DP-1 blocks cell cycle progression in G<sub>1</sub>. *Mol Cell Biol* **16**:3698-3706.

Wu D, Wang L, Sun M, Wang G, Fu S, Dong G and Wu Y (2013). CIITA rs4774 and rs6498122 polymorphisms are associated with oral lichen planus in Chinese people: a case-control study. *Eur J Oral Sci* **121**: 69-75.

Wyatt EH (1975). Lichen planus and ulcerative colitis. *Br J Dermatol* **93**: 465-8.

Wyllie AH (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* **11**:95 – 103.

## Y

Yamamoto T, Osaki T, Yoneda K and Ueta E (1994). Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **23**: 309-15.

Yang ZH, Dai Q, Gu YJ, Guo QX and Gong L (2012). Cytokine and chemokine modification by Toll-like receptor polymorphisms is associated with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Sci* **103**: 653-8.

Yiannias JA, el-Azhary RA, Hand JH, Pakzad SY and Rogers RS, 3rd (2000). Relevant contact sensitivities in patients with the diagnosis of oral lichen planus. *J Am Acad Dermatol* **42**: 177-82.

## Z

Zeljic K, Supic G, Jovic N, Kozomara R, Brankovic-Magic M, Obrenovic M and Magic Z (2013). Association of TLR2, TLR3, TLR4 and CD14 genes polymorphisms with oral cancer risk and survival. *Oral Dis*.

Zhao ZZ, Savage NW, Pujic Z and Walsh LJ (1997). Immunohistochemical localization of mast cells and mast cell-nerve interactions in oral lichen planus. *Oral Dis* **3**: 71-6.

Zhao ZZ, Sugerman PB, Zhou XJ, Walsh LJ and Savage NW (2001). Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus. *Oral Dis* **7**: 246-51.

Zhou XJ, Savage NW, Sugerman PB, Walsh LJ, Aldred MJ and Seymour GJ (1996). TCR V beta gene expression in lesional T lymphocyte cell lines in oral lichen planus. *Oral Dis* **2**: 295-8.

Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ and Seymour GJ (2002). Intra-epithelial CD8+ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **31**: 23-7.

**8. *BIOGRAFIJA***  
***AUTORA***

Doktor stomatologije, Dragan M. Stanimirović je rođen 6. oktobra 1975. godine u Kraljevu. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao školske 1994/95. godine, a diplomirao 2001. godine. Nakon obavljenog obaveznog staža, 2003. godine upisuje magistarske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Magistarsku tezu pod naslovom „Karakteristike i terapijske mogućnosti sindroma pečenja usta (SPU)” uspešno je odbranio 2009. godine i time stekao titulu magistra stomatoloških nauka. U periodu od 2005-2008. godine je bio na specijalističkim studijama Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Specijalista je paradontologije i oralne medicine. Zaposlen je kao asistent na Klinici za paradontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U dosadašnjoj karijeri, Dr Dragan M. Stanimirović je bio na stručnim usavršavanjima 2008. godine- Implant System NobelReplace Tapered Groovy, bazični hirurški kurs, u organizaciji Klinike za paradontologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i 2010. godine- The Essentials of Dental Implant Success: from Function to Aesthetics The Surgical Aspect of Implant Dentistry, u organizaciji BioHorizons.

Dr Dragan M. Stanimirović je do sada bio autor i koautor tri naučne publikacije u međunarodnim časopisima sa SCI liste i 11 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja. Održao je više stručnih predavanja po pozivu.

Član je Srpskog lekarskog društva- sekcije za Parodontologiju i BaSS-a. Tečno govori engleski jezik.

## ***9. PRILOZI***

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Драган М. Станимировић

број уписа 2011

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**”UDRUŽENOST POLIMORFIZMA GENA TLRs 2,3,4 i CD14 KOD BOLESNIKA SA ORALNIM LIHEN PLANUSOM (OLP).”**

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

**Потпис докторанта**

У Београду, 17.07.2014

---

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Драган М. Станимировић

Број уписа 2011

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада **”UDRUŽENOST POLIMORFIZMA GENA TLRs 2,3,4 i CD14 KOD BOLESNIKA SA  
ORALNIM LIHEN PLANUSOM (OLP).”**

Ментор Проф. Љиљана Јанковић

Потписани Драган М. Станимировић

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

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

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

**Потпис докторанта**

У Београду, 17.07.2014.

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**”UDRUŽENOST POLIMORFIZMA GENA TLRs 2,3,4 i CD14 KOD BOLESNIKA SA ORALNIM LIHEN PLANUSOM (OLP).”**

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанта**

У Београду, 17.07.2014.

---

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од



стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.