

PA 20835

Uč 34196-074

**UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET**

KLINIKA ZA PARODONTOLOGIJU I ORALNU MEDICINU

**IMUNOREAKTIVNOST NA PROTEINE HRANE U
ETIOPATOGENEZI REKURENTNIH ORALNIH
ULCERACIJA**

Doktorska teza



Autor: mr sci. dr Irina Besu Žižak
Mentori: Prof. Dr Ljiljana Janković
Dr Zorica Juranić, N.Sav

Beograd, 2010.

УНИВЕРЗИТЕТ "СВЕТОЗАР МАРКОВИЋ" БЕОГРАД
162651

2 305 19

ИЗВЕШТАЈ О РАДУ НАСТАВНИКА
У ПЕРИОДУ ОД 1. СЕПТЕМБРА ДО 31. ДЕЦЕМБРА



Име и презиме: _____
Место рада: _____
Датум: _____

Београд, 2019

Želela bih da se zahvalim svima koji su doprineli realizaciji ovog rada.

Na prvom mestu, posebnu zahvalnost dugujem mojim mentorkama, Prof. Dr Ljiljani Janković i Dr Zorici Juranić, Naučnom savetniku.

Prof. Dr Ljiljani Janković se zahvaljujem na dragocenoj pomoći u svim fazama izrade moje doktorske teze, od izbora teme, do njenog konačnog oblikovanja. Korisnim sugestijama i podsticajima, kao i velikim ličnim angažovanjem, Prof. Dr Ljiljana Janković dala je nemerljiv doprinos mome radu.

Moja šefica, Dr Zorici Juranić, mi je mnogo pomogla oko koncipiranja i sprovođenja istraživanja, koje je sprovedeno u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, u okviru projekta 145006 "Istraživanje dejstava modifikatora biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima," Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Svojim ličnim angažovanjem, podsticajima i savetima, Dr Zorica Juranić mi je pomogla da svoj rad krunišem doktorskom tezom.

Prof. Dr Sanvili Rašković sam zahvalna na korisnim sugestijama, bitnim za postavku, izradu i konačan oblik ovog rada.

Posebno se zahvaljujem kolegama iz Laboratorije za modifikatore biološkog odgovora, Tatjani Petrović, dr Milici Đorđević, dipl. mol. biologu Ivani Matić, mr sci. Željku Žišku, kao i svim kolegama na Odeljenju za eksperimentalnu onkologiju, na podršci i razumevanju.

Mom prijatelju, dipl. ph., istraživaču saradniku Aleksandri Konić-Ristić, dugujem veliku zahvalnost na pomoći i korisnim savetima u eksperimentalnom delu rada.

Dipl. mat., stručnom saradniku, Dušici Gavrilović izražavam zahvalnost zbog pružene pomoći u statističkoj obradi rezultata.

Ne mogu, a da ne spomenem svoje roditelje, koji su mi pružili puno ljubavi i topline. Pokazali su mi put koji sam sledila i koji me je danas, doveo do ovde. Hvala im na tome.

Autor

LISTA SKRAĆENICA

ADCC - ćelijsku citotoksičnu aktivnost (*engl. antibody-dependet cellular cytotoxic activity*)

AECAs - anti-endotelijalnih auto-antitela (*engl. anti-endothelial cell autoantibodies*)

BD - Behçetova bolest (*Behçet's disease*)

BSA - albumin goveđeg seruma (*engl. Bovine Serum Albumin*)

CIC - cirkulišući imuni kompleksi (*engl. Immune complexes in circulation*)

CMFD - dijeta bez proteina kravljeg mleka (*engl. cow's milk protein free diet*)

CMP - proteini kravljeg mleka (*engl. cow's milk proteins*)

DBPCFC - dvostruko-slepi placebo- kontrolisani oralni izazov hranom (*double-blind placebo-controlled oral food challenge*)

DEB - distrofična epidermolizis buloza (*dystrophic Epidermolysis bullosa*)

DH - dermatitis herpetiformis During (*Dermatitis Herpetiformis Duhring*)

DLE - diskoidni lupus eritematozus (*Discoïd lupus erythematosus*)

EB - epidermolizis buloza (*Epidermolysis Bullosa*)

EBS - epidermolizis buloza simpleks (*Epidermolysis bullosa simplex*)

EBV - Epštajn-Barov virus (*Epstein-Barr virus*)

ELISA test - (*engl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

EM – eritema eksudativum multiforme (*Erythema exudativum multiforme*)

ETA - toksično epidermalno nekrolizirajuća eritema multiforme (*Epidermolysis toxica acuta*)

FAO - (*engl. Food and Agriculture Organization*)

FGF-7 - epitelijalni ćelijsko - specifični faktor rasta fibroblasta-7 (*engl. epithelial cell-specific fibroblast growth factor-7*)

G-CSF - faktor stimulacije granulocitne loze (*engl. granulocyte-colony stimulating factor*)

HCV - hepatitis C virus (*Hepatitis C Virus*)

HHV-6 - humani herpes virus tip 6 (*Human Herpesvirus Six*)

HIV - virus humane imunodeficijencije (*Human Immunodeficiency Virus*)

HL - Hočkinova bolest (*engl. Hodgkin's lymphoma*)

HLA - humani leukocitni antigen (*engl. genetically determined human leucocyte antigen*)

HRP - (*engl. Horseradish peroxidase*)

HSV - herpes simpleks virus (*Herpes simplex virus*)

ICAM-1 - endotelijalnog intracelularnog adhezionog molekula-1 (*engl. endothelial intercellular adhesion molecule-1*)

IFN- γ - interferon γ (*engl. Interferon-gamma*)

IL-10 - interleukin-10 (*engl. Interleukin-10*)

JEB - *junctional Epidermolysis bullosa*

K - kontrolna grupa

LFA-1 - limfocitni funkcionalni-antigen-1 (*engl. lymphocyte function-antigen-1*)

LFA-3 - limfocitnog funkcionalnog-antigena-3 (*engl. lymphocyte function-antigen-3*)

MARAS - afte major (*Aphthae major, Peradenitis mucosa necrotican*)

MCs - mast ćelije (*engl. Mast cells*)

MHC - glavni lokus histokompatibilnosti (*engl. Major Histocompatibility Complex*)

MiRAS - afte minor (*Aphthae minor*)

MMP-8 - humani neutrofilni tip matriks metaloproteinaze-8 (*engl. human neutrophil-type matrix metalloproteinase-8*)

mRNA - informacione ribonukleinske kiseline (*engl. messenger ribonucleic acid*)

MTT - tetrazolijumski esej u mikrokulturi (*engl. microculture tetrazolium assay*)

NHL - Nehočkinski limfom (*engl. Non-Hodgkin's lymphoma*)

NK ćelije - ćelije prirodne ubice (*engl. Natural killer cells; NK-cells*)

NO - azotni oksid (*engl. nitric oxide*)

OPD - ortofenildiamin (*engl. Ortho Phenylene Diamine*)

PBMC - mononuklearne ćelije periferne krvi (*engl. Peripheral blood mononuclear cells*)

PMO – pemfigoid mukoze oris (*Pemphigoid mucosae oris*)

PV - pemfigus vulgaris (*Pemphigus vulgaris*)

QOL - „smanjeni kvalitet života“ (*engl. decreased quality of life*)

RAS - rekurentni aftozni stomatitis (*Recurrent aphthous stomatitis*)

RAU - rekurentne aftozne ulceracije (*Recurrent aphthous ulcerations*)

RNA - ribonukleinska kiselina (*engl. Ribonucleic acid*)

ROU - rekurentne oralne ulceracije (*Recurrent oral ulcerations*)

SCC - oralni karcinom skvamoznih ćelija (*Oral squamous cell carcinoma*)

SJS - Stiven-Džonsonovim sindromom (*Stevens-Johnson syndrome*)

SLE - sistemski lupus eritematosus (*Systemic Lupus Erythematosus*)

TB - tuberkuloza (*Tuberculosis*)

TMZ – temporomandibularni zglob

TNF- α - faktora nekroze tumora (*engl. Tumor necrosis factor-alpha*)

UC - ulcerozni kolitis (*Colitis ulcerosa*)

γ/δ - gama/delta T limfociti (*Gamma/delta T-lymphocytes*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 REKURENTNE AFTOZNE ULCERACIJE	1
1.1.1 Definicija, istorijat i epidemiologija rekurentnih aftoznih ulceracija	1
1.1.2 Klinička slika i klasifikacija rekurentnih aftoznih ulceracija.....	4
1.1.3 Serologija rekurentnih aftoznih ulceracija	5
1.1.4 Efektorske ćelije koje učestvuju u inflamatornim procesima RAU	6
Neutrofili	6
Makrofagi	6
Mast ćelije	7
Gama/delta T limfociti	7
1.1.5. Citokini i RAU	8
1.1.6. Postavljanje dijagnoze i dijagnostički kriterijumi	9
1.1.7. Patohistologija RAU	10
Regija ulceracije.....	10
Regija uz ulceraciju.....	11
1.1.8. Imunohistopatologija RAU	11
1.1.9. Bol i kvalitet života pacijenata sa RAU	13
1.2. BEHČETOVA BOLEST.....	14
1.3. REKURENTNE ORALNE ULCERACIJE U SKLOPU SISTEMSKIH OBOLENJA	16
1.3.1. Rekurentne oralne ulceracije i bolesti digestivnog trakta	16
Celijačna bolest	16
Kronova bolest	17
Ulcerozni kolitis	18
1.3.2. Rekurentne oralne ulceracije i bolesti vezivnog tkiva	19
Sistemski lupus eritematosus	19
Rajterov sindrom	20
1.3.3. Rekurentne oralne ulceracije i kožne bolesti.....	21
Lihen planus	21
Pemfigus vulgaris.....	22
Pemfigoid mukoze oris	22
Eritema eksudativum multiforme.....	23
Epidermolizis buloza.....	24
Dermatitis Herpetiformis Dering	25
1.3.4. Rekurentne oralne ulceracije i bolesti krvi.....	26
1.3.5. Oralne ulceracije kao posledica hormonskih promena	27
1.3.6. Rekurentne oralne ulceracije kao posledica infekcije	27
Infekcije prouzrokovane virusima.....	27
Infekcije prouzrokovane bakterijama i parazitima.....	29
Tuberkuloza.....	30
Infekcije prouzrokovane gljivicama.....	30
1.3.7. Oralne ulceracije kao posledica neželjenog dejstva medikamenata.....	31
1.3.8. Oralne ulceracije i pušenje	31
1.3.9. Oralne ulceracije i stres	32
1.3.10. Uloga drugih sistemskih faktora u etiologiji oralnih ulceracija.....	32
1.4. ORALNE ULCERACIJE U SKLOPU LOKALNIH OŠTEĆENJA	33
1.4.1. Oralne ulceracije kao posledica traume	33
Eozinofilni ulcer.....	33

1.4.2.	Oralne ulceracije kao posledica hemijskih oštećenja.....	34
1.4.3.	Oralne ulceracije kao posledica termičkih oštećenja.....	34
1.5.	REKURENTNE ORALNE ULCERACIJE I NEOPLAZME.....	35
1.5.1.	Rekurentne oralne ulceracije kao posledica neželjenog dejstva terapije u pacijenata obolelih od maligniteta.....	35
1.5.2.	Rekurentne oralne ulceracije i oralni kanceri.....	35
	Oralni karcinom skvamoznih ćelija.....	36
1.6.	ULOGA PROTEINA HRANE U ETIOLOGIJI REKURENTNIH ORALNIH ULCERACIJA.....	37
1.6.1.	Uloga glutena u etiologiji oralnih ulceracija.....	38
1.6.2.	Uloga proteina kravljeg mleka u etiologiji oralnih ulceracija.....	39
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	40
3.	PACIJENTI, MATERIJAL I METODE.....	41
3.1	IZBOR PACIJENATA.....	41
3.2	METODE.....	42
3.2.1	Kliničko ispitivanje.....	42
	Istraživački karton.....	44
3.2.2	Laboratorijski testovi.....	50
3.2.2.1	Određivanje humoralne imunoreaktivnosti na proteine hrane ELISA testom (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	51
3.2.2.2	Određivanje ćelijske imunoreaktivnosti na proteine hrane - Tetrazolijumski esej u mikrokulturi (Microculture Tetrazolium Assay – MTA).....	57
	3.2.2.2.1. Tetrazolijumske soli i produkcija formazana.....	58
	3.2.2.2.2. MTT test - protokol.....	58
3.3.	STATISTIČKA METODOLOGIJA.....	61
4.	REZULTATI.....	62
4.1	KLINIČKO ISTRAŽIVANJE.....	64
4.1.1.	Prvo pojavljivanje rekurentnih oralnih ulceracija.....	64
4.1.2.	Dužina trajanja rekurentnih oralnih ulceracija.....	65
4.1.3.	Učestalost recidiva rekurentnih oralnih ulceracija.....	65
4.1.4.	Pušenje kao loša navika.....	66
4.1.5.	Lokalizacija rekurentnih oralnih ulceracija.....	68
4.1.6.	Veličina rekurentnih oralnih ulceracija.....	73
4.1.7.	Broj rekurentnih oralnih ulceracija.....	74
4.2	HUMORALNA IMUNOREAKTIVNOST NA PROTEINE HRANE.....	75
4.2.1	Humoralna imunoreaktivnost na gliadin.....	75
4.2.2	Humoralna imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka.....	77
4.2.3	Humoralna imunoreaktivnost na specifične proteine kravljeg mleka.....	82
	4.2.3.1 Humoralna imunoreaktivnost na α -kazein.....	82
	4.2.3.2 Humoralna imunoreaktivnost na β -kazein.....	86
	4.2.3.3 Humoralna imunoreaktivnost na κ -kazein.....	90
	4.2.3.4 Humoralna imunoreaktivnost na α -lactalbumin.....	94
	4.2.3.5 Humoralna imunoreaktivnost na laktoferin.....	96
	4.2.3.6 Humoralna imunoreaktivnost na β -laktoglobulin A.....	98
	4.2.3.7 Humoralna imunoreaktivnost na β -laktoglobulin B.....	99
4.2.4	Analiza humoralne imunoreaktivnosti na specifične proteine kravljeg mleka.....	101
4.3	ĆELIJSKA IMUNOREAKTIVNOST NA PROTEINE HRANE.....	103

4.3.1	Ćelijska imunoreaktivnost na gliadin.....	103
4.3.2	Ćelijska imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka.....	105
4.3.3	Ćelijska imunoreaktivnost na BSA	107
5.	DISKUSIJA.....	108
5.1	Epidemiologija rekurentnih oralnih ulceracija.....	108
5.2	Klinički nalaz rekurentnih oralnih ulceracija.....	111
5.3	Rekurentne oralne ulceracije i pušenje.....	112
5.4	Proteini hrane u etiologiji obolenja.....	113
5.4.1	Imunoreaktivnost na gluten.....	117
5.4.2	Imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka.....	118
5.5	Uticaj termičke obrade mleka na antigenost proteina.....	127
5.6	Efekti dijetе kod pacijenata sa imunoreaktivnošću na proteine hrane.....	128
6.	ZAKLJUČCI.....	131
7.	LITERATURA.....	133

1. UVOD

Rekurentne oralne ulceracije (*Recurrent oral ulcerations*, ROU) se svrstavaju u najčešće promene na oralnoj sluzokoži (1, 2). Mogu se pojaviti u sklopu mnogih sistemskih i lokalnih obolenja. ROU se javljaju kao: rekurentne aftozne lezije; Behçetov sindrom (*Behçet's syndrome*); u sklopu sistemskih obolenja (bolesti digestivnog trakta (*Crohn's disease*, *Coeliacia*, *Ulcerative colitis*), bolesti vezivnog tkiva (*Lupus Erythematodes*, *Reiter's Syndrome*), kožnih bolesti (*Lichen planus*, *Pemphigus vulgaris*, *Pemphigoid mucosae oris*, *Erythema exsudativum multiforme*, *Epidermolysis bullosa*, *Dermatitis Herpetiformis Duhring*), bolesti krvi (*Leukopenia*, *Leukemia*, *Anemia*), hormonskih promena, infekcije, neželjenog dejstva lekova, pušenja, stresa i izmenjenog imunog odgovora domaćina); u sklopu lokalnih oštećenja oralne sluzokože (trauma, hemijska oštećenja i termička oštećenja); neoplazmi, hemio i zračne terapije.

1.1. REKURENTNE AFTOZNE ULCERACIJE

1.1.1. Definicija, istorijat i epidemiologija rekurentnih aftoznih ulceracija

Rekurentne aftozne ulceracije (*Recurrent aphthous ulcerations*; RAU) predstavljaju inflamatorne procese, nepoznate etiologije, koje karakteriše prisustvo bolnih, rekurentnih, pojedinačnih ili multiplih ulceracija na sluznici (3).

Grčki termin *aphtai* je prvobitno korišten za opis promena na oralnoj sluznici, a prvi put ga je upotrebio Hipokrat (460-370 pre n.e.) (4). U svojoj trećoj knjizi „*Epidimion*“, grčki filozof sa ostrva Kos, Hipokrat, je opisao bolest sa simptomima, koji odgovaraju simptomima Behçetove bolesti (*engl. Adamantiades-Behçet disease*; ABD): „Mnogi pacijenti su imali aftozne ulceracije u ustima. Na genitalijama su se nalazili purulentni ulceri, kao i furunkuli, spoljašnji i unutrašnji, kao i na preponama.

Postojala je vodnjikava inflamacija oka, koja je bila hronična i bolna, kao i izraštaji na očnim kapcima, spoljašnji i unutrašnji, koji su narušili vid mnogim pacijentima.

U mnogih pacijenata su se javljale i brojne *ecthymate* (gnojni ulkusi kože, prouzrokovani beta hemolitičkim Streptokokom grupe A (*engl. beta-hemolytic streptococc group A*)) kao i herpetične lezije (5).

Grčki oftalmolog, *Benediktos Adamantiades* (1875-1965.) je 1930. opisao nalaz osamnaestogodišnjeg pacijenta, po prvi put zajedno grupišući simptome, koji se javljaju na očima, afte u ustima i ulkuse na genitalijama, kao simptome pojedinačnog kliničkog entiteta. Kasnije je dodao vaskularne simptome kao četvrti, kardinalni simptom. U revijskom radu je dao prvu klasifikaciju bolesti, opisujući očne, mukokutane i sistemske forme bolesti (6). Glavni simptom bolesti je po *Adamantiadesu* bio hipopion (*hypopyon*), koji je nestajao u različitim intervalima, prouzrokujući manja ili veća oštećenja, završavajući se slepilom (5).

Hulûsi Behçet (1889-1948.), turski dermatolog, prvi je opisao, 1937., pacijenta sa rekurentnim lezijama usta, genitalija i očiju, dodajući "katalog" simptoma, koji je obuhvatao i periodontitis, ciste vilica, promene na koži u vidu akni, eritemu nodosum (*erythemum nodosum*) i artralgiju (*arthralgia*). *Behçet-ov* intenzivan rad na ovoj bolesti i njegovo ubeđenje da je bolest autoimunog karaktera, konačno je rezultirala sklapanjem kliničke slike iste.

Pariski dermatolog, *A. Tournaine* je 1941. opisao 274 slučaja "neinfektivne aftozne bolesti", koju je nazvao "*Aphthosé généralisée*" ili "*grande aphthosé*".

U *Heidelberg-u*, u Nemačkoj, *L. Blüthe* je dokumentovao kompletan kompleks simptoma još davne 1908. Do 1940. mnogi autori su prezentovali različite kliničke slučajeve. U periodu od 1974-1984. u Nemačkoj se obnovila zainteresovanost za ovu bolest, a bila je izazvana radom dva dermatologa, *D. Djawari-a* i *O.P. Hornstein-a*. Oni su otkrili povećanu hemotaksu neutrofila i identifikovali limfo-citotoksičnost protiv autologih ćelija u oralnoj sluzokoži. U proteklih 20 godina brojne istraživačke grupe u Nemačkoj, naročito one okupljene oko *M. Zierhut-a* i *I. Kötter-a* u *Tübingenu*, publikovale su brojne radove o Behçetovoj bolesti (7).

RAU se javljaju, kako kod osoba muškog, tako i kod osoba ženskog pola, podjednako su zastupljene u svim rasama i ne povezuju se sa određenom geografskom

pripadnošću. Dokazano je da se najmanje jedna od pet individua, barem jednom u životu susreće sa problemom aftoznih ulceracija (3).

Rekurentne aftozne ulceracije se, po nekim istraživanjima, javljaju u 5-66% individua unutar jedne populacije, sve u zavisnosti od karakteristika oformljene ispitivane grupe. *Pongissawaranum i Leohapand* (1991.) navode da su RAU učestalije u ženskoj populaciji (8), dok *Field* (1992.) navodi da ženska deca mogu imati veću predispoziciju za nastanak RAU (9).

U populaciji odraslih, u 60-85% slučajeva, prva ulceracija na oralnoj sluznici se javlja obično pre tridesete godine (10).

RAU se manje javljaju kod Beduinskih Arapa (11), dok su naročito česte u Severnoj Americi i zapadnim zemljama (12). U Škotskoj, u populaciji odraslih, starijih od pedeset godina, zapažena je manja učestalost aftoznih ulceracija u osoba muškog, ali ne i u osoba ženskog pola (13). *Axell* (1976.) je utvrdio da sa godinama ispitanika opada učestalost aftoznih ulceracija, u oba pola, u Švedskoj populaciji (14).

Oko 1% dece u razvijenim zemljama može imati rekurentne aftozne ulceracije (15), ali kod 40% od pomenute dece, aftozne ulceracije se javljaju još pre pete godine života, da bi sa godinama broj pacijenata rastao (16). Kod dece iz porodica, koje pripadaju višem socio – ekonomskom staležu, RAU se mnogo češće javljaju u poređenju sa decom, koja pripadaju nižim socio – ekonomskim grupacijama (17).

Visoka zastupljenost aftoznih ulceracija je uočena u populaciji studenata, koji potiču iz porodica, koje su dobro materijalno stituirane (18).

Pacijenti sa RAU mogu imati pozitivnu porodičnu anamnezu, u više od 40% slučajeva (13). Osobe, koje imaju člana porodice sa RAU, mogu ih dobiti u ranijim godinama i sa ozbiljnijom simptomatologijom, češće od pacijenata koji nemaju pozitivnu porodičnu anamnezu (18). Mogućnost da braća i sestre dobiju RAU zavisi od toga da li jedan ili oba roditelja imaju RAU (19), jer kod dece, čija oba roditelja imaju RAU, raste rizik da ih i ona sama dobiju (67-90%) (18). Učestalost RAU se povećava u slučajevima blizanaca (18).

Genetički faktori se navode u brojnim studijama koje govore o povezanosti RAU i subtipova genetički determinisanog humanog leukocitnog antigena (*engl. genetically determined human leucocyte antigen; HLA*). Utvrđena je povećana učestalost HLA2 (20), B12 (21, 22), B51 i Cw7 u Jevreja (23), DR2 (21, 24) i DR4 u Turaka (24), DR5

i A28 u Grka (25), DR7 i MT3 u naroda Sicilije (26) i DRw9 u naroda Kine (27). Nema povezanosti RAU sa HLA-B5 u Sicilijanaca (26) i DR4 u Grka (25).

Neki od istraživača su proučavali udruženost (24, 26, 28, 29) ili odsustvo povezanosti između RAU i partikula HLA antigena. Ove pojave mogu biti objašnjene različitom etničkom strukturom ili multiplim etiološkim faktorima, odgovornim za nastanak RAU. Pomenuti radovi navode na zaključak da je izvesno da RAU imaju genetičku osnovu, barem kod pojedinih osoba.

1.1.2. Klinička slika i klasifikacija rekurentnih aftoznih ulceracija

Jedan od najčešćih oblika ROU su afte. Prema kliničkoj slici afte možemo svrstati na:

- afte minor (*Aphthae minor*; MiRAS),
- afte major (*Aphthae major*, *Periadenitis mucosa necroticans*; MARAS),
- herpetiformne afte (*Aphthe herpetiformis*) i
- rekurentni aftozni stomatitis (*Recurrent aphthous stomatitis*; RAS) (1).

Afte se najčešće javljaju u formi minornih aftoznih ulceracija (75-85%). Afte minor su povratne, ovalne ulceracije sa inflamatornim haloom. One su 2-4mm u promeru, ne javljaju se na gingivi, tvrdom nepcu ili dorzumu jezika. Zarastaju u periodu od 7-14 dana, bez ožiljka. Lezije se mogu periodično javljati, mada se kod najvećeg broja pacijenata javljaju 2-4 puta godišnje (30). U slučajevima kada u usnoj duplji postoji više od jedne aftozne lezije govorimo o rekurentnom aftoznom stomatitisu (*Recurrent aphthous stomatitis*; RAS).

Afte major su povratne, ovalne ulceracije, koje se javljaju kod manjeg broja pacijenata (10-15%). Pojava ovakvih ulceracija je praćena bolom, otežanom ishranom, a u nekim slučajevima i povišenom telesnom temperaturom i groznicom. Veće su od 1cm u prečniku, mogu se javiti i na sluzokoži, koja orožava (dorzum

jezika), ali i na onoj, koja ne orožava (meko nepce). Najčešće se javljaju na bukalnoj sluzokoži, usnama i mekom nepcu. Traju više od mesec dana i zarastaju ožiljkom.

Herpetiformne afte su najređe (5-10%) (30). Karakterišu ih milijarne ulceracije, koje podsećaju na herpetični stomatitis. Međutim, nije ih teško razlikovati od herpetičnog stomatitisa, jer kod njihove pojave izostaje prodromalni stadijum, kataralni gingivitis i limfadenit (31). Herpetiformne afte se javljaju u vidu tačkastih, multipnih ulceracija, koje mogu da konfluiraju u ulceracije nepravilnog oblika. Najčešće se javljaju na ventralnoj strani jezika.

1.1.3. Serologija rekurentnih aftoznih ulceracija

U pacijenata sa aftoznim ulceracijama prisutne su i promene u serumu. Povišena koncentracija serumskih imunoglobulina, IgA, IgG, IgD i IgE, zabeležena je u nekim grupama pacijenata sa RAU (32, 33, 34). Neki pacijenti sa RAU imaju fiziološku ili redukovanu koncentraciju serumskog IgG, IgM i IgA (22, 35, 36). *Porter* i saradnici (1992.) (37) su u studiji, koja je obuhvatala 71 pacijenta sa RAU, objavili podatak da nije bilo značajnih promena u nivoima serumskog IgG₁, IgG₂, IgG₃ ili IgG₄. *Vicente* i saradnici (1996.) (38) su zabeležili snižen nivo serumskog IgG₂ tokom „tihog” perioda bolesti. Prisustvo povišenog nivoa anti-endotelijalnih auto-antitela (*engl. anti-endothelial cell autoantibodies; AECAs*) podupire hipotezu da se u pojedinim slučajevima RAU radi o vaskularnim procesima (39). Cirkulišući imuni kompleksi (*engl. Immune complexes in circulation, CIC*) (21, 40) su evidentirani u nekih pacijenata sa RAU. Imuni kompleksi nisu dovoljno pouzdano registrovani u pacijenata sa minornim RAU (35). Serumski nivo C9 i β2 mikroglobulina zabeleženi su kao povišeni u nekih pacijenata, što može predstavljati nespecifičnu, akutnu fazu odgovora (10).

1.1.4. Efektorske ćelije koje učestvuju u inflamatornim procesima RAU

Neutrofili (*Neutrophils*)

Mada je hemotaktička funkcija neutrofila normalna u pacijenata sa RAU (41, 42), njihova koncentracija u ulcerativnoj regiji, navodi na zaključak da oni mogu igrati aktivnu ulogu u patogenezi i/ili u lečenju RAU. Utvrđena je ista produkcija kiseoničnih radikala od strane neutrofila, u pacijenata sa RAU i u osoba iz kontrolne grupe (43), kao i to da im ne nedostaje fagocitarna funkcija (44). Brzo zarastanje afti u pacijenata, koji primaju faktor stimulacije granulocitne loze (*engl. granulocyte-colony stimulating factor*; G-CSF) (45) i klinički odgovor na slične načine lečenja pacijenata sa cikličnom neutropenijom (*engl. cyclic neutropenia*), ukazuje da neutrofili igraju važnu ulogu u zarastanju rekurentnih afti. Humani neutrofilni tip matriks metaloproteinaze-8 (*engl. human neutrophil-type matrix metalloproteinase-8*; MMP-8), registrovan je intracelularno u ulcerativnoj regiji i ekstracelularno u regiji membrane, lateralno od ulcera (46) i to ukazuje na mogućnost, da su neutrofili koji sadrže MMP-8 uključeni u destrukciju tkiva u aftama. Tačna uloga neutrofila u patogenezi zarastanja rekurentnih afti još uvek nije poznata i preostaje da se definiše.

Makrofage (*Macrophages*)

Iako makrofage verovatno učestvuju u svakom stadijumu inflamatornih procesa, oni još nisu adekvatno proučeni, da bi se utvrdila njihova tačna uloga u patogenezi RAU. *Schröder* i saradnici (1984.) (47) u histopatološkoj studiji RAU, spominju prisustvo brojnih makrofaga sa fagolizozomima, koji sadrže ostatke neutrofilnih granulocita. Navodi se da je najčešća uloga makrofaga da „očisti“ tkivo od neutrofilnih ostataka. Rezultati *Häyrynen-Immonen-a* i saradnika (1991.) (48), ukazuju da CD11b- i nespecifični esteraza pozitivni, zreli tkivni makrofagi (*engl. nonspecific esterase-positive mature tissue macrophages*), čine oko 14% svih inflamatornih ćelija u RAU lezijama, sa povišenom učestalošću oko periferije infiltrata limfoidnih ćelija.

Mast ćelije

Mast ćelije (*engl. Mast cells; MCs*) imaju sposobnost da proizvode brojne medijatore (49) i smatraju se važnim činiocima inflamatornog odgovora u RAU. *Dolby* i *Allison* (1969.) (50) u svojoj histopatološkoj studiji navode da se MCs broj u prva dva dana lezije, ne razlikuje od broja MCs u normalnoj obraznoj sluzokoži, ali da u lezija koje traju duže od 48 h, dolazi do redukcije broja MCs za 50%. Suprotno ovim navodima, u studiji *Lehnera* (1969.) (51) (toluidin plavim bojenjem) zabeležen je povišen broj MCs-a, u sva tri tipa RAU (minor, major i herpetiformne) i u oralnim aftama, udruženim sa Behčetrovom bolešću. Povećanje broja MCs je registrovano u kožnim lezijama i oralnim aftama pacijenata sa aktivnom formom Behčetrove bolesti (*engl. Behçet's disease; BD*) (52). Koristeći mnogo senzitivnije markere za detekciju MCs, utvrđeno je da su MCs za 63% brojniji u pacijenata sa RAU, nego u zdravoj sluzokoži i da MCs pokazuju znake aktivacije/degranulacije, nagoveštavajući aktivnu ulogu u patogenezi RAU (53).

Gama/delta T limfociti

Gama/delta T limfociti (*Gamma/delta T-lymphocytes; γ/δ*) imaju sposobnost da prepoznaju ne-peptidne molekule (*engl. non-peptide molecules*) najčešće udružene sa mikroorganizmima i ćelijama u stresu (54). Prepoznavanje ovih antigena od strane γ/δ T ćelija uključuje receptore antigena, ali ne zahteva obradu antigena, antigen prezentujuće ćelije ili glavni lokus histokompatibilnosti (*engl. Major Histocompatibility Complex; MHC*) genskih produkata. Gama/delta T ćelije su uglavnom lokalizovane u epitelijalnim tkivima, kao što su koža, sluzokože i pluća (55), ali su identifikovane, mada retko u normalnom, humanom, oralnom epitelu (56, 57, 58). Populacija γ/δ T ćelija čini 5% od cirkulišućih T ćelija i češća je u perifernoj krvi pacijenata sa RAU ili BD, naročito tokom aktivne faze bolesti (59, 60). *Hasan* i saradnici (1996.) (61) su pokazali da γ/δ T ćelije pacijenata sa muko-kutanom BD, imaju specifični, proliferativni odgovor na četiri peptida, dobijena od mikrobnog 65-kDa hit šok proteina (*engl. 65-kDa microbial heat shock protein*).



Faktori rasta keratinocita (*engl. Keratinocyte growth factors*), kao što je epitelijalni ćelijsko - specifični faktor rasta fibroblasta-7 (*engl. epithelial cell-specific fibroblast growth factor-7; FGF-7*), proizveden od strane γ/δ T ćelija, može igrati ulogu u zarastanju epitela, koji je oštećen infekcijom ili inflamacijom, podstičući rast ćelija i ponovo obnavljajući integritet tkiva (62, 63, 64). Studija *Jones-Carson-a* i saradnika (1995.) (65), ukazuje na to da γ/δ T ćelije, koje oblažu oro-gastrični trakt, mogu stimulisati produkciju azotnog oksida (*engl. nitric oxide; NO*) od strane susednih epitelijalnih ćelija. Kao gasoviti, slobodni radikal, NO može poslužiti kao fiziološki, citoprotektivni agens sluzokože (66). Međutim, NO sam ili nakon reakcije sa superoksidom, oslobođenim od strane fagocita (67, 68), može dovesti do epitelijalne autotoksičnosti (69) i mogućeg stvaranja ulceracije. Studija *Nataha* i saradnika (2000.) (56) ne daje odgovor, koji objašnjava funkciju γ/δ T limfocita u lezijama RAU, sugerirajući da pomenuti limfociti mogu imati patogenetsku i/ili regulatornu ulogu u aftoznim ulceracijama.

1.1.5. Citokini i RAU

U toku faze egzacerbacije, u pacijenata sa RAU zabeležen je visok nivo IL-2 u plazmi i povišena ekspresija IL-2 receptora od strane aktiviranih, perifernih limfocita (70).

Registrovano je da gama/delta T ćelije u pacijenata sa RAU proizvode interferon γ (*engl. Interferon-gamma; IFN- γ*), kada su indukovane mitogenom stimulacijom da proliferišu (66).

Povećano oslobađanje faktora nekroze tumora (*engl. Tumor necrosis factor-alpha; TNF- α*) od strane monocita periferne krvi, takođe je evidentirano u pacijenata sa RAU (71). Studija *Buno-a* i saradnika (1998.) (72) ukazuje na nizak nivo informacione ribonukleinske kiseline (*engl. messenger ribonucleic acid; mRNA*) za interleukin-10 (*engl. Interleukin-10; IL-10*) u mukozama bez lezija, pacijenata sa RAU. Autori registruju i visok nivo mRNA pro-inflamatornih citokina (*engl. pro-inflammatory cytokines*) IL-2, IFN- γ i TNF- α u lezijama sluzokože pacijenata sa RAU ali i u sluzokoži bez lezija. Ovi rezultati se delimično podudaraju sa rezultatima studije *Nataha* i saradnika (2000.) (56) u kojoj je demonstrirano da su RAU lezije karakteristične po visokoj ekspresiji TNF- α . Ova ekspresija se dešava u inflamatornim

ćelijama, mast ćelijama i vaskularnim endotelijalnim ćelijama (*engl. vascular endothelial cells*). Međutim, relativna važnost uloge citotoksičnosti u odnosu na otpuštanje citokina u posredovanoj smrti epitelijalnih ćelija i aftoznim ulceracijama, je još uvek nepoznata.

1.1.6. Postavljanje dijagnoze i dijagnostički kriterijumi

U odsustvu definitivnog etiološkog ili dijagnostičkog testa za RAU, njihova identifikacija u kliničkoj praksi se zasniva na kombinaciji anamneze, kliničkih karakteristika i histopatologije.

Dijagnostika primarnih RAU, minor tipa (idiopatskih) ili sekundarnih RAU, minor tipa (koje se javljaju u sklopu sistemskih bolesti) se može uspostaviti, ukoliko uslovi ispunjavaju četiri „velika“ kriterijuma (koji su neophodni za dijagnostiku RAU, minor tipa), dodajući najmanje jedan „mali“ (dopunjujući) kriterijum (3).

„Veliki“ (*major*) kriterijumi za prepoznavanje i dijagnostiku RAU, minor tipa:

1. spoljašnji izgled (jedna ili više okruglo/ovalnih ulceracija, nikada u vidu vezikula (*engl. vesicles*), imaju marginu, žuto-sivu bazu, oivičenu tankim eritematoznim haloom, različite veličine, ali manje od 1 cm u prečniku),
2. rekurentnost (najmanje tri epizode RAU, u toku tri protekle godine, s' tim da rekurentnost ne „napada“ istu stranu),
3. mehanička hiperalgezija (*engl. mechanical hyperalgesia*) (bolne lezije, pri čemu se bol javlja prilikom pomeranja regije zahvaćene ulceracijom) i
4. „samo-ograničenje uslova“ (ulceri zarastaju spontano bez posledica, sa ili bez tretmana).

„Mali“ (*minor*) kriterijumi za prepoznavanje i dijagnostiku RAU, minor tipa:

1. familijarna RAU istorija (prisutna pozitivna familijarna RAU istorija),

2. godine pacijenta prilikom prve pojave RAU (prva pojava RAU pre 40-te godine pacijenta),
3. lokalizacija ulceracije (javljaju se na ne-keratinizovanoj oralnoj sluzokoži),
4. trajanje lezije (od dva dana do dve nedelje),
5. model, šema rekurentnosti (iregularna),
6. histološki pregled (pokazuje nespecifično zapaljenje),
7. prisustvo precipitirajućih faktora (pojavi RAU prethode, kao okidači: hormonske promene, izloženost određenoj vrsti hrane ili lekova, povremene infekcije, stres i lokalizovana trauma),
8. prisustvo deficijencije hematina (laboratorijska ispitivanja mogu potvrditi udruženost sa deficijencijom hematina, naročito deficijencija feritina, folata, gvožđa, vitamina B i cinka),
9. negativna udruženost sa pušenjem (RAU pacijenti su najčešće nepušači ili se RAU javljaju nakon prestanka pušenja),
10. terapijska, klinička ispitivanja sa gluko-kortikosteroidima (pozitivan odgovor na tretmane sa lokalnim ili sistemskim steroidima).

1.1.7. Patohistologija RAU

U patohistološkom nalazu, posmatra se posebno region ulceracije, a posebno region uz ulceraciju.

Regija ulceracije

Na materijalu uzetom u regiji ulceracije, zapaža se površinsko, nekrotično tkivo, sa fibrino-purulentnim eksudatom. On se sastoji od zgrušanog fibrina i eritrocita i koji formira hemoragične fokuse. Neutrofili i ostatci ćelija prekrivaju nekrotično područje.

Uzeti materijal prožimaju brojni intraepitelijalni limfociti i nešto neutrofila (73). Neutrofili su predominantni u neposrednoj regiji ulceracije (51, 74-76).

Regija uz ulceraciju

Regija pored ulceracije se definiše kao „epitelom pokrivena“ regija i prostire se od ivice ulceracije, pa sve bočno do periferije biopsije. Postoji intenzivna infiltracija leukocitima, sa predominacijom limfocita u ne-ulcerativnoj regiji, gde oni nadmašuju broj neutrofila (48, 75). Monociti/makrofage su takođe brojni u okolnom tkivu, lateralno (bočno) od ulceracije. Gustina mast ćelija raste u lamini proprie (47, 51, 53). Limfociti u RAU lezijama su primarno T limfociti, a samo 5-12% od svih ćelija u leziji su B ćelije (48). Mali procenat plazma ćelija i eozinofila se može pronaći mnogo češće u starijim lezijama (51). Dilatacija krvnih sudova je konstantna i zapažena u RAU lezijama i predstavlja fokuse perivaskularnih, mononuklearnih ćelijskih infiltrata (*engl. perivascular mononuclear cell infiltrates*) (47, 51).

1.1.8. Imunohistopatologija RAU

Utvrđeno je da se ekspresija obe klase MHC antigena javlja na epitelijalnim, bazalnim ćelijama u preulcerativnim lezijama, difuznije u epitelu, koji je u stadijumu ulceracije, u skladu sa aktivnom, ćelijski posredovanom inflamacijom (77, 78). Studije, sprovedene u *in vitro* uslovima, su pokazale da su limfociti periferne krvi, pacijenata koji boluju od RAU, citotoksični za oralne, epitelijalne ćelije (79, 80), što nije potvrđeno u drugim studijama (81-83). Pacijenti sa RAU imaju značajno povećanu od antitela zavisnu ćelijsku citotoksičnu aktivnost (*engl. antibody-dependet cellular cytotoxic activity; ADCC*) u ranoj fazi bolesti (84). Registrovano je da su ADCC vrednosti, kao one koje procenjuju efektorsku funkciju polimorfonuklearnih neutrofila, više tokom akutne faze RAU u poređenju sa vrednostima koje su utvrđene kod kontrolnih osoba (85).



Imunofluorescencijom je registrovano da postoje depoziti IgG, IgM, IgA i C₃ u i duž krvnih sudova mukoze i u citoplazmi ćelija stratuma spinozuma (*stratuma spinosuma*) u aftoznim lezijama, pacijenata sa RAU i Behčetovom bolešću (22, 51, 86). Više istraživača je zabeležilo pad u broju cirkulišućih CD4⁺ ćelija, zatim normalni ili smanjeni broj CD8⁺ ćelija i normalni ili blago redukovani CD4/CD8 odnos u pacijenata sa RAU (85, 87-89). Upoređivanjem nivoa CD8 kod *major* i *minor* tipova RAU, dolazi se do zaključka da su CD8⁺ ćelije uobičajenije u *major* nego u *minor* tipu afti. Odnos CD4⁺/CD8⁺ u *major* tipu afti je bio niži u odnosu na *minor* tip (90). U oralnoj mukozi, povišen je procenat CD4⁺ limfocita u ulcerativnim lezijama (48) i postotak CD8⁺ ćelija na strani lezije (91).

Studije na perifernim NK ćelijama, ćelijama prirodnim ubicama (*engl. Natural killer cells*; NK-cells) u pacijenata sa RAU su dobijale različite rezultate, s'obzirom da su saopšteni procenti NK ćelija u pacijenata sa RAU, bili ili povećani (92) ili slični kontrolama (88, 89). Rezultati studije *Sun-a* i saradnika (1991.) (93) ukazuju da je u pacijenata sa RAU, *major* tipa, aktivnost NK ćelija povišena u toku aktivnih oralnih lezija, opada tokom perioda ozdravljenja i postaje normalna u toku perioda remisije. Suprotno rezultatima studije *Sun-a* i saradnika (93), rezultati studije *Sistig-a* i saradnika (2001.) (85) navode da se značajno opadanje aktivnosti NK ćelija zapaža u pacijenata sa RAU, u poređenju sa osobama iz kontrolne grupe, u akutnoj fazi, ali isto tako i tokom perioda remisije ovih pacijenata.

Kod pacijenata sa oralnim ulceracijama i inflamacijom, formacija perivaskularnih limfocitnih infiltrata je najverovatnije delimično posredovana vezivanjem endotelijalnog intracelularnog adhezionog molekula-1 (*engl. endothelial intercellular adhesion molecule-1*; ICAM-1) i limfocitnog funkcionalnog-antigena-3 (*engl. lymphocyte function-antigen-3*; LFA-3) za njihove ligande, tj. limfocitni funkcionalni-antigen-1 (*engl. lymphocyte function-antigen-1*; LFA-1) i CD-2 na limfocitima. (94, 95). ICAM-1 se ispoljava u epitelu i submukoznim kapilarima i venulama, što sugerise da može podržati atheziju T ćelija i kontrolisati put leukocita u submukozu i epitel (74, 78, 94, 96), dok je moguće da su LFA-3 i njegov duplikat, ligand CD-2, uključeni u aktivaciju T ćelija, u pacijenata sa RAU (94). Povišen broj CD1⁺ Langerhansovih ćelija (*engl. Langerhans cells*) je utvrđen u epitelu i lamini propriji (*lamini proprii*) u pacijenata sa Behčetovom bolešću i RAU (77, 97). Osim toga, utvrđeno je da je u subepitelijalnom delu RAU lezija povećana razmera (98, 99) i broj

(98) faktora XIIIa+ dendrocita, dendritičnih ćelija, koji je po svemu sudeći uključen u regulatornu funkciju (100) i/ili u obradu antigena u subepitelijalnom, vezivnom tkivu (101, 102) RAU lezija.

1.1.9. Bol i kvalitet života pacijenata sa RAU

Bol je neprijatan osećaj i emocionalno iskustvo udruženo sa aktuelnom ili mogućom destrukcijom tkiva (103).

RAU karakterišu nekrotišuće, perzistirajuće ulceracije oralne sluzokože, koje se nanovo javljaju kroz određen period vremena. Bolne ulceracije mogu onemogućavati pacijente da vrše svoje uobičajene dnevne aktivnosti. Lezije se najčešće javljaju na pokretnoj mukozni, a frekvencija njihovog javljanja može biti, od jedan do dva puta godišnje, pa sve do više ili manje kontinuiranih grupa lezija, koje izazivaju popriličan diskomfort, često bol sa poteškoćama prilikom ishrane i govora i „smanjeni kvalitet života“ (*engl. decreased quality of life; QOL*) (104).

„Kvalitet života“ je relativno novi koncept u kategorizaciji zdravlja. Podrazumeva procenu uloge bolesti na fizičko, psihološko i socijalno funkcionisanje (105). Uticaj RAU na QOL još nije proučen, ali klinička iskustva ostavljaju utisak da RAU prouzrokuju veliku patnju u pacijenata, koja se svaki put javlja iznova, prilikom svake bolne egzacerbacije aftoznih ulceracija. Zadatak budućih ispitivanja je potreba da se definiše QOL u pacijenata sa aftoznim ulceracijama, kao i da se utvrde egzaktni faktori, koji utiču na QOL u ovih pacijenata.

1.2. BEHČETOVA BOLEST

Behčetova bolest (*engl. Behçet's disease; BD*) je multisistemska obolenje, koje se češće javlja među mladim osobama muškog pola na Mediteranu, Srednjem Istoku i Japanu. Karakteriše je trijas simptoma: minorne aftozne lezije, ulceracije na genitalijama i promene na očima (106). Opisana su četiri klinička tipa:

- sluzokožno - kožni (*mucocutaneous*),
- artritični (*arthritic*),
- neurološki (*neurologic*) i
- očni (*ocular*).

U osnovi, u okviru ove bolesti, mogu postojati gastrointestinalni, vaskularni, plućni, renalni, mišićni i hematološki poremećaji (107).

Kriterijumi za postavljanje dijagnoze Behčetove bolesti su 1990. redefinisani, da obuhvate prisustvo oralnih ulceracija i još bilo koja dva, od navedenih simptoma: genitalne ulceracije, tipične promene na očima (uveitis (*uveitis*), hipopion (*hypopion*) i iridociklitis (*iridocyclitis*)), tipične promene na koži (108). Savetuje se da se pacijentima odrede HLA B5101 i autoantitela na cardiolopin, endotelium, fosfolipide.

Promene na koži mogu obuhvatati eritemu nodozum (*erythema nodosum*), pseudofolikulitis (*pseudofolliculitis*), papulopustularne lezije (*papulopustular lesions*) ili aknama slični čvorovi (*acneiform nodules*) u postadolescenata, koji ne reaguju na terapiju kortikosteroidima (108).

Pacijenti sa aftoznim i genitalnim ulceracijama, mogu predstavljati atipične forme Behčetove bolesti (109) i oni mogu tokom vremena razviti još simptoma karakterističnih za pomenutu bolest (109). Pacijenti demonstriraju povećanu učestalost HLA-Bw51 (110); ukoliko postoji predominacija pretežno simptoma vezanih za sistem vida, sluzokožu - kožu i zglobove, javlja se povećana učestalost HLA-B5, -B12 i -B27 (111). HLA-A2 i -B12 se često ispoljavaju u pacijenata sa oralnim ulceracijama, dok je HLA-B5 češće prisutan u pacijenata van područja Britanije, za razliku od HLA-B12 i -B27, koji je zastupljeniji u Britaniji (111).

Smatra se da imunski posredovani procesi dovode do vaskulitisa, koji je odgovoran za patogenezu Behčetove bolesti. Vaskulitis može prouzrokovati trombozu i na kraju fibrozu i vaskularnu opstrukciju (*vascular compromise*) (106). Studija *Aydintunga* i saradnika (1993.) utvrdila je prisustvo antitela na endotelijalne ćelije u 18,1% pacijenata, gde su povišeni nivoi antitela bili u korelaciji sa bolešću u aktivnoj formi (naročito u slučajevima sa akutnom trombozom i renalnim vaskulitisom) (112).

Za herpes simpleks virus (*Herpes simplex virus*; HSV) i streptokoke (*Streptococci*) se dugo vremena smatralo da igraju važnu ulogu u patogenetskim procesima lezija Behčetove bolesti. Ribonukleinska kiselina (*engl. Ribonucleic acid*; RNA) komplementarna sa HSV, takođe je pronađena u cirkulišućim limfocitima (113). Taj podatak je doveo do ponovnog oživljavanja stanovišta da streptokokna infekcija može igrati ključnu ulogu u patogenezi Behčetove bolesti (114). *Streptococcus sanguis* (*Streptococcus sanguis*) može sadržati kros-reaktivne (*engl. cross – reactive*) determinante hit šok proteina (*engl. heat shock proteins*), čije je prisustvo povezano sa brojnim imunološkim bolestima, kao što je reumatoidni artritis (*rheumatoid arthritis*) (115). Serum nekih pacijenata sa Behčetovom bolešću, sadrži antitela sa molekulskom masom sličnom molekulskoj masi hit šok proteina (115).

Terapiju pacijenata sa Behčetovom bolešću čini tretman steroidima, slično kao u pacijenata sa minornim aftoznim lezijama, lokalizovanim na jednom ili dva područja, kao što su oči i usta (116). Alfa interferon (α -interferon) se pokazao kao efektivan u lečenju aftoznih lezija u ustima (117). Sistemska terapija se sastoji od upotrebe steroida ili od kombinacije steroida i drugih imunosupresivnih i citotoksičnih lekova, kao što su: ciklofosfamid (*cyclophosphamide*), azatioprin (*azathioprine*), hlorambucil (*chlorambucil*), kolhicin (*colchicine*) i levamizol (*levamisole*) (106). Ciklosporin (*cyclosporine*) se pokazao kao dobar, posebno u slučajevima lečenja muko-kutanih i lezija na očima (118).

Firestein i saradnici (1985.), (119) su prvi opisali pet slučajeva pacijenata u kojih su se javljali simptomi Behčetove bolesti i relapsirajućeg polihondritisa (*polychondritis*); kasnije je opisano još trinaest slučajeva (120). Pacijenti sa sindromom, koji je nazvan „*MAGIC syndrome*“, su imali ulceracije u ustima i na genitalijama, kao i zapaljenske promene na hrskavicama.

1.3. REKURENTNE ORALNE ULCERACIJE U SKLOPU SISTEMSKIH OBOLENJA

Oralne ulceracije se mogu javiti u sklopu mnogih, kako sistemskih tako i lokalnih obolenja (31).

1.3.1. Rekurentne oralne ulceracije i bolesti digestivnog trakta

Celijačna bolest

Celijačna bolest (*engl. Celiac disease*) je genetički determinisana, hronična, inflamatorna bolest creva, indukovana glutenom. Epidemiološke studije su pokazale da celijačna bolest pogađa jednog od 250 ljudi. Bolest je povezana sa povećanim nivoom osteoporoza, neplodnosti, autoimunih i malignih bolesti, posebno limfoma. Mehanizam imunog odgovora u celijačnoj bolesti nije sasvim jasan, ali uključuje HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 zavisne T ćelijske imune reakcije u epitelu tankog creva (121).

Za pacijente obolele od celijačne bolesti karakteristično je:

- biopsijom potvrđena, histološki evidentna atrofija vilusa u tankom crevu,
- DQ2 ili DQ8,
- prisustvo anti-endomizijalnih IgA ili IgG antitela u serumu (*antiendomysial IgA or IgG antibodies*),
- prisustvo povišenih koncentracija antitela na tkivnu transglutaminazu,
- malapsorpcija nutritivnih sastojaka u tankom crevu,
- kliničko i histološko poboljšanje nakon rigorozne bezglutenske dijeta,

- klinički relaps nakon ponovnog uvođenja glutena u ishranu pacijenta (122-124).

Učestalost pacijenata sa RAU koji imaju celijačnu bolest, kreće se od 4,0 – 16,7% slučajeva (125, 126).

U studiji *Meini-a* i saradnika (1993.), koja je obuhvatala 113 pacijenata sa celijačnom bolešću, 17,7% pacijenata je imalo RAU i u ovih pacijenata je uočena povećana učestalost HLA-DRw10 i -DQw1 (127). U nekih pacijenata, koji nisu imali promene na crevima, što je potvrđeno biopsijom, došlo je do poboljšanja nakon bezglutenske dijeta (*engl. gluten-free diet*) (128, 129).

Pacijenti sa gluten-senzitivnom enteropatijom mogu pokazati širok spektar znakova i simptoma, karakterističnih za ovu bolest (130). Ova bolest može biti i asimptomatska, što jako otežava rano uspostavljanje dijagnoze, a samim tim i odlaže efekat terapije. Važnost rane dijagnoze celijakije je nepobitna i iz toga razloga, problemu RAU treba pristupiti s'ozbiljnošću, jer se iza ispoljavanja RAU, može kriti celijačna bolest.

Kronova bolest

Kronova bolest (*engl. Crohn's disease*) je inflamatorna, autoimuna bolest, koja se može javiti u bilo kom delu gastrointestinalnog trakta, od usne duplje do anusa, sa širokim spektrom simptoma. Poznata još pod nazivom granulomatozni kolitis (*granulomatous colitis*) i regionalni enteritis (*regional enteritis*). Uzrokuje bol u abdomenu, dijareju (koja može biti sa primesama krvi), povraćanje ili gubitak težine (131). Može izazvati i komplikacije van gastrointestinalnog trakta, kao što su: promene na koži, artritis i zapaljenje oka (131).

U ovih pacijenata se javljaju i promene na oralnoj i labijalnoj sluzokoži. Bukalna sluzokoža je enantematozna i na njoj se mogu uočiti nabori (plike) ili proliferacije, koje mogu ulcerisati primarno ili sekundarno, kao posledica mehaničke iritacije. Usne mogu biti edematozne, indurirane i praćene angularnim heilitisom (*Cheilitis angularis*). Jezik je enantematozan i često obložen (31).

Plauth i saradnici (1991.) ispitujući pacijente sa Kronovom bolešću, došli su do rezultata da su najčešće promene u usnoj duplji ispitanika, upravo RAU sa 29% (132).

Ulcerozni kolitis

Ulcerozni kolitis (*Colitis ulcerosa*; UC) je bolest, koja se ubraja u grupu inflamatornih bolesti creva. To je bolest creva, posebno debelog creva, tj. kolona, u kojem se javljaju karakteristični ulkusi. Glavni simptom aktivne bolesti je dijareja sa primesama krvi i bol u abdomenu. Pored ovih simptoma, mogu se još javiti: anemija, gubitak težine, gubitak apetita, lezije na koži, iznurenost, krvarenje iz rektuma. Ulcerozni kolitis ima sličnosti sa Kronovom bolešću. Bolest ima periode egzacerbacije i periode bez simptoma, koji nekada mogu nestati sami od sebe (133). Kolektomija (*colectomy*), delimično ili totalno uklanjanje debelog creva hirurškim putem, često je jedini put ka izlečenju ove bolesti.

UC se u usnoj duplji manifestuje zapaljenjem oralne sluzokože, rekurentnim aftoznim ulceracijama, kandidiozom, neprijatnim zadahom iz usta po fecesu (*fetor ex ore*), piostomatitisom gangrenozusom (*Pyostomatitis gangrenosum*) i piostomatitisom vegetansom (*Pyostomatitis vegetans*) sa brojnim mikro apscesima. RAU, u sklopu ove bolesti, se svrstavaju u primarne, a kandidioza u sekundarne oralne lezije. Afte mogu biti svrstane u sekundarne lezije ako se javljaju kao posledica anemije ovih bolesnika (31).

Ne mora svaki bolesnik sa RAU biti suspektan na UC, već samo oni pacijenti, kod kojih skup opštih kliničkih simptoma i oralnih promena ukazuju na neki sistemski poremećaj (31).

1.3.2. Rekurentne oralne ulceracije i bolesti vezivnog tkiva

Sistemski lupus eritematozus

Sistemski lupus eritematozus (*Systemic Lupus Erythematosus*; SLE) je hronično, autoimuno obolenje, koje se može završiti sa smrtnim ishodom, ali su sa razvićem medicine, danas takvi slučajevi retki. On se može javiti u bilo kom delu organizma, ali se promene najčešće javljaju na srcu, zglobovima, koži, plućima, krvnim sudovima, jetri, bubrezima i nervnom sistemu. Ishod bolesti je nepredvidiv, sa periodima remisije i egzacerbacije. Van Evrope se češće javlja kod osoba ženskog pola. Terapija je simptomatska (kortikosteroidi i imunosupresivi) (134).

SLE se na osnovu kliničkih karakteristika klasifikuje kao:

- lekovima izazvan lupus eritematozus,
- lupus nefritis (*Lupus nephritis*), izaziva promene na bubrezima,
- diskoidni lupus eritematozus (*Discoid lupus erythematosus*; DLE), izaziva promene na koži, osip po koži lica i tela,
- subakutni kutani lupus eritematozus (*Subacute cutaneous lupus erythematosus*), izaziva promene na koži i pege, koje se javljaju posle izlaganja Suncu i
- neonatalni lupus (*Neonatal lupus*), javlja se kod beba, čije su majke obolele od Sjogrenovog sindroma (*Sjögren's syndrome*).

Dijagnoza ove bolesti se često teško uspostavlja, pošto se javljaju mnogi simptomi, koji su karakteristični i za druga obolenja (groznica, malaksalost, bol u zglobovima, bol u mišićima, letargija) (134).

Oralne manifestacije koje se javljaju u toku DLE su relativno retke i po svojoj kliničkoj slici mogu podsećati na lihen planus (*Lichen planus*). Lezije se javljaju simetrično, na labijalnoj, bukalnoj ili alveolarnoj mukozi. Promenama može biti zahvaćena i granica vermilliona. Klinički se uočavaju jasno ograničeni eritematozni ili beli plakovi. Granicu prema zdravoj sluzokoži čine bele linije. Na plaku se može jasno uočiti kapilarna mreža. Centar lezije može ulcerisati. Ulceracije se javljaju kod

osoba sa aktivnim lupusom ili u slučajevima kada on prelazi u sistemsku formu. Promene na usnama (lokalizovane ili difuzne) se manifestuju u obliku beličastih ljušpa ili krusta, koje kada otpadnu, ostaju hiperkeratotična mesta, koja su podložna povredama (31).

Rajterov sindrom

Rajterov sindrom (*Reiter's syndrome*) je sindrom, koji je danas mnogima poznat pod nazivom reaktivni artritis (*reactive arthritis*), koji obuhvata trijas simptoma: konjuktivitis (*conjunctivitis*), uretritis (*urethritis*) i artritis (*arthritis*). Najčešće se javlja u mladih osoba, muškoga pola, nakon urogenitalnih i gastrointestinalnih infekcija (135). Značajan broj pacijenata sa Rajterovim sindromom ispoljava muko-kutane simptome, kao što su: keratoderma blenoragikum (*keratoderma blennorrhagicum*), circinate balanitis (*circinate balanitis*), ulcerativni vulvitis (*ulcerative vulvitis*), promene na noktima (*nail changes*) i oralne lezije (135).

Simptomi Rajterovog sindroma nestaju za četiri nedelje, a predominantni simtom se može razlikovati od osobe do osobe (135). U dece se dijareja javlja pre početka bolesti u 65-69% slučajeva (136, 137). Osobe ženskog pola ispoljavaju muko-kutane simptome, četiri godine pre artritičnih simptoma (138). U nekih pacijenata sigurni simptomi bolesti se manifestuju tek posle godinu dana, dok su se kod jednog pacijenta ispoljile manifestacije bolesti na koži tek nakon dvanaest godina od početka same bolesti (139).

Pacijenti mogu ispoljiti bilo koji, od brojnih simptoma, uključujući i generalizovane simptome, kao što su: groznica, iscrpljenost, gubitak na težini i urogenitalne, reumatološke, oftalmološke, dermatološke i crevne manifestacije (140).

Oralne lezije se u ovih pacijenata javljaju u 9-40% slučajeva. Često pacijenti ne zapaze promene na oralnoj sluzokoži, jer mogu biti bezbolne. Od promena na oralnoj sluzokoži najčešće se javljaju: erozije na nepcu (*palatal erosions*), oralne ulceracije, glositis (*glossitis*) i geografski jezik (*geographic tongue*) (141-145).

1.3.3. Rekurentne oralne ulceracije i kožne bolesti

Lihen planus

Lihen planus (*Lichen planus*) je muko-kutano obolenje, koje se karakteriše pojavom belih oralnih lezija, koje se u pojedinim slučajevima javljaju i na genitalijama i na koži u regionu zglobova (31). Etiologija ovog obolenja je još uvek nejasna, mada postoje dokazi o predominaciji T-limfocita u infiltratu, što ukazuje na imunopatološke reakcije, koje dovode do oštećenja pločasto-slojevitog epitela. U pojedinim slučajevima lihen planus mogu da izazovu:

- lekovi (promene slične lihen planusu-lihenoidne promene, koje mogu izazvati antihipertenzivi, soli zlata, nesteroidni antiinflamatorni lekovi, antimalarici i dr.),
- reakcija na amalgam ili zlato,
- odbacivanje alo ili izo kalema,
- HIV infekcija,
- hepatitis C.

Klinički razlikujemo sledeće forme lihen planusa:

- retikulozna (mrežica ili zavesa),
- papulozna,
- erozivno-ulcerozna (erozije i ulceracije),
- atrofična,
- bulozna,
- plakozna,
- deskvamativni gingivitis.

Erozivno-ulceroznu formu lihen planusa karakterišu erozije i ulceracije nepravilnog oblika, bolne, okružene belim lihenskim promenama. Nastaje prskanjem bula. Erozijske

ili ulceracije su prekrivene fibrinskim eksudatom. Promene su ograničene crvenim prstenom, čije spoljne granice čini lihenoidna mreža. Najčešće su lokalizovane na obraznoj sluzokoži, gingivi, jeziku, nepcu, a retko na podu usne duplje i vermilionu. Izrazite subjektivne tegobe se javljaju u pacijenata sa ovom formom lihena (31). Ove erozije su veoma bolne i teško ih je klinički razlikovati od drugih oralnih, erozivnih stanja, kao što su pemfigoid (*Pemphigoid*) i pemfigus vulgaris (*Pemphigus vulgaris*; PV) (146).

Klinička slika lihena je često karakteristična, ali bi dijagnoza uvek trebalo da bude potvrđena biopsijom (146).

Pemfigus vulgaris

Pemfigus vulgaris (*Pemphigus vulgaris*; PV) je imunskim sistemom posredovano, hronično, vezikulo-bulozno, muko-kutano obolenje. U više od polovine pacijenata sa PV, inicijalne lezije se javljaju na oralnoj sluzokoži. PV se karakteriše pojavom akantolitičkih, intraepitelialnih bula, koje su prouzrokovane akcijom IgG antitela protiv specifičnih proteina, dezmozomima (*desmogleins*), lokalizovanih u dezmozomima (147, 148).

Bule se najčešće pojavljuju u zadnjim partijama usne duplje, lako pucaju formirajući bolne ulceracije sa nekrotičnim dnom i eritematoznim haloom. Konačna dijagnoza zahteva biopsiju i histološku potvrdu, koja dokazuje akantolitične intraepitelijalne vezikule (*acantholytic intraepithelial vesicles*) i Cankove ćelije (*Tzanck cells*). Direktnom imunofluorescencijom tkiva otkriva se prisustvo IgG-a ili IgM-a i komplementarni fragmenti u interćelijskim prostorima (147, 148).

Pemfigoid mukoze oris

Pemfigoid mukoze oris (*Pemphigoid mucosae oris*; PMO) se ubraja u grupu imunoloških bolesti, koje se uglavnom javljaju na sluzokožama, u vidu subepitelialnih bula. Histološki nalaz ukazuje na depozite imunoglobulina G, imunoglobulina A ili frakcijom komplementa C3 na bazalnoj membrani. Ukoliko je i gingiva zahvaćena

promenama, opisujemo ih kao deskvamativni gingivitis (*chronic desquamative gingivitis*).

U pacijenata sa PMO-om promene se osim u usnoj duplji mogu javiti i na koži, očima, ždrelu, jednjaku i grkljanu. U pacijenata sa PMO se stvaraju antitela na nekoliko auto-antigena sluzokože ili bazalne membrane. Najčešći auto-antigeni su laminin-5, kolagen tipa IV, laminin-6, podjedinica $\beta 4$ integrina, uncein i bulozni pemfigoidni antigeni 1 i 2 (149).

Eritema eksudativum multiforme

Eritema eksudativum multiforme (*Erythema exudativum multiforme*; EM) je vezikulo-bulozno, muko-kutano obolenje, čiji se patogenetski mehanizam još uvek precizno ne zna, ali se veruje da su infekcije i upotreba lekova usko povezani sa nastankom ovog obolenja (150-152). Dijagnoza ovog obolenja se uspostavlja isključivanjem drugih bolesti, pošto ne postoji specifični test (152).

Promene na koži su polimorfne. To su najčešće:

- eritem,
- makula,
- papula,
- vezikula i
- bula (31).

Makule, koje se javljaju na koži su crvene, malo izdignute iznad kože i veličine sočiva. Podsećaju na kokardu. U njihovom središtu se mogu naći i druge eflorescence (papule, vezikule, bule), koje mogu pucati i time stvarati erodovane površine ispunjene serohemoragičnim sadržajem (31).

Oralne promene EM-a se manifestuju na:

- usnama - vezikule ili bule, erozije ili ulceracije, pustule, kruste i edem;
- oralnoj sluzokoži - makule, vezikule, bule, pustule, erozije ili ulcere, koje zahvataju posebno frontalnu regiju usne duplje. Eflorescence se javljaju na

inflamiranoj sluzokoži. Promene konfluiraju i otežavaju ishranu i govor bolesnika, koji se žali na bol. Zbog otežanog održavanja oralne higijene, moguća je i sekundarna infekcija (bakterijska, gljivična, virusna).

Postoje tri tipa EM-a:

- toksično epidermalno nekrolizirajuća EM (*Epidermolysis toxica acuta*; ETA) ili Liellov sindrom (*Lyell's syndrome*),
- EM *major* (najčešće se poistovećuje sa Stiven-Džonsonovim sindromom (*Stevens-Johnson syndrome*; SJS) i
- Multiformna eritema minor (*Erythema minor multiforme*) (152).

Akutna forma ovog obolenja (minorna forma) se može javiti u jednoj epizodi ili može biti rekurentna. Karakteristične lezije simetrično prekrivaju < 10% kože tela (*engl. body surface area*). Nekada se promene javljaju i na sluzokožama, najčešće sluzokoži usne duplje, u vidu crvenila, vezikula i ulceracija. Najčešće su promenama zahvaćene i usne, koje bivaju prekrivene krustama (152).

EM *major* je rekurentna forma i karakterišu je simetrične lezije na koži i lezije na najmanje dve sluzokože, i u ovom slučaju zahvatajući < 10% kože tela, ali mnogo jače nego u minornoj formi. Po mišljenju nekih autora majorna forma ovog obolenja je isto što i Stiven-Džonsonov sindrom, dok druga grupa autora ne deli to mišljenje (152).

TEN karakterišu eritematozne pege, lezije na koži, erozije i bule na sluzokoži i zahvaćenost epiderma sa > 30% od ukupne kože tela (150, 152).

Epidermolizis buloza

Epidermolizis buloza (*Epidermolysis Bullosa*; EB) je obolenje, koje obuhvata grupu naslednih poremećaja, koje karakteriše pojava bula na koži i sluzokožama na najmanju traumu. Opisana su tri opšta podtipa ove bolesti, na osnovu stepena separacije kože:

- Epidermolizis buloza simpleks (*Epidermolysis bullosa simplex*; EBS),
- *junctional Epidermolysis bullosa* (JEB) i
- distrofična epidermolizis buloza (*dystrophic Epidermolysis bullosa*; DEB) (153).

Svaka od ove tri navedene forme ima više podtipova, sve u zavisnosti od tipa i broja promena i stanja obolelog.

Oštećenja u regionu bazalne membrane nastaju delovanjem autoantitela tipa VII prokolagen, koja izazivaju defekte kolagena. Bule, koje se mogu javiti i na koži i na sluzokoži, pucaju i formiraju se ulcere, koje mogu i ožiljno zarastati.

U pojedinim slučajevima se javlja i hipoplazija gleđi, a zbog teškim subjektivnih tegoba, održavanje oralne higijene je otežano, pa je incidencija karijesa veća, kao i obolenja potpornog aparata zuba (31).

Promenama mogu biti zahvaćene i sluzokože gastrointestinalnog i genitalnog trakta, kao i sluzokoža očiju i usne duplje (154). Iz ulceracija na koži i sluzokoži se mogu razviti kancerske lezije (155).

Dermatitis Herpetiformis During

Dermatitis herpetiformis During (*Dermatitis Herpetiformis Duhring*; DH) je kožno obolenje, koje se manifestuje osipom (papulama i vezikulama) i svrabom po koži. Promene se javljaju simetrično i najčešće u predelu prevoja na koži (laktovi, kolena, krsna kost). U pojedinim slučajevima u ovih pacijenata se mogu uočiti urtikarijalni plakovi ili hemoragične makule u predelu stopala i dlanova. Lokalna oštećenja tkiva, u koje može biti uključena i preosetljivost na gluten, izazivaju depoziti IgA autoantitela. Kao i kod celijačne bolesti, javlja se u osoba sa HLA-B8 i HLA-DR3 antigenima, haplotipom.

Pacijenti sa DH imaju iste histološke promene, kao i pacijenti oboleli od celijačne bolesti; promene variraju od infiltracije lamine proprie (*lamine proprie*) mononuklearnim ćelijama i delimične atrofije crevnih vila do potpune atrofije intestinalne mukoze (156).

Chorzelski i saradnici (1983.) su prvi publikovali podatak da se kod pacijenata sa DH, kao i kod pacijenata sa celijačnom bolešću, javljaju IgA auto-antitela na endomizijum, specijalizovanu strukturu vezivnog tkiva (157).

Oralne lezije u pacijenata sa DH su najčešće lokalizovane na nepcu, bukalnoj sluzokoži ili gingivi. Na sluzokoži se mogu javiti: enantem, vezikule i ulceracije. Može biti prisutna i hipoplazija gleđi. Smatra se da postoji mali rizik da ove promene maligno alteriraju (31).

Chorzelski i saradnici (1979.) su razdvojili DH i linearni IgA dermatitis u dva različita entiteta, na osnovu rezultata imunofluorescencije. U pacijenata sa DH su utvrđeni granulirani IgA depoziti, dok su u pacijenata sa linearnim IgA dermatitisom utvrđeno prisustvo linearnih IgA depozita na dermalno-epidermalnim vezama. Kasnije je postalo očigledno da se radi o dva različita obolenja, koja imaju različitu imunogenetsku pozadinu. U pacijenata sa linearnim IgA dermatitisom se ne javljaju promene u gastrointestinalnom traktu (158).

1.3.4. Rekurentne oralne ulceracije i bolesti krvi

Oralne ulceracije se mogu javiti i u sklopu krvnih bolesti, kao što su: anemije, leukemije, limfomi, multipli mijelomi i neutropenije (1), pogotovo u sklopu ciklične neutropenije, koja uzrokuje ulceracije na oralnoj sluzokoži, veoma slične rekurentnim aftoznim ulceracijama (159).

Patološke oralne promene se javljaju kod limfoma sa primarnom lokalizacijom u usnoj duplji i to najčešće u vidu ulceracija na oralnoj sluzokoži. Sekundarne patološke oralne promene se mogu javiti kao posledica: terapije, izmenjenog imunog statusa pacijenta i osnovne bolesti.

Primarne promene u usnoj duplji se češće javljaju kod nehoćinskih limfoma (*engl. Non-Hodgkin's lymphoma*; NHL), nego kod Hoćkinove bolesti (*engl. Hodgkin's lymphoma*; HL) (31). Najčešće promene se javljaju na nepcu, gingivi, jeziku, obraznoj sluzokoži, sluzokoži poda usta i usnama i čine 2% od svih ektranodalnih limfoma (160).

Eflorescenca koja se javlja kod većine pacijenata sa NHL u ustima je bezbolna ulceracija, koja ne zarasta (161). NHL se može javiti i na mekom i na koštanom oralnom tkivu, sa najčešćom lokalizacijom na nepcu i donjoj vilici. Ekstranodalni NHL se retko može javiti na gingivi (162).

NHL najčešće zahvata pljuvačne žlezde, krajnike i nepce, a mnogo ređe gingivu i oralnu sluzokožu (163).

Rezultati studije *Tuling Leong-a* i saradnika (2001.) (164), pokazuju da su difuzni krupnoćelijski B limfomi najčešći histološki podtip oralnih NHL.

1.3.5. Oralne ulceracije kao posledica hormonskih promena

Ispitivanja su pokazala (165-169) da se kod nekih žena sa RAU, oralne ulceracije javljaju u cikličnim periodima, koji su u podudarnosti sa lutealnom fazom menstrualnog ciklusa. U tih žena je zapažena kompletna remisija tokom trudnoće (13, 170), sa egzacerbacijom tokom perioda puerperiuma (period odmah nakon porođaja) (166). Mada nekoliko istraživanja novijeg datuma nisu uspela da utvrde vezu između RAU i menopauze (167), 10% žena je izjavilo da su prvu epizodu RAU imale u periodu od 50 – 59 godine života (13).

1.3.6. Rekurentne oralne ulceracije kao posledica infekcije

Infekcije prouzrokovane virusima

Klinička slika infekcije izazvane herpes simpleks virusom (*herpes simplex virus*) zavisi od toga da li se radi o primarnoj ili sekundarnoj infekciji (1, 171, 172). Pod primarnom infekcijom se podrazumeva herpetični gingivostomatitis (*Gingivostomatitis herpetica*). Stomatitis herpetika (*Stomatitis herpetica*) se manifestuje vezikulama (erozijama, ulceracijama), kataralnim gingivitisom i obloženim jezikom. Promene su najčešće lokalizovane na usnama, jeziku, oralnoj

sluzokoži, nepcu i ždreću (171, 172). Ulceracije zarastaju spontano, najčešće za desetak dana, bez posledica (171, 172), i udružene su sa submandibularnim limfadenitisom (*submandibular lymphadenitis*), problemima sa gutanjem i neprijatnim zadahom iz usta (*halitosis*) (171, 172).

Herpes na usnama (*herpes labialis recurrens*) je rekurentna infekcija herpes simpleks virusom (1, 171, 172), koja se manifestuje vezikulama i ulceracijama na usnama i *vermilionu*- rumenom delu usana. Usled sekundarne infekcije mogu se formirati pustule. Nakon vezikula ili pustula formiraju se kruste (171). Promene zarastaju spontano za 7-10 dana (172). Rekurentni intraoralni herpes se ispoljava pojavom veoma bolne ulceracije, najčešće lokalizovane na keratinizovanoj gingivi i tvrdom nepcu. (171).

Virusna infekcija virusom varičele zoster (*varicella zoster virus infection*) se manifestuje inicijalnim, prodromalnim stadijumom, nakon kojeg se razvijaju promene na koži (vezikule i ulceracije). U zavisnosti od stepena bolesti, vezikule se mogu javiti i u usnoj duplji, najčešće na nepcu (172, 173). Virus ostaje ceo život latentan u ganglijama dorzalnih korenova odgovarajućih nerava ili u ganglijama ekstramedularnog kranijalnog živca, da bi se u kasnijim godinama mogao reaktivirati i proizvesti mono ili polineuropatije (173), poznatije kao herpes zoster (*Herpes zoster*). Herpes zoster se javlja kod starijih osoba, koje su preležale varičelu (171, 172). U 30% slučajeva, promene se javljaju u torakalnom predelu, mada se mogu javiti i u trigeminalnom regionu. Javlja se na mestima, koja inerviše zahvaćeni živac, a to je najčešće *nervus trigeminus*. Bolest počinje povišenom temperaturom, slabošću, lokalnim neuralgijama i osipom, da bi se kasnije manifestovala bolom, koji je jednostran i jak, i osipom (makula, papula, vezikula), koji prati senzornu granu živca. Najčešća posledica je postterapeutska neuralgija (172).

Infekcija koksaki virusom (*Coxsackie virus*) daje dve moguće kliničke slike u ustima: herpangina i bolest šaka, stopala i usta (171, 172). Herpangina je sistemsko obolenje, najčešće se javlja u detinjstvu u vidu groznice i bola u grlu, sa vezikulama u ždreću, naročito u predelu nepčanih lukova, mekog nepca, uvule (*uvulae*), nepca i krajnika. Ove vezikule spontano zarastaju (epiteliziraju) za 4-dana (172). Bolest šaka, stopala i usta, koja se u dece javlja u školskom periodu, karakteriše se vezikulama u usnoj duplji, na dlanovima i tabanima (171).

Epštajn-Barov virus (*Epstein-Barr virus*; EBV) može dati nekoliko kliničkih slika, u koje se svrstava i infektivna mononukleoza, koja se manifestuje osetljivošću grla, limfadenopatijom, malaksalošću i pozitivnim Bunelovim testom (*Paul Bunnell*). (1, 171, 172). Kliničku sliku karakterišu: groznica, malaksalost, generalizovana limfadenopatija, slezina i jetra mogu biti uvećane, perikarditis retko, osetljivost grla i osetljivost krajnika. U usnoj duplji se javljaju: petehije (na prelazu mekog u tvrdo nepce) i ulceracije po oralnoj sluzokoži.

Citomegalovirus (*cytomegalovirus*) može prouzrokovati veliku, hroničnu, oralnu ulceraciju u pacijenata sa oslabljenim imunim statusom (1).

Virus humane imunodeficijencije (*Human Immunodeficiency Virus*; HIV) prouzrokuje oralne lezije, koje često mogu biti i prvi znak obolenja (171, 172, 174). Široke i duboke ulceracije, u ovim slučajevima, zahvataju i vestibularnu i faringealnu sluzokožu. Pojava ovakvih ulceracija je u ovih pacijenata povezana i sa prisustvom oportunističkih patogena (1, 174).

Infekcije prouzrokovane bakterijama i parazitima

Sifilis je seksualno transmisiona bolest, uzrokovana anaerobnom spirohetom (*anaerobic spirochaete*) treponemom palidum (*Treponema pallidum*). Karakteriše se promenama na koži i oralnoj sluzokoži. „Tvdi šankr“ (*a chancre*), duboki, bezbolni ulcer sa izdignutim i induriranim ivicama se javlja tokom inicijalne faze primarnog sifilisa. Sekundarni sifilis izdvaja nekoliko sistemskih karakteristika, uključujući i sluzokožne ulceracije i plakove; tercijarni sifilis se karakteriše prisustvom sifilističkih guma (lezije u vidu bezbolnih čvorića na tvrdom nepcu ili jeziku), kao i promenama na nervima i krvnim sudovima (175).

Tuberkuloza

Tuberkuloza (*Tuberculosis*; TB) je hronično, granulomatozno, infektivno obolenje, najčešće uzrokovano Mikobakterijumom tuberkuloze (*Mycobacterium-om tuberculosis*), koje se često javlja kao komplikacija HIV infekcije (176-179). Oralne lezije su retke, javljaju se kod primarne tuberkuloze u usnoj duplji ili kao sekundarne lezije, aktivne pulmonalne tuberkuloze. Obolenje se manifestuje u vidu dubokog, nepravilnog, perzistirajućeg i bolnog ulkusa, najčešće lokalizovanog sa strane jezika, sa podrivenim ivicama i granulacionim tkivom na dnu ulkusa (176, 177). Sekundarna tuberkuloza usne duplje se manifestuje u vidu hroničnog ulkusa, uglavnom bolnog i otečenog (179). Dijagnoza zahteva histološku potvrdu (176, 179).

Infekcije prouzrokovane gljivicama

Kandidioza (*Candidiosis*) u usnoj duplji prouzrokuje ne-ulcerativne promene, dok ostale mikoze mogu dovesti do pojave oralnih ulceracija.

Histoplazma kapsulatum (*Histoplasma capsulatum*) je gljivica, koja je odgovorna za nastanak histoplazmoze, uglavnom u imuno-kompromitovanih pacijenata. Infekcija nastaje inhalacijom spora ovog tipa gljiva. Ovo je retko obolenje, kod kojeg se javljaju hronične forme ulceracija u usnoj duplji i zahteva histološku potvrdu bioptata (1, 180).

Infekcije prouzrokovane gljivom *Aspergillus fumigata* (*Aspergillus fumigata*), takođe se mogu ispoljiti u vidu hroničnih, oralnih ulceracija, koje se javljaju u imuno-kompromitovanih pacijenata (1, 181).

Gljive iz rodova *Absidia* (*Absidia*), *Rizopus* (*Rhizopus*), *Rizomukor* (*Rhizomucor*) ili *Mukor* (*Mucor*) prouzrokuju zigomikoze (*Zygomycosis*), gljivične infekcije koje mogu prouzrokovati ulceracije sa nekrotičnim haloom na nepcu. Dijabetičari i pacijenti sa imuno-deficijentnim obolenjima imaju povećani rizik za pojavu ovog tipa infekcija (182).

1.3.7. Oralne ulceracije kao posledica neželjenog dejstva medikamenata

Medikamenti koji se koriste u stomatološkoj terapiji ili u terapiji sistemskih obolenja mogu izazvati neželjene efekte. Rekurentne oralne ulceracije i ulceracije na genitalnoj sluzokoži mogu biti izazvane medikamentima poput onih iz grupe nesteroidnih antiinflamatorika (npr. *Diclofenac*) (183). *Piroxicam* može biti uzročnik samo ulceracije na oralnoj sluzokoži (184). U pojedinim slučajevima je utvrđena i pojava oralnih ulceracija nakon upotrebe medikamenata iz grupe beta blokatora (185), koje nestaju nakon obustave konzumacije pomenutih lekova. *Boulinguez* i saradnici (2000.) su u svojoj studiji sprovedenoj u Francuskoj (186) naveli sedam medikamenata, čija je upotreba u nekim slučajevima udružena sa pojavom aftoznih ulceracija na oralnoj sluzokoži:

- Kaptopril (*Captopril*) (187),
- soli zlata (188),
- Nikorandil (*Nicorandil*) (189),
- Niflumična kiselina (188),
- Fenindion (*Phenindione*) (188),
- Fenobarbital (*Phenobarbital*) (190),
- Piroksikam (*Piroxicam*) (184) i
- Sodium hipohlorid (*Sodium hypochloride*) (191).

1.3.8. Oralne ulceracije i pušenje

Shapiro sa saradnicima (1970.) (192) i *Axell* sa saradnicima (1985.) (193) su u svojim studijama utvrdili da nema udruženosti između pušenja i RAU. Negativna asocijacija je potvrđena i kada je u pitanju bezdimni duvan (duvan za žvakanje i ušmrkavanje) (194), kao i kada su u pitanju pacijenti, seropozitivni na HIV, koji su pušači (195). Paradoksalan podatak je da su većina pacijenata sa RAU nepušači (10), a jedna od

novijih studija (196) iznosi podatak da su samo 9% pacijenata sa RAU aktivni pušači, dok je procenat aktivnih pušača u kontrolnoj grupi veći i iznosi 25%.

1.3.9. Oralne ulceracije i stres

Udruženost RAU i različitih vrsta psiholoških faktora, uključujući nespokojstvo, neprijateljstvo, stresove vezane za posao, itd., se navodi u više studija (13, 197-199). Postoje studije, čiji rezultati nisu utvrdili udruženost RAU i straha (200), depresije (201), stresogenog načina života (202). U studiji *Andrews-a* i *Hall-a* (1990.) (203), u kojoj su korišćeni programski tretmani relaksacije pacijenata, zapažen je pad učestalosti epizoda oralnih ulceracija.

1.3.10. Uloga drugih sistemskih faktora u etiologiji oralnih ulceracija

U etiologiji RAU ulogu mogu igrati i imunološki faktori (204), deficijencija hematina (205), vitamina B12 (205-210), folata (205-210) i mogućnost deficijencije cinka (211, 212).

Field i saradnici (1987.) navode podatak da su deficijenciju hematina detektovali kod 20% pacijenata sa RAU (205), dok *Nolan* i saradnici (1991.) (213), u studiji sprovedenoj u Škotskoj, navode podatak da 28,2% pacijenata sa RAU ima deficijenciju vitamina B1, B2 i/ili B6. Oni su takođe dokazali da pacijenti sa RAU i deficijencijom vitamina B, mogu ublažiti svoje tegobe terapijom sa pomenutim vitaminima. *Olson* i saradnici (1982.) (214) smatraju da se vrednosti vitamina B12, folata i gvožđa, ne razlikuju značajno u pacijenata sa RAU u poređenju sa vrednostima osoba iz kontrolne grupe.

Nestajanje tegoba pacijenata sa RAU pri korišćenju suplemenata cink- sulfata se navodi u rezultatima studije *Merchanta* i saradnika (1977.) (212), kao i u prikazu slučaja pacijenta sa RAU, sa deficijencijom cinka i imunodeficijencijom (211).

Ovakvi rezultati, vezani za deficijenciju cinka, u kasnijim studijama nisu potvrđeni (215, 216). U studiji Pang-a (1992.) (217), sprovedenoj u Kini, koja je obuhvatala 75 pacijenata sa RAU, vrednosti serumskog cinka pacijenata su bile niže, ali ipak u granicama referentnih vrednosti.

O udruženosti RAU i drugih elemenata u tragovima, ne postoje podaci.

1.4. ORALNE ULCERACIJE U SKLOPU LOKALNIH OŠTEĆENJA

1.4.1. Oralne ulceracije kao posledica traume

ROU mogu biti posledica traume, prouzrokovane oštrim ivicama ili rubovima zuba. Ovaj tip lezija se češće sreće u dece i mentalno retardiranih osoba (218-220). Samoprouzrokujuće traumatske ulceracije mogu biti posledica nepravilnih pokreta tokom pranja zuba ili posledica ugriza, jezika ili donje usne, tokom delovanja anestezije ili u osoba koje boluju od neuroza, pa grickaju usne i oralnu sluzokožu (171). Dekubitalni ulceri mogu nastati kao posledica nošenja proteze (221). Oni su karakteristični po akutnom bolu, beličastim ili žućkastim dnom i crvenim haloom (171).

Eozinofilni ulcer

Eozinofilni ulcer (*Eosinophilic ulcer*) je neuobičajena, retka, benigna i generalno asimptomatska lezija, koja zarasta spontano. Njena etiologija je nepoznata, ali se zna da je povezana sa traumama. Javlja se u vidu širokog ulcera, najčešće na jeziku, sa širokim, otečenim ivicama i žućkasto-beličastim dnom, ličeći na malignu leziju. Razvija se brzo i perzistira nedeljama ili mesecima. Histološki predstavlja leukocitima bogat infiltrat i histološka potvrda njegove dijagnoze isključuje maligni tumor, kao što je karcinom skvamoznih ćelija (222).

1.4.2. Oralne ulceracije kao posledica hemijskih oštećenja

Oštećenja oralne sluzokože hemijskim sredstvima mogu biti slučajna (akcidentna) ili namerna. Eflorescence koje prate ova oštećenja su polimorfne.

Među najčešćim hemijskim oštećenjima spadaju oštećenja izazvana alkoholnim pićima, koja mogu biti direktna i indirektna (alkoholičari) (31).

Ulceracije prouzrokovane hemijskim oštećenjem su posledica direktnog kontakta oralne sluzokože sa kiselinama ili jakim bazama. One su povezane sa topikalnim preparatima acetilsalicilne kiseline, pankreatičnim suplementima, tabletama kalijuma, bifosfonatima, trihlorsirćetnom kiselinom i nekim proizvodima za oralnu negu. (150, 159, 223, 224). Oralne lezije mogu biti prouzrokovane i lokalnom aplikacijom kokaina (150, 225). Direktno oštećenje u vidu erozije ili ulceracije može biti vidljivo na oralnoj sluzokoži (najčešće pripojna gingiva) na mestu direktne aplikacije droge. Na eritematoznoj površini pripojne gingive i forniksa mogu se videti promene slične lihenu.

1.4.3. Oralne ulceracije kao posledica termičkih oštećenja

Usna duplja je izložena dejstvu različitih termičkih agenasa. Promene mogu nastupiti tokom konzumiranja toplih ili hladnih napitaka i jela (hrana iz mikrotalasne rerne), (226), stomatološke terapije (topli instrumenti, podlaganje protetskih nadoknada) ili kao posledica pušenja. Step en oštećenja tkiva zavisi od dužine ekspozicije i temperature (31).

Oralne ulceracije, nastale kao posledica štetnog delovanja električne energije su retke. Najčešće se sreću u dece nakon slučajnih kontakata sa električnim kablovima, utičnicama ili priključcima (227).

1.5. REKURENTNE ORALNE ULCERACIJE I NEOPLAZME

1.5.1. Rekurentne oralne ulceracije kao posledica neželjenog dejstva terapije u pacijenata obolelih od maligniteta

Kod pacijenata obolelih od malignih bolesti, kao komplikacija citostatske ili zračne terapije, mogu se javiti sekundarne patološke promene u usnoj duplji.

Pacijenti koji se leče zračnom terapijom, kao najčešće oralne komplikacije terapije imaju mukozitis (*mucositis*), infekcije (bakterijska, gljivična, virusna), suvoću usta (*xerostomia*), oralne ulceracije, gubitak čula ukusa, trizmus miškulature, osetljivost vratova zuba, cervikalni karijes i osteonekrozu i osteomijelitis (31).

Volpato i saradnici (2007.) (228), u svojoj studiji, koja je rađena u Brazilu, navode oralne mukozitise, kao najčešću oralnu komplikaciju citostatske i zračne terapije. Mukozitisi su difuzni eritemi, koji mogu biti praćeni ulceracijama. Mogu biti rezultat dva mehanizma: direktne toksičnosti terapije na sluzokožu ili mijelo-supresije tokom terapijskog tretmana. Patohistološki se sastoje od četiri faze: inicijalne ili inflamatorno/vaskularne, epitelijalne, ulcero/bakteriološke i faze zarastanja (228). Step en mukozitisa zavisi od vrste citostatika, načina davanja, kao i doze (31).

1.5.2. Rekurentne oralne ulceracije i oralni kanceri

Oralni kanceri se mogu manifestovati ulceracijama. Najčešći kancer (90% od svih tumora u usnoj duplji) je oralni karcinom skvamoznih ćelija (*Oral squamous cell carcinoma*; SCC).

Svakoј sumnjivoј leziji u ustima, koja perzistira i nakon eliminacije svih faktora rizika, treba da se uradi biopsija, jer je to jedina sigurno pouzdana metoda za uspostavljanje definitivne dijagnoze (171, 229).

Oralni karcinom skvamoznih ćelija

Oralni karcinom skvamoznih ćelija može biti:

- egzofitičan (*exophytic*),
- endofitičan (*endophytic*) i
- mešoviti (*mixed*) (171).

U nekim slučajevima se metastatske lezije primarnih tumora, mogu u usnoj duplji manifestovati kao oralne ulceracije (230).

Dijagnostika malignih ulceracija u ustima je od presudnog značaja za dobru prognozu bolesti, jer na vreme otkriveni malignitet ima bolju prognozu u poređenju sa prognozom kasnijih stadijuma maligne bolesti. Jedna od uloga stomatologa je i uloga edukatora, koji pacijentima treba da ukaže na faktore rizika za nastanak maligniteta u usnoj duplji, a to su: pušenje i konzumacija alkohola.

1.6. ULOGA PROTEINA HRANE U ETIOLOGIJI REKURENTNIH ORALNIH ULCERACIJA

Hrana predstavlja jedan od najvećih antigenskih izazova sa kojim humani imuni sistem može da se susretne. Da bi došlo do pojave osetljivosti, neophodno je da antigeni iz hrane ili njihovi delovi, dođu u dodir sa imunološki kompetentnim ćelijama. Postoji mnoštvo dokaza da neoštećene mikromolekule, koje imaju dovoljnu molekulsku težinu da bi delovale kao antigeni prolaze kroz epitel gastrointestinalnog trakta, reaguju sa imunim sistemom sluznice, a takođe dopiru i do cirkulatornog sistema (231-233).

Alergijska reakcija, koja je ograničena na gastrointestinalni trakt, može se ispoljiti u vidu muke i povraćanja, reakcija na koži (urtikarije), angioedema i atopijskog ekcema. U pojedinim slučajevima, ona se može manifestovati u vidu anafilaktičke reakcije (234).

Orofarinks i gastrointestinalni trakt prvi dolaze u dodir s antigenima. Posle dodira hrane sa sluznicom mogu se javiti otok i svrab u usnama, sluzokoži usne duplje, nepcu i ždrelu. Ovakve reakcije su prolaznog karaktera i nisu uvek praćene drugim alergijskim manifestacijama. Ulazak hrane, na koju je osoba alergična, u želudac i, kasnije u tanko crevo, može da bude praćen pojavom muke, povraćanja, bolnih grčeva, porastom obima trbuha, vetrovima i prolivom. Takođe je poznato da pojava alergijske reakcije u gastrointestinalnom traktu može biti povezana sa neprimetnim gubitkom krvi preko stolice, malapsorpcijom, enteropatijom sa gubitkom proteina i eozinofilnim gastroenteritisom (234).

Alergija na hranu, pored izazivanja simptoma i znakova u gastrointestinalnom traktu, takođe može da se ispolji i u drugim, ekstraintestinalnim delovima organizma, pogotovo na koži i, nešto ređe, u respiratornom traktu (235-237).

Pojava RAU se poredila sa korišćenjem određene hrane, kao što su: kravlje mleko (238), gluten (128, 129), čokolada, orasi i kikiriki (239), sir (240), azotne boje, aromati, konzervansi (241, 242).

Eversole i saradnici (1982.) (243) nisu utvrdili udruženost RAU sa paradajzom, jagodama i orasima.

Tuft i *Ettleson* (1956.) (244), kao i *Wilson* (1980.) (245) su utvrdili povišenu učestalost atopije u pacijenata sa RAU, dok *Wray* i saradnici (1982.) (239) ne utvrđuju statistički značajnu razliku u incidenci atopije između pacijenata sa RAU i osoba iz kontrolne grupe.

1.6.1. Uloga glutena u etiologiji oralnih ulceracija

Intoleranca na pojedine antigene hrane, kao što je gluten iz zrna žitarica (gliadin), može biti jedan od uzročnika oralnih ulceracija (246).

Studija *O'Farrelly-a* i sar. (1991.) (129), se bavila ispitivanjem gluten senzitivnih oralnih ulceracija, u odsustvu gastrointestinalnih poremećaja (atrofije crevnih resica) i bolesti, koji su udruženi sa humanim odgovorom na pšenične proteine. U studiju je bilo uključeno 10 pacijenata sa RAU, kojima je rađena intestinalna biopsija, i čiji je nalaz potvrdio odsustvo celijačne bolesti. Četiri pacijenta su imala povišen nivo antitela na alfa gliadin, proteinsku frakciju iz zrna žitarica, a kod tri od ova četiri pacijenta, ulceracije su se povukle nakon terapije, koja je podrazumevala dijetu bez glutena (*engl. gluten-free diet*) (129).

Učestalost pacijenata sa RAU koji imaju celijačnu bolest (genetički determinisana, inflamatorna bolest creva, indukovana glutenom) (121) kreće se u intervalu od 4,0 – 16,7% (125, 126).

U studiji *Meini-a* i saradnika (1993.) (127), koja je obuhvatala 113 pacijenata sa celijačnom bolešću, 17,7% pacijenata je imalo RAU i iz tog razloga RAU mogu predstavljati “vodilje“ do dijagnoze celijačne bolesti, jer i kod celijakije, kao i kod svih drugih obolenja, pravovremena dijagnoza povećava uspešnost lečenja, a u nekih bolesti predstavlja i pola puta do izlečenja.

1.6.2. Uloga proteina kravljeg mleka u etiologiji oralnih ulceracija

Taylor i sar. (1964.) (247) su istraživali učestalost povišenog nivoa antitela u humanom serumu, na proteine mleka i gluten, u pacijenata sa obolenjima gastrointestinalnog trakta. Uočili su povećanu incidencu povišenog nivoa antitela u humanom serumu, u pacijenata sa aftoznim ulceracijama, major tipa.

Thomas i sar. (1973.) (238) su ispitivali moguća objašnjenja ove pojave; prisustvo pomenutih antitela može ukazivati na preosetljivost na proteine hrane i to se može smatrati primarnim uzročnikom oralnih ulceracija ili antitela mogu predstavljati normalan odgovor organizma na povišenu koncentraciju proteina kravljeg mleka, koji su difundovali kroz ulceracijom oštećenu sluzokožu. Koristeći tehniku pasivne hemaglutinacije u svom istraživanju, pomenuti naučnici su utvrdili statistički značajno više vrednosti antitela na proteine kravljeg mleka u pacijenata sa rekurentnim aftoznim ulceracijama, minor tipa i u pacijenata sa drugim akutnim i hroničnim ulceracijama sluzokože usta. *Thomas* i saradnici nisu odredili o kojoj klasi imunoglobulina je reč, tj, da li su to IgE, IgG, IgA ili IgM imunoglobulini.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U skladu sa najnovijim istraživanjima, koja su pokazala da antigeni hrane igraju bitnu ulogu u etiopatogenezi i toku pojedinih oboljenja, cilj ovog istraživanja je da se kod pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama odredi prisustvo:

- Imunoreaktivnosti na gliadin,
- Imunoreaktivnosti na proteine kravljeg mleka i
- Imunoreaktivnosti na specifične proteine kravljeg mleka -
 1. α -kazein (*α -casein*),
 2. β -kazein (*β -casein*),
 3. κ -kazein (*κ -casein*),
 4. α -laktalbumin (*α -lactalbumin*),
 5. laktoferin (*lactoferrin*),
 6. β -laktoglobulin A (*β -lactoglobulin A*),
 7. β -laktoglobulin B (*β -lactoglobulin B*).

3. PACIJENTI, MATERIJAL I METODE

Ispitivanje uloge imunoreaktivnosti na proteine hrane u etiopatogenezi rekurentnih oralnih ulceracija je podeljeno na klinički i laboratorijski deo.

3.1. IZBOR PACIJENATA

Klinički deo istraživanja je sproveden na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalni deo istraživanja je sproveden u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u okviru projekta 145006 "Istraživanje dejstava modifikatora biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima," Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. U ispitivanje je bilo uključeno ukupno 100 ispitanika, koji su bili podeljeni u dve grupe:

- eksperimentalnu i
- kontrolnu (K).

U eksperimentalnu grupu je bilo uključeno 50 pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Pre uključivanja u studiju, pacijentima su eliminisani svi etiološki faktori koji utiču na nastanak ROU, osim imunoreaktivnosti na proteine hrane. Svi pacijenti su morali da zadovolje kriterijum da imaju više od 18 godina.

Kontrolna grupa (K) je obuhvatala 50 zdravih osoba bez zdravstvenih tegoba i bez prisustva rekurentnih oralnih ulceracija. Oni su regrutovani među ljudima slične starosne dobi (kao i ispitanici eksperimentalne grupe), koji su bili bez znakova bolesti, a dobrovoljno su dali krv za analizu.

Prikupljanje uzoraka je obavljeno u periodu od maja 2006–oktobra 2008. Ispitanicima bi najpre bila objašnjena procedura istraživanja, a zatim bi potpisivali pisanu saglasnost o dobrovoljnom uključivanju u studiju.

Istraživanje je dobilo saglasnost Etičkog komiteta, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

3.2. METODE

Klinički deo istraživanja je obuhvatao anamnezu i stomatološki pregled.

Laboratorijski deo istraživanja se sastojao od kliničko-laboratorijskih testova:

- određivanja humoralne imunoreaktivnosti na proteine hrane (gliadin, ukupne proteine kravljeg mleka i specifične proteine kravljeg mleka) ELISA testom (*engl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) i
- određivanja ćelijske imunoreaktivnosti na proteine hrane tetrazolijumskim esejem u mikrokulturi (*engl. Microculture Tetrazolium Assay; MTA*).

3.2.1. Kliničko ispitivanje

Klinički deo ispitivanja se sastojao od:

- anamneze i
- stomatološkog pregleda.

Anamneza je obuhvatala podatke o:

- generalijama pacijenta,
- glavnim tegobama (peckanje, žarenje, suvoća usta, krvarenje),
- prisustvu, kvalitetu i karakteru bola,
- sadašnjoj bolesti (početak bolesti, prodromalni simptomi i tok bolesti),
- prisustvu i učestalosti recidiva,
- prisustvu ekstraoralnih promena (koža, oči, genitalna sluzokoža),

- lekovima i lekovitim sredstvima koje je pacijent koristio u cilju olakšanja tegoba,
- ličnoj anamnezi (prisustvo sistemskih obolenja),
- lekovima za lečenje prisutnih sistemskih obolenja,
- lošim navikama (disanje na usta, grickanje stranih predmeta, sisanje bombona, konzumacija alkohola, duvana i droga) i
- porodičnoj anamnezi.

Stanje oralne sluzokože je bilo verifikovano stomatološkim pregledom uz korišćenje stomatološkog ogledalca.

Klinički nalaz je obuhvatao:

- ekstraoralni nalaz (oči, koža lica, usne, limfne žlezde, tiroidna žlezda, temporomandibularni zglob - TMZ, pljuvačne žlezde, kranijalni nervi),
- intraoralni nalaz – lokalizacija, opis promene (oblik, veličina, ivice, dno, da li je solitarna ili multipla) i odnos promene prema nivou oralne sluzokože i
- procenu o pravilnom održavanju oralne higijene, prisustvu oboljenja parodontijuma i oštih ivica zuba, postojanju parafunkcija).

ISTRAŽIVAČKI KARTON

Datum _____

OPŠTI PODACI O PACIJENTU

Prezime i ime _____ Godina rođenja _____

Adresa _____ Telefon _____

Zanimanje _____

Glavne tegobe (peckanje, žarenje, suvoća usta, krvarenje....)

Bol da ne

Kvalitet: oštar tup pekući

Lokalizacija: unilateralni bilateralni centralni

Deklanširajući faktor: _____

Objektivni znaci: da ne

Reakcija na analgetike: _____

Trajanje bola: _____

Vreme pojavljivanja: _____

Ometa san: da ne

Egzacerbacija: _____

Sadašnja bolest

Početak bolesti _____

Prodromalni simptomi _____

Tok bolesti (poboljšanja, pogoršanja) _____

recidivira da ne vreme prve erupcije ako recidivira _____

učestalost recidiva _____

Prisustvo ekstraoralnih promena (koža, oči, genitalna sluzokoža) _____

Lekovi koje je pacijent uzimao pre početka simptoma _____

Lekovi i lekovita sredstva koje je koristio u cilju olakšanja tegoba _____

Lična anamneza

		<i>NE</i>	<i>DA</i>
KVS	oboljenja srca, hipertenzija, angina pectoris, sinkopa		
	operacije srca, reumatska groznica, endokarditis		
	poremećaji u krvarenju antikoagulantna terapija		
	anemija		
RS	astma, TBC, bronhitis i dr.		
GU	bubrezi, bešika, polne bolesti		
	trudnoća, menstruacija, kontracepcija		
GI	hepatitis, žutica, druga oboljenja jetre		
	čir na želucu, celiacia, Cronova bolest, ulcerozni kolitis i dr.		
CNS	gluvoća		
	šlog, MS, Parkinsonova bolest, druge neurološke bolesti		
	psihijatrijski problemi		
	epilepsija, konvulzije mentalna hendikepiranost		
END	Dijabetes mellitus Tireoidea druge bolesti		
HEM	Granulocitoza Granulocitopenija i agranulocitoza Ciklična neutropenija Kvalitativni poremećaji Le Leukemija, Mijelom, Limfom		
	Policitemija Anemija: mikrocitna hipohromna, Plummer-Vinson, megaloblastna, perniciozna itd.		
	Trombocitopenija Koagulopatije kao posledica lekova (dikumarol, aspirin, heparin...) Hemofilija A i B Von Willebrand		

Oralna higijena da ne pravilna nepravilna

Oboljenja parodontijuma: ne da _____

Oštre ivice zuba: ne da _____

Parafunkcije grickanje sluzokože da ne stiskanje zuba da ne

tiskanje jezika da ne bruksizam da ne

DIFERENCIJALA DIJAGNOZA _____

ORALNO MEDICINSKA DIJAGNOZA _____

PLAN TERAPIJE

lokalna _____

opšta _____

3.2.2. Laboratorijski testovi

Ispitanicima je intravenskom punkcijom uzimano po 10 ml nativne krvi, iz koje je izolovan serum i 10 ml heparinizirane krvi, iz koje su izolovane mononuklearne ćelije i plazma. Tokom ispitivanja prikupljenog materijala korišćene su sledeće metode:

- **ELISA test na:**
 1. gliadin,
 2. proteine kravljeg mleka i
 3. specifične proteine kravljeg mleka.

- **MTT test, tetrazolijumski esej u mikrokulturi sa:**
 1. gliadinom,
 2. proteinima kravljeg mleka i
 3. albuminom goveđeg seruma (BSA).

Određivanje imunoreaktivnosti na proteine hrane, gliadina (frakcija glutena) i proteina kravljeg mleka je određivana ELISA testom i tetrazolijumskim esejem u mikrokulturi (*engl. Microculture Tetrazolium Assay; MTT test*). Ispitivanje imunoreaktivnosti na specifične proteine kravljeg mleka je vršeno ELISA testom. Za određivanje imunoreaktivnosti na albumin goveđeg seruma (*engl. Bovine Serum Albumin; BSA*) korišćen je samo MTT test.

Sve metode su primenjene i na eksperimentalnu i na kontrolnu grupu.

Prilikom ispitivanja imunoreaktivnosti na gliadin, proteine kravljeg mleka i specifične proteine kravljeg mleka u istraživanje je bilo uključeno 50 pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama i 50 zdravih osoba.

3.2.2.1. Određivanje humoralne imunoreaktivnosti na proteine hrane ELISA testom (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

ELISA je senzitivni imunoesej, kod koga se koristi enzim vezan za antigen ili antitelo kao marker za detekciju specifičnog proteina (248, 249).

Nivo serumske IgA i IgG imunoreaktivnosti, kao procenat od pozitivne kontrole na proteine kravljeg mleka, specifičnih proteina kravljeg mleka i gliadina, određivan je ELISA testom.

Za ispitivanje imunoreaktivnosti prema proteinima kravljeg mleka i specifičnim proteinima kravljeg mleka (α -kazein, β -kazein, κ -kazein, α -laktalbumin, laktoferin, β -laktoglobulin A i β -laktoglobulin B) koriste se laboratorijske pozitivne kontrole, normirane u odnosu na standarde, tri različita seruma sa visokim nivoom IgA, IgG odnosno IgE imunoreaktivnosti prema proteinima kravljeg mleka (s obzirom da su različiti epitopi imunogeni u indukciji IgA, IgG ili IgE antitela). Rezultati za imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU/ml), kao procenat odgovarajuće pozitivne kontrole.

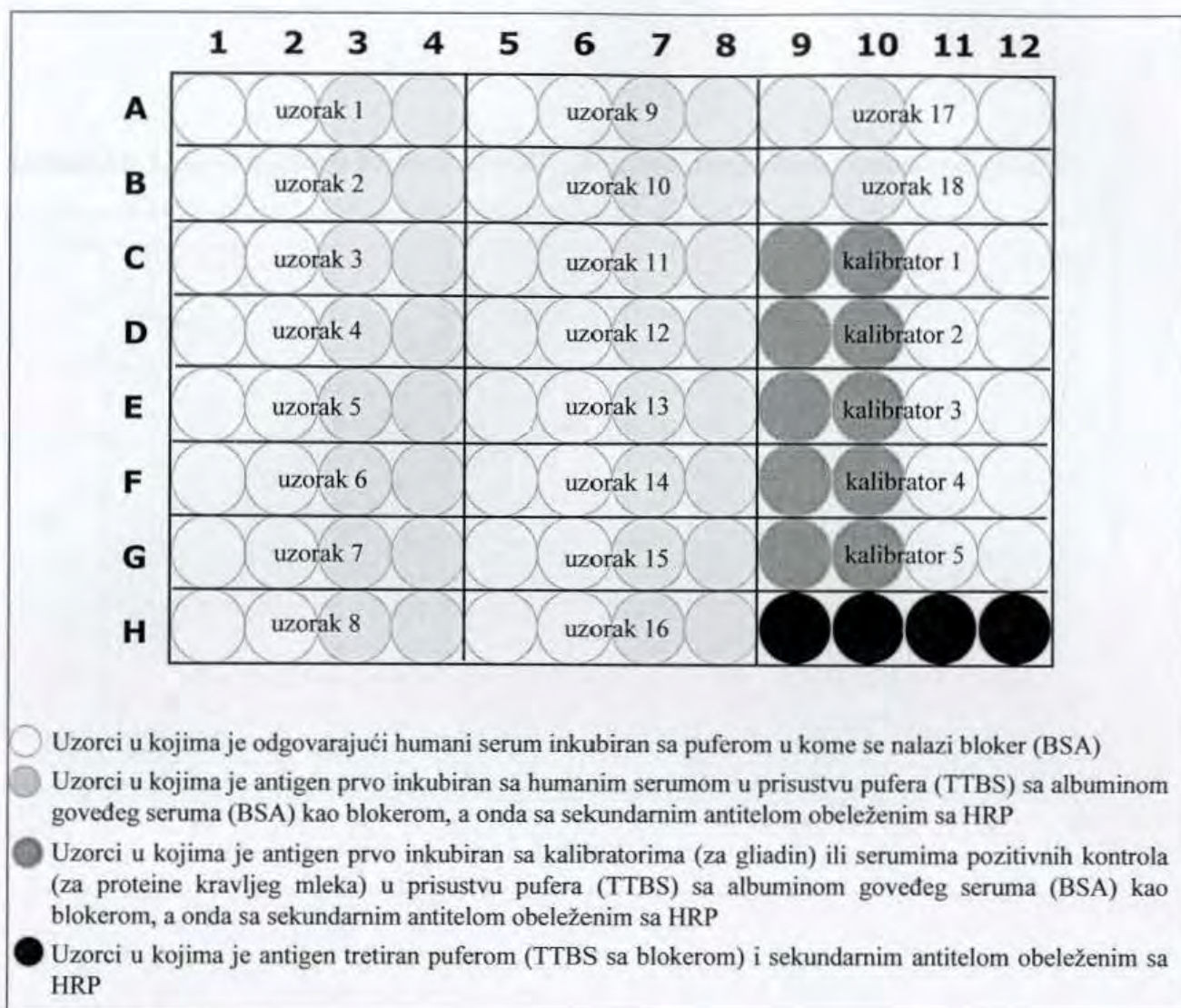
Kao pozitivne kontrole u ispitivanju imunoreaktivnosti na gliadin su korišćeni komercijalni kalibratori za IgA, odnosno IgG antitela (prizvođač *Binding Site, Birmingham, England*), a rezultati imunoreaktivnosti ispitivanih seruma su izraženi u internacionalnim jedinicama po mililitru seruma (IU/ml).

Proteini kravljeg mleka (0,1 mg/ml) i specifični proteini kravljeg mleka (5 μ g/ml) se rastvaraju u 0,05 M karbonatnom puferu pH 9,6, a gliadin (1 mg/ml) u 1% SDS-u, i ti rastvori se nalivaju u otvore mikrotitar ploča sa 96 rupica (100 μ l). Inkubacija ploča sa rastvorom kravljeg mleka i sa rastvorima specifičnih proteina kravljeg mleka se vrši na +4°C, a ploča sa rastvorom gliadina na sobnoj temperaturi. Vezani antigen (samo proteini kravljeg mleka i specifični proteini kravljeg mleka) se dvadesetičetiri sata kasnije ispira tri puta TTBS puferom (0,05% *Tween-20* u 20 mM *Tris-HCl*, 500 mM *NaCl*, pH 7,5) da bi se uklonio karbonat), pa se naliva 1% BSA u TTBS-u u otvore ploča i sve se inkubira 1 h. Ispira se pet puta, pa se naliva 50 μ l, 1% humanog seruma u 1% BSA u TTBS-u. Ploče se ispiraju četiri puta TTBS-om, nakon jednog sata, i nalivaju rastvorima antihumanog ovčijeg IgA ili antihumanog ovčijeg IgG, konjugovanog sa HRP (*engl. Horseradish peroxidase*; HRP). Po isteku 60 minuta,

ploče se ispiraju pet puta TTBS-om i dodaje se 100 μ l 0,7 mg/ml ortofenildiamina (*engl. Ortho Phenylene Diamine*; OPD) u 0,15 M citratnom puferu pH 5,5 sa 1 μ l/ml 12% H_2O_2 . Razvoj boje se zaustavlja petnaest minuta kasnije, dodavanjem 50 μ l H_2SO_4 i meri apsorbancu rastvora na 492 nm u odnosu na 630 nm.

Izračunavanje nivoa imunoreaktivnosti za ispitivane antigene se vrši tako što se od srednje vrednosti apsorbance (A 492,630) uzoraka, u kojima je antigen prvo inkubiran sa humanim serumom u prisustvu pufera (TTBS) sa albuminom govedeg seruma (BSA) kao blokerom, a onda sa sekundarnim antitelom obeleženim sa HRP (Ap), oduzmu srednje vrednosti apsorbanci odgovarajuće dve slepe probe. Prva slepa proba je apsorbancu uzorka u kome je odgovarajući humani serum inkubiran sa puferom u kome se nalazi bloker (da bi se oduzela imunoreaktivnost serumskih antitela prema blokeru), (As1). Druga slepa proba predstavlja srednju vrednost apsorbanci uzoraka u kojima je antigen tretiran puferom (TTBS sa blokerom) i sekundarnim antitelom obeleženim sa HRP (As2) (Šema 1).

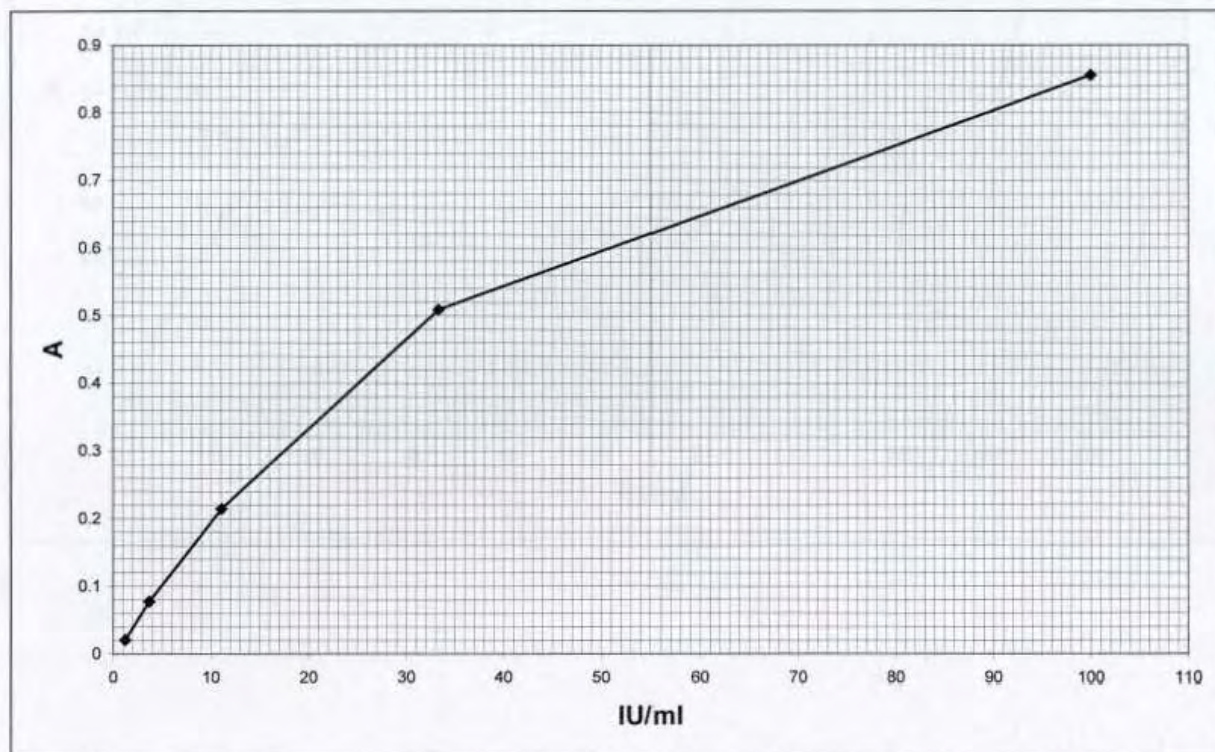
Šema 1. Postavka ELISA eksperimenta u ploči sa 96 otvora.



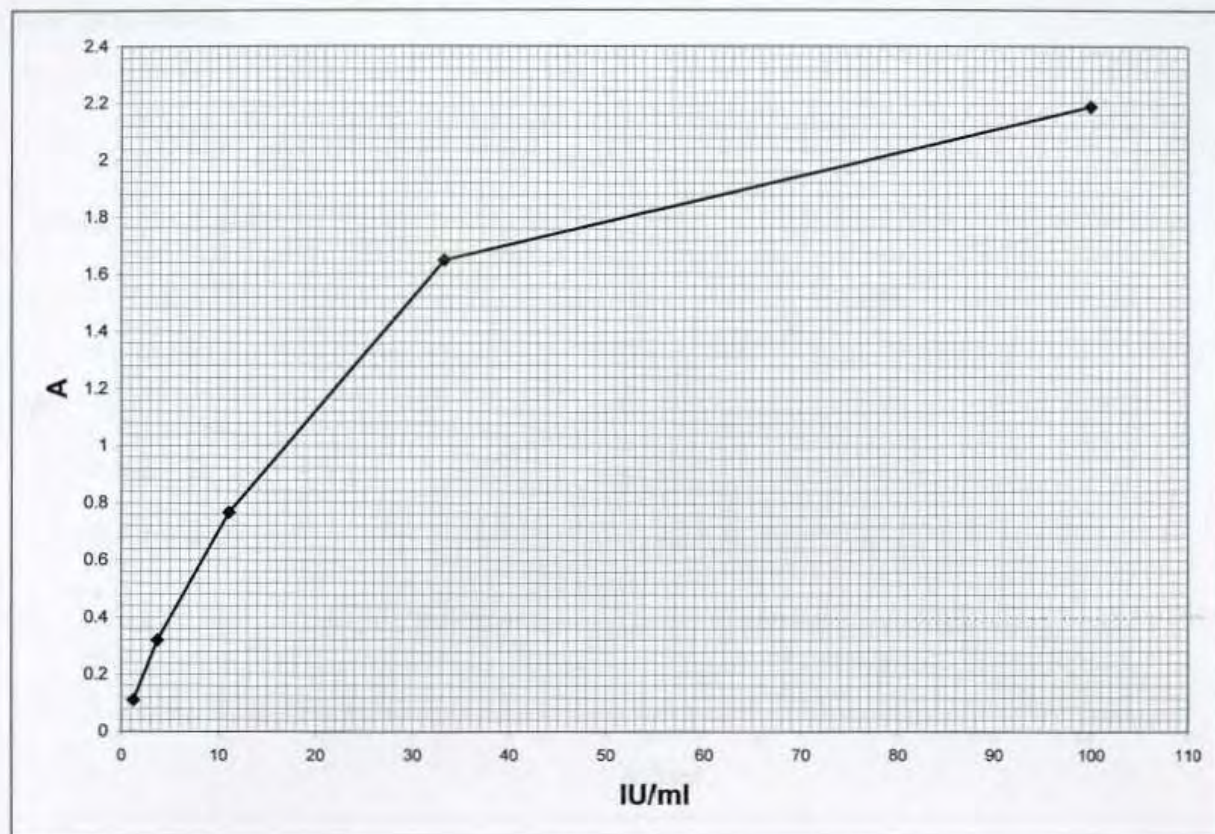
Nivo imunoreaktivnosti za svaki od uzoraka se određuje sa kalibracione krive, koja se konstruiše, tako što se na ordinatu nanesu apsorbance ($A_{492\text{ nm}}$, $A_{630\text{ nm}}$), a na apscisu koncentracije antitela za pozitivne kontrole izražene u internacionalnim jedinicama (IU/ml seruma) za gliadin (Grafikoni 1 i 2), tj. u arbitrarnim jedinicama (AU/ml seruma) za proteine kravljeg mleka (Grafikoni 3, 4 i 5). Prilikom određivanja imunoreaktivnosti na gliadin, kao pozitivne kontrole se koriste komercijalni kalibratori firme *Binding Site*, dok se prilikom određivanja imunoreaktivnosti na proteine kravljeg mleka koriste laboratorijske pozitivne kontrole, normirane u odnosu na standarde (tri različita seruma sa visokim nivoom IgA, IgG, odnosno IgE imunoreaktivnosti prema proteinima kravljeg mleka).

Iz dobijenih krivih, koje se prave za svaki eksperiment, se očitavaju vrednosti za dati antigen.

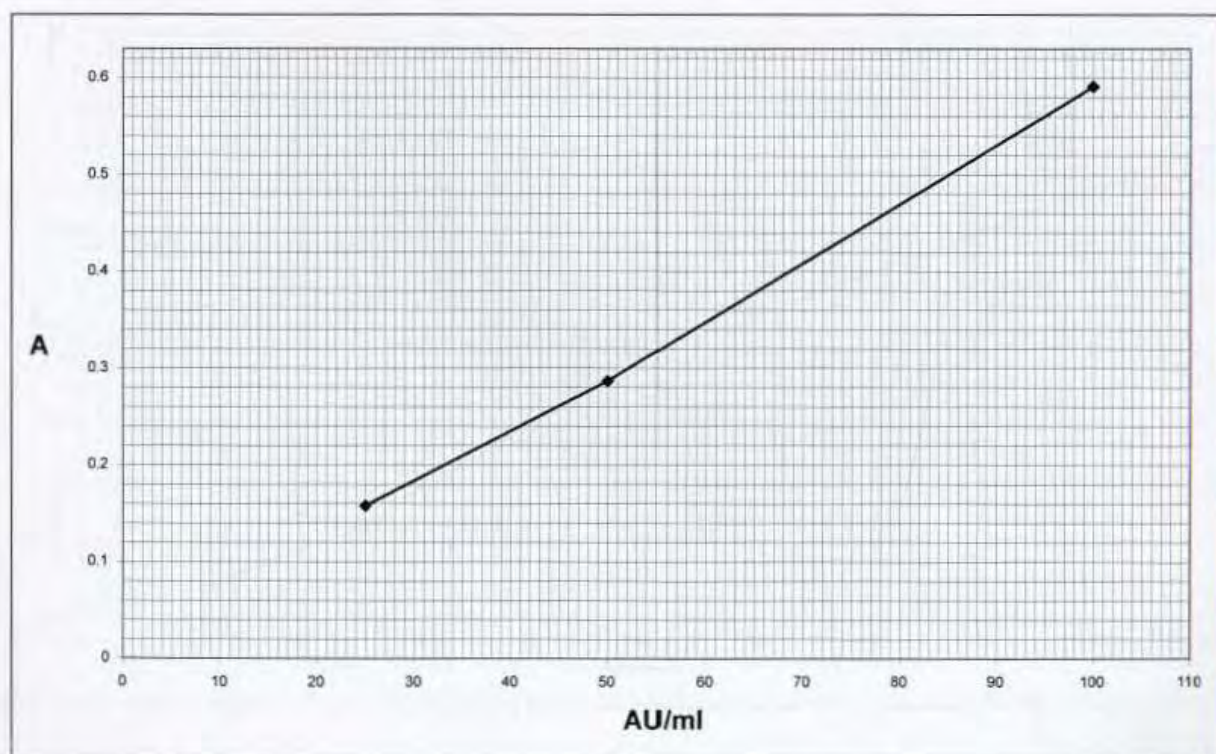
Grafikon 1. Kalibraciona kriva za određivanje IgA imunoreaktivnosti na gliadin.



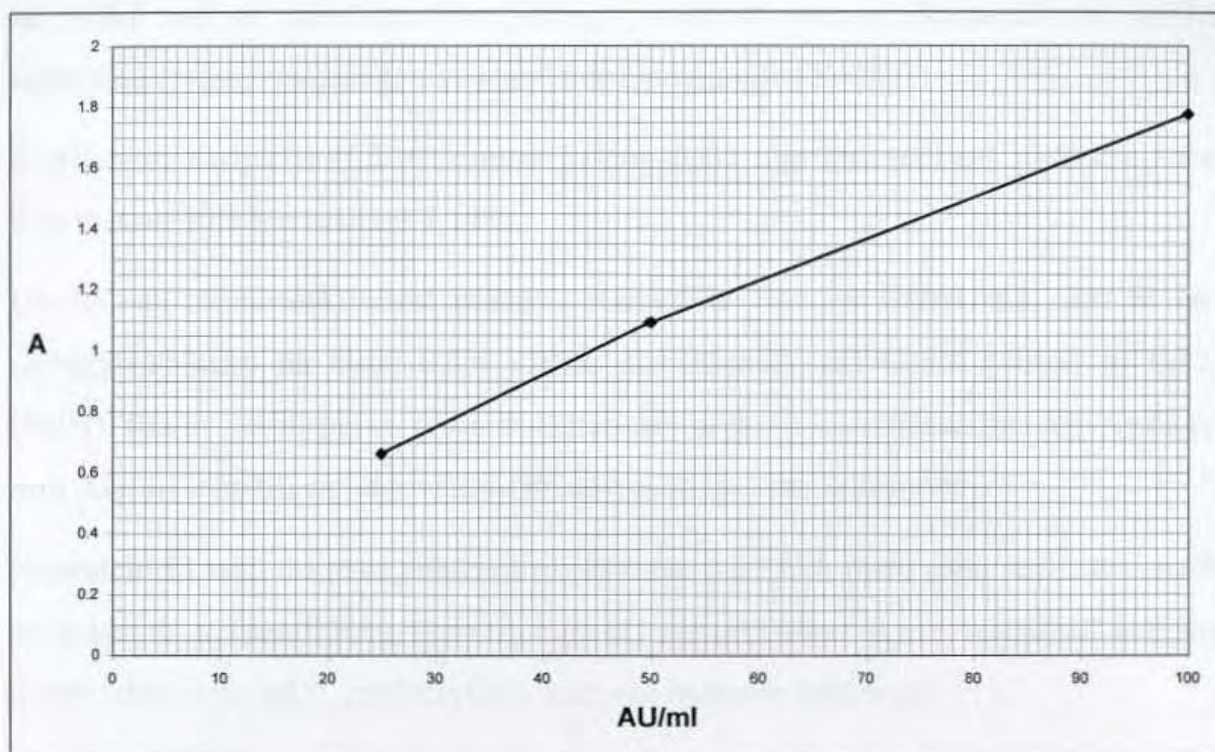
Grafikon 2. Kalibraciona kriva za određivanje IgG imunoreaktivnosti na gliadin.



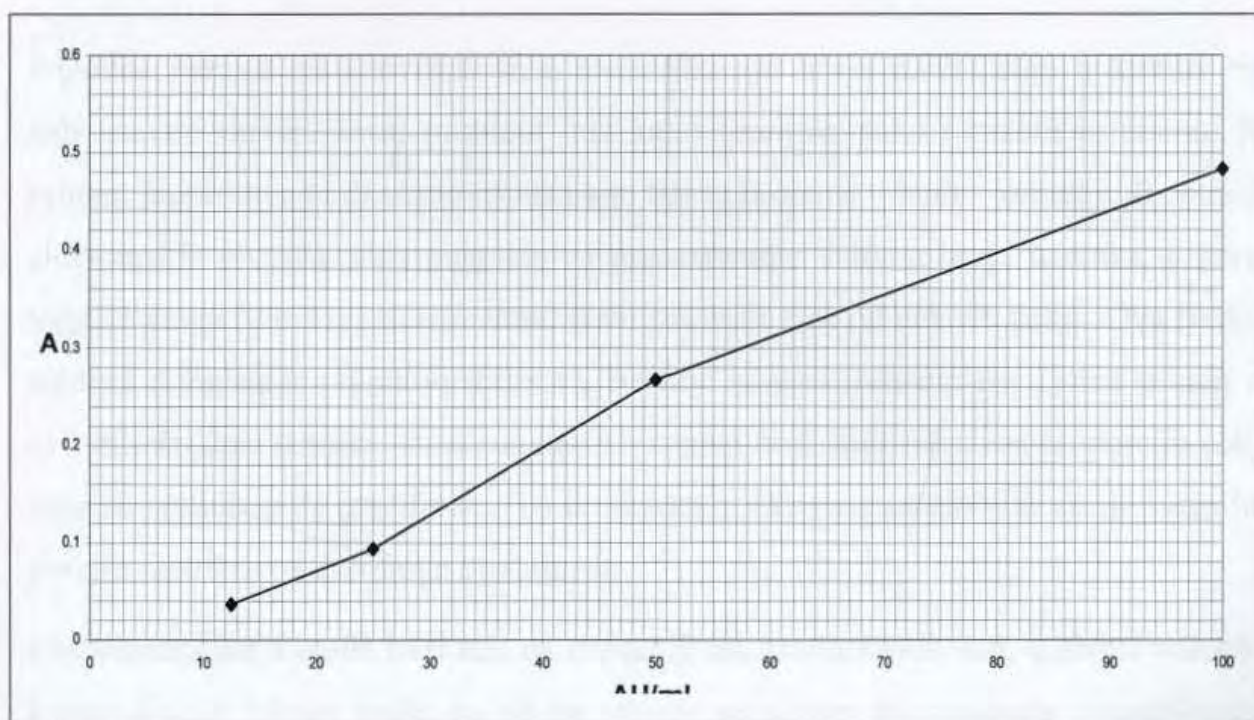
Grafikon 3. Kalibraciona kriva za određivanje IgA imunoreaktivnosti na proteine kravljeg mleka.



Grafikon 4. Kalibraciona kriva za određivanje IgG imunoreaktivnosti na proteine kravljeg mleka.



Grafikon 5. Kalibraciona kriva za određivanje IgE imunoreaktivnosti na proteine kravljeg mleka.



Granična vrednost je određena na osnovu humoralne imunoreaktivnosti prema ispitivanim antigenima, zdravih kontrolnih osoba, kojih je bilo 50. Granične vrednosti za svaki test su određene kao srednja vrednost imunoreaktivnosti za ispitivane kontrolne osobe uvećana za dve standardne devijacije ($X+2SD$).

Koeficijent varijacije (CV%) unutar jednog testa nije bio veći od 10,6%, a između više testova nije bio veći od 7,14%.

Ukoliko je imunoreaktivnost nekog seruma bila viša od 100AU/ml, tada bi serum razblaživali tako da bude 0,5% (200x razblaženje), pa 0,25% (400x) ili 0,125% (800x), (da bi dobili pravu imunoreaktivnost) onda bi sa kalibracione krive očitavani broj AU/ml množili sa odgovarajućim sekundarnim razblaženjem.

Neproteinski rastvori nisu pokazali reaktivnost u ELISA testu (bila je 0), što znači da ne dolazi do nespecifičnog vezivanja, pa iz toga proizilazi da sve vrednosti, dobijene u ovom testu, veće od 0, predstavljaju neki vid imunoreaktivnosti.

3.2.2.2. Određivanje ćelijske imunoreaktivnosti na proteine hrane - Tetrazolijumski esej u mikrokulturi (*Microculture Tetrazolium Assay* – MTA)

Pogodne metode za nedvosmislenu kvantifikaciju broja živih ćelija u kulturi nije jednostavno razviti. Ovaj problem ima kako teorijsku tako i praktičnu stranu. Na primer, jednostavne i direktne tehnike kao što su brojanje u hemocitometru ili pomoću elektronskih brojača, nisu pogodne za procesovanje velikog broja uzoraka, a pored toga ne mogu (u nekim slučajevima) diskriminisati žive od neživih ćelija. Ova tvrdnja zahteva definisanje pojma vijabilnosti, što nije sasvim jednostavno. Dobar primer za ovu dilemu daje tehnika označena kao klonogeni esej, koji odražava proporciju ćelija koje su sposobne da proliferišu. To u određenoj eksperimentalnoj situaciji može biti previše restriktivna definicija vijabilnosti.

Kolorimetrijske metode bazirane na redukciji tetrazolijumskih soli, u formi nekoliko komercijalnih kitova našle su se na tržištu sa ciljem da omoguće kvantifikaciju ćelijske proliferacije. Tetrazolijumske soli se u metabolički aktivnim, živim ćelijama, brzo redukuju do formazana. S obzirom da su formazani intenzivno obojeni ove soli

moгу biti kolorimetrijski reagens za citohemijsku kvantifikaciju broja metabolički aktivnih ćelija. Tetrazolijumska so se dodaje u mikrokulture ćelija zasadenih u mikrotitar pločama sa 96 rupica i zatim se produkovan formazan meri spektrofotometrijski (250).

Ovaj sistem koji koristi pogodne mikrotitar ploče, omogućava da se za kratko vreme obradi veliki broj uzoraka.

3.2.2.2.1. Tetrazolijumske soli i produkcija formazana

Tetrazolijumske soli se lako redukuju, i otvaranje heterocikličnog tetrazolijumskog prstena rezultira u stvaranju formazana. Tetrazolijumske soli koje se danas koriste relativno su stabilne, rastvorljive u vodi i njihova boja varira od bele do žute. Njihova najbitnija karakteristika je da su posle redukcije formazani koji od njih nastaju intenzivno obojeni.

Mosman (1983.) je opisao prvi MTA test za praćenje "ćelijskog rasta i preživljavanja," (250) koji je koristio *metil tiazolil*, tetrazolijumsku so, poznatu kao MTT.

Sa povećanim korišćenjem tehnologije mikrotitar ploča, MTT je primenjen na brojne varijetete MTA testa u cilju praćenja ćelijske proliferacije ili suprotno tome ubijanja ćelija.

3.2.2.2.2. MTT test - protokol

Proliferacija mononuklearnih ćelija periferne krvi se određuje MTT testom prema metodi *Mosmann-a* (1983.) (250) i modifikovanoj od *Ohno-a i Abe-a* (1991.) (251).

Iz pune heparinizirane krvi su izolovane plazma i mononuklearne ćelije periferne krvi (*engl. Peripheral blood mononuclear cells; PBMC*) centrifugiranjem u gradijentu gustine pomoću *Lymphoprep-a* (*Nycomed, Oslo, Norway*). PBMC sa interfaze su isprane tri puta *Haemaccel-om* (vodeni rastvor 145 mM Na^+ , 5.1 mM K^+ , 6.2 mM Ca^{2+} , 145 mM Cl^- i 35 g/L polimera želatina, pH 7,4) resuspendovane u hranljivom medijumu (*RPMI-1640*) i izbrojane.

Potom je napravljeno 2,5 ml *RPMI-1640* podloge sa 30% plazmom (finalna koncentracija plazme je 10%) i sipano po 50 μ l podloge u ploču.

Zatim je napravljena suspenzija PBMC (3×10^6 / ml) u *RPMI-1640* podlozi i sipano je u otvore ploče po 50 μ l suspenzije PBMC ili podloge bez dodataka.

Pripreme se radni rastvori glijadina (75 μ g/ml i 150 μ g/ml), proteina kravljeg mleka (500 μ g/ml i 1000 μ g/ml) i BSA (1000 μ g/ml) u podlozi. Dva sata kasnije dodaje se po 50 μ l rastvora glijadina, kravljeg mleka i BSA, izuzev u kontrolne otvore ploče, gde se dodaje samo hranljiva podloga po Šemi 2:

Šema 2. Nalivanje rastvora ispitivanih antigena u ploču sa 96 otvora.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	[Diagram showing 12 wells in row A]											
B	50 μ l podloge											
C	50 μ l glijadina (25 μ g/ml)											
D	50 μ l glijadina (50 μ g/ml)											
E	50 μ l proteina kravljeg mleka (167 μ g/ml)											
F	50 μ l proteina kravljeg mleka (333 μ g/ml)											
G	50 μ l BSA (333 μ g/ml)											
H	[Diagram showing 12 wells in row H]											

Finalne koncentracije glijadina su 25 μ g/ml i 50 μ g/ml, kravljeg mleka 167 μ g/ml i 333 μ g/ml, a primenjena koncentracija BSA je 333 μ g/ml. Finalna koncentracija glijadina je određena na osnovu činjenice da spektrofotometrijski 10 mg/ml proteina na 280 nm ima apsorbancau 10 u kiveti od 1 cm (252).

Nakon sedamdeset dva sata inkubacije po 20 μ l MTT rastvora (5 mg/ml u PBS-u) dodaje se u svaki otvor ploče, koja se zatim inkubira četiri sata na 37 °C u atmosferi vazduha zasićenog vodenom parom sa 5% *CO*₂. Četiri sata kasnije 100 μ l 10% SDS-a dodaje se u otvore ploče i meri apsorbanca na 570 nm sledećeg dana.

Nakon analize kalibracione krive ($n=kA$), gde je utvrđeno da je apsorbanca MTT tretiranih PBMC, direktno srazmerna broju zasejanih ćelija, može se odrediti preživljavanje PBMC. Za određivanje PBMC preživljavanja (S%) apsorbanca na 570 nm uzorka sa PBMC, koje su rasle u prisustvu ispitivanih antigena je podeljena

apsorbancom kontrolnih PBMC i pomnožena faktorom 100 prema formuli (uzimajući da je preživljavanje PBMC u kontrolnom redu B jednako 100%):

$$S(\%) = \frac{A_U}{A_K} \cdot 100$$

Gde je:

A_U - optička gustina uzorka PBMC stimulisanih mlekom, glijadinom ili sa BSA

A_K - optička gustina kontrolnih PBMC

3.3. STATISTIČKA METODOLOGIJA

Prilikom statističke obrade eksperimentalnih podataka korišćeno je sledeće:

1. Za opis parametara od značaja α u zavisnosti od njihove prirode, korišćene su frekvencije, procenti, uzoračka srednja vrednost, uzoračka medijana, uzoračka standardna devijacija i rang.
2. Za ispitivanje normalnosti raspodele parametara korišćeni su:
 - testovi: *Kolmogorov-Smirnov test* i *Shapiro-Wilk test*
 - grafici: *Histogram* i *Normal Q-Q Plot*
3. Za testiranje razlika između parametara α u zavisnosti od njihove prirode, korišćeni su: *Pearson's Chi-squared test* i *Wilcoxon rank sum test with continuity correction*.

Statistička obrada podataka je rađena u statističkim paketima:

- *SPSS 10.0 for Windows*
- akademskom „open source“ statističkom paketu *R - Bell Laboratories (John Chambers and colleagues)*.

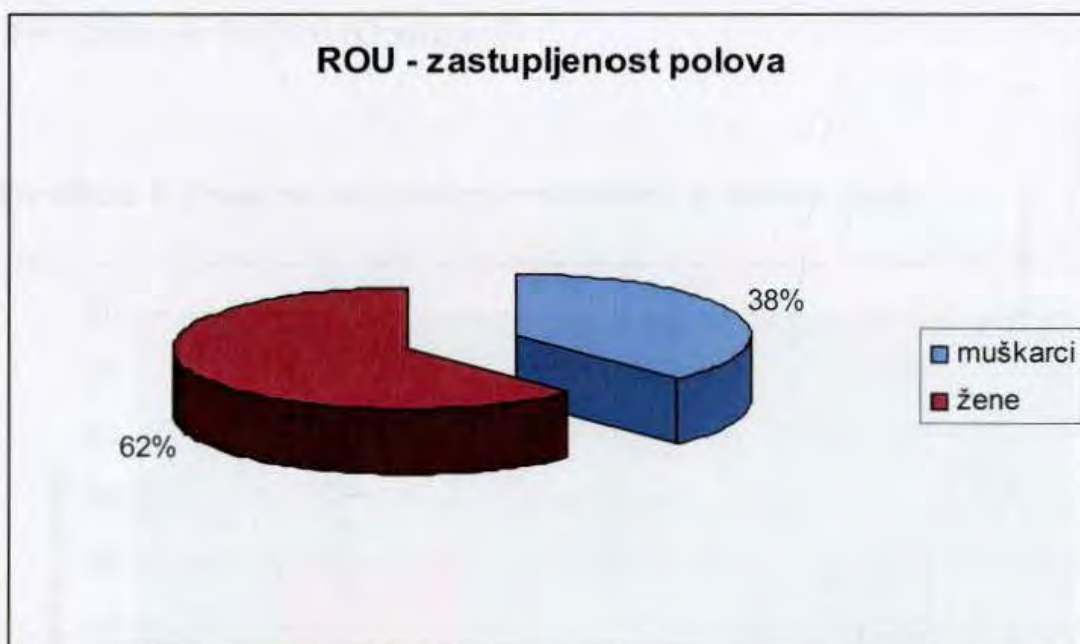
Za grafičke prikaze je korišćen *Microsoft Office Excel 2003* i *GraphPad Prism 4*.

4. REZULTATI

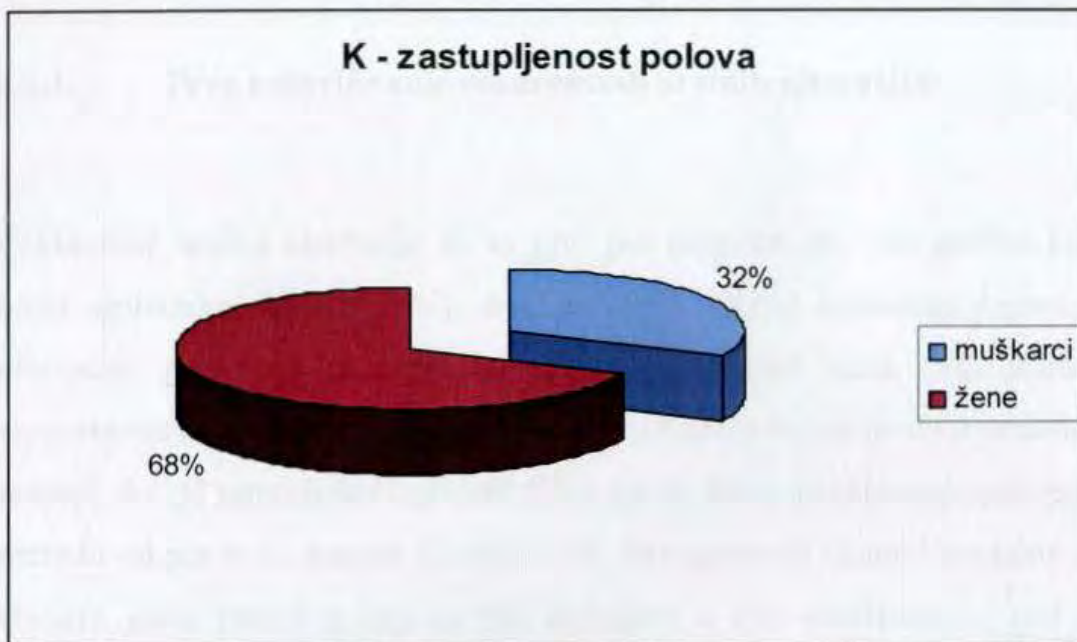
Analizom prikupljenih podataka u toku istraživanja, došli smo do sledećih rezultata: Studijom je bilo obuhvaćeno 50 pacijenata sa rekurentnim oralnim ulceracijama (eksperimentalna grupa) i 50 kontrolnih zdravih osoba (kontrolna grupa). Eksperimentalnu grupu je činilo 19 (38%) muškaraca i 31 (62%) žena (Grafikon 6), dok je kontrolnu grupu sačinjavalo 16 (32%) muškaraca i 34 (68%) žene (Grafikon 7). Nije bilo statističke značajnosti u zastupljenosti polova između eksperimentalne i kontrolne grupe; (Pirsonov hi-kvadrat test (*engl. Pearson Chi-squared Test*): $\chi^2=0.396$; $df=1$; $p=0.52937$).

Kod ispitanika nisu registrovane ekstraoralne promene, negirali su prisustvo sistemskih obolenja i nisu koristili lekove.

Grafikon 6. Zastupljenost polova u eksperimentalnoj grupi.

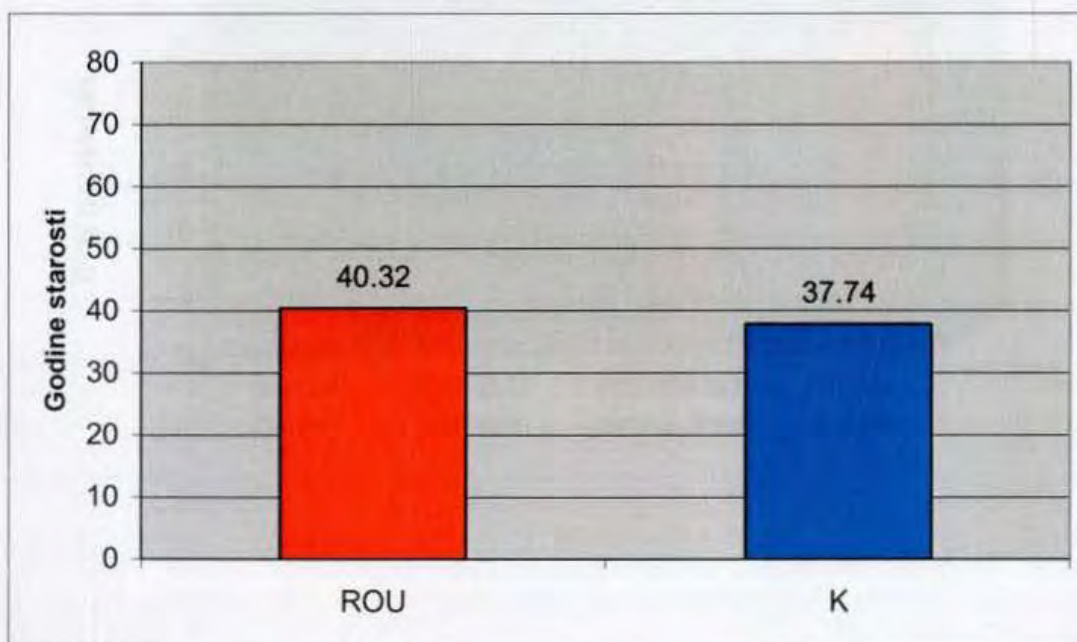


Grafikon 7. Zastupljenost polova u kontrolnoj grupi.



Prosečna starost eksperimentalne grupe je bila 40.32 godine, dok je prosečna starost kontrolne grupe iznosila 37.74 god. Nije bilo statistički značajne razlike između prosečne starosne dobi dve ispitivane grupe; (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta (*engl. Wilcoxon rank sum test with continuity correction*): $W= 1259.5$; $p= 0.9505$) (Grafikon 8).

Grafikon 8. Prosečna starost eksperimentalne i kontrolne grupe.

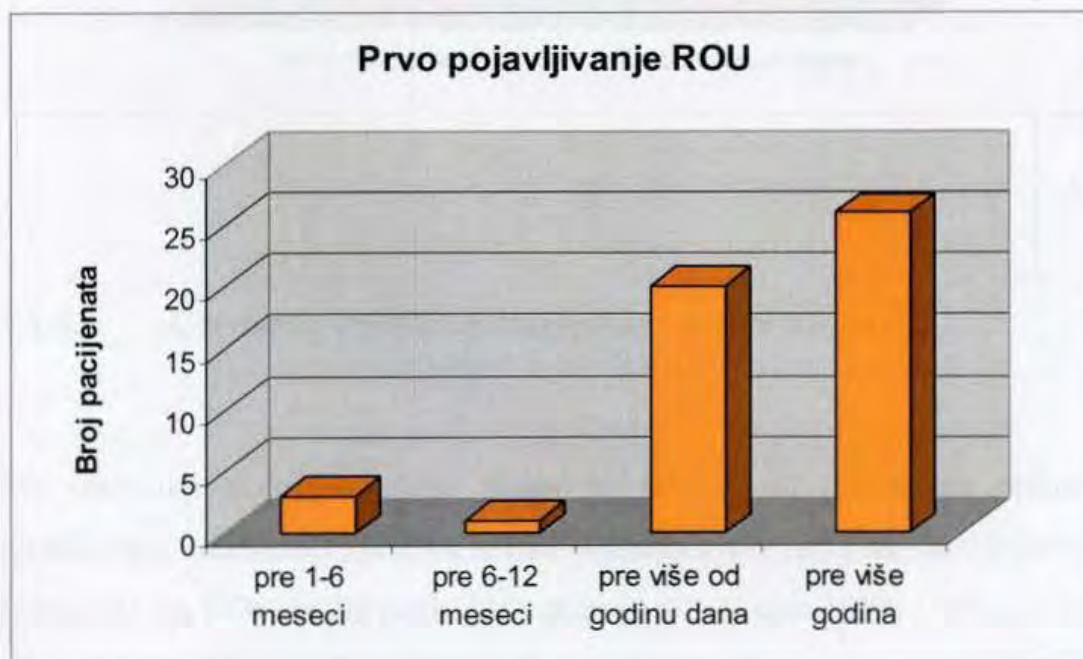


4.1. KLINIČKO ISTRAŽIVANJE

4.1.1. Prvo pojavljivanje rekurentnih oralnih ulceracija

Rekurentne oralne ulceracije su se prvi put pojavile pre više godina kod najvećeg broja ispitanika, 26/50 (52%), dok je 20/50 (40%) ispitanika izjavilo da su se ulceracije prvi put pojavile pre više od godinu dana. Tri ispitanika (6%) eksperimentalne grupe su navela da su se promene prvi put javile u periodu od pre 1-6 meseci, dok je samo jedan ispitanik (2%) naveo da su se ulceracije prvi put pojavile u periodu od pre 6-12 meseci (Grafikon 9). Svi ispitanici eksperimentalne grupe, osim članova jedne porodice koji su bili uključeni u ovo istraživanje i kod kojih su se pojavljivale rekurentne oralne ulceracije, negirali su prisustvo ROU kod nekog od članova svoje porodice.

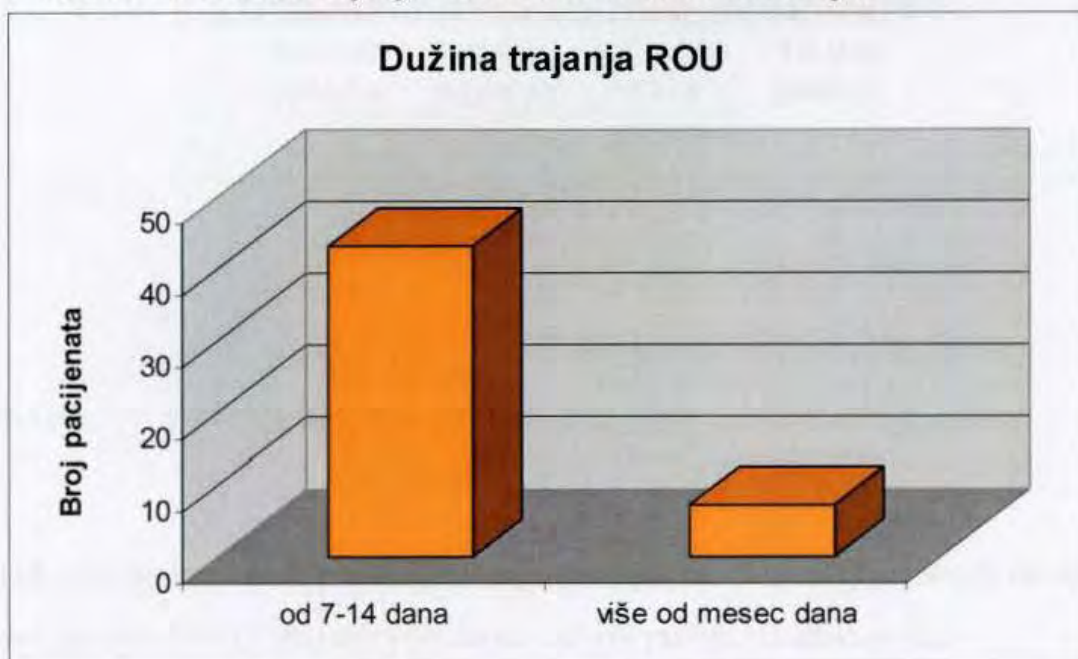
Grafikon 9. Prvo pojavljivanje rekurentnih oralnih ulceracija.



4.1.2. Dužina trajanja rekurentnih oralnih ulceracija

Najveći broj ispitanika, 43/50 (86%) je izjavio da im rekurentne oralne ulceracije traju (tj. zarastaju) od 7-14 dana, dok je 7/50 (14%) ispitanika naveo da im ROU zarastaju duži vremenski period (mesec i više od mesec dana) (Grafikon 10).

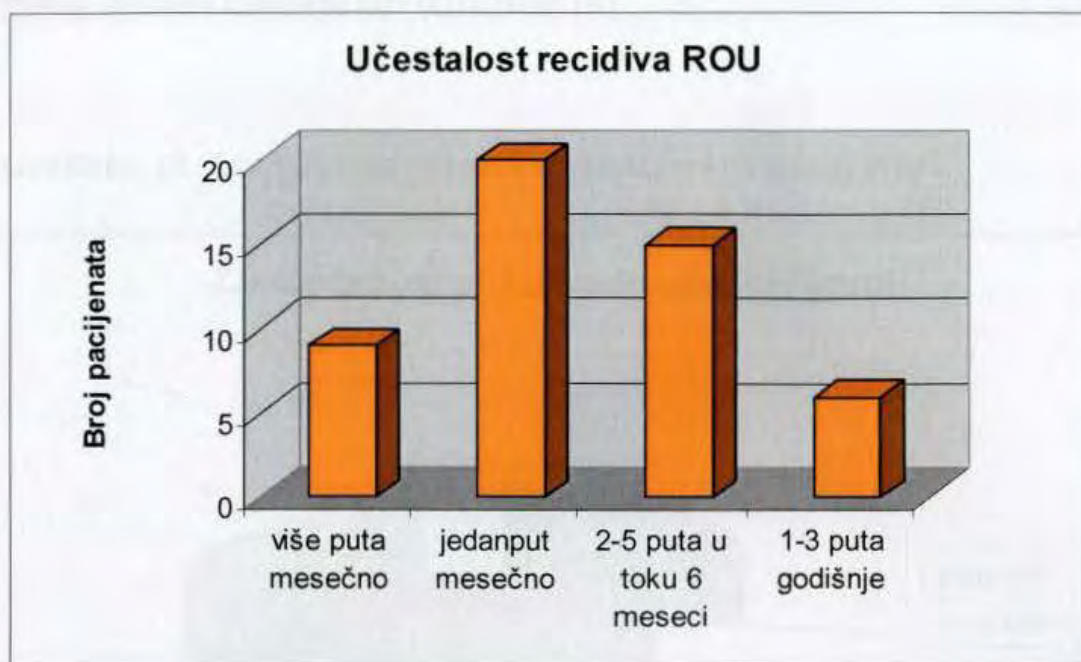
Grafikon 10. Dužina trajanja rekurentnih oralnih ulceracija.



4.1.3. Učestalost recidiva rekurentnih oralnih ulceracija

Svi ispitanici eksperimentalne grupe su izjavili da rekurentne oralne ulceracije recidiviraju. Učestalost recidiva je kod ispitanika bila različita, 20/50 (40%) ispitanika je izjavilo da ROU recidiviraju jedanput mesečno, njih 15/50 (30%) je izjavilo da je učestalost recidiva od 2-5 puta u toku 6 meseci, dok su se u 9/50 (18%) ispitanika recidivi javljali više puta mesečno. Samo 6/50 (12%) ispitanika je izjavilo da do recidiva dolazi od 1-3 puta u toku jedne godine (Grafikon 11).

Grafikon 11. Učestalost recidiva rekurentnih oralnih ulceracija.



4.1.4. Pušenje kao loša navika

Od svih ispitanika eksperimentalne grupe, njih 45/50 (90%) je navelo da su nepušači, dok je njih 5/50 (10%) izjavilo da su aktivni pušači (Grafikon 12).

Grafikon 12. Zastupljenost pušača i nepušača u eksperimentalnoj grupi.



U kontrolnoj grupi 13/50 (26%) ispitanika je navelo da puši, dok su se njih 37/50 (74%) izjasnili kao nepušači (Grafikon 13).

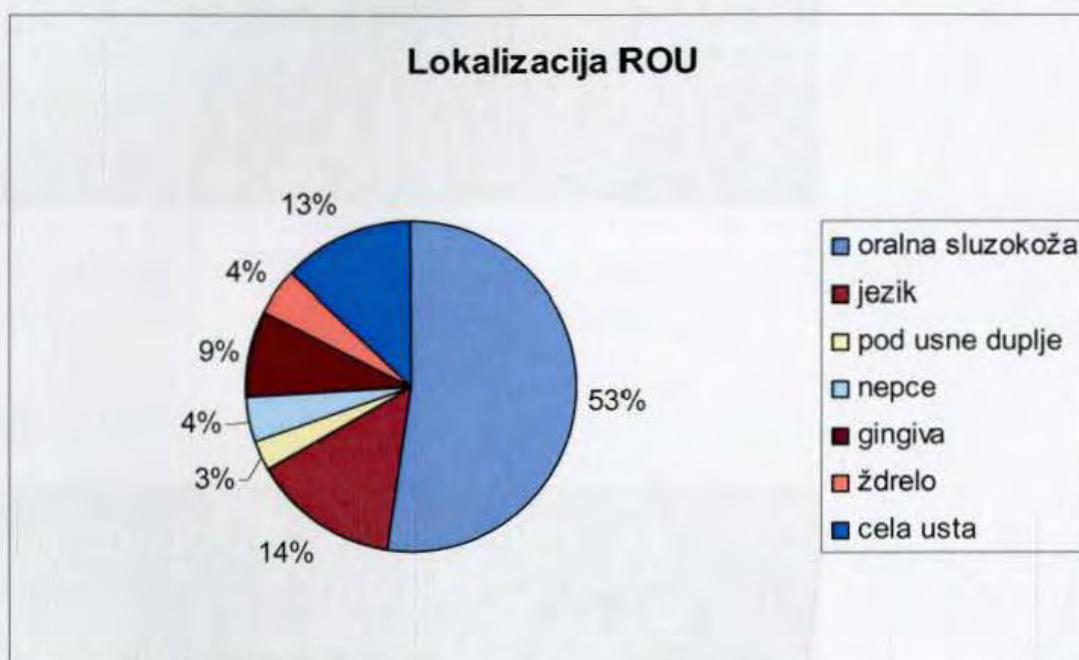
Grafikon 13. Zastupljenost pušača i nepušača u kontrolnoj grupi.



4.1.5. Lokalizacija rekurentnih oralnih ulceracija

Najčešća lokalizacija na kojoj su se javljale rekurentne oralne ulceracije u ispitanika eksperimentalne grupe, bila je sluzokoža obraza (bukalna) i sluzokoža unutrašnje strane usana (labijalna) (53%), zatim jezik (14%), dok su se u 13% slučajeva ROU javljale po celim ustima (Grafikon 14).

Grafikon 14. Lokalizacija rekurentnih oralnih ulceracija u ispitanika eksperimentalne grupe.



Slika 1(a i b). Oralne ulceracije na sluzokoži u gornjem forniksu.

a) *Oralna ulceracija na donjoj strani jezika.*



b) *Oralna ulceracija na donjoj strani jezika.*

b)



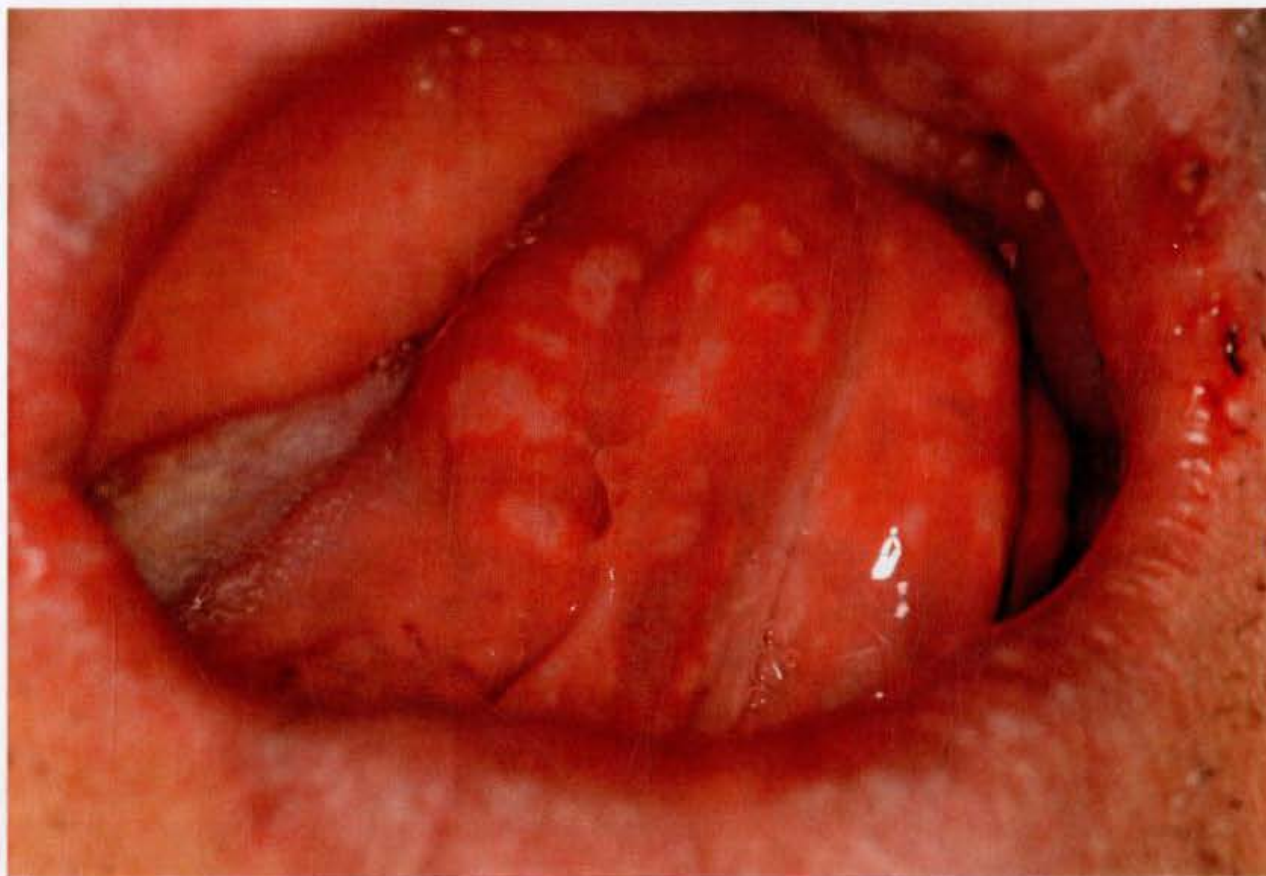
Slika 2. Oralna ulceracija na bočnoj strani jezika.



Slika 3. Oralne ulceracije na dorzalnoj strani jezika.



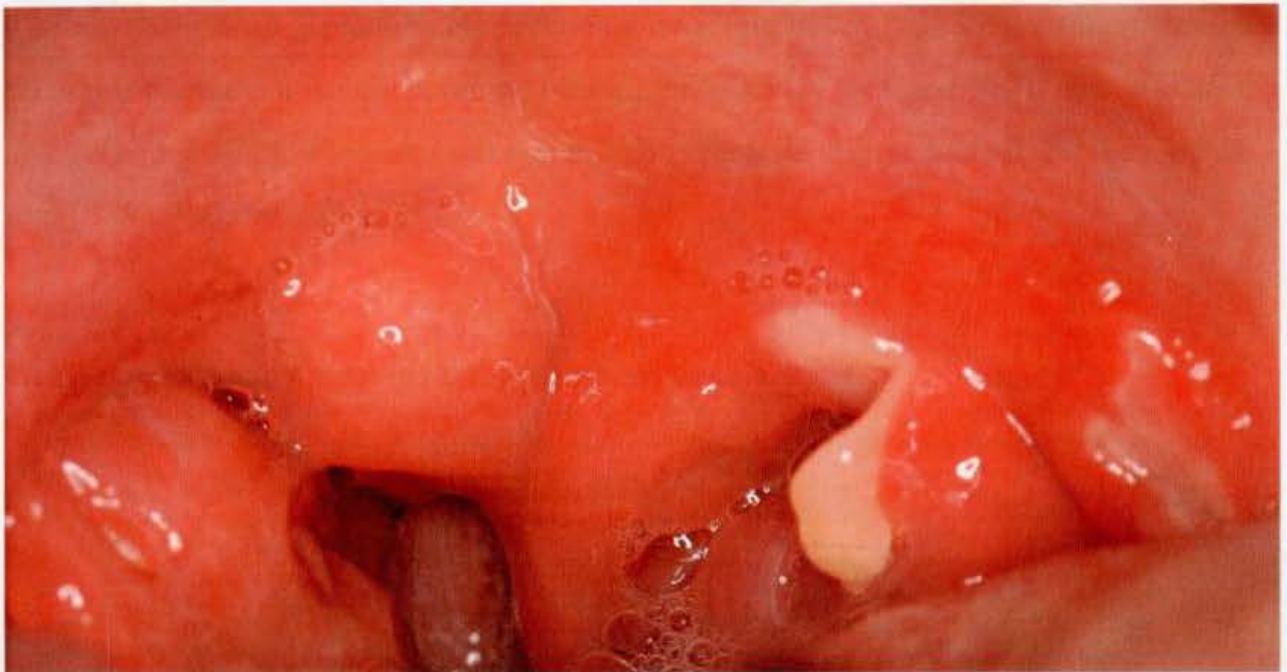
Slika 4. Oralne ulceracije na ventralnoj strani jezika.



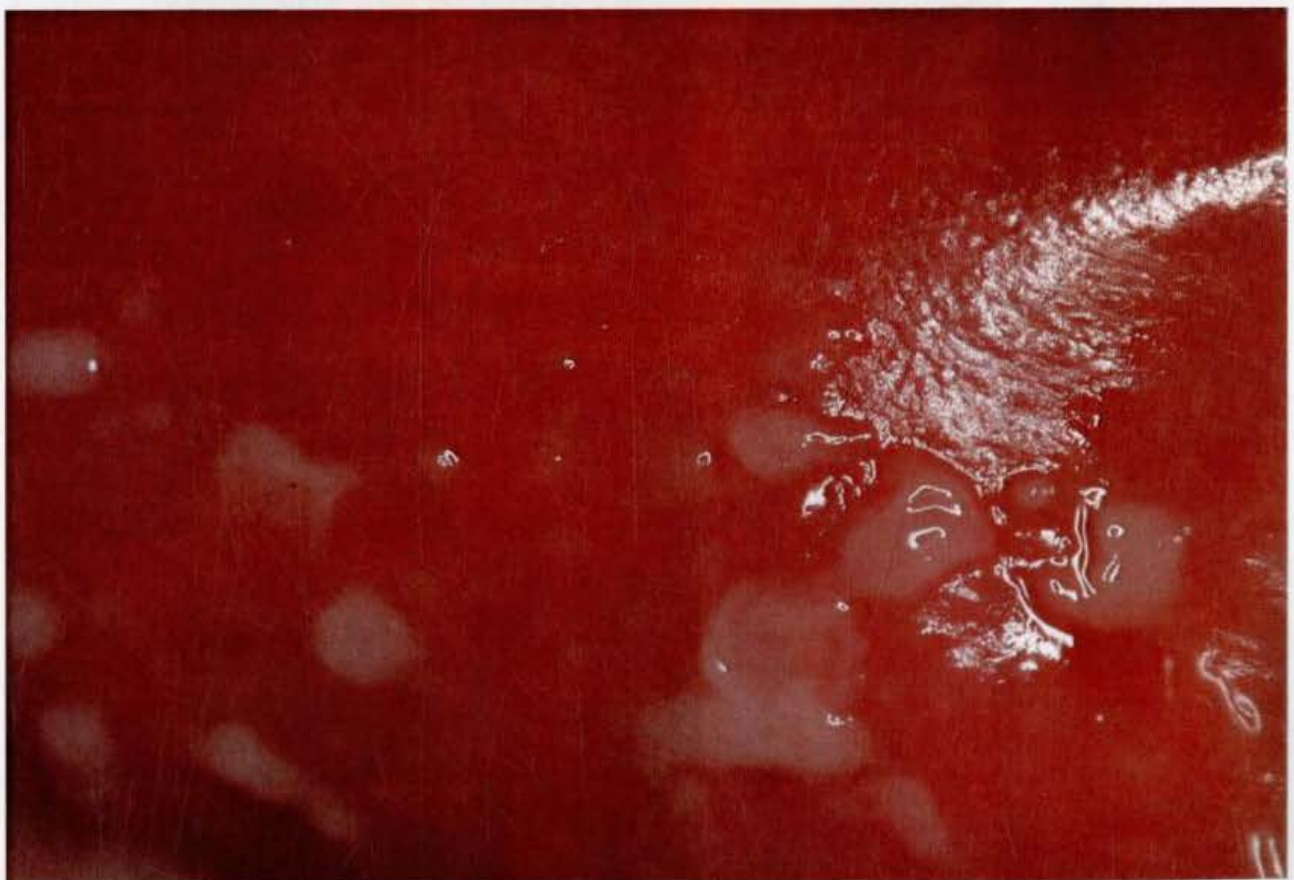
Slika 5. Oralne ulceracije na nepcu.



Slika 6. Oralna ulceracija u ždrelu.



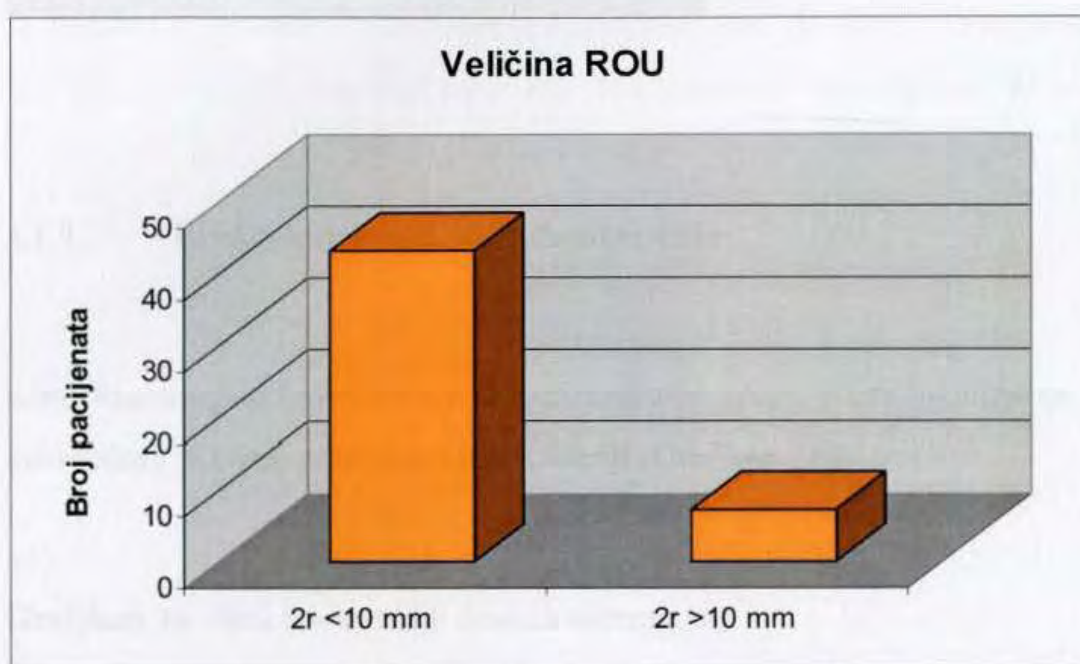
Slika 7. Milijarne ulceracije na oralnoj sluzokoži.



4.1.6. Veličina rekurentnih oralnih ulceracija

Kod najvećeg broja ispitanika eksperimentalne grupe (43/50), tj. 86%, evidentirane su rekurentne oralne ulceracije ovalnog oblika, prečnika (2r) manjeg od 10 mm (Slika 8), dok su kod 7/50, tj. 14% ispitanika utvrđene ulceracije, čiji je prečnik bio veći od 10 mm (Slika 9) (Grafikon 15).

Grafikon 15. Veličina rekurentnih oralnih ulceracija.



Slika 8. Oralna ulceracija prečnika manjeg od 10 mm.



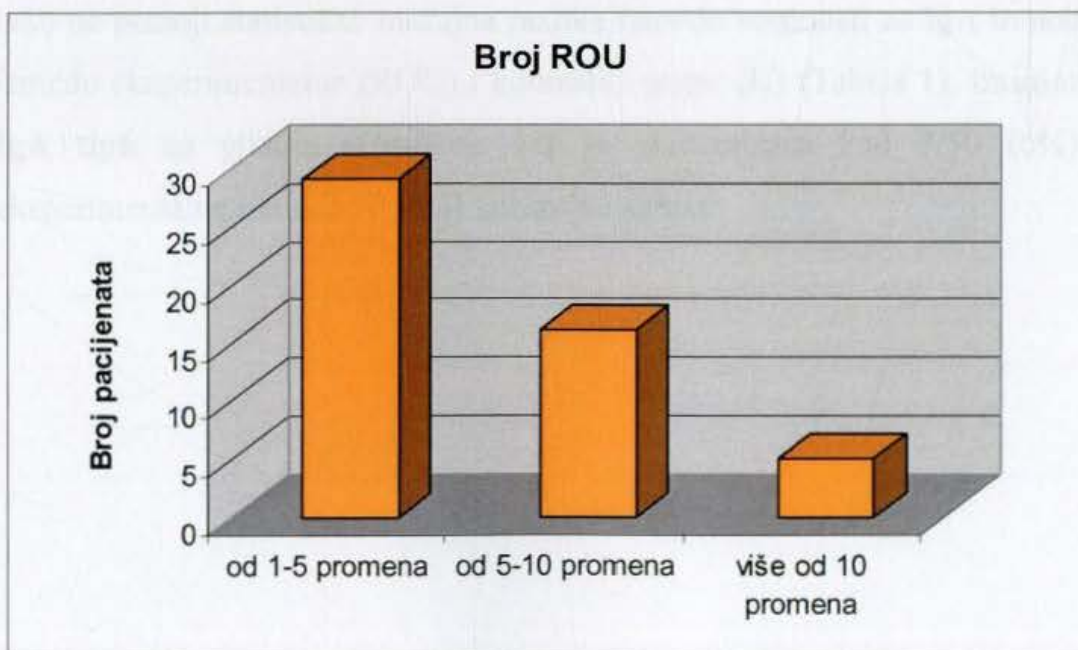
Slika 9. Oralna ulceracija prečnika većeg od 10 mm.



4.1.7. Broj rekurentnih oralnih ulceracija

Kliničkim pregledom ispitanika eksperimentalne grupe, pored lokalizacije i veličine, evidentiran je i broj promena u usnoj duplji (Grafikon 16).

Grafikon 16. Broj rekurentnih oralnih ulceracija.



Više od polovine ispitanika eksperimentalne grupe (29/50), tj. 58% je imalo od 1-5 ulceracija u usnoj duplji. Njih 16/50, tj. 32% je imalo od 5-10 promena u ustima, dok je 5/50 (10%) ispitanika eksperimentalne grupe imalo više od 10 ulceracija u momentu kliničkog pregleda.

4.2. HUMORALNA IMUNOREAKTIVNOST NA PROTEINE HRANE

Humoralna imunoreaktivnost na gliadin, proteine kravljeg mleka i specifične proteine kravljeg mleka je određivana, kako za eksperimentalnu, tako i za kontrolnu grupu.

4.2.1. Humoralna imunoreaktivnost na gliadin

Granična vrednost za imunoreaktivnost na gliadin je dobijena analizom 50 seruma zdravih ispitanika kontrolne grupe, bez rekurentnih oralnih ulceracija. Te vrednosti su iznosile 3,89 IU/ml za IgA i 13,03 IU/ml za IgG.

Iako ne postoji statistički značajna razlika između vrednosti za IgA imunoreaktivnost između eksperimentalne (ROU) i kontrolne grupe (K) (Tabela 1), **imunoreaktivnost IgA tipa** na gliadin (Grafikon 17) je evidentirana kod 3/50 (6%) ispitanika eksperimentalne i kod 2/50 (4%) kontrolne grupe.

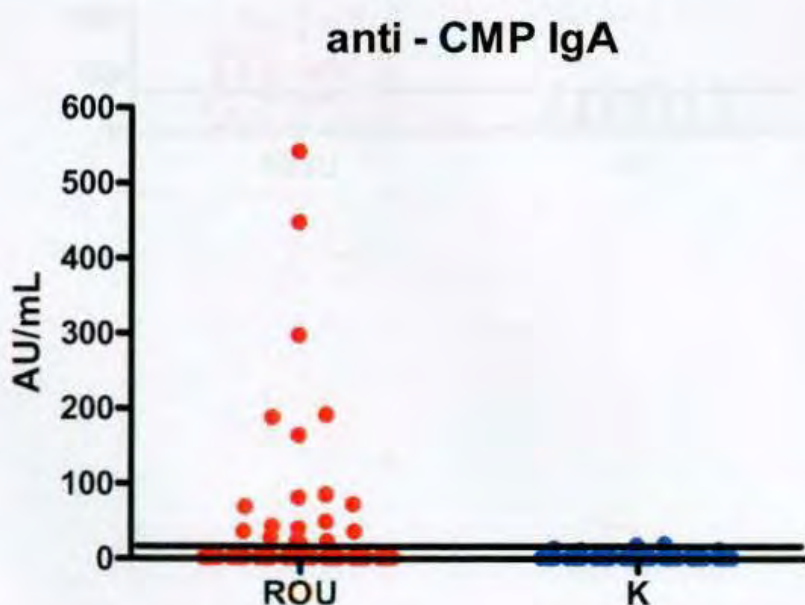
4.2.2. Humoralna imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka

Granična vrednost za imunoreaktivnost na ukupne proteine kravljeg mleka (*engl. cow's milk proteins*; CMP) je dobijena analizom 50 seruma zdravih ispitanika kontrolne grupe, bez zdravstvenih tegoba za IgA, IgG i IgE. Te vrednosti su iznosile 12,17 AU/ml za IgA, 35,29 AU/ml za IgG i 10,18 AU/ml za IgE.

Imunoreaktivnost IgA tipa na ukupne proteine kravljeg mleka (Grafikon 19) je evidentirana kod 19/50 (38%) ispitanika eksperimentalne i kod 4/50 (8%) kontrolne grupe.

Utvrđena je statistički značajna razlika između vrednosti za serumsku IgA imunoreaktivnost ispitivanih grupa (Tabela 2). Ispitanici eksperimentalne grupe imaju statistički značajno više vrednosti za imunoreaktivnost IgA tipa na ukupne proteine kravljeg mleka u odnosu na vrednosti kontrolne grupe (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W= 1508.5$; $p= 0.04457$).

Grafikon 19. Serumna IgA imunoreaktivnost (AU/ml) na proteine kravljeg mleka.



Imunoreaktivnost IgG tipa na proteine kravljeg mleka (Grafikon 20) je konstatovana u 30/50 (60%) slučajeva u eksperimentalnoj i u 3/50 (6%) slučajeva u kontrolnoj grupi.

Analizom dobijenih rezultata utvrđena je statistički značajna razlika između vrednosti za serumsku imunoreaktivnost IgG tipa na ukupne proteine kravljeg mleka, za ispitivane grupe (Tabela 2). Ispitanici eksperimentalne grupe imaju statistički značajno više vrednosti od kontrolne grupe (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W= 1937$; $p= 0$).

Grafikon 20. Serumski IgG imunoreaktivnost (AU/ml) na proteine kravljeg mleka.

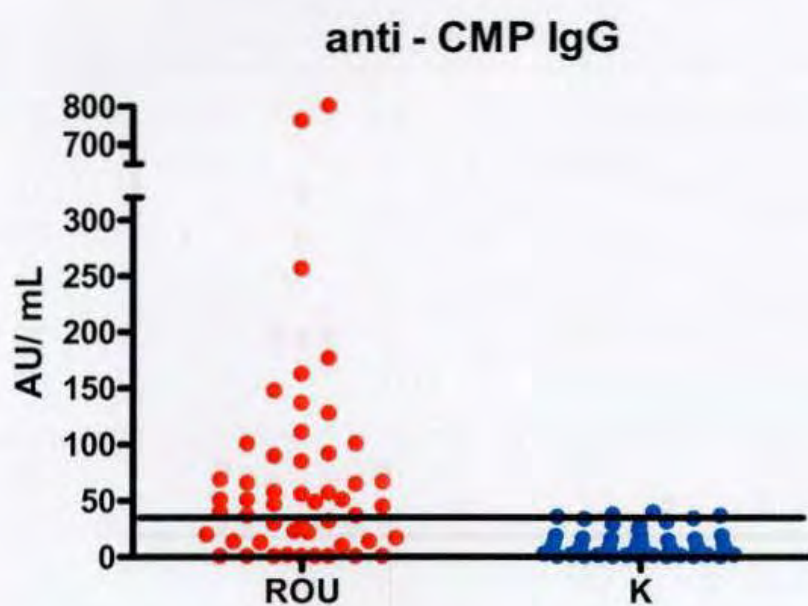


Tabela 1. Međugrupna zavisnost humoralne imunoreaktivnosti prema gliadinu.

Parametri	Grupe	Test	Test-statistika	p
Gliadin IgA	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	<i>W</i> = 1217	0.82117
Gliadin IgG	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	<i>W</i> = 1447	0.17435

Tabela 2. Međugrupna zavisnost humoralne imunoreaktivnosti prema ukupnim proteinima kravljeg mleka.

Ukupni proteini kravljeg mleka IgA	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	<i>W</i> = 1508.5	0.04457
Ukupni proteini kravljeg mleka IgG	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	<i>W</i> = 1937	0
Ukupni proteini kravljeg mleka IgE	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	<i>W</i> = 1888	0

Od ukupnog broja ispitanika eksperimentalne grupe, njih 16/50 (32%) je istovremeno imalo povišenu imunoreaktivnost IgE, IgG i IgA tipa na proteine kravljeg mleka, dok je njih 6/50 (12%) imalo povišenu imunoreaktivnost IgE i IgG tipa, 2/50 (4%) IgE i IgA tipa, a njih 17/50 (34%) povišenu imunoreaktivnost IgG i IgA tipa (Tabela 3).

Tabela 3. Broj pacijenata sa povišenom imunoreaktivnošću na ukupne proteine kravljeg mleka.

Klasa imunoglobulina	Br. pacijenata sa povišenom imunoreaktivnošću
IgE, IgG, IgA	16/50
IgE, IgG	6/50
IgE, IgA	2/50
IgG, IgA	17/50
IgE	4/50
IgG	7/50
IgA	0/50

Klinički nalaz ispitanika eksperimentalne grupe koji su ispoljili povišenu imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka, nije bio specifičan. Nije se mogla utvrditi pravilnost u dužini trajanja, učestalosti recidiva, lokalizaciji, veličini i broju rekurentnih oralnih ulceracija.

4.2.3. Humoralna imunoreaktivnost na specifične proteine kravljeg mleka

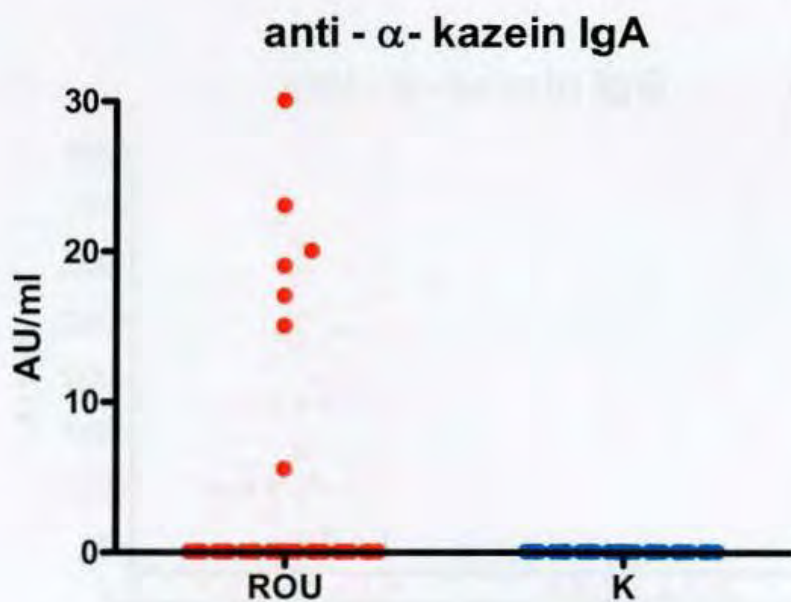
Određivana je humoralana imunoreaktivnost na α , β , κ -kazein (*casein*), α -laktalbumin (*lactalbumin*), laktoferin (*lactoferin*), β -laktoglobulin (*lactoglobulin*) A i B, kako za eksperimentalnu, tako i za kontrolnu grupu.

4.2.3.1. Humoralna imunoreaktivnost na α -kazein

Granična vrednost za imunoreaktivnost na α -kazein je dobijena analizom 50 seruma zdravih ispitanika kontrolne grupe, za IgA, IgG i IgE. Te vrednosti su iznosile 0,00 AU/ml za IgA, 27,77 AU/ml za IgG i 26,06 AU/ml za IgE.

Imunoreaktivnost IgA tipa na α -kazein (Grafikon 22) je evidentirana kod 7/50 (14%) ispitanika eksperimentalne i kod 0/50 (0%) kontrolne grupe.

Grafikon 22. Serumska IgA imunoreaktivnost (AU/ml) na α -kazein.

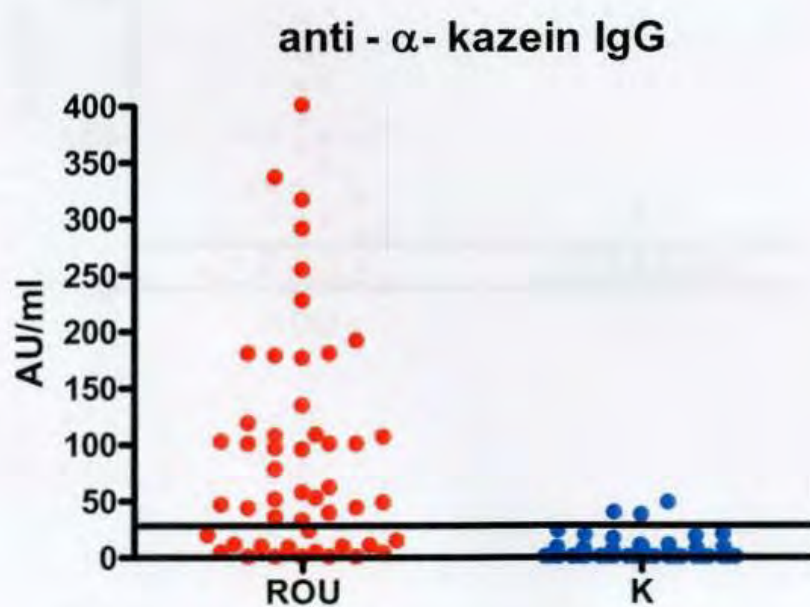


Utvrđena je statistički značajna razlika između vrednosti za serumsku IgA imunoreaktivnost ispitivanih grupa (Tabela 2). Eksperimentalna grupa ima statistički značajno više vrednosti za imunoreaktivnost IgA tipa na α -kazein u odnosu na kontrolnu (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W= 1425$; $p= 0.00654$).

Imunoreaktivnost IgG tipa na α -kazein (Grafikon 23) je konstatovana u 35/50 (70%) slučajeva u eksperimentalnoj i u 3/50 (6%) u kontrolnoj grupi. Dva ispitanika iz eksperimentalne i jedan iz kontrolne grupe su imali povišenu imunoreaktivnost IgG tipa na α -kazein, a da pri tom nisu prethodno pokazali povišenu imunoreaktivnost na ukupne proteine kravljeg mleka.

Dobijena je statistički značajna razlika između vrednosti za serumsku imunoreaktivnost IgG tipa na α -kazein, između ispitivanih grupa (Tabela 4). Ispitanici eksperimentalne grupe imaju statistički značajno više vrednosti od kontrolne grupe (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W= 2176$; $p= 0$).

Grafikon 23. Serumski IgG imunoreaktivnost (AU/ml) na α -kazein.



Imunoreaktivnost IgE tipa na α -kazein (Grafikon 24) je određena kod 26/50 (52%) ispitanika eksperimentalne i kod 2/50 (4%) kontrolne grupe. Jedan ispitanik eksperimentalne grupe je pokazao povišenu imunoreaktivnost IgE tipa na α -kazein, a da ranije kod njega nije evidentirana povišena imunoreaktivnost na ukupne proteine kravljeg mleka.

Utvrđena je statistički značajna razlika između vrednosti za serumsku imunoreaktivnost IgE tipa na α -kazein, između ispitivanih grupa (Tabela 4). Ispitanici eksperimentalne grupe imaju statistički značajno više vrednosti od vrednosti u kontrolnoj grupi (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W=1925$; $p=0$).

Grafikon 24. Serumski IgE imunoreaktivnost (AU/ml) na α -kazein.

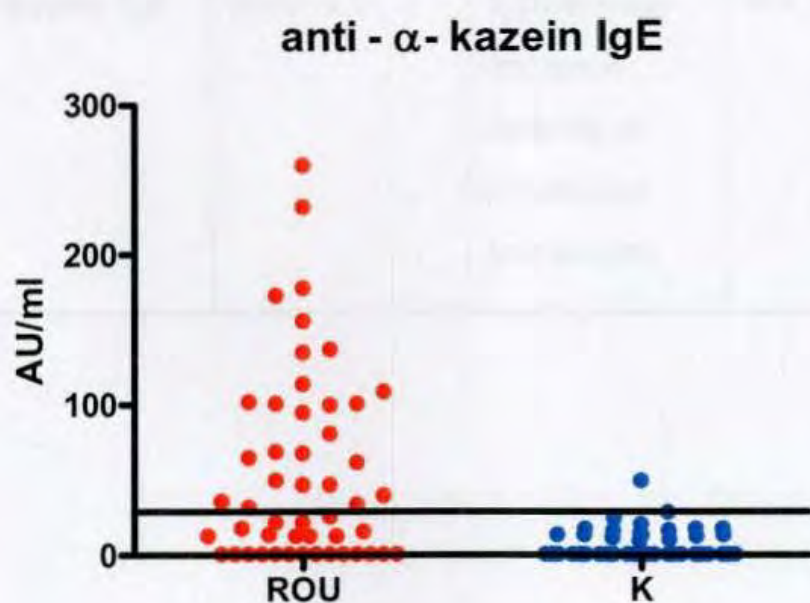


Tabela 4. Međugrupna zavisnost humoralne imunoreaktivnosti prema specifičnom proteinu kravljeg mleka, α -kazein-u.

Parametri	Grupe	Test	Test-statistika	p
α-kazein IgA	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 1425$	0.00654
α-kazein IgG	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 2176$	0
α-kazein IgE	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 1925$	0

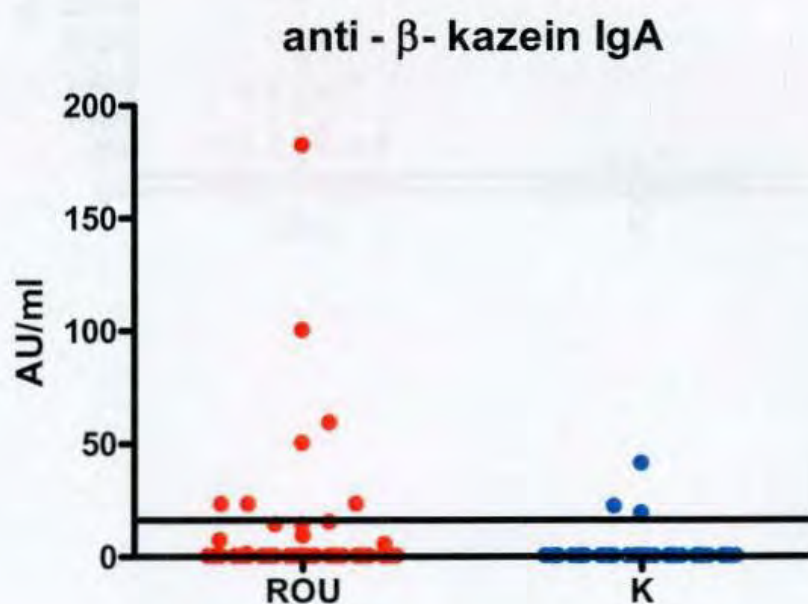
4.2.3.2. Humoralna imunoreaktivnost na β -kazein

Analizom 50 seruma zdravih ispitanika kontrolne grupe, dobijene su granične vrednosti za imunoreaktivnost na β -kazein za IgA, IgG i IgE. Te vrednosti su iznosile 15,47 AU/ml za IgA, 27,66 AU/ml za IgG i 28,28 AU/ml za IgE.

Imunoreaktivnost IgA tipa na β -kazein (Grafikon 25) je konstatovana u 7/50 (14%) slučajeva u eksperimentalnoj i u 3/50 (6%) u kontrolnoj grupi. Jedna osoba iz kontrolne grupe je ispoljila imunoreaktivnost na β -kazein, a da nije ispoljila na ukupne CMP.

Dobijena je statistički značajna razlika između vrednosti za serumsku imunoreaktivnost IgA tipa na β -kazein između ispitivanih grupa (Tabela 5). Vrednosti u eksperimentalnoj su statistički značajno više od onih u kontrolnoj grupi (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W= 1522$; $p= 0.00423$).

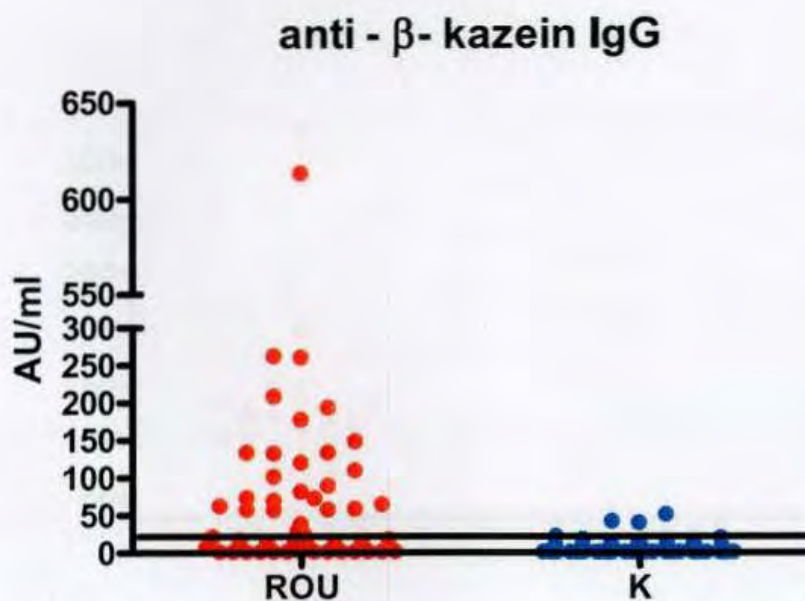
Grafikon 25. Serumna IgA imunoreaktivnost (AU/ml) na β -kazein.



Imunoreaktivnost IgG tipa na β -kazein (Grafikon 26) je utvrđena kod 26/50 (52%) ispitanika eksperimentalne grupe i kod 3/50 (6%) kontrolne grupe. U dva slučaja u eksperimentalnoj i u tri u kontrolnoj grupi utvrđena je povišena imunoreaktivnost IgG tipa na β -kazein, a da nije utvrđena na CMP.

Između vrednosti za serumsku imunoreaktivnost IgG tipa na β -kazein, za eksperimentalnu i kontrolnu grupu, dobijena je statistički značajna razlika (Tabela 5). Ispitanici eksperimentalne imaju statistički značajno više vrednosti od kontrolne grupe (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W= 1928$; $p= 0.$).

Grafikon 26. Serumski IgG imunoreaktivnost (AU/ml) na β -kazein.



Kod 26/50 (52%) ispitanika eksperimentalne grupe i kod 3/50 (6%) kontrolne grupe evidentirana je **imunoreaktivnost IgE tipa** na β -kazein (Grafikon 27). Kod dva ispitanika u eksperimentalnoj i kod jednog u kontrolnoj grupi, utvrđena je povišena imunoreaktivnost IgE tipa na β -kazein, a da pri tom nije utvrđena na CMP.

Između vrednosti za serumsku imunoreaktivnost IgE tipa na β -kazein, za ispitivane grupe, dobijena je statistički značajna razlika (Tabela 5). Ispitanici eksperimentalne grupe imaju statistički značajno više vrednosti od kontrolne grupe (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W= 2063$; $p= 0.$).

Grafikon 27. Serumski IgE imunoreaktivnost (AU/ml) na β -kazein.

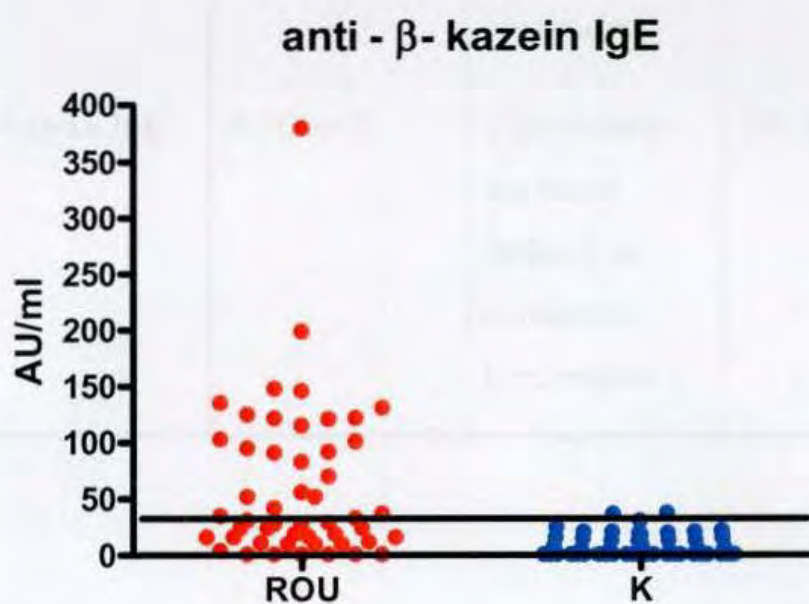


Tabela 5. Međugrupna zavisnost humoralne imunoreaktivnosti prema specifičnom proteinu kravljeg mleka, β -kazein-u.

Parametri	Grupe	Test	Test-statistika	p
β-kazein IgA	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 1522$	0.00423
β-kazein IgG	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 1928$	0
β-kazein IgE	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 2063.5$	0

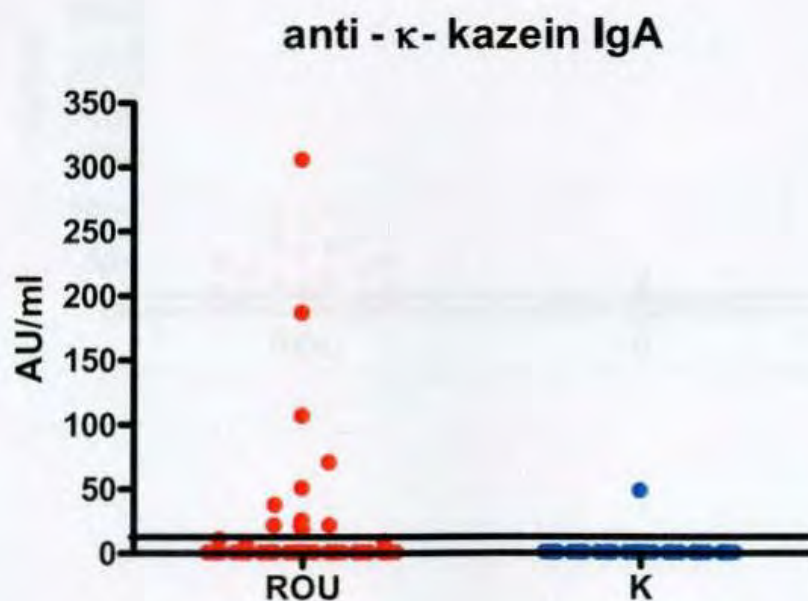
4.2.3.3. Humoralna imunoreaktivnost na κ -kazein

Granične vrednosti za imunoreaktivnost na κ -kazein za IgA, IgG i IgE dobijene su analizom 50 seruma zdravih ispitanika kontrolne grupe. Pomenute vrednosti su iznosile 14,40 AU/ml za IgA, 16,91 AU/ml za IgG i 29,36 AU/ml za IgE.

Imunoreaktivnost IgA tipa na κ -kazein (Grafikon 28) je evidentirana kod 11/50 (22%) ispitanika eksperimentalne grupe i kod 1/50 (2%) kontrolne grupe.

Dobijena je statistički značajna razlika između vrednosti za serumsku imunoreaktivnost IgA tipa na κ -kazein ispitivanih grupa (Tabela 6). Ispitanici iz eksperimentalne grupe imaju statistički značajno više vrednosti od kontrolne grupe (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W= 1573$; $p= 0.00034$).

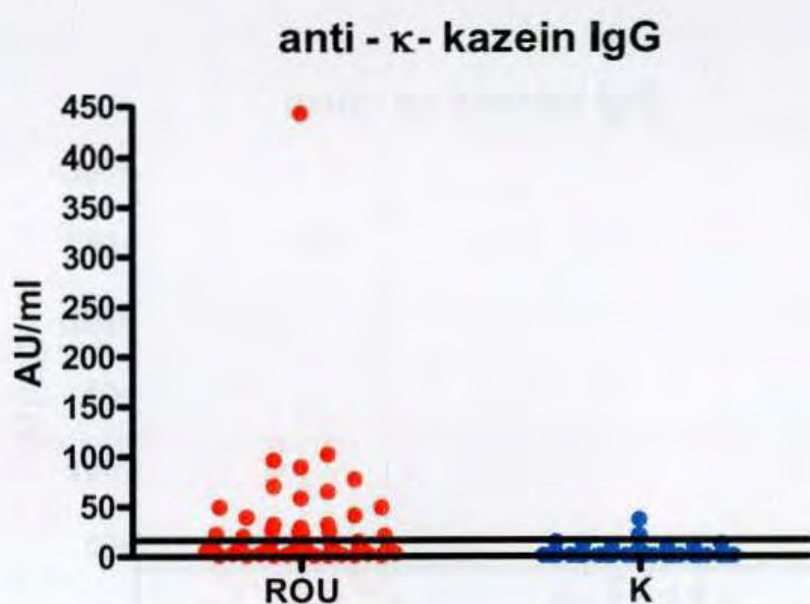
Grafikon 28. Serumaska IgA imunoreaktivnost (AU/ml) na κ -kazein.



Imunoreaktivnost IgG tipa na κ -kazein (Grafikon 29) je utvrđena kod 22/50 (44%) ispitanika eksperimentalne grupe i kod 3/50 (6%) kontrolne grupe. Kod dva ispitanika iz kontrolne i kod dva iz eksperimentalne grupe, ova imunoreaktivnost je bila povišena, a da pri tom nije bila povišena imunoreaktivnost na CMP.

Između vrednosti za serumsku imunoreaktivnost IgG tipa na κ -kazein, za ispitivane grupe, dobijena je statistički značajna razlika (Tabela 6). Ispitanici iz eksperimentalne grupe imaju statistički značajno više vrednosti od kontrolne grupe (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W= 2057.5$; $p= 0.$).

Grafikon 29. Serumski IgG imunoreaktivnost (AU/ml) na κ -kazein.



Kod 22/50 (44%) ispitanika iz eksperimentalne i kod 4/50 (8%) iz kontrolne grupe evidentirana je povišena **imunoreaktivnost IgE tipa** na κ -kazein (Grafikon 30). Ova imunoreaktivnost je bila povišena kod jednog ispitanika eksperimentalne i kod dva iz kontrolne grupe, a da pri tom nije bila povišena imunoreaktivnost na CMP.

Između vrednosti za serumsku imunoreaktivnost IgE tipa na κ -kazein, za eksperimentalnu i kontrolnu grupu, dobijena je statistički značajna razlika (Tabela 6). Ispitanici eksperimentalne grupe imaju statistički značajno više vrednosti od ispitanika iz kontrolne grupe (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W= 1936$; $p= 0.$).

Grafikon 30. Serumski IgE imunoreaktivnost (AU/ml) na κ -kazein.

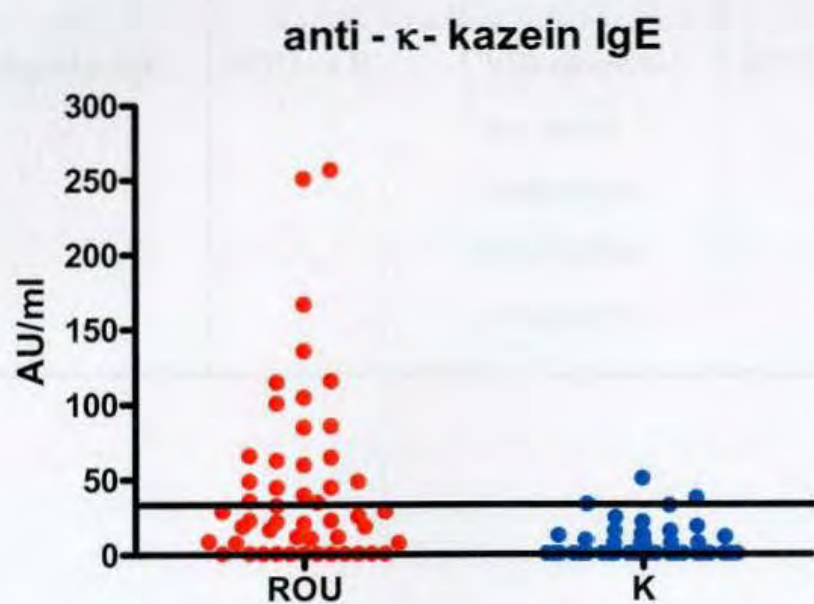


Tabela 6. Međugrupna zavisnost humoralne imunoreaktivnosti prema specifičnom proteinu kravljeg mleka, κ -kazein-u.

Parametri	Grupe	Test	Test-statistika	p
κ-kazein IgA	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 1573$	0.00034
κ-kazein IgG	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 2057.5$	0
κ-kazein IgE	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 1936$	0

4.2.3.4. Humoralna imunoreaktivnost na α -laktalbumin

Granične vrednosti za imunoreaktivnost na α -laktalbumin za IgG i IgE utvrđene su analizom 50 seruma zdravih ispitanika kontrolne grupe. Pomenute vrednosti su iznosile 36,62 AU/ml za IgG i 48,52 AU/ml za IgE. Niti ispitanici eksperimentalne, niti kontrolne grupe, nisu pokazali bilo kakvu imunoreaktivnost IgA tipa na α -laktalbumin, niti je bilo ispitanika u ove dve grupe, da su pokazali povišenu imunoreaktivnost na α -laktalbumin, a da prethodno nisu pokazali povišenu imunoreaktivnost na CMP.

Imunoreaktivnost IgG tipa na α -laktalbumin (Grafikon 31) je evidentirana kod 9/50 (18%) ispitanika eksperimentalne i kod 1/50 (2%) kontrolne grupe.

Dobijena je statistički značajna razlika između vrednosti za serumsku imunoreaktivnost IgG tipa na α -laktalbumin, za eksperimentalnu i kontrolnu grupu (Tabela 7). Ispitanici u eksperimentalnoj grupi imaju statistički značajno više vrednosti od kontrolne grupe (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W=1990.5$; $p=0$).

Grafikon 31. Serumski IgG imunoreaktivnost (AU/ml) na α -laktalbumin.

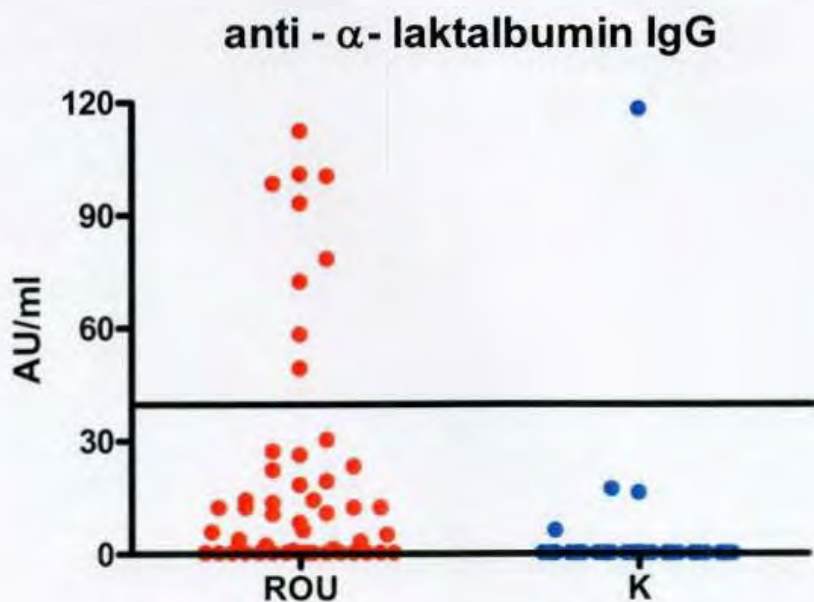


Tabela 7. Medugrupna zavisnost humoralne imunoreaktivnosti prema specifičnim proteinima kravljeg mleka, α -laktalbumin-u i laktoferin-u.

Parametri	Grupe	Test	Test-statistika	p
α-laktalbumin IgG	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 1990.5$	0
α-laktalbumin IgE	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 1479$	0.01122
laktoferin IgG	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 1778.5$	3×10^{-5}

4.2.3.7. Humoralna imunoreaktivnost na β -laktoglobulin B

Analizom 50 seruma zdravih ispitanika kontrolne grupe, određena je granična vrednost za imunoreaktivnost na β -laktoglobulin B za IgG, koja je iznosila 21,07 AU/ml. Ispitanici eksperimentalne i kontrole grupe nisu pokazali imunoreaktivnost IgA i IgE tipa na β -laktoglobulin B.

Imunoreaktivnost IgG tipa na β -laktoglobulin B (Grafikon 35) je evidentirana kod 15/50 (30%) ispitanika eksperimentalne i kod 3/50 (6%) kontrolne grupe. Kod jednog ispitanika iz eksperimentalne i jednog iz kontrolne grupe su evidentirane povišene imunoreaktivnosti IgG tipa na β -laktoglobulin B, a da nisu imali povišenu CMP imunoreaktivnost.

Između vrednosti za serumsku imunoreaktivnost IgG tipa na β -laktoglobulin B, za eksperimentalnu i kontrolnu grupu, dobijena je statistički značajna razlika (Tabela 8). Ispitanici eksperimentalne grupe imaju statistički značajno više vrednosti od kontrolne grupe (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W= 1754.5$; $p= 0.00012$).

Grafikon 35. Serumska IgG imunoreaktivnost (AU/ml) na β -laktoglobulin B.

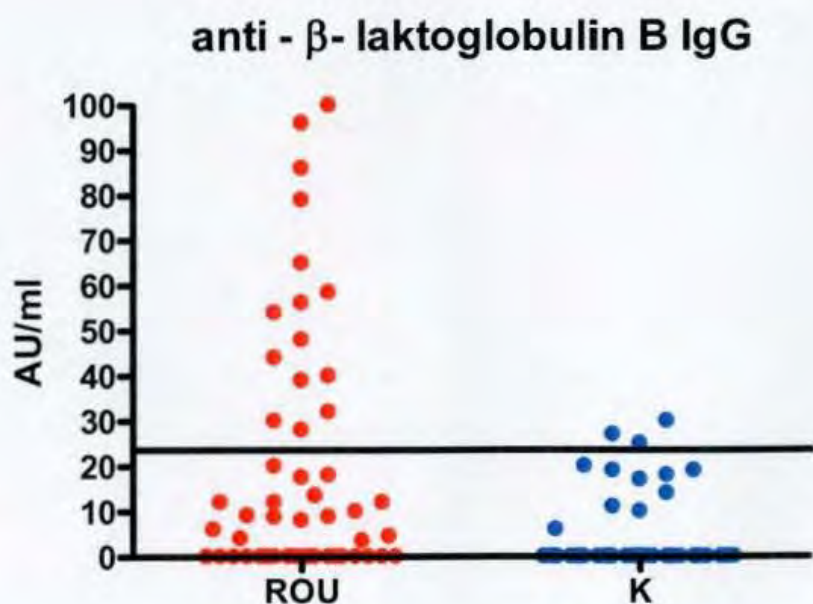


Tabela 8. Medugrupna zavisnost humoralne imunoreaktivnosti prema specifičnim proteinima kravljeg mleka, β -laktoglobulin-u A i β -laktoglobulin-u B.

Parametri	Grupe	Test	Test-statistika	p
β laktoglobulin A IgG	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 1719.5$	0.00043
β laktoglobulin B IgG	ROU vs K	Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta	$W= 1754.5$	0.00012

4.2.4. Analiza humoralne imunoreaktivnosti na specifične proteine kravljeg mleka

Analizom rezultata humoralne imunoreaktivnosti na specifične proteine kravljeg mleka, ističe se da su ispitanici eksperimentalne grupe (pacijenti sa ROU) na neke proteine kravljeg mleka bili više, a na neke manje reaktivni. Najviše pacijenata je pokazalo reaktivnost na α -kazein, a najmanje na α -laktalbumin (Tabele 9 i 10).

Tabela 9. Broj ispitanika eksperimentalne grupe sa povišenom imunoreaktivnošću na specifične proteine kravljeg mleka.

Specifični proteini kravljeg mleka	Br. pacijenata sa povišenom imunoreaktivnošću	Povišena IgA imunoreak.	Povišena IgG imunoreak.	Povišena IgE imunoreak.
α -kazein	36/50	7/50	35/50	26/50
β -kazein	31/50	7/50	26/50	26/50
κ -kazein	26/50	11/50	22/50	22/50
α -laktalbumin	9/50	/	9/50	3/50
laktoferin	10/50	/	10/50	/
β -laktoglobulin A	12/50	/	12/50	/
β -laktoglobulin B	15/50	/	15/50	/

Tabela 10. Broj ispitanika eksperimentalne grupe sa povišenom imunoreaktivnošću na specifične proteine kravljeg mleka.

Pacijent	α -kazein	β -kazein	κ -kazein	α -laktalb.	laktoferin	β -laktogl. A	β -laktogl. B
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+				
3	+	+	+	+			
4	+			+		+	+
5	+			+			
6	+	+	+				+
7	+	+					
8	+			+			
9	+						
10							
11	+				+	+	+
12					+		
13							
14	+	+	+				+
15	+	+	+	+			
16							
17	+	+					
18	+	+	+				+
19	+						
20	+						
21	+	+	+				
22	+	+	+	+		+	+
23	+	+					
24							
25	+	+	+				
26	+	+					
27	+	+	+				
28	+	+	+			+	+
29	+			+		+	+
30	+	+	+		+	+	+
31							
32		+					
33							
34							
35	+	+	+				
36	+	+	+		+	+	+
37	+	+	+				+
38	+	+	+			+	
39							
40							
41	+	+	+				
42	+	+	+		+	+	+
43		+	+				
44		+	+		+		
45						+	+
46	+	+	+				
47	+	+	+		+		
48	+	+	+		+	+	
49	+	+	+	+	+		+
50	+	+	+				

4.3. ČELIJSKA IMUNOREAKTIVNOST NA PROTEINE HRANE

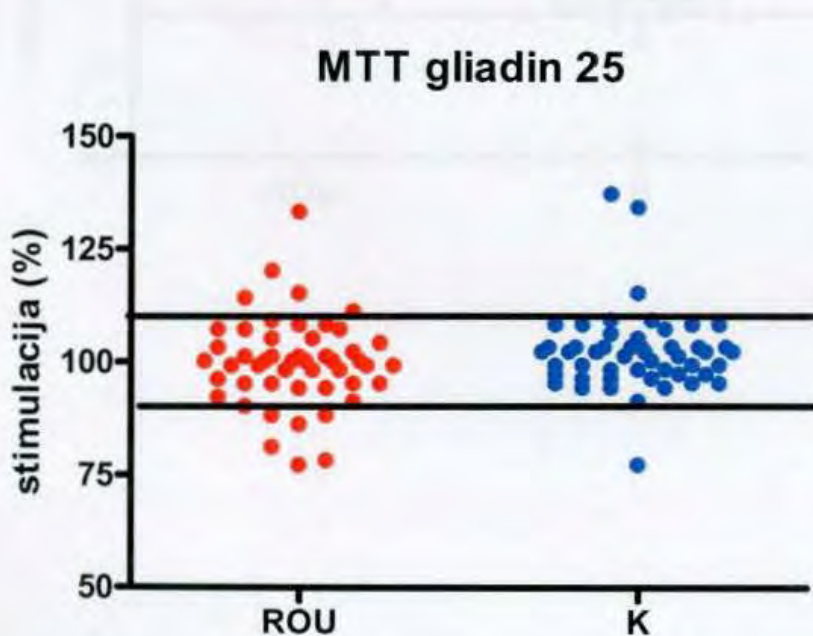
Analizom ćelijskog imunskog odgovora na gliadin, proteine kravljeg mleka i albumin govedeg seruma, dobijeni su sledeći rezultati:

4.3.1. Čelijska imunoreaktivnost na gliadin

Proliferacija mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) pod uticajem stimulatavnog dejstva gliadina koncentracije 25 $\mu\text{g/ml}$ (Grafikon 36), pokazala je da je supresija preživljavanja PBMC, veća od eksperimentalne greške, koja iznosi 10%, evidentirana u 1/50 (2%) ispitanika kontrolne i u 5/50 (10%) eksperimentalne grupe (pacijenata sa ROU). Stimulacija preživljavanja PBMC (veća od eksperimentalne greške) je utvrđena u 3/50 (6%) ispitanika kontrolne grupe i 6/50 (12%) eksperimentalne grupe.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima preživljavanja PBMC pod uticajem stimulatavnog dejstva 25 $\mu\text{g/ml}$ gliadina između vrednosti eksperimentalne i kontrolne grupe.

Grafikon 36. Proliferacija mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) pod uticajem stimulatavnog dejstva 25 $\mu\text{g/ml}$ gliadina.

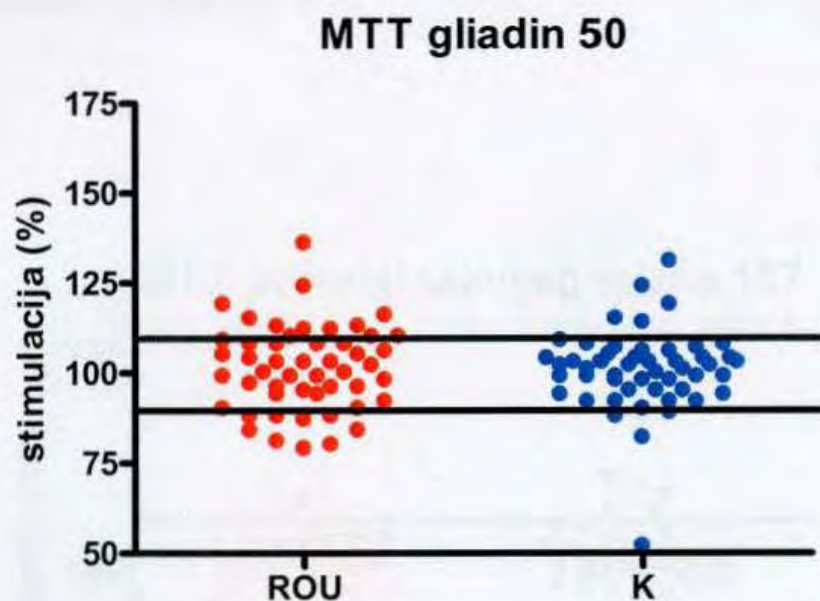


Uticajem stimulativnog dejstva gliadina u koncentraciji 50 $\mu\text{g/ml}$ (Grafikon 37) na PBMC proliferaciju, utvrđena je supresija preživljavanja PBMC, veća od eksperimentalne greške, koja iznosi 10%, u 4/50 (8%) ispitanika kontrolne i 9/50 (18%) eksperimentalne grupe.

Utvrđeno je da u 5/50 (10%) ispitanika kontrolne i 9/50 (18%) eksperimentalne grupe postoji stimulacija preživljavanja PBMC.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima preživljavanja PBMC pod uticajem stimulativnog dejstva 50 $\mu\text{g/ml}$ gliadina između rezultata dve ispitivane grupe.

Grafikon 37. Proliferacija mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) pod uticajem stimulativnog dejstva 50 $\mu\text{g/ml}$ gliadina.



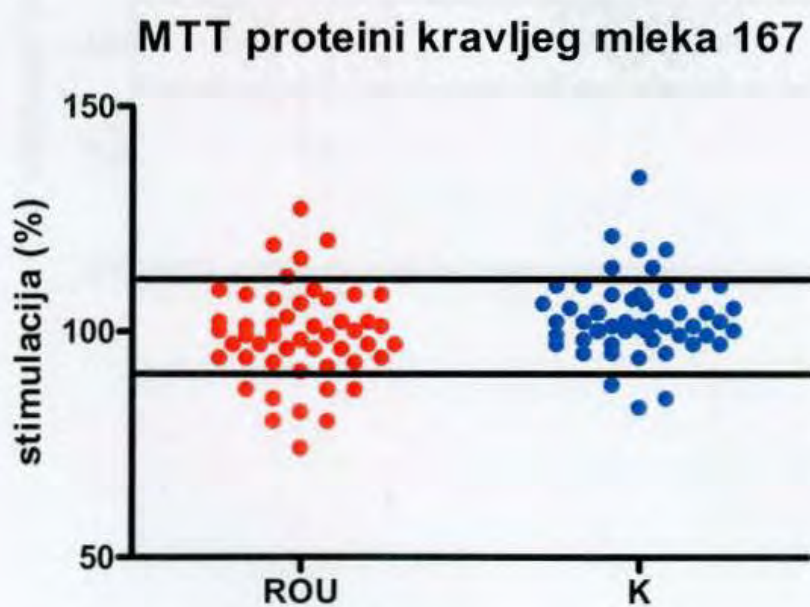
4.3.2. Čelijska imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka

Pod uticajem stimulativnog dejstva proteina kravljeg mleka u koncentraciji 167 $\mu\text{g/ml}$, na PBMC proliferaciju (Grafikon 38), evidentirana je supresija preživljavanja PBMC u 8/50 (16%) ispitanika eksperimentalne, i u 3/50 (6%) kontrolne grupe.

U 6/50 (12%) ispitanika kontrolne i 6/50 (12%) eksperimentalne grupe registrovana je stimulacija preživljavanja PBMC.

Razlika u vrednostima preživljavanja PBMC, između eksperimentalne i kontrolne grupe, je bila na granici statističke značajnosti, pod uticajem stimulativnog dejstva 167 $\mu\text{g/ml}$ proteina kravljeg mleka (Vilkoksonov test sume rankova sa korekcijom kontinuiteta: $W=961$; $p=0.05$).

Grafikon 38. Proliferacija PBMC pod uticajem stimulativnog dejstva 167 $\mu\text{g/ml}$ proteina kravljeg mleka.

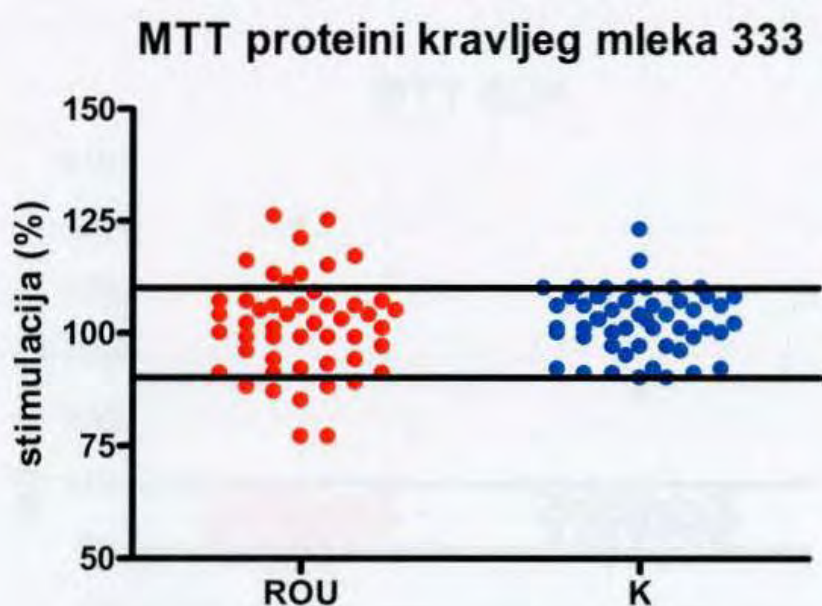


Registrovana je supresija preživljavanja PBMC, pod uticajem stimulatavnog dejstva proteina kravljeg mleka, u koncentraciji 333 $\mu\text{g/ml}$ (Grafikon 39) u 7/50 (14%) ispitanika eksperimentalne, dok je nije bilo u kontrolnoj grupi.

Utvrđena je stimulacija preživljavanja PBMC kod 2/50 (4%) ispitanika kontrolne i 10/50 (20%) eksperimentalne grupe.

Između vrednosti proliferacije PBMC, pod uticajem 333 $\mu\text{g/ml}$ proteina kravljeg mleka, za dve ispitivane grupe, nije postojala statistički značajna razlika.

Grafikon 39. Proliferacija PBMC pod uticajem stimulatavnog dejstva 333 $\mu\text{g/ml}$ proteina kravljeg mleka.



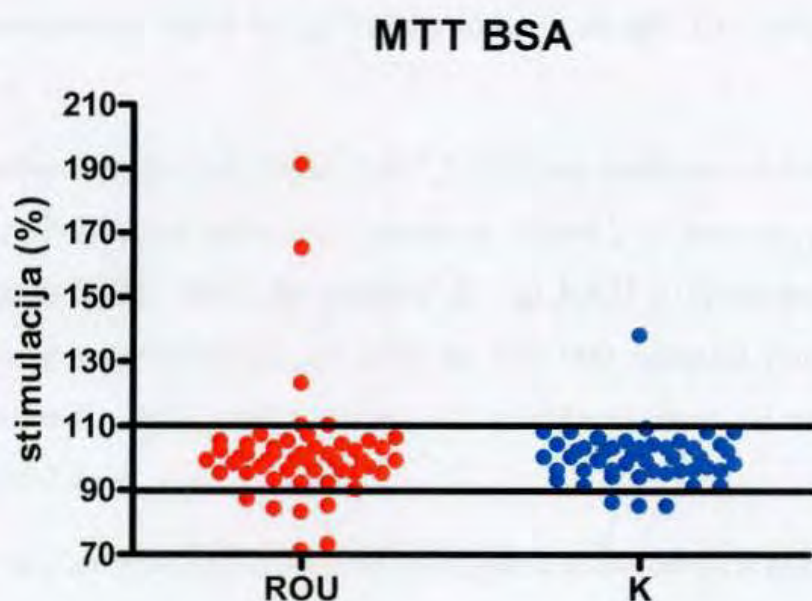
4.3.3. Čelijska imunoreaktivnost na BSA

PBMC proliferacijom pod uticajem stimulativnog dejstva albumina govedeg seruma (BSA) u koncentraciji 333 $\mu\text{g/ml}$, (Grafikon 40), evidentirana je supresija preživljavanja PBMC, u 3/50 (6%) ispitanika kontrolne i 6/50 (12%) eksperimentalne grupe.

Kod 1/50 (2%) ispitanika kontrolne i 3/50 (6%) eksperimentalne grupe, utvrđena je stimulacija preživljavanja PBMC.

Između vrednosti preživljavanja PBMC u ovom testu, za dve ispitivane grupe, nije bilo statistički značajne razlike.

Grafikon 40. Proliferacija PBMC pod uticajem stimulativnog dejstva 333 $\mu\text{g/ml}$ albumina govedeg seruma (BSA).



5. DISKUSIJA

5.1. Epidemiologija rekurentnih oralnih ulceracija

Natah i saradnici (2004.) (3) navode da se rekurentne oralne ulceracije javljaju kako kod osoba muškog, tako i kod osoba ženskog pola, da su zastupljene u svim rasama i da nisu uslovljene određenom geografskom pripadnošću. Pored toga, pomenuti autori (3) iznose i podatak da se najmanje jedna od pet individua tokom života susretne sa problemom oralnih ulceracija.

Za razliku od ovih navoda, *Pongissawaranum* i *Leohapand* (1991.) dolaze do zaključka da su RAU učestalije u ženskoj populaciji (8), dok *Field* (1992.) navodi da ženska deca mogu imati veću predispoziciju za nastanak RAU (9). Rezultati ovog istraživanja su u saglasnosti sa navodima *Pongissawaranum-a* i *Leohapand-a* (1991.), jer je eksperimentalnu grupu, u kojoj su bili pacijenti sa rekurentnim oralnim ulceracijama, činilo 50 individua, od kojih su njih 19 (38%) bili muškarci, a 31 (62%) žene.

Chattopadhyay i saradnici (2007.) (253) su analizom radova, koji su u svom naslovu sadržali ključnu sintagmu '*apthous ulcers*', iz perioda od 01. januara 1999 - 24. avgusta 2004., došli do podatka da se RAU u Sjedinjenim Američkim Državama javljaju sa učestalošću od 1030 na 100 000 odraslih ljudi i da su češće u muškoj populaciji, nego među ženama. U populaciji dece učestalost je iznosila 1500 na 100000 dece.

Sircus i saradnici (1957.) (13) ističu da je u Škotskoj, u populaciji odraslih, starijih od pedeset godina, zapažena manja učestalost aftoznih ulceracija u osoba muškog, ali ne i u osoba ženskog pola.

Prosečna starost eksperimentalne grupe u ovom istraživanju je bila 40.32 godine. Prosek godina pacijenata sa RAU, ali samo sa jednom lezijom na oralnoj sluznici, u Sjedinjenim Američkim Državama je iznosila 30.9 godina, dok je prosečna starost

pacijenata sa većim brojem lezija na oralnoj sluznici bila 39.2 god. što je u saglasnosti sa našim rezultatima (253).

Rennie-a i saradnici (1985.) (10) su izneli podatak da se u 60-85% slučajeva u okviru populacije odraslih, prva ulceracija na oralnoj sluznici javlja obično pre tridesete godine. *Axell* (1976.) je utvrdio da sa godinama ispitanika opada učestalost aftoznih ulceracija, u oba pola, u Švedskoj populaciji (14).

Sircus i saradnici (1957.) (13) ističu da pacijenti sa RAU mogu imati člana porodice sa RAU, kao i da više od 40% pacijenata ima pozitivnu porodičnu anamnezu. Osobe, koje imaju člana porodice sa RAU, mogu ih dobiti u ranijim godinama i sa ozbiljnijom simptomatologijom u odnosu na pacijente koji nemaju pozitivnu porodičnu anamnezu (18). Mogućnost da braća i sestre dobiju RAU zavisi od toga da li jedan ili oba roditelja imaju RAU (19), jer kod dece, čija oba roditelja imaju RAU, raste rizik da ih i ona sama dobiju (67-90%) (18). Učestalost RAU se povećava u slučajevima blizanaca (18). U okviru našeg ispitivanja su se našli članovi jedne cele porodice, koji su imali problem rekurentnih oralnih ulceracija, što potvrđuje prethodne navode *Sircus-a* i saradnika (13), da pacijenti sa RAU mogu imati pozitivnu porodičnu anamnezu.

Rezultati *Fahmy-a* (1976.) (11) nisu u saglasnosti sa rezultatima *Nataha* i saradnika (2004.) (3), koji su naveli da su RAU podjednako zastupljene u svim rasama i da nisu uslovljene geografskom pripadnošću. *Fahmy* ističe da se RAU manje javljaju kod Beduinskih Arapa, dok su naročito česte u Severnoj Americi i zapadnim zemljama (12). Rezultati velike studije *Pentenero-a* i saradnika (2008.), koja je obuhvatala pacijente iz oblasti Turin u Italiji, ukazuju da su ROU zastupljenije u osoba muškog pola (27,3% vs 22,89%) u ovoj italijanskoj regiji i da postoji mogućnost da su ROU u ovih pacijenata prouzrokovane rizičnim navikama i nošenjem protetskih nadoknada (254). Rezultati ove studije se podudaraju sa rezultatima studije *McCullough-a* i saradnika (2007.), koji takođe navode da su u njihovom istraživanju bile zastupljenije individue muškoga pola i to mlađe životne dobi.(255).

U Sjedinjenim Američkim Državama, kada učestalost RAU povežu sa nacionalnom strukturom stanovništva, *Chattopadhyay* i saradnici (2007.) dolaze do zaključka da se RAU javljaju sa statistički značajno nižom učestalošću u populaciji ljudi koji pripadaju negroidnoj rasi, ne-hispanskog porekla (253) i da se u okviru ove populacije

javljaju sa povećanom učestalošću među odraslima, starosti od 17-29 godina. Autori ističu da postoje rasno-etničke razlike, razlike u godinama, polu i geografskoj pripadnosti, kada se sagledava učestalost RAU u Sjedinjenim Američkim Državama. Povećana učestalost RAU na Zapadu u odnosu na ostale delove države, govori u prilog uticaju nekog od sredinskih faktora. Jedan od kofaktora, koji može uticati na povećanu učestalost RAU na Zapadu, može biti i geografska pripadnost različitih etničkih grupa.

Kleinman i saradnici (1994.) (15) navode da oko 1% dece u razvijenim zemljama može imati rekurentne aftozne ulceracije, dok *Peretz* (1994.) (16) dolazi do zaključka da se kod 40% od pomenute dece, aftozne ulceracije javljaju još pre pete godine života, da bi sa godinama broj pacijenata rastao. *Crevelli* i saradnici (1988.) (17) ističu da se kod dece iz porodica, koje pripadaju višem socio – ekonomskom staležu, RAU mnogo češće javljaju u poređenju sa decom, koja pripadaju nižim socio – ekonomskim grupacijama.

Visoka zastupljenost aftoznih ulceracija je uočena u populaciji studenata, koji potiču iz porodica, koje su dobro materijalno stituirane (18).

Deskriptivna studija *Eris-a* i saradnika (2007.) (256), koja je sprovedena u severnom Iranu obuhvatala je 485 studenata različitih medicinskih nauka, Univerziteta Golestan. Najveći broj studenata (40%) su bili studenti Para-medicinskog koledža (*Para-medical college*), 29,7% su bili sa koledža za sestre i 30,3% su bili studenti medicine. Iznesen je podatak da je 36,9% studenata dalo pozitivan iskaz da su nekad tokom života imali RAU. Od svih studenata, koji su tokom života imali RAU, njih 70,6% je imalo pozitivnu porodičnu anamnezu, tj. neko iz njihove porodice je tokom života imao RAU. Podaci su prikupljeni putem upitnika, a u momentu uzimanja anamneze 8,9% studenata je imalo prisutne RAU u ustima i to su u većem procentu (60,5%) bile osobe ženskog pola. Interesantan podatak je da su autori studije приметили da su RAU bile učestalije u studenata medicine, nego u studenata druga dva koledža (koledža za sestre ili Para-medicinskog koledža). Autori smatraju da razlog toga može biti stresogen način života, neredovno spavanje i veliki broj vežbi, tj. obaveza studenata na fakultetu. Velika učestalost RAU u studenata Para-medicinskog koledža se može objasniti stresom zbog kratkih edukativnih kurseva (tj. načina organizacije nastave na pomenutom koledžu) i strahom zbog neizvesnosti budućeg zaposlenja (256).

5.2. Klinički nalaz rekurentnih oralnih ulceracija

Prema lokalizaciji ROU, rezultati naše studije su u saglasnosti sa rezultatima studije *Eris-a* i saradnika (2007.) (256), koja je sprovedena na Golestan Univerzitetu, među studentima medicinskih nauka. *Eris* i saradnici navode da je najčešća lokalizacija oralnih ulceracija bukalna i labijalna sluzokoža sa 56%, zatim jezik sa 19%, gingiva sa 19%, nepce sa 3% i grkljan (*larynx*) sa 3%. U našoj studiji su bukalna i labijalna sluzokoža takođe bile najzastupljenije lokalizacije oralnih ulceracija u 53% slučajeva, zatim jezik sa 14%, gingiva sa 9%, nepce sa 4%, pod usne duplje i ždrelo (*pharynx*) sa po 4%, dok su promene u celim ustima bile prisutne u 13% slučajeva.

Labijalna i bukalna sluzokoža, kao najzastupljenije lokalizacije oralnih ulceracija se navode i u rezultatima studije *McCullough-a* i saradnika (2007.) (255), dok se bočna strana jezika ističe kao druga najčešću lokalizaciju za pojavu ROU.

Rezultati naše studije su u saglasnosti i sa navodima *Field-a* i saradnika (2003.) u čijim rezultatima se oralna sluzokoža (labijalna i bukalna) takođe navodi kao najčešća lokalizacija oralnih ulceracija, dok su jezik i pod usne duplje na drugom mestu. Ždrelo i tonzile, *Field* i saradnici navode kao lokalizacije gde se oralne ulceracije javljaju u manjem procentu (257).

Najveći broj ispitanika eksperimentalne grupe (86%) je imao oralne ulceracije prečnika manjeg od 10 mm, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima, koji govore da se afte minor, čiji je prečnik obično od 2-4 mm, mogu javiti usamljene ili u vidu aftoznog stomatitisa. Od ukupnog broja pacijenata sa rekurentnim aftoznim ulceracijama, njih 80% boluje od afti minor (258). Dužina zarastanja ovih ulceracija je od 7-10 dana. Prema izjavi 86% ispitanika naše eksperimentalne grupe, promene im traju od 7-14 dana. Pet pacijenata (10%) iz naše studije je u momentu pregleda imalo više od 10 ulceracija u ustima i klinička slika tih slučajeva je odgovarala herpetiformnim aftama.

Kod sedam ispitanika eksperimentalne grupe (14%) evidentirane su ulceracije, koje su bile veće od 1cm u prečniku, što odgovara kliničkoj slici ulceracija tipa afti major. Naši rezultati su u saglasnosti sa literaturnim, jer *Rennie* i saradnici (1985.) (10) iznose podatak da se od ukupnog broja pacijenata sa rekurentnim aftoznim ulceracijama, ovaj tip ulceracija javlja u 10% slučajeva.

U studiji *McCullough-a* i saradnika (2007.) (255), veličina oralnih ulceracija je procenjena kliničkim pregledom i notirano je da li su ulceracije veće ili manje od 10 mm. Kod najvećeg broja ispitanika (87.1%), evidentirane su oralne ulceracije tipa afti minor, kod 8.6% afte major i kod 4.3% herpetiformne aftozne ulceracije.

Po *Natahu* i saradnicima (2004.) (3), jedan od dijagnostičkih kriterijuma za prepoznavanje i dijagnostiku rekurentnih aftoznih ulceracija, minor tipa je rekurentnost. Ona je definisana kao pojava aftoznih ulceracija u pacijenta, najmanje tri puta u toku prethodne tri godine. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima naše studije, jer je 52% ispitanika izjavilo da su se oralne ulceracije prvi put pojavile pre više godina. U 40% ispitanika eksperimentalne grupe ulceracije su recidivirale čak jednom mesečno, a njih 30% je izjavilo da je učestalost recidiva 2-5 puta u toku 6 meseci. Devet ispitanika (18%) je izjavilo da promene recidiviraju više puta mesečno, dok je najmanji broj ispitanika (12%) izjavio da do recidiva dolazi 1-3 puta u toku jedne godine.

5.3. Rekurentne oralne ulceracije i pušenje

Ispitujući vezu između ROU i pušenja, nekoliko istraživača je potvrdilo da nema udruženosti (192, 193). Negativna asocijacija je potvrđena i kada je u pitanju bezdimni duvan (duvan za žvakanje i ušmrkavanje) (194).

Rennie i saradnici (1985.) (10) navode da su većina pacijenata sa ROU nepušači. U jednoj od novijih studija *Tuzun-a* i saradnika (2000.) (196) se iznosi podatak da su samo 9% pacijenata sa RAU aktivni pušači, dok je procenat aktivnih pušača u kontrolnoj grupi veći i iznosi 25%. Naši rezultati su u skladu sa ovim navodima, jer su i u okviru naše eksperimentalne grupe, samo 10% pacijenata pušači, dok su njih 90% bili nepušači. U okviru naše kontrolne grupe, procenat aktivnih pušača je bio veći u odnosu na grupu pacijenata i iznosio je 26%, što je u skladu sa navodima *Tuzuna* i saradnika iz 2000., dok su 37/50 zdravih kontrolnih osoba (74%) nepušači.

Studija *Chattopadhyay-a* i saradnika (2007.) (253) iznosi podatak iz Sjedinjenih Američkih Država, da je učestalost ROU smanjena za 10% u populaciji osoba koje

popuše 10 ili više cigareta dnevno, za razliku od populacije osoba koje nikada u životu nisu pušile. Učestalost RAU u osoba koje puše ili su nekada u životu pušile, bila je 570 na 100 000 osoba, dok je ta učestalost bila skoro duplo veća (1170/100 000) među ljudima koji nikada nisu u životu zapalili cigaretu.

5.4. Proteini hrane u etiologiji obolenja

Najveći pojedinačni antigeni izazov sa kojim se suočava imuni sistem svake individue je ishrana. Postoje dokazi da intaktni makromolekuli, dovoljno veliki da bi bili antigeni, prolaze epitel gastrointestinalnog trakta, interaguju sa imunim sistemom mukoze i ulaze u cirkulaciju (234). Antigeni proteini, koji prođu mukozni endotelijum pokreću imuni odgovor, koji rezultuje u aktivnoj sekreciji specifičnih antitela (pre svega IgA tipa). Prekomerna konzumacija životinjskih proteina tako može dovesti do povećane hronične antigene stimulacije.

Hronična antigena stimulacija antigenima hrane, može biti u direktnoj ili indirektnoj vezi sa razvojem raznih obolenja, kako malignih, tako i nemalignih.

Pacijenti sa ROU ispitivani u ovoj studiji su povrdili da su imali uobičajeni režim ishrane bez ikakvih posebnih dijetetskih restrikcija. Iako je etiologija ROU nepoznata, jedan od mogućih uzročnika mogu biti i proteini hrane.

Pojava problema RAU se može povezati sa konzumacijom određene hrane, kao što su: kravlje mleko (238), gluten (129, 130), čokolada, orasi i kikiriki (239), sir (240), azotne boje, aromati, konzervansi (241, 242), dok *Eversole* i saradnici (1982.) (243) nisu utvrdili udruženost RAU sa konzumacijom paradajza, jagoda i oraha.

Ishrana je potencijalno jedan od najznačajnijih sredinskih ili faktora ponašanja, koji bi trebalo da bude razmatran u tumačenju etiologije većine tipova malignih obolenja (259). Hrana i piće predstavljaju neke od najkompleksnijih mešavina supstanci, kojima su ljudi izloženi. Izloženost specifičnom sastojku hrane može biti često tokom dugog perioda vremena, značajno varirati od mesta do mesta i menjati se tokom vremena. Ishrana može uticati na karcinogenezu kod ljudi različitim mehanizmima-

od direktnog prisustva karcinogena ili njihovih prekursora, pa sve do izmena prirodnog DNK mehanizma reparacije (260). U etiologiji Nechočinskih limfoma (*engl. Non-Hodgkin's lymphoma*; NHL) hrana može pokrenuti mehanizme, koji imaju uticaj na jedan ili više aspekata imunog odgovora.

Cunningham (1976.) (261) je ukazao da forma hronične antigene stimulacije, preko apsorpcije antigena hrane, može biti direktno u vezi sa razvojem limfoma. On je dalje naveo da goveđi proteini mogu biti izuzetno snažni limfoidni stimulant, što je činjenica od izuzetne važnosti, kada se imaju u vidu rezultati studije *Franceschi-a* i saradnika (1989.) (262), koji se tiču konzumacije mleka. Sugerirano je da hronična limfoidna stimulacija ovog tipa, deluje udruženo sa drugim faktorima, kao npr. onkogenim virusima, u povećanju rizika za nastanak NHL (259).

Malo podataka iz literature sugerise etiološku vezu između faktora ishrane i NHL. Istraživanja u ovoj oblasti su uglavnom deskriptivna i daju samo posredne dokaze. Smatra se da ljudi iz viših socio-ekonomskih grupa imaju povećan rizik za razvoj NHL (263), jer su „preuhranjeni“, u smislu konzumiranja prevelike količine masnoća i broja kalorija. Konzumacija animalnih proteina je povećana u nekim grupama, za koje je dokazano, da imaju veći mortalitet, kao posledice limfoma i Hočkinove bolesti: populacije u Severnoj Evropi, Severnoj Americi, više socio-ekonomske grupe, muškarci i belci. Nasuprot tome, neadekvatna ishrana, kao posledica pripadnosti nižim ekonomskim slojevima, može imati uticaj na neadekvatan razvoj efektivnog imunog odgovora (264) i na taj način može uticati na razvoj limfoma. U severoistočnoj Italiji dizajnirana je studija, čiji je zadatak bio da istraži ulogu stila života i naročito običaja u ishrani. Uzete su anamneze o kvalitetu i kvantitetu ishrane od 208 bolesnika sa histološki potvrđenim NHL i dvostruko većeg broja kontrolnih subjekata. Praćena je učestalost konzumacije 14 izabranih namirnica. Značajan porast rizika za dobijanje NHL je udružen sa čestom konzumacijom jetre, mleka, butera i ulja (estara polinezasićenih masnih kiselina). Bitno smanjenje rizika za nastanak NHL je udruženo sa konzumacijom hleba od celog zrna i testenina od celog zrna. Konzumacija dimljenog mesa i margarina udružena je sa laganim porastom rizika, dok česta konzumacija zelenog povrća i šargarepe neznatno smanjuje rizik (262).

U epidemiološkoj studiji *Zhenga-a* i saradnika (2004.) (265) bio je uključen 601 slučaj pacijenata sa NHL i 717 kontrolnih osoba. Ispitanici obe grupe su bili ženskog pola. Ispitivana je veza između unosa vitamina i nastanka limfoma. Unosi vitamina A, β -karotena, α -karotena i vitamina C, nisu pokazivali vezu sa rizikom za nastanak NHL, dok je kod osoba koje su unosile najviši nivo retinola, rizik za nastanak NHL bio za 40% veći. Konzumacija vitamina E, vitamina D, gvožđa i drugih mikroelemenata, nije bila u vezi sa rizikom za nastanak NHL. Značajno smanjen rizik za nastanak NHL je primećen kod žena sa visokim unosom biljnih vlakana, kao i tune, crnog hleba, tortilja, kokica i majoneza. Povećani rizik za nastanak NHL nađen je i za osobe sa visokim unosom jaja (265).

Studija *Combs-a* (2004.) (266) nam ukazuje da je unošenje selena i suplemenata selena udruženo sa redukcijom rizika za nastanak kancera prostate i kolorektalnog karcinoma u starijih muškaraca u Sjedinjenim Američkim Državama.

Meta-analize *Norat-a* i saradnika (2002.) (267) i *Sandhu-a* i saradnika (2001.) (268) kao svoj rezultat ističu da je velika učestalost konzumacije crvenog mesa i prerađevina od mesa udružena sa povišenim rizikom za nastanak kolorektalnog karcinoma. Česta konzumacija crvenog mesa je više udružena sa pojavom rektalnog karcinoma, dok je česta konzumacija mesnih prerađevina više udružena sa pojavom karcinoma distalnog dela debelog creva (*colona*), ali ne i sa pojavom karcinoma lateralnog dela debelog creva (269). Konzumacija pečenog mesa, kao i redovna upotreba masti životinjskog porekla u kuvanju, značajni su faktori u nastanku karcinoma proksimalnog dela debelog creva (270).

Analizom rezultata *Besu I.* (2008.) (271), koji govore o humoralnoj imunoreaktivnosti na gliadin i proteine kravljeg mleka, pacijenata obolelih od NHL i osoba sa zdravstvenim, nemalignim tegobama, dolazi se do zaključka da povišena imunoreaktivnost na neke proteine hrane, koja je nađena u pacijenata obolelih od NHL, nije isključivo povezana sa njihovom bolešću. To znači da ukoliko u limfocitima postoji maligni genotip, prisustvo perzistentne aktivacije imunog sistema, nekim antigenima hrane, na sličan način kao i perzistentne virusne (HCV, EBV, humani herpes virus tip 6 (*Human Herpesvirus Six*; HHV-6)) ili bakterijske infekcije

(*Helicobacter pylori*), mogu podržati maligni fenotip pomenutih hematoloških maligniteta. Čini se da je ova imunoreaktivnost može imati još ozbiljnije posledice u prisustvu imunih kompleksa. To je razlog, zbog kojeg osobe sa celijakijom, koje nisu podvrgnute dijeti, tj. ishrani bez glutena (*gluten free diet*), imaju povišen rizik za nastanak NHL (272), dok je taj rizik gotovo isti za osobe obolele od celijakije koje su na glutenskoj dijeti i zdrave osobe (272-276). U odsustvu malignog genotipa u pacijenata sa nemaligim, zdravstvenim poremećajima, ovaj tip imunoreaktivnosti ne mora imati veliki značaj, sve do pojave malignog genotipa.

Proteini hrane, osim što se smatra da mogu imati posrednu ili neposrednu ulogu u nastanku različitih vrsta maligniteta, mogu imati uticaja i na nastanak, čak u nekim slučajevima biti i uzročnici, drugih obolenja.

Alergija na hranu je abnormalni imunološki odgovor posle senzitivacije na hranu ili njene komponente. Ona predstavlja značajan zdravstveni problem, posebno u industrijalizovanim zemljama, gde se procenjuje da pogađa oko 1-2% adultne populacije i do 8% dece do tri godine (277).

Kliničke manifestacije alergije na hranu, su posledica imunoloških reakcija. One se manifestuju u digestivnom traktu ili drugim organima (278-280). „Zlatni standard“ za dijagnozu alergije na hranu predstavlja dvostruko-slepi placebo- kontrolisani oralni izazov hranom (*double-blind placebo-controlled oral food challenge*; DBPCFC) i on bi uvek trebalo da se primeni kod pacijenata kod kojih se sumnja na alergiju na hranu (281). Ovaj test se sastoji u konzumaciji hrane koja sadrži potencijalni alergen i praćenju alergijskih reakcija. Metoda je „dvostruko-slepa“ s’obzirom da ni alergolog, ni pacijent ne znaju da li pacijent konzumira hranu koja sadrži potencijalni alergen ili placebo (281).

Široka rasprostranjenost ove patologije u populaciji, dovela je do pojačanog interesa naučnika na polju istraživanja alergije na hranu. I zapravo, ingestija antigena hrane, koja je obično praćena indukcijom oralne tolerance, sve češće dovodi do alergije (282). Normalno, sistemski humoralni (IgG) i ćelijski odgovori na proteine hrane, koji prethode toleranci, vode ka ukidanju odgovora na korenspondirajuće proteine i

održavanje tog stanja. Ali, u slučaju alergije na hranu, nema tog ukidanja odgovora, što vodi ka alergijskoj reakciji (283).

Jedan od razloga za primećeno povećanje prevalencije alergijskih poremećaja na hranu, mogli bi ležati u promenama u modernim navikama u ishrani i povećanoj kompleksnosti sastojaka hrane i njene proizvodnje (284). Mnoge supstance dodate hrani iz različitih tehničkih razloga, od boja i aroma, do nutritivnih sastojaka, mogu biti jedan od uzročnih faktora u alergijama na hranu ili intoleranci. Nivo nekih alergena u hrani za alergične individue, ne bi smeo da prelazi koncentraciju od nekoliko delova na milion (285). S'obzirom da su danas specifične izbegavajuće dijetete jedini način da se izbegnu alergijske reakcije na hranu, deklaracije o sastavu čak i tragova određenih sastojaka je od najvećeg značaja za osobe alergične na neke sastojke hrane (286).

5.4.1. Imunoreaktivnost na gluten

Celijačna bolest je inflamatorna bolest creva prouzrokovana glutenom, proteinskom frakcijom zrna žitarica. Studija *Franceschi-a* i saradnika (1989.) (287) je pokazala vezu između celijačne bolesti, gluten senzitivne enteropatije i NHL. Najčešće maligne bolesti kod pacijenata sa celijakijom su adenokarcinom tankog creva, skvamozni karcinom grkljana i jednjaka i NHL (288). Iako je celijačna bolest povezana sa povećanim nivoom osteoporoza, neplodnosti, autoimunih i malignih bolesti, posebno limfoma (121), u pacijenata sa celijakijom se mogu javiti i ROU.

Učestalost pacijenata sa oralnim ulceracijama koji imaju celijačnu bolest se kreće u intervalu od 4,0 – 16,7% (125, 126).

Meini i saradnici (1993.) (127), u svojoj studiji, u koju je bilo uključeno 113 pacijenata sa celijakijom, ističu da je od svih pacijenata, njih 17,7% imalo problem oralnih ulceracija. Rezultati našeg ispitivanja su u skladu sa ovim podacima, jer je 6% naših pacijenata imalo povišenu serumsku imunoreaktivnost IgA tipa, a 8% pacijenata serumsku imunoreaktivnost IgG tipa. Međutim, ne može se tvrditi da pacijenti iz naše

studije sa povišenom imunoreaktivnošću na proteinsku frakciju zrna žitarica (gliadin, frakcija glutena) imaju celijačnu bolest, jer se ova bolest pouzdano može dijagnostikovati jedino biopsijom. Dijagnoza celijačne bolesti se postavlja na osnovu pato-histološkog ispitivanja tankog creva u kome dolazi do atrofije crevnih resica (*villi*), koja je uzrokovana konzumacijom glutena. U ovih pacijenata je povećan i nivo serumskih anti gliadinskih IgA ili IgG antitela, iako se ovi indikatori ne koriste kao ključni dokazi u dijagnozi celijačne bolesti (289).

Ovakav rezultat u okviru naše eksperimentalne grupe, kada je u pitanju humoralna imunoreaktivnost na gluten, je bio za očekivati, jer celijačna bolest ima niz kliničkih simptoma i izaziva mnoštvo gastrointestinalnih tegoba, pa se pacijenti mnogo ranije jave doktoru interne medicine. Međutim u pojedinim slučajevima, celijakija može proći i neopaženo od strane pacijenata (zbog blagih tegoba ili odsustva istih), koji se ni ne obrate lekaru za pomoć, pa u takvim situacijama, ukoliko postoje ROU, stomatolog može imati ključnu ulogu u dijagnostici, jer će uputiti pacijenta na dalje analize.

Antigliadinska imunoreaktivnost često može biti skrivena u cirkulišućim imunim kompleksima (*engl. Immune complexes in circulation; CIC*). Pacijenti iz naše studije nisu imali povišen nivo CIC i nije evidentirana statistički značajna razlika između rezultata eksperimentalne grupe pacijenata sa ROU i kontrolne grupe, što je i bio očekivan rezultat. Cirkulišući imuni kompleksi su detektovani kod NHL, HL, hronične mijeloidne leukemije i akutne limfoblastne leukemije (290). Studija Patela i saradnika (1985.) ukazuje da serumi pacijenata sa NHL sa lošom prognozom, konzistentno ispoljavaju najviši nivo CIC pozitivnosti (290).

5.4.2. Imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka

Taylor sa saradnicima (1964.) (247), kao i *Thomas* sa saradnicima (1973.) (238) su ispitivali nivo antitela na proteine mleka u pacijenata sa ROU i došli do zaključka da se u ovih pacijenata javlja visoka učestalost povišenog nivoa antitela na proteine mleka, što je u saglasnosti sa našim istraživanjem, jer su naši pacijenti imali statistički

značajno više vrednosti serumskog IgA, IgG i IgE na proteine kravljeg mleka (*engl. cow's milk proteins*; CMP) u poređenju sa rezultatima osoba iz kontrolne grupe (291).

Sedamdesetih godina prošlog veka *Taylor* je sa saradnicima ispitivao učestalost serumskih antitela na proteine mleka i gluten u pacijenata sa obolenjima gastrointestinalnog trakta. Primetili su povišenu učestalost antitela u pacijenata sa atoznim ulceracijama major tipa. To je prvi put da se u literaturi ukazuje na povezanost oralnih ulceracija sa reaktivnošću na proteine mleka (247).

Desetak godina kasnije, koristeći tehniku pasivne hemaglutinacije, *Thomas* i saradnici su potvrdili navode prethodnih autora i evidentirali statistički značajno više nivoe antitela na CMP (mada nije determinisana klasa imunoglobulina) u pacijenata sa aftoznim ulceracijama minor tipa. Oni su bili povećani i u pacijenata sa drugim akutnim ili hroničnim ulcerativnim lezijama na oralnoj sluzokoži (238). Kod ovih pacijenata je bila utvrđena i povišena imunoreaktivnost na druge proteine hrane u serumu, što je proizvelo dilemu, šta je razlog te pojave. Po autorima postoje dva moguća objašnjenja:

- rešenje se može tražiti u pretpostavci da antitela mogu ukazivati na preosetljivost na proteine hrane, koja predstavlja primarni uzrok nastanka oralnih ulceracija ili sekundarni događaj koji uzrokuje produženje bolesti, ili
- antitela mogu predstavljati normalan odgovor na povećanu količinu proteina kravljeg mleka koji su apsorbovani kroz oštećenu mukozu.

Da povišena imunoreaktivnost nije striktno tipična za pacijente sa oralnim ulceracijama, pokazuju i naši podaci, da je i nekoliko zdravih osoba iz kontrolne grupe imalo povišenu IgA i/ili IgG imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka, što je u saglasnosti sa rezultatima *Thomasa* i saradnika (1973.) (238). Pomenuti autori smatraju da je povišena imunoreaktivnost na proteine hrane verovatno rezultat povećanog permeabiliteta oralne sluzokože u ovih pacijenata.

Zbog urođene povećane propustljivosti sluzokože pojedinih ljudi, proteini mleka mogu difundovati u dublje slojeve epitela i indukovati veće imunske poremećaje –

stimulaciju humoralnog imunskog odgovora-sintezu IgE i/ili IgG i/ili IgA antitela na proteine kravljeg mleka. Anatomske i funkcionalne karakteristike gastrointestinalnog trakta ukazuju da ovaj organ, osim digestivnih i absorptivnih funkcija, reguliše i prolazak makromolekula kroz barijerne mehanizme, između okoline i domaćina (292). Zonulinski put (*engl. zonulin pathway*) se koristi za transport lekova, makromolekula ili vakcina, koje se normalno ne absorbuju kroz mukozalnu barijeru. U slučajevima produžene funkcije proteina zonulina (*engl. prolonged zonulin up – regulation*), povišeni protok nesopstvenih antigena u intestinalnu submukozu, može prouzrokovati intestinalne i ekstraintestinalne autoimune poremećaje u genetički prijemčivih osoba (292, 293).

Proteini kravljeg mleka su mešavina više različitih konstituenata, kao što su α -kazein, β -kazein, κ -kazein, α -laktalbumin i drugi, pa imunost na ove proteine ili na njihove imunogene epitope, može biti različita u pacijenata sa ROU i ispitanika bez oralnih promena.

Kao rezultat urođene i povišene permeabilnosti mukoze u nekih osoba, koja je inicirana akcijom zonulina (proteina uključenog u otvaranje tesnih veza (292- 294)), proteini mleka mogu difundovati u dublje slojeve epitela i mogu indukovati dublji imuni odgovor, stimulacijom humoralnog imunog odgovora i sintezom sve tri klase antitela (IgE i/ili IgG i/ili IgA). Zbog nedovoljne lokalne mobilizacije mast ćelija ili CD16 ili CD 89 pozitivnih ćelija u slučajevima IgE, IgG ili IgA pozitivnosti, naročito u zdravih osoba, sledstvena, od antitela zavisna ćelijski posredovana reakcija se može razviti u formi ROU.

Saarinen sa saradnicima (1999.) (295) ističe da korišćenje kravljeg mleka tokom prvih dana života deteta, povećava rizik za nastanak alergije na kravlje mleko, u poređenju sa ishranom sa drugim suplementima. Međutim, iako se odojče duže doji, to ne eliminiše rizik za nastanak alergije.

Retrospektivna analiza *McCullough-a* i saradnika (2007.) (255) daje dokaze, koji proizilaze iz podataka prikupljenih iz kartona pacijenata koji podkrepljuju tezu da dojenje smanjuje rizik za nastanak RAU. Od ukupnog broja pacijenata, 51% pacijenata je znalo da odgovori na postavljeno pitanje, da li su kao novorođenčad

hranjeni isključivo majčinim mlekom ili su hranjeni „na flašicu”. Veći procenat pacijenata (56.1%) je izjavio da su hranjeni isključivo majčinim mlekom, njih 34.6% da su hranjeni isključivo „na flašicu”, dok je 9.3% izjavilo da su i dojeni i hranjeni prihranom. U pacijenata koji su hranjeni isključivo „na flašicu” dijagnostikovano je statistički značajno više RAU u odnosu na pacijente, koji su hranjeni isključivo majčinim mlekom.

Van Odijs sa saradnicima (2003.) (296) pregledom literature zaključuje da dojenje štiti od razvitka atopičnih bolesti.

Kravlje mleko sadrži 3-3,5% proteina, koji se generalno mogu klasifikovati u dve velike grupe:

- kazeini (80%) i
- proteini surutke (20%).

Proteini surutke ostaju solubilni i posle kisele precipitacije (pH=4,6) kazeina, koji formira koagulum (297). Kazeini i proteini surutke pokazuju veoma različite fiziko-hemijske i alergijske karakteristike. Ukupni kazeini se nalaze u kravljem mleku u koncentraciji od 30 g/l. U kravljem mleku α S1-kazein se može naći u koncentraciji od 12-15 g/l, a α S2-kazein u koncentraciji od 3-4 g/l. Koncentracija β -kazeina je od 9-11 g/l, κ -kazeina od 3-4 g/l, α -laktalbumina od 1-1.5 g/l, β -laktoglobulina od 3-4 g/l, dok je nivo laktoferina najniži, 0.09 g/l (286).

Do kontakta sa proteinima kravljeg mleka može doći prenatalno, s'obzirom da ovi proteini mogu proći placentu, stimulisati fetalni imuni sistem i podstaći specifični IgE odgovor na različite alergene, što je i pokazano u krvi pupčanika (298).

Novorođenčad su izložena proteinima hrane preko majčinog mleka, uključujući i proteine kravljeg mleka, kada majka konzumira njih ili njihove produkte (299). Tako se protein kravljeg mleka, β -laktoglobulin, može detektovati u mleku 95% dojilja (0.9-150 μ g/l) (299). S'druge strane, uključivanjem „formula“ baziranih na kravljem mleku u ishranu odojčeta, količina proteina kravljeg mleka je drastično povećana, imajući u vidu da „formula“ bazirana na kravljem mleku sadrži oko 15g/l proteina. Proteini kravljeg mleka se apsorbuju u želudcu i prisutni su u krvi dece i odraslih u

mikrogramskim količinama po litru seruma (300, 301). Apsorpcija makromolekula je povećana kod nedonoščadi i novorođenčadi, a pokazana je i kod dece sa alergijom na kravlje mleko. Još uvek nije jasno da li je povećana apsorpcija makromolekula deo alergijske konstitucije/nasleđa ili je posledica privremenog oštećenja mukoze. Isto tako, značaj povećane apsorpcije za razvoj kliničke bolesti nije razjašnjen.

Korišćenjem veoma senzitivne metode (*Magic lite SQ-system*) detektovani su specifični IgE na individualne proteine kravljeg mleka u krvi pupčanika kod 11% i 9% novorođenčadi sa i bez atopijske predispozicije, respektivno (302). Ovi podaci ukazuju da prenatalno formiranje specifičnih IgE može biti češće nego što je prethodno sugerisano i prenatalna senzitivizacija može imati ulogu u patogenezi alergije na hranu. Pored toga, drugi autori su pokazali specifične T ćelijske proliferativne odgovore fetalnih leukocita na specifične inhalacione i alergene hrane, što daje potporu hipotezi intrauterusne senzitivizacije (303).

Odojčad hranjena majčinim mlekom, koja imaju alergiju na kravlje mleko, mogu reagovati na minimalne količine kravljeg mleka u majčinom mleku, ali ubedljiv dokaz alergijske senzitivizacije na tako male količine proteina nikad nije bio dokumentovan. S'obzirom na nisku frekvencu alergije/intolerancije na proteine kravljeg mleka, vrlo male količine kravljeg mleka u majčinom mleku mogu pre indukovati toleranciju na proteine kravljeg mleka, a ne alergijsku senzitivizaciju i razvoj alergijske bolesti. Nasuprot tome, dokumentovana je značajna veza između rane ishrane odojčadi formulama baziranim na kravljem mleku i potonjeg razvoja alergije/intolerancije na proteine kravljeg mleka (304-306).

Iz razloga što β -laktoglobulin nije prisutan u humanom mleku, ovaj protein je dugo vremena smatran najvažnijim alergenom kravljeg mleka (307-309). Rezultati našeg istraživanja ukazuju da je 12/50 ispitanika eksperimentalne grupe pokazalo povišenu imunoreaktivnost na β -laktoglobulin A, dok je 15/50 ispitanika pokazalo povišenu imunoreaktivnost na β -laktoglobulin B. Nekoliko nezavisnih studija je istaklo da kazeinske frakcije takođe imaju važan antigeni potencijal (310-312), što je u saglasnosti sa našim rezultatima, jer je najveći broj pacijenata sa ROU iz naše studije (36/50) pokazao reaktivnost na α -kazein, njih 31/50 na β -kazein i 26/50 na κ -kazein.

Osim toga, antigenost može biti parcijalno eliminisana tehnološkim procesima (313), dok kazeini zadržavaju sposobnost vezivanja IgEs, i nakon jakih denaturišućih procesa (311, 314).

Proteini mleka podeljeni su u dve grupe, kazeine i proteine surutke. Neki od pacijenata iz naše studije su pokazali imunoreaktivnost samo na kazeine, ali ne i na proteine surutke. Šesnaest pacijenata je pokazalo povišenu imunoreaktivnost samo na neki od specifičnih proteina kravljeg mleka iz grupe kazeina. Iz tog razloga se smatra da bi ti pacijenti mogli da koriste proteine surutke u svojoj ishrani, pošto na njima nisu pokazali povišenu imunoreaktivnost.

Neka deca, koja su alergična na proteine kravljeg mleka, mogu tolerisati kozije mleko (315, 316), mada postoje i dokazi o ukrštenoj reaktivnosti (*engl. cross-reactivity*) između kravljeg i mleka drugih sisara, kao što su: koza, ovca i *buffalo* goveče (317-319).

Polazeći od činjenice da neka deca, alergična na proteine kravljeg mleka, mogu tolerisati kozije mleko (315, 316), *Restani* je sa saradnicima (1999.) (320) poredio proteinski sastav mleka krave, koze, ovce, *buffalo* govečeta i „egzotično“ mleko kamile. Autori su utvrdili da kravlje i mleko *buffalo* govečeta imaju sličnu proteinsku kompoziciju, dok su kozije i ovčije mleko slični kravljem, ali sa evidentnom redukcijom α -kazeinskih frakcija. Kamilje mleko je pokazalo drugačiju strukturu sa brojnim trakama u zoni kazeina i odsustvo β -laktoglobulina (320). Testiranjem seruma šestoro dece alergične na kravlje mleko (koristeći *imunoblotting* tehniku) autori su izolovali formaciju IgE-antigen kompleks, testiranjem svih pomenutih vrsta mleka, osim prilikom testiranja kamiljeg mleka. Tri seruma od ukupno šest, dece alergične na kravlje mleko, je pokazalo blažu reakciju na kozije mleko. Ovaj rezultat bi mogao biti opravdan manjom količinom α -kazeina u kozijem mleku i to bi moglo objasniti pojavu, zašto neka deca, koja su alergična na kravlje mleko, mogu da konzumiraju kozije (315, 316). Homologija aminokiselinske sekvence α S1-kazeina mleka kobile i humanog mleka iznosi 44%, dok je homologija sekvence β -kazeina 58%. Identičnost sekvence α S1-kazeina mleka kobile i kravljeg mleka je 39%, dok je identičnost aminokiselinske sekvence β -kazeina 56% (321).

U slučajevima dece, koja su specifično alergična na ovčije mleko, autori su našli povišenu reaktivnost na ovčije i kozije kazeine (320). Pošto u ove dece nije uočena reaktivnost na kravlje mleko, koje su konzumirala bez problema, autori dolaze do zaključka da su epitop ili epitopi, odgovorni za preosetljivost, različiti od onih koji su uključeni u alergiju na kravlje mleko.

Proteini kravljeg i kamiljeg mleka ne sadrže homologe epitope (320).

Restani i saradnici (1999.) (320) zaključuju da:

- kozije mleko (sporadično u kliničkoj praksi), može biti preporučeno jedino u „dobro-selektovanim“ slučajevima, nakon odgovarajuće modifikacije, sa nutricionističke tačke gledišta
- kamilje mleko može biti „obećavajući“ izvor proteina za alergičnu decu i može biti korišteno u modifikovanim formulama

Kamilje mleko je bogat izvor proteina, jer je kompozicija amino-kiselina u kamiljem mleku slična kao u kravljem, što je još ranije bilo istaknuto u studiji *Faraha* (1993.) (322). Odsustvo proteina u kamiljem mleku, koji imaju elektroforetsku mobilnost sličnu sa β -laktoglobulinom, predstavlja važan podatak, jer nas navodi na zaključak da postoji analogija između kamiljeg i humanog mleka. Kamiljem mleku nedostaje protein, koji je jedan od najvažnijih alergena kravljeg mleka (320).

Pre upotrebe kamiljeg mleka treba sprovesti kliničke studije, čiji će zadatak biti da potvrde da je kamilje mleko pogodno za ljudsku upotrebu, naročito za ishranu alergične decu. Tehološkim procesima, kao što su termička obrada ili hidroliza, može se nastojati da se redukuje mogućnost nove senzibilizacije (320). Ukoliko kamilje mleko prođe kliničke testove, bila bi olakšana ishrana dece alergične na kravlje mleko. Dostupnost kamiljeg mleka ne bi predstavljalo problem, jer u svetu danas ima najmanje sedamnaest miliona kamila, po podacima FAO Ujedinjenih Nacija (*engl. Food and Agriculture Organization of the United Nations*), najviše u Africi (Somalija, Etiopija, Mauretaniya i Kenija) i Aziji (uglavnom Indija, Kina i Pakistan) (323).

Hidvegi i saradnici (2002.) (324) su ispitivali nivo serumskih imunoglobulina na različite proteine kravljeg mleka u pedesetoro dece sa alergijom na kravlje mleko, da

bi korelirali nivo imunoglobulina sa kliničkim simptomima i prognozama. U ove dece alergija se manifestovala kroz gastrointestinalne, kožne i respiratorne simptome. Utvrđivanje totalnog serumskog IgE može biti od koristi, jer se na taj način proverava globalna, alergijska konstitucija dece sa alergijom na kravlje mleko i često je ukupan nivo IgE antitela snižen u alergija na kravlje mleko (325-327). S' toga, nizak nivo totalnog IgE ne isključuje dijagnozu alergije na kravlje mleko. Nejasno je da li kod alergija na kravlje mleko, IgE antitela specifična za proteine kravljeg mleka predstavljaju značajni procenat totalnog IgE. Autori navode da povišen nivo ukupnog IgE može ukazivati na to da će doći do produženog lečenja alergije (324). Lokalna produkcija i sistemska distribucija specifičnih IgE na proteine kravljeg mleka je karakteristična za alergiju na kravlje mleko (298, 325, 328), ali se ova antitela mogu detektovati i u 5% zdrave dece (329). Rezultati autora navode na tezu da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima totalnog IgE i specifičnog IgE na proteine kravljeg mleka, u dece sa kožnim, respiratornim i gastrointestinalnim simptomima. *Sicherer i Sampson* (1999.) (330) su došli do zaključka da je nivo specifičnih IgE antitela na proteine kravljeg mleka niži u dece sa alergijom na kravlje mleko, kod koje ne dolazi do prolongiranja bolesti. Više od polovine (56%) ispitanika naše eksperimentalne grupe je imalo povišen titar anti-IgE specifičnih antitela na ukupne proteine kravljeg mleka. Samo kod 8% ispitanika kontrolne grupe je ovaj titar bio povišen.

Dijagnostička vrednost specifičnih IgA i IgG antitela na proteine kravljeg mleka je diskutabilna, s' toga što je produkcija ovih antitela normalan fiziološki odgovor posle ekspozicije organizma proteinima kravljeg mleka (331-333). Japanski autori su odredili nivo specifičnih IgG na proteine mleka u serumu zdrave dece. Najviši nivo je nađen kod beba starih od 5-12 meseci; nivo je potom brzo opadao, a zanemarljive vrednosti je dostigao kod adultnih osoba (334).

Keller je sa saradnicima (1999.) (335) registrovao da su titri IgG antitela na kazein, β -laktoglobulin, α -laktalbumin i BSA, lagano rasli kod dece koja su samo dojena, kao i brzo dostigla najviši nivo u grupi dece koja su hranjena „formulom“ kravljeg mleka, posebno tokom prve godine života. Kod dece koja su hranjena hidrolizovanom formulom nivo specifičnih IgG na proteine kravljeg mleka je praktično isti kao i u

grupi dojene dece i značajno je niži od nivoa grupe dece koja su hranjena formulom kravljeg mleka.

Jenmalm sa saradnicima (1998.) (336) je saopštio da konzumacija proteina kravljeg mleka tokom prva tri meseca života uzrokuje povećanje nivoa IgG antitela na β -laktoglobulin, koji potom opada sve do osme godine života. Prihrana kravljim mlekom tokom prva tri dana života uzrokuje snažnu stimulaciju produkcije IgG antitela na CMP, koja se može utvrditi i u uzrastu od dve godine (295, 337). Rezultati naše studije ukazuju da je u ispitanika eksperimentalne grupe, najčešći tip imunoreaktivnosti na proteine kravljeg mleka i specifične proteine kravljeg mleka, bila imunoreaktivnost IgG tipa. Neophodno je navesti da su našu eksperimentalnu grupu činili odrasli ispitanici, dok se danas najveći broj publikovanih radova na temu reaktivnosti na proteine kravljeg mleka odnosi na decu.

Prethodne studije, koje su pokazale snažan humoralni odgovor kod dece sa alergijom na kravlje mleko (332, 338, 339), nisu potvrđene u kasnijim studijama, gde nije zapažena nikakva razlika u nivoima IgA i IgG antitela na CMP, kod dece sa alergijom na kravlje mleko i zdrave kontrolne dece (340, 341). Neki autori su čak saopštili jako niske titre IgG antitela na CMP kod pacijenata sa alergijom na kravlje mleko (342, 343).

Hidvegi i saradnici (2002.) (324) zaključuju da nivoi ovih IgA i IgG antitela nemaju dijagnostički značaj kod dece sa alergijom na kravlje mleko. Dijagnostički značaj podklasa IgG antitela na različite CMP je neizvestan, kako je pokazao *Host* sa saradnicima (1992.) (298), koji nije pronašao značajne razlike u nivoima ovih antitela kod dece sa alergijom na kravlje mleko i kontrola. Studija *Hidvegi-a* sa saradnicima (324) dalje potvrđuje da laboratorijske metode imaju samo dodatnu ulogu u dijagnozi alergije na kravlje mleko, koja mora biti bazirana na kliničkom odgovoru na eliminaciju kravljeg mleka i naknadnoj provokaciji (davanjem kravljeg mleka), kao što je preporučio *Goldman* sa saradnicima (344) još pre 47 godina. Visoki nivo totalnog IgE i povišeni nivo IgG antitela na α -kazein mogu ukazati na kasniji razvoj tolerancije na proteine kravljeg mleka, ali i perzistentne alergije na kravlje mleko.

5.5. Uticaj termičke obrade mleka na antigenost proteina

U obrađenom mleku je agregirano čak do 90% β -laktoglobulina (345), dok se α -laktalbumin brzo denaturiše na temperaturi od oko 64°C (346). Nasuprot tome, kazein prirodno formira micelle, pa prema tome egzistira u obliku agregata. Termička obrada ne menja to stanje.

U svojoj studiji, *Roth-Walter* i saradnici (2008.) (347) su ispitivali šta jedan antigen čini alergenom u slučaju oralne ekspozicije i da li postoje želudačno - specifične karakteristike, koje omogućavaju proteinima da postanu alergeni. Njihovi nalazi sugerišu da su različiti aspekti ingestiranih antigena značajni za inicijalni korak senzitivacije i sledbeno izazivanje alergijskog odgovora. Oni su naveli da pasterizacija indukuje agregaciju proteina surutke, α -laktalbumina i β -laktoglobulina (ali ne i kazeina, koji je već u micelarnoj formi). Pasterizacija-agregacija podstiče ulaz u Pejerove ploče (*engl. Peyer's patches*) inhibicijom ulaza kroz enterocite, što rezultira u povećanju imunogenosti (antitela i citokini) α -laktalbumina i β -laktoglobulina.

Roth-Walter i saradnici (2008.) (347) su primetili nepodudarnost između senzitivacije na pojedine antigene mleka (merenjem serumskih imunoglobulina, uključujući IgE) i njihove sposobnosti da podstaknu anafilaktičku reakciju posle oralne ekspozicije. Nepodudarnost između stepena senzitivacije i anafilaktičkog odgovora, čini se da je u korelaciji sa sposobnošću alergena da prođe kroz apsorptivni epitelijum tokom izazova. Nativni α -laktalbumin i β -laktoglobulin brzo prolaze epitelijalnu barijeru, podstiču jak anafilaktički odgovor, dok kazein, koji formira micelle, koje onemogućavaju efikasnu apsorpciju kroz epitelijalnu barijeru, nije u stanju da podstakne anafilaksu, kada je dat oralno. Ovaj obrazac je reprodukovan i u poređenju pasterizovanih proteina prema njihovim nativnim oblicima. Sposobnost da podstaknu anafilaksu oralnim putem kod senzitivovanih miševa je u velikoj meri umanjena posle izazova pasterizovanim α -laktalbuminom i β -laktoglobulinom, iako oni podstiču povećanje nivoa antigen specifičnog IgE.

Kazein se generalno smatra glavnim alergenom kod pacijenata alergičnih na mlečne proteine, s' obzirom da su antitela na kazein, ali ne uvek i na α -laktalbumin i β -

laktoglobulin, detektovana kod gotovo svih individua alergičnih na mleko (348, 349), što je u saglasnosti sa rezultatima naše studije, jer su gotovo svi pacijenti, koji su pokazali povišenu imunoreaktivnost na ukupne proteine kravljeg mleka, bili reaktivni i na α i/ili β i/ili κ -kazein.

Nasuprot pasterizaciji (345, 350), kuvanjem se potpuno ukida antigenost α -laktalbumina i β -laktoglobulina, što može objasniti činjenicu da se kuvano mleko bolje toleriše kod većine pacijenata (351).

Rezultati *Roth-Walter-a* i saradnika (347) sugerišu da pasterizacija dovodi do agregacije proteina surutke, ali ne i kazeina. Stvaranje agregata menja put preuzimanja antigena od strane apsorptivnih enterocita i prebacuje ga na Pejerove ploče. Kao rezultat, pasterizovan β -laktoglobulin, dovodi do povećanja IgE, kao i Th2 citokina u inicijalnom koraku senzitivacije, što sugerira da je stvaranje agregata značajna osobenost antigena hrane. Nasuprot tome, samo solubilni mlečni proteini podstiču anafilaksu, s'obzirom na to da transepitelijalni prolaz preko epitela tankog creva nije poremećen. Mlečni proteini se najčešće konzumiraju u pasterizovanoj formi, što može biti klinički značajno. Ovi nalazi podržavaju hipotezu da procesiranje hrane može doprineti povećanju učestalosti senzitivacije na proteine hrane u zapadnjačkim državama.

5.6. Efekti dijete kod pacijenata sa imunoreaktivnošću na proteine hrane

Ideja o mogućim pozitivnim efektima dijete bez glutena, odnosno proteina kravljeg mleka u prevenciji ili u održavanju indukovane remisije bolesti, imunoreaktivnih pacijenata, opravdana je većim brojem publikacija.

Utvrđeno je da snižavanje stimulacije imunskog sistema, smanjenjem prisustva antigena (*H. pylori* ili pozitivan hepatitis C (*Hepatitis C Virus-positive*; HCV+)) ima efekat na povećanje preživljavanja većine pacijenata sa limfomom. Striktno govoreći, tretman pacijenata sa MALT limfomom, niskog gradusa, u cilju izlječenja infekcije

bakterijom *H. Pylori* dovodi do poboljšanja u lečenju pomenutih pacijenata (352, 353). Na isti način je zapažen nestanak limfoidnog tkiva u gastričnoj mukozi kod pacijenata sa HCV+ limfomima, posle anti virusne terapije (354).

Pristupom - uklanjanje antigena, pretpostavimo da se mogu poboljšati rezultati u lečenju bolesnika, koji pored svoje osnovne bolesti, imaju i povišenu imunoreaktivnost na određene antigene hrane. Rezultati se mogu poboljšati dijetetskom restrikcijom unosa glutena u onih sa imunoreaktivnošću na gluten ili restrikcijom unosa proteina mleka u pacijenata sa imunoreaktivnošću na proteine mleka. Navedenu pretpostavku podupire rad *Makishime* i saradnika (2006.) (355), koji su opisali slučaj sredovečnog Japanca sa intestinalnim difuznim, B krupnoćelijskim limfomom, udruženim sa celijakijom, koji je posle kombinovane hemoterapije, bio u stanju remisije, a gastrointestinalni simptomi su se povukli, posle dijetete bez glutena.

Korisni efekti dijetete su prikazani i u prikazu slučaja *Juranića* i saradnika (2009.) (356). Prikazan je slučaj pacijenta sa psorijatičnim artritismom i adenomom prostate, koji je u isto vreme imao i MGUS komponentu (monoklonalna gamapatija koja može progredirati u multipli mijelom) i povišenu imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka. Nakon savetovane dijetete, koja je podrazumevala isključenje mleka i mlečnih proizvoda iz ishrane, pacijentu je nestala MGUS komponenta na elektroforetskom testiranju i drastično se smanjio nivo antitela na proteine kravljeg mleka.

Tri pacijenta sa ROU iz naše eksperimentalne grupe su se odlučila da prihvate savetovani dijetetski režim, koji je podrazumevao dijetetu bez proteina kravljeg mleka (*engl. cow's milk protein free diet; CMFD*) u trajanju od dva, odnosno tri meseca. Prvi pacijent je testiran pet puta (u periodu od 12 meseci) i zabeleženo je konstantno opadanje u koncentraciji IgA i IgG antitela na proteine kravljeg mleka četiri puta (od 190 AU/ml na 36 AU/ml za IgA i od 800 AU/ml na 172 AU/ml za IgG). Najbitnije je da su oralne ulceracije i subjektivne tegobe nestale i nisu se pojavljivale tokom perioda sprovođenja dijetete. Nivo serumskih IgE imunoglobulina na proteine kravljeg mleka je opao u drugoj i četvrtoj analizi, a porastao u trećoj i petoj analizi. Oralne ulceracije i subjektivne tegobe su se povratile nakon uvođenja mleka i mlečnih

proizvoda u svakodnevnu ishranu (pre petog testiranja) i bilo je praćeno povišenim nivoom IgA, IgG i IgE antitela na proteine kravljeg mleka u serumu pacijenta.

Serum drugog pacijenta je analiziran dva puta. Značajano opadanje koncentracije IgA i IgE imunoglobulina na proteine kravljeg mleka je zapaženo nakon osam meseci dijete, ali u isto vreme je zapažen porast IgG imunoglobulina na proteine kravljeg mleka i gliadin. Pacijent je naveo podatak da su se pojavile jedna do dve oralne ulceracije nakon konzumacije sladoleda.

Nakon 2,5 meseca dijete bez mleka i mlečnih proizvoda, zapažen je pad u koncentraciji IgG i IgE serumskih antitela u serumu trećeg pacijenta i istovremeno porast u koncentraciji serumskih IgA antitela na proteine kravljeg mleka. Period između egzacerbacija oralnih ulceracija je bio duži, nego što je to bilo pre dijete.

Rezultati dijete naših pacijenata su bili u saglasnosti sa pomenutim literaturnim podacima, jer je po prestanku konzumacije mleka i mlečnih proizvoda, u tri pacijenta, koja su pokazala povišenu humoralnu imunoreaktivnost na proteine kravljeg mleka, došlo do nestanka ROU ili do produženja perioda između dve epizode ROU.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu kompletne analize dobijenih rezultata, došli smo do sledećih zaključaka:

1. Karakteristike ROU:

- Eksperimentalnu grupu je činilo 38% muškaraca i 62% žena.
- Prosečna starost eksperimentalne grupe je iznosila 40.32 godine.
- Najzastupljenija lokalizacija (53%) ROU su bukalna i labijalna sluzokoža, zatim jezik sa 14% i cela usta u 13% pacijenata.
- U 86% slučajeva karakteristike ROU su odgovarale kliničkoj slici afta minor, dok su u 14% slučajeva odgovarale aftama major.
- Više od polovine pacijenata (58%) je u momentu kliničkog pregleda imalo od 1-5 ulceracija u usnoj duplji, 32% je imalo od 5-10 promena, dok je 10% imalo više od 10 ulceracija u ustima.
- Kod 52% pacijenata, ROU su se prvi put pojavile pre više godina, kod 40% njih pre više od godinu dana, dok su se u 6% slučajeva promene prvi put javile u periodu od pre 1-6 meseci; samo jedan ispitanik (2%) je izjavio da su se ulceracije prvi put pojavile u periodu od pre 6-12 meseci.
- Recidiv ROU se javljao jednom mesečno u 40% pacijenata, 30% njih je navelo da je učestalost recidiva od 2-5 puta u toku 6 meseci, dok su se u 18% njih promene javljale više puta mesečno; najmanji broj pacijenata (12%) je izjavio da do recidiva dolazi od 1-3 puta u toku jedne godine.
- U 86% pacijenata ROU zarastaju u periodu od 7-14 dana, dok u 14% slučajeva zarastaju duže od mesec dana.

2. Preosetljivost na proteine hrane:

- Kod 14% ispitanih pacijenata sa ROU registrovana je povišena humoralna imunoreaktivnost na gliadin.
- Povišena humoralna imunoreaktivnost na ukupne proteine kravljeg mleka je detektovana kod više od polovine (72%) pacijenata sa ROU.
- Serumska antitela su u povišenoj koncentraciji bila prisutna na:
 - α -kazein u 72%,
 - β -kazein u 62%,
 - κ -kazein u 52%,
 - α -laktalbumin u 18%,
 - laktoferin u 20%,
 - β -laktoglobulin A u 24% i
 - β -laktoglobulin B u 30%.

3. Na osnovu dobijenih rezultata konstatujemo da proteini kravljeg mleka mogu biti jedan od etioloških faktora u nastanku ROU.

7. LITERATURA

1. Porter SR, Leao JC. Oral ulcers and its relevance to systemic disorders. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2005; 21:295-306.
2. Scully C. Oral ulceration: a new and unusual complication. *British Dental Journal*. 2002; 192:139-140.
3. Natah SS, Konttinen YT, Enattah NS, Ashammakhi N, Sharkey KA, Hayrinen-Immonen R. Recurrent aphthous ulcers today: a review of the growing knowledge. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2004; 33:221-234.
4. Ship JA, Chavez EM, Doerr PA, Henson BS, Sarmadi M. Recurrent aphthous stomatitis. *Quintessence International*. 2000; 31:2:95-112.
5. Altenburg A, Papoutsis N, Orawa H, Martus P, Krause L, Zouboulis CC. Epidemiology and clinical manifestations of Adamantiades-Behcet disease in Germany – Current pathogenetic concepts and therapeutic possibilities. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2006; 4:49-66.
6. Zouboulis CC, Keitel W. A Historical review of early descriptions of Adamantiades-Behcet's Disease. *Journal of Investigative Dermatology*. 2002; 119:201-205.
7. Zouboulis CC. Morbus-Adamantiades-Behcet. Klinische und experimentelle Befunde von 53 Patienten aus dem Berliner Raum. Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin, 1994.
8. Pongissawaranun W, Laohapand. Epidemiologic study on recurrent aphthous stomatitis in a Thai dental patient population. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 1991; 19:52-53.
9. Field EA, Brookes V, Tyldesley WR. Recurrent aphthous ulcerations in children – a review. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 1992; 2:1-10.
10. Rennie RS, Reade PC, Hay D, Scully C. Recurrent aphthous stomatitis – review. *British Dental Journal*. 1985; 159:361-367.
11. Fahmy MS. Recurrent aphthous ulcers in a mixed Arab community. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 1976; 4:160-164.
12. Embil JA, Stephens RG, Mauriel R. Prevalence of recurrent herpes labials and aphthous ulcers among young adults on six continents. *Canadian Medical Association Journal*. 1975; 113:630-637.
13. Sircus W, Church R, Kelleher J. Recurrent aphthous ulceration of the mouth: a study of the natural history, aetiology, and treatment. *Quarterly Journal of Medicine*. 1957; 26:235-249.
14. Axell T. A prevalence study of oral mucosal lesions in an adult Swedish population. *Odontologisk Revy*. 1976; 27:IS-103S.
15. Kleinman DV, Swango PA, Pindborg JJ. Epidemiology of oral mucosal lesions in United States school children: 1986-87. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 1994; 22:243-253.

16. Peretz B. Major recurrent aphthous stomatitis in an 11 year old girl: case report. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 1994; 18:309-311.
17. Crevelli MR, Aguas S, Adler I, Quarracino C, Bazerque P. Influence of socioeconomic status on oral mucosa lesion prevalence in schoolchildren. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 1988; 16:58-60.
18. Miller MF, Garfunkel AA, Ram C, Ship II. Inheritance patterns in recurrent aphthous ulcers: twin and pedigree data. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1977; 43:886-891.
19. Ship II. Epidemiologic aspects of recurrent aphthous ulcerations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1972; 33:400-406.
20. Challacombe JJ, Batchelor JR, Kennedy LA, Lehner T. HLA antigens in recurrent oral ulcerations. *Archives of Dermatology*. 1977; 113:1717-1719.
21. Lehner T, Welsh KI, Batchelor JR. The relationship of HLA-B and DR phenotypes to Behcet's syndrome, recurrent oral ulceration and the class of immune complexes. *Immunology* 1982; 47:581-587.
22. Malmström M, Salo OP, Fyhrquist F. Immunogenetic markers and immune response in patients with recurrent oral ulceration. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1983; 12:23-30.
23. Shohat-Zabarski R, Kalderon S, Klein T, Weinberger A. Close association of HLA-B51 in persons with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1992; 74:455-458.
24. Ozbakir F, Yazici H, Mat C, Tüzün Y, Yurdakul S, Yilmazer S. HLA antigens in recurrent oral ulcerations: evidence against a common disease spectrum with Behcet's syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 1987; 5:263-265.
25. Albanidou-Farmaki E, Kayavis IG, Polymenidis Z, Papanayotou P. HLA-A, B, C and DR antigens in recurrent oral ulcers. *Annals of Dentistry*. 1988; 47:5-8.
26. Gallina G, Cumbo V, Messina P, Caruso C. HLA-A, B, C, DR, MT, MB antigens in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1985; 59:364-370.
27. Sun A, Hsieh RP, Chu CT, Wu YC. Strong association of HLA DRw9 in Chinese patients with recurrent oral ulcers. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1991; 24:195-198.
28. Dolby AE, Walker DM, Slade M, Allan C. HLA histocompatibility antigens in recurrent aphthous ulceration. *Journal of Dental Research*. 1977; 56:105-107.
29. Platz P, Ryder LP, Donatsky O. No evidence of HLA-A and B antigens in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Tissue Antigens* 1976; 8:279-280.
30. Rogers R S 3rd. Recurrent aphthous stomatitis: clinical characteristics and associated systemic disorders. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 1997; 16:278-283.
31. Jankovic Lj. *Oralna medicina, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd* 2001.

32. Ben-Aryeh H, Malberger E, Gutman D, Anavi Y. Salivary IgA and serum IgG and IgA in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1976; 42:746-752.
33. Lehner T. Immunological estimation of blood and saliva in human recurrent oral ulceration. *Archives of Oral Biology*. 1969; 14:351-364.
34. Scully C, Yap L, Boyle P. IgE and IgD concentrations in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Archives of Dermatology*. 1983; 119:31-34.
35. Bagg J, Williams BD, Amos N, Dagalis P, Walker DM. Absence of circulating IgG immune complexes in minor recurrent aphthous ulceration. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1987; 16:53-56.
36. Brady H, Silverman S. Studies on recurrent oral aphthae. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1969; 27:27-34.
37. Porter SR, Scully C, Bowden J. Immunoglobulin G subclasses in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1992; 21:26-27.
38. Vicente M, Soria A, Mosquera A, Pérez J, Lamas A, Castellano T, Ramos A. Immunoglobulin G subclass measurements in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1996; 25:538-540.
39. Healy CM, Carvalho D, Pearson JD, Thornhill MH. Raised anti-endothelial cell autoantibodies (AECA), but not anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA), in recurrent oral ulceration: modulation of AECA binding by tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interferon-gamma (IFN- γ). *Clinical and Experimental Immunology*. 1996; 106:523-528.
40. Burton-Kee JE, Mowbray JF, Lehner T. Different cross-reacting circulating immune complexes in Behcets syndrome and recurrent oral ulcers. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1981; 97:559-567.
41. Abdula YH, Lehner T. The effect of immune complexes on chemotaxis in Behcet's syndrome and recurrent oral ulcers. In: Lehner T, Barnes CG, eds: *Behcet's Syndrome: Clinical and Immunological Features*. London: Academic Press. 1979; 55:59.
42. Dagalis P, Bagg J, Walker DM. Spontaneous migration and chemotactic activity of neutrophil polymorphonuclear leukocytes in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1987; 64:298-301.
43. Wray D, Chardon J. Polymorphonuclear neutrophil function in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1991; 20:392-394.
44. Ueta E, Umazume M, Yamamoto T, Osaki T. Leukocyte dysfunction in oral mucous membrane diseases. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1993; 22:120-125.
45. Manders SM, Kostman JR, Mendez L, Russin VL. Thalidomide-resistant HIV associated aphthae successfully treated with granulocyte colonystimulating factor. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1995; 33:380-382.

46. Hayrinen-Immonen R, Sorsa T, Nordstrom D, Malmstrom M, Konttinen YT. Collagenase and stromelysin in recurrent aphthous ulcers (RAU). *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1993; 22:46-49.
47. Schroeder HE, Müller-Glauser W, Sallay K. Pathomorphologic features of the ulcerative stage of oral aphthous ulceration. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1984; 58:293-305.
48. Hayrinen-Immonen R, Nordstrom D, Malmstrom M, Hietanen J, Konttinen YT. Immune-inflammatory cells in recurrent oral ulcers (ROU). *Scandinavian Journal of Dental Research*. 1991; 99:510-518.
49. Brody D, Metcalfe DD. Mast cells: A unique and functional diversity. *Clinical & Experimental Allergy*. 1998; 28:1167-1170.
50. Dolby AE, Allison RT. Quantitative changes in the mast cell population in Mikulicz's recurrent oral aphtae. *Journal of Dental Research*. 1969; 48:901-903.
51. Lehner T. Pathology of recurrent oral ulceration and oral ulceration in Behcet's syndrome: light, electron and fluorescence microscopy. *Journal of Pathology*. 1969; 97:481-493.
52. Lichtig C, Haim S, Hammel I, Friedman-Birnbaum R. The quantification and significance of mast cells in lesions of Behcet's disease. *British Journal of Dermatology*. 1980; 102:255-259.
53. Natah SS, Hayrinen-Immonen R, Hietanen J, Malmstrom M, Konttinen YT. Quantitative assessment of mast cells in recurrent aphthous ulcers (RAU). *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1998; 27:124-129.
54. Boismenu R, Havran W. An innate view of γ/δ T cells. *Current Opinion in Immunology*. 1997; 9:57-63.
55. De Libero G. Sentinel function of broadly reactive human γ/δ T cells. *Immunology*. 1997; 18:22-26.
56. Natah SS, Häyrinen-Immonen R, Patinen P, Hietanen J, Malmström M, Savilahti E, Konttinen YT. Increased density of lymphocytes bearing γ/δ T-cell receptors in recurrent aphthous ulceration (RAU). *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2000; 29:375-380.
57. Patinen P, Savilahti E, Hietanen J, Malmström M, Maki M, Reunala T. Intraepithelial lymphocytes bearing the gamma/delta receptor in the oral and jejunal mucosa in patients with dermatitis herpetiformis. *European Journal of Oral Sciences*. 1997; 105:130-135.
58. Pepin LF, Roger T, Morisset J, Seman M. Preferential V δ 1 expression among TcR γ/δ -bearing T cells in human oral epithelium. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1993; 37:289-294.
59. Pedersen A, Ryder LP. γ/δ T-cell fraction of peripheral blood is increased in recurrent aphthous ulceration. *Clinical Immunology*. 1994; 72:98-104.
60. Suzuki Y, Hoshi K, Matsuda T, Mizushima Y. Increased peripheral blood $\gamma\delta$ + T cells and natural killer cells in Behcet's disease. *Journal of Rheumatology*. 1992; 19:588-592.

61. Hasan A, Fortune F, Wilson A, Warr K, Shinnick T, Mizushima Y, Van Der Zee R, Stanford MR, Sanderson J, Lehner T. Role of γ/δ T cells in pathogenesis and diagnosis of Behcet's disease. *Lancet*. 1996; 347:789-794.
62. Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial γ/δ T cells. *Science*. 1994; 266:1253-1255.
63. Boismenu R. Function of intestinal γ/δ cells. *Immunology Research*. 2000; 2-3:123-127.
64. Havran WL. A role for epithelial γ/δ T cells in tissue repair. *Immunology Research*. 2000; 2-3:63-69.
65. Jones-Carson J, Torres-Vazquez A, Van Der Heyde HC, Warner T, Wagner RD, Balish E. γ/δ T cell-induced nitric oxide production enhances resistance to mucosal candidiasis. *Nature Medicine*. 1995; 1:552-557.
66. Freysdottir J, Lau SH, Fortune F. γ/δ T cells in Behcet's disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Clinical and Experimental Immunology*. 1999; 118:451-457.
67. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 1990; 87:1620-1624.
68. Kimura H, Hokari R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, Kurose I, Higuchi H, Fujimori H, Tsuzuki Y, Serizawa H, Ishii H. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut: An International Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 1998; 42:180-187.
69. Flak TA, Goldman WE. Autotoxicity of nitric oxide in airways disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1996; 154:S202-206.
70. Sun A, Chu CT, Liu BY, Wang JT, Leu JS, Chiang CP. Expression of interleukin-2 by activated peripheral blood lymphocytes upregulated by the plasma level of interleukin-2 in patients with recurrent aphthous ulcers. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China B*. 2000; 24:116-122.
71. Taylor LF, Bagg J, Warker DM. Increased production of tumor necrosis factor by peripheral blood leukocytes in patients with recurrent oral aphthous ulceration. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1992; 21:21-25.
72. Buno IJ, Huff JC, Weston WL, Cook DT, Brice SL. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor α , interleukins 2, 4, and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. *Archives of Dermatology*. 1998; 134:827-831.
73. Stanley HR. Aphthous lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1972; 33:407-416.
74. Healy CM, Thornhill MH. Induction of adhesion molecule expression on blood vessels and keratinocytes in recurrent oral ulceration. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1999; 28:5-11.

75. Mills MP, Mackler BF, Nelms DC, Peavy DL. Quantitative distribution of inflammatory cells in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Dental Research*. 1980; 59:562-566.
76. Schroeder HE, Müller-Glauser W, Sallay K. Stereologic analysis of leukocyte infiltration in oral ulcers of developing Mikulicz aphtae. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1983; 56:629-639.
77. Poulter LW, Lehner T. Immunohistology of oral lesions from patients with recurrent oral ulcers and Behcet's syndrome. *Clinical and Experimental Immunology*. 1989; 78:189-195.
78. Savage NW, Seymour GJ, Kruger BJ. Expression of Class I and Class II major histocompatibility complex antigens on epithelial cells in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1986; 15:191-195.
79. Dolby AE. Recurrent aphthous ulceration. Effects of sera and peripheral blood lymphocytes upon oral epithelial tissue culture cells. *Immunology*. 1969; 17:709-714.
80. Rogers RS 3RD, Movius DL, Pierre RV. Lymphocyte-epithelial cell interactions in oral mucosal inflammatory diseases. *Journal of Investigative Dermatology*. 1976; 67:599-602.
81. Burnett PR, Wray D. Lytic effects of serum and mononuclear leukocytes on oral epithelial cells in recurrent aphthous stomatitis. *Clinical Immunology*. 1985; 34:197-204.
82. Gadol N, Greenspan JS, Hoover CI, Olson J. Leukocyte migration inhibition in recurrent aphthous ulceration. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1985; 14:121-132.
83. Peavy DL, Nelms DC, Mackler BF. Failure of autologous oral epithelia to activate RAU lymphocytes. *Clinical Immunology*. 1982; 22:291-295.
84. Greenspan JS, Gadol N, Olson JA, Talal N. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in recurrent aphthous ulceration. *Clinical and Experimental Immunology*. 1981; 44:603-610.
85. Sistig S, Cekic-Arambasin A, Rabatic S, Vucicevic-Boras V, Kleinheinz J, Piffko J. Natural immunity in recurrent aphthous ulceration. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2001; 30:275-280.
86. Vanhale HM, Rogers RS, Dozle JA, Schroeter AL. Immunofluorescence microscopic studies of recurrent aphthous stomatitis. *Archives of Dermatology*. 1981; 117:779-781.
87. Landesberg R, Fallon M, Insel R. Alterations of T helper/inducer and T suppressor/inducer cells in patients with recurrent aphthous ulcers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1990; 69:205-208.
88. Pedersen A, Pedersen BK. Natural killer cell function and number of peripheral blood are not altered in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1993; 76:616-619.

89. Savage NW, Mahanonda R, Seymour GJ, Bryson GJ, Collins RJ. The proportion of suppressor-inducer T-lymphocytes is reduced in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1988; 17:293-297.
90. Bachtiar EW, Cornain S, Siregar B, Raharjo TW. Decreased CD4+/CD8+ ratio in major type of recurrent aphthous ulcers: comparing major to minor types of ulcers. *Asian Pacific Journal of Allergy & Immunology*. 1998; 16:75-79.
91. Savage NW, Seymour GJ, Kruger BJ. T-lymphocyte subset changes in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1985; 60:175-181.
92. Greenspan JS, Daniels TE, Shillitoe FJ, Olson JA. Mononuclear cell subpopulations in recurrent aphthous ulceration enumerated using monoclonal antibodies, flow cytometry and the ABC technique (Abstract 1507). *Journal of Dental Research*. 1982; 61:346.
93. Sun A, Chu C-T, Wu Y-C, Yuan JH. Mechanisms of depressed natural killer cell activity in recurrent aphthous ulcers. *Clinical Immunology*. 1991; 60:83-92.
94. Hayrinen-Immonen R, Malmstrom M, Nordstrom, D, Sorsa T, Konttinen YT. Distribution of adhesion receptors in recurrent oral ulcers. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1992; 21:199-202.
95. Verdickt GM, Savage NW, Dodd NM, Walsh LJ. Expression of the CD54 (ICAM-1) and CD11a (LFA-1) adhesion molecules in oral mucosal inflammation. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1992; 21:65-69.
96. Eversole LR. Immunopathology of oral mucosal ulcerative, desquamative, and bullous diseases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1994; 77:555-571.
97. Hayrinen-Immonen R. Immuneactivation in recurrent oral ulcers (ROU). *Journal of Dental Research*. 1992; 100:222-227.
98. Natah SS, Häyrinen-Immonen R, Hietanen J, Malmström M, Kontinen YT. Factor XIIIa-positive dendrocytes are increased in number and size in recurrent aphthous ulcers (RAU). *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1997; 26:408-413.
99. Regezi JA, MacPhail LA, Richards DW, Greenspan JS. A study of macrophage-related cells, and endothelial adhesion molecules in recurrent aphthous ulcers in HIV-positive patients. *Journal of Dental Research*. 1993; 72:1549-1553.
100. Hermanns-Le T, Paquet P, Pierard-Franchimont C, Arrese JE, Pierard GE. Regulatory function of factor-XIIIa-positive dendrocytes in incipient toxic epidermal necrolysis and graft-versus-host reaction, a hypothesis. *Dermatology*. 1999; 198:184-186.
101. Nestle FO, Nickoloff BJ. A fresh morphological and functional look at dermal dendritic cells. *Journal of Cutaneous Pathology*. 1995; 22:385-393.
102. Yoo YH, Park BS, Whitaker-Menzes D, Korngold R, Murphy GF. Dermal dendrocytes participate in the cellular pathology of experimental acute graft-versus-host disease. *Journal of Cutaneous Pathology*. 1998; 25:426-434.
103. Wall P. *Pain: the Science of Suffering*, 2nd edn. London: Phoenix Ltd 2000:35.

104. Ship JA. Recurrent aphthous stomatitis. An update. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1996; 81:141-147.
105. Fletcher AE, Hunt BM, Bulpitt CJ. Evaluation of quality of life in clinical trials of cardiovascular disease. *Journal of Chronic Diseases*. 1987; 40:557-566.
106. Arbesfeld SJ, Kurban AK. Behcet's disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1988; 19:767-779.
107. Woo SB, Sonis ST. Recurrent aphthous ulcers: a review of diagnosis and treatment. *Journal of the American Dental Association*. 1996; 127:1202-1213.
108. International Study Group for Behcet's Disease. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. *Lancet*. 1990; 335:1078-1080.
109. Jorizzo JL, Taylor RS, Schmalstieg FC. Complex aphthosis: a forme fruste of Behcet's syndrome? *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1985; 13:80-84.
110. Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M. Close association of HLA-Bw51 with Behcet's disease. *Archives of Ophthalmology*. 1982; 100:1455-1458.
111. Lehner T, Batchelor JR, Challacombe SJ, Kennedy L. An immunogenetic basis for tissue involvement in Behcet's syndrome. *Immunol*. 1979; 37:895-900.
112. Aydintug AO, Tokgoz G, D'cruz DP, Gurler A, Cervera R, Duzgun N, Atmaca LS, Khamashta MA and Hughes GRV. Antibodies to endothelial cells in patients with Behcet's disease. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1993; 67:157-162.
113. Eglin RP, Lehner T, Subak-Sharpe JH. Detection of RNA complementary to herpes simplex virus in mononuclear cells from patients with Behcet's syndrome and recurrent oral ulcers. *Lancet*. 1982; 2:1356-1360.
114. Mizushima Y. Behcet's disease. *Current Opinion in Rheumatology*. 1991. 3:32-35.
115. Lehner T, Lavery E, Smith R, van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T. Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Behcet's syndrome. *Infection and Immunity*. 1991; 59:1434-1441.
116. Benazra D, Cohen E. Treatment and visual prognosis in Behcet's disease. *British Journal of Ophthalmology*. 1986; 70:589-592.
117. Hamuryudan V, Yurdakul S, Serdaroglu S, Tuzun Y, Rosenkaimer F, Yazici H. Topical alpha interferon in the treatment of oral ulcers in Behcet's syndrome: a preliminary report. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 1990; 8:51-54.
118. Caspers-Velu LE, Decaux G, Libert J. Cyclosporine in Behcet's disease resistant to conventional therapy. *Annals of Ophthalmology*. 1989; 21:111-116.
119. Firestein GS, Gruber HE, Weisman MH, Zvaifler NJ, Barber J, O'Duffy JD. Mouth and genital ulcers with inflamed cartilage: MAGIC syndrome. *American Journal of Medicine*. 1985; 79:65-72.

120. Orme RL, Nordlund JJ, Barich L, Brown T. The MAGIC syndrome (mouth and genital ulcers with inflamed cartilage). *Archives of Dermatology*. 1990; 126:940-944.
121. Green PHR, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet* 2003; 362:383-391.
122. Farrell RJ, Kelly CP. Diagnosis of celiac sprue. *American Journal of Gastroenterology*. 2001; 96:3237-3246.
123. Ladinsker B, Pittschieler K. Endomysium antibodies in celiac disease. *Gut*. 1994; 35:776.
124. Martin MG. The biology of inherited disorders of the gastrointestinal tract part I: GI disorders. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 1998; 26:321-325.
125. Ferguson MM, Wray D, Carmichael HA, Russell RI and Lee FD. Celiac disease with recurrent aphthae. *Gut*. 1980; 21:223-226.
126. Veloso FT, Saleiro JV. Small bowel changes in recurrent ulceration of the mouth. *Hepato-gastroenterology*. 1987; 34:36-37.
127. Meini A, Pillan MN, Plebani A, Ugazio AG, Majorana A, Sapelli PL. High prevalence of DRw10 and DQw1 antigens in celiac disease associated with recurrent aphthous stomatitis. *American Journal of Gastroenterology*. 1993; 88:972.
128. Wray D. GLuten-sensitive recurrent aphthous stomatitis. *Digestive Diseases & Sciences*. 1981; 26:737-740.
129. O'Farrelly C, O'Mahony C, Graeme-Cook F, Feighery C, McCartan BE, Weir DG. Gliadin antibodies identify gluten-sensitive oral ulceration in the absence of villous atrophy. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1991; 20:476-478.
130. Sedghizadeh PP, Shuler CF, Allen CM, Beck FM, Kalmar JM. Celiac disease and recurrent aphthous stomatitis: A report and review of the literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 2002; 94:474-478.
131. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*. 2007; 369(9573):1641-1657.
132. Plauth M, Jenss H, Meyle J. Oral manifestations of Crohn's disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 1991; 13:29-37.
133. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*. 2002; 347:417-429.
134. Lupus foundation of America. Retrieved on 2007-07-04.
135. Wu IB, Robert AS. Reiter's syndrome: The classic triad and more. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2008; 59:113-121.
136. Bauman C, Cron RQ, Sherry DD, Francis JS. Reiter syndrome initially misdiagnosed as Kawasaki disease. *Journal of Pediatrics*. 1996; 128:366-369.
137. Cuttica RJ, Scheines EJ, Garay SM, Romanelli MC, Maldonado Cocco JA. Juvenile onset Reiter's syndrome: a retrospective study of 26 patients. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 1992; 10:285-288.

138. Lotery HE, Galask RP, Stone MS, Sontheimer RD. Ulcerative vulvitis in atypical Reiter's syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003; 48:613-616.
139. Sehgal VN, Koranne RV, Basumatary RK, Vishwakarma GK, Singh AK, Raj GA. Reiter's disease. *Journal of Dermatology*. 1982; 9:145-148.
140. Malta JB, Milanelo D, Carvalheiro FA, Silva MV. Reiter's syndrome associated with the acquired immunodeficiency syndrome: a case report. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2002; 6:40-44.
141. Liao CH, Huang JL, Yeh KW. Juvenile Reiter's syndrome: a case report. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2004; 37:379-381.
142. al-Khonizy W, Reveille JD. The immunogenetics of the seronegative spondyloarthropathies. *Baillieres Clinical Rheumatology*. 1998; 12:567-588.
143. Zivony D, Nocton J, Wortmann D, Esterly N. Juvenile Reiter's syndrome: a report of four cases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1998; 38:32-37.
144. Willkens RF, Arnett FC, Bitter T, Calin A, Fisher L, Ford DK, et al. Reiter's syndrome: evaluation of preliminary criteria for definite disease. *Arthritis & Rheumatism*. 1981; 24:844-849.
145. Satko SG, Iskandar SS, Appel RG. IgA nephropathy and Reiter's syndrome: report of two cases and review of the literature. *Nephron*. 2000; 84:177-182.
146. Black M, Mignogna MD, Scully C. Pemphigus vulgaris. *Oral Diseases*. 2005; 11:119-130.
147. Camacho-Alonso F, Lopez-Jornet P, Bermejo-Fenoll A. Pemphigus vulgaris. A presentation of 14 cases and review of the literature. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*. 2005; 10:282-288.
148. Da Silva K, Mandel L. Early manifestation of pemphigus vulgaris. A case report. *New York State Dental Journal*. 2007; 73:42-44.
149. Parisi E, Raghavendra S, Werth VP, Sollecito TP. Modification to the approach of the diagnosis of mucous membrane pemphigoid: a case report and literature review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 2003; 95:182-186.
150. Scully C, Bagan JV. Adverse drug reactions in the orofacial region. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2004; 15:221-239.
151. Abdollahi M, Radfar M. A review of drug-induced oral reactions. *Journal of Contemporary Dental Practice*. 2003; 4:10-31.
152. Al-Johani KA, Fedele S, Porter SR. Erythema multiforme and related disorders. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 2007; 103:642-654.
153. Mellerio J.E. Molecular pathology of the cutaneous basement membrane zone. *Clinical and Experimental Dermatology*. 1999; 24:25-32.
154. Tong L, Hodgkins PR, Denyer J, Brosnahan D, Harper J, Russel-Eggitt I, Taylor DSI, Atherton D. The eye in epidermolysis bullosa. *British Journal of Ophthalmology*. 1999; 83:323-326.

155. Van Rengen A, Degreef H. Epidermolysis bullosa dystrophica of Hallopeau-Siemens and squamous-cell carcinoma: a case report. *Dermatology*. 1996; 192:418-419.
156. Michael Hertl. *Autoimmune Diseases of the Skin, Pathogenesis, Diagnosis, Management*. Springer Vienna. 2005. (Christian Rose and Detlef Zillikens, *Dermatitis Herpetiformis Duhring*, Pages 95-108).
157. Chorzelski TP, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Beutner EH, Kumar V. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1983; 4:325-334.
158. Chorzelski TP, Jablonska S, Beutner EH, Bear SF, Furey NL. Linear IgA bullous dermatosis. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Bear SF (eds) *Immunopathology of the skin*. 2nd ed. John Wiley & Sons. New York. 1979. pp 315-323.
159. Field EA, Allan RB. Review article: oral ulceration – aetiopathogenesis, clinical diagnosis and management in the gastrointestinal clinic. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2003; 18:949-962.
160. Ferry JA, Harris NL. Lymphomas and lymphoid hyperplasia in head and neck sites. In: *Head and neck surgical pathology*. Pilch BZ, editor. 2001; 476-533.
161. Richards A, Costelloe MA, Evenson JW, Scully C, Irvine GH, Rooney N. Oral mucosal non-Hodgkin's lymphoma: a dangerous mimic. *Oral Oncology*. 2000; 36:556-558.
162. Castellano S, Carbone M, Carozzo M, Broccoletti R, Pagano M, Vasino MA, Gandolfo S. Onset of oral extranodal large B- cell non-Hodgkin's lymphoma in a patient with polycythemia vera: a rare presentation. *Oral Oncology*. 2002; 38:624-626.
163. Gavalda C, Bagan JV, Jimenez Y, Martorell M. Linfoma no-Hodgkin con manifestacion en forma de tumefaccion facial. *Avances en odontoestomatologia*. 1997; 13:345-349.
164. Tuling Leong I, Fernandes BJ, Mock D. Epstein-Barr virus detection in non-Hodgkin's lymphoma of the oral cavity: An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2001; 92:184-193.
165. Boggess KA, Williamson HO, Homm RJ. Influence of the menstrual cycle on systemic diseases. *Obstetrics & Gynecology Clinics of North America*. 1990; 17:321-342.
166. Dolby AE. Recurrent Mikulicz's oral aphtae-their relationship to the menstrual cycle. *British Dental Journal*. 1968; 124:359-360.
167. McCartan BE, Sullivan A. The association of menstrual cycle, pregnancy, and menopause with recurrent oral aphthous stomatitis: A review and critique. *Obstetrics & Gynecology*. 1992; 80:455-458.
168. Segal AL, Katcher AH, Brightman KJ, Miller MF. Recurrent herpes labialis, recurrent aphthous ulcers, and the menstrual cycle. *Journal of Dental Research*. 1974; 53:797-803.

169. Ship II, Moris AL, Durocher RT, Burket LW. Recurrent aphthous ulceration in a professional school student population. IV-Twelve months study of natural disease patterns. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1961; 14:30-39.
170. Vincent SD, Lilly GE. Clinical, historic, and therapeutic features of aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1992; 74:79-86.
171. Bascones A, Figuero E, Esparza GC. Ulceras orales. *Medicina Clinica (Barc)*. 2005; 125:590-597.
172. McCullough MJ, Savage NW. Oral viral infections and the therapeutic use of antiviral agents in dentistry. *Australian Dental Journal*. 2005; 50:S31-35.
173. Kolokotronis A, Louloudiadis K, Fotiou G, Matiais A. Oral manifestations of infections of infections due to varicella zoster virus in otherwise healthy children. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2001; 25:107-112.
174. Bascones A, Serrano C, Campo J. Manifestaciones orales de la infeccion por el virus de la inmunodeficiencia humana en la cavidad bucal. *Medicina Clinica (Barc)*. 2003; 120:426-434.
175. Little JW. Syphilis: an update. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 2005; 100:3-9.
176. Garg RK, Singhal P. Primary tuberculosis of the tongue: a case report. *Journal of Contemporary Dental Practice*. 2007; 8:74-80.
177. Ito FA, de Andrade CR, Vargas PA, Jorge J, Lopes MA. Primary tuberculosis of the oral cavity. *Oral Diseases*. 2005; 11:50-3.
178. Feller L, Anagnostopoulos C, Bouckaert M, Raubenheimer EJ. HIV / TB co-infection: literature review and report of multiple tuberculosis oral ulcers. *Journal of the South African Dental Association*. 2005; 60:330-332.
179. Sezer B, Zeytinoglu M, Tuncay U, Unal T. Oral mucosal ulceration: a manifestation of previously undiagnosed pulmonary tuberculosis. *Journal of the American Dental Association*. 2004; 135:336-340.
180. O'Sullivan MV, Whitby M, Chahoud C, Miller SM. Histoplasmosis in Australia: a report of a case with a review of the literature. *Australian Dental Journal*. 2004; 49:94-97.
181. Correa ME, Soares AB, de Souza CA Cintra ML, Jorge J, Almeida OP, Vargas PA. Primary aspergillosis affecting the tongue of a leukemic patient. *Oral Diseases*. 2003; 9:49-53.
182. Tugsel Z, Sezer B, Akalin T. Facial swelling and palatal ulceration in a diabetic patient. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 2004; 98:630-636.
183. Healy CM, Thornhill MH. An association between recurrent oro-genital ulceration and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1995; 24:46-48.
184. Siegel MA, Balciunas BA. Medication can induce severe ulceration. *The Journal of the American Dental Association*. 1991; 122:75-77.

185. Boulinguez S, Reix S, Bedane C, Debrock C, Bouyssou-Gauthier ML, Sparsa A, Le Brun V, De Vencay P, Bernard P, Bonnetblanc JM. Role of drug exposure in aphthous ulcers: a case-control study. *British Journal of Dermatology*. 2000; 143:1261-1265.
186. Boulinguez S, Cornee-Leplat I, Bouyssou-Gauthier ML, Bedane C, Bonnetblanc J-M. Aphthes induits par les médicaments: analyse de la littérature. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*. 2000; 127:155-158.
187. Corone S, Davido A, Corone P. A rare complication of captopril: ulceration of the lingual and jugal mucosa. *Revue de Medecine Interne*. 1987; 8:73-74.
188. Kuffer R, Baumont M, Brocheriou C. Oral aphthoid toxic dermatoses. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale*. 1976; 77:747-755.
189. Shotts RH, Scully C, Avery CM, Porter SR. Nicorandil-induced severe oral ulceration: a newly recognized drug reaction. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1999; 87:706-707.
190. Kennet S. Stomatitis medicamentosa due to barbiturates. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1968; 25:351-356.
191. Menni S, Piccinno R, Pistrutto MG. Ulcerative stomatitis in a neonate due to a chlorine antiseptic. *Contact Dermatitis*. 1988; 18:320-321.
192. Shapiro S, Olsson DL, Chellemi SJ. The association between smoking and aphthous ulcers. *Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1970; 30:624-630.
193. Axell T, Henricsson V. Association between recurrent aphthous ulcers and tobacco habits. *Journal of Dental Research*. 1985; 93:239-242.
194. Grady D, Ernster VL, stillman L, Greenspan J. Smokeless tobacco use prevents aphthous stomatitis. *Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1992; 74:463-465.
195. Greenspan D, Hilton JF, Westenhous JL. Association between oral lesions and smoking in a clinic population (Abstract no. PoB 3362).
196. Tuzun B, Wolf R, Tuzun Y, Serdaroglu S. Recurrent aphthous stomatitis and smoking. *International Journal of Dermatology*. 2000; 39:358-360.
197. Miller MF, Ship II. A retrospective study of the prevalence and incidence of recurrent aphthous ulcers in a professional population , 1958-1971. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1977; 43:532-537.
198. Ship II, Morris AW, Durocher RT, Burket LW. Recurrent aphthous ulceration and recurrent herpes labialis in a professional school student population. *Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1960; 13:17-29.
199. Ship II, Brightman VJ, Laster LL. The patient with recurrent aphthous ulcers and the patient with herpes labialis: a study of two population samples. *The Journal of the American Dental Association*. 1967; 74:645-654.
200. Heft M, Wray D. Anxiety levels in recurrent aphthous stomatitis (RAS) patients. *Journal of Dental Research*. 1982; 61:264.

201. Ferguson MM, Carter J, Boyle P. An epidemiological study of factors associated with recurrent aphthae in women. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1984; 39:212-217.
202. Pedersen A. Psychologic stress and recurrent aphthous ulceration. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1989; 18:119-122.
203. Andrews VH, Hall HR. The effect of relaxation/imagery training on recurrent aphthous stomatitis: a preliminary study. *Psychosomatic Medicine*. 1990; 52:526-535.
204. Piskin S, Sayan C, Durukan N, Senol M. Serum iron, ferritin, folic acid, and vitamin B12 levels in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2002; 16:66-67.
205. Field AE, Rotter E, Speechley JA, Tyldesley WR. Clinical and haematological assessment of children with recurrent aphthous ulceration. *British Dental Journal*. 1987; 163:19-22.
206. Challacombe SJ, Scully C, Keevil B, Lehner T. Serum ferritin in recurrent oral ulceration. *The Journal of Pathology*. 1983; 12:290-299.
207. Ferguson R, Basu MK, Asquith P, Cooke WT. Jejunal mucosal abnormalities in patients with recurrent aphthous ulceration. *British Medical Journal*. 1976; 1:11-13.
208. Porter SR, Cassar A, Flint G, Scully C. Haematological assessment of patients with recurrent aphthous stomatitis. *British Society for Dental Research*. 1986; 344.
209. Tyldesley WR. Recurrent oral ulceration and celiac disease. *British Dental Journal*. 1981; 151:81-83.
210. Wray D, Ferguson MM, Mason DK, Hutcheon AW, Dagg JH. Recurrent aphthae: treatment with vitamin B12, folic acid, and iron. *British Medical Journal*. 1975; 2:490-493.
211. Endre L. Recurrent aphthous ulceration with zinc deficiency and cellular immune deficiency. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1991; 72:559-561.
212. Merchant HW, Gangarosa LP, Glassman AB, Sobel RE. Zinc sulphate supplementation for the treatment of recurring oral ulcers. *Southern Medical Journal*. 1977; 70:559-561.
213. Nolan A, McIntosh WB, Allam BF, Lamey P-J. Recurrent aphthous ulceration: Vitamin B1, B2 and B6 status and response to replacement therapy. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1991; 20:389-391.
214. Olson JA, Feinberg I, Silverman S, Abrams D, Greenspan JS. Serum vitamin B12, folate, and iron levels in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1982; 54:517-520.
215. Merchant HW, Gangarosa LP, Morse PK, Strain WH, Baisden CR. Zinc sulphate as a preventive of recurrent aphthous ulcers. *Journal of Dental Research*. 1981; 60A:609.

216. Wray D. A double-blind trial of systemic zinc sulfate in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1982; 53:469-472.
217. Pang JF. Relation between treatment with traditional Chinese medicine for recurrent aphthous ulcer and human zinc and copper. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 1992; 12: 280-282.
218. Lucavechi T, Barberia E, Maroto M, Arenas M. Selfinjurious behavior in a patient with mental retardation: review of the literature and a case report. *Quintessence International*. 2007; 38:393–398.
219. Zonuz AT, Treister N, Mehdipour F Farahani RM, Tubbs RS, Shoja MM. Factitial pemphigus-like lesions. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal*. 2007; 12:E205–208.
220. Alonso Chevatarese AB, Della Valle D, Primo L. Self-inflicted gingival injury in a pediatric patient: a case report. *Journal of Dentistry for Children (Chic)*. 2004; 71:215–217.
221. Kivovics P, Jahn M, Borbely J, Marton K. Frequency and location of traumatic ulcerations following placement of complete dentures. *International Journal of Prosthodontics*. 2007; 20:397–401.
222. Pilolli GP, Lucchese A, Scivetti M et al. Traumatic ulcerative granuloma with stromal eosinophilia of the oral mucosa: histological and immunohistochemical analysis of three cases. *Minerva Stomatologica*. 2007; 56:73–79.
223. Holmes RG, Chan DC, Singh BB. Chemical burn of the buccal mucosa. *American Journal of Dentistry*. 2004; 17:219–220.
224. Gonzalez-Moles MA, Bagan-Sebastian JV. Alendronaterelated oral mucosa ulcerations. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2000; 29:514–518.
225. Gandara JM, Diniz M, Gandara P, Blanco A, Garcia A. Lesiones inducidas por la aplicacion topica de cocaina. *Medicina Oral*. 2002; 7:103–107.
226. Rawal SY, Claman LJ, Kalmar JR, Tatakis DN. Traumatic lesions of the gingiva: a case series. *Journal of Periodontology*. 2004; 75:762–769.
227. Shimoyama T, Kaneko T, Nasu D et al. A case of an electrical burn in the oral cavity of an adult. *Journal of Oral Science*. 1999; 41:127–128.
228. Volpato LER, Silva TC, Oliveira TM, Sakai VT, Machado MAAM. Radiation therapy and chemotherapy- induced oral mucositis. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2007; 73:562-568.
229. Scully C, Felix DH. Oral medicine – update for the dental practitioner. *Oral cancer*. *British Dental Journal*. 2006; 200:13–17.
230. Bascones A, Llanes F. *Medicina Bucal*, 2nd edn. Madrid: Avances Me´dico-dentales, 1996:93–94, 241–252.
231. Wilson SJ, Walzer M. Absorption of undigested proteins in human beings: IV. Absorption of unaltered egg protein in infants. *American Journal of Diseases of Children*. 1935; 50:49-54.
232. Byars NE, Ferraresi RW. Intestinal anaphylaxis in the rat as a model of food allergy. *Clinical and Experimental Immunology* 1976; 24:352-356.

233. Walker WA. Antigen handling by the gut. *Archives of Disease in Childhood* 1978; 53:527-531.
234. Sampson HA, Buckley RH, Metcalfe DD. Food allergy. *JAMA* 1987; 258:2886-2890.
235. Atkins FM, Steinberg SS, Metcalfe DD. Evaluation of immediate adverse reactions to foods in adults: II. A detailed analysis of reaction patterns during oral food challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1985; 75:356-363.
236. Sampson HA, McCaskill CM. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: Evaluation of 113 patients. *Journal of Pediatrics* 1985; 107:669-675.
237. Bock SA, Lee Y, Remigio LK, et al. Studies of hypersensitivity reactions to food in infants and children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1978; 62:327-334.
238. Thomas HC, Ferguson A, McLennan JG, Mason DK. Food antibodies in oral disease: A study of serum antibodies to food proteins in aphthous ulceration and other oral diseases. *Journal of Clinical Pathology*. 1973; 26:371-374.
239. Wray D, Vlagopoulos TP, Siraganian RP. Food allergens and basophil histamine release in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1982; 54:388-395.
240. Hay KD, Reade PC. The use of elimination diet in the treatment of recurrent aphthous ulceration of the oral cavity. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1984; 57:504-507.
241. Nolan A, Lamey P-J, Milligan KA, Forsyth A. Recurrent aphthous ulceration and food sensitivity. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1991; 20:473-475.
242. Wright A, Ryan FP, Willingham SE, Holt S, Page AC, Hindle MO, Franklin CD. Food allergy or intolerance in severe recurrent aphthous ulceration of the mouth. *British Medical Journal*. 1986; 292:1237-1238.
243. Eversole LR, Shopper TP, Chambers DW. Effects of suspected foodstuff challenging agents in the etiology of recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. 1982; 54:33-38.
244. Tuft L, Ettleson LN. Canker sores from allergy to weak organic acids (citric and acetic). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1956; 27:536-543.
245. Wilson CWM. Food sensitivities, taste changes, aphthous ulcers and atopic symptoms in allergic disease. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 1980; 44:302-307.
246. Nowak M, Dziechciarz P, Dwilewicz-Trojaczek J. The frequency of coeliac disease occurrence in patients with recurrent aphthous stomatitis (RAS)-preliminary report. *Wiad Lek*. 2002; 55:542-546.
247. Taylor KB, Truelove SC, Wright R. Serologic reactions to gluten and cow's milk proteins in gastrointestinal disease. *Gastroenterology*. 1964; 46:99-108.
248. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971; 8:871-874.

249. Van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters*. 1971; 15:232-236.
250. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65:55-63.
251. Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of Immunological Methods*. 1991; 145:199-203.
252. Miletić V, Miletić I. Imunoheмиjske metode, Društvo medicinskih biohemičara Jugoslavije. Beograd 1997.
253. Chattopadhyay A, Chatterjee S. Risk indicators for recurrent aphthous ulcers among adults in the US. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 2007; 35:152-159.
254. Pentenero M, Broccoletti R, Carbone M, Conrotto D, Gandolfo S. The prevalence of oral mucosal lesions in adults from the Turin area. *Oral Diseases*. 2008; 14:356-366.
255. McCullough MJ, Abdel-Hafeth S, Scully C. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2007; 36:615-620.
256. Eris S, Ghaemi EO, Moradi A, Mansourian AR, Rabiei MR, Nosrat SB, Amirchaghmaghi A, Ahmadi AR. Aphthous Ulcer and the Effective Factors on It's Incidence among the Students of Golestan Medical Sciences University in the North of Iran. *Journal of Biological Sciences*. 2007; 7:830-832.
257. Field EA, Longman LP. *Tyldesley's Oral Medicine*, 5th edn. Oxford: Oxford University Press, 2003.
258. Porter SR, Scully C, Pedersen A. Recurrent aphthous stomatitis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1998; 9:306-321.
259. Davis S. Nutritional Factors and the Development of non-Hodgkins' lymphoma: A review of the Evidence. *Cancer research*. 1992; 52:5492-5495.
260. Armstrong BK, McMichael AJ, MacLenan R. Diet. In: D.Schottenfeld and JF Fraumeni Jr. (eds.). *Cancer Epidemiology and Prevention*, 419-421. Philadelphia: W.B.Saunders Co; 1982.
261. Cuningham AS. Lymphomas and animal-protein consumption. *Lancet*. 1976; 2:1184-1186.
262. Franceschi S, Serraino D, Carbone A, Talamini R, La Vecchia C. Dietaru factors and non-Hodgkin's lymphoma: A case-control study in the northeastern part of Italy. *Nutrition and Cancer*. 1989; 12:333-341.
263. 276. Ries LAG, Miller BA, Hankey BF. *SEER Cancer Statistics Review, 1973-1991: Tables and Graphs*. Bethesda, MD: National Cancer Institute. NIH Publication 1994; 94-2789.
264. Chandra RK. Nutrition as a critical determinant in susceptibility to infection. *World Review of Nutrition and Dietetics*. 1976; 25:166-188.
265. Zheng T, Holford T, Leaderer B, Zhang Y, Boyle P, Zahm SH., Flynn S, Tallini G, Owens PH, Rothman R, Lan Q and Boyle P. Diet and Nutrient Intakes and

- Risk of Non-Hodgkin Lymphoma in Connecticut Women. *American Journal of Epidemiology*. 2004; 159:454-466.
266. Combs Jr. GF. Status of selenium in prostate cancer prevention. *British Journal of Cancer*. 2004; 91:195-199.
267. Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *International Journal of Cancer*. 2002; 98:241-256.
268. Sandhu MS, White IR, McPherson K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2001; 10:439-446.
269. Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer*. 2006; 119:2657-2664.
270. Welfare MR, Cooper J, Bassendine MF, Daly AK. Relationship between acetylator status, smoking, and diet and colorectal cancer risk in the north-east of England. *Carcinogenesis*. 1997; 18:1351-1354.
271. Besu Irina. Stanje usne duplje i imunoreaktivnost na proteine hrane obolelih od limfoma. Beograd, 2008.
272. Holmes GK, Prior P, Lane MR, Pope D, Allan RN. Malignancy in coeliac disease-effect of a gluten free diet. *Gut*. 1989; 30:333-338.
273. Collin P, Reunala T, Pukkala E, Laippala P, Keyriläinen O, Pasternack A. Coeliac disease-associated disorders and survival. *Gut*. 1995; 36:475-476.
274. Seraphin P, Mobarhan S. Mortality in patients with celiac disease. *Nutrition Reviews*. 2002; 60:116-118.
275. Viljamaa M, Kaukinen K, Pukkala E, Hervonen K, Reunala T, Collin P. Malignancies and mortality in patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis: 30-year population-based study. *Digestive and Liver Disease*. 2006; 38:374-380.
276. Silano M, Volta U, Mecchia AM, Dessi M, Di Benedetto R, De Vincenzi M. Delayed diagnosis of coeliac disease increases cancer risk. *BMC Gastroenterology*. 2007; 9:7-8.
277. Helm RM, Burks AW. Mechanisms of food allergy. *Current Opinion in Immunology*. 2000; 12:647-653.
278. Businco L, Falconieri P, Giampietro P, Bellioni B. Food allergy and asthma. *Pediatric pulmonology*. 1995; 11:59-60.
279. Bousquet J, Metcalfe D, Warner J. *Allergy and Clinical Immunology International*. 1997; 10:21-25.
280. Sampson H. *Food Technology*. 1996; 46:141-144.
281. Ortolani C, Ispano M, Scibilia J, Pastorello EA. Introducing chemists to food allergy. *Allergy*. 2001; 56:5-8.
282. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005; 115:3-12.

283. Vaarala O, Saukkonen T, Savilahti E, Klemola T, Akerblom HK. Development of immune response to orally administered cow milk protein in young children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1995; 96:917–923.
284. Moneret-Vautrin DA. Modifications of allergenicity linked to food technologies. *Allergy and Immunology (Paris)* 1998; 30:9–13.
285. Goodwin PR. Food allergen detection methods: A coordinated approach. *The Journal of AOAC International*. 2004; 87:1383–1390.
286. Monaci L, Tregouat V, van Hengel AJ, Anklam E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology*. 2006; 223:149-179.
287. Franceschi S, Serraino D, Carbone A, Talamini R, La Vecchia C. Dietaru factors and non-Hodgkin's lymphoma: A case-control study in the northeastern part of Italy. *Nutrition and Cancer*. 1989; 12:333-341.
288. Holmes GK, Dunn GI, Cockel R, Brookes VS. Adenocarcinoma of the upper small bowel complicating celiac disease. *Gut*. 1980; 21:1010-1116.
289. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*. 1992; 102:330–354.
290. Patel GV, Gopal R, Nadkarni JJ. Evaluation of circulating immune complexes in lymphomas and leukemias using two different assays. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 1985; 20:80-84.
291. Besu I, Jankovic Lj, Magdu IU, Konic-Ristic A, Raskovic S, Juranic Z. Humoral immunity to cow's milk proteins and gliadin within the etiology of recurrent aphthous ulcers? *Oral Diseases*. 2009; 15:560-564.
292. Fasano A. Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: living life on the edge of the wall. *American Journal of Pathology*. 2008; 173:1243–1252.
293. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum S. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*. 2000; 355:1518–1519.
294. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shea-Donohue T, Tamiz A, Alkan S, Netzel-Arnett S, Antalis T, Vogel SN, Fasano A. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*. 2008; 135: 194–204.
295. Saarinen KM, Juntunen-Backman K, Jarvenpaa AL, Kuitunen P, Lope L, Renlund M, Siivola M, Savilahti E. Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: a prospective study of 6209 infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999; 104:457–461.
296. Van Odijk J, Kull I, Borres MP, Brandtzaeg P, Edberg U, Hanson LA, Host A, Kuitunen M, Olsen SF, Skerfving S, Sundell J, Wille S. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966–2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy*. 2003; 58:833–843.

297. Farrell HMJ, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF, Swaisgood HE. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*. 2004; 87:1641-1674.
298. Host A, Husby S, Gjesing B, Larsen JN, Lowenstein H. Prospective estimation of IgG, IgG subclass and IgE antibodies to dietary proteins in infants with cow's milk allergy. Levels of antibodies to whole milk protein, BLG and ovalbumin in relation to repeated milk challenge and clinical course of cow's milk allergy. *Allergy*. 1992; 47:218-229.
299. Host A, Husby S, Hansen LK, Osterballe O. Bovine beta-lactoglobulin in human milk from atopic and non-atopic mothers. Relationship to maternal intake of homogenized and unhomogenized milk. *Clinical and Experimental Allergy*.
300. Husby S. Dietary antigens. Uptake and humoral immunity in man (Thesis). *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 1988; 96:1-40.
301. Husby S, Host A, Teisner B, Svehag S-E. Infants and children with cow milk allergy/intolerance. Investigation of the uptake of cow milk protein and activation of the complement system. *Allergy*. 1990; 45:547-551.
302. Halcken S, Host A. Prevention of allergic disease. Exposure to food allergens and dietetic intervention. *Pediatric Allergy and Immunology*. 1996; 7:102-107.
303. Jones AC, Miles EA, Warner JA, Warner JO. IFN-gamma and proliferative responses from fetal leucocytes during second and third trimester of pregnancy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1995; 95:83.
304. Wilson NW, Hamburger RN. Allergy to cow's milk in the first year of life and its prevention. *Ann Allergy*. 1988; 61:323-327.
305. Halpern SR, Sellars WA, Johnson RB, Anderson DW, Saperstein S, Reisch JS. Development of childhood allergy in infants fed breast, soy or cow milk. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1973; 51:139-151.
306. Host A, Husby S, Osterballe O. A prospective study of cow's milk allergy in exclusively breast-fed infants. Incidence, pathogenetic role of early inadvertent exposure to cow's milk formula, and characterization of bovine milk protein in human milk. *Acta Paediatrica Scandinavica*. 1988; 77:663-670.
307. Goldman AS, Sellars WA, Halpern SR, Anderson DW, Furlow TE, Johnson CH Jr. Milk allergy. II. Skin testing of allergic and normal children with purified milk proteins. *Pediatrics*. 1963; 32:572-579.
308. Rolfsen W, Tibell M, Yman L. Cow's milk proteins as allergens and antigens (abstract). *Allergol Immunolog Clinica (Madr)*. 1987; 2:213.
309. Gjesing B, Osterballe O, Schwartz B, Wahn U, Lowenstein H. Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow's milk and milk substitutes. *Allergy*. 1986; 41:51-56.
310. Savilahti E, Kuitunen M. Allergenicity of cow milk proteins. *Journal of Pediatrics*. 1992; 121:12-20.
311. Restani P, Velona T, Plebani A, Ugazio AG, Poiesi C, Muraro A, Galli CL. Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in

- hydrolysed protein formulas. *Clinical & Experimental Allergy*. 1995; 25:651–658.
312. Docena GH, Fernandez R, Chirido FG, Fossati CA. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy*. 1996; 51:413–416.
313. McLaughlan P, Anderson K, Widdowson E, Coombs R. Effect of heat on the anaphylactic sensitizing capacity of cow's milk, goat's milk and various infant formulae fed to guinea pig. *Archives of Disease in Childhood*. 1981; 56:165–171.
314. Businco L, Bruno G, Giampietro PG, Cantani A. Allergenicity and nutritional adequacy of soy protein formulas. *Journal of Pediatrics*. 1992; 121:21–28.
315. Ellis MH, Short J, Heiner DC. Anaphylaxis after ingestion of a recently introduced hydrolysed whey protein formula. *Journal of Pediatrics*. 1991; 118:74–77.
316. Webber SA, Graham-Brown RAC, Hutchinson PE, Burns DA. Dietary manipulation in childhood atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*. 1989; 121:91–98.
317. Bernard H, Wal JM, Creminon C, Grassi J, Yvon M, Houdebine LM. Sensitivities of cow's milk allergic patients to casein fraction of milks from different species. *Allergy*. 1992; 47:306 (Abstr). 315
318. Gjesing B, Osterballe O, Schwartz B, Wahn U, Lowenstein H. Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow milk and milk substitutes. *Allergy*. 1986; 41:51–56.
319. Spuergin P, Walter M, Chiltz E, Deichmann K, Forster J, Mueller H. Allergenicity of alpha-caseins from cow, sheep and goat. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1997; 52:293–298.
320. Restani P, Gaiaschi A, Plebani A, Beretta B, Cavagni G, Fiocchi A, Poiesi C, Velona T, Ugazio AG, Galli CL. Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clinical and Experimental Allergy*. 1999; 29:997-1004.
321. Jenkins J, Breiteneder H, Mills C. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007; 120:1399-1405.
322. Farah Z. Composition and characteristics of camel milk. *Journal of Dairy Research*. 1993; 60:603–626.
323. FAO. *Statistical Yearbook*. Rome: FAO, 1979.
324. Hidvegi E, Cserhati E, Kereki E, Savilahti E, Arato A. Serum immunoglobulin E, IgA, and IgG antibodies to different cow's milk proteins in children with cow's milk allergy: Association with prognosis and clinical manifestations. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2002; 13:255-261.
325. Dannaeus A, Johansson SGO. A follow-up study of infants with adverse reactions to cow's milk. I. Serum IgE, skin test reactions and RAST in relation to clinical course. *Acta Paediatrica Scandinavica*. 1979; 69:377–382.

326. Sampson HA, Jolie PL. Increased plasma histamine concentrations after food challenges in children with atopic dermatitis. *The New England Journal of Medicine*. 1984; 311:372–376.
327. Bjorksten B, Ahlstedt S, Bjorksten F, Carlsson B, Fallstrom SP, Juntunen K, Kajosaari M, Kober A. Immunglobulin E and immunoglobulin G4 antibodies to cow's milk in children with cow's milk allergy. *Allergy*. 1983; 38:119–124.
328. Saarinen KM, Savilahti E. Infant feeding patterns affect the subsequent immunological features in cow's milk allergy. *Clinical and Experimental Allergy*. 2000; 30:400–406.
329. Bjorksten F, Saarinen UM. IgE antibodies to cow's milk in infants fed breast milk and milk formulae. *Lancet*. 1978; 2:624–625.
330. Sicherer SH, Sampson HA. Cow's milk protein-specific IgE concentrations in two age groups of milk-allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clinical and Experimental Allergy*. 1999; 29:507–512.
331. May CD, Remigio L, Feldman J, Bock SA, Carr RI. A study of serum antibodies to isolated milk proteins and ovalbumin in infants and children. *Clinical Allergy*. 1977; 7:583–595.
332. Burgin-Wolff A, Signer E, Friess HM, Berger R, Birbaumer A, Just M. The diagnostic significance of antibodies to various cow's milk proteins (fluorescent immunosorbent test). *European Journal of Pediatrics*. 1980; 133:17–24.
333. Oldaeus G, Bjorksten B, Jenmalm MC, Kjellman NI. Cow's milk IgE and IgG antibody responses to cow's milk formulas. *Allergy*. 1999; 54:352–357.
334. Ahmed T, Sumazakir, Nagai Y, Shibasaki M, Takita H. Immune response to food antigens: Kinetics of food-specific antibodies in the normal population. *Acta Paediatrica Japonica*. 1997; 39:322–328.
335. Keller KM, Burgin-Wolff A, Lippold R, Lentze MJ. Quality assurance in diagnostics: Are there normal values for IgG-antibodies to cow's milk proteins? *Klinische Paediatric*. 1999; 211:384–388.
336. Jenmalm MC, Bjorksten B. Exposure to cow's milk during the first 3 months of life is associated with increased levels of IgG subclass antibodies to beta-lactoglobulin to 8 years. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1998; 102:671–678.
337. Juvonen P, Mansson M, Kjellman NI, Bjorksten B, Jakobsson I. Development of immunoglobulin G and immunoglobulin E antibodies to cow's milk proteins and ovalbumin after a temporary neonatal exposure to hydrolyzed and whole cow's milk proteins. *Pediatric Allergy and Immunology*. 1999; 10:191–198.
338. May CD, Fomon SJ, Remigio L. Immunologic consequences of feeding infants with cow's milk and soy products. *Acta Paediatrica Scandinavica*. 1982; 71:43–51.
339. Fallstrom SP, Ahlstedt S, Carlsson B, Lonnerdal B, Hanson LA. Serum antibodies against native processed and digested cow's milk proteins in children with cow's milk protein intolerance. *Clinical Allergy*. 1986; 16:417–423.
340. Isolauri E, Suomalainen H, Kaila M, Jalonen T, Soppla E, Virtanen E, Arvilommi H. Local immune response in patients with cow's milk allergy:

- Follow-up of patients retaining allergy or becoming tolerant. *Journal of Pediatrics*. 1992; 120:9–15.
341. Burks AW, Williams LW, Casteel HB, Fiedorek SC, Connaughton CS. Antibody response to milk proteins in patients with milk-protein intolerance documented by challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1990; 85:921–927.
 342. Firer MA, Hosking CS, Hill DJ. Humoral immune reaction to cow's milk in children with cow's milk allergy. *International Archive of Allergy and Applied Immunology*. 1987; 84:173–177.
 343. Hill DJ, Firer MA, Ball G, Hosking CS. Recovery from milk allergy in early childhood: antibody studies. *Journal of Pediatrics*. 1989; 114:761–766.
 344. Goldman AS, Anderson DW Jr, Sellers WA, Saperstein S, Kniker WT, Halpern SR. Milk allergy. I. Oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children. *Pediatrics* 1963; 32: 425–443.
 345. Chen WL, Hwang MT, Liao CY, Ho JC, Hong KC, Mao SJ. Beta-lactoglobulin is a thermal marker in processed milk as studied by electrophoresis and circular dichroic spectra. *Journal of Dairy Science*. 2005; 88:1618-1630.
 346. McGuffey MK, Epting KL, Kelly RM, Foegeding EA. Denaturation and aggregation of three alpha-lactalbumin preparations as neutral pH. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005; 53:3182-3190.
 347. Roth-Walter F, Berin MC, Arnaboldi P, Escalante CR, Dahan S, Rauch J, Jensen-Jarolim E, Mayer L. Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy*. 2008; 63:882-890.
 348. Docena GH, Fernandez R, Chirido FG, Fossati CA. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy*. 1996; 51:412-416.
 349. Shek LP, Bardina L, Castro L, Sampson HA, Beyer K. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy*. 2005; 60:912-919.
 350. Ehn BM, Ekstrand B, Bengtsson U, Ahlstedt S. Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004; 52:1398-1403.
 351. 346. Pasche A, Besler M. Stability of bovine allergens during food processing. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2002; 6(Suppl. 1):16-20.
 352. Kim JS, Chung SJ, Choi YS, Cheon JH, Kim CW, Kim SG, Jung HC, Song IS. *Helicobacter pylori* eradication for low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma is more successful in inducing remission in distal compared to proximal disease. *British Journal of Cancer*. 2007; 96:1324-1328.
 353. Makola D, Peura DA, Crowe SE. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2007; 41:548-558.

354. Tursi A, Brandimarte G, Torello M. Disappearance of gastric mucosa-associated lymphoid tissue in hepatitis C virus-positive patients after anti-hepatitis C virus therapy. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2004; 38:360-363.
355. Makishima H, Ito T, Kodama R, Asano N, Nakazawa H, Hirabayashi K, Nakamura S, Ota M, Akamatsu T, Kiyosawa K, Ishida F. Intestinal Diffuse Large B-Cell Lymphoma Associated with Celiac Disease: A Japanese Case. *International Journal of Hematology*. 2006; 83:63-65.
356. Juranic Z, Besu I, Dajak M, Konic-Ristic A. Could the use of appropriate diet help in the prevention of multiple myeloma. *Journal of BUON*. 2009; 14:321-325.



Прилог 2.

Изјава о коришћењу

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

ИМУНОРЕАКТИВНОСТ НА ПРОТЕИНЕ ХРАНЕ У ЕТИОПАТОГЕНЕЗИ

РЕКУРЕНТНИХ ОРАЛНИХ УЛЦЕРАЦИЈА

која је моје ауторско дело.

Сагласан сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

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 следећој страници.)

Потпис

Милан Великић

У Београду, 10. 01.2014.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

ИМУНОРЕАКТИВНОСТ НА ПРОТЕИНЕ ХРАНЕ У ЕТИОПАТОГЕНЕЗИ

РЕКУРЕНТНИХ ОРАЛНИХ УЛЦЕРАЦИЈА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 10. 01.2014.

Милош Векић