

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА „МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ”

ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА

**ГЕНОМНИ И ЕПИГЕНОМНИ ПРОМЕНИ
ПРИ РАК НА ЛАРИНКСА**

СИЛВА ГАРО КЮРКЧИЯН

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

Научна специалност: „Молекулярна биология”

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Област на висше образование:

4. Природни науки, математика и информатика

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

ПРОФ. Д-Р РАДКА ПЕТРОВА КЪНЕВА, ДБ

АКАД. ПРОФ. Д-Р ВАНЬО ИВАНОВ МИТЕВ, ДМ, ДБН

СОФИЯ, 2020

На арх. Шавари Гарабет Папазян

С най-голямата си любов!

Благодаря на ръководителите ми Проф. д-р Радка Петрова Кънева, дб и Акад. Проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн за предоставената възможност за обучение и изработване на дисертационния труд в Център по Молекулна Медицина, МУ-София. Благодаря за техните съвети, подкрепа и насърчаване!

Благодаря на колабораторите от УМБАЛ „Царица Йоана-ИСУЛ“, Клиника по УНГ Болести за съдействието, насочването на пациенти и събиране на включения биологичен материал!

Благодаря на всички колеги от Център по Молекулна Медицина и Катедра по Медицинска Химия и Биохимия за помощта, съветите, милото и приятелско отношение, както и за хубавите моменти!

Благодаря на семейството и най-близките ми за силното търпение, подкрепа и обич!

СЪДЪРЖАНИЕ:

Използвани съкращения.....	13
ВЪВЕДЕНИЕ.....	15
ЧАСТ I ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	17
1.1. Анатомия на ларинкса.....	19
1.2. Карцином на ларинкса. Епидемиология.....	20
1.3. Рискови фактори.....	26
1.3.1. Основни рискови фактори.....	26
1.3.2. Допълнителни рискови фактори.....	28
1.3.3. Генетична предразположеност.....	29
1.4. Лечение на ларингеален карцином.....	30
1.5. Биомаркери.....	33
1.5.1. Сравнение на РНК, ДНК и белтъци като биомаркери.....	34
1.6. Некодираща РНК.....	35
1.6.1. Микро РНК (miRNA).....	36
1.6.1.1. История на miRNA.....	36
1.6.1.2. Биогенеза на miRNAs.....	38
1.6.2. Дълга некодираща РНК.....	39
1.6.2.1. История на lncRNA.....	40
1.7. Роля на lncRNAs и miRNAs при ПККЛ.....	42
1.7.1. Дълга некодираща РНК при рак на ларинкса.....	42
1.7.2. miRNAs при рак на ларинкса.....	44
1.8. Подбор на изследвани нкРНКи.....	47
1.8.1. Хипоксия и ангиогенеза.....	47
1.8.2. Некодиращи РНКи повлияни от хипоксията.....	50
1.9. Генетични промени при рак на ларинкса.....	54
1.9.1. TP53/RB сигнален път.....	55
1.9.2. NOTCH сигнален път.....	55
1.9.3. PI3K/Akt/mTOR сигнален път.....	55
1.9.4. EGFR сигнален път.....	56
1.9.5. MET сигнален път.....	57
1.9.6. JAK/STAT сигнален път.....	57
1.9.7. RAS/RAF/MAPK сигнален път.....	58
ЧАСТ 2 ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	59
2.1. Цел.....	61

2.2. Задачи.....	61
ЧАСТ 3 МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	63
3.1. Пациенти и контроли.....	65
3.1.1. Биологичен материал от пациенти, диагностицирани с рак на ларинкса.....	65
3.1.2. Набиране на биологичен материал за създаване на контролна група.....	68
3.2. Изолиране на тотална РНК.....	69
3.2.1. Изолиране на тотална РНК (включваща и малки РНКи) от тъкан.....	69
3.2.2. Изолиране на тотална РНК, включително и малки РНКи от плазма.....	72
3.3. Изолиране на ДНК.....	75
3.4. Определяне концентрация на изолирана тотална РНК/ДНК.....	78
3.4.1. Измерване количество и качество на изходен материал с NanoDrop 2000.....	78
3.4.2. Измерване на концентрацията на изолираната ДНК/РНК с флуориметричен метод с помощта на Qubit v2.0.....	79
3.5. Обратна транскрипция, или превръщане на РНК в кДНК.....	79
3.5.1. Превръщане на малки РНКи в кДНК с miScript II RT Kit.....	79
3.5.2 Превръщане на дълги некодирани РНКи в кДНК.....	82
3.6. Детекция на изследваните некодирани РНК посредством real time-qPCR.....	84
3.6.1. Детекция на микро РНКи	84
3.7. Детекция на дълги нкРНКи посредством ПСР в реално време (real time-qPCR).....	87
3.8. Секвениране от ново поколение, с използването на TSACP и секвенционна платформа MiSeq.....	88
3.9. Биоинформатичен и статистически подходи, използвани за анализ на получените резултати.....	95
3.9.1. Биоинформатичен анализ на получените резултати от секвенирането от ново поколение с MiSeq платформата.....	95
3.9.2. Количествен анализ на резултатите от генната експресия чрез real time-qPCR.....	98
3.9.3. Статистически методи.....	98
3.9.3.1. Описателна статистика (Descriptive statistics).....	98
3.9.3.2. Предварително изследване на данните (Explore).....	99
3.9.3.3. Статистическа проверка на хипотези.....	99
3.9.3.4. χ^2 -квадрат.....	101
3.9.3.5. Параметрични методи.....	103
3.9.3.5.1. Т тест.....	103
3.9.3.5.2. Едномерният еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA).....	103
3.9.3.6. Непараметрични методи.....	104
3.9.3.6.1. Mann-Whitney U test.....	104

3.9.3.6.2. Тест на Крушкел-Уолис (Kruskal-Wallis) за съпоставка на три или повече независими извадки.....	105
3.9.3.6.3. Тест на Уилкоксън (Wilcoxon) за съпоставка на две корелирани (свързани) извадки (групи).....	106
3.9.3.7. Корелационен анализ.....	106
3.9.3.7.1. Коефициент на обикновена линейна корелация на Пирсън (Pearson; r).....	107
3.9.3.7.2. Рангова корелация на Спирман (Spearman's rho).....	108
3.9.3.8. Оценка на процента на фалшиво позитивни резултати (асоциации) при множествени сравнения: тест на Benjamini–Hochberg FDR.....	109
3.9.3.9. Регресионен анализ.....	109
3.9.3.10. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностична точност на изследваните биомаркери.....	110
3.9.3.10.1. Мултимаркерен анализ на ROC кривите.....	112
3.9.3.11. Статистически пакети използвани с програма R.....	113
ЧАСТ 4 РЕЗУЛТАТИ.....	115
4.1. Демографска и клинична характеристика на изследваната група.....	117
4.2. Вредности при изследваната група пациенти.....	120
4.3. Клинико-патологични корелации при изследвания контингент.....	123
4.3.1 Клинико-патологични корелации свързани с туморния стадий на заболяването.....	123
4.3.2 Клинико-патологични корелации свързани с процесите на метастазирание.....	126
4.3.3 Клинични корелации свързани с възрастта и фамилната история.....	135
4.4. Нива на експресия на изследваните маркери (нкРНКи) в тъканни проби от рак на ларинкса.....	137
4.5. Асоциация между експресионните нива в туморни ларингеални тъкани на некодиращите РНКи и клиникопатологичните характеристики на пациентите.....	144
4.6. Корелационен анализ между изследваните некодиращи РНКи и матрични РНКи....	148
4.7. Венн диаграми с пътищата, в които участват изследваните miRNAs и общите таргетни молекули, които си споделят.....	152
4.8. Нива на експресия на изследваните маркери (нкРНКи) в плазмени проби от пациенти с напреднал рак на ларинкса.....	156
4.9. Корелационен анализ на изследваните некодиращи РНКи между тъканни проби и кореспондиращите им плазмени проби.....	163
4.10. ROC анализ на най-значимо променените в плазма miR-31-3p и miR-196a-5p.....	164
4.11. Асоциация между експресионните нива на miR-31-3p и miR-196a-5p в таргетната плазмена ПККЛ група и клиникопатологичните характеристики на пациентите.....	165

4.12. Патогенни соматични промени при напреднал ЧПВ-негативен плоскоклетъчен карцином на ларинкса, установени посредством таргетно NGS секвениране.....	167
4.13. Разпределение на патогенните соматични варианти сред супраглотисни, глотисни и субглотисни ларингеални локации.....	173
4.14. Връзка между нивата на експресия на нкРНКи и наличието на мутации в гена TP53.....	176
ЧАСТ 5 ОБСЪЖДАНЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ.....	179
5.1. Обсъждане на резултатите получени при анализа на демографската и клинична характеристика на изследваната група и клинично-патологични корелации при изследвания контингент.....	181
5.2. Обсъждане на резултатите получени при анализа на асоциация между експресионните нива в туморни ларингеални тъкани на нкРНКи и клиничнопатологичните характеристики на пациентите.....	184
5.3. Обсъждане на резултатите от корелационен анализ между изследваните некодиращи РНКи и матрични РНКи.....	189
5.4. Обсъждане на резултатите получени от асоциацията между експресионните нива на miR-31-3p, miR-196a-5p в таргетната ПККЛ плазмена група и клиничнопатологичните характеристики на пациентите.....	191
5.5. Обсъждане на резултатите получени от анализа на патогенните соматични промени при напреднал ЧПВ-негативен плоскоклетъчен карцином на ларинкса, установени посредством таргетно NGS секвениране.....	199
5.5.1. TP53.....	200
5.5.2. MET.....	204
5.5.3. CDKN2A.....	206
5.5.4. PIK3CA.....	207
5.5.5. FBXW7.....	208
5.5.6. RAS (KRAS, NRAS, HRAS).....	209
5.6. Обсъждане на резултатите от анализ на връзката между нивата на експресия на нкРНКи и наличието на мутации в гена TP53.....	213
6. ИЗВОДИ.....	217
7. ПРИНОСИ.....	217
8. ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ И ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	218
8.1. Публикации.....	218
8.2. Участия в научни прояви.....	219
8.3. Участие в проекти.....	220
9. БИБЛИОГРАФИЯ.....	221

Използвани съкращения

Кирилица:

бр (брой)
ДНК (Дезоксирибонуклеиновата киселина)
кб (килобази)
ЕБВ (Вирус на Епщайн-Бар)
ЛПКК (Ларингеален плоскоклетъчен карцином)
мг (милиграм)
мин (минута)
мкг (микрограм)
мкл (микролитър)
мл (милилитър)
МУ (Медицински Университет)
нкРНК (некодираща РНК)
ПКК (Плоскоклетъчен карцином)
ПККГШ (Плоскоклетъчни карциноми на главата и шията)
ПККЛ (Плоскоклетъчен карцином на ларинкса)
РНК (Рибонуклеинова киселина)
с-МЕТ (Tyrosine-protein kinase Met)
СО₂ (Въглероден диоксид)
УМБАЛ (Университетска многопрофилна болница за активно лечение)
УНГ (Уши Нос Гърло)
ФПКК (Фарингеален плоскоклетъчен карцином)
ЦММ (Център по Молекулна Медицина)
ЧПВ (Човешки Папиломен Вирус)

Латиница:

°C (градус по Целзий)
5-FU (Fluorouracil)
95%CI (95% Confidence Interval)
Akt (Protein kinase B, PKB)
AFP (Alpha-fetoprotein)
cDNA (copy DNA)
dCt (delta cycle threshold)

DNA-seq (DNA sequencing)
dsDNA (double strand DNA)
EA.hy926 (Human umbilical vein cell line)
EGFR (Epidermal growth factor receptor)
EPCs (Endothelial progenitor cells)
FDA (Food and Drug Administration)
g (gravity)
hBOECs (Human blood outgrowth endothelial cells)
HepG2 (Human liver cancer cell line)
hMBECs (Human microvascular blood endothelial cells)
hMVECs (Microvascular Endothelial Cells)
HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells)
IACR (International Association for Cryptologic Research)
lncRNA (long noncoding RNA)
mAbs (monoclonal antibodies)
miRNAs (microRNAs)
mL (milliliter)
mRNA (messenger RNA)
mTOR (Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase)
n (брой)
NCI (National Cancer Institute)
ng (nanogram)
ng (nanogram)
NGS (Next Generation Sequencing)
nt (nucleotide)
PAM50 (тумор профилиращ тест)
PCR (Polymerase chain reaction)
PFS (Progression-free survival)
pg (picogram)
PI3K (Phosphoinositide 3-kinases)
pmol (picomoles)
pre-miRNA (precursor-miRNAs)
pri-miRNA (primary-miRNA)
RNA (Ribonucleic acid)
RNA-seq (RNA sequencing)
rpm (revolutions per minute)
RQ (relative quantification)

RTKs (Receptor tyrosine kinases)
RT-qPCR (Quantitative reverse transcription PCR)
SD (standard deviation)
SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program)
ssDNA (single strand DNA)
SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable)

TCGA (The Cancer Genome Atlas)
TKI (Tyrosine kinase inhibitor)
UTR (untranslated region)
UV (ultra violet)
 Δ (delta)
 λ (lamda)
 μ l (microliter)

ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът на ларинкса е втория по честота на срещане заболяване от групата карциноми на главата и шията, като в 95-98% е с епителен произход. За 2012г., в световен мащаб са регистрирани 156 887 заболели и 83 376 смъртни случая от рак на ларинкса. България е една от страните в Европа с най-високи нива на заболяемост и смъртност от ларингеален карцином. Добре познати канцерогенни фактори са тютюнопушене и алкохолен концентрат. Човешкия папиломен вирус е установен като допълнителен рисков фактор за развитието на карциноми на главата и шията, основно за орофарингеален карцином и се асоциира с по-добра преживяемост. При рак на ларинкса инфектирането с ЧПВ не е толкова широко застъпено. Въпреки напредъка на технологиите на мултимодалното лечение в медицината, преживяемостта не е достигнала до задоволителни нива и не се наблюдава подобрене през последните години.

С обещаващ интерес е въвеждането и прилагането на биомаркери с диагностична, прогностична и предиктивна роля. Биомаркерите могат да служат като молекулни маркери за протичане на нормални и ракови-специфични клетъчни процеси, както и в отговор към факторите на околната среда или провеждане на терапия. Такива маркери са некодиращите РНК, чиято променена експресия се наблюдава при редица ракови заболявания, включително и рак на ларинкса. В настоящия дисертационен труд са подбрани тринадесет нкРНКи (miR-21-3/5p; miR-31-3/5p; miR-145-5p; miR-155-5p; miR-196a-5p; miR-210-3p; miR-221-3p; miR-222-3p; miR-424-5p, lncRNA MALAT1 и lncRNA HOTAIR), които имат отношение към процесите на хипоксия и ангиогенеза.

От друга страна се изследва и соматичния мутационен спектър на ракови-свързани гени подбрани в онкопанел. Резултати от соматични мутации върху раковите заболявания на главата и шията са публикувани в предходни изследвания, но прецизния механизъм на ларингеалната канцерогенеза все още не е добре познат. Установяват се различия в мутационния спектър между отделните локации на главата и шията, както и са публикувани предходно различия на геномно, генетично и епигенетично ниво, което предполага биологично различие между локациите на карциномите на главата и шията. Ларингеалният карцином по-вероятно да има различен механизъм на канцерогенеза в сравнение с останалите локации на глава и шията, което заслужава допълнително изследване.

Публикуваните резултати могат да предложат поглед върху механизмите на канцерогенеза и да идентифицират нови потенциални биомаркери за диагностика и прогнозиране. Те също биха улеснили стратификацията и включването на пациенти с ПМКЛ в клинични изпитвания на нови целеви терапии, водещи до по-добро лечение.

ЧАСТ 1

ЛИТЕРАТУРЕН
ОБЗОР

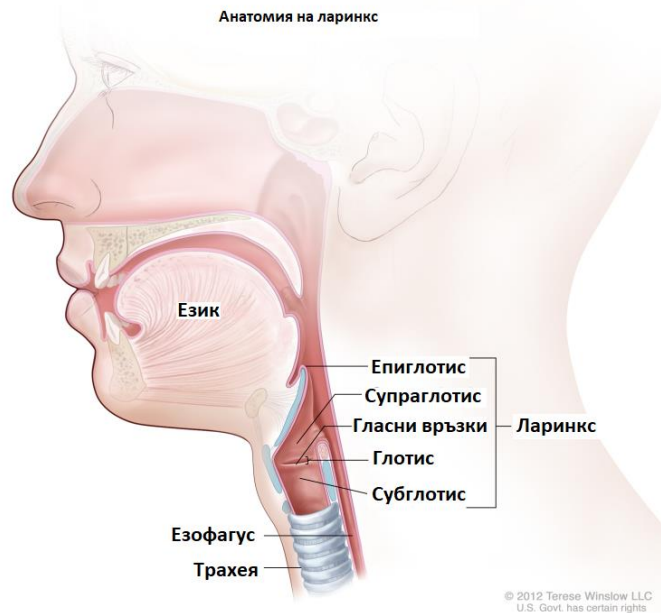
1.1. Анатомия на ларинкса

Ларинксът (гръклянът), се разделя на три различни области, известни като супраглотис, глотис и субглотис (Фигура 1.1.). В тези три области всички хрущялни, невровакуларни и мускулатурни елементи са преплетени, за да позволят на ларинкса да функционира като единица и да изпълнява свойствата си. Основните от тях са производството на глас, защитата на дихателните пътища по време на дишането и поглъщането.

Ларинксът се разполага в предния, среден участък на шията, под подезичната кост, на нивото от долния край на IV до горния край на VI шиен прешлен. Заедно с хрущялните участъци образува гъвкава, но стабилна структура. Той може да извършва значителни движения във вертикално направление при гълтане и говор. Гръклянът може да се отклонява пасивно и встрани, а големината му се различава в зависимост от възрастта и пола.

Ларингеалната лигавица е покрита основно с привидно многореден, цилиндричен, ресничест епител. В отделни участъци като истинските гласни гънки, задното пространство и езичната повърхност на епиглотиса, епителът е многослоен плосък. Лигавицата е осеяна с многобройни мукозни жлези концентрирани основно във венрикулите, ариепиглотичните гънки и по ларингеалната повърхност на епиглотиса. Глотисът не притежава жлези. Моторната и сетивната инервация на ларинкса се осъществява от блуждаещия нерв чрез горния и възвратния ларингеален нерв. Ларинксът се кръвоснабдява с артериална кръв от ларингеалните клонове на горната и долната тироидни артерии и крикотироидния клон на горната тироидна артерия. Вените следват съответните артерии.

Лимфният дренаж на ларинкса се разделя на две от истинските гласни гънки. Последните са без лимфни съдове, което обяснява късната поява на метастази при глотисните карциноми. Това се осъществява след разпространение на неоплазмата към другите етажи. Горната или супраглотичната лимфна мрежа се дренира от лимфни съдове вървящи паралелно на горните ларингеални вени и се вливат в горните дълбоки цервикални лимфни възли. Между супраглотисът и корена на езика се разполагат лигавични гънки. Субглотичното пространство се дренира през лимфни съдове към долните дълбоки цервикални възли, като част от лимфата преминава през преларингеалните и претрахеалните нодули. Ларинксът също така се свързва с трахеята и гълтача (1,2).



Фигура 1.1. Представяне анатомичното устройство на ларинкс. Трите участъка, съставляващи ларинкса са супраглотис (включващ и епиглотис), глотис (включващ гласните връзки) и субглотис. (E1).

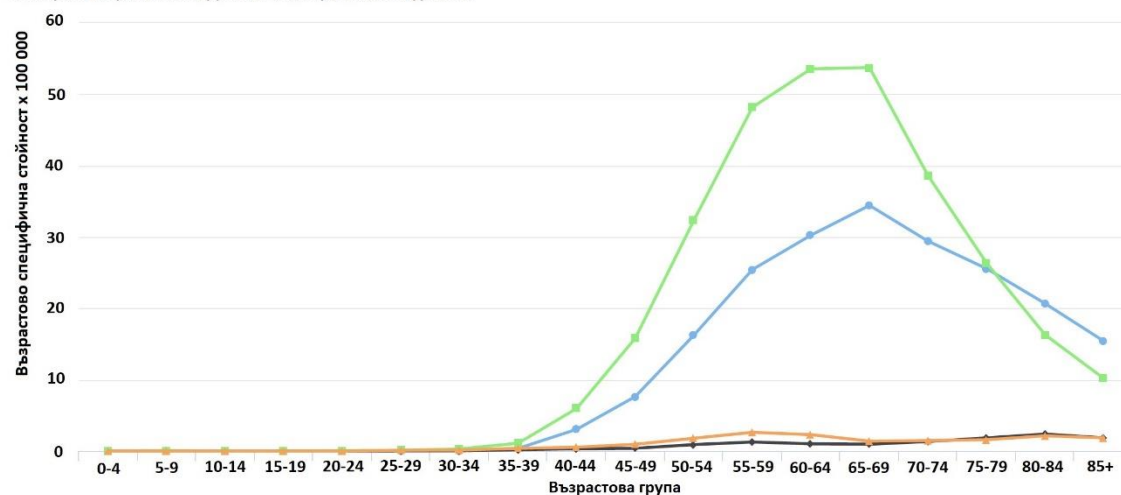
1.2. Карцином на ларинкса. Епидемиология

Онкологичните заболявания на глава и шия са хетерогенна група злокачествени заболявания, които се локализиращат в дихателните пътища и горния храносмилателен тракт, включващи устната кухина, фаринкса, ларинкса, сливиците, тироидната и паратироидните жлези, параназалните синуси и лигавицата, покриваща органите на главата и шията. Голяма част от ларингеалните заболявания спадат към плоскоклетъчните карциноми (95-98%). Останалите хистологични типове, които се причисляват към ларингеален карцином включват верукозен плоскоклетъчен карцином, аденокарцином, малки тумори в слюнчените жлези, вретеновидно клетъчен карцином, фибросаркома, хондросаркома, невроендоклини тумори и метастатични заболявания (3).

Приблизително 644 000 случая на карциноми на глава и шия се регистрират годишно, като злокачественостите в тази област се нареждат на шесто място по заболеваемост от рак световен мащаб, а две трети от заболяванията се наблюдават в развиващите се страни (4,5). Ракът на ларинкса остава вторият по заболеваемост от групата глава и шия (6) след оралният карцином (7), като се нарежда на единадесето място по честота на заболеваемост от всички злокачествени заболявания при мъжете (8). Почесто са засегнати мъжете, отколкото жените, като съотношението в глобален мащаб е около 7:1 и това съотношение е много сходно във всички възрастови групи, дори при най-възрастните хора (9). На Фигура 1.2. е представена възрастово специфичната заболеваемост и смъртност при рак на ларинкса в България (двата пола). Вижда се, че пика на заболеваемостта обхваща декадите между 55 и 69 годишна възраст.

Възрастова специфична заболеваемост и смъртност

Българска националност, Двата пола, Ларинкс, 2003 до 2013

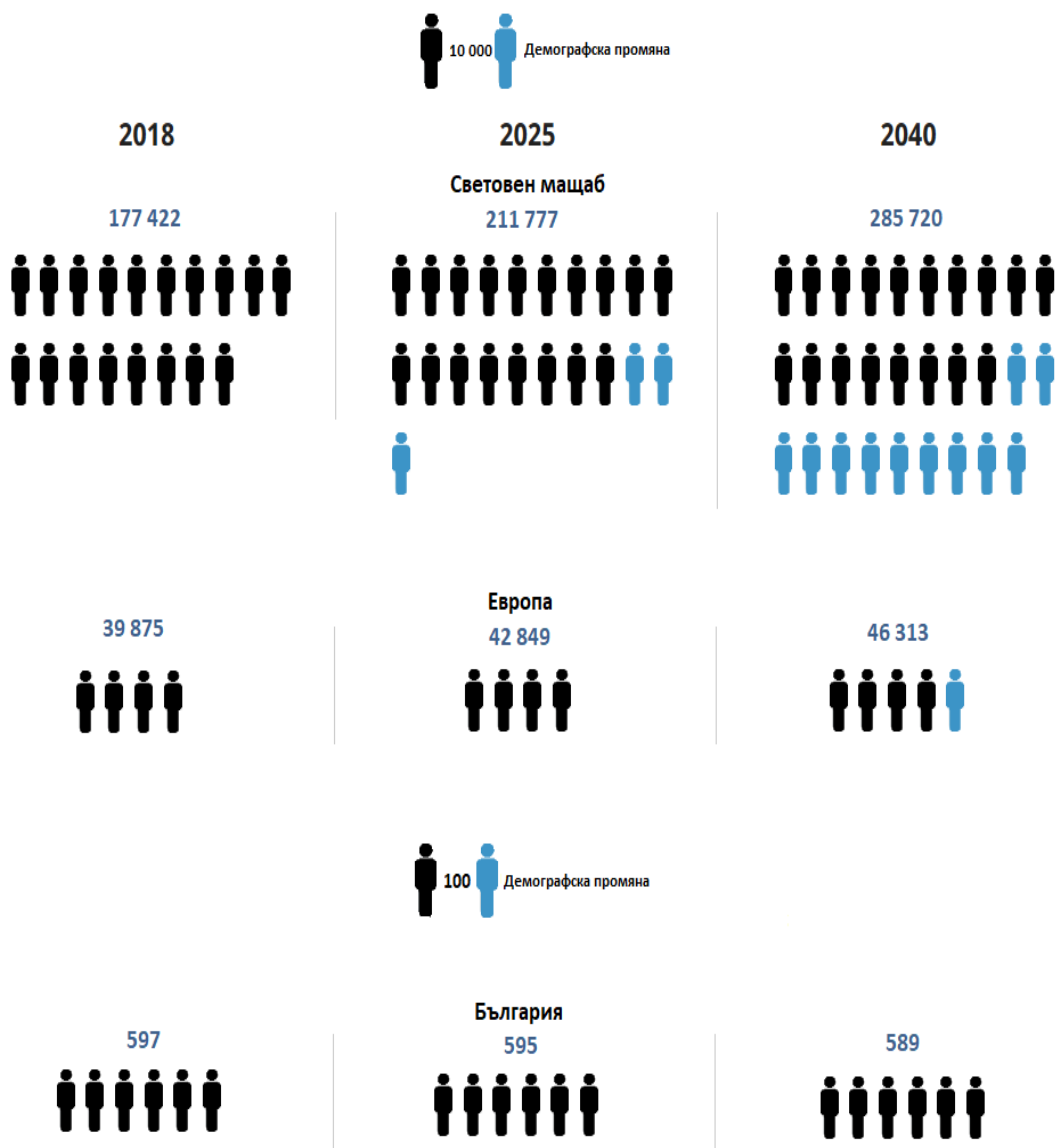


Индикатор	Регистър	Пол	Рак	Година, период	▲
Смъртност	България	Мъжки	Ларинкс	2003-2013	—
Смъртност	България	Женски	Ларинкс	2003-2013	—
Заболеваемост	България	Мъжки	Ларинкс	2003-2013	—
Заболеваемост	България	Женски	Ларинкс	2003-2013	—

Фигура 1.2. Представяне на възрастова специфична заболеваемост и смъртност от рак на ларинкса за двата пола в България за период 2003-2013 (E2).

По последни данни от 2012 година, в световен мащаб са диагностицирани 156 887 и регистрирани 83 376 смъртни случая (GLOBCAN 2012, данни за двата пола) (10). Очакваната заболеваемост от карцином на ларинкса за 2018г по данни на GLOBCAN, IACR (E3) в световен мащаб е 1.10% (177 422), а регистрираните смъртни случаи ще наброяват 1.07% (94 771) (данни за двата пола), което показва нарастване на случаите от ларингеалните карциноми с около 13% за период от 7 години (2012-2018). Негативна тенденция се наблюдава за увеличение на заболеваемостта и смъртността и в следващите десетилетия от рак на ларинкса както в световен мащаб, така и в Европа. До 2040г. в световен мащаб ще се наблюдава покачване на ларингеалните случаи с 61% и смъртни случаи с 67%, докато в Европа ще се очаква нарастване на заболеваемостта с 16.1% и смъртни случаи с 23.6% (Фигура 1.3. и Фигура 1.4.). На фона на европейския и световен мащаб, не се очаква увеличаване на заболеваемостта и смъртността от ларингеален карцином в България. Но въпреки това тези данни не са облекчение като се има предвид, че България е една от застаряващите нации и с повишени нива на емиграция.

Очакван брой на регистрирани случаи с рак на ларинкса за периода 2018 - 2040, двата пола, всички възрастови групи

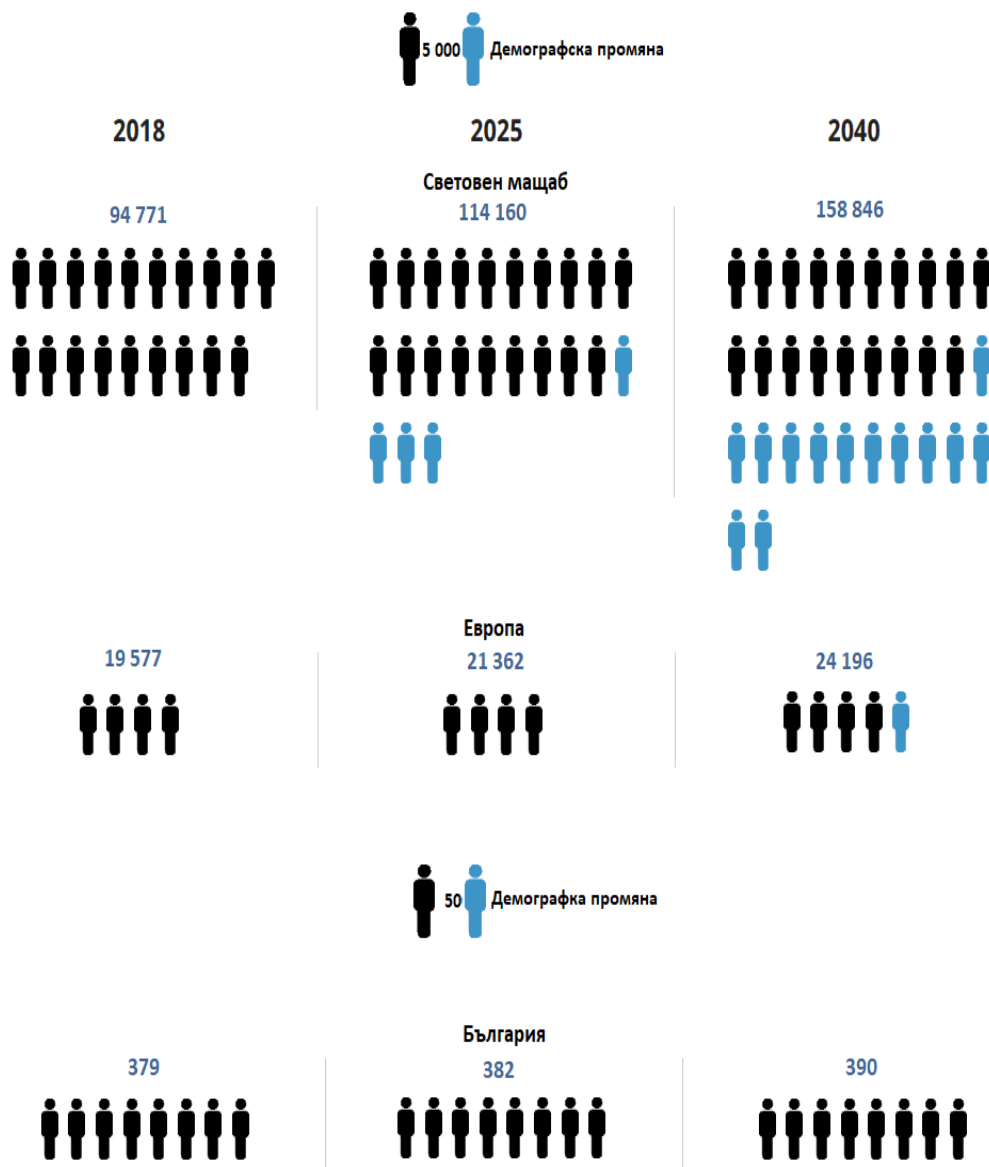


Data source: GLOBOCAN 2018
 Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)
 © International Agency for Research on Cancer 2018

International Agency for Research on Cancer
 World Health Organization

Фигура 1.3. На фигурата са представени очаквания брой от регистрирани случаи с рак на ларинкса в световен мащаб, Европа и България, за период 2018-2025-2040г (GLOBOCAN 2018, IACR).

Очакван брой на регистрирани смъртни случаи от рак на ларинкса за периода 2018 - 2040, двата пола, всички възрастови групи

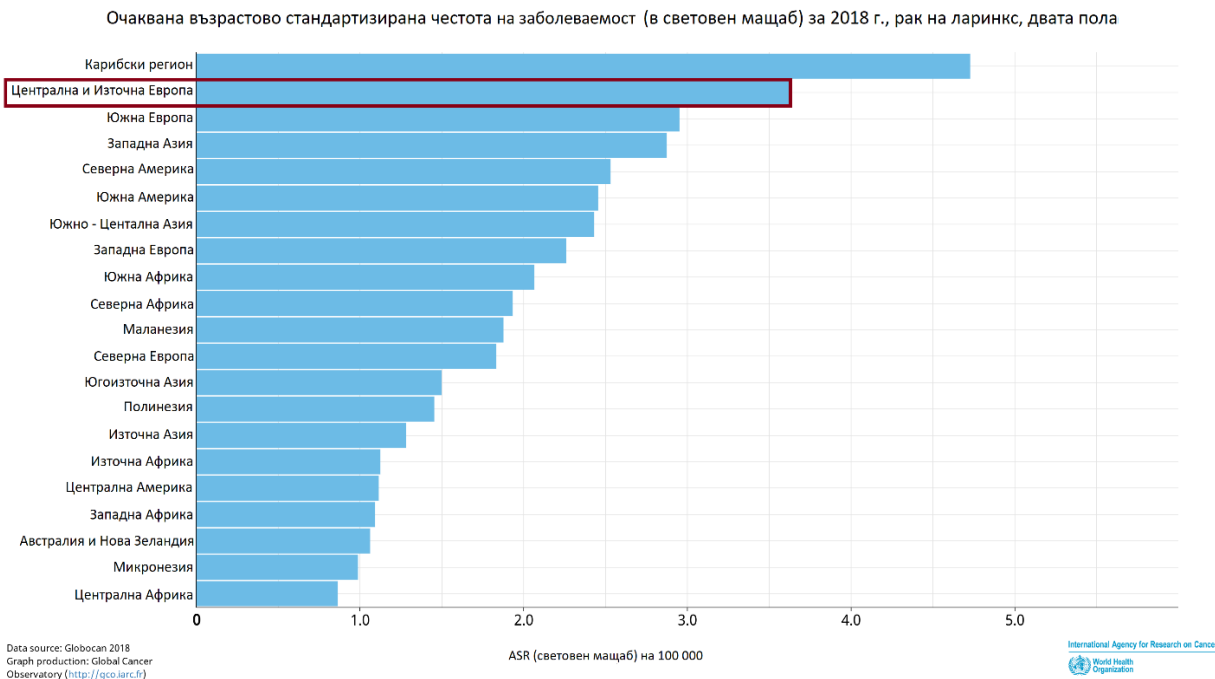


Data source: GLOBOCAN 2018
 Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)
 © International Agency for Research on Cancer 2018

International Agency for Research on Cancer
 World Health Organization

Фигура 1.4. На фигурата са представени очаквания брой от регистрирани смъртни случаи с рак на ларинкса в световен мащаб, Европа и България, за период 2018-2025-2040г (GLOBCAN 2018, IACR).

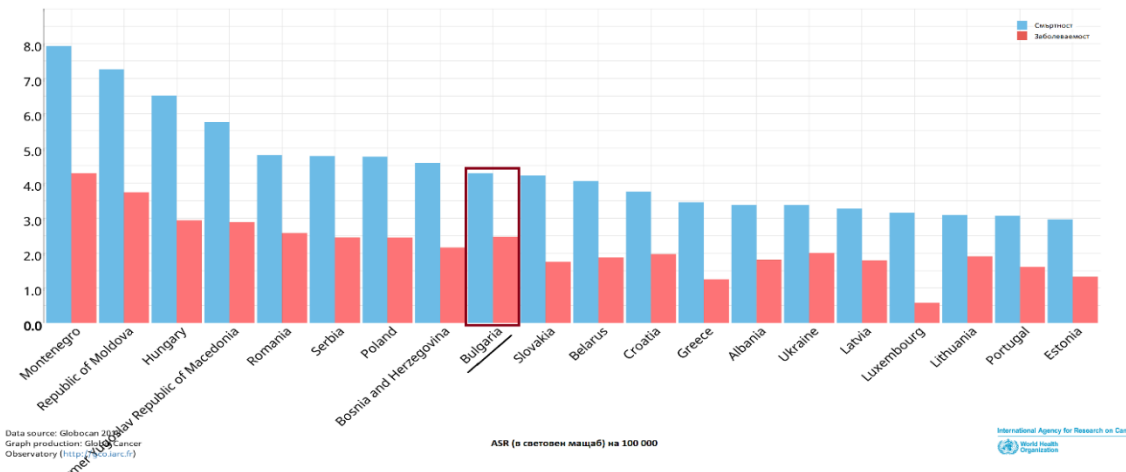
Централна и Източна Европа се нареждат на второ място след Карибски регион по честота на заболяемост от карцином на ларинкса (Фигура 1.5).



Фигура 1.5. Представяне на районите в световен мащаб по очаквана честота на заболяемост за 2018 година от рак на ларинкса). Централна и Източна Европа се нареждат на 2-то място (GLOBCAN 2018, IACR).

По последни данни на Националния Раков Регистър на България за 2015г, са заболели 554 души от ларингеален карцином и са регистрирани 343 смъртни случая. Тези резултати поставят ларингеалният карцином на девето място по честота на онкологична заболяемост с 3.1% и десето място по смъртност с 3.3% при мъжете (E4). Така България се нарежда на девето място сред страните с най-високи нива на заболяемост от ларингеален карцином в Европа – факти, които са индикативни за социалната значимост на това заболяване (GLOBCAN 2018, IACR) (Фигура 1.6).

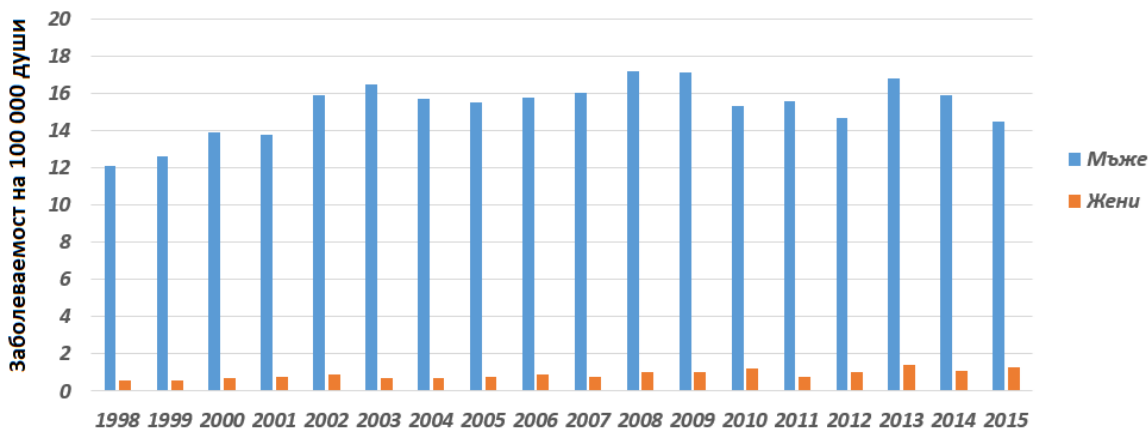
Очаквана възрастово стандартизирана честота на заболяемост и смъртност (в световен мащаб) за 2018 г., рак на ларинкс, двата пола, всички възрастови групи



Фигура 1.6. Представяне на страните от Европа по очаквана честота на заболяемост за 2018 година от рак на ларинкс. България се нарежда на 9-то място (GLOBCAN 2018, IACR).

През последните 18 години не се наблюдава понижаване случаите на заболяемост и смъртност от рак на ларинкса (E4), което силно се асоциира с тенденция на злоупотребата от тютюневи изделия и високо алкохолни напитки, доказани канцерогени на заболяването (Фигура 1.7.).

Заболеваемост от рак на ларинкса в България за период от 18 години (1998-2015), данни за двата пола



Фигура 1.7. Представяне на заболяемостта от рак на ларинкс при мъже и жени за период от 18 години (1998-2015) в България.

Клиничната картина при рак на гръкляна в зависимост от локацията му може да се прояви в началните етапи от възникване и развитие на заболяването, което е добра перспектива за ранна диагноза и добра прогноза (Таблица 1.1.) (Е5). Препоръчва се пациенти с дрезгав глас, продължаващ повече от 3 седмици, или с персистиращо възпалено гърло, дисфагия, одиофагия, която трае повече от 6 седмици, да бъдат насочени от общопрактикуващ лекар към отоларинголог (37,38).

Но въпреки това ларингеалният карцином остава късно диагностицирано заболяване (в III/IV стадий) (11), поради negliжиране на симптомите от повечето пациенти. Дългосрочната прогноза за авансирани ларингеални карциноми остава сравнително ниска, като в късните стадий е около 30-40% (12), и възникването на рекурентни карциноми засяга около 60% от случаите, докато метастази се развиват при около 15-20% от случаите (8). По данни на Националния Раков Институт, САЩ (NCI, SEER, USA) пет-годишната преживяемост за ларингеалния карцином от 52% за периода 1950-1954г. се е повишила до 60.4% за периода 2008 - 2014 г (13). Въпреки това тази промяна е незадоволителна на фона на съвременните постижения на медицината и генетично-диагностичните технологии, като успешното лечение на ларингеалния карцином остава предизвикателство за специалистите в областта.

Таблица 1.1. Клиничната картина при рак на гръкляна в зависимост от туморната локация.

Супраглотисни тумори (тумори локализиращи над гласните връзки)	Глотисни тумори (тумори локализиращи на гласните връзки)	Субглотисни тумори (Тумори локализиращи под гласните връзки)
<ul style="list-style-type: none"> • Затруднено преглъщане (дисфагия); • Болка при преглъщане (одиофагия); • Чуждо тяло в гърлото; • Промяна в гласа; • Затруднено дишане (диспнеа); • Шумно дишане; • Болка в ушите (оталгия). 	<ul style="list-style-type: none"> • Дрезгавост; • Дисфагия; • Затруднено дишане (диспнеа); • Шумно дишане. 	<ul style="list-style-type: none"> • Затруднено дишане (диспнеа); • Шумно дишане.

1.3. Рискови фактори

1.3.1. Основни рискови фактори

Основните рискови фактори за възникване на голяма част от неоплазиите, засягащи главата и шията, са употребата на тютюн и алкохол. Таблица 1.2. репрезентира рисковите фактори, които имат отношение към раковите заболявания, обхващащи главата и шията.

Тютюнопушенето е най-значимият рисков фактор за раково заболяване на ларинкса, като рискът е по-висок при тежки пушачи, дългогодишни пушачи и тези, които употребяват лули, черен тютюн и високо катранени цигарети (14). Също така се смята, че пушенето на биди, малки цигарети, характерни и често срещани в части от Азия, се свързва с повишен риск за развитие на рак, засягащ хипофаринкса и ларинкса, отколкото пушенето на западен тип цигари (15).

Консумацията на големи количества алкохолен концентрат също повишава риска от карцином на ларинкса. В сравнение с въздържателите или слабо консумиращите алкохол, рискът при тежките алкохолици е около десет пъти по-висок. По принцип този риск се свързва с употребата на алкохол, но се приема, че причината е продължителното въздействие на ацеталдехида, който е междинен метаболит на етанола, и е познат карциноген при животните (16).

Докато ефектът от злоупотребата с тютюн или консумацията на алкохол е променлив, то комбинацията между двата рискови фактора е най-честата причина за заболяемост от рак на глава и шия в световен план. Около 90% от ПКК в устната кухина, фаринкса и ларинкса възникват при тежки пушачи, и повечето от пациентите са от умерени до тежки алкохолици. Машабни проучвания предполагат намаляване на риска от ракови заболявания на главата и шията от 16% до 85% след спиране на тютюнопушенето (17–19). При тежките алкохолици - непушачи рискът от ларингеален рак е 2,5 пъти по-висок от нормата, и над 9 пъти по-висок при тежките пушачи, които са въздържатели от алкохол. Относителният риск от развитие на неоплазии нараства 10 до 100 пъти при хората, които консумират комбинирано алкохол и тютюн, в сравнение с индивидите, които никога не са употребявали тютюн или консумирали алкохол (20).

Все по-често се приема, че към основните етиологични фактори за възникване на заболяването, е човешкият папиломен вирус (ЧПВ), който също се асоциира с инфекциозни заболявания на главата и шията и тяхната потенциална роля за онкогенеза. Смята се, че има етиологична роля при непушачи и неконсумиращи алкохол. Скорошни данни докладват, че 25% от всички ракови заболявания на глава и шия са вследствие от инфектиране с ЧПВ, като при орофарингеални карциноми този процент може да достигне до 60% (21). Връзката между ЧПВ инфектирането като основна причина за развитие на рак на ларинкса, не е напълно установена, а проучванията докладват разнопосочно процентно разпределение на ларингеалните карциноми вследствие от ЧПВ. Докато Chen et al. (2017) оценяват че при 13.2% от 109 изследвани ларингеални тумора се открива ЧПВ (22), в друго скорошно проучване базирано на 82 изследвани пациента с рак на ларинкса ЧПВ не се открива при нито един (23). Въпреки различията от резултатите представящи процентното разпределение на ЧПВ при ЛПКК се предполага, че до 5% от случаите са възникнали вследствие от ЧПВ, като се наблюдава преобладаване на серотипове ЧПВ 16 и ЧПВ 18 (24,25). Съществуващите изследвания оценяват противоречиво процента на ларингеални ПКК, повлияни от наличието на ЧПВ16: от 3% до 85% (23). ЧПВ-свързаните ларингеални плоскоклетъчни карциноми (ПККЛ) обикновено възникват при по-млади пациенти и имат по-добра прогноза. Смята се, че при ларингеална канцерогенеза ЧПВ има

по-слаба роля в сравнение с тютюнопушенето и консумацията на големи количества алкохолен концентрат (26–28).

Таблица 1.2. Основни и допълнителни рискови фактори за развитие на ПККГШ (Е6).

<u>Локализация на тумора</u>	<u>Основни канцерогенни фактори</u>	<u>Допълнителни канцерогенни фактори</u>
Устна кухина	Алкохолен концентрат Тютюн за дъвчене ЧПВ 16 Тютюнопушене ЧПВ 16	ЧПВ 18
Сливици Фаринкс	Тютюнопушене Алкохолен концентрат Тютюн за дъвчене ЧПВ 16	Азбест Пасивно тютюнопушене Горещо мате (напитка с високо съдържание на кофеин)
Назофаринкс	Тютюнопушене ЕБВ Формалдехид Праха от дървообработване	
Назална кухина и параназални синуси	Тютюнопушене Производство на изопропилов алкохол Излагане на никелови компоненти	Формалдехид Текстилно производство на естествени и изкуствени кожи Праха от дървообработване
Ларинкс	Тютюнопушене Алкохолен концентрат Азбест Излагане на киселинни изпарения	ЧПВ 16 Пасивно тютюнопушене Горещо мате

1.3.2. Допълнителни рискови фактори

Допълнителни етиологични фактори за раковите заболявания на глава и шия са установени по-специфично за някои части на Азия. Такива са бетеловият орех и листата на арековата палма, срещани в Индия и Тайван (16). Към групата на допълнителните рискови фактори принадлежат още канцерогенни вещества, срещани на работното място, като азбест, никел, праха от дървообработването, бои, дизелови изпарения (29) и вещества, използвани в производството, като изопропанол, неорганични киселини, съдържащи сяра и иприт (30). Ниската устна хигиена и честата употреба на препарати за уста също са

потенциални рискови фактори за орален карцином, както и други карциноми на глава и шия (31).

Епидемиологични проучвания предполагат, че хранителен режим с ниско съдържание на зеленчуци и плодове и прекомерна консумация на червено месо с високо съдържание на наситени мазнини и холестерол, може да бъде рисков фактор за развитието на болестта (32). Според някои учени хранителните навици може да са от значение при механизмите на канцерогенеза, включително при ларингеален карцином. Консумацията на зеленчуци, цитрусови плодове, зехтин и портокалов сок, т. нар. „средиземноморска диета” се свързва с по-благоприятна прогноза при вече установено заболяване (10,33).

1.3.3. Генетична предразположеност

Ролята на генетичната предразположеност и възможното взаимодействие на генетични с външни фактори не са напълно изучени. Някои типове злокачествени заболявания, като карцином на гърдата, колона, белия дроб и хранопровода показват фамилна зависимост. Въпреки вниманието към потенциалните рискови фактори за раковите заболявания на главата и шията, като вирусни инфекции и професионални фактори, се знае малко за факторите, водещи до унаследяването на тези заболявания. Има случаи на рак на устната кухина и ларинкса, възникващи по сходен начин при двама или трима члена от едно семейство, които са регистрирани като фамилни. Идентифицирането на индивидите с потенциално висок риск от развитие на ПККГШ може да бъде от изключително значение при прилагане на превантивни мерки с цел да се намали риска от възникване на раково заболяване. Тези мерки включват пасивна превенция, като отказване на тютюнопушенето и приема на големи количества алкохол, и активна превенция, като хемипревантивно лечение, което може да намали риска от възникване на рак или да забави неговото развитие. Хемипревантивното лечение най-често се отнася до хранителни вещества, известни като хемипрофилактични агенти, които спомагат за забавянето на злокачествените процеси.

Данните за унаследяване на фамилен ПККЛ са непълни и противоречиви. Според някои изследователи се наблюдава по-висока честота на сквамозен карцином на глава и шия при братя и сестри, отколкото при родители на пациентите. При заболели с рак на ларинкса по-рядко се среща положителна фамилна история на сквамозен карцином на горната част на храносмилателния тракт, отколкото при тези с карцином на устната кухина или фаринкса. Повечето от пациентите с ларингеален карцином развиват и рак на белия дроб (77%), докато повечето от раково-положителните роднини на пациент с рак на устната кухина или фарингеален карцином развиват карцином на друга част от дихателния и горната част на храносмилателния тракт (56%) (34). В друго проучване е установено, че се наблюдава висока честота за фамилната история на орален и фарингеален или ларингеален рак, когато са диагностицирани двама или повече роднини от първа линия (35). В допълнение Garavello et al. (2012), публикуват резултати от проведено изследване, включващо заболели с ларингеален карцином. Резултатите сочат значително повишаване на честотата на рак на ларинкса при пациенти, които имат роднини, заболели от колоректален карцином и рак на бъбреците и рискът за развитие на

ларингеален карцином преди 60 годишна възраст е по-висок. Част от резултатите обобщават комбинирания ефект от тютюнопушене, алкохол и фамилна история при ларингеален карцином. В сравнение с категорията, включваща пациенти с нисък риск от развитие на ларингеален карцином, които са непушачи, консумиращи неголеми количества алкохол (<200мл/седмица) и без фамилна история, рискът от развитие на ларингеален карцином е значително по-висок при пациенти, които са изложени на влиянието на един или повече етиологични фактора и имащи фамилна история: OR 1,4 (95% CI, 0,3-6,2) и OR 18,2 (95% CI, 13,7-24,2) (36).

1.4. Лечение на ларингеален карцином

Настоящият стандарт на провеждане на лечение при ПККЛ цели да се подобри преживяемостта на пациента, да се контролира развитието на заболяването и да се запазят гласовите възможности. Прилаганите методи на лечение включват резекция, химио- и лъчетерапия (в комбинация или самостоятелно).

Близко разположените до ПККГШ здрави органи (мозък, гръбначен мозък, сънна артерия) водят до предизвикателства в дизайна на оптималните подходи на лечение, като целта е да се постигне максимален ефект от прилаганото лечение при минимално засягане на здрави структури с цел да се запази качеството на живот на пациента.

Ларинксът има важна роля при преглъщането, комуникацията и въздушната защита, в резултат на което лечението на рак на ларинкса се превръща в едно от най-големите предизвикателства в областта на онкологията, засягаща глава и шия. Поради уникалните функции на ларинкса, всяко лечение би могло да повлияе качеството на живот на пациента. Лечението на ларингеален рак е разделено на два стадия: ранна злокачественост – туморни стадии T1 и T2, и лечение на късна злокачественост – стадии T3 и T4. Целта на лечението при пациенти с ранен глотисен тумор е опазване на гласа. Седемдесет и пет процента от глотисните тумори се откриват рано, вследствие на ефекта, който оказва раковото заболяване върху качеството на гласа на пациента. Ранните глотисни неоплазми са потенциално лечими с един вид терапия, най-често радиолечение или хирургия (ендоскопска лазерна хирургия). Глотисният рак в ранен стадий (T1/T2) има отлична прогноза, с 5-годишна раково-специфична преживяемост между 85-95% (37.38). Въпреки че преживяемостта е висока, основните причини за неуспех в лечението се оказват локорегионалните метастази. Те възникват в района на туморното образуване. Успехът на лечението зависи както от етапа на развитие на болестта при пациента, така и от опита на лекуващия лекар.



Фигура 1.8. Роля на радиационното лечение при мултидисциплинарния подход в лечението на първични и метастатични ПККГШ (39).

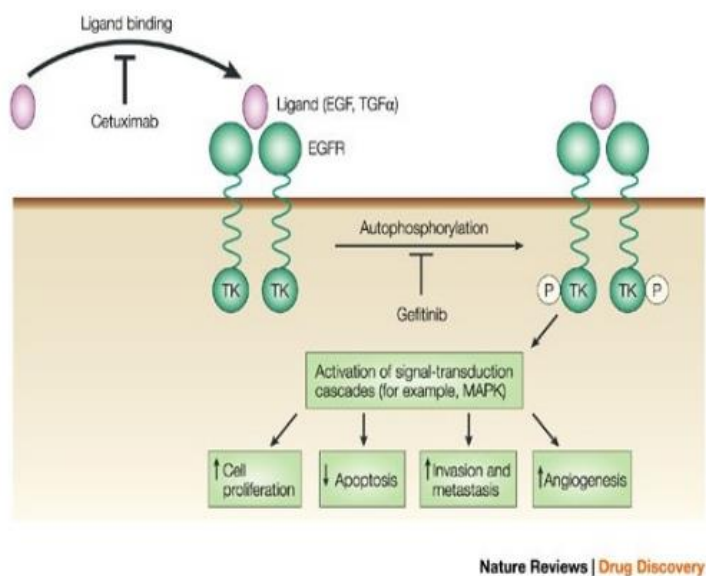
Радиотерапията все още е по-често използваният метод на лечение при ранен ларингеален карцином (Фигура 1.8.). Палиативното лечение отнема време, пациентите се подлагат на терапия в продължение на няколко седмици, като се наблюдават и свързаните с него странични ефекти. При наличие на локорегионален неуспех единственото лечение е хирургическа намеса. Последните години рак на глотиса в ранен етап от развитие за заболяването се лекува с ендоскопска лазерна СО₂ хирургия. Предимството е в това, че лечението е еднократно, без наличие на свързаните с радиотерапията странични ефекти. Качеството на гласа след такава процедура е сравнимо с това след радиотерапия. Ако отново възникне туморна маса на това място, вариантите за лечение включват следваща ендоскопска резекция, радикална операция или лъчетерапия (40). Много фактори повлияват върху избора на подходящо лечение, като място на възникване на първичен тумор, наличието на други заболявания при пациента, предходни заболявания в областта на главата и шията и др. За предпочитане е да се прилага палиативно лечение, с което може да се избегне тотална ларингектомия и да се постигне локален контрол на заболяването без драстична резекция.

Не на последно място по важност е прилагането на подходящи цитостатици с цел по-доброто менажиране на напреднал рак на ларинкса с избягване на драстична, променяща качеството на живот хирургия. Стандартни цитостатици, най-често използвани при лечение на ларингеален и хипофарингеален карцином включват цисплатина, карбоплатина, 5-флуороурацил (5-FU), доцетаксел, паклитаксел, и др. (41). Най-често

прилаганата химиотерапия включва комбинацията между цисплатина и 5-FU (42), като при 67% от пациентите се наблюдава запазване на гласовите функции след провеждане на лечение (43). В рандомизирано клинично изпитване три групи пациенти с напреднал стадий карцином са подложени на лечение с прилагането на цисплатина +5-флуороурацил с последваща радиотерапия, радиотерапия провеждана с цисплатина или самостоятелно прилагане на радиотерапия. Конкументната радиотерапия с цисплатина +5-флуороурацил води до статистически по-голям брой пациенти със запазен орган ларинкс две години след провеждане на лечението (88% към 75% към 70%, съответно за конкурентно лечение, въвеждаща химиотерапия и само радиотерапия) (44).

Въпреки различията в хистологията и молекулното охарактеризиране на раковите типове обхващащи главата и шията, основния протокол за лечение се основава на най-често срещания хистологичен тип на раковите заболявания в тази област на тялото. Рекурентните и метастатичните заболявания са обикновено нелечими, тъй като генетичните причини за възникването на тези заболявания не са напълно изяснени и се наблюдава липса в познанието на тези заболявания.

За разлика от други ракови заболявания, при тези на главата и шията не са установени предиктивни маркери и нови подходи за таргетна терапия освен цетуксимаб (Фигура 1.9.), одобрен от Американската Агенция за Контрол на Храните и Лекарствата (FDA) през 2006г (45).



Фигура 1.9. Действие на цетуксимаб. (46)

По епидемиологични данни ракът на ларинкса на микроскопско ниво е хомогенно заболяване като над 95% от случаите се дължат на плоскоклетъчен карцином. На клинично ниво обаче се оказва, че той има хетерогенно биологично поведение, което често не се припокрива с общоприетите патохистологични и клинични класификации.

Остават все още много нерешени въпроси по отношение на прогнозата, ефикасността на лечението и ранната диагностика. Непрестанното търсене на отговори на тези въпроси доведе до извода, че зад привидно еднородното заболяване се крие подчертана хетерогенност, както на клинично, така и на молекулно ниво. За да се подобри ефикасността на лечението при рак на ларинкса е необходимо да се вникне по-детайлно в молекулните и генетични механизми, които са включени в канцерогенезата на това агресивно заболяване. Установяването на специфични молекулно маркери (биомаркери), свързани с ларингеалната канцерогенеза биха подпомогнали прилагането на прецизирана терапия с цел подобрене на изхода от това коварно заболяване.

1.5. Биомаркери

През последните десетилетия се повишава познанието и по-доброто разбиране на злокачествените заболявания от гледна точка на молекулярната биология. Това дава възможност за установяване на подходящи маркери за ранно диагностициране и прогнозиране на възникването, и същевременно подбиране на подходящото лечение за малигнените заболявания.

Подходящият биомаркер трябва да бъде измерим и оценен като индикатор на нормални биологични процеси, процеси на патогенеза или фармакологичен отговор на терапевтична интервенция (47). Биомаркерите могат да бъдат ДНК, РНК, белтъци, метаболити или измерване на процеси, като апоптоза, ангиогенеза или пролиферация (48). Биомаркерите се разделят на няколко групи – такива с диагностична (скринингова) функция, прогностични и такива с предиктивна функция. Диагностичните биомаркери се използват за откриване и идентифициране на определен тип тумор. След като веднъж е поставена диагноза, се използват прогностичните биомаркери. Те са необходими при определяне прогнозата на пациента и дават информация относно агресивността на заболяването. Предиктивните биомаркери са подходящи за предсказване на отговора към бъдещото лечение. Такива маркери групират пациентите на потенциално отговарящи или неотговарящи на дадено лечение.

Биомаркерът може да бъде единична молекула, комбинация от няколко молекули или специфичен молекулен профил. Оценяването на биомаркерите трябва да бъде възможно чрез бърз и надежден метод, икономически изгоден с висока степен на аналитична чувствителност и специфичност. Също така трябва да са подходящи за вземането на правилно клинично решение за бъдещото лечение на пациента (49). При карциномите, засягащи областта на главата и шията, няма установен и наложен такъв биомаркер, но има редица проучвания, чиито резултати са свързани с потенциални биомаркери и тяхната необходимост за диагностицирането на този вид злокачествено заболяване. Валидирането на молекулните маркери ще бъде от полза при дизайна за индивидуален подход на лечение.

1.5.1. Сравнение на РНК, ДНК и белтъци като биомаркери

Рибонуклеиновите киселини (РНК, RNA) не служат само за пренасяне на генетична информация, но също са участници в регулацията на транскрипционно и след-транскрипционно ново. Въпреки че РНК молекулите са нестабилни в алкална среда, те са лесни за детекция, като дори и ниски нива на РНК могат да бъдат околичествени. Сравнени с белтъчните биомаркери, РНК молекулните маркери имат по-висока чувствителност и специфичност. Техниката на полимеразно верижна реакция (ПСР, PCR) позволява дори и малки количества от РНК секвенциите да бъдат намножени (амплифицирани) и да бъдат уловени специфично с висока чувствителност. В допълнение, икономически е по-изгодно да се детектира РНК биомаркер сравнение с белтъците, поради това че за всеки белтък е необходимо да се използва специфично антитяло, което оскъпява детекцията му. Сравнени с ДНК биомаркерите, РНК биомаркерите имат предимството че могат да предоставят информация за динамиката на клетъчните етапи и регулаторните процеси. Също така, някои РНКи със специфична структура, като кръглите РНК, са потенциално стабилни в телесни течности като плазма и серум (50,51).

На Таблица 1.3. са представени характеристиките на ДНК, РНК и белтък като биомаркери. (50).

Таблица 1.3. Сравнение на РНК, ДНК и белтъци като биомаркери

	РНК	ДНК	Белтък
Биологична Функция	Преносител на генетична информация; регулаторен фактор	Носител на генетична информация	Катализатор; регулаторен фактор; структурен компонент
Количество в човешка клетка	10~30 pg (52)	~6 pg (52)	130~150 pg (53)
Количество за 1mL плазма	1~1000 ng (54,55)	1~1000 ng (54,55)	~6 x 10 ⁴ ng (56)
Биологична стабилност	Не са стабилни в алкални условия; реактивни	Стабилни в алкални условия, по-слаби реактивни от РНК	Обикновено стабилни от нуклеиновите киселини
Настоящ етап като биомаркер	По предварителни проучвания; използвани за генетично консултиране	По предварителни проучвания; използвани за генетично консултиране	Широко използвани в рутинната диагностика
Характеристика като биомаркер	Експресионен профил	Мутации, епигенетични модификации	Количество; белтъчен профил
Точност и специфичност	Относително висока	Относително висока	Относително ниска (повечето се базират на употребата на

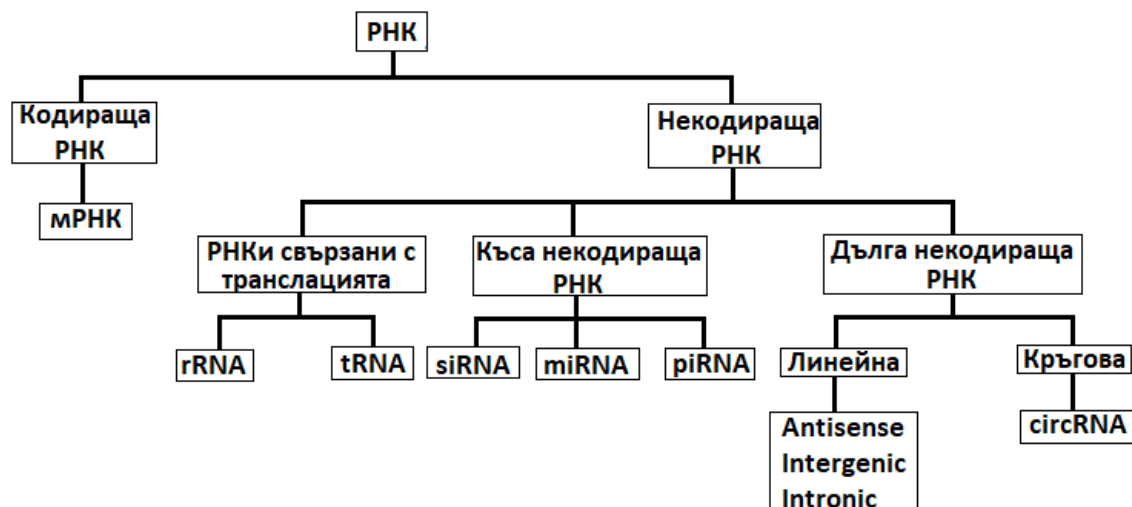
Методи детекция	на	RT-qPCR, микрочип	RNA-seq,	qPCR, микрочип	DNA-seq,	подходящо анти тяло)
Пример		PAM50 (Рак на гърдата)	(Рак на	BRCA1/2 мутации (Рак на гърдата)		Масспектометрия, имунологичен тест, електрофореза AFP (Рак на черния дроб)

Въведените технологии от ново поколение улесниха количественото измерване на РНК експресионните нива на ниво цялостен геном. Повишаване дълбочината на РНК секвенирането също позволява откриването на нови транскрипти, като ниско експресирани некодиращи РНКи, както и едва доловими вариации в експресията с висока прецизност (57).

1.6. Некодираща РНК

С напредъка на технологиите на РНК секвенирането от ново поколение (Next Generation Sequencing; NGS) се разкрива сложността на нашия геном. Некодираща РНК покрива по-голямата част (98%) от транскриптома и няколко различни класове на регулаторна РНК с важни функции са открити (Фигура 1.10.). Разбирането на значимостта на този РНК свят е един от най-важните предизвикателства, които се поставят пред биологията и некодиращата РНК представлява златна мина от потенциал за нови биомаркери и терапевтични таргети.

Изследвания установяват, че само около 2% от човешкия геном кодира белтък, докато останалите 98% участват с кодирането на различни класове некодираща РНК (58), която до скоро се е смятала за „непотребен материал“. Сред тази „пренебрегвана“ ДНК се локализируют гени, които отговарят за експресията на малки РНКи (миРНК; miRNAs) и дълга некодираща РНК (днкРНК; lncRNA). Голяма част от тези некодиращи РНКи имат регулаторни функции на транскрипционно, пост-транскрипционно и епигенетично ниво и те често са с нарушена експресия при много от злокачественостите. Поради тяхната доказана онкогенна и туморно супресорна функция в клетъчните процеси, miRNA и lncRNA имат потенциалната роля на нови противоракови терапевтични молекули (59,60).



Фигура 1.10. Класификация на РНК молекулите. РНКите са разделени в два основни класа: кодираща РНК и некодираща РНК. Към кодиращата РНК спада матричната РНК (мРНК), а към некодиращата РНК спадат РНКи свързани с трансляцията (rRNA; tRNA), по-къси некодиращи РНК (siRNA; miRNA; piRNA) и дълга некодираща РНК, която се разделя на линейна и кръгова. (63,64)

1.6.1. Микро РНК (miRNA)

Малките РНК (микро РНК) са клас от малки (~19-24 нуклеотида), ендогенни, еволюционно непроменени РНКи, които функционират като пост-транскрипционни регулатори на генната експресия. Тяхната основна функция е да се свързват към комплементарни таргетни секвенции в матричните РНК (mRNA) и да взаимодействат с транслационната машинария, посредством което повлияват белтъчната продукция. Проучвания разкриха, че в допълнение към потискането на трансляцията, свързването на miRNA с таргетните mRNA води до набирането и асоциирането на фактори, които са отговорни за дестабилизацията, деградацията на mRNA, както и за намаление на експресионните нива (63).

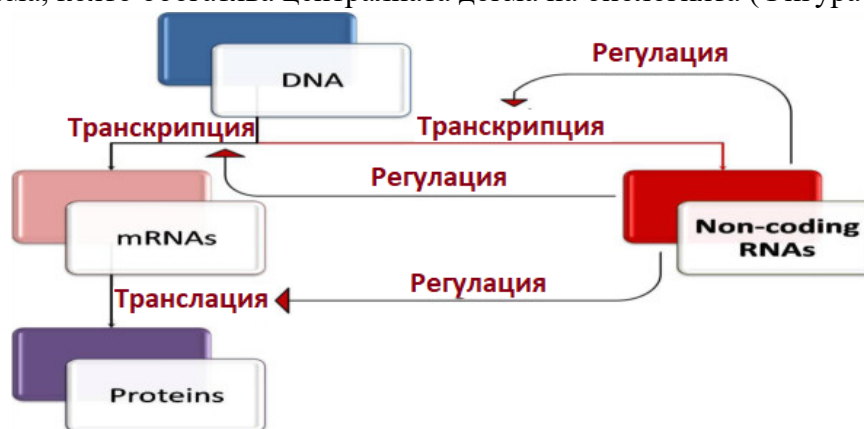
1.6.1.1. История на miRNA

Събитията, свързани с откриването на животински микро РНКи са започнали през ранните 80-те в лабораторията на Robert Horvitz, с откриването на нулевата мутация (e912) причиняваща загуба на функцията на lin-4, хетерохронен ген, отговорен за контролирането на времето развитие на нематодите, който се свързва с повишен брой на линеенятия и продължителната синтеза на ларвно-специфичен белтък при *Caenorhabditis elegans* (64,65). През 1984г. Victor Ambros, тогава постдокторант към лабораторията на Robert Horvitz, работи върху характеризиране на хетерохронните мутаци на *Caenorhabditis elegans*, и открива срещуположен фенотип на lin-4 (e912). Отделни нематоди, с мутацията

lin-4 (e912) развиват аномален фенотип на възрастни, като червеите повтарят съдбите на клетъчните стадии на късните ларви и по този начин не могат да отделят яйца (66).

По-късно през 1987г. същия екип открива че мутацията в lin-4 има противоположен фенотип на мутацията на друг ген, lin-14, когато се приема че lin-14 тумор супресорната мутация при нулеви lin-4 клетъчни линии е див тип (67). През същата година Horvitz и съавтори, Edwin Ferguson и Paul Sternberg докладват че нулева мутация в гена lin-14 обръща фенотипа, наблюдаван от загубата на lin-4 (68). Тези интригуващи наблюдения предполагат епистатично взаимодействие, в което lin-4 негативно регулира lin-14. Първоначалното предположение е, че генния продукт от lin-4 е най-вероятно белтък, който негативно регулира lin-14, което ще бъде опровергано на по-късен етап. Двата обучаващи се в лабораторията изследователи, Victor Ambros и Gary Ruvkun (по-късно ръководители на свои лаборатории) продължават проучванията в охарактеризирането на lin-4:lin-14 взаимодействието.

През 1993 г. две независими и взаимно подкрепящи се проучвания бяха публикувани в един и същ брой на списанието Cell, в резултат на споделяне на идеи и непубликувани резултати. Първо, Rosalind Lee и Rhonda Feinbaum, работещи в лабораторията на Ambros, показаха, че геномният локус който кодира lin-4, не отговаря за синтезата на белтък. Вместо това, Ambros и съавторите, идентифицират две малки некодиращи транскрипта, произхождащи от гена кодиращ от lin-4 съответно от 22nt и 61nt (69). В друга публикация, Ruvkun заедно с Bruce Wightman и Ilho Ha, идентифицират седем елемента в 3'-нетранслиращия регион (UTR) на lin-14, които са комплементарни на последователността на малките транскрипти от lin-4 (70). Тези две независими проучвания откриват нов механизъм, при който lin-4 повлиява ефекта на lin-14 посредством след транскрипционен механизъм (69,70). Така разработките започващи с идентифицирането на хетерохронните мутации при моделния обект C. Elegans водят до неочаквано откритие на напълно нов тип на регулаторен механизъм, контролиран от нкРНКи и се установява нова парадигма, която обогатява централната догма на биологията (Фигура 1.11).



Фигура 1.11. Модифицирана централна догма. Централната догма на молекулярната биология гласи, че ДНК е транскрибирана в РНК, която след това се трансформира в протеин. С възникването на възможността на нкРНК, тази диаграма показва как те служат за регулиране на всяка стъпка в централната догма, включително регулиране на собствената им транскрипция (71)

През следващите седем години, не са установени подобни нкРНКи, участващи в регулаторни механизми в друг животински организъм, освен *C. Elegans*, до 2000-та година когато учените от лабораторията на Ruvkun докладват, че са идентифицирали втори хетерохронен ген при нематоди, *lethal-7 (let-7)*, който не кодира белтъчен продукт, но продуцира РНК с дължина 22 нуклеотида (74). Подобно на *lin-4*, регулаторната РНК *let-7* е установена като основна за преминаването от ларвен стадий към възрастен индивид. През февруари 2000, Brenda Reinhart и Frank Slack от лабораторията на Ruvkun демонстрират че загубата на *let-7* води до трансформации, при които се наблюдава повторение на ларвените клетъчните етапи, докато повишените нива на *let-7* водят до пропускане на ларвено специфични етапи от развитието (72)

През април същата година, Frank Slack и колеги откриват, че активирането на *let-7* по време на късни ларвени стадии регулира преминаването на нематода от ларва към възрастен индивид посредством регулирането на неговия таргет: LIN-41, водещи до неговите понижени нива, което от своя страна негативно регулира LIN-29, транскрипционен фактор, който контролира особеностите на възрастния организъм (73). Само няколко месеца по-късно, Amy Pasquinelli и нейни колеги от лабораторията на Ruvkun докладват, че те са идентифицирали РНК хомолози на *let-7* при други животински видове, включително човек и други моделни организми (74). Регулирането на развитието посредством *let-7* беше показано и сред други видове като *Drosophila* и *Zebrafish*, което предполага че механизмът повлиян от малката некодираща РНК *let-7* е еволюционно съхранен (74).

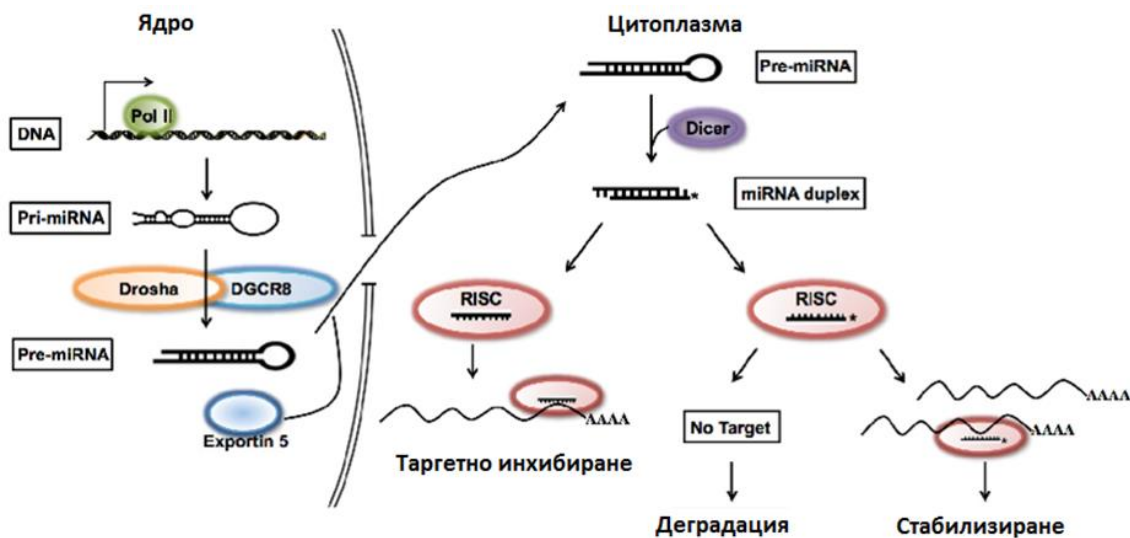
През 2000, в лабораториите на Ambros и Ruvkun са открити два основни членове на семейството на малките некодиращи РНКи, понастоящем наименувани като *microRNAs (miRNAs)*, които са част от голямото семейство с членове не само при нематоди, но и при насекоми, растения и бозайници (74–77). Тези открития са били направени през 2001 посредством три независими проучвания, които допринасят подкрепят предположението, че *miRNAs* са еволюционно съхранени и че също други *miRNAs* се намират при безгръбначни и бозайници, което означава, че функционално *miRNA* могат да участват в общ регулаторен механизъм, повлияващ гените при еукариоти (75,76).

Така откриването на хетерохронните *C. Elegans* мутанти доведе до неочаквано откриване на изцяло нов тип регулаторен механизъм под действието на некодираща РНК и се допълни централната догма на биологията.

1.6.1.2. Биогенеза на *miRNAs*

Микро РНКте се транскрибират като първичен микро РНК транскрипт (*pri-miRNA*), който се процесира до около 70 нуклеотидна прекурсорна РНК (*pre-miRNA*) с помощта на ензима *Drosha (RNase III)* и белтък с двойно-верижна РНК-свързващ домейн (*DGCR8*) (78). *Pre-miRNA* след това претърпява процеси на зреене, като се получава около 22 нуклеотиден *miRNA*: *miRNA** дуплекс посредством друг ензим от групата на *RNase III-Dicer* (79). Една от веригите в дуплекса се въвежда в белтък *Argonaute (Ago)*, като се продуцира РНК-индуциран затихнат комплекс (*RNA-induced silencing complex (RISC)*).

Също така се предполага че всички Ago белтъци участват в стабилизирането на зрелите микро РНКи, и само Ago2 (който има ендонуклеазна активност) реже miRNA* и активира RISC комплекса (80). Това предполага, че Ago1 улеснява RISC–медираната транслациона репресия и комплексът Ago2-RISC води до разрушаване на таргетна матрична РНК (81) (Фигура 1.12.).



Фигура 1.12. Схематично представяне на избора на миРНК изоформата и функцията. Pre-miRNA се транскрибират от РНК полимераза II и се претърпяват процеси на зреене в ядрото, с участието на Drosha/DGCR8. Pre-miRNAs се експортира от ядрото и продължава процеси на зреене с RISC комплекс. Избора на miRNA изоформата се определя от количеството на целевия транскрипт. Когато miRNA* таргетните транскрипти са в голямо количество, miRNA* секвенцията е стабилизирана и действа по същия подход както и miRNA изоформата (82).

1.6.2. Дълга некодираща РНК

Дългата некодираща РНКа (lncRNAs) принадлежи към по-голяма група от некодираща РНК, която главно се класифицира като 200nt–100kb дълги транскрипти, с липсваща рамка за четене. Те обикновено се транскрибират от РНК полимераза II и се контролират от транскрипционни активатори на SWI/SNF комплекс. Повечето от генерираните lncRNAs обикновено преминават през същите стъпки на зреене като mRNA. lncRNAs представляват голяма (>80%) и силно хетерогенна група от нкРНК, като тяхната експресия силно варира между тъканите и клетъчните типове (83).

1.6.2.1. История на lncRNA

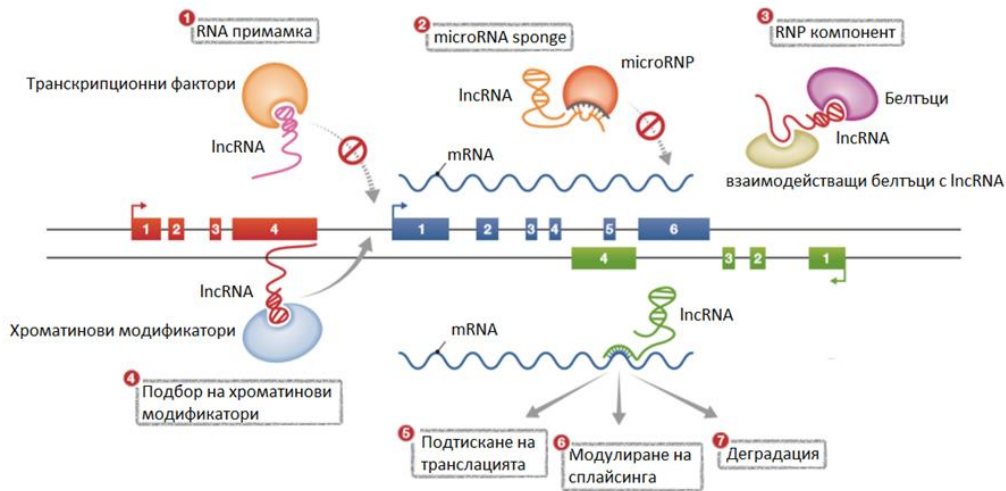
През 80-те, изследователите са използвани cDNA библиотеки, за да изучават тъканно-специфични гени и времеви модели на експресия. През този период първоначално усилията са били фокусирани върху гени, произвеждащи известни белтъци. В последствие е приет подход, при който не се разглежда единствено кодиращия потенциал на РНК. Благодарение на този подход е открита първия не кодиращ ген, а именно H19, който по това време се е смятал за mRNA (84).

В края на 80-те, прецизни генетични и молекулярни изследвания откриват феномена геномен импринтинг или родителски специфичен произход, който е част от молекулни компенсаторни механизми. Независимо два импринтирани гена са открити: бащино експресирания белтък кодиращ IGF2R и майчино експесиран H19. Двата гена са локализиращи в миша хромозома 7 в близост един до друг, формирайки H19/IGF2R клъстер (85,86). Това, което прави H19 необикновен е липсата на транслационно събитие, въпреки че гена съдържа малки отворени рамки за четене. H19 изразява силна секвенционна консервативност сред бозайниците и транскриптите имат характеристики сходни с тези на mRNA: транскрибират се от RNA полимеразата II, преминават през процеси на сплайсинг, 3' полиаденилирани и локализиращи са в цитоплазмата (87). Експресията на H19 при трансгенни мишки е установено, че може да бъде летална при пренатални етапи, предполагащо че не само концентрацията на H19 е строго контролирана, но и има също важно отношение към ембрионалното развитие. Функцията на H19 като РНК молекула със собствена функция остава мистерия, докато функционалното характеризирание на друга lncRNA, Xist, участваща в количественото компенсиране на генната експресия при бозайници. Оттогава H19 е обстойно изследвана и представлява прототип на мултифункционална lncRNA.

Полът може да бъде определен по редица начини, при бозайниците се определят от хромозомите X и Y. X хромозомата носи в себе си много гени, повечето от които нямат отношение за развитието на пола и е необходимо количествено компенсиране между мъжете и жените. Въпреки че механизма на избор при *Drosophila* е да се удвои транскрипцията на единична X хромозома при мъжките индивиди, при бозайниците се наблюдава обратния ефект, при който едната X хромозома е инактивирана. Този феномен, наречен инактивиране на X-хромозома (X-chromosome inactivation; XCI) е открит при мишки от Mary Lyon през 1961 (88) и след това се разкрива и при бозайници. Процесът на XCI е установен през ранното ембрионално развитие и се иницира от единствен локус, X-неактивационен център (X-inactivation center; Xic). През ранните 90-те, този локус е открит да продуцира дълга нкРНК, Xist (X-inactive-specific transcript). Експесирана е при много ниски нива при мъжки и женски миши недиференцирани ембрионални стволови клетки. По време на диференциацията експресията на Xist се активира при женски клетки, от бъдещата неактивна X хромозома (Xi), за да иницира XCI. Задържан в ядрото, Xist задейства заглушаването на гените, като физически се локализира и разпространява широко в бъдещата Xi (89,90). В сравнение с H19 или други lncRNA, които участват в количествено компенсиране, Xist е нетипична, тъй като включва на потискането на цяла хромозома.

Размножаването на Xist сред Xi, се нарича „обгръщане“, което включва РНК обвиване около X хромозомата и набирането на множество фактори, включително поликомб репресионни комплекси 1 и 2 (Polycomb Repressive Complexes 1; 2; PRC1; PRC2). Така се задейства каскада от хроматинови промени и пространствена реорганизация на Xi и стабилно потискане на Xi-свързаните гени по време на развитието и живота на възрастния индивид (91).

В редица изследвания са докладвани данни за участието на lncRNA в регулацията на генната експресия посредством разнообразни механизми (Фигура 1.13.). На пример, lncRNA могат да участват като молекулно скеле, с цел подсилване на репресивни (като Polycomb Repressive Complex 2; PRC2) или активиращи (като Trithorax групата; TrxG) генната експресия хроматинови модификатори. В допълнение, lncRNA могат също да модулират пост-транскрипционни събития по време на генната експресия, като сплайсинг (92), транслацията на матрична РНК или нейната деградация (93). Освен това, някои lncRNAs могат да инхибират miRNAs, като по този начин индиректно се повишава експресията на крайния продукт от транслацията - белтъците, които иначе биха били регулирани от miRNAs (94). Такъв регулаторен капацитет позволява на дългите нкРНКи да участват в модулирането на редица биологични сигнални пътища и процеси.



Фигура 1.13. Механизми на регулация с участието на дълги некодиращи РНКи (lncRNAs): [1] lncRNA участват като РНК примамки, с което успяват да задържат транскрипционни фактори настрана от техните РНК таргети посредством директното свързване към тях. [2] Инхибиране функцията на малките РНКи (miRNAs); [3] Много lncRNA изглежда да се свързват към специфични комбинации от регулаторни протеини, потенциално действащи като скелетни елементи в рибонуклеопротеиновите комплекси; [4] Подбиране на хроматин-модифициращи комплекси към съответните ДНК таргети; Някои от lncRNA модулират директно процесирването на съответните таргетни матрични РНКи, това включва транслация [5], сплайсинг [6] и деградация [7]. (95)

1.7. Роля на lncRNAs и miRNAs при ПККЛ

1.7.1. Дълга некодираща РНК при рак на ларинкса

Редица изследвания дискутират участието на lncRNAs в регулаторните процеси на генната експресия посредством различни механизми при раковите заболявания. Въпреки това недостатъчно е познанията за lncRNAs профилирането при раковите заболявания на главата и шията и особено при рак на ларинкса. На Таблица 1.14. са представени таргетни молекули на най-често изследваните lncRNAs при КГШ според базата данни LNCREG (E7).

Таблица 1.4. Потенциални таргетни молекули свързани с lncRNA при КГШ

lncRNA	Таргетни молекули
CDKN2B-AS1	ADIPOR1, C11ORF10, VAMP3, CARD8, Klf2, p21
FOXCUT	MMP2, MMP7, MMP9, VEGF, FoxC1
GAS5	miR-21, CDK6, C-myc, ATG7, Beclin, Cyclin D1, E2F1, LC3-II, ADAMTS4, MMP13, MMP2, MMP3, MMP9, p21, p53, PDCD4, PTEN
H19	let-7, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429, miR-675, N-cadherin, Snail, Twist, Vimentin, Zeb1, Zeb2, Claudin1, E-cadherin, KRT19, KRT8, p53, Bax, IGF2, COL2A1, Lnsr, Lpl, Slug, CDH13, DICER, Hmga2, AKT, CDC25A, GSK3 β
HOTAIR	miR-124, miR-130a, miR-331-3p, β -catenin, Bmi1, CD11b, CD18, CD44, CD82, CD133, E-cadherin, HoxA1, HoxA4, HoxA5, HER2, KRT8, p16, p21, p53, PTEN, QKI, RBM38, SFN, WIF-1, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP13, N-cadherin, Slug, Snail, Twist, VCAN, VEGF, Vimentin, Zeb1, Oct4
HOTTIP	HoxA7, HoxA9, HoxA10, HoxA11, HoxA13
LET	CASP3, BCL2, PCNA, Bax, p21
Linc-ROR	miR-145, miR-181, miR-205, miR-99, E-cadherin, Occludin, Fibronectin, N-cadherin, Vimentin, α -SMA, Zeb1, Zeb2, Nanog, Oct4, Sox2
MALAT1	CCT4, CTHRC1, FHL1, ROD1, SLC26a2, TMEM20, AKT, p38, PI3Kp85 α , β -catenin, CA2, E-cadherin, HNF4G, MIA2, RASSF6, ROBO1, ABCA1, ADAMTS12, AIM1, AKAP9, BMPER, CDCP1, COL6A1, CPM, CSF1, CXCL5, DRD1, GPC6, HMMR, LAYN, LPAR1, LPHN2, LY6K, MCAM, NNMT, PRKCE, Slug, Snail, STC1, Vimentin, Zeb1, Zeb2, ICAM, MMP9, PCNA, TNF- α , VEGF, Fibronectin, LTBP3, N-cadherin, p21
MEG3	CASP3, CASP9, p53, LC3-II, COL1A1, MDM2, α -SMA, CASP8, Dll4, Hes1, Iqgap1, MMP9, Timp1, Vegfa, Vegfr1, Wasl, BCL2, Bax, Cyto c, NF-kB
NEAT-1	HIV-1, ADARB2, EIF4G3, FP15737, OVC10-2, SH3PXD2A, F11R (JAM1)
UCA1	p21, CDKN2B, EP300, TGF-2, WNT6, AKT, CREB, p42, p44, ATM, Fas, PDGFB
XIST	X-chromosome, Atrx, Fgd1, Huw1

Chen J et al. (2018) изследват значителното намаляване на експресионните нива на lncRNA AC008440.10 при пациенти с напреднал рак на ларинкса, при които се установява наличие на лимфни метастази в сравнение с пациенти диагностицирани с ранен етап на развитие на ларингеална злокачественост. Резултатите значимо установяват силна корелация между нивата на lncRNA AC008440.10 и туморната прогресия, както и рискът от развитие на метастази и ниската преживяемост. В допълнение, авторите разкриват потенциала на lncRNA AC008440.10 като прогностичен маркер в комбинация с СТ сканиране на лимфни метастази, със специфичност достигаща до 100% (96). При карциномите на главата и шията, изследванията показват намалена експресия на lncRNA MEG3 (97) и повишени нива на lncRNA UCA1, което показва възможна корелация с присъствието на метастази при плоскоклетъчен карцином на езика (98). Повишена експресия на MIR31HG корелира значимо с напреднал туморен стадий и присъствие на лимфни метастази. КГШ имащи по-ниски нива на експресия на MIR31HG се свързват с по-добра цялостна преживяемост и липса от повтарящи се карциноми. Тази резултати допринасят за предложението на MIR31HG като потенциален прогностичен биомаркер (99). Li et al. (2013) демонстрират, че lncRNA HOTAIR (homeobox transcript antisense RNA) е значимо свръхекспресирана в тъканни проби от рак на ларинкса, като участва в метилирането на гена PTEN при злокачествена ларингеална Нер-2 клетъчна линия (100). HOTAIR участва и в химиотерапевтичната резистентност посредством активиране нивата на епително-мезенхимната транзиция чрез повишаване нивата на miR-613 и понижаване на регулаторната молекула SNAI2 (101). Wang et al. (2014) докладва, че екзозомните серумни нива на miR-21 и HOTAIR са значимо по-високи при пациенти с рак на ларинкса в сравнение с тези диагностицирани с доброкачествени полипи на гласните струни. Комбинацията от двата маркера успешно разграничава двете групи пациенти с висока чувствителност (94.2%) и специфичност (73.5%), което предполага и тяхното успешно използване за предикция на ларингеална злокачественост (102).

Друга lncRNA с повишена експресия при плоскоклетъчен рак на ларинкса е MALAT1, която също се свързва с тежък хистологичен тип или напреднал клиничен стадий. Значително потискане на клетъчната пролиферация и активирането на апоптоза след инхибиране на MALAT1 е показани от авторите (103).

Chen et al. (2014) установява силно значимо модифициране на експресията на три lncRNAs при рак на ларинкса: CDKN2B-AS1, HOTAIR и MALAT1. Драматично понижение на нивата на експресия на тези lncRNAs са установени след провеждане на химиотерапия с цисплатина и паклитаксел (104). Авторите предлагат тяхната употреба като прогностични маркери.

Друга lncRNA, която се свързва с регулацията на miRNAs е също и H19. В изследването на Wu T et al., (2016) H19 е със значимо променена експресия при рак на ларинкса и негативно корелира с преживяемост на пациентите с рак на ларинкса. Понижени нива на lncRNA H19 потискат клетъчната пролиферация, миграция и инвазия при рак на ларинкса, като miR-148a-3p е идентифициран като таргет на H19. В комбинация, двете молекули участват в инхибирането на DNMT1 и понижението на нивата на метилиране при ПККЛ (105). Скорошно изследване установява онкогенната

роля на lncRNA TUG1, която е положително свързана с туморен и клиничен стадий както и наличието на лимфни метастази. Потискането на TUG1 води до потискане на пролиферацията и миграцията на Hep-2 клетъчна линия (106). В друго изследване, серумните нива на UCA1, който е потенциален неинвазивен маркер за ларингеалната ракова диагноза, и неговите високи нива се свързват с далечни метастази, ниска преживяемост и лоша прогноза. UCA1 повлиява положително пролиферацията, миграцията и инвазията на AMC-HN-8 клетъчна линия посредством активиране на Wnt / β -катенин сигналния път (107).

1.7.2. miRNAs при рак на ларинкса

С откритието на функционалната роля на miRNAs, те стават атрактивни маркери за диагноза и предикция на много заболявания, включително рак на ларинкса.

Оценка на експресията на miRNAs посредством микрочиповите технологии демонстрират промени в експресионния профил при рак на ларинкса. Този подход може успешно да се използва когато се сравняват експресионните профили на miRNAs между нормални и туморни ларингеални тъкани както и между първични ларингеални лезии и авансирал рак на ларинкса или рекурентни и метастатични тумори. RT-qPCR често се използва за валидиране на микрочиповите резултати. Проучвания идентифицират много miRNAs с ракови-специфични възможности (онко miRNA) или инхибиращи (тумор супресорни miRNA). В допълнение, miRNA експресионните профили са анализирани в плазма при ПМКЛ и здрави индивиди (108). Таблица 1.5. презентира miRNAs с нарушена регулация при рак на ларинкса както и техните валидирани таргети и функции.

Таблица 1.5. Обобщение на потенциални miRNA като биомаркери при рак на ларинкса

miRNA	Таргет	Функция	Референция
let-7a↓	c-MYC, RAS	Засяга пролиферацията, апоптозата и туморната диференциация	(109)
miR-21↑	BTG2	Инхибирането на miR-21 води до загуба на G1-S преминаване и повишава апоптозата	(110)
miR-206↓	VEGF	Обратна корелация между експресията на miR-206 и T стадия, нодалните метастази и клиничния стадий	(111)
miR-145↓	MYCN, FOS, YES, cyclin D2, MAP3K3, MAPK4K4	Засягат се ангиогенезата, клетъчния цикъл и пролиферацията	(112)
miR-196a↑	HOXB8, HOXC8, HOXD8, HOXA7, annexin A1	Ембриогенеза, органогенеза и онкогенеза; Повлиява клетъчната пролиферация, клетъчен растеж и потиска апоптозата посредством annexin A1	(113,114)
miR-1↓	FN1, ANP32B,	Подтиска миграцията и инвазията при Hep-2	(115)

	CCND2, DDX5, E2F5, EIF4E, GAS2L, MAP4K3, MMD2, SOX6	клетъчна линия	
miR-16↑	zyxin	Миграция и адхезия	(116)
miR-19a↑	TIMP2	Пролиферация и апоптоза	(117)
miR-27a↑	PLK2	Пролиферация и инхибиране на късна апоптоза	(118)
miR-106b↑	RUNX3	Пролиферация и инвазия	(119)
miR-129-5p↑	APC, STAT3	Пролиферация, миграция и контрол на клетъчния цикъл	(120,121)
miR-155↑	SOCS1, STAT3	Растеж на Нер-2 клетъчна линия, миграция и инвазия	(122)
miR-1297↑	PTEN	Пролиферация и миграция	(123)
miR-24↓	S100A8	Пролиферация и инвазия	(124)
miR-125a↓	HAX-1	Повишаване на чувствителност към цисплатина in vitro и in vivo	(125)
miR-21-5p↑, miR-34c-5p↓ и let-7a↓	Не се споменава	Съотношението miR-21-5p/let-7a може да допринесе за подобряване на диагностичния потенциал; нивата на let-7a могат да участват в предикцията на нодални метастази и miR-34c-5p може да се използва като биомаркер за изхода от лечение	(126)
miR-34a↓	CCND1	Обратна асоциация с напреднал стадий и нодален статус; свръхекспресията на miR-34a води до потискане на пролиферацията и миграцията	(127)
miR-378↑	Не се споменава	Маркер за диагноза и постоперативен терапевтичен ефект при ПМКЛ	(128)

Съкращения: miR (miRNA; microRNA); let-7a (lethal-7a); ↓ (Понижвана експресия); ↑ (Повишена експресия); c-MYC (c-Myсproto-Oncogene); RAS (Retrovirus-Associated DNA Sequences); BTG2 (B-cell Translocation Gene 2); VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor); MYCN (v-Myс Myelocytomatosis Viral Related Oncogene, Neuroblastoma Derived (avian)); FOS (FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog); YES (v-yes-1 Yamaguchi Sarcoma Viral Oncogene Homolog 1); MAP3K3 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 3); MAPK4K4 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 4); HOXB8 (Homeobox Protein Hox-B8); HOXC8 (Homeobox Protein Hox-C8); HOXA7 (Homeobox Protein Hox-A7); FN1 (Fibronectin-1); ANP32B (Acidic leucine-Rich Nuclear Phosphoprotein 32 Family Member B); CCND2 (Cyclin D2); DDX5 (ATP-dependent RNA Helicase; DEAD Box Protein 5); E2F5 (E2F (Transcription Factor Activating Adenovirus E2 Gene) Transcription Factor 5); EIF4E (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E); GAS2L (Growth Arrest Specific 2 Like 1); SOX6 (Sry-Related HMG box 6); TIMP2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2); PLK2 (Polo-Like Kinase 2); RUNX3 (Runt Related Transcription Factor 3); APC (Adenomatous Polyposis Coli); STAT3 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 3); PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10); S100A8 (S100 Calcium-Binding Protein A8); HAX-1 (HS-1-Associated Protein X-1); CCND1 (Cyclin D1)

Изследователите докладват потенциалните терапевтични възможности на miRNAs при карцином на ларинкса. Например Wang et al. Показва, че miR-1 засяга растежа, миграцията и инвазията посредством негативна регулация на fibronectin 1 (FN1) при Hep-2 клетъчна линия (115). miR-129-5p, който е понижен при първичен ПМКЛ, също има негативен ефект върху клетъчната пролиферация и миграция, като причинява задържане на клетъчния цикъл посредством таргетиране на APC и модулиране на STAT3, като се индуцира апоптоза при Hep-2 клетъчна линия и *in vivo* модели. Повече данни предполагат, че растежа на ПМКЛ при животински модели е значимо потиснат от miR-129-5p антисенс олигонуклеотиди (ASO). Тези резултати ефективно предлагат, че miR-129-5p може да се обсъжда като потенциален таргет при лечение на ПМКЛ (120,121). miR-155 е докладван със значимо повишени експресионни нива при тъканни ларингеални тумори в сравнение с мукозна контролна тъкан. Свръхекспресията на същата miRNA е положително свързана с напреднал туморен стадий и активиране миграцията и инвазията посредством активиране на SOCS1 и STAT3. Междувременно, инхибиране на miR-155 води до потискане растежа, миграцията и инвазията на Hep-2 клетки (122).

Zhang et al. (2011) докладват, че miR-206 е понижена при ПМКЛ и негативно се свързва с прогресията на T, N и клиничния стадий. Авторите откриват че индуциране на повишени нива на miR-206 водят до драматично потискане на пролиферацията и инвазията, като апоптотичните клетъчни нива се повишават (111). Подобно на miR-206, други изследвания показват, че miR-24 се наблюдават с понижени нива на експресия при ПМКЛ и повишаването им посредством трансфекция инхибира формацията на клетъчни колонии, повишава апоптозата и чувствителността към радиотерапия чрез потискането експресията на XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) (129).

Guo et al. (2012) наблюдава подобни резултати от ектопична експресия на miR-24 и инхибиране пролиферацията на клетъчна линия посредством директно прицелване на S100A8 (124). От получените резултати може да се предположи потенциалната роля на miR-24 като терапевтична молекула при рак на ларинкса.

miRNAs които имат отговор към химиотерапия при рак на ларинкса са miR-31-3p, miR-210, miR-1264 и miR-3150b, което ги прави потенциални терапевтични таргети (130). В допълнение, експресията на miR-30b е значимо редуцирана при параракови тъкани в сравнение със злокачествени ларингеални форми, докато свръхекспресията на miR-30b благоприятства p53-зависимата клетъчна апоптоза *in vivo* и *in vitro*, което активира антитуморния ефект на p53 генната терапия при рак на ларинкса (131).

Xiao et al. (2015) открива, че miR-93- член от клъстера miR-106b-25, е значително дерегулиран при ПМКЛ. Други изследвания показват, че miR-93 свръхекспресията повишава клетъчната пролиферация, миграция и инвазия, редуцира апоптотичните нива, индуцира задържането на клетъчния цикъл чрез директно таргетиране на циклин G2 (CCNG2). Изглежда, че ключовата роля на miR-93 е да потиска няколко елемента от клетъчното развитие, което би допринесло за лечението на ПМКЛ (131).

Забелязва се че, експресионните нива на miR-139 са значимо по-ниски при първичен рак на ларинкса в сравнение с метастатичен ларингеален карцином и негативно корелира с експресията на CXCR4 (chemokine receptor 4). Заключение е, че miR-139

потиска клетъчната пролиферация и метастаза при рак на ларинкса посредством потискане функцията на таргетната молекула CXCR4 (132). Друга miRNA с тумор супресорна функция при рак на ларинкса е miR-203, експресията на която е открита с негативна корелация с нивата на ASAP1. В допълнение трансфектирането с miR-203 води до: потискане клетъчната пролиферация и инвазия; активиране на апоптозата, G1 клетъчен арест при Hep-2 клетки *in vitro* чрез потискането на ASAP1. Валидирането на резултатите, които са постигнати при клетъчни култури също се достигат и при животински модели предполагайки, че загубата на miR-203 действа като ключ при развитието на ПМКЛ (118).

Предизвикателството е да се интегрира познанието и използването на комбинацията от miRNAs като биомаркери. Добре установен маркер с диагностичен потенциал при ПМКЛ е съотношението между miR-21 и miR-375, които показват висока чувствителност (94%) и специфичност (94%) (133). Други маркери, идентифицирани с диагностична стойност при начален рак на ларинкс са miR-657 и miR-1287, които са с повишена и понижена експресия съответно. В комбинация те показват висока чувствителност и специфичност при диференциране на ранен рак на ларинкса (134). Откриването на променени плазмени нива на miRNA при ПМКЛ Ayaz et al. (2013) открива за пръв път нивата на miR-331-3p, miR-603, miR-1303, miR-660-5p и miR-212-3p в плазмата на ПМКЛ пациенти, които не се откриват при контролните индивиди. Според авторите те могат да служат като нови неинвазивни биомаркери при диагностицирането на ранен ПМКЛ при пациентите (108).

1.8. Подбор на изследвани нкРНКи

Една от поставените задачи бе да се разшири познанието за процесите на хипоксия и ангиогенеза при ПМКЛ, които са засегнати и дискутирани в предходни изследвания на екипа от ЦММ и Катедра по УНГ Болести, МУ-София. За целта се избраха нкРНКи, които са описани в литературата като свързани с процесите на настъпване на хипоксия и съответно ангиогенеза, но участието им не е лимитирано само до тези два клетъчни пътя.

Подбраните и изследвани нкРНКи в дисертационния труд са следните: miR-21-3p; miR-21-5p; miR-31-3p; miR-31-5p; miR-145-5p; miR-155-5p; miR-196a-5p; miR-210-3p; miR-221-3p; miR-222-3p; miR-424-5p; lncRNA MALAT1 и lncRNA HOTAIR.

1.8.1. Хипоксия и ангиогенеза

Солидните тумори съдържат слабо кръвоснабдени региони, включващи ниска нива на рН, тежка хипоксия и глад за хранителни вещества. Неконтролираната пролиферация на туморните клетки води до повишена необходимост от кислородна консумация, следствие в отделни части на солидните тумори се развива хипоксия в сравнение с обграждащата нормална тъкан. Туморната хипоксия типично корелира с лоша прогноза, частично заради липса на повлияване към терапия, в частност към радиотерапия която убива туморните клетки посредством генериране на реактивни кислородни частици (ROS). Хипоксията стимулира сложна клетъчна сигнална мрежа в раковите клетки,

включително HIF, PI3K, MAPK и NFκB клетъчни пътища, които взаимодействат помежду си, предизвиквайки положителни и отрицателни връзки за обратна връзка и засилвайки или намалявайки хипоксичните ефекти (135) (Фигура 1.14.).

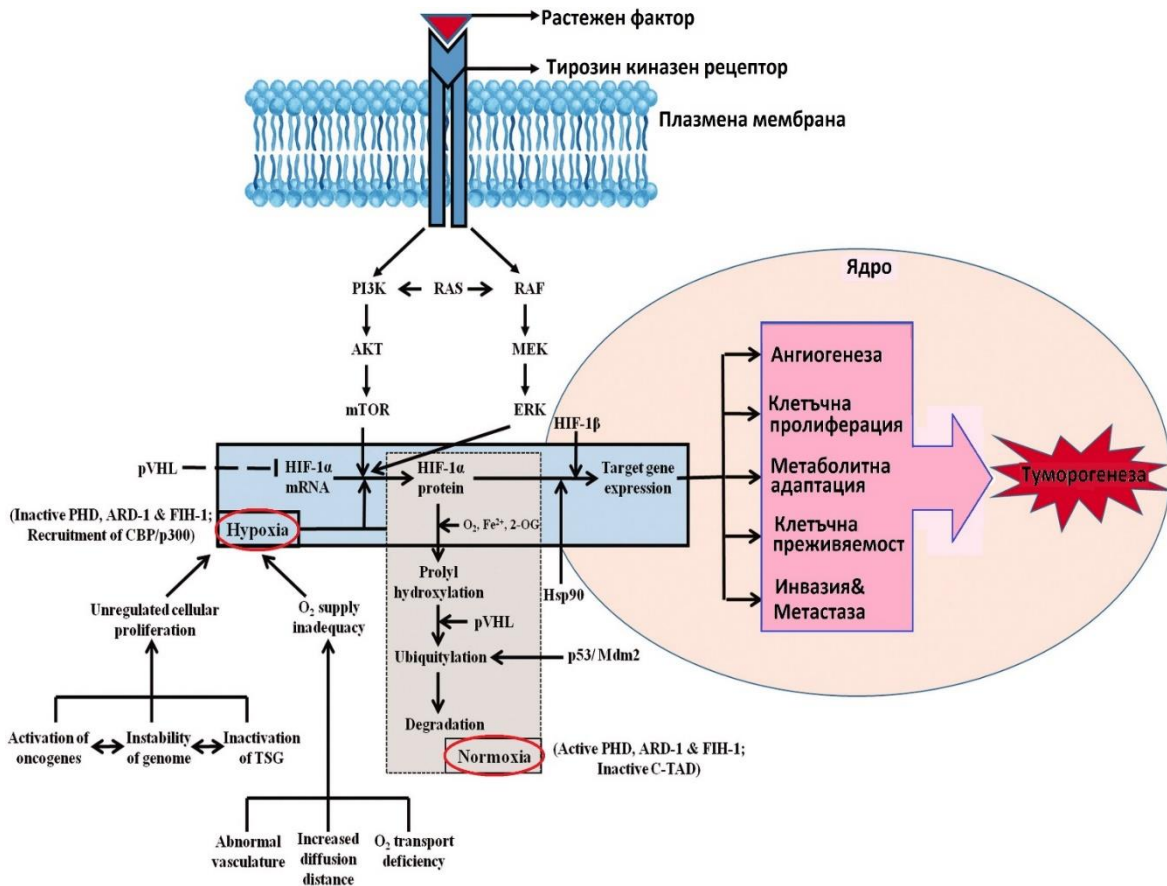
При ларингеален карцином е установено, че хипоксията повлиява клетъчната инвазия и метастаза посредством Епително-Мезенхимна Транзиция (EMT). Хипокси-индуциращия фактор (Hypoxia-inducible factor; HIF) играе важна роля в адаптирането на клетъчния отговор към хипоксия в околната среда (136–139).

Хипокси-индуциращите фактори (HIFs) са хетеродимери, състоящи се от кислород-зависима α-субединица (HIF-α) и кислород-независима β-субединица (HIF-β). HIF-α има три изоформи, HIF-1α, HIF-2α и HIF-3α. Наблюдават се две изоформи на HIF-β, които също се наричат транслокатори: „aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ (ARNT), които се обозначават с HIF-1β и HIF-2β. Сред тези HIFs, с най-важно значение е HIF-1α, отговорен за активирането на транскрипционния отговор към хипоксия. Подобно на HIF-1α, HIF-2α е също включен в регулирането при хипоксия. Въпреки това, тяхната способност да регулират специфични хипокси-отговорни гени, HIF-1α и HIF-2α имат различни функции и само частично се припокриват. Например HIF-2 доминантно регулира складирането на мастни киселини, докато гликолитичните гени доминантно се регулират от HIF-1. HIF-3α действа като даун-регулатор, редуциращ отговора към аноксия посредством инхибиторен посредник на HIF-1α. Следствие от стабилизацията на хипокси-индуциращите транскрипционни фактори, клетката постоянно активира хипоксични сигнални пътища, в резултат на които се задействат генни експресиращи програми, които са отговорни за пълната промяна на глюкозното поемане, клетъчната пролиферация, диференциация, апоптоза, енергиен метаболизъм, еритропоеза и ангиогенеза. Тези физиологични адаптивни отговори са също често наблюдавани при ракови заболявания (128-130).

HIF-1α и HIF-2α стимулират целеви гени, като се свързват към HRE. HIF-1α регулира експресията на гликолитични гени и за предпочитане задвижва апоптотични пътища, докато HIF-2α насърчава растежа на тумора и ангиогенезата (143). Ко-връзката между нивата на HIF-1α и HIF-2α с туморния растеж, ангиогенезата и метастазирането е установено както при животински модели така и при клинични изследвания. Установено е, че HIF-1α има важна роля при началния отговор (2-24ч) към тежка хипоксия (<0.1% O₂), докато HIF-2α се повлиява при хронична хипоксия (48-72ч). HIF-3α изоформата се включва при продължителна хипоксия и има възможност да регулира способността за свързване на HIF-1 към ДНК (143).

Също така има доказателства, че HIF активността може да бъде индуцирана по кислород-независим начин, като активиране на сигналните пътища на митоген-активираната белтъчна киназа (MAPK) и фосфоинозитол-3 фосфатна киназа (PI3K). Също така HIF активността се повишава посредством PI3K/Akt пътя чрез задействане на положителните регулатори като Ras и тирозин киназни рецептори или инактивиране на негативни регулатори като PTEN и TSC. PI3K сигналния път може да регулира HIF активността по mTOR зависим и независим механизъм. Всичко взето заедно води до

заклучението, че активирането на HIF е сложен процес и включва различни тумор супресорни и онкогени по време на туморната прогресия (142).



Фигура 1.14. HIF-1 сигнална каскада. Синтеза и етапи на експресия на HIF-1 α посредством каскада включваща серия от растежни фактори и сигнални събития. Най-големите разлики между хипоксичната и нормоксичната сигнализация и последователността на събитията са показани на фигурата. При нормоксия HIF-1 α белтъчната структура се деградира, докато при хипоксия HIF-1 α участва в регулирането и експресията на таргетни гени. Тази последователност от събития води до туморогенеза.

Ангиогенезата е критична при процесите на формиране на солидните тумори и прогресията поради неадекватно предоставяне на кислород и хранителни вещества в туморните клетки. Стимулацията на неоангиогенезата е необходима за туморния растеж. Възможността на туморните клетки включва множество стъпки, наименувани „ангиогенно превключване“, феномен който възниква когато баланса на про-ангиогенни фактори превишават анти-ангиогенните фактори. HIF може да индуцира експресията на голям брой про-ангиогенни фактори, включително VEGF, рецепторите FLT-1 и FLK-1, PDGF-B, PAI-1, TIE-2, MMP-2 и MMP-9, както и ангиопоетините ANG-1 и ANG -2. Сред всички

тези про-ангиогенни фактори активирани от HIF, VEGF-A е най-значим и силно експресиран при редица ракови заболявания (144,145).

При физиологичната и патофизиологичната ангиогенеза, HIF-1 α сигналния път е установен като главен регулатор на формирането на васкуларната система чрез регулиране на проангиогени фактори като VEGF. Освен HIF-1 α , за HIF-2 α също е установено, че има отношение към туморната ангиогенеза. Skuli et al. (2009) докладват, че ендотелни клетки дефицитни по HIF-2 α могат да понижат васкуларната формация и туморната ангиогенеза (146). Raval et al. (2005), публикуват че експресията на VEGF е положително регулирана от HIF-2 α при VHL-дефицитни бъбречни клетъчни линии (147). В допълнение, Geis et al. (2015), показват че HIF-2 α промотира ангиогенезата при HepG2 клетки посредством повишаване на PAI-1, който инхибира концентрацията на активен плазмин (148). Тези данни предполагат че освен HIF-1 α , HIF-2 α също допринася за туморната ангиогенеза.

1.8.2. Некодиращи РНКи повлияни от хипоксията

Под влияние на хипоксия е установено, че се променя и профила на редица miRNAs, които често се наричат и хипокси-miRNAs. Също така се докладват miRNAs, които променят експресията на HIFs.

На следващата Таблица 1.6. са представени miRNAs, които модулират експресията на HIF или самите HIF въздействат на експресията на редица miRNAs като miR-210 (149), miR-146a (150), miR-145 (151), miR-382 (152), miR-191 (153), miR-363 (154), miR-421 (155) при туморни клетки, miR-204 при невронни клетки (156), miR-30a и miR-21 при кардиомиоцити (157,158), miR-687 при ембрионални бъбречни клетки (159), miR-155 при интерстинални епителни клетки (160), miR-429 (161) и miR-19a при ендотелни клетки. Трябва да се акцентира на това, че сред miRNAs, които са докладвани че директно таргетират HIF mRNA при ракови клетки, няколко могат да бъдат класифицирани като хипокси miRNAs и са валидирани в нормални ендотелни клетки.

Таблица 1.6. miRNAs, които са директно или индиректно повлияни от HIF.

miRNA	Клетъчен тип	Влияние на хипоксията върху експресията на miRNA	miRNA таргети (директни или индиректни*)	Засегнати процеси	Референция
miR-18a	Ендотелни клетки	Повишена експресия	HIF1A	Пролиферация, миграция	(162)
miR-107	Ендотелни прогениторни клетки—EPCs	Повишена експресия	ARNT	Диференциация	(163)
miR-135b	HUVECs	Повишена експресия	HIF1AN HIF1A*	Ангиогенеза	(164)

miR-155	Миши кожни ендотелни клетки и HUVECs	Повишена експресия	HIF1A	Ангиогенеза, хипоксия	(160)
miR-199a	Ендометриални стромални клетки; Ендотелни EA.hy926 клетки	Не се докладва	HIF1A	Ангиогенеза	(165)
miR-200b	HMVECs	Понижена експресия	ETS1	Ангиогенеза, хипоксия	(161,166)
	HUVECs	Повишена експресия	KLF2		
miR-210	HUVECs	Повишена експресия	EFNA3	Ангиогенеза, хипоксия	(167–169)
			HIF3A		
miR-424	HUVECs, hMVECs, hBOECs и hMBECs	Повишена експресия	CUL2 HIF1A*	Ангиогенеза	(170)
miR-429	HUVECs	Повишена експресия	HIF1A	Хипоксия	(161,171)
			HIF3A		
miR-433	HUVECs	Понижена експресия	HIF1A	Пролиферация и миграция	(172)

miRNAs, които са доказани че директно се свързват към HIF мРНК са маркирни с **болд**, докато индиректно свързаните миРНКи са маркирани с “*”

Съкращения: ARNT aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, CUL2 cullin-2, EFNA3 ephrin A3, EGLN1 prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 (PHD2), ETS1 ETS Proto-Oncogene 1, Transcription Factor, HIF1A hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF1AN hypoxia-inducible factor 1-alpha inhibitor, HIF3A hypoxia-inducible factor 3 alpha, KLF2 Kruppel-like factor 2

През последните години, независими проучвания демонстрираха експресията на lncRNA, които се повлияват и модулират от хипоксията (173,174), като тези молекули също са познати и като хипокси-отговарящи lncRNAs. Тези РНК молекули са включени в многостъпалните процеси на туморогенезата по време на хипоксичния отговор, но детайлен механизъм с който участват все още не е напълно изучен. На следващата Таблица 1.7. са представени част от хипокси-регулираните дълги нкРНК.

Таблица 1.7. lncRNAs повлияни от хипоксия

lncRNA	Експресия под хипоксия	HIF зависимост	Референция
HIF - независима регулация			

ATG9B (некодираща изоформа)	Повишена	HIF независима	(175)
HIF - директно зависима транскрипционна регулация			
HOTAIR	Повишена	HIF-1 α зависима	(176)
H19	Повишена	HIF-1 α зависима	(177)
UCA1	Повишена	HIF-1 α зависима	(178)
NUTF2P3-001	Повишена	HIF-1 α зависима	(179)
EFNA3	Повишена	HIF-1 α зависима	(180)
HINCUT-1 (uc.475)	Повишена	HIF-1 α зависима	(181)
ANRIL	Повишена	HIF-1 α зависима	(182)
GAPLINC	Повишена	HIF-1 α зависима	(183)
lincRNA-p21	Повишена	HIF-1 α зависима	(184)
aHIF	Повишена	HIF-1 α и/или HIF2 α зависима	(185)
MALAT1	Повишена	HIF-2 α зависима	(186)
NEAT1	Повишена	HIF-2 α зависима	(187)
lncRNA-SARCC	VHL-зависима	HIF-2 α зависима	(188)
HIF-медирана индиректна епигенетична регулация			
WT1-AS	Повишена (недиректно: ДНК деметилиране)	HIF-1 зависима	(189)
lncRNA-LET	Понижена (недиректно: хистоново деацетиране)	HIF-1 зависима	(190)
Неопределена хипокси-индуцирана регулация			
LncHIFCAR (MIR31HG)	Повишена	HIF-1 α зависима	(191)
linc-ROR	Повишена	Неопределен	(192)
lncRNA-AK058003	Повишена	Неопределен	(193)
NBR2	Повишена	Неопределен	(194)
lncRNA-AK123072	Повишена	Неопределен	(195)
PVT1	Повишена	Неопределен	(196)
ENST00000480739	Понижена	Неопределен	(197)

В екзозоми, произлезли от човешки хипоксични клетки от орален плоскоклетъчен карцином повишават миграцията и инвазията на ОППК по HIF-1 α - и HIF-2 α -зависим маниер и съдържат високи количества на miR-21. Положителна обратна връзка между miR-21 и активността HIF-1 α също се докладва при човешки кардиомиоцити, където хипоксията индуцира експресията на miR-21. HIF-1 α транскрипционно повишава промоторната активност на miR-21, и miR-21 стимулира експресията на HIF-1 α , като се модулира PTEN/Akt сигналния път. miR-21 присъствайки в екзозомите предполага че miR-21 може да участва в активацията на хипоксичния отговор между клетките посредством HIF-1 сигнализирането (198).

Ектопична експресия на miR-31 повишава онкогенния потенциал на КГШ при нормоксични условия. Обратно, блокирането на miR-31 експресия намалява растежа на животински моделни обекти. *In silico* анализи предполагат, че miR-31 може да таргетира 3'UTR на фактор-индуциращ хипоксията (FIH), регулатор на HIF при нормоксични условия. Повишена експресия на miR-31 корелира с намалени нива на FIH в туморни тъкани (199).

Функционално свързващото място на miR-145 при 3'-UTR на EPAS1 е потвърдено при невробластомни клетки. Свърхекспресията или потискането на miR-145 повлиява HIF2 α , както на транскрипционно ниво, така и на белтъчно ниво и последващите засегнати гени при нормоксия (200).

miR-155 е с повишена регулации в хипоксична среда при човешки епителни клетки от аденокарцином на колона (Caco2) и човешки ендотелни клетки. Повлиява директно посредством свързването към HIF1 α mRNA, като по този начин се понижава транскрипционната активност на и белтъчните нива на HIF1 α . Ролята на HIF1 α в индуцирането на miR-155 е също наблюдавано. По този начин miR-155 води до специфична негативна връзка относно активността на HIF-1 α при продължителна хипоксия, като се установява че miR-155 заема важна част от HIF превключването (160,201).

miR-196a се свързва с клетъчната пролиферация, туморния растеж, потискането на апоптозата. Високи нива на miR-196a активират АКТ сигналния път и водят до отделяне на ракови клетки, тяхната миграция и инвазия. Проучванията показват, че miR-196a участва също и в диференциацията на мезенхимни стволови клетки. В проучването на Pin et al. (2012) се установява, че има активно участие и при ангиогенезата посредством VEGFA (113,202).

miR-210 е най-значимо индуциране miRNA по време на хипоксия. Също така е уникална с това, че се наблюдава при почти всички клетъчни линии. Експресията на тази miRNA се регулира от HIF-1 α и HIF-2 α . Свърхекспресията на miR-210 при HUVEC клетъчна линия повишава VEGFA и VEGFR2 като по този начин се задейства ангиогенезата. Допълнително, изследванията при човешки кардиомиоцити и чернодробни ракови клетки потвърждават, че miR-210 директно прицелва HIF3 α и потиска белтъчната продукция на HIF3 α . Също така, miR-210 подпомага при HIF превключването между HIF-1/HIF-2 и HIF-3. По време на остра хипоксия, нивата на miR-210 се увеличават от HIF-

1/HIF-2, за да предпазят натрупването HIF3, докато при хронична хипоксия нивата на HIF-1/HIF-2 са занижени, което води до активиране на HIF-3 сигналния път (167,203–205).

miRNAs - miR-221 и miR-222 са чувствителни регулатори на ендотелната тъкан и могат да дадат възможност за идентифициране на нови биомаркери и терапевтични таргети. Ролята на miR-221 и miR-222 при ангиогенезата е интензивно изучавана през последните години. Клъстерът се експресира при съдови гладки мускулни клетки и ендотелни клетки, но изявяват биологична специфичност при участието им в клетъчните процеси. Докато miR-221 и miR-222 имат анти-пролиферативни, анти-миграционни и про-апоптотични ефекти при ендотелните клетки, те показват про-пролиферативни и про-миграционни и анти-апоптотични ефекти при съдови гладки мускулни клетки.

Формирането на нови кръвоносни съдове, посредством ендотелна пролиферация е важен физиологичен процес за туморния растеж. miR-221 и miR-222 могат да се включат като потенциални биомаркери с терапевтична стойност при подтискането на ангиогенезата (206,207).

Друг елегантен miRNA-зависим механизъм, свързан с положителна HIF-1 α стабилност при човешки ендотелни клетки (вкл. HUVECs и hMVECs) по време на хипоксия се осъществява чрез miR-424. Тази miRNA е с променено повишена експресия при ендотелни клетки подложени на хипоксия като негов таргет е cullin 2 (CUL2), който е критичен при образуването на убиквитин-лигазен комплекс и това води до стабилизиране на HIF1 α (170,172).

MALAT1 (Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) е дълга некодираща РНК, която е с повишена експресия при редица ракови заболявания, участваща в клетъчния растеж и метастазирането. Под състояние на хипоксия се наблюдават повишени нива на MALAT1, като HIFs са установени върху активирането на промотора на MALAT1 при клетъчни култури, но молекулните механизми свързани с хипокси-повлияната MALAT1 остават недоизяснени (208).

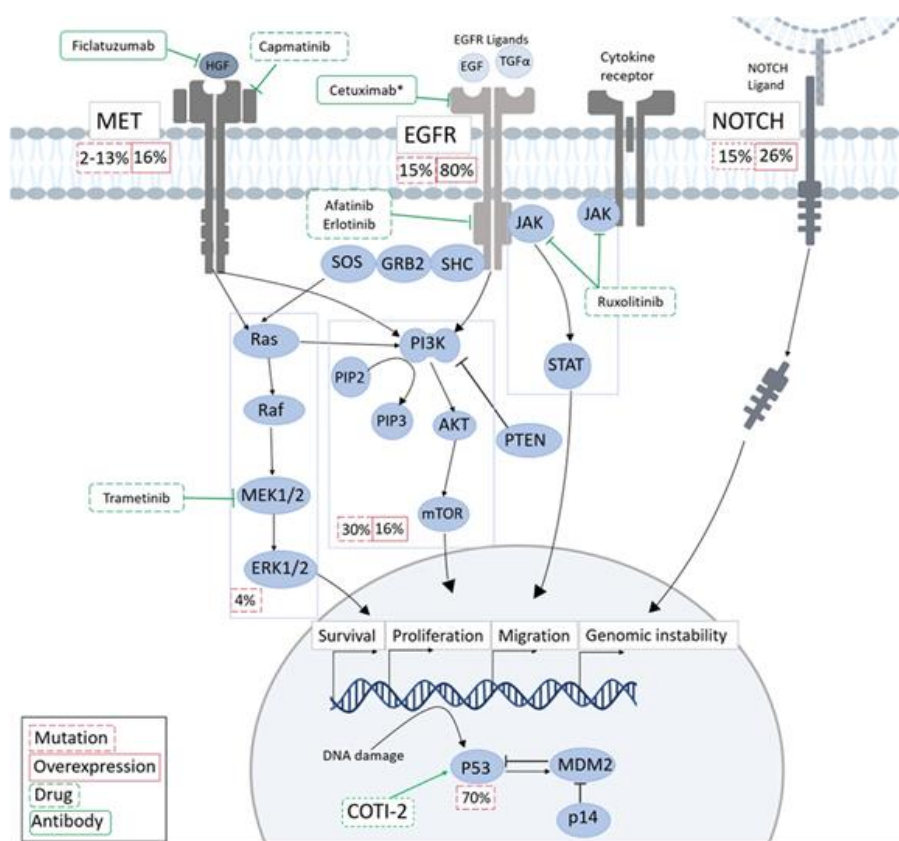
Дългата некодираща РНК HOTAIR е свръхекспресирана при много ракови заболявания, като се свързва с туморните метастази и растежа. Загубата на HOTAIR се свързва с намаляване на раковата инвазивност. HOTAIR регулира експресията на много гени, които се включват хомеобокс гените (като HOXD10, HOXD8), PCDHGA8 (protocadherin gamma subfamily A-8,) PCDHNB5 и др. Свръхекспресията на HOTAIR води до активна клетъчна пролиферация. Установено е, че HIFs имат роля на транскрипционни фактори при експресията на HOTAIR (209).

1.9. Генетични промени при рак на ларинкса

През 90-те години предраковите промени са проучени подробно с генетични маркери като се докладва, че броят на генетичните промени корелира с тежестта на диспластичните промени. Това довежда до формирането на първия модел на генетична прогресия на КГШ. Загубата на хетерозиготност при хромозоми 3p, 9p и 17p се проявява при дисплазия, очевидно отразяващи ранните промени в канцерогенезата, докато промените в рамената на хромозомите 11q, 4q и 8p обикновено са предшествващи при

карциноми, които отразяват сравнително късните фази в канцерогенезата (210). Проучвания идентифицират, че генетичните промени в рамената на хромозома 3p и 9p се асоциират заедно с мутациите в TP53 гена (17p), които са добри маркери за злокачествена трансформация (211).

КГШ често се характеризират с генетична хетерогенност, която се свързва с мутации водещи до загуба на функции на туморно-супресорни гени като p53 и p16INK4a и активиране на онкогени, като например рецептора на епидермалния фактор на растеж (EGFR) и PIK3CA. Към момента единствената таргетна терапия одобрена както за ЧПВ-позитивни, така и за отрицателни подтипове, одобрена от FDA е Cetuximab, моноклонално антитяло (mAb), насочен към EGFR. Терапията с Cetuximab или други терапии, конструирани да прицелват EGFR имат лимитирана ефективност (212).



Фигура 1.15. Промените в EGFR, MET и NOTCH насърчават пролиферацията, миграцията и клетъчната преживяемост чрез сигнализиране по пътищата RAS/RAF/ERK, PI3K и JAK/STAT, като всички те се регулират често при ПКГШ. Засягането на пътя на p53 също води до високи нива на геномна нестабилност. Маркираните в зелен цвят правоъгълници показват терапевтични възможности, като одобрените са маркирани с * или подложени на изследване за клинична употреба при ПКГШ. Процента на случаите на ПКГШ, показващи мутации, или свръхекспресия на засегнатите медиатори са показани в червени правоъгълници. Активирането на пътя JAK/STAT се наблюдава често при ПКГШ (213–215).

1.9.1. TP53/RB сигнален път

TP53 е тумор супресорен ген, който има роля в поддържането на геномната стабилност, клетъчния цикъл, ДНК репарацията, апоптозата и стареенето. Над 80% от ЧПВ-отрицателните ПКГШ имат p53 мутации, което води до загуба на функция. Мутациите в TP53 се появяват рано в канцерогенезата и са свързани с лоша обща преживяемост, резистентност към терапия и чести случаи на рецидиви. В отговор на увреждането на ДНК, p53 се регулира по MDM2-зависим начин и се активира от CHK1 и CHK2, което води до спиране на клетъчния цикъл и апоптоза.

Ретинобластомният туморсупресорен ген (RB) регулира прогресията на клетъчния цикъл в рестрикционната точка между ранна и късна G1 фаза. Мутации в RB също се свързват с ранни етапи на канцерогенеза при КГШ. Мутациите на p53 и RB водят до постоянни сигнали за пролиферация, което довежда до малигнизирание на клетките.

Разработени са няколко стратегии за насочени към p53 терапии, като използване на малки молекули за възстановяване на функцията на TP53 или нарушаване на инактивирането на див тип p53. Но не са достигнали до ефективност при провеждане на клинични проучвания. COTI-2 е трето поколение серосемикарбазон, който е с висока ефективност и ниска токсичност при реактивиране на мутантен p53 в див тип. В клинично изпитване (NCT02433626) скоро ще се тества ефикасността на COTI-2 при КГШ (216–222).

1.9.2. NOTCH сигнален път

Данните от геномния анализ от 2015 г. от раковия геномен атлас (TCGA) показва инактивиращи мутации в NOTCH1-3, които присъстват в 17% от ЧПВ-позитивните и 26% от ЧПВ-отрицателните КГШ. Тези аберации се срещат предимно в NOTCH1 и най-често включват мутации във функционални региони, водещи до скъсяване на белтъчния продукт, което се свързва с лоша прогноза. NOTCH сигналния път допринася за поддържане на ракови стволови клетки свързани, което води до рецидиви и метастази. Загубата на NOTCH сигнализация насочва туморогенезата при КГШ чрез регулиране на $\Delta Np63$, но точните механизми на регулацията на Notch- $\Delta Np63$ все още не са изяснени напълно. NOTCH сигнализацията при кератиноцитите може да бъде нарушена от експресията на $\Delta Np63$, което предполага реципрочен процес между NOTCH и p63 в епидермиса. Интересно е, че авторите коментират възникването на мутации засягащи NOTCH при различните подтипове на КГШ. Поради тази причина разработването на инхибитори или активатори трябва да бъдат внимателно подбирани за отделните подтипове (222–226).

1.9.3. PI3K/Akt/mTOR сигнален път

PI3K/Akt/mTOR сигналният път е един от най - често дерегулираните при КГШ. При КГШ, PI3KCA генът се открива с мутация при около 16% от случаите. PI3Ks са клас ензими, които са от особено значение при клетъчния растеж, диференциация и оцеляване, активирани от тирозин киназни рецептори като EGFR. Други молекули участващи в сигналния път включват mTOR комплексите (mTORC1 и mTORC2) и Akt. mTORC2 е от

съществено значение за фосфорилирането на Akt и активирането на други сигнални молекули на PI3K сигнализацията, включително и SGK146.

Окуражаващи резултати показват клинични изпитвания включващи рапамицин, еверолимус и темсиrolимус. Появата на резистентност към mTOR инхибитори се наблюдава при КГШ, но механизмите които участват в тази резистентност все още са обект на изследвания. Установена е обратна връзка между сигнализирането на Akt и ERK/MAPK чрез инхибиране на mTOR, което действа като механизъм за оцеляване на туморни клетки. Авторите предлагат съвместно таргетиране на mTOR и EGFR, като по този начин се потиска активирането на сигнализацията с участието на Akt и ERK (227–230).

1.9.4. EGFR сигнален път

Рецепторът за епидермален растежен фактор (EGFR, HER1 или ErbB1) принадлежи към семейството HER/ErbB на рецепторни тирозинкинази (RTKs), което също включва HER2-4. EGFR е свръхекспресирен в 80–90% от случаите на КГШ и корелира с лоша прогноза и резултати от лечение. EGFR сигнализацията е многостъпален процес, в който се включват много отделни молекули, припокриващи се с други пътища. По този начин потенциалът за терапевтично насочване към EGFR сигнализацията е огромен.

EGFR е трансмембранен рецептор с активност на тирозин киназа. Свързването на лиганда задейства хомо- или хетеро-димеризация с други членове на HER и последващо фосфорилиране на тирозинови остатъци, активиране на сигнални каскади надолу по веригата. Тези пътища контролират пролиферацията, диференциацията, преживяемостта, ангиогенезата, инвазията и метастазите при рак. EGFR може също да се премести в ядрото, където може да функционира като транскрипционен фактор. Установено е, че тази транслокация е предизвикана от йонизиращо лъчение, което води до резистентност към лъчетерапия. Показано е също така, че EGFR взаимодейства с други рецептори, като Ax1, повишавайки онкогенен потенциал.

Инхибирането на EGFR може да бъде постигнато чрез блокиране на лиганд-свързващия домейн с използване на моноклонални антитела (mAbs), или чрез инхибиране на активността на тирозинкиназния домейн с използване на инхибитори на тирозин киназа с малки молекули (TKIs). Цетуксимаб, химерно моноклонално антитяло с висока специфичност и афинитет към EGFR, остава единствената одобрена таргетна терапия за КГШ в комбинация с радио- и химиотерапия. Въпреки високите проценти на свръхекспресия на EGFR, цетуксимаб показва ограничена ефикасност при КГШ. Това може да се дължи на засягане на други членове от HER семейството и техните лиганди или активиране на други сигнални компоненти надолу по веригата.

Механизмите зад присъщата и придобита резистентност към цетуксимаб остават нерешени. Разработени са няколко нови таргетни терапии, насочени към EGFR или неговите сигнални партньори. Досега те показват само малки подобрения в оцеляването без прогресия (PFS) и нито едно не е одобрено за лечение в ПККГШ (231–234).

1.9.5. MET сигнален път

Един предложен механизъм за резистентност към насочени към EGFR терапия е регулирането или активирането на други RTKs, като с-MET. с-MET повлиява ЕМТ, който е свързан с повишена миграция, инвазия и метастаза при ракови заболявания. Съобщава се, че мутациите в с-MET са редки при ПКГШ (2–13%), докато увеличаване броя на копия на MET или свръхекспресията са често срещана при ПКГШ. Ролята на HGF/с-MET в инвазията и метастазата при ПКГШ са изследвани в много проучвания. Установено е, че с-MET е свръхекспресиран при метастази в лимфните възли, като това се свързва с по-лоша прогноза и по-ниска обща преживяемост.

EGFR и с-MET споделят общи сигнални пътища, включващи RAS-RAF-MAPK и PI3K-AKT-mTOR, което представлява възможен терапевтичен подход при ПКГШ. Проучванията за инхибирането на EGFR и с-MET показват обещаваща антитуморна активност при комбинирано лечение. Съсредоточаването върху двата рецептора демонстрира способност за повишена чувствителност на клетките към EGFR таргетна терапия. Капматиниб (INC-280) е с-MET инхибитор с антитуморна активност при миши модели. Извършена е фаза I на клинично изпитване за оценка на безопасността на капматиниб при напреднали солидни тумори (NCT01324479), като се очакват резултати. Фиклатузумаб, mAb, който е насочен към с-MET ос, също се тества в клинични изпитвания в комбинация с цетуксимаб при рекурентни или метастатични ПКГШ (NCT02277197). Обещаващи резултати от предклиничните модели на ПКГШ показват инхибиране на пролиферацията, миграцията, инвазията и ЕМТ (235–237).

1.9.6. JAK/STAT сигнален път

При КГШ се докладва промяна в регулацията на STAT като се смята, че повишената експресия на STAT3 и неговите таргетни молекули допринасят за развитието на злокачествено заболяване, резистентност към радио-, химио- и EGFR таргетна терапии.

Сигналния път с участието на STAT3 се счита за имunosупресивна и може да предпази раковите клетки от разпознаване и деградирането им чрез Т-лимфоцити, което се постига чрез задействане на производството на цитокини, включително IL-6, IL-10, VEGF и TGF- β . STAT3 се активира в отговор на IL-6 цитокинови рецепторни семейства, тирозин киназни рецептори като EGFR, VEGFR, JAK и Src кинази (SFK). След активиране, STAT3 насърчава експресията на целеви гени като циклин D1 и Bcl-xL.

Клиничното изпитване, което понастоящем е във фазата на наемане, има за цел да изпита ефикасността на Ruxolitinib (JAK инхибитор) при КГШ (NCT03153982). AZD9150, синтетична антисенс олигонуклеотидна молекула, насочена към STAT3 чрез инхибиране на транслацията, демонстрира антитуморна активност в животински модели. В момента се тества в клинични проучвания на метастатични случаи на ПКГШ като монотерапия или комбинирана с MED14736, имунотерапия, блокираща взаимодействието на PD-1 и PD-L1 (NCT02499328) (238–241).

1.9.7. RAS/RAF/MAPK сигнален път

Пътят на активирана с митоген протеин киназа (МАРК) регулира експресията на протеини, участващи в клетъчната пролиферация, диференциация, апоптоза, ангиогенеза, инвазия и метастази. Той се състои от четири под-пътя, от които пътеката Erk1/2 е получила най-много внимание при КГШ. При свързване на факторите на растеж (като EGF), сигнална каскада води до активиран Erk1/2, който се разделя от комплекса Ras-Raf-MEK-ERK1/2 и фосфорилира редица цитоскелетни протеини, кинази и транскрипционни фактори, включително NF- κ B, AP-1, ETS-1 и c-Myc. Мутациите в МАРК пътя са били замесени в други видове рак, но при КГШ мутациите представляват само 4% от случаите. MEK инхибиторите, като Trametinib, понастоящем са одобрени за лечение на меланом и се изследват в клинични изпитвания за ПККГШ (242–244).

ЧАСТ 2

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ

- ✓ Изследване ролята на подбрани нкРНК и соматични мутации в гени свързани с процесите на онкогенеза при рак на ларинкса и идентифициране на най-подходящи неинвазивни диагностични и прогностични биомаркери.

2.2. ЗАДАЧИ

1. Подбор на пациенти с ПМКЛ и неонкологично болни контроли съответстващи по пол и възраст;
2. Събиране на съответните биологични материали и разширение на създадената тъканна и плазмена ларингеална биобанка към Център по Молекулна Медицина, МУ-София;
3. Изолиране на ДНК/РНК от включените биологични материали;
4. Провеждане на експресионен анализ на miR-21-3p, miR-21-5p, miR-31-3p, miR-31-5p, miR-145-5p, miR-196a-5p, miR-210-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-424-5p, lncRNA HOTAIR и lncRNA MALAT1 чрез PCR в реално време, SybrGreen технологията;
5. Сравнение на експресионните нива на нкРНКи спрямо наличните клиникопатологични характеристики на пациентите;
6. Корелация между експресионните нива на нкРНКи и предходно изследваните мРНКи;
7. Провеждане на таргетно секвениране на соматични мутации в онкопанел;
8. Статистически и биоинформатичен анализ на получените резултати.

ЧАСТ 3

МАТЕРИАЛИ

И

МЕТОДИ

3.1. Пациенти и контроли

Включените пациенти, диагностицирани с рак на ларинкса, в настоящия дисертационен труд са набрани в периода 2012 - 2016 от Клиника по УНГ болести, Университетска Многопрофилна Болница за Активно Лечение „Царица Йоанна – ИСУЛ”, Медицински Университет – София и насочени към Център по Молекулна Медицина (ЦММ), Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Факултет, Медицински Университет – София. Включените здрави, неонкологично болни доброволци (контролна група), бяха набрани в периода 2015 – 2016 от Клиника по УНГ болести, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ” и ЦММ, МУ-София. На всички включени участници (пациенти и доброволци) им беше предоставена информация съответно за пациента или за контролна група, както и участието им бе потвърдено чрез подписване на информирано съгласие.

Изследванията, включени в дисертационния труд бяха осъществени благодарение на спечелени проекти към МУ-София в следния ред: проект №312/15.01.2015 (договор №15-Д/2015); проект №552/21.01.2016 (договор №12-Д); проект №550/21.01.2016 (договор №30) и проект №8553/12.12.2016 (договор №Д-137).

Изследването на включените пациенти в проучването беше одобрено от Съвет по Медицинска Наука към Медицински Университет – София, с протоколи №13/23.04.2015; №8/22.04.2016; №411/2016; №432/2017 и №435/2017.

3.1.1. Биологичен материал от пациенти, диагностицирани с рак на ларинкса

В дисертационния труд са включени 82 (осемдесет и двама) пациента, преминали през Клиника УНГ болести, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ”, МУ-София, диагностицирани с плоскоклетъчен рак на ларинкса. По време на оперативната интервенция се отделяше от всеки пациент, материал от туморната маса и здрава ларингеална тъкан, които до 15 минути бяха поставени в криоепруветки, след което се съхраняваха в контейнер с течен азот (-196°C). Така отделените проби в максимално кратки срокове се транспортираха до ЦММ, МУ-София, където се съхраняват във фризер Thermo Fisher Scientific (Масачузетс, САЩ) на -80°C за по-дълъг период от време. Допълнително се отделяше материал от туморната част за имунохистологично изследване.

В допълнение към включения тъканен материал, за целите на проучването, беше набран и включен плазмен материал от 22 пациента с авансирал плоскоклетъчен рак на ларинкса. За целта, преди пристъпване към оперативна интервенция, беше взето малко количество кръв (6-7мл) в BD Vacutainer® (BD Life Sciences, САЩ) епруветки, с коагулант К3ЕДТА (етилен диамин тетраацетат), като в рамките до 1 час беше центрофугирана на 2000rpm/15мин на стайна температура на центрофуга Centifuge 5810R (Eppendorf, Виена, Австрия). Отделената плазма се съхранява във фризер Thermo Fisher Scientific (Масачузетс, САЩ) на -80°C за по-дълъг период от време.

На Таблица 3.1. и Таблица 3.2. е представено групирането на пациентите по клиникопатологични характеристики, съответно на тези включени в изследването с тъканен материал и плазмен материал. Нито един от пациентите с рак на ларинкса не бе преминал през химио- и/или лъчелечение преди хирургичната намеса.

Таблица 3.1. Клиникопатологични характеристики на пациентите, включени с тъканен материал в дисертационния труд.

Клиникопатологични характеристика	Брой пациенти (%)
Пол	
Жена	4 (7.88)
Мъж	78 (95.12)
Възраст	
≤ 60	49 (59.76)
> 60	33 (40.24)
Туморен стадий	
T1	3 (3.65)
T2	8 (9.75)
T3	28 (34.15)
T4	43 (52.45)
Нодален стадий	
N0	56 (68.29)
N1	6 (7.32)
N2	18 (21.95)
N3	2 (2.44)
Диференциация на тумора	
G1	31 (37.80)
G2	40 (48.78)
G3	11 (13.41)
Локализация на тумора	
Глотис	43 (55.44)
Супраглотис	30 (36.58)
Субглотис	9 (10.98)
Фамилна история	
Отричат	54 (65.85)
Докладват	19 (23.18)
Липсват данни	9 (10.97)
Употреба на тютюн	
Отричат	4 (4.87)
≤20 (1 кутия) дневно	26 (31.70)
Между 21 и 40 (от 1 до 2 кутии) дневно	30 (36.58)
≥41 (над 2 кутии) дневно	13 (15.85)
Липсват данни	9 (10.97)
Консумация на алкохол	

Отричат	13 (15.85)
До 100 мл дневно	20 (24.39)
От 100 до 200 мл дневно	19 (23.17)
Над 200 мл дневно	17 (20.73)
Липсват данни	13 (15.85)
Вредна работна среда	
Отричат	33 (40.24)
Докладват	36 (43.90)
Липсват данни	13 (15.86)

Таблица 3.2. Клиникопатологични характеристики на пациентите, включени с плазмен материал в дисертационния труд.

Клиникопатологични характеристики	Брой пациенти (%)
Пол	
Жена	3 (13.64)
Мъж	19 (86.36)
Възраст	
≤ 60	11 (50.00)
> 60	11 (50.00)
Туморен стадий	
T3	11 (50.00)
T4	11 (50.00)
Нодален стадий	
N0	10 (45.45)
N1-3	12 (54.55)
Диференциация на тумора	
G1	7 (31.82)
G2	11 (50.00)
G3	4 (18.18)
Локализация на тумора	
Глотис	11 (50.00)
Супраглотис	11 (50.00)
Фамилна история	
Отричат	16 (72.73)
Докладват	6 (27.27)
Употреба на тютюн	
Отричат	4 (18.18)
≤20 (1 кутия) дневно	7 (31.82)

Между 21 и 40 (от 1 до 2 кутии) дневно	11 (50.00)
Консумация на алкохол	
Отричат	6 (27.27)
До 100 мл дневно	6 (27.27)
Над 100 мл дневно	10 (45.45)
Вредна работна среда	
Отричат	8 (36.37)
Докладват	14 (63.63)

3.1.2. Набиране на биологичен материал за създаване на контролна група

За целите на дисертационния труд бе необходимо да се набере контролна група, която съставлява здрави, неонкологично болни доброволци. На всички доброволци им бе предоставено информация за участие и информирано съгласие, с което те регламентираха участието в изследването. С цел отделяне на плазма, от всеки доброволец бе взето малко количество кръв (6-7мл) в BD Vacutainer® (САЩ) епруветки, с коагулант К3ЕДТА (етилен диамин тетраацетат), като в рамките до 1 час беше центрофугирана на 2000 rpm/15 мин на стайна температура на центрофуга Centifuge 5810R (Eppendorf, Виена, Австрия). На Таблица 3.3. са представени клиничните характеристики на контролната група.

Таблица 3.3. Клинични характеристики на контролната група.

Клинична характеристика	Брой (%)
Пол	
Жена	4 (19.04)
Мъж	17 (80.96)
Възраст	
≤60	16 (76.19)
>60	5 (23.81)
Употреба на тютюн	
Отричат	4 (19.04)
≤20 (1 кутия) дневно	5 (23.81)
21 и 40 (от 1 до 2 кутии) дневно	12 (57.14)
Консумация на алкохол	
Отричат	3 (14.28)
до 100 мл дневно	10 (47.62)
над 100 мл дневно	8 (38.10)
Заболявания към момента на взимане на кръв	
Отричат	15 (71.43)
Докладват	6 (28.57)

3.2. Изолиране на тотална РНК

3.2.1. Изолиране на тотална РНК (включваща и малки РНКи) от тъкан

За изолирането на тотална РНК, включваща и малки РНКи от тъкан беше използван кита miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Хилден, Германия). На Таблица 3.4. са представени материалите и реактивите, които са включени в използвания кит.

Таблица 3.4. Компоненти на кита.

<i>miRNeasy Micro Kit</i>	
<i>Каталожен №</i>	217084
<i>Брой на пробите</i>	50
RNeasy® MinElute® Spin Колонки (всяка пакетирани заедно с епруветка от 2мл)	50 бр
Епруветки (1.5 мл)	50 бр
Епруветки (2 мл)	50 бр
QIAzol® Lysis реагент	50 мл
RWT *† Буфер	15 мл
RPE‡ Буфер	11 мл
Вода, пречистена от РНази	10 мл
Бърз протокол на работа	1 бр

Забележка:

* Съдържа гуанидинови соли. Не е съвместимо с дезинфектанти, съдържащи белина.

† RWT буфер се доставя като концентрат. Преди употреба се добавят 2 обема 96%-100% (абсолютен) етанол, като се поставя индикатор на опаковачното шишенце. По този начин се постига работен разтвор.

‡ RPE Буфер се доставя като концентрат. Преди употреба се добавят 4 обема 96%-100% (абсолютен) етанол, като се поставя индикатор на опаковачното шишенце.

По този начин се постига работен разтвор.

На Таблица 3.5. са представени спецификациите на RNeasy MinElute центрофужните колонки. QIAzol Lysis реагент може да бъде съхраняван на стайна температура (15-25°C) или на 2-8°C. Всички останали компоненти на кита се съхраняват на стайна температура.

Принцип на работа

Реагентите от miRNeasy Micro кита комбинират фенол/гуанидин базиран лизис на пробите и силициево базирана мембрана за изолиране на тотална РНК. QIAzol Lysis реагент, включен в кита, е монофазов разтвор на фенол и гуанидин тиоцианат, разработен да улесни разграждането на тъканите, да инхибира РНазите и също така да премахне клетъчната ДНК и белтъците от лизата посредством органична екстракция. Тъканните проби бяха хомогенизирани в QIAzol Lysis реагент, с използването на хомогенизатор ИКА

3386000 (Cole-Parmer, Канада). След добавянето на хлороформ, хомогената се разделя на две фази посредством центрофугиране: водна и органична. РНК, се съдържа в горната, водна фаза, докато ДНК в междинната, а белтъците в долната органична фаза или в интерфазата.

Горната, водна фаза се отделя, и се добавя етанол, за да подобри свързващите условия за всички РНК молекули, по дълги от 18 нуклеотида. Пробата след това се прехвърля в RNeasy MinElute колонка, където РНК се свързва за мембраната и съдържащия се фенол и други компоненти са успешно промити. Високо – качествена РНК се елуира в малък обем вода, пречистена от РНази. На Фигура 3.1. е представена схематично протокола за изолиране на тотална РНК.

Таблица 3.5. Спецификации за RNeasy MinElute центрофужни колонки

Максимален свързващ капацитет	45 мкг РНК
Максимален обем	700 мкл
Размер на изолирана РНК	РНК >18 нуклеотида (приблизително)
Малксимален еуиращ обем	10 мкл
Максимално количество стартов материал	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Животински клетки ▪ Животински тъкани 	<p>1 x 10⁶</p> <p>5 мкг (10мкг за мастна тъкан)</p>

Забележка: Ако свързващия капацитет на RNeasy MinElute центрофужни колонки е превишен, РНК обема ще бъде нарушен и намелен. Ако лизиса на стартовия материал е непълен, РНК количеството ще бъде пониско от очакваното, дори и да не е превишен свързващия капацитет на RNeasy MinElute колонките.

Протокол на работа:

Пречистване и изолиране на тотална РНК, включително и малки РНКи от животинска тъкан

1. Отделя се малко парче тъкан (не повече от 5мг), което се поставя в 700 мкл QIAzol лизис буфер, в подходяща епруветка за хомогенизиране;
2. Пристъпва се към хомогенизиране, което трае около 20-40 секунди (или до разграждането на тъканта);
3. Епруветката с хомогенната проба се поставя на плота на стайна температура за 5 мин;
4. Добавят се 140 мкл хлороформ към пробата и се вортексира за 15 секунди;
5. Поставя се пробата на плота на стайна температура за 2-3 минути;
6. Центрофугира се за 15 мин на 12 000g на 4°C;
7. Прехвърля се горната водна фаза в нова епруветка и се добавят обем и половина (около 525мкл) абсолютен етанол (96-100%) и се миксира внимателно чрез пипетиране;

8. Пипетира се до 700 мкл от пробата, включително и ако присъстват преципитати, в RNeasy MinElute колонка поставена в епруветка от 2мл. Затваря се нежно и се центрофугира на $\geq 8\ 000g$ ($\geq 10\ 000rpm$) за 15 секунди на стайна температура (15-25°C). Изхвърля се преминалата през колонката течност;
 9. Повтаря се стъпка 8 с останалата част от пробата. Изхвърля се отделената течност. Изхвърля се преминалата през колонката течност;
 10. Добавят се 700 мкл RWT буфер към RNeasy MinElute центрофужната колонка. Затваря се капачката внимателно и се центрофугира за 15 секунди на $\geq 8\ 000g$ ($\geq 10\ 000rpm$), с цел да се промие колонката. Изхвърля се преминалата през колонката течност;
 11. Пипетират се 500 мкл RPE буфер към RNeasy MinElute центрофужната колонка и се центрофугира за 15 секунди на $\geq 8\ 000g$ ($\geq 10\ 000rpm$). Изхвърля се преминалата през колонката течност;
 12. Пипетират се 500 мкл 80% етанол към RNeasy MinElute центрофужната колонка и се центрофугира за 2 минути на $\geq 8\ 000g$ ($\geq 10\ 000rpm$), с цел да се промие центрофужната колонка. Изхвърля се събирателната епруветка заедно с преминалата течност;
 13. RNeasy MinElute центрофужната колонка се поставя в нова събирателна епруветка. Остава се отворен капака на колонката и се центрофугира на максимална скорост за 5 мин, с цел да се изсуши мембраната. Изхвърля се събирателната епруветка заедно с течността в нея;
 14. Поставя се RNeasy MinElute центрофужната колонка в нова 1.5 мл епруветка. Добавят се 14 мкл пречистена от РНази вода директно в центъра на колонката, като се внимава да не се наруши нейната цялост. Затваря се капака на колонката внимателно и се центрофугира на максимална скорост за 1 минута. Елуата се запазва.
- Забележка:** В зависимост от количеството добив на тотална РНК, се повтаря последната стъпка от протокола (№14).

miRNeasy Micro Процедура



Фигура 3.1. Схематично представяне на работния протокол на изолиране на тотална РНК, вкл. и малки РНКи от животинска тъкан.

3.2.2. Изолиране на тотална РНК, включително и малки РНКи от плазма

За изолирането на тотална РНК, включваща и малки РНКи от плазма беше използван кита miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Хилден, Германия). На Таблица 3.6. са представени материалите и реактивите, които са включени в използвания кит.

Таблица 3.6. Компоненти на кита

<i>miRNeasy Serum/Plasma Kit</i>	
<i>Каталожен №</i>	<i>217184</i>
<i>Брой на проби</i>	<i>50</i>
RNeasy® MinElute® центрофужни колонки (всяка пакетирана с епруветка от 2 мл)	50 бр
Епруветки (1.5мл)	50 бр
Епруветки (2мл)	50 бр

QIAzol лизис реагент*	50 мл
RWT*† Буфер	15 мл
RPE‡ Буфер	11 мл
Ce_miR-39_1 miScript® Primer Assay	100 реакции
Вода, пречистена от РНази	10 мл
Бърз протокол на работа	1 бр

* Съдържа гуанидинови соли. Не е съвместимо с дезинфектанти, съдържащи белина.

† RWT буфер се доставя като концентрат. Преди употреба се добавят 2 обема 96%-100% (абсолютен) етанол, като се поставя индикатор на опаковачното шишенце. По този начин се постига работен разтвор.

‡ RPE Буфер се доставя като концентрат. Преди употреба се добавят 4 обема 96%-100% (абсолютен) етанол, като се поставя индикатор на опаковачното шишенце.

По този начин се постига работен разтвор.

С цел да се провери качеството на изолираните miRNAs от плазма беше използвана и контрола за нормализиране miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control (Qiagen, Хилден, Германия) (Таблица 3.7.). Лиофилизираната miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control се разтваря в ТЕ буфер и се приготвя работен разтвор с концентрация 1.6×10^8 копия на мкл, който се използва за последващата процедура на изолиране.

Таблица 3.7.

<i>miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control</i>	<i>(10 pmol)</i>
<i>Каталожен номер</i>	<i>219610</i>
C. elegans miR-39 miRNA mimic	10 pmol

Разтварянето на Ce_miR-39_1 miScript Primer Assay се осъществява като внимателно се центрофугира и се добавят 550 мкл ТЕ, рН=8.0 и се миксира чрез пулсово вортексиране 4-6 пъти. Така разтворения праймер е готов за употреба, за 100 реакции по 50мл (или 550 реакции по 1 мкл). За да се избегнат повторени цикли на замразяване и размразяване на праймера, той беше аликвотиран в епруветки по 100 мкл.

Принцип на работа

Принципът на работа с miRNeasy Serum/Plasma Kit е аналогичен като този на miRNeasy Micro Kit и е представен схематично на Фигура 3.2. Протокола на работа е описан подробно в следващия параграф. На Таблица 3.8. са описани спецификациите на RNeasy MinElute центрофужните колонки от miRNeasy Serum/Plasma Kit.

miRNeasy Serum/Plasma Процедура



Фигура 3.2. Схематично представяне на работния протокол на изолиране на тотална РНК, вкл. и малки РНКи от животинска плазма.

Таблица 3.8. Спецификации за RNeasy MinElute центрофужни колонки.

Максимален свързващ капацитет	45 мкг РНК
Максимален зареждащ обем	700 мкл
Размер на изолирана РНК	РНК > 18 нуклеотида (приблизително)
Минимален елуиращ обем	10 мкл
Максимално количество на серум или плазма	200 мкл

Забележка: Ако се надвиши препоръчителния обем на използвания материал, добива на РНК може да бъде понижен, дори и да не се достигне до максималния капацитет на RNeasy MinElute центрофужна колонка.

Протокол на работа:

Изолиране на тотална РНК, включително малки РНКи от серум и плазма

1. Плазмения материал се размразява на лед (4°C);
2. Отделят се 200 мкл и към тях се добавят 5 обема QIAzol Lysis Reagent (1мл). Миксира се чрез вортексиране или пипетиране;
3. Така приготвената проба се инкубира 5 мин на стайна температура (15-25°C);
4. Добавят се 3.5мкл miRNeasy Serum/Plasma Spike-In контрола (с работна концентрация 1.6×10^8 копия на мкл) и се миксира внимателно;
5. Добавя се хлороформ, в равен обем на стартовия материал към лизата. Затваря се капака на епруветката и се разклаща грубо за 15 секунди;
6. Лизата се инкубира на стайна температура (15-25°C) за 2-3 минути;
7. Пробите се центрофугират за 15 минути на $12\ 000 \times g$ на 4°C;
8. Горната водна фаза се прехвърля в нова епруветка, като не се нарушава междинната фаза. Към отделената водна фаза се добавят 1.5 обема абсолютен (96-100%) етанол и се миксира чрез пипетиране. Не се центрофугира;
9. Пипетират се до 700 мкл от пробата, включително ако има и преципитати, в RNeasy MinElute центрофужна колонка, поставена в 2мл епруветка. Затваря се капака внимателно и се центрофугира на $\geq 8\ 000 \times g$ ($\geq 10\ 000 \text{ rpm}$) за 15 секунди на стайна температура. Изхвърля се преминалата през колонката течност;
10. При необходимост се повтаря стъпка 9, докато се изчерпа цялото количество материал;
11. Добавят се 700 мкл RWT буфер към RNeasy MinElute центрофужна колонка. Затваря се капане внимателно и се центрофугира за 15 секунди на $\geq 8\ 000 \times g$ ($\geq 10\ 000 \text{ rpm}$). Изхвърля се преминалата през колонката течност;
12. Пипетират се 500мкл RPE буфер към RNeasy MinElute центрофужната колонка и се центрофугира за 15 секунди на $\geq 8\ 000g$ ($\geq 10\ 000\text{rpm}$). Изхвърля се преминалата през колонката течност;
13. Пипетират се 500 мкл 80% етанол към RNeasy MinElute центрофужната колонка и се центрофугира за 2 минути на $\geq 8\ 000g$ ($\geq 10\ 000\text{rpm}$), с цел да се промие центрофужната колонка. Изхвърля се събирателната епруветка заедно с преминалата през колонката течност;
14. RNeasy MinElute центрофужната колонка се поставя в нова събирателна епруветка. Остава се отворен капака на колонката и се центрофугира на максимална скорост за 5 мин, с цел да се изсуши мембраната. Изхвърля се събирателната епруветка заедно с течността в нея;
15. Поставя се RNeasy MinElute центрофужната колонка в нова 1,5 мл епруветка. Добавят се 14 мкл пречистена от РНази вода директно в центъра на колонката, като се внимава да не се наруши нейната цялост. Затваря се капака на колонката внимателно и се центрофугира на максимална скорост за 1 минута. Елуата се запазва.

Забележка: В зависимост от количеството добив на тотална РНК, се повтаря последната стъпка от протокола (№15).

3.3. Изолиране на ДНК

За изолирането на висококачествена геномна ДНК от тъканни проби бе използван кита QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Хилден, Германия). На следващата Таблица 3.9. са представени компонентите включени в кита.

Таблица 3.9. Компоненти включени в кита

<i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	
<i>Каталожен номер</i>	51306
<i>Брой проби</i>	250
Събирателни епруветки (2мл)	750
Буфер AL*	54 мл
Буфер ATL	50
Буфер AW1* (концентрат)	95 мл
Буфер AW2† (концентрат)	66 мл
Буфер AE	110 мл
Протеиназа К	6 мл

* Съдържа хаотропична сол, която е дразнеш агент. Предприемете необходимите безопасни лабораторни средства и носете лабораторни очила по време на работа. Не е съвместимо с дезинфектиращи агенти съдържащо белина.

† Съдържа 0.04% натриев азид като консервант. Натриев азид е високо токсичен и може да реагира експлозивно с оловни и медни материали. Предприемете необходимите безопасни лабораторни средства и носете лабораторни очила по време на работа. Изхвърлете разтворите, съдържащи азид, съгласно указанията на вашата институция за изхвърляне на отпадъци.

Принцип на работа

QIAamp DNA Mini Kit предлага бързо и лесно пречистване на тотална ДНК, подходяща за PCR-базирани методики или Southern blotting. Тотална ДНК (вкл. геномна, вирусна и митохондриална) могат да бъдат изолирани от култивирани клетки, тъкани или съдебно-медицински проби.

Пречистването и изолирането изисква фенол/хлороформна екстракция или алкохолно преципитиране. ДНК е елуирана в АЕ буфер или вода, готова за използване за PCR или друг вид ензимни реакции. Изолираната ДНК е свободна от белтъци, нуклеази или други замърсители и инхибитори.

Изолираната ДНК с използването на QIAamp Kit варира до 50кб, с преобладаващи фрагменти от приблизително 20-30кб. ДНК с тази дължина денатурира напълно по време на термично циклене и може да бъде амплифицирана с висока ефективност. Количеството на изходния материал, който може да се ползва с този кит е до 25мг (Фигура 3.3.).

QIAamp центрофужна процедура



Фигура 3.3. Визуализиране на процедурата по QIAamp DNA Mini Kit

Протокол на работа:

Изолиране на геномна и митохондриална ДНК от тъкан

Забележка:

- Преди започване на работа, пробата трябва да е достигнала стайна температура.
- Загрейте две водни бани или термоблокове: един на 56°C, който се използва в стъпка 2, и един на 70°C, който се използва в стъпка 3.
- Използва се АЕ буфер или вода, която е със стайна температура за елуиране в стъпка 8.
- Буфери AW1 и AW2 трябва да са приготвени според зададените инструкции.
- Ако се установят някакви преципитати в буфер ATL или AL, за да се разтворят се инкубира на 56°C.
- Всички центрофугирания се извършват на стайна температура.
- Избягва се многократни стъпки на замразяване и размразяване на елуираната ДНК проба, което би довело до намаляване на нейното качество.

1. Отделя се до 25 мг тъкан и се поставя в епруветка с обем 1.5мл и се добавят 180 мкл ATL буфер;
2. Добавя се 20мкл Протеиназа К, вортексира се и се инкубира на 56°C докато тъканта се лизира напълно. По време на това инкубиране периодично (на 4-6 ч) се вортексира и центрофугира епруветката съдържаща лизата;
3. Внимателно се центрофугира епруветката, за да се отстранят капчиците от капачката. Добавят се 200мкл AL буфер към лизата, вортексира се пулсово за 15сек и се инкубира на 70°C за 10 мин. Внимателно се центрофугира епруветката;
4. Добавят се 200 мкл абсолютен етанол (96-100%) към пробата и се вортексира пулсово за 15 сек. Центрофугира се епруветката;
5. Внимателно се прехвърля лизата към QIAamp центрофужна колонка (която е поставена в епруветка от 2мл) без да се мокри ръба. Затваря се капака и се центрофугира на 6000 x g (8000 rpm) за 1 мин. Поставя се QIAamp колонката в нова епруветка от 2мл;
6. Отваря се капака на колонката и се добавят 500мкл AW1 буфер, без да се мокри ръба на колонката. Затваря се капака и се центрофугира на 6000 x g (8000 rpm) за 1 мин;
7. Внимателно се отваря центрофужната колонка и се добавят 500 мкл AW2 буфер без да се намокря ръба на колонката. Затваря се колонката и се центрофугира на пълни обороти (20 000 x g; 14 000 rpm) за 3 минути;
8. QIAamp центрофужната колонка се поставя в чиста 1.5 мл епруветка и се добавят 200 мкл AE буфер или дестилирана вода. Инкубира се на стайна температура за 1 минута и се центрофугира на 6000 x g (8000 rpm) за 1 минута;
9. При необходимост стъпка 8 се повтаря.

3.4. Определяне концентрация на изолирана тотална РНК/ДНК

3.4.1. Измерване количество и качество на изходен материал с NanoDrop 2000.

За измерване концентрацията и качеството на изолираната тотална РНК или ДНК бяха използвани спектрофотометрични методи. Това бе осъществено с помощта на NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Масачузетс, САЩ).

Методът се основава на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната $\lambda=260\text{nm}$ от пуриновите и пиримидиновите бази на ДНК и РНК. Абсорбцията при $\lambda=280\text{nm}$ дава концентрацията на белтъците.

1 O.D. при 260nm за двойноверижна ДНК = 50ng/ μl от dsDNA (двДНК)

1 O.D. при 260nm за едноверижна ДНК = 20-33ng/ μl от ssDNA (евДНК)

1 O.D. при 260nm за РНК молекули = 40ng/ μl за РНК

Отношението на абсорбциите, измерени съответно при $\lambda 260$ и $\lambda 280$, показва чистотата на ДНК/РНК. Чистите ДНК проби дават A260/280 съотношение приблизително 1.8 като стойности под 1.6 показват наличието на примеси от белтъци, а над 2 - примеси от РНК. Чистите РНК проби дават A260/280 съотношение от около 2 като в този случай стойности под 1.8 показват примеси от белтъци. Върху съотношението A260/280 влияние оказва и киселинността на пробите. Съотношението A260/A230 дава представа за съдържанието на други контаминиращи вещества, които абсорбират при $\lambda 230$ или $\lambda 260$.

Чистите проби имат съотношение на A260/A230 в обхвата 2-2.2. Вещества, които поглъщат при $\lambda 230$ са EDTA, въглехидратите и TRIzol (разтвор, който се използва за изолиране на РНК), Guanidine HCL (разтвор, който се използва за изолиране на ДНК). При контаминация с тях съотношението A260/A230 е понижено. Вещество, което поглъща при $\lambda 260$ е гуанидин изотиоцианат, който се използва за изолиране на РНК. При контаминиране с него A260/A230 съотношението има високи стойности.

3.4.2. Измерване на концентрацията на изолираната ДНК/РНК с флуориметричен метод с помощта на Qubit v2.0

Спектрофотометричното измерване на ДНК и РНК е широко използван метод, но то не е достатъчно надеждно и точно. Установено е, че UV базираните абсорбционни измервания не са селективни и не могат да правят разграничение между ДНК, РНК, белтък, или свободни нуклеотиди или свободни аминокиселини. Стойностите получени за концентрацията могат да се повлияят от варирането на съотношението на базите в измерваните нуклеинови киселини и от присъствието на други контаминиращи вещества като свободни нуклеотиди, соли и органични съединения. В допълнение чувствителността на спектрофотометричните измервания е ниска като е невъзможно измерването на ДНК/РНК с много ниски концентрации. Флуоресцентно базираното определяне на концентрацията на нуклеиновите киселини е по-чувствително и специфично тъй като прави разграничение между ДНК и РНК и белтъци, и дава възможност да се измерват проби с много ниска концентрация.

Основната разлика между двата метода за измерване на концентрацията е, че Qubit v2.0 (Life Technologies, Калифорния, САЩ) флуорометъра използва флуоресцентни багрила. Всяко багрило е специфично за определена молекула: ДНК, РНК или белтък. Тези багрила имат изключително ниска флуоресценция докато не се свържат с техните таргетни молекули (ДНК, РНК или белтък). При свързването си те започват интензивно да флуоресцират. Добавят се към разтвор на пробите и те се свързват към таргетните молекули за няколко секунди и се достига равновесие за по-малко от 2 минути. При специфично количество на багрилото, количеството на флуоресцентния сигнал от пробата е директно пропорционален на концентрацията на измерваната молекула в разтвора. След това Qubit флуорометърът отчита флуоресцентния сигнал и определя концентрация като използва стандарти с известна концентрация. Чрез стандартите се определя съотношението между ДНК концентрацията и флуоресценцията и след това полученото съотношение се използва за калкулиране на концентрацията на измерваните проби.

3.5. Обратна транскрипция, или превръщане на РНК в кДНК

3.5.1. Превръщане на малки РНКи в кДНК с miScript II RT Kit

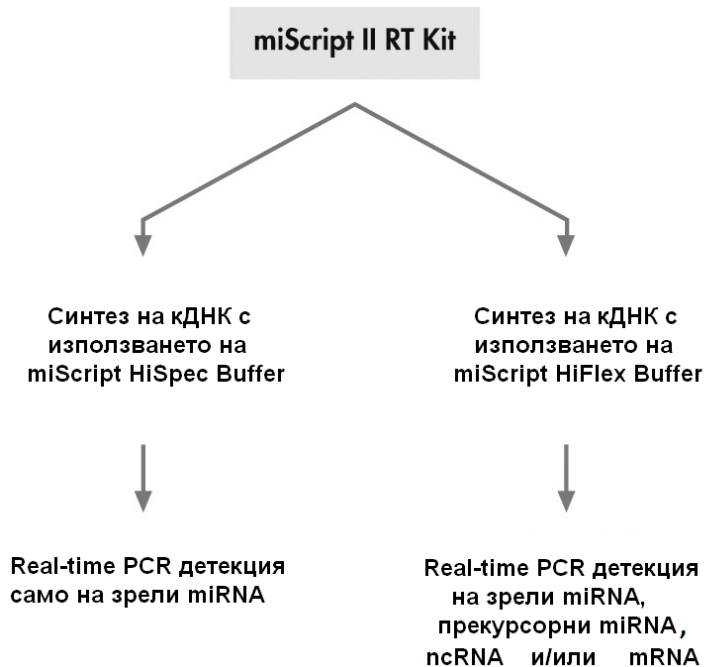
За превръщането на малки РНКи в кДНК беше използван специфичен за превръщането, освен на тотална РНК, но и на малки нкРНК кит miScript II RT Kit (Qiagen, Хилден, Германия) (Таблица 3.10.).

Таблица.3.10. Компоненти включени в miScript II RT Kit

miScript II RT Kit	(50)
Каталожен номер	218161
Брой на стандартни реакции*	50 бр
miScript Reverse Transcriptase Mix	100 мкл
10x miScript Nucleics Mix	200 мкл
5x miScript HiSpec Buffer	400 мкл
5x miScript HiFlex Buffer	400 мкл
Вода без РНази	1.9 мл
Бърз протокол на работа	1 бр

*Стандартна реакция е обем 20 мкл с 10pg - 2 µg тотална РНК (с използване на miScript HiSpec Buffer) или 10 pg-1 µg (с използване на miScript HiFlex Buffer)

miScript Reverse Transcriptase Mix е оптимизиран микс от поли (А) полимераза и обратна транскриптаза. 10x miScript Nucleic Mix съдържа dNTPs и oligo-dT праймери. Двата буфера, miScript HiSpec и miScript HiFlex, се използват в зависимост от целите на изследването (Фигура.3.4.). Така получената кДНК може да бъде използвана за real-time PCR методика, с използването на подходящ праймер.



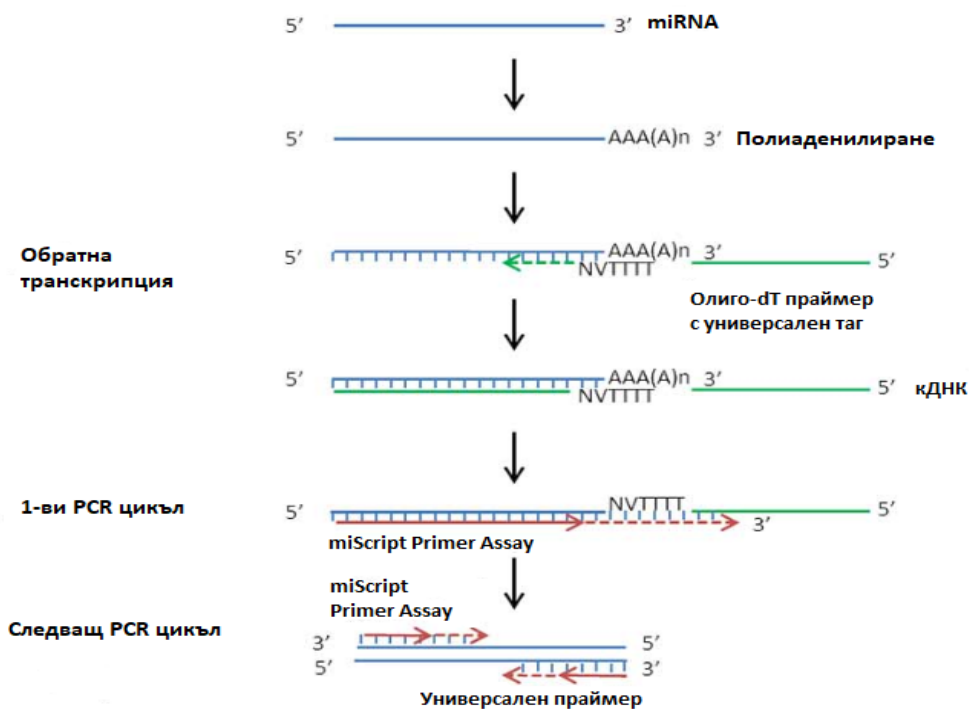
Фигура.3.4. Детекция на зрели miRNA, прекурсорни miRNA, други нкРНКи или mRNA

Принцип и процедура

Зрелите микро РНКи са естествено съществуващи, около 22-нуклеотидни последователности, нкРНКи, които участват с посттранслационната генна регулация. За разлика от мРНКи, миРНК не са полиаделенирани.

На Фигура.3.5. е представено схематично селективното превръщане на зрели микро РНКи в кДНК с помощта на miScript HiSpec буфер.

Обратната транскрипция бе осъществена с помощта на miScript II RT Kit. В кита са включени два различни буфера: HiSpec и HiFlex, чието предназначение е различно (Фигура 3.4.). В нашето проучване ние използвахме HiSpec буфер за синтез на кДНК само от зрелите miRNAs. Когато обратно транскриптаната реакция се извършва в присъствието на miScript HiSpec Buffer, зрелите miRNAs и определени ядръцеви РНК-и и малки ядрени РНК-и (snoRNAs, snRNAs) се конвертират в кДНК. Зрелите miRNAs (микроРНК-и) се полиаденилират от poly(A) полимераза и обратно се транскрибират в кДНК с помощта на олиго-dT праймери. Полиаденилирането и обратната транскрипция се осъществява паралелно в една епруветка. Олиго-dT праймерите притежават поли-Т последователност в 3' края си и универсална последователност - таг в 5' края си, което позволява амплификация на зрелите miRNAs в следващата стъпка, а именно real-time PCR (PCR в реално време). miScript Primer Assays използвани в комбинация с miScript SYBR Green PCR Kit спомагат за количественото определяне на зрелите miRNAs чрез PCR в реално време. Комбинацията от полиаденилиране и добавяне на универсален таг осигуряват специфичност на miScript Primer Assays и невъзможност за неспецифична амплификация на геномна ДНК.



Фигура.3.5. Селективно обръщане на miRNA в кДНК.

Протокол на работа:

1. РНК пробите, се размразяват на лед. 10x miScript Nucleic Mix, 5x miScript HiSpec буфер и вода без РНази се размразяват на стайна температура (15-25°C)
2. Приготвя се микс за обратна транскрипция според Таблица.3.11.

Таблица 3.11.

<i>Компонент</i>	<i>Обем/реакция</i>
5x miScript HiSpec буфер	4 µL
10x miScript Nucleic микс	2 µL
Вода без РНази	Варира
miScript Reverse Transcriptase Микс	2 µL
РНК матрица	Варира
Краем обем*	20 µL

Забележка: miScript Reverse Transcriptase Mix трябва да бъде съхраняван на -20°C и да бъде добавен след като се приготви миксът за обратна транскрипция, след което да се пипетира неколкократно. Обратна транскрипция на некодиращи РНК молекули, изолирани от тъкан беше направена в тотален обем 10мкл, а от плазма в 20 мкл.

3. Добавя се РНК матрица към всяка епруветка съдържаща микс за обратна транскрипция. Пипетира се, центрофугира и се съхранява на лед.
4. Следва инкубация за 60 мин на 37°C и следващи 5 мин на 95°C. След приключване на програмата, пробите се поставят на лед.
5. Може да се продължи с real time PCR, като се разреждат получената кДНК с 200 мкл вода без РНази или да се съхранят пробите на -20°C за по-дълъг период от време.

3.5.2 Превръщане на дълги некодиращи РНКи в кДНК

За превръщането на дълги нкРНКи в кДНК беше използван специфичен за превръщането RT² First Strand Kit (Qiagen, Хилден, Германия) (Таблица.3.12).

Таблица.3.12. Микс за обратна транскрипция на дълги некодиращи РНКи

<i>RT² First Strand Kit</i>	<i>(50)</i>
<i>Каталожен номер</i>	<i>330404</i>
<i>Брой на стандартни реакции*</i>	<i>50</i>
GE буфер	100 µL
5x BC3 буфер	200 µL
RE3 обратно транскриптазен микс	100 µL
Контрол Р2	50 µL

Вода без РНази	1 мл
Бърз протокол на работа	1 бр

Протокол на работа:

1. Размразяват се реагентите от RT2 First Strand Kit и се центрофугират за 10-15 сек;
2. Приготвя се елиминиращ геномна ДНК микс според Таблица.3.13. приготвения микс се пипетира няколко пъти и се центрофугира:

Таблица 3.13.

<i>Компонент</i>	<i>Количество</i>
РНК	25нг - 5мкг
Буфер GE	2 μ L
Вода без РНази	варира
Краен обем	10 μL

3. Така приготвените проби се инкубират за 5 мин на 42°C, след което се поставят веднага на лед за най-малко 1 мин;
4. Приготвя се микса за обратна транскрипция според таблица.3.14.

Таблица3.14.

<i>Компонент</i>	<i>Обем за една реакция</i>
5x Buffer BC3	4 μ L
Control P2	1 μ L
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 μ L
Вода без РНази	3 μ L
Краен обем	10μL

5. Добавят се 10мкл от приготвения микс за обратна транскрипция към епруветката, съдържаща 10мкл проба и елиминиращ геномна ДНК микс. Пипетира се неколкократно и центрофугира;
6. Пробите се инкубират на 37°C за точно 60 мин и последваща стъпка от 95°C за 5 мин.
7. Добавят се 91 мкл вода без нуклеази към всяка реакция. Пипетира се неколкократно;
8. Така приготвените проби могат да се поставят на лед, като се продължи със стъпка на real-time PCR или да се съхраняват на -20°C за по-дълъг период от време.

3.6. Детекция на изследваните некодиращи РНК посредством real time-qPCR

Конвенционалната полимеразна верижна реакция (PCR) се състои в амплифицирането на специфичен участък ДНК в *in vitro* условия. Това се осъществява чрез олигонуклеотидни фрагменти (праймери), които на база комплементарност обграждат интересуващата ни последователност от ДНК и чрез термостабилна полимераза я размножават чрез циклични повторения на три основни стъпки - денатурация на двойната спирала, хибридизация на праймерите и синтез. При PCR в реално време (Real Time PCR) резултатите се отчитат чрез флуоресцентни сигнали. Различните разновидности на тази методика позволяват отчитането на сигнал под формата на флуоресцентна крива след всеки цикъл на реакцията. Чрез детайлното следене на реакцията и подробен анализ на резултатите се прави количествен анализ на експесионните проби. Съществуват редица флуорофори, които могат да интеркалират между базите на ДНК молекулата. Благодарение на планарната си структура се свързват с нея и излъчват флуоресцентен сигнал. При всяка амплификация в реално време се генерира сигнал, който след определен брой цикли се отчита като покачване на общия сигнал. В зависимост от началното количество на специфичната последователност за размножаване, цикълът, при който флуоресцентната крива пресича линията на позитивиране (threshold line) е различен. На базата на това се изчислява *St* стойност, чрез която се извършва качествен (напр. отчита се само наличие на точката на пресичане) и количествен анализ (напр. определяне на нивото на експресия спрямо вътрешна контрола за даден молекулен маркер), т.нар. RT-qPCR.

3.6.1. Детекция на микро РНКи

Таблица.3.15.Реактиви включени в miScript SYBR Green PCR Kit

<i>miScript SYBR Green PCR Kit</i>	(1000)
<i>Каталожен номер</i>	218075
<i>Брой на 50мкл реакции</i>	1000
2x QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix, съдържащ:	25мл
- HotStarTaq® DNA полимераза	
- QuantiTect SYBR Green PCR Буфер	
- dNTP микс, включващ dUTP	
- SYBR Green I	
- ROX™ референтно багрило	
- 5 mM MgCl ₂	
10x miScript Универсален Праймер	5 x 1мл
Вода без РНази	20мл
Бърз протокол	1 бр

Протокол на работа:

Размразяват се 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 10x miScript Universal Primer, 10x miScript Primer Assay, cDNA матрица и вода без РНази на стайна температура (15-25°C);

1. Приготвя се микс според Таблица 3.16 с краен обем за всяка проба 10мкл за 384 ямкови плаки;

Таблица.3.16.

Компонент	Обем/реакция (384-ямкова плака)
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	5мкл
10x miScript Universal Primer	≤1мкл
10x miScript Primer Assay	≤1мкл
Вода без РНази	Варира
cDNA матрица	≤1мкл
Краен обем	10мкл

2. Разкапва се кДНК матрицата в съответните ямки;

3. Добавя се от така приготвения Мастер Микс;

4. Плаката се покрива с фолио и се центрофугира за 1 мин на 1000g на стайна температура (15-25°C).

5. Плаката се поставя в апарата на следната програма, показана на таблица.3.17.

Таблица 3.17.

Стъпка	Време	Температура	Коментар
Първоначална активираща стъпка	15 мин	95°C	HotStar Taq DNA полимеразата се активира по време на тази първоначална стъпка.
Пвторящи се цикли (40):			
Денатурация	15 сек	94°C	
Аннийлинг	30 сек	55°C	

Екстензия	30 сек 70°C	Извършва се флуоресцентно събиране на данните.
-----------	-------------	--

Таблица.3.18.

<i>miScript Primer Assay</i>	(100)
<i>Каталожен номер</i>	<i>Варира*</i>
<i>Брой на реакции в 50мкл краен обем</i>	100
10x miScript Primer Assay (съдържа един лиофилизиран специфичен miRNA праймер)	1 опаковка

*Каталожните номера могат да се открият в www.qiagen.com/GeneGlobe

Таблица 3.19. Използвани праймери за микро РНКи и техните секвенции в дисертационния труд

<i>Зряла miRNAs (изоформа)</i>	<i>Нуклеотидна последователност (5'-3')</i>	<i>Каталожен номер (Qiagen)</i>
hsa-miR-21-3p	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU	MS00009086
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	MS00009079
hsa-miR-31-3p	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU	MS00009415
hsa-miR-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	MS00003290
hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUCCCCAGGAAUCCCU	MS00003528
hsa-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	MS00031486
hsa-miR-196a-5p	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	MS00031563
hsa-miR-210-3p	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	MS00003801
hsa-miR-221-3p	AGCUACA UUGUCUGCUGGGUUC	MS00003857
hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	MS00007609
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA	MS00004186

has-RNU6-2	ACGCAAATTCGTGAAGCGTT	MS00033740
------------	----------------------	------------

3.7. Детекция на дълги нкРНКи посредством ПСР в реално време (real time-qPCR)

За провеждането на real time-qPCR на дълги нкРНКи бяха използвани реактиви от miScript SYBR Green PCR Kit.

Обема на използваните реактиви за подготовка на реакциите са показани на следващата таблица.3.20.

Таблица.3.20.

<i>Компонент</i>	<i>Обем/реакция (384-ямкова плака)</i>
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	5мкл
RT2 IncRNA qPCR Assay	≤1мкл
Вода без РНази	≤3мкл
cDNA матрица	≤1мкл
Краен обем	10мкл

Използваните праймери за детектиране на подобрите дълги нкРНК са представени на Таблица 3.21. АСТВ (Actin) беше използвани като ендогенна контрола, за изчисляване нивата на експресия на MALAT1 и HOTAIR.

Таблица.3.21. Използвани праймери за детекция на зрели микро РНКи и ендогенна контрола:

<i>Дълга не кодираща РНК</i>	<i>Каталожен номер (Qiagen)</i>
MALAT1*	LRH18065A
HOTAIR*	LRH07360A
АСТВ (Actin)*	QT00095431

*В интернет страницата на фирмата производител Qiagen (Hilden, Germany) не са упоменати секвенциите на праймерите. Каталожните номера могат да се открият в www.qiagen.com/GeneGlobe

Така подготвените 384-ямкови плаки, съдържащи съответната реакция, бяха поставени в апарат Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Thermofisher Scientific, Масачузетс, САЩ) на програма представена на Таблица.3.22.

Таблица.3.22. Условия за провеждане на real-time PCR за детекция на дълги нкРНКи

<i>Цикли</i>	<i>Продължение</i>	<i>Температура</i>	<i>Коментар</i>
1	10 мин	95°C	HotStart DNA Taq полимераза
40	15 сек	95°C	Извършва се флуоресцентно събиране на резултати
	1 мин	60°C	

3.8. Секвениране от ново поколение, с използването на TSACP и секвенционна платформа MiSeq.

В настоящия дисертационен труд се описва схематично протокола на работа за подготовка на пробите и библиотеките за секвениране с TSACP панела и секвенционна платформа MiSeq (Illumina, Калифорния, САЩ). Всяка стъпка, описана в протокола за работа, на фирмата производител, съпровождащ включените реагенти се е следвал детайлно!

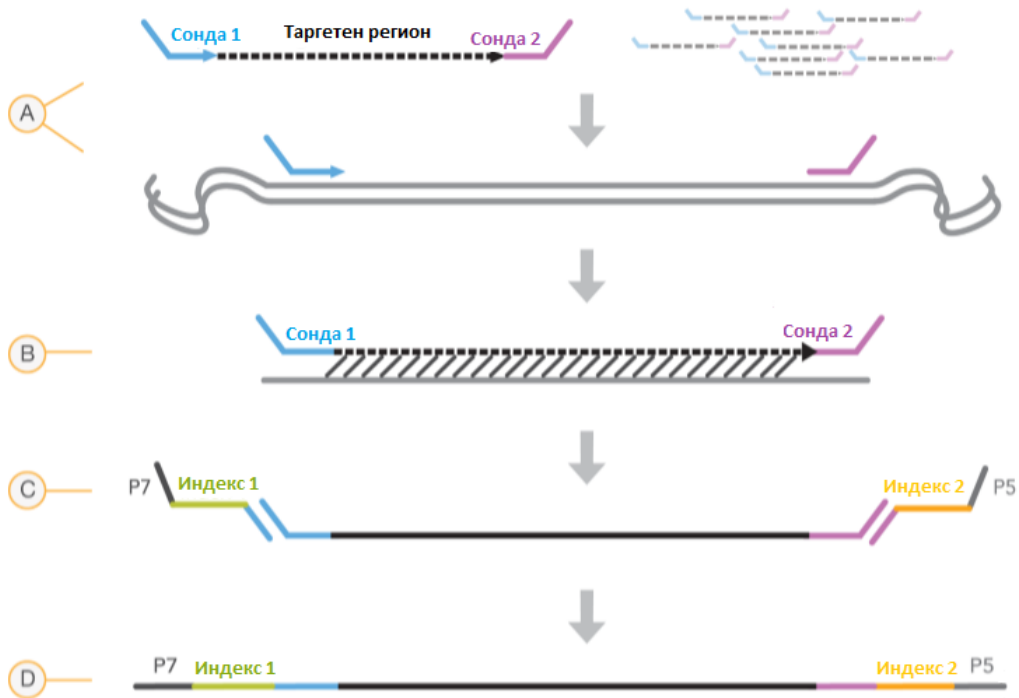
Беше проведено таргетно ресеквениране на панел за детекция на соматични мутации в значими тумор-асоциирани гени TruSeq Amplicon-Cancer Panel (TSACP) на платформа за следващо поколение секвениране MiSeq (Illumina, Калифорния, САЩ). На Фигура.3.6. е представен списък на гените, които се включват в панела. TSACP съдържа оптимизирани олигонуклеотидни проби за секвенирането на мутационни горещи точки (hotspots) в над 35 килобазова таргетна геномна секвенция. В рамките на високо мултиплексна единична реакция, 48-те гена са представени от 212 ампликона. Размерът на ампликоните е 170-190 базови двойки. TSACP е много подходящ за ДНК-и, изолирани от формалин фиксирани и парафин включени проби.

<i>ABL1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GNAS</i>	<i>MLH1</i>	<i>RET</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MPL</i>	<i>SMAD4</i>
<i>ALK</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HRAS</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>APC</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH1</i>	<i>NPM1</i>	<i>SMO</i>
<i>ATM</i>	<i>FGFR1</i>	<i>JAK2</i>	<i>NRAS</i>	<i>SRC</i>
<i>BRAF</i>	<i>FGFR2</i>	<i>JAK3</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>STK11</i>
<i>CDH1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KDR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>TP53</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FLT3</i>	<i>KIT</i>	<i>PTEN</i>	<i>VHL</i>
<i>CSF1R</i>	<i>GNA11</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTPN11</i>	
<i>CTNNB1</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MET</i>	<i>RB1</i>	

Фигура.3.6. Раково – свързани гени, включени в TSACP панела.

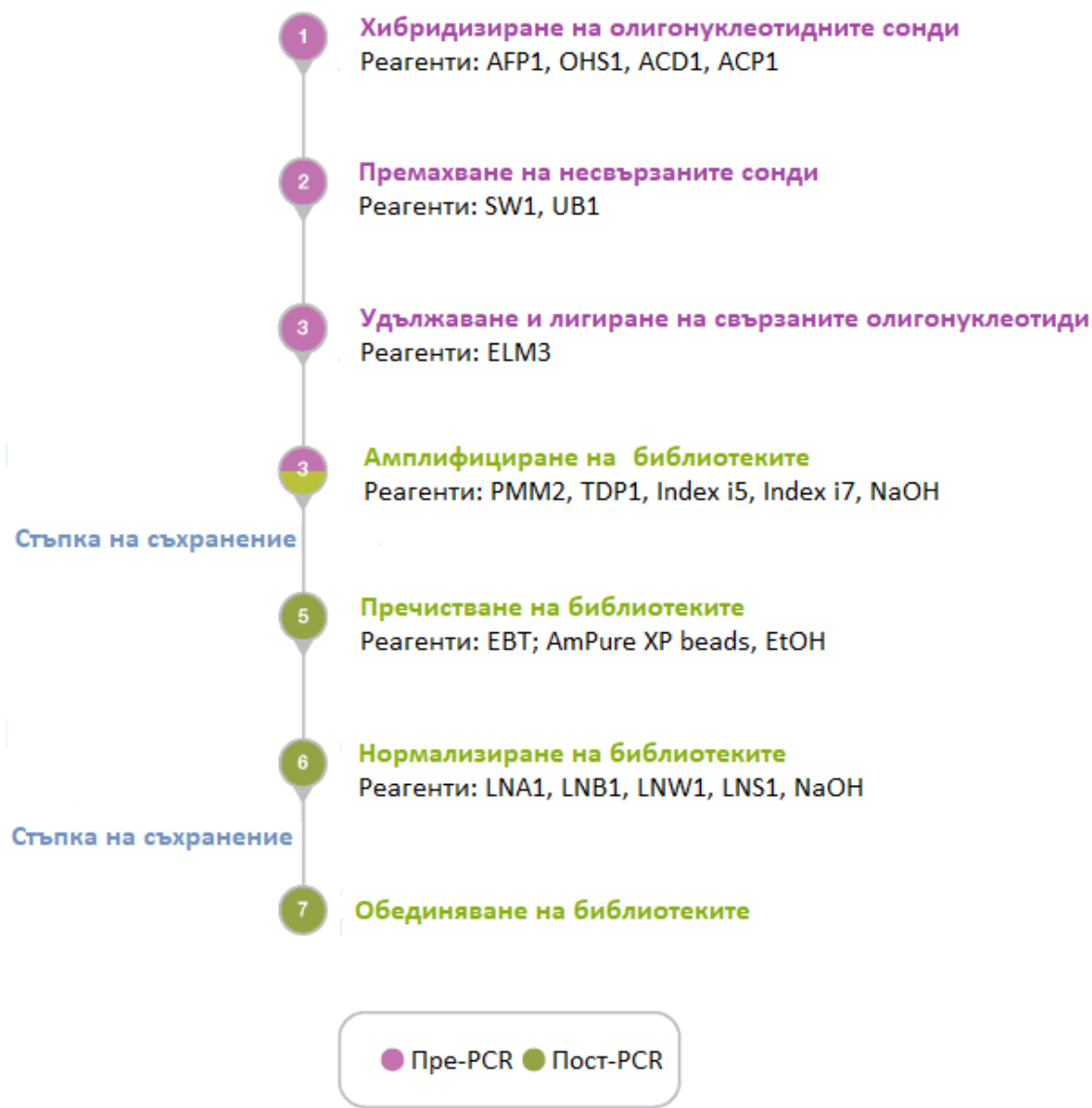
Количеството висококачествена геномна ДНК, изолирана от всяка свежо замразена тъканна проба посредством QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Хилден, Германия), необходимо за протокола на работа беше 250ng. За околичествяване на пробите и подготвяне на разрежките се използваше спектрофотометър Nanodrop 2000 и флуорометър Qubit v2.0.

Преди подготовката на ампликоните се провежда qPCR-базиран ДНК качествен анализ, който показва дали пробите са с достатъчно добро качество. Протоколът на TSACP започва с хибридизация на предварително смесени, оптимизирани олигонуклеотидни проби „upstream“ и „downstream“ от таргетните региони. Всяка проба включва „capture“ последователност и адапторна последователност, които се използват в последващата реакция на амплификация (намножаване). Патентованата реакция на удължаване-лигиране амплифицира таргетния регион и лигира двете проби разположени „upstream“ и „downstream“ от таргетния регион. Това създава нова матрична верига и осигурява отлична специфичност. Матриците, получени при реакцията на удължаване-лигиране се амплифицират с PCR , като се инкорпорират две уникални специфични за всяка проба индекси. Крайният продукт съдържа ампликони, които са готови за секвениране. Интегрираната нормализация с магнитни частици позволява прецизно обединяване на създадените библиотеки. Обединените библиотеки могат директно да се поставят на MiSeq системата, без да е необходимо допълнително процесизиране (Фигура.3.7.).



Фигура.3.7: (A) Хибридизация на олигонуклеотидните сонди, включени в раковия панел; (B) Екстензия и лигиране; (C) Добавяне на индекси и секвенционни адаптори посредством стъпка на PCR; (D) Крайния ампликон е готов за стъпка на секвениране посредством MiSeq платформата.

Кратко описание на всяка стъпка представена на Фигура.3.8. и включените към нея реактиви.



Фигура.3.8. Схематично представяне на протокола на работа с TruSeq Amplicon-Cancer Panel

Хибридиране на олигонуклеотидните сонди:

Тази стъпка хибридира готовият олигонуклеотиден пул, който съдържа upstream и downstream олигонуклеотидни сонди, специфични за таргетните региони. Осъществяват се реплики, с цел да се увеличи доверителният интервал на соматичните варианти.

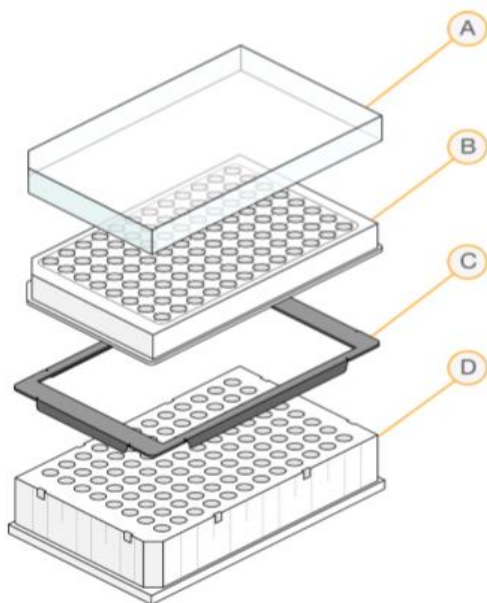
- ♥ AFP1 (Amplicon Fixed Panel 1)
- ♥ OHS1 (Oligo Hybridization for Sequencing 1)
- ♥ ACD1 (Amplicon Control DNA)
- ♥ ACP1 (Control Oligo Pool)

- ♥ НУР (Hybridization Plate), баркодирана
- ♥ Разредена високо-качествена геномна ДНК
- ♥ 96-ямкова плака
- ♥ Адхезивен филм от алуминиево фолио

Премахване на несвързани сонди:

Тази стъпка позволява да се премахнат несвързаните олигонуклеотиди от геномната ДНК, посредством използването на размер-селектиращ филтър. Две стъпки на промиване с SW1 осигуряват напълно премахване на несвързаните сонди. Третото промиване с UB1 премахва останалия SW1 и подготвя пробите за следваща стъпка (Фигура 3.9.).

- ♥ ELM3 (Extension-Ligation Mix 3)
- ♥ SW1 (Stringent Wash 1)
- ♥ UB1 (Universal Buffer 1)
- ♥ Филтърна плака с капак
- ♥ Адапторна яка
- ♥ Средна плака



- A Капак
- B Филтърна плака
- C Адапторна яка
- D Средна плака

Фигура.3.9. Асемблиране на филтърната плака от върха към дъното

Удължаване (екстензия) и лигиране на свързаните олигонуклеотиди

Тази стъпка свързва хибридризираните upstream и downstream олигонуклеотиди. ДНК полимеразата удължава от upstream олигонуклеотидите през таргетния регион,

последвано от лигиране с 5'края на downstream олигонуклеотида посредством ДНК лигаза. Тази стъпка се осъществява на 37°C за 45 мин.

- ♥ ELM3 (Extension-Ligation Mix 3)
- ♥ Адхезивно фолиево покривало

Амплифициране на библиотеките

Тази стъпка амплифицира получените продукти от предходната стъпка (удължаване и лигиране на олигонуклеотидите) и се добавят индекс 1 (i7) адаптори, индекс 2 (i5) адаптори и секвенциите, необходими за клъстерната формация.

- ♥ PMM2 (PCR Master Mix 2)
- ♥ Index i5 adapters (A5XX)
- ♥ Index i7 adapters (A7XX)
- ♥ TDP1 (TruSeqDNA Polymerase 1)
- ♥ 96 ямкова PCR плака
- ♥ Адхезивно микропокривало 'A'
- ♥ Адхезивно микропокривало 'B'
- ♥ 50nM NaOH

След като се подготвят пробите се поставят на термоциклер на следната PCR програма:

Таблица 3.23.

	<i>Температура</i>	<i>Време</i>
	95°C	3 мин
27 цикъла	95°C	30 сек
	62°C	30 сек
	72°C	60 сек
	72°C	5 мин
поддържане	10°C	за нощта

Стъпка на съхранение: от 2°C до 8°C до максимум 2 дни!

Пречистване на библиотеките

Тази стъпка използва AMPure XP частици, за да се пречисти PCR продукта от останалите реакционни компоненти. Стъпката се състои в инкубиране за 10 мин на пробите с AMPure XP частици и последващото им промиване с 80% етанол и елуиране с подходящ буфер.

- ♥ AMPure XP частици
- ♥ Баркодирани: CLP (Cleanup Plate) и LNP (Library Normalization Plate)
- ♥ броя 96-ямкови средни плаки
- ♥ Адхезивно микропокривало 'B'
- ♥ Прясно приготвен 80% етанол
- ♥ Магнит за 96-ямкови плаки

Нормализиране на библиотеките

Тази стъпка нормализира количествено всяка получена библиотека, която ще се включи в крайния пул. Само пробите, съдържащи подходящи ДНК фрагменти продължават в последващите стъпки.

- ♥ LNA1 (Library Normalization Additives 1)
- ♥ LNB1 (Library Normalization Beads 1)
- ♥ LNW1 (Library Normalization Wash 1)
- ♥ LNS1 (Library Normalization Storage buffer 1)
- ♥ SGP (Storage Plate) barcode label
- ♥ N NaOH (прясно приготвен)
- ♥ 96-ямкова PCR плака
- ♥ 15 ml конични епруветки
- ♥ Адхезивно микропокривало 'B'
- ♥ Магнит за 96-ямкови плаки

Стъпка на съхранение: от -15°C до -35°C за максимум 30 дни!

Обединяване на библиотеките

Обединяването на библиотеките комбинира равни обеми от нормализирани библиотеки в една епруветка. След обединяването, библиотеките се разреждат и денатурират преди да се заредят за секвенционния рън.

- ♥ PAL (Pooled Amplicon Library), баркодиран
- ♥ LoBind миницентрофужна епруветка
- ♥ 8-ямкови стрипове и капачки без РНази/ДНази

3.9. Биоинформатичен и статистически подходи, използвани за анализ на получените резултати

3.9.1. Биоинформатичен анализ на получените резултати от секвенирането от ново поколение с MiSeq платформата

Получените сурови данни от таргетното секвениране с TSCAP NGS панел (Illumina, Калифорния, САЩ) бяха анализирани със софтуерната програма VARSEQ (Golden Helix, Монтана, САЩ).

Софтуерът VARSEQ осигурява възможности за мощно филтриране на данни и тяхното пояснение, като пресява големи масиви от данни. С помощта на използваните филтри бързо се стеснява списъка на варианти до тези, които представляват интерес. След импортирането на данни, анотациите се прилагат автоматично въз основа на предварително конфигурирани настройки.

На Таблица.3.24. са представени всички приложени филтри от VARSEQ софтуер при анализа на получените данни.

Таблица 3.24. Използвани филтри при анализ на суровите данни от NGS.

Variant Info	Chr:Pos
	Ref/Alt
	Quality
Sample Field	Filter
	Read Depth (DP)
	Variant Allele Freq
	GQX
	Genotype Qualities (GQ)
	Allelic Depths (AD)
	VF
	NL
	SB
dbNSFP Functional Prediction Voting	N of 6 Predicted Tolerated
	N of 6 Predicted Damaging
	SIFT Pred (C)
	Polyphen2 HVAR Pred (C)
	MutationTaster Pred (C)

	MutationAssessor Pred (C)
	FATHMM Pred (C)
	FATHM MKL Coding Pred (C)
ExAC Variant Frequencies 0.3, BROAD	Adjusted Alt Allele Freq (AF_Adj)
	Non-Finnish European Allele Count (AC_NFE)
	Non-Finnish European Chromosome Count (AN_NFE)
	Non-Finnish European Heterozygous Count (Het_NFE)
	Non-Finnish European Homozygous count (Hom_NFE)
	Non-Finnish European Hemizygous Count (Hemi_NFE)
COSMIC Mutations Left Aligned 71 v2, GHI	Mutation ID
	Primary Site
	Site Subtype
	Primary Histology
	Histology Subtype
	Genome-wide Screen
	Mutation Zygosity
	Tumour Origin
P Functional Predictions and Scores 3	PROVEAN Pred
	VEST3 Score
	MetaSVM Pred
RefSeq Genes 105v2, NCBI	Gene Names
	Sequence Ontology (Combined)
	Effect (Combined)
	Exon Number (Clinically Relevant)
	HGVS c. (Clinically Relevant)
	HGVS p. (Clinically Relevant)

	Sequence Ontology (Clinically Relevant)
	Effect (Clinically Relevant)
COSMIC Cancer Gene Census 71, GHI	Somatic
	Germline
	Tumour Types (Somatic)
	Tumour Types (Germline)
	Cancer Syndrome
	Tissue Type
	Molecular Genetics
	Other Syndrome
dbSNP 147, NCBI	Identifier
	Variation Class (VC)
	1 kG Variant Frequencies (CAF)
UniProt Variants 2013-05-06, UCSC	Strand
	Diseases
ClinVar 2016-11-04, NCBI	HGVS g. Name
	Clinical Allele
	Clinical Channels
	Allele Origin
	Clinical Significance
	OMIM
	Disease Name
	ClinVar Review Status
dbscSNV Splice Altering Prediction	Ensemble gene
	ENS Func Con
	ENs IID
	Ada score
	RF score

След внимателно анализиране на резултатите, се разглеждат само сигурно патогенни варианти и такива с патогенна предикция при повече от 4 програми за предикция на новооткритите варианти.

3.9.2. Количествен анализ на резултатите от генната експресия чрез real time-qPCR.

Количественият анализ се състои в измерване на количеството на РНК молекула, която е от интерес по време на циклите на амплификация. Това се осъществи с помощта на софтуер SDS v.2.2.2, който е предназначен за използване с 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific, Масачузетс, САЩ). За оценка нивата на относителна или релативна експресия на желаната молекула се използва $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метод. За всяка изследвана молекула, която представлява интерес (таргет) се изчислява:

$$\Delta Ct = Ct (\text{таргет}) - Ct (\text{ендогенна контрола})$$

Стойността за Ct за едногоенна контрола се определя от софтуерът за генът RNU6-2 и АСТВ, които са подходящи ендеогенни контроли, тъй като показват минимални вариации между отделните проби. Това се прилага с цел по-точна количествена оценка на РНК-а молекули, като така се компенсират разлики в тоталната РНК, добавена към реакцията. За всяка група се изчислява:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{експ.гр.}) - \Delta Ct (\text{контр.гр.})$$

Накрая за всеки таргет се калкулира колко пъти е променена експресията (fold change; FC или Relative Quantification; RQ) на експерименталната в сравнение с контролната група или проба. Прилага се формулата:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ако последната стойност е ≥ 2.000 тя се представя като повишена промяна в експресията (overexpression; upregulation) на съответния таргет. Ако е < 0.500 се наблюдава понижена експресионна стойност (underexpression; downregulation). Стойности между 1.99 и 0.5 се приемат без промяна в експресионните нива.

Методът дава възможност за сравнение на няколко групи проби включени в дисертационния труд: Туморни тъканни проби и кореспондиращите им нормални тъкани проби, както и плазмени проби от включените в изследването, които се сравняват с плазмени проби от доброволци. В този случай ΔCt стойностите, за контролната група (доброволци) се използват, за да се сметне средно аритметична ΔCt , която послужи за пресмятането на относителната експресия на маркерите.

3.9.3. Статистически методи

Статистическият анализ на данните бе осъществен посредством готов статистически програмен пакет SPSS v23.0 (IBM, SPSS, САЩ) и софтуерната програма R v.3.5.1 (MathSoft, САЩ).

3.9.3.1. Описателна статистика (Descriptive statistics)

Описателната статистика произвежда всеобхватна обобщена статистика за променливи и изчислява стандартизирани стойности (z scores).

Дисперсия: Статистика, която измерва вариациите в данните; включва стандартното отклонение, дисперсии, размах, минимални и максимални стойности и стандартна грешка при средното число.

Средно аритметично (Mean): измерител на централната тенденция

Медиана (Median): значението, което има единицата заемаща централно положение в подредения възходящо или низходящо ред, т.е. 50% от значенията са до стойността на медианата.

Мода (Mode): най-често срещаното значение

Стандартно отклонение (Standard deviation): Измерва дисперсията около средното. σ – мярка за разсейването и показва доколко е единодушна получената средна оценка, т.е. доколко близо или далеч от средната оценка се намират отделните значения. Много често в практиката се използва втората степени на стандартното отклонение σ^2 (даричана дисперсия).

Размах: Разликата между най-големите и най-малките стойности на числена променлива, максималната стойност минус минималната.

Минимална стойност (Min): Най-малката стойност на числена променлива.

Максимална стойност (Max): Най-голямата стойност на числена променлива.

S.E. mean: Измерва колко средното число може да варира от извадка до извадка, взети от едно и също разпределение.

3.9.3.2. Предварително изследване на данните (Explore)

Процедурата Explore създава обобщена статистика и графично представяне за всички случаи или за отделни групи от случаи. Explore позволява да се направи проверка на данните за необичайни и екстремни стойности, пропуски в данните или други особености. Exploring на данните може да помогне да се определи дали статистиките, които се използват за анализ на данните са подходящи. Изследването може да покаже, че данните трябва да се трансформират ако техниката изисква нормално разпределение. Или пък може да има нужда от непараметрични тестове.

3.9.3.3. Статистическа проверка на хипотези

В практиката много често е необходимо не само да се опишат получените данни, но и тяхното съпоставяне. Методите, с които могат да се отговори дали наблюдаваните

разлики са значими, т.е. да надхвърлят рамките на грешката, се наричат тестове за хипотези. Хипотезата е предположение за стойностите на изучаваните параметри на съвкупността.

Проверката на хипотезата преминава през следните основни етапи:

Дефиниране на хипотезата, според която разликите между сравняваните стойности на параметрите е случайна. Тази хипотеза се нарича нулева и се записва: $H_0: X_1=X_2$

Хипотезата, която се противопоставя на нулевата хипотеза се нарича алтернативна. Според нея разликата е статистически значима. Бележи се с $H_1: X_1 \neq X_2$ при сложна хипотеза и $X_1 < X_2$ или $X_1 > X_2$ при проста. Начина на дефиниране на алтернативната хипотеза, като сложна или проста, определя с каква критична зона се работи, съответно двустранна (2-tailed) или единична (1-tailed).

Проверката на хипотеза се основава на ограничена информация (тази в извадката) и следователно заключенията не могат да бъдат категорични, но теорията на статистическите заключения дава възможност рискът от грешката да бъде оценен. Възможните грешки са две:

- Да се отхвърли H_0 , когато тя е вярна, наричана грешка от I род или α грешка.
- Да се приеме H_0 , когато тя не е вярна, наричана грешка от II род или β грешка.

Вероятността да бъде допусната α грешка се нарича равнище на значимост и се задава от изследователя. В повечето изследвания се работи с $\alpha=0.05$. В области, където последиците от направените изводи са от решаващо значение се работи с $\alpha=0.01$.

Избор на тест за проверка на хипотезата в зависимост от:

- Равнището на измерване (вида на скалата) – непараметрични тестове при слаби скали (номинални и ординални) и параметрични тестове при силни скали (интервални – количествени променливи);
- Формата на разпределение на съвкупността – параметричните методи имат изисквания към формата на разпределение (изисква нормално разпределение), докато при непараметричните тя е без значение;
- Зависими или независими са извадките, от които се получават сравняваните параметри.

Статистическо заключение, извършва се на основата на сравнение на изчисленото от софтуерната програма (SPSS v23) гранично равнище на значимост (Asymp. Sig.) и фиксираното от изследователя, обикновено 0.05:

- Ако $\text{Sig} > \alpha = 0.05 \Rightarrow H_0$, т.е няма разлика между сравняваните характеристики (параметри).
- Ако $\text{Sig} < \alpha = 0.05 \Rightarrow H_1$, т.е. има (статистически значима) разлика.

Тестовите, които бяха използвани за проверка на разпределението на данните бяха One-Sample Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk. One-Sample Kolmogorov-Smirnov – непараметричен метод за проверка за съгласуваност между емпирично и теоретично разпределение (нормално, равномерно, поасоново, експонциално). Shapiro- Wilk тест е подходящ за проверка на разпределението при брой на проби по-малко от 50, а не е

подходящ при проби с много еднакви стойности. Shapiro-Wilk е специфичен тест за нормалност, докато Kolmogorov-Smirnov е по общ и статистически по-слаб тест (което означава, че правилно отхвърля нулевата хипотеза за нормалност по-рядко). Kolmogorov-Smirnov е подходящ за проверка на разпределението на данни при по-големи извадки.

Избор на параметричен или непараметричен статистически тест

Статистическите тестове се разделят на две големи групи: параметрични и непараметрични тестове, между които има две важни различия.

1. Първото различие е, че за да се използват параметричните статистически тестове е необходимо да са изпълнени определени допълнителни условия за данните, наречени предпоставки.

2. Второто различие е, че ако предпоставките са изпълнени, параметричните тестове винаги ще са по-мощни от колкото непараметричната им алтернатива. Ето защо параметричните тестове имат по-голям шанс да открият статистически значимото различие на ефекта на независимата променлива върху зависимата, ако нулевата хипотеза H_0 не е вярна в случаите, когато наистина има такъв ефект.

Параметричните тестове се използват с данни:

1. Измерени само с интервална или пропорционална скали
2. И за които са изпълнени допълнителните условия, наречени предпоставки. За параметричните тестове, които са разгледани в учебника, изискват да са изпълнени две предпоставки:

а) хомогенност на дисперсиите за всяка изследвана група;
б) нормално разпределение на стойностите на променливата за всяка изследвана група.

Ако те не са изпълнени вероятността p , с която се асоциират изчислените стойности и която се използва при проверка на нулевата хипотеза H_0 се смята за приблизителна, а не за точна стойност. Съответно изводът, че нулевата хипотеза H_0 е вярна с вероятност 0.05 може да е подвеждащ (неточен).

Параметричните тестове се използват само с данни, измерени с интервална или пропорционална скала само ако двете предпоставки за тях: хомогенност на дисперсията и нормалното им разпределение са приблизително изпълнени. Нарушението на двете предпоставки на параметричните тестове води до увеличаване на вероятността да се допусне грешка от първи род. Нарушенията са особено сериозни при:

1. малка извадка;
2. силно неравенство на размера на извадките за всяка група;
3. различие във формата на разпределението за всяка от групите.

Ако изследователят не е убеден дали може да се използват параметричните тестове е по-добре да се използва непараметричната им алтернатива

3.9.3.4. χ^2 -квадрат

χ^2 -квадрат методът е пригоден за изследване на връзки от корелационен тип. Чрез този метод се търси отговор на въпроса, доколко предполагаема зависимост (връзка) съществува обективно, неслучайно и се проявява като такава сред изследвана съвкупност от единици. Методът е конструиран така, че се основава на сравнението на две разпределения. Едното-емпирично, такова, каквото се наблюдава в действителността, а другото-теоретично, каквото бихме имали, ако между изследваните явления не съществува обективно връзка. От съпоставянето на тези две разпределения се изгражда критерий, въз основа на който се проверява наличието на изследваната предполагаема връзка.

Особености и ограничителни условия при приложение на χ^2 -квадрат метода.

-методът показва само дали съществува дадена предполагаема връзка, но не може да даде отговор на въпроса, дали тя е от причинно-следствен или има друг характер. Нито пък да определи каква е посоката на връзката. Отговорите на тези въпроси се търсят въвн от метода, с допълнителен анализ.

-при практическото провеждане на хи- квадрат метода винаги съществува възможност една връзка да се докаже като обективно съществуваща, колкото и слаба да е тя. Логическото обяснение на тази особеност трябва да се търси въвн факта, че отхвърлянето на една хипотеза зависи главно от две неща: първо от силата, с която си взаимодействат явленията (ако такова взаимодействие съществува); второ от условията, при които се осъществява проверката- преди всичко от обема на извадката (броя на изследваните случаи) и от избраните рискове за грешки. С увеличаване обема на извадката се свързва възможността за компенсиране на случайните влияния и открояването на преден план на закономерното (неслучайното). А това създава предпоставки за отхвърляне на нулевата хипотеза, когато тя не е вярна. В същата посока действа и силата на изследваната връзка. Колкото по-тясна е връзката между изследваните две или повече явления, толкова по-малки са ефектите от влиянието на случайните фактори. Толкова по- голяма е и вероятността да бъде потвърдено предположението за наличие на закономерна (неслучайна) връзка. Когато една връзка е силна дори и при малки по обем извадки обективността на съществуването ѝ ще бъде доказано, и обратно. Когато броят на наблюдаваните случаи нарасне и стане достатъчно голям, винаги съществува вероятност една връзка да се докаже като обективно съществуваща, колкото и слаба или незначителна да е тя. Именно в това се крие причината сам по себе си χ^2 -квадрат методът да не може да оценява теснотата на изследваната връзка или силата на взаимодействие между явленията.

- както при всяка проверка на хипотези, така и при χ^2 -квадрат метода изходните данни за анализа трябва да бъдат събрани чрез представителна извадка. Това изискване се свързва: първо с възможността да бъдат отчитани случайните и закономерните влияние; второ с използването на схоластичните разпределения като основа за проверката на хипотези и трето с вероятностния характер на статистическата проверка на хипотези.

- методът е приложим само в случаите, когато общият брой на изследваните случаи е не по малко от 50 и когато теоретично очакваният брой случаи в отделните клетки на таблицата е не по-малък от 5. Тези ограничения се свързват с осигуряването на достатъчно приближение на емпиричната характеристика на хипотезата. В редица случаи тези ограничения са твърде строги и не позволяват или затрудняват в голяма степен прилагането на метода. Като изход от ситуацията, когато не е налице второто изискване, се предлага обединяването на два съседни реда или две съседни колони. Всичко това обаче води до загуба на информация, като проблемът особено се изостря при малки по обем извадки.

- методът е приложим само в случаите, когато в изходните клетки на таблицата броят на случаите е даден като абсолютна величина. χ^2 -квадрат не може да бъде оценен от относителни честоти.

3.9.3.5. Параметрични методи

3.9.3.5.1. Т тест

Бяха използвани три вида Т тестове:

Т-тестове за независими извадки (т тестове на две извадки; Independent-samples t test; two-sample t test). Сравнява средноаритметичните на една променлива за две групи от случаи. Предоставени са дескриптивна статистика за всяка група и теста на Левен за равностойност на дисперсиите, както и равна и различна дисперсия на т стойностите и 95% доверителен интервал за разликата в средноаритметичните.

Свързани извадки за т тестове (Зависими т тестове; Paired-samples t test; dependent t test). Сравнява средните на две променливи за една група. Този тест е също и за съвпадащи си двойки или модели на case-control study. Резултатът включва дескриптивни статистики за променливите в теста, корелацията между променливите, дескриптивната статистика за двойките разлики, т теста и 95% доверителен интервал.

Едноизвадков т-тест (One-sample t test). Сравнява средноаритметичната на една променлива с известна стойност или хипотеза за стойността. Дескриптивни статистики за променливите в теста се показват заедно с теста. 95% доверителен интервал за разликата между средноаритметичната и променливата на теста и хипотезата за стойността на теста е част от резултата по подразбиране.

3.9.3.5.2. Едномерният еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA от англ. ANalysis Of VAriance)

Дисперсионният анализ (или ANOVA от англ. ANalysis Of VAriance) е метод използван в статистиката за проверка на хипотези за равенство между повече от две средни. Чрез тази проверка на хипотези може да се прецени доколко влиянието на даден фактор-причина или на група фактори-причини е статистически значимо или не. По този

начин дисперсионният анализ се отнася към методите за изследване на връзки и зависимости. Този метод е най-подходящ за използване, когато значенията на признака-фактор са представени на слабата скала (обикновено номиналната), а значенията на резултативния признак – са на силната скала, т.е. имат числов израз.

Чрез дисперсионния анализ може само да се установи дали между изследваните явления (признаци) съществува зависимост, но не може да се измери теснотата или силата на зависимостта, както и нейната посока. За да се приложи дисперсионният анализ, е необходимо да бъдат изпълнени следните условия:

- необходимо е да се направи анализ с цел да се установи кои признаци са взаимно свързани, кои са фактори и кои са резултати;
- разпределението на единиците в генералната съвкупност по резултативния признак, от който са излъчени извадките, трябва да е нормално или близко до нормалното;
- извадките, излъчени от генералната съвкупност трябва да имат равни (еднакви) дисперсии;
- данните, които се използват при дисперсионния анализ, са излъчени от независими случайни извадки;
- при изследване на влиянието на даден фактор има възможност да се контролират странични за изследваната връзка фактори.

3.9.3.6. Непараметрични методи

3.9.3.6.1. Mann-Whitney U test

Тестът на Ман-Уитни (Mann-Whitney U test) е подобен на t-теста за две независими извадки. Ако при t-теста се сравняват средноаритметичните стойности за двете групи то при теста на Ман-Уитни се сравняват техните медиани. За целта изходните стойности за интервалната променлива се преобразуват в рангове и след това тестът проверява дали ранговете за двете групи са статистически значимо различни. Всеки път, когато вместо изходните данни се анализират техните рангове няма значение какво е изходното им честотно разпределение.

Тестът на Ман-Уитни за равен обем на две извадки е предложен от ирландския химик и статистик Франк Уйлкоксън (Frank Wilcoxon, 1892-1965) през 1945 г. Той обаче носи името на американския статистик от австрийски произход Хенри Ман (Henry Mann, 1905-2000) и на неговия студент американският статистик Доналд Уитни (Donald Whitney), които през 1947 г. го разширяват.

Предпоставки за теста на Mann-Whitney U test

Тъй като тестът на Ман-Уитни е непараметричен към него няма изискване за нормално разпределение на зависимата променлива и равенство на дисперсиите за двете групи. Въпреки това обаче, за да се проведе тестът на Ман-Уитни трябва да са изпълнени следните две предпоставки:

1. Предполага се, че зависимата променлива е изградена от “ниски” към “високи” стойности преди те да се ранжират.

2. Данните от двете групи са независими. Както другите непараметрични тестове така и тестът на Ман-Уитни чрез ранговете на съответните наблюдения в двете независими извадки се проверява дали при наблюденията в едната извадка се наблюдава тенденция да имат по-големи стойности и съответно по-големи рангове в сравнение с наблюденията в другата извадка.

Статистическите хипотезите, които се проверяват с теста на Mann-Whitney са следните:

H_0 : Двете групи имат еднакво разпределение.

H_1 : Двете групи нямат еднакво разпределение.

Тестът на Mann-Whitney проверява за равенство на двете разпределения, а не за равенство в двете средноаритметични стойности както е при t-теста за независима извадка. При този тест се цитират медианите, а не средноаритметичните стойности.

3.9.3.6.2. Тест на Крушкел-Уолис (Kruskal-Wallis) за съпоставка на три или повече независими извадки

Тестът на Крушкел-Уолис (Kruskal-Wallis) е непараметрична алтернатива на еднофакторния дисперсионен анализ за съпоставка на три и повече групи и се разглежда като разширение на теста на Ман-Уитни (Mann-Whitney U test) за три и повече независими извадки (групи). Тестът на Kruskal-Wallis, както и тестът на Ман-Уитни, използва ранговете на наблюденията като се сравняват средноаритметичните стойности на ранговете за всяка група. Тъй като при теста на Kruskal-Wallis се прави анализ между групите (извадките), респондентите за всяка група трябва да са различни, т. е. Извадките да са независими. Тестът на Kruskal-Wallis се смята за еднофакторен дисперсионен анализ за ординални (рангови) данни. Тестът на Kruskal-Wallis е наречен на името на американския математик и статистик Уилям Крушкел (William Kruskal, 1919-2005) и на американския икономист и статистик Уилсън Уолис (Wilson Wallis, 1912-1998), които през 1952 г. го публикуват.

Предпоставките, които трябва да са изпълнени, за да се проведе тестът на Kruskal-Wallis са същите както и за теста на Mann-Whitney:

1. Предполага се, че зависимата променлива е изградена от “ниски” към “високи” стойности преди те да бъдат ранжирани.

2. Данните за всяка групи са независими.

Статистическите хипотезите, които се проверяват с теста на Kruskal-Wallis са следните:

H_0 : Няма различие в разпределението на групите.

H_1 : Има различие в разпределението на групите.

Тестът на Kruskal-Wallis проверява за равенство на разпределенията между групите (които са три и повече), а неравенство на средноаритметичните стойности за групите

както е при дисперсионния анализ. Ако тестът на Kruskal-Wallis е статистически значим, $p \leq 0.05$, означава, че има различие в разпределението на групите, които са три и повече. За да се установи обаче къде точно е различието, т. е. Кои групи са статистически значимо различни трябва да се проведат няколко допълнителни теста на Mann-Whitney по един за всяка двойка от групите като за целта се използва коригираната стойност на Бонферони (Bonferroni).

3.9.3.6.3. Тест на Уилкоксън (Wilcoxon) за съпоставка на две корелирани (свързани) извадки (групи)

Знаковият рангов тест на Уилкоксън (Wilcoxon signed ranks test) се използва при сравняването на:

1. свързани двойки;
2. когато отговорите на респондентите са измерени в два случая (Време 1 и Време 2);
3. при две различни условия (например: преди тест, след тест).

Той е непараметричната алтернатива на t-теста за корелирани извадки, който вместо да сравнява средноаритметичните преобразува стойностите на променливата в рангови и ги сравнява за Време 1 и Време2 или Уловие 1 и Условие 2. Тестът изчислява броя на позитивните и негативните разлики и взема решение на базата на броя и размера на тяхното различие. Абсолютната стойност на различието между съответните двойки в двете извадки се ранжира от най-малко до най-голямо и тогава сумата на ранговете, които са асоциирани с позитивните разлики се сравнява със сумата на ранговете за отрицателните разлики. Тестът на Wilcoxon е наречен на името на ирландския химик и статистик Франк Уйлкоксън (Frank Wilcoxon, 1892-1965), който го развива през 1945 г.

Знаковият рангов тест на Wilcoxon предполага, че:

1. Разликите между ранговете са числови данни.
2. Разпределението на разликите е симетрично.

Хипотезите, които се проверяват със знаковия рангов тест на Wilcoxon са следните:

H_0 : Вероятността на положителните разлики е равна на вероятността на негативните разлики.

H_1 : Вероятността на положителните разлики не е равна на вероятността на негативните разлики.

3.9.3.7. Корелационен анализ

Една от основните задачи на статистиката е изследването на връзката между случайни променливи. Корелационният анализ се прилага за описание на силата и посоката на зависимост между променливи величини. Коефициентите на корелация са статистическата мярка, представяща зависимостта между две случайни променливи.

Според измерителната скала, в която са изразени променливите величини, се ползват различни коефициенти на корелация.

Сила на зависимостта

Абсолютната стойност на коефициентите на корелация е в границите от 0 до 1. Интерпретацията на стойността на корелационния коефициент (силата на зависимост) е до известна степен произволна. Тя зависи от свойствата на изучаваното явление и обикновено се извършва в контекста на корелиращите се променливи. Независимо от това, съществуват някои емпирични правила, които могат да се използват при интерпретацията на коефициента на корелация:

- ♥ при стойност 0 – липсва зависимост;
- ♥ до 0.3 – зависимостта е слаба;
- ♥ от 0.3 до 0.5 – умерена зависимост;
- ♥ от 0.5 до 0.7 – значителна зависимост;
- ♥ от 0.7 до 0.9 – силна зависимост;
- ♥ над 0.9 – много силна зависимост;
- ♥ при 1.0 – зависимостта е функционална.

Посока на зависимостта

- Ако коефициентът на корелация е положително число, зависимостта е положителна, възходяща – на по-големи стойности на едната променлива, съответстват по-големи стойности на другата променлива.
- Ако коефициентът на корелация е отрицателно число, зависимостта е отрицателна, низходяща – на по-големи стойности на едната променлива съответстват по-ниски стойности на другата променлива.

3.9.3.7.1. Коефициент на обикновена линейна корелация на Пирсън (Pearson; r)

Фундаменталното предположение, което стои в основата на корелационен коефициент, въведен от английския статистик Карл Пирсън е, че двете променливи са линейно свързани.

За да се определи корелационният коефициент, трябва да са налице подвойкови измервания на двете променливи върху едно и също множество от обекти. Корелационният коефициент на Pearson не може да бъде изчислен, ако по едната променлива са измерени обекти от една група, а по втората – от друга група, различна от първата. Освен това, корелационният коефициент е мярка за взаимовръзката между двете променливи само за разглежданата група обекти. Ако този коефициент се използва при нелинейна връзка, ще се получи занижена стойност на връзката. Затова преди да се изчисли и анализира коефициентът на корелация, би следвало да се построи и анализира диаграмата на разсейването. Тя ще покаже нагледно формата и посоката на връзката между двете променливи.

Коефициентът на корелация на Pearson изисква двете променливи да бъдат измерени в метрична скала. За променливи, измерени в номинална или рангова скала корелационният коефициент се пресмята по други начини, които са производни на формулата за Пирсъновия корелационен коефициент. Броят на измерванията, използвани за определяне на корелационния коефициент, не оказва влияние върху стойността на коефициента (с изключение на $n = 2$, когато двете точки определят права и в този случай $r = |1|$).

Статистическа значимост на коефициента на Пирсън (r)

Статистическата значимост на коефициента на Pearson се проверява като изчисленият извадков коефициент се сравнява с критичните стойности на коефициента на Pearson при дадено равнище на значимост (0,05 или 0,01) и степени на свобода $f = n-2$ (Приложение 1). Ако извадковият коефициент по абсолютна стойност е равен или по-висок от критичната стойност – коефициентът е статистически значим. В противен случай се приема, че проявата на зависимостта се дължи на случайни фактори и коефициентът не е статистически значим.

Корелацията е индикатор за силата на връзката между две променливи. Важно е да се отбележи, че тази връзка не е задължително да бъде причинно-следствена, т.е. стойностите на едната променлива да зависят или да са следствие от стойностите на другата. Причинността може да бъде разкрита само в контекста на конкретните променливи и не се разглежда от статистиката.

3.9.3.7.2. Рангова корелация на Спирман (Spearman's rho)

Корелационният коефициент r_s се нарича още коефициент на рангова корелация на Спирман (Spearman's rank-order correlation) или Спирман ро (Spearman's rho). Спирман ро мери силата на увеличението или намалението на връзката между две променливи като не се използват оригиналните данни, а те се ранжират и се анализират именно ранжираните данни. Както корелационният коефициент на Пирсън r , така и Спирман ро приема стойности от 1.00 – до 1.00 + и се интерпретира по сходен начин. Понякога има ситуации, когато и двата корелационни коефициента могат да се приложат. За предпочитане е да се използва Спирман ро пред корелационния коефициент на Пирсън r в следните два случая:

- когато данните на изследването съдържат аномални наблюдения или наблюдения, които имат необичайни стойности, но не могат да се отнесат към аномалните, тъй като корелационният коефициент на Пирсън r е силно чувствителен към такива наблюдения, неговата стойност може да е необосновано изместена вследствие на тези наблюдения. В такива случаи прилагането на Спирман ро, който използва ранговете на наблюденията, а не техните стойности дава ясна представа за силата на връзката, защото минимизира влиянието на екстремалните стойности.

- извадката е прекалено малка. Измерването на връзката между две променливи е за предпочитане при малка извадка и когато нормалното разпределение на една от променливите е под въпрос.

Използването на Спирман корелационния анализ е коректно, когато двете променливи са рангово скалирани признаци и/или едната променлива е рангова, а другата количествена. В такъв случай предварително е необходимо количествената променлива да бъде трансформирана в рангова скала.

Статистическа значимост на коефициентите на корелация

При статистически проучвания изследователят се интересува от проявлението на зависимостите между явленията. Информацията, с която разполага, обикновено се базира на данни от извадка, а това означава, че стойността на коефициента на корелация може да бъде повлияна от случайни фактори. Поради това се налага проверка на хипотезата за статистическата значимост на корелационния коефициент. Нулевата хипотеза гласи, че зависимост между изучаваните явления обективно не съществува, т.е. $r=0$, следователно емпиричният коефициент може да се счита за случаен. В случай, че стойността на изчисления по данни от извадката коефициент на корелация е по-малък от критичната стойност, за вярна се приема нулевата хипотеза, която твърди, че няма зависимост между променливите величини.

Коефициентът на Спирман има същото значение, каквото и коефициентът на Пирсон, но за рангови променливи.

3.9.3.8. Оценка на процента на фалшиво позитивни резултати (асоциации) при множествени сравнения: тест на Benjamini–Hochberg FDR

Множественият сравнителен анализ (корекция при множествени изследвания; correction for multiple testing) е процедура, с помощта на която се коригира стойността на величината p (p – value) получена при провеждане на голям брой аналогични статистически тестове. Прилагането на тази процедура има за цел да намали вероятността от възникване на грешка от тип I (α грешка или получаване на фалшиво позитивен резултат), изразяваща се в погрешно отхвърляне на нулевата хипотеза. Benjamini–Hochberg (BH) корекцията е модифициран вариант на корекцията на Бонферони (Bonferroni correction) и за разлика от нея не е толкова строга. При BH метода първоначално p стойностите се сортират и ранкират (определят им се места в редицата). Най-малката p стойност се определя като номер 1, следващата е номер 2, а най-високата p стойност се определя като N (където N е общия брой на p стойностите). След това всяка p стойност се умножава по N и се дели на своя определен номер като така се получава коригирана p стойност.

3.9.3.9. Регресионен анализ

Регресионният анализ е направление в математическата статистика, в което се изучават и оценяват възможните функционални зависимости между две или повече случайни величини. Основни въпроси са дали съществува функционална зависимост между две зависими случайни величини и ако да – да се намери функция, която да я

описва достатъчно точно. Връзката при регресионния анализ е корелационна, а не функционална, т.е. на едно X могат да се съпоставят едно или повече Y .

Регресионният анализ не дава отговор на въпроса какви са причините. Той показва взаимните отношения между променливите, които в контекста на разглежданата задача могат да бъдат интерпретирани като причинно-следствени. Предназначен е за решаване на общи задачи – относно вида на зависимостта, определяне функцията на тази зависимост, количествено определяне параметрите на избраната функция. Променливите, чиито вариации искаме да обясним или предскажем, се наричат зависими – това е следствието. Целите на регресионния анализ са да определи как и в каква степен зависимата променлива варира или се променя като функция от изменения на независимата променлива, която е причината.

Корелационният анализ показва взаимозависимост, а регресионният – причинно-следствени връзки между повече от две променливи. Може да приемаме повече променливи като независими и да търсим тяхното влияние върху една зависима. Изследователят определя кои променливи ще бъдат зависими и кои независими. Коэффициент на регресия обикновено се бележи с β .

При интерпретация, когато $\beta > 0$, повишаването на значението на едната променлива води до повишаване значението на другата. Важна е силата на тази връзка. Няма обратна възможност. Когато $\beta < 0$, повишаването на стойността на независимата води до понижаване на стойността на зависимата.

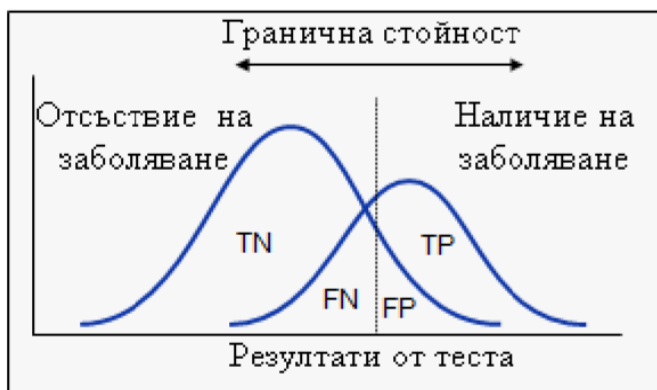
Ако между две случайни променливи съществува някаква връзка, то една от най-важните задачи на статистиката е да оцени тази връзка и да се определят характерът и формата на зависимостта. Въпросите, свързани със зависимостта между две случайни променливи, се изследват от два аспекта – от гледна точка на корелацията и на регресията. Корелацията описва степента на зависимост между двете променливи. Когато при изследване на зависимостта между две случайни променливи X и Y в резултат на корелационния анализ се установи, че зависимостта е статистически значима, може да се пристъпи към нейното математическо моделиране чрез прилагане на регресионен анализ. Регресията оценява стойността на едната променлива за даден елемент въз основа на знанията ни за стойността на другата променлива за същия елемент. Корелационната статистика отговаря на въпроса колко силна е зависимостта между двете променливи. Регресионната статистика дава отговор на въпроса какъв е характерът на зависимостта между тях. Регресията е широко използвана техника за анализ на ретроспективни и експериментални данни.

3.9.3.10. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностична точност на изследваните биомаркери

Диагностичната точност на даден биомаркер или точността на даден тест да разграничава пациентите със заболяване от тези без заболяване се определя с помощта на анализа на ROC кривите (Receiver Operating Characteristic curve). Анализът на ROC кривите може да бъде използван за сравнение на диагностичната точност на два или

повече лабораторни или диагностични тестове. С помощта на диагностичните тестове много рядко има абсолютно точно разделяне на групата пациенти със заболяването и групата пациенти (контроли) без заболяването.

За всяка възможна гранична стойност избрана за разграничаване на двете групи винаги ще има правилно класифицирани пациенти със заболяването, като това са истински позитивни резултати на теста (TP - True positive fraction), но някои пациенти със заболяването няма да са класифицирани правилно и това са фалшиво негативни резултати (FN - False Negative fraction). Това е представено на Фигура 3.10.



Фигура 3.10.

От друга страна някои пациенти без заболяването ще бъдат коректно класифицирани (истински негативни резултати: TN- True Negative fraction), но други ще бъдат класифицирани като пациенти със заболяване (фалшиво позитивни резултати: FP- False Positive fraction).

Въз основа на получените резултати се изчисляват: специфичността, чувствителността, позитивна предиктивна стойност (PPV), негативна предиктивна стойност (NPV) и др. Чувствителността показва възможността резултатът от теста да е позитивен, когато заболяването присъства (честотата на истинските позитивни резултати, представя се в %). Чувствителността се определя като: $TP/(TP+FN) = a/(a+b)$. Специфичността показва вероятността резултатът от теста да е негативен, когато заболяването не присъства (честотата на истински негативните резултати, представя се в %). Специфичността се определя като: $TN/(TN+FP)=d/d+c$ PPV представлява вероятността заболяването да присъства, когато тестът е положителен. PPV се определя като: $TP/(TP+FP)=a/(a+c)$ NPV показва вероятността заболяването да отсъства, когато резултатът е негативен. NPV се определя като: $TN/(TN+FN)=d/(d+b)$.

При избор на високи гранични стойности на теста (биомаркера), то фалшиво позитивните резултати намаляват с увеличаването на специфичността, но в същото време чувствителността (истински позитивните резултати) се понижава. При избор на по-ниска гранична стойност се повишава чувствителността, но се увеличат фалшиво позитивните резултати и по тази причина специфичността намалява (Фигура.3.11.).



Фигура.3.11. Зависимост на специфичността и чувствителността от избора на гранична стойност

ROC кривите представляват графични диаграми, илюстриращи изпълнението на бинарна класификаторна система при вариране на дискриминираща гранична стойност. Кривата се създава чрез представяне на честота на истински позитивни резултати (чувствителност) по оста y срещу честота на фалшиво позитивни резултати (специфичност) по оста x при различни стойности на теста (биомаркера). ROC кривите, съответстващи на високо дискриминативни диагностични тестове се локализират в близост до горния ляв ъгъл на диаграмата. ROC кривите, лежащи на диагоналната референтна линия принадлежат на диагностични тестове с ниска диагностична точност.

Площта под кривата - AUC (Area Under the Curve) е ефективна и комбинирана стойност на чувствителността и специфичността, която показва валидността на диагностичните тестове. AUC се изчислява с помощта на непараметричен Mann-Whitney U тест. Максималната стойност $AUC=1$ означава, че диагностичния тест прави перфектна дискриминация между болни и здрави. Това се получава, когато разпределенията на резултатите от теста на болните и здравите не се припокриват. $AUC=0.5$ означава, че диагностичния тест е толкова точен, колкото и определянето на диагноза на случаен принцип. При $AUC=0$ тестът неправилно определя всички здрави като болни, а всички болни като здрави, но това е малко вероятно да се случи в клиничната практика.

3.9.3.10.1. Мултмаркерен анализ на ROC кривите

За да определим дали диагностичната точност се подобрява при използване на комбинации от биомаркери проведехме мултмаркерен анализ на ROC кривите. Това бе осъществено с помощта на предварително изчисляване на коефициенти, определящи тежестта на всеки един от маркерите и даващи най-голяма площ на кривата при ROC curve анализа. Методът на изчисляване на коефициентите е описан от Pepe и Thompson(2000) (245).

3.9.3.11. Статистичеки пакети използвани с програма R

За визуализиране на корелационния анализ с програмата R беше използван следния пакет (E8):

Alboukadel Kassambara (2019). ggcorrplot: Visualization of a Correlation Matrix using 'ggplot2'. R package version 0.1.3.
<https://CRAN.R-project.org/package=ggcorrplot>

A BibTeX entry for LaTeX users is

```
@Manual{,  
  title = {ggcorrplot: Visualization of a Correlation Matrix using 'ggplot2'},  
  author = {Alboukadel Kassambara},  
  year = {2019},  
  note = {R package version 0.1.3},  
  url = {https://CRAN.R-project.org/package=ggcorrplot},  
}
```


ЧАСТ 4

РЕЗУЛТАТИ

Набирането на пациентите и изследването на биологичния материал се основава на колаборацията между Център по Молекулна Медицина, Катедра Медицинска Химия и Биохимия и Клиника по Ушни, Носни и Гърлени Болести, Катедра по Ушни, Носни и Гърлени Болести към Медицински Факултет, Медицински Университет-София.

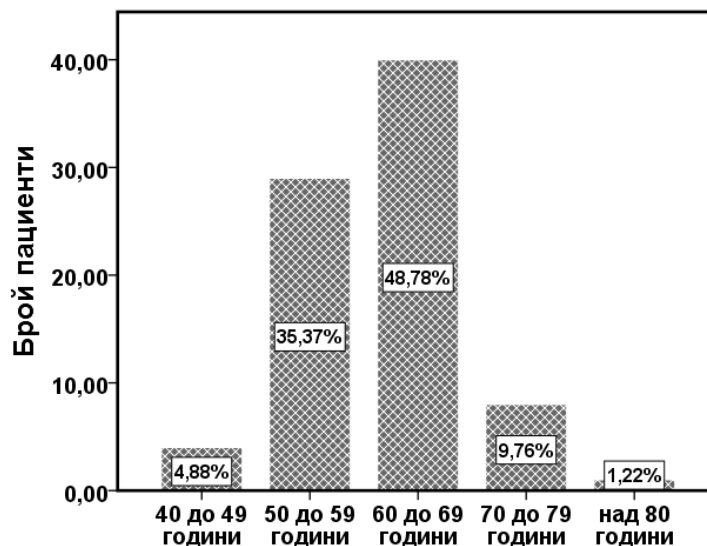
Разработването на настоящия дисертационен труд има тенденция да разшири и надгради постигнатото до настоящия момент между двата екипа.

4.1. Демографска и клинична характеристика на изследваната група

В настоящото проучване са включени 82 пациента, с патохистологично доказан плоскоклетъчен карцином на ларинкса. Средната възраст на извадката е 61 ± 7.17 години, като най-младия участник е на 41 години, а най-възрастния участник е на 84 години (Таблица 4.1.). С най-голям относителен дял са пациентите в декадата от 60 до 69 години (48.78%), следвани от пациентите на възраст между 50 и 59 години (35.37%), съответно тези между 70 и 79 години (9.76%), между 40 и 49 години (4.88%) и един пациент над 80 години (1.22%) (Фигура 4.1.).

Таблица 4.1. Дескриптивни характеристики

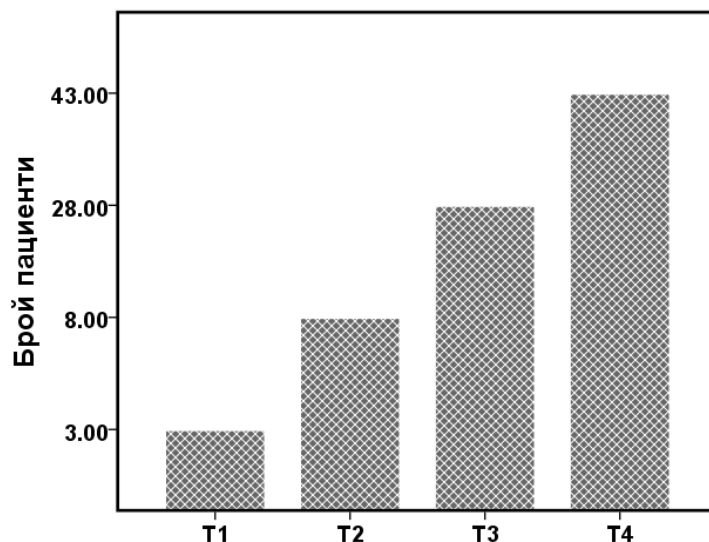
	N	Вариация	Най-млад пациент	Най-възрастен пациент	Средна възраст	Стандартна девиация
Възраст	82	43.0	41.0	84.0	61.06	7.17



Фигура 4.1. Разпределение на пациентите по възрастови групи

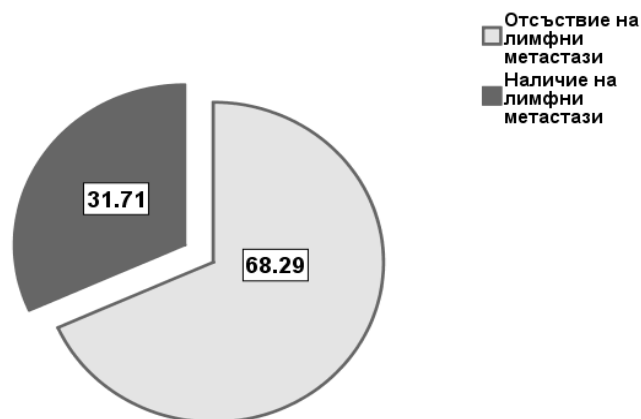
Кохортата включва 4 (4.88%) пациента от женски пол и 78 (95.12%) пациента от мъжки пол. Разпределението според T класификацията е както следва: стадий T1-3 пациента (3.66%); T2-8 пациента (9.76%); T3-28 пациента (34.15%); T4-43 пациента

(52.45%) (Фигура 4.2.). Поради ограничената бройка пациенти в групите T1 и T2, те са обединени като една група при част от статистическите анализи на получените резултати.



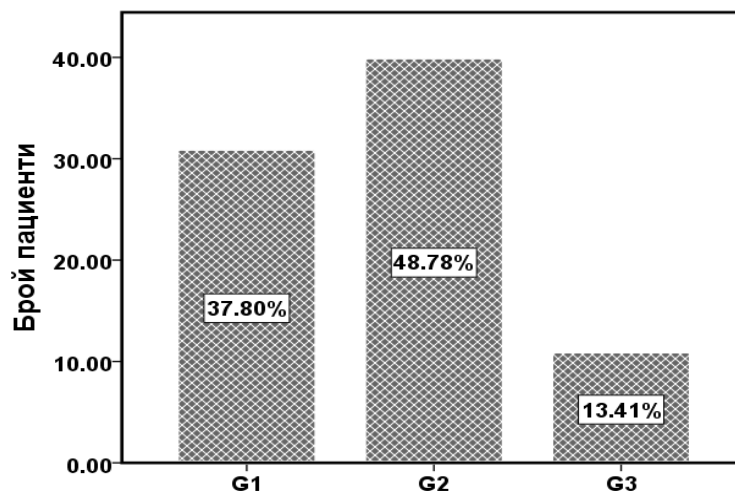
Фигура.4.2.Разпределение на пациентите според T стадирането.

Хистологично проверени метастази в лимфните възли са били налични при 26 пациенти (31.71%) по време на операцията. На Фигура 4.3. е представено процентното разпределение на пациенти с и без лимфни метастази. Всички пациенти, които са положителни за лимфни метастази са с доказан патохистологично стадий T4, като изключение правят двама, които са стадий T3.



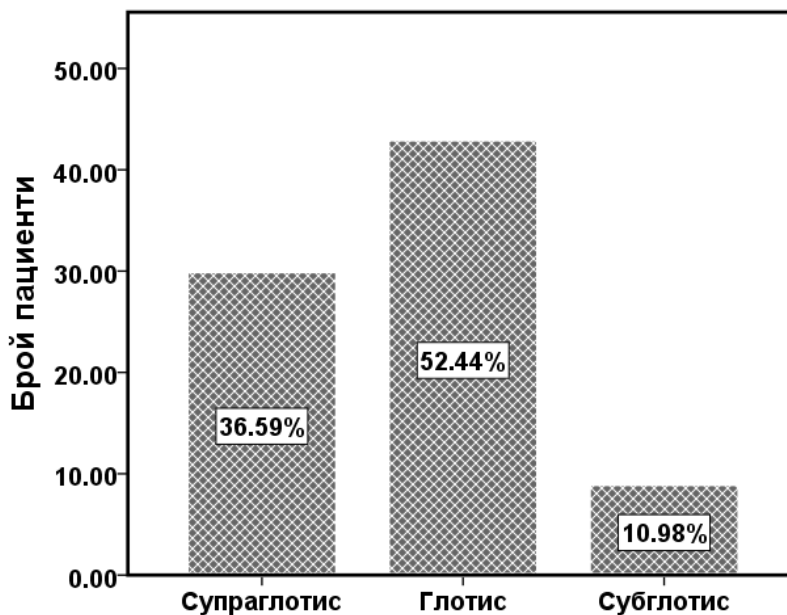
Фигура 4.3. Разпределение на пациентите според наличие на лимфни метастази.

По-голямата част от пациентите са с добро и умерено ниво на диференциране на туморната формация (G1 - 31 пациенти; 37.80% и G2 - 40 пациенти; 48.78%), докато ниско диференцираните туморни проби (G3) се откриват при 13.41% (11 пациенти) (Фигура 4.4.).



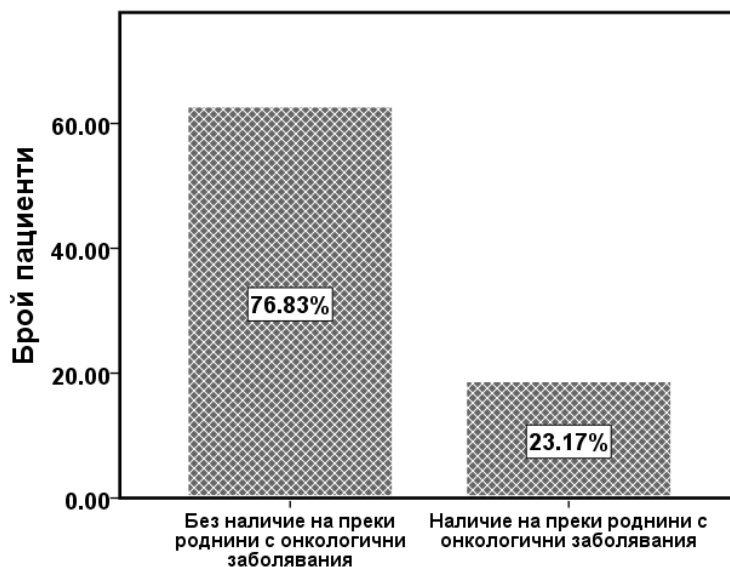
Фигура 4.4. Разпределение на пациентите според степента на диференциране на тумора

Разпределението на ларингеалните злокачествености според тяхната локализация е както следва: глотис—43 пациента (52.44%); супраглотис-30 пациента (36.59%) и субглотис-9 пациента (10.98%) (Фигура 4.5.).



Фигура 4.5. Разпределение на пациентите според локализацията на туморното образувание.

Не малък процент от пациентите, 23.17% (n=19) докладват положителна фамилна история, свързана с наличие на други онкологични заболявания на роднини по пряка линия. Сред докладваните заболявания са рак на устните, щитовидната жлеза, ларинкса, белите дробове, дванадесетопръстника, гърдата, пикочния мехур, бъбреците, матката, простатата, дебелото черво, стомаха и левкемия (Фигура 4.6.).

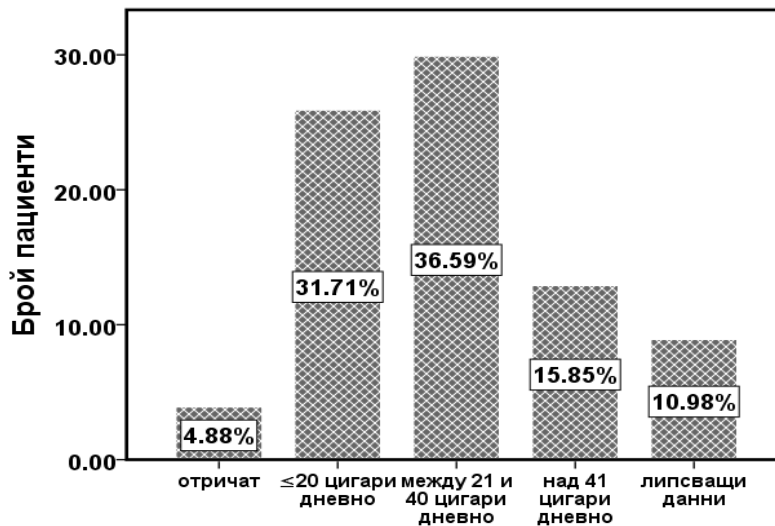


Фигура 4.6. Разпределение на пациентите според наличие или отсъствие на преки роднини с онкологични заболявания.

4.2. Вредности при изследваната група пациенти

Само четирима пациента (4.88%) отказват да докладват употреба на тютюневи изделия, а 13 (15.85%) пациента отказват да докладват консумация на алкохолни напитки.

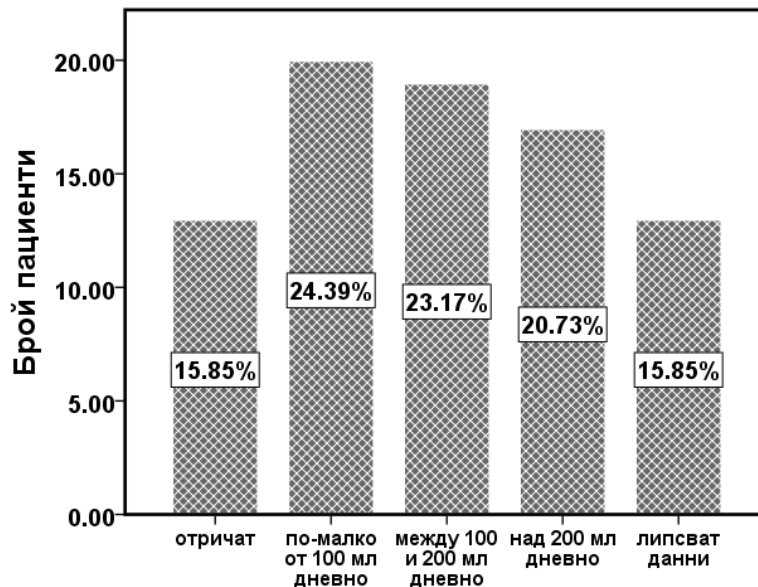
Разпределението на пациентите според броя цигари, които са употребявали и количеството алкохол, което са консумирали на ден е представено на Фигура 4.7. и Фигура 4.8.



Фигура 4.7. Разпределение на пациентите според броя тютюневи цигари употребявали дневно.

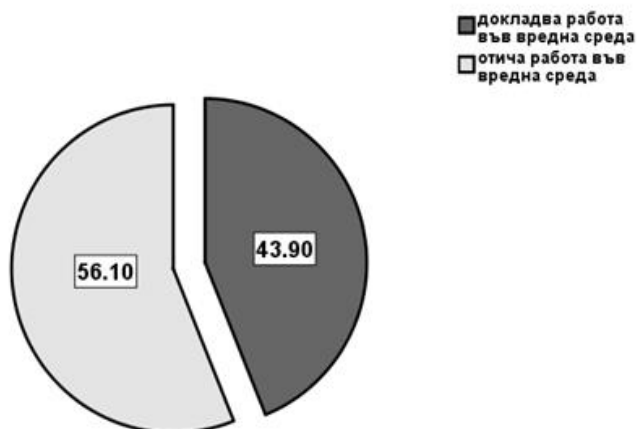
Средното количество изпушени цигари е 54.23 картоно-години (± 31.14 години), което се равнява приблизително на почти 20 000 изпушени кутии цигари. Картоно-годините представляват годините, на които се равнява изпушеното количество цигари, при условие, че пациентът би пушил по 1 кутия цигари на ден. Най-тежкият пушач от кохортата има изпушени 132 картоно-години, т.е. пациентът до момента на операцията е изпушил приблизително 48 180 кутии цигари.

Разпределението на броя пациенти във всяка от групите (<100мл; между 100 и 200мл и >200мл) докладвали консумация само на твърд алкохол е сравнително равномерно, като средното количество твърд алкохол, което е консумирано е 190.82мл (± 112.00 мл). Шест от пациентите докладват системна консумация на алкохолен концентрат (над 200мл дневно) в комбинация с нискоалкохолни напитки над 500мл дневно (вино, бира и др.).



Фигура 4.8. Разпределение на пациентите според количеството твърд алкохол, което са консумирали дневно.

Тридесет и шест (43.90%) пациента докладват настояща или предходна работа във вредна околна среда. Сред вредностите на работната околна среда, на които са били изложени докладващите участници в изследването са строителни дейности, дървообработване, металургия, фотографска лаборатория (излагане на химикали), заварски, зидарски, миньорски дейности, пътно строителство (асфалт), стъкларница (излагане на масла, прах, висока температура), леярнен цех, циментово производство, излагане на ацетон, лакове, работа в „Лукойл Нефтохим Бургас“ АД (за 18 месеца) (Фигура 4.9.).

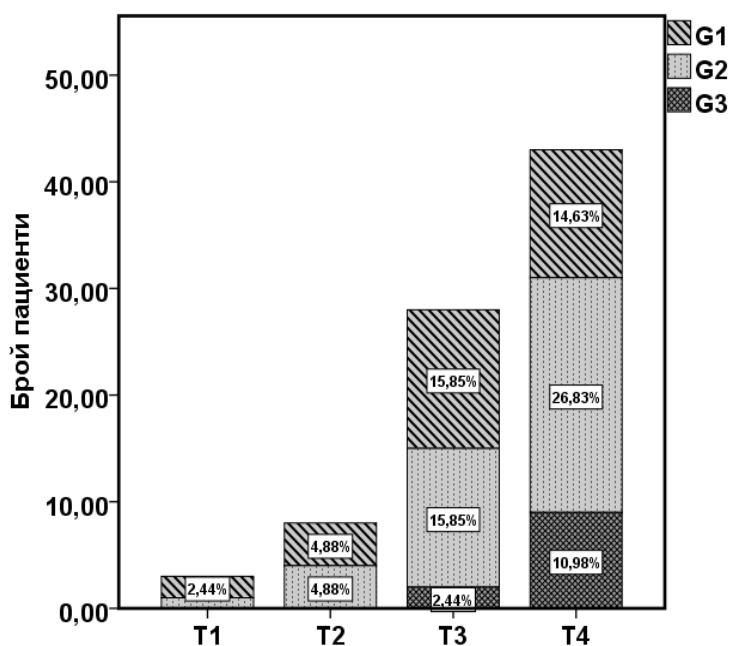


Фигура 4.9. Разпределение на пациентите според работна вредна среда.

4.3. Клинико-патологични корелации при изследвания контингент

4.3.1 Клинико-патологични корелации свързани с туморния стадий на заболяването

На Фигура 4.10. е представено разпределението и сравнението броя пациенти с добре диференциран (G1), умерено диференциран (G2) и ниско диференциран (G3) ларингеален тумор според тяхното групиране по туморния стадий (Т стадий). Туморните образувания на пациентите с ранен туморен стадий T1 и T2 се разпределят само на добре и умерено диференциран тумор. Забелязва се, че при пациентите, диагностицирани в туморен стадий 3 разпределението на G1 и G2 е равно (n=13; 15.85%), а G3 заема много малка част от 2.44% (n=2). Докато при пациенти с T4, слабо диференцираните тумори заемат не малка част от близо 11% (n=9; 10.98%). Използваните статистически анализи за сравнение на разпределението на диференцирането на тумора според туморния стадий бяха Kruskal Wallis и ANOVA, като резултатите не достиганата статистическа значимост, но показаха тенденция за взаимовръзка между двете величини. Въпреки получените резултати се достигна до статистическа значима корелация с $r_s=0.275$ ($p=0.012$), което показва положителна посока на зависимостта (Таблица 4.2.).



Фигура 4.10. Разпределение на броя и процента пациентите спрямо диференциацията на туморното образувание и Т-стадия.

Таблица(и) 4.2. Резултати от проведените статистически тестове показващи връзката между туморния стадий и диференциацията на туморното образуване (Kruskal Wallis, ANOVA и корелация на Spearman).

	Т стадий	N	Mean Rank
G стадий	T1	3	27,83
	T2	8	33,75
	T3	28	36,84
	T4	43	46,93
	Total	82	

	G стадий
Chi-Square	6,214
df	3
Asymp. Sig.	,102

a. Kruskal Wallis Test

b. Групираща
променлива: Т
стадий

ANOVA

G стадий

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,986	3	,995	2,274	,086
Within Groups	34,136	78	,438		
Total	37,122	81			

Correlations

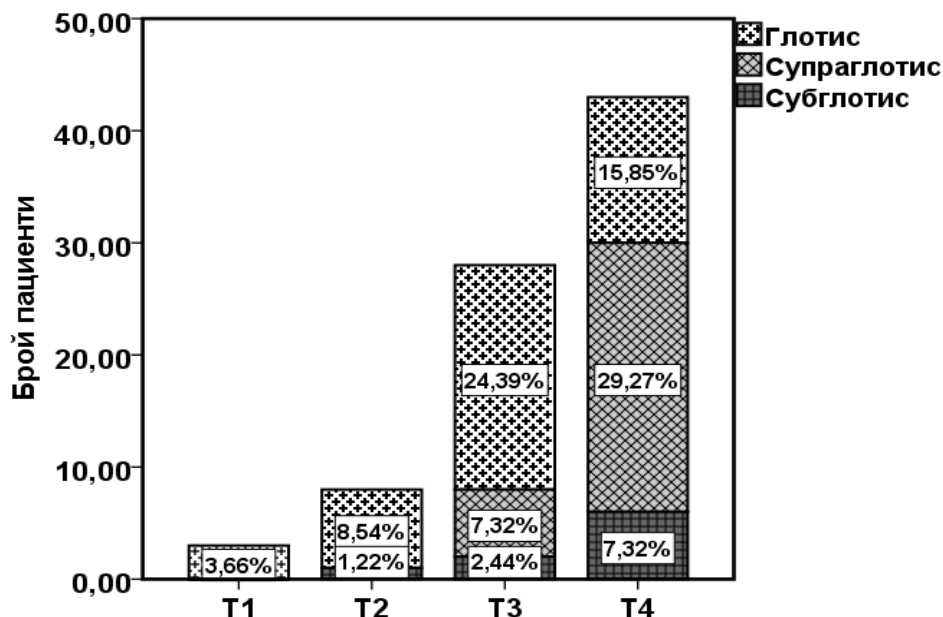
			Т стадий	G стадий
Spearman's rho	Т стадий	Correlation Coefficient	1,000	,275*
		Sig. (2-tailed)	.	,012
		N	82	82
	G стадий	Correlation Coefficient	,275*	1,000
		Sig. (2-tailed)	,012	.
		N	82	82

*. Значимост на корелацията при ниво на значимост 0.05 (2-tailed).

При сравнение на разпределението на локацията на туморното образуване според туморния стадий се установи, че глотисните ларингеални тумори се наблюдават сравнително по-често при Т3 стадий (n=20; 24.39%), докато супраглотисните ларингеални тумори са диагностицирани по-често в Т4 туморен стадий (n=24; 29.27%). Голяма част от

субглотичните ларингеални тумори са също открити в Т4 стадий (n=6; 7.32%) (Фигура 4.11.).

От проведените статистически тестове се установи статистически значима връзка между локацията на тумора и туморния стадий, както и положителна корелация между двете групи ($r_s=0.441$, $p<0.001$) (Таблица(и) 4.3.).



Фигура 4.11. Разпределение процента на пациентите според локализацията на тумора и Т-стадия

Таблица(и) 4.3. Резултати от проведените статистически тестове показващи връзката между туморния стадий и локализацията на туморното образуване (Kruskal Wallis и корелация на Spearman).

Ranks		
Т стадий	N	Mean rank
Локация T1	3	22,00
T2	8	29,00
T3	28	33,82
T4	43	50,19
Total	82	

Test Statistics ^{a,b}	
	Локация
Chi-Square	15,945
df	3
Asymp. Sig.	,001

a. Kruskal Wallis Test

b. Групираща

променлива: Т стадий

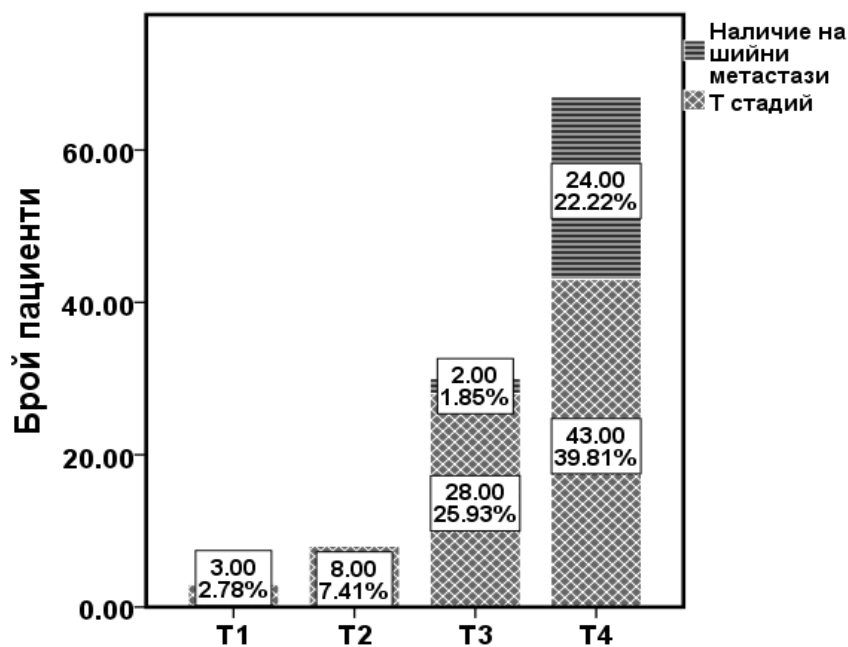
Correlations

			Локация	Т стадий
Spearman's rho	Локация	Correlation Coefficient	1.000	.441**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	82	82
		<hr/>		
Т стадий	Т стадий	Correlation Coefficient	.441**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	82	82

** . Значимост на корелацията при ниво на значимост 0.01 (2-tailed).

4.3.2 Клинико-патологични корелации свързани с процесите на метастазиране

От изследваната група пациенти, при 26 бяха открити шийни метастази. 24 от тях бяха диагностицирани с Т4, а двама с Т3 стадий. За да се сравни статистическата зависимост от наличието на шийни метастази и туморния статус се проведе Kruskal-Wallis test и корелационен Spearman анализ. Получените резултати показаха статистически значима асоциация с наличието на лимфни метастази и авансирал рак на ларинкса, както и наличието на положителна корелация между изследваните групи ($r_s=0.517$, $p<0.001$) (Фигура 4.12. и Таблица(и) 4.4.).



Фигура 4.12. Разпределение на броя и процента пациентите с шийни метастази

спрямо T-стадия

Таблица(и) 4.4. Сравнение на групите пациенти според T стадия и наличието или отсъствието на лимфни метастази (Kruskal Wallis и корелация на Spearman).

Ranks				Test Statistics ^{a,b}	
	N стадий	N	Mean rank		T стадий
T стадий	N-	56	34.19	Chi-Square	21.592
	N+	26	58.16	df	1
	Total	82		Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis

тест

b. Групираща

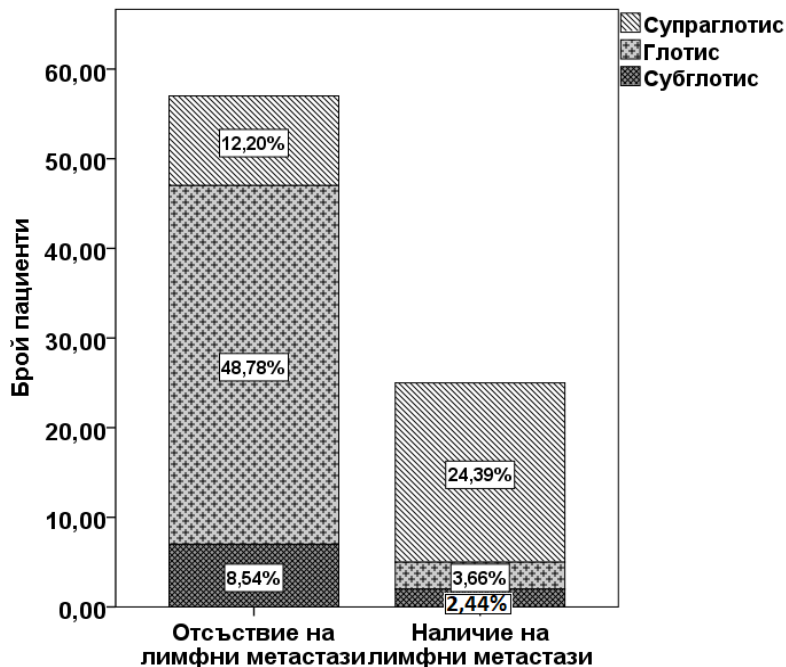
променлива: N

стадий

Correlations			T стадий	N стадий
Spearman's rho	T стадий	Correlation Coefficient	1.000	.516**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	82	82
N стадий	N стадий	Correlation Coefficient	.516**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	82	82

** . Значимост на корелацията при ниво на значимост 0.01 (2-tailed).

Сравнението между възникването на лимфни метастази и разположението на туморното образувание показва силна асоциация между глотичните (n=40; 48.78%) и субглотични (n=7; 8.54%) тумори и отсъствието на лимфни метастази. Докато при болшинството от супраглотични тумори се наблюдава наличие на лимфни метастази (n=20; 24.39%). Получените резултати се потвърждават и от проведените статистически анализи (Фигура 4.13. и Таблица(и) 4.5.).



Фигура 4.13. Разпределение процента на пациентите според локализацията на тумора и наличието на лимфни метастази.

Таблица(и) 4.5. Сравнение на групите пациенти според N стадия и локализирането на туморното образувание (Mann-Whitney U test и корелация на Spearman).

Ranks				Test Statistics ^a	
N стадий	N	Mean Rank	Sum of Ranks		Локация
Локация N-	57	35.28	2011.00	Mann-Whitney U	358.000
N+	25	55.68	1392.00	Wilcoxon W	2011.000
Total	82			Z	-3.978
				Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

a. Групираща променлива: N стадий

Frequencies	
N стадий	N
Локация N-	57
N+	25
Тотал	82

Test Statistics ^a		
		Локация
Most Extreme	Absolute	.582

Differences	Positive	.582
	Negative	-.043
Kolmogorov-Smirnov Z		2.425
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000

a.Групираща променлива: N стадий

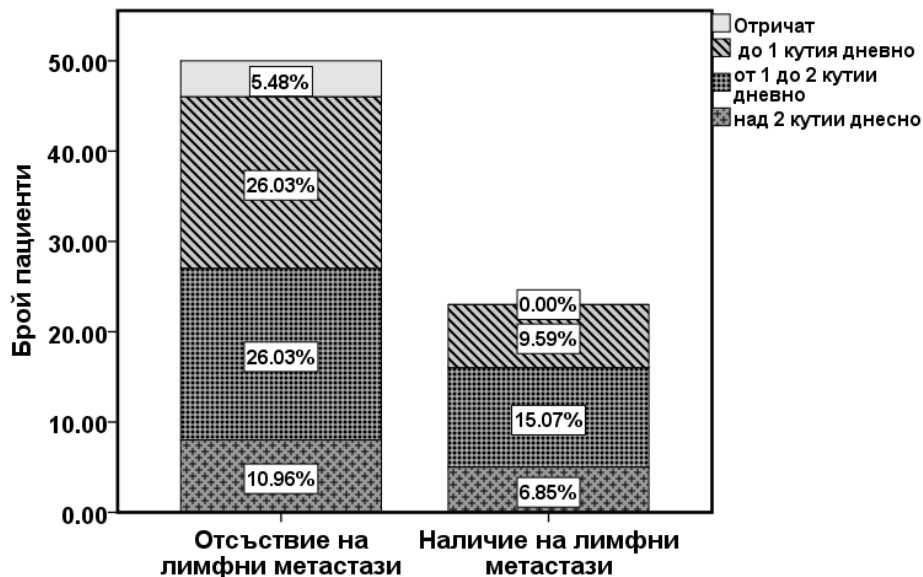
Correlations

		N стадий	Локация
Spearman's rho	N	1.000	.442**
	стадий		
	Correlation Coefficient		
	Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	82
Локация	Correlation Coefficient	.442**	1.000
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	82	82

** . Значимост на корелацията при ниво на значимост 0.01 (2-tailed).

За разлика от положителната връзка, която се установи между възникването на лимфни метастази вследствие от прекомерната консумация на алкохол и работа във вредна работна среда, асоциацията на лимфни метастази с тютюнопушенето не достигна статистическа достоверност. Резултатите от статистическите тестове между злоупотребата с тютюневи изделия и възникването на лимфни метастази са представени на Фигура 4.13. и Таблица(и) 4.6.

Тъй като с теста на Kolmogorov-Smirnov не се достигна статистическа значимост, се проведе допълнителен параметричен тест за сравнение на извадки, при който се валидира липсата на статистическа зависимост между наличието на лимфни метастази и тютюнопушенето ($p=0.126$). Корелационният анализ също не достигна до приетото статистическо ниво на значимост.



Фигура 4.13. Разпределение процента на пациентите според тежестта на тютюнопушене и развитието на лимфни метастази.

Таблица(и) 4.6. Статистически анализ на наличие на лимфни метастази в зависимост от злоупотребата с тютюневи изделия.

Ranks			
N стадий	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Тютюнопушене N-	50	34.70	1735.00
N+	23	42.00	966.00
Total	73		

Test Statistics ^a	
	Тютюнопушене
Mann-Whitney U	460.000
Wilcoxon W	1735.000
Z	-1.461
Asymp. Sig. (2-tailed)	.144

а.Групираща променлива: N стадий

Frequencies	
N	N
Тютюнопушене N-	50
N+	23
Total	73

Test Statistics^a

		Тютюнопушене
Most Extreme Differences	Absolute Positive	.156
	Negative	.000
Kolmogorov-Smirnov Z		.618
Asymp. Sig. (2-tailed)		.840

a. Групираца променлива: N стадий

Group Statistics

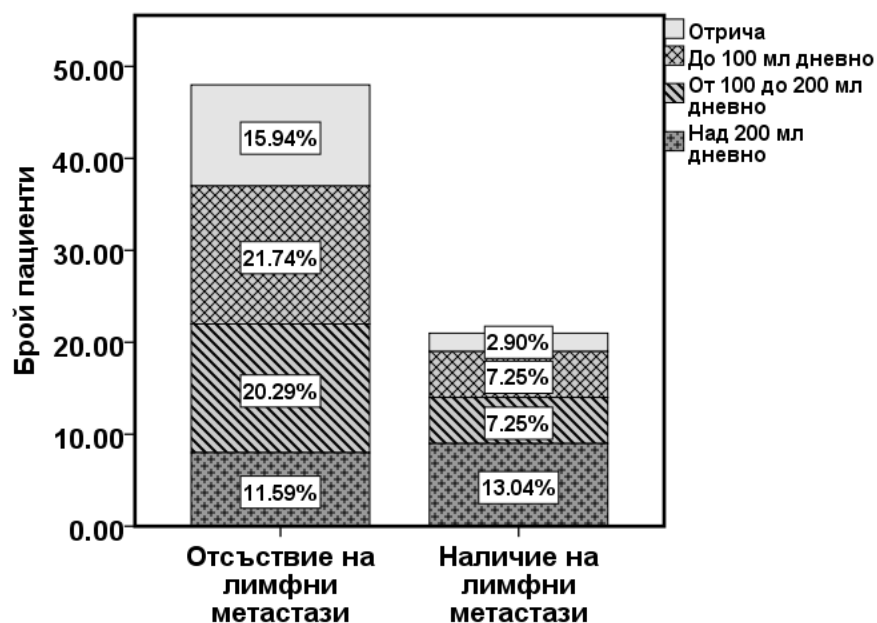
	N стадий	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Тютюнопушене	N-	50	1.60000	.832993	.117803
	N+	23	1.91304	.733178	.152878

Correlations

		N стадий	Тютюнопушене
Spearman's rho	N стадий	Correlation	1.000
		Coefficient	.172
		Sig. (2-tailed)	.145
	N		82
Тютюнопушене	Тютюнопушене	Correlation	.172
		Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	.145
	N		73

Връзките на възникване на лимфни метастази следствие от прекомерната консумация на алкохол, както и работа във вредна среда бяха положителни и статистически значими (Фигура 4.14. и 4.15.; Таблица(и) 4.7. и Таблица(и) 4.8.). Наблюдава се тенденция към злоупотребата с алкохолни напитки и присъствието на лимфни метастази. На Фигура 4.14. се вижда, че процента пациенти които консумират системно над 200мл дневно алкохолен концентрат съставляват близо половината пациенти от цялата група пациенти (за които има данни) с развити лимфни метастази (n=9; 13.04%). Приложените тестове за анализ бяха статистически значими, като в този случай освен тестовете на Mann-Whitney резултатите се валидираха и с параметричен тест за сравнение на независими извадки (Independent T test: p=0.012), тъй като според анализа на Kolmogorov-Smirnov данните следват нормалното разпределение (p=0.092). Тук бе

приложена корелация на Pearson, която отчете положителна умерена корелация между двете величини ($r=0.302$; $p=0.012$).



Фигура 4.14. Разпределение на пациентите според количеството консумиран алкохол дневно и наличието или отсъствието на лимфни метастази.

Таблица(и) 4.7. Статистическа връзка между наличието на лимфни метастази в зависимост от употребата на алкохолни напитки.

Ranks				
	N стадий	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Алкохол	N-	48	31.22	1498.50
	N+	21	43.64	916.50
	Total	69		

Test Statistics ^a	
	Алкохол
Mann-Whitney U	322.500
Wilcoxon W	1498.500
Z	-2.457
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014

а. Групираща променлива: N стадий

Frequencies

	N стадий	N
Алкохол	N-	48
	N+	21
	Total	69

Test Statistics^a

		АЛКОХОЛ
Most Extreme Differences	Absolute Positive	.324
	Negative	.000
Kolmogorov-Smirnov Z		1.240
Asymp. Sig. (2-tailed)		.092

а. Групираща променлива: N стадий

Group Statistics

	N стадий	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Алкохол	N-	48	1.33333	.952786	.137523
	N+	21	2.00000	1.048809	.228869

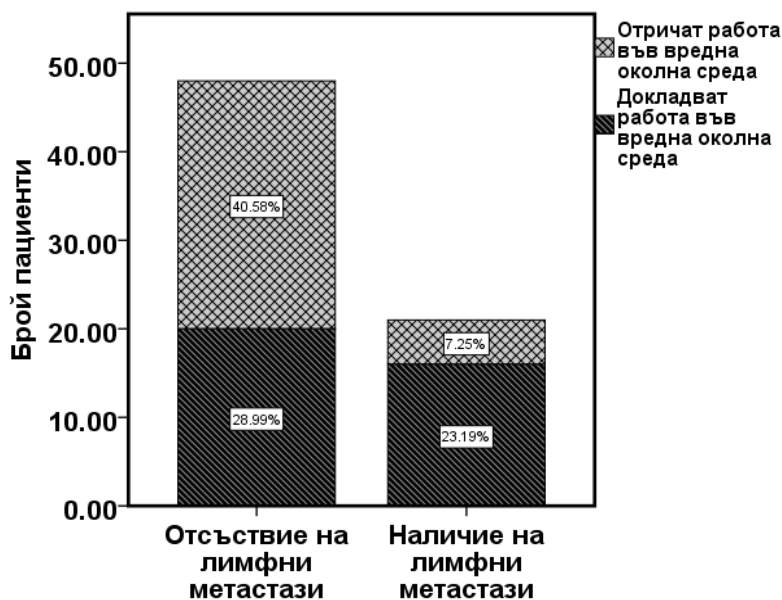
Correlations

		N стадий	АЛКОХОЛ
N стадий	Pearson Correlation	1	.302*
	Sig. (2-tailed)		.012
	N	82	69
Алкохол	Pearson Correlation	.302*	1
	Sig. (2-tailed)	.012	
	N	69	69

*. Значимост на корелацията при ниво на значимост 0.05 (2-tailed).

Сходна картина се наблюдава и при продължително излагане във вредна работна среда. Пациентите, които докладват работа в такава среда и са развили лимфни метастази, обхващат по-голям дял от общите пациенти, за които има данни за положителен нодален статус (n=16; 23.19%). Mann-Whitney анализа показва статистически значима разлика между изследваните групи, но се приложи и параметричен тест за сравнение на независими извадки (p=0.006), тъй като разпределението на данните според Kolmogorov-

Smirnov теста ($p=0.061$) следват параметрите за нормалност. Също така се достигна до статистически значима корелация между двата параметъра ($r=0.318$; $p=0.008$) (Фигура 4.15.; Таблица(и) 4.8.).



Фигура 4.15. Разпределение броя и процента на пациентите диагностицирани с лимфни метастази в зависимост от излагането на вредности на работното място.

Таблица(и) 4.8. Статистическа връзка между наличието на лимфни метастази и вредната работна среда.

Ranks				
	N стадий	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Околна работна среда	N-	48	31.38	1506.00
	N+	21	43.29	909.00
	Total	69		

Test Statistics ^a	
	Околна работна среда
Mann-Whitney U	330.000
Wilcoxon W	1506.000
Z	-2.622
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009

а. Групираща променлива: N стадий

Frequencies

	N стадий	N
Околна работна среда	N- N+	48 21
	Total	69

Test Statistics^a

		Околна работна среда
Most Extreme Differences	Absolute Positive Negative	.345 .345 .000
Kolmogorov-Smirnov Z		1.320
Asymp. Sig. (2-tailed)		.061

a. Групираща променлива: N стадий

Correlations

		N стадий	Околна работна среда
N стадий	Pearson Correlation	1	.318**
	Sig. (2-tailed)		.008
	N	82	69
Околна работна среда	Pearson Correlation	.318**	1
	Sig. (2-tailed)	.008	
	N	69	69

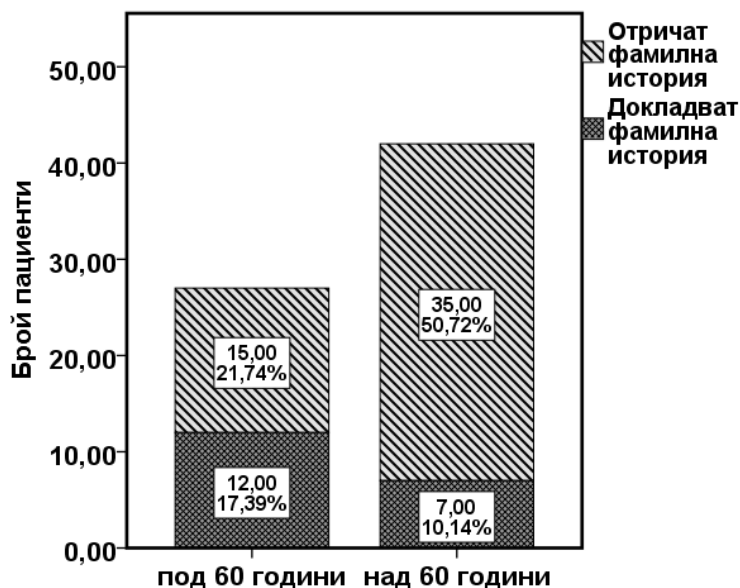
** . Значимост на корелацията при ниво на значимост 0.01 (2-tailed).

4.3.3 Клинични корелации свързани с възрастта и фамилната история

Значителна част от пациентите, които докладваха положителна фамилна история, свързана с наличието на други ракови заболявания в родословието им бяха диагностицирани с рак на ларинкса под 60 годишна възраст. На Фигура 4.16. е представено разпределението на броя и процента.

При провеждане на съответните статистически тестове се достигна до статистическа зависимост и положителна корелация между възрастта на заболяемост от рак на ларинкса и положителното докладване от злокачественост в семейството. Допълнително се проведе и параметричен анализ (Independent T test $p=0.011$), тъй като според анализа Kolmogorov–Smirnov разпределението на извадката следва правилата за нормалност. Резултатите валидираха теста на Mann-Whitney, като също се достигна статистическа значимост (Таблица(и) 4.9.). В заключение може да се коментира, че при пациенти които

имат злокачественост при близки родственици имат по-голяма вероятност да развият рак на ларинкса.



Фигура 4.16. Разпределение на групите пациенти докладващи фамилна история според възрастта на диагностициране на карцином на ларинкса

Таблица(и) 4.9. Резултати от статистически анализ между възрастта на заболяемост от рак на ларинкса и положителната фамилна история.

Ranks				
	Възраст	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Фамилна история	Над 60 години	42	31,25	1312,50
	Под 60 години	27	40,83	1102,50
	Total	69		

Test Statistics ^a	
	Фамилна история
Mann-Whitney U	409,500
Wilcoxon W	1312,500
Z	-2,503
Asymp. Sig. (2-tailed)	,012

a.Групираща променлива: Възраст

Frequencies			Test Statistics ^a		
	Възраст	N			Фамилна история
Фамилна история	Над 60 години	42	Most Extreme Differences	Absolute Positive	,278
	Под 60 години	27		Negative	,000
	Total	69	Kolmogorov-Smirnov Z		1,126
			Asymp. Sig. (2-tailed)		,158

а. Групираща променлива: Възраст

Correlations			
		Възраст	Фамилна история
Възраст	Pearson Correlation	1	,303*
	Sig. (2-tailed)		,011
	N	82	69
Фамилна история	Pearson Correlation	,303*	1
	Sig. (2-tailed)	,011	
	N	69	69

*. Значимост на корелацията при ниво на значимост 0.05 (2-tailed).

4.4. Нива на експресия на изследваните маркери (нкРНКи) в тъканни проби от рак на ларинкса

Нивата на експресия на подобрени по литературни данни тринадесет нкРНКи (11 miRNAs и 2 lncRNAs) бяха изследвани и анализирани при пациентите включени в дисертационния труд. Микро РНКте, които бяха изследвани са както следва: miR-21-3p, miR-21-5p, miR-31-3p, miR-31-5p, miR-145-5p, miR-196a-5p, miR-210-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-424-5p. Дългите нкРНКи са: lncRNA HOTAIR, lncRNA MALAT1.

На Таблица 4.10. са представени брой и процент пациенти, средна стойност на относителната експресия съответно в групите показващи повишени, без промяна и понижени нива на експресия.

Таблица 4.10. Относителна експресия на изследваните пациенти. Представени са средните RQ стойности при пациенти, които показват повишени, понижени и без промяна в експресионните нива.

ncRNA	Пациенти с повишени експресионни нива n (%) Средно RQ±SD	Пациенти с нормални нива на експресия n (%) Средно RQ±SD	Пациенти с понижени нива на експресия n (%) Средно RQ±SD
miR-21-3p	59 (71.95) 8.802±7.601	14 (17.07) 1.232±0.323	9 (10.97) 0.268±0.131
miR-21-5p	65 (79.27) 10.490±10.096	12 (14.64) 1.256±0.369	5 (6.09) 0.136±0.105
miR-31-3p	48 (58.54) 9.869±12.847	18 (21.95) 1.088±0.394	16 (19.51) 0.116±0.117
miR-31-5p	49 (59.76) 9.804±10.785	22 (26.83) 1.138±0.388	11 (13.41) 0.188±0.132
miR-145-5p	11 (13.44) 3.301±1.492	30 (36.58) 1.011±0.362	41 (50.00) 0.235±0.130
miR-155-5p	39 (47.56) 8.110±6.919	25 (30.48) 1.057±0.424	18 (21.95) 0.202±0.135
miR-196a-5p	66 (80.48) 37.845±47.133	11 (13.41) 1.075±0.274	5 (6.09) 0.236±0.097
miR-210-3p	34 (41.46) 8.471±8.463	31 (37.80) 0.980±0.360	17 (20.73) 0.246±0.142
miR-221-3p	32 (39.02) 4.570±3.241	38 (46.34) 1.161±0.462	12 (14.63) 0.293±0.150
miR-222-3p	31 (37.80) 6.981±5.696	38 (46.34) 1.217±0.390	13 (15.85) 0.297±0.119
miR-424-5p	59 (71.95) 10.660±11.245	16 (19.51) 1.136±0.374	7 (8.54) 0.088±0.103
lncRNA MALAT1*	4 (6.35) 4.958±2.535	24 (38.09) 0.977±0.390	35 (55.56) 0.246±0.128
lncRNA HOTAIR*	35 (55.56) 11.139±9.024	12 (19.05) 1.020±0.398	16 (25.40) 0.193±0.142

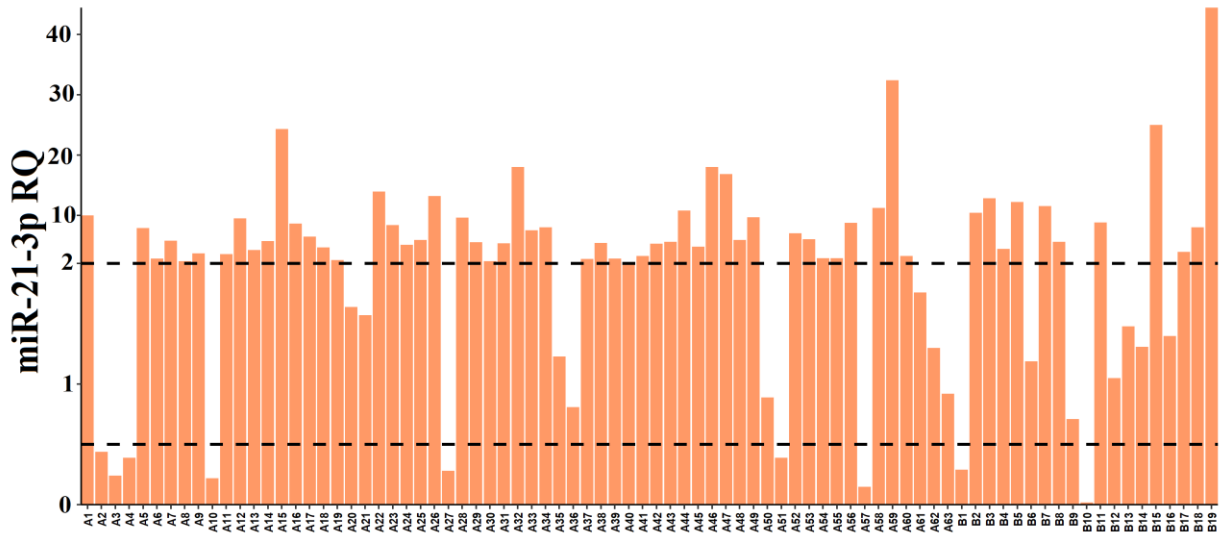
* Брой на пациенти с ПККЛ= 63

На следващата Фигура 4.17. са представени индивидуалните относителни нива на експресия в свежо замразена туморна ларингеална тъкан спрямо кореспондиращата ѝ нормална ларингеална тъкан. Микро РНКте са изследвани в 82 пациента, докато дългите нкРНКи бяха изследвани при 63 пациента. Най-високата стойност за нкРНКте са следните: miR-21-3p – RQ=44.4 (B19T); miR-21-5p – RQ=55.3 (A10T); miR-31-3p – RQ=57.5 (A47T); miR-31-5p – RQ=55.68 (A27T); miR-145-5p – RQ=7.05 (A10T); miR-155-5p – RQ=30.51 (A29T); miR-196a-5p – RQ=244.54 (A63T); miR-210-3p – RQ=42.3 (B15T);

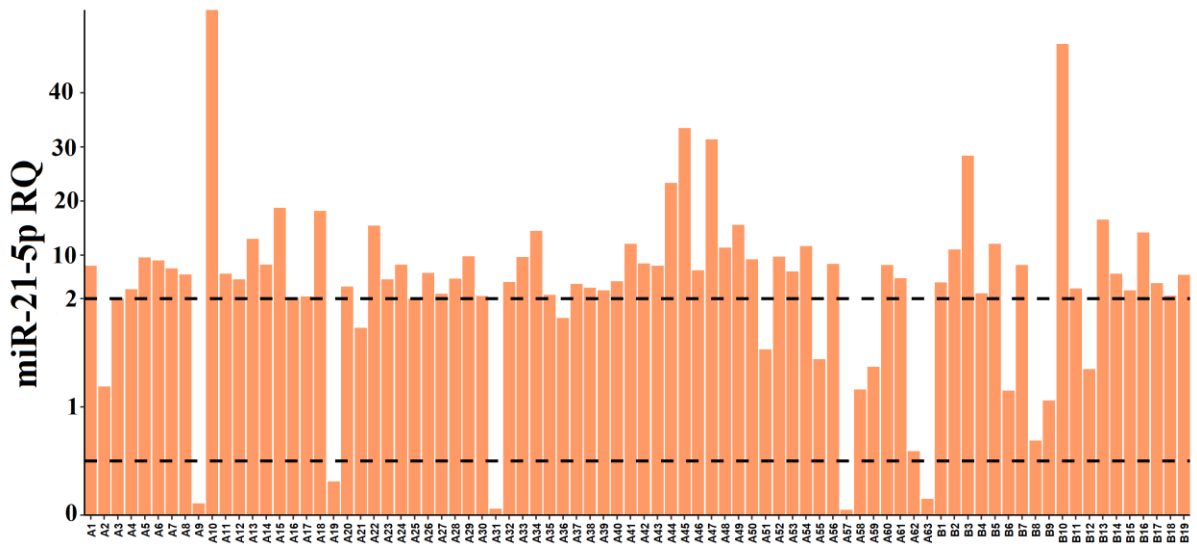
miR-221-3p – RQ=17.31 (A8T); miR-222-3p – RQ=21.71 (B5T); miR-424-5p – RQ=53.5 (A4T); lncRNA MALAT1 – RQ=7.68 (A12T) и lncRNA HOTAIR – RQ=43.63 (A30T). Най-ниските получени стойности са следните: miR-21-3p – RQ=0.02 (B10T); miR-21-5p – RQ=0.05 (A57T); miR-31-3p – RQ=0.01 (B15T); miR-31-5p – RQ=0.015 (A11T); miR-145-5p – RQ=0.039 (B11T); miR-155-5p – RQ=0.023 (B16T); miR-196a-5p – RQ=0.156 (B15T); miR-210-3p – RQ=0.023 (B11T); miR-221-3p – RQ=0.016 (A19T); miR-222-3p – RQ=0.076 (B8T); miR-424-5p – RQ=0.002 (A8T); lncRNA MALAT1 – RQ=0.03 (A43T) и lncRNA HOTAIR – RQ=0.008 (A58T).

На Фигура 4.17. са белязани с пунктир граничните cut-off стойности за понижена експресия (RQ<0.05) и повишена експресия (RQ>2.00). За визуализация на фигурата са използвани т.нар. прекъснати бар плотове (interrupted bar plots) с програма R.

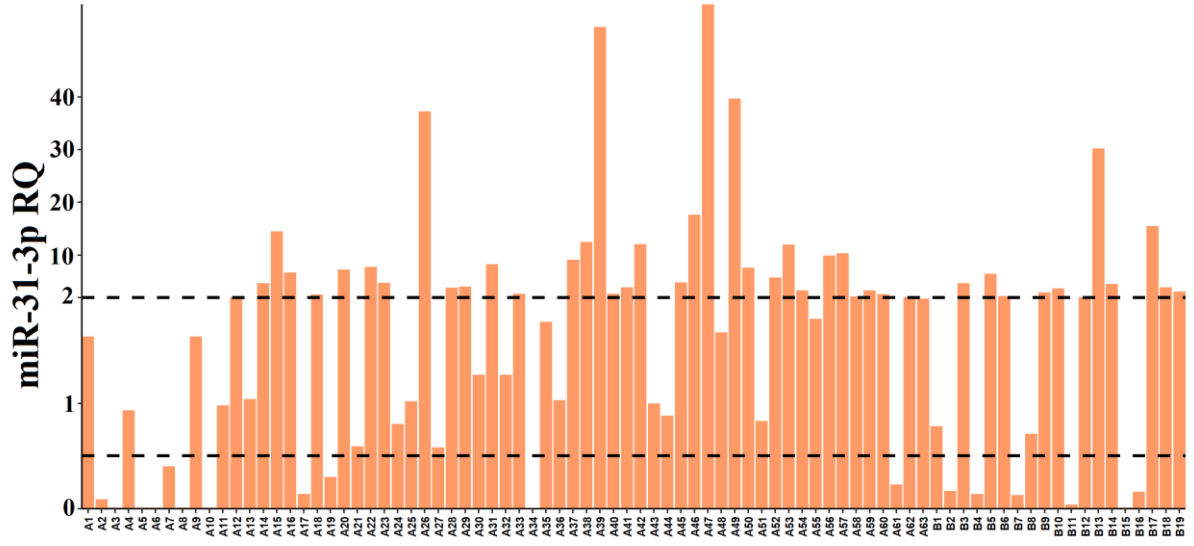
A



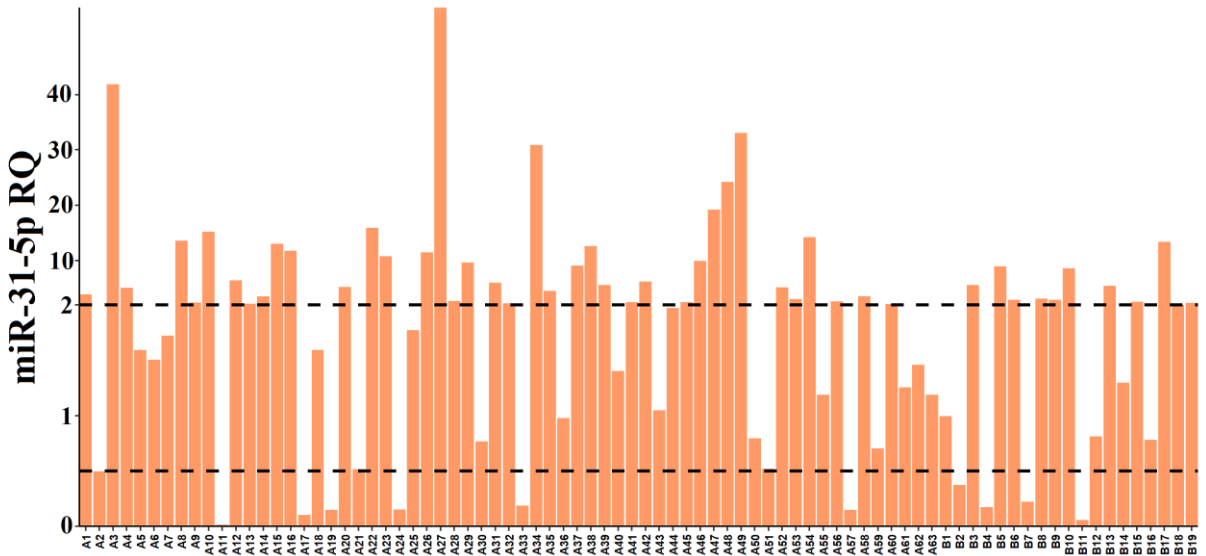
B



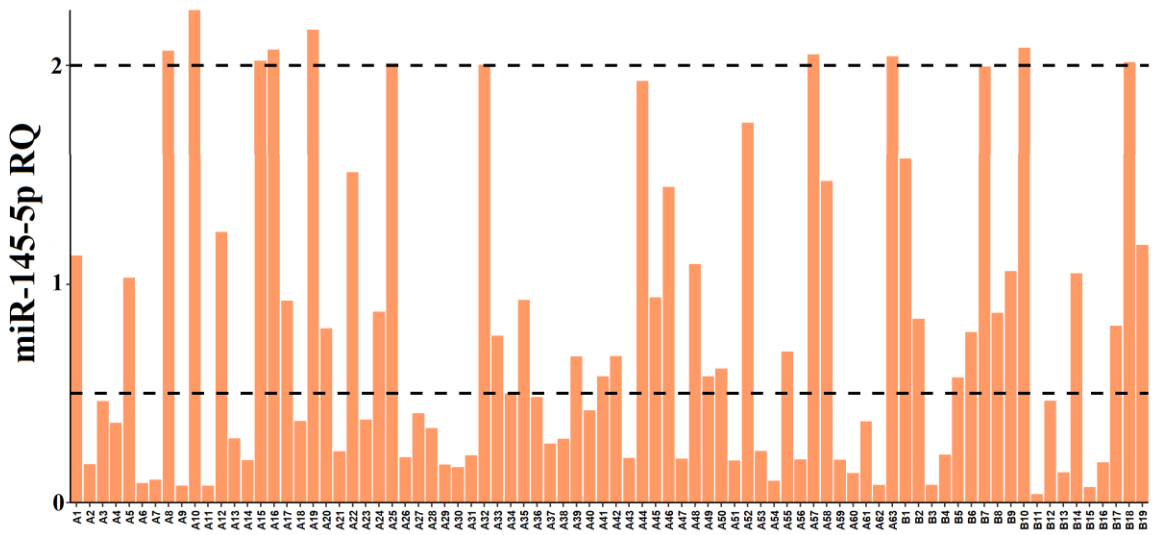
C



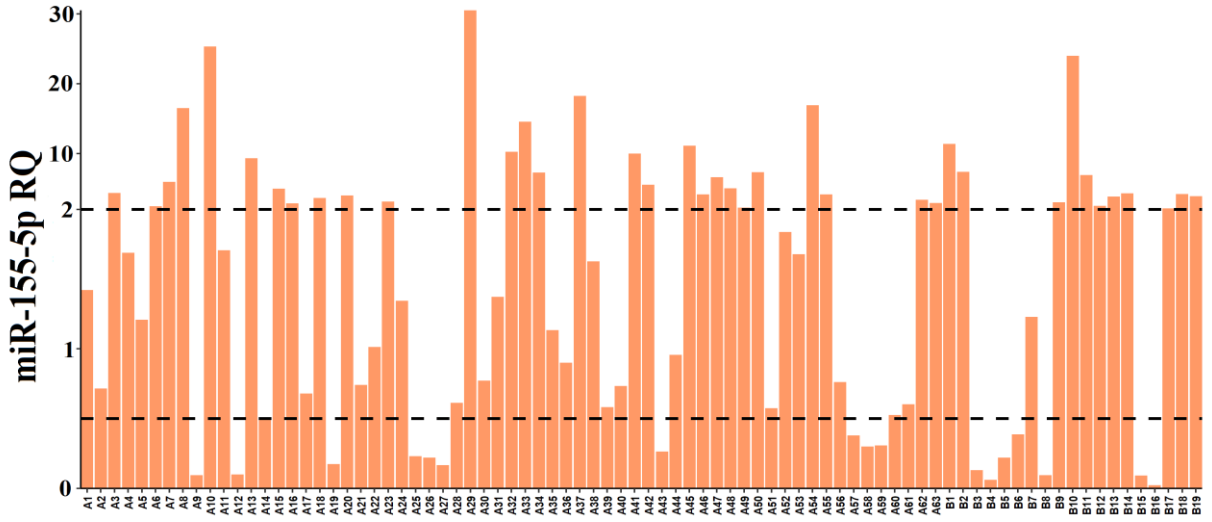
D



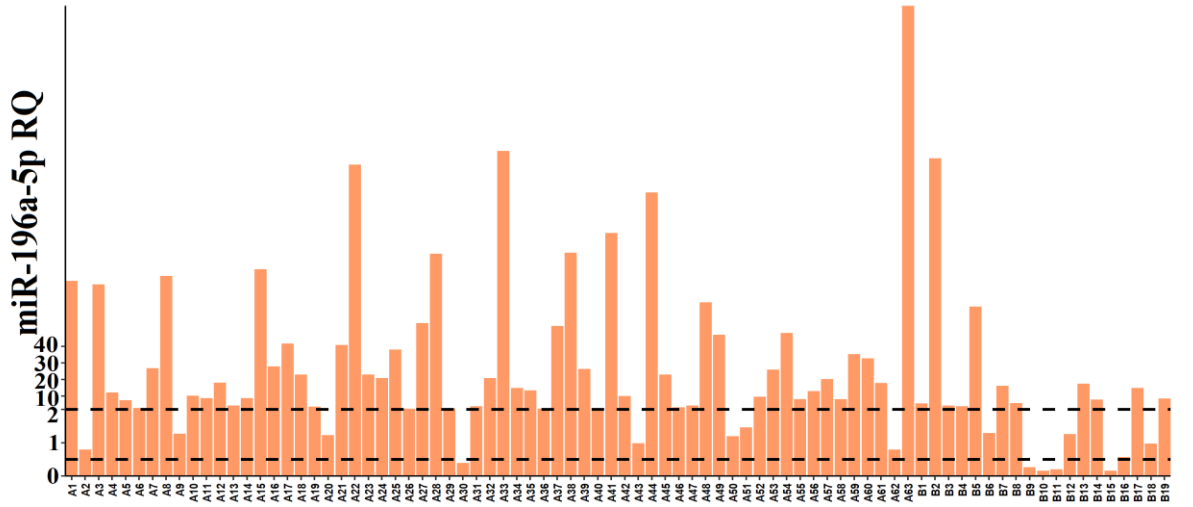
E



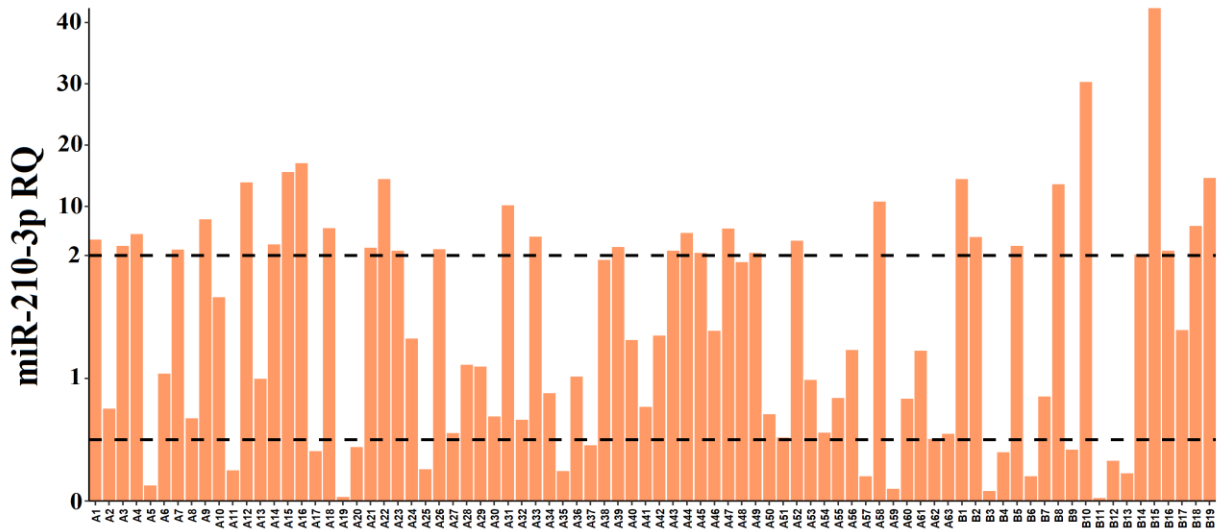
F



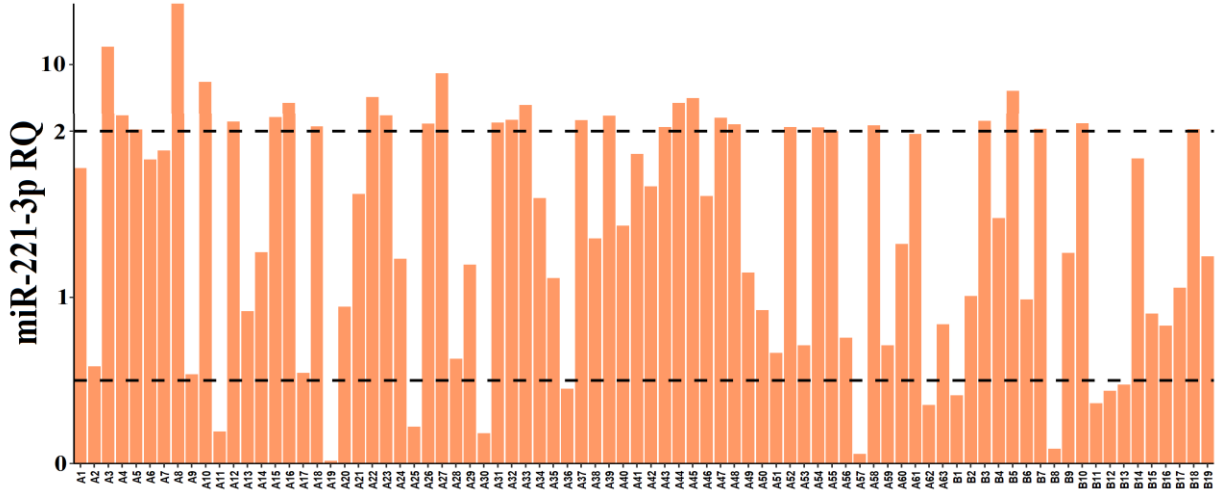
G



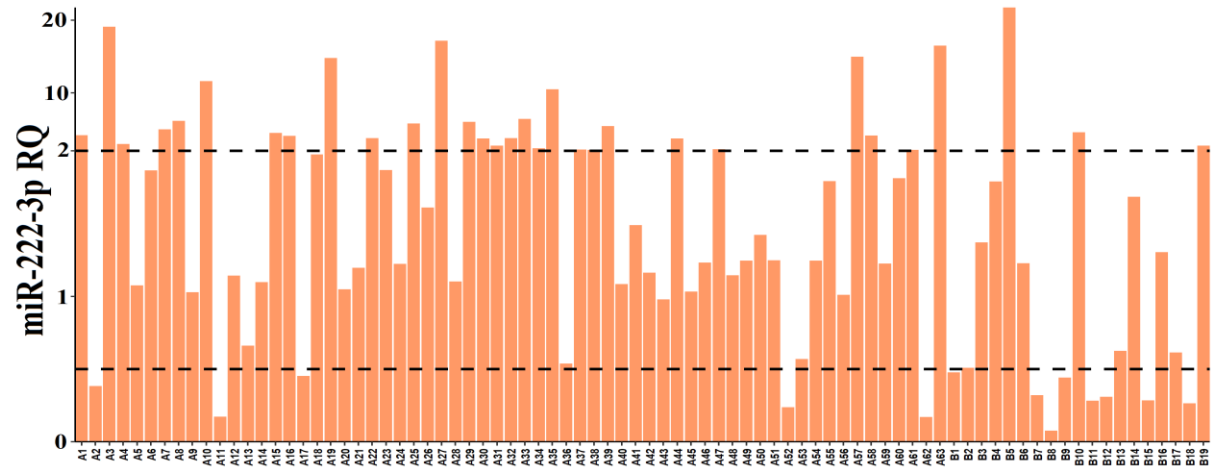
H



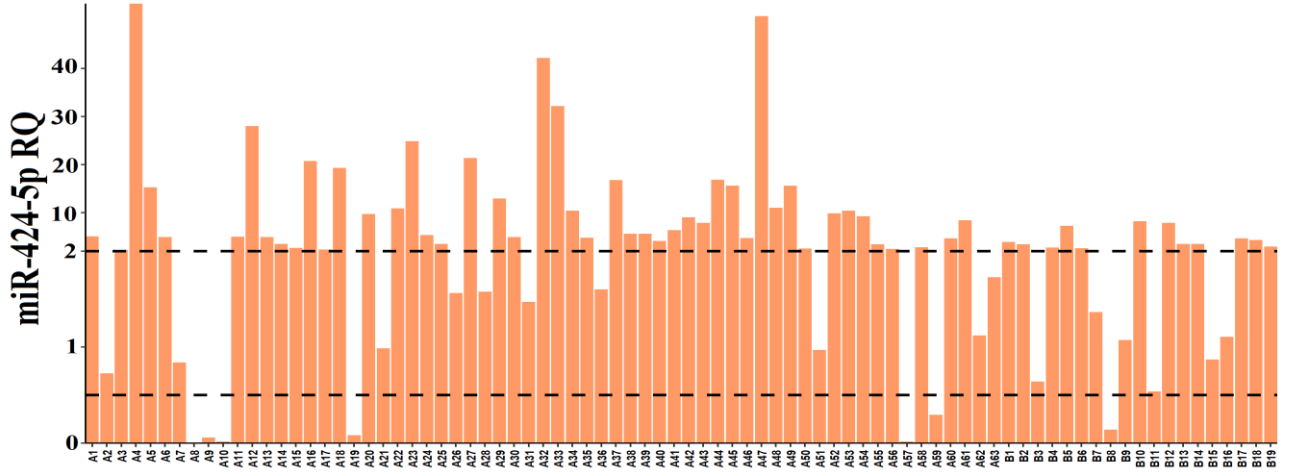
I

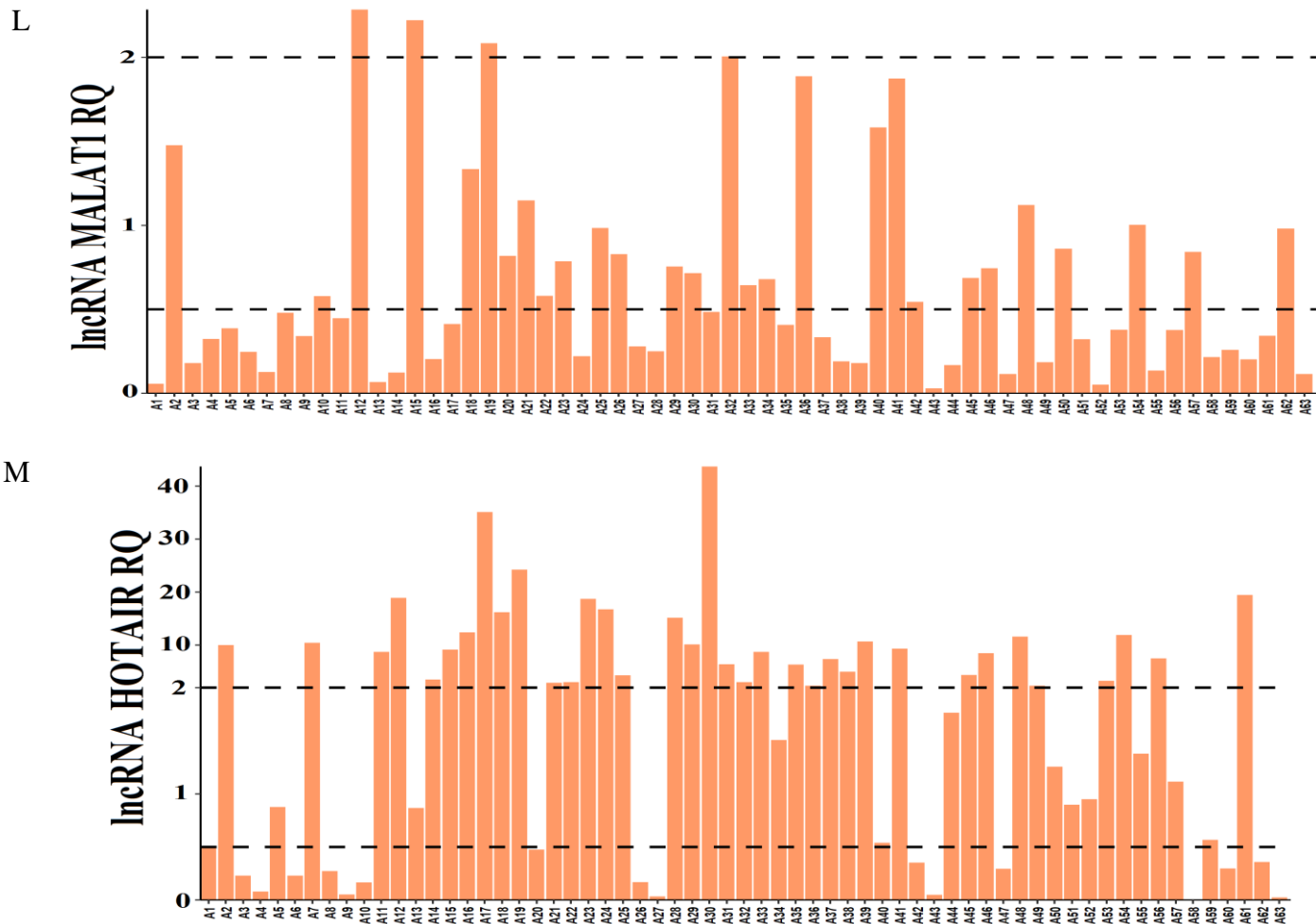


J



K



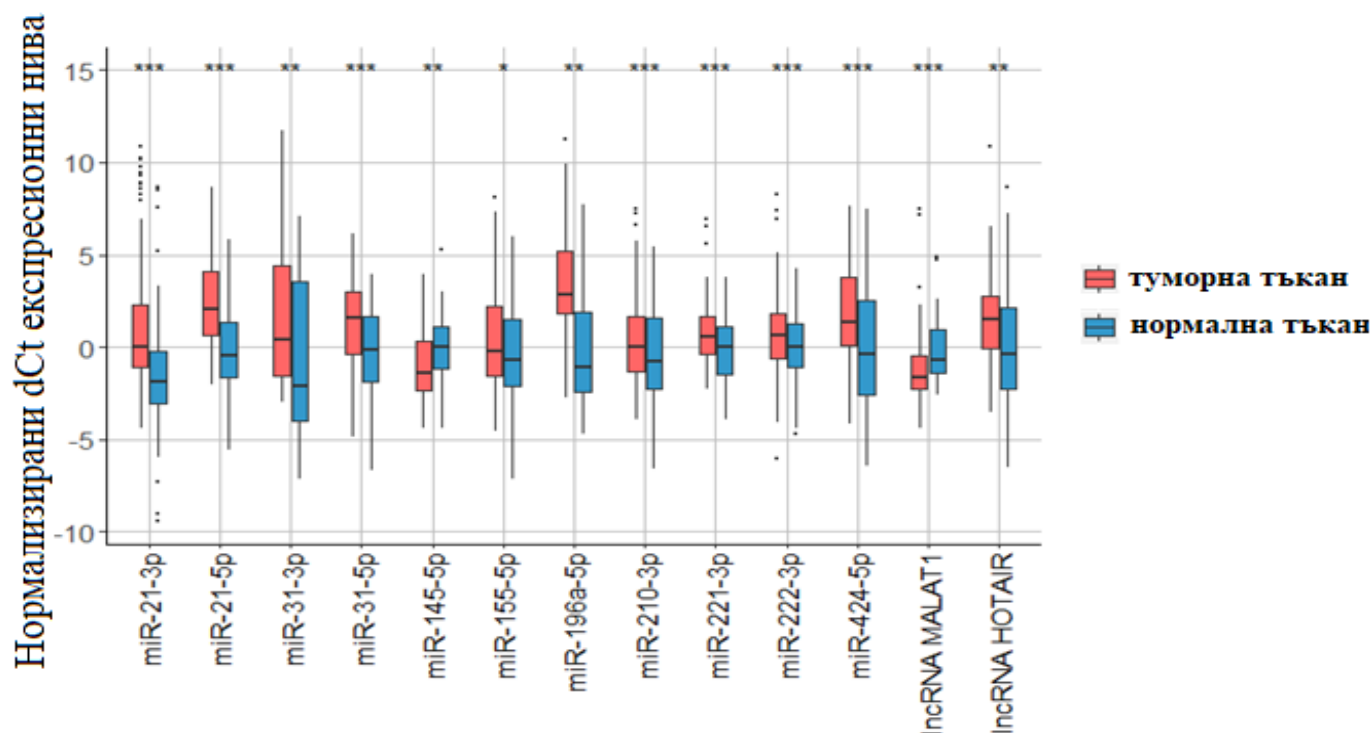


Фигура 4.17. Представяне на индивидуалните експресионни стойности (RQ) на (A) miR-21-3p; (B) miR-21-5p; (C) miR-31-3p; (D) miR-31-5p; (E) miR-145-5p; (F) miR-155-5p; (G) miR-196a-5p; (H) miR-210-3p; (I) miR-221-3p; (J) miR-222-3p; (K) miR-424-5p; (L) lncRNA MALAT1 и (M) lncRNA HOTAIR в туморна ларингеална тъкан спрямо кореспондиращата ѝ нормална ларингеална тъкан при изследваната група пациенти.

С цел да се определи кои от нкРНКи са статистически значимо променени в туморна ларингеална тъкан в сравнение с нормална ларингеална тъкан се проведе съответния параметричен или непараметричен статистически тест (paired T-test или Wilcoxon test), в зависимост от разпределението на данните. Данните, които бяха използвани за сравнение на групите бяха нормализирани експресионни dCt нива. Това преобразуване на данните беше необходимо, за да може да се сравнят коректно експресионните нива на подбраните биомаркери както в туморна, така и в нормална тъкан. Преобразуването се осъществи по следния начин: Всички dCt стойности получени за туморна и нормална ларингеална тъкан за съответния биомаркер бяха умножени по минус 1, след което се сметна средната стойност за вече умножените по минус едно dCt стойности на нормалната тъкан. Последната стъпка беше да се извади от минус dCt стойностите (както на туморна, така и

на нормална тъкан) тази средна стойност. dCt (туморна и нормална)*-1 → средно на - dCt само на нормалните тъкани → - dCt (всички проби) – средно на - dCt (само на нормалните тъкани).

Всички от изследваните нкРНКи при ПККЛ туморни проби бяха със значимо променена експресия в сравнение с съответстващата нормална тъкан. Експресионните нива на miR-21-3p ($p<0.001$), miR-21-5p ($p<0.001$), miR-31-3p ($p=0.004$), miR-31-5p ($p<0.001$), miR-155-5p ($p=0.003$), miR-210-3p ($p=0.025$), miR-221-3p ($p=0.001$), miR-222-3p ($p=0.001$), miR-196a-5p ($p<0.001$) и lncRNA HOTAIR ($p=0.004$) бяха значимо повишени, докато miR-145-5p ($p<0.001$) и lncRNA MALAT1 ($p<0.001$) бяха значимо понижени при ларингеална туморна тъкан в сравнение с нормалната тъкан. Преобразуваните и нормализирани dCt стойности са визуализирани с бокс плотове (Фигура 4.18.).



Фигура 4.18. Сравнение на експресионните нива на всички биомаркери между туморна и нормална ларингеална тъкан. Ниво на значимост: *- $p<0.05$; **- $p<0.01$; ***- $p<0.001$

4.5. Асоциация между експресионните нива в туморни ларингеални тъкани на некодиращите РНКи и клиникопатологичните характеристики на пациентите

Асоциацията между получените RQ данни на изследваните нкРНКи и групирането, базирано на клиникопатологичните характеристики на ПККЛ пациенти е резюмирано в Таблицы 4.11. и 4.12. Получените данни показаха статистически значима асоциация между експресионните нива на miR-21-5p, miR-31-3p, miR-31-5p, miR-145-5p, miR-222-3p, miR-424-5p, lncRNA MALAT1 и lncRNA HOTAIR с различни клинични характеристики. miR-

21-5p се асоциира статистически значимо с туморната диференциация ($p=0.036$), положителната фамилна история ($p=0.050$) и с излагането на вредности в околната среда ($p=0.046$). miR-31-3p показва положителна връзка с нодалните метастази ($p=0.009$) и туморната диференциация ($p=0.034$). Експресионните нива на miR-31-3p бяха повишени при пациенти положителни към вредности в околната среда, но статистическо ниво на значимост не беше достигнато ($p=0.081$). Значима асоциация между miR-31-5p ($p=0.048$) и miR-145-5p ($p=0.035$) беше открита с туморния стадий. Нивата на miR-145-5p намаляваха с прогресията на T стадия, наличието на лимфни метастази ($p=0.007$) и злоупотребата с тютюнопушене ($p=0.050$). miR-222-3p се свързва значимо с пола ($p=0.023$), положителната фамилна история ($p=0.015$), излагането на вредна работна среда ($p=0.020$) и гранично се асоциира с възрастта ($p=0.052$). Понижената експресия на miR-424-5p се асоциира с лимфните метастази ($p=0.012$) и туморната локализация ($p=0.015$), като най-високи експресионни нива бяха достигнати при субглотисни тумори. Дългата нкРНК MALAT1 беше положително свързана с възрастта ($p=0.024$), докато HOTAIR с положителната фамилна история ($p=0.031$). Биомаркерите, които не успяха да достигнат статистически значима асоциация между техните експресионни нива и групирането по клиникопатологичните характеристики са miR-21-3p, miR-155-5p, miR-196a-5p, miR-210-3p и miR-221-3p.

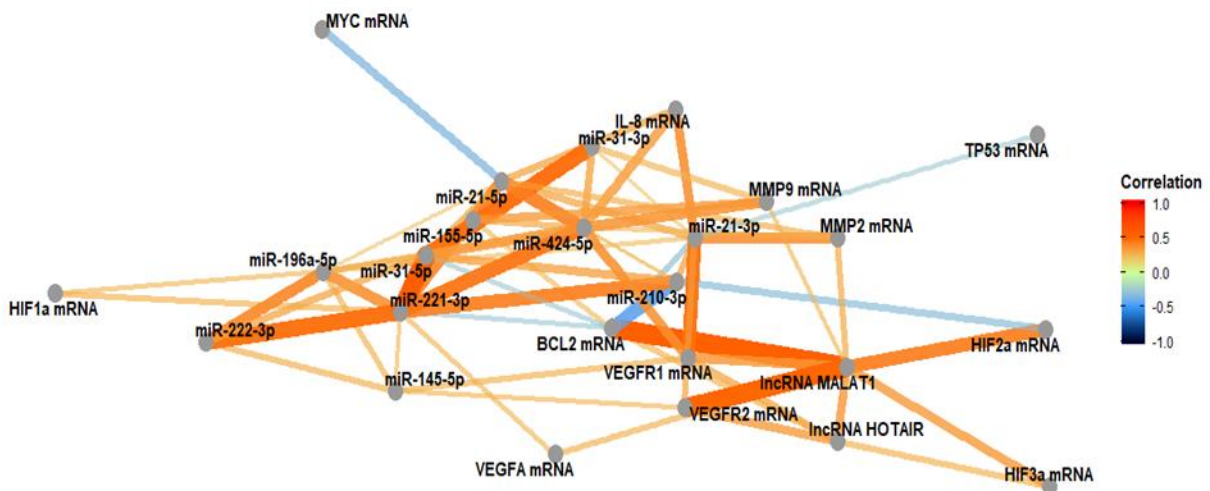
Таблица 4.11. Асоциация между средните RQ нива на miR-21 и miR-31 изоформи, miR-145-5p, miR-155-5p, miR-196a-5p и клиникопатологичните характеристики на изследваните пациенти с ПККЛ.								
Клинични характеристики	Брой пациенти (%)	Относителна експресия на miR-21-3p	Относителна експресия на miR-21-5p	Относителна експресия на miR-31-3p	Относителна експресия на miR-31-5p	Относителна експресия на miR-145-5p	Относителна експресия на miR-155-5p	Относителна експресия на miR-196a-5p
Пол Женски Мъжки	4 (7.88) 78 (95.12)	5.000 ± 0.169 6.468 ± 6.345	6.055 ± 2.863 8.166 ± 9.434	6.750 ± 8.131 7.390 ± 13.956	6.825 ± 8.167 6.939 ± 10.384	0.248 ± 0.061 1.020 ± 1.331	0.946 ± 0.964 4.478 ± 6.353	48.606 ± 67.352 32.979 ± 39.498
		p=0.666	p=0.613	p=0.754	p=0.797	p=0.178	p=0.393	p=0.314
Възраст ≤ 60 > 60	49 (59.76) 33 (40.24)	6.926 ± 5.161 6.104 ± 6.908	8.575 ± 9.131 8.372 ± 10.610	7.950 ± 10.949 6.432 ± 13.117	8.771 ± 11.134 6.202 ± 10.153	0.815 ± 0.879 0.563 ± 0.521	5.925 ± 7.382 3.097 ± 4.264	42.274 ± 47.878 27.731 ± 33.167
		p=0.446	p=0.902	p=0.380	p=0.305	p=0.738	p=0.313	p=0.314
Туморен стадий T1/2 T3 T4	11 (13.41) 28 (34.15) 43 (52.45)	4.065 ± 2.597 7.902 ± 6.481 5.976 ± 6.579	7.284 ± 4.976 8.681 ± 11.655 7.482 ± 9.518	9.518 ± 19.366 6.303 ± 8.884 7.589 ± 15.376	2.007 ± 1.870 6.643 ± 9.745 9.443 ± 8.121	1.253 ± 1.408 0.741 ± 0.684 0.459 ± 0.319	3.957 ± 4.092 6.390 ± 8.151 2.752 ± 3.410	23.635 ± 38.040 40.030 ± 46.452 29.967 ± 39.456
		p=0.301	p=0.832	p=0.985	p=0.048	p=0.035	p=0.642	p=0.746
Лимфни метастази N0 негативни N1-3 положителни	56 (68.29) 26 (30.71)	6.294 ± 5.514 6.838 ± 8.209	8.238 ± 7.618 6.441 ± 4.603	8.749 ± 15.585 3.319 ± 3.568	6.858 ± 10.090 8.318 ± 12.071	1.102 ± 1.315 0.485 ± 0.502	4.645 ± 6.233 3.006 ± 4.385	31.126 ± 39.661 40.639 ± 41.387
		p=0.957	p=0.834	p=0.009	p=0.805	p=0.007	p=0.948	p=0.597
Туморна диференциация G1 добре диференциран G2 умерено диференциран G3 ниско диференциран	31 (37.80) 40 (48.78) 11 (13.41)	4.410 ± 4.326 8.233 ± 7.365 4.332 ± 3.471	7.421 ± 8.011 7.352 ± 6.491 15.480 ± 8.724	8.553 ± 19.122 7.314 ± 9.642 1.535 ± 2.209	7.163 ± 10.175 7.602 ± 11.497 4.791 ± 4.346	0.790 ± 0.789 0.725 ± 0.781 0.232 ± 0.158	4.066 ± 5.130 4.465 ± 6.668 3.300 ± 1.863	26.399 ± 35.983 40.863 ± 43.937 16.216 ± 10.771
		p=0.429	p=0.036	p=0.034	p=0.797	p=0.722	p=0.374	p=0.219
Туморна локализация Супраглотис Глотис Субглотис	30 (36.59) 43 (52.44) 9 (10.97)	6.361 ± 7.414 6.437 ± 6.284 6.590 ± 2.278	7.375 ± 8.064 7.686 ± 6.717 9.181 ± 6.050	4.205 ± 4.257 9.061 ± 16.736 7.544 ± 14.361	5.327 ± 7.014 8.250 ± 11.889 7.334 ± 12.024	0.423 ± 0.418 0.819 ± 0.781 0.957 ± 1.153	2.986 ± 4.554 5.495 ± 6.750 1.636 ± 1.299	33.632 ± 39.336 35.248 ± 44.407 25.816 ± 16.863
		p=0.259	p=0.376	p=0.288	p=0.516	p=0.288	p=0.821	p=0.641
Фамилна история Отрича Докладва Липсващи данни	63 (60.97) 19 (23.18) 13 (15.85)	6.399 ± 6.681 6.532 ± 4.880	5.354 ± 3.852 9.167 ± 8.046	7.804 ± 14.941 6.085 ± 9.721	6.765 ± 10.574 8.591 ± 10.675	0.715 ± 0.696 0.711 ± 0.957	3.675 ± 4.450 5.849 ± 8.637	34.281 ± 42.603 31.400 ± 32.158
		p=0.370	p=0.050	p=0.653	p=0.721	p=0.141	p=0.705	p=0.987
Тютюнопушене Отрича ≤20 цигари дневно 21 - 40 цигари дневно ≥41 цигари дневно Липсващи данни	4 (4.87) 26 (31.70) 30 (36.58) 13 (15.85) 9 (10.97)	5.700 ± 2.880 7.316 ± 6.702 5.866 ± 5.075 7.007 ± 8.722	3.910 ± 3.631 10.148 ± 7.889 6.522 ± 4.110 7.604 ± 9.332	3.166 ± 3.085 9.599 ± 17.740 5.356 ± 10.160 4.294 ± 3.197	4.673 ± 6.161 6.543 ± 5.778 9.361 ± 15.564 7.144 ± 11.791	1.450 ± 1.753 0.950 ± 0.913 0.653 ± 0.435 0.318 ± 0.291	2.431 ± 1.979 4.846 ± 5.412 2.851 ± 3.694 5.408 ± 8.979	12.344 ± 13.935 40.942 ± 49.079 38.790 ± 43.680 20.553 ± 22.720
		p=0.744	p=0.205	p=0.516	p=0.687	p=0.048	p=0.678	p=0.920
Употреба на алкохол Отрича <100 mL дневно 100 - 200 mL дневно >200 mL дневно Липсващи данни	13 (15.85) 20 (24.39) 19 (23.17) 17 (20.73) 13 (15.85)	5.062 ± 3.224 7.173 ± 5.025 5.697 ± 4.826 6.727 ± 7.886	6.916 ± 4.696 10.280 ± 9.674 8.944 ± 7.814 6.548 ± 5.371	6.332 ± 12.692 7.622 ± 10.690 9.117 ± 19.506 4.190 ± 4.886	6.922 ± 10.650 6.052 ± 5.113 8.686 ± 14.673 9.866 ± 12.675	0.758 ± 1.054 0.840 ± 0.962 0.627 ± 0.518 0.811 ± 0.793	4.775 ± 9.738 3.678 ± 5.049 3.543 ± 4.194 5.571 ± 5.112	16.235 ± 16.313 41.079 ± 46.826 34.454 ± 52.613 38.359 ± 33.988
		p=0.600	p=0.768	p=0.714	p=0.754	p=0.295	p=0.278	p=0.670
Вредна работна среда Отрича Докладва Липсващи данни	46 (40.25) 36 (43.90) 13 (15.85)	7.283 ± 7.225 5.334 ± 4.558	5.594 ± 3.711 10.473 ± 7.386	5.818 ± 3.911 8.404 ± 13.510	7.827 ± 11.751 6.458 ± 8.897	0.827 ± 1.154 1.110 ± 1.307	3.468 ± 4.022 5.210 ± 7.534	27.671 ± 32.926 41.138 ± 47.161
		p=0.258	p=0.046	p=0.081	p=0.794	p=0.666	p=0.863	p=0.481

Таблица 4.12. Асоциация между средните RQ нива на miR-210-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-424-5p, lncRNA MALAT1, lncRNA HOTAIR и клиничкопатологичните характеристики на изследваните пациенти с ПМКЛ.							
Клинични характеристики	Брой пациенти (%)	Относителна експресия на miR-210-3p	Относителна експресия на miR-221-3p	Относителна експресия на miR-222-3p	Относителна експресия на miR-424-5p	Относителна експресия на lncRNA MALAT1	Относителна експресия на lncRNA HOTAIR
Пол Женски Мъжки	4 (7.88) 78 (95.12)	2.379 ± 0.585 3.167 ± 3.975 p=0.386	1.926 ± 0.807 2.691 ± 3.036 p=0.829	1.566 ± 0.828 3.502 ± 5.577 p=0.023	6.731 ± 1.595 9.906 ± 12.037 p=0.795	0.209 ± 0.113 0.739 ± 0.986 p=0.077	2.529 ± 3.507 6.472 ± 8.638 p=0.060
Възраст ≤ 60 > 60	49 (59.76) 33 (40.24)	2.369 ± 2.959 3.651 ± 4.394 p=0.574	2.541 ± 2.629 2.878 ± 3.208 p=0.817	3.189 ± 3.970 5.035 ± 4.118 p=0.052	10.071 ± 10.851 9.604 ± 12.601 p=0.817	1.076 ± 1.008 0.634 ± 1.123 p=0.024	7.674 ± 9.580 5.432 ± 7.762 p=0.130
Туморен стадий T1/2 T3 T4	11 (13.41) 28 (34.15) 43 (52.45)	1.586 ± 1.650 3.031 ± 3.872 3.603 ± 4.299 p=0.383	2.002 ± 1.058 1.477 ± 0.877 5.002 ± 7.985 p=0.144	1.701 ± 1.711 4.798 ± 5.265 2.890 ± 3.763 p=0.857	6.626 ± 4.683 11.382 ± 11.620 9.446 ± 13.249 p=0.873	0.431 ± 0.648 0.975 ± 1.381 0.514 ± 0.442 p=0.072	3.576 ± 4.429 6.437 ± 8.644 6.940 ± 9.271 p=0.918
Лимфни метастази N0 негативни N1-3 положителни	56 (68.29) 26 (30.71)	3.128 ± 3.865 3.166 ± 4.169 p=0.562	3.281 ± 5.744 4.026 ± 8.231 p=0.743	2.456 ± 6.062 3.361 ± 4.757 p=0.597	9.288 ± 13.175 4.733 ± 3.663 p=0.012	0.696 ± 1.043 0.598 ± 0.507 p=0.915	5.582 ± 7.271 8.515 ± 11.493 p=0.392
Туморна диференциация G1 добре диференциран G2 умерено диференциран G3 ниско диференциран	31 (37.80) 40 (48.78) 11 (13.41)	2.989 ± 3.131 3.355 ± 4.601 3.076 ± 1.836 p=0.795	5.251 ± 9.919 2.303 ± 2.078 2.879 ± 1.811 p=0.126	4.618 ± 5.429 2.672 ± 3.158 2.905 ± 1.447 p=0.139	7.333 ± 10.337 7.787 ± 8.934 9.901 ± 16.039 p=0.689	0.558 ± 0.514 0.790 ± 1.179 0.371 ± 0.288 p=0.481	4.028 ± 5.220 7.801 ± 10.093 7.366 ± 8.989 p=0.243
Туморна локализация Супраглотис Глотис Субглотис	30 (36.59) 43 (52.44) 9 (10.97)	3.141 ± 3.956 2.873 ± 3.385 4.403 ± 6.023 p=0.886	1.961 ± 1.734 4.577 ± 8.278 2.240 ± 1.578 p=0.702	1.796 ± 1.273 4.729 ± 5.327 1.659 ± 1.182 p=0.293	4.216 ± 4.125 9.661 ± 13.161 12.023 ± 6.780 p=0.015	0.648 ± 0.457 0.746 ± 1.180 0.393 ± 0.434 p=0.530	9.265 ± 10.490 3.978 ± 5.034 9.610 ± 12.960 p=0.417
Фамилна история Отрича Докладва Липсващи данни	63 (60.97) 19 (23.18) 13 (15.85)	3.117 ± 3.850 3.201 ± 4.209 p=0.952	3.181 ± 5.769 4.319 ± 8.139 p=0.917	2.567 ± 4.022 4.754 ± 5.408 p=0.015	9.541 ± 11.922 10.522 ± 11.963 p=0.987	0.703 ± 1.027 0.577 ± 0.593 p=0.868	4.748 ± 5.678 10.145 ± 11.211 p=0.031
Тютюнопушене Отрича ≤20 цигари дневно 21 - 40 цигари дневно ≥41 цигари дневно Липсващи данни	4 (4.87) 26 (31.70) 30 (36.58) 13 (15.85) 9 (10.97)	6.894 ± 8.849 3.567 ± 4.494 2.502 ± 2.600 3.151 ± 3.214 p=0.453	3.295 ± 1.822 4.302 ± 7.917 2.329 ± 2.162 4.525 ± 9.297 p=0.279	2.282 ± 1.605 4.297 ± 5.803 2.947 ± 4.104 3.725 ± 5.382 p=0.499	10.673 ± 9.034 14.022 ± 16.123 8.976 ± 9.986 4.888 ± 5.974 p=0.174	0.123 ± 0.087 0.939 ± 1.419 0.653 ± 0.532 0.395 ± 0.255 p=0.086	4.606 ± 6.775 5.515 ± 9.937 7.411 ± 7.146 4.005 ± 4.067 p=0.275
Употреба на алкохол Отрича <100 mL дневно 100 - 200 mL дневно >200 mL дневно Липсващи данни	13 (15.85) 20 (24.39) 19 (23.17) 17 (20.73) 13 (15.85)	2.990 ± 5.342 2.590 ± 1.912 3.484 ± 3.992 4.272 ± 4.749 p=0.146	2.046 ± 1.383 5.295 ± 10.256 2.634 ± 2.473 5.222 ± 9.002 p=0.154	2.257 ± 1.679 4.674 ± 4.949 3.532 ± 4.810 4.286 ± 5.121 p=0.506	9.990 ± 6.572 8.335 ± 8.433 11.953 ± 14.090 12.632 ± 18.264 p=0.892	0.758 ± 1.054 0.946 ± 0.997 1.067 ± 1.356 1.223 ± 1.832 p=0.108	5.317 ± 6.982 9.981 ± 12.399 3.469 ± 4.847 5.464 ± 4.533 p=0.391
Вредна работна среда Отрича Докладва Липсващи данни	46 (40.25) 36 (43.90) 13 (15.85)	3.001 ± 3.456 3.315 ± 4.440 p=0.501	2.370 ± 1.858 4.893 ± 9.363 p=0.620	2.159 ± 3.033 5.076 ± 7.727 p=0.020	9.090 ± 10.143 10.696 ± 13.886 p=0.455	0.727 ± 1.154 0.599 ± 0.542 p=0.302	5.614 ± 8.037 7.251 ± 9.202 p=0.218

4.6. Корелационен анализ между изследваните некодиращи РНКи и матрични РНКи

С цел да се анализира дали са свързани и каква е силата на зависимост между нивата на относителна експресия на нкРНКи в изследваната група пациенти се използва корелационен анализ на Spearman. Анализа също ни позволява да направим предположение дали една променлива (нкРНКа) зависи от една или повече други променливи. В допълнение се оцени и връзката между нивата на експресия между нкРНКи и предходно изследвани мРНКи като маркери за хипоксия, ангиогенеза и туморна прогресия върху същите проби и пациенти (246–248). Предходно изследваните маркери са следните: мРНКи за HIF1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha), HIF2 α (Hypoxia-inducible factor 2-alpha), HIF3 α (Hypoxia-inducible factor 3-alpha), VEGFA (Vascular endothelial growth factor A), VEGFR1 (vascular endothelial growth factor receptor 1), VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2), BCL2 (B-cell lymphoma 2), IL-8 (Interleukin – 8), MMP2 (Matrix Metalloproteinase 2), MMP9 (Matrix Metalloproteinase 9), PKM (pyruvate kinase muscle isozyme), MYC (Myelocytomatosis) и TP35 (tumor protein p53).

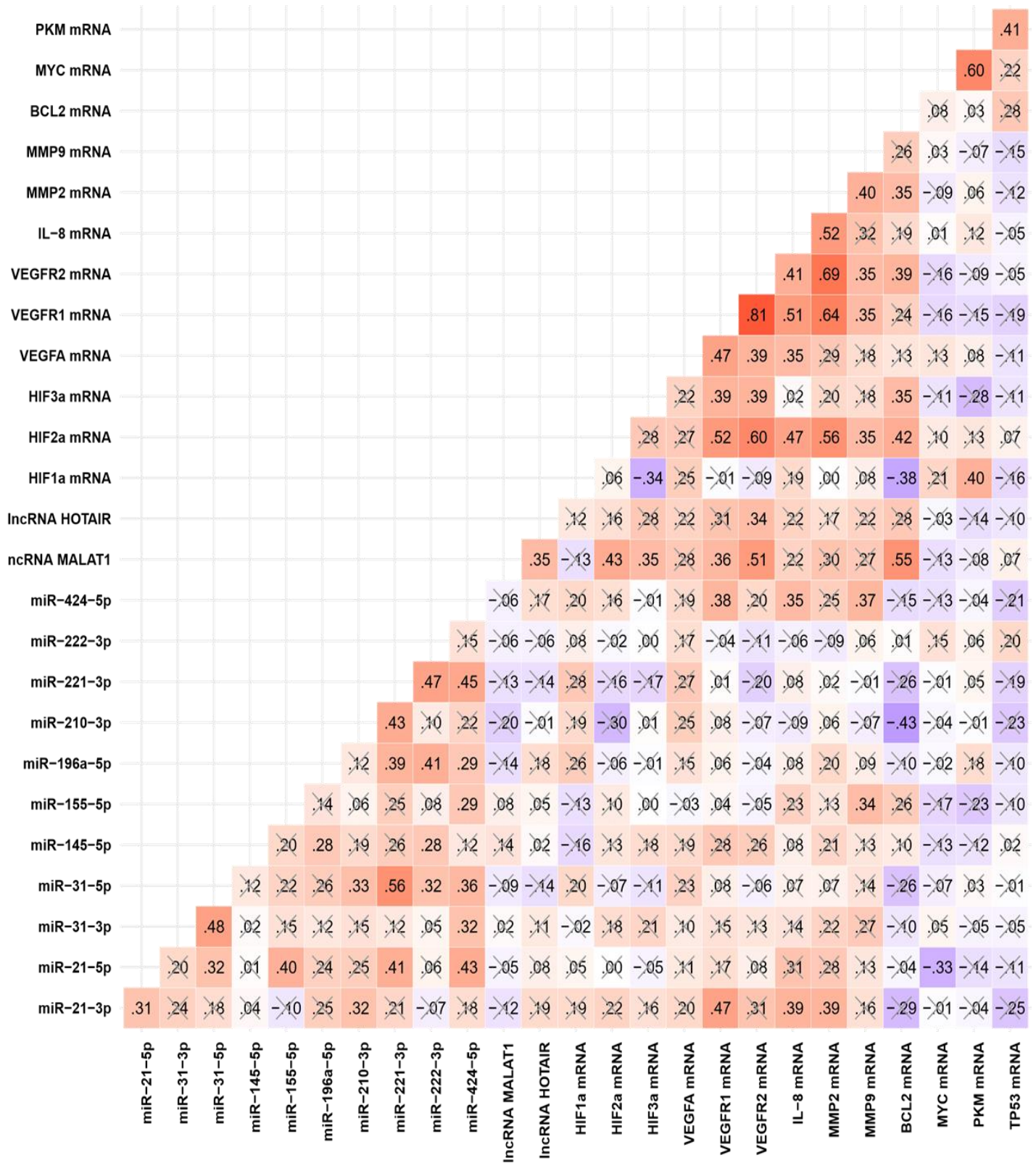
На следващата Фигура 4.19. са представени съответно матрица с корелационните коефициенти на всички възможни комбинации между нкРНКи и мРНКи. В червената скала са отбелязани положителните корелации, докато в синята скала са отбелязани отрицателните корелации. С кръст (X) са маркирани корелациите, които не са достигнали статистическа значимост. Допълнително статистически значимите корелации се представиха във вид на мрежа, с цел по-доброто визуализиране на потенциалните асоциации, благодарение на програмата за анализ на данни R (Фигура 4.20.). Съответно мрежите в червена и синя гама цветове представят положителна или отрицателна посока на корелация, а плътността на мрежите отразява и силата на корелационния коефициент.



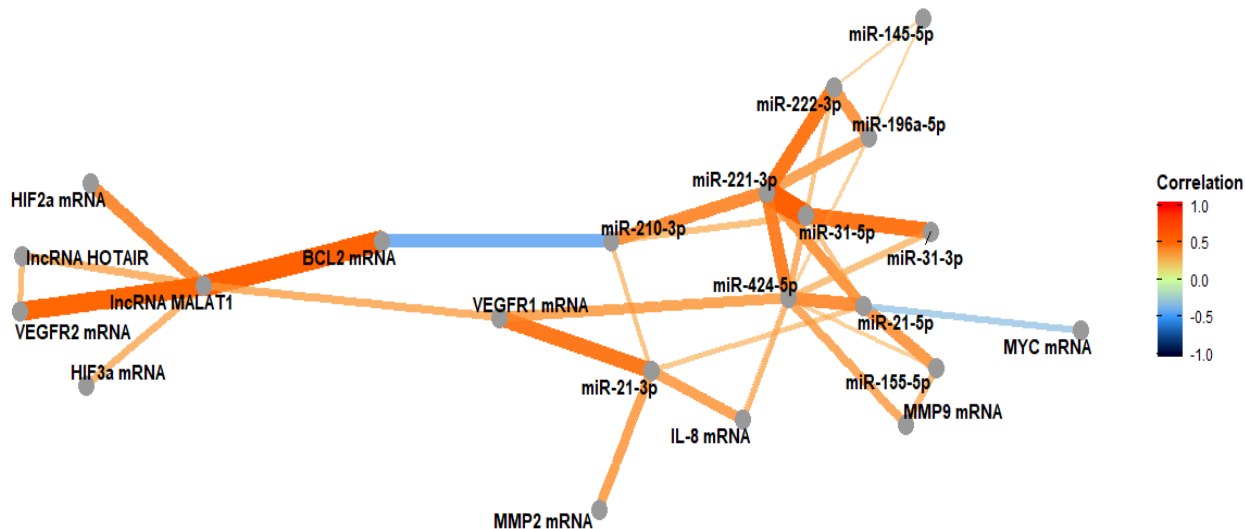
Фигура 4.20. Мрежа със статистически значимите корелационните връзки между маркерите. Без приложена корекция.

С цел да се избегнат фалшиво положително корелационни взаимовръзки се анализира Spearman's rho корелация с допълнителна корекция по Benjamini - Hochberg FDR (BH FDR). По този начин сте стеснява кръга до най-истинските и най-значими взаимовръзки между всички включени в анализа маркери.

На Фигури 4.21. и 4.22. са представени съответно матрицата с корелационните коефициенти и мрежата със статистически значими корелации между маркерите.



Фигура 4.21. Матрица с корелационните коефициенти на възможните комбинации между нкРНКи и мРНКи. С добавена корекция (BH FDR).



Фигура 4.22. Мрежа със статистически значимите корелационните връзки между маркерите. С добавена корекция (BH FDR).

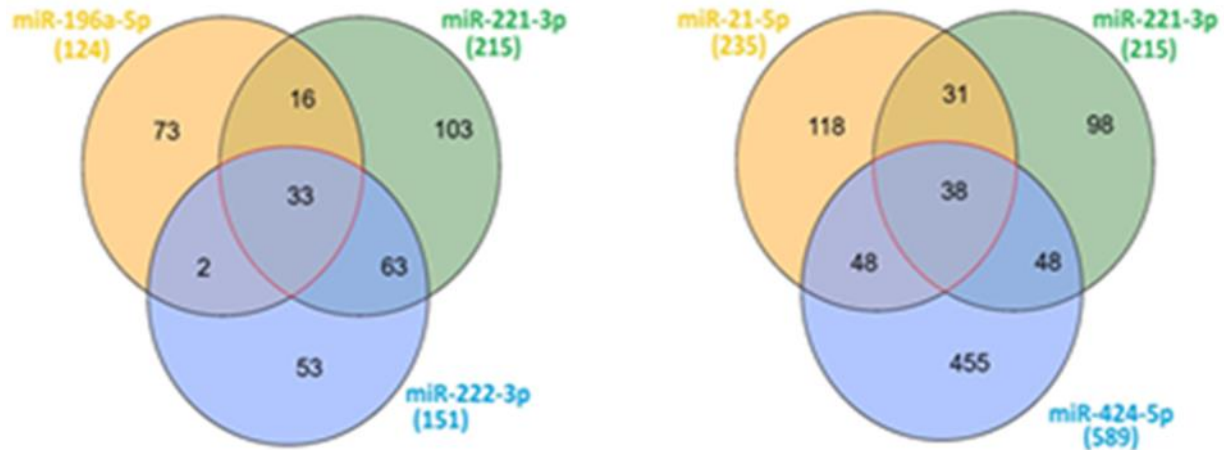
От Фигура 4.22. се вижда сформирана група от miRNAs, които успешно и значимо корелират по между си. Най-силна корелация показват групите: miR-196a-5p/miR-221-3p/miR-222-3p и miR-21-5p/miR-221-3p/miR-424-5p.

От корелационните връзки единствено две са с отрицателна посока: BCL2/miR-210-3p, както и MYC/miR-21-5p. Наблюдава се силна корелация по линията BCL2-MALAT1-VEGFR2. Също така MALAT1 има силно значима асоциация с HIF2, HIF3, HOTAIR и VEGFR1. VEGFR1 корелира положително с miR-21-3p и miR-424-5p. miR-21-3p също корелира с MMP2 и IL8, докато MMP9 е в тясна връзка с miR-155-5p и miR-424-5p.

4.7. Венн диаграми с пътищата, в които участват изследваните miRNAs и общите таргетни молекули, които си споделят

За да се обяснят предходно получените корелации между miRNAs се използваха Венн диаграми (Venn diagrams) (Фигура 4.23.). Целта е да се анализират общите пътища, които споделят групите miRNAs.

На Фигура 4.23. са представени броя на сигналните пътища, които се споделят между: (A) miR-196a-5p/miR-221-3p/miR-222-3p; (B) miR-21-5p/miR-221-3p/miR-424-5p. В скоби под всяка микроРНК, са представени общия брой пътища, в които тя участва самостоятелно според онлайн платформата <https://mpd.bioinf.uni-sb.de/>.



Фигура 4.23. Венн диаграми с броя на общите сигнални пътища между групираните микроРНКи (<http://www.interactivenn.net/>)

На следващите Таблицы от 4.13. и 4.14. са представени общите пътища, които се припокриват между miRNAs, показали корелация по между си. При анализа са включени всички пътища, в които участват miRNAs, а не са ограничени само до тези, които са ракови свързани.

Таблица 4.13. Сигнални пътищата, които се припокриват между miR-196a-5p/miR-221-3p/miR-222-3p.

BDNF signaling pathway
Colorectal cancer
DNA Damage Response
Ectoderm Differentiation
EGF/EGFR Signaling Pathway
Epithelial tube morphogenesis
EPO signaling pathway
ErbB signaling pathway
ErbB1 downstream signaling
FoxO signaling pathway
IGF-1 Signaling Pathway
Imatinib Resistance in Chronic Myeloid Leukemia
Insulin Signaling
Integrated Breast Cancer Pathway
Integrated Pancreatic Cancer Pathway
Links between Pyk2 and Map Kinases
MicroRNAs in cancer

MicroRNAs in cardiomyocyte hypertrophy
miRNA Regulation of DNA Damage Response
Oncostatin M Signaling Pathway
PDGFR-beta signaling pathway
Phosphatidylinositol binding
Physiological and Pathological Hypertrophy of the Heart
Proteoglycans in cancer
Ras signaling pathway
Signaling events mediated by Hepatocyte Growth Factor Receptor c-Met
Signaling events mediated by Stem cell factor receptor c-Kit
Signaling of Hepatocyte Growth Factor Receptor
Signaling Pathways in Glioblastoma
TCR Signaling Pathway

TGF-beta Signaling Pathway
Thyroid hormone signaling pathway

Transforming growth factor beta receptor signaling pathway
--

Таблица 4.14. Сигнални пътищата, които се припокриват между miR-21-5p/miR-221-3p/miR-424-5p.

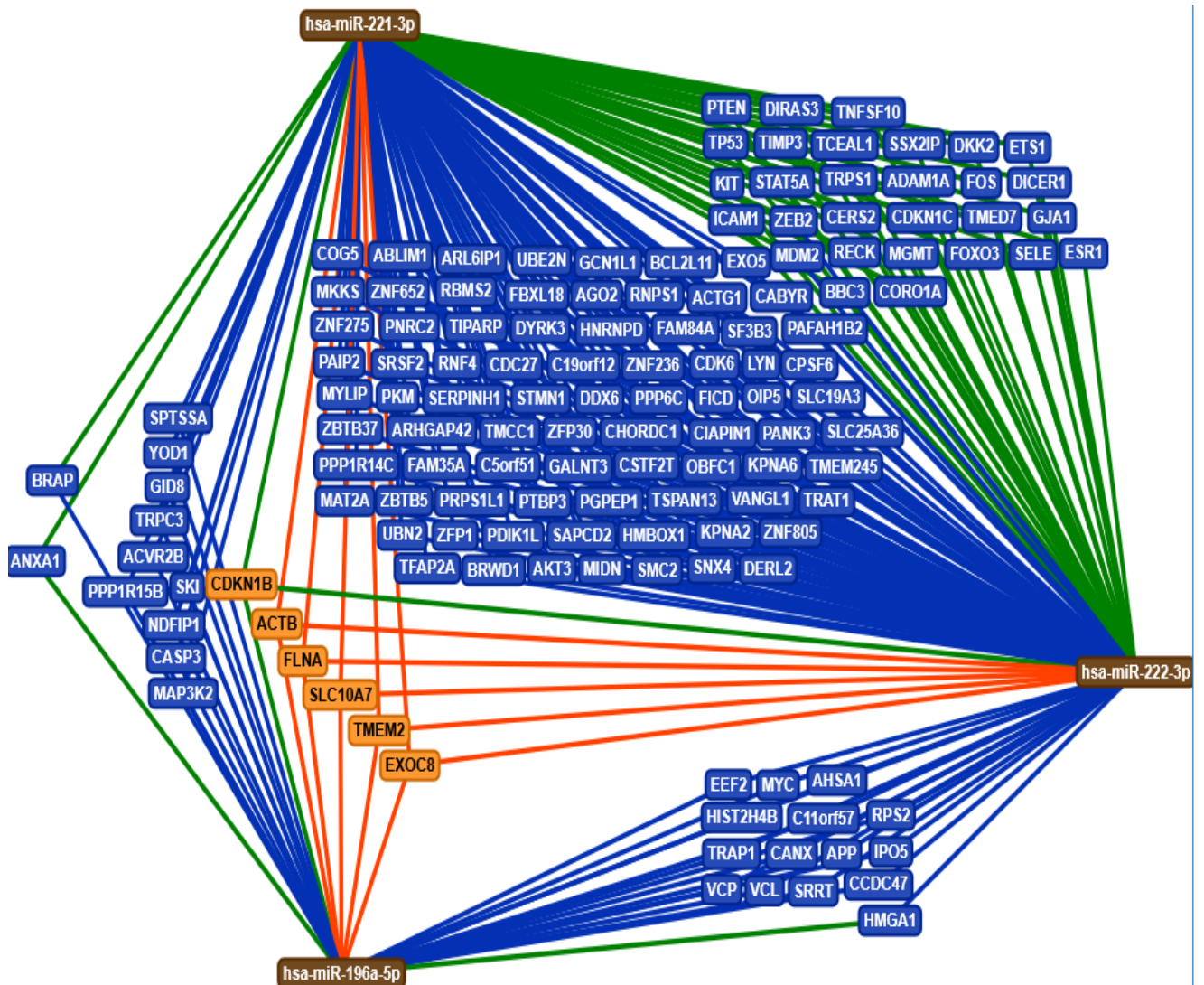
MicroRNAs in cancer
Hepatitis B
Pancreatic cancer
Pathways in cancer
Signaling Pathways in Glioblastoma
Small cell lung cancer
Proteoglycans in cancer
Integrated Breast Cancer Pathway
Melanoma
TGF-beta Signaling Pathway
miRNA Regulation of DNA Damage Response
Chronic myeloid leukemia
FoxO signaling pathway
Prostate cancer
DNA Damage Response only ATM dependent
Non-small cell lung cancer
DNA Damage Response
BDNF signaling pathway
Integrated Pancreatic Cancer Pathway

Glioma
Measles
EGF/EGFR Signaling Pathway
Retinoblastoma RB in Cancer
Cell cycle
Endometrial cancer
TSH signaling pathway
p53 signaling pathway
LPA receptor mediated events
Insulin Signaling
B Cell Receptor Signaling Pathway
Rac1/Pak1/p38/MMP-2 pathway
MicroRNAs in cardiomyocyte hypertrophy
G1 to S cell cycle control
mTOR signaling pathway
Transforming growth factor beta receptor signaling pathway
Ubiquitin specific protease activity
Ubiquitinyl hydrolase activity
Epithelial tube morphogenesis

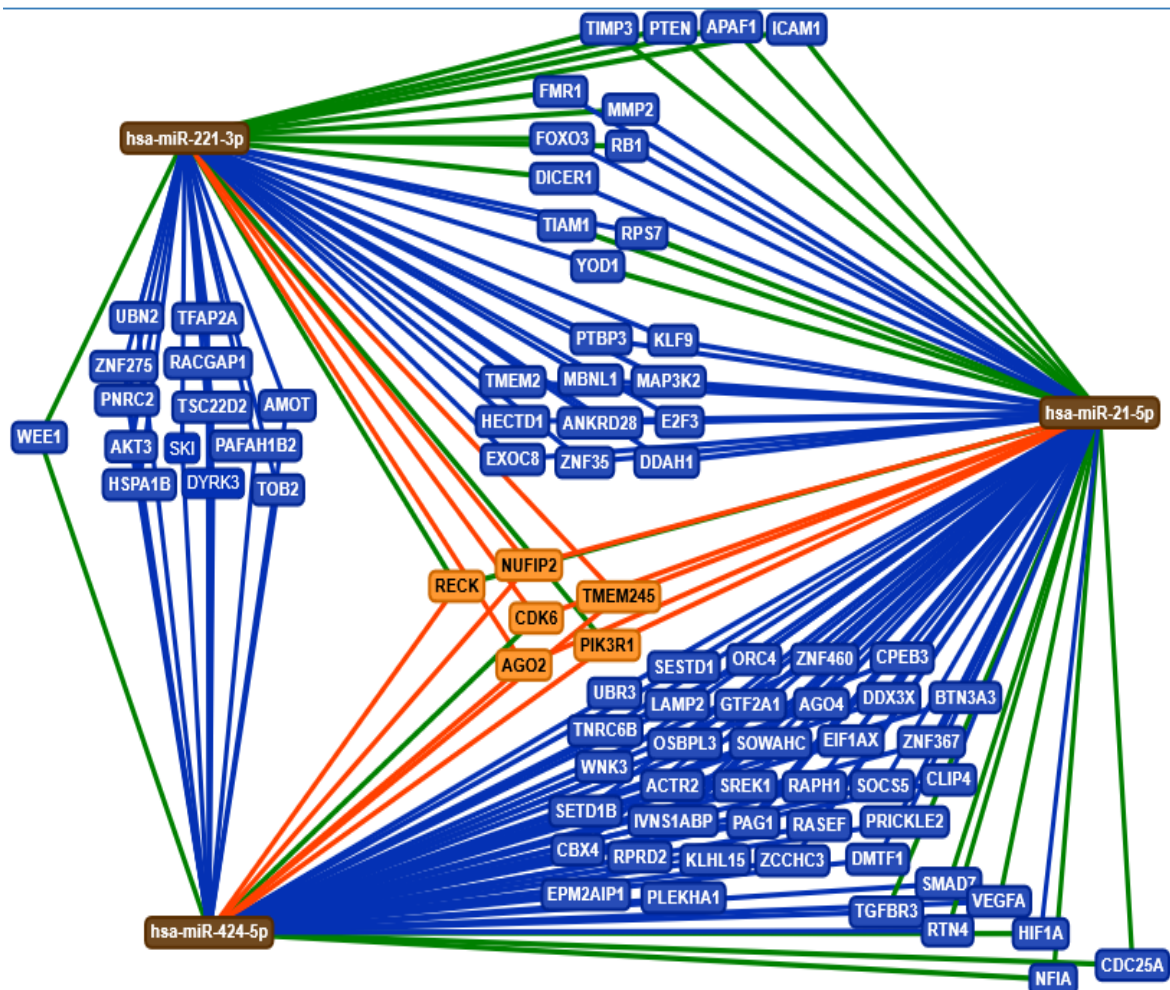
От друга страна благодарение на онлайн приложението <https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/>, се анализираха общите таргетни молекули, които споделят най-силно и значимо групирани от корелационния анализ miRNAs. На следващите Фигури 4.24. и 4.25. резултатите.

Легенда:

- Повеќе от 2 взаимодействия: цветни възли и ръбове – оранжев цвят;
- 2 взаимодействия (предиктивни, *in silico*): възли и ръбове оцветени в син цвят;
- Силните взаимодействия са обозначени със зелени ръбове.



Фигура 4.24. Таргетни молекули, които са общи между miR-196a-5p/miR-221-3p/miR-222-3p.



Фигура 4.25. Таргетни молекули, които са общи между miR-21-5p/miR-221-3p/ miR-424-5p.

4.8. Нива на експресия на изследваните маркери (нкРНКи) в плазмени проби от пациенти с напреднал рак на ларинкса

В дисертационния труд бяха изследвани нивата на експресия на всички тринадесет нкРНКи в плазмен материал от двадесет и двама пациенти, диагностицирани с рак на ларинкса. ПККЛ плазмената група се състоеше от 3 жени и 19 мъже, като средната възраст на пациентите, включени в изследването е 61 (възрастов обхват: 41-76 години). Всички пациенти бяха диагностицирани с авансирал рак на ларинкса. Осемнадесет пациента докладваха системно тютюнопушене и консумация на твърд алкохол. Четиринадесет ПККЛ пациента докладваха излагане на вредна работна среда (Таблица 3.2.).

Изчислението на относителната експресия на биомаркерите в таргетната ПККЛ група се осъществи на база контролна група, която беше набрана за целите на изследването. Контролната група се състоеше от 21 неонкологично болни доброволци, включваща 4 жени и 18 мъже със средна възраст на групата 45 години (възрастов обхват: 29-68 години). Седемнадесет контроли докладваха системно тютюнопушене, като броя варираше от 5-10 до 40 изпушени цигари на ден. Осемнадесет участника докладваха консумация на алкохол (твърд алкохол, бира и вино), като количеството

което консумират беше до 200мл твърд алкохол дневно. Критериите, по които се сравняваха нивата на експресия бяха полово и възрастово групиране (над и под 60 годишна възраст). Шест от доброволците докладваха съпътстващи заболявания (четири свързани с възпаление и подуване на лимфните възли, по един с диабет и дискинезия).

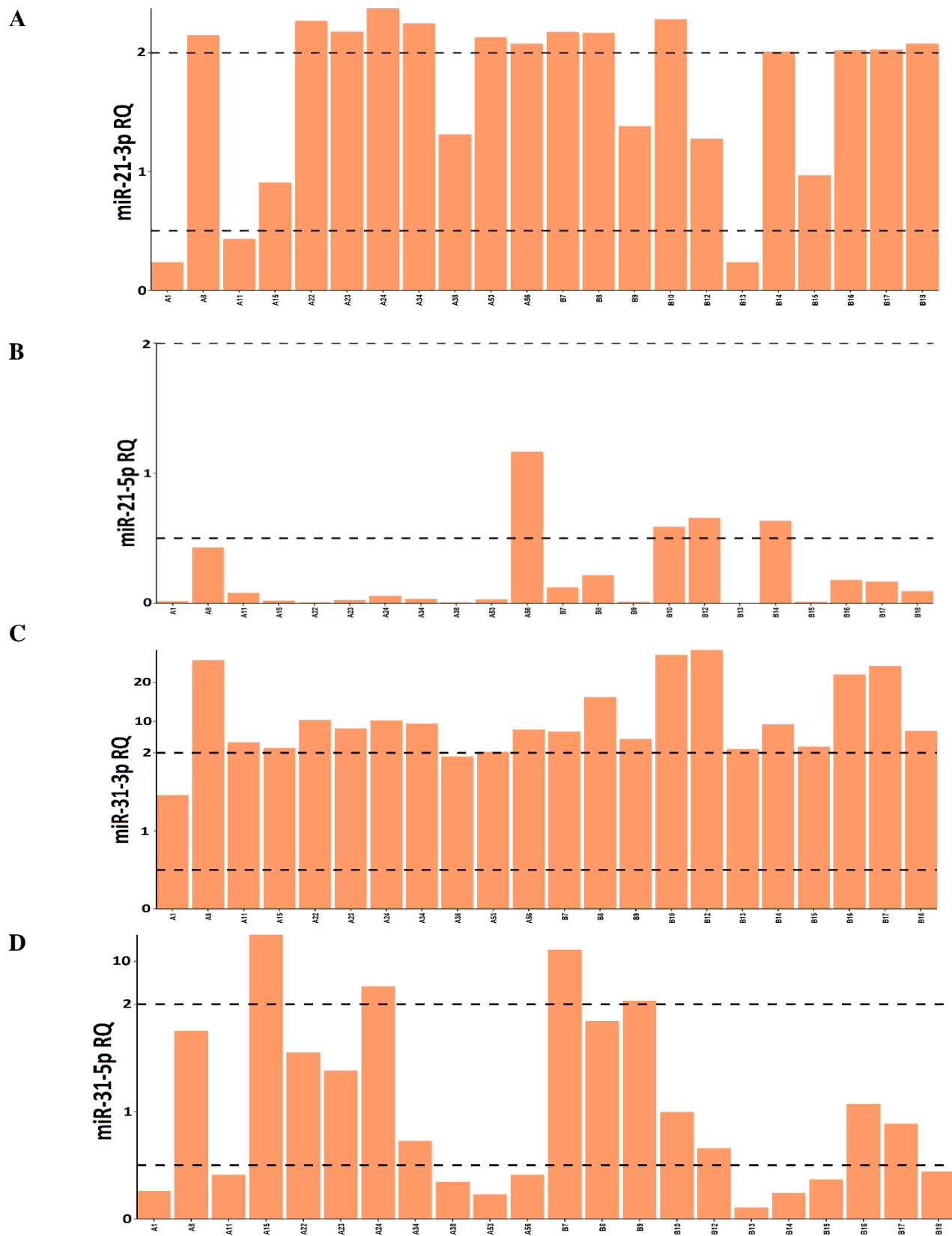
Нивата на експресия на всички маркери, както броя и процент пациенти, при които се установяват повишени, без промяна и понижени нива на относителна експресия са резюмирани в Таблица 4.15.

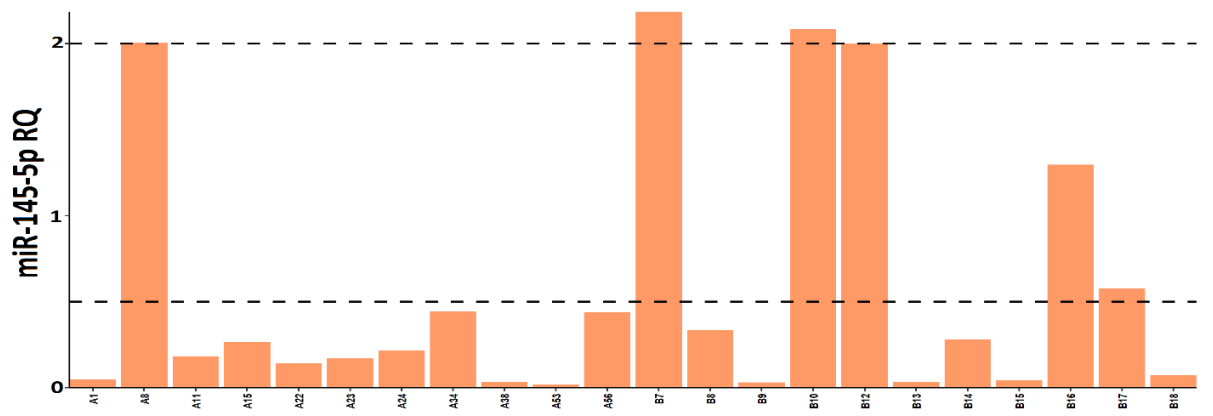
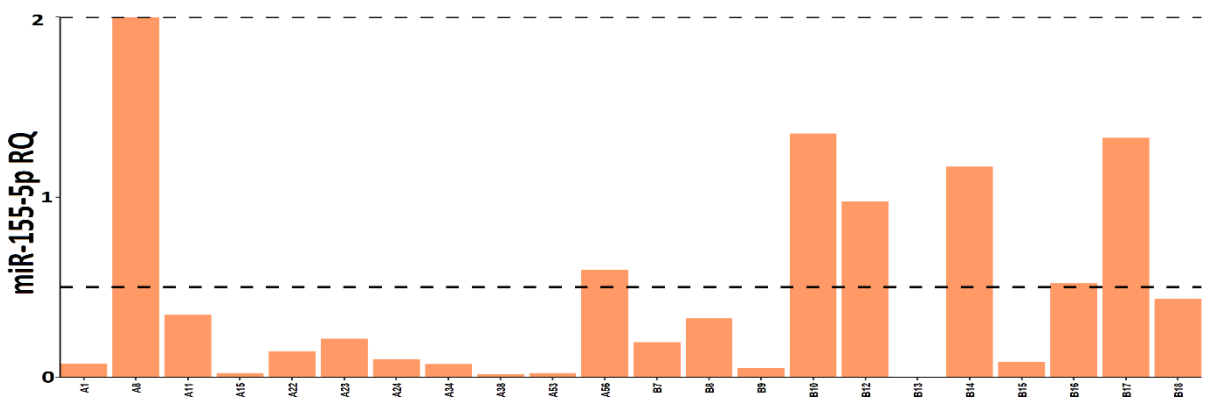
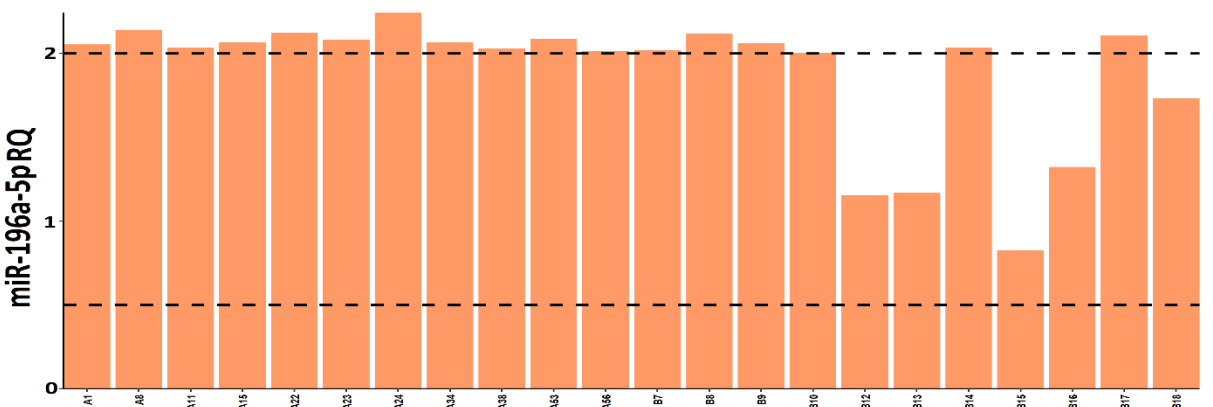
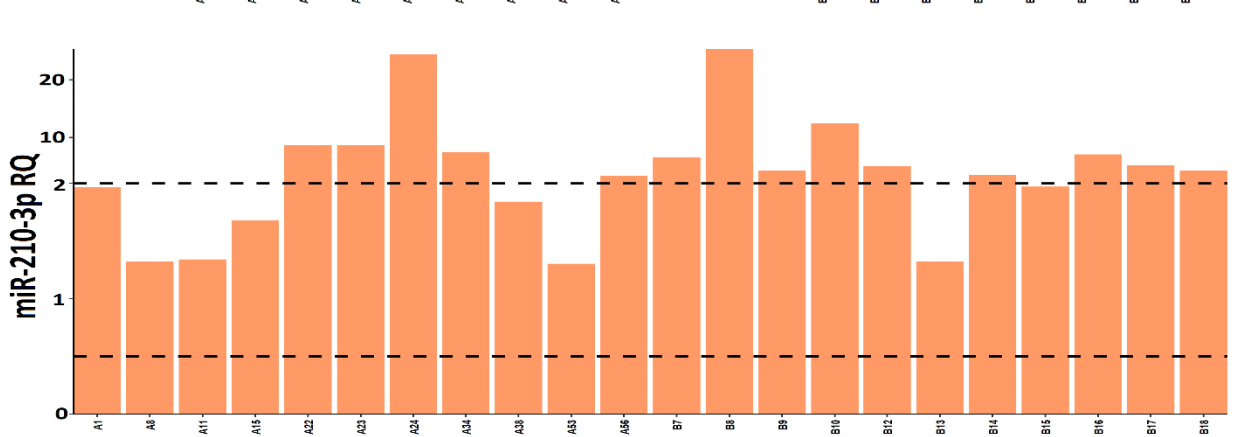
Таблица 4.15. Относителна експресия на включените с плазмен материал пациенти. Представени са средните RQ стойности при пациенти, които показват повишени, понижени и без промяна в експресионните нива.

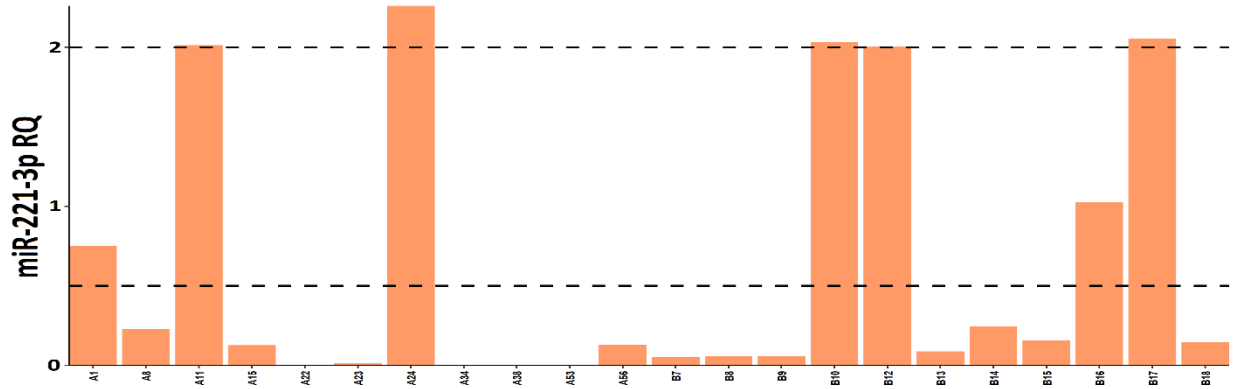
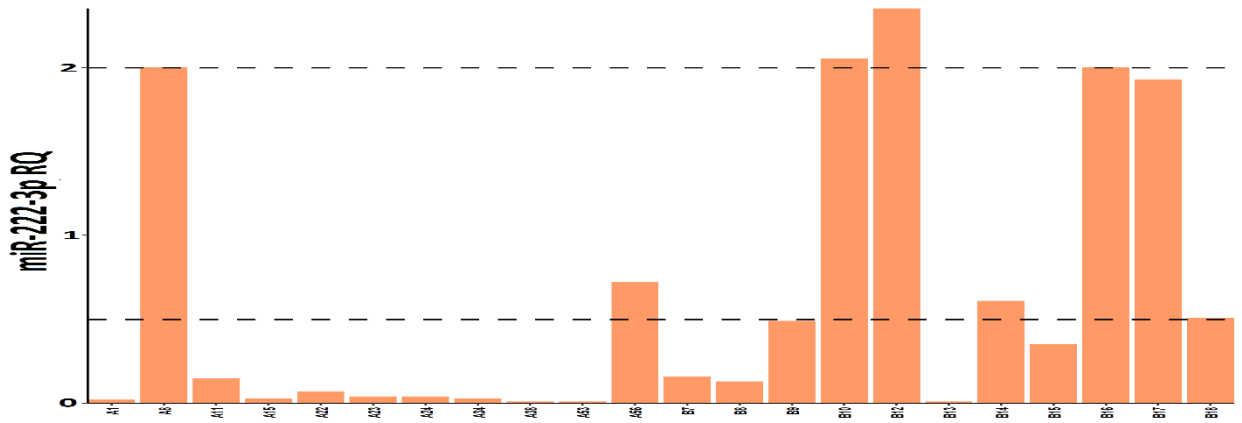
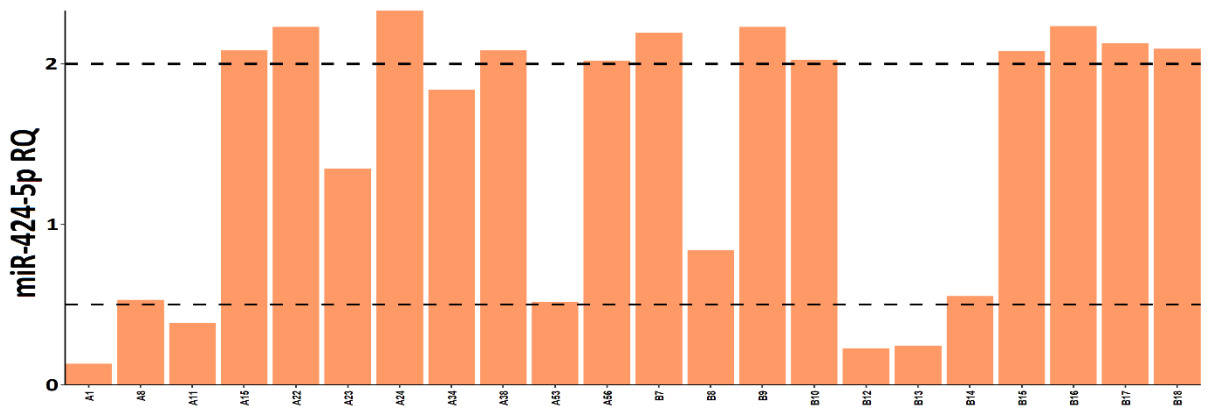
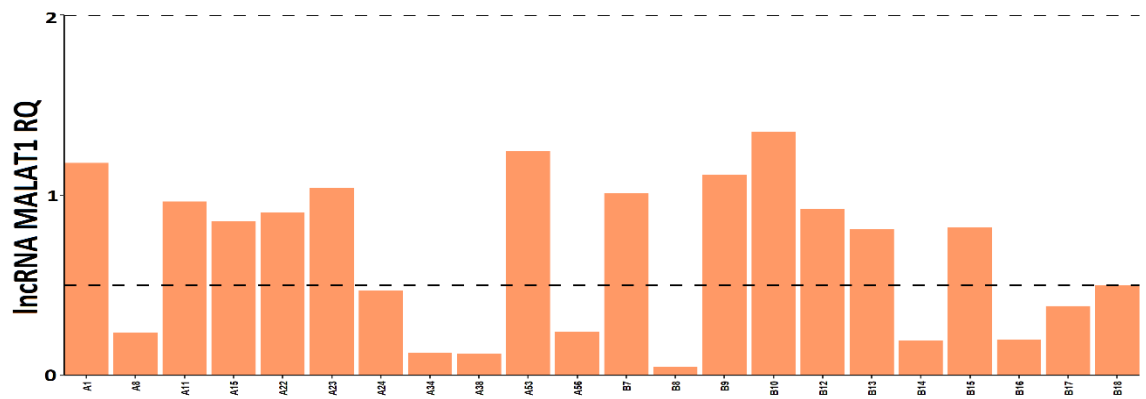
ncRNA	Пациенти с повишени експресионни нива n (%) Средно RQ±SD	Пациенти с нормални нива на експресия n (%) Средно RQ±SD	Пациенти с понижени нива на експресия n (%) Средно RQ±SD
miR-21-3p	14 (63.64) 5.14±2.18	5 (22.73) 1.17±0.21	3 (13.64) 0.29±0.11
miR-21-5p	Не се установяват данни	5 (22.73) 0.69±0.28	17 (77.27) 0.06±0.07
miR-31-3p	20 (90.91) 11.91±8.74	2 (9.09) 1.71±0.35	Не се установяват данни
miR-31-5p	4 (18.18) 8.77±4.96	9 (40.91) 1.20±0.44	9 (40.91) 0.31±0.11
miR-145-5p	4 (18.18) 3.39±1.71	16 (72.72) 0.17±0.14	2 (9.09) 0.93±0.50
miR-155-5p	1 (4.55) 2.01	6 (27.27) 0.99±0.36	15 (68.18) 0.14±0.13
miR-196a-5p	17 (77.27) 3.51±1.18	5 (22.73) 1.24±0.33	Не се установяват данни
miR-210-3p	14 (63.64) 8.98±7.15	8 (36.36) 1.59±0.30	Не се установяват данни
miR-221-3p	5 (22.73) 3.46±2.13	2 (9.09) 0.88±0.19	15 (68.18) 0.08±0.08
miR-222-3p	4 (18.18) 4.04±3.35	5 (22.73) 0.90±0.58	13 (59.10) 0.11±0.14
miR-424-5p	12 (54.55) 4.89±1.94	6 (27.27) 0.94±0.54	4 (18.18) 0.25±0.10
lncRNA MALAT1	Не се установяват данни	12 (54.55) 1.01±0.17	10 (45.45) 0.25±0.13
lncRNA HOTAIR	8 (36.36) 5.75±5.62	14 (63.64) 1.03±0.39	Не се установяват данни

Индивидуалните нива на експресия при ПМКЛ пациентите са представени на следващата Фигура 4.26. За визуализиране на относителната експресия на всеки

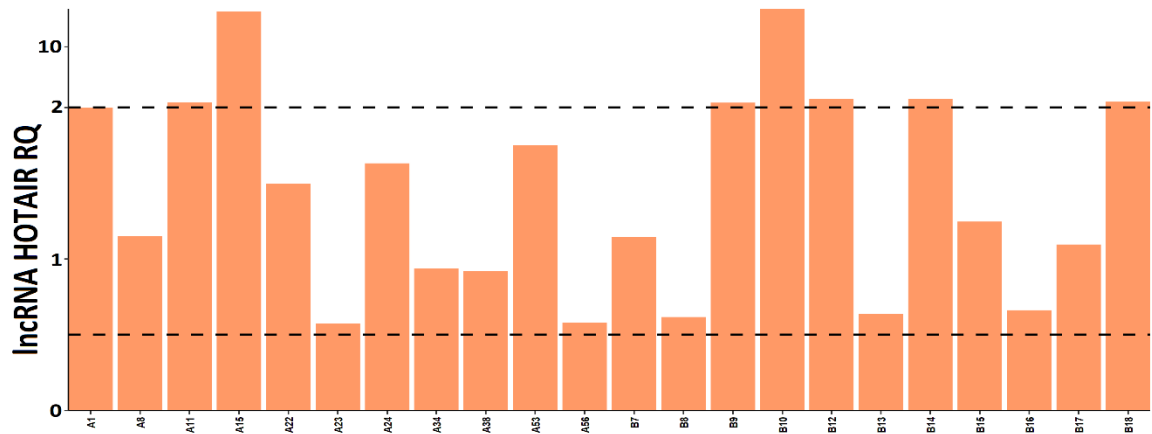
пациент се приложиха прекъснати бар плотове с пунктирна линия, която маркира стойностите за повишена експресия ($RQ > 2$) и понижена експресия ($RQ < 0.5$).



E**F****G****H**

I**J****K****L**

М

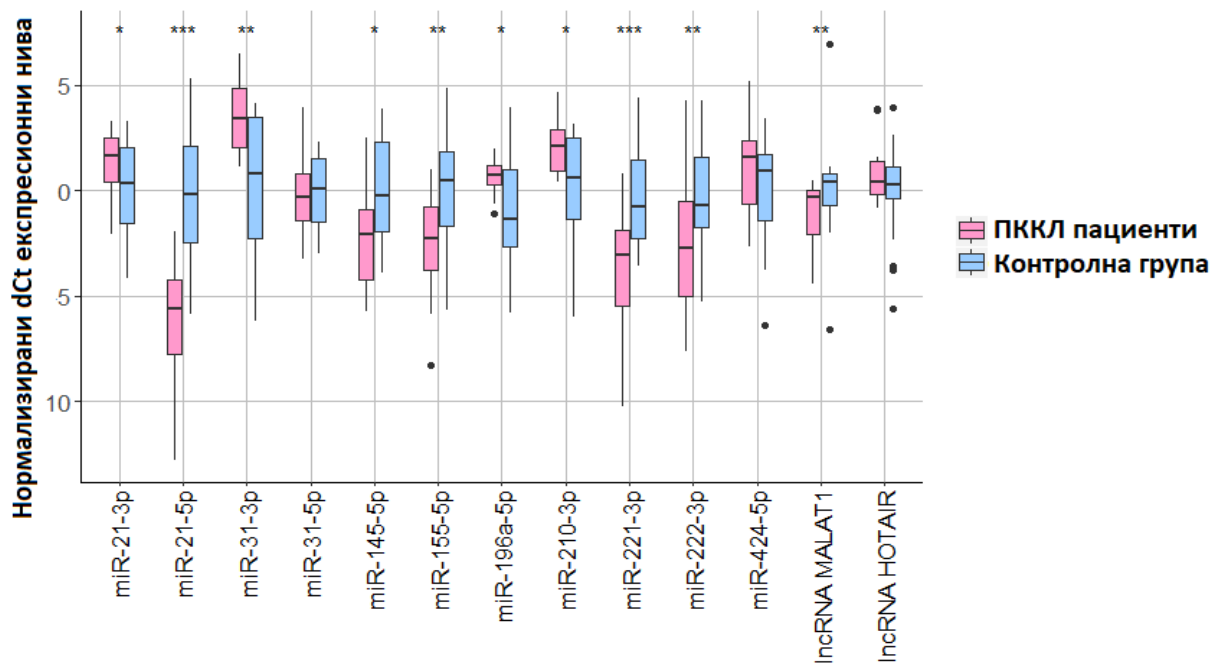


Фигура 4.26. Представяне на индивидуалните експресионни стойности (RQ) на (A) miR-21-3p; (B) miR-21-5p; (C) miR-31-3p; (D) miR-31-5p; (E) miR-145-5p; (F) miR-155-5p; (G) miR-196a-5p; (H) miR-210-3p; (I) miR-221-3p; (J) miR-222-3p; (K) miR-424-5p; (M) lncRNA MALAT1 и (L) lncRNA HOTAIR в плазма от пациенти с авансирал рак на ларинкса (n=22), спрямо контролната група (неонкологично болни доброволци; n=21).

С цел да се определи кои от нкРНКи са статистически значимо променени в таргетната ПККЛ група в сравнение с контролната група се проведе статистически T-test за независими извадки. Данните, които бяха използвани за сравнение на групите бяха нормализирани експресионни dCt нива.

Експресионните нива на miR-21-р, miR-31-3р, miR-196a-5р, miR-210-3р, miR-424-5р и lncRNA HOTAIR бяха повишени в таргетната ПККЛ група в сравнение с контролната група, докато нивата на miR-21-5р, miR-31-5р, miR-145-5р, miR-155-5р, miR-221-3р, miR-222-3р и lncRNA MALAT1 бяха понижени в таргетната ПККЛ група в сравнение с контролната група. Некодиращите РНК, които бяха значимо променени в таргетната ПККЛ група бяха miR-21-3р (p=0.048), miR-21-5р (p<0.001), miR-31-3р (p<0.001), miR-145-5р (p=0.007), miR-155-5р (p=0.005), miR-196a=5р (p=0.041), miR-210-3р (p=0.005), miR-221-3р (p<0.001), miR-222-3р (p=0.009) и lncRNA MALAT1 (p=0.004). Биомаркерите, които не достигнаха статистическо ниво на значимост са miR-31-5р (p=0.721), miR-424-5р (p=0.130) и lncRNA HOTAIR (p=0.224).

Преобразуваните и нормализирани dCt стойности в проби от плазма и контролна група са визуализирани с бокс плотове (Фигура 4.27.).



Фигура 4.27. Сравнение на експресионните нива на всички биомаркери между плазмена ПККЛ таргетна група (n=22) и контролна група (n=21). Ниво на значимост: *- p<0.05; **- p<0.01; ***-p<0.001

Допълнително към сравнението на нормализираните dCt между двете изследвани групи, бяха изчислени и статистически сравнени RQ стойностите, както на ПККЛ плазмената група така и на контролната група. За изчислението на RQ стойностите на контролната група беше използвана средна стойност на dCt стойностите на контролната група. Този вид допълнителен анализ допринесе с потвърдителни резултати към предходния анализ, както и да се открият най-статистически значимо променените нива на експресия в двете изследвани групи. Резултатите за двете групи и нивата на значимост са представени на следващата Таблица 4.16.

Таблица 4.16. Нива на средна относителна експресия ± стандартно отклонение за ПККЛ група, контролна група и ниво на значимост.

Изследвани нкРНКи	Средна стойност ± стандартно отклонение (RQ±SD)		Ниво на значимост
	ПККЛ група (n=22)	Контролна група (n=21)	
miR-21-3p (RQ)	3.59±2.75	2.03±2.09	0.047
miR-21-5p (RQ)	0.05±0.07	2.16±2.72	<0.001
miR-31-3p (RQ)	10.98±8.84	1.08±0.97	<0.001
miR-31-5p (RQ)	2.22±3.87	1.63±1.45	0.520
miR-145-5p (RQ)	0.65±0.90	2.96±4.23	0.016
miR-155-5p (RQ)	0.46±0.56	4.84±8.40	0.018
miR-196a-5p (RQ)	3.00±1.43	1.00±0.83	<0.001
miR-210-3p (RQ)	6.30±6.70	5.62±5.57	0.720
miR-221-3p (RQ)	0.70±1.02	4.15±6.93	0.026

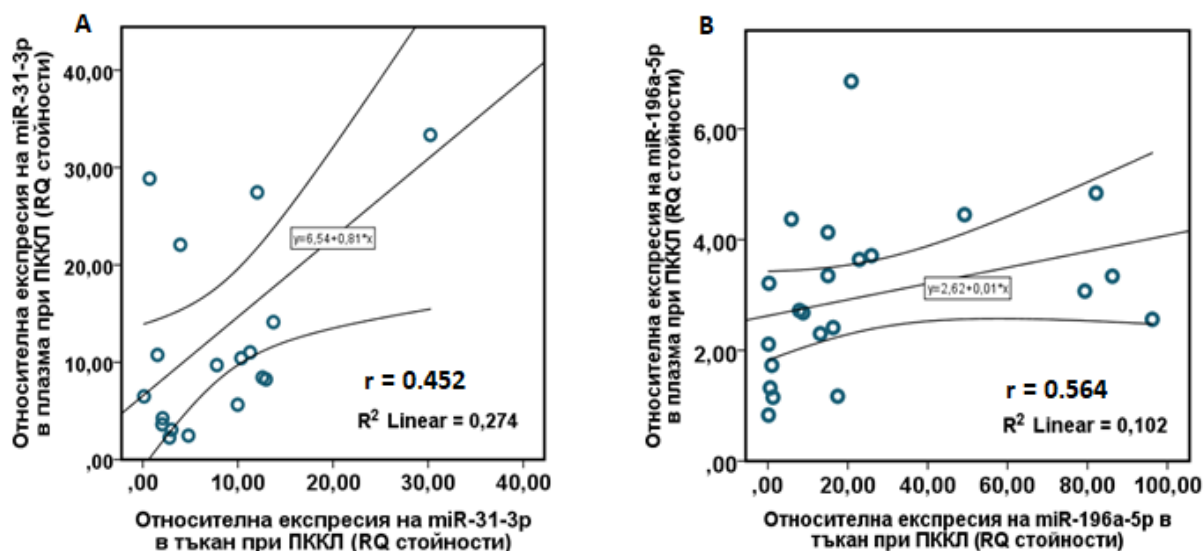
miR-222-3p (RQ)	0.98±2.00	4.10±6.55	0.038
miR-424-5p (RQ)	2.97±2.60	2.29±2.75	0.460
MALAT1 (RQ)	0.67±0.42	1.17±0.65	0.004
HOTAIR (RQ)	2.75±4.01	3.30±4.82	0.686

Резултатите от сравнението на RQ стойностите между двете групи се препокриха, с изключение за miR-210-3p. Нивата на значимост са представени в Таблица 4.23. miR-210-3p показва статистическа значима разлика при сравнение на нормализирани dCt стойности ($p=0.005$), докато при сравнението на RQ стойностите за този маркер не се достигна до приетото в изследванията статистическо ниво на значимост ($p=0.720$). Поради тази причина miR-210-3p беше отхвърлен в следващите анализи, както и miR-31-5p, miR-424-5p и lncRNA HOTAIR, които също не се различаваха статистически значимо в изследваната таргетна група спрямо контролната.

4.9. Корелационен анализ на изследваните некодиращи РНКи между тъканни проби и кореспондиращите им плазмени проби

С цел да се определят кои нкРНКи са положително корелирани между изследваните тъканни и плазмени ПККЛ проби от включените 22 ПККЛ пациента се проведе корелация на Pearson, тъй като се търси линейна зависимост. Резултатите от корелационния анализ показаха положителна значима корелация за miR-31-3p ($r=0.452$, $p=0.035$) и miR-196a-5p ($r=0.564$, $p=0.006$), които са представени на Фигура 4.28. Резултатите от Pearson корелацията на останалите некодиращи РНКи са: miR-21-5p ($r=0.062$, $p=0.786$), miR-155-5p ($r=0.129$, $p=0.566$), miR-221-3p ($r=0.047$, $p=0.835$), miR-222-3p ($r=0.115$, $p=0.612$) lncRNA MALAT1 ($r=0.009$, $p=0.979$), но не достигнаха статистическа значимост. miR-145-5p и miR-210-3p показаха тенденция за линейна корелация съответно с умерен корелационен коефициент $r=0.378$ ($p=0.082$) и $r=0.340$ ($p=0.121$), но също не достигнаха статистическа значимост.

Този вид анализ предостави информация за отсяването на най-значимо променените нкРНК както в тъкан, така и в плазма, които биха послужили за потенциални неинвазивни маркери при диагностицирането на авансирал ПККЛ.

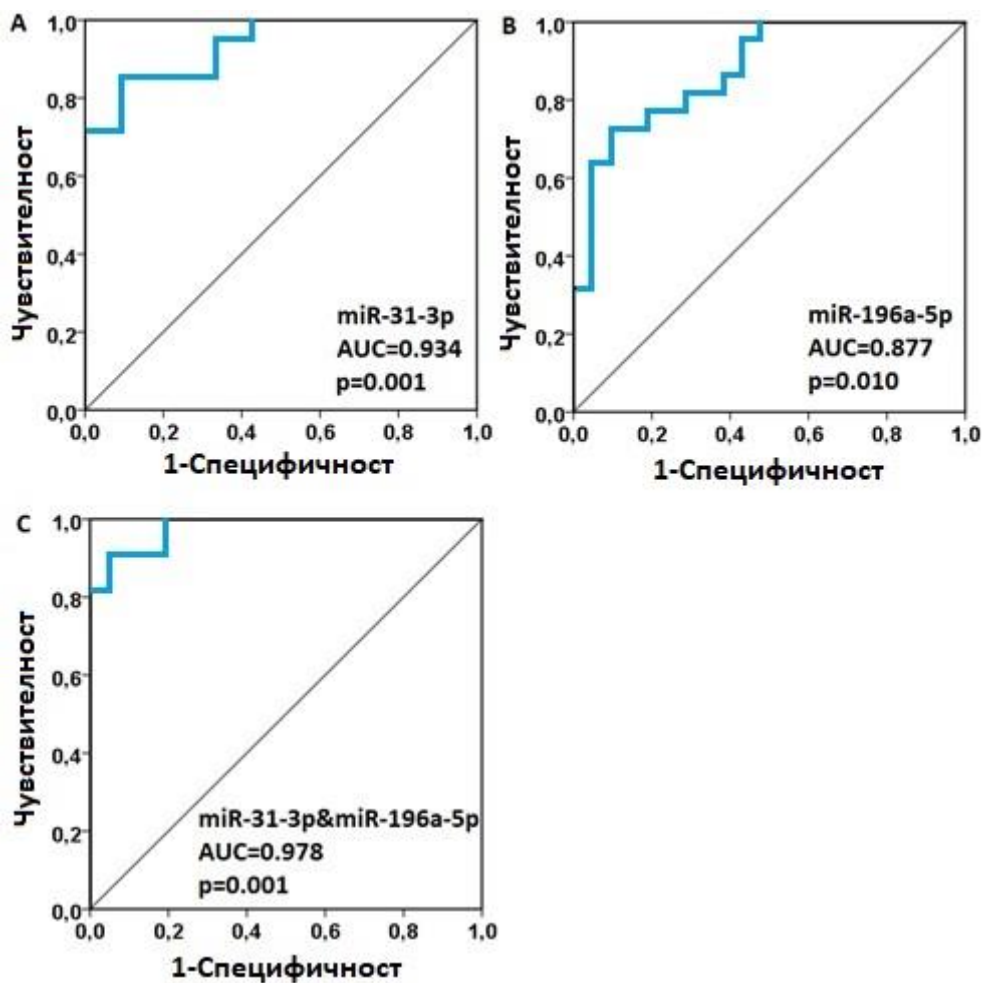


Фигура 4.28. Корелация между изследваните ПККЛ тъканни и кореспондиращите им плазмени проби за (А) miR-31-3p $r=0.452$, $p=0.039$; (В) miR-196a-5p $r=0.564$, $p=0.008$.

4.10. ROC анализ на най-значимо променените в плазма miR-31-3p и miR-196a-5p

Във връзка с изследването и установяването разграничаващия потенциал на най-значимо дерегулирани в изследването miR-31-3p и miR-196a-5p като плазмени неинвазивни биомаркери при напреднал карцином на ларинкса се проведе ROC анализ на микро РНКите самостоятелно и в комбинация. miR-31-3p показва по-добра разграничителна способност ($AUC=0.934$, $95\%CI: 0.865 - 1.000$, $p=0.001$) между ПККЛ групата пациенти и контролната група, в сравнение с miR-196a-5p. При оптимална гранична стойност (cut-off value) $RQ=2.96$ за miR-31-3p чувствителността е 85.7% и специфичността е 91.5%. miR-196a-5p плазмените нива показаха $AUC=0.877$, $95\%CI: 0.775 - 0.978$; $p<0.001$ с чувствителност 77.3% и специфичност 81.0% при гранична стойност (cut-off value) равна на $RQ=2.10$.

При използване на неонкологичните контролни проби като калибратори, данните от комбинацията на miRNAs miR-31-3p&miR-196a-5p превъзхождаха предходните резултати от разграничителния потенциал на miR-31-3p и miR-196a-5p самостоятелно ($AUC=0.978$, $95\% CI: 0.945 - 1.000$, $p<0.001$ с чувствителност 100% и специфичност 81% при гранична стойност (cut-off): $RQ=2.99$). Коефициентите които се получиха от анализа и се използваха за умножението на изходните RQ бяха съответно $RQ\ miR-31-3p*0.6$ и $RQ\ miR-196a-5p*1.0$. Резултатите са представени на Фигура 4.29.



Фигура 4.29. ROC анализ на (A) miR-31-3p (AUC=0.943, 95% CI: 0.865 – 1.000, $p=0.001$); (B) miR-196a-5p (AUC=0.877, 95% CI: 0.775-0.978, $p<0.001$); (C) Комбинация между miR-31-3p&miR-196a-5p (AUC=0.978, 95% CI: 0.945 – 1.000, $p<0.001$)

4.11. Асоциация между експресионните нива на miR-31-3p и miR-196a-5p в таргетната плазмена ПМКЛ група и кликопатологичните характеристики на пациентите

За да се определи дали най-статистически значимо променените циркулиращи miR-31-3p и miR-196a-5p (самостоятелно и в комбинация) могат да предскажат кликопатологичните характеристики на изследваната таргетна извадка се използваха Т-тест и ANOVA статистически методи. Резултатите са представени в Таблица 4.17., но за съжаление нито една от двете миРНКи не показаха значителна връзка, което предполага, че те не могат да бъдат използвани като маркери при кликопатологичната диагноза на пациентите с ПМКЛ.

Таблица 4.17. Асоциация между плазмените нива на miR-31-3p и miR-196a-5p (самостоятелно и в комбинация) с клиникопатологичните характеристики на изследваната ПККЛ група пациенти.

Клиникопатологични характеристики	ПККЛ пациенти (n; %)	miR-31-3p експресия	miR-196a-5p експресия	miR-31-3p&miR-196a-5p expression
Пол Женски Мъжки	3 (13.64) 19 (86.36)	9.26±7.17 11.41±9.45 p=0.989	3.03±1.52 3.42±0.91 p=0.784	11.352±8.607 14.256±12.861 p=0.712
Възраст ≤ 60 > 60	11 (50.00) 11 (50.00)	8.91±6.03 13.46±11.37 p=0.372	3.09±1.02 2.95±1.89 p=0.461	9.769±4.689 17.950±15.998 p=0.119
Туморен стадий T3 T4	11 (50.00) 11 (50.00)	11.76±8.66 10.37±9.85 p=0.933	2.94±1.29 3.11±1.67 p=0.534	11.784±7.745 15.936±15.662 p=0.440
Нодален стадий N0 N1-3	10 (45.45) 12 (54.55)	12.22±9.05 10.08±9.34 p=0.902	3.09±1.16 2.96±1.73 p=0.628	12.407±7.830 15.071±15.246 p=0.605
Туморна диференциация G1 G2 G3	7 (31.82) 11 (50.00) 4 (18.18)	13.27±8.28 9.26±9.07 12.29±12.66 p=0.551	2.67±1.54 3.44±1.43 2.30±1.21 p=0.326	12.632±7.452 11.456±8.999 22.618±23.264 p=0.294
Туморна локализация Глотис Супраглотис	10 (45.45) 12 (55.55)	13.38±10.42 8.98±7.87 p=0.425	2.82±1.21 3.12±1.76 p=0.823	12.201±7.551 15.794±15.953 p=0.514
Фамилна история Отричат Докладват	16 (72.73) 6 (27.27)	13.20±9.75 5.85±3.98 p=0.127	2.88±1.24 3.38±1.97 p=0.693	15.335±12.870 9.926±10.344 p=0.330
Тютюнопушене Отричат ≤20 Цигари дневно Между 21 и 40 цигари дневно	6 (27.27) 7 (31.82) 9 (41.00)	16.80±10.11 9.333±8.98 8.87±8.14 p=0.333	2.73±1.48 3.06±1.33 3.21±1.67 p=0.895	15.210± 7.411 9.578± 7.052 16.290±17.255 p=0.549
Алкохол Отричат ≤100 mL дневно >100 mL дневно	6 (27.27) 6 (27.27) 10 (45.45)	16.80±10.11 13.48±10.20 5.71±3.74 p=0.620	2.73±1.48 3.30±0.92 3.03±1.80 p=0.676	15.210± 7.411 12.881± 8.639 13.637±16.608 p=0.949
Вредна среда Отричат Докладват	8 (36.37) 14 (63.63)	12.60±10.49 10.18±8.33 p=0.692	2.71±1.17 3.21±1.61 p=0.714	11.257± 7.067 15.347±14.444 p=0.384

4.12. Патогенни соматични промени при напреднал ЧПВ-негативен плоскоклетъчен карцином на ларинкса, установени посредством таргетно NGS секвениране

С цел да се определи соматичния мутационен спектър на пациенти с авансирал карцином на ларинкса се проведе таргетно секвениране от ново поколение. Общия брой проби, които бяха включени в анализа бяха 57 туморни проби от свежо-замразена тъкан, отделена по време на хирургична интервенция. Средната възраст на пациентите, които бяха включени е 62 години (възрастов обхват: 41-84 години). Кохортата съставлява 3 жени и 54 мъже, всичките диагностицирани с напреднал плоскоклетъчен карцином на ларинкса. Разпределението според Т стадия беше както следва: Т3 – 20 пациента (35%) и Т4 – 37 пациента (65%). Хистологично верифицирани метастази се откриваха при 25 пациента (44%). Разпределението на туморните локации беше 26 супраглотисни (46%), 22 глотисни (39%) и 9 субглотисни (15%) злокачествени образувания. Петдесет пациента докладваха злоупотреба с тютюнопушене и 39 пациента докладваха злоупотреба с твърд алкохол.

ЧПВ (HPV; Human Papilloma Virus) тестване беше осъществено при тъканните проби, с готов кит за детекция на вирусна ДНК. Анализът е проведен с помощта на digene HPV Genotyping RH test (Qiagen, Хилден, Германия), включващ два кита: за амплификация и за детекция на 18 високо-рискови типа HPV (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 73 и 82). Резултатите бяха потвърдени с помощта на nested PCR с MY/GP праймери. ЧПВ тестването беше негативно за изследваните проби.

Таргетното секвениране се осъществи посредством TSCAP панел на Illumina (САЩ) на платформата MiSeq, Illumina. От получените данни се установиха 13 непубликувани варианта с патогенна предикция и 79 публикувани мутации (общо 92 патогенни замени) в общо 27 ракови асоциирани гени. Новооткритите варианти са определени като патогенни посредством положителна предикция за патогенност от повече от четири предиктивни програми. Тези варианти са определени с потенциално патогенен ефект.

В допълнение, бяха установени два полиморфизма (по един в гените TP53 и KDR) докладвани в базата данни COSMIC, като неутрални. Единия от неутралните вариант е добре познатия TP53 полиморфизъм rs1042522, c.215C>G (p.Pro72Arg), който има отношение към отговора от химиотерапия (249). При 60% от изследваните пациенти (n=34) бенайн мисенс вариант p.Pro72Arg (rs1042522) е открит в хомозиготно Arg/Arg състояние, докато при 26% (n=15) варианта беше представен в хетерозиготно Pro/Arg състояние. В по-малка група от 14 % Pro/Pro (n=8) варианта е в хомозиготно състояние. Другия неутрален вариант, rs1870377 в гена KDR, c.1416A>T (p.Gln472His) се наблюдава при 31.58% от пациентите (n=18). При шест от пациентите rs1870377 е в хомозиготен ТТ генотип, и при 12 пациента се открива в хетерозиготен АТ генотип.

Полиморфизмът rs3822214 (c.1621A>C; p.Met541Leu) в 10 екзон на гена KIT също беше анализиран. Той е докладван в базата данни ClinVar, като likely benign при мастоцитоза и ГИСТ от герминативни клетки, но като патогенен в базата COSMIC (COSM28026). Оценен е като tolerated от пет програми за in silico предикция. Замяната

p.Met541Leu е наблюдавана при 16% от ПМКЛ пациентите (n=9), като шест от тях бяха положителни за лимфни метастази по време на хирургичната намеса.

Всички наблюдавани патогенни варианти включват 59 missense variants, 12 frameshifts, 11 stop gains, 2 inframe deletions, 4 splice acceptor и 4 splice donor variants. От всички изследвани 57 ПМКЛ пациента, 84.2% носят мутации в гена TP53 (n=48). Интригуващо, при осем пациента (A59, A63, A38, A9, 42, A30, A45) паралелно се откриват по два патогенни варианта в гена TP53, а при един пациент (A5) бяха открити три мутации в същия ген. При девет пациента не бяха открити патогенни в гена TP53 (A2, A16, A17, A20T, A53, B2T, B10T, B12, B14T).

Втория най-често мутирал ген е MET–19.3% (n=11), следван от CDKN2A–15.8% (n=9), PIK3CA с 14.0% (n=8) и FBXW7 с 8.8% (n=5). Равен брой честота на мутации по 5.3% (n=3) се наблюдават в гените ATM, GNAS, HRAS, PTEN, FGFR2 и KIT. По двама пациента носят мутации в гените JAK3, KRAS, SMAD4, APC, BRAF и SMARCB1. По една мутация беше открита в гените CDH1, ERBB4, FLT3, GNAQ, KDR, NOTCH1, NRAS, RET, STK11 и VHL. При четири пациента не се установиха патогенни публикувани мутации или новооткрити варианти. На Фигура 4.38. е представено разпределението и честотата на патогенните варианти в изследваната ПМКЛ група.

Общо 45 мутации и непубликувани варианти с патогенна предикция са открити в гена TP53, като по-голямата част от тях бяха missense (n=21). Спектърът на TP53 гена също включва десет stop gains и седем frameshifts, два от които нови, c.239_247delinsA (p.Pro80>LeufsTer48) и c.250_265del (p.Ala84ProfsTer34). В допълнение, четири splice donor variants бяха наблюдавани: един герминативен вариант който е описан в dbSNP базата данни rs1131691003 при наследствено предразполагащ рак синдром, но в получените резултати се открива нова замяна (c.96+1G>A). Също така два познати splice acceptor variants и един неописан inframe deletion в екзон 10: c.1041_1064del (p.Leu384_Ala355del).

При MET гена бяха открити само два публикувани варианта, като двата от тях са докладвани в базата данни COSMIC–c.3029C>T (p.Thr1010Ile) и c.1124A>G (p.Asn375Ser). Мутацията p.Thr1010Ile, високо повтаряща се в изследваната група беше открита при 10 (17.5%) ПМКЛ пациента.

При анализа на гена CDKN2A бяха установени седем предишно описани патогенни варианта при девет проби, пет от тях са локализирани в екзон 2. CDKN2A мутациите включват два missense, splice acceptor и frameshift variants и един интронен вариант. Пет PIK3CA варианта бяха открити. Четири от тях са публикувани missense патогени варианта и един е новооткрит frameshift c.3031delC (p.Pro1011fsTer16). Четири missense и един stop gained варианти в FBXW7 гена: c.1136A>G (p.His379Arg), c.1428C>G (p.Ser476Arg), c.1877C>T (p.Ala626Val), c.1513C>G (p.Arg505Gly) и c.1435C>T (p.Arg479Ter), бяха анализирани. Нови варианти с патогенна предикция също бяха открити в гените CDH1, ERBB4, FLT3, GNAQ, KDR, NRAS и SMARCB1. Таблица 4.18. представя всички мутации и новооткрити варианти с патогенна предикция, които бяха установени. Използвани база данни: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> и литературни източници.

Таблица 4.18. Анализирани известни мутации и непубликувани варианти с патогенна предикция в изследваната група ПККЛ пациенти

Проба	Chr:Pos	Ген	Екзон/Инtron	Генетична промяна	АК замяна	Тип на нуклеотидната замяна	Реф./База данни
A4T;A5T	5:112175802	APC	16	c.4511C>T	p.Ser1504Phe	missense variant	(250)
A5T;A15T;B17T	11:108181014	ATM	39	c.5890A>G	p.Lys1964Glu	missense variant	(251)
A60T;A63T	7:140453179	BRAF	15	c.1756G>A	p.Glu586Lys	missense variant	COSM463
A9T	16:68847386	CDH1	9	c.1308G>C	p.Leu436Phe	missense variant	НП
A15T	9:21974860	CDKN2A	1	c.-34G>T	-	intron variant	(252)
A35	9:21974792	CDKN2A	1	c.35C>A	p.Ser12Leu	missense variant	(252)
B4T;B13T	9:21971208	CDKN2A	2	c.151-1G>T	-	splice acceptor variant	(253)
A9T;A38T	9:21971209	CDKN2A	2	c.151-2A>T	-	splice acceptor variant	COSM13222
A21	9:21971263	CDKN2A	2	c.205G>T	p.Glu69Stop	missense variant	(252)
A2	9:21971318	CDKN2A	2	c.260_267 del	p.Arg87ProfsTer71	frameshift variant	(252)
A31	9:21971360	CDKN2A	2	c.342delC	p.Pro17ArgfsTer4	frameshift variant	(252)
A40T	2:212587228	ERBB4	7	c.773G>A	p.Cys258Tyr	missense variant	НП
42T	4:153250924	FBXW7	8	c.1136A>G	p.His379Arg	missense variant	COSM48375
A40T	4:153247374	FBXW7	10	c.1428C>G	p.Ser476Arg	missense variant	НП
A21T	4:153247367	FBXW7	10	c.1435C>T	p.Arg479Ter	stop gained	COSM206697
B4T	4:153247289	FBXW7	10	c.1513C>G	p.Arg505Gly	missense variant	COSM99604
A63T	4:153244	FBXW7	12	c.1877	p.Ala626Val	missense	(254)

	280			C>T		variant	
A38T	10:12327 9552	FGFR2	7	c.880G >T	p.Val294Leu	missense variant	(255)
A24T; A40T	10:12327 9545	FGFR2	7	c.887A >G	p.Lys296Arg	missense variant	(256)
A21T	13:28608 258	FLT3	14	c.1798 G>T	p.Asp600Tyr	missense variant	HPI
B9T	9:803363 22	GNAQ	7	c.997G >A	p.Asp333Asn	missense variant	HPI
A9T; B5T; B15T	20:5748 4417	GNAS	8	c.2527T >C	p.Cys843Arg	missense variant	(257)
B5T	11:53428 9	HRAS	2	c.34G> A	p.Gly12Ser	missense variant	rs1048942 29
A38T; B4T	11:53428 6	HRAS	2	c.37G> C	p.Gly13Arg	missense variant	rs1048942 28
A9T; B5T	19:17945 696	JAK3	16	c.2164 G>A	p.Val722Ile	missense variant	COSM342 13
A38T	4:559804 27	KDR	6	c.664A >T	p.Arg222Trp	missense variant	HPI
A17T; A34T	4:555936 73	KIT	11	c.1739 A>C	p.His580Pro	missense variant	(258)
A16	4:556027 18	KIT	17	c.2539 A>C	p.Thr847Pro	missense variant	(259)
A34T	12:25398 299	KRAS	2	c.20T> G	p.Val7Gly	missense variant	COSM534 7015
A21T	12:25398 285	KRAS	2	c.34G> T	p.Gly12Cys	missense variant	COSM516
B18T	7:116340 262	MET	2	c.1124 A>G	p.Asn375Ser	missense variant	(260)
A5T; A7T; A10T; A22T; A26T; A43; A53T; A60T; B15T; B17T	7:116411 990	MET	14	c.3029 C>T	p.Thr1010Ile	missense variant	COSM707
B13T	9:139399 409	NOTCH 1	26	c.4732_ 4734del GTG	p.Val1578del	inframe deletion	(261)
A53T	1:115256 590	NRAS	3	c.121A >G	p.Arg41Gly	missense variant	HPI
A59T; B3T; B18T	3:178936 082	PIK3CA	9	c.1624 G>A	p.Glu542Lys	missense variant	COSM760
A3T	3:178936 091	PIK3CA	9	c.1633 G>C	p.Glu545Gln	missense variant	rs1048860 03

A61T; B4T	3:178936 091	PIK3CA	9	c.1633 G>A	p.Glu545Lys	missense variant	rs1048860 03
A24T	3:178952 063	PIK3CA	20	c.3118 A>G	p.Met1040Val	missense variant	COSM148 4869
A56T	3:178951 976	PIK3CA	20	c.3031d elC	p.Pro1011fsTe r16	frameshift variant	HII
A17T; A34T	10:89692 817	PTEN	5	c.301A >T	p.Ile101Phe	missense variant	rs7862048 57
A16T	10:89692 924	PTEN	5	c.408T >G	p.Cys136Trp	missense variant	rs8693127 76
A14T	10:43609 994	RET	11	c.1946 C>T	p.Ser649Leu	missense variant	COSM417 0226
A59T	18:48575 200	SMAD4	3	c.394C >G	p.His132Asp	missense variant	rs1060500 743
A16T	18:48591 847	SMAD4	6	c.1010 A>G	p.Glu337Gly	missense variant	COSM138 9057
A23T; B11T	22:24134 057	SMARC B1	2	c.208de lA	p.Thr72fsTer1 3	frameshift variant	HII
B12T	19:12070 22	STK11	1	c.110A >G	p.Gln37Arg	missense variant	(262)
A43	17:75796 99	TP53	3	c.96+1 G>A	-	splice donor variant	HII
A59T	17:75785 31	TP53	4	c.399G >T	p.Met133Ile	missense variant	rs1064795 139
A26T	17:75795 36	TP53	4	c.151G >T	p.Glu51Ter	stop gained	(263)
A30T	17:75793 77	TP53	4	c.193C >T	p.Gln65Ter	stop gained	rs7752485 97
A4T; A5T	17:75794 40	TP53	4	c.239_2 47delin sA	p.Pro80>Leufs Ter48	frameshift variant	HII
A49T	17:75794 22	TP53	4	c.250_2 65del	p.Ala84ProfsT er34	frameshift variant	HII
A30T	17:75794 20	TP53	4	c.267du pC	p.S90Lfs*59Te r	frameshift variant	COSM131 025
B8T	17:75793 89	TP53	4	c.298C >T	p.Gln100Ter	stop gained	(264)
A63T	17:75793 11	TP53	4	c.375+1 G>T	-	splice donor variant	(265)
A59T	17:75785 27	TP53	5	c.403du pT	p.Cys135fs	frameshift variant	(266)
A21T	17:75782 71	TP53	5	c.406C >T	p.Gln136Ter	stop gained	COSM111 66
A40T	17:75784 75	TP53	5	c.455de lC	p.Pro152fsTer 18	frameshift variant	(267)
B9T	17:75784 63	TP53	5	c.467G >C	p.Arg156Pro	missense variant	rs3715244 13
A38T	17:75784 57	TP53	5	c.473G >A	p.Arg158His	missense variant	COSM106 90
A23T	17:75783	TP53	5	c.535C	p.His179Tyr	missense	COSM107

	95			>T		variant	68
42T	17:75783 94	TP53	5	c.536A >G	p.His179Arg	missense variant	COSM108 89
A5T; A22T; B17T	17:75783 84	TP53	5	c.546C >A	p.Cys182Ter	stop gained	(268)
A45T	17:75782 77	TP53	6	c.572de lC	p.Pro191Leufs Ter56	frameshift variant	(269)
A14T	17:75782 71	TP53	6	c.578A >G	p.His193Arg	missense variant	COSM107 42
B6T	17:75782 68	TP53	6	c.581T >G	p.Leu194Arg	missense variant	COSM445 71
A25T; A40T	17:75782 63	TP53	6	c.586C >T	p.Arg196Ter	stop gained	COSM107 05
A63T	17:75782 39	TP53	6	c.610G >T	p.Glu204Ter	stop gained	rs3975164 36
A3T	17:75782 12	TP53	6	c.637C >T	p.Arg213Ter	stop gained	COSM106 54
A5T; A7T	17:75782 11	TP53	6	c.638G >T	p.Arg213Leu	missense variant	COSM436 50
A38T	17:75782 08	TP53	6	c.641A >G	p.His214Arg	missense variant	COSM436 87
A24T	17:75781 76	TP53	6	c.672+1 G>A	-	splice donor variant	COSM135 86
A9T	17:75776 10	TP53	6	c.673- 2A>T	-	splice acceptor variant	COSM336 49
A10T	17:75775 75	TP53	7	c.706T >A	p.Tyr236Asn	missense variant	COSM438 26
A19T	17:75775 69	TP53	7	c.712T >C	p.Cys238Arg	missense variant	COSM443 21
B4T	17:75775 67	TP53	7	c.713_7 14delG T	p.Cys238Ter	stop gained	COSM456 77
A34T	17:75775 40	TP53	7	c.721_6 del 6bp	p.His178Glufs Ter163	frameshift variant	(252)
A29T; A35T	17:75775 50	TP53	7	c.731G >A	p.Gly244Asp	missense variant	COSM108 83
A61T; B7T	17:75775 48	TP53	7	c.733G >T	p.Gly245Cys	missense variant	COSM110 81
B13T	17:75775 47	TP53	7	c.734G >T	p.Gly245Val	missense variant	COSM111 96
A60T	17:75775 39	TP53	7	c.742C >T	p.Arg248Trp	missense variant	COSM106 56
A9T; B3T; B18T	17:75775 38	TP53	7	c.743G >T	p.Arg248Leu	missense variant	COSM654 9
A56T; B5T	17:75775 38	TP53	7	c.743G >A	p.Arg248Gln	missense variant	COSM106 62
A18T;	17:75771	TP53	8	c.818G	p.Arg273Leu	missense	COSM107

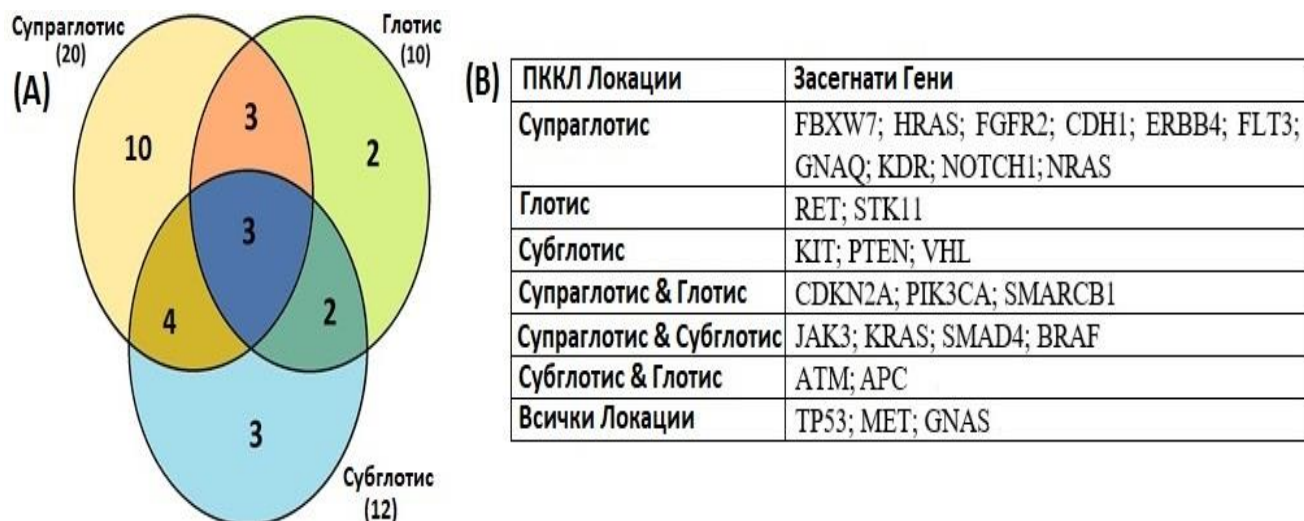
B15T	20			>T		variant	79
A27T	17:75771 14	TP53	8	c.824G >T	p.Cys275Phe	missense variant	COSM107 01
B1T; B11T	17:75785 24	TP53	8	c.833C >T	p.Pro278Leu	missense variant	COSM108 63
42T; A8T	17:75770 94	TP53	8	c.844C >T	p.Arg282Trp	missense variant	COSM107 04
A31T	17:75770 46	TP53	8	c.892G >T	p.Glu298Ter	stop gained	rs2017445 89
A45T	17:75768 52	TP53	9	c.993+1 G>T	-	splice donor variant	COSM691 8
A15T	17:75740 34	TP53	9	c.994- 1G>A	-	splice acceptor variant	COSM694 04
A28T	17:75739 63	TP53	10	c.1041_ 1064del	p.Leu348_Ala 355del	inframe deletion	НП
A18T	3:101915 00	VHL	3	c.493G >A	p.Val165Ile	missense variant	COSM182 63

Съкращения: Chr:Pos (Хромозомна позиция); АК замяна (аминокиселинна замяна); реф. (референция); НП (Непубликувана).

4.13. Разпределение на патогенните соматични варианти сред супраглотисни, глотисни и субглотисни ларингеални локации

За пръв път бяха анализирани в детайли варианти с патогенна предикция сред трите основни локации при ларингеалния карцином: супраглотис, глотис и субглотис. В изследването бяха включени 27 супраглотични, 21 глотични и 9 субглотични ПККЛ проби. При три от супраглотичните и една от глотичните ПККЛ проби не беше установен нито един патогенен вариант.

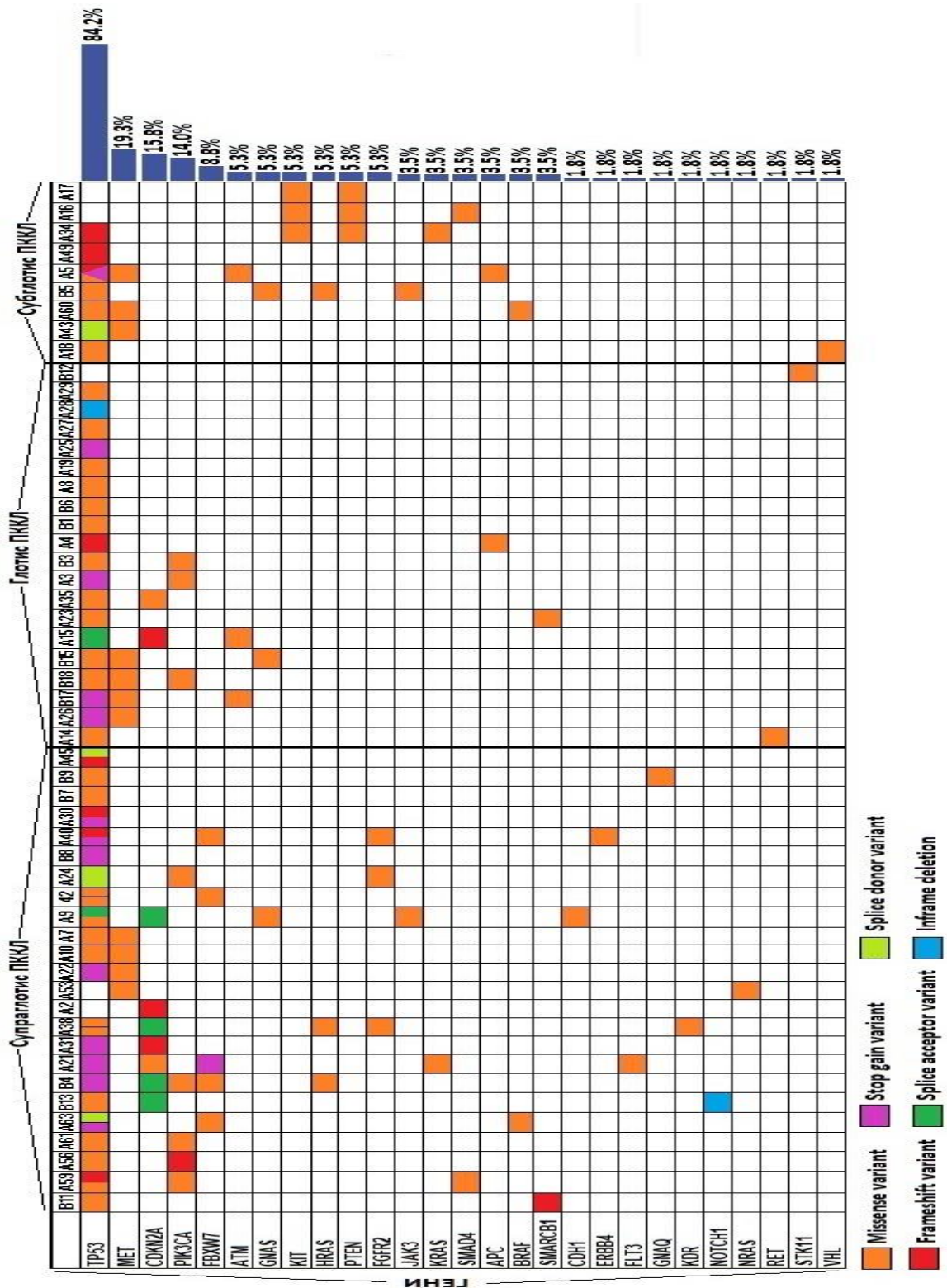
Супраглотисния ПККЛ беше най-често мутиралата локализация с варианти детектирани в общо 20 гена, докато при глотисния и субглотисния ПККЛ съответно бяха открити варианти в 10 и 12 гена. Резултатите се резюмираха с използването на вен диаграми (Venn Diagram), чиято платформа може да се открие онлайн и е публикувана от Heberle и съавтори (2015) (270). Фигура 4.30. представя броя на не припокриващите се и припокриващите се гени сред ПККЛ локациите и таблица с детайлна презентация на засегнатите гени при всяка локация поотделно и заедно по групи.



Фигура 4.30. (A) Venn Diagram презентираща броя на припокриващите се и индивидуално засегнати гени; (B) Таблица с детайлен лист на мутиралите гени сред трите ПККЛ локации.

Вариантите в гените TP53, MET и GNAS бяха сходно разпределени сред трите ПККЛ локации. Интересно, всички пациенти, които носят паралелно по две мутации в гена TP53 бяха с карцином от супраглотисен ларингеален произход, а пациента носещ три мутации в гена TP53 беше с установен субглотисен произход.

Въпреки, че CDKN2A и PIK3CA вариантите са детектирани при супраглотис и глотис ПККЛ локации, пациентите със супраглотисен произход превъзхождат, съответно по седем и пет пациента. Всички варианти открити в FBXW7 гена са установени при супраглотисен ПККЛ, докато ATM вариантите не бяха открити при същата локация. Мутирал HRAS ген беше установен при двама супраглотисни и един субглотисен ПККЛ пациента. Всички KIT, PTEN и VHL генни варианта са открити само при субглотисна локация, докато всички три FGFR2 мутации и по един патогенен вариант в гените CDH1, ERBB4, FLT3, GNAQ, KDR, NOTCH1, и NRAS гени се наблюдават при супраглотисна локация. Нито един от патогените варианти в гените BRAF, JAK3 и KRAS бяха открити при глотисен ПККЛ, а APC варианта не е установен при супраглотисен ПККЛ. Засегнати RET и STK11 гени са анализирани при глотисен ПККЛ, а един SMARCB1 вариант е открит при супраглотисен и глотисен ПККЛ. Фигура 4.31. представя честотата и разпределението на наблюдаваните варианти сред всички ларингеални локации в изучаваната напреднала ПККЛ група. Повечето от анализираните мутирала гени са представени с няколко варианта, но получените резултати ни дават насока за афектиралите гени при всяка от ларингеалните локации.

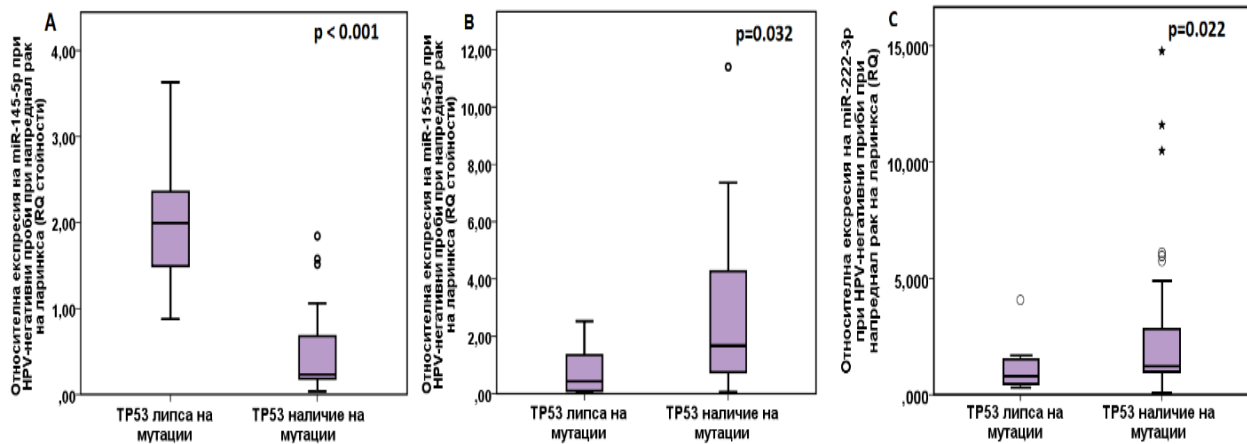


Фигура 4.31. Разпределение и честота на изследваните варианти при 57 ЧПВ-негативни ПККЛ проби, разпределени по туморни локации. Туморните проби са представени по колони, а гените по редове.

4.14. Връзка между нивата на експресия на нкРНКи и наличието на мутации в гена TP53

С цел да се изследва връзката между експресията на включените в дисертационния труд нкРНКи и TP53 мутационния статус на изследваните авансирани ларингеални проби се сравниха нивата на експресия между двете групи пациенти: TP53 положителни (n=48) и TP53 отрицателни (n=9).

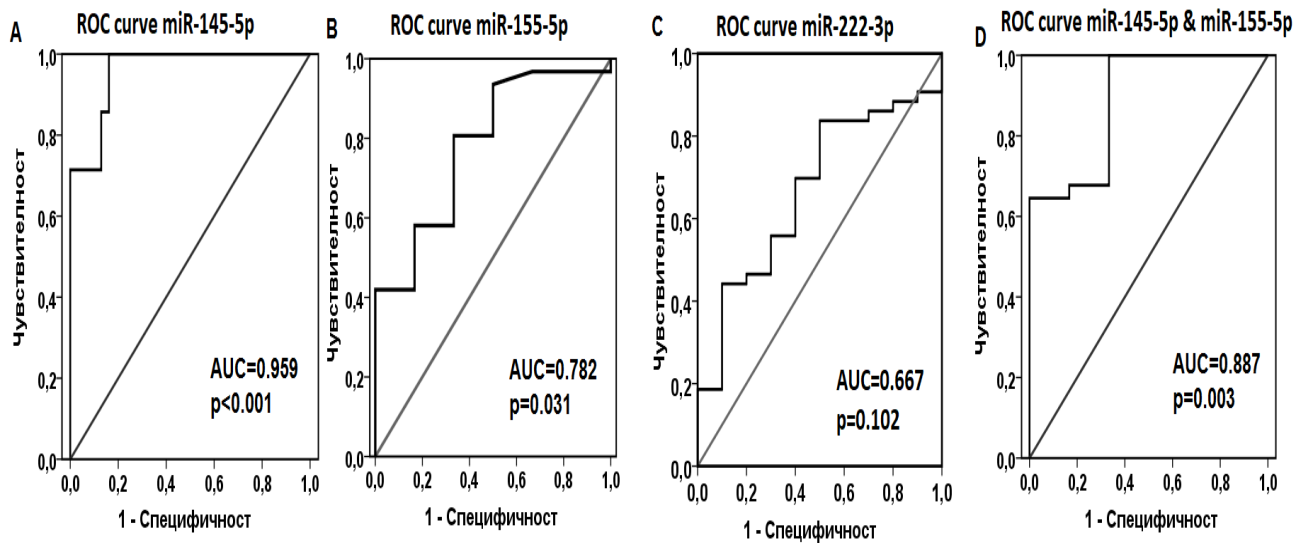
Значима разлика се откри между групите пациенти и експресията на miR-145-5p, miR-155-5p и miR-222-3p. При пациентите с патогенна мутация в TP53 средното ниво на експресия на miR-145-5p е по-ниско ($RQ=0.485 \pm 0.464$) в сравнение с тези пациенти, при които липсва мутация в TP53 ($RQ=2.044 \pm 1.008$) ($p<0.001$). Относителната експресия на miR-155-5p беше видимо по-висока при TP53 положителни пациенти ($RQ=2.751 \pm 2.657$) в сравнение в TP53 негативни пациенти ($RQ=0.818 \pm 0.972$) ($p=0.032$). Подобно на miR-155-5p, нивата на miR-222-3p бяха по-високи в TP53 положителната група (2.906 ± 3.142) в сравнение с TP53 негативната група (1.178 ± 1.321) ($p=0.022$) (Фигура 4.32.).



Фигура 4.32. Представяне на относителната експресия на (А) miR-145-5p; (В) miR-155-5p и (С) miR-222-3p при групите пациенти с и без мутация в TP53.

В допълнение се проведе ROC анализ за оценка на чувствителността и специфичността на трите нкРНКи, като потенциални биомаркери за разграничаване на пациенти с положителен и отрицателен TP53 мутационен статус. Най-значимо разграничение показва miR-145-5p с 100% чувствителност и 83.9% специфичност при гранична RQ стойност 0.845 ($AUC=0.959$, $p<0.001$; 95%CI: 0.895-1.000). ROC анализа за miR-155-5p показва 80.6% чувствителност и 66.7% специфичност при гранична RQ стойност 0.726 ($AUC=0.782$, $p=0.031$; 95% CI: 0.589-0.976). За съжаление miR-222-3p не се представи със статистически значими резултати при този вид анализ, както и показва най-ниски възможности на чувствителност и специфичност със съответно 69.8% и 60% при гранична RQ стойност 1.07 ($AUC=0.667$, $p=0.102$; 95% CI: 0.495-0.840). С цел да се анализира комбинацията между двете miRNAs дали статистически положителни резултати при ROC анализа (miR-145-5p и miR-155-5p) се използва отново комбинирания ROC анализ. Резултатите показаха, че miR-145-5p & miR-155-5p могат да разграничат ПМКЛ пациенти с TP53 положителен статус от тези с отрицателен

статус с 96.8% чувствителност и 66.7% специфичност при RQ стойност = 0.584 (AUC=0.887, p=0.003), като резултатите не подобриха възможностите на miR-145-5p самостоятелно (Фигура 4.33.).



Фигура 4.33. ROC curve анализ на изследваните miRNAs самостоятелно и в комбинация като разграничителни маркери за TP53 положителен и отрицателен мутационен статус при пациенти с ЧПВ-негативен авансирал ПККЛ: (A) miR-145-5p; (B) miR=155-5p; (C) miR-222-3p; (D) miR-145-5p & miR-155-5p.

ЧАСТ 5

ОБСЪЖДАНЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

5.1. Обсъждане на резултатите получени при анализа на демографската и клинична характеристика на изследваната група и клинико-патологични корелации при изследвания контингент

За периода 1999-2007, 5-годишната преживяемост на пациентите диагностицирани с орален, орофарингеален и хипофарингеален карцином се е подобрила с от 3% до 5%, докато за рака ларинкса не се наблюдава такава тенденция, а напротив преживяемостта остава постоянна и непроменена (271).

Въпреки че през последните години се наблюдава значително подобряване на диагностицирането, стадирането и лечението на пациенти с рак на главата и шията, менажирането по мултимодален подход е все още комплексно и често среща трудности свързани със смъртност и пълноценно качество на живот. Конкурентната химио- и радиотерапия се е превърнала в стандарт на лечение при повечето пациенти. За рак на ларинкса две американски изследвания показват негативна тенденция (272) (E9), която се преписва на променящите се терапевтични подходи. Друга предложена хипотеза е промяна в излагането на тютюнопушене. Тази причинно-следствена връзка се подкрепя от идеята за увеличаване на интензивността на тютюневата експозицията и може да бъде свързана с повишена честота и намалена преживяемост при заболяване особено в късен стадий (273). Последващо американско проучване, базирано на населението за период от 19-години (274), публикува увеличаване на радиотерапия без да се наблюдава значително повлияване върху рака на ларинкса.

В настоящото изследване бяха включени 78 мъже и 4 жени, като пикът на заболяването в световен мащаб е между 50 и 75 годишна възраст, каквото е и възрастовото разпределение в изследваната група.

Едва 13.5% от пациентите, които се изследваха бяха в ранния T1-T2 стадий на заболяването, където прогнозата за траен контрол и излекуване е много добра. При 34.15% карцинома на ларинкса е в стадий T3, а при повече от половината пациенти (52.45%) в T4 стадий. Това показва, че профилактиката и здравната култура на населението в България към момента са в изключително лошо състояние. Късното поставяне на ларингеалната злокачествена диагноза води до висока смъртност, при едно заболяване със сравнително благоприятни предпоставки за ранна диагноза и успешно лечение. Анализът на разпределението на степента на диференциация на туморите показват тенденция за асоциация и значима умерена корелация с напредване на T стадия. Също така разпределението на субглотичните и супраглотичните тумори е по-високо при напредналите туморни стадий, докато глотичните тумори заемат значима част от T1/2 и T3.

Редица автори наблюдават, че състоянието на шийните лимфни възли заема челно място по важност на прогностичен фактор при карцином на ларинкса и вероятността за 5-годишна преживяемост, независимо от проведеното лечение, която намалява с 50% след разпространението на тумора в регионални настъпили лимфни възли (275). Поради тази причина проучванията, занимаващи се с вероятността от възникване на възлови метастази, са важни при вземането на терапевтични решения. Близко 32% от изследваните пациенти са с установен положителен нодален статус, като наличието на лимфни метастази значимо се асоциира и корелира с крайно напреднал T4 стадий. Забелязва се, че при голяма част от глотичните и субглотичните тумори не се установяват лимфни метастази, докато при супраглотичните карциноми наличието им

се вижда осезаемо. Връзката между тютюнопушенето и наличието на лимфни метастази не достигна статистическа значимост. Въпреки това лимфните метастази се асоциират с консумацията на алкохол и работа във вредна околна среда, като се наблюдава че процента пациентите които отричат консумация на алкохолен концентрат и работа с вредна експозиция значимо са по-малко в сравнение с тези които докладват тези вредности. Разбира се, трябва да се отчете факта че не са налични данни за вредности при всички пациенти, което може да повлиява върху статистическите резултати.

Въпреки че заслугата за първите изследвания върху ларингеалната лимфа се присъжда на Најек през 1891г., историческото изследване на ларингеалната лимфа чрез инжектиране на оцветители и радиоизотопи от Pressman и колектив през 1956г., предоставя отлични данни за анатомичното деление и лимфния поток при ларинкса и дава значителен поглед върху същността на разпространението на рак в областта на ларинкса. Анатомичните и рентгенографски изследвания на лимфата на главата и шията от Fisch, 1964 показват, че лимфният дренаж на този регион следва предсказуеми пътища (275,276).

Концепцията за подхода на сентинелни лимфни възли се основава на знанието, че нодалните метастази напредват постепенно, като първото място на метастазирането е най-близко разположения възел (сентинелен възел). Лимфните метастази са най-важният механизъм в разпространението на плоскоклетъчен карцином на главата и шията. Множество клинични проучвания показват, че разпределението на метастазите в шийните лимфни възли наистина е предсказуемо при пациенти с нелекуван по-рано плоскоклетъчен карцином на горния дихателно-храносмилателен тракт. Скоростта на метастазиране вероятно отразява агресивността на първичния тумор и е важен прогностичен маркер. Важна характеристика са не само наличието, но и броят на възловите метастази, тяхното ниво в шията, големината на възлите и наличието на екстра-капсулно разпространение.

Необходимо е да се идентифицират фактори за предварително определяне на високо-рискови и ниско-рискови пациенти по отношение на лечение и наличие на окултни метастази. Няколко клинични фактора (туморно място, тъканен тип, локален обхват и стадий на първичния тумор) и патологични (степен на хистологично диференциране, дебелина, кръвоснабдяване, перинеурална инвазия) са свързани с риска от метастази в лимфните възли на главата и шията. Златният стандарт за откриване на метастази на лимфните възли в шията е хистологичното изследване на внимателно всички възли от патолога в пробата или цялостна дисекция на шията.

В изследването на Kaur et al. (2002), 72% (36 случая) са с умерено диференциран плоскоклетъчен карцином, 16% (8 случая) са с добре диференциран и 12% (6 случая) са с ниско диференциран плоскоклетъчен карцином. Докато 60% от глотичните злокачествености са добре диференцирани, 58.3% от супраглотичните са умерено диференцирани. От корелационния анализ се наблюдава че 66.7% от ниско диференцираните лезии се свързват с нодални метастази, в сравнение с 41.7% от умерено диференцираните и 25% от добре диференцираните лезии, които имат лимфни метастази (275).

Корелацията между Т стадия и N стадия също показва, че напредналия туморен стадий се асоциира както с наличието, така и с броя лимфни метастази, което е в съответствие с получените данни от проведените изследвания в дисертацията.

Дори и в страните с висок стандарт на живот като Финландия, се наблюдава че социо-икономическия статус значимо повлиява разпределението по локализация при рака на ларинкса, като супраглотичните карциноми са едва 12% при мениджъри и служители на високопоставени административни позиции, а 44% се откриват сред пониско поставени административни позиции и специализирани служители и 53% са при неспециализирани работници. Сред 244-те изследвани пациенти се установява, че пропорцията на тежките пушачи е по-висока при супраглотичните тумори (96.1%) в сравнение при глотичните тумори (87.9%) (277). Значимо различие между T-разпределението според ларингеалната локация също се наблюдава като 51.2% от глотичните и 14.2% от супраглотичните лезии са T1 и T2, докато T4 се наблюдава по-често при супраглотичните случаи, което е в съответствие с получените резултати в дисертацията. По време на диагностицирането са установени регионални лимфни метастази, които клинично са присъствали при 20.5% от супраглотичните и само 1.8% от глотичните случаи. Глотичните тумори се докладват с по-добра преживяемост в сравнение със супраглотичните (277).

Пушенето и повишената консумация на алкохол са основно установени като най-големите рискови фактори за развитието на ларингеален карцином, въпреки че екологичните, професионалните, както и хранителния режим също са от значение. Ролята на алкохола е установена като важна етиология в частност при супраглотичния карцином (278–282). Това е подкрепено от факта, че във Франция, Италия, Испания и Уругвай където консумацията на алкохол, особено вино е висока, и също се наблюдава често възникване на ларингеални карциноми със супраглотичен произход (278,280,281,283). От друга страна употребата на по-канцерогенния черен тютюн също е по-чест сред тези популации с латинско потекло (278,281).

Супраглотичният тумор изглежда по-чувствителен на излагане на вредна околна среда в сравнение с глотичния. По този начин възникването от супраглотичен карцином може да бъде по-зависимо събитие от вариациите в предразполагащите етиологични фактори (277). Супраглотичните тумори обикновено се считат с по-лоша прогноза от глотичните (280,284,285). Това обаче се дължи най-вече на различното T-разпределение и към по-високия потенциал за метастазирание на супраглотични тумори (38,284,286).

Първичните карциноми на субглотичния карцином са специфично описани в литературата за пръв път от Isambert през 1876г (“Isambert. Ann des Mal de l’Oreille et du Larynx. 1876:1”). Първичният субглотичен плоскоклетъчен карцином не се среща често, като е прието че е между 1 и 3% от всички ларингеални злокачествениности (280). Първичните субглотични тумори са обикновено асимтоматични и поради тази причина често се детектират в напреднала фаза. Клиничната оценка на субглотичните карциноми е възможно да бъде предизвикателство. Визуализирането на региона е затруднено и много ранни лезии е възможно да бъдат пренебрегнати. Нарушена мобилност или фиксиране на гласната връзка е често срещано и отразява дълбока инвазия към вътрешните ларингеални мускули. Dahm et al. 1998 и Garas et al. (2006), докладват, че преживяемостта на субглотични ларингеални тумори с напредване на стадия, значително намалява. От 80% характерни в ранните етапи на развитие на заболяването до само 25% в крайно напредналите стадии. Но резултатите които получават по отношение разпределението на субглотичните тумори според туморното стадиране се различават. Докато Dahm et al. (1998) докладва деветнадесет случая

(67.9%) са начален T1/2 стадий и девет (32.1%) в T3/4 стадий, то Garas et al. (2006) публикуват че 20% (3/15) субглотични карциноми са диагностицирани в T1/2 стадий, докато останалите 80% (12/15) са диагностицирани в късен стадий – T3/4. Нодалното стадиране показва, че при висок процент от изследваните пациенти 78.6% (22/28) липсват нодални метастази (N0), докато 10.7% (3/28) са N1, 7.1% - N2 и при 3.6% (1/28) се наблюдава N3, като не се откриват далечни метастази по време на диагностицирането. Повторно възникване на рак на ларинкса при съща локализация се наблюдава при 38.5% (10/26) от случаите (287,288). Високата честота на късните етапи на заболяването при истинските субглотични карциноми може да възниква поради неговата локация. Често остава недиагностициран, до момента в който не напредне заболяването и се появят симптоми като проблеми с дишането или глухота.

Безспорна е ролята на доказаните етиологични фактори – тютюнопушене и злоупотреба с алкохолен концентрат. Едва 5% от изследваните в дисертацията заболелите са непушачи, а близо 16% не консумират алкохол. Въпреки че тютюнопушенето и алкохолната консумация са основни рискови фактори за развитие на рак на ларинкса, някои от пациентите не са ангажирани с тези вредни навици. Теориите за развитие на ларингеален карцином при непушачи и неконсумиращи алкохол са описани в предходни изследвания (289). Причината за развитието на ларингеална злокачественост при такива пациенти най-вероятно се състои в други фактори, които са допринесли за неговата поява. Гастроезофагиалният рефлукс (ГЕРБ) малко, но значимо допринася за развитието на рак. Въпреки това, все още механизмът на повлияване на ГЕРБ не е напълно изяснен. Рефлуксът на жлъчката изглежда допълнителен повлияващ фактор. След контролиране на ефекта на алкохола и тютюна, излагането на онкогенни видове вирус на папилома при човека е свързано с повишен риск от карцином на ларинкса. Доказателства подкрепят самото излагане на силно вредна околна работна среда, като увеличаване на относителния риск от рак на ларинкса. Увеличаването на консумацията на зеленчуци и плодове може да даде предимство за намаляване на честотата на рака на ларинкса. Унаследените повреди в системите за контрол на клетъчния цикъл, системите за възстановяване на ДНК и метаболизиращите канцерогени ензими могат да увеличат риска от рак на ларинкса, но засега не е доказан причинно-следствен механизъм (289).

5.2. Обсъждане на резултатите получени при анализа на асоциация между експресионните нива в туморни ларингеални тъкани на нкРНКи и клиникопатологичните характеристики на пациентите

Една от поставените задачи на настоящото проучване е да се изследва и анализира асоциацията между експресионните нива на определени изоформи на често дерегулирани miRNAs и lncRNAs и клиникопатологичните характеристики на български пациенти, диагностицирани с ПККЛ.

Развитието на ПККЛ включва редица генетични и епигенетични промени, включващи засегната експресия на нкРНКи, включително на miRNAs и lncRNAs. Некодиращите РНКи имат важни, но все още не напълно изяснени регулаторни роли в каноничните каскади на ларингеалната канцерогенеза. Получените резултати показват статистически значимо променени нива на експресия на всички изследвани нкРНКи при ларингеална туморна тъкан в сравнение с кореспондиращите нормални тъкани

проби, което предполага тяхното участие в ларингеалната канцерогенеза. Въпреки това най-обещаващите miRNAs и lncRNAs, асоциирани с характеристиките на пациентите са: miR-21-5p, miR-31-3p, miR-31-5p, miR-145-5p, miR-222-3p, miR-424-5p, и lncRNA HOTAIR.

За първи път ние представихме, че експресионните нива на miR-21-5p, miR-222-3p и lncRNA HOTAIR са статистически значимо асоциирани с положителната фамилна история на ПМКЛ пациентите. Фамилната история е важен рисков фактор при раковите заболявания, но познанието относно експресията на нкРНКи свързана с фамилната история е все още оскъдно. В проучването, ПМКЛ пациентите, които са с положителна фамилна история, са докладвали наличие на други солидни тумори, вкл. рак на главата и шията (гръкляна, устните, тироидната жлеза), рак на белия дроб, гърдите, пикочния мехур, матката, стомаха, простатата, дванадесетопръстника и левкемия при близки родственици. Предполага се, че експресионните нива на miR-21-5p, miR-222-3p и lncRNA HOTAIR са потенциално свързани с променени нива на експресия на таргетни мРНКи. Една от често срещаните таргетни мРНКи на miR-21 и miR-222 е тази на *PTEN*, често дерегулирана при редица туморни образувания, включително неоплазми при глава и шия вследствие от соматични мутации, делеции или епигенетично потискане, засягащи гена кодиращ *PTEN* (290), и се асоциира с фамилен рак (291). В допълнение, два lncRNA HOTAIR полиморфизма са публикувани, rs7958904C>G и rs4759314G>A, за които е установено че водят до по-високи нива на експресия при фамилни солидни тумори (292). Има публикувани данни за изследване на експресия на микроРНКи, включително и за miR-21, при пациенти с и без фамилен рак на гърдата, но статистическа достоверност между двете групи не е достигната (293), докато в друго изследване експресията на miR-155 е установено значимо променена при пациенти с фамилен рак на белия дроб (294). Данните, които получаваме могат да допринесат за допълнителното изследване на дерегулираните нкРНКи при случаи с фамилен рак.

В допълнение към предходни проучвания, нивата на експресия miR-222-3p бяха незначително положително свързани със стареенето, докато lncRNA MALAT1 беше значително отрицателно свързана с възрастта. miR-222 се отчита като „старееща miRNA“ (295), докато връзката на lncRNA MALAT1 с възрастта не е изследвана предходно и заслужава по-задълбочено проучване. Факторът възраст също може да бъде взет предвид, когато се сравняват резултатите за тези нкРНКи между различните проучвания, в допълнение към етническите и клиничните характеристики. miR-222-3p, X-свързана микроРНКа е предходно асоциирана с пола. Повишените нива се наблюдават при мъжете в сравнение при жените в изследването на Khalifa et al. (2016). Значима връзка между FOXP3 промоторния полиморфизъм rs3761548A/C, експресията на miR-222-3p и ефекта на пола е установена (296). Експресионните нива на lncRNA MALAT1 не са свързани предходно с пола но въпреки това двата маркера трябва да бъдат валидирани в по-голяма ПМКЛ женска група.

Нивата на miR-424-5p бяха повишени при ПМКЛ пациенти с и без положителен нодален статус, но статистическите анализи показаха значима негативна асоциация с положителния нодален статус. Постигнатите резултати са в подкрепа на предходно описана понижена експресия на miR-424-5p при нодално метастатичен езофагиален плоскоклетъчен карцином (ЕППК) и епителен овариален карцином (297). За пръв път беше идентифицирано силна асоциация между експресионните нива на miR-424-5p и туморната ларингеална локация. Резултатите показаха градиентно повишаване на

експресионните нива от супраглотис, през глотис и субглотис. Субглотисни нодални метастази не са чести при ПККЛ, като те са по-слабо метастатични тумори в сравнение със супраглотисните, които са по-богати на лимфни възли (298).

Можем да се предположи, че свръхекспресия на miR-424-5p може да бъде потенциален защитен маркер за възлови метастази и инвазия. Другата изоформа, miR-424-3p е публикувана като една от най-значимо корелираните микроРНКи със супраглотичните ларингеални тумори (299), докато в резултатите от дисертациония труд се установи че другата изоформа miR-424-5p е значително отрицателно свързана със субглотисната локализация на тумора. Потенциално се смята, че нивата на експресия на miR-424 изоформите може да бъде свързана със специфично местоположение на LSCC и може да се използва като допълнителен маркер в медицинската практика за точно определяне на ларингеална локализация.

В настоящото проучване, променените нива на miR-31-3p и miR-145-5p се асоциират негативно с наличието на нодални метастази. В допълнение, експресията на miR-145-5p се понижава с напредването на T стадията и тежката злоупотреба с тютюнопушене, докато „активната“ изоформа miR-31-5p се открива с повишени нива при напредване на T стадия. Чувствителност към паклитаксел и резистентност към химиотерапия е свързана с аберантно експресирана miR-31 при ПККЛ пациенти (300), докато понижението на miR-145 е свързано с чувствителност към цетуксимаб при КРК, независимо от KRAS мутационния статус, посредством снижаване на BCL2 експресията (301). Тези две микроРНКи могат да бъдат предложени като потенциални маркери при прилагане на лечение и характеризизиране на прогноза.

МикроРНКте miR-21 и miR-31 са докладвани като аберантно експресиранни вследствие на излагане на вредна околна среда, тютюнопушене и развитие на раково заболяване (302). Получените резултати потвърждават по-специфично, че miR-21-5p изоформата в изследваната ПККЛ извадка се статистически значимо се свързва с вредни излагания на работното място, докато експресията на miR-31-3p изоформата се наблюдава с по-високи стойности при пациенти докладвали излагане във вредна среда, но до статистическа значимост не се достига. Също така, се достига до положителна асоциация между miR-222 и ПККЛ пациентите които докладват излагане във вредна работна среда ($p=0.020$), което е в съответствие с предходно проучване на Bollati et al. (2010). Авторите на изследването изследват промени в експресионните нива на miR-222 като кандидат биомаркер при периферни кръвни левкоцити, получени от 63 служители след излагане на вредна работна среда (303).

Получените данни индикират също, че повишените нива на miR-21-5p се асоциират с ниско диференциран ларингеален карцином, докато противоположно повишените нива на „пасивна“ miR-31-3p изоформа са по-типични за добре и умерено диференциран ларингеален карцином, което би предположило силна онкогенна активно по време на ранните етапи на канцерогенеза. Резултатите потвърждават предходни проучвания върху miR-31, но не и за асоциацията на miR-21 и туморната диференциация при верукозен карцином на главата и шията (304). Двете микроРНКи, miR-21 и miR-31, са сред най-изследваните, широко експресиранни при повечето плоскоклетъчни карциноми, включителни и при рак на ларинкса (305), но все още познанието за асоциация между конкретни изоформи и клиникопатологичните характеристики при ПККЛ е оскъдно.

Останалите изследвани изоформи на малки РНКи: miR-21-3p, miR-155-5p, miR-196a-5p, miR-210-3p и miR-221-3p показаха променени нива на експресия при ларингеалната туморна тъкан, но не достигнаха до статистическа значимост с нито една от включените в дисертациония труд клиникопатологични характеристики.

Скорошни проучвания са публикували, че miR-21-3p е онкогенна молекула, която силно се свързва с микросателитна нестабилност и промотира клетъчната мобилност посредством епително-мезенхимната танзиция (306) и се свързва значимо с дълбочината на туморната инвазия, нодалните метастази и клиничния стадий при гастритен карцином (307). В изследването на Zhao et al. (2013), miR-155 е изследвана при 63 ларингеално туморни проби и резултатите показват значима положителна корелация към T стадия и ниската туморна диференциация, като колектива предполага че онкогена активира ларингеалната инвазивност посредством нейните таргетни молекули SOCS1 и STAT3 (122). Едно възможно обяснение на несъответстващите резултати би могло да бъде, че при това изследване нивата на експресия в тумори са сравнени само с пул от 21 нормални тъкани на ларинкса (122), докато в дисертационния труд се сравнява всяка ларингеална туморна тъкан с кореспондиращата ѝ нормална тъкан. От получените резултати RQ нивата на miR-196a се установиха екстремно високи с липса на статистическа асоциация с клиничните характеристики на ПМКЛ групата. В изследването на Saito et al. (2013), miR-196a е представена като най-обещаващия кандидат биомаркер с високи експресионни нива при ранен T стадий (113). Повишени нива на miR-196a-5p при T1 и T2 стадий бяха също установени, което също подкрепя активната онкогенна роля по време на ранните туморни стадий при прогресията на рак на ларинкса. При рак на бъбреците, miR-210 е свързана с метастазиране, докато miR-221 е предложен за подходящ маркер за слабо ефективно раково специфично лечение (308), но в текущото изследване не се достигна до значима връзка с изследваните характеристики. Получените резултати могат да се дължат на малката изследвана извадка.

В заключение, базирано на съществуващи изследвания и настоящите наблюдения не може да се изясни ролята на miR-21-3p, miR-155-5p, miR-196a-5p, miR-210-3p и miR-221-3p при ларингеалната канцерогенеза, което може да бъде обект на следващи по-задълбоени изследвания. На този етап не може да се предложи подходящ маркер за ПМКЛ диагноза и прогноза.

Нивата на lncRNA MALAT1 са с понижена експресия в изследваните ПМКЛ туморни тъкани. В много публикации MALAT1 е предходно описан като активиращ раковите и метастатичните процеси, докато при други изследвания е предложен с тумор-супресорна роля (309,310).

Относно ролята на MALAT1 при ракови заболявания, резултатите в литературата са противоположни. В изследването на Xu et al. (2015), нивата на MALAT1 при рак на гърдата са с намалена експресия и се асоциират с кратка преживяемост без възникване на рецидив и е предложен като таргетен терапевтичен биомаркер (311). В допълнение, понижението на MALAT1 е предвидено като маркер за отключване на стволови клетки и пролиферация посредством активирането на гена LTBP3 и потискане на експресията на Sox2 и Nestin при глиома мезенхимни стволови клетки - SHG139S клетъчна линия. Също така, понижените нива на MALAT1 водят до активацията на ERK/MAPK сигналния път и промотират пролиферацията (312). От друга страна, при мултиплена миелома, потискането на MALAT1 индуцира апоптоза,

но не и пролиферация, посредством активирането на митохондриална-контролирана апоптоза чрез повишената експресия на Bax, Caspase-3/-9 и понижението на Bcl-2 (313). Fang et al. (2016) показват, че нокдаун на MALAT1 при плоскоклетъчни клетъчни линии от карцином на езика (CAL27 and SCC-25) се свързва с повишението на белтъка SPRR2A, което повлиява далечните метастази при ПККЕ (314). Противоположно, предходно изследване на Pang et al. (2015) открива че повишените нива на MALAT1 при рак на панкреаса имат онкогенен потенциал, като се свързват с неблагоприятна прогноза и се дискутират за потенциална таргетна стратегия (315).

Малък на брой са изследванията на експресионните нива на MALAT1 върху ларингеален карцином. Интригуващо, Feng et al. (2012) публикуват нарушена повишена експресия на MALAT1 при 72 проби от рак на ларинкса, като нивата се свързват с ниска туморна диференциация и активна пролиферация (316).

Внимателно бяха проучени експерименталните настройки и подходи, използвани за изследване на lncRNA MALAT1 и може да се предположи, че несъответствията в наблюденията между проучванията могат да се дължат на различни причини, някои свързани с експериментални и статистически проблеми. В изследването на Feng et al. (2012), като ендегенна контрола за провеждане на експериментите се е ползвала 18S (316), докато в настоящата разработка се използва АСТВ, която наскоро е предложена като подходяща ендегенна контрола (317). Zhou et al. (2015) публикува повишена експресия на MALAT1 в 54 произволно събрани туморни проби от плоскоклетъчен карцином на орофаринкса и само 12 проби от нормална мукоза, но в изследването на авторите са ползвали GADPH като ендегенна контрола. Така поставени експерименталните задачи водят до несъответствие на туморна с нормална проба, тъй като техният брой не е равен (318). Статистическата сила на такъв тип изследвания и проби за детектиране на достоверна разлика в експресията е силно лимитирано.

В допълнение, няколко молекулни механизми чрез които MALAT1 регулира туморната прогресия и метастаза, включително и взаимодействие с конкуритивни ендегенни РНКи (competitive endogenous - ceRNA) или miRNAs като „примамки“, също така взаимодействие с потискащ комплекс Polycomb repressive complex 2 (PRC2), катализиращи метилирането хистони и играещи важна роля в регулирането на транскрипционната репресия и раковата прогресия, свързване и деактивиране на TEAD транскрипционен фактор, регулиране на множествени сигнални пътища като Hippo-YAP, PI3K-AKT, MAPK, WNT и NF- κ B (310). Все още не е изяснено дали при силно еволюционни запазени и голямото количество на lncRNA при нормална тъкан, MALAT1 има туморно супресорна роля или е тумор индуцираща молекула. В сравнение с получените и публикуваните резултати, може да се заключи че експресията на MALAT1 може да варира между различните тъкани, видове рак и генетични характеристики. Необходими са по-обстойни проучвания върху разгадаването на точния механизъм на действие и влияние върху ларингеалната канцерогенеза.

В заключение, се изследваха експресионните нива на единадесет miRNAs и две lncRNAs (MALAT1 и HOTAIR) при ПККЛ и съпътстващи нормални тъкани при български пациенти, които резултати доведоха до нови непубликувани до сега асоциации между включените нкРНКи и клиникопатологичните характеристики. Също така се демонстрира нов потенциал на асоциация между фамилната история и експресията на miR-21-5p, miR-222-3p и lncRNA HOTAIR, понижената регулация на

MALAT1 с възрастта и потенциала за възрастов ефект, повишената експресия на „пасивната“ miR-31-3p при добре и умерено диференциран ларингеален тумор, както и потенциала на miR-424-5p изоформата при скрининг на точната локализация на ларингеална злокачественост. Настоящото изследване потвърждава и някои предходни резултати и показва противоположни резултати спрямо други резултати. miR-145-5p негативно се свързва с туморния стадий и злоупотребата с тютюневи изделия, докато miR-31-3p се свързва с лимфните метастази и може да бъде потенциален маркер за избор на лечение. Валидира се потенциала на miR-21-5p и miR-222-3p с излагането на вредна околна среда.

Получените резултати допринасят за по-доброто разбиране на механизмите на канцерогенеза при рак на ларинкса и изясняване на потенциалната роля на нкРНКи като биомаркери в клиничната практика.

5.3. Обсъждане на резултатите от корелационен анализ между изследваните некодиращи РНКи и матрични РНКи

Изследва се корелацията между подобрите нкРНКи и предходно изследваните хипоксични и ангиогенни мРНК маркери. Kulshreshtha et al. (2007) публикуват за пръв път променено експресирани нкРНКи следствие на хипоксия (319). Sun et al. (2013) публикуват данни от miRNA микрочипов анализ при пациенти с ПМКЛ, които показват повишени ко-експресирани нива на miR-196a, miR-31, miR-21, miR-221-3p, и miR-424-3p (299). Получените данни подкрепят предходното изследване, но за разлика от Sun et al. (2013), в текущата разработка се изследва miR-424-5p изоформа, която също е с повишени нива и ко-експресирана със съответните микроРНКи.

В светлината на хипоксията, получените резултати показват значима корелация между маркерите HIF2 α и HIF3 α и lncRNA MALAT1. Публикувано е, че транскрипционния фактор HIF2 доминантно активира експресията на lncRNA MALAT1 в сравнение с HIF1 (320). Положителна корелация между HIF3 α и lncRNA MALAT1 не е описана до сега. Свърхекспресирана MALAT1 в ПМКЛ туморни тъкани се свързва с метастазата и участва в регулацията на клетъчната апоптоза (316). MALAT1 е описана като отговаряща при недостиг на кислород ендотелна дълга некодираща РНК. Нивата на MALAT1 и VEGFR2 са установени повишени и директно взаимодействащи си при ендотелни клетки (321). Пациенти с понижени нива на lncRNA MALAT1 са свързани с лоша прогноза при рак на гърдата и индуциращи ЕМТ посредством PI3K-АКТ пътя (311). От друга страна MALAT1 участва в активната клетъчна пролиферация и инвазия посредством директното регулиране на BCL2 (322).

miR-221 и miR-222 са свързани с процесите на ангиогенеза, които са едно от най-повлияните при хипоксия, като тези две miRNAs също се наричат и ангиогенни микроРНКи. Негативна регулация посредством miRNAs като miR-221 and miR-222 са били докладвани като блокиращи ангиогенезата (323). Повишена експресия на тези две микроРНКи е често срещана при заболявания, като тяхната повишена експресия се свързва с рецептора с-KIT при васкуларни стволови клетки (324). MiR-21 е силно онкогенна miRNA, която е била детектирана за пръв път при рак на ларинкса през 2010г (325). Потвърдени нейни таргети са PTEN, TPM1, PDCD4, които участват в активирането на сигнални пътища свързани с пролиферацията, следствие на промяна в околната среда, като хипоксия. miR-21 е идентифицирана в отговор на недостиг на

кислород. Скорошни публикации показват, че HIF1 α е включен в регулацията на miR-21 при кардиомиоцити и панкреатични ракови клетки (158).

Под влияние на хипоксия, нивата на miR-210 и HIF1 α се повишават. Намаляване на функцията на miR-210 води до повишаване на BCL-2, като се потиска преживяемостта на ракови заболявания и се намаля чувствителността към радиотерапия при хипоксична среда посредством връзката HIF1 α /miR-210/BCL-2 (326). Експресията на BCL-2 зависи от lncRNA MALAT1 при не-аденокарциноми и се свързва с лоша прогноза (327).

miR-424 положително се свързва с лимфните метастази и miR-424 директно прицелва Chk1 и подпомага повишаване експресията на MMP9, което води до инвазия и метастаза (328). Активирането на STAT5 също подпомага развитието на ПКГШ, както *in vitro*, така и при животински модели и клинични изследвания. Повишената експресия и фосфорилиране на STAT5 е установено при тумори на главата и шията в сравнение с нормална епителна тъкан и туморния растеж е наблюдаван при животински модели под влияние на STAT5 активирането, което предполага неговата значима роля по време на туморогенезата. С използването на клетъчни култури и животински модели, Корпикар et al., демонстрират ролята на STAT5 при повишаване на туморния растеж, инвазия и EMT, както и при развитието на резистентност към цисплатина и ерлотиниб. Разкрива се сигналната линия IL-8/miR-424-5p/STAT5, която има роля относно активирането на STAT5 при клетъчната миграция и инвазия при ОПКК. Сигналната линия включва активиране на STAT5 под влиянието на IL-8, което впоследствие индуцира SOCS-2, инхибитор на STAT5, както и miR-424-5p. Повишената експресия на miR-424-5p е установена, че потиска активността на SOCS-2 и води до постоянна STAT5 експресия, корелираща с повишена туморна миграция и инвазия при IL-8 активирани орални плоскоклетъчни клетки. В резултат от публикуваните данни се установява, че miR-424-5p има значима роля при повлияването на IL-8/STAT5/SOCS2 сигналната линия (329). За пръв път се представя положителна корелация между miR-424-5p и VEGFR1 *in vivo* при ПККЛ.

В процесите на ангиогенеза и метастаза на туморните клетки, MMP имат роля като ключови ензими. MMP2 е способен да разгражда колаген IV и също да индуцира капилярна хиперплазия. MMP9 е протеолитичен ензим, който се секретира от редица клетки и е с най-голяма молекулна маса сред всички членове на MMP. MMP9 разгражда екстраклетъчния матрикс и базалната мембрана, което постепенно увеличава възможността за подвижност на клетките да се разпространяват и да метастазират туморите. Установено е, че увеличената експресия на miR-155 активира STAT3 сигналния път, което води до повишаване експресията на MMP9 (330).

MMP2 е индиректен таргет на miR-21, посредством инхибирането на TIMP3 (331) и също така miR-21 повлиява индуцираната от VEGFR1 EMT, което благоприятства метастазиранието и инвазията при ракови клетки (332). MYC се явява директен таргет на miR-21 (333). Също така повишената експресия на miR-21 води до увеличаване нивата на IL8 при A549 клетъчна линия изложени на тютюнев дим (334).

Микро РНКте, които показаха най-силно и значимо корелационно групиране по между си са miR-196a-5p, miR-221-3p, miR-222-3p, както и miR-21-5p, miR-221-3p, miR-424-5p. Общия брой пътища в които участват miR-196a-5p, miR-221-3p и miR-222-3p е 33, включващи DNA Damage Response, ErbB signaling pathway, FoxO signaling pathway, IGF-1 Signaling Pathway, Ras signaling pathway и др. Общия брой пътища в които участват miR-21-5p, miR-221-3p и miR-424-5p е 38, включващи TGF-beta Signaling

Pathway, FoxO signaling pathway, DNA Damage Response, EGF/EGFR Signaling Pathway, p53 signaling pathway и др. Общите молекули които таргетират първа група корелационно групирани микро РНКи (miR-196a-5p, miR-221-3p, miR-222-3p) са CDKN1B, ACTB, FLNA, SLC10A7, EXOC8 и TMEM2, докато общите молекули които споделят miR-21-5p, miR-221-3p, miR-424-5p са RECK, NUFIP2, TMEM245, CDK6, AGO2 и PK3R1.

CDKN1B (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) е изследвана при рак на ларинкса, като ниската му експресия се свързва с туморна агресивност при пациенти с ПМКЛ (335). Високата експресия на FLNA (Filamin A) се свързва с присъствието на лимфни метастази при ПМКЛ (336). Промоторното метилиране на RECK при пациенти с ПМКЛ се свързва с ниска диференциация на туморните клетки и по-лоша преживяемост (337). Експресията на CDK6 (Cyclin Dependent Kinase 6) е повишена и той има роля на онкоген. Високата експресия на CDK6 е предиктор за лоша прогноза при ПМКЛ (338). AGO2 (Argonaute-2 protein), който взема основно участие при процесирването на малките РНКи се открива основно като цитоплазмен белтък при ларингеални проби, докато при кератиноцити и цервикални клетъчни линии се локализира като ядрен белтък. Наличието на ЧПВ инфекция няма отношение към локализирането на AGO2. Междуклетъчното разпределение на AGO2 се осъществява по клетъчен и тъканно зависим начин и може да корелира с различните му функции в регулирането на генната експресия (339).

Останалите общи таргетни молекули не са изследвани в ларингеални проби. SLC10A7 (Solute Carrier Family 10 Member 7) е част от семейство транспортни белтъци (SLC10), които участват в пренасянето на различни вещества включително и лекарствени препарати (340). EXOC8 (exocyst complex component 8) участва в белтъчен комплекс, имащ отношение към везикуларния трафик и секреторните пътища включващи апарата на Голджи и плазмената мембрана. Белтъка има роля в развитието на простатата (341). TMEM2 (transmembrane-protein-2) е установен като участник при метастазирането и образуването на ракови колонии при карцином на гърдата (342). NUFIP2 (Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2) е една от най-силно заседнатите молекули при костни метастази от белодробен аденокарцином (343). TMEM245 (Transmembrane protein 245) е участник в патогенезата на заболяванията свързани с нервната система (344). Мутации в PK3R1 водят до SHORT синдром, който се проявява в липодистрофия и тежка инсулинова резистентност. При ендометриален рак засегнат PK3R1 се асоциира с подобрена преживяемост и нови възможности за таргетна терапия (345).

Докладваните таргетни молекули имат потенциал за изследване при ПМКЛ, както и тяхната роля с микроРНКте.

5.4. Обсъждане на резултатите получени от асоциацията между експресионните нива на miR-31-3p, miR-196a-5p в таргетната ПМКЛ плазмена група и клиникопатологичните характеристики на пациентите

В последните години, микро РНКите придобиват изследователска популярност, не само в тъканни проби, но също и като неинвазивни маркери при редица телесни течности, като плазма, серум и слюнка (346). Едно от най-големите предимства на неинвазивните, циркулиращи маркери са относително лесния достъп с неинвазивни или

минимално инвазивни методи, както и тяхната ексклузивна стабилност в телесните течности (347).

Голям брой изследвания откриват възможността за използването на миРНКи като биомаркери в телесни течности, което определя тяхната сила като неинвазивни биомаркери. Установено е че миРНКите могат да бъдат идеален клас от кръвно-базирани биомаркери за ракова диагностика, защото: миРНК експресията е често дерегулирана при ракови заболявания, експресионните характеристики на миРНКите при раковите заболявания изглежда тъканно специфичен и миРНКите са високо стабилни в плазма, поради техния малък размер и относително висока резистентност към нуклеази (348,349). Изследването на Lawrie et al (2008) е първото което демонстрира присъствието на циркулиращи миРНКи в телесните течности като плазма и серум (350), като авторите публикуват че серумните експресионни нива на miR-21 има потенциала на диагностичен маркер при дифузен В-клетъчен лимфом. Откакто циркулиращите миРНКи са докладвани с аберантна експресия в кръвна плазма или серум при редица ракови заболявания, като папиларен тироиден карцином, рак на простата и колона (351–353), изследванията в областта нарастват значително.

Малко се знае относно потенциала на тези молекули като биомаркери при ПМКЛ и поради тази причина те са обект на настоящи и бъдещи проучвания. Изследването на Wang et al. (2016) анализира в голяма ПМКЛ група (n=280) и контролна група (n=560) нивата на miR-155 в тъкан и плазма. Авторите докладват силна корелация между miR-155 експресията в тъкан и плазма и също така силната точност на miR-155 да се установява ранен рак на ларинкса (354). Друго изследване на Yilmaz et al (2015), с използването на профилиране на микроРНКи с микрочипова технология и валидиране с RT-qPCR представят, че miR-221 нивата са значимо повишени в плазмени проби от пре-оперативни ПМКЛ пациенти, докато в плазмени проби получени от същите пациенти след хирургическа интервенция и от контролна група miR-221 показва нормални нива на експресия (355). Ayaz et al. (2013) публикуват за пръв път нивата на miR-331-3p, miR-603, miR-1303, miR-660-5p и miR-212-3p са детектирани в ПМКЛ плазмени проби в сравнение със здрави контроли без детектирано съпътстващо заболяване, като авторите предлагат тези миРНКи като потенциални циркулиращи биомаркери за ранно диагностициране на ПМКЛ (108). Изследвания публикувани след Ayaz et al. (2013), показват че miR-331-3p, miR-603, miR-660-5p и miR-212-3p също се откриват в плазмени проби от други ракови и ревматоидни заболявания (356–359), което предполага че предходно подбраните миРНКи от Ayaz et al. (2013) не са тъканно и болестно специфични и могат да се използват не само като маркер за детекция на ларингеална злокачественост.

Ранната диагностика на ларингеалния карцином все още е предизвикателство. Тестовете, базирани на оценяването на циркулиращи миРНКи в плазма или серум могат да предложат допълнителна информация към моментно използваните и прилаганите диагностични инструменти, позволяващи скрининг и ранна детекция на ПМКЛ. Разработването на методите за ранно изследване на молекулните маркери придобива голяма популярност като иновативни и минимално инвазивна техника. Въпреки големия брой изследвания в тази област, все още няма валидирани неинвазивни миРНКи като маркери включени широко в клиничната практика, които могат да дадат допълнителна информация за диагнозата и предикция на заболяването.

В настоящия дисертационен труд се изследва експресията на нивата на всички тринадесет подобрани нкРНКи, които са познати онкогенни и тумор-супресорни молекули при ларингеални тъкани и клетъчни линии. За миРНКте: miR-21, miR-31, miR-145, miR-155, miR-221 и miR-222 са публикувани данни за тяхната експресия в циркулация, като често в изследванията не се конкретизира коя точно изоформа е изследвана. Поради тази причина се приема че авторите изследват „водещата“ изоформа, а именно -5p. Докато от изследваните дълги нкРНКи има публикувани данни за HOTAIR в циркулация при рак на ларинкса. За miR-31-3p, miR-196a-5p, miR-210-3p и miR-424-5p, както и lncRNA MALAT1 не бяха установени данни докладващи нивата на подобраните миРНКи и техния потенциал като неинвазивни биомаркери при ПМКЛ. Целта на проучването бе да се оценят експресионите нива на избраните нкРНКи, асоциацията им с клиникопатологичните характеристики и да се изследва способността им на диагностични биомаркери при напреднал карцином на ларинкса. Това пилотно проучване е направено след селекцията на набор от нкРНКи, базирано на литературно търсене.

В дисертационния труд част от поставените задачи бяха да се изследват експресионните нива на подобраните нкРНКи плазмени проби от пациенти, диагностицирани с рак на ларинкса (ПМКЛ) (n=22), както и в неонкологична контролна група (n=21). След литературно търсене в базите данни (PubMed, Scholar и др.), се установи, че част от включените нкРНКи демонстрирали онкогенен потенциал в ларингеална тъканна лезия и злокачествени ларингеални клетъчни линии (305,360–362), не са описани предходно като неинвазивни маркери при пациенти с ларингеална неоплазия. В настоящото проучване за пръв път представяме потенциала на най-значимите миРНКи като диагностични маркери, самостоятелно и в комбинация.

В резюме, се демонстрира че плазмените нива на миРНКи са силно корелирани с техните експресионни нива в ларингеална туморна тъкан, отделена от същите пациенти, включени в плазмената ПМКЛ група. Резултатите показват че, miR-21-3p, miR-31-3p, miR-196a-5p и lncRNA MALAT1 са повишени при болшинството от плазмени проби, получени от пациентите, но само две от 11 миРНКи (miR-31-3p and miR-196a-5p) най-значимо корелират с експресията им в тъканни ларингеални проби от същите пациенти. Още повече, за пръв път се показва и техния потенциал като неинвазивни биомаркери, като комбинацията между двете микроРНКи показва най-висока степен на разграничаване на напреднал ПМКЛ с 100% чувствителност и 81% специфичност. Докато miR-21-5p, miR-145-5p, miR-155-5p, miR-221-3p, miR-222-3p и lncRNA MALAT1 показаха понижени нива на експресия в изследваната плазмена ПМКЛ група в сравнение с контролната група. miR-31-5p, miR-210-3p и lncRNA HOTAIR не достигнаха такава статистическа значимост, поради което бяха отстранени от последващите анализи.

Дългите некодиращи РНКи MALAT-1 и HOTAIR са представени в проби от слюнка при пациенти с орален плоскоклетъчен карцином, като тези които са развили лимфни метастази показват по-високи нива на експресия на HOTAIR. Същата дълга некодираща РНК положително корелира с напреднал туморен и клиничен стадий, предполагайки че е подходяща за диагностика при ОПКК (363). При серумни проби от пациенти с назофарингеален карцином дългата некодираща РНК MALAT1 е изследвана в сет от три lncRNAs включващи още и AFAP1-AS1 и AL359062. Установява се, че експресията на тези маркери в комбинация се свързва силно значимо с напреднал

стадий от развитие на заболяването и наличието на нодални метастази. При пациенти, които се повлияват от терапия се установяват понижени нива на експресия на тези lncRNAs (364), което ги прави потенциални диагностични и предиктивни маркери. За съжаление, резултатите получени при анализа на тези нкРНКи в извадката не потвърждават предходно публикуваните данни.

Една от най-добре изучените миРНКи при редица заболявания включително и раковите заболявания е miR-21. Експресионните нива на miR-21 са изследвани предходно в ПККЛ плазмени проби, като е установено, че са открити значимо по-високи при ПККЛ пациенти и премалигнени ларингеални лезии в сравнение с контролите. Това откритие предполага високо онкогенната роля на miR-21 дори и в ранни етапи на развитие на рак на ларинкса, както и в напредналите стадии на злокачествеността. В допълнение Wu J. et al. (2015), докладват че серумните нива на miR-21 имат потенциала на диагностичен маркер при стомашен карцином при гранична стойност RQ=2.78 с AUC=0.912 и чувствителност 88.4% и специфичност 79.6%, но експресионните нива не корелират с клиничните характеристики (365). Противоположно на тези данни, Wang J et al. (2014) изследва серумните екзозомни нива на miR-21 и HOTAIR и докладва че експресията на двата маркера значимо се асоциират с напреднал T стадий и клиничен стадий в сравнение с ранни етапи на развитие и високите нива се асоциират с лимфни метастази. В същото проучване е представено че комбинацията от двата маркера показват значима високо различаване на злокачествени неоплазми от доброкачествени ларингеални полипи с AUC 87.6% с 94.2% чувствителност и 73.5% специфичност (102), което предполага че комбинацията от двата маркера може да служи като обещаващ предиктивен маркер за пациенти с ларингеална неоплазия.

Резултатите, които се получиха в изследваната извадка за двете изоформи на miR-21 показаха че miR-21-3p е свръхекспресиран при ПККЛ пациенти, но изненадващо другата изоформа miR-21-5p, която е с валидиран онкогенен потенциал беше значително понижена при пациенти с ПККЛ в сравнение с контролната група. В литературата се откри единствена статия върху серумни нива на пациенти с КРК, които показват също понижени нива на miR-21 и не се наблюдава асоциация с клиничните характеристики и прогнозата при тези пациенти (366). Допълнително резултати от циркулиращи нива на miR-21 показват повишаване на количеството с възрастта и наличието на възпалителни процеси в тялото (367). Експресията на miR-21-3p и miR-21-5p, макар и незначително, показват понижение при по-възрастна кохорта (над 64 годишна възраст) (368). Поради този факт е възможно miR-21 освен като една от най-основните миРНКи, участваща в сигнализацията при раковите клетки да е активна молекула и при други придружаващи по-възрастните хора заболявания. Необходимо е да се проведат допълнителни изследвания върху проби от пациенти с рак на ларинкса и участието на miR-21-5p и в канцерогенезата на това заболяване.

В литературата данните на miR-155 експресия при злокачествени тумори на различни образувания включително ПКГШ са непоследователни. Lerner et al. (2015) публикуват понижени нива на експресия на miR-155 в плазмени проби от ПКГШ, които се асоциират с напреднал T стадий и наличието на далечни метастази. Авторите валидират изследването си с клетъчни култури, като установяват че инхибирането на miR-155 се свързва с активна пролиферация, а добавянето на mimic miR-155 води до инхибиране (369). Докато в изследването на Wang et al. (2016) се демонстрира високата

експресия и корелация на miR-155 между плазмени и тъканни ларингеални проби (354). Liu et al. (2012), публикуват значимо понижени нива на циркулираща в плазма miR-155 при пациенти с езофагиален плоскоклетъчен карцином (ЕППК). Понижената експресия на miR-155 се асоциира значимо с повишен риск от езофагиален карцином и с злоупотребата от тютюневи и алкохолни изделия. Не се достига до значима корелация между експресията на miR-155 в плазма и тъкан при същите пациенти. Тези резултати са противоположни на техни предходни изследвания само върху тъкан от езофагиален карцином, където се установяват повишени нива на miR-155 (370). В съгласие с тези резултати, Lodes et al. (2009) демонстрира недиректна връзка между miRNKi в серум и miRNKi в тъканни проби при пациенти с рак на простатата, колона гърдата и белия дроб (371). Farazi et al. (2011) забелязва че експресията на miR-155 е значимо по-висока при тъканни проби от рак на гърдата, както и Yanaihara et al. (2006) наблюдават асоциация между понижени нива на преживяемост и свръхекспресията на тъканна miR-155 при белодробен аденокарцином (372,373). Противоположно Wang et al. (2010) открива понижена експресия на серумни циркулиращи miR-155 при пациенти със системен лупус еритематозус (Systemic lupus erythematosus; SLE) в сравнение със здрави контроли (374).

Различията в експресията между плазмени/серумни и тъканни miRNKi е възможно да е следствие от екстраклетъчните екзозоми, секретирани от туморните и кръвни клетки. Екзозомите са везикулки с размер 40-100 нм, които се освобождават от много видове клетки в междуклетъчното пространство. Такива везикулки са широко разпределени в много телесни течности. miRNKi и miRNKi са идентифицирани в екзозомите, които могат да бъдат поети от съседно или далечно разположени клетки и съответно да модулират рецепиентните клетки. Екзозомите имат важна роля в прогресията на заболяването и могат да стимулират ангиогенезата и да подпомагат метастазирането (375). За някои miRNKi е открито че са в по-голямо количество в екзозомите (376), като на пример е установено по-голямо количеството на miR-21 да се открива в екзозоми в сравнение с междуклетъчното пространство (377). Предполагано е че по-голяма част от miRNKi в циркулация са селективно концентрирани в екзозоми и екзозомални miRNKi са определени като главен източник на циркулиращи miRNKi (378). Сравнени към циркулиращите туморни клетки и нуклеинови киселини, намиращи се директно в телесните течности, тумор-произлизащите екзозоми са по-стабилни и тяхната концентрация е по-висока. Докладвано е, че интегрин CD47 по повърхността на екзозомите може да ги предпазва от фагоцитоза (379). miRNKi секретирани от екзозоми показват независим експресионен спектър от клетките които секретират тези екзозоми (380–382) и RNKi са докладвани като селективно сортирани в екзозоми. lncRNAs са различно експресирани в екзозоми при много ракови заболявания, което предполага екзозомните lncRNAs могат да рефлектират физиологичния и патологичния статус на техните родителски клетки (379). Абнормалната експресия на екзозомните lncRNAs при раковите пациенти на различни стадии на заболяването в сравнение със здравите субекти ги прави потенциален биомаркер за ракова диагностика (379,383). При рак на пикочния мехур, ларингеален карцином, глиобластома екзозомна lncRNA HOTAIR е установено, че допринася за туморната инициация и прогресия, промотира туморната миграция и инвазия и може да служи като биомаркер (384,385). Публикуваните данни показващи различие на концентрацията на RNKi в екзозоми и междуклетъчно пространство може да е една от

хипотезите обясняващи защо експресията на miR-21-5p, miR-155-5p, lncRNA MALAT1 е по-ниска в плазмени проби.

С цел да се определят специфични серумни миРНКи, като потенциални диагностични маркери при пре-оперативни пациенти с рак на ларинкса, Grzelczyk et al. (2019) изследват 66 пациенти. Сред миРНКте със значимо променена експресия в таргетната ларингеална група са miR-31 и miR-145, като miR-31 успешно разграничава ПККЛ пациенти от контролната група с максимална AUC=1.0, което я прави потенциален неинвазивен биомаркер за рак на ларинкса (386). В изследването на Guo et al. (2019), се публикува че комбинацията от серумни miR-145 и miR-218 при пациенти с ларингеален карцином се асоциира с агресивност на заболяването. Допълнително авторите на проучването докладват, че повишени нива на двете миРНКи се свързват с по-добра преживяемост в сравнение с понижените им нива при проследяването на пациентите (387), което ги прави прогнозен индикатор. В изследваната извадка 4 пациента показаха повишени нива на експресия на miR-145-5p, която е с установено силна тумор-супресорна функция в ракови клетки. Проследяване на тези пациенти във времето заслужава да бъде направено, като получените данни ще допринесат за валидиране на публикуваното твърдение от Guo et al. (2019).

В мащабно мета-проучване публикувано през 2019г. са изследвани експресионните нива на двете miR-221 и miR-222 при общо 6086 раково болни пациенти, чиито данни са публикувани в 17 изследователски статии. При мета-анализа се установява, че двете миРНКи се асоциират значимо с негативна тенденция към цялостна преживяемост и miR-222 се отличава като по-силен маркер от miR-221. Освен това, високата експресия miR-222 също е свързана с по-лоша преживяемост без прогресия и оцеляване без болести, обединено с оцеляване без рецидив (388). Към момента miR-222-3p не е изследвана при ПККЛ, като не инвазивен маркер, докато повишена miR-221 е установена в циркулация при пре-оперативни в сравнение с постоперативни ПККЛ пациенти (355). Резултатите които се получиха показват, че тази микроРНКи са със значимо намалена експресия при таргетната ПККЛ група

Част от получените резултати могат да се обвържат с причинно следствени връзки, различни от наличието на рак. Например, променени нива на миРНКи в циркулация се наблюдават и при различие в спортните методи на издръжливост. В изследване включващо три малки групи мъже: атлети трениращи издръжливост и такива трениращи сила, както и контролна нетренирана група се изследват общо 14 миРНКи (miR-1, miR-16-2, miR-20a-1, miR-21, miR-93, miR-103a, miR-133a, miR-146a, miR-192, miR-206, miR-221, miR-222, miR-451, miR-499). Сред тези миРНКи miR-222, miR-21, miR-146a и miR-221 показват различие между групите трениращи издръжливост и се различават между тренираните атлети за издръжливост и съпротива и по този начин имат потенциал като полезни биомаркери за тренировъчни тренировки и / или играят роля в специфичните за тренировъчния режим тренировки (389). Резултатите от това изследване могат да поставят хипотезата, че тези миРНКи участват освен в канцерогенни пътища, така и в специфични метаболитни стъпала, характеризиращи протичането на клетъчния цикъл в здраво тяло.

Получените резултати в дисертационния труд показаха най-силна значимост на miR-31-3p и miR-196a-5p като неинвазивни маркери за диагностициране на ПККЛ в напреднал стадий. Последните години miR-31 набира широка популярност сред

микроРНКте, които са изследвани при ПКГШ, като редица са проучванията които докладват значимостта ѝ на биомаркер, самостоятелно или в сет от миРНКи.

Предходно, miR-31 е изследвана при пациенти с орален плоскоклетъчен карцином (ОППК) и контролна група като неинвазивен маркер в плазма и слюнка за ранна детекция с ОППК. Изследователите установяват, че miR-31 е изобилна и чиито нива са намалени в телесни течности след отстраняването на орален карцином, което го прави като маркер с потенциален интерес (390). Повишени нива на miR-31 са показани също и при други плоскоклетъчни карциноми като езофагиален. В проучването на Zhang et al. (2011) се демонстрира, че miR-31 може да бъде детектиран при пациенти с ЕППК с площ под кривата AUC от 0.902 (95% CI: 0.857–0.936) (391), което е сходно до данните които се получиха при анализа на ROC кривата за miR-31-3p самостоятелно. В допълнение се откри, че miR-31-3p в изследваните ПККЛ проби се открива при почти всички пациенти, с относително високи нива на експресия в сравнение с останалите изследвани микро РНКи, което е в съответствие с предходни изследвания. Повечето от авторите не специфицират коя микроРНКА изследват, което може да повлияе върху прецизното познание за микроРНКи и техния начин на регулация и функциониране. Авторите от изследването на Chang et al. (2013), изследват двете miR-31 изоформи (-5p и -3p), като резултатите показват че miR-31-3p се открива в по-малка наличност в сравнение с miR-31-5p, но въпреки това miR-31-3p има силно онкогенна роля при ОППК. Негов 3'UTR таргет е RhoA и тази миРНКИ е способна да понижава експресията на RhoA, което понижава пролиферацията и миграцията при ОППК SAS и Fadu клетъчни линии (392), което е предложено като негова ключова роля при туморогенезата. Скорошно проучване на Lu et al. (2019), докладва конкретно повишените нива на miR-31-5p изоформата се свързва като неинвазивен маркер за успешна терапия при пациенти с ОППК (393). От анализиранияте публикации прави впечатление, че мнозинството докладват значимостта на miR-31 при пациенти с орален карцином, което може да подсказва че активната изоформа в циркулация може да е по-специфична за тази област на главата и шията.

miR-31 също е асоциирана с отговор към терапия при колоректален карцином (КРК) и малигнени ларингеални клетъчни линии. В скорошно проучване на Daneberga Z et al., (2016), показва че свръхекспресията на miR-31 е асоциирана с отговор към терапия при КРК, следствие на ракова клетъчна автофагия, което води до високи нива на концентрация на miR-31, докато неговата свръхекспресия може да бъде подходящ неинвазивен маркер за ракова прогресия и резистентност към терапия (394). Също, циркулиращ miR-31 беше предложена като маркер за метастазирание и преживяемост, но това откритие е противоречиво, поради други изследователски проучвания и мета-анализи, които не валидират тези данни (395,396). Конкретно miR-31-3p изоформата беше изследвана като една от най-значимо повишено регулирани микроРНКи след лечение с паклитаксел при злокачествена ларингеална плоскоклетъчна линия Нер-2 и е предложена като потенциален маркер на резистентност към лекарствена терапия (130). Резултатите, които се получиха в дисертационния труд допринасят към познанието за потенциалната роля на циркулираща miR-31-3p при ларингеалните карциноми и показва предпочитано че miR-31-3p може да бъде част от панел с неинвазивни маркери за ПККЛ скрининг.

Изследването на Saito et al. (2013) показва, че двете miR-196a изоформи са най-успешните маркери за диагностика и лечение на ларингеален карцином. Понижената

регулация на miR-196a инхибира раковата клетъчна пролиферация при злокачествени ларингеални клетъчни линии и животински модели (113). Следователно, miR-196a може силно да промотира растежа на рака на ларинкса и потискането на експресията на miR-196a успешно да намали *in vivo* растежа на ПККЛ. Високите експресионни плазмени нива на miR-196a при орален карцином са установени в сравнение с орални ракови лезии и комбинацията с miR-196b е представена като потенциален неинвазивен маркер за детерминиране и предикция потенциала на злокачественост с 91% чувствителност и 85% специфичност (397). Получените резултати за разграничителната точност на miR-196a самостоятелно в проучването е AUC=0.864 (397), което е много сходно с получените в дисертациония труд резултати за miR-196a-5p в ПККЛ плазмената група AUC=0.877.

Същата комбинация от miR-196a и miR-196b е изследвана и при рак на стомаха, където miR-196a самостоятелно показва по-висок разграничителен потенциал в сравнение с комбинацията miR-196a/b, въпреки че комбинацията от двата маркера се установява силно асоциирана с напреднал стадий на рак на стомаха, метастазирането и лошата преживяемост (398). Данните от двете изследвания предполагат, че нивата на miR-196a и miR-196b самостоятелно или в комбинация могат да варират при различните ракови заболявания и е необходимо техният потенциал на биомаркер да бъде валидиран в по-голяма извадка.

МикроРНКте, miR-31-5p, miR-210-3p и miR-424-5p не достигнаха до статистически значими разлики на експресия в плазмената ПККЛ група в сравнение с неонкологичната контролна група.

miR-210 е една от най-изследваните „хипоксични“ миРНКи и нейната хипоксична асоциация е демонстрирана при рак на ларинкса (130). Под действие на хипоксия miR-210 намалява пролиферацията чрез индуциране на арест на клетъчния цикъл и апоптоза чрез таргетиране на FGFR1 (fibroblast growth factor receptor-like 1) (130). При глиоми, циркулиращите серумни нива на miR-210 са свързани с напреднал стади и лош изход от лечението (399), но неговия неинвазивен потенциал не е детерминиран при ПККЛ.

Ектопична miR-424 експресия е публикувана предходно при ПККЛ, която е свързана с влиянието ѝ върху p53 сигналния път (400), и мултилекарствена резистентност с конкретно miR-424-3p изоформата (398). Циркулираща miR-424 може да бъде потенциален маркер за ранен етап от развитие на рак на гърдата (401), но подобно на miR-210, потенциала на miR-424-5p при ПККЛ не е изследван в детайли все още.

Интригуващо, получените резултати показват че miR-210-3p е значимо с повишена експресия при туморни ларингеални тъкани в сравнение с нормална тъкан, което може да предположи влиянието на тази изоформа при ларингеалната канцерогенеза, но не се наблюдават значимо повишени нива на експресия в плазмената ПККЛ група в сравнение с неонкологичната контролна група. Не се установи значимо повишена регулация в плазмените и тъканните проби за miR-424-5p. При четири доброволца с придружаващи неонкологични заболявания, включени в контролната група, се наблюдаваха повишени нива на експресия на miR-210-3p и miR-424-5p, което може да допринася за наблюдаваната липса от статистически значима разлика между експресията в таргетната ПККЛ плазмена и контролна групи. Освен доказаната за miR-210 и miR-424 ракова асоциация, за тези миРНКи също е установено че участват във възпалителни процеси при автоимунни заболявания и възпалителни механизми

свързани със сърдечен удар (402–404). Възможно е miR-210-3p и miR-424-5p, като валидирани онкогенни miRNKi при ракови заболявания да имат също и значима роля при възпалителните пътища. Може да се предположи, че експресията на двете miRNKi не може да бъде определена като специфична само за рак на ларинкса. Може да се отбележи, че трима от доброволците бяха с установени по-високи от граничната стойност $RQ=2.00$ стойности за miR-31-3p и двама показяха повишени нива за miR-196a-5p, но въпреки това плазмените експресионни нива miR-31-3p и miR-196a-5p бяха много по-високи в ПККЛ групата, и може да се предположи тяхната силна ракова асоциация. За съжаление, нивата на miR-31-3p и miR-196a-5p не достигнаха до статистическа значимост с нито една от клиникопатологичните характеристики, което е възможно следствие на малката изследвана извадка. Поради тази причина приемаме, че тези получени данни могат да служат като стартова точка за валидиране в по-голяма кохорта.

В заключение, значимо повишена експресия на miR-31-3p и miR-196a-5p се установи както при ларингеални туморни тъканни проби така и при плазмени проби от пациенти, диагностицирани с ПККЛ, което предполага тяхното влияние в ларингеалната туморогенеза. Комбинацията от двата циркулиращи маркера показва най-висока точност за детекция на напреднал ПККЛ в изследваната група. Нивата на експресия на другите изследвани маркери miR-210-3p и miR-424-5p не показва разлика между плазмените ПККЛ нива и контролите, което предполага че те не са подходящи като неинвазивни биомаркери при ПККЛ. Получените пилотни данни могат да послужат като начална точка за валидиране в по-голяма група.

5.5. Обсъждане на резултатите получени от анализа на патогенните соматични промени при напреднал ЧПВ-негативен плоскоклетъчен карцином на ларинкса, установени посредством таргетно NGS секвениране

Част от поставените задачи в настоящия дисертационен труд е да се изследва соматичния спектър на мутации при напреднали ЧПВ-негативни туморни проби, събрани от 57 ПККЛ пациента, посредством таргетно NGS секвениране, (TruSeq Amplicon-Cancer Panel) на платформа MiSeq, Illumina. Също така за пръв път се докладва сравнение на генетични промени при туморни образувания между трите основни ларингеални локации: супраглотис, глотис и субглотис. Непосредствено до представените патогенни варианти се подчертаха и три варианта в гените TP53, KDR и KIT, които не са определени като патогенни в базите данни, но се свързват с канцерогенезата и лекарствената терапия.

Към момента, единствената таргетна терапия за моделиране на КГШ е цетуксимаб, одобрена от Администрацията за лекарства и храни (FDA; Food and Drug Administration, САЩ) през 2006. Представлява IgG1 моноклонално антитяло, което инхибира лигандното свързване към EGFR (Endothelial Grow Factor Receptor), който рецептор се наблюдава свръхекспресиран при до 90% от пациентите с КГШ (405). Въпреки това цетуксимаб не е подходящ препарат за всеки пациент с КГШ и се асоциира с висока раково-специфична смъртност (CSM; Cancer Specific Mortality) в сравнение с други химиотерапевтици (406), което определя и по-честото смущаване от лечението и висока токсичност (407). Развитието на персонализираната таргетна

медицина ще бъде в полза за успешната терапия при локации обхващащи ПМКЛ и КГШ.

Най-често мутиралите гени във включената и изследваната извадка, както и техния потенциал върху канцерогенезата на туморите обхващащи главата и шията, включително и ларинкса са подробно дискутирани. Останалите изследвани гени, при които са установени мутации, се откриват само при няколко пациента и могат да допълнят спектъра от засегнати гени.

Резултатите, които се анализираха показаха наличие на патогенни варианти в 27 ракови-асоциирани гени, като най-често мутиралия ген е TP53 подобно на предходни NGS изследвания, базирани върху главата и шията (408–411). Следващите най-често засегнати гени са MET, CDKN2A, PIK3CA и FBXW7. Останалите 22 гена, в които са открити патогенни варианти са: APC, ATM, BRAF, CDH1, ERBB4, FGFR2, FLT3, GNAQ, GNAS, HRAS, JAK3, KDR, KIT, KRAS, NOTCH1, NRAS, PTEN, RET, SMAD4, SMARCB1, STK11 и VHL. От една страна наблюдаваните мутации потвърждават предходни данни за това, че ларингеалния карцином е силно хетерогенно заболяване (412). От друга страна, резултатите които се получиха показват различие в разпределението и честотата на мутации между различните локации на КГШ, което може да предположи вътрешна хетерогенност на ларингеалните локации.

В сравнение с оралният карцином, където мутационната честота на гените TP53, MET и FBXW7 е 68%, 4% и 2% (266), в изследваната извадка се установиха, че трите гена са представени с по-висок процент мутации съответно 84.2%, 19.3% и 8.8%. В допълнение, друго изследване върху КГШ от Chau et al (2016) публикува, че NOTCH1 е втория най-често мутирал ген след TP53 при p16-негативни пациенти (413), докато в изследваната ПМКЛ кохорта мутации в NOTCH1 гена беше установено само при един пациент. В същото изследване на Chau et al (2016), колектива изследва значим брой проби от КГШ (n=213), но въпреки това включените ПМКЛ проби са само 24. След детайлно разглеждане на статията, се идентифицира че сред 24-те проби от ПМКЛ, NOTCH1 мутация е установена също само при един пациент. Взети заедно тези данни могат да предположат, че мутациите засягащи NOTCH1 гена не са чести и специфични при рак на ларинкса, в сравнение с орален и орофарингеален карцином, където тези мутации се откриват по-често (413). Следователно рака на ларинкса може да има специфични пътища на канцерогенеза от другите локации на глава и шия. Внедряването на NGS анализите при стандартите на лечение, базирани на характеризирани на раковия ларингеален генетичен профил, сходно на други солидни тумори (414) е необходимо.

На Фигура 5.7. са представени най-често засегнатите молекули и сигнални пътища, в резултат от анализирани патогенни варианти.

5.5.1. TP53

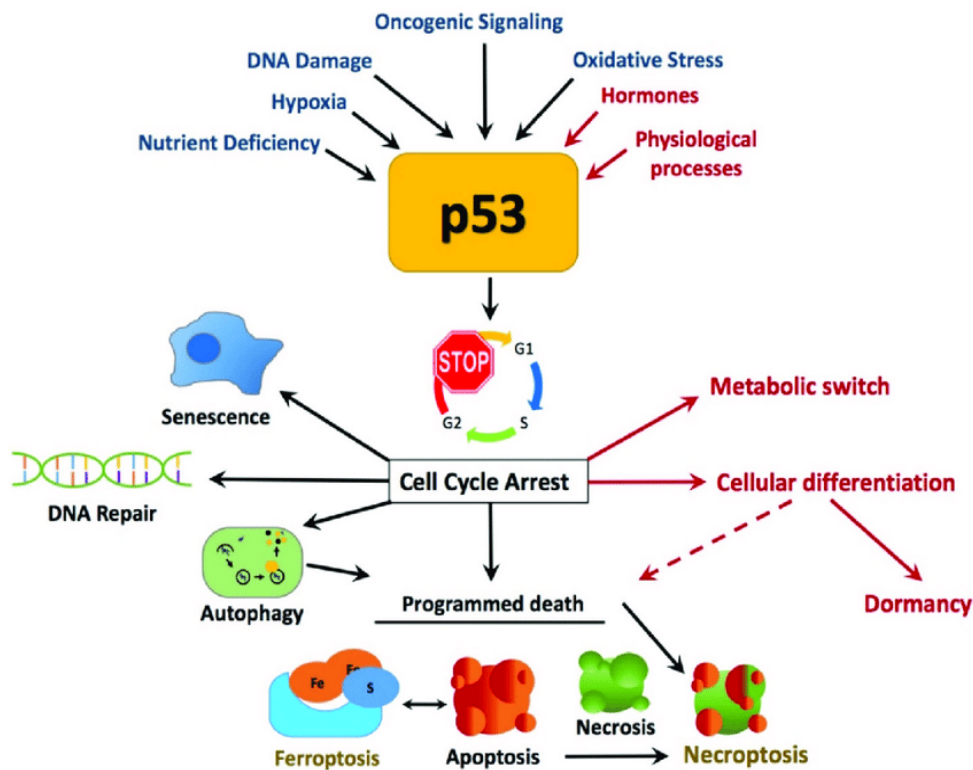
За първи път открит в края на 70-те години като протеин, свързан с големия туморен антиген SV40 (а също и като протеин, който е открит в някои вирусно трансформирани клетки), p53 обикновено се е разглеждал като подпомагаща молекула онкогенната трансформация на клетки (415). Отнема близо 10 години в областта на раковите заболявания, за да разбере че дивия тип p53 е тумор супресорен белтък. През 1989 г., Vogelstein и колеги откриват, че делециите, инсерциите и точковите мутации в

гена TP53 са ключови при колоректален карцином (416). Това е подкрепено от Eliyahu et al. (1989) и Finlay et al. (1989), които демонстрират, че p53 див тип, клониран от не-трансформирани клетки, е способен да потисне способността на малигнизирани клетки (417,418). Скоро след това започват редица изследвания с участието на p53 при човешки ракови заболявания, миши модели и клетъчна биология, които засилват идентичността на p53 като основен тумор супресорен белтък. Вече е добре установено, че TP53 е афектиран с висока честота при много ракови заболявания, отколкото всеки друг тумор супресорен ген (419).

Също така централно значение за историята на p53 са и приносите на Arnold Levine и колеги и списъкът с открития, получени от лабораторията на Levine е дълъг. Като Levine и колегите му откриват наличието на белтъка p53 (420), както и създаването на първите успешни клонове на p53. Също така те идентифицират, че Mdm2 е свързващ партньор на p53, като инхибира неговата функция (421).

Генът, който кодира белтъка p53 е TP53 и се локализира на късото рамо на хромозома 17 (17p13.1). Първи екзон е некодиращ, а останалите кодиращи последователности показват високо ниво на консервативност между гръбначните (422). P53 е хомо-тетрамер, съдържат 393 аминокиселини. N-терминалният регион (остатъци 1-62) съдържа трансактивиращ домейн, който е разделен на два субдомейна (TAD1 и TAD2), последван от пролин-богат регион (остатъци 63-94), със значение относно апоптотична активност, ДНК-свързващ домейн (DBD), който е познат като коров домейн (остатъци 94-292), съдържа електроположителни аргининови аминокиселини и един цинков атом, който взаимодейства с тандемни повтори на p53 отговарящия елемент (RRRCWWGYYY: R, G/A; W, A/T; Y, C/T) в ДНК веригата, разделени с до 13bp в промоторните региони на своите целеви гени. ДНК-свързващия домейн се свързва към нуклеарните сигнални домейни (остатъци 316-325), които са отговорни за тетрамеризацията, която е основна за p53 активността. С-терминалният домейн (остатъци 363-393) действат като подвижен регион, който е включен в даун-регулацията на централния ДНК-свързващ домейн (423).

Вследствие от неговата централна роля в клетъчния цикъл, p53 печели гръмкото име „пазител на генома“ (“guardian of the genome”) (424) и „клетъчен портиер“ (“cellular gatekeeper”) (425). Редица са процесите, в които участва p53 като програмирана клетъчна смърт, стареене, арест на клетката, ДНК поправка, метаболитно превключване и др. (Фигура 5.1.).



Фигура 5.1. p53 канонична и неканонична тумор супресорна роля на p53. p53 е активиран посредством редица сигнали задействани от клетъчния стрес. Тези активатори на p53 включват нутриентен стрес, хипоксични условия, активирани на онкогени, ДНК нарушаване и оксидативен стрес вследствие от реактивни кислородни молекули (ROS), като в резултат се повишава активността на p53. Класическите или канонични отговори на p53 включват транскрипционни, транслационни, задържане на клетъчния цикъл и поправка на ДНК повреди, които поставят клетката на етап стареене или индуцират апоптоза. Неканоничната, контролирана програмирана клетъчна смърт включва автофагия, некроза и фероптоза. Нормалните физиологични процеси като хормонално активирани също може да доведе до p53-индуцирано задържане на клетъчния цикъл и p53 действа като превключва метаболитните процеси включващи диференциация и насочване към специализирани клетъчни функции (426).

TP53 е един от най-често мутиралите гени при солидни ракови заболявания, но неговото използване при раковата диагноза и прогноза е все още рядко поради разнопосочните данни за ефекта на аберациите при ракови заболявания (427).

Поради хетерогенността на КГШ и различните методи на детекция на TP53 мутации при КГШ (вкл. имунохистохимия и мутационен скрининг), честотата на TP53 мутациите варират сравнително често в различните проучвания, вариращи от 30% до 70%. Все по-често се използва секвениране от ново поколение, което потвърждава че TP53 гена е най-често засегнатия тумор супресор при КГШ, като мутации се откриват при 75-85% от случаите (222,222,410,428).

Обновен анализ на Раковия Геномен Атлас (TCGA; NHI, САЩ) разглеждащ общо 510 проби от КГШ демонстрира че 70.4% от туморите имат мутации в TP53 (Таблица 5.1.). Още повече се забелязва, че процента на засягане на TP53 при различните ракови локации варира. Тумори в областта на ларинкса и хипофаринкса демонстрират най-висок мутационен процент от 83.5%, в сравнение с туморите обхващащи езика и

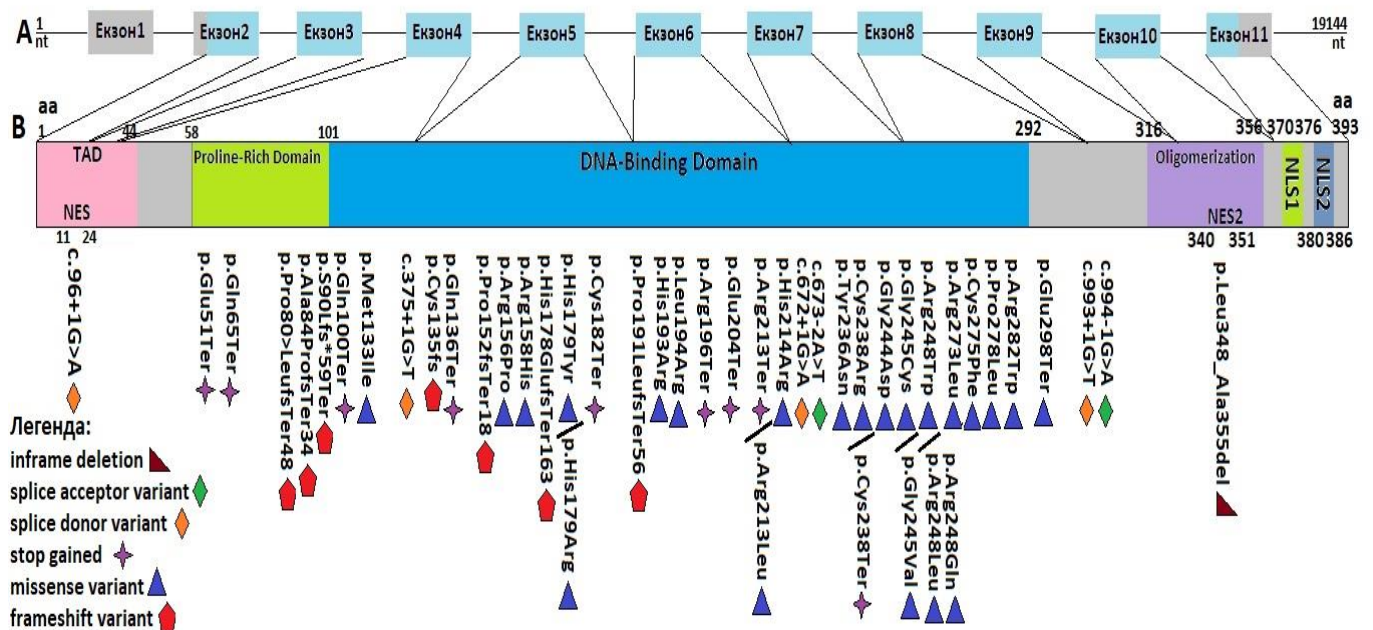
оралната кухина (75.6%) и туморите на орофаринкса, включващи сливиците и базата на езика където се детектират най-нисък процент 28.6% (429). Тези факти, че най-ниско TP53 засягане има при орофаринкса и сливиците не са учудващи, тъй като болшинството от тези тумори са силно ЧПВ-асоциирани.

Таблица 5.1.

Преобладаване на TP53 мутации при КГШ TCGA (n=510)

Анатомична локация	Случаи (n)	HPV ⁺ (%)	HPV ⁺ & WT TP53 (%)	TP53 Mutation (%)	TP53 Mutation/HPV ⁻ (%)
Ларинкс&Хипофаринкс	121	1.5 (2/121)	1.5 (2/121)	83.5 (101/121)	84.5 (101/119)
Орална кухина&Език	312	3.8 (12/312)	3.5 (11/312)	75.6 (236/312)	78.9 (236/300)
Орофаринкс, език&база на език	77	28.6 (22/77)	28.6 (22/77)	28.6 (22/77)	40 (22/55)
Тотал	510	7.1 (36/510)	6.9 (35/510)	70.4 (359/510)	75.6 (236/312)

Повечето от TP53 мутациите се наблюдават като мисенс замени, често възникващи в ДНК-свързващия регион и няколко TP53 мутации се наблюдават според TCGA при КГШ като най-често възникващи или „хот спот“: R248, R273, G245, R175, R282 и H179 (429). В изследваната извадка бяха установени общо 9 „хот спот“ мисенс мутации, а именно: p.Arg248Trp; p.Arg248Leu; p.Arg248Gln; p.Arg273Leu; p.Gly245Val; p.Gly245Cys; p.Arg282Trp; p.His179Tyr; p.His179Arg (Фигура 5.2.). В скорошно изследване на Malekzadah et al. (2019), докладват иновативен подход за имуно терапия при плоскоклетъчни карциноми, носещи „хот спот“ мутации в TP53 и експресиран HLA антиген (430).



Фигура 5.2. Разпределение на откритите патогенни варианти в p53 участъците.

При КГШ, мутациите в TP53 се свързват с ЧПВ-негативен статус и лош изход след стандартно лечение (268). В скорошно проучване на Neskey DM et al. (2016), се описва разработването на компютърен подход и точково оценяване наречено Evolutionary Action (EA), което е разработено с цел да се определи силата на мисенс TP53 мутации на високо и ниско рискови. Допълнително, същия авторски колектив демонстрира, че пациентите с КГШ, които носят високо рискови мисенс TP53 мутации се асоциират с агресивен раков фенотип и понижена чувствителност към платина-базирана терапия, в сравнение с тези които носят див тип TP53 или ниско рискови TP53 мисенс мутации (431,432). С използването на базата данни <http://mammoth.bcm.tmc.edu/cgi-bin/panos/EAp53.cgi> (431), беше калкулирана предикцията на идентифицираните общо 21 мисенс TP53 патогени варианта в изследваната група. Пет мисенс варианта (p.Met133Ile; p.Arg156Pro; p.His214Arg; p.Tyr236Asn и p.Arg282Trp) се определиха като ниско рискови мутации, а останалите шестнадесет мисенс варианта се прогнозираха като високо рискови (p.Arg158His; p.His179Tyr; p.His179Arg; p.His193Arg; p.Leu194Arg p.Arg213Leu; p.Cys238Arg; p.Gly244Asp; p.Gly245Val; p.Gly245Cys; p.Arg248Leu; p.Arg248Gln; p.Arg248Trp; p.Arg273Leu; p.Cys275Phe и p.Pro278Leu). В допълнение, при пациенти с колоректален карцином с метастази в черния дроб, носещи високо рискови TP53 мутации в комбинация с мутации в RAS генната фамилия се свързват с по-кратка 5-годишна преживяемост след хирургическа интервенция (433). В дисертационният труд, са описани пет пациента (9%), които носят паралелно мутации в HRAS или KRAS гените и високо рисков TP53 вариант. Ниско или високо рискови TP53 мутации в комбинация с RAS мутации могат да бъдат използвани като предиктивен или прогностичен биомаркер при прилагане на терапевтични подходи при КГШ.

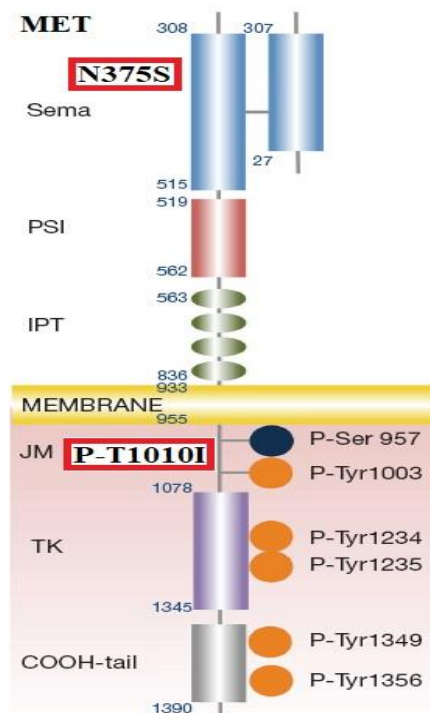
5.5.2. MET

Следващия най-често засегнат ген в извадката е MET. MET локусът е картиран на хромозома 7q21-31 и се състои от 21 екзона. MET гена кодира тирозин киназен рецептор, който се състои от няколко основни функционални домейна включващи киназен (kinase), до мембраната (juxtamembrane) и Сема домейни (Sema domains) (434). Активиращи MET мутации са открити при редица ракови заболявания, като активирането на MET пътя корелира с лоша прогноза при рекурентни/метастатични КГШ (435).

В изследваната група се идентифицираха само два описани в литературата и базата данни MET варианта при общо 19.3% (n=11) от случаите, които са разположени в SEMA и JM домени, а именно с.1124A>G (p.Asn375Ser) и с.3029C>T (p.Thr1010Ile) (Фигура 5.3.). Патогения вариант p.Thr1010Ile беше открит при 17.54% от изследваните ПМКЛ пациенти и предходно е описан като активираща „драйвърна“ мутация (436), докато p.Asn375Ser се определя като герминативен и се свързва с положителна фамилна ракова история (260). Двата варианта се асоциират с активиран MET сигнален път.

Дерегулиране на MET при раковите заболявания възниква посредством няколко механизма, включващи свръхекспресия, амплификация, автокринна сигнализация и мутационна активация. Първите мутации в JM (juxtamembrane) са открити при стомашен карцином (P1009S) и при биопсия от рак на гърдата (T1010I) (437).

Важността на тези мутации и тяхната честота е установена по-късно върху изследвания с рак на белия дроб (438,439). Ma et al. (2003), идентифицира мисенс мутации в JM домейн (R988C, T1010I, S1058P) и Sema домейн (E168D, L299F, S323G, N375S) (439). В отделно проучване базирано на НДКПБД и КРК се идентифицират мутации в Sema домейн (N375S) и JM домейн (R970C and T992I) (438). Мутации в тези два домейна е установено, че намаляват силата на убиквитиниране на MET рецептора и неговата деградация, което съответно води до продължителна MET сигнализация. Честотата на MET мутациите при ракови белодробни заболявания е 3% при плоскоклетъчен, 5.6% при недребноклетъчен и 8% при аденокарциноми, но не са ограничени само до белодробни неоплазии. Също така 9% MET мутации се откриват при напреднал рак на гърдата и 7.4% при напреднал карцином на яйчниците (440–442). Всички тези изследвания подчертават ролята на активирането на MET гена при раковите заболявания по различни механизми, по които RTKs могат да добият онкогенни способности.



Фигура 5.3. Структура на MET рецептора и маркиране на откритите мутации N375S и T1010I.

Десет от пациентите с мутация в MET гена докладват злоупотреба с тютюневи изделия повече от 20 години, което може да се предположи връзка между никотиновото действие и поява на MET мутации. В проучването на Nagahashi et al. (2018), коментират, че 19% от пациентите с белодробен аденокарцином, носещи MET мутация, докладват употреба на тютюневи изделия (443). В допълнение мутации в MET гена се свързва като механизъм водещ до резистентност към лекарствена терапия. Промени в броя копия и соматични мутации в този ген са асоциирани с по-къс период на преживяемост (237,444). Според Tu et al. (2018), пациенти с активиран MET ген, които също са тежки пушачи са резистентни към MET инхибитори (445). В други проучвания, дерегулиран MET ген (амплификация и свръхекспресия) се свързва с резистентност

към EGFR инхибитори (Cetuximab; Erlotinib, Dasatinib), както и цисплатина самостоятелно и VEGFR инхибитори (Cediranib; Vandetanib) при орални клетъчни линии, животински модели и рекурентни/метастатични пациенти с КГШ (446). При КГШ клетъчни линии, инхибирането на MET допълнително с SU11274 може да синергизира показвайки висока ефикасност с ерлотиниб и цисплатин химиотерапия, и може значително са подобри ефекта в сравнение с прилагането на самостоятелен лекарствен агент (447). Счита се, че пациенти, диагностицирани с КГШ, които имат засегнат MET ген и са третирани с EGFR инхибитори се влошават по-бързо и имат лоша прогноза (448). Засегнат MET ген може да бъде съществен двигател при канцерогенезата на КГШ и анализа на статуса му може да бъде подходящ за селекцията на по-прецизна онко терапия.

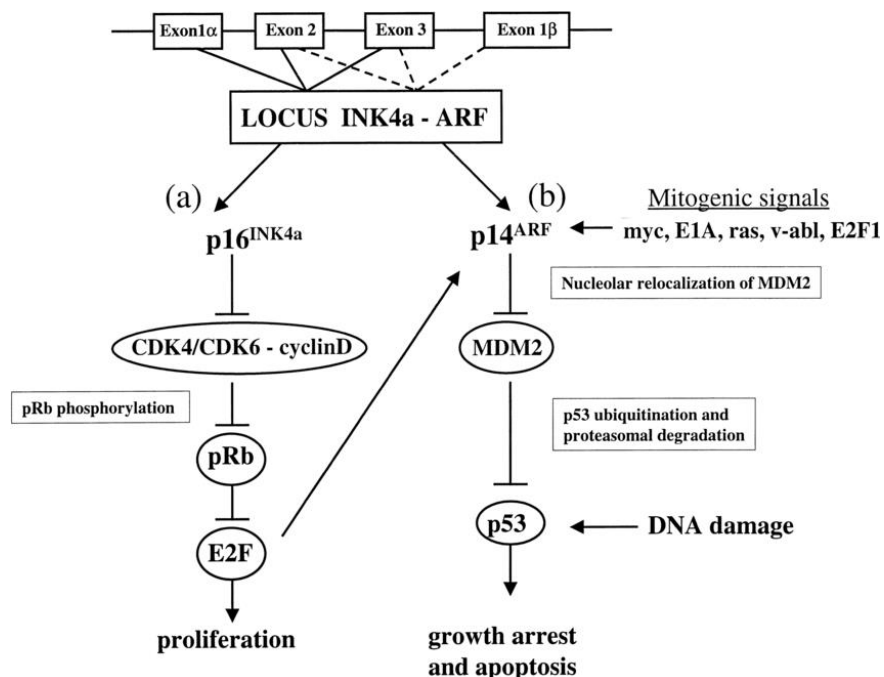
5.5.3. CDKN2A

Мащабни геномни анализи идентифицират, че тумор супресорният ген CDKN2A е втория най-често засегнат при плоскоклетъчните КГШ (222). CDKN2A (познат още като P16, INK4, p16INK4A и MTS1) се локализира на хромозома 9p21 и кодира CDK4/CDK6 киназни инхибитори, които ограничават клетките към прогресията посредством рестрикция в фаза G1 (Фигура 5.4.). Смята се, че засегнат CDKN2A участва в ранните етапи от развитието на плоскоклетъчен КГШ. Афектиран е до 80% от КГШ – често е делетиран, хиперметиран и по-рядко мутиран (252). Асоциира се с лоша преживяемост при пациенти с рекурентен или метастатичен КГШ. Повечето от мутациите в CDKN2A се откриват в екзон 2, като според авторите те често сами по себе си са недостатъчни да предизвикат туморогенеза. Например, CDKN2A мутации при доброкачествени епителни лезии имат нисък потенциал да ги трансформират в малигнени (449). Терапевтично таргетиране с цел инхибиране на пътищата и молекулите, които са били активирани вследствие от засягане на CDKN2A все още представлява предизвикателство (446).

Свърхекспресията на p16INK4a е изтъкнат сурогатен маркер за ЧПВ позитивност, изключително докладвана при ОППК (450). Мутации в CDKN2A рефлексират функцията на p16INK4a, като детекцията на експресията посредством имунохистохимия на p16INK4a е предложена като допълнителен маркер за вирусна онкогенна активност при плоскоклетъчни КГШ (451). В редица изследвания се докладва по-висока преживяемост и намален риск от смъртност с 40% до 80%, по-ниски шансове за локално възникване на повторен карцином (редуцирани до 60% - 70%) и по-добър отговор към химио- и лъчетерапия при ЧПВ-положителни пациенти с повишена експресия на p16INK4a в сравнение с ЧПВ-негативни пациенти, които са третирани със стандартна мултимодална терапия (452,453).

От друга страна до 90% от ЧПВ-негативните КГШ имат загуба на p16INK4a вследствие на CDKN2A мутации, промоторни хиперметиране или делеция на 9p21. Но неотдавнашното проучване установи, че CDKN2A мутация води до свърхекспресията на p16INK4a и при HPV-отрицателен КГШ. Следователно, свърхекспресията на p16INK4a е свързана с мутация в CDKN2A в част от случаите (446,451,454), като по този начин оценката на p16INK4a като биомаркер за наличие на HPV инфекция не е надеждна.

Клиничната тежест на редица потенциални механизми включващи CDKN2A инактивиране при ПМКЛ не е напълно изучено. В предходни проучвания на екипа от ЦММ и Клиника по УНГ Болести, МУ-София, се изследва мутационния статус на TP53 и CDKN2A гените в по-голяма кохорта от набрани ПМКЛ пациенти (n=108), като при 16 пациента (14.2%) се наблюдаваха генетични аберации в CDKN2A гена (252). В настоящата разработка резултатите които се получиха подкрепят публикуваните до сега процентни данни с 15.8%, въпреки че е изследвана по-малка група от 57 пациента. В подкрепа на предходните данни, мутации в CDKN2A са значимо свързани с висока p16INK4a експресия и при ЧПВ-негативни ПМКЛ (455) като се описват като предиктор за добър отговор към имунотерапия (456). Установи се, че най-засегнатия CDKN2A екзон е 2, повлияващ експресията и на двете p16 и p14/ARF молекули, които имат критична роля при прогресията на клетъчния цикъл.



Фигура 5.4. Схематично представяне на локуса INK4a-ARF и взаимодействието между p16 INK4a и p14 ARF белтъците и регулацията на клетъчния цикъл: (a) p16 INK4a /CDK4/pRb пътя: Циклин-звисимата киназа 4 (CDK4) негативно регулира активността на белтъка ретинобластома (pRb) посредством фосфорилиране. p16 INK4a инхибира свързването на CDK4 към циклин D, което води до предпазване от инактивиране на pRb. Хипофосфорилираният pRb потиска E2F- зависимите гени, блокира G1/S фазата. Свободен E2Fактивира много гени, участващи в митозата и p14 ARF . (b) p14 ARF /p53 сигнален път: p53 е целева молекула на MDM2 за убиквитирилиране и деградация. В отговор на онкогенни сигнали, p14 ARF индуцира MDM2 ядрената релокализация, което води до несъществуване на MDM2– p53 взаимодействието и като резултат се стабилизира p53 (457).

5.5.4. PI3CA

Анализ на WES данни при КГШ демонстрират, че PI3K сигналният път е един от най-засегнатите онкогенни пътища при КГШ и мутации в PI3CA гена възникват при между 8% и 13% от плоскоклетъчните карциномите на глава и шия (458). Lui et al.,

установява че 100% (10/10 случая) носят мутации в PI3K при напреднал карцином (стадий IV) (458). Мутации в PIK3CA гена водят до туморна агресивност и имат роля на таргетни молекули. Голямо разнообразие от инхибитори на PI3K сигналния път са разработени. Един от най-съвременните и обещаващите клинично тествани PI3K инхибитори е алпелисиб (Alpelisib). Одобрен е от FDA за пациенти при напреднал или метастатичен карцином на гърдата с мутантен PIK3CA (459). Най-високата честота на PIK3CA мутации при КГШ се локализира в екзон 9, следвани от екзон 20 (460). Ларингеалният карцином демонстрира преобладаване на мутации в PI3K сигналния път в сравнение с други локации на главата и шията (458). Екзон 9 на PIK3CA кодира хеликазния домейн, докато екзон 20 кодира киназния домейн на p110 α субединицата. Мутации в кодони 542 или 545 могат да доведат до намаляване на инхибиторния ефект на p85 на p110 α водещо до повишаване на PI3K активността и включване на последващите сигнални елементи в клетъчния път, включително и АКТ (461). Мутирал PIK3CA беше открит при 14% от случаите с три „хот спот“ мутации в екзон 9 (p.Glu542Lys, p.Glu545Gln и p.Glu545Lys) и още два патогени варианта в екзон 20, като един от тях е непубликуван frameshift p.Pro1011fsTer16. Плоскоклетъчни линии от КГШ, съдържащи хот спот мутация H1047R показват повишена чувствителност към инхибиране на PI3K посредством инхибиране с mTOR/PI3K инхибитор BEZ-235 в сравнение с КГШ клетъчна линия с див тип PIK3CA. В допълнение към изследването се установява, че се увеличава значително чувствителността към химиотерапия от комбинацията на BEZ-235 и цетуксимаб, спрямо прилагането на цетуксимаб самостоятелно (462), но все още прилагането на такъв вид терапия е предизвикателство (458). От друга страна е установено че при модели, които носят активиращите мутации E545K и H1047R и имат засегнат MET ген се свързват с резистентност към MET инхибитори, като тя може да бъде преодоляна, като се насочи таргетна терапията към PIK3CA (463).

Източната Кооперативна Онкологична Група (Eastern Cooperative Oncology Group; ECOG) докладва, че активирани PI3K/Akt и RAS/MAPK/ERK пътища се свързват с резистентност към цетуксимаб-съдържаща химио-и радиотерапия при оперативни КГШ стадий III/IV (464). Предклинични проучвания предполагат, че PIK3CA и RAS мутациите могат да предизвикат вътрешна резистентност към цетуксимаб, което може да се предотврати комбинацията между цетуксимаб и PI3K и mTOR инхибитори при КГШ (465).

5.5.5. FBXW7

Петият най-често мутирал ген е FBXW7, който е тумор супресорен ген, кодиращ убиквитин лигазен белтъчен комплекс F-box, открит засегнат при множествени тумори.

FBXW7 (F-box with 7 tandem WD40) е член от семейството F-box, с високо запазен F-box мотив около 40 аминокиселини. За първи път е идентифициран през 1973г. като Cdc4. При хората, генът е локализиран в хромозома 4q31q.3, като този регион е делетирал при 30% от раковите заболявания. Състои се от 4 нетранслиращи и 13 кодиращи екзона (466,467).

По-важното е, че FBXW7 е силно зависим от p53 тумор супресорен белтък, който повлиява прогресията на клетъчен цикъл, растеж и развитието на тумора чрез насочване на някои онкопротеини като Cyclin E, Notch, c-Jun, c-Myc, mammalian target

of rapamycin (mTOR), за убиквитин-медирана протеолиза. Редица изследвания показват, че инактивация или понижена регулация на FBXW7 може да доведе до дерегулиране на онкогени, които да доведат до туморогенеза и развитие на химиорезистентност (440,441).

Доказано е, че соматичните мутации в гена FBXW7 се проявяват заедно с други молекулни изменения при пациенти с напреднал рак (469). Мутации в FBXW7 са докладвани при 5% от КГШ (411). В нашето изследване, се идентифицираха 8.8% от пациентите, които са ЧПВ-негативни носят мутации в този ген. Известно е, че FBXW7 има критична роля като тумор супресорен ген по време на канцерогенезата, в резултат на което се блокира и последващата активация на NOTCH1 сигналния път (264).

5.5.6. RAS (KRAS, NRAS, HRAS)

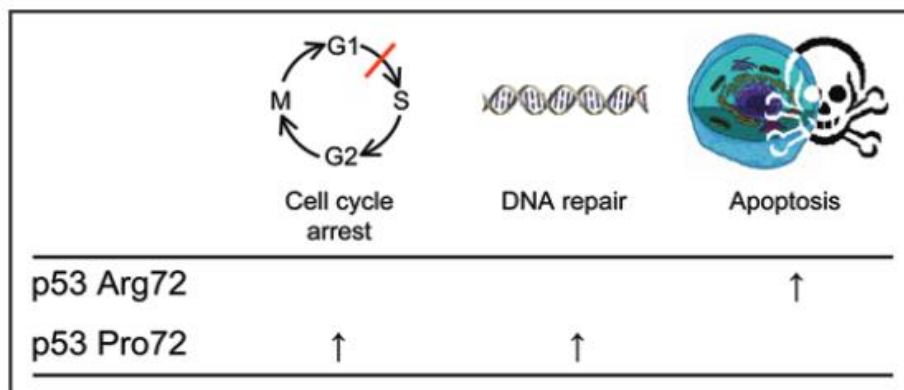
Мутации в гена KRAS при пациенти, диагностицирани с КГШ, се свързват с лоша преживяемост. Любопитен факт е, че KRAS мутациите демонстрират процентно вариране в различните популации. Докато в европейската популация KRAS мутации се откриват при около 5% от случаите на орален карцином, то в азиатската популация мутациите обхващат около 18% от пациентите с ОППК. По-високият процент на KRAS засягане се свързва значимо с употребата на бетелов орех и дъвченето на листата му, което е типично за Азиатските страни и е етиологичен фактор за развитие на злокачественост (470). Също така в литературата се наблюдава и различие в разпределението на RAS мутации при отделните локации на глава и шия. При ларингеални и орофарингеални карциноми KRAS мутации се откриват съответно при 11.5% и 3.3%. При назофарингеални тумори, NRAS мутации се докладват при 4%, докато HRAS са под 1%, а KRAS изключително рядко (471–474). Активиращи мутации в онкогенния HRAS ген може да имат функционална връзка с апоптотичните пътища, както е наблюдавано при колоректален карцином (410). При КГШ, HRAS мутации възникват при 5% от пробите, като се наблюдават и „хот спот“ мутации (G12, G13, Q61), които редуцират GTP-азната активност, водещи до поддържането на HRAS в активно състояние (410,411). Активиран HRAS също подпомага сигнализирането посредством MEK/ERK пътя, за който е известно че се припокрива с PI3K/Акт сигналния път, и може допълнително да допринася за PI3CA-инхибиторната резистентност посредством mTOR активиране (228). От RAS фамилията при КГШ, HRAS е по-често засегнат, което не подкрепя предходни публикувани данни за преобладаващо засегнат KRAS ген (475). В изследваната група се установиха две „хот спот“ HRAS мутации при трима пациента (p.Gly12Ser и p.Gly13Arg) и два патогенни варианта в KRAS (p.Val7Gly и p.Gly12Cys), които се отнасят към анти- EGFR терапия (476). Установен е също и един непубликуван до сега вариант в NRAS (p.Arg41Gly). За съжаление, не съществува успешна таргетна стратегия, която директно да се цели към RAS въпреки разработването на потенциални химиотерапевтици (477), макар че таргетирането на ключови сигнални пътища при RAS-мутирани ракови заболявания предлага обещаващ алтернативен терапевтичен подход (478).

Интригуващ факт е, че при четирима пациента не се откри нито един патогенен вариант. Съответните проби се отнасяха към субгрупите на глотис (A20) и супраглотис (B2, B10 и B14). В допълнение, 8 от 28 пациента с ларингеален карцином на глотиса, четири пациента със супраглотисен карцином и един пациент със субглотисен

карцином бяха с установени мутации само в TP53 гена. В предходни изследвания е публикувано, че CNVs (промяна в броя копия) често се наблюдават при карциноми на главата и шията (413,479) и големи епигенетични промени включващи метилационен дисбаланс, хистоновы модификации и променени нива на РНК експресия могат да играят ключова роля в развитието на плоскоклетъчен рак на ларинкса (480). Следствие на тези вече публикувани факти, може да се предположи, че са необходими по-обширни изследвания като цялостно екзомно изследване на SNV и CNVs, както и анализ на модификации на епигенетично ниво, с цел да се открият „драйвърни“ мутации или ключови промени в молекулните механизми при ларингеалните неоплазии.

В допълнение към патогените варианти, бяха идентифицирани няколко полиморфизма, предходно асоциирани с повишен риск, специфични туморни характеристики или отговор към химиотерапия.

Един от много добре изследваните полиморфизми в TP53 гена е rs1042522, кодиращ два алела Pro72 или Arg72. Arg72Pro е открит през 1986г. Чрез разлика в електрофоретичната мобилност на две версии на p53. От тогава този SNP е изследван и за риск от развитие на рак, хепатит С, шизофрения и др. Честотата на алела Pro72 варира от 70% при южноамериканци до 23% при западноевропейци. Pro72 е вероятно по-старият алел, но причината Arg72 да е по-чест при европейци не е изяснена. Градиентът от Европа към Африка според географската ширина предполага, че Pro72 е по-добър протектор от заболявания, причинени от прекомерно излагане на слънчева светлина (481). От функционална гледна точка се предполага, че алелът Pro72 може да бъде по-ефикасен в предизвикването на арест на клетъчния цикъл и ДНК поправка, докато алелът Arg72 е по-ефективен при индуцирането на апоптозен отговор (Фигура 5.5.) (482).

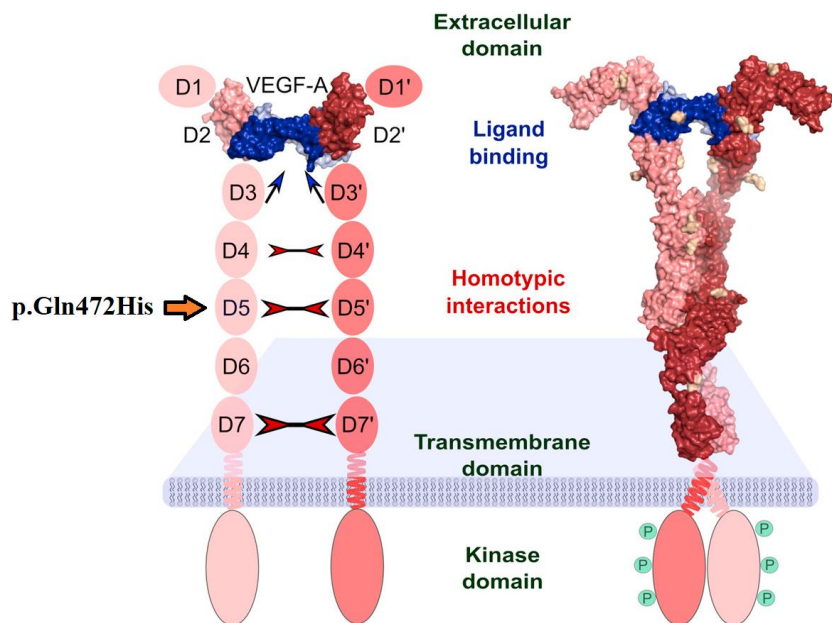


Фигура 5.5. Функционална разлика между Arg72 и Pro72 на p53 (481).

Публикувани данни свързват алела Pro72 с орален плоскоклетъчен карцином и езофагиален плоскоклетъчен карцином (483), но твърде малко се знае относно асоциацията с развитието на ПККЛ. Полиморфизмът p.Pro72Arg е асоцииран с развитието на рак и риск от токсичност в резултат от платина-базирана химиотерапия при пациенти с напреднал недребноклетъчен плоскоклетъчен карцином на белия дроб (НДПКБД), но не и с отговор към първа линия на платина базирана химиотерапия (249). Още повече, пациенти носещи хомозиготен Pro72 се свързват с напреднал

белодробен карцином и показват по-ниски нива на преживяемост в сравнение с хомозиготи по Arg72 или хетерозиготи (484). По-задълбочено допълнително изследване на rs1042522 при ПККЛ може да бъде полезно при избор на възможностите за лечение и предикцията на пациентите.

Другият неутрален полиморфизъм, rs1870377 (c.1416A>T; p.Gln472His) в гена KDR (също познат като VEGFR2) е предходно свързан с повишени нива на фосфорилиране на KDR, което води до повишени нива на ангиогенеза, туморна плътност и скъсено време на преживяемост, свободна от прогресия на заболяването, PFS, и по-малка обща преживяемост; OS) (485). Полиморфизмът rs1870377 е локализиран в екстраклетъчния, пети имуноглобулино-подобен домейн, който е от важно значение за свързването на VEGF към KDR (Фигура 5.6.) (486). Пациенти, носещи такъв вариант също са чувствителни към развитие на раково заболяване. Ефектът от засилената туморна ангиогенеза може да бъде по-силен по отношение на повишената плътност на микро-кръвоносните съдове и снабдяването с хранителни вещества в сравнение с подобрената достъпност към терапевтик (иматиниб) (487).



VEGF receptor dimerization and activation

Фигура 5.6. Активиране (димеризиране и фосфорилиране) на VEGFR рецептор след свързването на лиганда VEGF-A (488).

Полиморфизмът rs3822214 (c.1621A>C; p.Met541Leu) в екзон 10 на гена KIT е свързан с бърза прогресия, лоша прогноза, агресивни метастази и резистентност към иматиниб при ракови заболявания (489). При изследване на 3 T3 L541 клетъчна линия, KIT^{L541} белтъкът проявява спонтанно фосфорилиране в сравнение с див тип KIT и също така този вариант се среща по-често при пациенти, които са диагностицирани с положителни метастази при ГИСТ (490), при което пациенти носещи този вариант се свързват с по-висок риск от метастаза или повторно възникване на раково заболяване. p.Met541Leu се наблюдава при 9 (16%) от изследваните 57 ПККЛ пациенти, като 6 от тях бяха докладвани с положителен нодален статус по време на хирургическата интервенция.

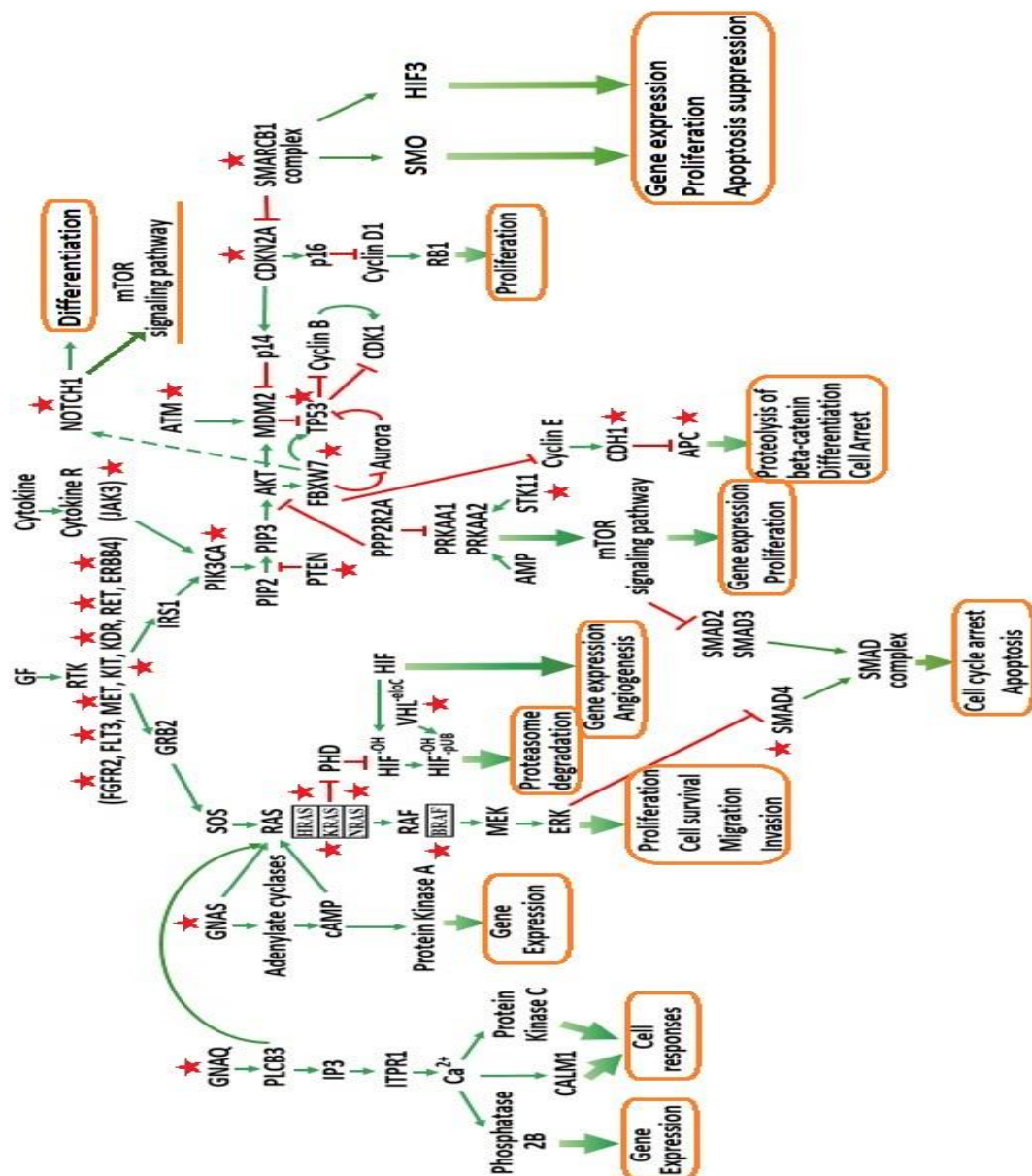
Въпреки, че тези три варианта не са патогенни, тяхната асоциация със специфични туморни характеристики може да бъде обещаваща за използването им като

биомаркери за предикция и прогноза. За да се оцени относителния риск, свързан с тях, са необходими изследвания включващи по-големи кохорти.

Настоящото изследване има и своите ограничения. Едно от тях е сравнително малкият брой пациенти, които са анализирани, и в резултат на това по-малките субгрупи, което не позволява да се направи прецизно заключение за точната разлика в мутационния обхват между супраглотис, глотис и субглотис. В допълнение, броят на включените гени, е също ограничен до 48, селектирани на базата на досегашното познание за най-силно засегнатите раково свързани пътища. Това затруднява възможността за откриване на нови, специфични промени за рак на ларинкса. Независимо от това, предходни изследвания установяват че дори таргетните NGS панели могат да бъдат успешно включени в клиничната практика за пациенти с КГШ, улеснявайки възможността пациентите да се включат към таргетна терапия и участието им в подходящи клинични изпитвания (413).

Необходимо е цялостно проучване на всички промени на геномно, транскриптомно и епигеномно ниво, както и анализ на нкРНКи, за да се получи пълната картина и да се получат по-задълбочени познания за молекулните механизми на ларингеалната карциногенеза.

В заключение, това изследване отразява детайлен анализ на соматичните мутации посредством таргетно NGS секвениране при 57 пациента с напреднал ЧПВ-негативен ларингеален карцином в българската популация. Патогени варианти са открити при 27 раково-свързани гени, като най-често засегнатите от тях са TP53, MET, CDKN2A, PIK3CA и FBXW7. Предполага се, че в сравнение с други локации на главата и шията, мутации в NOTCH1 гена по-рядко възникват при ПККЛ пациенти, както и дефектни TP53, MET и FBXW7 гени са по-често срещани при ПККЛ. Още повече, трите основни ларингеални локации: супраглотис, глотис и субглотис показват малко по-различен мутационен профил един от друг. Може да се формулира хипотеза, че ПККЛ мутационният профил и характеристиките може да се различават от останалите КГШ. Получените резултати обогатяват ПККЛ мутационния спектър с 13 нови, непубликувани варианта с патогенна предикция. Нещо повече, открити са мутации, с потенциал за въвеждането им в клиничната практика с цел селекция на таргетна терапия в бъдещето. Високо рискови TP53 мутации самостоятелно или в комбинация с мутации в RAS гена се свързват с намалена чувствителност към цисплатина базирана терапия и лоша преживяемост. „Драйвърната“ мутация в MET гена p.Thr1010Ile и фамилно свързаният p.Asn375Ser патогенен вариант водят до активирането на MET сигналния път и могат да бъдат определени като потенциални биомаркери за иновативна таргетна терапия при ПККЛ. Разработването и въвеждането на NGS таргетно секвениране в рутинната практика при ларингеалния скрининг би подобрило възможностите за установяване на нови терапевтични подходи при напреднал ЧПВ-негативен ларингеален карцином.



Фигура 5.7. Схематично представяне на най-засегнатите пътища в изследваната извадка от 57 ЧПВ-негативни ПККЛІ пациента, в зависимост от получените NGS резултати.

5.6. Обсъждане на резултатите от анализ на връзката между нивата на експресия на нкРНКи и наличието на мутации в гена TP53

Предходни изследвания показват близката връзка между p53 и miRNAs (491). p53 индуцира транскрипционната експресия на редица miRNAs и повлиява зреенето на специфични miRNAs, като се допринася за тумор супресорната функция на p53. Мутации в TP53 гена се свързват с понижена експресия на някои miRNAs, като miR-16, miR-143 и miR-145 (492), miR-223, miR-130b (493), miR-27a (494), let-7i (495) и miR-205 (496), и повишение на miR-128-2 (497), miR-155 (498). Друг клас от miRNAs индиректно са засегнати от p53 сигналния път посредством регулирането на гени свързани в p53 сигнализирането. Например, miR-21 антагонизира p53 пътя при рак на гърдата посредством инхибирането експресията на гените регулирани от p53. Онко-

миРНКите miR-221/222 задействат пролиферацията при рак на гърдата чрез потискането на p53, който е модулатор на апоптозата (499).

miR-145 е важен регулатор на ЧПВ цикъла и повишена му експресия е свързана с ЧПВ-положителни клетки, докато понижените нива на miR-145 се свързват с ЧПВ-негативни клетки (500). Понижената експресия на miR-145 е публикувана при редица ракови заболявания включващи рак на простатата, гърдата, главата и шията, стомаха и колоректален карцином (501–505). В светлината на епигенетичната регулация няколко доклада дискутират асоциацията между miRNAs експресията и TP53 мутационния статус при раковите заболявания (506,507). Механизма, свързан с miR-145 понижената регулация не е напълно изяснен. Изказана е хипотезата, че miR-145 се потиска посредством ДНК хиперметиране и се асоциира с мутации в p53 при агресивен рак на простатата и клетъчни култури (508). При рак на ларинкса експресията на miR-145 е показана като понижена в комбинация с miR-125b (112). В друго изследване понижената експресия на miR-145 при ПККЛ е потвърдена, заедно със свръхекспресията на SOX2, който е валидиран таргет на miR-145, като тази регулация може да бъде ключова стъпка при ларингеалната ПКК патогенеза (509). В допълнение miR-145-5p е способен да инхибира клетъчната пролиферация и метастазирането при ПККЛ клетъчна линия Tu-177 и понижената регулация на miR-145-5p води до лоша прогноза при ПККЛ (510). В същото изследване на Ding Y et al. (2017), за свръхекспресията на hsa-miR-145-5p при Tu-177 клетъчния модел са анализирани диференцирано експресирани гени, от които 164 са с повишена експресия и 221 са с понижена експресия. Докато свръхекспресираниите таргетни гени са първично свързани с функцията на имунитета и понижената експресия на таргетните гени са значително свързани с p53 сигналния път (510).

Получените данни са в съответствие с предходни резултати, като се показва, че понижената експресия на miR-145-5p е значимо по-ниска при ЧПВ-негативен ПККЛ и още повече, че пациенти с положителен TP53 мутационен статус показват значимо по-ниска експресия на miR-145-5p. В допълнение, се установи значима асоциация между miR-145-5p експресията и T стадия, както и към тежко тютюнопушене. Получените резултати водят до хипотезата, че мутации в гена TP53 са следствие най-вече на тютюнопушенето, който е основен рисков фактор (511), и са силно свързани с понижената експресия на miR-145-5p, което предполага че miR-145-5p е потенциален маркер за туморна агресивност при ЧПВ-негативен ПККЛ карцином.

miR-145 е директен таргет на p53 и p53 се свързва към p53 отговорния елемент (Responsive Element, RE) при промотора на miR-145 и индуцира експресията на miR-145. Според литературата, p53 използва miR-145 като понижава регулацията на c-MYC и други регулатори на клетъчния цикъл (CDK4 и CKD6) (492). Още повече, ДНК мутации в p53 гена, като R175H и R273H често се наблюдават при туморите, което може да доведе до понижаване на процесирването на pri-miRNAs от Drosha и съответно на понижени нива pri-miRNAs и зрели miRNAs в клетките, включително и miR-145 (491). Експресията на miRNAs беше предходно асоциирана с TP53 статус и понижено преживяване след хирургическа намеса при плоскоклетъчен КГШ (512). Резултатите от текущото изследване подкрепят предходни данни и добавят оценяването ролята на p53 при ларингеален карцином.

Следващата микроРНК, която показва положителна асоциация с наличието на TP53 мутации е miR-155-5p също е изследвана предходно при ПККЛ и клетъчни Нер-2

злокачествени ларингеални клетъчни култури. В допълнение, повишената експресия на miR-155 е свързана с инвазия, клетъчен растеж и миграция посредством SOCS1 (suppressor of cytokine signalling 1) и STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) (122). В скорошно изследване, включващо голям брой ПККЛ пациенти (n=280) публикуват, че повишената miR-155 експресия е значимо асоциирана с туморния размер, диференциация статус, лимфните метастази и клиничния стадий (354). В притивовес на тези открития, нашите данни не показват значима асоциация с туморните стадии и възловата лимфна метастаза. Наблюдава се понижена експресия на miR-155-5p при ЧПВ-позитивни SiHa и HeLa клетъчни линии, докато при ЧПВ-негативни клетъчни линии е установена свръхекспресия на същата миРНК (513) и се предполага, че miR-155 е специфична при ЧПВ-негативните тумори (514). Във включената ЧПВ-негативна извадка се показва значимо по-висока експресия на miR-155-5p, което подкрепя предходните изследвания. Също така в изследването на Chernyy et al. (2018) се публикуват повишени нива на miR-155 и miR-222 които са статистически значимо асоциирани с лимфни метастази при тройно негативен рак на гърдата, като и двете миРНК са предложени като потенциални молекулни биомаркери с прогностична стойност за наличие на лимфни метастази (515), а miR-155 е свързана с ЕТМ трансформация при рак на гърдата и белодробен аденокарцином (513,514). Nielsen et al. (2013) показва че при рак на гърдата miR-155 е силно експресирана при мезенхимни клетъчни линии, в сравнение с епителни клетъчни линии, което предполага действието на miR-155 при процесите на ЕТМ (498). Следствие на описаните резултати се предполага, че miR-155-5p може би има по-голяма роля при аденокарциномите и мезенхимни типове рак отколкото епителни карциноми, и неговата роля е необходимо да бъде по-детайлно изследвана при епително клетъчни карциноми, особено при ларингеален плоскоклетъчен карцином. Roosbroeck et al. (2017) предполага за пръв път че TP53 и miR-155 са свързани посредством пътя на обратната връзка (516), която участва в резистентност към мултимодална химиотерапия при рак на белия дроб (517) и левкемия (518) и TP53 положителен статус при комбинация с повишени нива на miR-155 са свързани с по-къса цялостна преживяемост при белодробен аденокарцином (516). Мезенхимна клетъчна линия от рак на гърдата BT-549, носеща p.Arg249Ser в гена TP53, води до по-високи нива на miR-155, като след нокдаун на мутантния p53, нивата на miR-155 е значително понижен. Тези резултати потвърждават активирането на miR-155 следствие на мутантен p53 (498). Същите автори предлагат, че мутантен p53 взаимодейства и инхибира действието на p63, който промотира генната експресия на miR-155 (498), докато в изследването Wang et al. (2018), се показва че p53 свързва директно miR-155 промоторния регион и при високи глюкозни нива се подкрепя неговата синтеза (519), но недостатъчно се знае за наблюдаваното взаимодействие между miR-155 и мутантен p53. Резултатите, които се получиха в настоящото изследване показват, че ПККЛ пациентите носещи TP53 мутантен ген имат по-високи нива на експресия на miR-155-5p, в сравнение с тези пациенти без наличие на патогенни мутации в същия ген. ROC анализ допринася за това че miR-145-5p и miR-155-5p както самостоятелно, така и в комбинация могат да разграничат ПККЛ пациенти с TP53 мутации от тези без мутации в този ген. Но най-добър резултат показва miR-145-5p самостоятелно, с най-висок процент на чувствителност (100%) и специфичност (83.9%), което поставя под въпрос потенциалната сила на този маркер при скрининга на ЧПВ-негативен рак на ларинкса.

Резултатите от дисертацията допринасят за познанието за ларингеалната канцерогенеза посредством изследването на асоциацията между TP53 мутации и miR-145 понижена експресия. В заключение се предполага, че miR-145-5p има роля в ларингеалната канцерогенеза като част от променената p53 регулация и може да служи като допълнителен маркер за HPV-негативни напреднали ПМКЛ тумори, като неговата намалена експресия може да е следствие от аномалния p53 белтък следствие на злоупотребата с тютюнопушене. Също така получените резултати показват че miR-155-5p изглежда, че се свързва с TP53 мутационния статус, но резултатите не са напълно подкрепящи предходни изследвания. Предполага се, че miR-155 е регулаторна молекула, която взема участие в клетъчните пътища включени при адено- и мезенхимна канцерогенеза и е необходимо по-детайлно изследвана на ролята ѝ при ПМКЛ.

6. ИЗВОДИ:

- ♣ Резултатите от корелационните анализи на експресията на miR-21-5p, miR-31-3p, miR-145-5p, miR-222-3p, miR-424-5p и lncRNA HOTAIR и кликопатологичните характеристики показват потенциалната им роля в ларингеалната канцерогенеза и възможността им за въвеждане като биомаркери в скрининга и прогнозата при пациенти с рак на ларинкса.
- ♣ Установена е значимо повишена експресия на miR-31-3p и miR-196a-5p, както в туморна ларингеална тъкан, така и в плазма от пациенти, диагностицирани с ПККЛ, което предполага тяхното влияние в ларингеалната туморогенеза. Комбинацията от двата циркулиращи биомаркера показва най-висока чувствителност и специфичност за детекция на напреднал ПККЛ.
- ♣ Анализът на соматичния спектър от мутации при напреднал ЧПВ-негативен ПККЛ показва патогенни варианти при 27 ракови-свързани гени, като най-често засегнатите от тях са TP53, MET, CDKN2A, PIK3CA и FBXW7.
- ♣ Трите основни ларингеални локации: супраглотис, глотис и субглотис демонстрират различия в мутационния си профил.
- ♣ Въвеждането на NGS таргетно секвениране в рутинната практика при ларингеалния скрининг би подобрило възможностите за установяване на драйвърните мутации и избор на нови терапевтични подходи при напреднал ЧПВ-негативен ларингеален карцином.

7. ПРИНОСИ:

- ♣ За първи път се открива статистически значима асоциация на нивата на експресия на miR-21-5p, miR-222-3p и lncRNA HOTAIR с фамилна история на ПККЛ;
- ♣ Наблюдава се градация в експресионните нива на miR-424-5p според туморната локация от супраглотис към субглотис;
- ♣ За пръв път се установява положителна корелация между нивата на експресия на lncRNA MALAT1 и HIF3a;
- ♣ Открити са с 13 нови, непубликувани варианта с патогенна предикция в гените CDH1, ERBB4, FBXW7, FLT3, GNAQ, KDR, NRAS, PIK3CA, SMARCB1 и TP53, с което се обогатяват базите данни за мутационния спектър при ПККЛ;
- ♣ Установят се разлики в мутационния спектър при трите основни ларингеални локации: супраглотис, глотис и субглотис;
- ♣ За първи път в България е извършено новогенерационно секвениране на панел от 48 тумор-асоциирани гени при напреднал карцином на ларинкса.

8. ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ И ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

8.1. Публикации

- ◆ **Silva Garo Kyurkchian**, Todor Miroslavov Popov, Gergana Stancheva, Julian Rangachev, Vanyo Ivanov Mitev, Diana Petrova Popova, Radka Petrova Kaneva. Novel insights into LSCC from association study of aberrantly expressed miRNAs, lncRNAs and clinical features in Bulgarian patients. *JBUON*, 2020: Volume 71, Issue1, IF=1.379 (2018-9), SJR: 0.381;
- ◆ **Kyurkchian SG**, Popov TM, Mitev VI, Kaneva RP. The role of miRNAs and lncRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. *Folia Med (Plovdiv)* 2020;62(2):244-52. SJR:0.311;
- ◆ Todor M. Popov, Gergana S. Stancheva, **Silva G. Giragosyan**, Orlin V. Stoyanov, Sylvia E. Valcheva, Emil I. Tsenev, Radka P. Kaneva, Diana P. Popova. Correlations between PKM2, HIF 1 α , c Myc and p53 mRNA Expression Levels in Laryngeal Carcinoma, *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, Volume 71, Issue No5, 2018, p685-693 IF=0.270 (2017), SJR:0.21;
- ◆ Popov T, **Giragosyan S**, Petkova V, Marinov Tz, Belitova M, Rangachev J, Kaneva R, Mitev V. Regulatory role of microRNAs in tumor angiogenesis. *Journal Acta Medica Bulgarica*, Issue 1, 2020, SJR:0.19;
- ◆ **Силва Гирагосян**, Иван Попов, Гергана Станчева, Ваньо Митев, Радка Кънева. Малките рибонуклеинови киселини като потенциални биомаркери при ларингеален карцином. *Български Медицински Журнал*, 11, 2017, №1, 11-19 2017, Vol11, p: 11-19;
- ◆ **Силва Гирагосян**, Гергана Станчева, Тодор Попов, Юлиан Рангачев, Димитър Конов, Спиридон Тодоров, Ваньо Митев, Радка Кънева. Експресионен анализ на хипокси-индуцираната miR-21-3p при ларингеален карцином. *Сборник Наука и Младост* 2016, p: 43-48;
- ◆ **Силва Гирагосян**, Иван Попов, Гергана Станчева, Радка Кънева, Ваньо Митев. Етиопатогенеза и молекулярна генетика на ларингеален карцином. *Studia Oncologica*, 2015, год V, брой 2, p:42-64.

8.2. Участия в научни прояви:

- ♣ Veronika Yordanova Petkova, **Silva Garo Giragosyan**, Todor Miroslavov Popov, Julian Rangachev, Vanyo Ivanov Mitev, Diana Petrova Popova, Radka Petrova Kaneva. MicroRNA proangiogenic signature of advanced laryngeal carcinoma after global microarray profiling. 4th EACR Conference. Cancer Genomics, 23-26 June 2019, Cambridge, UK (poster presentation);
- ♣ **S Giragosyan**, V Petkova, T Popov, V Mitev, R Kaneva. miR-145-5p, miR-196a-5p, miR-222-3p and lncRNA MALAT1 as non-invasive markers in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. EACR25, 30 June-03 July, Amsterdam, Netherlands, 2018 (poster presentation);
- ♣ **Silva Giragosyan**, Todor Popov, Veronika Petkova, Gergana Stancheva, Darina Kachakova, Kalina Mihova, Julian Rangachev, Vanyo Mitev, Diana Popova, Radka Kaneva. Pathogenic alterations in advanced HPV-negative cell squamous laryngeal carcinoma revealed by Next Generation Sequencing. ESHG 2018, Milan, Italy, 16-19 June, 2018 (poster presentation);
- ♣ **S. Giragosyan**, T. Popov, V. Petkova, G. Stancheva, D. Kachakova, K. Mihova, J. Rangachev, V. Mitev, D. Popova, R. Kaneva. Somatic mutation status in advanced laryngeal squamous cell carcinoma revealed by Next Generation Sequencing, ICGEB Workshop on diagnostics 2018, Macedonian Academy of Sciences and Art, Skopje, FYR Macedonia 22-24 March, 2018 (poster presentation);
- ♣ **Giragosyan S**, Stancheva G, Popov T., Mitev V, Kaneva R. miR-221-3p and miR-424-5p may act as non-invasive biomarkers in detection of patients with laryngeal squamous cell carcinoma. XV International Medical Scientific Conference, 9-14 October, 2017, Pleven, Bulgaria (poster presentation);
- ♣ **Silva Giragosyan**, Gergana Stancheva, Todor Popov, Vanyo Mitev, Radka Kaneva. miR-31-3p and miR-31-5p are overexpressed in laryngeal cancer and show correlation with genetic factors of angiogenesis. 3rd International Cancer Symposium of the Cancer Research Center of Lyon. 25-27 September 2017, Lyon, France (poster presentation);
- ♣ **Giragosyan S**, Popov T, Petkova V, Stancheva G, Kachakova D, Mihova K, Mitev V, Popova D, Kaneva R. Genetic profiling of advanced laryngeal carcinoma by new generation sequencing. 12th BALKAN CONGRESS OF HUMAN GENETIC; Plovdiv, Bulgaria, 8-10 September, 2017 (oral presentation);
- ♣ **S. Giragosyan**, G. Stancheva, T. Popov, D. Konov, J. Rangachev, V. Mitev, R. Kaneva. Involvement of miR-424-5p and miR-221-3p in tumour metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. ESHG2017, Copenhagen, Denmark, 27-30 May, 2017 (poster presentation);
- ♣ **S. Giragosyan**. The role of hypoxic induced miRNAs as expression markers in LSCC. Symposium "Application of New Technologies in Genetic and Genomic Diagnostics" (Symposiums Acad. Chudomir Nachev, 2016) (oral presentation);
- ♣ **S. Giragosyan**, G. Stancheva, T. Popov, D. Konov, J. Rangachev, O. Stoyanov, V. Mitev, S. Todorov, R. Kaneva. Expression of hypoxia related miRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. EACR24, Amsterdam, Netherlands, 9-12 July 2016 (poster presentation);

- ♣ **S Giragosyan**, G Stancheva, T Popov, D Konov, J Rangachev, S Todorov, V Mitev, R Kaneva. Study of the oncogenic potential of hypoxic-induced miR-21-3p in laryngeal cancer. Science and Youth 2016, Medical University-Plovdiv, Bulgaria 12-14 May, 2016 (oral presentation).

8.3. Участие в проекти:

- ♣ Млад Изследовател‘ 2017
Медицински Университет - София
Проект с № 8553/12.12.2016, Договор с № Д-137/2017
„Изследване ролята на хипоксични микро РНКи при карцином на ларинкса“
(Водещ изследовател)
- ♣ Млад Изследовател‘ 2016
Медицински Университет – София
Проект с № 552/21.01.2016, Договор с № 12-D
“Експресионен анализ на разширен панел от хипоксични микроРНКи в тъканни и плазмени проби от пациенти с ларингеален карцином“ (Водещ изследовател)
- ♣ Млад изследовател‘2015
Медицински Университет – София
Проект с № 312/15.01.2015, договор с № 15-D
“Експресионен анализ на микро РНКи като молекулни биомаркери за ранното диагностициране и прогноза при рак на ларинкса“ (Водещ изследовател)
- ♣ ГРАНТ‘ 2016
Медицински Университет – София
Проект с № 550/21.01.2016, договор с № 30
„Генетично профилиране на ларингеален карцином чрез секвениране от ново поколение“ (Участник)

9. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Mendelsohn MS, McConnel FM. Function in the pharyngoesophageal segment. *The Laryngoscope*. 1987 Apr;97(4):483–9.
2. Saran M, Georgakopoulos B, Bordoni B. Anatomy, Head and Neck, Larynx Vocal Cords. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cited 2020 Mar 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535342/>
3. L B, JW E, P R, D S. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours [Internet]. [cited 2020 Mar 5]. Available from: <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Pathology-And-Genetics-Of-Head-And-Neck-Tumours-2005>
4. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2008 Apr;83(4):489–501.
5. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005 Feb;55(1):10–30.
6. Mäkitie AA, Monni O. Molecular profiling of laryngeal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009 Sep;9(9):1251–60.
7. Marur S, D’Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*. 2010 Aug;11(8):781–9.
8. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jan;11(1):9–22.
9. McCarthy CE, Field JK, Rajlawat BP, Field AE, Marcus MW. Trends and regional variation in the incidence of head and neck cancers in England: 2002 to 2011. *Int J Oncol*. 2015 Jul;47(1):204–10.
10. Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Muñoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol*. 2000 Jan;36(1):106–15.
11. Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, Higgins KA, Saba NF. An update on larynx cancer. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jan 23];67(1):31–50. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21386>
12. Gourin CG, Conger BT, Sheils WC, Bilodeau PA, Coleman TA, Porubsky ES. The effect of treatment on survival in patients with advanced laryngeal carcinoma. *The Laryngoscope*. 2009 Jul;119(7):1312–7.
13. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016 Feb;66(1):7–30.
14. Kjaerheim K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancers: a prospective study of 10,900 Norwegian men. *Cancer Causes Control CCC*. 1998 Jan;9(1):99–108.
15. Sapkota A, Gajalakshmi V, Jetly DH, Roychowdhury S, Dikshit RP, Brennan P, et al. Smokeless tobacco and increased risk of hypopharyngeal and laryngeal cancers: a multicentric case-control study from India. *Int J Cancer*. 2007 Oct 15;121(8):1793–8.
16. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2004;83:1–1438.
17. Kenfield SA, Stampfer MJ, Rosner BA, Colditz GA. Smoking and smoking cessation in relation to mortality in women. *JAMA*. 2008 May 7;299(17):2037–47.
18. Bosetti C, Gallus S, Franceschi S, Levi F, Bertuzzi M, Negri E, et al. Cancer of the larynx in non-smoking alcohol drinkers and in non-drinking tobacco smokers. *Br J Cancer*. 2002 Aug 27;87(5):516–8.
19. Bosetti C, Gallus S, Peto R, Negri E, Talamini R, Tavani A, et al. Tobacco smoking, smoking cessation, and cumulative risk of upper aerodigestive tract cancers. *Am J Epidemiol*. 2008 Feb 15;167(4):468–73.

20. P B, B L. World Cancer Report 2008 [Internet]. [cited 2020 Mar 5]. Available from: <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2008>
21. Spence T, Bruce J, Yip KW, Liu F-F. HPV Associated Head and Neck Cancer. *Cancers* [Internet]. 2016 Aug 5 [cited 2020 Mar 5];8(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4999784/>
22. Chen W-C, Chuang H-C, Lin Y-T, Huang C-C, Chien C-Y. Clinical impact of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: a retrospective study. *PeerJ*. 2017;5:e3395.
23. Onerci Celebi O, Sener E, Hosal S, Cengiz M, Gullu I, Guler Tezel G. Human papillomavirus infection in patients with laryngeal carcinoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2018 Oct 20 [cited 2020 Mar 5];18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6195980/>
24. Wittekindt C, Wuerdemann N, Gattenlöhner S, Brobeil A, Wierzbicka M, Wagner S, et al. The role of high-risk human papillomavirus infections in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. 2017 Nov;274(11):3837–42.
25. Li X, Gao L, Li H, Gao J, Yang Y, Zhou F, et al. Human papillomavirus infection and laryngeal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*. 2013 Feb 1;207(3):479–88.
26. Gallo O, Bianchi S, Giannini A, Boccuzzi S, Calzolari A, Fini-Storchi O. Lack of detection of human papillomavirus (HPV) in transformed laryngeal keratoses by in situ hybridization (ISH) technique. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1994 Mar;114(2):213–7.
27. Lie ES, Karlsen F, Holm R. Presence of human papillomavirus in squamous cell laryngeal carcinomas. A study of thirty-nine cases using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1996 Nov;116(6):900–5.
28. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer*. 1997 Feb 1;79(3):595–604.
29. Muscat JE, Wynder EL. Tobacco, alcohol, asbestos, and occupational risk factors for laryngeal cancer. *Cancer*. 1992 May 1;69(9):2244–51.
30. Siemiatycki J, Richardson L, Straif K, Latreille B, Lakhani R, Campbell S, et al. Listing Occupational Carcinogens. *Environ Health Perspect*. 2004 Nov;112(15):1447–59.
31. Guha N, Boffetta P, Wünsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*. 2007 Nov 15;166(10):1159–73.
32. McLaughlin JK, Gridley G, Block G, Winn DM, Preston-Martin S, Schoenberg JB, et al. Dietary factors in oral and pharyngeal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1988 Oct 5;80(15):1237–43.
33. Uzcudun AE, Retolaza IR, Fernández PB, Sánchez Hernández JJ, Grande AG, García AG, et al. Nutrition and pharyngeal cancer: results from a case-control study in Spain. *Head Neck*. 2002 Sep;24(9):830–40.
34. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995 Feb;121(2):157–60.
35. Garavello W, Foschi R, Talamini R, Vecchia CL, Rossi M, Maso LD, et al. Family history and the risk of oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer*. 2008;122(8):1827–31.
36. Garavello W, Turati F, Bosetti C, Talamini R, Levi F, Lucenteforte E, et al. Family history of cancer and the risk of laryngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland. *Int J Cancer*. 2012 Feb 1;130(3):665–70.

37. Groome PA, O'Sullivan B, Irish JC, Rothwell DM, Math KS, Bissett RJ, et al. Glottic cancer in Ontario, Canada and the SEER areas of the United States. Do different management philosophies produce different outcome profiles? *J Clin Epidemiol*. 2001 Mar;54(3):301–15.
38. Shah JP, Karnell LH, Hoffman HT, Ariyan S, Brown GS, Fee WE, et al. Patterns of care for cancer of the larynx in the United States. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997 May;123(5):475–83.
39. Ow TJ, Pitts CE, Kabarriti R, Garg MK. Effective Biomarkers and Radiation Treatment in Head and Neck Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2015 Nov;139(11):1379–88.
40. Mendenhall WM, Werning JW, Hinerman RW, Amdur RJ, Villaret DB. Management of T1-T2 glottic carcinomas. *Cancer*. 2004 May 1;100(9):1786–92.
41. Chemotherapy for Laryngeal and Hypopharyngeal Cancers [Internet]. [cited 2020 Mar 5]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/laryngeal-and-hypopharyngeal-cancer/treating/chemotherapy.html>
42. Metastatic Cancer of the Throat [Internet]. txo. [cited 2020 Mar 5]. Available from: <https://www.texasoncology.com/types-of-cancer/head-and-neck-cancers/throat-cancer/treatment-of-metastatic-cancer-of-the-throat>
43. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet Lond Engl*. 2000 Mar 18;355(9208):949–55.
44. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, et al. Concurrent Chemotherapy and Radiotherapy for Organ Preservation in Advanced Laryngeal Cancer. *N Engl J Med*. 2003 Nov 27;349(22):2091–8.
45. Specenier P, Vermorken JB. Biologic therapy in head and neck cancer: a road with hurdles. *ISRN Oncol*. 2012;2012:163752.
46. Graham J, Muhsin M, Kirkpatrick P. Cetuximab. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(7):549–50.
47. Lesko LJ, Atkinson AJ. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:347–66.
48. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Kemeny NE, Jessup JM, et al. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Oct 16;88(20):1456–66.
49. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*. 2005 Nov;5(11):845–56.
50. Xi X, Li T, Huang Y, Sun J, Zhu Y, Yang Y, et al. RNA Biomarkers: Frontier of Precision Medicine for Cancer. *Non-Coding RNA*. 2017 Feb 20;3(1).
51. Hu B, Yang Y-CT, Huang Y, Zhu Y, Lu ZJ. POSTAR: a platform for exploring post-transcriptional regulation coordinated by RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*. 2017 04;45(D1):D104–14.
52. Russo J, Russo IH. Techniques and Methodological Approaches in Breast Cancer Research [Internet]. New York: Springer-Verlag; 2014 [cited 2020 Mar 5]. Available from: <https://www.springer.com/gp/book/9781493907175>
53. Finka A, Goloubinoff P. Proteomic data from human cell cultures refine mechanisms of chaperone-mediated protein homeostasis. *Cell Stress Chaperones*. 2013 Sep;18(5):591–605.
54. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jun;11(6):426–37.
55. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jan;1775(1):181–232.

56. Caby M-P, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*. 2005 Jul;17(7):879–87.
57. Hu L, Xu Z, Hu B, Lu ZJ. COME: a robust coding potential calculation tool for lncRNA identification and characterization based on multiple features. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 9;45(1):e2.
58. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 2012 Sep;489(7414):101–8.
59. Inamura K. Diagnostic and Therapeutic Potential of MicroRNAs in Lung Cancer. *Cancers*. 2017 May 9;9(5).
60. Renganathan A, Felley-Bosco E. Long Noncoding RNAs in Cancer and Therapeutic Potential. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1008:199–222.
61. Santosh B, Varshney A, Yadava PK. Non-coding RNAs: biological functions and applications. *Cell Biochem Funct*. 2015 Jan;33(1):14–22.
62. Akman HB, Bensan AEE. Noncoding RNAs and cancer. *Turk J Biol Year 2014 Vol 38 Issue 6* 817-828 [Internet]. 2014 [cited 2020 Mar 5]; Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TR2016025733>
63. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol*. 2014 Jul;51(4):759–74.
64. Horvitz HR, Sulston JE. Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1980 Oct;96(2):435–54.
65. Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell*. 1981 Apr;24(1):59–69.
66. Ambros V, Horvitz HR. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1984 Oct 26;226(4673):409–16.
67. Ambros V, Horvitz HR. The *lin-14* locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. *Genes Dev*. 1987 Jun;1(4):398–414.
68. Ferguson EL, Sternberg PW, Horvitz HR. A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1987 Mar 19;326(6110):259–67.
69. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843–54.
70. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):855–62.
71. Ozomaro U, Wahlestedt C, Nemeroff CB. Personalized medicine in psychiatry: problems and promises. *BMC Med*. 2013 May 16;11:132.
72. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901–6.
73. Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*. 2000 Apr;5(4):659–69.
74. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86–9.
75. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):862–4.
76. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):858–62.

77. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):853–8.
78. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:175–205.
79. Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002 Sep 2;21(17):4663–70.
80. Leuschner PJF, Ameres SL, Kueng S, Martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep*. 2006 Mar;7(3):314–20.
81. Iwasaki S, Kawamata T, Tomari Y. Drosophila argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell*. 2009 Apr 10;34(1):58–67.
82. Kang S-M, Choi J-W, Hong S-H, Lee H-J. Up-regulation of microRNA* strands by their target transcripts. *Int J Mol Sci*. 2013 Jun 26;14(7):13231–40.
83. Bolha L, Ravnik-Glavač M, Glavač D. Long Noncoding RNAs as Biomarkers in Cancer. *Dis Markers* [Internet]. 2017 [cited 2020 Mar 16];2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5467329/>
84. Pachnis V, Belayew A, Tilghman SM. Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Sep;81(17):5523–7.
85. Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature*. 1991 May 9;351(6322):153–5.
86. Barlow DP, Stöger R, Herrmann BG, Saito K, Schweifer N. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature*. 1991 Jan 3;349(6304):84–7.
87. Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol*. 1990 Jan;10(1):28–36.
88. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*. 1961 Apr 22;190:372–3.
89. Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler MC, Dandolo L, Arnaud D, Capra V, et al. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature*. 1991 May 23;351(6324):325–9.
90. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*. 1991 Jan 3;349(6304):38–44.
91. Gendrel A-V, Heard E. Noncoding RNAs and epigenetic mechanisms during X-chromosome inactivation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:561–80.
92. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*. 2010 Sep 24;39(6):925–38.
93. Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature*. 2011 Feb 10;470(7333):284–8.
94. Karreth FA, Tay Y, Perna D, Ala U, Tan SM, Rust AG, et al. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell*. 2011 Oct 14;147(2):382–95.
95. Hu W, Alvarez-Dominguez JR, Lodish HF. Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs. *EMBO Rep*. 2012 Nov 6;13(11):971–83.
96. Chen J, Shen Z, Deng H, Zhou W, Liao Q, Mu Y. Long non-coding RNA biomarker for human laryngeal squamous cell carcinoma prognosis. *Gene*. 2018 Sep 10;671:96–102.
97. Jia L-F, Wei S-B, Gan Y-H, Guo Y, Gong K, Mitchelson K, et al. Expression, regulation and roles of miR-26a and MEG3 in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2014 Nov 15;135(10):2282–93.

98. Fang Z, Wu L, Wang L, Yang Y, Meng Y, Yang H. Increased expression of the long non-coding RNA UCA1 in tongue squamous cell carcinomas: a possible correlation with cancer metastasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 Jan;117(1):89–95.
99. Wang R, Ma Z, Feng L, Yang Y, Tan C, Shi Q, et al. LncRNA MIR31HG targets HIF1A and P21 to facilitate head and neck cancer cell proliferation and tumorigenesis by promoting cell-cycle progression. *Mol Cancer*. 2018 20;17(1):162.
100. Li D, Feng J, Wu T, Wang Y, Sun Y, Ren J, et al. Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2013 Jan;182(1):64–70.
101. Zhou J, Zhang J, Ma W, Zhang W, Ke Z, Ma L. Anti-tumor effect of HOTAIR–miR-613-SNAI2 axis through suppressing EMT and drug resistance in laryngeal squamous cell carcinoma. *RSC Adv*. 2018 Aug 20;8(52):29879–89.
102. Wang J, Zhou Y, Lu J, Sun Y, Xiao H, Liu M, et al. Combined detection of serum exosomal miR-21 and HOTAIR as diagnostic and prognostic biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2014 Sep;31(9):148.
103. Wu Y, Zhang L, Zhang L, Wang Y, Li H, Ren X, et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes tumor cell invasion and metastasis by recruiting EZH2 and repressing E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2015;46(6):2586–94.
104. Chen H, Xin Y, Zhou L, Huang J, Tao L, Cheng L, et al. Cisplatin and paclitaxel target significant long noncoding RNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2014 Nov;31(11):246.
105. Wu T, Qu L, He G, Tian L, Li L, Zhou H, et al. Regulation of laryngeal squamous cell cancer progression by the lncRNA H19/miR-148a-3p/DNMT1 axis. *Oncotarget*. 2016 Mar 8;7(10):11553–66.
106. Zhang Z, Wang X, Cao S, Han X, Wang Z, Zhao X, et al. The Long Noncoding RNA TUG1 Promotes Laryngeal Cancer Proliferation and Migration. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2018;49(6):2511–20.
107. Sun S, Gong C, Yuan K. LncRNA UCA1 promotes cell proliferation, invasion and migration of laryngeal squamous cell carcinoma cells by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2019 Feb;17(2):1182–9.
108. Ayaz L, Görür A, Yaroğlu HY, Ozcan C, Tamer L. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Sep;139(9):1499–506.
109. Long X-B, Sun G-B, Hu S, Liang G-T, Wang N, Zhang X-H, et al. Let-7a microRNA functions as a potential tumor suppressor in human laryngeal cancer. *Oncol Rep*. 2009 Nov;22(5):1189–95.
110. Liu M, Wu H, Liu T, Li Y, Wang F, Wan H, et al. Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma. *Cell Res*. 2009 Jul;19(7):828–37.
111. Zhang T, Liu M, Wang C, Lin C, Sun Y, Jin D. Down-regulation of MiR-206 promotes proliferation and invasion of laryngeal cancer by regulating VEGF expression. *Anticancer Res*. 2011 Nov;31(11):3859–63.
112. Cao P, Zhou L, Zhang J, Zheng F, Wang H, Ma D, et al. Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013 May;35(5):720–8.
113. Saito K, Inagaki K, Kamimoto T, Ito Y, Sugita T, Nakajo S, et al. MicroRNA-196a is a putative diagnostic biomarker and therapeutic target for laryngeal cancer. *PLoS One*. 2013;8(8):e71480.

114. Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, et al. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene*. 2008 Nov 6;27(52):6667–78.
115. Wang F, Song G, Liu M, Li X, Tang H. miRNA-1 targets fibronectin1 and suppresses the migration and invasion of the HEP2 laryngeal squamous carcinoma cell line. *FEBS Lett*. 2011 Oct 20;585(20):3263–9.
116. Wu H, Liu T, Wang R, Tian S, Liu M, Li X, et al. MicroRNA-16 targets zyxin and promotes cell motility in human laryngeal carcinoma cell line HEP-2. *IUBMB Life*. 2011 Feb;63(2):101–8.
117. Wu T-Y, Zhang T-H, Qu L-M, Feng J-P, Tian L-L, Zhang B-H, et al. MiR-19a is correlated with prognosis and apoptosis of laryngeal squamous cell carcinoma by regulating TIMP-2 expression. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(1):56–63.
118. Tian Y, Fu S, Qiu G-B, Xu Z-M, Liu N, Zhang X-W, et al. MicroRNA-27a promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting PLK2 in laryngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 2014 Sep 18;14:678.
119. Cai K, Wang Y, Bao X. MiR-106b promotes cell proliferation via targeting RB in laryngeal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2011 Aug 8;30:73.
120. Li M, Tian L, Wang L, Yao H, Zhang J, Lu J, et al. Down-regulation of miR-129-5p inhibits growth and induces apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting APC. *PloS One*. 2013;8(10):e77829.
121. Shen N, Huang X, Li J. Upregulation of miR-129-5p affects laryngeal cancer cell proliferation, invasiveness, and migration by affecting STAT3 expression. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2016 Feb;37(2):1789–96.
122. Zhao X, Zhang W, Liang H, Ji W. Overexpression of miR -155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3. *PloS One*. 2013;8(2):e56395.
123. Li X, Wang H, Peng X, Zhou H, Wang X. miR-1297 mediates PTEN expression and contributes to cell progression in LSCC. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Oct 19;427(2):254–60.
124. Guo Y, Fu W, Chen H, Shang C, Zhong M. miR-24 functions as a tumor suppressor in Hep2 laryngeal carcinoma cells partly through down-regulation of the S100A8 protein. *Oncol Rep*. 2012 Apr;27(4):1097–103.
125. Liu J, Tang Q, Li S, Yang X. Inhibition of HAX-1 by miR-125a reverses cisplatin resistance in laryngeal cancer stem cells. *Oncotarget*. 2016 Dec 27;7(52):86446–56.
126. Re M, Magliulo G, Gioacchini FM, Bajraktari A, Bertini A, Çeka A, et al. Expression Levels and Clinical Significance of miR-21-5p, miR-let-7a, and miR-34c-5p in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *BioMed Res Int*. 2017;2017:3921258.
127. Ye J, Li L, Feng P, Wan J, Li J. Downregulation of miR-34a contributes to the proliferation and migration of laryngeal carcinoma cells by targeting cyclin D1. *Oncol Rep*. 2016 Jul;36(1):390–8.
128. Xu Y, Lin Y-P, Yang D, Zhang G, Zhou H-F. Expression of serum microRNA-378 and its clinical significance in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(24):5137–42.
129. Xu L, Chen Z, Xue F, Chen W, Ma R, Cheng S, et al. MicroRNA-24 inhibits growth, induces apoptosis, and reverses radioresistance in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Cancer Cell Int*. 2015;15:61.
130. Xu C-Z, Xie J, Jin B, Chen X-W, Sun Z-F, Wang B-X, et al. Gene and microRNA expression reveals sensitivity to paclitaxel in laryngeal cancer cell line. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(7):1351–61.

131. Li L, Wang B. Overexpression of microRNA-30b improves adenovirus-mediated p53 cancer gene therapy for laryngeal carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2014 Oct 29;15(11):19729–40.
132. Luo H-N, Wang Z-H, Sheng Y, Zhang Q, Yan J, Hou J, et al. MiR-139 targets CXCR4 and inhibits the proliferation and metastasis of laryngeal squamous carcinoma cells. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* 2014 Jan;31(1):789.
133. Hu A, Huang J-J, Xu W-H, Jin X-J, Li J-P, Tang Y-J, et al. miR-21 and miR-375 microRNAs as candidate diagnostic biomarkers in squamous cell carcinoma of the larynx: association with patient survival. *Am J Transl Res.* 2014;6(5):604–13.
134. Wang Y, Chen M, Tao Z, Hua Q, Chen S, Xiao B. Identification of predictive biomarkers for early diagnosis of larynx carcinoma based on microRNA expression data. *Cancer Genet.* 2013 Oct;206(9–10):340–6.
135. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia Auckl NZ.* 2015;3:83–92.
136. Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CMA, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res.* 2011 Jul 1;71(13):4640–52.
137. Koh MY, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1alpha and cancer therapy. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer.* 2010;180:15–34.
138. Zuo J, Wen J, Lei M, Wen M, Li S, Lv X, et al. Hypoxia promotes the invasion and metastasis of laryngeal cancer cells via EMT. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* 2016 Feb;33(2):15.
139. Kumar V, Gabrilovich DI. Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology.* 2014 Dec;143(4):512–9.
140. Zeng W, Wan R, Zheng Y, Singh SR, Wei Y. Hypoxia, stem cells and bone tumor. *Cancer Lett.* 2011 Dec 27;313(2):129–36.
141. Saito S, Lin Y-C, Tsai M-H, Lin C-S, Murayama Y, Sato R, et al. Emerging roles of hypoxia-inducible factors and reactive oxygen species in cancer and pluripotent stem cells. *Kaohsiung J Med Sci.* 2015 Jun;31(6):279–86.
142. Lv X, Li J, Zhang C, Hu T, Li S, He S, et al. The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genes Dis.* 2017 Mar;4(1):19–24.
143. Soni S, Padwad YS. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncol Stockh Swed.* 2017 Apr;56(4):503–15.
144. Maynard MA, Ohh M. The role of hypoxia-inducible factors in cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2007 Aug;64(16):2170–80.
145. Prager GW, Poettler M, Unseld M, Zielinski CC. Angiogenesis in cancer: Anti-VEGF escape mechanisms. *Transl Lung Cancer Res.* 2012 Mar;1(1):14–25.
146. Skuli N, Liu L, Runge A, Wang T, Yuan L, Patel S, et al. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood.* 2009 Jul 9;114(2):469–77.
147. Raval RR, Lau KW, Tran MGB, Sowter HM, Mandriota SJ, Li J-L, et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol.* 2005 Jul;25(13):5675–86.
148. Geis T, Döring C, Popp R, Grossmann N, Fleming I, Hansmann M-L, et al. HIF-2alpha-dependent PAI-1 induction contributes to angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Exp Cell Res.* 2015 Feb 1;331(1):46–57.
149. Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, et al. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell.* 2009 Sep 24;35(6):856–67.
150. Spinello I, Quaranta MT, Paolillo R, Pelosi E, Cerio AM, Saulle E, et al. Differential hypoxic regulation of the microRNA-146a/CXCR4 pathway in normal and leukemic

- monocytic cells: impact on response to chemotherapy. *Haematologica*. 2015 Sep;100(9):1160–71.
151. Blick C, Ramachandran A, McCormick R, Wigfield S, Cranston D, Catto J, et al. Identification of a hypoxia-regulated miRNA signature in bladder cancer and a role for miR-145 in hypoxia-dependent apoptosis. *Br J Cancer*. 2015 Aug 11;113(4):634–44.
152. Seok J-K, Lee SH, Kim MJ, Lee Y-M. MicroRNA-382 induced by HIF-1 α is an angiogenic miR targeting the tumor suppressor phosphatase and tensin homolog. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jul;42(12):8062–72.
153. Nagpal N, Ahmad HM, Chameettachal S, Sundar D, Ghosh S, Kulshreshtha R. HIF-inducible miR-191 promotes migration in breast cancer through complex regulation of TGF β -signaling in hypoxic microenvironment. *Sci Rep*. 2015 Apr 13;5:9650.
154. Xie Y, Li W, Feng J, Wu T, Li J. MicroRNA-363 and GATA-1 are regulated by HIF-1 α in K562 cells under hypoxia. *Mol Med Rep*. 2016 Sep;14(3):2503–10.
155. Ge X, Liu X, Lin F, Li P, Liu K, Geng R, et al. MicroRNA-421 regulated by HIF-1 α promotes metastasis, inhibits apoptosis, and induces cisplatin resistance by targeting E-cadherin and caspase-3 in gastric cancer. *Oncotarget*. 2016 Apr 26;7(17):24466–82.
156. Wang X, Li J, Wu D, Bu X, Qiao Y. Hypoxia promotes apoptosis of neuronal cells through hypoxia-inducible factor-1 α -microRNA-204-B-cell lymphoma-2 pathway. *Exp Biol Med* Maywood NJ. 2016 Jan;241(2):177–83.
157. Yang Y, Li Y, Chen X, Cheng X, Liao Y, Yu X. Exosomal transfer of miR-30a between cardiomyocytes regulates autophagy after hypoxia. *J Mol Med Berl Ger*. 2016;94(6):711–24.
158. Liu Y, Nie H, Zhang K, Ma D, Yang G, Zheng Z, et al. A feedback regulatory loop between HIF-1 α and miR-21 in response to hypoxia in cardiomyocytes. *FEBS Lett*. 2014 Aug 25;588(17):3137–46.
159. Bhatt K, Wei Q, Pabla N, Dong G, Mi Q-S, Liang M, et al. MicroRNA-687 Induced by Hypoxia-Inducible Factor-1 Targets Phosphatase and Tensin Homolog in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2015 Jul;26(7):1588–96.
160. Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, Fitzpatrick SF, Cheong A, Scholz CC, et al. MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1 α activity during prolonged hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2011 Oct;31(19):4087–96.
161. Bartoszewska S, Kochan K, Piotrowski A, Kamysz W, Ochocka RJ, Collawn JF, et al. The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1 α expression in human endothelial cells through a negative feedback loop. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2015 Apr;29(4):1467–79.
162. Han F, Wu Y, Jiang W. MicroRNA-18a Decreases Choroidal Endothelial Cell Proliferation and Migration by Inhibiting HIF1A Expression. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2015 Jun 5;21:1642–7.
163. Meng S, Cao J, Wang L, Zhou Q, Li Y, Shen C, et al. MicroRNA 107 partly inhibits endothelial progenitor cells differentiation via HIF-1 β . *PloS One*. 2012;7(7):e40323.
164. Umezu T, Tadokoro H, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood*. 2014 Dec 11;124(25):3748–57.
165. Dai L, Lou W, Zhu J, Zhou X, Di W. MiR-199a inhibits the angiogenic potential of endometrial stromal cells under hypoxia by targeting HIF-1 α /VEGF pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):4735–44.
166. Chan YC, Khanna S, Roy S, Sen CK. miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells. *J Biol Chem*. 2011 Jan 21;286(3):2047–56.

167. Li Z, Meng D, Li G, Xu J, Tian K, Li Y. Overexpression of microRNA-210 promotes chondrocyte proliferation and extracellular matrix deposition by targeting HIF-3 α in osteoarthritis. *Mol Med Rep.* 2016 Mar;13(3):2769–76.
168. Kai AK-L, Chan LK, Lo RC-L, Lee JM-F, Wong CC-L, Wong JC-M, et al. Down-regulation of TIMP2 by HIF-1 α /miR-210/HIF-3 α regulatory feedback circuit enhances cancer metastasis in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Baltim Md.* 2016;64(2):473–87.
169. Fasanaro P, D’Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem.* 2008 Jun 6;283(23):15878–83.
170. Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N, Zhang X, Joshi HP, Basi D, et al. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- α isoforms and promotes angiogenesis. *J Clin Invest.* 2010 Nov;120(11):4141–54.
171. Janaszak-Jasiecka A, Bartoszewska S, Kochan K, Piotrowski A, Kalinowski L, Kamysz W, et al. miR-429 regulates the transition between Hypoxia-Inducible Factor (HIF)1A and HIF3A expression in human endothelial cells. *Sci Rep.* 2016 Mar 8;6:22775.
172. Zhang L, Zhang Y, Zhang X, Zhang Y, Jiang Y, Xiao X, et al. MicroRNA-433 Inhibits the Proliferation and Migration of HUVECs and Neurons by Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha. *J Mol Neurosci MN.* 2017 Feb;61(2):135–43.
173. Chang Y-N, Zhang K, Hu Z-M, Qi H-X, Shi Z-M, Han X-H, et al. Hypoxia-regulated lncRNAs in cancer. *Gene.* 2016 Jan 1;575(1):1–8.
174. Dong J, Xu J, Wang X, Jin B. Influence of the interaction between long noncoding RNAs and hypoxia on tumorigenesis. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2016 Feb;37(2):1379–85.
175. Fish JE, Matouk CC, Yeboah E, Bevan SC, Khan M, Patil K, et al. Hypoxia-inducible expression of a natural cis-antisense transcript inhibits endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2007 May 25;282(21):15652–66.
176. Zhou C, Ye L, Jiang C, Bai J, Chi Y, Zhang H. Long noncoding RNA HOTAIR, a hypoxia-inducible factor-1 α activated driver of malignancy, enhances hypoxic cancer cell proliferation, migration, and invasion in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2015 Dec;36(12):9179–88.
177. Matouk IJ, DeGroot N, Mezan S, Ayesh S, Abu-lail R, Hochberg A, et al. The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth. *PloS One.* 2007 Sep 5;2(9):e845.
178. Xue M, Li X, Li Z, Chen W. Urothelial carcinoma associated 1 is a hypoxia-inducible factor-1 α -targeted long noncoding RNA that enhances hypoxic bladder cancer cell proliferation, migration, and invasion. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2014 Jul;35(7):6901–12.
179. Li X, Deng S, Zhu S, Jin Y, Cui S, Chen J, et al. Hypoxia-induced lncRNA-NUTF2P3-001 contributes to tumorigenesis of pancreatic cancer by derepressing the miR-3923/KRAS pathway. *Oncotarget.* 2016 Feb 2;7(5):6000–14.
180. Gómez-Maldonado L, Tiana M, Roche O, Prado-Cabrero A, Jensen L, Fernandez-Barral A, et al. EFNA3 long noncoding RNAs induced by hypoxia promote metastatic dissemination. *Oncogene.* 2015 May 14;34(20):2609–20.
181. Ferdin J, Nishida N, Wu X, Nicoloso MS, Shah MY, Devlin C, et al. HINCUTs in cancer: hypoxia-induced noncoding ultraconserved transcripts. *Cell Death Differ.* 2013 Dec;20(12):1675–87.
182. Wei X, Wang C, Ma C, Sun W, Li H, Cai Z. Long noncoding RNA ANRIL is activated by hypoxia-inducible factor-1 α and promotes osteosarcoma cell invasion and suppresses cell apoptosis upon hypoxia. *Cancer Cell Int.* 2016;16:73.

183. Liu L, Zhao X, Zou H, Bai R, Yang K, Tian Z. Hypoxia Promotes Gastric Cancer Malignancy Partly through the HIF-1 α Dependent Transcriptional Activation of the Long Non-coding RNA GAPLINC. *Front Physiol.* 2016;7:420.
184. Yang F, Zhang H, Mei Y, Wu M. Reciprocal regulation of HIF-1 α and lincRNA-p21 modulates the Warburg effect. *Mol Cell.* 2014 Jan 9;53(1):88–100.
185. Thrash-Bingham CA, Tartof KD. aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jan 20;91(2):143–51.
186. Michalik KM, You X, Manavski Y, Doddaballapur A, Zörnig M, Braun T, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res.* 2014 Apr 25;114(9):1389–97.
187. Choudhry H, Mole DR. Hypoxic regulation of the noncoding genome and NEAT1. *Brief Funct Genomics.* 2016 May;15(3):174–85.
188. Zhai W, Sun Y, Jiang M, Wang M, Gasiewicz TA, Zheng J, et al. Differential regulation of LncRNA-SARCC suppresses VHL-mutant RCC cell proliferation yet promotes VHL-normal RCC cell proliferation via modulating androgen receptor/HIF-2 α /C-MYC axis under hypoxia. *Oncogene.* 2017;36(31):4525.
189. McCarty G, Loeb DM. Hypoxia-sensitive epigenetic regulation of an antisense-oriented lncRNA controls WT1 expression in myeloid leukemia cells. *PloS One.* 2015;10(3):e0119837.
190. Yang F, Huo X, Yuan S, Zhang L, Zhou W, Wang F, et al. Repression of the long noncoding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated metastasis. *Mol Cell.* 2013 Mar 28;49(6):1083–96.
191. Shih J-W, Chiang W-F, Wu ATH, Wu M-H, Wang L-Y, Yu Y-L, et al. Long noncoding RNA LncHIFCAR/MIR31HG is a HIF-1 α co-activator driving oral cancer progression. *Nat Commun.* 2017 22;8:15874.
192. Takahashi K, Yan IK, Haga H, Patel T. Modulation of hypoxia-signaling pathways by extracellular linc-RoR. *J Cell Sci.* 2014 Apr 1;127(Pt 7):1585–94.
193. Wang Y, Liu X, Zhang H, Sun L, Zhou Y, Jin H, et al. Hypoxia-inducible lncRNA-AK058003 promotes gastric cancer metastasis by targeting γ -synuclein. *Neoplasia N Y N.* 2014 Dec;16(12):1094–106.
194. Wiedmeier JE, Ohlrich A, Chu A, Rountree MR, Turker MS. Induction of the long noncoding RNA NBR2 from the bidirectional BRCA1 promoter under hypoxic conditions. *Mutat Res.* 2017;796:13–9.
195. Yang Z, Wang R, Zhang T, Dong X. Hypoxia/lncRNA-AK123072/EGFR pathway induced metastasis and invasion in gastric cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(11):19954–68.
196. Iden M, Fye S, Li K, Chowdhury T, Ramchandran R, Rader JS. The lncRNA PVT1 Contributes to the Cervical Cancer Phenotype and Associates with Poor Patient Prognosis. *PloS One.* 2016;11(5):e0156274.
197. Sun Y-W, Chen Y-F, Li J, Huo Y-M, Liu D-J, Hua R, et al. A novel long non-coding RNA ENST00000480739 suppresses tumour cell invasion by regulating OS-9 and HIF-1 α in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer.* 2014 Nov 25;111(11):2131–41.
198. Mace TA, Collins AL, Wojcik SE, Croce CM, Lesinski GB, Bloomston M. Hypoxia induces the overexpression of MicroRNA-21 in pancreatic cancer cells. *J Surg Res.* 2013 Oct;184(2):855–60.
199. Peng H, Kaplan N, Hamanaka RB, Katsnelson J, Blatt H, Yang W, et al. microRNA-31/factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1 nexus regulates keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Aug 28;109(35):14030–4.
200. Zhang H, Pu J, Qi T, Qi M, Yang C, Li S, et al. MicroRNA-145 inhibits the growth, invasion, metastasis and angiogenesis of neuroblastoma cells through targeting hypoxia-inducible factor 2 alpha. *Oncogene.* 2014 Jan 16;33(3):387–97.

201. Yang D, Wang J, Xiao M, Zhou T, Shi X. Role of Mir-155 in Controlling HIF-1 α Level and Promoting Endothelial Cell Maturation. *Sci Rep.* 2016 12;6:35316.
202. Pin A-L, Houle F, Fournier P, Guillonneau M, Paquet ÉR, Simard MJ, et al. Annexin-1-mediated Endothelial Cell Migration and Angiogenesis Are Regulated by Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-induced Inhibition of miR-196a Expression. *J Biol Chem.* 2012 Aug 31;287(36):30541–51.
203. Chan SY, Loscalzo J. MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle Georget Tex.* 2010 Mar 15;9(6):1072–83.
204. Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, et al. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1340–8.
205. Liu F, Lou Y-L, Wu J, Ruan Q-F, Xie A, Guo F, et al. Upregulation of microRNA-210 regulates renal angiogenesis mediated by activation of VEGF signaling pathway under ischemia/perfusion injury in vivo and in vitro. *Kidney Blood Press Res.* 2012;35(3):182–91.
206. Celic T, Metzinger-Le Meuth V, Six I, Massy ZA, Metzinger L. The mir-221/222 Cluster is a Key Player in Vascular Biology via the Fine-Tuning of Endothelial Cell Physiology. *Curr Vasc Pharmacol.* 2017;15(1):40–6.
207. Landskroner-Eiger S, Moneke I, Sessa WC. miRNAs as Modulators of Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med [Internet].* 2013 Feb [cited 2020 Mar 6];3(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3552340/>
208. Stone JK, Kim J-H, Vukadin L, Richard A, Giannini HK, Lim S-TS, et al. Hypoxia induces cancer cell-specific chromatin interactions and increases MALAT1 expression in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2019 19;294(29):11213–24.
209. Bhan A, Deb P, Shihabeddin N, Ansari KI, Brotto M, Mandal SS. Histone methylase MLL1 coordinates with HIF and regulate lncRNA HOTAIR expression under hypoxia. *Gene.* 2017 Sep 20;629:16–28.
210. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996 Jun 1;56(11):2488–92.
211. Zhang L, Poh CF, Williams M, Laronde DM, Berean K, Gardner PJ, et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer. *Cancer Prev Res Phila Pa.* 2012 Sep;5(9):1081–9.
212. Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis.* 2019 Jul 15;10(8):1–17.
213. Shaw R, Beasley N. Aetiology and risk factors for head and neck cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol.* 2016 May;130(S2):S9–12.
214. Carbone M, Amelio I, Affar EB, Brugarolas J, Cannon-Albright LA, Cantley LC, et al. Consensus report of the 8 and 9th Weinman Symposia on Gene x Environment Interaction in carcinogenesis: novel opportunities for precision medicine. *Cell Death Differ.* 2018;25(11):1885–904.
215. Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M. Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death Dis.* 2014 Jan 23;5:e1018.
216. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(2):89–102.
217. Kaiser AM, Attardi LD. Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):93–103.
218. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018;25(1):104–13.

219. Parrales A, Thoenen E, Iwakuma T. The interplay between mutant p53 and the mevalonate pathway. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):460–70.
220. Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst.* 2016 Jun;108(6):djv403.
221. Wu D, Prives C. Relevance of the p53-MDM2 axis to aging. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):169–79.
222. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015 Jan 29;517(7536):576–82.
223. Nowell CS, Radtke F. Notch as a tumour suppressor. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(3):145–59.
224. Sun W, Gaykalova DA, Ochs MF, Mambo E, Arnaoutakis D, Liu Y, et al. Activation of the NOTCH pathway in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2014 Feb 15;74(4):1091–104.
225. Zhao Z-L, Zhang L, Huang C-F, Ma S-R, Bu L-L, Liu J-F, et al. NOTCH1 inhibition enhances the efficacy of conventional chemotherapeutic agents by targeting head neck cancer stem cell. *Sci Rep.* 2016 25;6:24704.
226. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017 30;7(6):e577.
227. Kang H, Kiess A, Chung CH. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015 Jan;12(1):11–26.
228. Vander Broek R, Mohan S, Eytan DF, Chen Z, Van Waes C. The PI3K/Akt/mTOR axis in head and neck cancer: functions, aberrations, cross-talk, and therapies. *Oral Dis.* 2015 Oct;21(7):815–25.
229. Wang Z, Valera JC, Zhao X, Chen Q, Gutkind JS. mTOR co-targeting strategies for head and neck cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36(3):491–502.
230. Swick AD, Prabakaran PJ, Miller MC, Javaid AM, Fisher MM, Sampene E, et al. Cotargeting mTORC and EGFR Signaling as a Therapeutic Strategy in HNSCC. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(7):1257–68.
231. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol.* 2018;52(Pt 2):228–40.
232. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol.* 2018;12(1):3–20.
233. Brand TM, Iida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2013 Sep;108(3):370–7.
234. Redlich N, Robinson AM, Nickel KP, Stein AP, Wheeler DL, Adkins DR, et al. Anti-Trop2 blockade enhances the therapeutic efficacy of ErbB3 inhibition in head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis.* 2018 05;9(1):5.
235. Madoz-Gúrpide J, Zazo S, Chamizo C, Casado V, Caramés C, Gavín E, et al. Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *J Transl Med.* 2015 Aug 29;13:282.
236. Cho YA, Kim EK, Heo SJ, Cho BC, Kim HR, Chung JM, et al. Alteration status and prognostic value of MET in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer.* 2016;7(15):2197–206.
237. Szturz P, Raymond E, Abitbol C, Albert S, de Gramont A, Faivre S. Understanding c-MET signalling in squamous cell carcinoma of the head & neck. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017 Mar;111:39–51.
238. Geiger JL, Grandis JR, Bauman JE. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncol.* 2016 May;56:84–92.

239. Wang Y, Wang S, Wu Y, Ren Y, Li Z, Yao X, et al. Suppression of the Growth and Invasion of Human Head and Neck Squamous Cell Carcinomas via Regulating STAT3 Signaling and the miR-21/ β -catenin Axis with HJC0152. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(4):578–90.
240. Bu LL, Yu GT, Wu L, Mao L, Deng WW, Liu JF, et al. STAT3 Induces Immunosuppression by Upregulating PD-1/PD-L1 in HNSCC. *J Dent Res.* 2017 Aug;96(9):1027–34.
241. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer.* 2014 Nov;14(11):736–46.
242. Chiba T, Soeno Y, Shirako Y, Sudo H, Yagishita H, Taya Y, et al. MALT1 Inhibition of Oral Carcinoma Cell Invasion and ERK/MAPK Activation. *J Dent Res.* 2016 Apr;95(4):446–52.
243. Peng Q, Deng Z, Pan H, Gu L, Liu O, Tang Z. Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oral cancer. *Oncol Lett.* 2018 Feb;15(2):1379–88.
244. De Carvalho TG, De Carvalho AC, Maia DCC, Ogawa JK, Carvalho AL, Vettore AL. Search for mutations in signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2013 Jul;30(1):334–40.
245. Pepe MS, Thompson ML. Combining diagnostic test results to increase accuracy. *Biostat Oxf Engl.* 2000 Jun;1(2):123–40.
246. Popov TM, Stancheva G, Goranova TE, Rangachev J, Konov D, Todorov S, et al. Strong Correlation Between mRNA Expression Levels of HIF-2 α , VEGFR1, VEGFR2 and MMP2 in Laryngeal Carcinoma. *Pathol Oncol Res POR.* 2016 Oct;22(4):741–6.
247. Popov TM, Goranova T, Stancheva G, Kaneva R, Dikov T, Chalakov I, et al. Relative quantitative expression of hypoxia-inducible factor-1 α , -2 α and -3 α , and vascular endothelial growth factor A in laryngeal carcinoma. *Oncol Lett.* 2015 Jun;9(6):2879–85.
248. Correlations between PKM2, HIF-1 α , c-Myc and p53 mRNA Expression Levels in Laryngeal Carcinoma [Internet]. [cited 2020 Mar 19]. Available from: <http://www.proceedings.bas.bg/>
249. Zheng D, Chen Y, Gao C, Wei Y, Cao G, Lu N, et al. Polymorphisms of p53 and MDM2 genes are associated with severe toxicities in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(11):1542–51.
250. Harvey NT, Tabone T, Erber W, Wood BA. Circumscribed sebaceous neoplasms: a morphological, immunohistochemical and molecular analysis. *Pathology (Phila).* 2016 Aug;48(5):454–62.
251. Yurgelun MB, Allen B, Kaldate RR, Bowles KR, Judkins T, Kaushik P, et al. Identification of a Variety of Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients With Suspected Lynch Syndrome. *Gastroenterology.* 2015 Sep;149(3):604–613.e20.
252. Todorova TA, Jordanov SH, Stancheva GS, Chalakov IJ, Melncharov MB, Kunev KV, et al. Mutational Status of CDKN2A and TP53 Genes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res POR.* 2015 Apr;21(2):413–21.
253. Lim AM, Do H, Young RJ, Wong SQ, Angel C, Collins M, et al. Differential mechanisms of CDKN2A (p16) alteration in oral tongue squamous cell carcinomas and correlation with patient outcome. *Int J Cancer.* 2014 Aug 15;135(4):887–95.
254. Weisman PS, Ng CKY, Brogi E, Eisenberg RE, Won HH, Piscuoglio S, et al. Genetic alterations of triple negative breast cancer by targeted next-generation sequencing and correlation with tumor morphology. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2016;29(5):476–88.
255. Fibroblast Growth Factor Receptor-2 Mutations in Endometrial Cancer — ASN Events [Internet]. [cited 2020 Mar 8]. Available from: <http://metastasis-2012.m.asnevents.com.au/schedule/session/78/abstract/1123>

256. Liu W, Liu L, Wang R, Gong G, Ding X, Yang B, et al. Bevacizumab Combined With Oxaliplatin/Capecitabine in Patient With Refractory and Recurrent Mucinous Adenocarcinoma of the Appendix: A Case Report. *Front Oncol.* 2019;9:55.
257. Acuna-Hidalgo R, Sengul H, Steehouwer M, van de Vorst M, Vermeulen SH, Kiemeny LALM, et al. Ultra-sensitive Sequencing Identifies High Prevalence of Clonal Hematopoiesis-Associated Mutations throughout Adult Life. *Am J Hum Genet.* 2017 Jul 6;101(1):50–64.
258. Dieter SM, Heining C, Agaimy A, Huebschmann D, Bonekamp D, Hutter B, et al. Mutant KIT as imatinib-sensitive target in metastatic sinonasal carcinoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017 01;28(1):142–8.
259. Nomura K, Hatayama I, Narita T, Kaneko T, Shiraishi M. A novel KIT gene missense mutation in a Japanese family with piebaldism. *J Invest Dermatol.* 1998 Aug;111(2):337–8.
260. Tode N, Kikuchi T, Sakakibara T, Hirano T, Inoue A, Ohkouchi S, et al. Exome sequencing deciphers a germline MET mutation in familial epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer. *Cancer Sci.* 2017 Jun;108(6):1263–70.
261. Cordaro FG, De Presbiteris AL, Camerlingo R, Mozzillo N, Pirozzi G, Cavalcanti E, et al. Phenotype characterization of human melanoma cells resistant to dabrafenib. *Oncol Rep.* 2017 Nov;38(5):2741–51.
262. He G, Chen Y, Zhu C, Zhou J, Xie X, Fei R, et al. Application of plasma circulating cell-free DNA detection to the molecular diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Am J Transl Res.* 2019;11(3):1428–45.
263. Cole AJ, Dwight T, Gill AJ, Dickson K-A, Zhu Y, Clarkson A, et al. Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. *Sci Rep.* 2016 18;6:26191.
264. Dallol A, Buhmeida A, Al-Ahwal MS, Al-Maghrabi J, Bajouh O, Al-Khayyat S, et al. Clinical significance of frequent somatic mutations detected by high-throughput targeted sequencing in archived colorectal cancer samples. *J Transl Med.* 2016 04;14(1):118.
265. Smardova J, Liskova K, Ravcukova B, Malcikova J, Hausnerova J, Svitakova M, et al. Complex analysis of the p53 tumor suppressor in lung carcinoma. *Oncol Rep.* 2016 Mar;35(3):1859–67.
266. Er T-K, Wang Y-Y, Chen C-C, Herreros-Villanueva M, Liu T-C, Yuan S-SF. Molecular characterization of oral squamous cell carcinoma using targeted next-generation sequencing. *Oral Dis.* 2015 Oct;21(7):872–8.
267. Kandioler D, Mittlböck M, Kappel S, Puhalla H, Herbst F, Langner C, et al. TP53 Mutational Status and Prediction of Benefit from Adjuvant 5-Fluorouracil in Stage III Colon Cancer Patients. *EBioMedicine.* 2015 Aug;2(8):825–30.
268. Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, Carnot F, Houllier AM, Soussi T, et al. p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2000 Apr;18(7):1465–73.
269. Leroy B, Girard L, Hollestelle A, Minna JD, Gazdar AF, Soussi T. Analysis of TP53 mutation status in human cancer cell lines: a reassessment. *Hum Mutat.* 2014 Jun;35(6):756–65.
270. Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics.* 2015 May 22;16:169.
271. Gatta G, Botta L, Sánchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L, et al. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EUROCARE-5 population-based study. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2015 Oct;51(15):2130–43.

272. Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer CJ, et al. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival. *The Laryngoscope*. 2006 Sep;116(9 Pt 2 Suppl 111):1–13.
273. Cosetti M, Yu G-P, Schantz SP. Five-year survival rates and time trends of laryngeal cancer in the US population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008 Apr;134(4):370–9.
274. Zhang H, Travis LB, Chen R, Hyrien O, Milano MT, Newlands SD, et al. Impact of radiotherapy on laryngeal cancer survival: a population-based study of 13,808 US patients. *Cancer*. 2012 Mar 1;118(5):1276–87.
275. Kaur K, Sonkhya N, Bapna AS. Nodal metastases from laryngeal carcinoma and their correlation with certain characteristics of the primary tumor. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg Off Publ Assoc Otolaryngol India*. 2002 Oct;54(4):255–63.
276. Fisch UP, Sigel ME. CERVICAL LYMPHATIC SYSTEM AS VISUALIZED BY LYMPHOGRAPHY. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1964 Dec;73:870–82.
277. Raitiola H, Pukander J, Laippala P. Glottic and supraglottic laryngeal carcinoma: differences in epidemiology, clinical characteristics and prognosis. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1999;119(7):847–51.
278. Tuyns AJ. Laryngeal cancer. *Cancer Surv*. 1994;19–20:159–73.
279. De Stéfani E, Carzoglio J, Cendán M, Deneo H, Olivera L, Oreggia F. Laryngeal cancer in Uruguay (1958-1981). An epidemiologic study. *Cancer*. 1985 Jan 1;55(1):214–6.
280. Silvestri F, Bussani R, Stanta G, Cosatti C, Ferlito A. Supraglottic versus glottic laryngeal cancer: epidemiological and pathological aspects. *ORL J Oto-Rhino-Laryngol Its Relat Spec*. 1992;54(1):43–8.
281. Tuyns AJ, Estève J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer*. 1988 Apr 15;41(4):483–91.
282. Wynder EL, Covey LS, Mabuchi K, Mushinski M. Environmental factors in cancer of the larynx: a second look. *Cancer*. 1976 Oct;38(4):1591–601.
283. De Stefani E, Correa P, Oreggia F, Leiva J, Rivero S, Fernandez G, et al. Risk factors for laryngeal cancer. *Cancer*. 1987 Dec 15;60(12):3087–91.
284. Lauerma S. Treatment of laryngeal cancer. A study of 638 cases. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1967;Suppl 225:1+.
285. Stell PM. Prognosis in laryngeal carcinoma: host factors. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1990 Apr;15(2):111–9.
286. Stell PM. Prognosis in laryngeal carcinoma: tumour factors. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1990 Feb;15(1):69–81.
287. Dahm JD, Sessions DG, Paniello RC, Harvey J. Primary Subglottic Cancer. *The Laryngoscope*. 1998;108(5):741–6.
288. Garas J, McGuirt WF. Squamous cell carcinoma of the subglottis. *Am J Otolaryngol*. 2006 Feb;27(1):1–4.
289. Wight R, Paleri V, Arullendran P. Current theories for the development of nonsmoking and nondrinking laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Apr;11(2):73–7.
290. Snietura M, Jaworska M, Mlynarczyk-Liszka J, Goraj-Zajac A, Piglowski W, Lange D, et al. PTEN as a prognostic and predictive marker in postoperative radiotherapy for squamous cell cancer of the head and neck. *PLoS One*. 2012;7(3):e33396.
291. Bakarakos P, Theohari I, Nomikos A, Mylona E, Papadimitriou C, Dimopoulos A-M, et al. Immunohistochemical study of PTEN and phosphorylated mTOR proteins in familial and sporadic invasive breast carcinomas. *Histopathology*. 2010 Jun;56(7):876–82.

292. Wu H, Shang X, Shi Y, Yang Z, Zhao J, Yang M, et al. Genetic variants of lncRNA HOTAIR and risk of epithelial ovarian cancer among Chinese women. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):41047–52.
293. Han J-G, Jiang Y-D, Zhang C-H, Yang Y-M, Pang D, Song Y-N, et al. A novel panel of serum miR-21/miR-155/miR-365 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer. *Ann Surg Treat Res*. 2017 Feb;92(2):55–66.
294. Ibrahim FK, Ali-Labib R, Galal IH, Mahmoud HM. MicroRNA-155 expression in exhaled breath condensate of patients with lung cancer. *Egypt J Chest Dis Tuberc*. 2017 Oct 1;66(4):687–91.
295. Zhang H, Yang H, Zhang C, Jing Y, Wang C, Liu C, et al. Investigation of microRNA expression in human serum during the aging process. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015 Jan;70(1):102–9.
296. Khalifa O, Pers Y-M, Ferreira R, Sénéchal A, Jorgensen C, Apparailly F, et al. X-Linked miRNAs Associated with Gender Differences in Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2016 Nov 8;17(11).
297. Wang F, Wang J, Yang X, Chen D, Wang L. MiR-424-5p participates in esophageal squamous cell carcinoma invasion and metastasis via SMAD7 pathway mediated EMT. *Diagn Pathol*. 2016 Sep 15;11(1):88.
298. Ma H, Lian M, Feng L, Li P, Hou L, Chen X, et al. Factors contributing to lymph node occult metastasis in supraglottic laryngeal carcinoma cT2-T4 N0M0 and metastasis predictive equation. *Chin J Cancer Res Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu*. 2014 Dec;26(6):685–91.
299. Sun X, Song Y, Tai X, Liu B, Ji W. MicroRNA expression and its detection in human supraglottic laryngeal squamous cell carcinoma. *Biomed Rep*. 2013 Sep;1(5):743–6.
300. Li P, Liu H, Wang Z, He F, Wang H, Shi Z, et al. MicroRNAs in laryngeal cancer: implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Am J Transl Res*. 2016;8(5):1935–44.
301. Zhang Y, Wang J. MicroRNAs are important regulators of drug resistance in colorectal cancer. *Biol Chem*. 2017 26;398(8):929–38.
302. Vrijens K, Bollati V, Nawrot TS. MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: a systematic review. *Environ Health Perspect*. 2015 May;123(5):399–411.
303. Bollati V, Marinelli B, Apostoli P, Bonzini M, Nordio F, Hoxha M, et al. Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes. *Environ Health Perspect*. 2010 Jun;118(6):763–8.
304. Odar K, Boštjančič E, Gale N, Glavač D, Zidar N. Differential expression of microRNAs miR-21, miR-31, miR-203, miR-125a-5p and miR-125b and proteins PTEN and p63 in verrucous carcinoma of the head and neck. *Histopathology*. 2012 Aug;61(2):257–65.
305. Wang P, Fu T, Wang X, Zhu W. [Primary, study of miRNA expression patterns in laryngeal carcinoma by microarray]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2010 Jun;24(12):535–8.
306. Jiao W, Leng X, Zhou Q, Wu Y, Sun L, Tan Y, et al. Different miR-21-3p isoforms and their different features in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2017 15;141(10):2103–11.
307. Xu W, Yang M, Gao M, Wu W, Fei Z. MiR-21-3p and miR-21-5p in tumor tissue as diagnostic biomarkers for gastric cancer. 2016 Jan 1;9:7195–201.
308. Dias F, Teixeira AL, Ferreira M, Adem B, Bastos N, Vieira J, et al. Plasmatic miR-210, miR-221 and miR-1233 profile: potential liquid biopsies candidates for renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Nov 28;8(61):103315–26.
309. Wang Y, Wu C, Zhang C, Li Z, Zhu T, Chen J, et al. TGF- β -induced STAT3 overexpression promotes human head and neck squamous cell carcinoma invasion and metastasis through malat1/miR-30a interactions. *Cancer Lett*. 2018 01;436:52–62.
310. Sun Y, Ma L. New Insights into Long Non-Coding RNA MALAT1 in Cancer and Metastasis. *Cancers*. 2019 Feb 13;11(2).

311. Xu S, Sui S, Zhang J, Bai N, Shi Q, Zhang G, et al. Downregulation of long noncoding RNA MALAT1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via the PI3K-AKT pathway in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):4881–91.
312. Han Y, Zhou L, Wu T, Huang Y, Cheng Z, Li X, et al. Downregulation of lncRNA-MALAT1 Affects Proliferation and the Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cell Line SHG139S. *Cell Mol Neurobiol*. 2016 Oct;36(7):1097–107.
313. Liu H, Wang H, Wu B, Yao K, Liao A, Miao M, et al. Down-regulation of long non-coding RNA MALAT1 by RNA interference inhibits proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017 Oct;44(10):1032–41.
314. Fang Z, Zhang S, Wang Y, Shen S, Wang F, Hao Y, et al. Long non-coding RNA MALAT-1 modulates metastatic potential of tongue squamous cell carcinomas partially through the regulation of small proline rich proteins. *BMC Cancer*. 2016 01;16:706.
315. Pang E-J, Yang R, Fu X, Liu Y. Overexpression of long non-coding RNA MALAT1 is correlated with clinical progression and unfavorable prognosis in pancreatic cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2015 Apr;36(4):2403–7.
316. Feng J, Tian L, Sun Y, Li D, Wu T, Wang Y, et al. Expression of long non-coding ribonucleic acid metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript-1 is correlated with progress and apoptosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol*. 2012 Sep 9;4:46.
317. Chang J, Xu W, Du X, Hou J. MALAT1 silencing suppresses prostate cancer progression by upregulating miR-1 and downregulating KRAS. *OncoTargets Ther*. 2018;11:3461–73.
318. Zhou X, Liu S, Cai G, Kong L, Zhang T, Ren Y, et al. Long Non Coding RNA MALAT1 Promotes Tumor Growth and Metastasis by inducing Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Sci Rep*. 2015 Nov 2;5:15972.
319. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2007 Mar;27(5):1859–67.
320. Lelli A, Nolan KA, Santambrogio S, Gonçalves AF, Schönenberger MJ, Guinot A, et al. Induction of long noncoding RNA MALAT1 in hypoxic mice. *Hypoxia Auckl NZ*. 2015;3:45–52.
321. Zhang X, Tang X, Hamblin MH, Yin K-J. Long Non-Coding RNA Malat1 Regulates Angiogenesis in Hindlimb Ischemia. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 11;19(6).
322. Huang S, Litt MD, Blakey CA. *Epigenetic Gene Expression and Regulation*. Academic Press; 2015. 484 p.
323. Fish JE, Srivastava D. MicroRNAs: opening a new vein in angiogenesis research. *Sci Signal*. 2009 Jan 6;2(52):pe1.
324. Li Y, Song Y-H, Li F, Yang T, Lu YW, Geng Y-J. MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Mar 27;381(1):81–3.
325. Ren J, Zhu D, Liu M, Sun Y, Tian L. Downregulation of miR-21 modulates Ras expression to promote apoptosis and suppress invasion of Laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2010 Dec;46(18):3409–16.
326. Sun Y, Xing X, Liu Q, Wang Z, Xin Y, Zhang P, et al. Hypoxia-induced autophagy reduces radiosensitivity by the HIF-1 α /miR-210/Bcl-2 pathway in colon cancer cells. *Int J Oncol*. 2015 Feb;46(2):750–6.
327. Schmidt LH, Görlich D, Spieker T, Rohde C, Schuler M, Mohr M, et al. Prognostic impact of Bcl-2 depends on tumor histology and expression of MALAT-1 lncRNA in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2014 Sep;9(9):1294–304.

328. Xu J, Li Y, Wang F, Wang X, Cheng B, Ye F, et al. Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. *Oncogene*. 2013 Feb 21;32(8):976–87.
329. Peng H-Y, Jiang S-S, Hsiao J-R, Hsiao M, Hsu Y-M, Wu G-H, et al. IL-8 induces miR-424-5p expression and modulates SOCS2/STAT5 signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *Mol Oncol*. 2016;10(6):895–909.
330. Wei H, Li Y, Ning Q, Suo Z-M. Regulation of miR-155 affects the invasion and migration of gastric carcinoma cells by modulating the STAT3 signaling pathway. *Oncol Lett*. 2018 Oct;16(4):4137–42.
331. Hu J, Ni S, Cao Y, Zhang T, Wu T, Yin X, et al. The Angiogenic Effect of microRNA-21 Targeting TIMP3 through the Regulation of MMP2 and MMP9. *PloS One*. 2016;11(2):e0149537.
332. Ai J-H, Li Y, Huang J-P, Chen G, Lin H-S, Shi J. MicroRNA-21 involves in VEGFR-1 activation induced epithelial-mesenchymal transition via Src in hepatocellular carcinoma. 2016 Feb 29;9:1708–15.
333. Du G, Cao D, Meng L. miR-21 inhibitor suppresses cell proliferation and colony formation through regulating the PTEN/AKT pathway and improves paclitaxel sensitivity in cervical cancer cells. *Mol Med Rep*. 2017 May;15(5):2713–9.
334. Pace E, Di Vincenzo S, Di Salvo E, Genovese S, Dino P, Sangiorgi C, et al. MiR-21 upregulation increases IL-8 expression and tumorigenesis program in airway epithelial cells exposed to cigarette smoke. *J Cell Physiol*. 2019 May 1;234.
335. Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Buffa R, Di Finizio D, Cesana BM, et al. Clinical relevance of expression of the CIP/KIP cell-cycle inhibitors p21 and p27 in laryngeal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999 Oct;17(10):3150–9.
336. Wang J-X, Liu Y, Jia X-J, Liu S-X, Dong J-H, Ren X-M, et al. Upregulation of circFLNA contributes to laryngeal squamous cell carcinoma migration by circFLNA–miR-486-3p-FLNA axis. *Cancer Cell Int*. 2019 Jul 29;19(1):196.
337. Cui J, Li H, Tian Y. Correlation between RECK gene methylation and the prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *J Med Postgrad*. 2014 Jan 1;(6):615–8.
338. Niu JT, Liu SG, Yan P, Li C. [Study on the mechanism of miR-497-induced laryngeal squamous cell carcinoma growth inhibition by targeting CDK6]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2019 Feb 7;54(2):126–32.
339. Sharma NR, Wang X, Majerciak V, Ajiro M, Kruhlak M, Meyers C, et al. Cell Type- and Tissue Context-dependent Nuclear Distribution of Human Ago2. *J Biol Chem*. 2016 Jan 29;291(5):2302–9.
340. da Silva TC, Polli JE, Swaan PW. The solute carrier family 10 (SLC10): beyond bile acid transport. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr;34(2–3):252–69.
341. Hazelett CC, Yeaman C. Sec5 and Exo84 mediate distinct aspects of RalA-dependent cell polarization. *PloS One*. 2012;7(6):e39602.
342. Lee H, Goodarzi H, Tavazoie SF, Alarcón CR. TMEM2 Is a SOX4-Regulated Gene That Mediates Metastatic Migration and Invasion in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2016 Sep 1;76(17):4994–5005.
343. Xie L, Yang Z, Li G, Shen L, Xiang X, Liu X, et al. Genome-Wide Identification of Bone Metastasis-Related MicroRNAs in Lung Adenocarcinoma by High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 Apr 8 [cited 2020 Apr 19];8(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3620207/>
344. Wu W, Tan W, Ye S, Zhou Y, Quan J. Analysis of the promoter region of the human miR-32 gene in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2019 Apr;17(4):3743–50.

345. Jeck W, Roque D, Hayes D, Dizon A, Clark L, Pierce S, et al. Frequency of multiple PIK3CA and PK3R1 concurrent mutations in endometrial cancers. *J Clin Oncol*. 2015 May 20;33:e16522–e16522.
346. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem*. 2010 Nov;56(11):1733–41.
347. Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Human Solid Tumors. *Cancer Lett*. 2013 Feb 28;329(2):125–36.
348. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA N Y N*. 2007 Oct;13(10):1668–74.
349. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834–8.
350. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008 May;141(5):672–5.
351. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Fälth M, Haese A, Steuber T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2011 Feb 1;128(3):608–16.
352. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29;105(30):10513–8.
353. Yu S, Liu Y, Wang J, Guo Z, Zhang Q, Yu F, et al. Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jun;97(6):2084–92.
354. Wang JL, Wang X, Yang D, Shi WJ. The Expression of MicroRNA-155 in Plasma and Tissue Is Matched in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Yonsei Med J*. 2016 Mar;57(2):298–305.
355. Yilmaz SS, Guzel E, Karatas OF, Yilmaz M, Creighton CJ, Ozen M. MiR-221 as a pre- and postoperative plasma biomarker for larynx cancer patients. *The Laryngoscope*. 2015 Dec;125(12):E377–381.
356. Li L-L, Qu L-L, Fu H-J, Zheng X-F, Tang C-H, Li X-Y, et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers of ALK-positive nonsmall cell lung cancer and predictors of response to crizotinib therapy. *Oncotarget*. 2017 Jul 11;8(28):45399–414.
357. Gu J, Zhang J, Zheng L, Ajani JA, Wu X, Ye Y. Serum miR-331-3p predicts tumor recurrence in esophageal adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2018 18;8(1):14006.
358. Herman A, Gruden K, Blejec A, Podpečan V, Motaln H, Rožman P, et al. Analysis of Glioblastoma Patients' Plasma Revealed the Presence of MicroRNAs with a Prognostic Impact on Survival and Those of Viral Origin. *PloS One*. 2015;10(5):e0125791.
359. Balzano F, Deiana M, Dei Giudici S, Oggiano A, Pasella S, Pinna S, et al. MicroRNA Expression Analysis of Centenarians and Rheumatoid Arthritis Patients Reveals a Common Expression Pattern. *Int J Med Sci*. 2017;14(7):622–8.
360. Qiang H, Zhan X, Wang W, Cheng Z, Ma S, Jiang C. A Study on the Correlations of the miR-31 Expression with the Pathogenesis and Prognosis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm*. 2019 Apr;34(3):189–95.
361. Zuo J, Wen M, Lei M, Peng X, Yang X, Liu Z. MiR-210 links hypoxia with cell proliferation regulation in human Laryngocarcinoma cancer. *J Cell Biochem*. 2015 Jun;116(6):1039–49.
362. Yin W, Wang P, Wang X, Song W, Cui X, Yu H, et al. Identification of microRNAs and mRNAs associated with multidrug resistance of human laryngeal cancer Hep-2 cells. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol*. 2013 Jun;46(6):546–54.

363. Tang H, Wu Z, Zhang J, Su B. Salivary lncRNA as a potential marker for oral squamous cell carcinoma diagnosis. *Mol Med Rep*. 2013 Mar;7(3):761–6.
364. He B, Zeng J, Chao W, Chen X, Huang Y, Deng K, et al. Serum long non-coding RNAs MALAT1, AFAP1-AS1 and AL359062 as diagnostic and prognostic biomarkers for nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Jun 20;8(25):41166–77.
365. Wu J, Li G, Wang Z, Yao Y, Chen R, Pu X, et al. Circulating MicroRNA-21 Is a Potential Diagnostic Biomarker in Gastric Cancer. *Dis Markers*. 2015;2015:435656.
366. Almeida ALNR de, Bernardes MVAA, Feitosa MR, Peria FM, Tirapelli DP da C, Rocha JJR da, et al. Serological under expression of microRNA-21, microRNA-34a and microRNA-126 in colorectal cancer. *Acta Cir Bras*. 2016;31 Suppl 1:13–8.
367. Olivieri F, Spazzafumo L, Santini G, Lazzarini R, Albertini MC, Rippon MR, et al. Age-related differences in the expression of circulating microRNAs: miR-21 as a new circulating marker of inflammaging. *Mech Ageing Dev*. 2012 Dec;133(11–12):675–85.
368. Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH, De S, Ejiogu N, Zhang Y, et al. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging*. 2013 Oct;5(10):725–40.
369. Lerner C, Wemmert S, Bochen F, Kulas P, Linxweiler M, Hasenfus A, et al. Characterization of miR-146a and miR-155 in blood, tissue and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma patients and their impact on cell proliferation and migration. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016 Apr;142(4):757–66.
370. Liu R, Liao J, Yang M, Shi Y, Peng Y, Wang Y, et al. Circulating miR-155 expression in plasma: a potential biomarker for early diagnosis of esophageal cancer in humans. *J Toxicol Environ Health A*. 2012;75(18):1154–62.
371. Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One*. 2009 Jul 14;4(7):e6229.
372. Farazi TA, Horlings HM, Ten Hoeve JJ, Mihailovic A, Halfwerk H, Morozov P, et al. MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res*. 2011 Jul 1;71(13):4443–53.
373. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006 Mar;9(3):189–98.
374. Wang G, Tam L-S, Li EK-M, Kwan BC-H, Chow K-M, Luk CC-W, et al. Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2010 Dec;37(12):2516–22.
375. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015 Feb;13(1):17–24.
376. Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Oct 14;111(41):14888–93.
377. Bhome R, Del Vecchio F, Lee G-H, Bullock MD, Primrose JN, Sayan AE, et al. Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. *Cancer Lett*. 2018 28;420:228–35.
378. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One*. 2012;7(3):e30679.
379. Matsumoto A, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Morishita M, Charoenviriyakul C, et al. Role of Phosphatidylserine-Derived Negative Surface Charges in the Recognition and Uptake of Intravenously Injected B16BL6-Derived Exosomes by Macrophages. *J Pharm Sci*. 2017;106(1):168–75.

380. Meckes DG, Shair KHY, Marquitz AR, Kung C-P, Edwards RH, Raab-Traub N. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 23;107(47):20370–5.
381. Eldh M, Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, Olsson B, Jernås M, et al. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PloS One*. 2010 Dec 17;5(12):e15353.
382. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PloS One*. 2008;3(11):e3694.
383. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654–9.
384. Tan SK, Pastori C, Penas C, Komotar RJ, Ivan ME, Wahlestedt C, et al. Serum long noncoding RNA HOTAIR as a novel diagnostic and prognostic biomarker in glioblastoma multiforme. *Mol Cancer*. 2018 20;17(1):74.
385. Berrondo C, Flax J, Kucherov V, Siebert A, Osinski T, Rosenberg A, et al. Expression of the Long Non-Coding RNA HOTAIR Correlates with Disease Progression in Bladder Cancer and Is Contained in Bladder Cancer Patient Urinary Exosomes. *PloS One*. 2016;11(1):e0147236.
386. Lucas Grzelczyk W, Szemraj J, Kwiatkowska S, Józefowicz-Korczyńska M. Serum expression of selected miRNAs in patients with laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). *Diagn Pathol*. 2019 May 28;14(1):49.
387. Guo L, Cai X, Hu W, Hua W, Yan W, Lin Y, et al. Expression and clinical significance of miRNA-145 and miRNA-218 in laryngeal cancer. *Oncol Lett*. 2019 Jul;18(1):764–70.
388. Ravegnini G, Cargnin S, Sammarini G, Zanotti F, Bermejo JL, Hrelia P, et al. Prognostic Role of miR-221 and miR-222 Expression in Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers*. 2019 Jul 11;11(7).
389. Wardle SL, Bailey MES, Kilikevicius A, Malkova D, Wilson RH, Venckunas T, et al. Plasma microRNA levels differ between endurance and strength athletes. *PloS One*. 2015;10(4):e0122107.
390. Liu C-J, Lin S-C, Yang C-C, Cheng H-W, Chang K-W. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2012 Feb;34(2):219–24.
391. Zhang T, Wang Q, Zhao D, Cui Y, Cao B, Guo L, et al. The oncogenetic role of microRNA-31 as a potential biomarker in oesophageal squamous cell carcinoma. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2011 Nov;121(10):437–47.
392. Chang K-W, Kao S-Y, Wu Y-H, Tsai M-M, Tu H-F, Liu C-J, et al. Passenger strand miRNA miR-31* regulates the phenotypes of oral cancer cells by targeting RhoA. *Oral Oncol*. 2013 Jan;49(1):27–33.
393. Lu Z, He Q, Liang J, Li W, Su Q, Chen Z, et al. miR-31-5p Is a Potential Circulating Biomarker and Therapeutic Target for Oral Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019 Jun 7;16:471–80.
394. (PDF) Plasma miR-21 and miR-31 as Predictive Biomarkers for Evaluation of Therapeutic Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer [Internet]. ResearchGate. [cited 2020 Mar 9]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/287147540_Plasma_miR-21_and_miR-31_as_Predictive_Biomarkers_for_Evaluation_of_Therapeutic_Efficacy_in_Metastatic_Color_ectal_Cancer
395. Ma Y, Chen Y, Lin J, Liu Y, Luo K, Cao Y, et al. Circulating miR-31 as an effective biomarker for detection and prognosis of human cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Apr 25;8(17):28660–71.

396. Liu C-J, Kao S-Y, Tu H-F, Tsai M-M, Chang K-W, Lin S-C. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Dis*. 2010 May;16(4):360–4.
397. Lu Y-C, Chang JT-C, Huang Y-C, Huang C-C, Chen W-H, Lee L-Y, et al. Combined determination of circulating miR-196a and miR-196b levels produces high sensitivity and specificity for early detection of oral cancer. *Clin Biochem*. 2015 Feb;48(3):115–21.
398. Tsai M-M, Wang C-S, Tsai C-Y, Huang C-G, Lee K-F, Huang H-W, et al. Circulating microRNA-196a/b are novel biomarkers associated with metastatic gastric cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2016;64:137–48.
399. Lai N -s, Wu D -g, Fang X -g, Lin Y -c, Chen S -s, Li Z -b, et al. Serum microRNA-210 as a potential noninvasive biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma. *Br J Cancer*. 2015 Mar 31;112(7):1241–6.
400. Nair J, Jain P, Chandola U, Palve V, Vardhan NRH, Reddy RB, et al. Gene and miRNA expression changes in squamous cell carcinoma of larynx and hypopharynx. *Genes Cancer*. 2015 Jul;6(7–8):328–40.
401. Zhang L, Xu Y, Jin X, Wang Z, Wu Y, Zhao D, et al. A circulating miRNA signature as a diagnostic biomarker for non-invasive early detection of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Nov;154(2):423–34.
402. Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M. The Interplay of MicroRNAs in the Inflammatory Mechanisms Following Ischemic Stroke. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2017 Jul 1;76(7):548–61.
403. Zhang D, Cao X, Li J, Zhao G. MiR-210 inhibits NF- κ B signaling pathway by targeting DR6 in osteoarthritis. *Sci Rep*. 2015 Aug 5;5:12775.
404. Wu R, Zeng J, Yuan J, Deng X, Huang Y, Chen L, et al. MicroRNA-210 overexpression promotes psoriasis-like inflammation by inducing Th1 and Th17 cell differentiation. *J Clin Invest*. 2018 01;128(6):2551–68.
405. Agulnik M. New approaches to EGFR inhibition for locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2012 Dec;29(4):2481–91.
406. Xiang M, Holsinger FC, Colevas AD, Chen MM, Le Q-T, Beadle BM. Survival of patients with head and neck cancer treated with definitive radiotherapy and concurrent cisplatin or concurrent cetuximab: A Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare analysis. *Cancer*. 2018 01;124(23):4486–94.
407. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006 Feb 9;354(6):567–78.
408. Shiga K, Ogawa T, Katagiri K, Yoshida F, Tateda M, Matsuura K, et al. Differences between oral cancer and cancers of the pharynx and larynx on a molecular level. *Oncol Lett*. 2012 Jan;3(1):238–43.
409. Nichols AC, Chan-Seng-Yue M, Yoo J, Xu W, Dhaliwal S, Basmaji J, et al. A Pilot Study Comparing HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinomas by Whole Exome Sequencing. *ISRN Oncol*. 2012;2012:809370.
410. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*. 2011 Aug 26;333(6046):1157–60.
411. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*. 2011 Aug 26;333(6046):1154–7.
412. de Miguel-Luken MJ, Chaves-Conde M, Carnero A. A genetic view of laryngeal cancer heterogeneity. *Cell Cycle Georget Tex*. 2016 02;15(9):1202–12.

413. Chau NG, Li YY, Jo VY, Rabinowits G, Lorch JH, Tishler RB, et al. Incorporation of Next-Generation Sequencing into Routine Clinical Care to Direct Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 15;22(12):2939–49.
414. Nagahashi M, Shimada Y, Ichikawa H, Kameyama H, Takabe K, Okuda S, et al. Next generation sequencing-based gene panel tests for the management of solid tumors. *Cancer Sci*. 2019 Jan;110(1):6–15.
415. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):749–58.
416. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*. 1989 Apr 14;244(4901):217–21.
417. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989 Jun 30;57(7):1083–93.
418. Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(22):8763–7.
419. Bargonetti J, Prives C. Gain-of-function mutant p53: history and speculation. *J Mol Cell Biol*. 2019 Jul 19;11(7):605–9.
420. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979 May;17(1):43–52.
421. Oren M, Levine AJ. Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jan;80(1):56–9.
422. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999 Dec 13;18(53):7621–36.
423. Kamaraj B, Bogaerts A. Structure and Function of p53-DNA Complexes with Inactivation and Rescue Mutations: A Molecular Dynamics Simulation Study. *PloS One*. 2015;10(8):e0134638.
424. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15–6.
425. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):323–31.
426. Moulder DE, Hatoum D, Tay E, Lin Y, McGowan EM. The Roles of p53 in Mitochondrial Dynamics and Cancer Metabolism: The Pendulum between Survival and Death in Breast Cancer? *Cancers*. 2018 Jun 8;10(6).
427. Bradford CR, Zhu S, Poore J, Fisher SG, Beals TF, Thoraval D, et al. p53 mutation as a prognostic marker in advanced laryngeal carcinoma. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Cooperative Study Group. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997 Jun;123(6):605–9.
428. Pickering CR, Zhang J, Yoo SY, Bengtsson L, Moorthy S, Neskey DM, et al. Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discov*. 2013 Jul;3(7):770–81.
429. Zhou G, Liu Z, Myers JN. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *J Cell Biochem*. 2016;117(12):2682–92.
430. Malekzadeh P, Pasetto A, Robbins PF, Parkhurst MR, Paria BC, Jia L, et al. Neoantigen screening identifies broad TP53 mutant immunogenicity in patients with epithelial cancers. *J Clin Invest*. 2019 01;129(3):1109–14.
431. Neskey DM, Osman AA, Ow TJ, Katsonis P, McDonald T, Hicks SC, et al. Evolutionary Action Score of TP53 Identifies High-Risk Mutations Associated with

- Decreased Survival and Increased Distant Metastases in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 2015 Apr 1;75(7):1527–36.
432. Osman AA, Neskey DM, Katsonis P, Patel AA, Ward AM, Hsu T-K, et al. Evolutionary Action Score of TP53 Coding Variants Is Predictive of Platinum Response in Head and Neck Cancer Patients. *Cancer Res.* 2015 Apr 1;75(7):1205–15.
433. Chun YS, Passot G, Yamashita S, Nusrat M, Katsonis P, Loree JM, et al. Deleterious Effect of RAS and Evolutionary High-risk TP53 Double Mutation in Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg.* 2019;269(5):917–23.
434. Petrini I. Biology of MET: a double life between normal tissue repair and tumor progression. *Ann Transl Med.* 2015 Apr;3(6):82.
435. Citron F, Armenia J, Franchin G, Polesel J, Talamini R, D'Andrea S, et al. An Integrated Approach Identifies Mediators of Local Recurrence in Head and Neck Squamous Carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2017 Jul 15;23(14):3769–80.
436. Ma PC, Tretiakova MS, MacKinnon AC, Ramnath N, Johnson C, Dietrich S, et al. Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008 Dec;47(12):1025–37.
437. Lee JH, Han SU, Cho H, Jennings B, Gerrard B, Dean M, et al. A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene.* 2000 Oct 12;19(43):4947–53.
438. Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, Zhu W, Bhawe K, Mendoza N, et al. Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):283–9.
439. Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res.* 2003 Oct 1;63(19):6272–81.
440. Mak HHL, Peschard P, Lin T, Naujokas MA, Zuo D, Park M. Oncogenic activation of the Met receptor tyrosine kinase fusion protein, Tpr-Met, involves exclusion from the endocytic degradative pathway. *Oncogene.* 2007 Nov 8;26(51):7213–21.
441. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014 Jul 31;511(7511):543–50.
442. Tang C, Jardim DLF, Falchook GS, Hess K, Fu S, Wheler JJ, et al. MET nucleotide variations and amplification in advanced ovarian cancer: characteristics and outcomes with c-Met inhibitors. *Oncoscience.* 2014;1(1):5–13.
443. Nagahashi M, Sato S, Yuza K, Shimada Y, Ichikawa H, Watanabe S, et al. Common driver mutations and smoking history affect tumor mutation burden in lung adenocarcinoma. *J Surg Res.* 2018;230:181–5.
444. Garufi A, Trisciuglio D, Porru M, Leonetti C, Stoppacciaro A, D'Orazi V, et al. A fluorescent curcumin-based Zn(II)-complex reactivates mutant (R175H and R273H) p53 in cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2013 Oct 7;32:72.
445. Tu C-Y, Cheng F-J, Chen C-M, Wang S-L, Hsiao Y-C, Chen C-H, et al. Cigarette smoke enhances oncogene addiction to c-MET and desensitizes EGFR-expressing non-small cell lung cancer to EGFR TKIs. *Mol Oncol.* 2018;12(5):705–23.
446. Jiang X, Ye J, Dong Z, Hu S, Xiao M. Novel genetic alterations and their impact on target therapy response in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2019;11:1321–36.
447. Seiwert TY, Jagadeeswaran R, Faoro L, Janamanchi V, Nallasura V, El Dinali M, et al. The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2009 Apr 1;69(7):3021–31.

448. Stabile LP, He G, Lui VWY, Thomas S, Henry C, Gubish CT, et al. c-Src activation mediates erlotinib resistance in head and neck cancer by stimulating c-Met. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013 Jan 15;19(2):380–92.
449. Loyo M, Li RJ, Bettegowda C, Pickering CR, Frederick MJ, Myers JN, et al. Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head Neck*. 2013 Mar;35(3):454–63.
450. Posner MR, Lorch JH, Goloubeva O, Tan M, Schumaker LM, Sarlis NJ, et al. Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2011 May;22(5):1071–7.
451. Larque AB, Conde L, Hakim S, Alos L, Jares P, Vilaseca I, et al. P16(INK^{4a}) overexpression is associated with CDKN2A mutation and worse prognosis in HPV-negative laryngeal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2015 Apr;466(4):375–82.
452. Sinha P, Thorstad WT, Nussenbaum B, Haughey BH, Adkins DR, Kallogjeri D, et al. Distant metastasis in p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: a critical analysis of patterns and outcomes. *Oral Oncol*. 2014 Jan;50(1):45–51.
453. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell*. 2004 May;5(5):489–500.
454. Li Z, Gonzalez CL, Wang B, Zhang Y, Mejia O, Katsonis P, et al. Cdkn2a suppresses metastasis in squamous cell carcinomas induced by the gain-of-function mutant p53(R172H). *J Pathol*. 2016;240(2):224–34.
455. Loo JCY, Liu L, Hao A, Gao L, Agatep R, Shennan M, et al. Germline splicing mutations of CDKN2A predispose to melanoma. *Oncogene*. 2003 Sep 25;22(41):6387–94.
456. Helgadottir H, Ghiorzo P, van Doorn R, Puig S, Levin M, Kefford R, et al. Efficacy of novel immunotherapy regimens in patients with metastatic melanoma with germline CDKN2A mutations. *J Med Genet*. 2018 Oct 5;
457. Soufir N, Daya-Grosjean L, de La Salmonière P null, Moles JP, Dubertret L, Sarasin A, et al. Association between INK4a-ARF and p53 mutations in skin carcinomas of xeroderma pigmentosum patients. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Nov 15;92(22):1841–7.
458. Lui VWY, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov*. 2013 Jul;3(7):761–9.
459. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019 16;380(20):1929–40.
460. Feldman R, Gatalica Z, Knezetic J, Reddy S, Nathan C-A, Javadi N, et al. Molecular profiling of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016;38 Suppl 1:E1625-1638.
461. Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 18;102(3):802–7.
462. Soulières D, Faivre S, Mesía R, Remenár É, Li S-H, Karpenko A, et al. Buparlisib and paclitaxel in patients with platinum-pretreated recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (BERIL-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(3):323–35.
463. Fokas E, Im JH, Hill S, Yameen S, Stratford M, Beech J, et al. Dual inhibition of the PI3K/mTOR pathway increases tumor radiosensitivity by normalizing tumor vasculature. *Cancer Res*. 2012 Jan 1;72(1):239–48.
464. Psyrri A, Lee J-W, Pectasides E, Vassilakopoulou M, Kosmidis EK, Burtneess BA, et al. Prognostic biomarkers in phase II trial of cetuximab-containing induction and chemoradiation

- in resectable HNSCC: Eastern cooperative oncology group E2303. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2014 Jun 1;20(11):3023–32.
465. Misiukiewicz K, Dang RP, Parides M, Camille N, Uczkowski H, Sarlis NJ, et al. Endothelial growth factor receptor inhibitors in recurrent metastatic cancer of the head and neck. *Head Neck.* 2016;38 Suppl 1:E2221-2228.
466. Zhao J, Tang J, Men W, Ren K. FBXW7-mediated degradation of CCDC6 is impaired by ATM during DNA damage response in lung cancer cells. *FEBS Lett.* 2012 Dec 14;586(24):4257–63.
467. Cheng Y, Chen G, Martinka M, Ho V, Li G. Prognostic significance of Fbw7 in human melanoma and its role in cell migration. *J Invest Dermatol.* 2013 Jul;133(7):1794–802.
468. Gong J, Zhou Y, Liu D, Huo J. F-box proteins involved in cancer-associated drug resistance. *Oncol Lett.* 2018 Jun;15(6):8891–900.
469. Jardim DL, Wheler JJ, Hess K, Tsimberidou AM, Zinner R, Janku F, et al. FBXW7 mutations in patients with advanced cancers: clinical and molecular characteristics and outcomes with mTOR inhibitors. *PloS One.* 2014;9(2):e89388.
470. Kuo MY, Jeng JH, Chiang CP, Hahn LJ. Mutations of Ki-ras oncogene codon 12 in betel quid chewing-related human oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* 1994 Feb;23(2):70–4.
471. Zhang Z-C, Fu S, Wang F, Wang H-Y, Zeng Y-X, Shao J-Y. Oncogene mutational profile in nasopharyngeal carcinoma. *OncoTargets Ther.* 2014;7:457–67.
472. Kodaz H, Kostek O, Hacıoglu MB, Erdogan B, Elpen Kodaz C, Hacibekiroglu I, et al. Frequency of Ras Mutations (Kras, Nras, Hras) in Human Solid Cancer. *EURASIAN J Med Oncol.* 2017;1(1):1–7.
473. Saranath D, Bhoite LT, Deo MG. Molecular lesions in human oral cancer: the Indian scene. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1993 Apr;29B(2):107–12.
474. Bissada E, Abboud O, Abou Chacra Z, Guertin L, Weng X, Nguyen-Tan PF, et al. Prevalence of K-RAS Codons 12 and 13 Mutations in Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Impact on Clinical Outcomes. *Int J Otolaryngol.* 2013;2013:848021.
475. Paterson IC, Eveson JW, Prime SS. Molecular changes in oral cancer may reflect aetiology and ethnic origin. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996 May;32B(3):150–3.
476. Rothenberg ML, LaFleur B, Levy DE, Washington MK, Morgan-Meadows SL, Ramanathan RK, et al. Randomized phase II trial of the clinical and biological effects of two dose levels of gefitinib in patients with recurrent colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005 Dec 20;23(36):9265–74.
477. Rizzo G, Black M, Mymryk JS, Barrett JW, Nichols AC. Defining the genomic landscape of head and neck cancers through next-generation sequencing. *Oral Dis.* 2015 Jan;21(1):e11-24.
478. Ryan MB, Corcoran RB. Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(11):709–20.
479. Manterola L, Aguirre P, Larrea E, Arestín M, Gaafar A, Elorriaga K, et al. Mutational profiling can identify laryngeal dysplasia at risk of progression to invasive carcinoma. *Sci Rep.* 2018 26;8(1):6613.
480. Wong T-S, Gao W, Li Z-H, Chan JY-W, Ho W-K. Epigenetic dysregulation in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Oncol.* 2012;2012:739461.
481. Bojesen SE, Nordestgaard BG. The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle Georget Tex.* 2008 Jan 15;7(2):158–63.
482. Fernández-Mateos J, Seijas-Tamayo R, Adansa Klain JC, Pastor Borgoñón M, Pérez-Ruiz E, Mesía R, et al. Genetic Susceptibility in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Spanish Population. *Cancers.* 2019 Apr 7;11(4).

483. Adduri RSR, Katamoni R, Pandilla R, Madana SN, Paripati AK, Kotapalli V, et al. TP53 Pro72 allele is enriched in oral tongue cancer and frequently mutated in esophageal cancer in India. *PloS One*. 2014;9(12):e114002.
484. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Greco G, Mussi A, et al. Prognostic impact of p53 Pro72 homozygous genotype in non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep*. 2008 Mar;19(3):771–3.
485. Silva IP, Salhi A, Giles KM, Vogelsang M, Han SW, Ismaili N, et al. Identification of a Novel Pathogenic Germline KDR Variant in Melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 15;22(10):2377–85.
486. Park H-W, Lee J-E, Shin E-S, Lee J-Y, Bahn J-W, Oh H-B, et al. Association between genetic variations of vascular endothelial growth factor receptor 2 and atopy in the Korean population. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Apr;117(4):774–9.
487. Ravegnini G, Nannini M, Zenesini C, Simeon V, Sammarini G, Urbini M, et al. An exploratory association of polymorphisms in angiogenesis-related genes with susceptibility, clinical response and toxicity in gastrointestinal stromal tumors receiving sunitinib after imatinib failure. *Angiogenesis*. 2017 Feb;20(1):139–48.
488. Markovic-Mueller S, Stutfeld E, Asthana M, Weinert T, Bliven S, Goldie KN, et al. Structure of the Full-length VEGFR-1 Extracellular Domain in Complex with VEGF-A. *Struct Lond Engl* 1993. 2017 07;25(2):341–52.
489. Yim E, An HJ, Cho U, Kim Y, Kim SH, Choi Y-G, et al. Two different KIT mutations may lead to different responses to imatinib in metastatic gastrointestinal stromal tumor. *Korean J Intern Med*. 2018;33(2):432–4.
490. Brahmi M, Alberti L, Dufresne A, Ray-Coquard I, Cassier P, Meeus P, et al. KIT exon 10 variant (c.1621 A > C) single nucleotide polymorphism as predictor of GIST patient outcome. *BMC Cancer*. 2015 Oct 24;15:780.
491. Feng Z, Zhang C, Wu R, Hu W. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol*. 2011 Feb;3(1):44–50.
492. Hermeking H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2012 Sep;12(9):613–26.
493. Dong P, Karaayvaz M, Jia N, Kaneuchi M, Hamada J, Watari H, et al. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene*. 2013 Jul 4;32(27):3286–95.
494. Wang W, Cheng B, Miao L, Mei Y, Wu M. Mutant p53-R273H gains new function in sustained activation of EGFR signaling via suppressing miR-27a expression. *Cell Death Dis*. 2013 Apr 4;4:e574.
495. Subramanian M, Francis P, Bilke S, Li XL, Hara T, Lu X, et al. A mutant p53/let-7i-axis-regulated gene network drives cell migration, invasion and metastasis. *Oncogene*. 2015 Feb 26;34(9):1094–104.
496. Tucci P, Agostini M, Grespi F, Markert EK, Terrinoni A, Vousden KH, et al. Loss of p63 and its microRNA-205 target results in enhanced cell migration and metastasis in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 18;109(38):15312–7.
497. Donzelli S, Fontemaggi G, Fazi F, Di Agostino S, Padula F, Biagioni F, et al. MicroRNA-128-2 targets the transcriptional repressor E2F5 enhancing mutant p53 gain of function. *Cell Death Differ*. 2012 Jun;19(6):1038–48.
498. Neilsen PM, Noll JE, Mattiske S, Bracken CP, Gregory PA, Schulz RB, et al. Mutant p53 drives invasion in breast tumors through up-regulation of miR-155. *Oncogene*. 2013 Jun 13;32(24):2992–3000.
499. Zhang C, Zhang J, Zhang A, Wang Y, Han L, You Y, et al. PUMA is a novel target of miR-221/222 in human epithelial cancers. *Int J Oncol*. 2010 Dec;37(6):1621–6.

500. Gunasekharan V, Laimins LA. Human papillomaviruses modulate microRNA 145 expression to directly control genome amplification. *J Virol*. 2013 May;87(10):6037–43.
501. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*. 2008 Mar 13;27(12):1788–93.
502. Sempere LF, Christensen M, Silahdaroglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, et al. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res*. 2007 Dec 15;67(24):11612–20.
503. Wang X, Tang S, Le S-Y, Lu R, Rader JS, Meyers C, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PloS One*. 2008 Jul 2;3(7):e2557.
504. Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárata R, Ramirez N, et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer*. 2006 Jul 19;5:29.
505. Takagi T, Iio A, Nakagawa Y, Naoe T, Tanigawa N, Akao Y. Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers. *Oncology*. 2009;77(1):12–21.
506. Pollutri D, Gramantieri L, Bolondi L, Fornari F. TP53/MicroRNA Interplay in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 2;17(12).
507. Liu J, Zhang C, Zhao Y, Feng Z. MicroRNA Control of p53. *J Cell Biochem*. 2017;118(1):7–14.
508. Suh SO, Chen Y, Zaman MS, Hirata H, Yamamura S, Shahryari V, et al. MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2011 May;32(5):772–8.
509. Karatas OF, Yuceturk B, Suer I, Yilmaz M, Cansiz H, Solak M, et al. Role of miR-145 in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016 Feb;38(2):260–6.
510. Ding Y, Wu Y, Gao W, Zhang C, Zhao Q, Guo H, et al. Analysis of gene expression profiling variations induced by hsa-miR-145-5p-overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma cell line Tu-177. *Mol Med Rep*. 2017 Nov;16(5):5863–70.
511. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002 Oct 21;21(48):7435–51.
512. Ganci F, Sacconi A, Bossel Ben-Moshe N, Mancio V, Sperduti I, Strigari L, et al. Expression of TP53 mutation-associated microRNAs predicts clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013 Dec;24(12):3082–8.
513. Wang F, Shan S, Huo Y, Xie Z, Fang Y, Qi Z, et al. MiR-155-5p inhibits PDK1 and promotes autophagy via the mTOR pathway in cervical cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;99:91–9.
514. Vojtechova Z, Zavadil J, Klozar J, Grega M, Tachezy R. Comparison of the miRNA expression profiles in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tonsillar tumors. *PloS One*. 2017;12(6):e0179645.
515. Chernyy V, Pustyl'nyak V, Kozlov V, Gulyaeva L. Increased expression of miR-155 and miR-222 is associated with lymph node positive status. *J Cancer*. 2018;9(1):135–40.
516. Van Roosbroeck K, Fanini F, Setoyama T, Ivan C, Rodriguez-Aguayo C, Vannini I, et al. A miR-155/TP53 regulatory feedback loop involved in resistance to therapy in lung cancer and leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Jun 1;23(11):2891–904.
517. Chang A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer Amst Neth*. 2011 Jan;71(1):3–10.
518. Garcia-Manero G, Kantarjian HM. The hyper-CVAD regimen in adult acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000 Dec;14(6):1381–96, x–xi.

519. Wang Y, Zheng Z-J, Jia Y-J, Yang Y-L, Xue Y-M. Role of p53/miR-155-5p/sirt1 loop in renal tubular injury of diabetic kidney disease. J Transl Med. 2018 30;16(1):146.

Електронни източници:

- E1. <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/patient/adult/laryngeal-treatment-pdq>
- E2. <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>
- E3. <https://gco.iarc.fr/>
- E4. <https://www.sbaloncology.bg>
- E5. <https://voicefoundation.org/>
- E6. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Table4.pdf>.
- E7. <http://bioinformatics.ustc.edu.cn/lncreg/>
- E8. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggcorrplot/ggcorrplot.pdf>
- E9. https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2007/