

## МАЛКИТЕ РИБОНУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ КАТО ПОТЕНЦИАЛНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ЛАРИНГЕАЛЕН КАРЦИНОМ

*С. Гирагосян, Ив. Попов, Г. Станчева, В. Митев и Р. Кънева*

*Център по молекулна медицина, Катедра „Медицинска химия и биохимия“, Медицински факултет,  
Медицински университет – София*

## SMALL RIBONUCLEIC ACIDS AS POTENTIAL BIOMARKERS IN LARYNGEAL CANCER

*S. Giragosyan, Iv. Popov, G. Stancheva, V. Mitev and R. Kaneva*

*Molecular Medicine Center, Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty,  
Medical University – Sofia*

**Резюме.** Ларингеалният плоскоклетъчен карцином (ЛПКК) е един от най-често срещаните карциноми на главата и шията. ЛПКК се характеризира с висока честота в България и Европа, съответно 8,9/100 000 и 3,2/100 000. Не се наблюдава промяна в преживяемостта през последните години въпреки съвременните подходи на лечение. Затова е необходимо да се установят биомаркери, които успешно да се прилагат в клиничната и медико-биологичната практика при диагностициране и терапия на пациенти с ЛПКК. Микро-РНК са малки не кодиращи последователности, които активно участват в регулацията на клетъчните процеси. Променени нива на експресия често се наблюдават при карциноми на глава и шия, включително и при ЛПКК, както в тъканни проби, така и в проби от плазма, серум и слюнка. Установено е, че микро-РНК могат да имат онкогенна или тумор-супресорна функция в канцерогенезата на ЛПКК, което ги прави атрактивни като молекулни биомаркери. В обзора синтезираме познанията за променените нива на експресия на микро-РНК при пациенти с ЛПКК и при злокачествени клетъчни линии и техния потенциал като неинвазивни биомаркери в клиничната практика, както и ролята им в процесите на резистентност към лечение.

**Ключови думи:** рак на ларинкса, микро-РНК, експресия, неинвазивни маркери, резистентност

**Адрес за кореспонденция:** С. Гирагосян, [sggiragosyan@abv.bg](mailto:sggiragosyan@abv.bg)

**Abstract.** Laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is one of the most common cancers of the head and neck. LSCC is characterized by a high frequency in Bulgaria and Europe, 8.9/100 000 and 3.2/100 000, respectively. No change was observed in the survival, despite the introduction of modern approaches in treatment. It is therefore necessary to establish biomarkers that can be successfully applied in clinical and medical-biological practice for the diagnosis and therapy of patients with LSCC. Micro RNAs are small non-coding sequences that are actively involved in the regulation of cellular processes. Altered expression levels are commonly seen in cancers of the head and neck, including the LSCC, in both tissue samples and in samples of plasma, serum and saliva. It was found that micro RNAs may have oncogenic or tumor suppressor functions in the carcinogenesis of LSCC, which makes them attractive as molecular biomarkers. In this review we summarize current knowledge of the altered expression levels of micro RNAs in patients with LSCC and in malignant cell lines, and their potential as noninvasive biomarkers in clinical practice and their role in the processes of resistance to treatment.

**Key words:** laryngeal cancer, micro RNA, expression, noninvasive markers, resistance

**Address for correspondence:** S. Giragosyan, [sggiragosyan@abv.bg](mailto:sggiragosyan@abv.bg)

## ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът на ларинкса е вторият по честота карцином от групата на раковите заболявания, обхващащи главата и шията. Раковите заболявания, засягащи ларинкса, съставляват около 2,4% от всички неоплазми в световен мащаб [1]. Въпреки че плоскоклетъчните карциноми на главата и шията се разглеждат като едно цяло, Американската ракова асоциация разграничава ларинкса и фаринкса от тази обща група органи [2]. Голяма част от ларингеалните карциноми се отнасят към плоскоклетъчните. Въпреки лечението на ларингеален карцином посредством валидираните методи: радиолечение, хирургична намеса и химиолечение или комбинирани подходи, не се наблюдава тенденция за подобрене през последните десетилетия за пациентите в късен етап от развитието на ларингеален карцином [3]. Според данни на Международната асоциация за ракови регистри (GLOBCAN, 2012, IACR) за 2012 в световен мащаб са регистрирани 160 000 случая от рак на ларинкса [4], като честотата на заболяемост от ларингеален карцином в Европа е 3,2/100 000 (данни и за двата пола). България се нарежда на пето място по честота на заболяемост и смъртност от рак на ларинкса в Европа [5]. Според „Годишник на заболяемостта от злокачествени новообразувания в България за 2013 г.“ са диагностицирани 593 пациенти, като честотата и за двата пола на ларингеални карциноми в България се равнява на 8,9/100 000, а смъртността – 5,6 на 100 000 души [6]. Смъртността от ЛПКК остава висока, с петгодишна преживяемост около 64%. Една от причините за това е диагностицирането в късен етап от развитието на болестта. Злоупотребата с тютюнопушене и алкохол се смятат за основните рискови фактори [7]. През последните години с развитието на ларингеален карцином все повече се свързва и човешкият папиломен вирус (ЧПВ) [8].

С откриването на микро-РНК (още означавани miRNAs или miRs) се промени разбирането на молекулните процеси, включени в рамките на канцерогенезата. С активното им изучаване се установи, че те биха имали ролята на потенциални биомаркери за диагностика и прогнозиране на патологични процеси.

Микро-РНК са некодиращи рибонуклеинови киселини с къса нуклеотидна последователност от около 20-24 нуклеотида, които имат важна роля в биологичните клетъчни процеси на организмите. Установено е, че микро-РНК влияят върху редица раковозависими процеси, като клетъчно делене, контрол върху клетъчния цикъл, апоптоза, диференциация, миграция и метаболизъм на раковите клетки [9]. След последното обновяване на базата

данни за микро-РНК miRBase (версия 21.0, обновена юли 2014), броят на микро-РНК-прекурсорите е 1881 и са познати 2588 зрели човешки микро-РНК [10]. Потенциалът на микро-РНК е огромен, тъй като те участват в miRNA зависима регулация на генната експресия и за повече от 30% от иРНК е докладвано, че са под контрола на микро-РНК [11].

Голяма част от гените, кодиращи микро-РНК, са разположени в ракови свързани региони или хромозомно нестабилни области [12]. Специфични характеристики на микро-РНК се свързват с определени типове солидни тумори и хематологични злокачествени заболявания [13]. Микро-РНК могат да действат като тумор-супресорни гени, ако загубят функция, и като онкогени, ако придобият такава, което води до трансформация на нормална клетка в злокачествена. Загубата или придобиването на функция може да се осъществи по няколко начина, включващи мутации, делеции, епигенетично заглушаване или повреда при процесирването на микро-РНК [14, 15].

През последното десетилетие са предложени редица методи за анализиране на експресионните нива с цел идентифициране на микро-РНК като биомаркери, характеризиращи заболявания при човека [16, 17]. По-голямата част от изследванията в областта на биомаркерите са насочени към ДНК генетични промени, иРНК и белтъчния синтез, но въпреки това някои автори смятат, че малките регулаторни РНК са по-подходящи маркери, поради тяхната стабилна структура [18], което би позволило достъпна детекция.

По-задълбоченото познание и разбиране на потенциалните молекулни маркери при ларингеален карцином цели идентифицирането на нови клинични способности за предсказване на прогнозата и терапевтичната ефективност, както и дизайна на таргетна терапия за заболяванията. В този обзор ние обобщаваме познанието за микро-РНК като биомаркери, както и онкогенния им потенциал при плоскоклетъчен ларингеален карцином.

## МИКРО-РНК ПРИ ЛАРИНГЕАЛЕН КАРЦИНОМ

Редица са причините, поради които се смята, че микро-РНК могат да служат като идеален биомаркер при откриване на раково заболяване: 1) експресията на микро-РНК често е с променена регулация [19, 20]; 2) експресионният модел на микро-РНК при човешки рак изглежда тъканно специфичен [21]; 3) микро-РНК имат висока стабилност, дори и при формалин фиксирани тъкани [22]. Изследвания в областта докладват потенциалната роля на микро-РНК като биомаркери при различни ракови заболявания, включващи рак на дебелото черво, рак на

гърдата и хепатоклетъчни неоплазии [23-26]. Днес са познати много микро-РНК, за които е установено, че имат тумор-супресорна (tsmiRs) или онкогенна функция (oncomiRs), както и тяхното активно участие в туморогенезата. На табл. 1 са представени част от публикуваните данни за микро-РНК, свър-

зани с ларингеален карцином, изследвани в човешки ларингеални злокачествени клетъчни линии и тъканен материал. Голяма част от изследванията включват ларингеалния карцином в общата група плоскоклетъчни заболявания на глава и шия и не го разглеждат като отделен тип раково заболяване.

**Таблица 1. Микро-РНК с променена експресия при ларингеален карцином**

Източник	miRNA и промяна в експресията	Функционално значение според авторите
[27]	let-7a↓	let-7a може да потисне експресията на RAS и c-MYC. Let-7a също участва в индуцирането на апоптоза при ларингеални ракови клетки
[28]	miR-27a↑	miR-27a е онкогенна посредством потискане на PLK2 и е подходяща цел за развитието на таргетна терапия
[29] и [30]	miR-21↑ miR-106b↑ miR-375↓	miR-21, miR-106b и miR-375 имат ролята на потенциални биомаркери в диагностицирането на ЛПКК. Инхибирането на miR-21 води до намалени белтъчни нива на Ras и има роля на тумор-супресор при клетъчната пролиферация и инвазия
[31]	miR-196a↑	Експресионните нива на miR-196a са значително високи в ранен етап от развитие на тумора (T1a), което предполага, че тя може да служи като важен маркер за ранно откриване на ларингеален карцином. Високи нива на miR-196a активират клетъчната пролиферация
[32]	miR-34a↓	miR-34a значително потиска клетъчната пролиферация посредством задържане на G0/G1 фаза от клетъчния цикъл
[33]	miR-34c↓	miR34c има роля в канцерогенезата посредством прицелната ѝ молекула c-Met
[34]	miR-145↓	Свърхекспресията на miR-145 води до потискане на пролиферацията и миграцията, чрез индуциране на апоптоза и задържане на клетъчния цикъл. Важен регулатор на SOX2, който има роля при ЛПКК туморогенезата
[35]	miR-203↑	miR-203 инхибира пролиферацията на ларингеален карцином посредством survivin, предполагайки потенциална роля в антираковите терапии
[36]	miR-206↓	Обратна корелация е установена между miR-206 и T-стадия, лимфните метастази и клиничния етап при ЛПКК. Трансфекция с miR-206 потиска експресията на VEGF, което определя и нейната тумор-супресорна функция
[37]	miR-16↑	Прицелна молекула на miR-16 е zyxin, с което се потиска клетъчната миграция и се повишава клетъчната адхезия

Long et al. (2009) за пръв път докладват намалена експресия на let-7a при тъканни проби от биопсия и ларингеална злокачествена клетъчна линия Нер-2 [27]. Микро-РНК let-7a е открита през 2000 г. и е една от най-активно изучаваните тумор-супресорни микро-РНК [38]. Човешката let-7 има няколко изоформи и при човешки рак е установено, че обикновено е с намалена експресия, което предполага тумор-супресорната ѝ роля. Let-7a е с потисната функция както при ларингеален плоскоклетъчен карцином, така и при ларингеална злокачествена клетъчна линия Нер-2. Let-7 участва в потискане на клетъчната пролиферация и индуциране на апоптоза. Предизвикване на свърхекспресия на let-7 в злокачествени ларингеални клетъчни линии довежда до потискане на RAS и c-MYC белтъчните нива. В допълнение експресията на let-7 се свързва с потенциална чувствителност на ЛПКК към лъче- или химиолечение [27].

Друга микро-РНК, активно изследвана при редица ракови заболявания, свързвана със злокачествената прогресия и процеси като клетъчна

пролиферация, апоптоза, клетъчна инвазия и метастазиране, е miR-21 [30,39-43]. Действието на miR-21 се свързва с контрол на експресията на PTEN, TPM1 и PDCD4 при ракови клетки [43-45] и това предполага нейната онкогенна функция. Ren et al. (2010) за пръв път изследват повишената експресия на miR-21 при проби от ЛПКК с помощта на количествен PCR в реално време [30]. Освен това независими изследвания, основани върху използването на различни методи, подкрепят резултатите за променената регулация на miR-21 при ЛПКК тъкани и клетъчни линии [29, 46, 47].

MiR-21 и miR-375 често са с променена експресия при плоскоклетъчни карциноми [48-51], включително и при ларингеален плоскоклетъчен карцином [52]. Според Hu et al. (2015) съотношението между miR-21 и miR-375 демонстрира висок дискриминативен потенциал, с чувствителност 94% и специфичност 94% за разграничаване на туморна от нормална тъкан. В допълнение са установени високи нива на експресия в сравнение с началните стадии на развитие (I-II) ( $p = 0,006$ ). Тези резултати

предполагат, че съотношението на тези две микро-РНК може да има значителен клиничен потенциал и би служило за предсказване злокачествеността на ларингеалните тумори ( $p = 0,032$ ) [53]. За пациенти, диагностицирани със супраглотисен ларингеален тумор, е установено, че експресията на miR-375 е по-ниска в сравнение с глотисните тумори и се свързва и с прекомерната консумация на алкохол [47].

Свързана експресия на miR-155 също се наблюдава при различни туморни образувания, като левкемия и лимфом [54], рак на гърдата [55], рак на панкреаса [56], рак на белия дроб [57] и плоскоклетъчни карциноми на глава и шия [50, 58-60]. Функционални изследвания установяват, че miR-155 се свързва директно към тумор-супресорен протеин 53-индуциран ядрен белтък (TP53INP1) и потиска апоптозата при туморни клетки [61]. Други експериментално потвърдени таргетни гени на miR-155 включват: ARID2 (AT rich interactive domain 2), BACH1 (BTV и CNC homology1), HIF1 (Hypoxia-inducible factor1), CSF1R (Colony stimulating factor 1 receptor), MAP3K7IP2 (Mitogen-activated protein kinase 7 interacting protein 2), RHOA (Ras homolog gene family, member A) [62]. При проби от ЛПКК miR-155 има водеща онкогенна роля, като таргетна молекула на тази микро-РНК е SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1), инхибираща STAT3 [63]. Агресивността на ЛПКК се свързва с понижена експресия на SOCS1 [64] и повишена експресия на STAT3 [65]. Потискането на експресията на miR-155 намалява експресията на STAT3, потиска растежа, миграцията и инвазията на злокачествената ларингеална клетъчна линия Нер-2 [63].

В допълнение са докладвани редица микро-РНК с повишена експресия при ракови заболявания на глава и шия, както и при рак на ларинкса: miR-16 [66], miR-18a [49], miR-142-3p [50, 67], miR-155 [68], miR-205, miR-39, miR-708 [69] или такива с потисната експресия: miR-125a, R-145 [69], miR-200a [70], miR-221 [49, 71] и miR-375 [72]. Тези резултати водят до хипотезата, че изследването на микро-РНК може да е от полза за по-доброто разбиране на генетичната етиология и има потенциал за откриване на диагностични и прогностични маркери при рак на ларинкса.

За miR-16 е установено, че няма ефект върху растежната активност на злокачествена клетъчна линия Нер-2, но участва в процесите на клетъчна адхезия и миграция посредством таргетната молекула *zyxin* [37]. За първи път са публикувани данни от Janiszewska et al. (2015) за повишена експресия на miR-1290 в двадесет злокачествени ларингеални клетъчни линии в туморен тъканен материал при

петдесет пациенти с рак на ларинкса. Авторите установяват, че повишените нива на miR-1290 водят до потискане функцията на таргетните молекули ITPR2 и MAF при ЛПКК [73]. Тези молекули участват в процесите на апоптоза в клетката.

Zhang et al. (2011) публикуват резултати от експресионен анализ на miR-206 при тъканни проби от 35 пациенти с ларингеален карцином и показват значимо понижени нива на експресия на miR-206 в туморната тъкан в сравнение с нормална ларингеална тъкан, като понижените нива на експресия се свързват с канцерогенезата на ЛПКК и в допълнение нивата на експресия на miR-206 имат обратна корелация с клиникопатологичните характеристики като TNM стадиране и степен на диференциация. Тези резултати дават основание за хипотезата, че miR-206 може да има ключова роля в прогресията на ЛПКК [36]. В допълнение, Yu et al. (2015) установяват, че циклин D2 е таргетна молекула на miR-206 при злокачествена ларингеална клетъчна линия и *in vivo* експерименти. Авторите свързват повишените нива на експресия на miR-206 с инхибиране на циклин D2 и потискане на клетъчната пролиферация [74]. Резултатите от изследванията докладват тумор-супресорната роля на miR-206 при ЛПКК.

Един от най-обещаващите биомаркери за ранна детекция на ЛПКК е miR-196a. Повишените нива на експресия на miR-196a се наблюдават в T1 стадий от развитието на ЛПКК, който понякога е труден за патологична диагноза [75]. miR-196a участва в регулацията на пролиферацията и потиска апоптозата [76] и повишава радиорезистентността [77] посредством таргетната молекула анексин A1.

Онкогенният потенциал на miR-23a е установен при ларингеални тъканни проби и злокачествена клетъчна култура Нер-2 посредством установяване на негативна корелация между miR-23a и таргетната молекула APAF1 ( $R = -0.697$ ,  $p < 0.05$ ), както и белтъчните нива на таргетната молекула в тъканни проби. Инхибиране на функцията на miR-23a води до увеличаване нивата на апоптоза и потискане на активната пролиферация [78]. Повишените нива на експресия на miR-23a се свързват и с агресивност на заболяването, лимфни метастази и кратък 5-годишен период на преживяемост [79].

Една от установените директни таргетни молекули на miR-27a е полоподобна киназа 2 (PLK2), която има основна роля в клетъчния цикъл. miR-27a е част от клъстера miR-23a/27a/24-2, като онкогенният или тумор-супресорният потенциал на клъстера е установен при редица заболявания. В изследването на Tian et al. (2014) са включени 67 ларингеални туморни проби и принадлежащите им

нормални тъканни проби, като се докладва потискане на ранната апоптоза от miR-27a. Авторите на изследването коментират използването на потенциала на miR-27a като таргетна молекула при терапия на ЛПМК [28].

Към днешна дата вече има няколко публикации, които сравняват експресията на микро-РНК при ларингеален туморен материал и ларингеални клетъчни линии и тяхното участие като потенциални онкогени или тумор-супресорни гени и тяхната конкретна регулаторна роля в клетъчни пътища, свързани с канцерогенеза, пролиферация и апоптоза. Част от публикуваните резултати са базирани само върху изследвания с ларингеални злокачествени клетъчни линии. Някои от авторите смятат, че предложените в този случай потенциални биомаркери не са подходящи за детекция при ларингеален карцином [49]. Недостатъкът на клетъчните линии е фактът, че туморните клетки са извадени от туморната микросреда и липсва взаимодействието организъм-тумор с изключително важното влияние от страна на имунната система.

#### ПОТЕНЦИАЛНИ НЕИНВАЗИВНИ БИОМАРКЕРИ

Lawrie et al. (2008) са сред първите, които демонстрират присъствието на циркулиращи микро-РНК в телесни течности като плазма и серум [80]. Установява се, че серумните нива на miR-21 могат да служат за диагностичен биомаркер при пациенти с дифузен В-клетъчен лимфом. Оттогава циркулиращи микро-РНК са докладвани с променена експресия в кръвна плазма или серум при различни типове рак, като папиларен карцином на щитовидна жлеза, простата и дебело черво [81, 82]. Сред най-големите предимства на циркулиращите маркери е относителната им достъпност чрез прилагане на неинвазивни методи, а също и тяхната изключителна стабилност в серум или плазма [83, 84]. Ранната детекция на рак все още остава голямо предизвикателство при ларингеалния карцином. Разработването на методи за ранното откриване на молекулни маркери придобива все по-широка популярност като иновативна минимално инвазивна техника. Въпреки засиленото изследване на подходящи биомаркери, все още не се е наложил такъв при диагностицирането или прогнозирането на болестта [85]. Тестове, основани на измерване на циркулиращите микро-РНК в плазма или серум, могат да предложат важни допълнения към съществуващите диагностични инструменти, позволяващи скрининг и откриване на ЛПМК.

Друг леснодостъпен неинвазивен материал, на който се базират и развиват неинвазивни методи за откриване на биомаркери, е човешката слюнка.

Терминът *salivaomics* се използва, за да се подчертае съдържанието на биологични молекули в слюнката, които могат да бъдат използвани за развитие на биомаркери и приложението им в персонализираната медицина [86]. Слюнчена извънклетъчна РНК (exRNA) е открита преди десетилетие и оттогава активно се изучават природата, характеристиката и произходът на слюнчените РНК [87-89]. Изследванията показват потенциална роля на слюнчена РНК за откриване на карцином на глава и шия [90], резектабилен простатен рак [88], белодробен рак [91], рак на яйчниците и гърдата [92].

Установено е, че извънклетъчни микро-РНК циркулират в кръвта и телесни течности както при здрави, така и при болни пациенти, въпреки рибонуклеазите, които се намират в серума и плазмата. Повечето от циркулиращите микро-РНК са включени в липидни или липобелтъчни комплекси, като апоптотични телца, микровезикули, или екзозоми, и са високо стабилни. Присъствието на циркулиращи микро-РНК в кръвта при раково болни пациенти повдига въпроса за тяхната възможна роля на биологични диагностични маркери [93]. Chen et al. установяват, че експресионните нива на miR-25 и miR-223 са повишени при пациенти с рак на простата, колоректален карцином, и пациенти, страдащи от диабет, в сравнение със здравите контроли [94]. В допълнение е докладвано, че експресионните нива на miR-92 при пациенти с колоректален карцином са значително по-високи от тези на пациенти със стомашен карцином [95], което може да служи като разграничителен маркер при тези две ракови заболявания. При плоскоклетъчен карцином на езика плазмените нива на miR-184 са сравнително по-високи от тези при здрави индивиди и значително намаляват след отстраняване на карцинома [58]. Също така Park et al. установяват, че miR-125a и miR-200a са представени със значително по-високи нива в слюнчен секрет при заболели от орален карцином [96]. Komatsu et al. описват и miR-21-5p, която може да служи като неинвазивен маркер за диагностициране на езофагеален карцином [97].

При изследване на слюнчен материал от пациенти, диагностицирани с карцином на глава и шия, се докладва повишена експресия на панел от микро-РНК (miR-9, miR-127, miR-191 и miR-222) и понижена регулация на miR-34 [90]. Според някои автори потиснатата експресия на miR-134 се свързва с агресивност и лекарствена резистентност при простатен и белодробен карцином [98]. Скорошно изследване публикува резултати от плазмени проби на пациенти, диагностицирани с ЛПМК, като предполага специфична miR експресия за това заболяване, включваща miR-99b-5p,

miR-21-5p, miR-106a-5p, miR-205-5p, miR-146b-5p, miR-48a-3p, miR-17-5p, miR-331-3p, miR-194-5p, miR-214-3p, miR-335-5p, miR-483-5p, miR-660-5p, miR-18a-5p, miR-212-3p, miR-603, miR-1303. Сред тези 17 микро-РНК с променена експресия само в плазма на пациенти с ЛПКК плазмените miR-331-3p, 603, 1303, 660-5p и 212-3p не са експресирани при проби от здрави индивиди и се предлага те да служат като нови неинвазивни биомаркери за ЛПКК [85]. Основавайки се на проби от кръвен материал и валидиране в клетъчни култури, Summerer et al. предлагат miR-435-5p и miR-93-5p като кандидат-биомаркери за лъчечувствителни микро-РНК при ракови заболявания на глава и шия след проведено облъчване [99]. Изследователският екип на С. Puthyadeera, използвайки неинвазивен материал (слюнка), докладва, че miR-9, miR-134, miR-191 биха служили в диагностичната практика. Те разработват и метод за изолиране на микро-РНК от малки количества слюнна течност [90], насочен към медицинската практика.

Скорошно изследване установява повлияни експресионни нива на miR-221 в проби от плазма, при пациенти, диагностицирани с рак на ларинкса. В проучването е установено, че след хирургична намеса нивата на miR-221 в кръвта се нормализират [100]. miR-221 участва в регулацията на PTEN/Akt сигналния път, което води до потискане нивата на апоптоза [101]. Потискане функцията на miR-221 води до повишаване чувствителността на плоскоклетъчен карцином към химиолечение с Adriamycin [102]. Тези проучвания допускат хипотезата, че miR-221 е потенциален неинвазивен биомаркер, както и потенциална таргетна молекула при ЛПКК.

Често се предполага, че плазмените микро-РНК произлизащи от ракови клетки, са следствие от активна секреция или от апоптозни телца от мъртви ракови клетки [103, 104]. Според редица автори микро-РНК участват в клетъчния отговор към химиотерапевтици [105] и лъчетерапия [106, 107].

## РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ЛЪЧЕ- И ХИМИОТЕРАПИЯ

Комбинацията от химиолечение и лъчелечение е стандарт при провеждане на лечение при авансирани тумори на глава и шия. Резистентността към единия или другия вид лечение е често срещана, вследствие на което се наблюдава нечувствителност към лечението и възникване на ново туморно образуване. Причината е възникването на различни промени и засегнати клетъчни пътища, които по различен начин се повлияват към лъчелечението. Скорошно изследване въвежда хипотезата за химиорезистентност с участието на микро-РНК. Yu et al. установяват различия в експресията на микро-

РНК между резистентни към цисплатина и цисплатина-чувствителни клетъчни линии от рак на езика. При цисплатина-резистентни пациенти се наблюдават намалени нива на miR-21 и miR-342, а при цисплатина-чувствителните – понижени нива на let-7, miR-23a, miR-214, miR-518c, miR-608. MiR-21 и miR-214 са докладвани в предишни изследвания като повишаващи химиорезистентността при други ракови заболявания, напр. рак на жлъчния мехур и рак на яйчниците [108, 109]. Предполага се, че miR-214 индуцира клетъчна преживяемост и резистентност към цисплатина посредством взаимодействие с 3' нетранслирания регион на гена PTEN, което води до намален синтез на белтъка и активация на Akt сигналния път.

Влиянието на микро-РНК върху радиорезистентността също се изследва. Докладвано е, че повишените нива на miR-205 потискат функцията на PTEN, което се свързва с радиорезистентност при назофарингеални ракови клетъчни линии [110]. Ниски нива на miR-125b се наблюдават при орален плоскоклетъчен карцином, като се свързват с повишената клетъчна пролиферация и процесите на радиорезистентност посредством потиснатата експресия на прицелната за miR-125a вълтреклетъчна адхезионна молекула 2 (ICAM2) [111].

Мултилекарствената резистентност е сериозен проблем при лечението на ларингеален карцином. Микрочипови анализи показват, че miR-210 и miR-923 са с повишена експресия, докато miR-93, miR-424, miR-25 и miR-494 са с понижена експресия при мултилекарствена резистентна клетъчна линия Hep2/v в сравнение с контролна клетъчна линия Hep2 [112]. Променена експресия на miR-31, miR-1264 и miR-210 се наблюдава при авансирал ларингеален карцином, която се свързва с химиорезистентност към паклитаксел [113], химиотерапевтик, използван при рак на ларинкса. Към групата на микро-РНК, участващи в радиорезистентността, се отнася и miR-196a, която има онкогенен ефект и повишава радиорезистентността при ларингеални клетъчни линии. MiR-196a се открива при ракови заболявания и се свързва с раковата агресивност и метастазиране [77].

Очевидно промени в генната експресия на микро-РНК при ларингеален карцином могат да се наблюдават в отговор на химио- или лъчелечение. На базата на това познание могат да се развият бъдещи терапевтични подходи, основани на микро-РНК-инхибиторна или заместителна терапия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микро-РНК имат значима роля в патологичните процеси на ларингеалната канцерогенеза. Редица

са изследванията, които установяват тяхната потенциална онкогенна или тумор-супресорна роля при ЛПКК. Резултатите от изследванията биха ни помогнали да разберем по-задълбочено пътищата на канцерогенеза при ЛПКК, както и потенциалната роля на микро-РНК като биомаркери в клиничната практика. Сред микро-РНК с установени променени нива на експресия е miR-21, чиято онкогенна роля е добре проучена при редица ракови заболявания, вкл. и ларингеален карцином. Докато променените нива на експресия на miR-205, miR-23a и miR-155 имат потенциална роля като биомаркери за агресивност на заболяването, то miR-196a се свързва с резистентност към лечение. В допълнение към възможностите на микро-РНК, miR-9, miR-134 и miR-191 могат да служат като неинвазивни биомаркери в диагностиката при рак на ларинкса. Въпреки наличните изследвания при ракови заболявания на ларинкса, все още не е напълно изяснена ролята на микро-РНК в онкогенезата на ларингеален карцином. Необходими са по-мощни и валидиращи изследвания, които да представят категорични данни и да наложат определени микро-РНК като диагностични и прогностични маркери в клиничната практика.

#### Библиография

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62(1):10-29.
2. Almadori G, Bussu F, Paludetti G. Predictive factors of neck metastases in laryngeal squamous cell carcinoma. Towards an integrated clinico-molecular classification. *Acta Otorhinolaryngol Ital Organo Uff Della Soc Ital Otorinolaringol E Chir Cervicofacc.* 2006; 26(6):326-34.
3. Bezerra de Souza DL, Jerez Roig J, Bernal MM. Laryngeal cancer survival in Zaragoza (Spain): a population-based study. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* 2012; 14(3):221-4.
4. wcr\_2008\_7.pdf. [cited 2015 Sep 23]. Available from: [http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr\\_2008\\_7.pdf](http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008_7.pdf)
5. Globocan 2012. [cited 2015 Oct 7]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
6. PD-Rakov-2015.PDF. [cited 2016 Mar 15]. Available from: [http://www.sbaloncology.bg/assets/files/rakov\\_registar/PD-Rakov-2015.PDF](http://www.sbaloncology.bg/assets/files/rakov_registar/PD-Rakov-2015.PDF)
7. Sapkota A, Hsu CC, Zaridze D, et al. Dietary risk factors for squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in central and eastern Europe. *Cancer Causes Control CCC.* 2008; 19(10):1161-70.
8. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M, et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck.* 2011; 33(4):581-6.
9. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol.* 2012; 6(6):590-610.
10. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(Database issue):D68-73.
11. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009; 136(2):215-33.
12. Rothschild SI. microRNA therapies in cancer. *Mol Cell Ther.* 2014; 2:7.
13. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(10):775-89.
14. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005; 353(17):1793-801.
15. Nakamura T, Canaani E, Croce CM. Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(26):10980-5.
16. Kosari F, Parker AS, Kube DM, et al. Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005; 11(14):5128-39.
17. Yan Z, Xiong Y, Xu W, et al. Identification of recurrence-related genes by integrating microRNA and gene expression profiling of gastric cancer. *Int J Oncol.* 2012; 41(6):2166-74.
18. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Dev Camb Engl.* 2005; 132(21):4653-62.
19. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(11):857-66.
20. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(4):259-69.
21. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005; 435(7043):834-8.
22. Li J, Smyth P, Flavin R, et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol.* 2007; 7:36.
23. Tsai W-C, Hsu PW-C, Lai T-C, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology Baltim Md.* 2009; 49(5):1571-82.
24. Wu H, Mo Y-Y. Targeting miR-205 in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2009; 13(12):1439-48.
25. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(39):15472-7.
26. Tie J, Pan Y, Zhao L, et al. MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor. *PLoS Genet.* 2010; 6(3):e1000879.
27. Long X-B, Sun G-B, Hu S, et al. Let-7a microRNA functions as a potential tumor suppressor in human laryngeal cancer. *Oncol Rep.* 2009; 22(5):1189-95.
28. Tian Y, Fu S, Qiu G-B, et al. MicroRNA-27a promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting PLK2 in laryngeal carcinoma. *BMC Cancer.* 2014; 14:678.
29. Yu X, Wu Y, Liu Y, et al. miR-21, miR-106b and miR-375 as novel potential biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma. *Curr Pharm Biotechnol.* 2014; 15(5):503-8.
30. Ren J, Zhu D, Liu M, et al. 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; 46(18):3409-16.
31. Saito K, Inagaki K, Kamimoto T, et al. MicroRNA-196a is a putative diagnostic biomarker and therapeutic target for laryngeal cancer. *PLoS One.* 2013; 8(8):e71480.
32. Shen Z, Zhan G, Ye D, et al. MicroRNA-34a affects the occurrence of laryngeal squamous cell carcinoma by targeting the antiapoptotic gene survivin. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* 2012; 29(4):2473-80.
33. Cai. Hsa-miR-34c suppresses growth and invasion of human laryngeal carcinoma cells via targeting c-Met. *Int J Mol Med [Internet].* 2010 Mar 2 [cited 2015 Sep 7];25(4). Available from: <http://www.spandidos-publications.com/ijmm/25/4/565>
34. Karatas OF, Yuceturk B, Suer I, et al. Role of miR-145 in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2014.

35. Bian K, Fan J, Zhang X, et al. MicroRNA-203 leads to G1 phase cell cycle arrest in laryngeal carcinoma cells by directly targeting survivin. *FEBS Lett.* 2012; 586(6):804-9.
36. Zhang T, Liu M, Wang C, et al. Down-regulation of MiR-206 promotes proliferation and invasion of laryngeal cancer by regulating VEGF expression. *Anticancer Res.* 2011; 31(11):3859-63.
37. Wu H, Liu T, Wang R, et al. MicroRNA-16 targets zyxin and promotes cell motility in human laryngeal carcinoma cell line HEp-2. *IUBMB Life.* 2011; 63(2):101-8.
38. Boyerinas B, Park S-M, Hau A, et al. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17(1):F19-36.
39. Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, et al. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009; 15(6):1915-22.
40. Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, et al. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood.* 2009; 114(15):3265-75.
41. Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2008; 68(19):8164-72.
42. Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, et al. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin Chem.* 2008; 54(10):1696-704.
43. Gabrieli G, Wurdinger T, Kesari S, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(17):5369-80.
44. Huang T-H, Wu F, Loeb GB, et al. Up-regulation of miR-21 by HER2/neu signaling promotes cell invasion. *J Biol Chem.* 2009; 284(27):18515-24.
45. Li T, Li D, Sha J, Sun P, Huang Y. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 383(3):280-5.
46. Liu J, Lei D-P, Jin T, et al. Altered expression of miR-21 and PTEN in human laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2011; 12(10):2653-7.
47. Hu A, Huang J-J, Xu W-H, 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.
48. Feber A, Xi L, Luketich JD, et al. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008; 135(2):255-260; discussion 260.
49. Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009; 15(8):2850-5.
50. Hui ABY, Lenarduzzi M, Krushel T, et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010; 16(4):1129-39.
51. Guo Y, Chen Z, Zhang L, et al. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2008; 68(1):26-33.
52. Hu A, Jin X. [Expression of mir-21 and mir-375 in laryngeal squamous cell carcinoma]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2012; 26(18):788-92.
53. Hu A, Huang J-J, Xu W-H, et al. MiR-21/miR-375 ratio is an independent prognostic factor in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2015; 5(5):1775-85.
54. Lawrie CH. MicroRNAs and haematology: small molecules, big function. *Br J Haematol.* 2007; 137(6):503-12.
55. Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005; 65(16):7065-70.
56. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2007; 120(5):1046-54.
57. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006; 9(3):189-98.
58. Wong T-S, Liu X-B, Wong BY-H, et al. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2008; 14(9):2588-92.
59. Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, et al. MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010; 23(4):1229-34.
60. Lajer CB, Nielsen FC, Friis-Hansen L, et al. Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer.* 2011; 104(5):830-40.
61. Ovcharenko D, Kelnar K, Johnson C, et al. Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer Res.* 2007; 67(22):10782-8.
62. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792(6):497-505.
63. 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.
64. Starska K, Forma E, Lewy-Trenda I, et al. The expression of SOCS1 and TLR4-NFkappaB pathway molecules in neoplastic cells as potential biomarker for the aggressive tumor phenotype in laryngeal carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol Pol Acad Sci Pol Histochem Cytochem Soc.* 2009; 47(3):401-10.
65. Liu B, Ren Z, Shi Y, et al. Activation of signal transducers and activators of transcription 3 and overexpression of its target gene CyclinD1 in laryngeal carcinomas. *The Laryngoscope.* 2008; 118(11):1976-80.
66. Kimura S, Naganuma S, Susuki D, et al. Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. *Oncol Rep.* 2010; 23(6):1625-33.
67. Chang SS, Jiang WW, Smith I, et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2008; 123(12):2791-7.
68. Chen Z, Jin Y, Yu D, et al. Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2012; 48(8):686-91.
69. Cao P, Zhou L, Zhang J, et al. Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2013; 35(5):720-8.
70. Tran N, McLean T, Zhang X, et al. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 358(1):12-7.
71. Liu X, Chen Z, Yu J, et al. MicroRNA profiling and head and neck cancer. *Comp Funct Genomics.* 2009; 837514.
72. Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, et al. Tumor suppressive microRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Hum Genet.* 2011; 56(8):595-601.
73. Janiszewska J, Szaumkessel M, Kostrzewska-Poczekaj M, et al. Global miRNA Expression Profiling Identifies miR-1290 as Novel Potential oncomiR in Laryngeal Carcinoma. *PLOS ONE.* 2015; 10(12):e0144924.
74. Yu WF, Wang HM, Lu BC, et al. miR-206 inhibits human laryngeal squamous cell carcinoma cell growth by regu-

- lation of cyclinD2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015; 19(14):2697-702.
75. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(9):2999-3004.
  76. Yekta S, Shih I-H, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* 2004; 304(5670):594-6.
  77. Suh Y-E, Raulf N, Gäken J, et al. MicroRNA-196a promotes an oncogenic effect in head and neck cancer cells by suppressing annexin A1 and enhancing radioresistance. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2014.
  78. Zhang X-W, Liu N, Chen S, et al. Upregulation of microRNA-23a regulates proliferation and apoptosis by targeting APAF-1 in laryngeal carcinoma. *Oncol Lett.* 2015; 10(1):410-6.
  79. Zhang X-W, Liu N, Chen S, et al. High microRNA-23a expression in laryngeal squamous cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. *Diagn Pathol.* 2015; 10:22.
  80. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008; 141(5):672-5.
  81. Yu S, Liu Y, Wang J, et al. Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jun;97(6):2084-92.
  82. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2011; 128(3):608-16.
  83. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(30):10513-8.
  84. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(16):7223-33.
  85. Ayaz L, Görür A, Yaroğlu HY, et al. 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; 139(9):1499-506.
  86. Bahn JH, Zhang Q, Li F, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva. *Clin Chem.* 2015; 61(1):221-30.
  87. Park NJ, Li Y, Yu T, et al. Characterization of RNA in saliva. *Clin Chem.* 2006; 52(6):988-94.
  88. Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, et al. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138(3):949-957-7.
  89. Spielmann N, Ilsley D, Gu J, et al. The human salivary RNA transcriptome revealed by massively parallel sequencing. *Clin Chem.* 2012; 58(9):1314-21.
  90. Salazar C, Nagadia R, Pandit P, et al. A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. *Cell Oncol Dordr.* 2014; 37(5):331-8.
  91. Zhang L, Xiao H, Zhou H, et al. Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2012; 69(19):3341-50.
  92. Zhang L, Xiao H, Karlan S, et al. Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. *PLoS One.* 2010; 5(12):e15573.
  93. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 2010; 101(10):2087-92.
  94. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008; 18(10):997-1006.
  95. Ng EKO, Chong WWS, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut.* 2009; 58(10):1375-81.
  96. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009; 15(17):5473-7.
  97. Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, et al. Prognostic impact of circulating miR-21 and miR-375 in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Expert Opin Biol Ther.* 2012; 12 Suppl 1:S53-59.
  98. Liu C-J, Shen WG, Peng S-Y, et al. miR-134 induces oncogenicity and metastasis in head and neck carcinoma through targeting WWOX gene. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2014; 134(4):811-21.
  99. Summerer I, Niyazi M, Unger K, et al. Changes in circulating microRNAs after radiochemotherapy in head and neck cancer patients. *Radiat Oncol Lond Engl.* 2013; 8:296.
  100. Yilmaz SS, Guzel E, Karatas OF, et al. MiR-221 as a pre- and postoperative plasma biomarker for larynx cancer patients. *The Laryngoscope.* 2015; 125(12):E377-81.
  101. Kan X, Sun Y, Lu J, et al. Co-inhibition of miRNA-21 and miRNA-221 induces apoptosis by enhancing the p53-mediated expression of pro-apoptotic miRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep [Internet].* 2016 Mar 28 [cited 2016 May 16]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2016.5048>
  102. Chen D, Yan W, Liu Z, et al. Downregulation of miR-221 enhances the sensitivity of human oral squamous cell carcinoma cells to Adriamycin through upregulation of TIMP3 expression. *Biomed Pharmacother.* 2016; 77:72-8.
  103. Hannafon BN, Ding W-Q. Intercellular Communication by Exosome-Derived microRNAs in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(7):14240-69.
  104. Zerneck A, Bidzhikov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2009; 2(100):ra81.
  105. Du L, Pertsemliadis A. microRNA regulation of cell viability and drug sensitivity in lung cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2012; 12(9):1221-39.
  106. Svoboda M, Sana J, Fabian P, et al. MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. *Radiat Oncol Lond Engl.* 2012;7:195.
  107. Anastasov N, Höfig I, Vasconcellos IG, et al. Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells. *Radiat Oncol Lond Engl.* 2012;7:206.
  108. Yang H, Kong W, He L, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res.* 2008; 68(2):425-33.
  109. Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology.* 2006; 130(7):2113-29.
  110. Qu C, Liang Z, Huang J, et al. MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN. *Cell Cycle Georget Tex.* 2012; 11(4):785-96.
  111. Shiiba M, Shinozuka K, Saito K, et al. MicroRNA-125b regulates proliferation and radioresistance of oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2013; 108(9):1817-21.
  112. Yin W, Wang P, Wang X, 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 Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica AI.* 2013; 46(6):546-54.
  113. Xu C-Z, Xie J, Jin B, 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.