

Mesopharynx és hypopharynx tumorok HPV és miRNS-analízise

PhD értekezés

Dr. Orosz Éva

Pécsi Tudományegyetem - Klinikai Központ, Fül-, Orr-, Gégészeti és
Fej-, Nyaksebészeti Klinika

Doktori iskola: Klinikai Orvostudományok (D94)

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Doktori program: Molekuláris patológiai és laboratóriumi vizsgálatok
jelentősége az orvosi diagnosztikában és terápiában (A-146/1993)

Doktori program vezetője: Prof. Dr. Miseta Attila

Témacím: Molekuláris biomarkerek vizsgálata malignus fej-nyaki daganatokban

Témavezető: Dr. Szanyi István

Pécs
2021

Tartalom

Tartalom	2
Rövidítések jegyzéke	4
I. BEVEZETÉS	6
I./1. A fej-nyak daganatok epidemiológiája	6
I./2. A meso- és hypopharynx daganatok klinikuma	8
I./3. A fej-nyaki daganatok etiológiai faktora	10
I./4. A humán papilloma vírus szerepe a mesopharynx daganatokban	12
I./5. A mikro-RNS	14
I./6. Cancer-field (tissue organization field theory, TOFT)	17
I./7. Szomatikus mutációs teória (somatic mutation theory, SMT)	18
II. CÉLKITŰZÉSEK	20
III. A VIZSGÁLAT ELSŐ SZAKASZA	21
III./1. Anyag és módszerek	21
III./1.1. Mintagyűjtés	21
III./1. 2. A vizsgált miRNS-ek.....	23
III./1. 3. RNS izolálás és reverz transzkripció	24
III./1. 4. PCR analízis	24
III./1. 5. Statisztikai analízis	25
III./2. Eredmények	25
III./3. Az első vizsgálati szakasz eredményeinek összegzése.....	30
IV. A VIZSGÁLAT MÁSODIK SZAKASZA	31
IV./1. Anyag és módszerek	31
IV./1. 1. Mintagyűjtés	31
IV./1. 2. RNS izolálás és reverz transzkripció.....	31
IV./1. 3. Droplet digital PCR analízis	32
IV./1. 4. HPV P16 immunhisztokémiai festés	32
IV./1. 5. DNS-extrakció és HPV-genotipizálás.....	33
IV./1. 6. Statisztikai analízis	33
IV./1. 7. A cancer-field ábrázolására kidolgozott kombinált molekuláris-radiológiai alapú 3 dimenziós modell létrehozása	34
IV./2. Eredmények.....	34
IV./2. 1. A HPV pozitivitással kapcsolatos miRNS profil elemzése	34
IV./2. 2. A cancer fielddel korreláló miRNS profil analízise	41
IV./2. 3. A molekuláris-radiológiai alapú 3 dimenziós modell megjelenítése	44
V. MEGBESZÉLÉS	47

miR-21	49
miR-143	51
miR-221	52
miR-155	53
A molekuláris-radiológiai alapú 3 dimenziós modell jelentősége	54
VI. Összegzés, tézisek, új klinikai megállapítások	56
Irodalomjegyzék	58
Köszönetnyilvánítás	74

Rövidítések jegyzéke

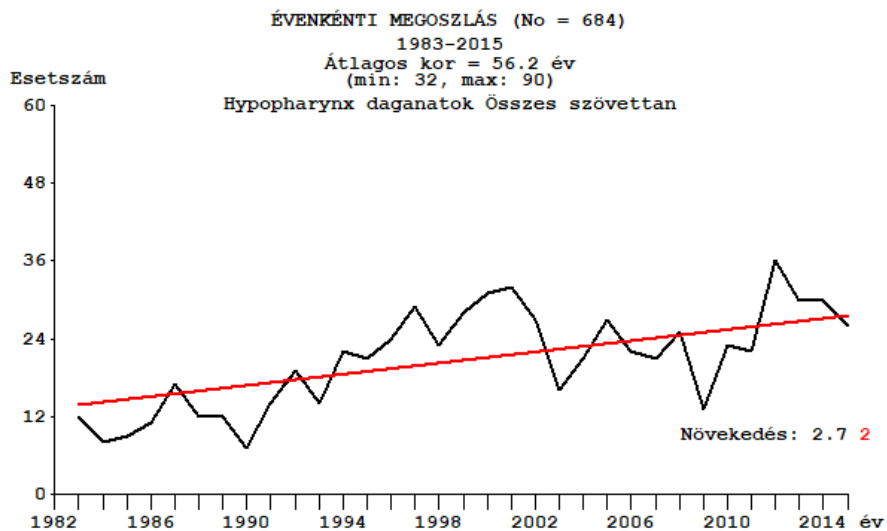
5S RNS	5S riboszomális ribonukleinsav
AGO 1-4	argonauta 1-4 fehérje
Akt/mTOR	akt/mammalian target of rapamycin
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
BCL-2	B-cell lymphoma-2
CADM1	Cell Adhesion Molecule 1
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
CDKI	ciklin dependens kináz inhibitor
CI	confidence interval, megbízhatósági tartomány
DGCR-8	diGeorge syndrome critical region
DNáz	dezoxiribonukleáz
DNS	dezoxiribonukleinsav
EBV	Epstein-Barr vírus
ERK	extracellular signal-regulated kinases
E2F	E2 transzkripciós faktor
HPV	Human papilloma vírus
HRCT	High-resolution computed tomography
KRAS	Kirsten patkány szarkóma onkogén
MAPK	mitogen activated protein kinases
miRNS vagy miR	micro ribonukleinsav
mRNS	messenger ribonukleinsav
NF κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PDCD4	Programmed cell death protein 4
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
pRb	retinoblasztóma tumorszupresszor fehérje
pre-miRNS	prekurzor micro ribonukleinsav
pri-miRNS	primer micro ribonukleinsav
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog

RAS	patkány szarkóma onkogén
RISC	RNA-induced silencing complex
RNS	ribonukleinsav
SHIP1	inozitol-polifoszfát-5-foszfátáz
SMT	somatic mutation theory
snRNP	small nuclear ribonukleinsav
SOCS	suppressor of cytokine signaling proteins
SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2
STAT	signal transducer and activator of transcription
TCGA	The Cancer Genom Atlas
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TOFT	tissue organization field theory
TP16	tumor protein 16
TP53	tumor protein 53
TP63	tumor protein 63
TP27	tumor protein 27
TPM1	tropomyosin 1
TRAF3	TNF Receptor Associated Factor 3
TRBP	Tar RNA binding protein
UTR	untranslated region

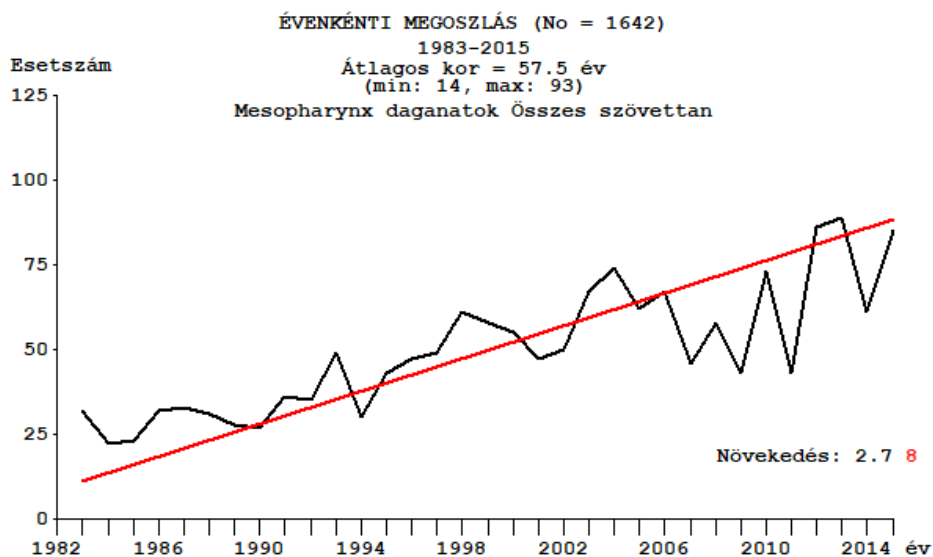
I. BEVEZETÉS

I./1. A fej-nyak daganatok epidemiológiája

Az Európai Unióban évente 1,3 millióan halnak meg daganatos megbetegedés következtében, Magyarországon pedig évente több, mint 32 ezer ember. Az ENCR (European Network of Cancer Registries) adatai alapján rákbetegség következtében elhunytak száma az Európai Unión belül Magyarországon, Szlovákiában és Horvátországban a legmagasabb. A GLOBOCAN adatai alapján évente csaknem 600.000 beteget regisztrálnak fej-nyaki daganattal világszerte. A magyarországi fej-nyaki daganatok okozta halálozás Európában az első helyen áll. E régió daganatainál az elmúlt 40 évet tekintve a mortalitási ráta négyszeresére nőtt. Leggyakoribbak ezen lokalizáción belül a szájüregi régió, a garat és a gége tumorai, mortalitásuk 50% feletti¹. A Nemzeti Rákregiszter adatai szerint 2016-ban hazánkban mintegy 3500 embert diagnosztizáltak fej-nyaki daganattal. A fej-nyaki régió laphám daganatainak száma az 55-60 éves populációban a legmagasabb, ám további aggodalomra ad okot, hogy egyre inkább megfigyelhető fiatalabb életkorban is. Fokozott figyelmet igényel, hogy az egy régióra lokalizálódó larynx, tonsilla palatina tumorai, melyek klasszikusan operálhatók és kedvezőbb prognózisúak, egyre inkább eltűnnek, míg a több régiót érintő, kedvezőtlen prognózisú, agresszív daganatokkal gyakrabban találkozunk¹. Annak ellenére, hogy jól vizsgálható régiókról van szó, illetve modern diagnosztikus és kezelési módszerek állnak rendelkezésre, a prognosztikai és mortalitási mutatók nem javulnak. A Pécsi Tudományegyetem, Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinikájának statisztikája alapján a 80-as évektől napjainkig a mesopharyngeális daganatok száma megkétszereződött, a hypopharynxgeális daganatoké csaknem megháromszorozódott (1., 2. ábra).



1.ábra: A hypopharynx tumor incidenciája 1983-2015 között a Pécsi Tudományegyetem, Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinikáján, a grafikon prof. Pytel József tumorstatisztikai programjában készült.



2.ábra: A mesopharynx tumor incidenciája 1983-2015 között a Pécsi Tudományegyetem, Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinikáján, a grafikon prof. Pytel József tumorstatisztikai programjában készült.

Fontos megjegyezni, hogy az etiológiai faktorokat tekintve a meso- és hypopharynx laphám karcinómák megelőzhetők lennének. A tudatos egészségre nevelés, a rákszűréseken való részvétel elsődleges fontosságú volna a rákbetegségek kialakulásának megelőzésében, illetve a betegség korai stádiumban történő felismerésében. A daganatszűrő programok

fontossága tehát kiemelendő. A daganatkezelés sikerében az individuális terápiás választások is jelentősek, így kiemelt fontosságúak azon molekuláris onkológiai, genetikai vizsgálatok, melyek a tumorok kialakulására, viselkedésére magyarázatot adhatnak és új terápiás lehetőségek kidolgozásához vezethetnek. Éppen ezért szenteltünk különös figyelmet kutatásunk során a meso- és hypopharynx daganatok molekuláris epigenetikai változásainak vizsgálatára és olyan biomarkerek kutatására, amik a jövőben esetleg prediktív, prognosztikai céllal is alkalmazhatóak lehetnek.

I./2. A meso- és hypopharynx daganatok klinikuma

A fej-nyaki régió mind lokalizációban, mind szövettanilag, mind klinikailag sokrétű. Tág értelemben minden fej-nyaki régióban, tehát a koponyaalap és kulcscsont közti területen megjelenő folyamatot ide soroljuk, szűk értelemben a fej-nyak nyálkahártyáján megjelenő daganatos elváltozások tartoznak ide. Fej-nyaki régióba tartozik tehát a középfül, az orrüreg és a paranasális szinuszok, a szájüreg, a garat, a gége, a pajzsmirigy, mellékpajzsmirigy rosszindulatú elváltozásai, a nyálmirigyek és a fej-nyaki régió bőrtumorai. Kutatásunkban kiemelten a meso- és hypopharynx lokalizációjú laphám karcinómákkal foglalkozunk. Az itt előforduló malignus daganatok túlnyomó többsége laphám karcinóma illetve az ezen lokalizációban előforduló daganatok, különösen a hypopharynx tumor prognózisa napjainkban is igen kedvezőtlen, kezelésük igen gyakran kihívást jelent.

Mesopharynx lokalizáció esetén leggyakrabban a tonsilláris régióból és a lágyszájpadról indul ki a malignus folyamat. Legritkább a hátsó garatfal daganata. Ebben a lokalizációban nincs barrier, mely gátja lehetne a terjedésnek, így könnyen és gyorsan infiltrálja a tumor a környezetét. A tonsillaris régióból induló daganatok beszűrhetik a trigonum retromolarét, a térség izmait, a periosteumot, a mandibulát. A nyelvgyök daganata agresszívan, gyorsan terjed, a nyelv izomzatát is benövi. A lágyszájpad malignus elváltozásai lefelé terjedve infiltrálhatják a garatíveket, tonsillát, majd a nyelvgyököt is, felfelé az epipharynxot, akár a koponyaalapot is elérhetik. A garatfal tumorai könnyen benövik mind az epi-, mind a hypopharynxot, és közelsége miatt hamar ráterjed a fascia praevertebralisra.

Regionális nyirokcsomó áttétek gyakoriak, főként a submandibularis, felső, középső parajuguláris régió, retro- és parapharyngealis régió nyirokcsomói érintettek. Ha középvonali a daganat, metasztázisaik gyakran bilaterálisak. Távoli metasztázisok a nyelvgyöki daganatoknál a leggyakoribbak.

Hisztológiailag a daganatok legtöbbször hám eredetű, ezen belül is planocelluláris karcinóma (90%). Előfordul még anaplasztikus karcinóma, tranziciocelluláris karcinóma, bazocelluláris karcinóma és adenokarcinóma. Nem hám eredetű daganatok közül ki kell emelni a non-Hodgkin limfómát, ami viszonylag gyakran indul ki ebből a régióból, illetve a Hodgkin limfómát és a melanoma malignumot. Gyakori előfordulásuk okán kutatásunkban a laphám karcinómákkal foglalkozunk.

Diagnózis

Az anamnézisből, fizikális vizsgálatból, tünettamból felállított klinikai kép alapján a lehetséges diagnózist bizonyítani kell képalkotó vizsgálatokkal. Nyaki UH és nyaki MR vizsgálat szükséges a nyirokcsomó státusz megítélésére, a mediastinalis áttétek kimutatására mellkas CT vizsgálat javasolt. A regionális terjedés pontos megítélésére az MRI-n, CT-n kívül még a PET-CT ad lehetőséget. A biztos szövettani diagnózis elengedhetetlen, ezt a tumorból történő mintavétel teszi lehetővé. A metasztatikusnak ítélt nyirokcsomó finomtű aspirációs biopsziája is kiegészíti a diagnózist. A sebészileg eltávolított nyirokcsomók hisztológiai feldolgozása nagyon fontos és teljessé kell tenni a rezekciós szél patológiai vizsgálatával. Mindezen vizsgálatok lehetővé teszik a pontos staging-et, így a terápia egyéni megválasztását.

Terápia

A daganat lokalizációja, kiterjedése és a tumoros folyamat stádiuma a meghatározó a terápia szempontjából. Meso- és hypopharynx tumorok kezelésében két lokális modalitás van, a sebészi és a radioterápia, míg a szisztémás terápia része a kemoterápia és a biológiai terápia. A radioterápia lehet definitív primer radioterápia, adhatjuk posztoperatív esetben, konkurrens radiokemoterápia részeként illetve palliatív céllal, továbbá alternatív megoldásként radiobioterápia – cetuximab konkurrens sugárkezeléssel - végezhető. A 3D konformális besugárzás mellett újabban egyre gyakrabban és jóval enyhébb mellékhatásspektrummal alkalmazható az intenzitás modulált sugárterápia.

Fej-nyak kemotrapiában elsőként alkalmazott platinaszármazék a ciszplatin, melyet leggyakrabban 5-fluorouracillal és cetuximabbal, mint targetterápiával együtt alkalmaznak recidív vagy metasztatikus daganatok esetén. A kemoterápia jellemzően adjuváns radiokemoterápia esetén jön szóba magas recidíva kockázat (R1 rezekció, nyirokcsomó tokáttörés) esetén. Ezen felül előrehaladott (T3-4, N2-3) esetekben indukciós kemoterápia alkalmazható, továbbá palliatív céllal is adható.

Új szisztémás terápiás lehetőséget jelent a biológiai terápia, fej-nyaki daganat esetén a PD-1 gátló pembrolizumab illetve nivolumab jön szóba.

Kis kiterjedésű, korai stádiumú meso- és hypopharynx daganatok (T1-2, N0-N1, M0) esetén a műtéti terápia illetve a kuratív célú radioterápia választható. Radiokemoterápia kizárólag nyirokcsomó pozitivitás esetén indokolt. A tumor műtéti eltávolítása ipszilaterális nyaki II-IV. régiók szelektív disszekciójával együtt végezendő.

Nagy kiterjedésű, lokoreginálisan előrehaladott tumorok (T3-4, N0-1, M0) esetében onkológiai kezelés (konkurrens radiokemoterápia vagy indukciós kemoterápiát követő radiokemoterápia) illetve műtéti terápia egyaránt végezhető. Műtéti terápia esetén a primer tumor műtéti eltávolítása ipszilaterális nyaki II-IV. régiók szelektív disszekciójával együtt végezendő.

Nagyméretű nyaki nyirokcsomó áttét, lokoreginálisan előrehaladott (T3-4, N2-3, M0) esetben szintén onkológiai kezelés (konkurrens radiokemoterápia vagy indukciós kemoterápiát követő radiokemoterápia) illetve műtéti terápia jön szóba. Műtét esetén a primer tumor eltávolítása mellett azonos komprehenzív nyaki disszekció szükséges az ellenoldal II-IV. nyaki régiók szelektív vagy komprehenzív disszekciójával (NCCN Guidelines Version 2.2020).

Összegzésként tehát elmondható, hogy korai stádiumú daganat esetén bármelyik modalitás választható, túlélés tekintetében nincs különbség az onkológiai illetve a műtéti modalitás között, törekedni kell azonban a funkciómegőrzésre, továbbá arra, hogy az adott választott modalitás teljes mértékben kuratív legyen. Míg lokoreginálisan előrehaladott daganat esetében leggyakrabban a kombinált terápia a célravezető, ebben az esetben a funkcionalitás kevésbé őrizhető meg műtéti terápiával, ám lebenyplasztikai megoldások nagyon sokat javíthatnak a funkción, így a beteg általános életminőségén.

I./3. A fej-nyaki daganatok etiológiai faktorai

A *dohányzás* kiemelt rizikófaktort jelent a fej-nyaki daganatokban. Bizonyos karcinogének a növény természetes alkotórészei, míg más rákkeltő anyagok a dohány égése, feldolgozása során keletkeznek. Ismert, hogy a cigaretta mintegy 3000 féle, a cigarettafüst csaknem 4000 féle vegyi anyagot tartalmaz, melyből legalább 100 bizonyítottan karcinogén. A cigarettafüst vegyi anyagok komplex keveréke, két fázisból, részecskékből és gázból áll, melyben nagy mennyiségben vannak jelen dohány-specifikus nitrózaminok és policiklusos

aromás szénhidrogének, amik pontmutációkon, DNS egyes és kettős száltöréseken keresztül vezetnek diszplasztikus, daganatos elváltozásokhoz. Ez magyarázza a passzív dohányzás szintén káros hatását. Bizonyított, hogy passzív dohányosokban is emelkedett a tüdőrák, az emphysema, a szív-, érrendszeri betegségek kialakulásának kockázata. A nitrózaminok a dohány alkaloidjaiból képződnek, ezek közül a nitrózamin-keeton és az N-nitrozonornikotin a leginkább karcinogén². Több tanulmány leírta a nitrózaminok jelenlétét az e-cigaretákban is, ám jóval csekélyebb dózisban³. Az e-cigaretta, mint a cigaretta „egészséges”, leszokást segítő formája került forgalomba, ám hangsúlyozni kell, hogy a pontos élettani hatásai jelenleg még ismeretlenek. A policiklusos aromás szénhidrogének közül kiemelendő karcinogén a dimetil-benzantracén, a metil-kolantrén és a benzpirén.

A cigarettán kívül a pipázás, a bételdiórágás nem csak a garat, hanem ajak, szájüregi és bucca daganatok kialakulását is potenciálja. Meso- és hypopharynx daganatoknál ki kell emelni az alkohol és dohányzás szinergista hatását⁴.

Az *alkohol* és a fej-nyaki laphám karcinóma közti klinikai kapcsolat régóta ismert^{5,6}. Az alkohol biokémiai átalakulása során keletkező köztitermék, az acetaldehid a nyálkahártya funkcionális, metabolikus és morfológiai elváltozását okozza. A nyálkahártya karcinogenezisre és fokozott sejt proliferációra való fogékonysága emelkedetté válik, és ezen genetikai változások diszplasztikus elváltozásokat eredményeznek⁷.

Az alkohol dehidrogenáz, a citokróm P450 enzimrendszer és a metilén tetrahidrofolát reduktáz génjeinek polimorfizmusában, vagyis az alkohol és a folát metabolizmusában is kereshető az összefüggés arra, hogy egyeseknél az alkohol fogyasztás miatt növeli a daganat kialakulásának rizikóját, míg másoknál miért nem^{8,9,10}

Ismert, hogy a krónikus alkoholfogyasztás negatív hatást gyakorol mind a veleszületett, mind az adaptív immunitásra. Ezek a hatások érzékenyebbé teszik a szervezetet a virális, bakteriális fertőzésekkel szemben, mely további patogén mikrobák megtelepedéséhez vezet, ezenkívül rontják a kórokozók elleni védelmet is, emellett az alkohol immunválaszra gyakorolt hatása elősegíti a gyulladós reakciókat, így egy állandó szubklinikai gyulladós állapot tarthat fenn. Ezek az eltérések hozzájárulnak a szervezet szöveteinek, szerveinek károsodásához, egyéb betegségeken túl a daganatos betegségek kialakulásához, illetve a betegségek felgyorsult progressziójához¹¹.

Az alkohol továbbá elősegíti a dohányfüstben lévő karcinogén anyagok felszívódását, így az alkohol a dohányzással együttesen exponenciálisan növeli a rák kialakulásának

veszélyét. Az alkoholfogyasztás és az oro-, hypopharynx tumorok közti kapcsolat szorosabb, mint az alkoholfogyasztás és a gége-, szájüregi daganatok kialakulása közötti összefüggés¹².

Az *Epstein-Barr vírus* (EBV) bizonyítottan szerepet játszik és szoros összefüggésbe hozható a nasopharygealis karcinóma elszarusodó formájának (lymphoepithelioma) kialakulásával elsősorban az ázsiai populációban. Szoros korrelációt mutat a Burkitt lymphoma és hajassejtes leukaemia kialakulásával^{13,14,15}.

Plummer-Vinson szindróma kiemelten fontos rizikófaktora a hypopharynx - főként a postcricoid régió - daganatainak. Ez egy ismeretlen eredetű gyulladással járó betegség. A gyulladás következtében a szájüreg, garat nyálkahártyája atrófiássá válik, glossitist, papillák elsimulását, cheilitist, stomatitist, postcricoid odynophagiát eredményez. Északi országokban és nőknél gyakoribb. Feltételezik a táplálkozási hiányállapotok - főként a vas, de tiamin, riboflavin, piridoxin és különböző proteinek - szerepét a betegség kialakulásában^{16,17}.

Mindezek mellett a *rossz szájhygiéne, a vegyszer expozíciók, a környezeti karcinogének, sugárterhelés, a vitamin szupplementáció, az immunszuppresszió* is szerepet játszanak a fej-nyaki daganatok kialakulásában¹⁸, az alacsony szocioökonómiai státusz szintén hozzájárul a garatdaganat kialakulásához. A férfiak körében háromszor gyakrabban fordul elő ez a daganattípus, mint nők körében¹⁹.

A *humán papilloma vírus (HPV)* az utóbbi két évtizedben került előtérbe, mint a fej-nyaki daganatok fontos rizikófaktora, mely kutatásunkban is központi szerepet tölt be, így külön fejezetben foglalkozom vele.

I./4. A humán papilloma vírus szerepe a mesopharynx daganatokban

A dohányzáshoz kapcsolódó fej-nyaki daganatok száma az USA-ban a 70-es évektől kezdve csökkenő tendenciát mutat, ezzel szemben megfigyelték, hogy a nemdohányzó, alkoholt nem fogyasztó populációban az oropharynx tumorok incidenciája drámaian növekszik. Ez arra utal, hogy egyéb etiológiai tényezők is szerepet játszanak a daganat kialakulásában, így vált a humán papillomavírus (HPV) és a fej-nyaki laphám karcinómák közötti kapcsolat a 2000-es évek óta intenzíven kutatott területté^{20,21}. A HPV típusa és a tumor lokalizációja szoros

összefüggést mutat, a garatban a HPV 16 felelős a HPV pozitív laphám daganatok kialakulásának mintegy 90%-ért^{22,23,24}.

A HPV indukált daganat elsősorban a tonsilláris régiókat (tonsilla palatina és tonsilla lingualis) érinti, egyéb fej-nyaki régiókban a HPV jelenléte 20% alatti²⁵. Az oropharynx daganatainak HPV-pozitivitása világviszonylatban 30-40%^{26,27}, viszont az USA-ban és a skandináv országokban eléri a 80%-ot²⁸. A HPV pozitív oropharynx tumoros betegek átlagéletkora 5-10 évvel alacsonyabb, mint a HPV negatív betegeké²⁹. Az oropharynx tumorok és az oropharyngeális HPV fertőzöttség mintegy ötször-hétszer gyakrabban jelenik meg a férfiakban³⁰. Szoros összefüggés mutatható ki továbbá a szexuális szokások, az anogenitális traktus HPV fertőzöttsége és az oropharyngealis daganatok kialakulása között³¹.

A HPV a papillomavírusok családjába tartozó, több mint 120 típust számláló vírus (Papillomavirus Episteme – NIH). A virális genom örökítőanyaga cirkuláris, kettős szálú DNS²⁷. A HPV típusok hét taxonómiai nemzethez tartoznak (alfa-, béta-, gamma-, mupa-, nupatata- és thetapapillomavírus). A vírusgenom legkonzerváltabb szekvenciája, az L1 open reading frame (ORF) régió. Az L1 és L2 ORF-ekből transzlált fehérjetermékek alkotják a víruskapszidot, míg az E6 és E7 ORF-ek onkoproteineket kódolnak, amelyek modulálják a vírus transzformációs folyamatát. E6 gén által kódolt fehérje a TP53 fehérjét az ubiquitin útvonalon keresztül gátolja, míg az E7 gén fehérjéje a retinoblastoma tumor szupresszor fehérjét (pRb) inaktiválja, ezek következményeképpen gátlódik az apoptózis, károsodik a sejtciklus szabályozása és fokozódik a sejtproliferáció³². A TP53 gén a fej-nyaki laphámrákok csaknem 45 %-ában mutálódik, míg a pRb mutációk ritkák, ám a pRb fehérjét szabályzó TP16³³ és ciklin D expresszója nagyon gyakran fokozódik³⁴. A TP16 egy ciklin dependens kináz inhibitor (CDKI), melynek túlzott expressziója megakadályozza a pRb foszforilációját, ezáltal a sejtciklus gátló szabályozása megszűnik. Bizonyított továbbá, hogy a TP16 pozitivitás szoros korrelációt mutat a hosszabb távú túléléssel, tehát fontos prognosztikus marker^{35,36}. A p16 immunhisztokémiai szűrés a szövettani vizsgálat során ma már rutin diagnosztikai módszer.

A HPV benignus és malignus elváltozásokért egyaránt felelőssé tehető. Ezt a genomba való beépülése határozza meg: ha a vírus csak epizomálisan van jelen, jóindulatú, míg, ha integrálódik a genomba, rosszindulatú elváltozást okozhat³⁷. A HPV a többrétegű hám bazális sejtjeit fertőzi meg. Az epiteliális sejtek differenciálódásának módosítása a sejtciklus szabályozása révén a DNS replikáció folyamatos újraaktiválódását eredményezi, és a HPV vírus genomjának replikációjához vezet^{38,39,40}. A HPV típusok közül mukozális és kután

formákat különítünk el. A rosszindulatú fejnyci daganatokat okozó mukozális típusokat onkológiai kockázati csoportok alapján alacsony, közepes és magas kockázatú típusokba lehet besorolni. Gyakran látunk multiplex vírusfertőzéseket, ebből arra következtethetünk, hogy a különböző genotípusok egymással interferálhatnak, így befolyásolhatják egymás fertőzőképességét. Azonban a különböző HPV-genotípusok közötti interferencia jelenleg még nem bizonyított és egymás virulenciájára gyakorolt hatásai még nem ismertek.

A HPV pozitív oropharyngeális daganatokra vonatkozó klinikai megfigyelések azt mutatják, hogy viselkedésük jelentősen különbözik a HPV negatív oropharyngeális tumoroktól, miszerint kevésbé agresszívak, fiatalabb életkorban jelennek meg, jellemző a nagy nyirokcsomó áttét egy viszonylagos kis kiterjedésű tumor jelenléte mellett, továbbá jobban reagálnak az onkológiai kezelésre^{41,42,43}. Ezen adatok alapján új TNM osztályozást vezettek be a HPV pozitív mesopharynx daganatokra vonatkozóan, mely szerint ugyanakkora kiterjedésű és ugyanolyan nyirokcsomó státuszú HPV pozitív páciens alacsonyabb stádium besorolásba kerül, mint a HPV negatív beteg. Ezt az állítást támogatja a The Cancer Genome Atlas (TCGA) a HPV pozitív és negatív fej-nyaki laphámrákakat összehasonlító molekuláris vizsgálata, ahol a HPV-vel társult és a nem vírus asszociált-laphám karcinómás csoportok közötti különbséget egyértelműen megerősítették⁴⁴.

I./5. A mikro-RNS

A mikro-RNS-ek (mi-RNS) az utóbbi évek kutatásainak középpontjában állnak. 1990-es években fedezték fel egy mikroszkopikus nematódában (*Caenorhabditis elegans*), és rájöttek, hogy más fajokban, így az emberben is expresszálódnak⁴⁵. A mi-RNS-ek kis, 19-25 bázispár hosszúságú RNS-ek, melyek intra- vagy intergenikus, tehát nem kódoló szakaszról íródnak át, és nem transzlálódnak. Szintézisük többlépcsős folyamat: a transzkripciót RNS-polimeráz III. végzi, ami egy 1-3 kb hosszú, kettős szálú prekursor, a primer miRNS-t (pri-miRNS) hoz létre, jellegzetessége, hogy hajtú-struktúrákat (stem loop) tartalmaz. Ezután még a sejtmagon belül egy endoribonukleáz, a DROSHA és kofaktora, a DGCR-8 (di George syndrome critical region) segítségével a stem loop részeket leválasztja. Az így keletkezett 70-100 nukleotid hosszúságú pre-miRNS a citoplazmába Ran-GTPáz aktivitású Exportin-5 segítségével jut ki. Végző átalakítását a DICER ribonukleáz és kofaktora, a TRBP (Tar RNA binding protein) végzi a terminális hurok eltávolításával, és így kialakul a 19-25 bázispár hosszúságú miRNS. Az érett miRNS beépül egy ribonukleotid komplexbe, a RISC-be (RNA induced silencing complex). Itt

a kettős szálú miRNS szétcsavarodik, elválk egymástól, a vezérszál stabilizálódik, a másik szál pedig degradálódik. Ezt követően kötődésük a messenger RNS-ekhez (mRNS) ehhez a komplexhez kapcsolatosan történik. A RISC a miRNS-en kívül argonauta fehérjét (emlősökben négy változat ismert: AGO-1-4) és több más fehérjét tartalmaz. A miRNS a cél mRNS-hez kötődve szabályozza annak működését. A szabályozás történhet a target mRNS 3' UTR (untranslated region) szakaszához történő kapcsolódással, de kötődhet az 5' UTR szakaszhoz vagy ORF-hez (open reading frame) is. Így a miRNS blokként gátolja a transzlációt, vagy lebontó endonukleázokat aktiválva a mRNS degradációját okozza. A kötődéshez, így a szabályozáshoz nem szükséges a teljes komplementaritás^{46,47,48}.

Eddig 38.589 miRNS-t azonosítottak (mirBase.org 2020. március). Fontos szerepet játszanak a sejtek posztranszkripciós szabályozásában. Valószínűsítik, hogy a genom 50-60%-át szabályozzák a miRNS-ek. Egy mRNS-t több miRNS szabályozhat, és egy miRNS több mRNS transzlációját befolyásolhatja^{46,47,49,50}. Így lehetővé válik a génexpresszió finom hangolása, a sejt életfolyamatainak - a differenciáció, a sejtosztódás, az apoptózis, az intermedier anyagcsere folyamatok - harmonikus szabályozása, a homeosztázis fenntartása⁵¹. Mindebből következik, hogy, ha a sejtek életfolyamatainak bármely területén változás következik be, a miRNS mintázat, a miRNS-ek mennyisége megváltozik; pontosabban a miRNS-ek szabályozó képességének módosulása, károsodása vezet élettani funkciók megváltozásához - tehát gyulladási folyamatokban, szövetskárosodás során, daganatos betegségekben detektálható ez az eltérés. Ugyanakkor természetes élettani folyamatokban, például terhességben is megfigyelhető a miRNS kifejeződés változása, mivel a placenta bizonyos miRNS-eket fokozottan termel^{52,53,54}.

Adott szövet daganatos és egészséges sejtjeit összehasonlítva a miRNS mintázat eltérést mutat. Ez abból következik, hogy a miRNS gének fragilis kromoszóma régiókban találhatóak, melyek daganatokban gyakran szenvednek deléciót, transzlokációt, töréseket^{46,47}. A genom szintű változásokon kívül a miRNS-ek érése során bekövetkező módosulások, epigenetikus eltérések is vezethetnek eltérő miRNS kifejeződéshez^{55,56}. Ez úton jöhet létre - a mRNS transzláció eltérésein keresztül - a fehérjék, a jelátviteli utak megváltozása, majd a sejt malignus transzformációja.

Aszerint, hogy mely gén funkcióját gátolják, a miRNS-ek viselkedhetnek onkogénként (onkomir) illetve tumorszupresszor géneként. Mutathatnak csökkent vagy fokozott

expressziót⁴⁷. Mivel a miRNS-ek kifejeződése sejt és szövet specifikus, a különböző szervek daganatai más miRNS kifejeződést eredményeznek (1. táblázat).

Tumoros szövet típusa	Fokozott kifejeződés	Csökkent kifejeződés
fej-nyak	miR-16, miR-18, miR-21, miR-31, miR-146b, miR155, miR-221, miR-222, let-7	miR-26b, miR-107, miR-133b, miR-138, miR-139, miR-342, miR-373
pajzsmirigy	miR-146, miR-197, miR-221, miR-222, miR-346	
cervix	miR-10a, miR-132, miR-148a, miR-196a, miR-302	miR-26a, miR-143, miR-145, miR-203, miR-513
petefészek	miR-141, miR-200, miR-221	let-7f, miR-140, miR-145, miR-199a, miR-424
here	miR-372, miR-373	
prosztatata	let-7d, miR-195, miR-203	miR-128a
emlő	miR-21, miR-29b-2, miR-155	miR-10b, miR-17-5p, miR-27b, miR-125b, miR-145, miR-155
vastagbél	miR-10a, miR-20a, miR-21, miR-31, miR-191	miR-143, miR-145, miR-342, let-7
máj	miR-18, miR-224	miR-125a, miR-195, miR-199a, miR-200a
hasnyálmirigy	miR-21, miR-24, miR-100, miR-103, miR-107, miR-125b, miR-221, miR-301, miR-376	miR-375
gyomor	miR-21, miR-103, miR-223	miR-218
tüdő	miR 17-5p, miR-31	let-7

1. táblázat: miRNS-ek jelenléte a különböző daganattípusokban.

2008-as felfedezés, hogy a miRNS-ek a szérumban, a nyálban és más testnedvekben is jelen vannak^{57,58}. Ezek a szabad, érett miRNS-ek kis méretük miatt endonukleázokkal szemben nagyon ellenállóak és stabilak, így laboratóriumi körülmények között reprodukálhatóan kimutathatók⁵⁹. Szilárd szerkezetükhöz hozzájárulnak egyéb mechanizmusok is, így specifikus fehérjekötések, metilációs, adenilációs modifikációk vagy mikrovezikulákba való integráció^{58,60}. Az, hogy milyen módon kerülnek a testnedvekbe nem teljesen tisztázott. Ismertek sejt-sejt interakciók, mely során miRNS-mRNS csere játszódik le, mintegy megvalósítva a sejtek közti kommunikációt. Szövetkárosodáskor, apoptóziskor felfigyeltek a miRNS passzív kiáramlására, ám vezikulákból történő aktív szekréciójukra is van tudományos

bizonyíték^{61,62}.

Lehetőség nyílik tehát a szövetek vizsgálatán túl, vérből, nyálból vagy más testnedvekből történő miRNS izolálásra. A miRNS-ek nem csupán a tumoros folyamat meglétéről adnak tájékoztatást, hanem az áttétek kialakulásáról is, és ami még jelentősebb, a tumoros folyamatot olyan korán jelzik, mikor még fenotípusosan a sejtek egészségesnek tűnnek, ám genetikai szinten elindultak már a malignus átalakulás felé. Így nem csak diagnosztikai és prognosztikai faktorokról van szó, hanem prediktív markerekként is tekinthetünk rájuk^{57,63}. Fej-nyaki daganatok esetén a nyálból történő miRNS izolálás a betegek utánkövetésén túl a veszélyeztetett populáció szűrése céljából is nagyon jelentős volna, hiszen bevált szűrő módszer nem áll rendelkezésre.

I./6. Cancer-field (tissue organization field theory, TOFT)

Először 1953-ban Slaughter és munkacsoportja figyelték meg, hogy bizonyos daganatok esetén igen gyakori a tumorrecidíva, illetve a szekunder primer tumor kialakulása, és ők vetették fel elsőként a field-cancerization elméletet, mint a tumorgenezis modelljét. Azóta a molekuláris biológia fejlődésével ez a modell egyre inkább a figyelem középpontjába került és regisztrálták a fej-nyaki-, emlő-, bőr- és nyelőcsődaganatok esetében is^{64,65,66}. A field-cancerization vagy cancer-field a tumorfejlődés paradigmája. Lényege, hogy a malignus lézió mikroszkopikus kialakulása előtt a normál sejtvonal pro-tumorogén epigenetikai változásokat szenved, és ezek a változások pozitívan szelektálódnak az egyébként egészséges szerv, szövet mikro környezetében⁶⁷. A teória értelmében a karcinogenezis elsősorban a szöveti szerveződés problémja. A környezeti karcinogének elpusztítják a normál szöveti architektúrát, ezáltal megzavarják a sejtek közti jelátvitelt és veszélyeztetik a genom integritását. Ennélfogva a TOFT-ban a DNS-mutációk a szöveti események következményei és nem okai.

A karcinogenezis folyamatában tehát a sejtek közti interakciók miRNS, mRNS transzmisszió útján is hozzájárulnak a premalignussá váláshoz. Tehát ezen a területen, ezekben a sejtvonalakban mutációk szintjén kimutathatók a daganatra jellemző eltérések – pontmutációk, kromoszóma aberrációk, amplifikáció –, de nem mindegyik daganatképződéshez vezető eltérés van jelen, és fontos megjegyezni, hogy mikroszkopikusan ép sejtekről van szó. A genetikai és epigenetikai változások különféle fenotípusos változásokat eredményeznek, melyek nem feltétlenül morfológiai jegyeket jelentenek, hanem ide sorolható

például a sejtek fokozott növekedési üteme, az immunrendszer elkerülésének képessége és a csökkent sejthalálozás. Ezek a fenotípusos eltérések lehetnek átmenetiek, illetve jelenthetnek csupán minimális változást, ám érzékenyítik a sejtet a további mutációk kialakulására⁶⁸.

A HPV negatív fej-nyaki daganatok túlélése a növekvő terápiás stratégiák ellenére az utóbbi évtizedekben szignifikánsan nem javult. A daganatok nagyon gyakran recidíválnak és a szekunder tumor kialakulási aránya is magas. Ezt a magas kiújulási rátát a tumor környezetében lévő cancer-field eredményezi, mely jóval nagyobb területet érint, mint a tényleges tumor mérete. Amennyiben ez a terület kívül esik a műtéti rezekciós széleken, magyarázata lehet az ismételt tumor kialakulásának és hozzájárulhat a rossz prognózishoz⁶⁹. (3. ábra)

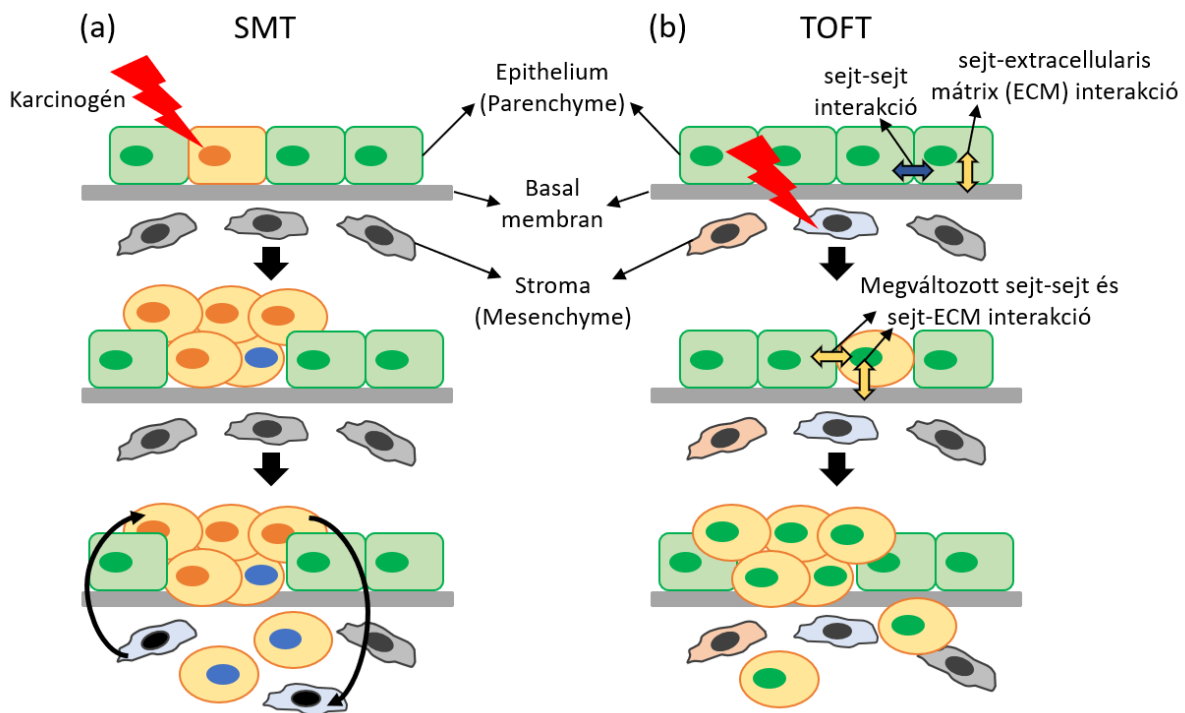
Ryser és munkatársai mintegy 20.000 beteg adatait vizsgálva egy matematikai modellt dolgoztak ki a cancer-field meghatározására. Vizsgálataik kimutatták, hogy a primer daganatot körülvevő mező várható mérete 50-90 éves kor között megkétszereződik, továbbá az egymástól független felder kialakulása 80 éves korra 20 %-kal nagyobb arányban van jelen. Ezen eredmények fényében újra kell értékelni a sebészi rezekciós széleket. Ezekkel az adatokkal összefüggésben továbbá azt találták, hogy idős korban, 3 cm-nél kisebb tumorméret esetében, a csak műtéttel kezelt betegek mortalitása magasabb, azon idős betegekkel szemben, akik csak sugárkezelésben vagy posztoperatív sugárkezelésben is részesültek. Ez azzal magyarázható, hogy a sugármező nagyobb területet ölel fel, mint a műtéti rezekciós zóna, vagyis a genetikai- és epigenetikai mutációkat szenvedett felder nagyobb eséllyel érinti. Természetesen ezen eltérések több további klinikai és biológiai tényező kombinációjából is adódhatnak⁷⁰. Más szerzők kimutatták, hogy a dohányzás abbahagyása csökkent mezőméretet eredményez⁷¹.

Nehézséget jelent a klinikumban, hogy a cancer-field láthatatlan, így kiterjedése ismeretlen. Ismerete a pontos prognózisbecsléshez, továbbá a megfelelő terápia megtervezéséhez elengedhetetlen lenne, melyek segítségével jobb mortalitási mutatókat érhetnénk el. Kutatásunk során ezért igyekeztünk a cancer-felder detektálni a miRNS, mint epigenetikus marker expressziós változásai illetve a kidolgozott térképbiopszias mintavétel által.

I./7. Szomatikus mutációs teória (somatic mutation theory, SMT)

A cancer field elmélet mellett a másik, tumorgenezis magyarázatát szolgáló teória a szomatikus mutációs teória. Az elmélet lényege, hogy a tumor egyetlen szomatikus sejtől származik, mely egymás után több DNS mutációt halmozott fel, és ezek a mutációk olyan

géneken történtek, melyek a sejtproliferációt és a sejtciklust szabályozzák. Az SMT szerint tehát a normál szöveti architektúrát elpusztító daganatos elváltozások DNS-szintű események eredményei^{73,74}. Vagyis DNS-szintű történések eredménye, mely végül a sejt, a szövet normális, egészséges stukturáját elpusztítja. Ilyen szomatikus mutációkat okoznak a vírusok (például a HPV) illetve a sugárterhelés. Míg a környezeti karcinogén ágensek a cancer field elmélet szerint elsőként a sejt-sejt interakciókat, a szöveti strukturális szerveződést bontják fel, epigenetikai elváltozásokat okozva veszélyeztetik a genom integritását, addig a szomatikus mutációs elmélet szerint a tumor egyetlen sejt klónja^{75,76}. Szakirodalmi adatok szerint egyes citogenetikai vizsgálatok kimutatták, hogy sok primer tumorban az összes sejt ugyanazt a kóros kariotípust mutatja, például plazmasejt daganatok által termelt immunoglobulin szinte minden esetben egyetlen klónra jellemző homogenitással rendelkezik⁷⁷. A két ismert daganatkialakulási teória, a SMT és a TOFT adhat magyarázatot a HPV asszociált és a HPV negatív fej-nyaki daganatok eltérő biológiai viselkedésére és prognózisuk különbözőségére (3. ábra).



3.ábra: (a) A szomatikus mutációs teória (SMT) sematikus ábrája.

(b) A cancer-field daganatfejlődési modell (TOFT) sematikus ábrája.

ECM: extracelluláris mátrix

II. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk célja volt, hogy a mesopharynx és hypopharynx daganatokat elkülönítve vizsgálva a fej-nyak más régióitól, pontosabb képet kapjunk ezen lokalizációjú tumorok molekuláris biológiai tulajdonságairól a miRNS expressziós mintázat tükrében. Az epigenetikai eltérések által próbáltuk feltérképezni a cancer-fieldet, továbbá kombinált radiológiai-molekuláris 3D modell segítségével igyekeztünk láthatóvá tenni ezt a területet. A fentiek alapján olyan markereket kerestünk, melyek a későbbiekben diagnosztikus és prediktív szereppel bírhatnak.

- I. Kutatásunk első fázisában a meso- és hypopharynx karcinómák cancer field alapú miRNS expressziós mintázatának vizsgálatát terveztük.
 - Olyan speciális térképsiopsziás mintavételi eljárás kidolgozása volt a cél, mely nem csak a daganatos és makroszkóposan ép terület összehasonlító vizsgálatára irányul, hanem amelynek segítségével, 4 mintavétellel, a daganattól egyre távolodva, a cancer-field pontosabban feltérképezhető.
 - Célul tűztük ki egy miRNS alapú daganat- és lokalizációs-specifikus biomarker panel összeállítását.
 - További célunk volt a daganatlokalizációk egymással történő összehasonlítása a panel alkalmazásával nyert miRNS expressziók függvényében.

- II. Kutatásunk második fázisában a HPV pozitív és negatív mesopharynx karcinómák összehasonlító analízisét terveztük a miRNS expressziós változások függvényében.
 - Célul tűztük ki a HPV pozitív és negatív daganatok és a daganatos szöveteket körülvevő nyálkahártya szegmentumok miRNS mintázat változásainak összevetését.
 - Emellett célunk volt a cancer field alapján egy komplex molekuláris genetikai- képződiagnosztikai modell kidolgozása.

III. A VIZSGÁLAT ELSŐ SZAKASZA

III./1. Anyag és módszerek

III./1.1. Mintagyűjtés

Vizsgálatunk első fázisában szövettanilag igazolt meso- és hypopharynx laphámkarcinómákat vizsgáltunk. Mintáink a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinika betegeitől származnak, a mintavételek 2014. szeptember – 2015. április között történtek. Mintáinkat egységes eljárás szerint, intraoperatívan a tumor széléből (0), a daganattól 1 cm-re (1), a daganattól 2 cm-re (2), illetve a tumortól legalább 3 cm-re (3) fekvő ép nyálkahartyaszövetből vettük (4. ábra). A mintákat a műtetet követően azonnal –80 °C-ra fagyasztottuk a laboratóriumi feldolgozásig. Vizsgálatainkat a betegek beleegyezési nyilatkozatával és a Regionális Kutatásetikai Bizottság engedélyével végeztük, az etikai engedély száma: 316-26465 (4319) KK 15/2011.



4. ábra: Jobb oldali tonsillatumor és a térképbiopsziás mintavételi eljárás ábrázolása.

1: tumor, 2: tumortól 1 cm-re, 2: tumortól 2 cm-re, 3: tumortól 3 cm-re

A miRNS-expressziós analízis során összesen 52 szövetmintát vizsgáltunk 13 betegről, amelyből 5 hypopharynx-, 8 mesopharynx daganatból származott. A tumoros szövetminták klinikopatológiailag II-es, III-as és IV-es stadiumú laphámsejtes karcinómának feleltek meg. A mintavétel alapjául szolgáló daganatok lokalizáció, nem és stádium szerinti beosztását a 2. táblázat mutatja be.

		Mesopharynx (n=8)	Hypopharynx (n=5)	Összes (n=13)
		N (%)	N (%)	N (%)
Nem	nő	1 (12%)	1 (20%)	2 (15%)
	férfi	7 (87%)	4 (80%)	11 (85%)
Kor	0-44	0	0	0
	45-64	5 (62%)	4 (80%)	9 (69%)
	65-	3 (37%)	1 (20%)	4 (31%)
Lokalizáció	tonsilla	3 (37%)	recessus piriformis 2 (40%)	
	nyelvgyök	2 (25%)	retrocricoid régió 2 (40%)	
	oldalsó oropharyngealis garatfal	1 (12%)	hátsó garatfal 1 (20%)	
	tonsillolinguális átmenet	2 (25%)		
T	1	0	0	0
	2	3 (37%)	2 (40%)	5 (38%)
	3	4 (50%)	3 (60%)	7 (54%)
	4	1 (12,5%)	0	1 (7%)
N	0	0	1 (20%)	1 (7%)
	1	3 (37%)	1 (20%)	4 (31%)
	2	4 (50%)	2 (40%)	6 (46%)
	3	1 (12,5%)	1 (20%)	2 (15%)
Összstádium	II.	0	1 (20%)	1 (7%)
	III.	3 (37%)	1 (20%)	4 (31%)
	IV.	5 (62%)	3 (60%)	8 (62%)
Rizikócsoportok	alkohol	4 (50%)	3 (60%)	7 (54%)
	dohányzás	7 (87%)	4 (80%)	11 (85%)

2.táblázat: A 13 beteg lokalizáció, nem és stádium megoszlása.

III./1. 2. A vizsgált miRNS-ek

A 8 vizsgált miRNS tulajdonságait az eredmények könnyebb értelmezhetősége kedvéért itt röviden összefoglalom:

A *miR-21* erős onkogén tulajdonságú miRNS. Vizsgálatunkban meso- és hypopharynx lokalizációjú daganatok esetén is szignifikánsan fokozott expressziót mutatott. Kifejeződése a mesopharynx daganatokban a daganathoz közelebb fekvő ép szövetekben csökkent alacsonyabb értékre, míg a hypopharynx daganatokban csupán a daganattól 3 cm-re lévő szövetekben mutatott számottevő csökkenést. A logisztikus regressziós vizsgálat során a hypopharynx daganatokban a miR-21 értékei egyébként jelentősen magasabbnak is bizonyultak a mesopharynx daganatokénál.

A *miR-34a* és *miR-143* tumorszuppresszor tulajdonságú miRNS-ek. Az eddigi kutatások a HPV-asszociált fej-nyak daganatokban csökkent kifejeződésüket azonosították^{78,79}. Vizsgálatunkban szintén alacsony expresszió jellemezte ezeket a miRNS-eket. Mesopharynx daganatok esetén a daganattól 2 és 3 cm-re találtuk meg ezen miRNS-eket, a hypopharynxban azonban a miR-34a már a daganattól 1 cm-re lévő szövetekben is megjelent, így a kifejeződés eltűnése ezekben a daganatokban nagyon szorosan összefüggött a daganatos fenotípussal.

A *miR-146a* és *miR-148a* szerepe a gyulladásos folyamatok és a karcinogenezis kapcsolódási pontjaiban jelentős^{80,81}. Vizsgálatunkban mindkét miRNS a hypopharynx daganataira volt jellemző. Kifejeződésük a daganatokra és peritumorális szövetekre is jellegzetes volt, és szélesen a daganat körül megtalálható maradt.

A *miR-155* daganatinváziót elősegítő miRNS^{82,83}. Vizsgálatainkban a miR-155 a tumoroknál jelentős kifejeződést mutatott és még a daganatoktól 2 cm-es távolságra lévő szövetekben is jelen volt.

A *miR-221* a daganatok rossz prognózisával és a tumorinvázió mértékével mutat összefüggéseket^{84,85}. Vizsgálatunkban ez a miRNS kifejezetten a mesopharynx daganatokra és a peritumorális szöveikre volt jellemző. A hypopharynxban nem volt kimutatható. Ennek oka – azon kívül, hogy a hypopharynx daganatok esetén ez a marker nem jellegzetes – lehet az is, hogy a hypopharynxban esetleg elterő nukleotid-sorrendű variáns érik ki, amelyet az általunk alkalmazott specifikus primer szekvenciák nem tudtak hatékonyan amplifikálni. Mivel a miR-221 esetén találtuk a leghatározottabb eltérést a két daganattípus között, további vizsgálatainkkal ennek a különbségnek a tisztázására figyelmet szenteltünk.

A *miR-27a* egy, az irodalomban eddig még kevésbé vizsgált miRNS⁸⁶. Vizsgálatunk során mesopharynx és hypopharynx daganatokban egyaránt nagyon hasonló viselkedést

mutatott, mint a miR-21. A miR-21-gyel való szekvenciális hasonlóságaik miatt valószínűleg az mRNA célmolekuláinak egy részét képes a miR-27a is gátolni.

III./1. 3. RNS izolálás és reverz transzkripció

A teljes nukleinsav-izolálás menetét a szövetminták izolált homogenizálásával kezdtük, 60 µg kiindulási szövetből, amelyhez 150 µl lízispuffert adtunk (High Pure miRNA Isolation Kit, katalógusszám: 05080576001, Roche, Mannheim, Németország). Mintáinkat MagNA Pure Green Beads (Roche) kerámiagyöngyös homogenizálósövekbe mértük, és MagNA Lyzer (Roche) rázóhomogenizátor segítségével homogenizáltuk. Ezt követően a nukleinsav-izolálást a Roche High Pure miRNA izolációs kit vegyszereinek felhasználásával és a hozzá tartozó használati útmutatónak megfelelően végeztük. Az így nyert teljes RNS minőségét abszorpciós fotometriával ellenőrizzük (260/280 nm A>1,9). Minőségi ellenőrzést követően a mintáinkat azonnal felhasználtuk a további vizsgálatainkhoz. A miRNS-frakciókat reverz transzkripció során írtuk át cDNS-re. Universal cDNA synthesis kitet (Quiagen, Woburn, MA, Amerikai Egyesült Államok) használtunk, radnom hexamer priming alkalmazásával, amely a kitben szerepelt.

III./1. 4. PCR analízis

A teljes szöveti RNS-ről átírt cDNS-mintákat kvantitatív PCR-rendszerben (Roche LC480 rendszer és LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit, Roche) amplifikáltuk. Az általunk vizsgált miRNS-eknek megfelelően specifikus primereket használtunk az universal miCURY LNA primer szettből (Exiqon, Vedbaek, Dania) hsa-miR-21, -27a, -34a, -143, -146a, -148a, -155, -221. Belső kontrollként pedig az universal miCURY LNA 5S rRNS-nek, valamint az U6 snRNS-nek megfelelő specifikus primereket alkalmaztuk. A PCR-reakcióoldat minden esetben 2 µl primer mixet, 8 µl cDNS-templátot és 10 µl LC480 SYBR Green I Master mixet tartalmazott 20 µl ösztérfogóban. Az amplifikáció 8×12-es plate-en történt, az általunk tervezett forma szerint: PCR futásonként a plate 6 daganatspecifikus miRNS-t és 2 belső kontrollt tartalmazott, amelyeket 10 ismeretlen nukleinsav-koncentrációjú mintán, egy sor ismert koncentrációjú pozitív mintán és egy sor negatív kontrollal szemben vizsgáltunk. A real time PCR során kapott expressziós értékeket az LC480-as PCR-gépen a Light Cycler Exor 4.0

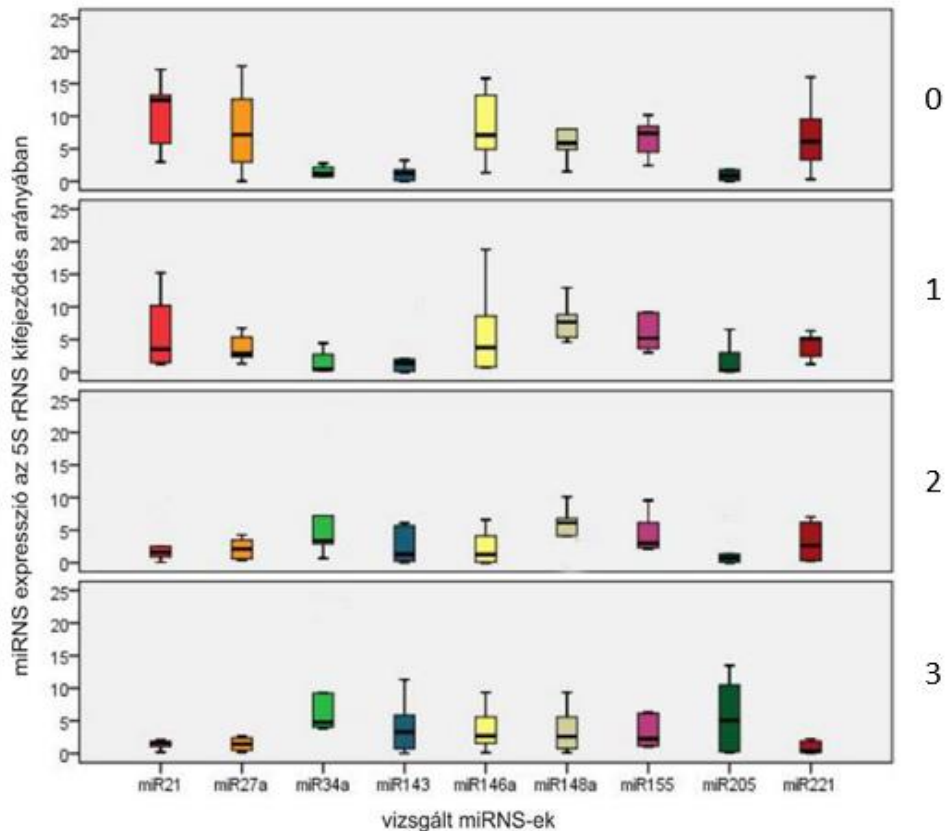
szoftver segítségével a belső kontrollhoz viszonyítva relatív kvantifikációs analízissel számoltuk ki ($\Delta\Delta C_p$ módszerrel).

III./1. 5. Statisztikai analízis

A kapott relatív kvantifikációs arányszámokat – a tumorszéli mintákban, a tőle 1 cm-re, 2 cm-re, illetve 3 cm-re lévő ép szövetekben kétszélű kétmintás t-próbával, valamint bináris logisztikus regresszió alkalmazásával – elemeztük SPSS 21.0 szoftver segítségével.

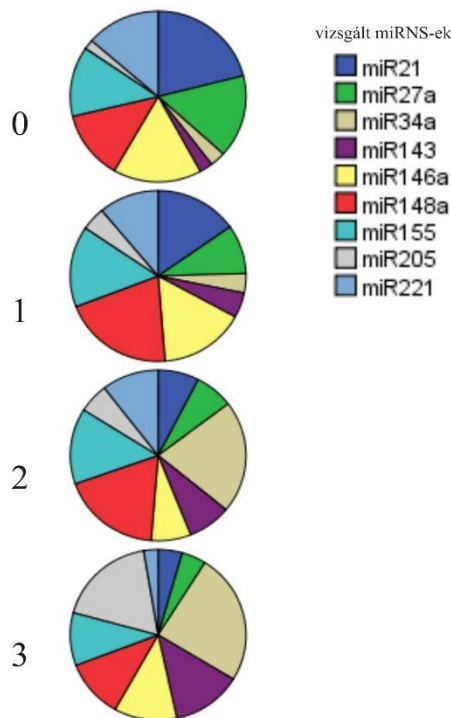
III./2. Eredmények

Vizsgálatunk elsődleges célja a cancer-field molekuláris jellemzése volt meso- és hypopharynx daganatokban. Ehhez a tumoros és az általunk kidolgozott séma szerinti mikroszkóposan ép nyálkahártya-területekről vett szövetminták egymással történő miRNS-expressziós mintázatának összehasonlítását végeztük el. A daganathoz képest attól centiméterenként távolodva az ép nyálkahártyaszövetekben jellegzetes miRNS-kifejeződési mintázatot találtunk (5. ábra).



5.ábra: A vizsgált miRNS-ek mennyisége: 0: a tumorban, 1: a tumortól 1 cm-re, 2: a tumortól 2 cm-re, 3: a tumortól 3 cm-re.

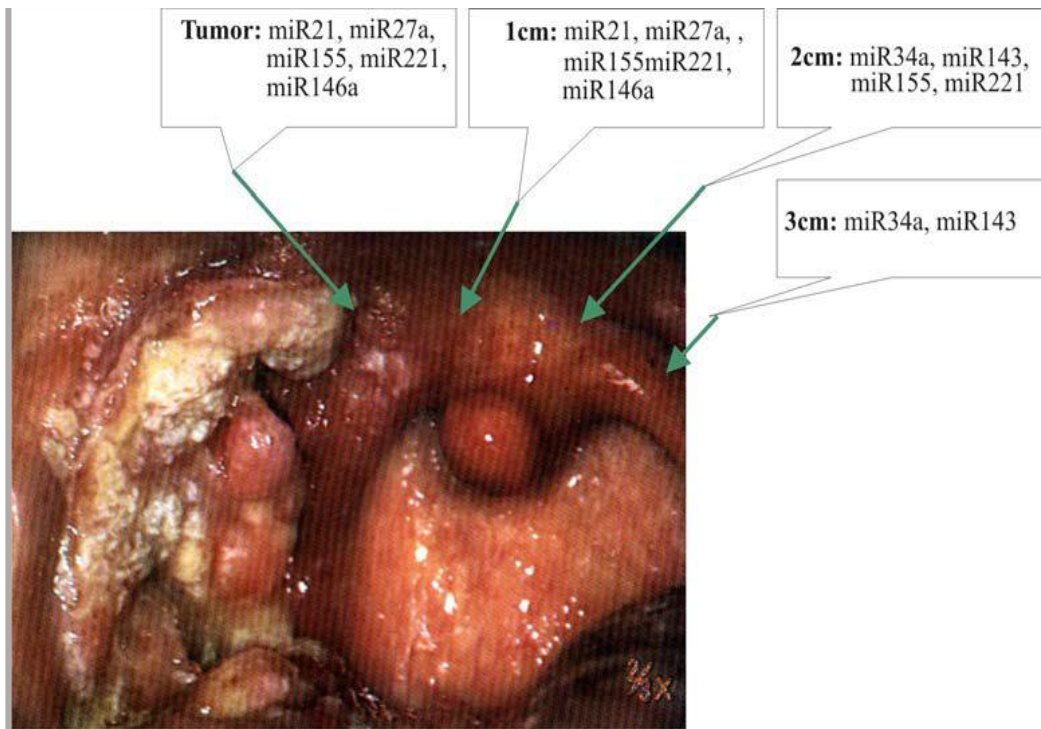
Amennyiben a vizsgált miRNS-ek kifejeződését a tumorokban, valamint a tumortól meghatározott távolságra lévő szövetekben minden esetben egymáshoz viszonyított arányaiban fejezzük ki, úgy még szemléletesebb különbségeket találunk a daganatot körülvevő nyálkahártya miRNS-expressziós jellemzésére (6. ábra).



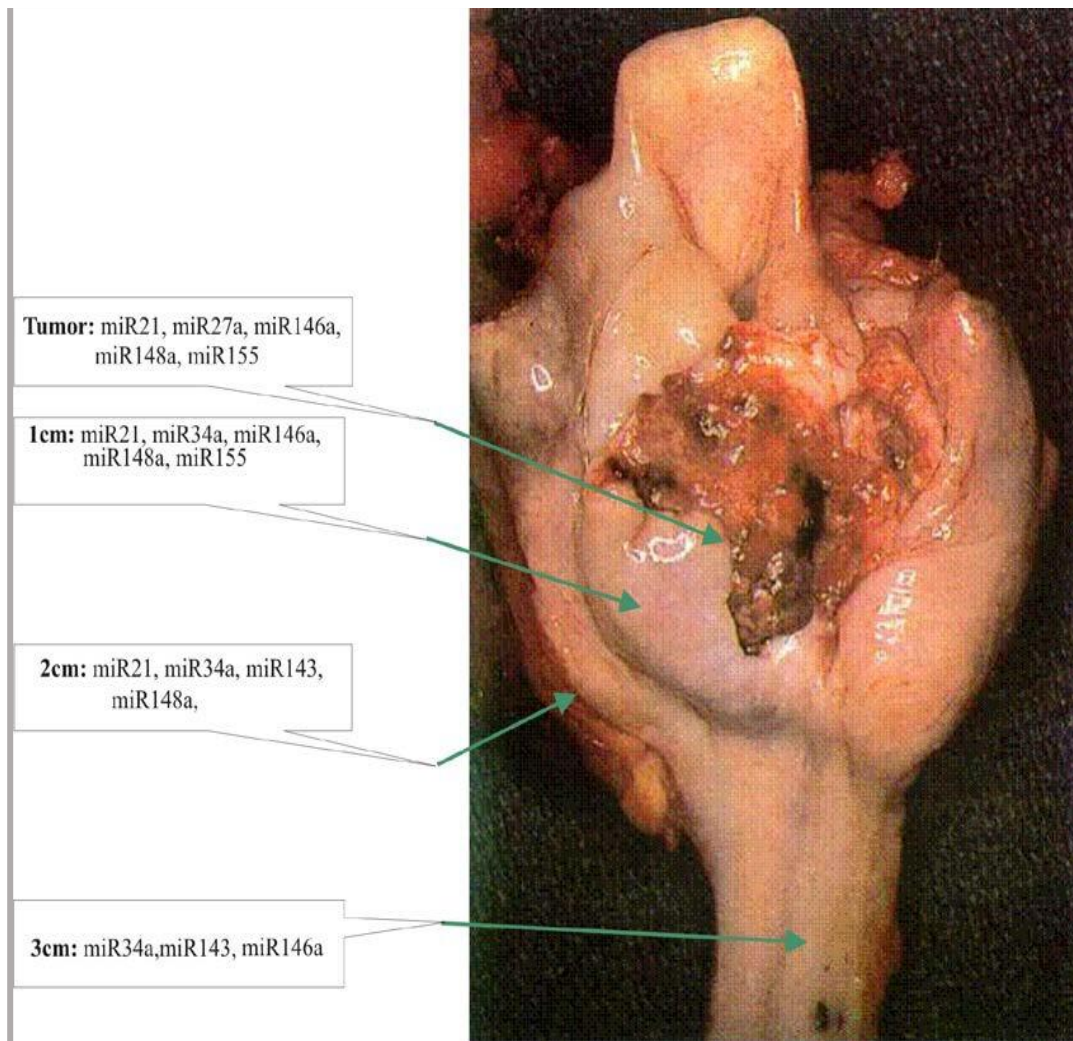
6.ábra: A miRNS expressziók egymás arányaiban kifejezve.
0: tumor, 1:tumortól 1 cm-re, 2: tumortól 2 cm-re, 3: tumortól 3 cm-re.

Egymás arányaiban kifejezve a tumor szélén a miR-21, miR-27a, miR-221 mintegy a teljes expresszió 50%-át adja, ez a daganattól legtávolabb eső szövetekben alig 15%. Míg a miR-34a és miR-143 éppen ellenkezőleg, a daganatokban 10% alatti expressziós arányt mutat, ami fokozatosan mintegy 40% körülire nő a daganattól távol eső szövetekben. A daganat szélétől 1 cm-re eső nyálkahártya az egymásra vonatkoztatott expressziós arányokban kevés eltérést mutat magától a daganattól, míg 2 cm-es, illetve 3 cm-es távolságban már markánsabban eltér. A 2 cm-es távolság már több közös vonást mutat a 3 cm-re fekvő ép nyálkahártya miRNS kifejeződési mintázatával, mint a daganatéval.

A mesopharynx- és hypopharynx minták miRNS-expressziós adatait összehasonlítva a két lokalizáció között szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk. Statisztikailag szignifikánsnak bizonyult a miR-21, miR-143, miR-155 és miR-221 tekintetében.



7.ábra: Jobb oldali tonsilla palatinából kiinduló laphám karcinóma, és az ettől cm-ekre lévő ép peritumorális szövet és az adott területre jellemző miRNS profil.



8.ábra: Retrocricoid régióból kiinduló, mindkét oldali recessus piriformist involváló laphám karcinóma, és az ettől cm-ekre lévő ép peritumorális szövet és az adott területekre jellemző miRNS profil.

A miR-21, -143, -155 a hypopharynxból származó mintákban szignifikánsan magasabb expressziós értékeket mutatott, míg a miR-221 kifejeződése kizárólag a mesopharynxból vett szövetekben volt kimutatható ($p < 0,05$).

A daganatos és a peritumorális szöveteket vizsgálva mind hypo-, mind mesopharynx tekintetében a tumoros és a tumortól 1 cm-re lévő mikroszkóposan ép szövet epigenetikailag nagyon hasonló (7., 8. ábra).

III./3. Az első vizsgálati szakasz eredményeinek összegzése

A miRNS-kifejeződés mennyiségi különbségeit tekintve számos érdekes és jellegzetes eltérést tapasztaltunk a daganatok és a tőlük meghatározott távolságra lévő, fenotípusosan ép szövetek, illetve a két eltérő lokalizációban elhelyezkedő daganatok és peritumorális szövetek szempontjából. A vizsgálatunkban szereplő miRNS-ek karcinogenezisben betöltött szerepe korábban ismert volt számunkra, a meso- és hypopharynx laphámdaganatok előfordulásában játszott szerepüket azonban még nem írta le a szakirodalom. A legmarkánsabbnak, szinte minden összehasonlításban statisztikai szempontból is szignifikánsnak a miR-21 bizonyult.

A miRNS-kifejeződés tekintetében számos jellegzetes sajátosságot észleltünk a daganatszövetek, valamint az eltérő távolságra fekvő ép szövetek szempontjából. A mesopharynx- és hypopharynx minták lokalizációs-specifikus összehasonlításában elsősorban a miR-221 jelenléte, valamint a miR-21, 143 és 155-expresszió mennyiségi különbségei voltak megfigyelhetők. A miR-21, 143 és 155 marker magasabb kifejeződést mutatott a hypopharynx laphámdaganatokban, míg a miR-221 mesopharynxban volt szignifikánsan magasabb. Ennek magyarázatául az életmódbeli etiológiai faktorok magasabb dózisu jelenléte szolgálhat.

Tekintettel ezen miRNS expressziós eredményekre, a kutatásunk második szakaszában a ledominánsabb expressziós különbségeket mutató miR-21-et, miR-143-at, miR-155-öt és miR-221-et alkalmaztuk a további vizsgálatainkban.

IV. A VIZSGÁLAT MÁSODIK SZAKASZA

IV./1. Anyag és módszerek

IV./1. 1. Mintagyűjtés

A szövetmintákat (10-60 mg) szövettanilag igazolt mesopharynx tumoros betegektől vettük, akik műtéti kezelésben részesültek a PTE KK, Fül-, Orr-, Gégészeti-, és Fej-, Nyaksebészeti Klinikán. A 2017 november - 2018 április között történt vizsgálati időszakban kezelt 48 betegből végül 25, T2-3 stádiumú mesopharynx daganatos beteget választottunk be a vizsgálatba. Mindegyik betegnek igazolt laphám karcinómája volt. A daganatok osztályozását és klinikopatológiai értékelését egy patológus és egy fej-nyak sebész végezte a “8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer, American Joint Committee on Cancer (AJCC), 2017” szerint. A klinikopatológiai stádiumbesorolást, a HPV P16 immunhisztokémiát és a HPV genotipizálást minden vizsgált beteg esetében elvégeztük. Mintagyűjtési stratégiánk szigorú sémát követett, hogy a tumorszövet körüli ép nyálkahártya miRNS expressziós mintázatát a lehető legpontosabban fel tudjuk térképezni. Az első mintát a tumorszövetből vettük, figyelve arra, hogy semmiképpen se a nekrotikus területről történjen a mintavétel, ezt követően a peritumorális ép nyálkahártya területről vettük a további mintákat, a tumor szélétől 1 cm-es, 2 cm-es és 3 cm-es távolságból. A mintagyűjtést követően a szövetmintákat gyorsfagyasztva, - 80 °C- on tároltuk a feldolgozásig. Az itt leírt klinikai és kísérleti vizsgálati protokollt a 2014/5341-es etikai engedélyszám alapján végeztük el (Pécs Tudományegyetem, Regionális Etikai Bizottság). A módszereket a megfelelő irányelvekkel és rendeletekkel összhangban hajtottuk végre. A vizsgálatba bevont összes résztvevőt tájékoztattuk a mintavételről, majd beleegyező nyilatkozatot írtunk alá a betegekkel.

IV./1. 2. RNS izolálás és reverz transzkripció

A 60 ug friss fagyasztott szövetmintából teljes szöveti RNS-t izoláltunk Aurum Total RNA mini kit (kat. Szám.: 7326820; Bio-Rad, Madison, USA) felhasználásával. Az izolált RNS minőségét Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY) fotométer segítségével ellenőriztük. Az egyes mintákból 5 ng teljes szöveti RNS-t írtunk át

cDNS-re miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Kit (kat. Szám.: 339340, Qiagen) segítségével.

IV./1. 3. Droplet digital PCR analízis

A kvantitatív PCR-analízis során Qiagen miRCury LNA miRNA PCR-vizsgálatokat (Qiagen, Hilden, Dánia) a következő miRNS-célpontok szerint választottuk: hsa-miR-21-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-155, hsa -miR-221-5p. A master mixeket úgy készítettük elő, hogy tartalmazzanak 1 µl miRCury LNA miRNS assayt, target-miRNS specifikus forward és rezerv primer párokat, 12 µl QX200 ddPCR EvaGreen Supermixet (1864034, Bio-Rad) és 9 µl PCR minőségű víz és 2 µl (~ 100 pg) cDNS-mintát. A lemezen kb. 100 pg/µl templátkoncentrációt használtunk. A negatív kontrollokhoz két külön mastermixet készítettünk, az egyik esetben a templát cDNS-t PCR minőségű vízzel helyettesítettük (nincs templát kontroll = NTC), a másik esetben a templát cDNS-t és a primert vízzel szubsztituáltuk (nincs primer kontroll = NTC + NPC). Minden egyes mastermix dropletet a QX200 automatizált ddPCR rendszer cseppképző egységében generáltunk cseppgenerátor-olaj EvaGreen alkalmazásával (Bio-Rad). A PCR amplifikáció a QX200 Thermo cyclerben történt, az alábbi termikus körülmények között (1 ciklus enzimaktiválás: 95 °C 5 perc, 40 ciklus; amplifikáció 96 °C 30 másodpercig és 58-60 °C – primer függően 1 percig), jelstabilizálás 1 cikluson keresztül (4 °C 5 percig és 90 °C 5 percen keresztül) és 4 °C-on. A QX200 csepp-leolvasó PCR-reakciója után a cseppeket azonnal elemeztük. A fluoreszcencia adatokat a QuantaSoft® analízis Pro szoftver verzió 1.0.596 (Bio-Rad, CA, USA) által használt Poisson disztribúciós statisztikai analízis szerint koncentrációkra alakítottuk át.

IV./1. 4. HPV P16 immunhisztokémiai festés

A fej-nyaki HPV-indukált laphámsejtes karcinómákat p16 immunhisztokémiai módszerrel határoztuk meg, amely a patogenezis és prognózis összefüggésében fontos marker. A p16INK4a, amelynek kifejeződését a magas rizikójú HPV E7-protein által indukált pRb-degradáció jellemzi, olyan marker, amely képes jelezni a tumorokban a HPV-fertőzés onkogén expresszióját. Összesen 25 esetet értékeltünk ki standard H&E festéssel és p16

immunhisztokémiával. Ezt követően egy CINtec p16INK4a detektáló rendszert használtunk (Ref.: 9511, Roche mtm labor. AG, Sandhofer Strasse, Mannheim, Németország). Az immunjelzést a gyártó protokollja alapján végeztük. A p16 pozitív festést a daganatos sejtek legalább 70%-ában erős nukleáris és citoplazmatikus festés azonosítása alapján határoztuk meg. Negatívnak minősültek a nem festődő, a halvány nukleáris, citoplazmatikus festődésű minták, illetve, ha a tumormentes sejtek festődtek meg. A pozitív kontroll egy olyan cervicalis laphámsejtes karcinóma volt, amely a standard klinikai laboratóriumi eljárás részeként p16 pozitívnak bizonyult⁸⁷.

IV./1. 5. DNS-extrakció és HPV-genotipizálás

A teljes DNS-extrakcióhoz 60 µg frissen fagyasztott szövetmintát használtunk HighPure templát előkészítő készlet alkalmazásával (kat. Szám.: 11796828001, Roche, Molecular Diagnostics, Mannheim, Németország). A DNS koncentrációját és minőségét NanoDrop spektrofotometriával ellenőriztük. Lineáris array HPV-genotípus-tesztet (kat. Szám.: 04391853 190; Roche Molecular Diagnostics) alkalmaztunk annak meghatározására, hogy mely HPV-genotípusok vannak jelen a szövetmintákban. A vizsgálat 37 humán papillomavírus-genotípust észlel: a 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58 59, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 és CP6108. A lineáris array kvalitatív teszt, amely biotinizált primereket használ a PGM09/PGMY11 és a PC04/ GH20 plazmidokra a HPV L1-gén és a humán béta-globin gén 450 bp és 268 bp méretű fragmenseinek egyidejű amplifikálásához. PCR-amplifikáció után a genotipizálás egy HPV-típusú és humán béta-globin-specifikus oligonukleotid próbával bevont egyetlen nylon szalag alkalmazásával történik. A vizsgálatot a gyártó utasításainak megfelelően végeztük.

IV./1. 6. Statisztikai analízis

A QuantaSoft szoftverből származó koncentrációs adatokat exportáltuk és elemeztük. A szövetminták kórszövettani, kvantitatív különbségeit, a tumoroktól való távolságot, a lokalizációt és a HPV-státusz elemzését az IBM SPSS Statistics 21.0 ANOVA analízissel ($p \leq 0,05$) és Pearson-analízissel végeztük ($0,887 p \leq 0,19$).

IV./1. 7. A cancer-field ábrázolására kidolgozott kombinált molekuláris-radiológiai alapú 3 dimenziós modell létrehozása

A 3D modellező mérnökök artériás és vénás fázisú, kontraszterősített, nagyfelbontású sorozatokat (szeletvastagság = 0,75 mm, mátrix = 512 x 512, pixelméret = 0,445 mm) tartalmazó CT DICOM-adatokat nifti formátumba MRIConvert 2.1.0 segítségével (Lewis Center, Neuroimaging számára, Oregon Egyetem, USA) konvertálták át és 3D Slicer 4.1. programba töltötték fel. A tumortömeget a 3D Slicer szerkesztő programban, axiális síkban, kontraszterősítést követően az anatómiai viszonyok alapján egy több, mint 10 éves klinikai tapasztalattal rendelkező radiológus kolléga jelölte ki. A 3D Slicer 4.1 szoftver szegmensszerkesztő moduljának felhasználásával készítették el a daganat 3D szegmentálást a körvonalak alapján. Ugyanebben a modulban a garat belsejében lévő levegő 3D szegmentálást is elvégezték. A margó felhasználásával 1 mm vastag határ került kialakításra a levegő szegmentációjából a nyálkahártya modellezéséhez. A daganat 3D modelljére alkalmazott *offset* paranccsal felvették a 10, 20 és 30 mm-es régiókat, majd a *boolean* paranccsal kivonták a 30 mm-es régióból a 20 mm-es, a 20 mm-es régióból a 10 mm-es térfogatot, végül a 10 mm-es régióból magát a tumort. Ennek eredményeként megkapták a 10, 20 és 30 mm-es térfogatok eltolási modelljét a tumor körül. A logikai operátor eszközzel metszeteket hoztak létre a nyálkahártya szegmentációja és a daganatra alkalmazott eltolási térfogatok, valamint a tumor felhasználásával, hogy megkapják a tumor 10, 20 és 30 mm-es környezetének a nyálkahártyára eső felületének modelljét.

IV./2. Eredmények

IV./2. 1. A HPV pozitivitással kapcsolatos miRNS profil elemzése

A vizsgálati időszakban a PTE KK Fül-, Orr-, Gégészeti-, és Fej-, Nyaksebészet Klinikán 35 beteget diagnosztizáltunk fej-nyaki laphám karcinómómával, 26 férfi és 9 női páciens. A daganatok klinikopatológiai besorolása után csak a T2-T3 stádiumú, 25 oropharyngealis elhelyezkedésű laphám karcinómával kezelt betegeket választottuk be a

vizsgálatunkba. A betegek részletes adatait stádiumra, lokalizációra, nemre és átlagéletkorra vonatkozóan a 3. táblázat tartalmazza. A stádium besorolást az “8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer, American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2017” szerint végeztük. Oropharynx esetében a legtöbb daganat a tonsillolinguális átmenetből (7) és a nyelvgyökből (6) indult ki, 2 tonsillából és további 2 a hátsó garatfalról. HPV pozitív mesopharynx tumor esetében döntően (5 esetben) a nyelvgyökből indultak ki a daganatok. Klinikai összstádium meghatározás során a HPV pozitív tumorokban egyenlően oszlottak meg az esetek a II. és III. stádiumban, míg HPV negatív daganatokban a legtöbb IV-es stádiumbesorolásba került.

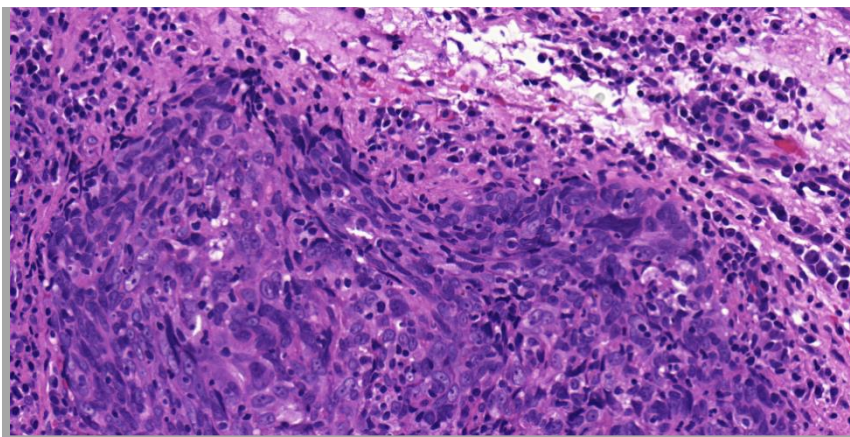
A HPV pozitív oropharynx daganatos betegek átlagéletkora 56,1 év, a HPV negatív mesopharynx tumoros páciensek átlagéletkora pedig 61,6 év volt.

Mesopharynx		HPV negatív (n=17)	HPV pozitív (n=8) HPV16: n=7 HPV16 és 52: n=1	Összes (n=25)
		N (%)	N (%)	N (%)
Nem	férfi	13 (52%)	6 (75%)	19 (76%)
	nő	4 (23,5 %)	2 (25%)	6 (24%)
Kor	0-44	-	1 (12,5%)	1 (4%)
	45-64	11 (64,7%)	5 (62,5%)	16 (64%)
	65+	6 (24%)	2 (25%)	8 (32%)
Tumor kiindulása	tonsilla	2 (11,8%)	1 (12,5%)	3 (12%)
	nyelvgyök	6 (24%)	5 (62,5%)	11 (44%)
	oldalsó oropharyngealis garatfal	2 (11,8%)	-	2 (8%)
	tonsillolinguális átmenet	7 (41,2 %)	2 (25%)	9 (36%)
Klinikai T stádium	1	-	-	-
	2	7 (41,2%)	5 (62,5%)	12 (48%)
	3	10 (58,8%)	3 (37,5%)	13 (52%)
	4	-	-	-
Klinikai N stádium	0	3 (17,6%)	-	3 (12%)
	1	6 (35,2%)	3 (37,5%)	9 (36%)
	2	8 (47,1%)	5 (62,5%)	13 (52%)
	3	-	-	-

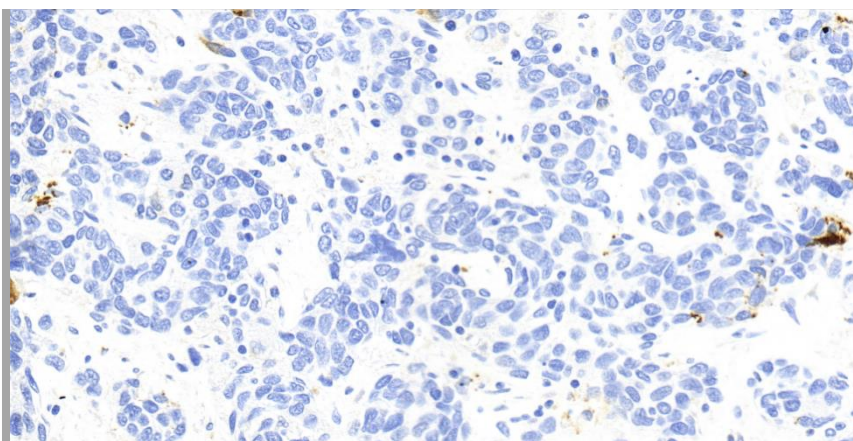
Klinikai öszstádium	I.	-	-	-
	II.	3 (17,6%)	4 (50%)	7 (28%)
	III.	6 (35,2%)	4 (50%)	10 (40%)
	IV.	8 (47,1%)	-	8 (32%)
Rizikó csoportok	alkohol	13 (76,5%)	-	13 (25%)
	dohányzás	13(76,5%)	3 (37,5%)	16 (64%)

3. táblázat: A kiválasztott oropharynx tumoros beteganyag demográfiai és klinikai adatai.

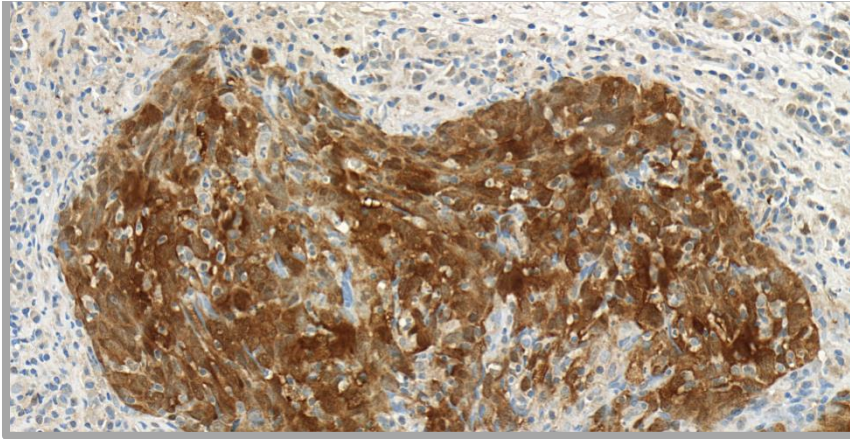
A 25 mesopharynx tumorból nyolc eset bizonyult HPV pozitívnek (28%) p16 immunhisztokémiai festéssel (9., 10., 11. ábra). A genotípus meghatározás során hét esetben találtunk HPV 16 pozitivitást, egy esetben pedig HPV 16 és 52 genotípus kombinált pozitivitását mutattuk ki.



9. ábra: 40x-es nagyítású, egy grade 3-as, tonsilla kiindulású laphám karcinóma HE festett metszete.

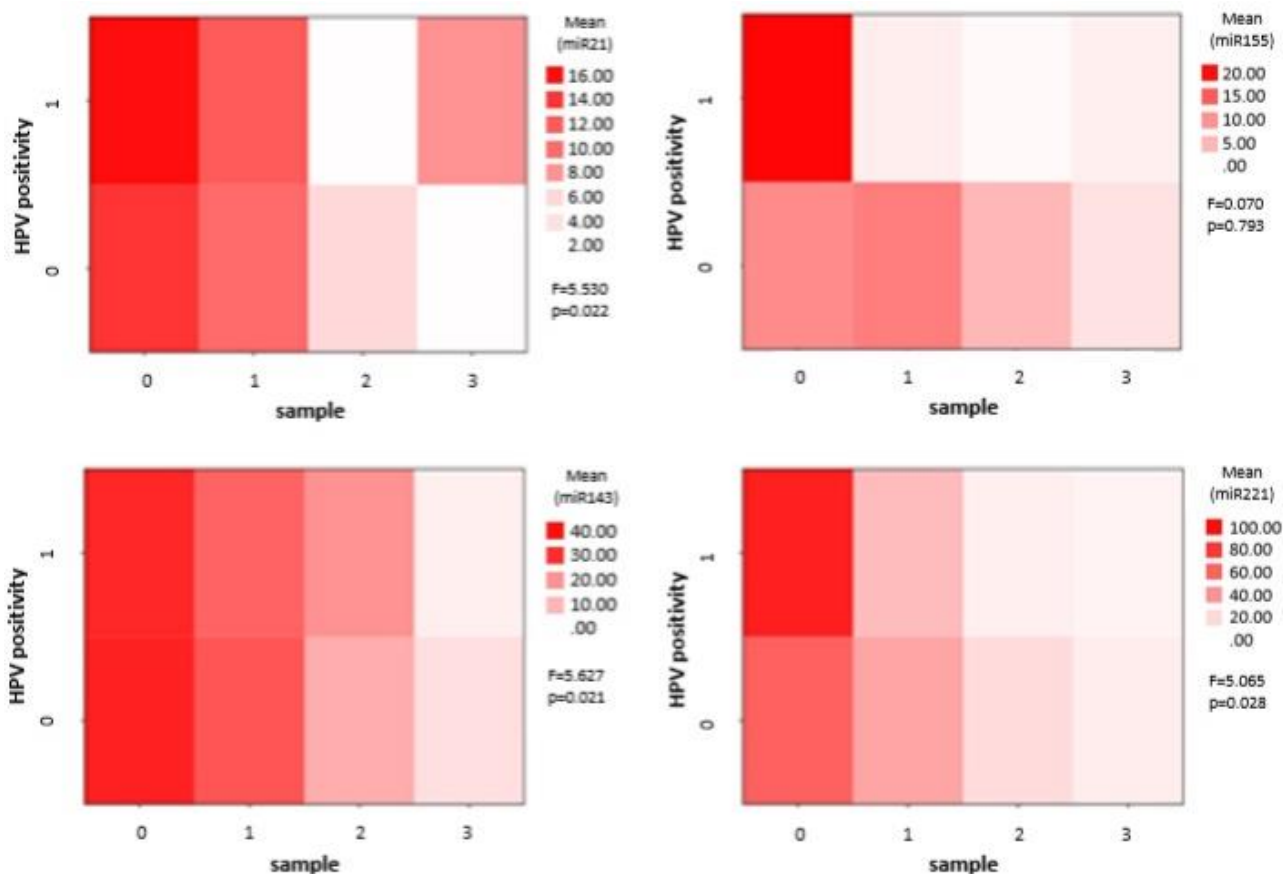


10. ábra: 40x nagyítású, p16 immunhisztológiai festéssel negatív, grade 2-es oropharygealis oldalsó garatfali laphám karcinóma metszete.



11. ábra: 40x nagyítású, p16 immunhisztológiai festéssel pozitív, grade 3-as tonsilla laphám karcinóma metszete.

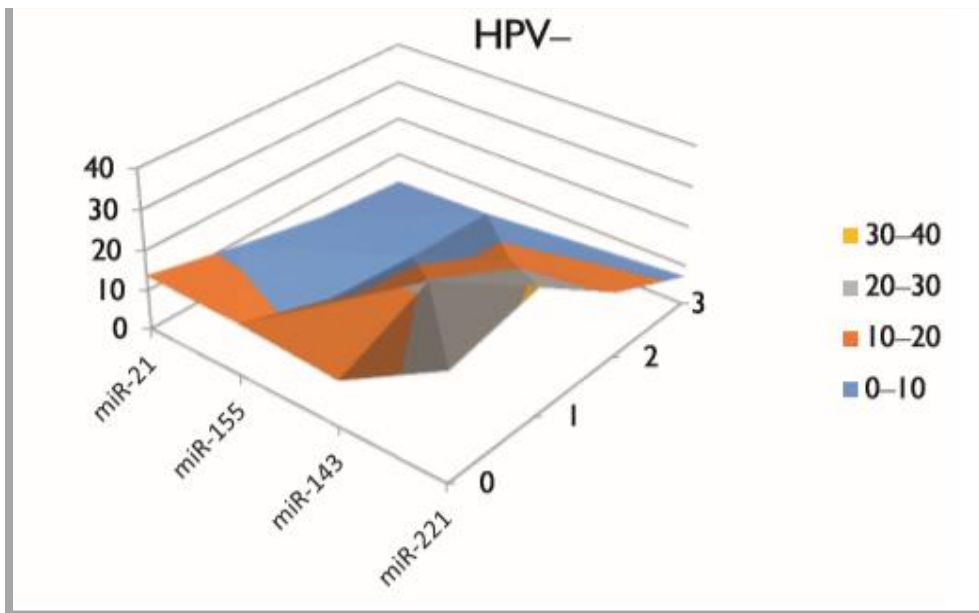
A HPV pozitív tumorszövetekben az összes vizsgált miRNS esetében magasabb expressziós szintet mértünk, mint a HPV negatív tumor mintákban. Az ANOVA analízis során a HPV pozitív tumorszövet biopsziákban szignifikáns eltéréseket találtunk a miR-21 ($F = 5,53$, $p = 0,022$), a miR-143 ($F = 5,627$, $p = 0,021$) és a miR-221 ($F = 5,056$, $p = 0,028$) esetében. A statisztikai elemzés során egyedül a miR-155 esetében nem találtunk egyértelmű szignifikáns eltérést ($F = 0,70$, $p = 0,793$). Eredményeink alapján HPV pozitivitásra specifikus miRNS markert nem tudtunk azonosítani, ám a miRNS expressziós profil változásai egyértelműen korreláltak a HPV jelenlétével (12. ábra).



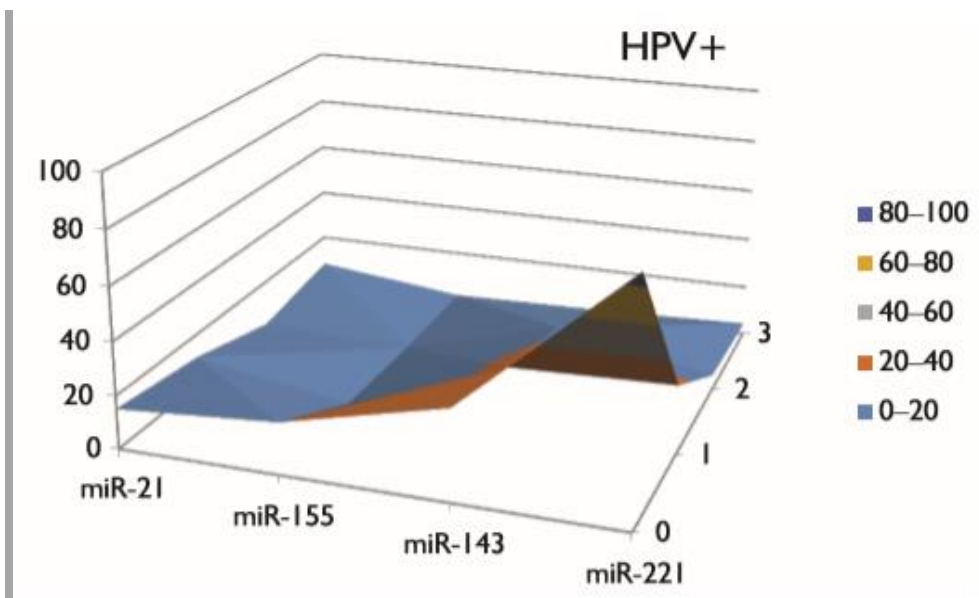
12. ábra: A HPV pozitív és negatív daganatok összehasonlító hőterkép-elemzése. A szövetmintákat a HPV pozitivitás szerint csoportosítottuk és a függőlegesen tengelyen jelöltük (1 - a HPV pozitív, 0 - a HPV negatív szövet). A horizontális kiterjesztésen a biopsziás helyet jelöltük a tumortól való távolság szerint (0 = tumor, 1 = normál nyálkahártyaszövet 1 cm távolságban a tumor szélétől, 2 = normál nyálkahártyaszövet 2 cm távolságban a tumor szélétől, 3 = normál nyálkahártyaszövet 3 cm távolságban a tumor szélétől). A HPV pozitív és negatív mintákat ANOVA analízissel hasonlítottuk össze a miR-21, miR-143, miR-155 és miR-221 expressziós értékei szempontjából. Az F-próba eredményeit és a szignifikancia szintjét az egyes hőterképek jobb oldalán mutatjuk be.

A HPV-negatív daganatok esetén a tumor környezetében (1 és 2 cm-re) is emelkedett miRNS-expressziós értékek figyelhetők meg, a távoli (3 cm-es) ép szövetekben csökken csak jelentősen a malignitást jelző markerek mennyisége (13. ábra). Míg a HPV-pozitív tumorokban az expressziós értékek magasabbak, ám a tumorszéltől cm-enként távolodva az ép szövetekben sokkal meredekebben csökken a malignitást, rossz prognózist jelző miR-21 és miR-155 expressziója már az 1cm-es tumorközeli ép szövetben is, a 2 és 3 cm-es távolságban pedig már nagyon alacsony kifejeződési értékeket mutatnak, nem látható a gradiens jellegű csökkenés,

mint a HPV negatív daganatok esetén, ez a különbség magyarázata lehet a tumorok kialakulásbeli különbségnek (14. ábra).



13. ábra. HPV-negatív mesopharynx tumorok és ép szövetek mikro-RNS-expresszió értékei a biopsziás távolságok függvényében. 0 = tumor, 1 = normál nyálkahártyaszövet 1 cm távolságban a tumor szélétől, 2 = normál nyálkahártyaszövet 2 cm távolságban a tumor szélétől, 3 = normál nyálkahártyaszövet 3 cm távolságban a tumor szélétől.

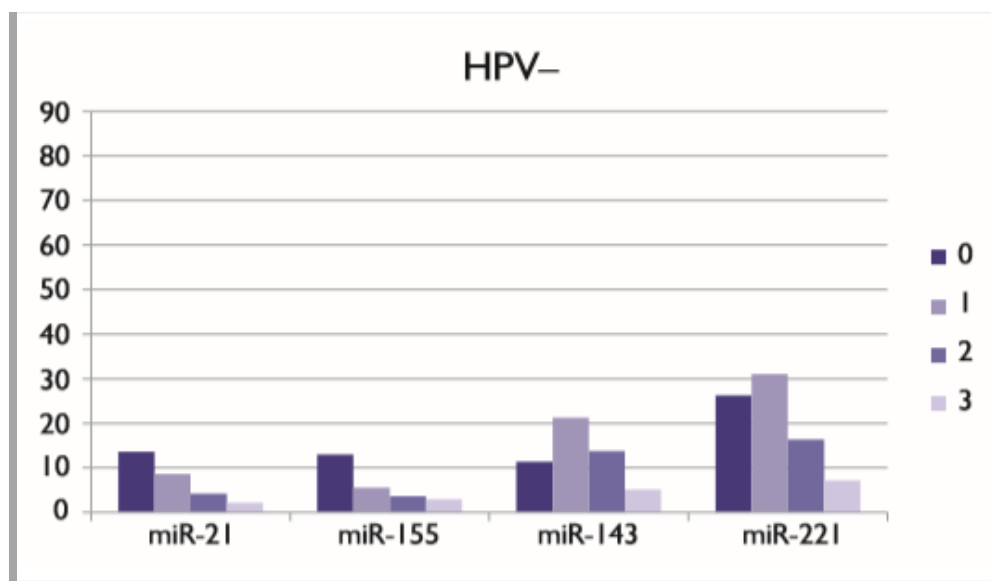


14. ábra. HPV-pozitív mesopharynx tumorok és ép szövetek mikro-RNS-expresszió értékei a biopsziás távolságok függvényében. 0 = tumor, 1 = normál nyálkahártyaszövet 1 cm távolságban a tumor szélétől, 2 = normál nyálkahártyaszövet 2 cm távolságban a tumor szélétől, 3 = normál nyálkahártyaszövet 3 cm távolságban a tumor szélétől.

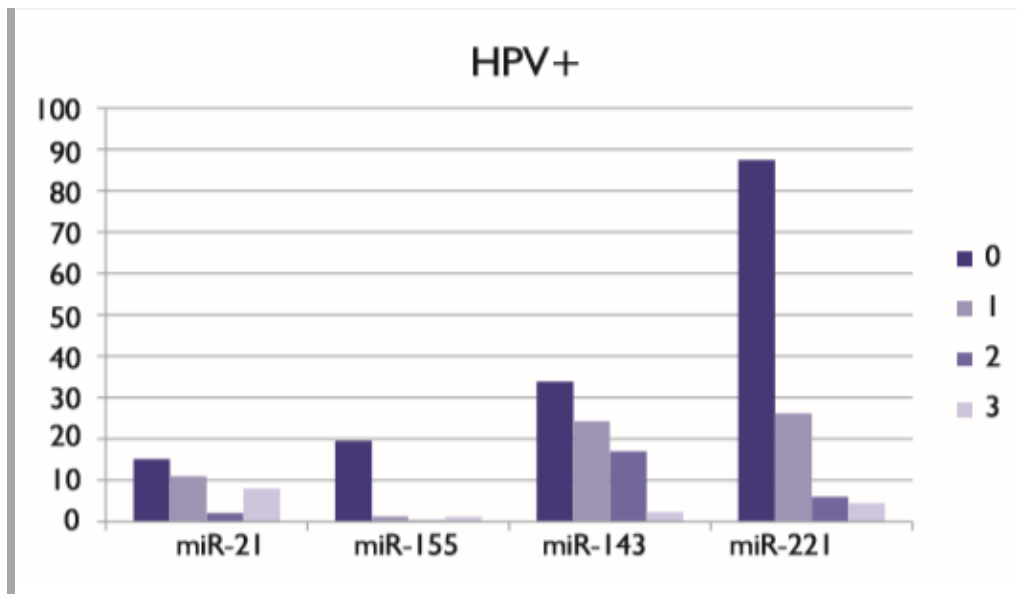
Összefoglalva tehát a HPV negatív tumormintákat alacsonyabb miRNS kifejeződés jellemzi mind a 4 vizsgált miRNS tekintetében, legmagasabb a miR-221 expressziója, a további 3 miRNS kifejeződésének mértéke közel hasonló.

A HPV pozitív daganatmintákban a miR-221 expressziója duplája a többi értéknek, ezt követi a szintén kiemelkedő miR-143 expresszió, ez tehát a két domináló miRNS és értékük többszöröse a HPV negatív tumormintákban mérteknek. A miR-21 és miR-155 értéke csak enyhén magasabb a HPV pozitív mintákban.

Fontos különbség, hogy a tumor szélétől 1 cm-re lévő normál szövetek miRNS expressziója a HPV negatív mintákban miR-143 és miR-221 esetében magasabb mint, amit a tumorban mértünk, az expressziós értékek meredek lecsengése itt nem látható, a tumor szélétől 2 és 3 cm-re lévő ép szövetekben is magasabb expressziókat kaptunk, mint a HPV pozitív ép nyálkahártya mintákban (15., 16. ábra), és megfigyelhető, hogy a miRNS expresszió csökkenése nem grádiensszerű, mint a HPV negatív minták esetében.



15. ábra: HPV-negatív mesopharynx tumorok és ép szövetek mikro-RNS-expresszió értékei a biopsziás távolságok függvényében oszlopdiagramon ábrázolva. 0 = tumor, 1 = normál nyálkahártyaszövet 1 cm távolságban a tumor szélétől, 2 = normál nyálkahártyaszövet 2 cm távolságban a tumor szélétől, 3 = normál nyálkahártyaszövet 3 cm távolságban a tumor szélétől.



16. ábra: HPV-pozitív mesopharynx tumorok és ép szövetek mikro-RNS-expresszió értékei a biopsziás távolságok függvényében oszlopdiagramon ábrázolva. 0 = tumor, 1 = normál nyálkahártyaszövet 1 cm távolságban a tumor szélétől, 2 = normál nyálkahártyaszövet 2 cm távolságban a tumor szélétől, 3 = normál nyálkahártyaszövet 3 cm távolságban a tumor szélétől.

IV./2. 2. A cancer fielddel korreláló miRNS profil analízise

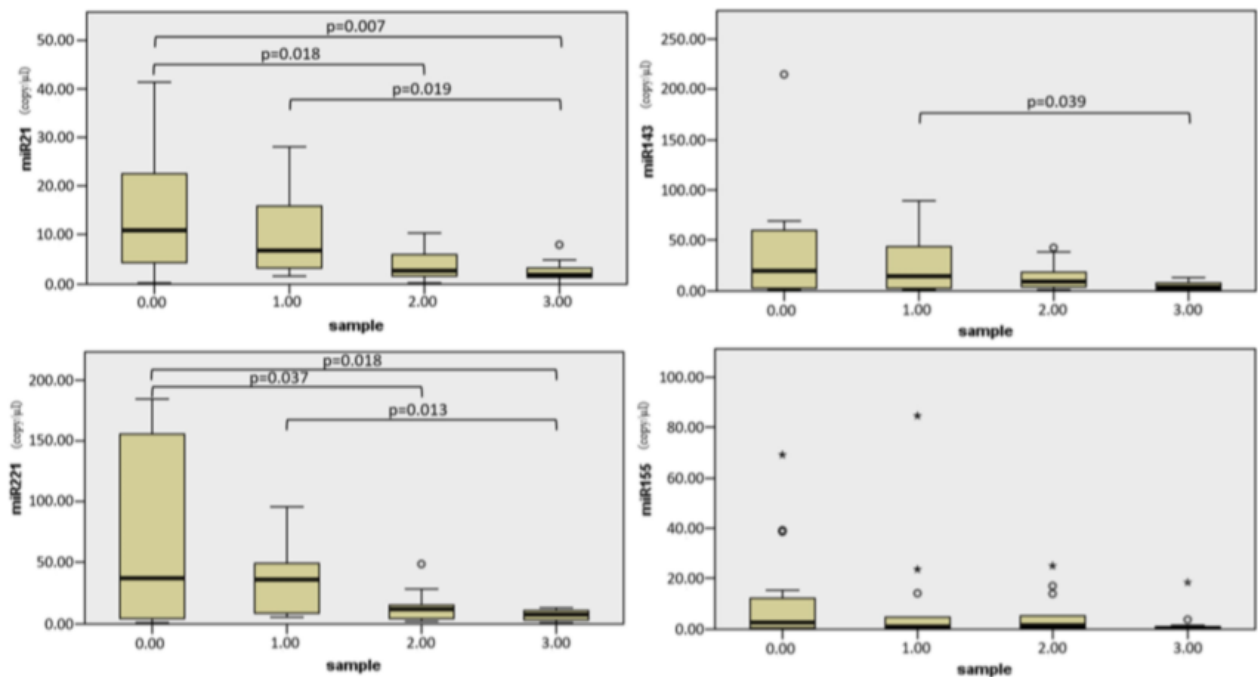
A HPV negatív daganatokban és a peritumorális szövetekben a miRNS expressziójának változása fokozatos mintázatot követett, amelye a daganattól való távolságtól függött. A peritumorális normál nyálkahártya területen a miR-21 és a miR-221 fokozatos koncentráció csökkenése statisztikailag szignifikánsnak bizonyult ANOVA teszt során. A miR-143 és miR-155 szintén hasonló eloszlási mintázatot mutatott, azonban nem érte el a statisztikai szignifikancia határát (17. ábra).

A daganatokban és a szomszédos ép peritumorális szövetekben a miR-21 fokozatosan csökkenő értéket mutatott, csökkenése összhangban volt a tumortól való távolsággal, ám az 1 cm-es peritumorális nyálkahártyában az expressziós értékek nem különböztek szignifikánsan. Viszont egyértelmű szignifikáns csökkenést találtunk a daganattól távolabb, 2 és 3 cm-re.

A miR-221 koncentrációja a tumorban igen magas volt, míg a tumortól távolodva az expressziója szintén fokozatosan csökkent. Itt is hasonló expressziós mintázatot állapítottunk meg, mint a miR-21 esetében, tehát nem találtunk szignifikáns különbséget a tumorban és a tumor közeli, 1 cm-es ép szövetben a koncentrációját tekintve, ám daganattól távolabb, attól 2 és 3 cm-re viszont szignifikánsan kisebb expressziót mértünk.

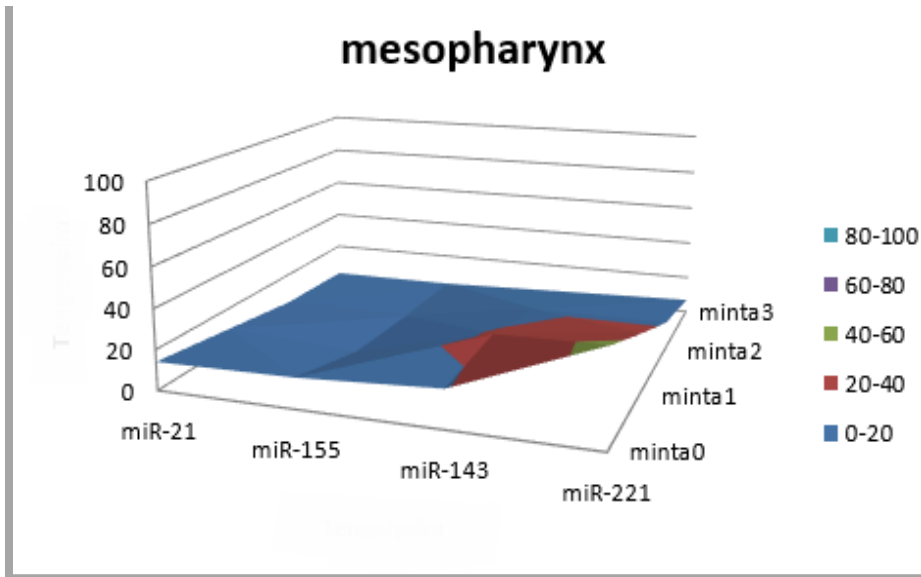
A miR-143 expresszió esetében is a tumortól távolodva fokozatosan csökkenő kifejeződést figyeltünk meg, viszont ezek a változások statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak ANOVA teszttel.

A miR-155 esetében nem mutattunk ki összefüggést az expressziós értékek és a tumortól való távolság tekintetében.



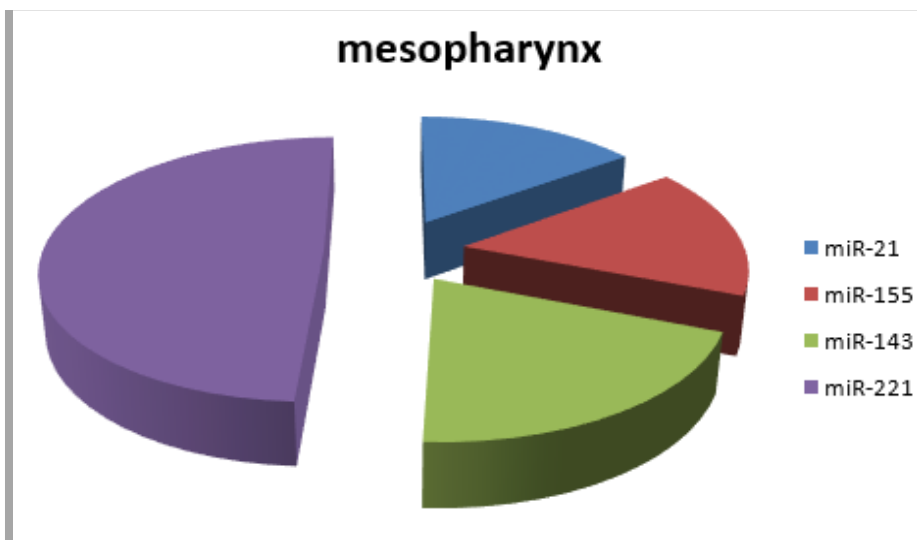
17. ábra: A mikro-RNS expressziós értékei (y tengely: abszolút kvantitatív meghatározás copy/μl mértékegységben meghatározva) a biopsziás minta távolsága alapján a makroszkopikus tumorszéltől (x tengely: 0: tumor, 1: tumortól 1 cm-es, 2: tumortól 2 cm-re, 3: tumortól 3 cm-re). ANOVA analízist végeztünk, a szignifikancia $\leq 0,05$.

A mesopharynx tumorminták miRNS expressziója jóval alacsonyabb, a tumorban a miR-221 dominál, magas a miR-143 expressziója is, a tumorhoz közeli, 1 cm-es területen is hasonló a mintázat, a 2-3 cm-es területen már látható az expresszió csökkenése (18. ábra).



18. ábra: Mesopharynx tumorok és ép szövetek mikro-RNS expresszió értékei a biopsziás távolságok függvényében. 0 = tumor, 1 = normál nyálkahártyaszövet 1 cm távolságban a tumor szélétől, 2 = normál nyálkahártyaszövet 2 cm távolságban a tumor szélétől, 3 = normál nyálkahártyaszövet 3 cm távolságban a tumor szélétől.

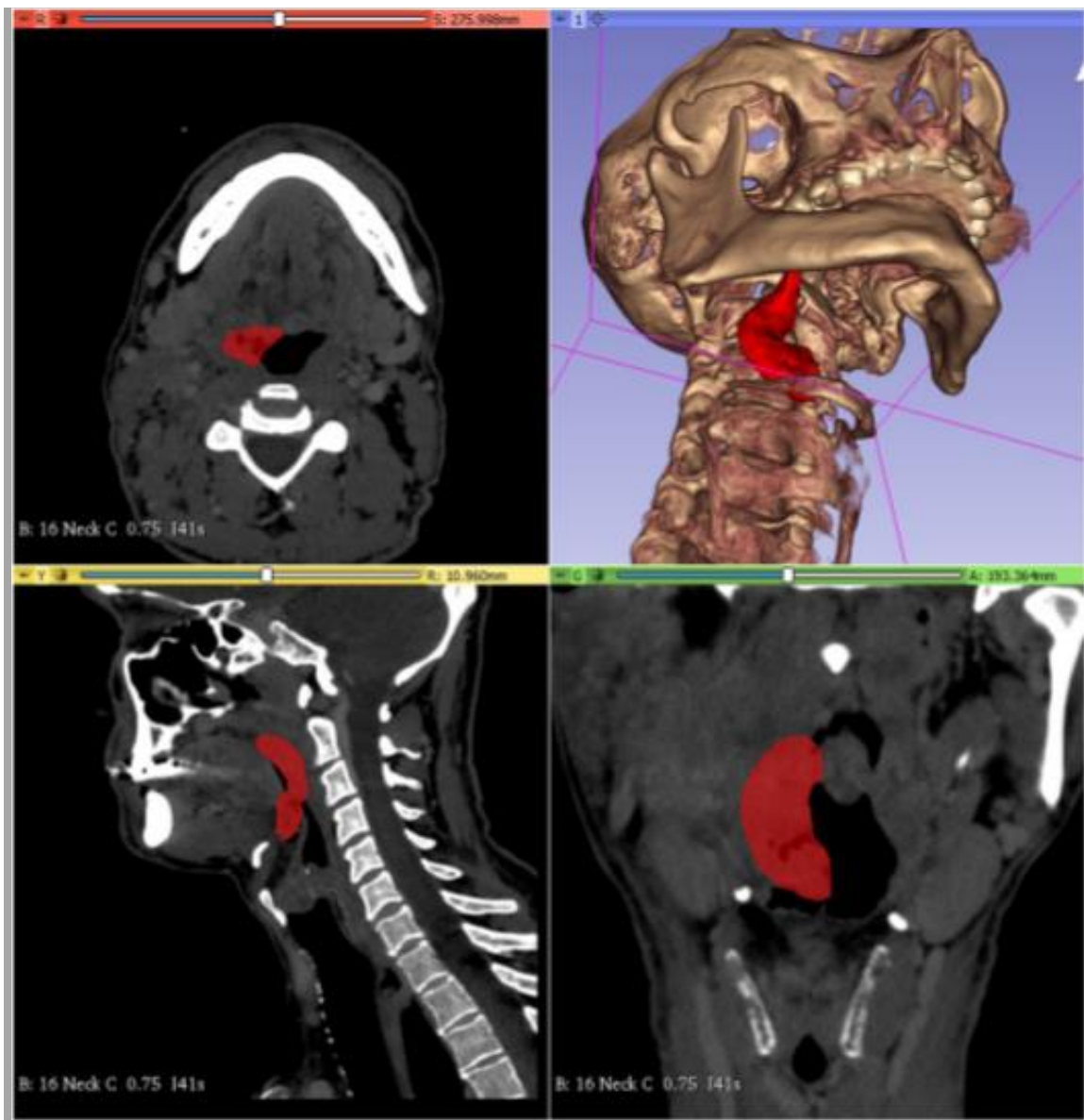
Csak a mesopharynx daganatos szövetet és a kifejeződés értékeit egymás arányaiban vizsgálva a miR-221 dominanciáját látjuk, ezt követi a miR-143, míg a miR-21 és miR-155 közel hasonló arányban van jelen (19. ábra).



19. ábra: Mesopharynx tumor mikro-RNS mintázata a miRNS kifejeződés egymáshoz viszonyított arányaiban kifejezve.

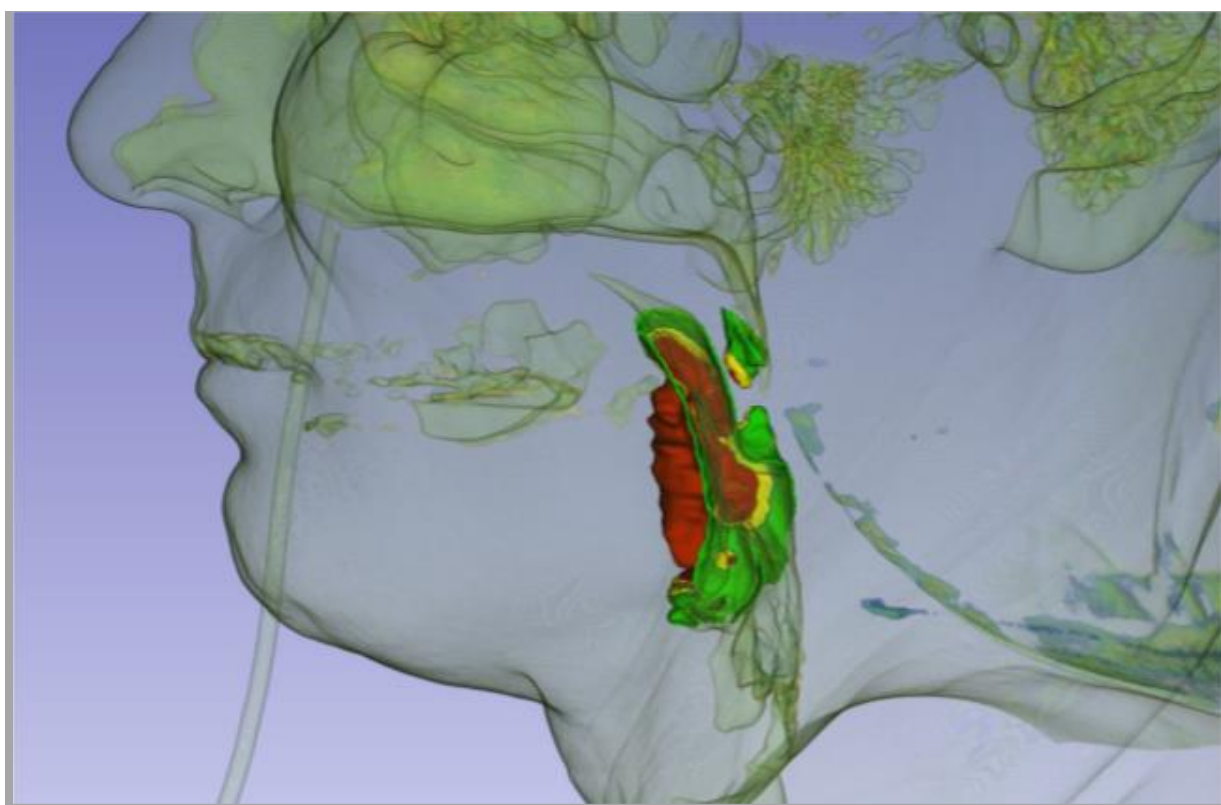
IV./2. 3. A molekuláris-radiológiai alapú 3 dimenziós modell megjelenítése

A 3D-s modell egy jobb oldali, HPV negatív, kifelé fejlődő, T3-as kiterjedésű tonsillából kiinduló tumoros beteg anyaga alapján készült, mely mélyen infiltrálta az oldalsó garatfalat és betejedt a jobb vallecula epiglotticába is. A 3D Slicer programban a daganatot piros színnel jelenítettük meg (20. ábra).

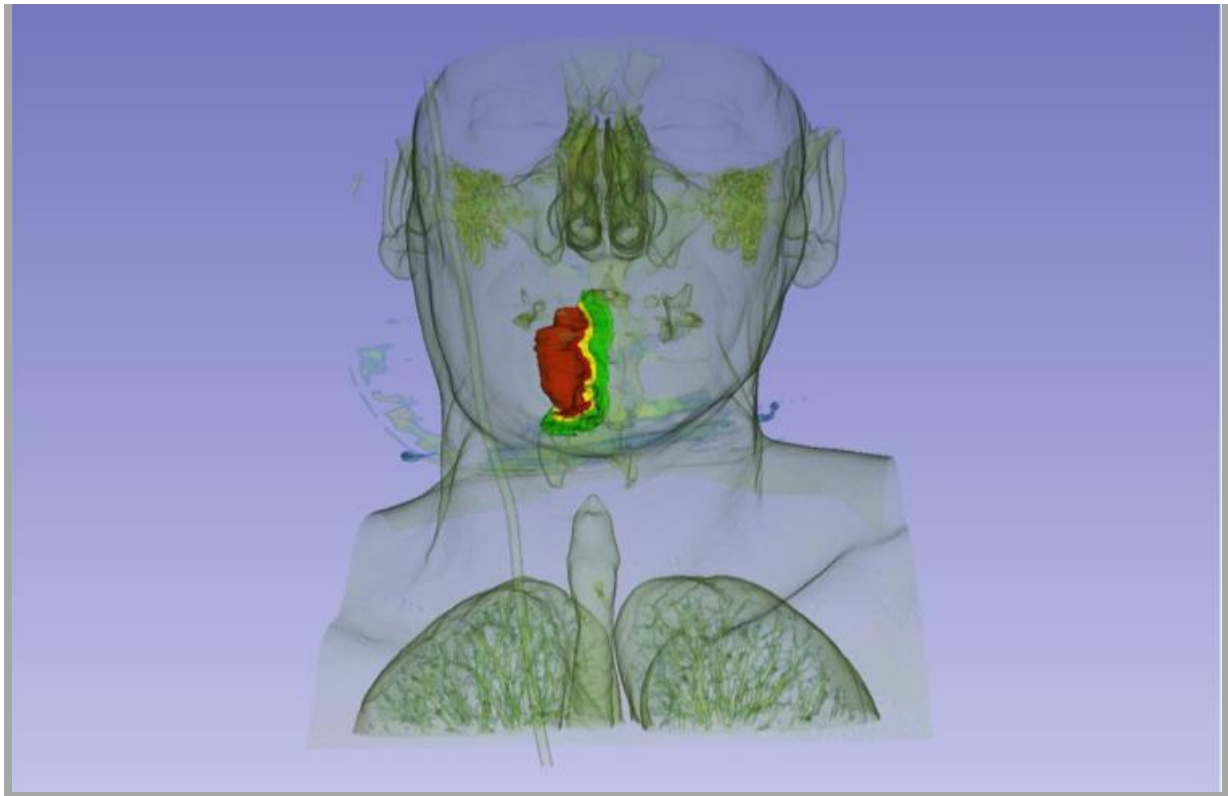


20. ábra: HPV negatív T3-as tonsillából kiinduló tumor HR CT képe és 3D modellje. A tumor tömegét mind horizontális, mind szagittális, mind frontális síkban piros színnel jelenítettük meg. A kép jobb felső negyedében látható a HRCT alapján készített 3D modell.

Ebben a 3D modellben képesek voltunk megjeleníteni a daganat kiterjedését, továbbá a daganatot körülvevő cancer-fieldet. A tumor szélétől 1 cm-es távolságban lévő nyálkahártyát a tumorhoz hasonló pirosas árnyalattal jelöltük, figyelembe véve, hogy ezen terület miRNS kifejeződésének mértéke hasonló a tumoréhoz. A tumortól távolabbi ép szöveteket zölddel, valamint sárgával jelöltük, ezzel a színváltozással is jelezve, hogy itt az általunk vizsgált miRNS-ek expressziójának mértéke szignifikánsan eltér a tumortól (21. és 22. ábra).



21. ábra: HPV negatív T3-as tonsillából kiinduló tumor 3D modellje szagittális síkban. A tumor beterved az oldalsó garatfalba és a vallecula epiglotticába (piros színű), a peritumorális 1 cm-es terület (vörös színű), a távolabbi peritumorális szövetek, 2 cm-es terület (sárga színű), 3 cm-es rész (zöld színű) szagittális nézetben.



22. ábra: HPV negatív T3-as tonsillából kiinduló tumor 3D modellje koronális síkban. A tumor beterved az oldalsó garatfalba és a vallecula epiglotticába (piros színű), a peritumorális 1 cm-es terület (vörös színű), a távolabbi peritumorális szövetek, 2 cm-es terület (sárga színű), 3 cm-es rész (zöld színű) frontális nézetben.

V. MEGBESZÉLÉS

A fej-nyaki laphám daganatok molekuláris onkológiai vizsgálatai az utóbbi évek kutatásainak a középpontjában állnak, hiszen mortalitásuk nem csökken, különösen hypopharynx tumorok esetében igen kétségbeejtőek a statisztikák mind előfordulás, mind prognózis tekintetében. A humán papillomavírus (HPV) jelenlétének kimutatása a fej-nyaki laphám karcinómákban mérföldkönek bizonyult. Nyilvánvalóvá vált, hogy a HPV okozta daganatnak más epigenetikai és genetikai profilja van, hiszen a virális és a kémiai karcinogenezis molekuláris útvonala eltérő.

A HPV pozitív esetekben leírták a TRAF3 (TNF Receptor Associated Factor 3) mutációját, mely a vírusellenes immunválasz fontos eleme, emellett TP63 (tumor protein 63), SOX2 (SRY-Box Transcription Factor), PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha) génjeikben bekövetkező mutációkat is leírtak, melyeket a HPV negatív esetekben nem mutattak ki⁸⁹. A vírus-asszociált tumorgenezis feltehetőleg nem a cancer-field teória elvén működik, hanem a szomatikus mutációs teória elvén, mely feltételez egyetlen többszörös DNS-mutációt szenvedett sejtet, melynek klónjai alkotják a daganatot. Ezt a molekuláris különbözőséget támasztja alá az a klinikai megfigyelés is, hogy a HPV pozitív garatdaganatokban sokkal gyakrabban lehetővé válik a szervmegtartó műtéti kezelés, hiszen nincs egy széles mikroszkopikusan is láthatatlan cancer-field, mely megnehezíti a sebészi terápiát. A cancer field hiánya miatt a lokális recidíva esélye sokkal kisebb. A primer daganat továbbá gyakran kisméretű, illetve az onkológiai kezelésekre is jobban reagálnak^{91,92,93,94}. Metasztázis képzésük is eltér miszerint az áttétek hosszabb idő alatt alakulnak ki, mint a HPV negatív esetekben. A távoli áttétképzésük tekintetében is különbséget mutatnak, atipikus helyeken hajlamosabbak távoli metastázis képzésre, leírtak például a vesében és a vázizomzatban kialakult áttétet⁹⁵. A mi vizsgálati anyagunkban T2-T3-as stádiumú eseteket vizsgáltunk, a HPV negatív daganatok magasabb stádiumbesorolásba kerültek, mint a HPV pozitívak.

A HPV genotipizálási vizsgálatok kimutatták, hogy az oropharyngealis daganatokban a HPV 16 százalékos aránya a legmagasabb, kisebb százalékban fordul elő ebben a lokalizációban még HPV 18, 33, 35, 45 és 59 genotípus is^{96,97}. Vizsgálatunkban egy olyan genotipizáló platformot alkalmaztunk, amely képes felismerni a HPV genotípusok széles spektrumát. A 25 vizsgált mesopharynx tumorból nyolc lett HPV pozitív, ebből hét esetben HPV 16-ot, egy esetben a HPV 16 mellett a HPV 52 jelenlétét igazoltuk. A HPV 52 is a magas

rizikójú HPV csoportba tartozik és a HPV 16 és 42 után a legelterjedtebb genotípus a cervix mintákban.

A fej-nyaki régióban a mesopharynx, azon belül is a tonsilla palatina a leginkább érintett a HPV által. Ez feltehetően azzal magyarázható, hogy a tonsilla kiterjedt lakunáris, kriptális szerkezete lehetővé teszi, hogy az epitheliális nyálkahártya és az alatta lévő nyirokszövet szoros kapcsolatba kerüljön, mely megfelelő kiindulást jelent a HPV indukált karcinogenezisnek. Vizsgált betegeink közül csupán egy eset volt tonsilláris kiindulású, további kettő tonsillolinguális átmenetből indult ki, a többi öt esetben pedig a nyelvgyökből fejlődött ki a daganat. A tonsilláris és nyelvgyöki terület szövettanilag nagyon hasonló, sok tanulmány HPV tekintetében együtt foglalkozik a két területtel^{98,99}.

Noha statisztikai elemzésünkben az összes oropharynx tumor 32%-a volt HPV pozitív szemben a 68%-os HPV negativitással, korlátozza az eredményeink széleskörű interpretációját az alacsony esetszám. A reprezentatív mintaszám eléréshez több évre, magasabb mintaszámra van szükség. Ismert, hogy a HPV előfordulása földrajzi és populációs elterjedése eltéréseket mutat, ennek hátterében különböző kulturális, szexuális szokások, eltérő dohányzási, alkoholfogyasztási habitus, illetve az eltérő genetikai háttér is szerepet játszhat. Egyes szerzők szerint a HPV pozitívitas USA-ban és Európában a fej-nyaki daganatok tekintetében csaknem 50%-os, de elérheti a 70-80 %-os gyakoriságot is^{100,101}, továbbá Svédországban 93%-os HPV pozitívitas is leírtak¹⁰². Ezzel szemben Egyiptomban csupán 28%-os, Japánban 29%-os HPV pozitívitas mutattak ki a fej-nyaki laphám rákokban, amely korrelál az általunk kapott eredményekkel^{103,104}.

2017. november és 2018. április közötti vizsgálati időszakban 25 mesopharynx tumoros beteget vontunk be a kutatásunkba HPV genotipizálás és miRNS expresszió elemzése céljából. A mintákat az általunk kidolgozott térképbiopsziás módszer szerint vettük, hogy a tumor és a környező szövetek miRNS expressziós változásait nyomon tudjuk követni. A miRNS expresszió különbségeket a HPV pozitív és negatív daganatokban és azoktól távolodva is össze tudtuk hasonlítani. Vizsgálatainkban különbséget találtunk a HPV negatív és pozitív tumorszövetek, valamint a tumort körülvevő ép nyálkahártyaszövetek miRNS expresszió mintázatában.

A HPV negatív fej-nyaki laphám karcinómákra jellemző a környezetüben az epigenetikai, genetikai változások felhalmozódása. Az epigenetikai változások a génexpresszió reverzibilis, örökölhető változásai. A környezeti hatások és a genetikai kód közötti kapcsolatot

az epigenetikai tényezők jelentik, melyek a humán genom gyors adaptációjáért felelősek, a folyamatosan változó fizikai, kémiai és biológiai környezetben. Az epigenetikai tulajdonságok a génextpresszió szabályozásban hajtanak végre módosításokat a DNS szekvencia megváltoztatása nélkül. Ilyen eltérések a hisztonmodifikáció és a DNS-metiláció, a kromatin remodelling és a rövid nem kódoló RNS molekulák (miRNS, siRNS, piRNS és snoRNS és snRNS) által közvetített szabályozás¹⁰⁵. A daganatokban olyan genetikai változások választhatnak ki, ami az „epigenom” kedvező módosulásait eredményezi a tumor túlélés és a növekedés szempontjából.

Genetikai változásokat jelentenek a kromoszómarendellenességek, a tumorszuppresszorok inaktiválása illetve az onkogének fokozott aktivitása. A daganatellenes mechanizmusok jelátviteli útjai részt vesznek a daganatok kialakulásában és progressziójában, a TP53, az RB1 INK4 ARF (retinoblasztóma-asszociált protein 1 infestin 4 alternatív reading frame) és a NOTCH1 (neurogenikus lokusz homológ protein 1) jelátviteli útvonalakat azonosították. A DNS szekvencia elemzés adatai arra utalnak, hogy a foszfatidil-inozitol-3-kináz PI3K-Akt-mTOR útvonala szintén gyakran vesz részt a daganat kialakulásában¹⁰⁶. Az epigenetikus megközelítésben a közelmúltban bekövetkezett gyors fejlődés rámutatott, hogy a nem kódoló RNS-ek (ncRNS), különösen a miRNS finomhangoló szerepet játszik a génátírásban a mRNS-sel és a kromatin-modulátorokkal való kölcsönhatás révén¹⁰⁷. Ezáltal a miRNS morfosztatikus tényezőként viselkedik, összekapcsolva az epigenetikai és a genetikai faktorokat. Bebizonyosodott, hogy hasznos több tumortípus molekuláris jellemzésében¹⁰⁶.

Vizsgálatunkban ennek a molekulának az előnyeit használtuk fel a fej-nyaki laphám karcinóma esetében a cancer field felismerésére és jellemzésére. Figyelembe véve a miRNS expressziójának mennyiségi különbségeit, számos változást találtunk a daganatok és a fenotípusosan ép szövetek között.

miR-21

A miR-21 a legtöbb daganattípusban magas expressziót mutat, így a petefészek-, központi idegrendszeri-, tüdő-, vastagbél-, máj-, prosztata, emlő-, hasnyálmirigy-, daganatokban, illetve haematológiai malignitásokban is kimutatták az emelkedett expresszióját¹⁰⁸. Több tanulmány beszámolt arról, hogy a miR-21 magas kifejeződése korrelál a rossz prognózissal, különösen emésztőrendszeri és fej-nyaki daganatokban^{109,110,111}. In vivo és in vitro vizsgálatokban a miR-21 fokozott sejtnövekedést eredményezett, míg miR-21

inhibitor adása gátolta a sejtek szaporodását és fokozta az apoptózist¹¹². A fokozott sejtproliferáción és apoptózisgátláson túl továbbá elősegítik a sejtinváziót, a tumoros transzformációt. Onkogén szerepe azzal magyarázható, hogy a PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), TMP1 (tropomyosin 1) és PDCD4 (Programmed cell death protein 4) fehérjéket gátolva elősegíti az apoptózis folyamatát^{113,114}. Korábbi vizsgálatok kimutatták a szerepét a TP53 gén mRNS fehérje transzlációjának gátlásában, amelyet kimutattak melanoma malignumban és szájüregi laphám karcinómában¹¹⁵. Tehát egy fontos onkogén típusú biomarkernek tekinthető¹¹⁶. Ezek a tulajdonságai befolyásolják a tumor ciszplatinnal, valamint az irradiációval szembeni érzékenységét, így összefüggésbe hozható a rossz terápiás válasszal^{117,118,119}. Továbbá emelkedett expresszióját összefüggésbe hozzák a nyirokcsomó metastasisok megjelenésével is¹²⁰. De Mattos-Arruda és munkatársai emlődaganatok vizsgálata során rámutattak arra, hogy a kiindulási tumor miR-21 expressziójának kiértékelése, majd a neoadjuváns terápiát követő maradványdaganat ismételt miR-21 expressziójának kiértékelése felhasználható a terápiás hatékonyság megítélésére, valamint a gyógyszerrezisztens betegcsoport kiemelésére és esetleg új farmakológiai szerek alkalmazására¹²¹.

A fej-nyaki daganatok karcinogenezisét vizsgálva a miR-21 magas expressziója révén TNF- α (tumor necrosis factor alpha) szintje csökken, ami előidézi a fokozott sejtproliferációt. Az NF κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) útvonal aktivitásának fokozásával pro-inflammatorikus és pro-tumorigenikus környezetet teremt. A PDCD4, PTEN és BCL-2 gátlásával az inváziót és a metastázis képződést potenciózza. Míg a CADM1 (Cell Adhesion Molecule 1) gátlásával elősegíti a kemoterápiára való rezisztenciát¹²².

Vizsgálatunkban a miR-21 expresszió magasabb szintet ért el a HPV pozitív daganatokban, ám a tumortól távolabb (2, 3 cm-re) a miR-21 expresszió meredeken esett. Míg a HPV negatív tumoroktól távolodva (2 cm-re) nem csökkent olyan alacsony szintre az expressziója. Mindezeket az eredményeket figyelembe véve magyarázatot kaphatunk a HPV negatív és pozitív tumorok közti eltérő genetikai háttérre és eltérő prognózisra. Az eddig közzétett vizsgálatok szerint a miR-21 szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutatott a HPV pozitív fej-nyaki daganatokban^{123,124}. Azonban ezekben a vizsgálatokban a minták kórszövettanilag és klinikailag nem voltak homogének. Vizsgálati mintáink mind T2-T3 stádiumú válogatott esetek, mind a HPV negatív és mind a HPV pozitív minták tekintetében, így eredményeink tükrözik a klinikopatológiailag homogén tumorcsoportok miR-21 expressziós tulajdonságait.

Jelenleg az irodalomban nincs adat térképbiopsziás mintavételre, de a vizsgálatainkban az 1 cm-es peritumorális szövetekben magas miR21 értékeket találtunk, vagyis nem volt szignifikáns eltérés a tumorszövetben és az 1 cm-es szövetben mért értékek között a HPV negatív daganatok esetében, ez az eredmény feltételezi a tumor körüli cancer-field meglétét.

Míg a HPV pozitív tumorok esetén a tumorban mért magas expressziót a miR-21 expresszió gyors esése követte már a tumor közeli 1cm-es ép szövetben. Vagyis a tumortól fokozatosan távolodva nem jellemző a grádiens szerű fokozatos csökkenés, ehelyett hirtelen miRNS expresszió esés figyelhető meg. Ebből következhet, hogy a virális onkogenezis feltételezhetően nem a field cancerization (tissue organization field theory) elvén működik.

miR-143

A miR-143 az egyetlen vizsgált tumorszupresszor típusú miRNS. A miR-143 gátolja az E2F fehérjét (E2 transzkripciós faktor) és a survivint, ami hozzájárul a tumor proliferációjához és a neoangiogenezihez¹²⁵. Ezen kívül modulálja a KRAS (Kirsten patkány szarkóma onkogén) fehérje transzkripcióját, ezáltal gátolja a sejtek proliferációját¹²⁶. A KRAS a RAS (patkány szarkóma onkogén) tagja, amely fontos szerepet játszik a sejtek túlélésében, szaporodásában és inváziójában. A jobb prognózissal hozható összefüggésbe, magasabb expresszióját megfigyelték a HPV pozitív oropharynx tumorokban¹²⁷. Nem kis sejtes tüdőrákban és prosztatákban szignifikánsan gátolta a tumorsejtek invázióját és migrációját, valamint a proliferációját^{128,129}. Vastagbélrákban, emlőrákban alacsonyabb expresszióját mutatták ki az egészséges kontrollokkal szemben¹³⁰. Továbbá humán vastagbél-tumorsejtekbe történő bejuttatása a daganat növekedésének megállását eredményezte¹³¹. Fontos megjegyezni, hogy Slaby és munkatársai kolorektális karcinómák vizsgálata során megállapították, hogy a klinikai stádium növekedésével emelkedik a miR-143 expressziója¹³². Tehát a miR-143 daganatok növekedésében és szabályozásában fontos szerepet játszhat.

Vizsgálatainkban az 1 cm-es ép nyálkahártyaminták magasabb miR-143 expressziós szintet mutattak, mint maguk a tumorsejtek. Az expressziós értékek a tumortól távolodva, 2 és 3 cm-re a peritumorális szövetekben csökkenő tendenciát mutattak, ám nem voltak szignifikánsak a kapott értékek. Jonigk és munkacsoportjának vizsgálata is a miR-143 csökkent expresszióját írta le a laphám karcinómában az ép nyálkahártya mintával szemben¹³³. A lokalizációk összehasonlításakor hypopharynx tumorok esetében magasabb expressziós

értékeket kaptunk. Kizárólag hypopharynx lokalizációjú tumor miR-143 expressziójára jelenleg nincs a nemzetközi irodalomban adat.

A HPV pozitív daganatokban magasabb miR-143 expressziót találtunk, mint a HPV negatív mintákban, ám a különbség inkább a peritumorális, tumormentes nyálkahártyán volt szembetűnő, amely szignifikánsabb magasabb miR-143 expressziót mutatott. Ez szintén bizonyíthatja a HPV pozitív daganat jobb prognózisát. Nemzetközi tanulmányok HPV pozitív fej-nyak tumoros mintákban csökkent expresszióját írták le^{134,135}. Ismert, hogy a HPV fertőzés megváltoztatja a miRNS profilokat fej-nyaki laphámkarcinómában és a miR-143 a HPV egyik célpontja lehet¹³⁶.

miR-221

A miR-221 fokozott expresszióját írták le emlőrákban, petefészekdaganatban, szájüregi laphámrákban, kissejtes tüdőrákban, gyomorrákban, vastagbél-daganatban, hepatocelluláris karcinómában^{137,138,139}. A miR-221 elősegíti a tumoros sejtproliferációt azáltal, hogy gátolja a CDKN1B/p27 (ciklin-dependens kináz inhibitor 1B/ tumor protein 27) útvonalat. Továbbá elősegíti a sejt belépését a G1 fázisból az S fázisba. Ezen felül a PTEN jelátviteli utat közvetlenül gátolja, ezáltal aktiválva az Akt/mTOR (akt/mammalian target of rapamycin) jelátviteli utat, így elősegítve a sejtek proliferációját és invázióját, továbbá a PTEN út gátlása hozzájárulhat a kemoterápiás szerekekkel szembeni rezisztencia kialakulásához emlődaganatban¹⁴⁰.

Sun és munkacsoportja leírták, hogy a miR-221 célmolekulája az Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) apoptotikus fehérje, melyet downregulál/alulszabályoz, illetve a miR-221 gátlása csökkentette a daganatok súlyát és térfogatát a sejtproliferáció elnyomásán és az apoptózis indukcióján keresztül^{141,142}.

A miR-221 magas expresszióját számos korábbi vizsgálat igazolta fej-nyak laphám daganatokban, míg alacsony expresszióról számoltak be a daganatmentes szövetekben^{143,144,145,146}. Kutatásunkban is hasonló eredményekről számoltunk be, ám a daganat közeli 1 cm-es ép szövetekben is magas expressziót találtunk, majd szignifikáns expressziócsökkenést láthattuk a daganattól fokozatosan távolodva (a tumortól 2-3 cm-re).

A miR-221 magasabb expressziós szintet mutatott a HPV pozitív tumormintákban. Lu és munkacsoportja vizsgálata szerint a miR-221 overexpresszált a HPV pozitív sejtekben¹⁴⁷. A térképbiopsziás értékelésünk során legmagasabb miRNS szintet a HPV pozitív daganatminta

miR-221 expressziójában mértünk. Ám a tumor körüli szövetekben alacsonyabb koncentrációkat mértünk, mint a HPV negatív daganat környezetében.

Megállapításaink megerősítik, hogy a miR-221 részt vesz a tumor növekedésében és a tumor körüli 1 cm-es területen mért magasabb expresszió feltételezi a cancer-field meglétét a HPV negatív daganat esetében. Továbbá a HPV negatív mintákban a tumort körülvevő ép szövetben a miR-221 csökkenése nem olyan nagymértékű, mint a HPV pozitív mintákban, ez a különbség magyarázhatja a tumorigenezisbeli és prognosztiai különbségeket a két tumortípus között.

miR-155

A miR-155-öt először retrovirális integráció során a B-sejtes lymphomákban fedezték fel, azóta számos daganattípusban, így emlő-, máj-, méhnyak-, hasnyálmirigy, pajzsmirigy-, és tüdődaganat esetében kimutatták a jelenlétét. Szájüregi rákok esetében is leírták a magas kifejeződését, és szoros összefüggést mutatott a lokális recidívával, továbbá a gége daganatokban is magas expressziós értékeket találtak^{148,149}.

A miR-155 elősegíti a tumorinváziót azáltal, hogy növeli a SOCS (supressor of cytokine signaling proteins) expresszióját, így blokkolva a STAT3 (signal transducer and activator of transcription) transzkripciós faktorokat¹⁵⁰. Ezeken felül több ponton szabályozza a MAPK (mitogen activated protein kinases) jelátviteli utat. Továbbá a SHIP1 (inozitol-polifoszfát-5-foszfátáz) megcélzása révén elősegíti az ERK (extracellular signal-regulated kinases) foszforilációján keresztül ennek aktivációját, ezáltal a sejtek proliferációját.

Vizsgálatunk során miR-155 biomarker értékei a tumormintákban voltak a legmagasabbak, míg a tumortól távolodva egyre csökkentek, ám a szingifikáns értéket nem érték el. Wang és munkacsoportja laryngealis laphámkarcinómák vizsgálata során leírták a szérum és a tumoros szövet emelkedett miR-155 expresszióját, és azt találták, hogy a tumor eltávolítását követően a szérum miR-155 szintje szignifikánsan csökkent, illetve érdekes eredmény, hogy dohányzást követően a miR-155 szárumszintje kissé módosult¹⁵¹.

Shi és munkatársai kutatásuk során leírták miR-155 általi gyulladási út aktiválódást, mely út a krónikus gyulladási állapot fenntartásán keresztül hozzájárul a daganat kialakulásához, és több tanulmánnyal összhangban megállapították, hogy a miR-155 lehet az egyik korreláció a krónikus gyulladás és a rosszindulatú daganat kialakulása között^{152,153}.

Egyéb tanulmányok szerint korrelál továbbá a nyirokcsomó metasztázisra való hajlammal és a rossz prognózissal¹⁵⁴⁻¹⁵⁸.

A molekuláris-radiológiai alapú 3 dimenziós modell jelentősége

A cancer-field molekuláris alapú bizonyítását követően célunk volt ennek klinikai szemmel is érthető prezentálása. E célból létrehoztunk egy molekuláris-radiológiai alapú 3D modellt, mellyel szemléltetni tudtuk a daganat és a daganat körüli megváltozott szöveti szervedődési területet, azaz a cancer-fieldet.

A CT alapú 3D modellben a klinikai tumor tömeget és a tumorközeli peritumorális szövetet, - amely a makroszkópikus tumortól 1 cm-re helyezkedik el -, hasonló piros tónusú színekkel jelöltük, mert ebben a 2 szövet lokalizációban hasonló miRNS expressziós értékeket kaptunk. Ebből következik, hogy ezen a piros zónán belül végzett sebészi kimetszés a daganat recidívájának magas kockázatával jár.

A sárga szín a tumor makroszkópikus szélétől 2 cm-re lévő peritumorális szövetterületet jelöli. Ez egy olyan biztonsági terület, mely epigenetikusan már jelentősebben eltér a daganattól. A rezekálható daganatok esetén javasolt eddig a területig kimetszeni a daganatot, ezáltal feltehetően nagyobb valószínűséggel kerülhető el a lokális recidíva (20., 21., 22. ábra).

A modell felhasználható a műtéti tervezésben az optimális és pontosabb tumorrezekciós vonal meghatározására azáltal, hogy a molekuláris-onkológiai adatokat és a CT-képeket együtt ábrázolva a 3 dimenzióban egy olyan pontosságú képet kapunk a daganat valódi, vagyis a tényleges molekuláris-onkológiai kiterjedéséről, melyre korábban nem volt lehetőség. Ez lehetővé teszi, hogy preoperatíván sokkal precízebben meg tudjuk tervezni a kimetszés vonalát, amely a tényleges, molekuláris-onkológiai értelemben vett tumormentességet jelenti. Segítségével pontosabban megtervezhetők a kimetszést követő szövethiány esetleges rekonstrukciós lehetőségei is.

Amennyiben a műtéti rezekciós vonal nagy mértékben befolyásolja a funkcionális képességeket (a nyelést, a beszédet és a légzést), akkor a szervmegtartást, az onkológiai kezelési stratégiákat részesítjük előnyben, természetesen amennyiben ezekkel teljes tumormentesség érhető el.

A modell továbbá lehetővé teszi a célzott, maximálisan egyénre szabott terápia megválasztásán túl, hogy kiemeljük azt a betegcsoportot, mely potenciálisan veszélyeztetett a rezidíva vagy a szekunder primét tumor megjelenése szempontjából. Azon betegeknek ugyanis, akiknek kiterjedtebb a molekuláris daganatprofiljuk, illetve az anatómia nem teszi lehetővé a kiterjedtebb műtétet, és a daganat eltávolítását csak az 1 cm-es “piros” zónában lehet végrehajtani, sokkal szorosabban utánkövetésben kell részesülniük.

A HPV pozitív esetekben, amelyekben a szervmegőrzés, illetve az onkológiai kezelés nagyobb hangsúlyt kap, a 3D modell és a genomikus térkép kiértékelése alapján szintén pontosabb kezelési stratégiát nyújthatunk. Végző célunk az volt, hogy optimalizáljuk a diagnosztikai lépéseket a fej-nyaki laphám karcinóma kezelésében, megbecsüljük és minimalizáljuk a daganat megismétlődésének esélyét, továbbá, hogy jobb túlélést érjünk el a betegek magasabb életminősége mellett. A 3D modell létrehozását egy innovatív diagnosztikai lehetőségnek tekintjük. Az első lépéseket követően ennek további multidiszciplináris fejlesztését tervezzük.

Jövőbeni tervünk, hogy a miRNS expressziós vizsgálatokat és a HPV genotipizálást szeretnénk a mindennapi rutin diagnosztikába bevezetni. Továbbá munkacsoportunk nagyobb esetszámon alapuló vizsgálatot tervez a meso- és hypopharynx tumorok miRNS expressziós vizsgálatát illetően, így az eredmények szélesebb körű interpretációját tenné lehetővé. Ezeken túl szeretnénk kifejleszteni egy non-invazív vizsgálatot a miRNS expresszió szűrésére, a nyálból történő miRNS izolálás erre alkalmas lenne. A primer prevenció fontosságának hangsúlyozása, a mesopharyngealis HPV szűrések rutinszerű bevezetése is fontos célkitűzésünk.

VI. Összegzés, tézisek, új klinikai megállapítások

- I. A cancer field vagy szöveti organizációs terület (tissue organization field) molekuláris jellemzése céljából elsőként hoztunk létre egy térképbiopsziás modellt, mely a későbbiekben alkalmassá vált ezen epigenetikailag megváltozott terület vizsgálatára. (Orosz, E ; Gombos, K ; Riedling, T ; Afiakurue, P ; Kiss, I ; Pytel, J ; Gerlinger, I ; Szanyi, I: Comparative miRNA Expression Profile Analysis of Squamous Cell Carcinoma and Peritumoral Mucosa from the Meso- and Hypopharynx. CANCER GENOMICS & PROTEOMICS 14 : 4 pp. 285-292., 2017)
- II. Először vizsgáltuk és alkalmaztunk mikroRNS expressziós mintázatot a meso - és hypopharynx laphámrákok elkülönítésében és az őket körülvevő megváltozott szöveti organizációs terület kimutatásában. A miR-21, -143 és -155 marker magasabb kifejeződést mutatott a hypopharynx laphámdaganatokban, míg a miR-221 mesopharynx tumorokban volt szignifikánsan magasabb. Az onkomirek (miR-21, miR-221) leginkább a tumoros és a közvetlen peritumoralis (tumortól 1 cm-re) szövetekben expresszálódtak, míg a tumor szupresszor jellegű miRNS-ek (miR- 34a, miR-143) a tumortól távolabb jelentek meg. (Orosz, E ; Gombos, K ; Riedling, T ; Afiakurue, P ; Kiss, I ; Pytel, J ; Gerlinger, I ; Szanyi, I: Comparative miRNA Expression Profile Analysis of Squamous Cell Carcinoma and Peritumoral Mucosa from the Meso- and Hypopharynx. CANCER GENOMICS & PROTEOMICS 14 : 4 pp. 285-292., 2017)
- III. Eltérő mikroRNS mintázatot találtunk a HPV pozitív és negatív oropharynx laphámrákokban. A HPV pozitív tumoros szövetek minden vizsgált miRNS tekintetében magasabb expressziót mutattak a HPV negatívokkal összevetve. Szignifikáns overexpresszió volt kimutatható a miR-21-5p, miR-143 és a miR-221-5p esetében HPV pozitív tumorszövetekben. (Orosz, Eva ; Gombos, Katalin ; Petrevszky, Nerina ; Csonka, David ; Haber, Istvan ; Kaszas, Balint ; Toth, Arnold ; Molnar, Krisztian ; Kalacs, Krisztina ; Piski, Zalan ; Gerlinger, Imre ; Burian, Andras ; Bellyei, Szabolcs ; Szanyi, Istvan: Visualization of mucosal field in HPV positive and negative oropharyngeal squamous cell carcinomas: combined genomic and radiology based 3D model SCIENTIFIC REPORTS 2020, Jan 8;10 (1)doi: 10.1038/s41598-019-56429-4.)

IV. Az oropharynx tumor körüli nyálkahártyán, a miR-21 és a miR-155 elszórt mintázatot mutatott a HPV pozitív esetekben, míg graduális csökkenést lehetett látni minden vizsgált miRNS expresszióban a HPV negatív tumoroknál, miR-21 és miR-221 esetén a változás szignifikáns volt. A fentiek igazolhatják a HPV pozitív és negatív daganatok eltérő tumorfejlődési modelljét.

(Orosz, Eva ; Gombos, Katalin ; Petrevszky, Nerina ; Csonka, David ; Haber, Istvan ; Kaszas, Balint ; Toth, Arnold ; Molnar, Krisztian ; Kalacs, Krisztina ; Piski, Zalan ; Gerlinger, Imre ; Burian, Andras ; Bellyei, Szabolcs ; Szanyi, Istvan: Visualization of mucosal field in HPV positive and negative oropharyngeal squamous cell carcinomas: combined genomic and radiology based 3D model, SCIENTIFIC REPORTS 2020, Jan 8;10 (1)doi: 10.1038/s41598-019-56429-4.)

V. Molekuláris és radiológiai alapú 3D modellünkben elsőként sikerült vizualizálni a tumoros propagációt és a tumor körüli megváltozott szöveti szerveződésű területet, figyelembe véve térképbiopsziás stratégiánkat és a szöveti miRNS expressziós eredményeinket. A modell hasznos lehet a preoperatív sebészi tervezésnél.

(Orosz, Eva ; Gombos, Katalin ; Petrevszky, Nerina ; Csonka, David ; Haber, Istvan ; Kaszas, Balint ; Toth, Arnold ; Molnar, Krisztian ; Kalacs, Krisztina ; Piski, Zalan ; Gerlinger, Imre ; Burian, Andras ; Bellyei, Szabolcs ; Szanyi, Istvan: Visualization of mucosal field in HPV positive and negative oropharyngeal squamous cell carcinomas: combined genomic and radiology based 3D model, SCIENTIFIC REPORTS 2020, Jan 8;10 (1)doi: 10.1038/s41598-019-56429-4.)

Irodalomjegyzék

1. Szanyi I.: Molekuláris epidemiológiai biomarkerek vizsgálata malignus fej-nyaki daganatokban. PhD értekezés, 2011.
2. Konstantinou E, Fotopoulou F, Drosos A, Dimakopoulou N et al. Tobacco-specific nitrosamines: A literature review. *Food Chem Toxicol.* 2018; 118:198-203.
3. Trtchounian, A, Williams, M., Talbot, P. Conventional and electronic cigarettes (e-cigarettes) have different smoking characteristics. *Nicotine & Tobacco Research*, 2010; 12:905-912.
4. Ember I: Népegészségügyi orvostan. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 2007; 227-228.
5. Bosetti C, Gallus S, Altieri A et al. Wine, beer and spirits and risk of oral and pharyngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland. *Oral Oncol*, 2004; 40: 904-909.
6. Blot JW, McLaughlin KJ, Winn MD, et al. Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Res*, 1988; 48: 3282-3287.
7. Riedel F, Goessler U, Hörmann K: Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Dig Dis*, 2005; 23: 195-203.
8. Boffetta P, Hashibe M: Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*, 2006; 7: 149-156.
9. Druesne-Pecollo N, Tehard B, Mallet Y et al. Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. *Lancet Oncol*, 2009; 10: 173-180.
10. Praud D, Rota M, Rehm J et al. Cancer incidence and mortality attributable to alcohol consumption. *Int J Cancer*. 2016; 138:1380-7.
11. Gy. Szabo, B. Saha Alcohol's Effect on Host Defense. *Alcohol Res.* 2015; 37: 159–170.
12. Daisuke Kawakita, Keitaro Masuto Alcohol and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2006; 7:149-56.

13. Goldenberg D, Benoit NE, Begum S. et al. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope*, 2004; 114:1027-1031.
14. Cordes C, Tiemann M, Tiemann K. et al. Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma of the hypopharynx. *B-ENT*, 2011; 7:43-46.
15. Shimakage M, Sasagawa T, Yoshino K. et al. Expression of Epstein-Barr virus in mesopharyngeal and hypopharyngeal carcinomas. *Hum Pathol*, 1999; 30:1071-1076.
16. Larsson LG, Sandström A, Westling P. Relationship of Plummer-Vinson Disease to Cancer of the Upper Alimentary Tract in Sweden. *Cancer Res*, 1975; 35:3308-3316.
17. Gude D, Bansal D, Malu A: Revisiting plummer vinson syndrome. *Ann Med Health Sci Res*, 2013; 3:119-121.
18. Li Q, Chuang Sc, Eluf-Neto J, Menezes A et al. Vitamin or mineral supplement intake and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. *Int J Cancer*, 2012; 131:1686-1699.
19. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol* 2014; 50:387–403.
20. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease?. *Curr Opin Oncol*, 1999; 11:191-199.
21. Evidence for causal association between human papillomavirus and subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92:709-20.
22. Bussu F, Sali M, Gallus R, et al. HPV infection in squamous cell carcinomas arising from different mucosal sites of the head and neck region. Is p16 immunohistochemistry a reliable surrogate marker? *Br J Cancer*, 2013; 108:1157-1162.

23. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJ, et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine* 2012; 30:34–54.
24. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer *Surg Oncol Clin*. 2015; 24:379-96.
25. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* 2012; 35:747–55.
26. McKaig RG, Baric RS, Olshan AF: Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck*,1998; 20:250-265.
27. Tamás L, Szentkúti G, Pál A. et al. Humán papilloma vírusok előfordulása és jelentősége fej-nyaki daganatokban. *Fül-Orr-Gégegyógyászat*, 2010; 56:4-12.
28. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100:407–20.
29. Heath S, Willis V, Allan K, et al. Clinically significant human papilloma virus in squamous cell carcinoma of the head and neck in UK practice. *Clin Oncol*. 2012; 24:18–23.
30. D'Souza G, Cullen K, Bowie J, et al. Differences in oral sexual behaviors by gender, age, and race explain observed differences in prevalence of oral human papillomavirus infection. *PLoS One*. 2014.
31. DSouza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007; 346:1944-1956.
32. Jones DL, Münger K: Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol*. 1997; 71:2905-2912.

33. Liggett WH Jr, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol.* 1998; 16:1197-206.
34. Reed AL, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996; 56:3630-3.
35. Ming Li, Xiao-Lei Zhang, Fang Deng et al. Involvement of TP53 and TP16 expression in human papillomavirus-associated non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2016; 12: 3330–3336.
36. Kang H, Kiess A, Chung CH. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015; 12:11-26.
37. Badaracco G, Venuti A, Morello R. et al. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res,* 2000; 20:1301-1305.
38. Holmes, A. et al. Mechanistic signatures of HPV insertions in cervical carcinomas. *NPJ Genom Med.* 2016; 16:16004.
39. de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R. et al. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324:17–27.
40. Bernard, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010; 401:70–79.
41. Ahmadi, N., Chan, M., Huo, Y. R. et al. Survival outcome of tonsillar squamous cell carcinoma (TSCC) in the context of human papillomavirus (HPV): A systematic review and meta-analysis. *Surgeon.*2019; 17:6–14.
42. Kida, K. et al. Between p16 Expression and Prognosis in Patients with Oropharyngeal Cancer. Undergoing Surgery. *In Vivo.* 2018; 32:927–935.

43. Valls-Ontañón, A. et al. Impact of human papilloma virus in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Med Clin (Barc)*. 2019; 152:174–180.
44. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015; 517:576–582.
45. Marilena V, Iorio and Carlo M. Croce: MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a High Impact. *J Clin Oncol*, 2009; 27:5848-5856.
46. 38. Molnár V, Bakos B, Hegyesi H, Falus A: Nem kódoló genom és mikroRNS-ek: új fejezet a genetika történetében. *LAM*, 2008; 18:591-597.
47. 39. Gócze K, Gombos K, Pajkos G. et al. Mikro-RNS-ek jelentősége a molekuláris epidemiológiában. *Orvosi Hetilap*, 2011; 152:633-641.
48. 40. Tömböl Zs, Szabó P, Rácz K. et al. A mikro-RNS-ek jelentősége daganatos betegségekben. *Orvosi Hetilap*, 2007; 148:1135-1141.
49. Liu, T., Xu, Z., Ou, D. et al. The miR-15a/16 gene cluster in human cancer: A systematic review. *J Cell Physiol*. 2019; 234:5496–5506.
50. Håkansson, K. E. J. et al. Circulating Small Non-coding RNAs as Biomarkers for Recovery After Exhaustive or Repetitive Exercise. *Front Physiol*. 2018; 9:1136.
51. Wang M, Wang Q, Zhang B. Response of miRNAs and their targets to salt and drought stresses in cotton. *Gene*, 2013; 510: 26-32.
52. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM: Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*, 2008; 54: 482-490.
53. Mohr, A. M. & Mott, J. L. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis*. 2015; 35:3–11.

54. Chen DB, Wnag W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol Reprod*, 2013; 88: 130.
55. Saito Y, Liang G, Egger G. et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, 2006; 9: 435-443.
56. Meng F, Wehbe-Janek H, Henson R. et al. Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes. *Oncogene*, 2008; 27: 378-386.
57. Gombos K, Horváth R, Szele E. et al. miRNA expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res*, 2013; 33: 1511-1517.
58. Zen K, Zhang CY: Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev*, 2012; 32: 326-348.
59. 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: 672-675.
60. Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K. et al. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev*, 2009; 23: 433-438.
61. Ji X, Takahashi R, Hiura Y. et al. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*, 2009; 55: 1944-1949.
62. Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention? *Oncologist*, 2005; 10: 493-500.
63. Braakhuis BJ, Leemans Cr, Brakenhoff R. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med*, 2004; 33: 317-322.
- 64 13. Heaphy CM, Griffith JK, Bisoffi M. Mammary Field Cancerization: Molecular Evidence and Clinical Importance. *Breast cancer research and treatment*. 2009; 118:229–39.

65. Nonn L, Ananthanarayanan V, Gann PH. Evidence for Field Cancerization of the Prostate. *The Prostate*. 2009; 69:1470–9.
66. Graham TA, McDonald SA, Wright NA. Field Cancerization in the Gi Tract. *Future oncology*. 2011; 7:981–93.
67. Baba Y, Ishimoto T, Kurashige J, Iwatsuki M et al. Epigenetic field cancerization in gastrointestinal cancers. *Cancer Lett*. 2016; 375:360-366.
68. Curtius K, Wright NA, Graham TA. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18:19-32.
69. Ryser MD¹, Lee WT^{2,3}, Ready NE et al. Quantifying the Dynamics of Field Cancerization in Tobacco-Related Head and Neck Cancer: A Multiscale Modeling Approach. *Cancer Res*. 2016; 76:7078-7088.
70. Marc D. Ryser, Walter T. Lee, Neal E. Ready et al. Quantifying the dynamics of field cancerization in tobacco-related head and neck cancer: a multi-scale modeling approach. *Cancer Res*. 2016; 76(24): 7078–7088
71. Marron M, Boffetta P, Zhang ZF et al. Cessation of Alcohol Drinking, Tobacco Smoking and the Reversal of Head and Neck Cancer Risk. *International journal of epidemiology*. 2010; 39: 182–96.
73. 8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2004.
74. Sonnenschein C, Soto AM. Somatic mutation theory of carcinogenesis: why it should be dropped and replaced. *Mol Carcinog*. 2000; 29:205–11.
75. Simon Rosenfeld Are the Somatic Mutation and Tissue Organization Field Theories of Carcinogenesis Incompatible? *Cancer Inform*. 2013; 12:221–229.

76. Sonnenschein C, Soto AM. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Semin Cancer Biol.* 2008; 18:372–7.
77. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976; 194:23–8.
78. Wald, A. I., Hoskins, E. E, Wells, S. I., et al. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head Neck,* 2011; 33:504–512.
79. Saintigny, P., Zhang, L, Fan, Y. H, et al. Gene expression profiling predicts the development of oral cancer. *Cancer Prev. Res.* 2011; 4:218–229.
80. Volinia, S, Calin, G. A, Liu, C. G, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 2006; 103:2257–2261.
81. Motsch, N, Pfuhl, T, Mrazek, J., et al. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol.* 2007; 4:131–137.
82. Ramdas, L., Giri, U., Ashorn, C. L., et al. MiRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck.* 2009; 31:642–654.
83. Liu, J, Mao, Q, Liu, Y, et al. Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. *Chin. J. Cancer Res.* 2013, 25:46–54.
84. Garofalo, M., Di Leva, G, Romano, G, et. al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 down-regulation. *Cancer Cell,* 2009; 16:6.
85. Wang, J, Liu S, Sun, G. P., et al. Prognostic significance of microRNA-221/222 expression in cancers: evidence from 1,204 subjects. *Int. J. Biol. Markers,* 2014; 10:5301.
86. Gao, Y., Li, B. D., Liu, Y. G. Effect of miR27a on proliferation and invasion in colonic cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013; 14:4675–4678.

87. M. Poljak, BJ Kocjan. Commercially available assays for alfa human papillomavirus multiplex. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 10: 1139–1162.
89. Brakenhoff RH, Wagner S, Klussmann JP. Molecular Patterns and Biology of HPV-Associated HNSCC. *Recent Results Cancer Res.* 2017; 206:37-56.
90. Rothenberg, S. M. & Ellisen, L. W. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest.* 122, 1951–1957 (2012).
- 91.. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. & Brakenhoff, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 11, 9–22 (2010).
- 92.. Ang, K. K. et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 363, 24–35 (2010).
93. Chung, C. H. & Gillison, M. L. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 15, 6758–6762 (2009).
94. Masuda, M., Toh, S., Wakasaki, T., Suzui, M. & Joe, A. K. Somatic evolution of head and neck cancer - biological robustness and latent vulnerability. *Mol Oncol.* 7, 14–28 (2013).
95. Trosman SJ, Koyfman SA, Ward MC et al. Effect of human papillomavirus on patterns of distant metastatic failure in oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with chemoradiotherapy. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015; 141:457–62.
96. Bersani, C. et al. MicroRNA-155, -185 and -193b as biomarkers in human papillomavirus positive and negative tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2018; 82, 8–16.
97. El-Salem F, Mansour M, Gitman M et al. PCR HPV genotyping in fine needle aspirations of metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Exposing the limitations of conventional p16 immunostaining. *Oral Oncol.* 2019; 90:74-79.

98. Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ et al. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96:998–1006
99. Bersani C, Haegglblom L, Ursu RG et al. Overexpression of FGFR3 in HPV-positive Tonsillar and Base of Tongue Cancer Is Correlated to Outcome. *Anticancer Res.* 2018; 38:4683-4690.
100. Mehanna H, Beech T, Nicholson T et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer— systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck.* 2013; 35:747–55.
101. Young D, Xiao CC, Murphy B et al. Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). *Oral Oncol.* 2015; 51:727-30.
102. Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viralinduced carcinoma? *Int J Cancer* 2009; 125:362–6
103. Tealab SH, Sedhom NFH, Hassouna A et al. Prevalence of human papilloma virus in oropharyngeal, tongue and lip squamous cell carcinoma: an experience from the Egyptian National Cancer Institute. *J Investig Med.* 2019; 67:1061-1066.
104. Toman J, Von Larson S, Umeno H, et al. HPV-Positive Oropharyngeal Cancer Via p16 Immunohistochemistry in Japan. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology* 2017; 126:152–8.
105. Iorio M V, Croce CM. MicroRNAs in Cancer : Small Molecules With a Huge Impact. 2012; 27:34.
106. Sacks R, Law JY, Zhu H et al. Unique Patterns of Distant Metastases in HPV-Positive Head and Neck Cancer. *Oncology.* 2020; 98:179-185.

107. van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW et al. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *J Pathol.* 2002; 198:476–486.
108. Volinia S, Calin GA, Liu CG et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:2257–61.
109. Thapa DR, Bhatia K, Bream JH et al. B-cell activation induced microRNA-21 is elevated in circulating B cells preceding the diagnosis of AIDS-related non-Hodgkin lymphomas. *AIDS.* 2012; 26:1177-80.
110. Yan LX, Huang XF, Shao Q et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 2008; 14:2348–60.
111. Hwang JH, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM et al. Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PLoS ONE* 2010;5:e1063
112. Frezzetti D, De Menna M, Zoppoli P et al. Upregulation of miR-21 by Ras in vivo and its role in tumor growth. *Oncogene* 2011; 30:275–86.
113. Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 2008; 27:4373–9.
114. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133:647– 58.
115. Boldrup., L., Coates, P. J., Wahlgren, M. et al. Subsite-based alterations in miR-21, miR-125b, and miR-203 in squamous cell carcinoma of the oral cavity and correlation to important target proteins. *J Carcinog.* 2012; 11:18.
116. Fu X, Han Y, Wu Y et al. Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest.* 2011; 41:1245–125

117. Liu T, Chen G, Sun D et al. Exosomes containing miR-21 transfer the characteristic of cisplatin resistance by targeting PTEN and PDCD4 in oral squamous cell carcinoma. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2017; 49:808–816.
118. Li, J. et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:3998–4008.
119. Arantes, L. M. et al. MiR-21 as prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma patients undergoing an organ preservation protocol. *Oncotarget.* 2017; 8:9911–9921.
120. Sun S.-S., Zhou X., Huang Y.-Y. et al. Targeting STAT3/miR-21 axis inhibits epithelial-mesenchymal transition via regulating CDK5 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer.* 2015; 14:213.
121. De Mattos-Arruda L, Bottai G, Nuciforo PG, et al. MicroRNA-21 links epithelial-to-mesenchymal transition and inflammatory signals to confer resistance to neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy in HER2-positive breast cancer patients. *Oncotarget.* 2015; 6:37269–37280.
122. Irimie-Aghiorghiesei AI, Pop-Bica C, Pintea S et al. An Updated Meta-Analysis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *J Clin Med.* 2019; 21:8-12.
123. Sannigrahi, M. K. Role of non-coding RNAs in head and neck squamous cell carcinoma: A narrative review. *Oral Dis.* 2018; 24:1417–1427.
124. Ko, Y. H. et al. Human papillomavirus-stratified analysis of the prognostic role of miR-21 in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Int.* 2014; 64, 499–507.
125. Saintigny, P. et al. Gene expression profiling predicts the development of oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011; 4:218–29.
126. Liu H, Liu J, Huo J et al. Downregulation of miR-143 modulates KRAS expression in colorectal carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2019; 42:2759-2767.

127. Andreia Bufalino, Nilva K. Cervigne, Carine Ervolino de Oliveira et al. Low miR-143/miR-145 Cluster Levels Induce Activin A Overexpression in Oral Squamous Cell Carcinomas, Which Contributes to Poor Prognosis. *PLoS One*. 2015; 28:10
127. Wei J, Ma Z, Li Y, Zhao B, et al. miR-143 inhibits cell proliferation by targeting autophagy-related 2B in non-small cell lung cancer H1299 cells. *Mol Med Rep* . 2015; 11: 571–576.
129. Wu D, Huang P, Wang L et al. MicroRNA-143 inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in prostate cancer. *Mol Med Rep*. 2013; 8: 626–630.
130. Kundaktepe BP, Sozer V, Papila C et al. Associations Between miRNAs and Two Different Cancers: Breast and Colon. *Cancer Manag Res*. 2020; 12:871-879.
131. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep*. 2006; 16:845–850.
132. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 2007; 72:397–402.
133. Jonigk D, Izykowski N, Maegel L et al. MicroRNA expression in Epstein-Barr virus-associated post-transplant smooth muscle tumours is related to leiomyomatous phenotype. *Clin Sarcoma Res*. 2013; 6:3-9.
134. C B Lajer, E Garnæs, L Friis-Hansen et al. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *Br J Cancer*. 2012; 106:1526-34.
135. Chen Y, Ma C, Zhang W, Chen Z et al. Down regulation of miR-143 is related with tumor size, lymph node metastasis and HPV16 infection in cervical squamous cancer. *Diagn Pathol*. 2014; 9:88.

136. Wald AI, Hoskins EE, Wells SI et al. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head Neck*. 2011; 33:504–512.
137. He XX, Guo AY, Xu CR, et al. Bioinformatics analysis identifies miR-221 as a core regulator in hepatocellular carcinoma and its silencing suppresses tumor properties. *Oncol Rep*. 2014; 32:1200-1210.
138. le Sage C, Nagel R, Egan DA, et al. Regulation of the p27 (Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J*. 2007; 26:3699-3708.
139. Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, et al. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2008; 27:5651-5661.
140. Yin Y, Wang X, Li T et al. MicroRNA-221 promotes breast cancer resistance to adriamycin via modulation of PTEN/Akt/mTOR signaling. *Cancer Med*. 2020; 9:1544-1552.
141. Sun X, Liu B, Zhao XD et al. MicroRNA-221 accelerates the proliferation of laryngeal cancer cell line Hep-2 by suppressing Apaf-1. *Oncol Rep*. 2015; 33:1221-6.
142. Avissar, M., Christensen, B. C., Kelse et al. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:2850–5.
143. Hussein, S., Mosaad, H., Rashed, H. E. Up-regulated miR-221 expression as a molecular diagnostic marker in laryngeal squamous cell carcinoma and its correlation with Apaf-1 expression. *El-Anwar MW Cancer Biomark*. 2017; 19:279–287.
144. Hussein S, Mosaad H, Rashed HE et al. Up-regulated miR-221 expression as a molecular diagnostic marker in laryngeal squamous cell carcinoma and its correlation with Apaf-1 expression. *Cancer Biomark*. 2017; 19:279-287.
145. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of 413 head and neck squamous cell carcinomas, *Nature*. 2015; 414:576–582.

146. S. S. Yilmaz, E. Guzel, O. F. Karatas et al. MiR-221 as a Pre- and Postoperative Plasma Biomarker for Larynx Cancer Patients, *Laryngoscope*. 2015; E377–81.
147. Lu H, Gu X MicroRNA-221 inhibits human papillomavirus 16 E1-E2 mediated DNA replication through activating SOCS1/Type I IFN signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12:1518-1528.
148. Hess, A. K. et al. MiR-200b and miR-155 as predictive biomarkers for the efficacy of chemoradiation in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2017; 77:3–12.
149. Wang, J. L., Wang, X et al. The Expression of MicroRNA-155 in Plasma and Tissue Is Matched in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Yonsei Med J*. 2016; 57:298–305.
150. Ramdas, L. et al. D. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck*. 2009; 31:642–54.
151. *Yonsei Med J*. 2016 Mar;57(2):298-305. doi: 10.3349/ymj.2016.57.2.298. The Expression of MicroRNA-155 in Plasma and Tissue Is Matched in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Wang JL¹, Wang X¹, Yang D¹, Shi WJ².
152. Shi LJ, Zhang CY, Zhou ZT et al. MicroRNA-155 in oral squamous cell carcinoma: Overexpression, localization, and prognostic potential. *Head Neck*. 2015; 37:970-6.
153. Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* 2009; 15:425–430.
154. Baba., O. et al. MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. *J Oral Pathol Med*. 2016; 45:248–55.
155. Jamali, Z. et al. MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2015; 51:321–31.

156. Lerner, C. 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; 142:757–66.

157. Wald, A. I., Hoskins, E. E., Wells et al. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head Neck.* 2011; 33:504–12.

158. Baba O, Hasegawa S, Nagai H et al. MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. *J Oral Pathol Med.* 2016; 45:248-55.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Szanyi István tanár úrnak, aki tapasztalatával, hasznos magyarázataival és tanácsaival segítséget nyújtott a munkámban. Köszönöm a készséges támogatását és, hogy mindig számíthattam rá, hogy mindig nyitottan meghallgatta az észrevételeimet. Köszönet a konstruktív kritikákért, amellyel segített emelni a dolgozat minőségét.

Külön köszönettel tartozom Dr. Gombos Katalin adjunktus asszonynak, aki felkeltette az érdeklődésemet a téma iránt; valamint azért, mert tudásával és szakértelmével az egyetemi éveim óta folyamatosan segítette munkámat. Motiváló gondolatai mindig előre vittek és újabb lendületet adtak a munkám során. Hálás vagyok a számtalan konzultációért, az ötleteiért és a szakmai, emberi segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, akik hozzájárultak a dolgozat létrejöttéhez, Dr. Petrevszky Nerinának a sok közös munkát, a minták feldolgozásában való részvételét, Dr. Kaszás Bálintnak az immunhisztokémiai festést, Háber Istvánnak, Csonka Dávidnak, Dr. Tóth Arnoldnak és Dr. Molnár Krisztiánnak a 3D-s modell létrejöttét, Kalács Krisztinának, valamint a Laboratóriumi Medicina Intézet dolgozóinak és a Fül-, Orr-, Gégészeti- és Fej-, Nyaksebészeti Klinika munkatársainak a segítséget és a lehetőséget a kutatásom elvégzésére, nélkülük ez a kutatás nem jöhetett volna létre.

Köszönettel tartozom továbbá mindazoknak, akik a kutatásban vizsgálati személyként jelen voltak. Őszintén remélem, hogy eredményeim az ő javukat is szolgálják majd.

Hálával tartozom továbbá családomnak. Köszönöm nekik, hogy munkám során türelemmel és megértéssel támogattak, és minden helyzetben mellettem álltak.

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Éva Orosz, Katalin Gombos, Nerina Petrevszky, David Csonka, Istvan Haber, Balint Kaszas, Arnold Toth, Krisztian Molnar, Krisztina Kalacs, Zalan Piski, Imre Gerlinger, Andras Burian, Szabolcs Bellyei, István Szanyi, Visualization of mucosal field in HPV positive and negative oropharyngeal squamous cell carcinomas: combined genomic and radiology based 3D model. Scientific Reports, Sci Rep., 2020, Jan 8;10 (1) doi: 10.1038/s41598-019-56429-4. (IF 4,4)

Éva Orosz, Katalin Gombos, Nerina Petrevszky, Bálint Kaszás, Krisztina Kalács, Gréta Bodzai, Imre Gerlinger, István Szanyi, miRNA expression pattern differences of HPV negative and HPV positive advanced stage mesopharynx cancers. Fül-Orr-Gégegyógyászat, 2019, 65 (2): 63-68.

Orosz Éva, Gombos Katalin, Tamás Riedling, Priscilla Afiakurue, Kiss István, Pytel József, Gerlinger Imre, Szanyi István, Comparative miRNA expression profile analysis of squamous cell carcinoma and peritumoral mucosa from the meso- and hypopharynx. Cancer Genomics and Proteomics. 2017 JulAug;14 (4): 285-292. (IF 2,5)

Orosz Éva dr., Gombos Katalin dr., Révész Péter dr., Kiss István dr., Pytel József dr., Gerlinger Imre dr., Szanyi István dr., MicroRNA expression profiles in squamous cell carcinomas of the meso- and hypopharynx. Orvosi Hetilap, 2014, 155, 27: 1063–1070. (IF 0,3)

Egyéb társszerzős közlemények:

Bellyei S, Bakó P, **Orosz É**, Molnár K, Remenár É, Mangel L, First report on successful application of nivolumab in Hungary for the treatment of locally recurrent head and neck squamous cell carcinoma. Magy Onkol, 2018, 62: 175-178.

Ráth Gábor, Bakó Péter, Révész Péter, Somogyvári Krisztina, Gaál Veronika, **Orosz Éva**, Gerlinger Imre, Glass ionomer cement alkalmazása a stapes talpán: a perilympa alumínium szintjének állatkísérletes vizsgálata. Fül-Orr-Gégegyógyászat, 2016, 62: 17-21.

A témában tartott előadások:

Orosz Éva, Kiss István, Pytel József, Gerlinger Imre, Szanyi István, Gombos Katalin, Mesopharynx, hypopharynx daganatok vizsgálata mikro-RNS markerek segítségével.

Fiatal Onkológusok III. Konferenciája, Budapest, 2014. szeptember 12.

Orosz Éva, Szanyi István, Révész Péter, Gombos Katalin, Meso- és hypopharynx lokalizációjú fej-nyaki laphám karcinómák együttes miRNS-mRNS expressziós mintázatainak értékelése.

Magyar Onkológusok Társaságának XXX. Kongresszusa, Pécs, 2013. november 14-16.

Orosz Éva, Gombos Katalin, Kiss István, Gerlinger Imre, Szanyi István, Mesopharynx, hypopharynx daganatok és a peritumorális ép szövetek mikro-RNS expressziós mintázatának analízise.

A Magyar Fül-, Orr-, Gége és Fej-, Nyaksebész Orvosok Egyesületének 43. Kongresszusa, Tapolca, 2014. október 15-18.

Orosz Éva, Gombos Katalin, Szanyi István, Molekuláris epidemiológiai biomarkerek jelentősége, lehetőségei a fej-nyaki daganatokban.

MFOE Tudományos Ülés, Budapest, 2015. április

Orosz Éva, Afiakurue Priscilla, Gerlinger Imre, Gombos Katalin, Szanyi István, Magas kockázatú HPV összefüggései meso-, hypopharynx és szájüregi daganatok megjelenésével és micro-RNS mintázatával.

Magyar Fül-, Orr-, Gége és Fej-, Nyaksebész Orvosok Egyesülete 44. Kongresszusa és az MFOE Audiológiai Szekciójának 53. Vándorgyűlése, 2016. október 6-9.

Orosz Éva, Nerina Petrevszky, Gombos Katalin, Szanyi István: MicroRNA expression profiles in squamous cell carcinomas of the meso- and hypopharynx.

4th Congress of European ORL-HNS, Barcelona, 2017. október 7-11.

Orosz Éva, Gombos Katalin, Petrevszky Nerina, Kaszás Bálint, Háber István, Csonka Dávid, Szanyi István: Szöveti miR-21, miR-143, miR-155 és miR-221 expresszió, mint a tumor lokalizáció és HPV pozitivitást jelző biomarkerek laphámsejtes fej-nyak karcinómákban.

Magyar Fül-, Orr-, Gége és Fej-, Nyaksebész Orvosok Egyesülete 45.
Kongresszusa és az MFOE Audiológiai Szekciójának 55. Vándorgyűlése, Szeged, 2018.
szeptember 13-16.

Mikro-RNS-expressziós mintázatok mesopharynx-hypopharynx laphámcarcinomákban

Orosz Éva dr.¹ ■ Gombos Katalin dr.² ■ Révész Péter dr.¹
Kiss István dr.¹ ■ Pytel József dr.¹ ■ Gerlinger Imre dr.¹
Szanyi István dr.¹

¹Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Központ,
Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Pécs

²Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Népegészségtani Intézet, Pécs

Bevezetés: A mikro-RNS-ek a gének szabályozásán keresztül szerepet játszanak a daganatok kialakulásában. *Célkitűzés:* A szerzők a „cancer field” elmélet tükrében nemcsak magát a tumoros folyamatot, hanem annak környezetét is vizsgálva igyekeztek feltérképezni a meso- és hypopharynxlaphám-carcinomák mikro-RNS-mintázatát. *Módszer:* A szerzők által kidolgozott térképbiopsziás (1.: tumor, 2.: tumortól 1 cm-re, 3.: 2 cm-re és 4.: 3 cm-re) mintavételt követően 13 friss fagyasztott szövetből real-time quantitative polimeráz láncreakciós módszerrel határozták meg a mikro-RNS-expressziót. *Eredmények:* A miR-221 csak mesopharynxszövetekben, míg a miR-21, miR-143 és miR-155 hypopharynxdaganatokban mutatott szignifikánsan magasabb expressziót. A tumoros és a hozzá közeli mikroszkóposan ép szövet mikro-RNS-mintázata hasonló volt, míg a távoli ép szöveteké eltért a tumortól. *Következtetések:* A szerzők a mikro-RNS-expressziós mintázat alapján sikeresen különítették el a hypopharynx- és mesopharynx-daganatokat, valamint a tumor környéki szöveteket. A módszer jövőbeni jelentőségét az adja, hogy betekintést enged a szövetek epigenetikus szabályozásába, így a tumoros folyamat olyan korán fellelhető, amikor a sejt még fenotípusosan ép. *Orv. Hetil., 2014, 155(27), 1063–1070.*

Kulcsszavak: fej-nyak daganatok, laphámcarcinoma, szöveti szerveződési terület, mikro-RNS, epigenetika

MicroRNA expression profiles in squamous cell carcinomas of the meso- and hypopharynx

Introduction: MicroRNAs play a role in carcinogenesis through their genome regulatory function. *Aim:* The aim of the authors was to identify and compare microRNA expression signatures of meso- and hypopharynx squamous cell cancers on the basis of the cancer field hypothesis. *Method:* Using standard mapping biopsy (tumour tissue and macroscopically normal tissues obtained 1, 2 and 3 cm from margin) 13 snap frozen sample series were analysed for microRNA expression with quantitative real-time polymerase chain reaction. *Results:* MiR-221 was significantly overexpressed in mesopharynx cancers, whole miR-21, miR-143 and miR-155 showed significant overexpression in hypopharynx cancers. *Conclusions:* Using microRNA expression profiles the authors were able to distinguish peritumoural tissues according to distance from the primary tumour site. Future application of the method may prove to be useful in early detection of the altered epigenetic regulation in tissue fields representing normal phenotype. This may be helpful in cancer risk assessment and prevention.

Keywords: head and neck cancer, squamous cell carcinoma, tissue organization field theory, micro-RNA, epigenetics

Orosz, É., Gombos, K., Révész, P., Kiss, I., Pytel, J., Gerlinger, I., Szanyi, I. [MicroRNA expression profiles in squamous cell carcinomas of the meso- and hypopharynx]. *Orv. Hetil., 2014, 155(27), 1063–1070.*

(Beérkezett: 2014. április 8.; elfogadva: 2014. május 8.)

Rövidítések

miR = mikro-RNS; NF κ B = nuclear factor-kappaB; ORF = open reading frame; RISC = RNA induced silencing complex; UTR = untranslated region

A fej-nyaki daganatok okozta halálozás Magyarországon az elmúlt évtizedekben megnégyszereződött [1]. Az Országos Onkológia Intézet által vezetett rákregiszter adatai alapján 2010-ben és 2011-ben a meso- és hypopharynxdaganatok száma több mint 1200 volt [2]. Klinikánkon a mesopharynxdaganatok incidenciája 1983 óta több mint duplájára nőtt, a hypopharynxmalignomák száma pedig megháromszorozódott (1. és 2. ábra). A meso- és hypopharynxdaganatok előfordulása folyamatosan növekszik, mortalitásuk 50% feletti [3]. A két régió malignus daganatai az 55–60 éves populációra a legjellemzőbbek, ám az utóbbi években egyre inkább megfigyelhető a garatdaganatok fiatalabb életkorban való megjelenése. Figyelemfelkeltő az a tény is, hogy az egy régióra lokalizálódó, jól operálható, így kedvezőbb prognózisú tumorok egyre inkább eltűnnek, míg a több régiót involváló, agresszív terjedésű, kedvezőtlen prognózisú daganatok jóval gyakoribbak. Célunk egy olyan molekuláris biológiai marker vizsgálata, amely a jövőben esetleg prediktív, prognosztikai céllal is alkalmazható.

A mikro-RNS-ek (miRNS) az utóbbi évek tudományos kutatásainak középpontjában állnak. A miRNS-ek kis, 19–25 bázispár hosszúságú RNS-ek, amelyek intravagy intergenikus szakaszcsoportra íródnak át, és nem transzlálódnak. Az érett miRNS egy ribonukleotid komplexhez, a RISC-hez (RNA induced silencing complex) kapcsolatosan kötődik az mRNS-hez és látja el feladatát. A szabályozás történhet a target mRNS 3' UTR (untranslated region) szakaszához való kapcsolódással, de kötődhet az 5' UTR-szakaszhoz vagy ORF-hez (open reading frame) is. Ezáltal blokként gátolja a transzlációt, vagy lebontó endonukleázokat aktiválva az mRNS degradációját okozza [4, 5, 6]. A humán genom 50–60%-át szabályozzák miRNS-ek. Egy mRNS-t több miRNS szabályozhat, és egy miRNS több mRNS transzlációját befolyásolhatja [4, 5]. Így válik lehetővé a génexpresszió finom hangolása, a sejt életfolyamatainak – a differenciá-

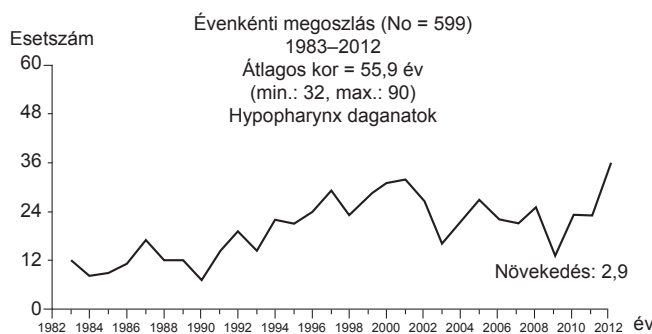
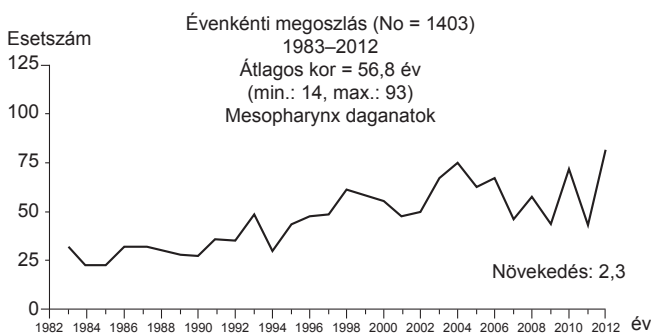
ció, a sejtosztódás, az apoptózis, az intermedier anyagcsere-folyamatok – harmonikus szabályozása, a homeosztázis fenntartása [7]. Mindebből következnek: ha a sejtek életfolyamatainak bármely területén változás következik be, a miRNS-mintázat, a miRNS-ek mennyisége megváltozik, pontosabban a miRNS-ek szabályozóképességének módosulása, károsodása vezet élettani funkciók megváltozásához. Tehát gyulladáscsökkentő folyamatokban, szövettársodás során, daganatos betegségekben detektálható ez az eltérés. Aszerint, hogy mely gént regulálják, a miRNS-ek viselkedhetnek onkogénként (onkomir), illetve tumorszuppresszor géneként. Mutathatnak csökkent vagy fokozott expressziót [5].

2008-as felfedezés, hogy a miRNS-ek a szérumban, a nyálban és más testnedvekben is jelen vannak [8, 9]. Ezek a szabad, érett miRNS-ek kis méretük miatt endonukleázokkal szemben nagyon ellenállóak és stabilak, így laboratóriumi körülmények között reprodukálhatóan kimutathatók [10].

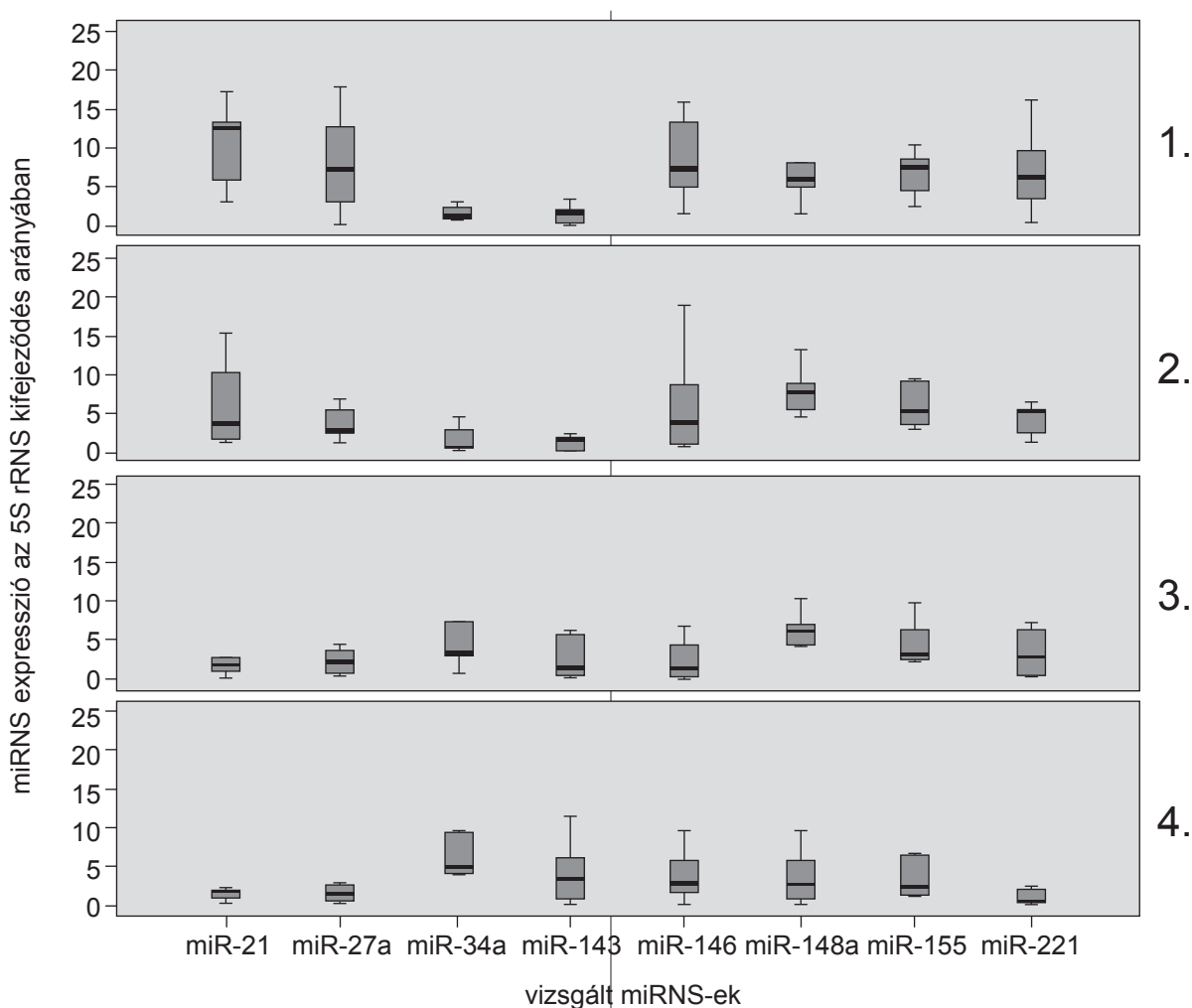
Fej-nyaki laphám daganatok szomorú jellemzője, hogy a primer tumor eltávolítása után nagyon gyakran korán megjelenik a lokális recidíva vagy egy szekunder primer tumor. Ennek hátterében az állhat, hogy a daganat környezete, habár makroszkóposan és szövettanilag is épek tűnik, genomikailag mutatja a daganatra jellemző eltéréseket – pontmutációkat, kromoszómaaberrációkat, amplifikációt –, így egy preneoplasztikus területet (cancer field) vagy módosult szöveti szerveződési területet alakítanak ki [11, 12]. A terület preneoplasztikus elváltozása miRNS-szinten detektálható. A karcinogenezis folyamatában a klonális expanzió túl, a sejtek közötti interakciók akár miRNS-mRNS transzmisszió útján is hozzájárulhatnak a premalignussá váláshoz.

Módszer

Kutatásunk során szövettanilag igazolt meso- és hypopharynxlaphám-carcinomákat vizsgáltunk. Mintáink a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikáról származnak. Mintáinkat egységes eljárás szerint a tumor széléből (0), a daganattól 1 cm-re (1), a daganattól 2 cm-re (2), illet-



1. és 2. ábra | PTE KK Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika malignus meso- és hypopharynx daganatainak száma 1983-tól 2012-ig. Az adatok forrása a pécsi Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikán, Pytel József professzor úr által kifejlesztett tumor statisztikai program.



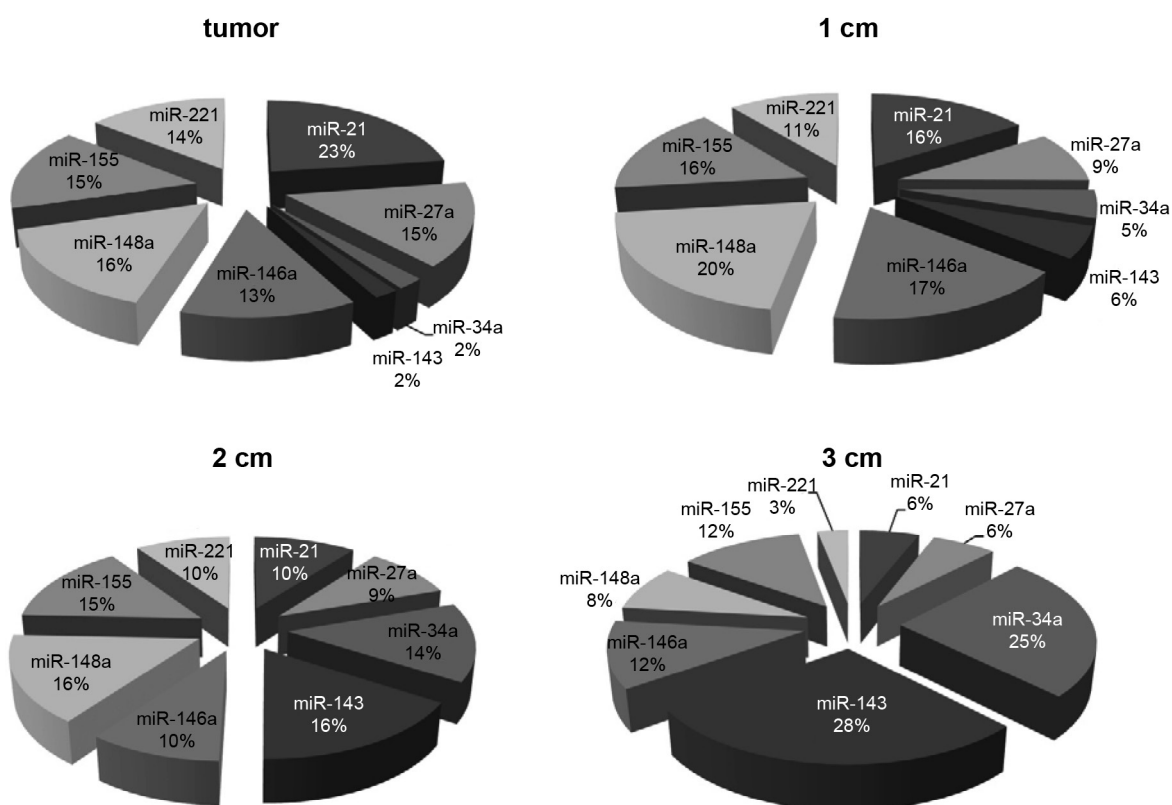
3. ábra | Meso- és hypopharynx laphám karcinómák miRNS expressziója tumortól való távolság szerint (1.: tumor, 2.: tumortól 1 cm-re, 3.: tumortól 2 cm-re, 4.: tumortól 3 cm-re)

ve a tumortól legalább 3 cm-re (3) fekvő ép nyálkahártyaszövetből vettük. A miRNS-expressziós analízis során összesen 52 szövetmintát vizsgáltunk 13 betegről, amelyből 5 hypopharynx-, 8 mesopharynx daganatból származott. A tumorszövetminták klinikopatológiailag II-es, III-as és IV-es stádiumú laphámsejtes carcinómának feleltek meg.

A mintákat a műtétet követően azonnal $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottuk a laboratóriumi feldolgozásig. A teljes nukleinsav-izolálás menetét a szövetminták izolált homogenizálásával kezdtük, 60 μg kiindulási szövetből, amelyhez 150 μl lízispuffert adtunk (High Pure miRNA Isolation Kit, katalógusszám: 05080576001, Roche, Mannheim, Németország). Mintáinkat MagNA Pure Green Beads (Roche) kerámiagyöngyös homogenizálós csövekbe mértük, és MagNA Lyzer (Roche) rázóhomogenizátor segítségével homogenizáltuk. Ezt követően a nukleinsav-izolálást a Roche High Pure miRNA izolációs kit vegyszereinek felhasználásával és a hozzá tartozó használati útmutatónak megfelelően végeztük. Az így nyert teljes RNS minőségét abszorpciós fotometriával ellenőrizzük (260/280 nm $A > 1,9$). Minőségi ellenör-

zést követően a mintáinkat azonnal felhasználtuk a további vizsgálatainkhoz.

A miRNS-frakciókat reverz transzkripció során írtuk át cDNS-re. Universal cDNA synthesis kitet (Quiagen, Woburn, MA, Amerikai Egyesült Államok) használtunk, radnom hexamer priming alkalmazásával, amely a kitben szerepelt. A teljes szöveti RNS-ről átírt cDNS-mintákat kvantitatív PCR-rendszerben (Roche LC480 rendszer és LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit, Roche) amplifikáltuk. Az általunk vizsgált miRNS-eknek megfelelően specifikus primereket használtunk az universal miCURY LNA primer szettből (Exiqon, Vedbaek, Dánia) hsa-miR-21, -27a, -34a, -143, -146a, -148a, -155, -221. Belső kontrollként pedig az universal miCURY LNA 5S rRNS-nek, valamint az U6 snRNS-nek megfelelő specifikus primereket alkalmaztunk. A PCR-reakcióoldat minden esetben 2 μl primer mixet, 8 μl cDNS-templátot és 10 μl LC480 SYBR Green I Master mixet tartalmazott 20 μl össztérfogatban. Az amplifikáció 8×12 -es plate-en történt, az általunk tervezett forma szerint: PCR futásonként a plate 6 daganatspecifikus miRNS-t és 2 belső kontrollt tartalmazott, amelyeket 10 ismeretlen nuklein-



4. ábra | A miRNS expresszió egymáshoz viszonyított arányaiban kifejezve a tumorban és attól cm-ként távolodva

sav-koncentrációjú mintán, egy sor ismert koncentrációjú pozitív mintán és egy sor negatív kontrollal szemben vizsgáltunk. A real time PCR során kapott expressziós értékeket az LC480-as PCR-gépen a Light Cycler Exor 4.0 szoftver segítségével a belső kontrollhoz viszonyítva relatív kvantifikációs analízissel számoltuk ki ($\Delta\Delta C_p$ módszerrel). A kapott relatív kvantifikációs arányszámokat – a tumoros mintákban, a tőle 1 cm-re, 2 cm-re lévő, illetve az ellenoldali ép szövetekben kétszélű kétmintás t-próbával, valamint bináris logisztikus regresszió alkalmazásával – elemeztük SPSS 21.0 szoftver segítségével.

Eredmények

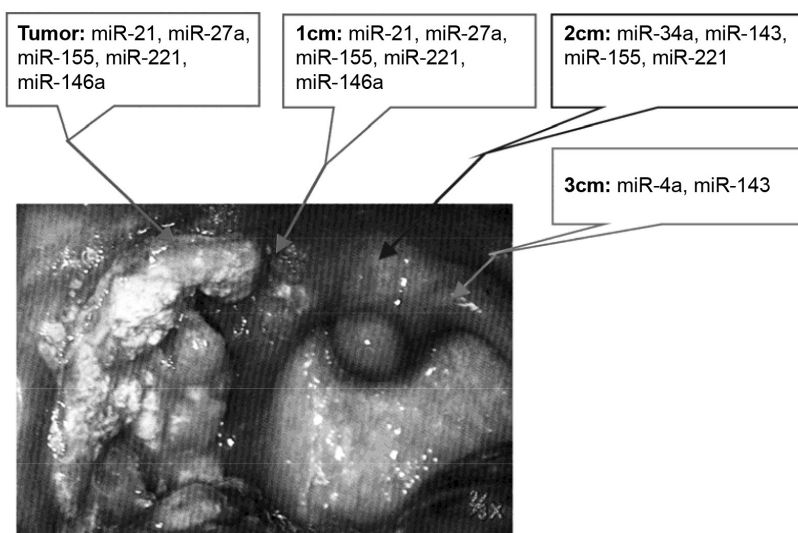
Vizsgálatunk célja a cancer-field molekuláris jellemzése volt meso- és hypopharynx-daganatokban. Ehhez a tumoros és az általunk kidolgozott séma szerinti mikroszkóposan ép nyálkahártya-területekről vett szövetminták egymással történő miRNS-expressziós mintázatának összehasonlítását végeztük el. A daganathoz képest attól centiméterenként távolodva az ép nyálkahártyaszövetekben jellegzetes miRNS-kifejeződési mintázatot találtunk (3. ábra).

Amennyiben a vizsgált miRNS-ek kifejeződését a tumorokban, valamint a tumortól meghatározott távolságra levő szövetekben minden esetben egymáshoz viszonyított arányaiban fejezzük ki, úgy még szemléletesebb különbségeket találunk a daganatot körülvevő nyálka-

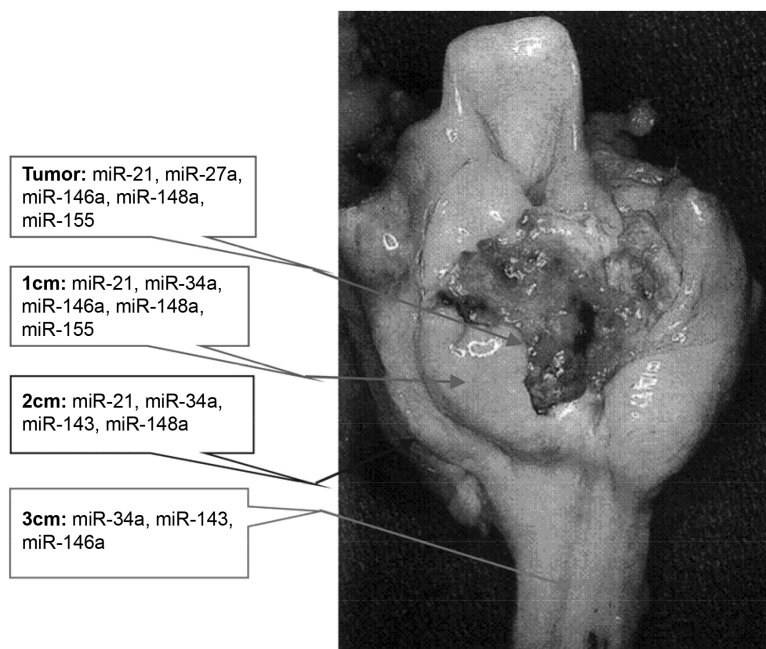
hártya miRNS-expressziós jellemzésére (4. ábra). Egy más arányaiban kifejezve a tumorban a miR-21, miR-27a, miR-221 mintegy a teljes expresszió 50%-át adja, ez a daganattól legtávolabb eső szövetekben alig 15%. Míg a miR-34a és miR-143 éppen ellenkezőleg, a daganatokban 10% alatti expressziós arányt mutat, ami fokozatosan mintegy 40% körülire nő a daganattól távol eső szövetekben. A daganat sebési kimetszésének vonalától 1 cm-re eső nyálkahártya az egymásra vonatkoztatott expressziós arányokban kevés eltérést mutat magától a daganattól, míg 2 cm-es, illetve 3 cm-es távolságban már markánsabban eltér. A 2 cm-es távolság már több közös vonást mutat a 3 cm-re fekvő ép nyálkahártya miRNS-kifejeződési mintázatával, mint a daganatéval.

A mesopharynx- és hypopharynxminták miRNS-expressziós adatait összehasonlítva a két lokalizáció között szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk. Statisztikailag szignifikánsnak bizonyult a miR-21, miR-143, miR-155 és miR-221. A miR-21, 143, 155 a hypopharynxból származó mintákban szignifikánsan magasabb expressziós értékeket mutatott, míg a miR-221 kifejeződése kizárólag a mesopharynxból vett szövetekben volt kimutatható ($p < 0,05$).

A daganatos és a peritumorális szöveteket vizsgálva mind hypo-, mind mesopharynx tekintetében a tumoros és a tumortól 1 cm-re lévő mikroszkóposan ép szövet epigenetikailag nagyon hasonló (5. és 6. ábra).



5. ábra | Jobb tonsilla palatinát infiltráló mesopharynx laphám carcinoma



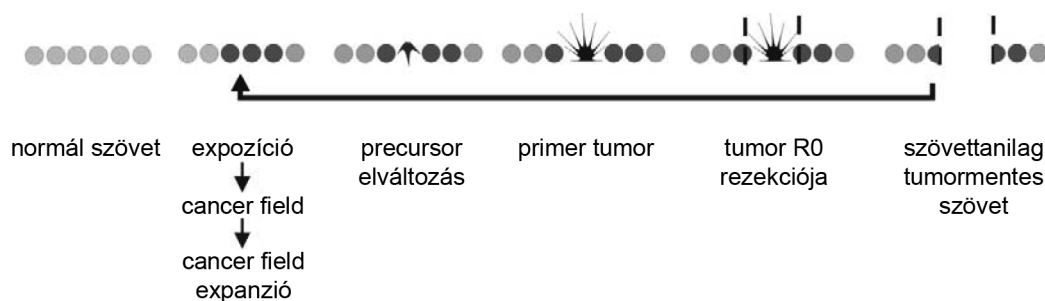
6. ábra | Retrocricoid régiót, oldalsó garatfalat és sinus piriformist beszűrő hypopharynx laphám carcinoma

Megbeszélés

A fej-nyak daganatok között a szájüregi, mesopharynx-hypopharynx, valamint gégelokalizációjú laphámeredetű carcinomák daganatfejlődési modelljét az elmúlt évek során az irodalomban gyakran jellemezték az úgynevezett cancer field, újabban szöveti szerveződési terület elmélettel (tissue organization field theory) [13, 14]. A modell feltételezi, hogy a daganatképződést elindító környezeti etiológiai tényezők, valamint az egyéni érzékenységet meghatározó tényezők jellegzetes genom-szintű változásokat hoznak létre a fenotípusosan ép nyálkahártyasejtekben. Az így létrejövő, nehezen meghatározható, genetikailag vagy epigenetikailag módosult

szöveti szerveződési terület, amelyen a prekursor elváltozások, a primer daganat, a daganatrecidíva vagy esetlegesen a szekunder primer daganat előfordulhat (7. ábra). Az elmélet kiválóan magyarázza ezen tumorok klinikai jellemzőit – gyors progresszió, magas recidívaarány, szekunder primer tumorok különösen gyakori előfordulása.

Az egyéni genetikai tulajdonságok által meghatározott, de morfosztatikus faktorként epigenetikai szinten is szerepet játszó miRNS-ek a nemzetközi irodalomban számos daganattípus molekuláris jellemzésében ígéretesnek bizonyultak [14, 15]. Kutatásunkban igyekeztünk ennek a laboratóriumi szempontból stabil és jól reprodukálhatóan kimutatható molekulának az előnyeit felhasználni, hogy a miRNS-kifejeződési eltérésekkel össze-



7. ábra | Cancer field modell

függést mutató cancer fieldet detektálhassuk és jellemezhessük.

A miRNS-kifejeződés mennyiségi különbségeit tekintve számos érdekes és jellegzetes eltérést tapasztaltunk a daganatok és az őket meghatározott távolságra körülvevő, fenotípusosan ép szövetek, illetve a két eltérő lokalizációban elhelyezkedő daganatok és peritumoralis szövetek szempontjából.

A vizsgálatunkban szereplő miRNS-ek karcinogenezisben betöltött szerepe korábban ismert volt számunkra, meso- és hypopharynxlaphám-daganatok előfordulásában játszott szerepüket azonban még nem írta le a szakirodalom.

A legmarkánsabbnak, szinte minden összehasonlításban statisztikai szempontból is szignifikánsnak bizonyult a *miR-21*. A korábbi tanulmányok a p53-sejtciklus szabályozásában bizonyították szerepüket szájjüregi lokalizációjú squamocellularis carcinómákban [16, 17, 18, 19, 20]. Vizsgálatunkban meso- és hypopharynxlokalizációjú daganatok esetén is szignifikánsan fokozott expressziót mutatott. Kifejeződése a mesopharynxdaganatokban a daganathoz közelebb fekvő ép szövetekben csökkent alacsonyabb értékre, míg a hypopharynxdaganatokban csupán a daganattól 3 cm-re levő szövetekben mutatott számottevő csökkenést. A logisztikus regressziós vizsgálat során a hypopharynxdaganatokban a *miR-21* értékei egyébként jelentősen magasabbnak is bizonyultak a mesopharynxdaganatokénál.

A *miR-34a* és *miR-143* tumorszuppresszor tulajdonságú miRNS-ek. Az eddigi kutatások a HPV-asszociált fej-nyak daganatokban csökkent kifejeződésüket azonosították. Gátolják a tumorproliferációban és daganatos neoangiogenezisben szerepet játszó fehérjéket és transzlációjukat [21, 22, 23, 24, 25]. Vizsgálatunkban szintén alacsony expresszió jellemezte ezeket a miRNS-eket. Mesopharynxdaganatok esetén a daganattól 2 és 3 cm-re találtuk meg ezen miRNS-eket, a hypopharynxban azonban a *miR-34a* már a daganattól 1 cm-re levő szövetekben is megjelent, így a kifejeződés eltűnése ezekben a daganatokban nagyon szorosan összefüggött a daganatos fenotípussal.

A *miR-146a* és *miR-148a* az NF κ B (nuclear factor-kappaB) antiapoptotikus jelátviteli folyamatokban központi szerepet játszó gén promoterspecifikus represszorainak hatékony gátlói [26, 27]. Szerepük a gyulladáso-

folyamatok és a karcinogenezis kapcsolódási pontjaiban jelentős. Vizsgálatunkban mindkét miRNS a hypopharynx daganataira volt jellemző. Kifejeződésük a daganatokra és peritumoralis szövetekre is jellegzetes volt, és szélesen a daganat körül megtalálható maradt.

A *miR-155* egy, már gégelaphám-carcinómában azonosított miRNS, amely a daganatinváziót segíti elő [28, 29]. Vizsgálatainkban a *miR-155* a tumoroknál jelentős kifejeződést mutatott, és még a daganatoktól 2 cm-es távolságra lévő szövetekben is megtalálható maradt.

A *miR-221* a daganatok rossz prognózisával és a tumorinvázió mértékével mutatott összefüggéseket [30, 31]. Vizsgálatunkban ez a miRNS kifejezetten a mesopharynxdaganatokra és peritumoralis szövetekre volt jellemző. A hypopharynxban nem volt kimutatható. Ennek oka – azon kívül, hogy a hypopharynxdaganatok esetén ez a marker nem jellegzetes – lehet az is, hogy a hypopharynxban esetleg eltérő nukleotid-sorrendű variáns érik ki, amelyet az általunk alkalmazott specifikus primer szekvenciák nem tudtak hatékonyan amplifikálni. Mivel a *miR-221* esetén találtuk a leghatározottabb eltérést a két daganattípus között, további vizsgálatainkkal ennek a különbségnek a tisztázására még feltétlenül figyelmet szentelünk.

A *miR-27a* egy, az irodalomban eddig még kevésbé vizsgált miRNS [32]. Vizsgálatunk során mesopharynx- és hypopharynxdaganatokban egyaránt nagyon hasonló viselkedést mutatott, mint a *miR-21*. A *miR-21*-gyel való szekvenciális hasonlóságai miatt valószínűleg az mRNS célmolekuláinak egy részét képes a *miR-27a* is gátolni.

A mesopharynx- és hypopharynxminták lokalizáció-specifikus összehasonlításában elsősorban a *miR-221* jelenléte, valamint a *miR-21*, 143 és 155-expresszió mennyiségi különbségei voltak megfigyelhetők. A *miR-21*, 143 és 155 marker magasabb kifejeződést mutatott a hypopharynxlaphám-daganatokban, míg a *miR-221* mesopharynxban volt szignifikánsan magasabb. Ennek magyarázatául az életmódbeli etiológiai faktorok magasabb dózisu jelenléte szolgálhat.

A miRNS-kifejeződés tekintetében számos jellegzetes sajátosságot észleltünk a daganatszövetek, valamint az eltérő távolságra fekvő ép szövetek szempontjából. A mesopharynx- és hypopharynxdaganatok esetén sok közös jellemzőt és eltéréseket is sikerült megfigyelniünk.

- [26] *Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., et al.*: A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2006, *103*(7), 2257–2261.
- [27] *Motsch, N., Pfuhl, T., Mrazek, J., et al.*: Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol.*, 2007, *4*(3), 131–137.
- [28] *Ramdas, L., Giri, U., Ashorn, C. L., et al.*: MiRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck*, 2009, *31*(5), 642–654.
- [29] *Liu, J., Mao, Q., Liu, Y., et al.*: Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. *Chin. J. Cancer Res.*, 2013, *25*(1), 46–54.
- [30] *Garofalo, M., Di Leva, G., Romano, G., et al.*: miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 down-regulation. *Cancer Cell*, 2009, *16*(6), 498–509.
- [31] *Wang, J., Liu, S., Sun, G. P., et al.*: Prognostic significance of microRNA-221/222 expression in cancers: evidence from 1,204 subjects. *Int. J. Biol. Markers*, 2014. Doi: 10.5301/ijbm.5000058.
- [32] *Gao, Y., Li, B. D., Liu, Y. G.*: Effect of miR27a on proliferation and invasion in colonic cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2013, *14*(8), 4675–4678.

(Orosz Éva dr.,
Pécs, Munkácsy M. u. 2., 7621
e-mail: ev.orosz@gmail.com)

Comparative miRNA Expression Profile Analysis of Squamous Cell Carcinoma and Peritumoral Mucosa from the Meso- and Hypopharynx

EVA OROSZ¹, KATALIN GOMBOS², TAMAS RIEDLING², PRISCILLA AFIKURUE², ISTVAN KISS³, JOZSEF PYTEL¹, IMRE GERLINGER¹ and ISTVAN SZANYI¹

¹PTE KK Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Pécs, Hungary;

²PTE ÁOK Department of Laboratory Medicine, Pécs, Hungary;

³PTE ÁOK Department of Public Health Medicine, Pécs, Hungary

Abstract. *Background/Aim: The role of microRNAs (miRNA) in carcinogenesis is related to their genome regulatory function. The aim of the present study was to identify and compare miRNA expression signatures of meso- and hypopharynx squamous cell cancers in consideration of the cancer field hypothesis. Patients and Methods: Thirteen snap-frozen biopsy series of tumors and peritumoral tissues from the meso- and hypopharynx were analyzed for miRNA expression with quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT PCR) method. Results: Significant miRNA expression change of miR-21, -27a, -34a, -143 and -146a was found in peritumoral tissues that was dependent from the tumor location and the distance from the primary tumor site. Conclusions: miRNA expression analysis was found to be appropriate for molecular segregation of tumor locations and peritumoral tissue segments, and appears to be a promising marker for cancer field characterization.*

In Europe, according to the age-standardized rates per 100,000 population, Hungary had the highest estimated incidence, mortality and prevalence from lip, oral cavity and pharyngeal cancers for both sexes. Based on the cancer registry held by the National Institute of Oncology, in 2010 and 2011 meso- and hypopharyngeal carcinomas counted more than 1,200 cases. The number of diagnosed mesopharyngeal carcinomas in our clinical site has doubled,

This article is freely accessible online.

Correspondence to: Dr. Eva Orosz, Munkácsy utca 2., 7632 Pécs, Hungary. Tel: +36 72507317, e-mail: ev.orosz@gmail.com

Key Words: Head and neck cancer, squamous cell carcinoma, tissue organization field theory, micro-RNA, epigenetics.

while hypopharyngeal carcinoma cases have tripled since 1983 (Figures 1 and 2). Incidence of meso- and hypopharyngeal carcinomas are constantly growing, while the rate of mortality is above 50% due to late-stage recognition. In our clinical practice, malignant cancers of the meso- and hypopharyngeal regions are most specific in the 55-60 age range population, although the appearance of the different pharyngeal carcinomas has been observed in a growing number at younger ages in the past few years. It is important to note that the cancers affecting only one region, having good operability options and a better prognosis are disappearing, while the ones involving more than one region, with aggressive spreading and progressive prognosis are becoming more frequent. Our goal was to find and study a molecular marker which could be used as a predictive and a prognostic tool to complete clinical diagnostics.

In recent years micro RNAs (miRNA) have been excessively studied. These small, 19-25 base pairs long RNAs are transcribed from an intra- or intergenic segment of DNA and are not translated into proteins. Matured miRNA binds to a ribonucleotid complex, called RISC (RNA induced silencing complex), and drives the regulation of mRNA translation, either by binding to the target mRNA's 3' UTR (untranslated region) segment, or to 5' UTR or just directly to the ORF (open reading frame). This way translation is blocked or endonucleases are activated causing the degradation of mRNA target (1, 2). Estimated 50-60% of the human genome is regulated by miRNAs. A specific mRNA can be regulated by multiple miRNAs, and a miRNA can modulate more than hundred mRNA's translation (1). This RNA interference mechanism establish precise modulation of gene expression, harmonic regulation of cellular functions as cell division, differentiation, apoptosis and intermediary metabolism (3). miRNAs can behave either as oncogenes (oncomirs) or tumor suppressors according to

which target mRNA is regulated by them (1). miRNAs can be detected from blood serum, saliva and other bodily fluids (4-9). Cell-free, matured miRNAs - because of their small size - can easily escape from endonuclease activity, this characteristic make them well reproducible and detectable in laboratory experiments (10).

Clinical management of HNSCC is complicated by high rate of local tumor recurrence or development of a second primary tumor. The development of a recurrent tumor is strongly supported by both the Somatic Mutation Theory and the Tissue Organization Field Theory. Peritumoral tissues which might appear normal on macroscopical and histopathological evaluation can show several genetic and epigenetic alterations: DNA mutations, chromosomal aberrations, genomic instability, changes in DNA methylation and miRNA dysregulation. Our aim was to analyze miRNA expression pattern changes of meso- and hypopharyngeal mucosal tissues surrounding the primary tumors within and beyond the margin of the surgical removal to be able to model the extension field of modified molecular regulatory around tumorous tissue organization (11, 12).

Patients and Methods

Sample collection. Samples of meso- and hypopharynx carcinomas were collected from patients diagnosed and operated on at the Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery of the Clinical Center at University of Pécs. All removed tissue blocks were verified by histopatological examination. During tissue sample collection we followed a standard mapping biopsy strategy and removed small fractions (approx. 0,5-1 mg) of mucosal tissues from the tumor edge (0), 1cm (1) and 2 cm (2) distance from the macroscopic tumor margin and from intact mucosal tissue being at least 3 cm (3) distance from the tumor margin. During the study 52 tissue samples, originating from 13 patients, were collected. Five patients suffered from hypo- and eight from mesopharynx carcinoma. On clinicopathological classification tumors were listed into TNM II, III and IV stage squamous cell carcinomas.

RNA isolation. Tissue samples from mapping biopsy were immediately snap-frozen to -80°C following collection until molecular laboratory processing. Sixty μg of tissue sample were homogenized in 150 μl lysis puffer (HighPure miRNA Isolation Kit, catalogue number: 05080576001, Roche, Mannheim, Germany) by using MagNa Lyzer Green Beads (Roche) ceramic beads tubes in MagNa Lyzer (Roche) shaking homogenizer. Total RNA was isolated with downstream application of the High Pure miRNA isolation kit (Roche), following the manufacturer's instructions. RNA quality was checked by nano-drop absorption photometry and only the RNA fractions with (260/280 nm $A>1,9$) were used for reverse transcription.

cDNA synthesis and RT PCR. Five $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of the RNA templates was used for cDNA synthesis with the Universal cDNA synthesis kit (Quiagen, Woburn, MA, USA), applying the random hexamer priming, included in the kit. cDNA samples were evaluated for miRNA expression in Roche LC480 system (Roche). For miRNA

expression analysis specific primers were chosen from the universal miCURY LNA primer set (Exiqon, Vedbaek, Denmark) according to: hsa-miR-21, -27a, -34a, -143, -146a, -148a, -155, -221. Universal miCURY LNA 5S rRNA and U6 snRNA were used as controls for relative quantification. PCR mastermix contained 2 μl specific primer mix, 8 μl cDNS-template and 10 μl LC480 SYBR Green I Master mix in a total volume of 20 μl . Amplification was carried out on a 8x12 plate according to the following design: 6 tumor specific miRNA and two internal controls, that were examined on ten nucleic acid samples with unknown concentrations, on one set of positive samples with known concentrations and against one set of negative controls.

Statistical analysis. Relative quantification results were calculated by Exor4.0 software of LC480 (Roche), using the $\Delta\Delta\text{-CP}$ method. Calculated relative quantification rates grouped according to tumor and peritumoral tissues were used for further statistical analysis by two tailed two sample T-test, as well as binary logistic regression-using the software SPSS 21.0.

Results

During miRNA expression analysis of meso- and hypopharyngeal mapping biopsies from tumor and peritumoral tissues, we found perceptible differences in characterizing the miRNA expression of mucosa surrounding the tumor tissue. Mucosal tissues located 1 cm away from surgical excision line show only a little difference in expression rate pattern from the tumor itself, while those at 2 and 3 cm away from the tumor differ prominently. The samples taken from 2 cm and 3 cm distance from the tumor center shared many similarities in miRNA expression patterns. In the different line segments of peritumoral mucosa specific miRNA expression pattern has been found. miR-21, -27a and -146a showed a decreasing relative expression rate scaling from the tumor tissues, where their expression is high, towards the peritumoral tissues where their expression is gradually lower according to the distance. miR-34a and -143 was found to have similar but inverse expression pattern being the lowest in the tumor and higher in the tumor surrounding tissues. We could not observe such expression changes according to miR-148a, -155 and 221 (Figure 3).

Analysing the miRNA expression reflected to the global expression measured, in cancer cells miR-21, miR-27a, miR-221 give nearly 50% of the cells' total miRNA expression. This number is barely 15% in cells localized in tissues, which can be found outermost from the tumor tissue. While miR-34a and miR-143 shows exactly the opposite, their expression rates are below 10% in tumor tissue, and growing up step by step to 40% as we are going further from the tumor. Mucosa being 1 cm far from surgical excision line shows little difference from the tumor itself in the expression rate referred on each other, while in the distances of 2 and 3 cm these rates differ prominently. Sample from 2 cm has in the miRNA expression

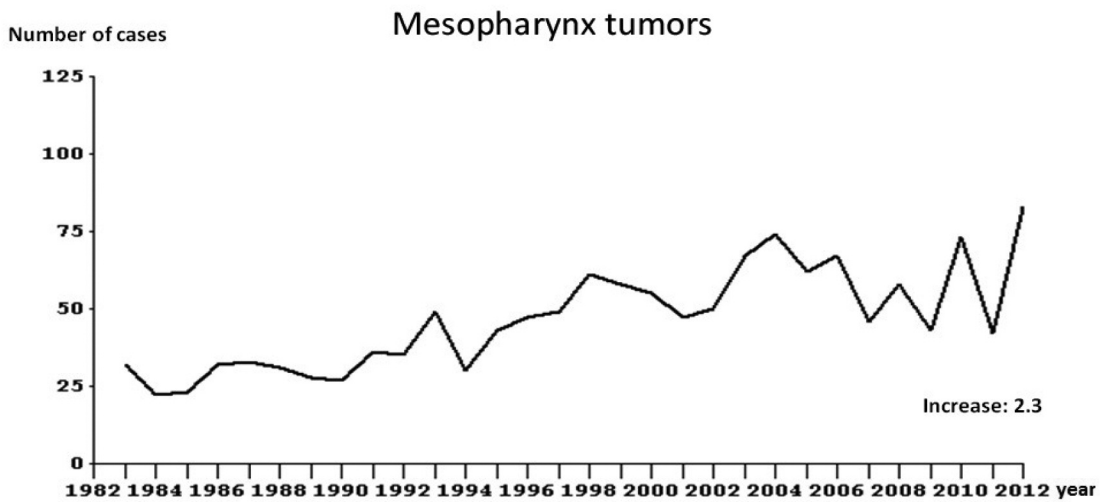


Figure 1. Number of malignant mesopharyngeal tumors in Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Pécs, Hungary between 1983-2012.

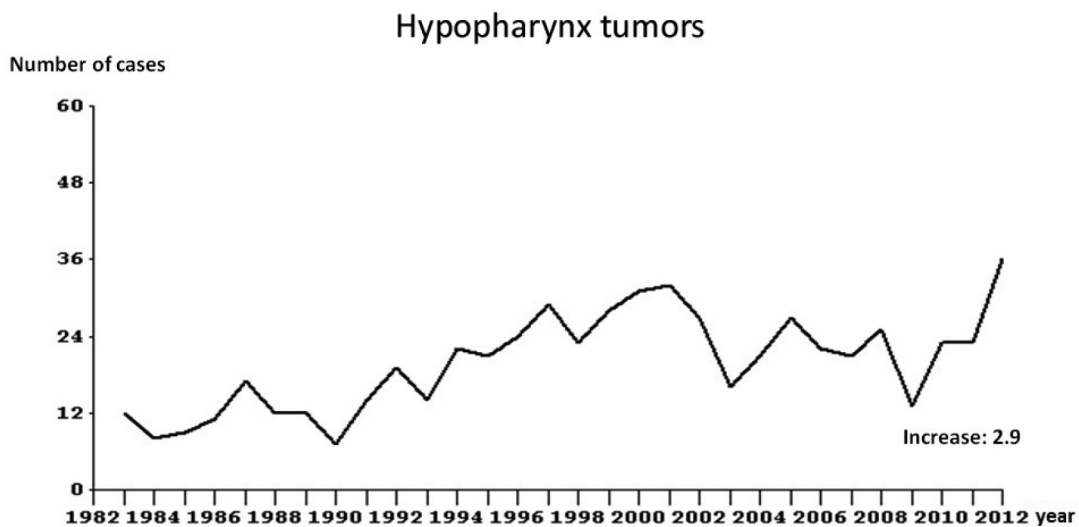


Figure 2. Number of malignant hypopharyngeal tumors in Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Pécs, Hungary between 1983-2012.

pattern similarities with intact mucosa in the distance of 3cm. Expression differences are the greatest between the intact mucosa from 3 cm and the tumor (Figure 4).

Tumor and peritumoral samples of meso- and hypopharynx location showed significantly different miRNA expression rates on binary logistic regression analysis according to miR-21, miR-143, miR-155 and miR-221. In samples from hypopharynx miR-21, 143 and 155 have shown significantly higher expression rates, while expression of miR-221 was detectable solely in samples collected from mesopharynx ($p < 0.05$).

Studying our tumor and peritumoral tissue samples - as in hypo- so in mesopharynx -, tumor and microscopically-intact tissue from 1 cm are both epigenetically highly similar (Figures 5 and 6).

Discussion

Carcinogenesis of oral, laryngeal, meso- and hypopharyngeal squamous cell carcinomas are often described by the cancer field or as we nowadays call it, tissue organization field theory (13-14). This theory states that; the- environmental

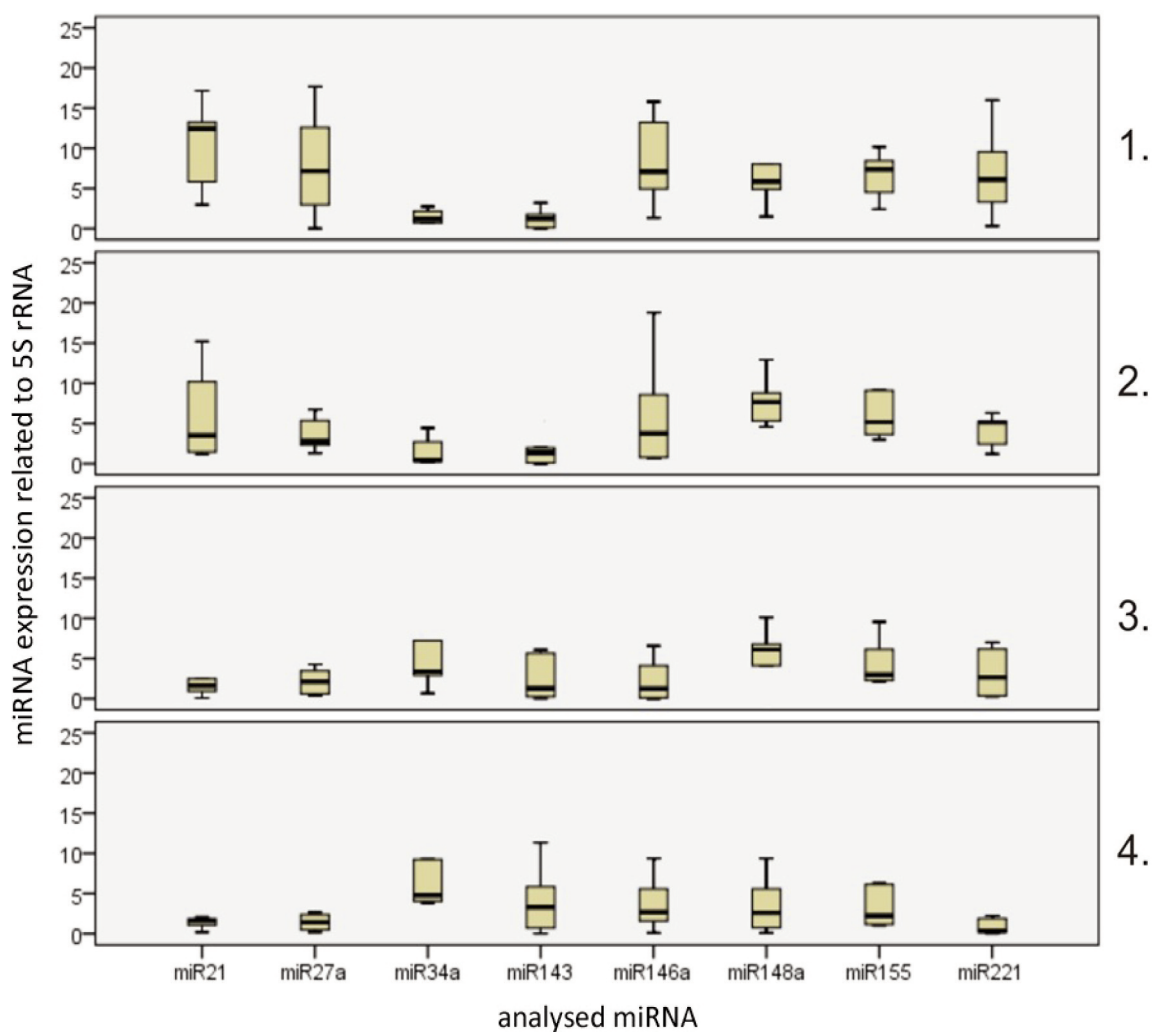


Figure 3. The standard mapping biopsy - 1: tumor biopsy, 2: 1 cm 3: 2 cm, 4: 3 cm distance from the macroscopic tumor margin in the normal mucosa.

factors that can initiate tumor development, and the factors, defining individual sensibility can make characteristic changes genomically in the phenotypically intact mucosa cells. Precursor lesions, primary tumors, recurrent tumors or even a second primary tumor can develop on this genetically or epigenetically changed tissue organization field (Figure 7). This theory can explain the clinical features of these tumors such as rapid progression, high recurrence rates, occurrence of second primary tumors at a notably high rate.

miRNAs are defined by individual genetics, but they also play an important role as morphostatic factors on epigenetic level and they have been proven to be promising in the molecular characterisation of numerous type of cancers (14-16). We found interesting and characteristic differences between miRNA expression rate changes in meso- and

hypopharyngeal tumors and peritumoral, macroscopically - intact tissues. We took the advantage of these stable and well reproducible molecules to identify and describe the cancer field, which clearly showed correlation to the changes in the miRNA expression patterns.

miR-21 was found to be statistically significantly elevated in all peritumoral tissues compared to 3cm distant mucosa. Previous studies have already proven the role of miR-21 in the modified regulation of p53 dependent apoptosis and cell cycle arrest in oral squamo-cellular carcinomas (17-22). In our study, miR-21 showed a significantly elevated expression rate in meso- and hypopharyngeal carcinomas. This expression rate was lowered in intact tissues around the mesopharyngeal carcinomas, while in hypopharyngeal carcinomas this rate was found to be significantly lower (3 cm) from the tumor

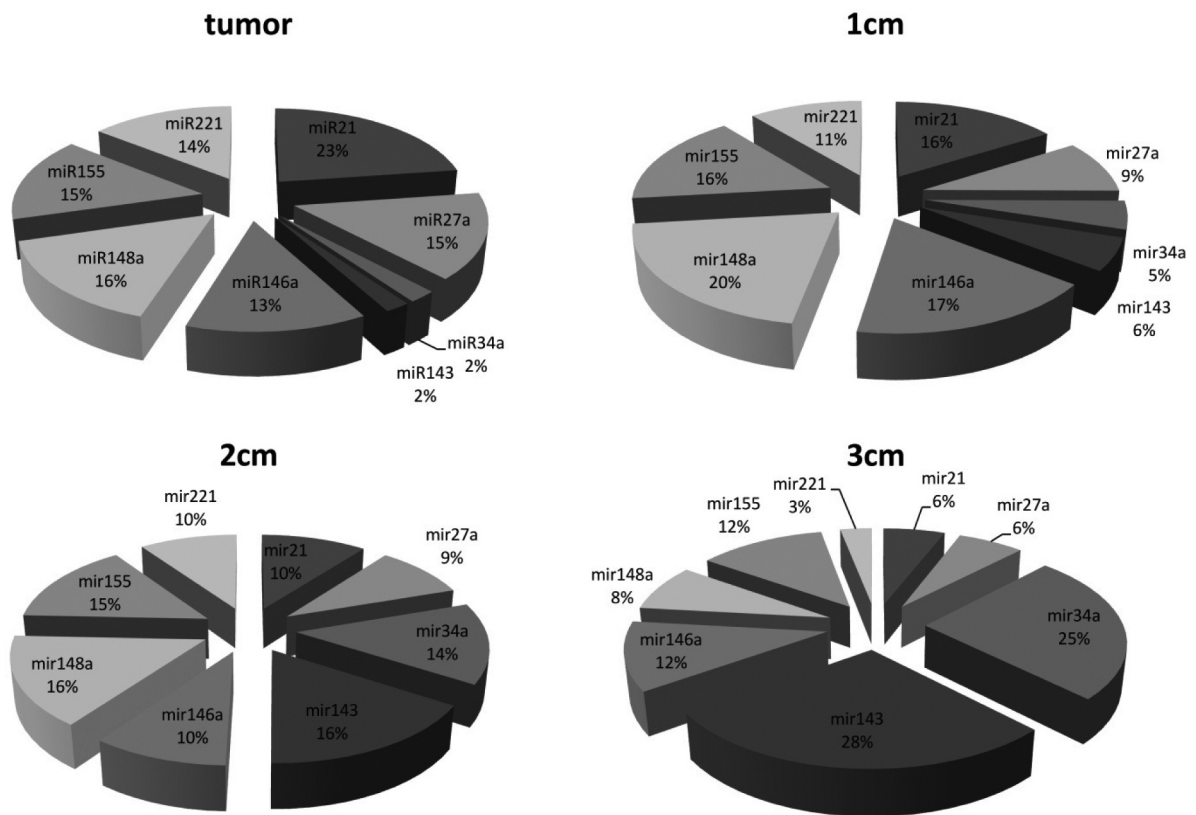


Figure 4. miRNA expression related to their global expression in the tumor and 1 cm, 2 cm, 3 cm distance from the tumor.

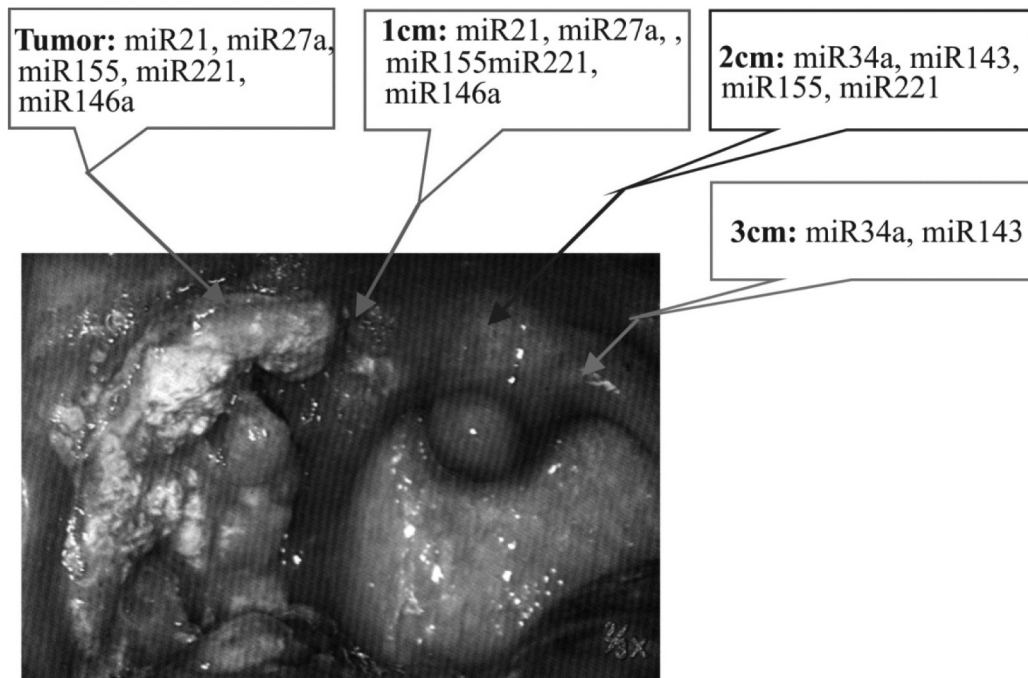


Figure 5. Mesopharyngeal carcinoma and peritumoral tissue (Photograph is published with the written permission of Orvosi Hetilap).

itself. Logistic regression analysis revealed that in hypopharyngeal carcinomas miR-21 expression rates were significantly higher than in mesopharyngeal carcinomas.

MiR-34a and miR-143 have been found to have tumor-suppressor activities. They can block those proteins and their translations, which play important roles in tumor cell proliferation and neoangiogenesis. Their lowered expression rates were identified in HPV associated head and neck cancers (23-28). In our study these miRNAs also showed lowered expression rates. In mesopharyngeal carcinomas these miRNAs were found 2 and 3 cm from the tumor, while in hypopharyngeal ones miR-34a could be detected in tissues just 1 cm from the tumor. The loss of miR-34a's expression rate in these tumors is strongly associated with the tumor phenotype.

miR-146a and miR-148a are effective blockers of promoter-specific repressors, that play a key role in NF- κ B (nuclear factor-kappa B) anti-apoptotic signaling pathway (29, 30). These miRNAs play an important role at those signaling points which are shared by both the inflammatory and carcinogenetic pathways. In our study we found both miRNAs' expression characteristic of hypopharyngeal carcinomas. These rates were also observed in the peritumoral tissues and even areas further way from the tumors.

MiR-155 has been identified in laryngeal squamous cell carcinomas and can be seen to promote tumor invasion (31-33). In our study miR-155 has shown significant expression rates in tumors, and could be also seen in tissues (2 cm) away from the tumor.

MiR-221 was seen in correlation to cancers with bad prognosis and the estimated stage of invasion (22, 34, 35). In our research we found that miR-221 was the characteristic miRNA in mesopharyngeal carcinomas and in their peritumoral tissues, this miRNA could not be detected in hypopharyngeal carcinomas. It is possible, that in the hypopharynx a variant miRNA with a different nucleotide sequence matures, which we were not able to efficiently amplify by our specific primer sequences. Our further studies will focus on this miRNA to throw more light on this difference.

miR-27a is one of the least studied miRNAs in the literature (36, 37). During our research we found that this miRNA showed very similar behavior both in meso- and hypopharyngeal carcinomas as miR-21.

The site specific comparison of meso- and hypopharyngeal samples mostly resulted in finding the presence of miR-221, and the differences between miR-21, -143, -155 expression rates. miR-21, -143 and -155 markers showed higher expression rates in hypopharyngeal squamous cell carcinomas, while the rate of miR-221 was significantly higher in mesopharyngeal ones. The difference in life style could be a possible explanation to this.

We observed that in miRNA expression rates, some characteristic patterns have been found to be common in tumor tissues, and in the intact mucosa at varying distances

from the tumor. We have also found identical profiles and some features which distinguish meso- and hypopharyngeal carcinomas on miRNA expression level. Analysis of miRNA expression signatures was an efficient method to segregate tumor locations and peritumoral tissues. miRNA profile analysis is a promising marker for cancer field characterization. Future application of the method could enable early detection of the disturbed epigenetic regulation in peritumoral tissue fields showing unchanged macroscopic appearance that can be helpful in molecular diagnostics, prognostics and cancer risk assessment (38).

Acknowledgements

This work was supported by: Research Found of Pécs University Faculty of Medicine KA-2016-19 and the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 'National Excellence Program'. Proposal number: A2-ACSJD-13-0349.

We would like to thank Tamas Toth for his assistance provided by the editing of the figures.

References

- Gócze K, Gombos K, Pajkos G, Magda I, Ember Á, Juhász K, Patezai B and Ember I: Impact of microRNAs on molecular epidemiology [Mikro-RNS-ek jelentősége a molekuláris epidemiológiában]. *Orv Hetil* 152: 633-641, 2011.
- Tömböl Zs, Szabó P, Rácz K, Tulassay Zs and Igaz P: Relevance of microRNA-s in neoplastic diseases [A mikro-RNS-ek jelentősége daganatos betegségekben]. *Orv Hetil* 148: 1135-1141, 2007.
- Wang M, Wang Q and Zhang B: Response of miRNAs and their targets to salt and drought stresses in cotton. *Gene* 530: 26-32, 2013.
- Chakraborty SK, Prakash A, Nechooshtan G, Hearn S and Gingeras TR: Extracellular vesicle-mediated transfer of processed and functional RNY5 RNA. *RNA* 21: 1966-79, 2015.
- Gombos K, Horváth R, Szele E, Juhász K, Gocze K, Somlai K, Pajkos G, Ember I and Olasz L: miRNA expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 33: 1511-1517, 2013.
- Zen K and Zhang CY: Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev* 32: 326-348, 2012.
- van Balkom BW, Eisele AS, Pegtel DM, Bervoets S and Verhaar MC: Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *J Extracell Vesicles* 4: 26760, 2015.
- Yeri A, Courtright A, Reiman R, Carlson E, Beecroft T, Janss A, Siniard A, Richholt R, Balak C, Rozowsky J, Kitchen R, Hutchins E, Winarta J, McCoy R, Anastasi M, Kim S, Huentelman M and Van Keuren-Jensen K: Total extracellular small RNA profiles from plasma, saliva, and urine of healthy subjects. *Sci Rep* 7: 44061, 2017.
- Fehlmann T, Ludwig N, Backes C, Meese E and Keller A: Distribution of microRNA biomarker candidates in solid tissues and body fluids. *RNA Biol* 13: 1084-1088, 2016.

- 10 Lawrie CH, Gal S, Dunlop H M, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS, Hatton CS and Harris AL: Detection of elevated levels of tumor-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 141: 672-675, 2008.
- 11 Braakhuis BJ, Brakenhoff RH and Leemans CR: Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention? *Oncologist* 10: 493-500, 2005.
- 12 Braakhuis BJ, Leemans Cr and Brakenhoff RH: A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 33: 317-322, 2004.
- 13 Cognetti DM, Weber RS and Lai SY: Head and neck cancer: an evolving treatment paradigm. *Cancer* 113: 1911-1932, 2008.
- 14 Iorio MV and Croce CM: microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 33: 1126-1133, 2012.
- 15 Mydlarz WK, Hennessey PT and Califano JA: Advances and perspectives in the molecular diagnosis of head and neck cancer. *Expert Opin Med Diagn* 4: 53-65, 2010.
- 16 Kaladhar B Reddy: MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int* 15: 38, 2015.
- 17 Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S and Mo YY: MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 18: 350-359, 2008.
- 18 Boldrup L, Coates PJ, Wahlgren M, Laurell G and Nylander K: Subsite-based alterations in miR-21, miR-125b, and miR-203 in squamous cell carcinoma of the oral cavity and correlation to important target proteins. *J Carcinog* 11: 18, 2012.
- 19 Zhang BG, Li JF, Yu BO, Zhu ZG, Liu BY and Yan M: microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN. *Oncol Rep* 27: 1019-1026, 2012.
- 20 Mydlarz W, Uemura M, Ahn S, Hennessey P, Chang S, Demokan S, Sun W, Shao C, Bishop J, Krosting J, Mambo E, Westra W, Ha P, Sidransky D and Califano J: Cluster in Is a Gene-Specific Target of microRNA-21 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 20: 868-877, 2014.
- 21 Akagi I, Miyashita M, Ishibashi O, Mishima T, Kikuchi K, Makino H, Nomura N, Hagiwara N, Uchida E and Takizawa T: Relationship between altered expression levels of MIR21, MIR143, MIR145, and MIR205 and clinicopathologic features of esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 24: 523-530, 2011.
- 22 Kan X, Sun Y, Lu J, Li M, Wang Y, Li Q, Liu Y, Liu M and Tian L: Coinhibition of miRNA21 and miRNA221 induces apoptosis by enhancing the p53mediated expression of proapoptotic miRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* 13: 4315-20, 2016.
- 23 Wald AI, Hoskins EE, Wells SI, Ferris RL and Khan SA: Human Papilloma virus alters microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell lines. *Head Neck* 33: 504-512, 2011.
- 24 Saintigny P, Zhang L, Fan YH, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou VA, Feng L, Lee JJ, Kim ES, Ki Hong W and Mao L: Gene expression profiling predicts the development of oral cancer. *Cancer Prev Res* 4: 218-229, 2011.
- 25 Li W, Ma H and Sun J: microRNA34a/c function as tumor suppressors in Hep2 laryngeal carcinoma cells and may reduce GALNT7 expression. *Mol Med Rep* 9: 1293-1298, 2014.
- 26 Zauli G, Voltan R, di Iasio MG, Bosco R, Melloni E, Sana ME and Secchiero P: miR-34a induces the downregulation of both E2F1 and B-Myb oncogenes in leukemic cells. *Clin Cancer Res* 17: 2712-2724, 2011.
- 27 Wu D, Huang P, Wang L, Zhou Y, Pan H and Qu P: MicroRNA-143 inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in prostate cancer. *Mol Med Rep* 8: 626-630, 2013.
- 28 Muñoz-Largacha JA, Gower AC, Sridhar P, Deshpande A, O'Hara CJ, Yamada E, Godfrey TE, Fernando HC and Litle VR: miRNA profiling of primary lung and head and neck squamous cell carcinomas: Addressing a diagnostic dilemma. *J Thorac Cardiovasc Surg* doi: 10.1016/j.jtcvs.2017.02.071, 2017. [Epub ahead of print]
- 29 Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC and Croce CM: A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci* 103: 2257-2261, 2006.
- 30 Motsch N, Pfuhl T, Mrazek J, Barth S and Grässer FA: Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol* 4: 131-137, 2007.
- 31 Ramdas L, Giri U, Ashorn C, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK and Story MD: miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck* 31: 642-654, 2009.
- 32 Jian-ling Wang, Xin Wang, Dong Yang and Wen-jie Shi: The Expression of MicroRNA-155 in Plasma and Tissue Is Matched in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Yonsei Med J* 57: 298-305, 2016.
- 33 Liu J, Mao Q, Liu Y, Hao X, Zhang S and Zhang J: Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. *Chin J Cancer Res* 25: 46-54, 2013.
- 34 Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankou A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P, Gasparini P, Gonelli A, Costinean S, Acunzo M, Condorelli G and Croce CM: miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumor igenicity through PTEN and TIMP3 down-regulation. *Cancer Cell* 16: 498-509, 2009.
- 35 Wang J, Liu S, Sun GP, Wang F, Zou YF, Jiao Y, Ning J and Xu J: Prognostic significance of microRNA-221/222 expression in cancers: evidence from 1,204 subjects. *Int J Biol Markers* 29: 129-141, 2014.
- 36 Gao Y, Li BD and Liu YG: Effect of miR27a on proliferation and invasion in colonic cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 4675-4678, 2013.
- 37 Liu W, Qian K, Wei X, Deng H, Zhao B, Chen Q, Zhang J and Liu H: miR27a promotes proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer by targeting FAM172A and acts as a diagnostic and prognostic biomarker. *Oncol Rep* 37: 3554-3564, 2017.
- 38 Baker SG: A cancer theory kerfuffle can lead to new lines of research. *J Natl Cancer Inst* 107: dju405, 2015.

Received April 25, 2017

Revised May 29, 2017

Accepted June 1, 2017

HPV-negatív és -pozitív mesopharynx tumorok mikro-RNS térképanalízise

Orosz Éva dr.¹, Gombos Katalin dr.², Petrevszky Nerina dr.¹, Kaszás Bálint dr.³, Kalács Krisztina dr.², Bodzai Gréta dr.¹, Gerlinger Imre dr.¹, Szanyi István dr.¹

¹PTE KK, FÜL-, ORR-, GÉGESZETI ÉS FEJ-, NYAKSEBÉSZETI KLINIKA, PÉCS

²PTE ÁOK, LABORATÓRIUMI MEDICINA INTÉZET, PÉCS

³PTE ÁOK, PATHOLOGIA INTÉZET, PÉCS

ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés: A fej-nyaki laphám daganatok jól jellemezhető a daganat (tumor) organizációs terület modellel. A mikro-RNS-ek stabil, jól reprodukálható molekulák, amelyek segítségével a cancer-field detektálható. Célunk azonos klinikai stádiumú HPV-pozitív és negatív mesopharynx daganatok mikro-RNS mintázatának elemzése volt.

Anyag és módszer: Vizsgálatunkban 25 mesopharynx lokalizációban diagnosztizált laphámsejtes karcinóma területéről vett szövetmintát dolgoztunk fel. Standard térképbioptizációs mintavételt alkalmaztunk (a daganattól és attól cm-ként távolodva). Mintáink a PTE KK Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinikán diagnosztizált, illetve operált betegektől származtak és vizsgálatuk a PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézetben történt. A HPV-pozitivitás kimutatását a mintákból p16 immunfestéssel végeztük, a pozitív eseteket Linear Array-módszerrel genotipizáltuk. A térképbioptizációs mintaanyagból a tumorban és attól adott távolságra eső szövetekből RNS-izolálást és reverz transzkripciót követően miR-21, miR-143, miR-155, miR-221 mennyiségi meghatározás történt QX200 Automata Digitális Droplet PCR-rendszerben. Eredményeink statisztikai értékelését SPSS 21.0 szoftver segítségével, Pearson-analízissel végeztük.

Eredmények: HPV-pozitivitás esetén emelkedett expressziós értékeket mutatott a miR-221, míg a HPV-negatív tumorokhoz képest a miR-21, miR-155 esetében szignifikánsan csökkent expressziós értékeket mértünk.

Megbeszélés: A HPV-negatív tumorokra jellemző az összetett expressziós mintázat, amely az összes vizsgált miRNS-molekula emelkedett értékeivel jellemezhető. Ezzel szemben a klinikailag mérsékeltebb agresszivitású, ám azonos klinikai stádiumban nagyobb tumorméretet elérő HPV-pozitív tumorok a miR-21 és miR-155 alacsonyabb mértékű kifejeződését mutatják. Helyette a sejtproliferációt serkentő miR-221 expresszió jellemző rájuk. Ezen vizsgálatok alkalmasak a tumor biológiai viselkedésének meghatározására, amelyek alátámasztják a klinikai prognózis becslését.

KULCSSZAVAK

CANCER FIELD, DIGITÁLIS DROPLET PCR, HPV, miRNS, OROPHARYNX

miRNA expression pattern differences of HPV negative and HPV positive advanced stage mesopharynx cancers

SUMMARY

Introduction: Head and neck squamous cell carcinomas are well characterized by the tissue organizational area model. Micro-RNAs are stable, well-reproducible molecules that can detect the cancer field. Our aim was to analyze and compare the miRNA expression profiles of HPV positive and negative tumors at similar clinical stage.

Methods: Using standard mapping biopsy (tumor tissue and macroscopically normal samples taken 1, 2 and 3 cm from tumor margin), samples were collected during surgical intervention from 25 mesopharynx tumors. After RNA isolation and reverse transcription, miR-21, miR-143, miR-155, miR-221 expressions were quantitatively determined in QX200 Automated Digital Droplet PCR system. Statistical evaluation of our results was performed using Pearson analysis on SPSS 21.0 software.

Results: In case of HPV positivity, tumors showed significantly elevated miR-221 expressions, while the amounts of miR-21 and miR-155 were significantly lower than those with HPV negative tumor samples.

Discussion: The expression patterns of HPV negative tumors involve elevated expressions of all investigated miRNAs. In contrast, clinically less aggressive, but more expansive HPV positive cancers in the similar clinical stage expressed miR-21 and miR-155 in lower quantities, while the levels of the proliferation inducing marker, miR-221, were outstandingly high. These studies are suitable for determining the biological behavior of tumors, which support the estimation of the clinical prognosis.

KEYWORDS

CANCER FIELD, DIGITAL DROPLET PCR, HPV, miRNA, OROPHARYNX

Levelezési cím:

Dr. Orosz Éva

7632 Pécs, Munkácsy Mihály utca 2.

E-mail: ev.orosz@gmail.com

Tel.: +36/20-466-3562

Bevezetés

A fej-nyaki daganatok kialakulásában a régóta ismert etiológiai tényezők, mint a kémiai karcinogének, a rossz szájhygiénia mellett a humán papillomavírus (HPV) is szerepet játszik (1). Férfiak körében szignifikánsabban magasabb a szájüregi HPV-pozitivitás, így a vírus indukálta oropharynx tumorok száma (2). A mesopharynxon belül a tonsilla palatina karcinómaiban a legmagasabb a HPV-pozitivitás, a többi alrégióhoz viszonyítva aránya a 70%-ot is elérheti (3). A tonsillaris predilekció hátterében a lacunák és crypták kiterjedt nyálkahártya felszíne, valamint a hám és az alatta lévő nyirokszövet szoros kapcsolata állhat (4).

Klinikai megfigyelések jelentős különbségeket mutatnak a HPV-indukált és a kémiai karcinogének okozta daganatok között. Onkológiai és sebészi terápiára jobban reagálnak, a prognózisuk kedvezőbb (2, 5, 6, 7, 8). Tekintettel a prognosztikai, viselkedés- és kialakulásbeli különbségekre 2017-ben a HPV-pozitív mesopharynx daganatok külön TNM-beosztást kaptak (9, 10).

Humán papillomavírus

A humán papillomavírus (HPV) a papovavírusok családjába tartozó, több mint 200 altípusú számláló vírus, örökítőanyaga cirkuláris kettős szálú DNS. A HPV-k a többrétegű hám bazális sejtjeit fertőzik, eszerint cutan, illetve mucosalis típust különböztetünk meg. A nyálkahártyát fertőző típusok között megkülönböztetünk alacsony és magas onkogén kockázatú típusokat (low risk és high risk). Az alacsony kockázatúak, mint a HPV 6, 8, 10, 11, 28, 42 csak epizomálisan vannak jelen, így benignus proliferációt okoznak, míg a high risk típusok, mint a HPV 16, 18, 31, 33, 35 integrálódnak a genomba (11), ezáltal invazív karcinómák kialakításában van szerepük. Gyakran látunk multiplex vírusfertőzéseket és ez arra enged következtetni, hogy a low és high risk típusok valószínűleg egymással interferálnak, a különböző genotípusok egymás fertőzőképességét befolyásolhatják. A vírusok a bazális hám sejtjeihez mikroszerűléseken keresztül jutnak el, itt megtörténik a korai gének (E6, E7 onkogének) expressziója (12). Az E6 gén által kódolt fehérje a p53 fehérjét, míg az E7 gén fehérjeje a retinoblastoma tumor szupresszor fehérjét inaktíválja, ezek következményeképpen gátolódik az apoptózis (13, 14).

Mikro-RNS

A mikro-RNS-ek (miRNS) kis, 19-25 bázispár hosszúságú szabályozó molekulák. Aszerint, hogy mely gént regulálják, a miRNS-ek viselkedhetnek onkogénként (onkomir), illetve tumorszupresszor miRNS-ként. Kis méretükből adódóan nagyon ellenállóak és stabilak az endonukleázokkal szemben, így laboratóriumi körülmények között jól reprodukálhatók. Eddig több mint 30 000 miRNS-t azonosítottak. Egy miRNS több messenger RNS translációját befolyásolhatja és egy mRNS-t (mRNS) több miRNS szabályozhat (15, 16). Így lehetővé válik a génexpresszió finom hangolása, a sejt életfolyamatainak – a differenciáció, a sejtosztódás, az apoptózis, az intermediér anyagcsere-folyamatok – harmonikus szabályozása (17). Mindebből következik, hogyha a sejtek életfolyamatainak bármely területén epigenetikai, illetve genetikai szintű változás következik be, a miRNS mintázata és mennyisége megváltozik. A miRNS-ek kifejeződése sejt- és szövetspecifikus, így a különböző szervek daganatai más miRNS-expressziót eredményeznek. Kutatásunk során a HPV-pozitív és negatív mesopharynx tumorok viselkedésbeli különbségeiből kiindulva vizsgáltuk a két csoport miRNS mintázatának eltéréseit.

Anyag és módszer

Munkánk során HPV-negatív és pozitív fej-nyak laphámkarcinómák miRNS-expressziós profiljait hasonlítottuk össze mesopharynx lokalizációkban. Vizsgálatunk 2017. november és 2018. április között történt a PTE KK Fül-, Orr-, Gégészeti-, és Fej-, Nyaksebészeti Klinikán, amely során 25 mesopharynx laphámkarcinómás beteg anyagát dolgoztuk fel.

Mintagyűjtés

A vizsgálatba a pácienseket a laphámsejtes karcinóma hisztopatológia jelenléte alapján választottuk be. Minden esetben klinikopatológiai staging vizsgálatot, HPV PI 6 immunhisztokémiát, HPV-genotipizálást és miRNS-expressziós elemzést végeztünk. Szigorú mintavételi stratégiát követtünk: a nem-nekrotikus daganatszövetből nyertük az első mintánkat, majd peritumorális makroszkóposan normál szövetszövetmintákat gyűjtöttünk 1 cm, 2 cm, illetve 3 cm-re a tumor makroszkópos szélétől. Az itt leírt vizsgálatokat a PTE Etikai Bizottságának döntése értelmében a 2014/5341-es engedélyszám alapján végeztük el. A szövetszövetmintákat az összegyűjtés után -80°C -on azonnal lefagyasztottuk és a laboratóriumi feldolgozásig tároltuk.

RNS izolálás és reverz transzkripció

60 μg friss fagyasztott szövetszövetmintából teljes szöveti RNS-t izoláltunk Aurum Total RNA mini kit (Cat. no. 7326820; Bio-Rad, Madison, USA) felhasználásával. Az izolált RNS minőségét Thermo Scientific NanoDropTM 2000 (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY) fotométer segítségével ellenőriztük. Minden mintából 5 ng teljes szöveti RNS-t irtunk át cDNS-re miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Kit (Cat. no. Qiagen) segítségével. Az izolált RNS minőséget a Thermo Scientific NanoDropTM 2000-rel vizsgáltuk (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY). Mindegyik mintából 5 ng teljes RNS-sel reverz transzkripciót végeztünk, a miRCURY LNA Univerzális RT microRNA PCR Kit-tel (Cat. No. Qiagen).

Droplet digital PCR-analízis

A kvantitatív PCR-analízis során Qiagen miRCURY LNA miRNA PCR-vizsgálatokat (Qiagen, Hilden, Dánia) a következő miRNS-célpontok szerint vásároltuk: hsa-miR-21-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-155, hsa-miR-221-5p. A master mixeket úgy készítettük elő, hogy tartalmazzanak 1 μl miRCURY LNA miRNS assayt, target-miRNS specifikus elpre és rezerv primer párokat, 12 μl QX200 ddPCR EvaGreen Supermixet (1864034, Bio-Rad) és 9 μl PCR minőségű víz és 2 μl (~ 100 pg) cDNS-mintát. A lemezen kb. 100 pg/ μl templátkoncentrációt használtunk. A negatív kontrollokhoz két külön mastermixet készítettünk, az egyik esetben a templát cDNS-t PCR minőségű vízzel helyettesítettük (no template control = NTC), a másik esetben a templát cDNS-t és a primert vízzel szubsztituáltuk (nincs primer kontroll = NTC + NPC). Minden egyes mastermix dropletet a QX200 automatizált ddPCR rendszer cseppképző egységében generáltunk, cseppgenerátor-olaj EvaGreen alkalmazásával (Bio-Rad). A PCR amplifikációt a QX200 Thermo cycleren hajtottuk végre, az alábbi termikus körülmények között (1 ciklus enzimaktiválás: 95°C 5 perc, 40 ciklus; amplifikáció 96°C 30 másodperc és $58-60^{\circ}\text{C}$ – primer függően 1 percig), jelstabilizálás 1 cikluson keresztül (4°C 5 percig és 90°C 5 percen keresztül) és 4°C -on A QX200 csepp-leolvasó PCR-reakciója után a cseppeket azonnal elemeztük. A fluoreszcencia adatokat a QuantaSoft® analízis Pro szoftver verzió 1.0.596 (Bio-Rad, CA, USA) által használt Poisson disztribúciós statisztikai analízis szerint koncentrációkra alakítottuk át.

HPV p16 immunhisztokémiai festés

A fej-nyaki HPV-indukált laphámsejtes karcinómákat p16 immunhisztokémiai módszerrel határoztuk meg, amely a patogenezis és prognózis összefüggésében fontos marker. A p16INK4a, amelynek kifejeződését a magas rizikójú HPV E7-protein által indukált pRb-degradáció jellemzi, olyan marker, amely képes jelezni a tumorokban a HPV-fertőzés onkogén expresszióját.

Összesen 25 esetet értékeltünk ki standard H&E festéssel és p16 immunhisztokémiával. Ezt követően egy CINtec p16INK4a detektáló rendszert használtunk (Ref.: 9511, Roche mtm labor. AG, Sandhofer Strasse, Mannheim, Németország). Az immunjelzést a gyártó protokollja alapján végeztük.

A p16 pozitív festést a daganatos sejtek legalább 70%-ában erős nukleáris és citoplazmatikus festés azonosítása alapján határoztuk meg. Negatívnak minősültek a nem festődő, a halvány nukleáris, citoplazmatikus festődésű minták, illetve, ha a tumormentes sejtek festődtek meg. A pozitív kontroll egy olyan cervicalis laphámsejtes karcinóma volt, amely a standard klinikai laboratóriumi eljárás részeként p16 pozitívnak bizonyult.

DNS-extrakció és HPV-genotipizálás

A teljes DNS-extrakcióhoz 60 µg frissen fagyasztott szövetmintát használtunk HighPure templát előkészítő készlet alkalmazásával (Cat. No. 11796828001, Roche, Molecular Diagnostics, Mannheim, Németország). A DNS koncentrációját és minőségét NanoDrop spektrofotometriával ellenőriztük.

Lineáris array HPV-genotípus-tesztet (Cat. No. 04391853190; Roche Molecular Diagnostics) alkalmaztunk annak meghatározására, hogy mely HPV-genotípusok vannak jelen a szövetmintákban. A vizsgálat 37 humán papillomavírus-genotípust észlel: a 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 és CP6108. (M. Poljak, B. Kocjan, A. Ostrbenk, K. Seme Commercially available molecular assays for human papillomavirus (HPV): 2015 update *J Clin Virol* 2016; 76(Suppl 1): S3–S9.) A lineáris array kvalitatív teszt, amely biotinilált primereket használ PGM09/PGMY11 és PC04/GH20 plazmidokra a HPV L1-gén és a humán béta-globin gén 450 bp és 268 bp méretű fragmenseinek egyidejű amplifikálásához. PCR-amplifikáció után a genotipizálás egy HPV-típusú és humán béta-globin-specifikus oligonukleotid próbával bevont egyetlen nylon szalag alkalmazásával történik. (M. Poljak, B. Kocjan Commercially available assays for alfa human papillomavirus multiplex kimutatására. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010 October 8; 10: 1139–1162. O.) A vizsgálatot a gyártó utasításainak megfelelően végeztük.

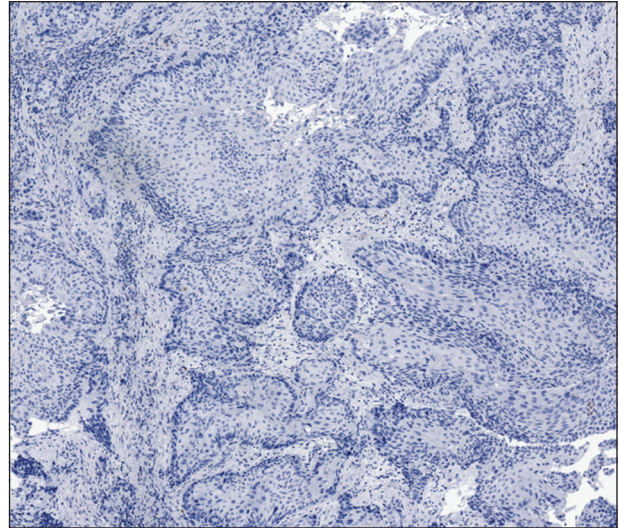
Statisztikai analízis

A QuantaSoft szoftverből származó koncentrációs adatokat exportáltuk és elemeztük. A szövetminták kórszöveti, kvantitatív különbségeit, a tumoroktól való távolságot és a HPV-státus elemzését az SPSS Statistics 21.0 Pearson-analízissel végeztük (0,887 p ≤ 0,19).

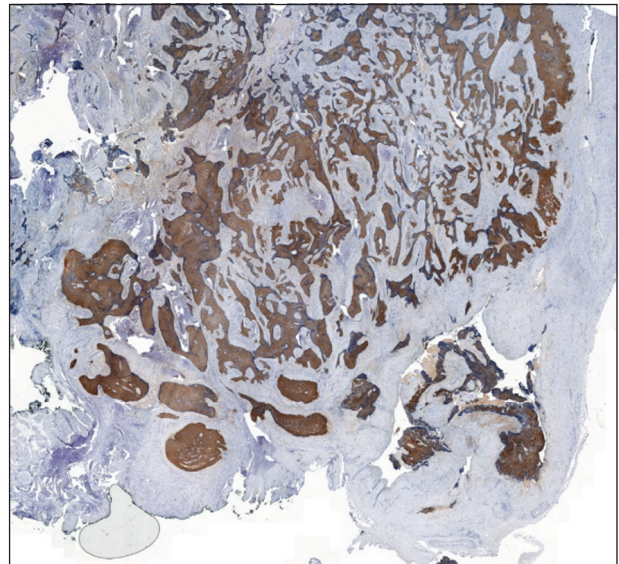
Eredmények

A betegek átlagéletkora 61,5 év volt. Vizsgálatunkban 5 nőbeteg szerepelt. A kiválasztott 25 beteget klinikopatológiailag III-as és IV-es stádiumba soroltuk az „8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer, American Joint Committee on Cancer (AJCC), 2017” alapján.

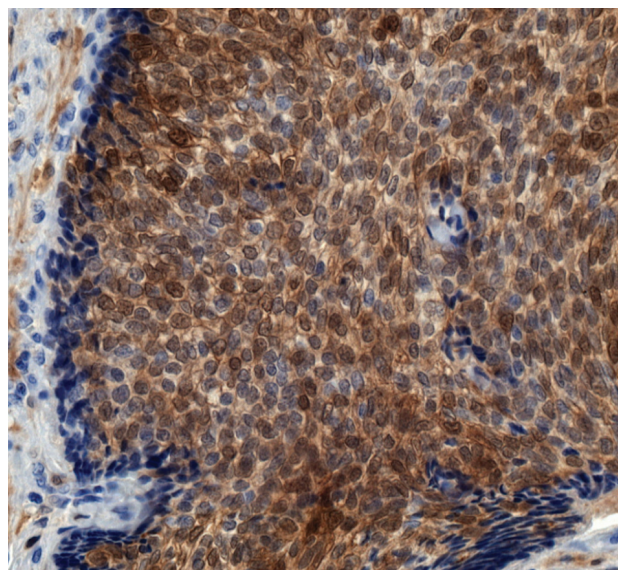
A 25 mesopharynx tumorból 7 bizonyult HPV-pozitívnak (28%) a p16 immunhisztokémiai festéssel (1–3. ábra). Genotipizálás



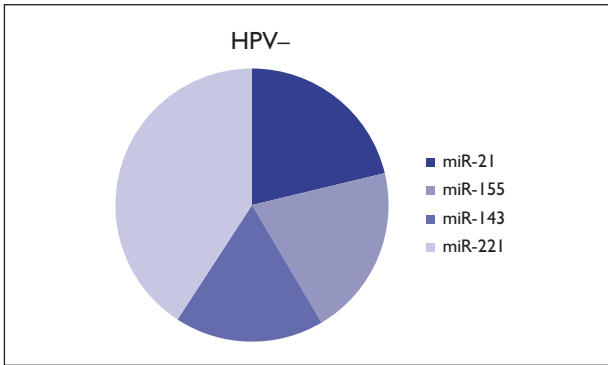
1. ábra: p16 negatív minta



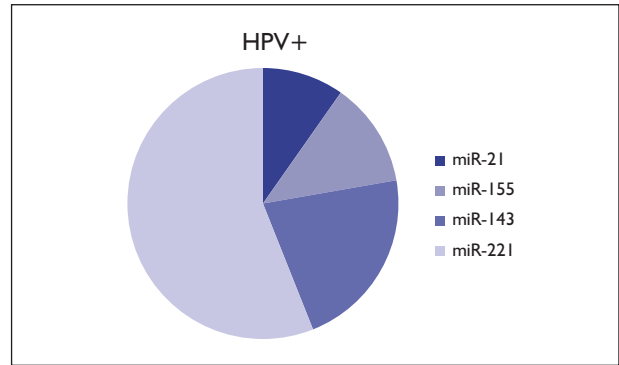
2. ábra: p16 pozitív minta



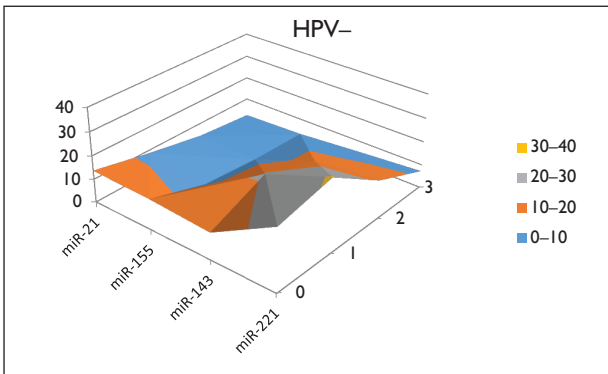
3. ábra: p16 pozitív minta



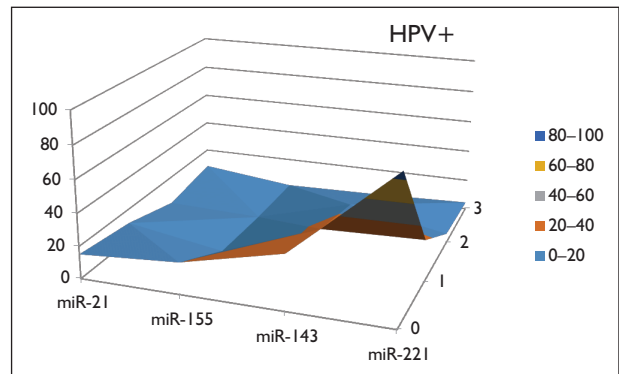
4. ábra: HPV-negatív mesopharynx tumor mikro-RNS mintázata egymáshoz viszonyított arányokban kifejezve



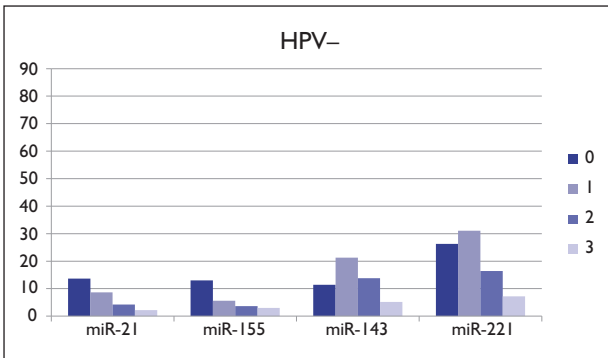
5. ábra: HPV-pozitív mesopharynx tumor mikro-RNS mintázata egymáshoz viszonyított arányokban kifejezve



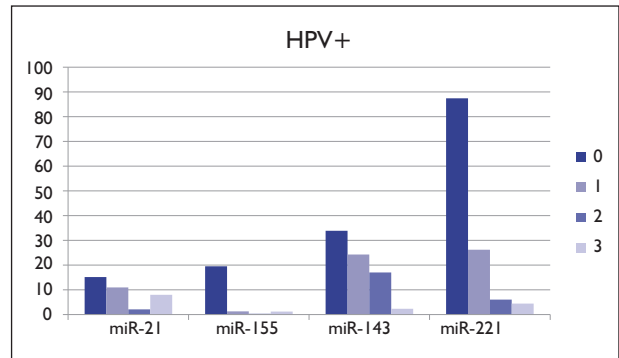
6. ábra: HPV-negatív mesopharynx tumorok és ép szövetek mikro-RNS-expresszió értékei a biopsziás távolságok függvényében. A biopsziás helyek: 0: tumor, 1: tumortól 1 cm-re, 2: 2 cm-re, 3: 3 cm-re



7. ábra: HPV-pozitív mesopharynx tumorok és ép szövetek mikro-RNS-expresszió értékei a biopsziás távolságok függvényében. A biopsziás helyek: 0: tumor, 1: tumortól 1 cm-re, 2: 2 cm-re, 3: 3 cm-re



8. ábra: HPV-negatív mesopharynx tumorok és ép szövetek mikro-RNS-expresszió értékei a biopsziás távolságok függvényében oszlopdiaqramon ábrázolva. A biopsziás helyek: 0: tumor, 1: tumortól 1 cm-re, 2: 2 cm-re, 3: 3 cm-re



9. ábra: HPV-pozitív mesopharynx tumorok és ép szövetek mikro-RNS-expresszió értékei a biopsziás távolságok függvényében oszlopdiaqramon ábrázolva. A biopsziás helyek: 0: tumor, 1: tumortól 1 cm-re, 2: 2 cm-re, 3: 3 cm-re

során hat esetben HPV16, egy esetben HPV16 és 52 pozitívást észleltünk.

A tumorok HPV-pozitivitásához kapcsolódóan egyetlen miRNS-markert nem lehet kapcsolni, vagyis a teljes miRNS-profil változását jelzi a HPV-pozitivitás jelenlétét. Szignifikáns különbséget találtunk a miR-21, -221 és -155 együttes elemzésekor (Pearson test statistic: 0,887 $p \leq 0,19$). A miRNS-ek egymáshoz viszonyított arányaiban a HPV-pozitív daganatok magasabb arányban

tartalmaznak miR-221-et és alacsonyabb arányban a miR-21-et és -155-öt (4-5. ábra).

A HPV-negatív daganatok esetén a tumor környezetében is emelkedett miRNS-expressziós értékek figyelhetők meg, a távoli (3 cm-es) ép szövetekben csökken jelentősen a malignitást jelző markerek mennyisége (6. ábra).

A HPV-pozitív tumorokban az expressziós értékek magasabbak, mint a HPV-negatív daganatok esetében, ám a tumorszél-

től cm-enként távolodva az ép szövetekben gyorsan csökken a malignitást, rossz prognózist jelző miRNS-ek expressziója, 2 és 3 cm-es távolságban nagyon alacsony kifejeződési értékek mérhetőek (7. ábra). A malignitást legerősebben jelző marker, a miR-21 a HPV-pozitív daganatban sem mutat olyan magas expressziót, mint a HPV-negatív tumor esetén, ezen daganatokat a miR-221 expressziója jellemzi (8–9. ábra).

Megbeszélés

A virális és kémiai karcinogenezis molekuláris útvonala eltérő, így a miRNS-profiljuk is különbségeket mutat (18). Oropharynx daganatok HPV genotipizálása során legnagyobb százalékban HPV16-ot mutattak ki, kisebb arányban HPV33, -35 volt jelen (19). Saját vizsgálati anyagunkban HPV16-os genotípus mellett egy esetben HPV52 jelenlétét igazoltuk. Bár a vizsgálati mintaszámunk erősen korlátozza az eredményeink régiókra történő interpretációját, ismert, hogy az egyes HPV-genotípusok földrajzi és populációs elterjedése eltéréseket mutathat.

A miR-21 szerepét korábbi tanulmányok szerint a p53 sejtciklus szabályozásában szerepet játszó gén mRNS-termékének fehérjetranszlációs gátlásában bizonyították melanoma malignumban és szájüregi laphámkarcinómákban (20, 21). Emelkedett expressziót mutat fej-nyak laphámkarcinómákban (22, 23), ezen belül larynx (24), pharynx, valamint nyelvtumorokban, azon belül is főként a metasztatizáló nyelv laphámtumorokban (25, 26). A miR-21 megemelkedett expressziója szoros összefüggést mutat az alacsony 5 éves túléléssel, a csekélyebb kemoirradiációra adott válasszal, így a jövőben fontos eszköze lehet a terápiás tervezésnek és prognózisbecslésnek (27). A miR-21 szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutatott a HPV-pozitív fej-nyaki daganatokban a HPV-negatívokkal szemben (28). Más tanulmány is a fentiakat támasztotta alá, kimutatták, hogy a HPV-negatív tumorokban a miR-21 emelkedett expressziója 41%, HPV-pozitív esetén csupán 28%-ban figyelték meg (29). Vizsgálatunk is alátámasztja a fenti adatokat, miszerint HPV-pozitív daganatban alacsonyabb a miR-21 expressziója.

A miR-155 humán T-sejtes leukémiában és gége laphámkarcinómában azonosított miRNS, amely a daganatinvázíót segíti elő a SOCS (suppressor of cytokine signaling proteins) fehérjecsald és a STAT (signal transducer and activator of transcription) transzkripció faktor gátlásával (30). Oropharynx tumorok esetében szoros összefüggésbe hozható a lokális recidíva kialakulásával (31), továbbá magas expressziót mutatott larynx tumorokban (32).

A tumor proliferációval, metasztázis-hajlammal, ezáltal a rossz prognózissal szintén korrelációt mutat (33, 34, 35). A HPV pozitív oropharynx tumorokban alacsonyabb expressziót mutat (36), ahogy jelen tanulmányunkban is.

A miR-143 tumor szuppresszor tulajdonságú miRNS, amelyet osteosarcomában, glioblastomában valamint HPV-asszociált fej-nyak daganatokban csökkent kifejeződéssel azonosítottak. Gátolja a tumorproliferációban és a daganatos neoangiogenezisben szerepet játszó E2F és survivin fehérjét és transzlációját (37). A jobb prognózissal van összefüggésben, ezért lehet magasabb az expressziójuk a HPV-pozitív oropharynx tumorokban (38). Kutatásunk során is emelkedett kifejeződését találtuk a HPV-pozitív daganatokban. Más tanulmányban a daganatos szövetekben alacsonyabb expresszióját mérték a kontroll ép szövetekkel összehasonlítva (39).

A miR-221 a daganatok rossz prognózissal és a tumorinvaszió mértékével mutatott összefüggéseket emlőkarcinómában és központi idegrendszeri glioma esetén (40). Gége laphám-

karcinómákban (41) és fej-nyaki laphámaganatokban is (42) emelkedett expresszióját írták le, míg a tumormentes szövetben alacsony expressziót mutatott. A HPV-pozitív oropharynx tumorokban is alacsonyabb expresszióját találták (43). Jelen vizsgálatunkban a HPV-pozitív daganatokban arányaiban magasabb miR-221 expressziós értékeket kaptunk, ennek magyarázatául az szolgálhat, hogy ezen tumorok mindegyike előrehaladott stádiumú volt.

Következtetések

Az alacsony HPV-pozitivitás és az alacsony összmintaszám ellenére szignifikáns különbségeket találtunk az általunk vizsgált HPV-pozitív és negatív csoport között a vizsgált miRNS-ek expressziójában. A mikro-RNS-ek alkalmas markerek a HPV-pozitív és negatív daganatok epigenetikai különbségeinek elemzésére. Összegzésként elmondhatjuk, hogy a HPV-pozitív tumorok eltérő mintázata magyarázat lehet a prognosztikai, viselkedésbeli különbségekre, miszerint a HPV-negatív daganatokkal szemben kevésbé malignus természetűek. A pontosabb epigenetikai eltérések feltérképezésére a jövőben további nagyobb esetszámon alapuló vizsgálatok szükségesek.

Irodalom

- Lacko M, Braakhuis BJ, Sturgis EM, Boedeker CC, Suárez C, Rinaldo A, et al. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014 May 1; 89(1): 38–48.
- Ducatman BS. The Role of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2018 Jun; 142(6): 715–718.
- Snijders P, Brule A, Meijer C, et al. HPV and cancer of the aerodigestive tract. *Papillomavirus Rep* 1995; 6: 157–162.
- Kreimer A, Clifford G, Boyle P, et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 467–75.
- Ahmadi N, Chan M, Huo YR, Sriharan N, Chin RY. Survival outcome of tonsillar squamous cell carcinoma (TSCC) in the context of human papillomavirus (HPV): A systematic review and meta-analysis. *Surgeon* 2018 May 26. pii: S1479–666X(18)30066-0.
- Kida K, Terada T, Uwa N, Omori Y, Fujii T, Tomita Y, et al. Between p16 Expression and Prognosis in Patients with Oropharyngeal Cancer Undergoing Surgery. *In Vivo* 2018 Jul-Aug; 32(4): 927–935.
- Hussein AA, Helder MN, de Visscher JG, Leemans CR, Braakhuis BJ, de Vet HCW, Forouzanfar T. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review. *Eur J Cancer* 2017 Sep; 82: 115–127.
- Lajer CB, von Buchwald C. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *APMIS* 2010 Jun; 118(6–7): 510–9.
- Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2017 Jul; 18(7): 40.
- O'Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, Lee N, et al. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol* 2016 Apr; 17(4): 440–451.
- Holmes A, Lameiras S, Jeannot E, Marie Y, Castera L, Sastre-Garau X, Nicolas A. Collection 2016. Mechanistic signatures of HPV insertions in cervical carcinomas. *NPJ Geno-m Med* 2016 Mar 16; 1: 16004.
- Yeo-Teh NSL, Ito Y, Jha S. High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. *Int J Mol Sci* 2018 Jun 8; 19(6). pii: E1706.
- Ajiro M, Sakai H, Onogi H, Yamamoto M, Sumi E, Sawada T, Nomura T, et al. CDK9 Inhibitor FIT-039 Suppresses Viral Oncogenes E6 and E7 and Has a Therapeutic Effect on HPV-Induced Neoplasia. *Clin Cancer Res* 2018 Sep 15; 24(18): 4518–4528.
- Rietbergen MM, Braakhuis BJ, Moukhtari N, Bloemena E, Brink A, Sie D, et al. No evidence for active human papillomavirus (HPV) in fields surrounding HPV-positive oropharyngeal tumors. *J Oral Pathol Med* 2014 Feb; 43(2): 137–42.
- Liu T, Xu Z, Ou D, Liu J, Zhang J. The miR-15a/16 gene cluster in human cancer: A systematic review. *J Cell Physiol* 2018 Sep 24.
- Dallaire A, Frédérick PM, Simard MJ. Somatic and Germline MicroRNAs Form Distinct Silencing Complexes to Regulate Their Target mRNAs Differently. *Dev Cell* 2018 Sep 20.

17. Håkansson KEJ, Sollie O, Simons KH, Quax PHA, Jensen J, Nossent AY. Circulating Small Non-coding RNAs as Biomarkers for Recovery After Exhaustive or Repetitive Exercise. *Front Physiol* 2018 Aug 22; 9: 1136.
18. Sannigrahi MK. Role of non-coding RNAs in head and neck squamous cell carcinoma: A narrative review *Oral Dis* 2017 Sep 21.
19. Bersani C, Mints M, Tertipis N, Haegglblom L, Näsman A, Romanitan M, et al. MicroRNA-155, -185 and -193b as biomarkers in human papillomavirus positive and negative tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma, *Oral Oncol* 2018 Jul; 82: 8–16.
20. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008 Mar; 18(3): 350–9.
21. Boldrup L, Coates PJ, Wahlgren M, Laurell G, Nylander K. Subsite-based alterations in miR-21, miR-125b, and miR-203 in squamous cell carcinoma of the oral cavity and correlation to important target proteins. *J Carcinog* 2012; 11: 18.
22. Lubov J, Maschietto M, Ibrahim I, Mlynarek A, Hier M, Kowalski LP et al. Meta-analysis of microRNAs expression in head and neck cancer: uncovering association with outcome and mechanisms *Oncotarget* 2017 Jul 13; 8(33): 55511–55524.
23. Lamperska KM, Kozłowski P, Kolenda T, Teresiak A, Blizniak R, Przybyla W, et al. Unpredictable changes of selected miRNA in expression profile of HNSCC. *Cancer Biomark* 2016; 16(1): 55–64.
24. 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; 35: 720–728.
25. Wang Y, Zhu Y, Lv P, Li L. The role of miR-21 in proliferation and invasion capacity of human tongue squamous cell carcinoma in vitro. *Int J Clin Exp Pathol* 2015 May 1; 8(5): 4555–63.
26. Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res* 2009 Jun 15; 15(12): 3998–4008.
27. Arantes LM, Laus AC, Melendez ME, de Carvalho AC, Sorroche BP, De Marchi PR, et al. MiR-21 as prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma patients undergoing an organ preservation protocol. *Oncotarget* 2017 Feb 7; 8(6): 9911–9921
28. Ko YH, Won HS, Sun DS, An HJ, Jeon EK, Kim MS, et al. Human papillomavirus-stratified analysis of the prognostic role of miR-21 in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Int* 2014 Oct; 64(10): 499–507.
29. Yan B, Li H, Yang X, Shao J, Jang M, Guan D et al. Unraveling regulatory programs for NF- κ B, p53 and microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2013 Sep 19; 8(9): e73656.
30. Ramdas L, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, et al. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck* 2009 May; 31(5): 642–54.
31. Hess AK, Mürer A, Mairinger FD, Weichert W, Stenzinger A, Hummel M, Budach V, et al. MiR-200b and miR-155 as predictive biomarkers for the efficacy of chemoradiation in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2017 May; 77: 3–12.
32. 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.
33. Baba O, Hasegawa S, Nagai H, Uchida F, Yamatoji M, Kanno NI, et al. MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis, *J Oral Pathol Med* 2016 Apr; 45(4): 248–55.
34. Jamal Z, Asl Aminabadi N, Attaran R, Pournagajaz F, Ghertasi Oskoui S, et al. MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2015 Apr; 51(4): 321–31.
35. Lerner C, Wemmert S, Bochen F, Kulas P, Linxweiler M, 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.
36. Wald AI, Hoskins EE, Wells SI, Ferris RL, Khan SA. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head Neck* 2011 Apr; 33(4): 504–12.
37. Saintigny P, Zhang L, Fan YH, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou VA, Feng L, et al. Gene expression profiling predicts the development of oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011 Feb; 4(2): 218–29.
38. 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 Jun 23; 12(6): e0179645.
39. Manikandan M, Deva Magendhra Rao AK, Arunkumar G, Rajkumar KS, Rajaraman R, Munirajan AK. Down Regulation of miR-34a and miR-143 May Indirectly Inhibit p53 in Oral Squamous Cell Carcinoma: a Pilot Study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(17): 7619–25.
40. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankea A, et al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell* 2009 Dec 8; 16(6): 498–509.
41. Hussein S, Mosaad H, Rashed HE. Up-regulated miR-221 expression as a molecular diagnostic marker in laryngeal squamous cell carcinoma and its correlation with Apaf-1 expression, *El-Anwar MW Cancer Biomark* 2017 Jul 4; 19(3): 279–287.
42. Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009 Apr 15; 15(8): 2850–5.
43. Abigail I. Wald BS, Elizabeth E. Hoskins, Susanne I. Wells, et al. Human papillomavirus alters microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell lines. *Head Neck* 2011 Apr; 33(4): 504–512.

OPEN

Visualization of mucosal field in HPV positive and negative oropharyngeal squamous cell carcinomas: combined genomic and radiology based 3D model

Eva Orosz^{1,7*}, Katalin Gombos^{2,7}, Nerina Petrevszky¹, David Csonka³, Istvan Haber³, Balint Kaszas⁴, Arnold Toth⁵, Krisztian Molnar⁵, Krisztina Kalacs², Zalan Piski¹, Imre Gerlinger¹, Andras Burian¹, Szabolcs Bellyei⁶ & Istvan Szanyi¹

The aim of this study was to visualize the tumor propagation and surrounding mucosal field in radiography-based 3D model for advanced stage HNSCC and combine it with HPV genotyping and miRNA expression characterization of the visualized area. 25 patients with T1-3 clinical stage HNSCC were enrolled in mapping biopsy sampling. Biopsy samples were evaluated for HPV positivity and miR-21-5p, miR-143, miR-155, miR-221-5p expression in Digital Droplet PCR system. Significant miRNA expression differences of HPV positive tumor tissue biopsies were found for miR-21-5p, miR-143 and miR-221-5p compared to the HPV negative tumor biopsy series. Peritumoral mucosa showed patchy pattern alterations of miR-21-5p and miR-155 in HPV positive cases, while gradual change of miR-21-5p and miR-221-5p was seen in HPV negative tumors. In our study we found differences of the miRNA expression patterns among the HPV positive and negative tumorous tissues as well as the surrounding mucosal fields. The CT based 3D models of the cancer field and surrounding mucosal surface can be utilized to improve proper preoperative planning. Complex evaluation of HNSCC tissue organization field can elucidate the clinical and molecular differentiation of HPV positive and negative cases, and enhance effective organ saving therapeutic strategies.

In addition to the widely-known etiological factors including various chemical carcinogens and poor oral hygiene, the human papilloma viruses (HPV) are major risk factors in the development of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC)¹. Oral HPV positivity and the number of viral-induced oropharyngeal tumors have significantly higher frequency in males². In the oropharyngeal region the highest HPV positivity can be detected in the palatine tonsils. The HPV positivity ratio of these tumors can amount to 70% compared to the other sub regions³. The mucosal surface of lacunas and crypts constitute a strong conjunction between the epithelial mucosa and the lymphatic tissue underneath and is often revealed in the background of tonsillar predilection of HPV initiated carcinogenesis⁴. Clinical investigations have shown remarkable differences between tumors induced by HPV and chemical carcinogenesis: HPV induced tumors particularly emerge at younger ages, and in many cases, the first clinical sign of the malignancy is the lymph node metastasis. The size of primary tumor is frequently small and thereby, it is difficult to explore in the early stage, however, later it often increases in tumor size compared with those HPV negative tumors in the same stage. HPV positive cancers respond much better to oncological and surgical therapy, thus prognosis is generally, far more favorable⁵⁻⁸. Considering the differences from aspects of prognosis, behavior and development, a separate TNM classification was released in 2017 for HPV positive oropharyngeal tumors^{9,10}.

¹University of Pécs, Medical School, Department of Otorhinolaryngology, Pécs, Hungary. ²University of Pécs, Medical School, Department of Laboratory Medicine, Pécs, Hungary. ³University of Pécs, Faculty of Engineering and Information Technology, Pécs, Hungary. ⁴University of Pécs, Medical School, Department of Pathology, Pécs, Hungary. ⁵University of Pécs, Medical School, Department of Radiology, Pécs, Hungary. ⁶University of Pécs, Medical School, Department of Oncotherapy, Pécs, Hungary. ⁷These authors contributed equally: Eva Orosz and Katalin Gombos. *email: ev.orosz@gmail.com

Human Papilloma Virus

HPV belongs to the family of *Papillomaviridae* and the HPV Reference Center has classified more than 120 types (Papillomavirus Episteme – NIH). The viral genome in this family is a circular, double-stranded DNA (deoxyribonucleic acid). Regarding the most conserve sequence of the viral genome, which is the L1 open reading frame (ORF) region, the HPV types belong to seven taxonomical genera (alpha-, beta-, gamma-, mupa- and nupa- eta- and thetapapillomaviridae). Protein products translated from L1 and L2 ORFs constitute the viral capsid, while E6 and E7 ORFs encode oncoproteins that modulate the viral transformation process. HPV infects the basal cells of the multilayer epithelium. The modification of the epithelial cell differentiation, through regulation of the cell cycle, results in the generation of the continuous reactivation of DNA replication and leads to the replication of the genome of the HPV virus^{11–14}. Cutaneous and mucosal invasive types of the HPV can be distinguished, accordingly. Based on oncological risk groups mucosal types can be assigned according to low, intermediate and high risk HPV. The identification of multiple viral infections is frequently observed and the resulting virulence might be influenced by the different genotypes. However interference between different HPV types and the impact on their virulence are events that have not been demonstrated yet. Due to the fact, that clinical observations about the behavior of the HPV positive oropharyngeal cancer differ so much from HPV negative HNSCC, a new TNM classification was needed to be introduced with a specific staging guideline. This statement is underlined by the The Cancer Genome Atlas (TCGA) publication on comparative molecular characteristics of the HPV positive and negative HNSCCs. The difference between the HPV associated and non-viral groups was clearly confirmed¹⁵. The TCGA study was not able to determine sufficient number of oncogenic mutation HNSCC that can drive the mechanisms of carcinogenesis; beside of this fact many epigenetical alterations were proved to characterize this cancer type. Linking to this concept, a recent publication of Masuda *et al.* stated that HNSCC is strongly linked to changes in epigenetic regulatory¹⁶. miRNAs as translator molecules between the environmental exposures and genomic regulation might reflect the carcinogenic process through their expression profile changes.

Cancer Field

Chemical and viral carcinogens constitute a genetically and epigenetically modified field in the intact cells of the mucosal surface as the first step of carcinogenesis. The expression, “cancer field“ or “tissue organization field“ is described in the literature. Later, followed by precursor changes, a primary tumor, and recurrence of a tumor or a second primary tumor can develop within this field. The behavior of the oral cavity, oropharyngeal, hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma can be represented via this model of tumor development^{17,18}.

Micro-RNA

micro RNAs (miRNA) are small, 19–25 mer regulator molecules. Interestingly, miRNAs can behave either as oncogenes (oncomirs) or tumor suppressors according to which target mRNA they regulate^{19,20}. The comparison of cancer and healthy cells originating from the same tissue presents differences in the expression patterns of miRNA. The analysis of the miRNA expression profile proved to be an appropriate method towards differentiating between normal and tumorous tissues, and selecting subgroups specifically in relation to tissue regarding several tumorous diseases²¹. Previous reviews have observed a discrepancy of miRNA findings across studies focusing on cancers of the head and neck, and there has been no consensus on specific miRNAs that are associated to HPV positivity and HNSCC.

In our study, we aimed to analyze the miRNA profile of oropharyngeal squamous cell carcinomas through a cancer field model in tumors and surrounding healthy tissues. We collected mapping biopsy series of tissue samples from the tumors and from the peritumoral mucosa 1–2–3 cm away from the macroscopic tumor margin. We also aimed to visualize the mucosal field and the tumor propagation in 3D model based on radiography and to combine it with clinical and genomic results. In our experimental design we selected a set of miRNA targets-miR-21-5p, miR-143, miR-155, miR-221-5p- which satisfy the causality criteria for carcinogenesis in HNSCC. Considering the behavioral differences of HPV positive and negative oropharyngeal tumors, we investigated the miRNA pattern alterations among the two groups with highly quantitative droplet digital PCR technique.

Materials and Methods

Sample collection. Tissue samples (10–60 mg) were collected from patients undergoing surgical intervention and treatment at the Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Clinical Center, University of Pécs. During our study period between 2017 and 2018, 48 patients were diagnosed and received multimodal therapy for oropharynx, hypopharynx and larynx HNSCCs. From this patient cohort 25 patients were selected for miRNA analysis based upon the presence of stage T2–3 squamous cell carcinoma of the oropharynx. Tumor classification and clinicopathological evaluation were carried out by a pathology expert according to the “8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer, American Joint Committee on Cancer (AJCC), 2017”. Clinicopathological staging, HPV P16 immunohistochemistry and HPV genotyping were performed in all HNSCC cases. Our sample collection strategy followed a strict scheme towards effectively mapping the biopsy originating from the cancer area. We obtained our first sample from the non-necrotic tumor tissue, and next, we collected peritumoral macroscopically normal tissue samples at 1 cm, 2 cm and 3 cm distance from the edge or perimeter of the tumor. Following collection, tissue samples were snap frozen at –80 °C and stored until processing. The clinical and experimental study protocol described here was performed under the license number 2014/5341 (University of Pécs, regional ethical committee). The methods were carried out in accordance with the relevant guidelines and regulations. Informed consent was obtained from all participants who were enrolled in this study.

RNA isolation and reverse transcription. Cell free total RNA was isolated from 60 µg fresh frozen tissue samples using the Aurum Total RNA mini kit (Cat. no. 7326820; Bio-Rad, Madison, USA). Isolated RNA quality

was checked using the Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY). 5 ng total RNA from each sample was reverse transcribed using the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Kit (Cat. no. 339340; Qiagen).

Droplet digital PCR analysis. Regarding quantitative PCR analysis, we procured the Qiagen miRCURY LNA miRNA PCR assays (Cat. no. Qiagen, Hilden, Denmark), in accordance with the following miRNA targets: hsa-miR-21-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-155 and hsa-miR-221-5p. Master mixes were prepared to include 1 µl of miRCURY LNA miRNA assay containing the target-miRNA specific forward and reverse primer pair, 12 µl of QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (cat. no. 1864034; Bio-Rad) and 9 µl PCR grade water and 2 µl (~100 pg) of cDNA sample. Application onto the plate was performed using approximately 100 pg/µl template concentration. Regarding the negative controls, we prepared a master mix, in which the template cDNA was substituted with PCR grade water (no template control = NTC) and a master mix, in which the template cDNA and primer were both substituted with water (no primer control = NTC + NPC). From each master mix, droplets were generated in the automated droplet generator unit of the QX200 automated ddPCR system using Droplet Generation Oil for EvaGreen (Bio-Rad). PCR amplification was carried out in the QX200 Thermo cycler with the following thermic conditions (enzyme activation 1 cycle: 95 °C for 5 min; amplification 40 cycles {96 °C for 30 s and 58–60 °C -primer dependently-for 1 min}, signal stabilization 1 cycle {4 °C for 5 min and 90 °C for 5 min} and hold on, 4 °C. Droplets were immediately analyzed following the PCR reaction in the QX200 Droplet Reader. Fluorescence data were converted into concentrations according to the Poisson distribution statistical analysis used by the QuantaSoft® Analysis Pro software, version 1.0.596 (Bio-Rad, CA, USA).

HPV P16 Immunohistochemical staining. At present, HPV association of head and neck SCC is determined using p16 immunohistochemistry, and it is widely considered as an important marker with respect to pathogenesis and prognosis²². Furthermore, the recently published the 8th edition of TNM-staging handbook also acknowledged the relevance of differentiating HPV and non-HPV related cases²³.

Some consider p16^{INK4a}, the expression of which is thought to be up-regulated due to pRb degradation induced by high-risk HPV E7 protein, a marker which is able to identify tumors with relevant viral oncogene expression^{24,25}.

All HNSCC cases were evaluated based on FFPE tissue samples using the standard H&E staining and p16 immunohistochemistry. Regarding the later model, we used the CINtec p16^{INK4a} Detection System (Ref: 9511, Roche mtm laboratories AG, Sandhofer Strasse, Mannheim, Germany). The immunostaining was performed according to the recommended manufacturer's protocol.

Additionally, the p16 positive staining was concluded based on the identification of strong nuclear and cytoplasmic staining in at least 70% of malignant cells. No staining, faint nuclear and cytoplasmic staining with background marking, small foci of staining or staining in non-malignant cells were considered negative results. The positive control was a cervical squamous cell carcinoma previously proven to be p16 positive, as part of the standard clinical laboratory procedure.

DNA extraction and HPV genotyping. 60 µg of fresh frozen tumor tissue sample was used for the total DNA extraction using the HighPure template preparation kit (Cat. no. 11796828001; Roche, Molecular Diagnostics, Mannheim, Germany). DNA concentration and quality was examined using NanoDrop spectrophotometry.

Linear array HPV genotyping test (Cat. no. 04391853 190; Roche Molecular Diagnostics) was used to determine specifically, which HPV genotypes were present in the tissue samples. The test detects 37 human papillomavirus genotypes: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39, and CP6108²³.

The Linear Array is a qualitative test which uses biotinylated primers sets PGM09/PGMY11 and PC04/GH20 for simultaneous amplification of a 450 bp and 268 bp fragments of the HPV L1 gene and human beta-globin gene, respectively. Following PCR amplification, genotyping is performed using a single nylon strip coated with HPV type-specific and human beta-globin-specific oligonucleotide probes²⁶. Testing was performed in accordance with the recommended manufacturer's instructions.

Statistical analysis. Concentration data acquired from QuantaSoft software (BioRad) were next exported and analyzed for quantitative differences between the tissue samples according to histopathology, distance from the tumor, and, the location and HPV status were analyzed using IBM SPSS Statistics 21.0 for ANOVA with statistical significance level $p \leq 0.05$.

Image reconstruction for illustration of sample collection sites. CT DICOM data including arterial and venous phase contrast-enhanced high resolution series (slice thickness = 0.75 mm, matrix = 512 × 512, pixel size = 0.445 mm) of the patient above were converted to nifti format using MRIConvert 2.1.0 (Lewis Center for Neuroimaging, University of Oregon, USA) and loaded in 3DSlicer 4.1^{27,28}. Based on contrast enhancement, anatomy and asymmetry, tumor mass was delineated in axial plane slices by a radiologist using 3DSlicer segment editor draw tool. Tumor contours were revised and modified if necessary by a board-certified neuroradiologist with over 10 years of clinical experience.

Using the segment editor module of 3DSlicer 4.1 software 3D segmentation of the tumor was created according to the delineation. Using the same module, the 3D segmentation of the air inside the pharynx was created as well. Using the margin and hollow tools a 1 mm thick boundary was created from the segmentation of the air in order to model the mucous membrane. Using the margin tool on the 3D segmentation of the tumor 10 mm,

Characteristics		HPV negative (n = 17)	HPV positive (n = 8)	Total (n = 25)
		N (%)	N (%)	N (%)
Gender	Male	13 (52%)	6 (75%)	19 (76%)
	Female	4 (23.5%)	2 (25%)	6 (24%)
Age	0–45	—	1 (12.5%)	1 (4%)
	45–64	11 (64.7%)	5 (62.5%)	16 (64%)
	65+	6 (24%)	2 (25%)	8 (32%)
Tumor Location	Tonsil	2 (11.8%)	1 (12.5%)	3 (12%)
	Base of tongue	6 (24%)	5 (62.5%)	11 (44%)
	Oropharyngeal wall	2 (11.8%)	—	2 (8%)
	Glossotonsillar sulcus	7 (41.2%)	2 (25%)	9 (36%)
Clinical T stage	1	—	—	—
	2	7 (41.2%)	5 (62.5%)	12 (48%)
	3	10 (58.8%)	3 (37.5%)	13 (52%)
	4	—	—	—
Clinical N stage	0	3 (17.6%)	—	3 (12%)
	1	6 (35.2%)	3 (37.5%)	9 (36%)
	2	8 (47.1%)	5 (62.5%)	13 (52%)
	3	—	—	—
Overall stage	I	—	—	—
	II	3 (17.6%)	4 (50%)	7 (28%)
	III	6 (35.2%)	4 (50%)	10 (40%)
	IV	8 (47.1%)	—	8 (32%)
Risk group	Alcohol	13 (76.5%)	—	13 (52%)
	Smoking	13 (76.5%)	3 (37.5%)	16 (64%)

Table 1. Demographical and clinical parameters of the selected tumors.

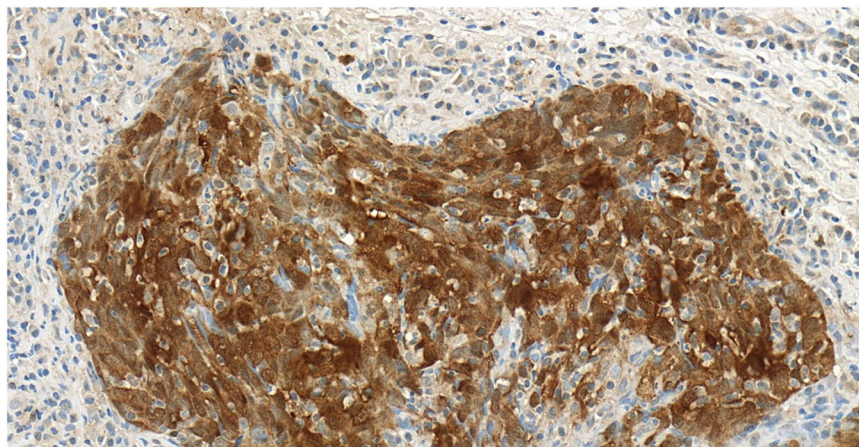


Figure 1. Squamous cell epithelium negative for p16 immunohistochemical staining at 40x magnification. Histological section originates from a grade 2 oropharyngeal wall squamous cell carcinoma.

20 mm and 30 mm offset volumes were created according to the sample collection site distances. Using a logical operator tool, intersections were created using the segmentations of the mucous membrane and the offset volumes applied to the tumor.

Results

miRNA profile analysis associated with HPV positivity. In the study period our clinical site diagnosed 48 patients with HNSCC 34 men and 14 women. After clinicopathological classification of the tumors we enrolled to this study only the patients with stage T2-3 HNSCCs with oropharyngeal location, based on the “8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer, American Joint Committee on Cancer (AJCC), 2017” (Table 1.)

Out of the 25 mesopharyngeal tumors, eight cases proved to be HPV positive (28%) with p16 immunohistochemical staining (Figs. 1,2). Genotyping found seven cases of HPV 16 positivity and one case with combined positivity of HPV 16 and 52 genotypes.

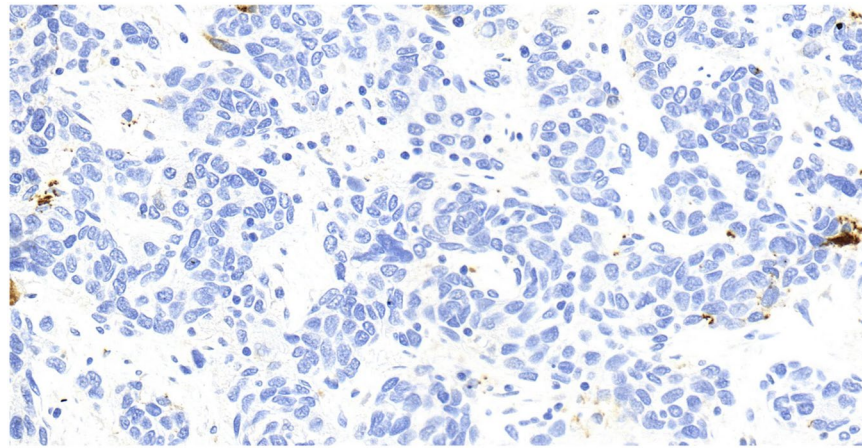


Figure 2. Squamous cell epithelium positive for p16 immunohistochemical staining at 40x magnification. Histological section originates from a grade 3 tonsillar squamous cell carcinoma.

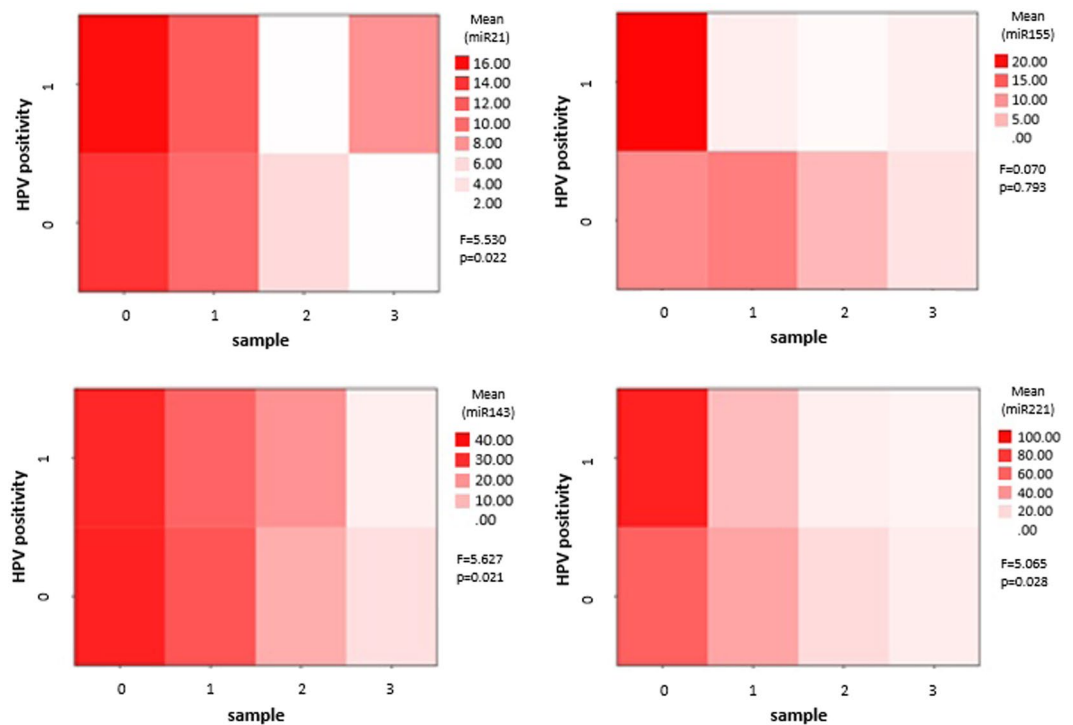


Figure 3. Comparative heat map analysis of HPV positive and negative tumors. Tissue samples are grouped according to HPV positivity and labeled vertically (1 for HPV positive and 0 for HPV negative tissues). The horizontal scale shows the mucosal tissue samples according to distance from the macroscopic tumor margin (0 = tumor, 1 = normal mucosal tissue 1 cm away from the tumor margin, 2 = normal mucosal tissue from 2 cm and 3 = normal mucosal tissue from 3 cm distance from the clinically visible tumor propagation). HPV positive and negative tissue sample series were compared on ANOVA for expression differences of miR-21-5p, miR-143, miR-155 and miR-221-5p. F-probe results and significance levels are shown on the right side of each heat map. The mean difference was accepted to be significant at the 0.05 level.

HPV positive tumor tissues showed higher expression levels of all investigated miRNA compared to the HPV negative. Significant over expressions in the HPV positive tumor tissue biopsies were found with ANOVA for miR-21-5p ($F = 5.53$, $p = 0.022$), miR-143 ($F = 5.627$, $p = 0.021$), and miR-221-5p ($F = 5.065$, $p = 0.028$). The statistical analysis did not confirm miR-155 to be consequently correlated to HPV infection in the tissue biopsy series ($F = 0.70$, $p = 0.793$). Based on our results, we were not able to identify a single miRNA marker specific for HPV positivity, but patterns of the miRNA expression profiles correlated with the presence of HPV (Fig. 3.). miRNA expressions in correlation with the distance from the tumor margin on the peritumoral mucosa showed patchy pattern alterations of miR-21 and miR-155 in HPV positive cases, while gradual change of all investigated miRNAs was seen in HPV negative tumors.

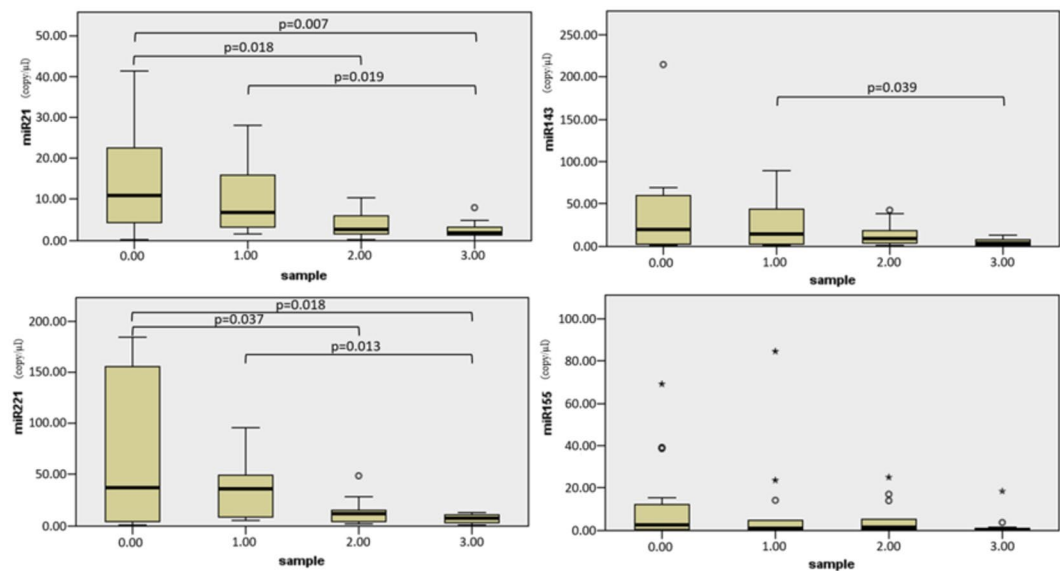


Figure 4. Micro-RNA expression values (y axis: absolute quantification results in copy/ μ l) according to distance of the biopsy sample from the macroscopic tumor margin (row: 0: tumor, 1: 1 cm from the tumor, 2: 2 cm from the tumor, 3: 3 cm from the tumor). The mean differences were analyzed with ANOVA and significance was maintained at the 0.05 level.

miRNA profiles correlating with tissue organization field (TOF). In HPV negative tumors and peritumoral tissues miRNA expression changes followed gradual pattern which depended on the measured distance from the tumor propagation itself. On the peritumoral normal mucosal field, the gradual concentration decrease of two miRNAs (miR-21-5p, miR-221-5p) was found to be statistically significant on the ANOVA test (Fig. 4). miR-143 and -155 also showed a similar miRNA distribution pattern, however, it did not reach the limit of statistical significance.

In the tumors and their neighboring intact mucosa, miR-21-5p showed gradually decreasing values correlating with distance from the tumor propagation. Average miR-21-5p values do not differ significantly among the tumor samples and in the 1 cm peritumoral normal mucosa. We found a significant decrease in miR-21-5p expression levels in tissues at 2 and 3 cm distance from the tumor margin.

The concentration of miR-221-5p was found to be high in tumor tissues while it decreased rapidly in the histopathologically normal peritumoral mucosa. The standard deviation of the miRNA-221-5p expressions were found to scatter in wider range among the tumor biopsies, while we detected more integrated expression levels in the mucosa biopsies. Mean miR-221-5p expression levels did not significantly differ from the site of the 1 cm peritumoral mucosal region. miR-221-5p levels were equally found to be low in 2 and 3 cm distant biopsies.

Although we noticed gradual down-regulation of miR-143 expression in our cancer field detection model, it was not confirmed to be statistically significant on the ANOVA.

Regarding miR-155, we were not able to detect correlation in the mapping biopsy samples with the tumor propagation field.

3 Dimensional model. The patient's HR CT DICOM files were uploaded to 3D slicer version 4.1. The 3D model was generated based on a HPV negative right side exulcerated tonsillar tumor (stage T3) with the anatomical extension into the vallecula and deeply infiltrating the lateral pharyngeal wall. The area pointed red on the high resolution CT shows the primary tumor. It is visualized by 3D slicer program in an anatomical model also appearing with deep orange color (Fig. 5). In this 3D model we were able to visualize the tumor propagation into the surrounding mucosal tissues where the biopsy samples were taken from and evaluated for miRNA expression levels. On the images the clinical tumor mass is painted deep orange, peritumoral mucosa at 1 cm is inked red, 2 cm is yellow and 3 cm is green (Figs. 6,7).

Discussion

Growing interest has focused on the development of novel treatment strategies based on HNSCC cell biology. Within this trend, recent identification of human papilloma virus (HPV) positive HNSCC is a milestone discovery, because it has become apparent that this type of cancer has a distinctive genetic and epigenetic profile, which can be cured within the framework of conventional organ-preserving treatment²⁹⁻³³.

HPV genotyping experiments, have demonstrated that HPV 16 has the highest percentage in oropharyngeal tumors and in a smaller proportion, the presence of HPV 33 and 35 genotypes have also been confirmed³⁴. In our study we applied a genotyping platform which is able to recognize a broad spectrum of mucosal HPV genotypes.

We could confirm HPV 16 as the most frequent genotype in all our clinical samples (7 cases out of 48) and we also detected HPV 52 besides HPV 16 in a single case. HPV 52 belongs to the high cancer inducing risk category

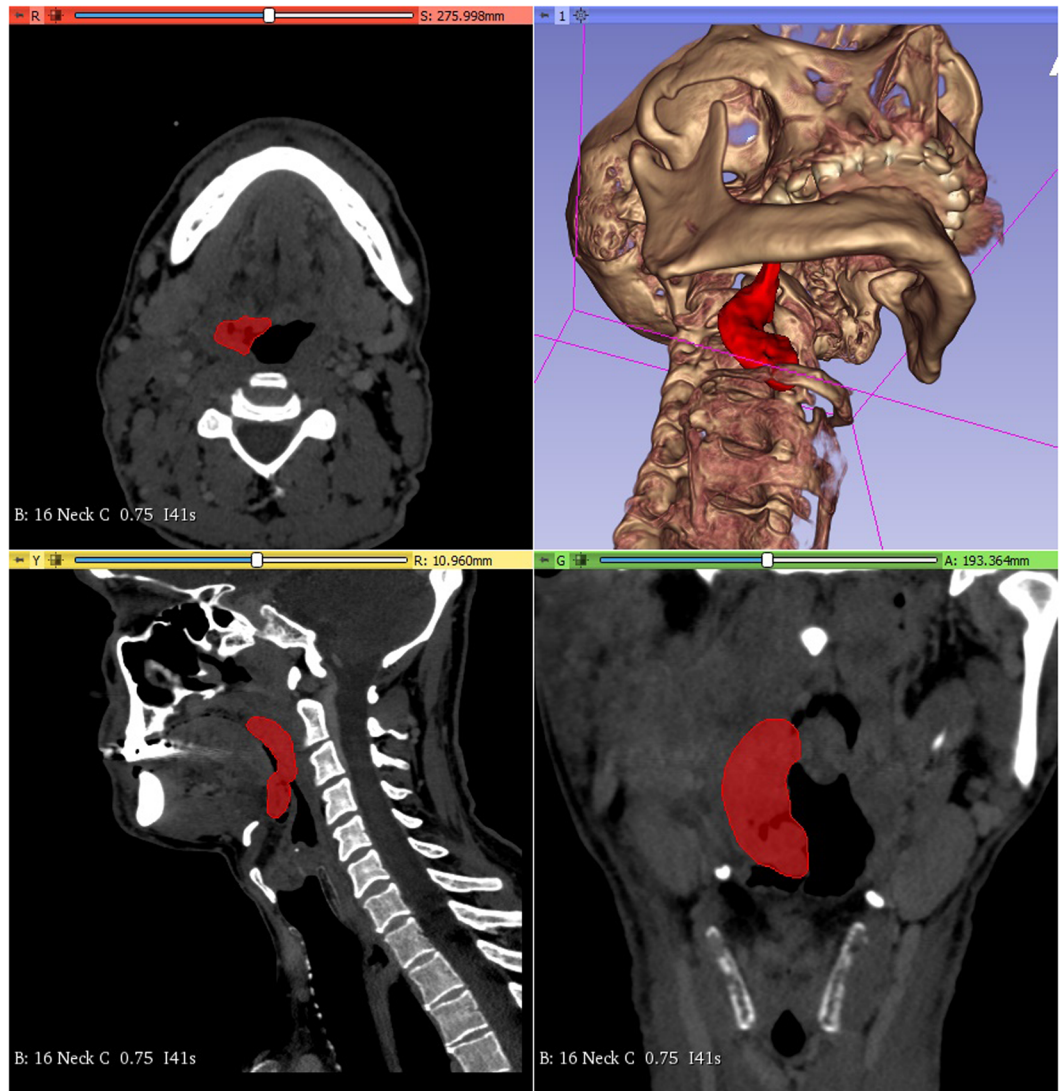


Figure 5. HR CT image and 3D model of a HPV negative stage T3 tonsillar squamous cell carcinoma. Tumor mass is marked red on the horizontal, sagittal and frontal planes in all sections and a 3D model is built up based on the CT segments on the upper right quarter of the picture.

(HR) HPV group and it was found to be the third most prevalent genotype- after HPV 42 and HPV 16- during the routine cervical HPV genotyping at our laboratory site. In the head and neck region the oropharynx presents the highest ratio of HPV associated HNSCC. The mucosal surface of lacunas and crypts constitute a strong conjunction between the epithelial mucosa and the lymphatic tissue underneath and is often revealed in the background of tonsillar predilection of HPV initiated carcinogenesis. During our study period between 2017 and 2018, 48 patients were diagnosed with oropharynx, hypopharynx and larynx HNSCCs. From this patient cohort 25 patients had oropharyngeal tumor and were selected into the study for HPV genotyping and microRNA expression characterization. Due to the very prospective manner of the study (the patients were diagnosed, then mapping biopsy was carried out and biopsies was analyzed for HPV with other genetic features of the samples) whilst we gained HPV negative and HPV positive case numbers according to the general HPV incidence in our region. Although the quantity of HPV positive samples used in our statistical analysis restrict the interpretation of our results due to its smaller number compared to the HPV negative tumors (8 HPV positive cases compared to 17 cases of HPV negatives in the T2-3 stage oropharyngeal HNSCCs). To fulfill the need for group equalizing we should have waited a two-year period to be able to complete sample size for HPV positive tumor group. Since our study is a proof of concept for the 3D model combined with miRNA expression analysis we presume that case number would not influence much on the outcome. Also it is hard to reflect the current results on HPV positivity of the HNSCCs found in our region, because it is known that geographic distribution and the prevalence of certain HPV genotypes may differ, which can cause differences in tumor induction.

The molecular pathways of viral and chemical carcinogenesis are different resulting in alterations in miRNA profiles³⁵. In our study we found differences in miRNA expression patterns in the HPV positive and negative tumor tissues as well as in the surrounding mucosal fields.

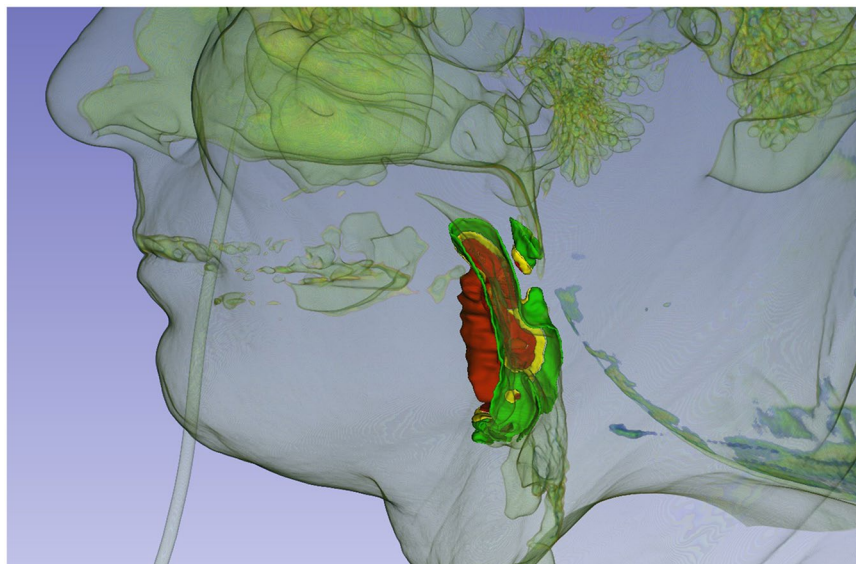


Figure 6. 3D image of HPV negative stage T3 right side exulcerated tonsillar squamous cell cancer - with the anatomical extension into the vallecula and infiltrating the lateral pharyngeal wall (deep orange)- and peritumoral mucosa at 1 cm from the tumor margin (red tone), at 2 cm (yellow) and 3 cm (green) from the tumor margin in sagittal view.

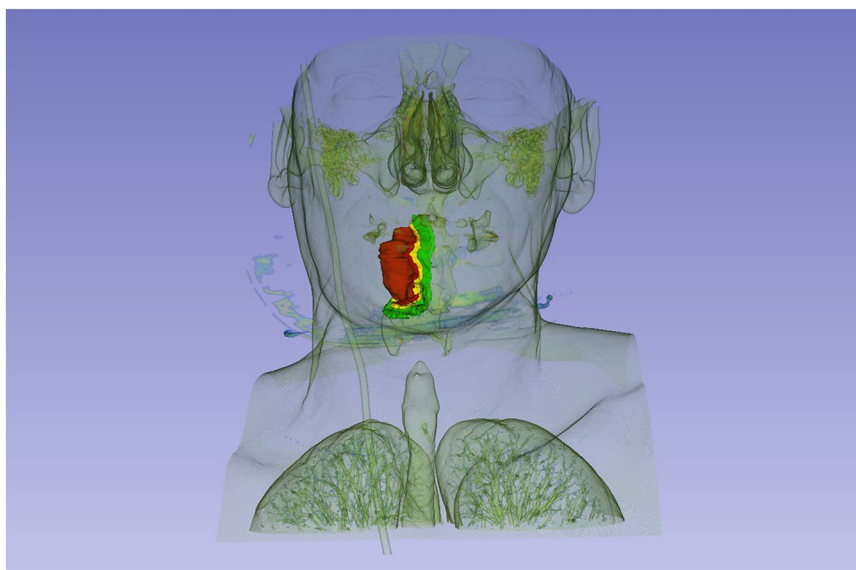


Figure 7. 3D image of HPV negative stage T3 right side exulcerated tonsillar squamous cell cancer - with the anatomical extension into the vallecula and infiltrating the lateral pharyngeal wall (deep orange)- and peritumoral mucosa at 1 cm from the tumor margin (red tone), at 2 cm (yellow) and 3 cm (green) from the tumor margin in frontal view.

We found miR-21-5p expression to reach higher levels in HPV positive tumors and 1 cm distant peritumoral area. In study evidences published so far, miR-21 showed significantly lower expression in HPV positive head and neck tumors, compared to HPV negative ones³⁶⁻³⁸. However, these studies lacked the clinical and histopathological homogeneity of their samples. Sample enrollment was heterogenic for the clinical stage. Furthermore, tumor negative samples were collected close to the tumor itself; consequently, these studies neglected to take in consideration the tumor organization field. Our study samples were all taken from homogeneous, advanced stage (T2, T3) tumor propagations for both HPV negative and positive tumors, so our results reflect miR-21-5p characteristics of clinicopathologically homogenous tumor groups. Our tumor negative samples were collected according to a complete mapping biopsy strategy taking into consideration the TOF (tissue organization field).

miR-143 is a tumor suppressor miRNA, which has been identified as having a lower expression level in HPV associated head and neck tumors. It inhibits the proteins E2F (E2 transcription factor) and survivin and their protein translation, which contributes to tumor proliferation and neoangiogenesis³⁹. It is associated with a better prognosis, hence its higher expression was observed in HPV positive oropharyngeal tumors⁴⁰. We have also found a high miR-143 expression in HPV positive tumors compared to the negatives, but the difference was more characteristic for the peritumoral mucosa, which showed significantly higher concentrations of miR-143.

As well as miR-21-5p, we recognized miR-221-5p with significantly higher expression levels in the HPV positive cancers compared to the negatives, which may also be explained by the fact that HPV positive tumors were large in size. On our mapping biopsy evaluation the highest miRNA values were measured for the HPV positive tumor tissues and miR-221-5p expression. In conclusion, our findings confirm that miR-221 is involved in HPV positive HNSCC tumor growth.

Regarding the HPV negative HNSCCs despite the exponentially expanding information on the cellular biology, research evidence has not lead to a holistic understanding of the dynamically evolving molecular circuitry of this type³³. Many factors seem to contribute to their development, such as the accumulation of genetic and epigenetic alterations, e.g. chromosomal abnormalities, inactivation of tumor suppressors, and increased activity of oncogenes. Signaling pathways in antitumor mechanisms are involved in tumor initiation and progression correlating with biological aggressiveness: TP53 (tumor protein p53), RB1/INK4/ARF (retinoblastoma-associated protein 1/infestins 4/alternate open reading frame) and NOTCH1 (neurogenic locus homolog protein 1) signaling pathways are recognized. Data from DNA sequence analysis implies that the phosphatidylinositol 3-kinase PI3K-Akt-mTOR pathway is also frequently involved in the cancer development⁴¹.

Recent rapid progress in epigenetic approach has revealed that noncoding RNAs (ncRNA), especially miRNA, have a fine-tuner role within gene transcription. Through interaction with mRNA and chromatin modulators, miRNA orchestrates the stoichiometric equilibrium of gene expression on dynamically changing cellular context³³. Thereby, miRNA behaves as a morphostatic factor, linking epigenetic to genetic factors, it is characterized by distinct genetic attributes and plays a key role in the regulation of the mucosal landscape and has been proven to be useful in the molecular characterization of several tumor types⁴¹. In our study, we utilized the benefits of this molecule to detect and characterize the HNSCC tissue organization field. Considering the quantitative differences in the miRNA expression, we found many alterations between tumors and phenotypically intact tissues at defined distances. We revealed significant changes of miR-21-5p and miR-221-5p in HPV negative tumors. Tumor surrounding normal mucosa showed gradual concentration depletion of these markers.

In previous studies, the role of miR-21 has been demonstrated in the inhibition of protein translation of the mRNA of the p53 gene responsible for cell cycle regulation in malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma⁴². An elevated expression of miR-21 was also reported in squamous cell carcinomas of the head and neck^{43,44}, including larynx⁴⁵, pharynx and tongue tumors, primarily metastatic squamous cell carcinomas of the tongue in the latter⁴⁶. The increased expression of miR-21 is closely related to a low five-year survival rate and lower response to chemoradiotherapy, which can be an important tool for treatment planning and prognosis estimation in the future^{36,37}. Currently, there is no evidence in relation to mapping biopsy in literature, but during the progress of our examinations, we found high values of miR-21-5p in the healthy tissue at a distance of 1 cm from the tumor, which correlates with the surgical safety zone.

miR-155 is a type of miRNA, identified in squamous cell cancers of the larynx, it promotes tumor invasion by blocking the SOC (suppressor of cytokine signaling proteins) and STAT (signal transducer and activator of transcription) transcription factors⁴⁷. It can be closely associated with a local recurrence in the case of oropharyngeal cancer⁴⁸, and its expression is higher in laryngeal tumors⁴⁹. It also correlates with tumor proliferation, tendency for metastasis and poor prognosis⁵⁰⁻⁵³. The changes in biomarker values in miR-155, measured at different biopsy distances, could not prove the role of miR-155 in the peritumoral field in our study.

A previous study by *Hussein et al.* confirmed decreased miR-143 expression within the HNSCC tumor tissue, compared to the values measured in the mucosal controls^{54,55}. In our study, we found a higher expression in tumor samples than in normal tissue, however the tissues taken at 1 cm distance in the intact mucosa showed similar, and in some cases higher expression levels compared to the tumor samples themselves. Changes were found to be very moderate. The expression results decreased with the distance in the peritumoral field.

High expression of miR-221 has been demonstrated by several previous studies in the case of laryngeal squamous cell carcinoma⁵⁶ and head and neck squamous cell carcinoma⁵⁷, while low expression has been reported in tumor-free tissue. We can confirm these results for miR-221-5p as our tissue organization field model, showed a significant gradual change on the tumor surrounding mucosal surface.

Overall, it can be said that the differing patterns of HPV positive tumors can explain the prognostic and behavioral differences compared to HPV negative tumors. In order to perform a comprehensive examination regarding epigenetic differences, additional investigations are needed with more cases involved. We plan to examine regulation of the miRNAs, we have analyzed thus far, through their target mRNAs in a future research project.

In the CT based 3D model we tried to visualize the tumor mass and the peritumoral tissues considering our mapping biopsy strategy and the tissue miRNA expression results. In the 3D model the clinical tumor mass and the peritumoral tissue locating at 1 cm distance from the macroscopically tumorous margin - where similar miRNA patterns were proved - presents in red tone colors with precise compilation (Figs. 6,7). Surgical excision carried out in this zone can result a high risk of tumor recurrence. Yellow color represents peritumoral tissue at 2 cm distance from the tumor margin. This is a safety field with a better epigenetic patterns differing from the tumor. In case of resectable tumors the surgical resection is highly recommended in this area to avoid the locoregional recurrence. This model can be utilized in preoperative surgical planning to decide the optimal tumor resection line. In case the surgical line affects the functionality (swallowing, breathing and speaking) we prefer the organ preservation among therapeutical modalities (chemo/radiation). The 3D software might be effective in assisting preoperative planning, especially in current clinical settings. Our approach enables the risk estimation

of malignant disease progression before the operative intervention on the basis of genomic and epigenetic characteristics of the tumor and the peritumoral mucosal surface and the surgical safety margin can be determined in consideration with the anatomical situation of the mucosal landscape. This strategy could facilitate the complex planning of surgical excision. In some cases, where the anatomy does not permit a more extended surgery according to the 3D model and tumor removal was carried out in the 1 cm zone which is still histologically tumor-free but high recurrence risk is indicated by genomic evaluation a closer patient follow-up is highly recommended.

HPV positive cases, where organ preservation and chemo-irradiation therapy are usually preferred, could also be managed in a more precise way based on the 3D models and genomic cancer field evaluation.

Our ultimate goal was to optimize the diagnostic steps in HNSCC management, to estimate and minimize the chances of tumor recurrence and to achieve better survival with higher life quality of HNSCC patients.

Ethics approval and consent to participate. The clinical and experimental study protocol described here was performed under the license number 2014/5341 (University of Pécs, regional ethical committee). The methods were carried out in accordance with the relevant guidelines and regulations. Informed consent was obtained from all participants who were enrolled in this study.

Data availability

All data generated during this study are included in this published article.

Received: 9 July 2019; Accepted: 22 November 2019;

Published online: 08 January 2020

References

- Lacko, M. *et al.* Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **89**, 38–48 (2014).
- Ducatman, B. S. The Role of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* **142**, 715–718 (2018).
- Landry, D. & Glastonbury, C. M. Squamous cell carcinoma of the Upper aerodigestive tract. A review. *Radiol Clin.* **53**, 81–97 (2015).
- Kreimer, A., Clifford, G., Boyle, P. & Franceschi, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **14**, 467–75 (2005).
- Ahmadi, N., Chan, M., Huo, Y. R., Sritharan, N. & Chin, R. Y. Survival outcome of tonsillar squamous cell carcinoma (TSCC) in the context of human papillomavirus (HPV): A systematic review and meta-analysis. *Surgeon.* **17**, 6–14 (2019).
- Kida, K. *et al.* Between p16 Expression and Prognosis in Patients with Oropharyngeal Cancer. Undergoing Surgery. *In Vivo.* **32**, 927–935 (2018).
- Valls-Ontañón, A. *et al.* Impact of human papilloma virus in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Med Clin (Barc).* **152**, (174–180 (2019).
- Geiger, J. L. & Ku, J. A. Postoperative Treatment of Oropharyngeal Cancer in the Era of Human Papillomavirus. *Curr Treat Options Oncol.* **20**, 20 (2019).
- Huang, S. H. & O'Sullivan, B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* **18**, 40 (2017).
- O'Sullivan, B. *et al.* Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentrecohort study. *Lancet Oncol.* **17**, 440–451 (2016).
- Holmes, A. *et al.* Mechanistic signatures of HPV insertions in cervical carcinomas. *NPJ Genom Med.* **16**(1), 16004 (2016).
- <https://pave.niaid.nih.gov>
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & zur Hausen, H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* **324**, 17–27 (2004).
- Bernard, H. U. *et al.* Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* **401**, 70–79 (2010).
- The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* **517**, 576–582 (2015).
- Masuda, M., Wakasaki, T. & Toh, S. Stress-triggered atavistic reprogramming (STAR) addiction: driving force behind head and neck cancer? *Am. J. Cancer Res.* **6**, 1149–1166 (2016).
- Rietbergen, M. M. *et al.* No evidence for active human papillomavirus (HPV) in fields surrounding HPV-positive oropharyngeal tumors. *J Oral Pathol Med.* **43**, 137–42 (2014).
- Braakhuis, B. J. *et al.* Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck.* **24**, 198–206 (2002).
- Liu, T., Xu, Z., Ou, D., Liu, J. & Zhang, J. The miR-15a/16 gene cluster in human cancer: A systematic review. *J Cell Physiol.* **234**, 5496–5506 (2019).
- Håkansson, K. E. J. *et al.* Circulating Small Non-coding RNAs as Biomarkers for Recovery After Exhaustive or Repetitive Exercise. *Front Physiol.* **9**, 1136 (2018).
- Mohr, A. M. & Mott, J. L. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis.* **35**, 3–11 (2015).
- Hafkamp, H. C. *et al.* Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer.* **122**, 2656–64 (2008).
- Beltz, A. *et al.* Staging of oropharyngeal carcinomas: New TNM classification as a challenge for head and neck cancer centers. *HNO.* **66**, 375–382 (2018).
- Klussmann, J. P. *et al.* Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol.* **162**, 747–53 (2003).
- Poljak, M., Kocjan, B. J., Ostrbenk, A. & Seme, K. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. *J Clin Virol.* **76**, S3–S13 (2016).
- Poljak, M., Kocjan, B. J. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev. Anti Infect.* 1139–1162 (2010).
- Fedorov, A. *et al.* 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magn Reson Imaging.* **30**, 1323–41 (2012).
- <https://www.slicer.org/>.
- Rothenberg, S. M. & Ellisen, L. W. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest.* **122**, 1951–1957 (2012).

30. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. & Brakenhoff, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. **11**, 9–22 (2010).
31. Ang, K. K. *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. **363**, 24–35 (2010).
32. Chung, C. H. & Gillison, M. L. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res*. **15**, 6758–6762 (2009).
33. Masuda, M., Toh, S., Wakasaki, T., Suzui, M. & Joe, A. K. Somatic evolution of head and neck cancer - biological robustness and latent vulnerability. *Mol Oncol*. **7**, 14–28 (2013).
34. Bersani, C. *et al.* MicroRNA-155, -185 and -193b as biomarkers in human papillomavirus positive and negative tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. **82**, 8–16 (2018).
35. Sannigrahi, M. K. Role of non-coding RNAs in head and neck squamous cell carcinoma: A narrative review. *Oral Dis*. **24**, 1417–1427 (2018).
36. Li, J. *et al.* MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res*. **15**, 3998–4008 (2009).
37. Arantes, L. M. *et al.* MiR-21 as prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma patients undergoing an organ preservation protocol. *Oncotarget*. **8**, 9911–9921 (2017).
38. Ko, Y. H. *et al.* Human papillomavirus-stratified analysis of the prognostic role of miR-21 in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Int*. **64**, 499–507 (2014).
39. Saintigny, P. *et al.* Gene expression profiling predicts the development of oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. **4**, 218–29 (2011).
40. 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*. **12**, e0179645 (2017).
41. Iorio, M. V. & Croce, C. M. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*. **33**, 1126–1133 (2012).
42. Boldrup, L., Coates, P. J., Wahlgren, M., Laurell, G. & Nylander, K. Subsite-based alterations in miR-21, miR-125b, and miR-203 in squamous cell carcinoma of the oral cavity and correlation to important target proteins. *J Carcinog*. **11**, 18 (2012).
43. Lubov, J. *et al.* Meta-analysis of microRNAs expression in head and neck cancer: uncovering association with outcome and mechanisms. *Oncotarget*. **8**, 55511–55524 (2017).
44. Lamperska, K. M. *et al.* Unpredictable changes of selected miRNA in expression profile of HNSCC. *Cancer Biomark*. **16**, 55–64 (2016).
45. Cao, P. *et al.* Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head & neck*. **35**, 720–728 (2013).
46. Wang, Y., Zhu, Y., Lv, P. & Li, L. The role of miR-21 in proliferation and invasion capacity of human tongue squamous cell carcinoma *in vitro*. *Int J Clin Exp Pathol*. **8**, 4555–63 (2015).
47. Ramdas, L. *et al.* D. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck*. **31**, 642–54 (2009).
48. Hess, A. K. *et al.* MiR-200b and miR-155 as predictive biomarkers for the efficacy of chemoradiation in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. **77**, 3–12 (2017).
49. Wang, J. L., Wang, X., Yang, D. & Shi, W. J. The Expression of MicroRNA-155 in Plasma and Tissue Is Matched in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Yonsei Med J*. **57**, 298–305 (2016).
50. Baba, O. *et al.* MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. *J Oral Pathol Med*. **45**, 248–55 (2016).
51. Jamali, Z. *et al.* MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. **51**, 321–31 (2015).
52. Lerner, C. *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*. **142**, 757–66 (2016).
53. Wald, A. I., Hoskins, E. E., Wells, S. I., Ferris, R. L. & Khan, S. A. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head Neck*. **33**, 504–12 (2011).
54. Manikandan, M. *et al.* Down Regulation of miR-34a and miR-143 May Indirectly Inhibit p53 in Oral Squamous Cell Carcinoma: a Pilot Study. *Asian Pac J Cancer Prev*. **16**, 7619–25 (2015).
55. Božinović, K. *et al.* Genome-wide miRNA profiling reinforces the importance of miR-9 in human papillomavirus associated oral and oropharyngeal head and neck cancer. **9**, 2306 (2019).
56. Hussein, S., Mosaad, H. & Rashed, H. E. Up-regulated miR-221 expression as a molecular diagnostic marker in laryngeal squamous cell carcinoma and its correlation with Apaf-1 expression. *El-Anwar MW Cancer Biomark*. **19**, 279–287 (2017).
57. Avissar, M., Christensen, B. C., Kelse, Y. K. T. & Marsit, C. J. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. **15**, 2850–5 (2009).

Acknowledgements

The study was supported by grant from University of Pecs, Medical School grant number: AOK-KA-2016-19 received by István Szanyi and by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TAMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-001, “National Excellence Program” grant number: A2-ACSD-13-0349 received by Katalin Gombos. The funding organizations played no role in conceptualization, design, data collection, analysis or preparation and submission of the manuscript.

Author contributions

all authors contributed to the intellectual development of this paper. O.E., G.K. and S.Z.I. had the original idea designed the project and drafted the manuscript with the contribution of all authors. O.E., S.Z.I., P.Z., B.A., S.Z.B. and G.I. carried out the clinical management of the patients and collected the tissue samples. T.A. and M.K. performed C.T. imaging. K.B. evaluated the samples on histopathology and immunohistochemical assays for p16. G.K. and K.K. performed the HPV genotyping and miRNA analysis. HI and CSD performed the 3D slicer imaging. P.N. contributed to sample collection, molecular laboratory analysis and 3D imaging equally. G.K. and P.N. performed the statistical analysis.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56429-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.O.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020