

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Goran M. Stojković

**In silico karakterizacija *miRNK* meta
potpisa i validacija odabranih *miRNK* kao
potencijalnih prognostičkih biomarkera u
oralnom karcinomu**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Goran M. Stojković

**In silico characterisation of *miRNA* meta
signature and validation of selected *miRNAs*
as potential prognostic biomarkers in oral
carcinoma**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTOR

dr sci med Milovan Dimitrijević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

KOMENTOR

dr sci biol Katarina Zeljić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

dr sci med Nada Tomanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

dr sci med Nenad Arsović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

dr sci med Milan Petrović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Stomatološki fakultet

dr sci med Srboljub Stošić, redovni profesor
Univerzitet odbrane – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

dr sci biol Ivan Jovanović, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke “Vinča” – Institut od nacionalnog značaja za
Republiku Srbiju

Datum odbrane _____

ZAHVALNICA

Pre svega želim da se zahvalim svom mentoru, velikom stručnjaku i čoveku, profesoru Milovanu Dimitrijeviću na veoma korisnim savetima i podršci tokom realizacije doktorske disertacije. Zahvalnost i poštovanje upućujem mom komentoru profesorki Katarini Zeljić za veliki doprinos u osmišljavanju problematike ove doktorske disertacije.

Uz veliku podršku svih kolega sa odeljenja maksilofacijalne hirurgije kao i ostalih članova Klinike za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, pri zbrinjavanju pacijenata i savesnom pristupanju, čitav ovaj doktorat dobio je entuzijastičnu i olakšavajuću notu. Zahvalnost dugujem i kolegama sa Odeljenja za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ za ljubazno ustupanje opreme njihovog instituta za relativnu kvantifikaciju ekspresije gena. Zahvajući ostvarenim saradnjama, pored rada sa pacijentima, ovaj doktorat ima multidisciplinarni aspekt.

Veliku zahvalnost upućujem svim članovima Komisije na pregledu doktorske disertacije i sugestijama koje su unapredile kvalitet teksta.

Naposletku, hvala svim članovima moje porodice na velikoj podršci i strpljenju u svakom mom životnom i profesionalnom koraku.

In silico karakterizacija *miRNK* meta potpisa i validacija odabranih *miRNK* kao potencijalnih prognostičkih biomarkera u oralnom karcinomu

Sažetak

Oko 30% pacijenata sa oralnim karcinomom će nakon ekscizije tumora imati recidiv u periodu od dve godine. Stoga je važno identifikovati senzitivne molekularne biomarkere koji mogu imati dijagnostički i prognostički značaj. Proces oralne karcinogeneze je povezan sa deregulacijom ekspresije malih nekodirajućih *miRNK* molekula. Cilj istraživanja je bilo utvrđivanje najčešće dereguliranih *miRNK* u oralnom karcinomu i ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog značaja odabranih *miRNK*. Lista najčešće dereguliranih *miRNK* u oralnom karcinomu, *miRNK* meta potpis, je dobijena sprovođenjem meta-analize ranije publikovanih studija. Meta potpis najčešće dereguliranih *miRNK* u oralnom karcinomu čini 13 *miRNK*, od toga sedam povišeno (*miR-21-5p*, *miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-31-5p*, *miR-424-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-21-3p*) i pet sniženo eksprimiranih (*miR-139-5p*, *miR-30a-3p*, *miR-375-3p*, *miR-376c-3p*, *miR-30a-5p*). Studijsku grupu je činilo 35 pacijenata sa oralnim karcinomom. Na kliničkim uzorcima je validirana povišena ekspresija *miR-31-3p*, *miR-135b-5p* i snižena ekspresija *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* gena u tkivu oralnog karcinoma. Panel od tri analizirane *miRNK*, *miR-31-3p*, *miR-139-5p*, *miR-30a-5p* su imale najbolji dijagnostički potencijal za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva (AUC: 0,780 (95% CI: 0,673-0,886), $p < 0,0005$, senzitivnost 94,3%, specifičnost 51,4%). Značajno lošije preživljavanje su imali pacijenti sa povišenom ekspresijom *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p* i *miR-30a-5p* ($p=0,003$, $p=0,048$, $p=0,016$, redom). Panel koji čine *miR-31-3p*, *miR-139-5p*, *miR-30a-5p* se može koristiti kao potencijalni dijagnostički set biomarkera za senzitivnu diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva. Kao potencijalni prognostički biomarkeri se mogu koristiti *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p* i *miR-30a-5p*. Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju dobar osnov za planiranje budućih istraživanja, koja bi trebalo sprovesti na većoj studijskoj grupi sa dužim vremenom praćenja pacijenata.

Ključne reči: oralni karcinom, ekspresija, *miRNK*, meta potpis

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: rekonstruktivna hirurgija

In silico characterisation of *miRNA* meta signature and validation of selected *miRNAs* as potential prognostic biomarkers in oral carcinoma

Abstract

About 30% of patients with oral cancer will have a recurrence after the excision of the tumor within a period of two years. Therefore, it is important to identify sensitive molecular biomarkers that may have diagnostic and prognostic significance. The process of oral carcinogenesis is associated with the deregulation of the expression of small non-coding miRNA molecules. The aim of the study was to determine the most commonly deregulated miRNAs in oral cancer and to examine the diagnostic and prognostic significance of selected miRNAs. A list of the most commonly deregulated miRNAs in oral cancer, the miRNA meta signature, was obtained by conducting a meta-analysis of previously published studies. The meta signature of the most commonly deregulated miRNAs in oral cancer consisted of 13 miRNAs, of which seven were up- (*miR-21-5p*, *miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-31-5p*, *miR-424-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-21-3p*) and five down-regulated (*miR-139-5p*, *miR-30a-3p*, *miR-375-3p*, *miR-376c-3p*, *miR-30a-5p*). The study group consisted of 35 patients with oral cancer. Increased expression of *miR-31-3p*, *miR-135b-5p* and decreased expression of *miR-139-5p* and *miR-30a-5p* genes in oral cancer tissue were validated on clinical samples. A panel of three analyzed miRNAs, *miR-31-3p*, *miR-139-5p*, *miR-30a-5p* had the best diagnostic potential for discriminating oral cancer tissue from non-tumor tissue (AUC: 0.780 (95% CI: 0.673-0.886), $p < 0.0005$, sensitivity 94.3%, specificity 51.4%). Patients with increased expression of *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p* and *miR-30a-5p* had significantly worse survival ($p=0.003$, $p=0.048$, $p=0.016$, respectively). The panel consisting of *miR-31-3p*, *miR-139-5p*, *miR-30a-5p* can be used as a potential diagnostic biomarker set for sensitive discrimination of oral cancer tissue from non-tumor tissue. *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p* and *miR-30a-5p* can be used as potential prognostic biomarkers. The results of this doctoral dissertation represent a good basis for planning future research, which should be conducted in a larger study group with a longer patient follow-up time.

Key words: oral carcinoma, expression, miRNA, meta signature

Scientific field: medicine

Narrower scientific field: reconstructive surgery

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Oralni karcinom.....	1
1.1.1. Epidemiologija	1
1.1.2. Etiologija	2
1.1.3. Histopatologija	3
1.1.4. Klinička slika	4
1.1.5. Limfni sistem glave i vrata i putevi širenja oralnog karcinoma.....	5
1.1.6. TNM klasifikacija	6
1.1.7. Dijagnostika	8
1.1.8. Lečenje	9
1.1.9. Genetička i epigenetička osnova razvoja oralnog karcinoma	10
1.1.10. Važnost identifikacije novih biomarkera u oralnom karcinomu.....	12
1.2. MikroRNK: biogeneza i mehanizam regulacije ekspresije ciljnih gena.....	12
1.3. MikroRNK i maligni tumori	15
1.3.1. MikroRNK kao molekularni biomarkeri i terapeutici u malignim tumorima.....	16
1.3.2. MikroRNK i oralni karcinom.....	17
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1. Materijal	22
3.1.1. Etički aspekti.....	22
3.1.2. Studijska grupa i biološki uzorci.....	22
3.2. Metode.....	23
3.2.1. Eksperimentalni dizajn.....	23
3.2.2. Pretraga literature i kriterijumi za uključivanje studija u meta-analizu dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu	23
3.2.3. Meta-analiza, in silico karakterizacija miRNK meta potpisa i izbor miRNK za validaciju	24
3.2.4. Izolacija ukupne RNK, određivanje koncentracije i provera kvaliteta izolovane RNK ..	24
3.2.5. Reakcija reverzne transkripcije	26
3.2.6. Određivanje relativne ekspresije miRNK	26
3.2.7. Statistička analiza.....	28
4. REZULTATI	30
4.1. Demografske i kliničkopatološke karakteristike studijske grupe.....	30
4.2. Pregled studija uključenih u meta-analizu	32
4.3. Meta potpis najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu.....	34
4.3.1. In silico karakterizacija miRNK meta potpisa oralnog karcinoma	36
4.3.2. Mreža interakcija odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma.....	38
4.4. Validacija relativne ekspresije odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma	41
4.5. Dijagnostički potencijal odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma.....	45
4.6. Korelacija ekspresije odabranih miRNK u oralnom karcinomu i okolnom netumorskom tkivu.....	49
4.7. Asocijacija relativne ekspresije odabranih miRNK sa demografskim i kliničkopatološkim karakteristikama pacijenata sa oralnim karcinomom	50
4.8. Prognostički značaj odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma	53
4.9. Validacija relativne ekspresije i dijagnostički potencijal odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma na uzorcima iz TCGA baze podataka.....	56
5. DISKUSIJA	61
6. ZAKLJUČCI	71
7. LITERATURA	72

1. UVOD

Maligni tumori predstavljaju jedan od najznačajnijih zdravstvenih problema u celom svetu, samim tim i u Republici Srbiji. Statistički podaci ukazuju da su kardiovaskularne bolesti prvi uzrok smrtnosti ljudi, za kojima slede maligne bolesti (<https://ourworldindata.org/causes-of-death>). Maligni tumori predstavljaju grupu od stotinu različitih bolesti, koje imaju različite kliničke prezentacije, tok i prognozu. Zajednička odlika svih, ovih međusobno heterogenih bolesti, je nekontrolisan rast ćelija i sposobnost malignih ćelija da invadiraju okolna tkiva i metastaziraju u udaljene delove tela. Rana dijagnostika, preciznija patološka karakterizacija i sl. su imperativi današnjice na putu razvoja precizne medicine, čemu pretenduje medicina XXI veka.

Maligni tumori koji se javljaju u regionu glave i vrata su heterogena grupa koja obuhvata oralni karcinom, karcinom larinksa, farinksa (nazofarinks, orofarinks, hipofarinks), karcinom pljuvačnih žlezda i paranasalnih šupljina, nosne duplje i karcinom kože.

1.1. Oralni karcinom

Usna duplja predstavlja početni deo organa za varenje koju karakterišu funkcije žvakanja, prvi akt gutanja, oblikovanje glasa, a u njoj se nalazi i čulo ukusa. Poput tunela, otvorena je napred prema spoljnoj sredini, a put nazad ka ždrelu. Elementi ove anatomske jedinice su, vermilion usana, bukalna mukoza, donji i gornji alveolarni grebeni, retromolarni prostor, pod usne duplje, tvrdo nepce i telo jezika. Usna duplja ima dva dela, koja su razgraničena alveolarnim grebenovima obe vilice sa zubima i to su, prednji, manje zapremine, koji se naziva vestibulum usta i zadnji, značajno veći prostor koji predstavlja pravu usnu duplju.

Usna duplja je obložena pločasto slojevitim epitelom koji može podleći kompleksnom procesu maligne transformacije. Kao posledica toga se razvija tumorska masa, tj. karcinom usne duplje, još nazvan oralni karcinom. Jedan od vodećih problema u onkologiji je upravo oralni karcinom koji se odlikuje visokim stepenom mortaliteta bez obzira koje je lečenje ili dijagnostika primenjena. Petogodišnje preživljavanje bolesnika sa ovom vrstom karcinoma, već dugo vremena, iznosi oko 50-60%. Jezik i pod usta su delovi usne duplje koji su najčešće zahvaćeni tumorom, a histološka forma najzastupljenijeg malignog tumora je planocelularni karcinom (90% slučajeva). Stoga se oralni karcinom još naziva i oralni planocelularni karcinom.

S obzirom da oralni karcinom u ostatku sveta, kao i u Evropi spada u ređe malignitete, to može usloviti relativno zanemarivanje ulaganja i interesovanja za molekularno genetička ispitivanja ovog maligniteta.

1.1.1. Epidemiologija

Prema podacima GLOBOCAN-a (engl. global cancer observatory), incidenca i mortalitet od oralnog karcinoma među svim ostalim, zauzima petnaesto mesto, ali svakako da ovaj podatak varira u odnosu na geografski deo sveta. Od ukupnog broja slučajeva dijagnostikovanih oralnih karcinoma u svetu na godišnjem nivou, oko 62,5% potiče iz Azije, gde je stopa smrtnosti 73,3% (G. Sarode et al., 2020). Poređenja radi, u Evropi je udeo dijagnostikovanih slučajeva u odnosu na ceo svet oko 17,4%, sa mortalitetom od 13,6% (G. Sarode et al., 2020). Karcinom oralne duplje i usana se nalazi na sedamnaestom mestu u Srbiji, sa godišnjom incidencom od 450-500 slučajeva prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut". Oralni karcinom ima udeo od 1,1% u ukupnom mortalitetu i morbiditetu u našoj zemlji (Dimitrijevic et al., 2001; Dimitrijevic 2020).

Najveći procenti zastupljenosti novootkrivenih slučajeva zabeleženi su u južnoj i jugoistočnoj Aziji među kojima se izdvaja Indija i Šri Lanka gde je ovaj karcinom na prvom mestu kod muškog dela populacije.

Što se tiče starosnih grupa, za očekivati je da se incidenca oralnog karcinoma uvećava sa godinama, tako da su pacijenti najčešće u šestoj i sedmoj deceniji života. Ipak, sve se češće dijagnostikuju slučajevi kod mlađih osoba, koje su u četvrtoj deceniji života.

Raspodela pacijenata po polovima je 2-3:1 u korist muškaraca, s obzirom da se oralni karcinom dva do tri puta češće javlja među pripadnicima muškog pola i to je karakteristično za većinu etničkih grupa (Rivera, 2015). Smatra se da su muškarci prijemčiviji lošim životnim navikama, konkretno konzumaciji alkohola i pušenju, te izloženost ovih faktorima rizika može doprineti češćem oboljevanju od oralnog karcinoma. Savremeni podaci ukazuju da se razlika u polnoj raspodeli po pitanju oboljevanja od oralnog karcinoma sve više smanjuje.

1.1.2. Etiologija

Uopšteno je dokazano da su faktori koji dovode do malignih bolesti faktori rizika iz spoljašnje sredine, kao i nagomilavanje genetičkih i epigenetičkih promena. Među faktorima spoljašnje sredine, kako je prethodno navedeno, smatra se da konzumacija alkohola i duvana predstavlja jedan od vodećih rizika za razvoj oralnog karcinoma.

Dugo vremena unazad se objavljuju studije koje bezprigovorno dokazuju da konzumacija žestokih alkoholnih pića u većim količinama povećava rizik za nastanak oralnog karcinoma, a pokazano je da alkohol i duvan imaju i sinergističko dejstvo. Epitel koji je glavna barijera za ulazak karcinogena, kako iz hrane tako i iz štetnih pića među kojima je alkohol vodeći, biva izmenjen i atrofičan kod alkoholičara i njegova barijerna funkcija slabi. Acetaldehid, kao glavni metabolit alkohola, oštećuje molekul DNK ćelija višeslojnog epitela usne duplje, što može rezultovati inicijacijom maligne transformacije (Kumar, Nanavati, Modi, & Dobariya, 2016).

Postoje brojni dokazi koji govore u prilog činjenici da duvan može dovesti do razvoja malignih tumora na svim nivoima prisustva duvanskog dima u našem organizmu, kako direktno u usnoj duplji, ždrelu, grkljanu, plućima i jednjaku, tako i indirektno u mokraćnoj bešici, bubregu i pankreasu. Pored pušenja duvan se nekim delovima sveta konzumira i na druge načine (žvakanje i ušmrkavanje) pa se njegovo direktno štetno dejstvo ispoljava na mukozi usne i nosne duplje.

Jedan od važnih faktora rizika iz spoljašnje sredine koji može dovesti do razvoja oralnog karcinoma je biljka betel, čije se lišće žvaće (Kumar et al., 2016). Ova biljka, je jedan u nizu karcinogena koji je odgovoran što je u zemljama Azije oralni karcinom vrlo visoko kotiran, s obzirom da je žvakanje betela običaj u zemljama južne i jugoistočne Azije. Lišće biljke betel sadrži komponente koje imaju genotoksično dejstvo i dovode do oštećenja na molekulu DNK, a pokazano je i da mogu dovesti do nekontrolisane proliferacije ćelija (Kumar et al., 2016).

Ishrana koja obiluje niskokvalitetnom hranom bogatom konzervansima, stabilizatorima i pojačivačima ukusa i boje je element koji u sinergizmu sa već navedenim karcinogenima ispoljava štetno dejstvo na visokom nivou. Ukoliko se na sve prethodno pomenuto doda i loša oralna higijena, mogućnost nastanka oralnog karcinoma se multiplicira. Postoje veoma jasni dokazi da je loša oralna higijena povezana sa povećanim rizikom za razvoj oralnog karcinoma (Mathur, Singhavi, Malik, Nair, & Chaturvedi, 2019).

Virusi često prave infekcije hroničnog tipa koje poseduju mogućnost da izmenjuju ćelije epitela i da prouzrokuju tumore tako da se takve grupe nazivaju onkogeni virusi. Oni za koje se smatra da su odgovorni za nastanak oralnog karcinoma su humani herpes virus (Epštajn-Bar), humani papiloma virus (HPV) i herpes simpleks virus (HSV) (Sand & Jalouli, 2014). Ovi virusi najčešće izazivaju mnogobrojne benigne tumore koje se sreću kod velikog broja pacijenata na redovnim kontrolnim pregledima, međutim ima i onih sa visokim malignim potencijalom koji se povezuju sa prekancerozama i planocelularnim karcinomom usne duplje. Kada je reč o HPV-u,

izloženost visoko rizičnim tipovima, kao što su HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35 i HPV39 se dovodi u vezu sa razvojem oralnog karcinoma (Chaitanya et al., 2016; Kumar et al., 2016). Od navedenih, najčešće se kod pacijenata identifikuju HPV16 i HPV18. Prema nekim podacima HPV16 se javlja u oko 66-82%, a HPV18 u oko 26-34% slučajeva oralnog karcinoma koji su HPV pozitivni (Yete, D'Souza, & Saranath, 2018). Ovi visoko rizični HPV tipovi preko svojih proteina E6 i E7 utiču na proliferaciju ćelija i apoptozu kroz interakcije sa genima (Yete et al., 2018). Između HPV-pozitivnih i HPV-negativnih oralnih karcinoma postoje razlike u pogledu identifikovanih mutacija. Tako na primer se izvesne mutacije *TP53* gena javljaju češće u HPV-negativnim tumorima (Yete et al., 2018). Pored virusa, u današnje vreme je prepoznat značaj izučavanja mikrobioma usne duplje kao potencijalnog uzročnika oralne karcinogeneze. Pokazano je da su bakterije *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus* i dr. asociirane sa razvojem oralnog karcinoma (Stasiewicz & Karpiński, 2021).

Izloženost faktorima rizika iz spoljašnje sredine može dati relativno jednostavno objašnjenje zašto je došlo do razvoja oralnog karcinoma. Dokazi da samo mali broj pušača i konzumenata alkohola oboli od karcinoma usne duplje definitivno ukazuju na individualnu osetljivost na navedene karcinogene odnosno da je genetička predispozicija posebno značajan faktor u nastanku oralnog karcinoma. Akumulacija epigenetičkih promena (DNK metilacija, modifikacije histona i izmenjena ekspresija nekodirajućih, posebno malih RNK molekula) se takođe dovode u vezu sa nastankom oralnog karcinoma.

1.1.3. Histopatologija

Planocelularni karcinom procentualno zauzima apsolutnu većinu svih maligniteta usne duplje, i čini oko 90% slučajeva, dok se pored njega mogu naći još maligni tumori porekla epitela (verukozni karcinom, bazaloidni skvamozni karcinom, papilarni skvamozni karcinom, karcinom vretenastih ćelija, limfoepitelni karcinom), vezivnog tkiva (Kapošijev sarkom), malih pljuvačnih žlezda (mukoepidermoidni karcinom, adenoid cistični karcinom, karcinom acinusnih ćelija, epitelni-mioepitelni karcinom), limfnog tkiva (razne vrste limfoma), melanocita (mukozni maligni melanom), a mogu biti prisutne i metastaze drugih malignih tumora.

Ono čemu se još pridaje velika pažnja kliničara su i prekancerozne lezije. To su mesta oštećenja epitela na kojima su prisutne displazije ćelija nižeg ili višeg stepena i na kojima se transformacija u malignitet dešava mnogo češće nego na zdravom epitelu. To su leukoplakija, eritroplakija, lihen planus, submukozna fibroza. Prekanceroze se prema stepenu displazije klasifikuju na blage, umerene, teške i karcinoma *in situ*.

Leukoplakija predstavlja belu mrežastu promenu mukoze, koja nije uzrokovana fizičkim ili hemijskim faktorima, osim duvanom i konzumiranjem alkohola. Analogno leukoplakiji crvene lezije predstavljaju eritroplakije, koje imaju veći maligni potencijal i češće su udružene sa epitelnom displazijom i karcinomom *in situ*.

Submukozna fibroza je hronična premaligna promena usne duplje, koja se karakteriše progresivnom fibrozom submukoznog tkiva, naročito u bukalnoj regiji, i povezana je sa žvakanjem biljke betel i areka oraha.

Karcinoma *in situ* se manifestuje kao zadebljanje sluznice, praćeno crvenilom ili infiltracijom i ovoj promeni treba pridati veću pažnju jer je prelazak u invazivni karcinom očekivan.

Planocelularni karcinom nastaje malignom transformacijom ćelija pločasto-slojevitog i pseudo-slojevitog epitela. Prema stepenu ćelijske diferencijacije, planocelularni karcinom se deli na dobro diferentovan, srednje diferentovan i slabo diferentovan. Stepenu ćelijske diferenciranosti reflektuje agresivnost tumora. Ta odlika je od velikog značaja za klinički tok bolesti i planiranje

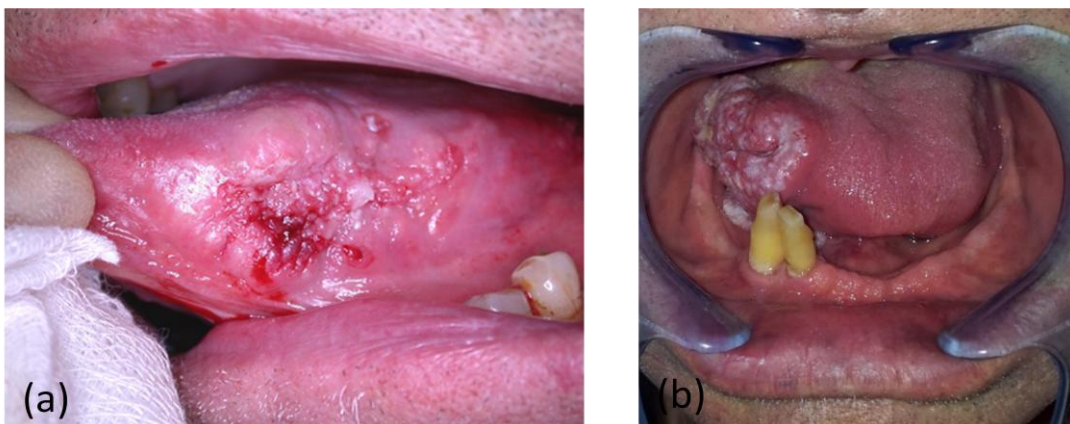
terapije. Veći maligni potencijal imaju karcinomi sa nižim stepenom ćelijske diferencijacije za razliku od karcinoma sa višim stepenom diferencijacije. Planocelularni karcinom usne duplje najčešće je dobro ili srednje diferentovan, retko slabo diferentovan. Dubina infiltracije predstavlja najvažniju histološku odliku primarnog tumora, koja određuje izbor inicijalne terapije i ima prognostički značaj. Regionalne metastaze se ređe javljaju u slučaju površnih lezija, bolje reaguju na terapiju i praćene su boljom prognozom. Lezije sa dubljom infiltracijom uzrokuju znatno češće regionalne metastaze, što značajno utiče na prognozu. Dubinu infiltracije je moguće precizno odrediti nakon ekscizije tumora.

1.1.4. *Klinička slika*

Klinička slika oralnog karcinoma je u početku oskudna i manifestuje se najčešće ulceracijom koju pacijent zanemaruje posmatrajući je kao proizvod hronične infekcije zbog čega se pacijenti ne obraćaju za lekarsku pomoć. Stoga veoma značajnu ulogu u dijagnostikovanju ove bolesti imaju stomatolozi kod kojih pacijenti dolaze češće radi redovnih kontrolnih pregleda zuba. Važno je napomenuti da se svaka ulceracija na mukozi usne duplje, koja ne prolazi u roku od dve do tri nedelje, tretira kao suspektna i pacijent biva upućen maksilofacijalnom hirurgu na dalju dijagnostiku (Wong & Wiesenfeld, 2018).

Sam razvitak bolesti prolazi kroz faze koje se manifestuju početnom ulceracijom dalje u infiltraciju koja se širi najpre površno, a zatim i u dublje slojeve tkiva da bi u ređim oblicima napredovala i kroz egzofitični, vegetantni oblik. Što se tiče mesta u usnoj duplji na kojima se karcinom najčešće javlja su, bočna strana jezika i pod usne duplje, a nešto ređe bukalna mukoza, retromolarni predeo i nepce. Usled normalno prisutne bakterijske flore u usnoj duplji, hronična infekcija je redovni pratilac ovog karcinoma. Najčešći lokalni simptom jeste bol, potom otežano žvakanje i gutanje, otežan izgovor, zadah, utrnutost, osećaj stranog tela, dok uznapredovale tumore prati trizmus, rasklaćenje zuba, jaki iradirajući bolovi prema uvu i krvarenje. Od opštih simptoma mogu biti prisutni gubitak apetita, gubitak telesne težine, malaksalost. Važno je napomenuti da se u manjem procentu dešavaju slučajevi kada se pacijent javlja na prvi pregled sa simptomom uvećanog limfnog čvora na vratu bez evidentnih kliničkih znakova na mukozi usne duplje.

Kako bolest napreduje tako i sam karcinom karakterišu zone nekroze unutar tumorskog tkiva, infiltracija okolnih struktura kao što su mišići, kost i koža. Terminalni stadijum bolesti gotovo uvek karakterišu orokutane fistule, glosoptoza, intenzivni bolovi koji ne reaguju na analgetsku terapiju, obilna krvarenja, a sve to uvodi pacijenta u anemiju i kaheksiju. Regionalna proširenost bolesti u limfne čvorove vrata je vrlo česta i dešava se u oko 60% slučajeva zbog razvijene mreže limfnih sudova, dok su udaljene metastaze ipak retkost.



Slika 1. Izgled (a) ranog stadijuma i (b) kasnog stadijuma karcinoma jezika. [Izvor slike: G. Stojković]

1.1.5. *Limfni sistem glave i vrata i putevi širenja oralnog karcinoma*

Limfni sistem glave i vrata čine limfni čvorovi i mreže limfnih kanala koji ih povezuju. Ovaj sistem je deo retokiloendotelnog sistema organizma i broj limfatika koji je lociran iznad klavikule je oko 200-300 čak trećina od ukupnog broja limfnih čvorova u telu.

Limfni čvorovi glave i vrata su terminalni (sabirni) i intermedijarni (spoljašnji). Terminalni se još nazivaju duboki cervikalni s obzirom da se u njih dreniraju limfni sudovi glave i vrata direktno iz tkiva ili indirektno kroz površne limfne čvorove. Jugularno limfatično stablo je formirano eferentnim sudovima dubokih cervikalnih čvorova koji se na desnoj strani završavaju na spoju arterije subklavije i unutrašnje jugularne vene ili na desnom limfatičnom duktusu. Na levoj strani se ulivaju u duktus toracikus, ili ređe se završavaju u unutrašnjoj jugularnoj veni ili veni subklaviji.

Limfni čvorovi koji su od značaja za širenje karcinoma usne duplje su:

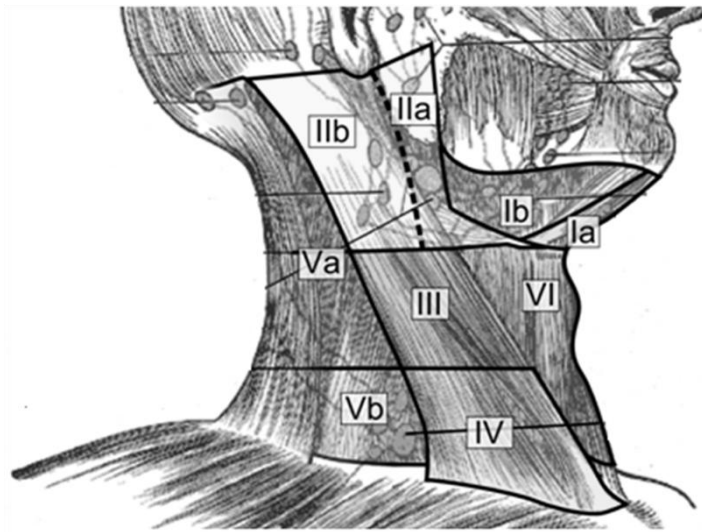
- **submandibularni:** najčešće ih je 3 do 7, pri čemu im je drenažno područje prednji deo jezika i pod usne duplje, donja usna, obraz, nos, prednji deo nosne šupljine, gingiva, zubi, sublingvalne i submandibularne pljuvačne žlezde;
- **submentalni:** mogu se podeliti na prednje, srednje i zadnje submentalne čvorove;
- **lingvalni:** ovo su nestalni limfni čvorovi, pa se ponekada mogu naći na preparatima nakon ekscizije na mišiću hioglosusu, duž vene i arterije lingvalis;
- **lateralni cervikalni:** velika i važna grupa koja se deli na površne, koji prate tok spoljašnje jugularne vene i nadovezuju se na donje parotidne čvorove i duboke, koji se sastoji od dubokog jugularnog lanca, lanca uz akcesorni nerv i lanca supraklavikularnih čvorova.

Duboki jugularni lanac nalazi se duž istoimene vene i deli se na gornju, srednju i donju grupu. Ispod sternokleidomastoidnog mišića u prednjepoljašnjem delu u odnosu na venu jugularis internu se nalaze čvorovi gornje grupe. Jugulodigastrični limfni čvor je najznačajniji u ovoj grupi, budući da se svi maligni tumori glave i vrata dreniraju kroz njega. Najznačajniji limfni čvor srednje grupe je jugulokarotidni (jugulomohoidni) čvor. Limfni čvorovi donje grupe locirani su neposredno uz traheju, ispred i medijalno u odnosu na venu jugularis internu. Svi čvorovi glave i vrata kao i oni iz dela usne šupljine, jezika, nosnih šupljina, uva, velikih pljuvačnih žlezda, štitne žlezde, sva tri sprata farinksa i larinksa dreniraju limfu u duboke cervikalne limfne čvorove. XI kranijalni živac je od odvajanja od jugularne vene do ulaska u m. trapezijus praćen akcesornim lancem, u čiju grupu se dreniraju okcipitalni i retroaurikularni čvorovi, koža vrata, i dalje ka supraklavikularnim čvorovima. U supraklavikularnim čvorovima se pored metastaza organa glave i vrata, mogu javiti i metastaze torakalnih i abdominalnih organa.

Navedena anatomska podela, koja je relativno komplikovana, modifikovana je za terapijsku i kliničkopatološku primenu. Komitet Američke akademije za otorinolaringologiju i hirurgiju glave i vrata (AAO-HNS) je 1988. godine cervikalne limfonoduse podelio u šest grupa po nivoima vrata. Prednost ove podele je laka primena pri određivanju kliničkog statusa vrata i određivanju lokacije limfnih čvorova u opisanim grupama pre patohistološkog pregleda.

Shodno ovoj podeli, nivo I vrata obuhvata submentalne i submandibularne limfne noduse (IA submentalni, IB submandibularni), nivo II gornje jugularne (IIA noduse lokalizovane medijalno od n. akcesorijusa, IIB noduse lokalizovane lateralno od n. akcesorijusa), nivo III srednje jugularne, nivo IV donje jugularne, nivo V noduse zadnjeg trougla vrata (nivo VA noduse lokalizovane iznad prostora koji je ograničen donjom ivicom krikoidne hrskavice, uključeni su i nodusi duž n. akcesorijusa, VB noduse lokalizovane ispod prostora koji je ograničen donjom ivicom krikoidne

hrskavice, uključeni su i nodusi duž a. transverze koli) i nivo VI noduse prednjeg odeljka vrata. Nivoi vrata su šematski prikazani na Slici 2.



Slika 2. Šematski prikaz nivoa vrata. Detaljno objašnjenje je dato u tekstu. [Izvor slike: Wikimedia creative commons, modifikovano]

1.1.6. *TNM klasifikacija*

TNM klasifikacija (engl. tumor node metastasis) je metoda koja se koristi za označavanje proširenosti tumora, s obzirom na veličinu primarnog tumora (T), proširenost na regionalne limfne čvorove (N) i prisustvo udaljenih metastaze (M), Tabela 1 (Zanoni, Patel, & Shah, 2019). Smisao upotrebe navedene klasifikacije je svrstavanje bolesnika u stadijume, specifične po lečenju i prognozi, kao i mogućnosti poređenja ishoda lečenja (Tabela 2). Na ovoj klasifikaciji, intenzivno se radilo još od sredine XX veka kada je i prvi TNM sistem postavljen od strane Pierre Denoix koji je prihvaćen u čitavom svetu za većinu solidnih tumora bez mogućnosti da se primenjuje na leukemije i tumore centralnog nervnog sistema. Ova klasifikacija je vremenom dalje razvijana i revidirana od strane Međunarodnog udruženja za borbu protiv raka i Udruženog američkog komiteta za rak, dok je poslednja revizija učinjena 2019. godine. Važno je napomenuti da je TNM klasifikacija zasnovana na podacima dobijenim pre lečenja. Ovi podaci se crpe iz kliničkog pregleda, biopsije i ostalih relevantnih pregleda. Za klasifikaciju tumora neophodno je ispuniti sledeće uslove: tumor mora biti patohistološki potvrđen, pri čemu se klasifikacija tumora usne duplje sprovodi samo u slučaju karcinoma, klasifikacija se sprovodi pre lečenja za bolesnike koji se javljaju prvi put i tada utvrđena klasifikacije se ne može naknadno menjati. Na osnovu podataka dobijenih pre lečenja se uspostavlja patološka klasifikacija (pTNM). Ova klasifikacija uključuje i dodatne podatke dobijene tokom hirurške operacije i histopatoloških pregleda preparata dostavljenih na analizu. Ciljevi TNM klasifikacije su: pružanje pomoći kliničarima u planiranju terapije, prognozi, proceni rezultata terapije, olakšavanje razmene informacija između zdravstvenih ustanova s obzirom da je lečenje karcinoma multidisciplinarno uključujući hirurge, interniste - onkologe i radioterapeute.

Tabela 1. TNM klasifikacija oralnog karcinoma [Prema (Zanoni et al., 2019)]

Primarni tumor (T)	
Tx	Primarni tumor se ne može ustanoviti
T0	Bez znakova primarnog tumora
Tis	Karcinom <i>in situ</i>
T1	Tumor veličine do 2cm
T2	Tumor veličine od 2 do 4cm
T3	Tumor veličine preko 4cm
T4a	Umereno uznapredovala lokalna bolest: <ul style="list-style-type: none"> ▪ usna - tumor zahvata kortikalni deo kosti, n. alveolaris inferior, pod usta, kožu lica ▪ usna duplja - tumor zahvata susedne strukture (na pr. kortikalni deo kosti, spoljašnje mišiće jezika, maksilarni sinus, kožu lica)
T4b	Veoma uznapredovala lokalna bolest: tumor zahvata mastikatorni prostor, pterigoidne nastavke, bazu lobanje, obavija a. karotis internu
Regionalni limfni čvorovi (N)	
Nx	Regionalni limfni čvorovi se ne mogu ustanoviti
N0	Bez znakova regionalnih limfnih čvorova
N1	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru čiji dijametar ne prelazi 3cm
N2	N2a Metastaza u ipsilateralnom limfnom čvoru čiji je dijametar veći od 3cm, a manji od 6cm N2b Metastaza u više ipsilateralnih limfnih čvorova, od kojih nijedan nije veći od 6cm N2c Metastaza u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima, od kojih nijedan nije veći od 6cm
N3	Metastaza u limfnom čvoru čiji je dijametar veći od 6cm
Udaljene metastaze (M)	
Mx	Udaljene metastaze se ne mogu ustanoviti
M0	Bez udaljene metastaze
M1	Udaljena metastaza postoji

Tabela 2. Klinički stadijumi oralnog karcinoma prema TNM klasifikaciji [Prema (Zanoni et al., 2019)]

Stadijum	Primarni tumor	Regionalni limfni čvorovi	Udaljene metastaze
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
IVA	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
IVB	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
	T (bilo koji)	N3	M0
	T4b	N (bilo koji)	M0
IVC	T (bilo koji)	N (bilo koji)	M1

1.1.7. Dijagnostika

Za postavljenje dijagnoze karcinoma usne duplje neizostavna je pažljivo uzeta anamneza, klinički pregled, radiografski i ultrazvučni pregledi, kompjuterizovana tomografija, magnetna rezonanca, pozitronska emisiona tomografija, biopsija i patohistološka verifikacija.

Anamneza definitivno predstavlja osnovu u procesu postavljanju dijagnoze jer je razgovor sa pacijentom nezamenljiv kako u onkologiji tako i u svim medicinskim granama. Kroz porodičnu anamnezu se može saznati za eventualnu genetičku predispoziciju za nastanak maligniteta. U ličnoj anamnezi se utvrđuje postoje li faktori rizika (pušenje, konzumiranje alkohola, ishrana, higijena usne duplje...) i u kojoj meri je pacijent njima izložen. U sadašnjoj bolesti se prikupljaju podaci o samoj bolesti, njenom početku, hronologiji, tegobama pacijenta i eventualnom prethodnom lečenju.

Klinički pregled se započinje inspekcijom kojom se dobijaju podaci o lokalizaciji, vrsti tumora, otvaranju usta i pokretljivosti jezika. Sledi palpacija kojom se utvrđuje pokretljivost tumora, ograničenost, konzistencija i odnos prema okolini. Pored palpacije samog tumora neophodno je palpirati vrat odnosno limfne čvorove zbog izražene sklonosti karcinoma usne duplje da metastaziraju u regionalne limfatike. Klinički pregled definitivno predstavlja najznačajniju metodu u postavljanju dijagnoze oralnog karcinoma.

Radiološka dijagnostika je pomoćna metoda kojom se dijagnostikuje infiltracija kosti usled širenja malignog tumora koje karakteriše osteolitički proces na okolne koštane strukture. U današnje vreme kada na raspolaganju imamo kompjuterizovanu tomografiju, ova dijagnostika u ove svrhe je potpuno izgubila na značaju.

Ultrazvuk je imao, ima i imaće široku primenu u dijagnostici tumora glave i vrata, primarno ga koristeći u dijagnostici regionalne proširenosti bolesti. Njegov najveći značaj je to što je dostupna, kratkotrajna, jeftina i zadovoljavajuće precizna dijagnostička metoda koja svakim danom i tehničkim usavršavanjem uređaja dobija na preciznosti podataka.

Kompjuterizovana tomografija (CT) predstavlja najinformativniju dijagnostičku proceduru za tumore glave i vrata. Ova metoda prilikom aplikacije kontrasta omogućava direktnu vizualizaciju tumora mekih tkiva, tumorsku infiltraciju kosti i širenje tumora u limfne čvorove vrata. Sve navedeno je od velikog značaj za preoperativnu procenu proširenosti tumora i detekciju eventualnih udaljenih metastaza.

Magnetna rezonanca (MR) ne emituje jonizujuće već radiofrekventno zračenje koje nema štetan uticaj na organizam, a što je čini podobnijom u odnosu na CT. Najpreciznije prikazuje strukturu mekih tkiva, a samim tim i granice proširenosti tumora na okolna tkiva i krvne sudove. Loša strana ove dijagnostičke metode je dužina pregleda, cena i nemogućnost sprovođenja na bilo kom pacijentu koji u sebi ima implant metalne strukture.

CT u odnosu na MR ima niz značajnih prednosti, koje se ogledaju u: dostupnosti, relativno nižoj ceni, lakšem izvođenju, kraćem trajanju pregleda, bolje prikazivanje koštanih struktura, visokokvalitetno snimanje u tri ravni sa 3D rekonstrukcijom, po potrebi se snimanje lako proširuje na endokranijum i toraks. Međutim, postoje i određeni nedostaci: slabije diferenciranje mekotkivnih struktura, upotreba jednog kontrasta, pojava artefakata uzrokovana zubnim plombama ili metalnim stranim telima, izlaganje jonizujućem zračenju.

Pozitronska emisiona tomografija (PET) funkcioniše po principu određivanja stepena metaboličke aktivnosti malignog tkiva koje se uvek razlikuje od zdravog. Glukoza je targetni molekul jer maligno tkivo pokazuje njen povećan utrošak u odnosu na zdravo i oslobađa produkte glikolize što se registruje kao pojačano nakupljanje radiofarmaka.

Biopsija je proces postavljanja definitivne dijagnoze putem hirurškog uzimanja uzorka tkiva na kom se radi patohistološka analiza. Utvrđuje se histološki tip karcinoma i stepen diferentovanosti. Klinasta incizionna biopsija predstavlja zlatni standard za uzorkovanje sa suspektnog dela promene na granici prema zdravom tkivu.

1.1.8. Lečenje

S obzirom da usna duplja sa svojim funkcijama ima važno mesto u socijalnom životu ljudi ugrožavanje bilo koje od njih direktno utiče na smanjenje kvaliteta života (Dimitrijevic, 2020). Ciljevi lečenja su: izlečenje od maligne bolesti, očuvanje ili ponovno uspostavljanje oblika i funkcije (kozmetika), očuvanje funkcije govora i gutanja, izbeći ili minimizirati negativne posledice lečenja, prevencija nastanka drugog primarnog tumora, očuvanje kvaliteta života. Za postizanje ovih ciljeva, raspoložive terapijske mogućnosti su: hirurgija, radioterapija, hemioterapija, kombinovani modaliteti lečenja, primarna i sekundarna prevencija.

Osnovni vid lečenja oralnog karcinoma je hirurški, osim ukoliko se pacijent nije javio u terminalnom stadijumu bolesti kada se takvi tumori proglašavaju kao inoperabilni i kada se mora pribeci drugim entitetima lečenja. Osnovni hirurški cilj je da se tumor ukloni u celosti, odnosno da se sa makroskopskim tkivom tumora odstrani i deo zdravog okolnog tkiva koje će za cilj imati prevenciju recidiva. Protokoli hirurškog lečenja nalažu da je ta granica 2cm do u zdravo tkivo ako je to moguće, ne ugroziti neku od vitalnih struktura glave i vrata. Eksciziju tumora prati i neki od tipova disekcije vrata. Faktori koju utiču na izbor hirurškog pristupa su veličina i lokalizacije tumora, dubina infiltracije, odnos sa donjom i gornjom vilicom, potreba za rekonstruktivnom hirurgijom. Pristup može biti intraoralni, ekstraoralni i kombinovani. Ukoliko se radi o T1 ili T2 tumoru kod kojih nemamo dijagnostičkim metodama potvrđene uvećane limfne čvorove na vratu, pristupa se selektivnoj disekciji kojom će nakon patohistološke analize preparata biti ili ne, potvrđeno prisustvo okultnih metastaza u limfnim čvorovima u 20-45% slučajeva (Dimitrijevic et al., 2004). Regionalne metastaze kod oralnog karcinoma predstavljaju značajan prognostički činilac, jer se petogodišnje preživljavanje umanjuje za 50% u odnosu na pacijente sa sličnim osobinama primarnog tumora bez sekundarnih depozita na vratu. Tumori tvrdog nepca i alveolarnog nastavka gornje vilice retko daju okultne cervikalne metastaze, zbog čega selektivna disekcija vrata nije indikovana.

Klasifikacija disekcija vrata:

- **selektivna disekcija vrata** podrazumeva odstranjivanje limfnih čvorova pojedinih vratnih regija, pri čemu se čuvaju nelimfatične strukture: supraomohoidna (anterolateralna) – odstranjuju se limfni čvorovi regija I-III; lateralna disekcija – odstranjuju se limfni čvorovi regije II-IV; posterolateralna disekcija – odstranjuju se limfni čvorovi regije II-V; anteriorna disekcija – odstranjuju se limfni čvorovi regije VI;
- **modifikovana radikalna disekcija** podrazumeva uklanjanje u celosti sve grupe limfnih čvorova regija I-V, pri čemu se čuvaju pojedine nelimfatične strukture: tip I – uklanjaju se u celosti limfni čvorovi regija I-V, a čuva n. accesorius; tip II – uklanjaju se u celosti limfni čvorovi regija I-V, a čuva n. accesorius i unutrašnja jugularna vena; tip III – uklanjaju se u celosti limfni čvorovi regija I-V, a čuvaju n. accesorius, unutrašnja jugularna vena i sternokleidomastoidni mišić;
- **radikalna disekcija vrata** podrazumeva uklanjanje u celosti svih grupa limfnih čvorova regija I-V i nelimfatične strukture: sternokleidomastoidni mišić, unutrašnja jugularna vena i n. accesorius;
- **proširena radikalna disekcija vrata** podrazumeva uklanjanje svih prethodno opisanih struktura u radikalnoj disekciji uz dodatne regije i nelimfatične strukture.

Ukoliko je tumorom zahvaćena i mandibula, što nije retko kod tumora poda usne duplje, ventralne strane jezika ili donjeg vestibuluma usta, stepen zahvaćenosti potvrđujemo ortopantomografijom i CT-om. Indikacije za marginalnu mandibulektomiju su: blizina tumora manja od 1cm, tumor zahvata gingivu ili periost, površna erozija korteksa, ukoliko nema invazije spongioze. Segmentna mandibulektomija je indikovana kod: značajne invazije kosti, invazije spongioze, velike zahvaćenosti okolnih mekih tkiva tumorom, pacijenata koji su zračeni, infiltracije n. alveolaris inferiora, značajne zahvaćenosti donje ivice mandibule.

Nakon radikalne hirurgije oralnog karcinoma usne, ponovno uspostavljanje oblika i funkcije predstavlja veoma važan deo lečenja, a postiže se odabirom odgovarajuće rekonstruktivne metode. Defekti tkiva mogu biti manji kod početnih stadijuma bolesti i oni se mogu zbrinuti direktnom suturom, slobodnim kožnim transplantatima ili zarastanjem per sekundam. Rekonstrukcija većih i složenijih defekata se izvodi lokalnim, regionalnim, udaljenim ili slobodnim mikrovaskularnim režnjevima, dok je kod segmentne mandibulektomije neophodna i rekonstrukcija koštanog tkiva kada koristimo titanijumske ploče, nevaskularizovane koštane transplantate kao i mikrovaskularne slobodne kompozitne režnjeve.

U lečenju pacijenata sa oralnim karcinomom, pored hirurškog lečenja se primenjuje i radio i hemioterapija. Radioterapija je neizostavni entitet lečenja oralnog karcinoma i može biti primarna, postoperativna, elektivna i palijativna. Kod pacijenata sa uznapredovalim inoperabilnim tumorom ili kod onih koji odbijaju hirurško lečenje, primenjuje se primarna radioterapija. Postoperativna radioterapija se primenjuje u skladu sa patohistološkim nalazom odnosno sa podacima o tačnoj veličini i proširenosti tumora. Elektivna radioterapija vrata je indikovana kod bolesnika sa klinički negativnim nalazom na vratu (N0), ako postoji visok rizik od okultnih cervikalnih metastaza. Palijativna radioterapija se sprovodi kod inkurabilnih tumora ili recidiva tumora, u cilju smanjenja tegoba i produženja života bolesnika.

Kod težih oblika bolesti se može primenjivati hemioterapija i to neoadjuvantna, konkomitantna i sistemska terapija. Uznapredovali i inoperabilni karcinomi usne duplje zahtevaju najpre primenu neoadjuvantne hemioterapije radi dovođenja u stanje hirurške i/ili radioterapijske kurabilnosti. Konkomitantna hemioterapija, koja podrazumeva hemioterapiju udruženu sa radioterapijom, se primenjuje postoperativno kod bolesnika sa visokim rizikom pojave lokoregionalnih recidiva. Tretman bolesnika sa razvojem udaljenih metastaza (jetra, pluća, medijastinum) podrazumeva primenu sistemske hemioterapije.

Praćenje ovih pacijenata mora biti sprovedeno u periodu od pet godina u kraćim vremenskim intervalima jer karcinomi regije usne duplje imaju visok rizik od pojave lokoregionalnih recidiva, a takođe i pojave novih primarnih tumora s obzirom da se u velikom procentu pacijenti ne odriču konzumacije faktora rizika i u rekonvalescentnom periodu.

1.1.9. *Genetička i epigenetička osnova razvoja oralnog karcinoma*

Razvoj novih preventivnih i terapeutskih pristupa u tretmanu pacijenata sa oralnim karcinomom zahteva dublje razumevanje osnova razvoja ovog maligniteta na molekularnom nivou i to na molekularno genetičkom i epigenetičkom nivou. U prilog tome govori činjenica da se oralni karcinom razvija i kod osoba koje nisu direktno izložene najčešćim faktorima rizika iz spoljašnje sredine, što nameće značaj izučavanja genetičke osnove. Izvesne nasledne bolesti i sindromi su povezane sa značajno većim rizikom za razvoj oralnog karcinoma. Tako na primer osobe koje imaju germinativne mutacije u *TP53* genu, tj. Li-Fraumeni sindrom, imaju značajno povećan rizik za razvoj oralnog karcinoma u ranijoj životnoj dobi (C. C. Li, Shen, Bavarian, Yang, & Bhattacharya, 2020). Bolesti hromozomske nestabilnosti, npr. Fankoni anemija i Blumov sindrom, se odlikuju brojnim aberacijama i nestabilnošću genetičkog materijala i povećanim rizikom za razvoj različitih

maliginiteta, uključujući oralni karcinom (Furquim, Pivovar, Amenábar, Bonfim, & Torres-Pereira, 2018; C. C. Li et al., 2020; G. S. Sarode, Batra, Sarode, Yerawadekar, & Patil, 2016).

Višegodišnje nagomilavanje genetičkih promena u brojnim genima, ali i epigenetičke izmene su identifikovane kao važni pokretači maligne transformacije višeslojnog pločastog epitela usne duplje što, zajedno sa izlaganjem faktorima rizika kao konačni ishod ima nastanak oralnog karcinoma. Na svim stupnjevima razvoja oralnog karcinoma, počevši od inicijacije, hiperplazije, slabe, umerene i teške displazije, karcinoma *in situ* i invazivnog karcinoma, su identifikovane promene u genetičkom materijalu.

Smatra se da je za inicijaciju, ali i metastaziranje oralnog karcinoma, odgovorna posebna populacija ćelija, koje se nazivaju kancer stem ćelije (engl. cancer stem cells - CSCs) (Naik, Panda, & Bhutia, 2017; Shin & Kim, 2018). Ove ćelije imaju odlike stem ćelija i mogućnost samoobnavljanja, kao i nekontrolisane deobe, a njihovom deobom nastaju klonovi koji su heterogeni. Kako su kancer stem ćelije neosetljive na standardne hemioterapeutike, njihovim prisustvom se može objasniti i visoka stopa recidiva kod pacijenata.

Genetičke i epigenetičke promene se mogu desiti u protoonkogenima, tumor supresor genima, genima uključenim u popravku oštećenja na molekulu DNK i dr. što sveukupno vodi razvoju fenotipskih odlika meligne ćelije, kao što su gubitak regulacije ćelijskog ciklusa, izbegavanje programirane ćelijske smrti (apoptoze), invadiranje okolnih tkiva i metastaziranje na udaljena mesta. Hromozomska nestabilnost, a posebno gubitak heterozigotnosti (engl. loss of heterozygosity – LOH) hromozoma 3p, 8p, 9p, 17p su česte posebno u inicijacionim fazama, ali i progresiji oralnog karcinoma (C. C. Li et al., 2020). LOH 17p, u okviru kog je lociran *TP53* gen, nosi veći rizik za razvoj oralnog karcinoma. Oko 80% pacijenata ima identifikovane mutacije koje dovode do gubitka funkcije *TP53* gena, koji zbog svoje značajne uloge u regulaciji ćelijskog ciklusa se još naziva čuvar genoma. Pored mutacija u *TP53* genu, mutacije u drugim ključnim genima su takođe identifikovane u oralnom karcinomu, npr. mutacije u *NOTCH*, *EGFR*, *CDKN2A*, *CCND1*, *RB*, *PTEN*, *PIK3CA* i drugi. Takođe, izvesni signalni putevi su izmenjeni o oralnom karcinomu, npr. PI3K/PTEN/AKT/mTOR signalni put. Genetički izmenjene ćelije u uznapredovalim fazama, karcinoma *in situ* i invazivnog karcinoma, počinju da luče različite faktore (matriksne metaloproteinaze MMP9, MMP13, vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), hemokine, slobodne radikale itd.) što dovodi do gubitka ćelijske adhezije, probijanja bazalne membrane i epitelno mezenhimske tranzicije (Rivera, 2015).

Kada je reč o epigenetičkim promenama, one predstavljaju sve one modifikacije ekspresije gena koje nisu uzorkovane izmenama u primarnoj sekvenci DNK i obuhvataju stepen metilovanosti gena (metilacije citozina u okviru CpG ostrvaca promotorskih regiona), hemijske modifikacije histona (npr. acetilacije i deacetilacije histona) i promenjenu ekspresiju nekodirajućih RNK molekula. Za sve navedeno je pokazana promena u oralnom karcinomu za brojne analizirane gene (Irimie, Ciocan, Gulei, Mehterov, & Atanasov, 2018; Shaw, 2006). S obzirom da su epigenetičke promene reverzibilne prirode, prepoznata je mogućnost dizajniranja terapeutika koji bi imali ulogu u resetovanju epigenetičkih oznaka.

Jedan od ciljeva ispitivanja genetičke i epigenetičke osnove oralnog karcinoma je bilo i utvrđivanje molekularnih biomarkera čijom primenom se mogu identifikovati osobe koje imaju povišen ili snižen rizik za razvoj oralnog karcinoma. Brojne varijante u različitim genima su povezane sa rizikom. U grupi ispitanika sa oralnim karcinomom iz Srbije, pokazano je da su genske varijante u *ADHIC* SspI genu povezane sa povišenim rizikom za razvoj oralnog karcinoma (Brocic et al., 2011), kao i geni koji su uključeni u funkcionisanje i metabolizam vitamina D (Zeljic et al., 2012), rs1570360 (-1154G/A) u *VEGF-A* genu (Supic, Jovic, Zeljic, Kozomara, & Magic, 2012). Od epigenetičkih izmena je utvrđena hipermetilovanost tumor supresora *E-cad* za E-kadherin (Supić, Kozomara, Branković-Magić, Jović, & Magić, 2009).

1.1.10. Važnost identifikacije novih biomarkera u oralnom karcinomu

Činjenice kojih je svestan svaki kliničar tj. hirurg koji se bavi ovom patologijom, a koje se ne mogu zanemariti, je da postoje značajne razlike u ishodima lečenja pacijenata sa apsolutno identičnim anamnestičkim, kliničkim, patohistološkim i radiološkim karakteristikama tumora. To se potencijalno može objasniti kroz različitost i specifičnost u genetičkom materijalu svakog pacijenta kod kojih se na različite načine manifestuje sam tok bolesti odnosno petogodišnje preživljavanje.

Kako je objašnjeno u prethodnim potpoglavljima uvoda ove doktorske disertacije, prva linija lečenja oralnog karcinoma je hirurgija, kojom se pored tumorskog tkiva uklanja i deo na 2cm okolnog makroskopski zdravog tkiva, takozvanih hirurških margina. Prema teoriji polja kancerizacije (engl. field of cancerization), predloženoj još 1953. godine (Slaughter, Southwick, & Smejkal, 1953) okolno netumorsko tkivo, iako na makroskopskom nivou histopatološki negativno, može pretrpeti izvesne genetičke i epigenetičke promene koje mogu voditi ponovnoj karcinogenezi, a koje ne mogu biti identifikovane klasičnim patološkim pristupima (Leemans, Braakhuis, & Brakenhoff, 2011; Supic, Kozomara, Jovic, Zeljic, & Magic, 2011). Podatak da se kod oko 30% pacijenata nakon operacije oralnog karcinoma javlja recidiv, ukazuje na osnovanost teorije polja kancerizacije (Hunter, Parkinson, & Harrison, 2005; Leemans et al., 2011). Iz navedenog se nameće zaključak, da histopatološko makroskopsko utvrđivanje zdravog tkiva nije dovoljno osetljivo. Stoga je neophodna identifikacija novih senzitivnijih molekularnih biomarkera koji bi omogućili precizniju distinkciju tumorskog od okolnog zdravog tkiva. Pored toga, identifikacija biomarkera koji imaju prognostički značaj, je od važnosti pri proceni toka bolesti i preživljavanja pacijenata.

Savremena naučna istraživanja su zbog svega prethodno navedenog usmerena na pronalaženje specifičnih i senzitivnih biomarkera, među koje spadaju i mikroRNK, kako u tumorskom tako i u peritumorskom zdravom tkivu, ne bi li se potvrdilo statistički značajno prisustvo nekih elemenata koje bi se mogli upotrebiti kao dijagnostički ili prognostički faktori, a koji bi dalje mogli da utiču na izmenu dosadašnjih protokola lečenja oralnog karcinoma. Do sada, ne postoje biomarkeri specifični za oralni karcinom.

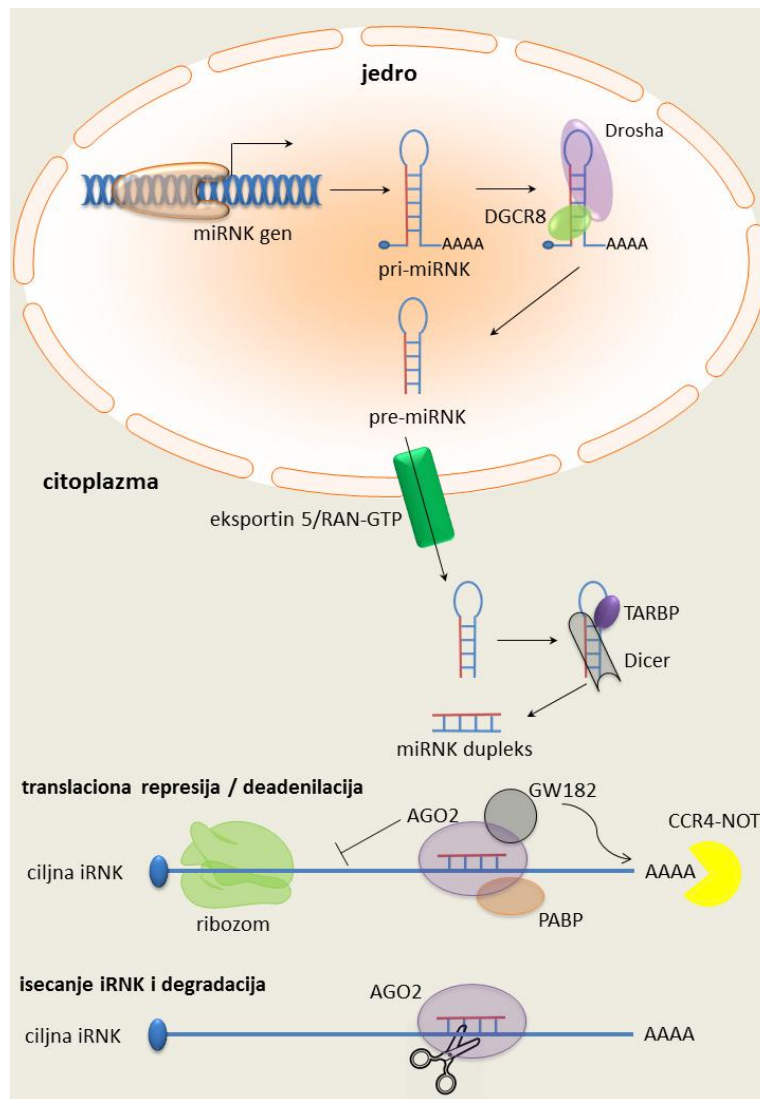
1.2. MikroRNK: biogeneza i mehanizam regulacije ekspresije ciljnih gena

Manji deo humanog genoma (~1,5%) je protein kodirajući, dok je znatno veća zastupljenost nekodirajućeg genoma koji ima važnu regulatornu ulogu. Regulatornu ulogu obavljaju nekodirajuće RNK - molekuli RNK koji se ne transliraju u proteine. U zavisnosti od njihove biogeneze, uloge i dužine lanca, nekodirajuće RNK se mogu klasifikovati u dve klase: male nekodirajuće RNK, čija je dužina od oko 18-200nt, i duge nekodirajuće RNK (engl. long non coding RNA – lncRNK) koje su duže od 200nt. Klasu malih nekodirajućih RNK čine tri osnovne grupe: male interferirajuće RNK (sngl. small interfering RNA - siRNK), mikro RNK i piwi interagujuće RNK (piRNK), pri čemu su mikroRNK (miRNK) najbolje proučene. U momentu njihovog otkrića, 1993. godine kada je identifikovana prva nekodirajuća RNK *lin-14* koja reguliše translaciju *lin-14* gena kod vrste *Caenorhabditis elegans* (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993; Olsen & Ambros, 1999), smatralo se da su male nekodirajuće RNK karakteristične samo za pojedine grupe organizama. Kasnija istraživanja, počevši od 2000. godine, su ukazala da je reč o velikoj grupi evoluciono očuvanih molekula koje su široko rasprostranjene kod eukariotskih organizama. MikroRNK su dosta dobro okarakterisana klasa nekodirajućih RNK i proučavane su kod brojnih organizama u vezi sa različitim biološkim procesima.

Mikro RNK su jednolančani RNK molekuli dužine oko 18-24nt, visoko evoluciono očuvani (Dexheimer & Cochella, 2020; V. N. Kim, Han, & Siomi, 2009). Regulatorna uloga miRNK je veoma široka, s obzirom da su gotovo svi biološki procesi regulisani posredstvom ovih molekula. Konkretno, proliferacija ćelija, diferencijacija, rast i razviće, programirana ćelijska smrt (apoptoza), odgovor na stres, metabolizam, angiogeneza i dr. su regulisane sa brojnim miRNK. Činjenica da je

oko 60% protein kodirajućih gena kod čoveka regulisano posredstvom miRNK ukazuje na značaj ovog vida regulacije ekspresije gena (Dexheimer & Cochella, 2020; Friedman, Farh, Burge, & Bartel, 2009). Prema podacima iz javno dostupne miRBase koja sadrži sve do sada identifikovane i anotirane miRNK sekvence kod različitih vrsta, kod čoveka je poznato preko 2 500 različitih miRNK (miRBase release 22.1, oktobar 2018.). Prema pravilima nomenklature, nazivu odgovarajuće miRNK prethodi troslovni ili četvoroslovni prefiks koji ukazuje o kojoj vrsti je reč. Za obeležavanje zrele miRNK kod čoveka se koristi prefiks *hsa-miR-*, nakon čega se označava broj miRNK i lanac sa kog je sintetisana (-5p ili -3p) (Griffiths-Jones, Grocock, van Dongen, Bateman, & Enright, 2006). Na primer, pun naziv jedne zrele miRNK kod čoveka bi bio: *hsa-miR-31-5p*. Kako je ova doktorska disertacija u oblasti medicinskih nauka i uključuje istraživanje na čoveku, za obeležavanje miRNK neće biti korišćen prefiks *hsa*.

Jednolančani mali nekodirajući molekuli, miRNK, nastaju složenim i visoko kontrolisanim procesom biosinteze koji se odvija u jedru i citoplazmi (Slika 3). miRNK geni su najčešće locirani u intronima protein kodirajućih i nekodirajućih gena, dok su neki i u egzonskim regionima. Transkripcijom miRNK gena enzimom RNK polimerazom II nastaje primarna miRNK (pri-miRNK) dužine od nekoliko stotina do nekoliko hiljada nukleotida koja je na 5' kraju zaštićena kapom, a na 3' kraju poliadenilatnim repom. Delovanjem mikroprocesorskog kompleksa, kog čini RNK endonukleaza Drosha i kofaktor DGCR8, primarni transkript se obrađuje i nastaje prekursorska RNK (pre-RNK) dužine ~70-100nt, koja se posredstvom proteinskog kompleksa Exportina 5/RAN-GTP transportuje u citoplazmu gde se nastavlja dalja obrada. Pre-miRNK će u citoplazmi biti obrađena delovanjem RNK endonukleaze Dicer i kofaktora TARBP čime nastaje miRNK dupleks, tj. dvolančana miRNK. miRNK dupleks ulazi u RISC kompleks u kom ulogu ima i AGO2 protein i tako nastali kompleks se naziva miRISC. Jedan lanac miRNK dupleksa će biti degradovan, pa se naziva lanac putnik (engl. passenger strand), dok preostali lanac ima ulogu u posttranskripcionom utišavanju ciljnih gena i naziva se vodeći lanac (engl. guide strand). Selekcija vodećeg lanca se vrši na osnovu termodinamičke stabilnosti na 5' kraju i najčešće je selektovan lanac koji ima manju stabilnost.



Slika 3. Kanonski put biosinteze miRNK i mehanizam regulacije ekspresije ciljnog gena. miRNK gen se transkribuje RNK polimerazom II i nastaje primarni transkript pri-miRNK koja se u jedru delovanjem DGCR8/Drosha obrađuje u pre-miRNK. Pre-miRNK se transportuje u citoplazmu preko eksportin 5/RAN-GTP kompleksa. U citoplazmi se pre-miRNK obrađuje TARBP/Dicer kompleksom i nastaje miRNK dupleks. miRNK dupleks sa AGO2 proteinom čini miRISC kompleks. Zrela sintetisana miRNK reguliše ekspresiju ciljnog gena isecanjem i degradacijom iRNK, translacionom represijom ili deadenilacijom u zavisnosti od stepena komplementarnosti miRNK-iRNK. [Izvor slike: (Zeljic, Supic, & Magic, 2017) modifikovano]

Svoju regulatornu ulogu miRNK ostvaruju na posttranskripcionom nivou tako što deluju kao negativni regulatori transkripcije ciljnih gena koji su regulisani posredstvom miRNK. Proces utišavanja ekspresije na taj način se naziva RNK interferencija. U osnovi regulacije ekspresije ciljnog gena se nalazi prepoznavanje regulatornih elemenata miRNK na 3'-UTR kraju transkribovane informacione RNK (iRNK) ciljnog gena od strane regiona semena (engl. seed), pozicijama 2-7nt na 5' kraju miRNK koji se vezuje po principu komplementarnosti za 3'-UTR kraj iRNK. Pored regiona semena, nukleotidi na pozicijama 8 i 13-16 takođe doprinose sparivanju sa iRNK. Stepen komplementarnosti miRNK-iRNK, tj. vezivanje može biti kompletno (potpuno) ili nekompletno (nepotpuno). Kompletno vezivanje rezultuje destabilizacijom, tj. isecanjem iRNK ciljnog gena od strane AGO2 i degradacijom, čime se njegova ekspresija snižava i to se može detektovati određivanjem nivoa ekspresije ciljnog gena. Ovo je najčešći vid regulisanja ekspresije od strane miRNK. Usled nekompletnog vezivanja regiona semena miRNK i 3'-UTR kraja iRNK, može doći do translacione represije narušavanjem inicijacionog kompleksa, što vodi izostanku translacije i posledično smanjenju nivoa proteinskog produkta. Takođe, usled inicijacije GW182 i PABP može doći i do deadenilacije polyA repa od strane regrutovanog deadenilacionog kompleksa CCR4/NOT. Deadenilacija podrazumeva gubitak ponovljenih adenina sa 3' kraja ciljne iRNK, čime

se gubi stabilnost iRNK. Složenost posttranskripcione regulacije ekspresije gena posredstvom miRNK molekula se može ilustrovati činjenicom da zbog relativno kratkih sekvenci prepoznavanja, jedna miRNK može regulisati ekspresiju velikog broja različitih gena, ali i ekspresija jednog gena može biti regulisana većim brojem različitih miRNK. Prema novijim podacima miRNK mogu učestvovati u regulaciji lncRNK, cirkularnih RNK i miRNK (Hill & Tran, 2021).

Usled promene ekspresije miRNK može doći do razvoja bolesti. Kod ljudi je posebno atraktivno izučavanje miRNK kao potencijalnih biomarkera različitih patoloških stanja, uključujući i maligne tumore. Potencijal miRNK molekula kao biomarkera je zasnovan na njihovoj velikoj stabilnosti i biološkim i hemijskim odlikama.

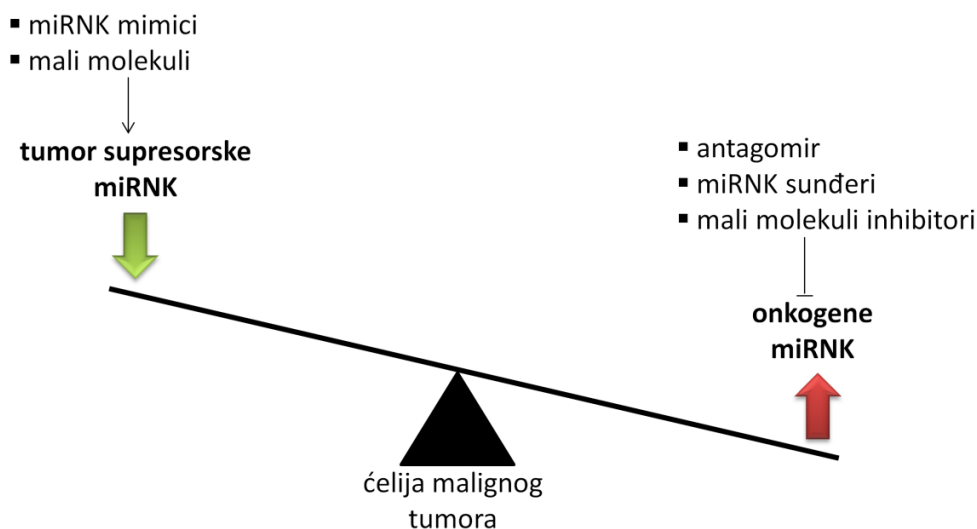
1.3. MikroRNK i maligni tumori

Za održanje ćelijske homeostaze je neophodna precizna kontrola nivoa miRNK. Poznato je da u izmenjenim fiziološkim uslovima u ćeliji dolazi do poremećaja aktivnosti, tj. do deregulacije ekspresije miRNK, što je važan činilac koji leži u osnovi patogeneze različitih bolesti čoveka. Prve studije koje su dovele u vezu deregulaciju miRNK i pojavu maligniteta datiraju s početka XXI veka. Jedan od prvih dokaza je bio da u B-ćelijskoj hroničnoj limfocitnoj leukemiji (engl. B-cell chronic lymphocytic leukemia – B-CLL) u više od 50% slučajeva deletiran hromozomski region 13q14 koji sadrži *miR-15a* i *miR-16-1* gene, koji su bili sniženo eksprimirani u B-CLL u poređenju sa zdravim tkivom (Calin et al., 2002). Od tada su se akumulirali brojni dokazi da je aberantna miRNK ekspresija veoma česta u malignim tumorima i smatra se da ona ne predstavlja posledicu maligne transformacije već uzrok, mada ima i stavova prema kojima može biti i posledica i uzrok. Imajući to u vidu, može se reći da deregulacija ekspresije miRNK predstavlja jedno od obeležja malignih ćelija, s obzirom da miRNK učestvuju u regulaciji svih odlika ćelije malignog tumora. Postoje različiti razlozi zbog kojih dolazi do deregulacije miRNK ekspresije u procesu maligne transformacije. Ćelije malignih tumora se odlikuju brojnim genetičkim promenama, genskim i hromozomskim mutacijama. Ukoliko je miRNK gen lociran u regionu koji je pretrpeo genetičke promene (delecije, duplikacije, amplifikacije, translokacije i dr.) ili je u tzv. fragilnim mestima, to za posledicu može imati izmenjenu ekspresiju miRNK gena (Bracken, Scott, & Goodall, 2016; Y. S. Lee & Dutta, 2009). Pored toga, epigenetičke promene miRNK gena, ali i poremećaji u složenom procesu biogeneze miRNK, npr. gubitak ili mutacije u genima *Dicer* i *Drosha*, se mogu odraziti na poremećenu ekspresiju miRNK (Bracken et al., 2016; Di Leva, Garofalo, & Croce, 2014; Y. S. Lee & Dutta, 2009). Prisustvo genskih varijanti, tj. izmena jednog nukleotida u miRNK genima se može odraziti na nivo sintetisane zrele miRNK i njenu funkciju (Ryan, Robles, & Harris, 2010). Pored toga, postojanje genskih varijanti u sekvenci 3'-UTR iRNK mogu uticati na miRNK funkciju.

MikroRNK koje imaju povećanu ekspresiju u malignom tumoru u poređenju sa neizmenjenim tkivom se nazivaju onkogenima ili onkomir (Di Leva et al., 2014), Slika 4. Onkogene miRNK negativno regulišu ekspresiju tumor supresorskih gena (B. Zhang, Pan, Cobb, & Anderson, 2007). Njihova onkogena uloga se manifestuje kroz indukciju proliferacije, pospešivanje rasta, invazije i metastaze ćelija (Inoue & Inazawa, 2021). Snižena ekspresija miRNK u malignom tumoru ukazuje na njihovu tumor supresorsku ulogu (Di Leva et al., 2014). Ove miRNK negativno regulišu ekspresiju onkogenih gena (B. Zhang et al., 2007). Rastući je broj dokaza koji ukazuju da uloga jedne miRNK može biti kompleksnija i zavisiti od biološkog konteksta, tj. tipa tumora. Postoje miRNK za koje je pokazano da imaju dualnu ulogu, tj. mogu delovati kao onkomir ili kao tumor supresorske miRNK u različitim tipovima maligniteta. Upravo iz tog razloga je potpuno opravdano i neophodno ispitivati kandidat miRNK kao potencijalne biomarkere u odgovarajućem kontekstu, tj. tumoru, s obzirom da uloga konkretne miRNK ne mora biti univerzalna. Dodatno, svaki tumor ima svoj specifični miRNK potpis, miRNom, koji može odražavati kliničkopatološke karakteristike, tip kao i poreklo tumorskog tkiva (Di Leva et al., 2014; Y. S. Lee & Dutta, 2009). Brojni su dokazi koji

potvrđuju da se utvrđivanjem miRNoma može vršiti veoma precizna molekularna klasifikacija različitih tumora, kao i razlikovanje tumorskog od netumorskog tkiva.

Pored onkomir i tumor supresor miRNK, može se izdvojiti grupa miRNK koje učestvuju u posttranskripcionoj regulaciji ekspresije gena od značaja za epigenetičku regulaciju, npr. gena za DNK metil transferaze (DNMT), histon deacetilaze (HDAC). Te miRNK se još nazivaju epi-miRNK (Ramassone, Pagotto, Veronese, & Visone, 2018).



Slika 4. Šematski prikaz izmenjene ekspresije onkogenih i tumor supresorskih miRNK u ćeliji malignog tumora. U narušenoj homeostazi ćelije malignog tumora dolazi do deregulacije ekspresije miRNK i to tako što onkogene miRNK imaju povišenu ekspresiju, dok tumor supresorske miRNK imaju sniženu ekspresiju u poređenju sa neizmenjenim stanjem. Homeostaza se potencijalno može uspostaviti resetovanjem deregulisane ekspresije onkomir i tumor supresor miRNK. Delovanjem antagomir, miRNK sunderima i malim inhibitorim molekulima se može inhibitorno delovati na ekspresiju onkogenih miRNK. S druge strane povećavanje ekspresije tumor supresorskih miRNK i vraćanje na normalni nivo se postiže miRNK mimicima i delovanjem određenih malih molekula. [Izvor slike: prema: (Fu et al., 2021), modifikovano]

Sa intenzivnim razvojem molekularno bioloških metoda, kao i baza podataka o ekspresiji gena, uključujući i miRNK, omogućen je relativno brz i efikasan način za utvrđivanje deregulisanih miRNK u različitim patološkim stanjima kod ljudi, ali i ispitivanje funkcije miRNK. Uporedni razvoj bioinformatike i bioinformatičkih pristupa u analizi bioloških podataka, je omogućio *in silico* analize i predikcije potencijalnih targeta miRNK bez sprovođenja eksperimenata u laboratorijskim uslovima (Pirrò, Matic, Colizzi, & Galgani, 2021). Ispitivanje miRNK u malignim tumorima je pored fundamentalnog značaja rasvetljavanja molekularno genetičke prirode maligniteta otvorilo i široko polje mogućnosti primene rezultata takvih istraživanja. Sveukupno, prepoznat je značaj usmeravanja ovakvih istraživanja u kliničkoj praksi, radi daljeg unapređenja dijagnostičkih, prognostičkih i terapijskih pristupa pacijentima obolelih od različitih tipova malignih tumora.

Intenzivna akumulacija podataka koji se odnose na deregulisane miRNK u različitim malignim tumorima, neretko ukazuje da su podaci veoma nekonzistentni između studija za isti tip maligniteta. Ta činjenica svakako opravdava sprovođenje meta-analiza kao istraživačkog pristupa za dobijanje što preciznijih i konzistentnijih podataka o deregulisanim miRNK za konkretan tip malignog tumora.

1.3.1. MikroRNK kao molekularni biomarkeri i terapeutici u malignim tumorima

Postoji velika potreba da se identifikuju novi, senzitivni, stabilni i pouzdani molekularni biomarkeri koji se mogu koristiti za preciznije uspostavljanje dijagnoze i prognoze bolesti, ali i imati prediktivni značaj u proceni odgovora na primenjenu terapiju ili i sami biti terapijski agensi.

Zbog svojih jedinstvenih fizičko-hemijskih karakteristika, kao i stabilnosti u tkivima i telesnim tečnostima, miRNK već dugo vremena zadobijaju veliku pažnju istraživača u kontekstu različitih patologija čoveka, među kojima su maligne bolesti.

miRNK molekuli se mogu pakovati u vanćelijske vezikule i oslobađati iz ćelije u vanćelijsku tečnost – cirkulaciju (Barger, Rahman, Jackson, Acunzo, & Nana-Sinkam, 2016). Svi tipovi ćelija sekretuju vanćelijske vezikule i njihov sadržaj oslikava fiziološko i patološko stanje ćelije. miRNK zaštićene unutar egzozomalnih vezikula pokazuju veliku stabilnost u telesnim tečnostima, plazmi i serumu (H. Wang, Peng, Wang, Qin, & Xue, 2018). Upravo to je jedan od razloga što se ove miRNK smatraju najboljim kandidatima za biomarkere različitih patoloških stanja. Pored toga, miRNK pokazuju i stabilnost u drugim telesnim tečnostima, npr. limfi, pljuvački, urinu, semenoj tečnosti i dr., kao i u tkivima (H. Wang et al., 2018). Veliki broj različitih bioloških uzoraka je na raspolaganju kada je reč o određivanju relativne ekspresije različitih miRNK gena i u zavisnosti od potrebe i dizajna istraživanja će različiti uzorci i biti korišćeni. Ekspresija miRNK se može utvrđivati i sa ciljem preciznije podklasifikacije nekog tipa malignog tumora, kao i za diskriminaciju tumorskog od okolnog netumorskog tkiva. To je razlog zbog kog su veoma aktuelna istraživanja miRNK ekspresionih potpisa karakterističnih za neki određeni tip maligniteta.

Neretko se dešava da jedna miRNK nema dovoljno visoku specifičnost i senzitivnost kao molekularni biomarker dijagnoze i/ili prognoze bolesti. Radi povećanja dijagnostičke i prognostičke preciznosti, istraživači sve češće pribegavaju razmatranju većeg broja miRNK istovremeno, tzv. miRNK panela kao biomarkera, kao i kombinovanja miRNK sa nekim tradicionalno korišćenim tumorskim biomarkerima (H. Wang et al., 2018).

Saznanje da se ekspresija miRNK može modifikovati i na taj način reprogramirati fenotipske odlike maligne ćelije pokrenulo je razvoj novih pristupa u terapiji malignih tumora (Fu et al., 2021; Garzon, Marcucci, & Croce, 2010). Korišćenje sintetisanih miRNK molekula kao terapeutika podrazumeva svojevrsno vraćanje poremećene aktivnosti miRNK u inicijalno stanje. Primenom antagomir-ova se može inhibirati dejstvo onih miRNK koje su povišeno ekspimirane, dok se primenom miRNK mimika može uticati na povećanje ekspresije sniženo regulisanih miRNK, Slika 4 (Fu et al., 2021). Najveći izazovi za razvoj terapeutika baziranih na miRNK su pronalaženje najoptimalnijeg vida isporuke miRNK na potrebno mesto dejstva, javljanje neželjenih promena i obezbeđivanje potpune sigurnosti primene (Garzon et al., 2010; Toden, Zumwalt, & Goel, 2021).

1.3.2. MikroRNK i oralni karcinom

Oralni karcinom, kao i svi drugi tipovi malignih tumora, se odlikuje poremećenom aktivnošću miRNK u poređenju sa neizmenjenim tkivom, na šta ukazuju rezultati brojnih studija (Manasa & Kannan, 2017). U jednom od skorije publikovanih revijskih prikaza deregulisanih miRNK u oralnom karcinomu su izdvojene brojne miRNK (D'Souza & Kumar, 2020). U studijama u kojima je primenom visokopropusnih platformi utvrđivan miRNom oralnog karcinoma se uočavaju nekonzistentnosti u pogledu identifikovanih miRNK (Zeljic et al., 2018). Poznavanje jedinstvenog ekspresionog potpisa deregulisanih miRNK u oralnom karcinomu ima višestruki značaj. Pored toga što se njihovim izučavanjem dobija bolji uvid u molekularno genetičku osnovu razvoja i progresije oralnog karcinoma, tako se mogu pronaći novi molekularni biomarkeri koji bi omogućili precizniju dijagnozu i prognozu bolesti, ali i identifikovati targeti za terapiju. Sve su to neophodni koraci koje je potrebno ispuniti da bi se unapredila klinička praksa i razvili novi terapijski pristupi u tretmanu oralnog karcinoma.

Najveći broj istraživanja iz oblasti miRNK i oralnog karcinoma se zasniva na ispitivanju ekspresije i/ili funkcije pojedinačnih miRNK i njihovih target gena. Sve su brojnije studije u kojima se ispituje dijagnostički i prognostički potencijal miRNK kao biomarkera (J. Wang et al., 2021).

Ispitivanja ekspresije pojedinačnih miRNK su do sada publikovana i u grupi pacijenata sa oralnim karcinomom iz Srbije (Supic et al., 2022; Supic et al., 2018).

Kako molekuli miRNK učestvuju u regulaciji svih odlika ćelije malignog tumora, pokazano je da miRNK imaju značajnu ulogu u inicijaciji i progresiji oralnog karcinoma. Rastući je broj eksperimentalnih potvrda asocijacije različitih miRNK sa proliferacijom, apoptozom, epitelijalnom mezenhimskom tranzicijom, invazijom i migracijom, metastazom, rezistencijom na hemioterapeutike, radiorezistencijom i radiosenzitivnošću oralnog karcinoma (Rishabh, Khadilkar, & Kumar, 2021). Sumiran prikaz je dat u Tabeli 3.

Tabela 3. miRNK koje su identifikovane kao regulatori odlika ćelija oralnog karcinoma [Prema (Rishabh et al., 2021)]

Odlika ćelije malignog tumora	Povišeno eksprimirane miRNK	Sniženo eksprimirane miRNK
Proliferacija	<i>miR-21, miR-223, miR-650, miR-155, miR-455-5p, miR-543, miR-204-5p, miR-5100, miR-221</i>	<i>miR-22a-3p, miR-27b-5p, miR-372-5p, miR-101-3p, miR-381-3p, miR-106a, miR-494, miR-22, miR-107, miR-184, miR-655-3p, miR-194, miR-375, miR-99a-5p, miR-299-3p</i>
Apoptoza	<i>miR-4513, miR-543</i>	<i>miR-205, miR-139, miR-376-3p, miR-203, miR-1-3p, miR-29a, miR-26a, miR-9, miR-299-3p</i>
Epitelno mezenhimska tranzicija	<i>miR-29b-1-5p, miR-134, miR-155, miR-155-5p</i>	<i>miR-106a, miR-27a-3p</i>
Invazija i migracija	<i>miR-10b, miR-29b, miR-5100, miR-196b, miR-543, miR-211, miR-382-5p</i>	<i>miR-17, miR-101-3p, miR-377, miR-199a-5p, miR-216a, miR-148a, miR-375, miR-22</i>
Metastaze	<i>miR-21, miR-497, miR-21-3p, miR-654-5p</i>	<i>miR-338, miR-98, miR-491-5p, miR-200c, miR-101, miR-138-5p, miR-204-5p</i>
Hemio i radio rezistencija	<i>miR-21, miR-221, miR-494-3p, miR-155, miR-1246, miR-218, miR-654-5p</i>	<i>miR-375, miR-125b</i>

Kada je reč o miRNK identifikovanim kao biomarkeri koji su pogodni za klasifikaciju pacijenata sa oralnim karcinomom od zdravih osoba, u studijama se pominju, da imenujemo samo neke od njih: *miR-27b, miR-136* (Momen-Heravi, Trachtenberg, Kuo, & Cheng, 2014), *miR-21, miR-375* (Momen-Heravi et al., 2014). Spisak je daleko veći i objedinjeni nalazi su predstavljeni u Tabeli 4.

Brojni su dokazi koji potvrđuju da miRNK mogu imati prognostičku ulogu u oralnom karcinomu. U srpskoj grupi pacijenata je pokazano da je povišena ekspresija *miR-183* gena povezana sa rizikom za loš ishod bolesti i kraćim ukupnim preživljavanjem pacijenata sa karcinomom jezika, što ukazuje na potencijal korišćenja ove miRNK kao prognostičkog biomarkera (Supic et al., 2018). Snižena ekspresija *miR-34b/c* je takođe identifikovana kao prognostički biomarker lošijeg preživljavanja HPV negativnih pacijenata sa oralnim karcinomom (Supic et al.,

2022). Duže ukupno preživljavanje su imali pacijenata sa povišenom ekspresijom *miR-99a* za koju je potvrđeno da može biti nezavisni prognostički indikator (L. Chen et al., 2018), a *miR-455-5p* se u literaturi pominje kao prognostički biomarker (C. M. Cheng, Shiah, Huang, Hsiao, & Chang, 2016).

U Tabeli 4 je dat pregled miRNK koje su u prethodnom periodu identifikovane kao potencijalni dijagnostički i prognostički biomarkeri oralnog karcinoma. Važno je naglasiti da u zavisnosti od korišćenog literaturnog izvora, kao i primenjenih kriterijuma za popis miRNK, ova lista miRNK se može razlikovati među publikacijama.

Tabela 4. miRNK koje su identifikovane kao dijagnostički i prognostički biomarkeri u oralnom karcinomu. Ekspresija miRNK koje su identifikovane kao dijagnostički biomarkeri je određivana u različitim biološkim uzorcima i to tkivu, serumu, plazmi ili pljuvački [Prema (J. Wang et al., 2021)]

Biomarker	Povišeno eksprimirane miRNK	Sniženo eksprimirane miRNK
Dijagnostički	<i>miR-21, miR-24-3p, miR-31-5p, miR-512-3p, miR-412-3p, miR-222-3p, miR-150-5p, miR-423-5p, miR-548b, miR-18a, miR-183, miR-483-5p, miR-125b, miR-184, miR-196a, miR-196b, miR-494, miR-3651, miR-27b, miR-155, miR-221, miR-16, let-7b</i>	<i>miR-3651, miR-99a, miR-542-3p, miR-375, miR-139-5p, miR-145, miR-186, miR-136, miR-191, miR-333-3p, miR-29a, miR-223</i>
Prognostički	<i>miR-99a, miR-99b-3p, let-7i-3p</i>	<i>miR-183, miR-100-5p, miR-29b-1-5p, miR-503-5p</i>

Tabela 5. Deregulisane miRNK koje su povezane sa kliničkopatološkim odlikama i prognozom pacijenata sa oralnim karcinomom [Prema (Yete & Saranath, 2020)]

Kliničkopatološka odlika / prognoza	Povišeno eksprimirane miRNK	Sniženo eksprimirane miRNK
Lokacija tumora	<i>miR-21, miR-31</i>	<i>let-7f</i>
Veličina tumora	<i>miR-155, miR-183, miR-223</i>	<i>miR-26a, miR-32, miR-99a, miR-126, miR-143, miR-375</i>
Nodalni status	<i>miR-21, miR-29b, miR-143-3p, miR-144, miR-155, miR-203, miR-211, miR-223, miR-504, miR-1275</i>	<i>miR-17, miR-20a, miR-26a, miR-32, miR-125a, miR-126, miR-153, miR-200c, miR-375</i>
Stadijum	<i>miR-21, miR-29b, miR-31, miR-155, miR-183, miR-223, miR-504</i>	<i>miR-17, miR-20a, miR-32, miR-125a, miR-126, miR-143, miR-375</i>
Recidiv	<i>miR-21, miR-29b, miR-96, miR-130b, miR-183, miR-141</i>	<i>let-7d, miR-34a, miR-542-3p</i>
Prognoza	<i>miR-21, miR-29b, miR-31, miR-155, miR-183, miR-211</i>	<i>let-7d, miR-17, miR-20a, miR-26a, miR-32, miR-125a, miR-126, miR-137, miR-153, miR-200c, miR-375</i>

Različite miRNK su povezane sa kliničkopatološkim odlikama pacijenata sa oralnim karcinomom što je prikazano u Tabeli 5 (Yete & Saranath, 2020).

S obzirom da oralni karcinom uključuje tumore na različitim anatomskim lokacijama unutar usne duplje, izvesne genetičke i fiziološke heterogenosti mogu postojati između različitih mikrolokacija. Pokazano je i da izvesne miRNK imaju različitu ekspresiju u oralnom tumoru u zavisnosti of anatomske lokacije (Priya et al., 2021). Stoga je prilikom izučavanja uloge miRNK u oralnom karcinomu važno uzeti i ovaj podatak u obzir.

U kliničkoj praksi tretmana pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim karcinomom je prepoznata potreba za pronalaženje novih senzitivnih neinvazivnih molekularnih biomarkera koji bi imali dijagnostički i prognostički značaj (Brinkmann et al., 2011). Iako je dosta napretka učinjeno u dijagnozi, terapiji i prognozi pacijenata, preživljavanje u petogodišnjem periodu od inicijalnog postavljanja dijagnoze je i dalje oko 50%. Istovremeno, kod visokog procenta pacijenata (~30%) se javljaju i recidivi nakon ekscizije tumora iz usne duplje (Capote-Moreno et al., 2020). Identifikacija novih molekularnih biomarkera bi mogla da doprinese značajnom poboljšanju pri ranoj dijagnostici oralnog karcinoma, tretmana pacijenata i prognoze bolesti. Kao što je prethodno ilustrovano, mnoge studije ukazuju da je veliki broj miRNK koje mogu biti biomarkeri oralnog karcinoma. Imajući u vidu da postoji preko 2 500 identifikovanih humanih miRNK, ispitivanje pojedinačnih miRNK bi predstavljalo vremenski zahtevan posao. Razvoj i primena visokopropusnih platformi (sekvenciranje nove generacije, mikroereji) je značajno ubrzala taj proces. Budući da su rezultati studija koje su ispitivale masovnu ekspresiju miRNK visokopropusnim tehnikama veoma nekonzistentni i heterogeni, neophodno je iz postojećeg korpusa identifikovanih dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu napraviti listu najčešće dereguliranih miRNK koje odlikuju ovaj tip malignog tumora. Na taj način bi se mogao dobiti tzv. miRNK potpis karakterističan za oralni karcinom, na osnovu kog se mogu vršiti dalja fokusiranja ispitivanja pojedinačnih miRNK, njihovog dijagnostičkog i prognostičkog značaja i njihove veze sa inicijacijom, razvojem i progresijom oralnog karcinoma.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Definisan je osnovni cilj istraživanja: utvrditi najčešće deregulisane miRNK u oralnom karcinomu i ispitati njihov dijagnostički i prognostički značaj. Iz postavljenog opšteg cilja doktorske disertacije, proistekli su sledeći specifični ciljevi istraživanja:

- Sprovođenje meta-analize ranije publikovanih radova u kojima je ispitivana ekspresija miRNK u tkivu oralnog karcinoma i odgovarajućem netumorskom tkivu poreklom od istog pacijenta nekom od visokopropusnih metoda.
- Kreiranje liste (meta potpis) najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu na osnovu rezultata meta-analize.
- *In silico* karakterizacija meta potpisa utvrđivanjem statistički značajnih bioloških procesa i molekularnih puteva obogaćenih genima čija je ekspresija regulisana od strane miRNK iz meta potpisa.
- Odabir miRNK za validaciju na kliničkim uzorcima na osnovu njihove uloge utvrđene u prethodnoj *in silico* analizi.
- Utvrđivanje nivoa ekspresije odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma u tumorskom tkivu i odgovarajućem okolnom netumorskom tkivu poreklom od istog pacijenta.
- Ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog značaja odabranih miRNK kandidata iz meta potpisa.
- Ispitivanje povezanosti ekspresije odabranih miRNK sa demografskim odlikama pacijenata (pol, starost, upotreba alkohola, pušački status, oralna higijena).
- Ispitivanje povezanosti ekspresije odabranih miRNK sa kliničkopatološkim odlikama pacijenata (lokacija primarnog tumora, histološki gradus, stadijum tumora, veličina tumora, nodalni status, prisustvo metastaza, recidiv, smrtni ishod).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Etički aspekti

Izvođenje studije je odobrio Etički komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u skladu sa Helsinškom deklaracijom (redni broj odobrenja 1550/VII-6). Pacijentima sa oralnim karcinomom, lečenih i operisanih na Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u periodu od januara 2018. do marta 2021. godine, ponuđeno je učešće u ovoj studiji. Svi pacijenti su dobili sve potrebne informacije o istraživanju pismenim i usmenim putem. U studiju su uključeni samo oni pacijenti koji su dali dobrovoljni potpisan informisani pristanak. Svi biološki uzorci i prikupljeni podaci o ispitanicima su anonimizirani i čuvani u elektronskom dokumentu zaštićenim šifrom. Samo su ordinirajući lekar i istraživač doktorand imali pristup podacima. Čuvanje i korišćenje prikupljenih podataka je vršeno u skladu sa Zakonom o zaštiti podataka o ličnosti Republike Srbije (Službeni glasnik RS, br. 87/2018).

3.1.2. Studijska grupa i biološki uzorci

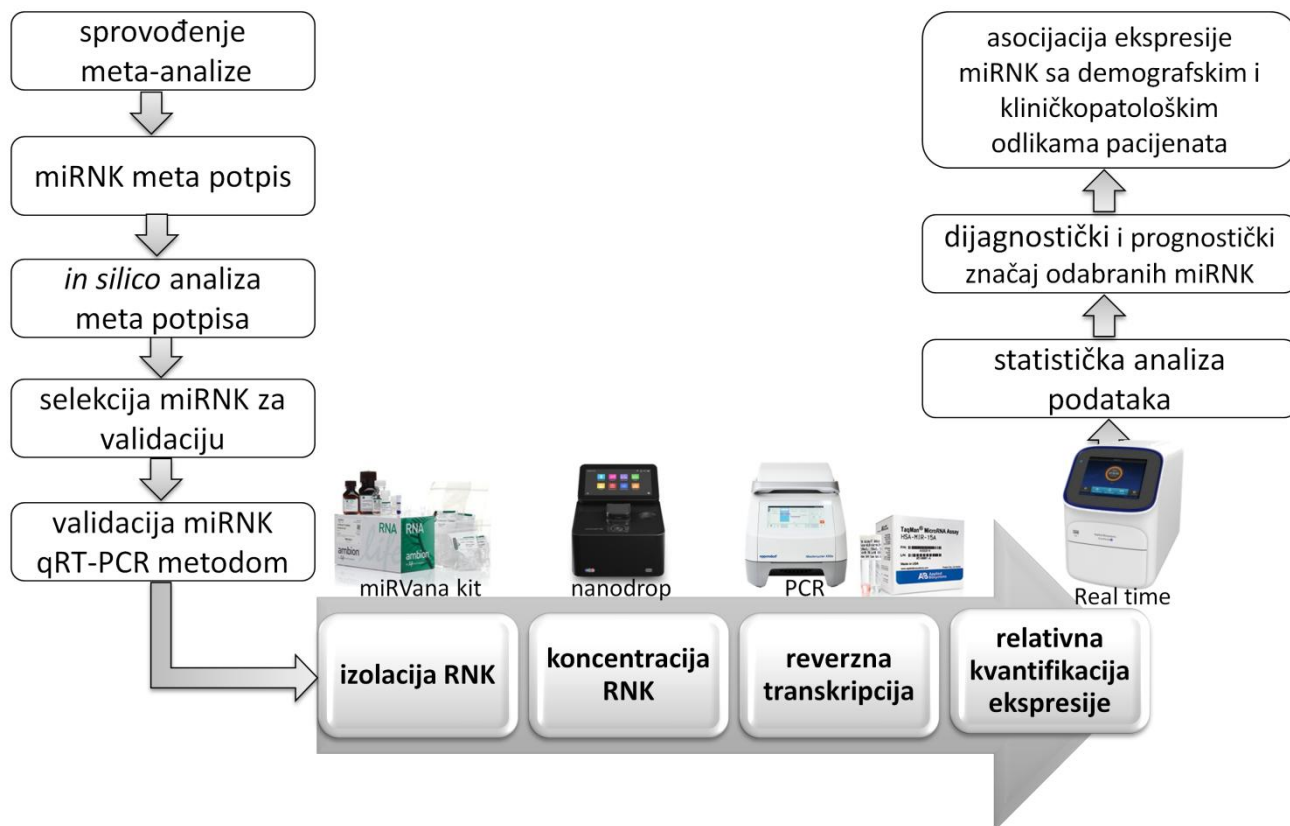
U ovu studiju su bili uključeni pacijenti sa dijagnostikovanim oralnim karcinomom, lečeni na Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Pacijenti kod kojih se karcinom javio na jednoj od tri lokacije i to: jezik, pod usne duplje i tvrdo nepce. Od svakog pacijenta je u toku ekscizije tumora uzet deo tumorskog tkiva i odgovarajućeg okolnog histopatološki neizmenjenog tkiva, najmanje 2cm do u zdravo tkivo (tzv. hirurških margina). Uzorak tumorskog tkiva i odgovarajućeg okolnog netumorskog tkiva su smešteni u odvojene plastične tube i potopljeni u rastvor RNAlater[®] (Ambion, Autin, SAD). Svrha čuvanja tkiva u ovom rastvoru je čuvanje stabilnosti tkivne RNK i njene zaštite od degradacije enzimima ribonukleazama. Prikupljeni biološki uzorci od svakog pacijenta su čuvani na -80°C, do momenta izolacije ukupne RNK.

Od ispitanika uključenih u studiju su iz istorije bolesti prikupljeni sledeći demografski podaci: pol, godine starosti u momentu postavljanja dijagnoze, konzumacija alkohola (ne pije, umereno, mnogo), pušački status (nepušač, bivši pušač, pušač) i oralna higijena (dobra, loša). Pacijenti koji su pušenje ostavili najmanje pet godina pre nego što im je dijagnostikovano oralni karcinom su svrstani u grupu nepušača. Pacijenti koji su svakodnevno konzumirali više od dva pića, svrstavani su u grupu visokog unosa alkohola. Oralna higijena je procenjivana kao dobra ili loša na osnovu prisutnih naslaga, kamenca, inflamiranih desni i prisustva paradontopatija. Za pacijente uključene u studijsku grupu su prikupljeni kliničkopatološki podaci: mesto primarnog tumora, histološki gradus, TNM stadijum tumora, veličina tumora, nodalni status, prisustvo metastaza, pojava recidiva, terapija (radioterapija, hemioterapija) i preživljavanje u mesecima do smrti od bolesti. Klasifikaciju tumorskog tkiva su radili specijalisti patologije prema uputstvima datim u 8. izdanju vodiča *Union for International Cancer Control Staging Manual*. Poslednji follow-up pacijenata je rađen u aprilu 2021. godine.

3.2. Metode

3.2.1. Eksperimentalni dizajn

Eksperimentalni dizajn ove doktorske disertacije je predstavljen šematski na Slici 5. U narednim potpoglavljima će svaki korak biti detaljnije objašnjen.



Slika 5. Šematski prikaz dizajna doktorske disertacije. Prikazani su ključni koraci u realizaciji doktorske disertacije. Početni korak je prikazan na levoj strani, a poslednji na desnoj strani, između kojih strelice upućuju na tok koraka po redosledu. [Izvor slike: G. Stojković]

3.2.2. Pretraga literature i kriterijumi za uključivanje studija u meta-analizu dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu

Pretraga literature je rađena u PubMed bazi. Za pretragu su korišćene različite kombinacije ključnih reči na engleskom jeziku: *miR*, *miRNA*, *microRNA*, *oral*, *cancer*, *carcinoma squamous cell carcinoma*, *tumor*, *tumour*, *profile*, *profiling*, *signature*. Poslednji datum pretrage je bio 30.07.2020. godine, nakon čega je pristupljeno detaljnoj analizi selektovanih publikacija.

Kriterijumi za uključivanje prethodno publikovanih studija u meta-analizu su bili isti kao i u ranije sprovedenoj meta-analizi srpske grupe istraživača (Zeljic i sar, 2018). Razmatrane su samo studije publikovane na engleskom jeziku koje su publikovane nakon ranije urađene meta-analize, studije koje su se bavile profilisanjem diferencijalno eksprimiranih miRNK u tkivu oralnog tumora u poređenju sa okolnim netumorskim tkivom poreklom od istog pacijenta i studije koje su imale jasno prikazanu listu značajno diferencijalno eksprimiranih miRNK u oralnom karcinomu sa naznačenim graničnim (engl. cut-off) vrednostima koje su korišćene. U ovoj doktorskoj disertaciji nisu razmatrane studije koje su za istraživanja koristile podatke objavljene u javno dostupnim bazama, kao što je GEO (engl. gene expression omnibus) i TCGA (engl. the cancer genome atlas), niti su uzimani ili zahtevani izvorni podaci (engl. raw data) iz publikacija. Ukoliko je u studiji drugi

tip uzorka poreklom od pacijenta sa dijagnostikovanim oralnim karcinomom rađen, npr. pljuvačka (saliva), periferna krv, plazma, serum, takve studije nisu uključene u meta-analizu.

Pored sedam studija koje su ranije uvrštene u prethodno publikovanoj meta-analizi, tri nove studije su ispunile postavljene kriterijume za uključivanje i objedinjena je grupa od deset studija koje su uključene u novu ažuriranu meta-analizu.

3.2.3. *Meta-analiza, in silico karakterizacija miRNK meta potpisa i izbor miRNK za validaciju*

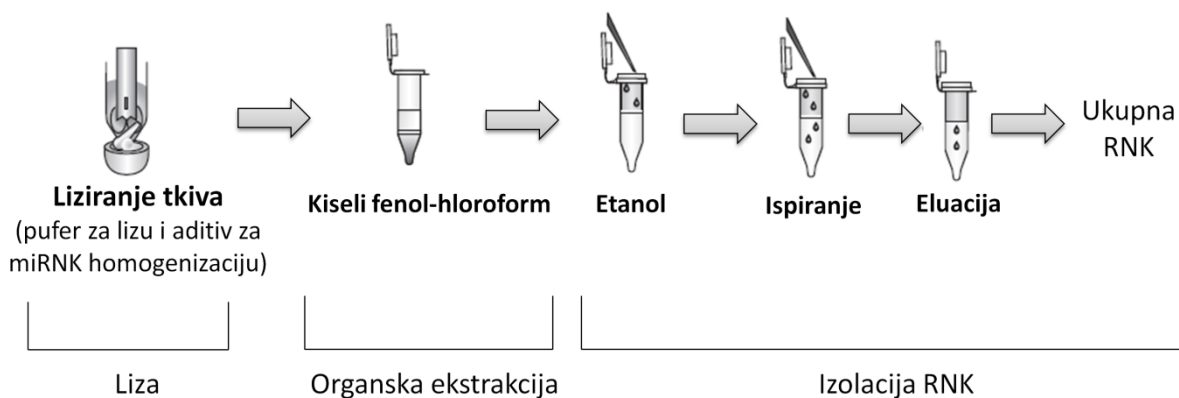
Studije koje su nakon razmatranja kriterijuma za uključivanje bile uvrštene u meta-analizu su, nakon harmonizacije miRNK lista između studija, podvrgnute tzv. metodi prebrojavanja (engl. vote counting) korišćenjem softvera R (engl. R software environment for statistical computing and graphics) radi utvrđivanja miRNK meta potpisa oralnog karcinoma. Ukoliko se neka konkretna miRNK javljala kao konzistentno deregulisana miRNK u oralnom karcinomu u pet i više studija, svrstana je na listu meta potpisa. Stoga, kao prag (engl. threshold) za utvrđivanje često deregulisane miRNK u oralnom karcinomu je korišćeno javljanje iste miRNK u 50% ili više studija koje su ušle u meta-analizu.

Dobijena lista najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu je okarakterisana bioinformatičkom analizom obogaćivanja (engl. enrichment analysis) korišćenjem softvera DIANA miRPath v.3.0 (Vlachos & Hatzigeorgiou, 2017; Vlachos et al., 2015). Analiza obogaćenja je vršena prema *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Grafički prikaz obogaćenja u formi mape intenziteta boja (eng. heatmap) je urađen korišćenjem softvera DIANA miRPath v3.0.

Nakon sprovedene meta-analize i *in silico* karakterizacije dobijenog miRNK meta potpisa oralnog karcinoma, izvršen je izbor od pet miRNK za validaciju na nezavisnom setu kliničkih uzoraka oralnog karcinoma i odgovarajućeg okolnog, histopatološki neizmenjenog tj. netumorskog tkiva. Odabrane miRNK za validaciju su podvrgnute bioinformatičkoj analizi mreža interakcija korišćenjem miRNet v2.0 platforme (L. Chang, Zhou, Soufan, & Xia, 2020). Slike koje prikazuju mreže interakcije su dobijene u istoimenom softveru. Radi utvrđivanja humanih patoloških stanja koja su obogaćena genima koji su regulisani od strane odabranih miRNK, korišćena je DisGeNET baza v7.0 koja sadrži podatke o genima i varijantama asociiranim sa različitim humanim patologijama (Piñero et al., 2020).

3.2.4. *Izolacija ukupne RNK, određivanje koncentracije i provera kvaliteta izolovane RNK*

Za izolaciju ukupne RNK je korišćen komercijalni kit miRVanaTM (Invitrogen, SAD). Izolacija RNK navedenim kitom je zasnovana na organskoj ekstrakciji pomoću kiselog fenol-hloroforma i imobilizaciji ribonukleinske kiseline na filteru od staklenih vlakana. Celokupna procedura izolacije podrazumeva najpre lizu uzorka u puferu za liziranje uz dodavanje aditiva za homogenizaciju, deproteinizaciju RNK i razdvajanje vodene i organske faze pomoću kiselog fenol-hloroforma (pH=4), precipitaciji RNK apsolutnim etanolom, ispiranju i eluciji izolata (Slika 6).



Slika 6. Protokol izolacije RNK miRVana™ kitom. Izolacija komercijalnim miRVana™ kitom započinje mehaničkim liziranjem tkiva u puferu za liziranje uz prisustvo aditiva za miRNK homogenizaciju. Organska ekstrakcija se vrši kiselim fenol-hloroformom koji ima ulogu u razdvajanju proteina od nukleinskih kiselina, ali i uklanjanju DNK iz uzorka. Kisela pH vrednost rastvora poboljšava razdvajanje dve faze: organske u kojoj se nalaze proteini, soli i DNK, i vodene u kojoj se nalazi RNK. Precipitacija se vrši apsolutnim etanolom, koji potpomaže u vezivanju RNK na filter od staklenih vlakana. Potom se filter ispira nekoliko puta i konačno eluira RNK pomoću odgovarajućeg elucionog rastvora.

Detaljan protokol izolacije je dat u Tabeli 6. Izolovana RNK je čuvana na -20°C do najviše mesec dana, nakon čega je prebačena na nižu temperaturu (-80°C). Svi uzorci izolovane RNK su razblaženi do koncentracije $20\text{ng}/\mu\text{l}$ i korišćeni u sledećim eksperimentalnim koracima, tj. za sintezu cDNK.

Tabela 6. Detaljan protokol za izolaciju ukupne RNK miRVana™ kitom

Korak	Postupak
1.	Zagrijati <i>Ellute buffer</i> na 95°C .
2.	U plastičnu tubu ubaciti prethodno homogenizovan uzorak tkiva sa dodatim $300\mu\text{l}$ <i>Lysis buffer</i> .
3.	Dodati $30\mu\text{l}$ <i>miRNA Homogenate additive</i> u tubu, promešati pipetom i vorteksovati.
4.	Inkubirati sadržaj tube na ledu u trajanju od 20 minuta.
5.	Dodati $300\mu\text{l}$ <i>Acid Phenol:Chloroform</i> , vorteksovati 1 minut.
6.	Centrifugirati na $14\,000\text{ rpm}/5\text{ min}$.
7.	Prebaciti gornju fazu u novu tubu.
8.	Dodati $375\mu\text{l}$ 100% etanola (sa sobne temperature), promešati pipetom.
9.	Pipetirati lizat-etanolni miks na <i>Filter Cartridge</i> kolonu.
10.	Centrifugirati na $10\,000\text{ rpm}/1\text{ min}$.
11.	Odbaciti iscentrifugiranu tečnost, dodati $700\mu\text{l}$ <i>Washnig buffer 1</i> na kolonu.
12.	Centrifugirati na $10\,000\text{ rpm}/1\text{ min}$.
13.	Odbaciti iscentrifugiranu tečnost, dodati $500\mu\text{l}$ <i>Washing buffer 2/3</i> na kolonu, pa centrifugirati na $10\,000\text{ rpm}/\text{min}$.
14.	Odbaciti iscentrifugiranu tečnost, dodati $500\mu\text{l}$ <i>Washing buffer 2/3</i> na kolonu, pa centrifugirati na $10\,000\text{ rpm}/1\text{ min}$.
15.	Ponoviti centrifugiranje na $10\,000\text{ rpm}/2\text{ min}$.
16.	Prebaciti filter kolonu na novu kolekcionu tubu.
17.	Dodati prethodno zagrejan <i>Elute buffer</i> $20\text{-}25\mu\text{l}$ na filter.
18.	Inkubirati 2 min, centrifugirati na $14\,000\text{ rpm}/1\text{ min}$. Iscentrifugirana tečnost je izolovana RNK.
19.	Ponoviti prethodna dva koraka.
20.	Nakon centrifugiranja baciti filter kolonu, a uzorak izolovane RNK ostaviti na led.

Koncentracija izolovane RNK je merena spektrofotometrijski na Nanofotometru N60 (Implen, Nemačka). Čistoća izolovane RNK je određena odnosom izmerenih apsorbanci na talasnim dužinama od 260nm i 280nm i uzorci su smatrani čistim ukoliko se odnos kretao u opsegu od 1,9-2,1.

3.2.5. Reakcija reverzne transkripcije

U cilju utvrđivanja ekspresije ciljnih gena, neophodno je izolovanu ukupnu RNK prevesti u cDNK pomoću enzima reverzne transkriptaze. Iz pripremljenih uzoraka razblažene RNK (20ng/μl) je urađena reverzna transkripcija, tj. sinteza cDNK korišćenjem komercijalnog TaqMan[®] kita za reverznu transkripciju miRNK (Invitrogen, SAD). Sinteza se zasniva na primeni tzv. stem-loop miRNK prajmera, koji na jednom kraju imaju petlju. Ovi prajmeri imaju veću efikasnost i specifičnost u poređenju sa konvencionalnim prajmerima (C. Chen et al., 2005).

Za sintezu cDNK je korišćeno 50ng RNK i pripremljen miks prajmera (engl. pool). Miks je sadržao prajmere za svaku miRNK za koje je merena ekspresija u tkivu oralnog karcinoma i okolnom neizmenjenom tkivu. Miks prajmera je pripreman tako što je u 940μl dH₂O dodato po 10μl 5x prajmera za svaku miRNK (*miR-30a-5p*, *miR-31-5p*, *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-139-5p*) i endogenu kontrolu (*RNU6B*). Finalno razblaženje prajmera u pripremljenom miksu je bilo 0,05x.

U Tabeli 7 su prikazane komponente neophodne za reakciju reverzne transkripcije (a) i temperaturni profil pod kojim je izvršena reverzna transkripcija (b).

Tabela 7. Sinteza cDNK iz ukupne izolovane RNK (a) komponente i (b) temperaturni profil za sintezu cDNK

(a)		(b)	
Komponenta	Količina (μl)	Vreme (min)	T (°C)
H ₂ O bez nukleaza	8,16	30	16
10x RT pufer	1,5	30	42
100mM dNTP	0,15	5	85
Miks prajmera	2	∞	4
Multiscribe reverzna transkriptaza	1		
RNAse inhibitor	0,19		
Izolovana RNK (20ng/μl)	1		

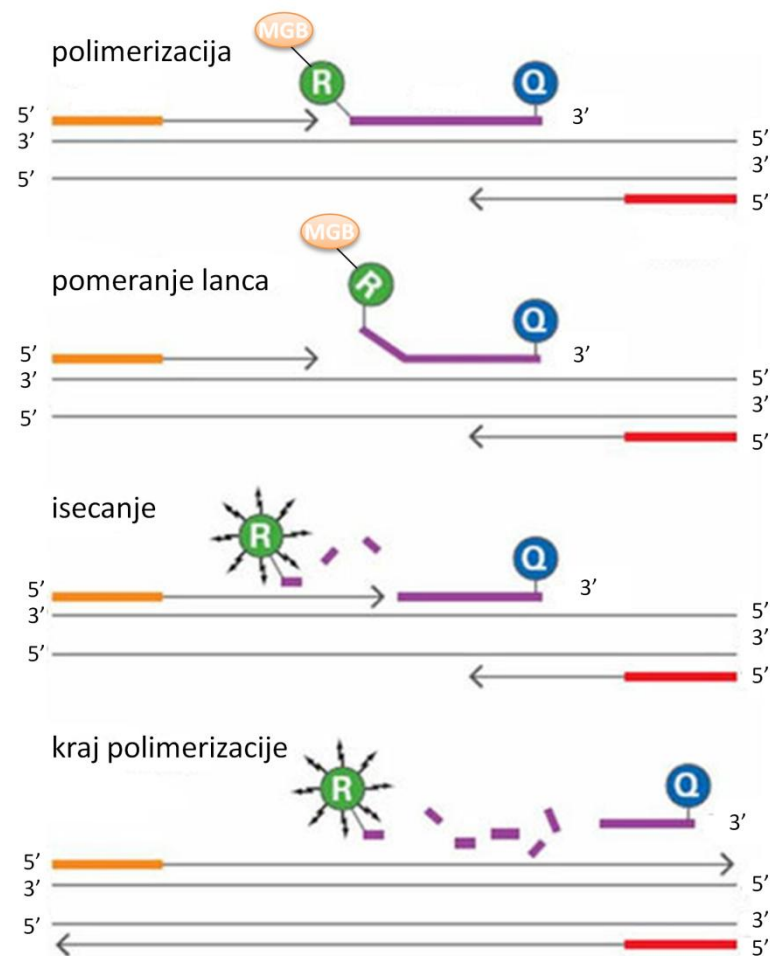
T – temperatura

Sintetisana cDNK je čuvana na -20°C do nastavka eksperimenta.

3.2.6. Određivanje relativne ekspresije miRNK

Nivo relativne ekspresije odabranih miRNK na osnovu prethodno identifikovanog miRNK meta potpisa oralnog karcinoma je određena kvantitativnim Real Time PCR-om (qRT-PCR) pomoću komercijalnog TaqMan[®] microRNA Gene Expression eseja za detekciju zrelih formi miRNK. Sintetisana cDNK je bila matrica za amplifikaciju tokom kvantifikacije. qRT-PCR je metoda koja omogućava da se u realnom vremenu, u svakom PCR ciklusu, meri količina amplifikovanog produkta. U slučaju veće zastupljenosti RNK u analiziranom uzorku, eksponencijalni porast amplifikacijske krive se uočava u ranijim ciklusima, dok je u slučaju niže zastupljenosti RNK u uzroku očekivano da se u kasnijim ciklusima uoči amplifikacija.

Za kvantifikaciju ekspresije je korišćen TaqMan[®] metod, kako je prethodno navedeno. Ovaj metod se zasniva na primeni fluorescentnih proba specifičnih za odabrane zrele miRNK. TaqMan[®] proba na 5' kraju ima vezanu fluorescentnu boju FAM, dok se na 3' kraju nalazi nefluorescentni hvatač - prigušivač, NFQ (engl. no fluorescent quencher). U intaktnom stanju, reporterska boja FAM ne fluorescira, s obzirom da ima višu energiju u poređenju sa prigušivačem, pa se dešava transfer energije sa reporterske boje na prigušivač, što se naziva FRET (engl. fluorescence resonance energy transfer). Na 3' kraju probe, na NFQ se nalazi vezan MGB (engl. minor groove binder), koji predstavlja modifikaciju zahvaljujući kojoj se povećava temperatura topljenja probe. Prilikom polimerizacije od strane DNK polimeraze, egzozonukleaznom aktivnošću ovog enzima dolazi do isecanja probe, čime se reporterska FAM boja oslobađa efekta prigušivača i nakon isecanja i oslobađanja reporterska boja će fluorescirati (Slika 7). Real-Time PCR uređaj tokom amplifikacije meri porast fluorescentnog signala u svakom ciklusu, što se vizualizuje preko amplifikacijskih kriva.



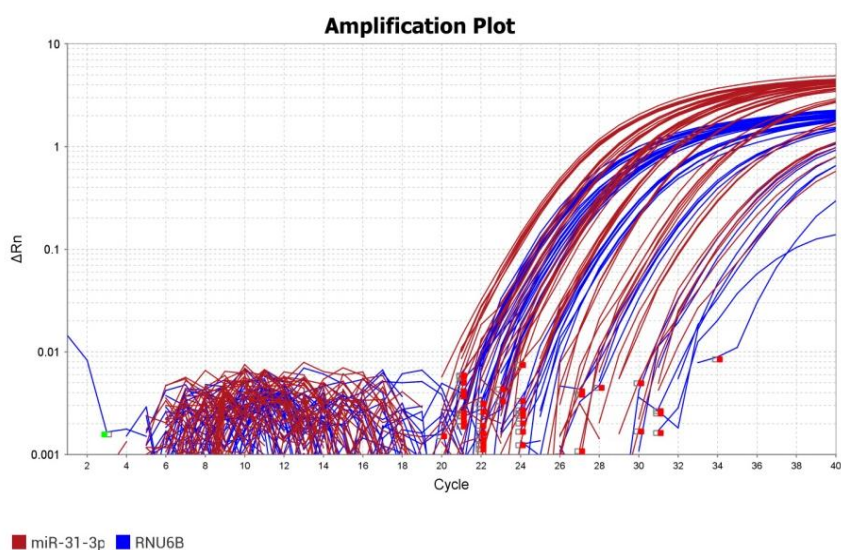
Slika 7. Princip funkcionisanja TaqMan hemije. Detaljnije objašnjenje je dato u tekstu. R – reporterska boja, Q – prigušivač (engl. quencher), MGB – engl. minor groove binder [Izvor slike: Wikimedia creative commons, modifikovano]

Kao endogena kontrola je korišćen *RNU6B* gen za sve analizirane miRNK. Endogena kontrola je gen koji se stabilno eksprimira u analiziranom tkivu i koja se koristi za normalizaciju ekspresije ciljnih gena. U Tabeli 8 je prikazan sastav reakcione smeše i temperaturni profil qRT-PCR. Svi uzorci su rađeni u triplikatu, tj. tri tehničke replike. Za pripremu uzoraka za qRT-PCR su korišćeni tzv. plejtovi od optičke plastike sa 96 mesta za uzorke koji su prekriveni adhezionom folijom i lagano centrifugirani pred puštanje kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu. Korišćen je Quant Studio 3 Real Time PCR uređaj (Applied Biosystems, SAD). Analiza rezultata je rađena pomoću Quant Studio Design & Analysis Software v1.3.1. U uzorcima koji su imali uspešnu

amplifikaciju je bila prisutna eksponencijalna kriva (Slika 8). Nivo praga (engl. threshold) je bio manuelno podešavan, tako da najoptimalnije preseca amplifikacijsku krivu u eksponencijalnoj fazi.

Tabela 8. Kvantifikacija ekspresije miRNK u realnom vremenu (a) komponente i (b) temperaturni profil

(a)		(b)		
Komponenta	Količina (μl)	Vreme (min)	T (°C)	Ciklusi
TaqMan miRNA Assay (20x)	0,5	10	95	hold
PCR Master Mix, No AmpErase UNG	5	15 sec	95	40
H ₂ O bez nukleaza	4,5	1	60	
cDNK	1			



Slika 8. Krive amplifikacije *miR-31-3p* i *RNU6B* gena u uzorcima oralnog karcinoma i okolnog netumorskog tkiva.

Uspešno amplifikovani uzorak ima izgled eksponencijalne krive. Mesto na kom eksponencijalna kriva preseca nivo praga predstavlja Ct vrednost. Niža Ct vrednost ukazuje da je ciljni gen ekspimiran u višem stepenu. Ct vrednosti u tehničkim replikama treba da se kreću oko iste vrednosti.

Nivo ekspresije za analizirane miRNK je određen na osnovu računanja ΔCt vrednosti za svaki uzorak tako što je od srednje Ct vrednosti ispitivanog miRNK gena za svaki pojedinačni uzorak (srednja Ct vrednost triplikata uzorka) oduzeta srednja Ct vrednost endogene kontrole za konkretni uzorak ($\Delta Ct = \text{srednja vrednost } Ct_{miR-31-3p} - \text{srednja vrednost } Ct_{RNU6B}$) (Schmittgen & Livak, 2008). Relativna ekspresija za svaki analizirani gen je izražena kao $2^{-\Delta Ct}$.

3.2.7. Statistička analiza

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni u programima SPSS v20.00 i GraphPad Prism v9.0. Za analizu demografskih i kliničkopatoloških podataka korišćene su metode deskriptivne statistike. Postojanje asocijacija i/ili razlika u distribuciji kategorijskih varijabli je utvrđivano hi-kvadrat (χ^2) ili Fišerovim testom. Normalnost distribucije podataka je testirana Shapiro-Wilk testom. Ukoliko podaci nisu bili normalno distribuirani ($p < 0,05$), razlike u ekspresiji odabranih miRNK između tkiva oralnog karcinoma i okolnog netumorskog tkiva su poređene neparametrijskim Wilcoxon rank testom. U slučaju neuparenih uzoraka za koje podaci nisu bili normalno distribuirani korišćen je Mann Whitney U test, dok je T-test korišćen za podatke koji su imali normalnu raspodelu.

Diskriminacijska, tj. dijagnostička moć svake pojedinačne analizirane miRNK je testirana ROC krivom (engl. receiver operating curves), određivanjem površine ispod krive, AUC (engl. area under the curve). Za vrednosti AUC od 0,5-0,6 smatra se da biomarker ima loš potencijal za diskriminaciju; AUC od 0,6-0,7 - biomarker ima dovoljnu diskriminacijsku moć; AUC od 0,7-0,8 ukazuje da je moć diskriminacije dobra; AUC od 0,8-0,9 moć diskriminacije veoma dobra, a

AUC od 0,9-1 ukazuje da biomarker ima odličnu dijagnostičku moć. Optimalna granična vrednost za diskriminaciju tumorskog od netumorskog tkiva je određivana na osnovu maksimalne vrednosti Youden-ovog indeksa (Youden index = senzitivnost + specifičnost -1) za svaku analiziranu miRNK. Za identifikovanu graničnu vrednost su određeni specifičnost i senzitivnost.

Ekspresija svake miRNK u tumorskom tkivu je dihotomizirana na povišenu i sniženu na osnovu vrednosti medijane relativne ekspresije za svaku pojedinačnu miRNK. Vrednosti relativne ekspresije niže od vrednosti medijane su svrstavane u sniženo eksprimirane, dok su vrednosti relativne ekspresije više od medijane označene kao povišeno eksprimirane. Ovako kategorisanim vrednostima za svakog pacijenta uključenog u studiju su pridruženi podaci o ukupnom preživljavanju datom u mesecima od trenutka postavljanja dijagnoze. Na osnovu toga su konstruisane krive preživljavanja pacijenata sa oralnim karcinomom. Krive preživljavanja su predstavljene Kaplan-Meier-ovim krivama i međusobno su poređene log-rank testom radi utvrđivanja postojanja značajnih razlika u preživljavanju pacijenata sa povišenom i sniženom relativnom ekspresijom analiziranih kandidat miRNK. Cox proporcionalnom regresijom je određena Hazard Ratio vrednost. Sve varijable koje su bile značajne u univarijantnoj analizi su uvrštene u multivarijantnu analizu.

Za vizualizaciju relativnih ekspresija analiziranih miRNK gena korišćen je prikaz mapa intenziteta boja (engl. heatmap). Uz pomoć softvera ClustVis (Metsalu & Vilo, 2015) je rađeno hijerarhijsko klasterovanje analiziranih miRNK i kliničkih uzoraka radi utvrđivanja grupa povišeno odnosno sniženo dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu, kao i segregacije kliničkih uzoraka u oralni karcinom i okolno neizmenjeno tkivo. Hijerarhijsko klasterovanje je rađeno na osnovu Pearson korelacije relativne ekspresije miRNK u kliničkim uzorcima. Hijerarhijsko klasterovanje se sprovodi radi svrstavanja odgovarajućih elemenata koji dele slične karakteristike u jedan domen tj. skup na osnovu njihove međusobne sličnosti. Objekti koji su međusobno sličniji se grupišu bliže jedni drugom. Vizuelni prikaz hijerarhijskog klasterovanja se naziva dendogram.

Analiza glavnih komponenti (engl. principal component analysis - PCA) je rađena pomoću softvera ClustVis. PCA analiza podrazumeva smanjenje dimenzionalnosti podataka u komponente (dve ili više) na osnovu kojih je moguće razdvojiti analizirane uzorke u klustere, tj. u slučaju ove doktorske disertacije tkivo oralnog karcinoma od netumorskog tkiva na osnovu relativne ekspresije pet kandidat miRNK. U osnovi PCA se nalazi linearna transformacija višedimenzionalnih podataka u nekorelisane varijable koje su organizovane prema opadajućim vrednostima varijanse (Metsalu & Vilo, 2015).

Korelacija ekspresije analiziranih miRNK je utvrđivana neparametrijskim Spirmanovim korelacionim koeficijentom i izražena je kao rho vrednost. Ukoliko je rho vrednost bila pozitivna i veća od 0,2, a p vrednost manja od 0,05, takva korelacija je smatrana jakom i značajnom.

P vrednosti su bile dvosmerno testirane i sve asocijacije su smatrane značajnim ukoliko je p vrednost bila manja od 0,05. Za obeležavanje p vrednosti na slikama su korišćeni i simboli zvezdica, gde je: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 i ****p<0,0001.

4. REZULTATI

4.1. Demografske i kliničkopatološke karakteristike studijske grupe

Za potrebe ove doktorske disertacije je u predviđenom periodu prikupljanja bioloških uzoraka tkiva oralnog karcinoma i netumorskog tkiva, u studiju uključeno 35 pacijenata koji su lečeni na Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. U Tabeli 9 su predstavljene demografske i kliničkopatološke karakteristike studijske grupe. Najmlađi pacijent sa oralnim karcinomom je imao 35, a najstariji 82 godine. Medijana starosti pacijenata uključenih u studiju je iznosila 59 godina. Među pacijentima su tri puta zastupljeniji bili pripadnici muškog pola u poređenju sa pripadnicama ženskog pola. Kao najčešće lokacija oralnog karcinoma unutar oralne duplje, u najvećem broju slučajeva se javljao jezik (71,4%), potom pod usne duplje (17,1%) i tvrdo nepce (11,4%). Uznapredovala bolest u IV stadijumu je bila zastupljena kod najvećeg procenta pacijenata (42,9%), praćena II (34,3%) i III (17,1%) stadijumom, dok je najniža bila učestalost pacijenata sa I stadijumom bolesti (5,7%). Ni jedan pacijent nije imao udaljene metastaze. Nakon ekscizije tumora, 82,9% pacijenata je imalo terapiju zračenjem, dok je 60% imalo radio i hemioterapiju. Pacijenti su praćeni nakon operacije najmanje šest, a najviše 38 meseci, medijana praćenja je bila 20 meseci. Recidiv se javio kod 25,7% pacijenata, a do poslednjeg datuma praćenja pacijenata, aprila 2021. godine, 25,7% pacijenata je preminulo.

Tabela 9. Demografske i kliničkopatološke karakteristike studijske grupe

Karakteristike		N	%
Pol	muško	26	74,3
	žensko	9	25,7
Starost (godine)	srednja vrednost ± SD	61,74 ± 10,416	
Starost (medijana)	≤59 godina	18	51,4
	>59 godina	17	48,6
Upotreba alkohola	bez	10	28,6
	umerena	14	40
	visoka	11	31,4
Pušački status	nepušač	9	25,7
	bivši pušač	11	31,4
	pušač	15	42,9
Oralna higijena	dobra	15	42,9
	loša	20	57,1
Lokacija primarnog tumora	jezik	25	71,4
	pod usne duplje	6	17,1
	tvrdo nepce	4	11,4
Histološki gradus	dobro diferenciran	10	28,6
	srednje diferenciran	18	51,4
	slabo diferenciran	7	20
Stadijum	I	2	5,7
	II	12	34,3
	III	6	17,1
	IV	15	42,9
Veličina tumora (T)	<2cm	2	5,7
	2-4cm	15	42,9
	>4cm	16	45,7
	infiltrisani	2	5,7
Nodalni status (N)	N0	18	51,4
	N1	3	8,6
	N2	6	17,1
	N3	8	22,9
Udaljene metastaze (M)	ne	35	100
	da	0	0
Terapija nakon hirurgije	radioterapija	29	82,9
	hemioterapija	21	60
	radio + hemioterapija	21	60
Recidiv	ne	26	74,3
	da	9	25,7
Ishod bolesti	živ	26	74,3
	smrt	9	25,7

N – broj pacijenata; SD – standardna devijacija

Napomena: tabela je publikovana na engleskom jeziku u okviru rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

4.2. Pregled studija uključenih u meta-analizu

Nakon detaljnog pregleda literature i izdvajanja studija kojima je utvrđivana ekspresija miRNK visokopropusnim metodama u tkivu oralnog karcinoma i okolnog netumorskog tkiva poreklom od istog pacijenta, samo je 10 studija ispunilo sve postavljene kriterijume za uključivanje u meta-analizu (Z. Chen et al., 2017; Farah & Fox, 2018; Fukumoto et al., 2015; Ganci et al., 2016; Manikandan et al., 2016; Pedersen et al., 2018; Schneider, Victoria, & Lopez, 2018; Shi et al., 2015; Shiah et al., 2014; Soga et al., 2013). Uključene studije su publikovane u periodu od 2013 do 2018. godine. Detalji o studijama koje su uvrštene u meta-analizu su predstavljene u Tabeli 10. Prvih sedam studija je bilo analizirano u okviru ranije sprovedene i publikovane meta-analize (Zeljic et al., 2018), pri čemu su uključene dodatne tri publikacije objavljene 2018. godine radi ažuriranja meta-analize. Uvrštene studije u meta-analizu su se međusobno razlikovale prema visokopropusnim platformama koje su korišćene za identifikaciju diferencijalno eksprimiranih miRNK, graničnim tj. cut-off vrednostima, broju uzoraka koji je uključen u analizu, kao i zemljama u kojoj su istražavanja sprovedena. Kada je reč o korišćenim platformama za utvrđivanje dereguliranih miRNK, u tri studije je korišćeno RNK sekvenciranje, u tri studije TaqMan[®] low density assay i u preostale tri studije su korišćeni mikroereji različitih proizvođača. Korišćenje različitih visokopropusnih platformi, kao i graničnih vrednosti za utvrđivanje dereguliranih miRNK je najverovatnije rezultovalo različitim brojem identifikovanih miRNK između studija uključenih u meta-analizu.

Najveći broj studija, njih pet, je iz azijskih zemalja: iz Indije, Tajvana, Japana i Kine; tri studije su iz evropskih zemlja: Italije, Poljske i Danske; po jedna studija je bila iz SAD-a i Australije. U svih 10 studija je ukupno analizirano 287 uzoraka oralnog karcinoma i 193 uzorka okolnog netumorskog tkiva. U svim studijama je, zbirno posmatrano, identifikovano ukupno 309 diferencijalno dereguliranih miRNK u tkivu oralnog karcinoma u poređenju sa okolnim netumorskim tkivom. Ukupno je identifikovano 143 miRNK molekula koji su bili povišeno eksprimirani i 147 koji su bili sniženo eksprimirani. Nekonzistentna ekspresija među studijama je utvrđena za 19 miRNK molekula.

U svim studijama je broj uzoraka oralnog karcinoma i okolnog netumorskog tkiva bio isti, osim u slučaju studije Pedersen i saradnika iz 2018. godine, u kojoj je samo osam ispitanika imalo upareni uzorak okolnog netumorskog tkiva (Pedersen et al., 2018). S obzirom da je navedena studija ispunjavala sve druge postavljene kriterijume za uključivanje u meta-analizu, uzeta je u dalje razmatranje.

Tabela 10. Detalji o studijama uključenim u ažuriranu meta-analizu

Reference	Broj uzoraka tkiva (tumor/kontrola) ^a	Diferencijalno eksprimirane miRNK			Cut-off kriterijumi	Visokopropusna platforma				Zemlja, kontinent
		ukupno	povišeno ekrimirane	sniženo eksprimirane						
Ganci et al., 2016 ^b	76 (38/38)	78	59	19	FDR<0,06 FC>1 p<0,01 SD>1	Agilent platform microarray (V2)	Human	miRNA		Italija, Evropa
Manikandan et al., 2016 ^b	58 (29/29)	39	15	24	FC>1 p<0,05	miRCURY LNA™ microRNA array (Exiqon)				Indija, Azija
Shiah et al., 2014 ^b	80 (40/40)	84	32	52	FC>2 p<0,05	Human v2 microRNA expression BeadChips (Illumina)				Tajvan, Azija
Soga et al., 2013 ^b	36 (29/7)	23	12	11	FC>4	TaqMan® Low Density Array (Human microRNA Panel v2.0)				Japan, Azija
Shi et al., 2015 ^b	4 (2/2)	38	31	7	FC>2	RNA Seq (Illumina HiSeq 2000)				Kina, Azija
Fukomoto et al., 2015 ^b	72 (36/36)	42	NP	42	p<0,05	TaqMan® Low Density Array Human microRNA Panel v2.0				Japan, Azija
Chen et al., 2017 ^b	20 (10/10)	12	7	5	p<0,05, p<0,01 FDR<0,05	TaqMan® Low Density array (TLDA v1.0)				SAD
Schenider et al., 2018	10 (5/5)	48	23	25	FC>2 FC<0,5	RNA seq (Illumina HiSeq 2500)				Poljska, Evropa
Pedersen et al., 2018	88 (80/8)	65	47	18	logFC<0,2 FC<0,4	RNA seq (Illumina NextSeq 500)				Danska, Evropa
Farah et al., 2018	36 (18/18)	119	53	66	p<0,01	SurePrint® G3 Human miRNA Microarrays (Release 16)				Australija

^a tkivo oralnog karcinoma / upareno okolno netumorsko tkivo od istog pacijenta

^b studije uključene u prethodno sprovedenoj meta-analizi (Zeljic et al., 2018).

FDR - engl. false discovery rate

FC – stepen promene (engl. fold change)

NP - nema podataka; SD - standardna devijacija

Napomena: tabela je publikovana na engleskom jeziku u okviru dodatka rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

4.3. Meta potpis najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu

Iz popisa diferencijalno eksprimiranih miRNK u studijama koje su uključene u meta-analizu, nakon harmonizacije unosa između studija, napravljena je lista, svojevrsni meta potpis najčešće dereguliranih miRNK u tkivu oralnog karcinoma (Tabela 11). U pet i više studija je potvrđena diferencijalna ekspresija 13 miRNK molekula. Od toga, sedam miRNK su imale povišenu ekspresiju (*miR-21-5p*, *miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-31-5p*, *miR-424-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-21-3p*), dok je pet imalo sniženu ekspresiju (*miR-139-5p*, *miR-30a-3p*, *miR-375-3p*, *miR-376c-3p*, *miR-30a-5p*). Nekonzistentna ekspresija je potvrđena u slučaju jedne miRNK (*miR-223-3p*) zbog čega je bila isključena iz dalje *in silico* analize i funkcionalne anotacije.

U najvećem broju studija, 7/10, su utvrđene dve najčešće deregulirane, povišeno eksprimirane *miR-21-5p* i *miR-31-3p*. U 6/10 studija su identifikovane povišeno eksprimirane *miR-135b-5p* i *miR-31-5p*, a od sniženo eksprimiranih *miR-139-5p* i *miR-30a-5p*. Svi ostali miRNK molekuli su bili identifikovani u 5/10 studija uključenih u meta-analizu.

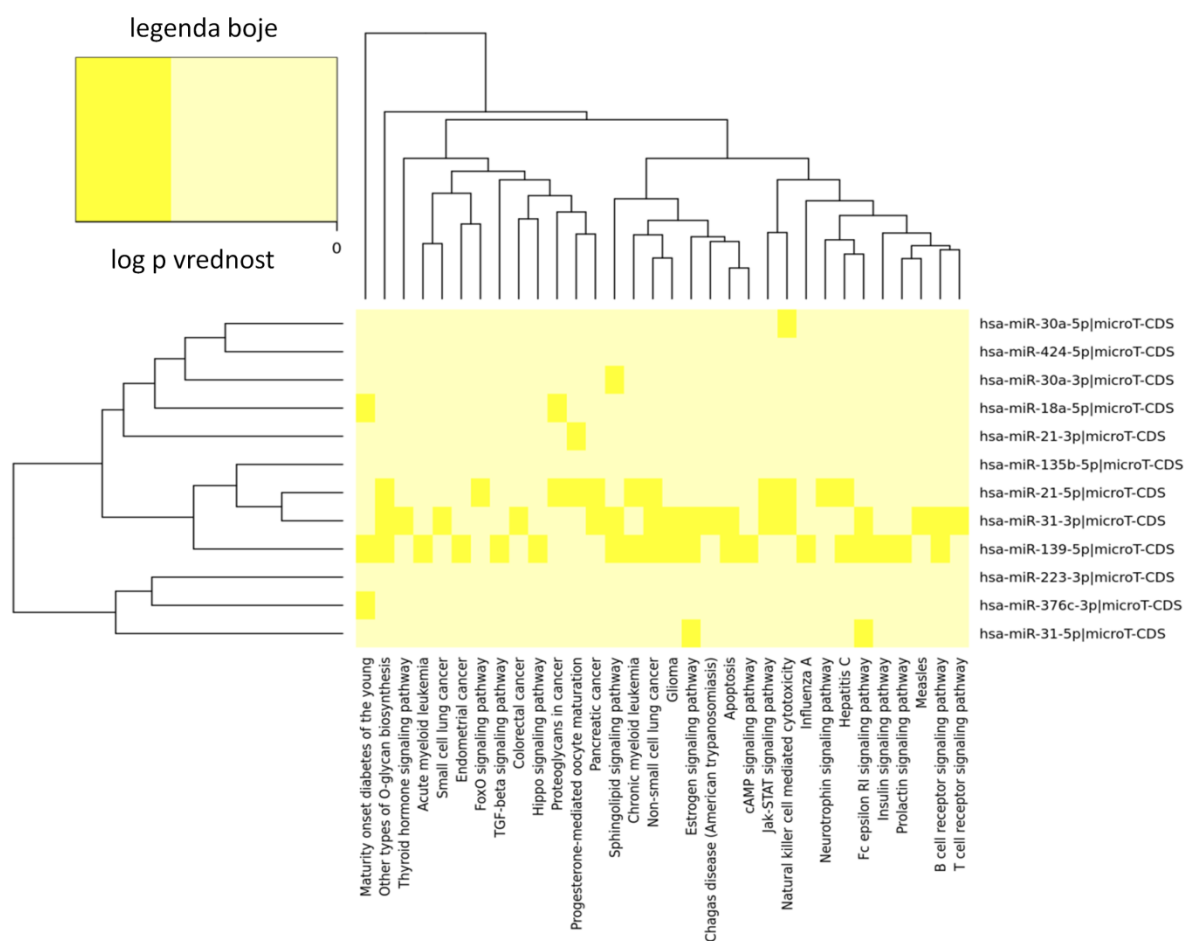
Tabela 11. Popis najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu u poređenju sa netumorskim tkivom dobijen na osnovu sprovedene meta-analize

Deregulisane miRNK	Ukupan broj studija	Broj studija - povišeno eksprimiran	Broj studija – sniženo eksprimiran	Studija
<i>miR-21-5p</i>	7	7	0	Ganci et al., 2015; Soga et al., 2013; Shi et al., 2015; Chen et al., 2017; Manikandan et al., 2016; Schneider et al., 2018; Farah et al., 2018
<i>miR-31-5p</i>	7	7	0	Ganci et al., 2015; Soga et al., 2013; Chen et al., 2017; Manikandan et al., 2016; Shiah et al., 2014; Schneider et al., 2018; Pedersen et al., 2018
<i>miR-139-5p</i>	6	0	6	Soga et al., 2013; Fukomoto et al., 2015; Chen et al., 2017; Shiah et al., 2014; Schneider et al., 2018; Farah et al., 2018
<i>miR-30a-3p</i>	6	0	6	Soga et al., 2013; Shi et al., 2015; Fukomoto et al., 2015; Shiah et al., 2014; Pedersen et al., 2018; Farah et al., 2018
<i>miR-135b-5p</i>	6	6	0	Ganci et al., 2015; Soga et al., 2013; Shi et al., 2015; Shiah et al., 2014; Schneider et al., 2018; Farah et al., 2018
<i>miR-31-3p</i>	6	6	0	Ganci et al., 2015; Soga et al., 2013; Manikandan et al., 2016; Shiah et al., 2014; Schneider et al., 2018; Farah et al., 2018
<i>miR-375-3p</i>	5	0	5	Shi et al., 2015; Fukomoto et al., 2015; Shiah et al., 2014; Schneider et al., 2018; Farah et al., 2018
<i>miR-376c-3p</i>	5	0	5	Ganci et al., 2015; Soga et al., 2013; Fukomoto et al., 2015; Shiah et al., 2014; Farah et al., 2018
<i>miR-30a-5p</i>	5	0	5	Ganci et al., 2015; Shi et al., 2015; Shiah et al., 2014; Pedersen et al., 2018; Farah et al., 2018
<i>miR-223-3p^a</i>	5	4	1	Ganci et al., 2015; Soga et al., 2013; Chen et al., 2017; Manikandan et al., 2016; Schneider et al., 2018
<i>miR-424-5p</i>	5	5	0	Ganci et al., 2015; Shi et al., 2015; Shiah et al., 2014; Schneider et al., 2018; Farah et al., 2018
<i>miR-18a-5p</i>	5	5	0	Ganci et al., 2015; Shi et al., 2015; Shiah et al., 2014; Schneider et al., 2018; Farah et al., 2018
<i>miR-21-3p</i>	5	5	0	Ganci et al., 2015; Shi et al., 2015; Shiah et al., 2014; Schneider et al., 2018; Farah et al., 2018

^a miRNK nije dalje razmatrana kao najčešće deregulisana u oralnom karcinomu u poređenju sa okolnim netumorskim tkivom, s obzirom da je ova miRNK imala nekonzistentnu ekspresiju između različitih studija. *Napomena:* tabela je publikovana u celosti na engleskom jeziku u okviru dodatka rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

4.3.1. In silico karakterizacija miRNK meta potpisa oralnog karcinoma

Da bi se funkcionalno okarakterisale najščešće deregulisane miRNK u oralnom karcinomu, koje su identifikovane ažuriranom meta-analizom, urađena je bioinformatička, tj. *in silico* funkcionalna anotacija signalnih puteva u kojima su obogaćene miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma. Rezultati *in silico* analize su predstavljeni na Slici 7 i Tabeli 12. Ukupno je 32 KEGG molekularna puta bilo obogaćeno genima koji su regulisani od strane miRNK iz meta potpisa. Može se uočiti da je većina molekularnih puteva povezana sa različitim malignitetima, što potencijalno ukazuje da su miRNK iz meta potpisa u oralnom karcinomu često deregulisane i u drugim malignim bolestima, te nisu karakteristične samo za oralnu karcinogenezu. Najveći broj gena regulisanih od strane miRNK iz meta potpisa je bio u okviru putanje NK ćelijama posredovana citotoksičnost i proteoglikani u kanceru (Tabela 12).



Slika 9. Mapa intenziteta boja KEGG molekularnih puteva obogaćenih sa miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma. Mapa intenziteta boja prikazuje nivo obogaćenja KEGG molekularnih puteva sa najčešće deregulisanim miRNK u oralnom karcinomu. Za predikciju targeta je korišćena microT CDS v5.0, p vrednost od 0,05, microT granična vrednost 0.7, i unbiased empirical distributions). Intenzitet žute boje predstavlja logaritam (log) p vrednosti.

Napomena: slika je publikovana u celosti na engleskom jeziku u okviru rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

Rezultati sprovedene *in silico* analize su poslužili kao osnov za odabir kandidat miRNK molekula za validaciju ekspresije na kliničkim uzorcima tkiva oralnog karcinoma i okolnog netumorskog tkiva, kao i ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog značaja odabranih miRNK. Osnovni kriterijumi za izbor miRNK kandidata su bili konzistentna ekspresija u studijama koje su uključene u meta-analizu i da li su signalni putevi koji su u vezi sa malignitetima obogaćeni u

konkretnoj miRNK. Kao dodatni značajan kriterijum je korišćen podatak iz literature o nepostojanju ili relativnoj oskudnosti eksperimentalnih podataka o ekspresiji odgovarajućih miRNK u oralnom karcinomu. Na osnovu navedenih kriterijuma, izdvojena su tri miRNK kandidata koje su meta-analizom identifikovane kao povišeno eksprimirane u oralnom karcinomu i to: *miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p* i dve miRNK koje su identifikovane kao sniženo eksprimirane: *miR-139-5p* i *miR-30a-5p*.

Tabela 12. Popis KEGG molekularnih puteva obogaćenih u miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma

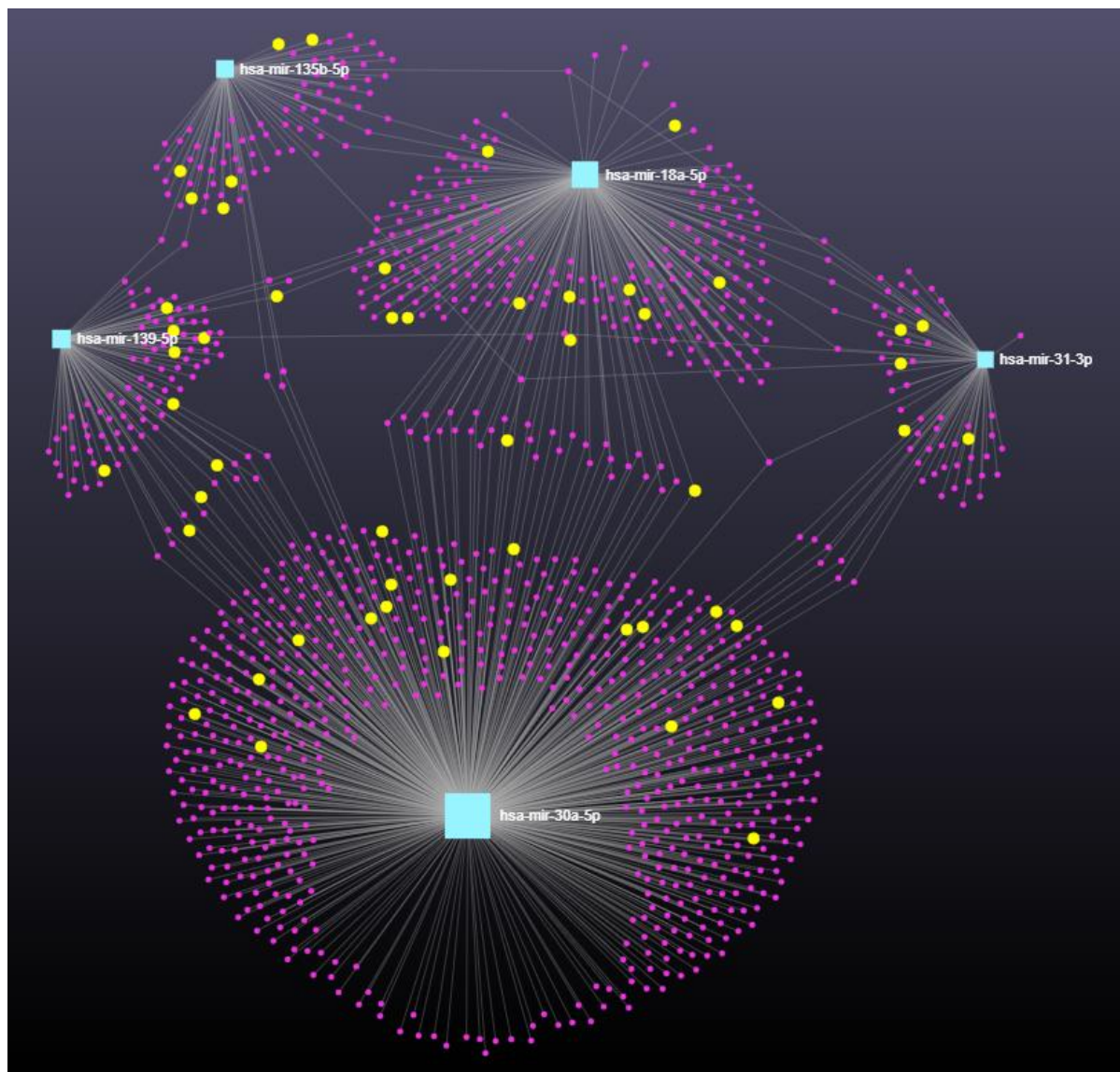
KEGG molekularni putevi	p*	Broj gena	Broj miRNK
NK ćelijama posredovana citotoksičnost	0,00516125	29	3
Karcinom pankreasa	0,00794173	10	2
Prolaktin signalni put	0,01142659	4	1
Jak-STAT signalni put	0,01166283	14	2
B ćelijski receptor signalni put	0,01260237	6	2
Fc epsilon RI signalni put	0,01304901	10	3
Morbili	0,01442966	4	1
Hepatitis C	0,01456119	10	2
Nesitnoćelijski karcinom pluća	0,01462334	9	3
Progesteronom posredovano sazrevanje-maturacija oocita	0,01527843	16	2
Influenca A	0,01540533	3	1
Estrogen signalni put	0,01608396	18	3
Sfingolipidni signalni put	0,01630426	14	3
T ćelijski receptor signalni put	0,01761602	7	1
Američka tripanozomija	0,01802417	6	1
Akutna mijeloidna leukemija	0,02288295	2	1
Apoptoza	0,02341931	4	2
Gliom	0,0237542	6	2
Endometrijalni karcinom	0,02568728	3	1
Insulin signalni put	0,02769479	6	1
Neurotrophin signalni put	0,02772952	12	1
Sitnoćelijski karcinom pluća	0,03340454	5	1
Kolorektalni karcinom	0,03638449	3	1
Dijabetes tipa 2 kod mladih	0,04104973	5	3
FoxO signalni put	0,0417227	11	1
Hronična mijeloidna leukemija	0,04236602	9	2
cAMP signalni put	0,04355883	5	1
Proteoglikani u kanceru	0,04403459	28	2
Tiroidni hormon signalni put	0,04550577	6	1
Drugi tipovi O-glikan biosinteze	0,04644131	5	3
Hippo signalni put	0,04678812	5	1
TGF-β signalni put	0,04759265	4	1

*p<0,05 je predstavljeno boldom.

Napomena: tabela je publikovana u celosti na engleskom jeziku u okviru dodatka rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

4.3.2. Mreža interakcija odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma

Odabrani miRNK kandidati (*miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-139-5p* i *miR-30a-5p*) za validaciju ekspresije na kliničkim uzorcima tkiva oralnog karcinoma i okolnog netumorskog tkiva su podvrgnuti analizi mreža eksperimentalno validiranih molekularnih interakcija (Slika 10). Pokazano je da najveći broj gena u mreži regulisan od strane *miR-30a-5p* (734 gena), praćen sa *miR-18a-5p* (262 gena), *miR-139-5p* (105 gena), *miR-135b-5p* (83 gena) i *miR-31-3p* (70 gena).



Slika 10. Mreža interakcija odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma i njihovih gena targeta. Mreža je konstruisana korišćenjem softvera miRNet v2.0. Svetlo plavi kvadrati predstavljaju odabrane miRNK kandidate. Veličina kvadrata oslikava broj interakcija. Ljubičasti krugovi predstavljaju gene koji su regulisani od strane miRNK kandidata. Žuti krugovi predstavljaju označene gene koji su asocirani sa signalnim putevima u malignitetima koji su analizom obogaćenja identifikovani među najzačajnijim putevima (Tabela 13).

Primenom hipergeometrijskog testa na genima koji su regulisani od strane odabranih miRNK iz meta potpisa je urađena analiza obogaćivanja KEGG molekularnih puteva (Tabela 13). Putanje u malignim tumorima (engl. pathways in cancer) su jedna od najznačajnijih obogaćenih putanja sa najvećim brojem gena (52 gena). Na Slici 11 su geni obogaćeni u putanji u malignim tumorima naznačeni žutom bojom. Može se uočiti da svaka odabrana miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma komplementarno reguliše izvesni broj gena iz tog puta.

Korišćenjem baze koja sadrži integrisane podatke o genima i varijantama asociiranim sa humanim bolestima, DisGeNET v7.0, urađena je analiza obogaćenja hipergeometrijskim testom, nad svim genima koji su regulisani od strane odabranih miRNK iz mreže interakcija (Tabela 14). Rezultati ukazuju da su bolesti koje su obogaćene u ovoj listi gena uglavnom maligniteti.

Tabela 14. Popis humanih bolesti obogaćenih u genima regulisanim od strane odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma

Humana bolest	Broj gena	p*	Adj. p*
Metastaze neoplazme	22	1,25E-08	1,25E-06
Adenokarcinom	19	3,68E-08	1,28E-06
Neoplazme stomaka	31	3,85E-08	1,28E-06
Neoplazme prostate	35	1,46E-05	0,000365
Hemangiosarkom	6	2,27E-05	0,000454
Neoplastična ćelijska transformacija	13	4,32E-05	0,00072
Karcinom jetre	20	6,48E-05	0,000926
Nesitnoćelijski karcinom pluća	13	0,00011	0,001375
Neoplazme dojke	30	0,000194	0,001843
Karcinom želuca	5	0,000198	0,001843
Karcinom skvamoznih ćelija	13	0,000214	0,001843
Neoplazme životinjskih dojki	13	0,00025	0,001843
Neoplazme penisa	3	0,000258	0,001843
Abnormalnost morfologije ćelija koštane srži	3	0,000258	0,001843
Adenokarcinom pluća	9	0,000491	0,003273

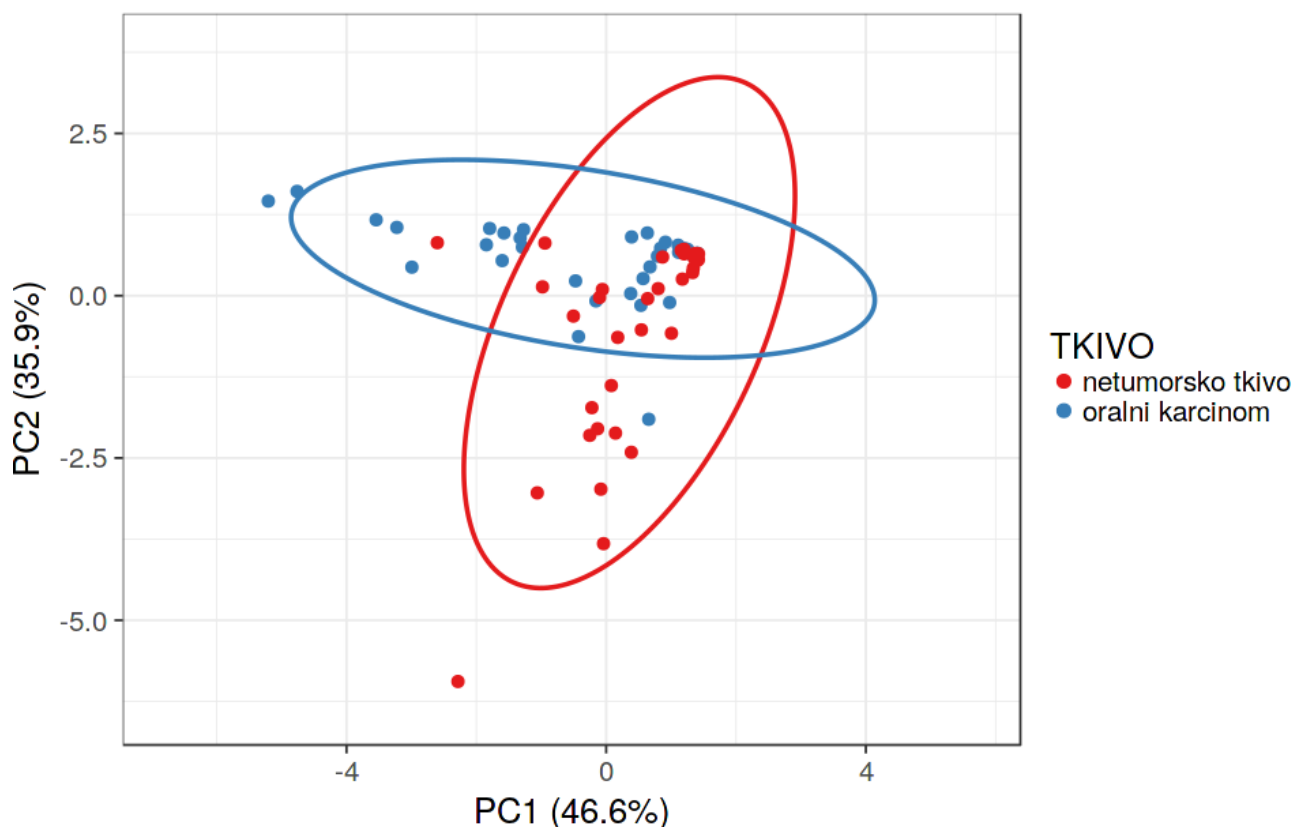
*p<0,05 je predstavljeno boldom. Adj. p – korigovana p vrednost

Odabrane miRNK pokazuju komplementarnost u regulaciji gena uključenih u molekularne puteve u malignim tumorima. Stoga rezultati sprovedenih bioinformatičkih analiza dodatno potvrđuju opravdanost našeg izbora miRNK kandidata, *miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-139-5p* i *miR-30a-5p*, za dalju validaciju na kliničkim uzorcima oralnog karcinoma i netumorskog tkiva.

4.4. Validacija relativne ekspresije odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma

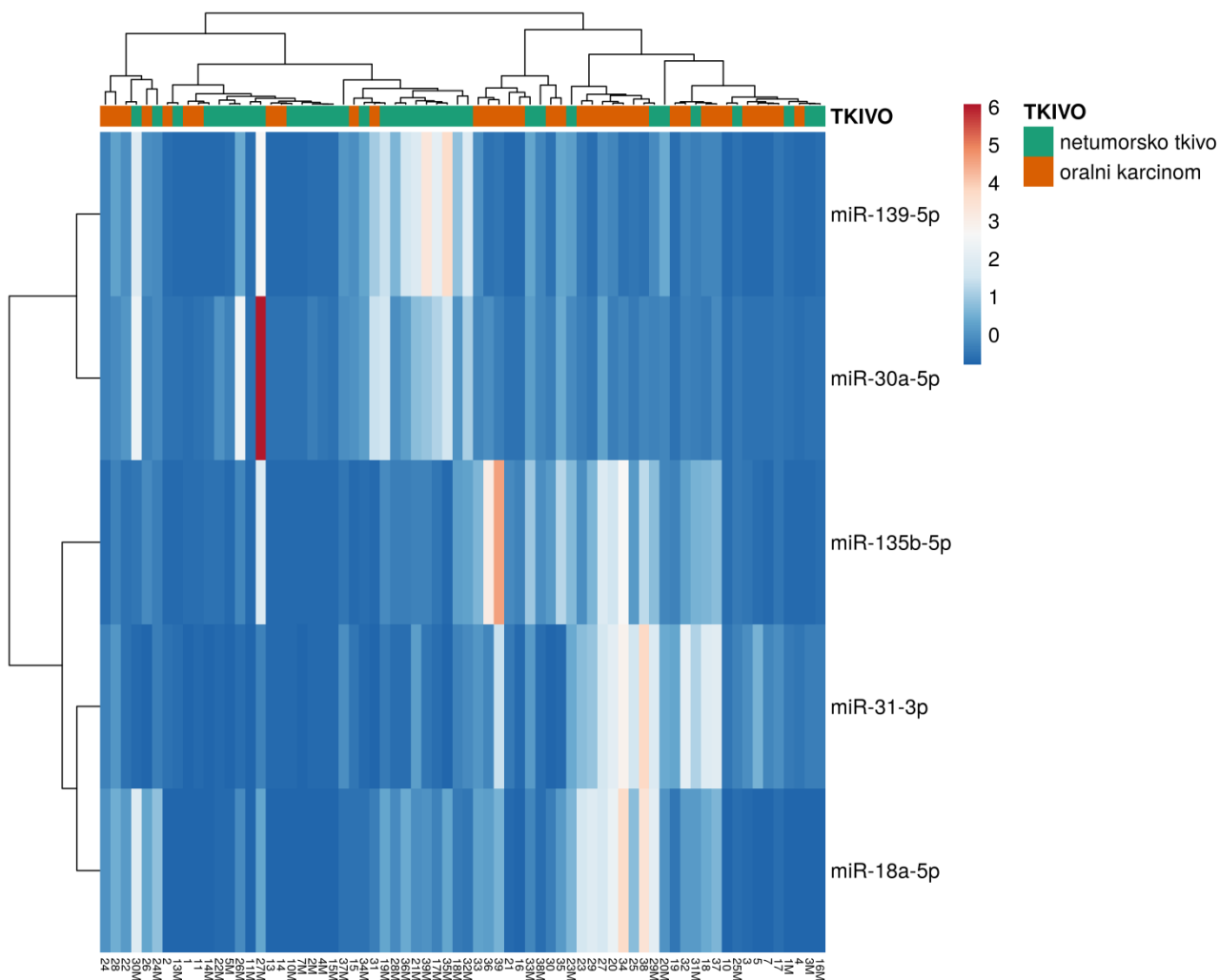
Iz miRNK meta potpisa oralnog karcinoma, dobijenog na osnovu sprovedene meta-analize, izvršen je odabir pet miRNK kandidata za validaciju ekspresije u kliničkim uzorcima tkiva oralnog karcinoma i okolnih netumorskih tkiva u grupi pacijenata iz Srbije koji su dali pristanak za učešće u ovoj studiji.

Na osnovu $2^{-\Delta Ct}$ podataka relativne ekspresije kandidat miRNK gena (*miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-195-5p*, *miR-30a-5p*) u tkivu oralnog karcinoma i netumorskog tkiva je izvršena analiza glavnih komponenata. Glavna komponenta 1 (PC1) opisuje 46,6% varijabilnosti, dok glavna komponenta 2 (PC2) opisuje 35,9% varijabilnosti. Uočava se da PC1 i PC2 opisuju 82,5% ukupne varijanse ekspresije odabranih miRNK. Na Slici 12 se izdvajaju dva klastera uzoraka: oralnog karcinoma i netumorskog tkiva. Klasteri su ograničeni predikcionim elipsama koje se delimično preklapaju. Ovakav rezultat ukazuje da postoji trend razdvajanja tumorskog od netumorskog oralnog tkiva, te da se relativna ekspresija kandidat miRNK može koristiti za potencijalnu diskriminaciju tumorskog od netumorskog oralnog tkiva. S obzirom da je u okviru PCA analizirano relativno mali broj varijabli, tačnije samo pet kandidat gena od interesa za ovu doktorsku disertaciju, može se uočiti izvesno preklapanje predikcionih elipsi. Predikcione elipse imaju nivo poverenja od 95%, što upućuje na verovatnoću svrstavanja novog analiziranog uzorka u odgovarajuću elipsu.



Slika 12. Analiza glavnih komponenata za relativnu ekspresiju odabranih kandidat miRNK u tkivu oralnog karcinoma i netumorskog tkiva. Na X osi je predstavljena glavna komponenta 1 (PC1), a na Y osi glavna komponenta 2 (PC2). Pored svake komponente je data procentualna vrednost koja predstavlja udeo u ukupnoj varijansi. PC – principal component

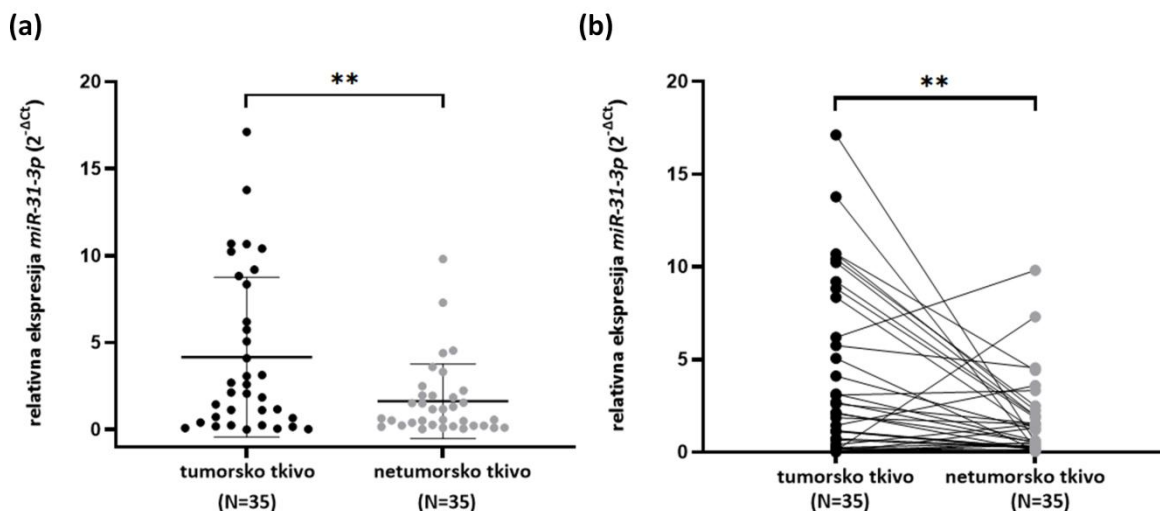
Urađeno je i hijerarhijsko klasterovanje relativne ekspresije analiziranih kandidat miRNK gena (Slika 13). Klaster predstavlja skup objekata koji su svrstani u istu kategoriju prema sličnostima svojih karakteristika. Na dendrogramu se može uočiti da postoje jasno izdvojena dva klastera analiziranih miRNK, gde jedan klaster čine *miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p*, dok su *miR-139-5p*, *miR-30a-5p* u drugom klasteru. Što se tiče klasterovanja kliničkih uzoraka, prikazanih u redovima na Slici 13, segregacija između uzoraka oralnog karcinoma i neizmenjenog tkiva nije toliko precizna, s obzirom da se u okviru klastera kog čine dominantno uzorci oralnog karcinoma javlja i izvestan broj uzoraka (8) okolnog netumorskog tkiva i obrnuto, u klasteru koji čine uzorci netumorskog tkiva se nalazi i 12 uzoraka oralnog karcinoma.



Slika 13. Hijerarhijsko klasterovanje relativne ekspresije *miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-139-5p*, *miR-30a-5p* u uzorcima oralnog karcinoma i okolnog netumorskog tkiva. Mapa intenziteta boja, tj. heatmap-a predstavlja prikaz relativne ekspresije analiziranih miRNK gena (prikazanih u redovima) za svaki analiziran klinički uzorak (prikazan u kolonama). U okviru svakog reda je prikazana minimalna i maksimalna vrednost relativne genske ekspresije na osnovu čega je određena broja kvadratića. Skala intenziteta boja se kreće od plave (0), koja predstavlja sniženu ekspresiju, ka crvenoj boji koja predstavlja povišenu ekspresiju. Uzorci oralnog karcinoma su označeni brojevima, a okolnog netumorskog tkiva brojem i slovom M.

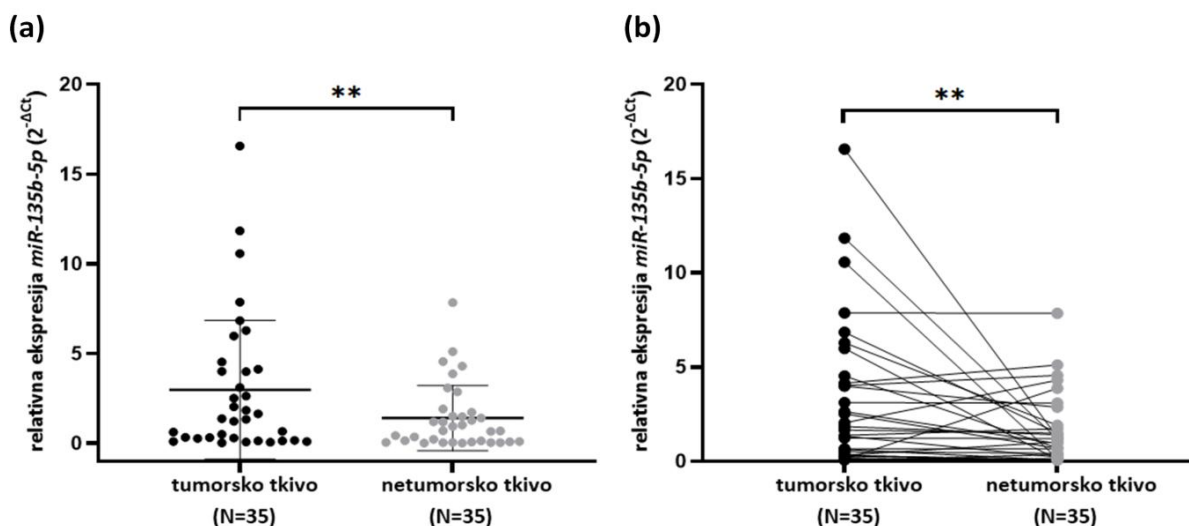
Na Slici 14 je prikazana relativna ekspresija *miR-31-3p* gena u tkivu oralnog karcinoma i uparenom okolnom neizmenjenom zdravom tkivu. Srednja vrednost ekspresije u tumorskom tkivu je iznosila $4,157 \pm 4,593$, a u zdravom tkivu $1,626 \pm 2,146$. Relativna ekspresija je bila povišena 2,5 puta u tumorskom tkivu u odnosu na upareno netumorsko tkivo i uočena razlika je bila značajna ($p=0,003$, Wilcoxon test). Dobijenim rezultatom na kliničkim uzorcima pacijenata sa oralnim

karcinomom je ekspresija *miR-31-3p* gena validirana prema očekivanjima na osnovu ažurirane meta-analize.



Slika 14. Relativna ekspresija gena *miR-31-3p* u tumorskom i okolnom netumorskom tkivu. Relativna ekspresija je normalizovana prema *RNU6B* i izražena kao $2^{-\Delta C_t}$. (a) Na slici su predstavljene srednje vrednosti \pm standardna devijacija. (b) Na slici su predstavljene relativne ekspresije *miR-31-3p* u uzorcima tkiva oralnog karcinoma i uparenog okolnog netumorskog tkiva. N – broj uzoraka. ****** $p < 0,01$

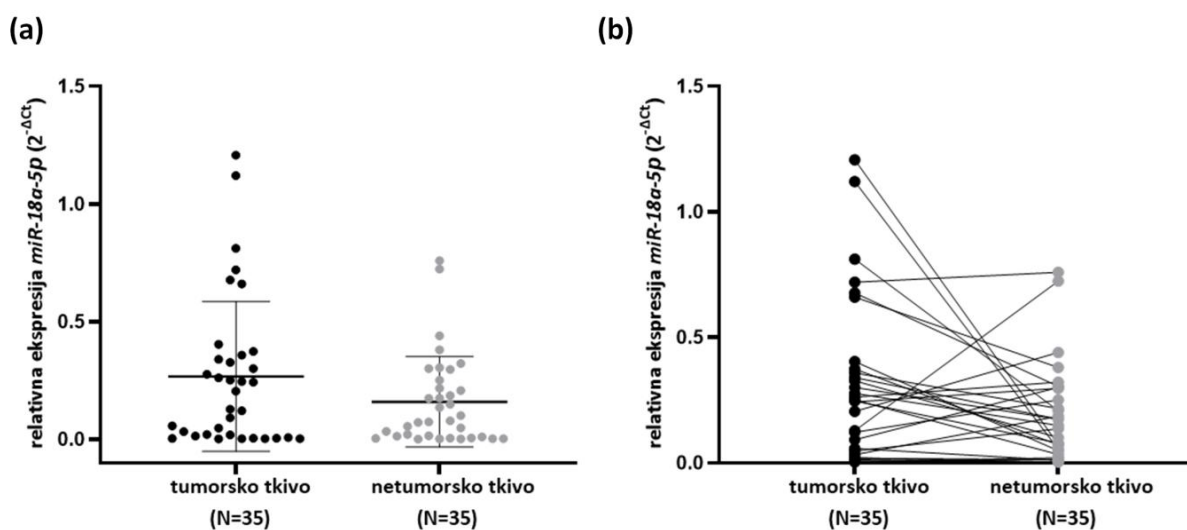
Relativna ekspresija *miR-135b-5p* gena je predstavljena na Slici 15. Uočeno je postojanje značajne razlike između srednje vrednosti ekspresije *miR-135b-5p* gena u tumorskom ($2,972 \pm 3,873$) i uparenom okolnom netumorskom tkivu ($1,401 \pm 1,815$), pri čemu je ekspresija u tumorskom tkivu bila oko dva puta viša ($p = 0,010$, Wilcoxon test). Meta-analizom je *miR-135b-5p* gena bila identifikovana kao povišeno ekspimirana u oralnom karcinomu, što je validirano na našim kliničkim uzorcima.



Slika 15. Relativna ekspresija gena *miR-135b-5p* u tumorskom i okolnom netumorskom tkivu. Relativna ekspresija je normalizovana prema *RNU6B* i izražena kao $2^{-\Delta C_t}$. (a) Na slici su predstavljene srednje vrednosti \pm standardna devijacija. (b) Na slici su predstavljene relativne ekspresije *miR-135b-5p* u uzorcima tkiva oralnog karcinoma i uparenog okolnog netumorskog tkiva. N – broj uzoraka. ****** $p < 0,01$

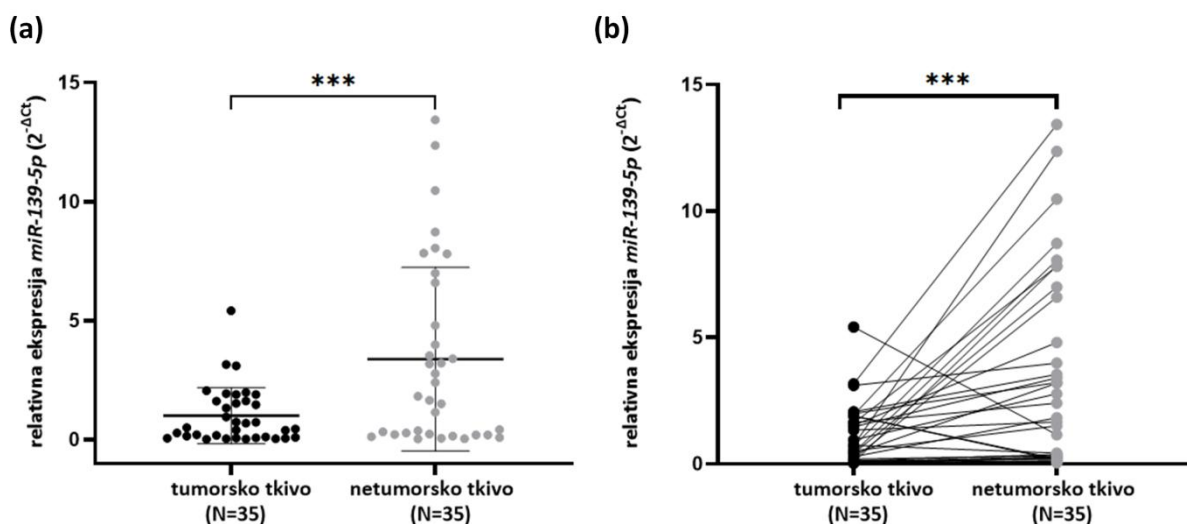
U slučaju analizirane *miR-18a-5p*, utvrđena je povišena ekspresija u oralnom karcinomu ($0,267 \pm 0,318$) u poređenju sa netumorskim tkivom ($0,159 \pm 0,191$), ali uočena razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,072$, Wilcoxon test). Time ekspresija *miR-18a-5p* gena nije validirana u

kliničkim uzorcima oralnog karcinoma prema očekivanjima na osnovu rezultata sprovedene meta-analize (Slika 16).



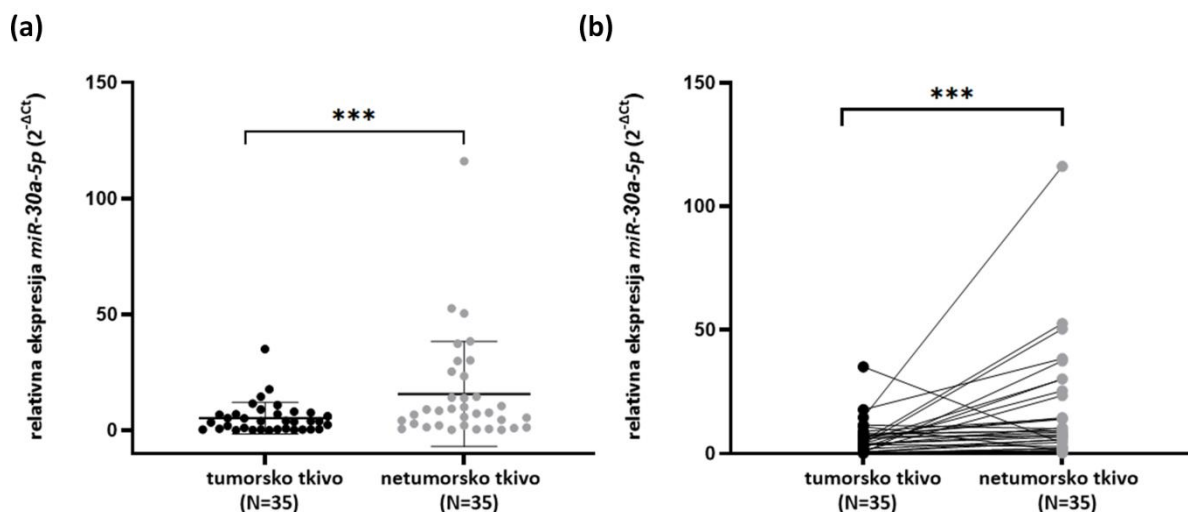
Slika 16. Relativna ekspresija gena *miR-18a-5p* u tumorskom i okolnom netumorskom tkivu. Relativna ekspresija je normalizovana prema *RNU6B* i izražena kao $2^{-\Delta C_t}$. (a) Na slici su predstavljene srednje vrednosti \pm standardna devijacija. (b) Na slici su predstavljene relativne ekspresije *miR-18a-5p* u uzorcima tkiva oralnog karcinoma i uparenog okolnog netumorskog tkiva. N – broj uzoraka.

Za validaciju rezultata dobijenih ažuriranom meta-analizom su odabrane i dve sniženo eksprimirane miRNK: *miR-139-5p* i *miR-30a-5p*. Rezultati validacije su predstavljeni na Slikama 17 i 18. U oba slučaja je potvrđena značajno niža relativna ekspresija u kliničkim uzorcima oralnog karcinoma ($p < 0,0001$, Wilcoxon test i *miR-30a-5p* $p < 0,0001$, Wilcoxon test). Srednja vrednost ekspresije *miR-139-5p* u tumorskom tkivu je iznosila $1,010 \pm 1,180$, a u netumorskom $3,385 \pm 3,853$, što ukazuje da je 3,3 puta bila snižena ekspresija u tkivu oralnog karcinoma (Slika 17).



Slika 17. Relativna ekspresija gena *miR-139-5p* u tumorskom i okolnom netumorskom tkivu. Relativna ekspresija je normalizovana prema *RNU6B* i izražena kao $2^{-\Delta C_t}$. (a) Na slici su predstavljene srednje vrednosti \pm standardna devijacija. (b) Na slici su predstavljene relativne ekspresije *miR-139-5p* u uzorcima tkiva oralnog karcinoma i uparenog okolnog netumorskog tkiva. N – broj uzoraka. *** $p < 0,001$

Kada je reč o *miR-30a-5p*, srednja vrednost relativne ekspresije u tumorskom tkivu je bila $5,246 \pm 6,804$, a u okolnom netumorskom $15,642 \pm 22,631$. Stoga je ekspresija *miR-30a-5p* bila značajno snižena tri puta u tkivu oralnog karcinoma (Slika 18).

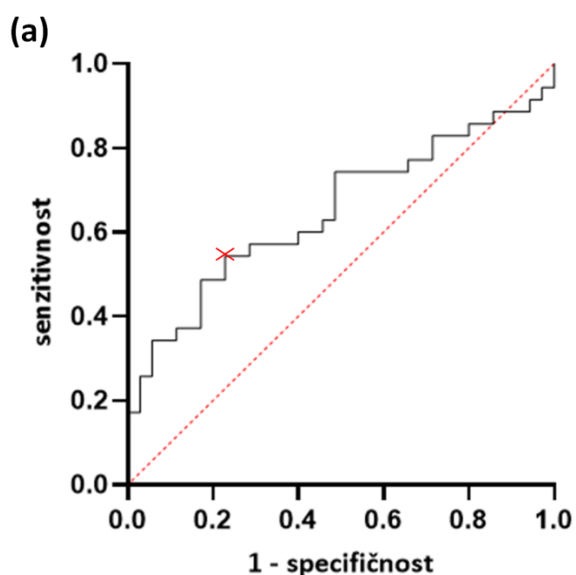


Slika 18. Relativna ekspresija gena *miR-30a-5p* u tumorskom i zdravom tkivu. Relativna ekspresija je normalizovana prema *RNU6B* i izražena kao $2^{-\Delta C_t}$. (a) Na slici su predstavljene srednje vrednosti \pm standardna devijacija. (b) Na slici su predstavljene relativne ekspresije *miR-30a-5p* u uzorcima tkiva oralnog karcinoma i uparenog okolnog netumorskog tkiva. N – broj uzoraka. *** $p < 0,001$

4.5. Dijagnostički potencijal odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma

Da bi se utvrdio dijagnostički potencijal odabranih miRNK iz meta potpisa kao molekularnih biomarkera za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva, urađena je ROC analiza za svaku pojedinačnu miRNK. Analiziran biomarker je smatran korisnim ukoliko je AUC vrednost bila veća od 0,6, a nivo značajnosti manji od 0,05.

Rezultati ROC krive pokazuju da *miR-31-3p*, koja je inače povišeno ekspimirana u oralnom karcinomu, ima AUC vrednost značajno višu od referentne, što ukazuje da *miR-31-3p* ima dovoljnu moć za bude primenjena kao biomarker za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva. Na Slici 19 su predstavljene vrednosti analize ROC kriva, kao i vrednosti specifičnosti i senzitivnosti i granične vrednosti dobijene na osnovu maksimalnog Youden-ovog indeksa koje se mogu koristiti za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva. Za graničnu vrednost 2,013 relativne ekspresije *miR-31-3p*, senzitivnost analiziranog biomarkera je iznosila 54,3%, a specifičnost 77,1%.

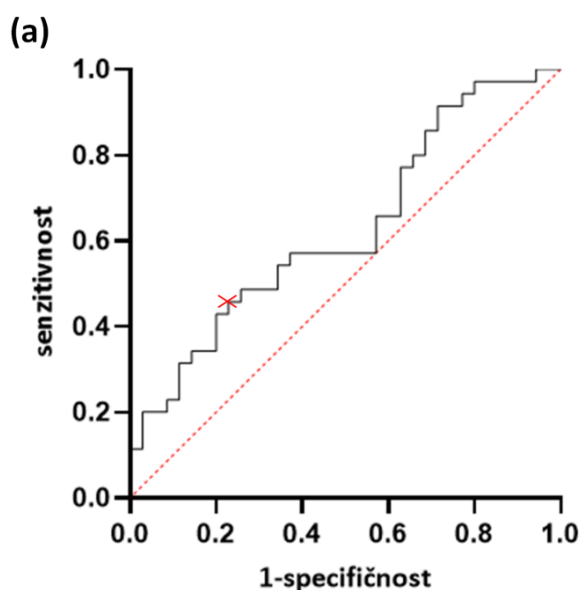


(b)

miRNK	<i>miR-31-3p</i>
AUC (95% CI)	0,650 (0,518-0,781)
p*	0,031
Cut-off	2,013
Senzitivnost	0,543
1-Specifičnost	0,229
Specifičnost	0,771
Youden index	0,314

Slika 19. Dijagnostički potencijal *miR-31-3p* za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od okolnog netumorskog tkiva (a) ROC kriva (b) karakteristike ROC krive i optimalna granična vrednosti sa senzitivnošću i specifičnošću. Cut-off vrednost je označena crvenim krstićem na ROC krivi. * $p < 0,05$ je predstavljeno boldom.

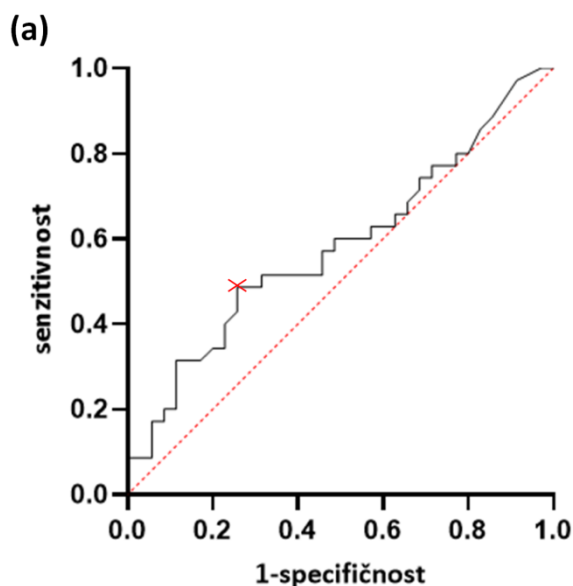
Kada je reč o dijagnostičkom potencijalu *miR-135b-5p* i *miR-18a-5p*, iako su AUC vrednosti ROC krive bile veće od 0,5, one nisu bile značajne (Slika 20, Slika 21). To ukazuje da ove dve miRNK nisu potvrđene kao dobri dijagnostički biomarkeri oralnog karcinoma.



(b)

miRNK	<i>miR-135b-5p</i>
AUC (95% CI)	0,629 (0,498-0,759)
p	0,064
Cut-off	1,777
Senzitivnost	0,457
1-Specifičnost	0,229
Specifičnost	0,771
Youden index	0,229

Slika 20. Dijagnostički potencijal *miR-135b-5p* za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od okolnog netumorskog tkiva (a) ROC kriva (b) karakteristike ROC krive i optimalna granična vrednost sa senzitivnošću i specifičnošću. Cut-off vrednost je označena crvenim krstićem na ROC krivi.

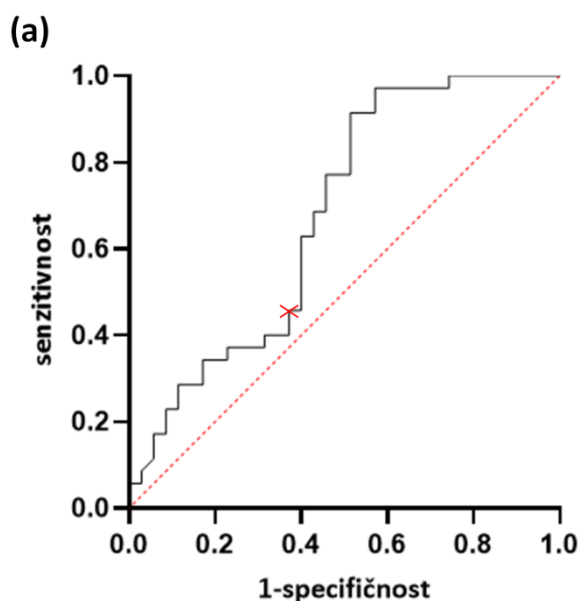


(b)

miRNK	<i>miR-18a-5p</i>
AUC (95% CI)	0,583 (0,448-0,718)
p	0,233
Cut-off	0,230
Senzitivnost	0,486
1-Specifičnost	0,257
Specifičnost	0,743
Youden index	0,229

Slika 21. Dijagnostički potencijal *miR-18a-5p* za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od okolnog netumorskog tkiva (a) ROC kriva (b) karakteristike ROC krive i optimalna granična vrednost sa senzitivnošću i specifičnošću. Cut-off vrednost je označena crvenim krstićem na ROC krivi.

Sniženo eksprimirane *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* imaju AUC vrednost značajno višu od referentne, što ukazuje na značaj i dovoljnu moć navedenih miRNK za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva. Na Slikama 22 i 23 su predstavljene ROC krive i njene karakteristike sa optimalnim graničnim vrednostima dobijene na osnovu maksimalnog Youden-ovog indeksa. Za graničnu vrednost je određena senzitivnost i specifičnost biomarkera koja u slučaju *miR-139-5p* iznosi 2,229 (senzitivnost 48,6%, specifičnost 91,4%), dok za *miR-30a-5p* iznosi 7,069 (senzitivnost 54,3 %, specifičnost 77,1%).

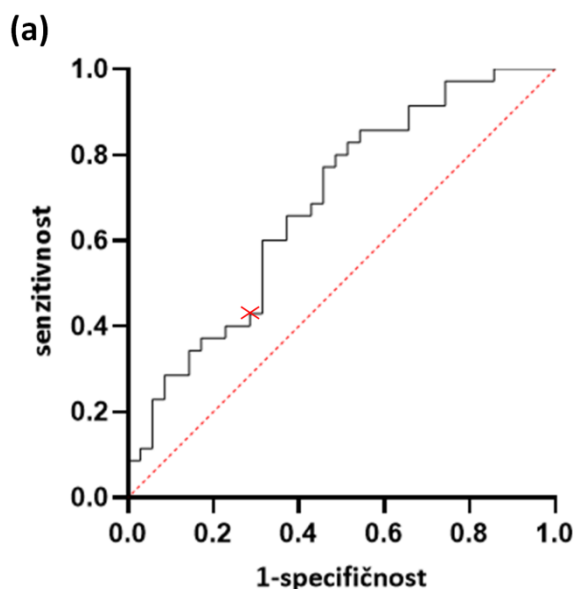


(b)

miRNK	<i>miR-139-5p</i>
AUC (95% CI)	0,677 (0,549-0,805)
p*	0,011
Cut-off	2,229
Senzitivnost	0,486
1-Specifičnost	0,086
Specifičnost	0,914
Youden index	0,400

Slika 22. Dijagnostički potencijal *miR-139-5p* za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od okolnog netumorskog tkiva (a) ROC kriva (b) karakteristike ROC krive i optimalna granična vrednost sa senzitivnošću i specifičnošću. Cut-off vrednost je označena crvenim krstićem na ROC krivi.

*p<0,05 je predstavljeno boldom.

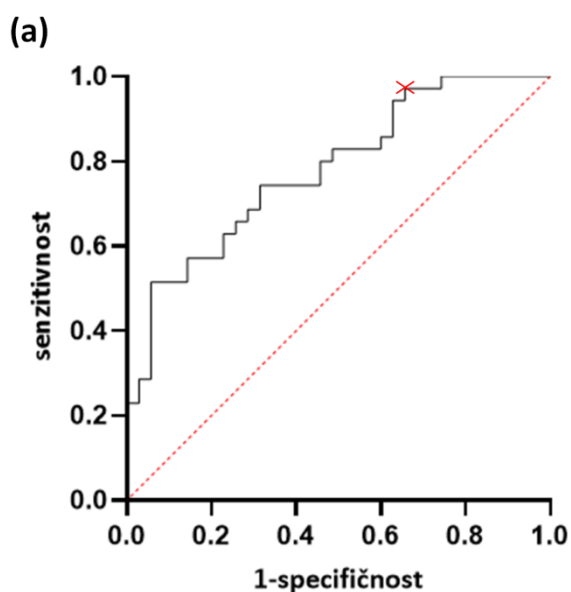


(b)

miRNK	<i>miR-30a-5p</i>
AUC (95% CI)	0,685 (0,561-0,809)
p*	0,008
Cut-off	7,069
Senzitivnost	0,543
1-Specifičnost	0,229
Specifičnost	0,771
Youden index	0,314

Slika 23. Dijagnostički potencijal *miR-30a-5p* za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od okolnog netumorskog tkiva (a) ROC kriva (b) karakteristike ROC krive i optimalna granična vrednost sa senzitivnošću i specifičnošću. Cut-off vrednost je označena crvenim krstićem na ROC krivi. * $p < 0,05$ je predstavljeno boldom.

Budući da su tri miRNK bile značajne kada su analizirane pojedinačno kao dijagnostički biomarkeri, uvrštene su u zajedničku analizu. Kombinovanom analizom koja je uključila istovremeno *miR-31-3p*, *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* je dobijena najveća površina ispod krive koja je značajna (Slika 24). Time je pokazano da istovremena analiza tri navedene miRNK ima jači dijagnostički potencijal u diskriminaciji tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva nego pojedinačno analizirane miRNK. Na osnovu logističke regresije je izračunata predviđena verovatnoća, zasnovana na kombinaciji tri navedene miRNK na sledeći način: $\text{logit}(p=\text{oralni karcinom (tumor/netumor)}) = -0.113 + (-0.230 \times 2^{-\Delta\text{CtmiR-31-3p}}) + (0.459 \times 2^{-\Delta\text{CtmiR-139-5p}}) + (-0.011 \times 2^{-\Delta\text{CtmiR-30a-5p}})$.



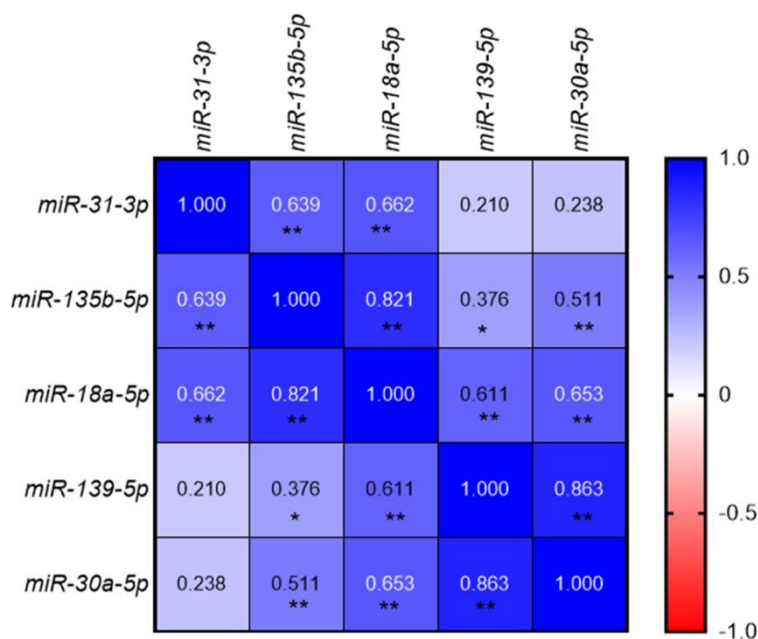
(b)

miRNK	<i>miR-31-3p</i> <i>miR-139-5p</i> <i>miR-30a-5p</i>
AUC (95% CI)	0,780 (0,673-0,886)
p*	<0,0001
Cut-off	0,396
Senzitivnost	0,943
1-Specifičnost	0,486
Specifičnost	0,514
Youden index	0,457

Slika 24. Dijagnostički potencijal panela *miR-31-3p*, *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od okolnog netumorskog tkiva (a) ROC kriva (b) karakteristike ROC krive i optimalna granična vrednost sa senzitivnošću i specifičnošću. Cut-off vrednost je označena crvenim krstićem na ROC krivi. * $p < 0,05$ je predstavljeno boldom.

4.6. Korelacija ekspresije odabranih miRNK u oralnom karcinomu i okolnom netumorskom tkivu

U okviru doktorske disertacije je ispitivano postojanje korelacije relativne ekspresije analiziranih miRNK gena u tkivu oralnog karcinoma. Rezultati su predstavljeni na Slici 25. Utvrđeno je postojanje jake pozitivne korelacije između povišeno eksprimiranih *miR-135b-5p* i *miR-31-3p* ($\rho=0,639$, $p<0,0001$), *miR-135b-5p* i *miR-18a-5p* ($\rho=0,821$, $p<0,0001$) i *miR-31-3p* i *miR-18a-5p* ($\rho=0,662$, $p<0,0001$). Pozitivna korelacija je utvrđena i između sniženo eksprimiranih *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* ($\rho=0,863$, $p<0,0001$). Interesantno je primetiti da je potvrđena i pozitivna korelacija između određenih parova povišeno i sniženo eksprimiranih miRNK: *miR-139-5p* i *miR-18a-5p* ($\rho=0,611$, $p<0,001$, Spearman test), *miR-139-5p* i *miR-135b-5p* ($\rho=0,376$, $p=0,026$, Spearman test), *miR-30a-5p* i *miR-18a-5p* ($\rho=0,653$, $p<0,001$, Spearman test), *miR-30a-5p* i *miR-135b-5p* ($\rho=0,511$, $p=0,002$, Spearman test).

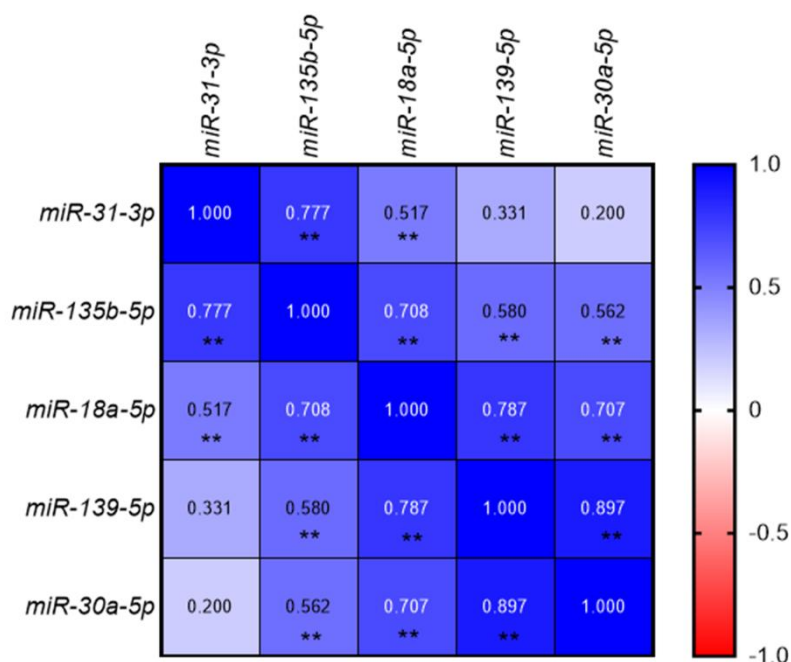


Slika 25. Korelacije analiziranih miRNK u tkivu oralnog karcinoma predstavljene mapom intenziteta boja. Vrednosti koeficijenta korelacije (ρ) su prikazana brojevima u kvadratićima.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$ prema Spearman testu korelacije. Egzaktne p vrednosti su navedene u tekstu.

Napomena: slika je publikovana u celosti na engleskom jeziku u okviru rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

Kada je reč o okolnom netumorskom tkivu, isti trend pozitivne korelacije između parova analiziranih miRNK je potvrđen korelacionom analizom, a rezultati su predstavljeni na Slici 26. Jaka pozitivna korelacija je uočena između parova povišeno eksprimiranih *miR-135b-5p* i *miR-31-3p* ($\rho=0,777$, $p<0,0001$, Spearman test), *miR-135b-5p* i *miR-18a-5p* ($\rho=0,708$, $p<0,0001$, Spearman test) i *miR-31-3p* i *miR-18a-5p* ($\rho=0,517$, $p=0,001$, Spearman test). Isti trend je zapažen između sniženo eksprimiranih *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* ($\rho=0,897$, $p<0,0001$, Spearman test). Kao i u slučaju tumorskog tkiva, potvrđeno je i postojanje pozitivne korelacije između parova povišeno i sniženo eksprimiranih miRNK: *miR-139-5p* i *miR-18a-5p* ($\rho=0,787$, $p<0,0001$, Spearman test), *miR-139-5p* i *miR-135b-5p* ($\rho=0,580$, $p<0,0001$, Spearman test), *miR-30a-5p* i *miR-18a-5p* ($\rho=0,707$, $p<0,0001$, Spearman test), *miR-30a-5p* i *miR-135b-5p* ($\rho=0,562$, $p<0,0001$, Spearman test).



Slika 26. Korelacije analiziranih miRNK u okolnom netumorskom tkivu predstavljene mapom intenziteta boja. Vrednosti koeficijenta korelacije (rho) su prikazana brojevima u kvadratićima.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ prema Spearman testu korelacije. Egzaktne p vrednosti su navedene u tekstu.

4.7. Asocijacija relativne ekspresije odabranih miRNK sa demografskim i kliničkopatološkim karakteristikama pacijenata sa oralnim karcinomom

Jedan od ciljeva doktorske disertacije je bilo ispitivanje postojanja povezanosti relativne ekspresije odabranih miRNK iz meta potpisa sa demografskim i kliničkopatološkim karakteristikama pacijenata (Tabela 15). Relativna ekspresija miRNK kandidata u tkivu oralnog karcinoma je dihotomizovana na povišenu i sniženu prema medijani ekspresije. Uočeno je postojanje značajane asocijacije između ekspresije *miR-31-3p* i konzumacije alkohola i pušačkog statusa ($p=0,027$, χ^2 test). Niži nivo ekspresije *miR-31-3p* je bio češći kod pacijenata koji su imali umerenu ili visoku konzumaciju alkohola, kao i koji su bili pušači. Starost klasifikovana prema medijani godina je bila značajno povezana sa relativnim nivoom *miR-135b-5p* ($p < 0,0001$, χ^2 test), *miR-18a-5p* ($p=0,011$, χ^2 test) i *miR-30a-5p* ($p=0,028$, χ^2 test). Nije utvrđeno postojanje razlike između ekspresije analiziranih miRNK i pola pacijenata. Takođe, oralna higijena nije bila asociirana sa relativnim nivoom odabranih miRNK.

Od analiziranih kliničkopatoloških karakteristika pacijenata, jedino je uočeno da je histološki gradus bio asociiran sa ekspresijom *miR-31-3p* ($p=0,004$, χ^2 test) i *miR-18a-5p* ($p=0,025$, χ^2 test). Pacijenti koji su imali sniženu ekspresiju *miR-31-3p* su češće imali srednji ili slab histološki gradus u poređenju sa pacijentima koji su imali ekspresiju *miR-31-3p* višu od medijane. U slučaju snižene ekspresije *miR-18a-5p* zastupljeniji je bio srednji i slab histološki gradus. Što se tiče lokacije primarnog tumora, nije potvrđeno postojanje razlika u ekspresiji ispitivanih miRNK. Relativni nivo za sve analizirane miRNK se nije značajno razlikovao između pacijenata grupe T3/4 prema grupi T1/2 tumora. U slučaju ekspresije *miR-30a-5p* je primećen statistički trend povezanosti sa veličinom tumora ($p=0,063$, χ^2 test). Povišena ekspresija *miR-30a-5p* je bila zastupljenija kod pacijenata T3/4 u poređenju sa T1/2. Pacijenti sa pozitivnim nodalnim statusom se nisu značajno razlikovali u pogledu relativne ekspresije ispitivanih miRNK gena od pacijenta koji su bili N0. Kada je reč o pacijentima koji su imali recidiv, nije uočeno postojanje razlike u nivou svih pet analiziranih miRNK u poređenju sa pacijentima koji nisu imali recidiv u periodu praćenja.

Table 15. Povezanost demografskih i kliničkopatoloških odlika pacijenata sa oralnim karcinomom sa nivoom relativne ekspresije *miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* u tkivu oralnog karcinoma

Varijabla	N	<i>miR-31-3p</i>			<i>miR-135b-5p</i>			<i>miR-18a-5p</i>			<i>miR-139-5p</i>			<i>miR-30a-5p</i>			
		↑	↓	p*	↑	↓	p*	↑	↓	p*	↑	↓	p*	↑	↓	p*	
Pol	muški	26	10	16	0,060	11	15	0,264	11	15	0,264	12	14	0,711	13	13	1,000
	ženski	9	7	2		6	3		6	3		5	4		5	4	
Starost (medijana godina)	≤59	18	8	10	0,615	3	15	<0,0001	5	13	0,011	7	11	0,238	6	15	0,028
	>59	17	9	8		14	3		12	5		10	7		12	5	
Konzumacija alkohola	bez unosa	10	8	2	0,027	6	4	0,471	6	4	0,471	5	5	0,915	5	5	0,915
	umereno/ mnogo	25	9	16		11	14		11	14		12	13		12	13	
Pušački status	nepušači	10	8	2	0,027	5	5	0,915	5	5	0,915	5	5	0,915	4	6	0,471
	pušači	25	9	16		12	13		12	13		12	13		14	11	
Oralna higijena	dobra	15	10	5	0,064	7	8	0,845	9	6	0,241	8	7	0,625	7	8	0,625
	loša	20	7	13		10	10		8	12		9	11		11	9	
Lokacija primarnog tumora	jezik	25	12	13	0,432	14	11	0,114	13	12	0,096	14	11	0,114	14	11	0,082
	pod usne duplje	6	4	2		3	3		4	2		3	3		4	2	
	tvrd nepce	4	1	3		0	4		0	4		0	4		0	4	
Histološki gradus	dobro	10	9	1	0,004	7	3	0,214	8	2	0,025	6	4	0,692	5	5	0,944
	srednje	18	7	11		8	10		8	10		8	10		9	9	
	slabo	7	1	6		2	5		1	6		3	4		4	3	
Stadijum	I - II	14	7	7	0,890	6	8	0,581	6	8	0,581	6	8	0,581	5	9	0,129
	III - IV	21	10	11		11	10		11	10		11	10		13	8	

Veličina tumora (T)	<2cm	2	1	1	0,878	1	1	0,671	1	1	0,671	1	1	0,671	0	2	0,068
	2-4cm	15	8	7		6	9		6	9		6	9		6	9	
	>4cm	18	8	10		10	8		10	8		10	8		12	6	
	T1/2	17	9	8	0,615	7	10	0,395	7	10	0,395	7	10	0,395	6	11	0,063
	T3/4	18	8	10		10	8		10	8		10	8		12	6	
Nodalni status (N)	N0	18	9	9	0,862	9	9	0,862	8	10	0,615	9	9	0,862	8	10	0,395
	N+	17	8	9		8	9		9	8		8	9		10	7	
Recidiv	ne	26	13	13	0,774	12	14	0,711	13	13	0,774	14	12	0,443	13	13	0,774
	da	9	4	5		5	4		4	5		3	6		4	5	
Smrtni ishod	ne	26	13	13	0,774	12	14	0,711	13	13	0,774	14	12	0,443	13	13	0,774
	da	9	4	5		5	4		4	5		3	6		4	5	

N – broj pacijenata. Povišena i snižena ekspresija se odnose na vrednosti više ili niže od medijane relativne ekspresije miRNK gena u tkivu oralnog karcinoma. Povišena ekspresija je označena strelicom usmerenom na gore, dok je snižena ekspresija označeno strelicom usmerenom na dole.

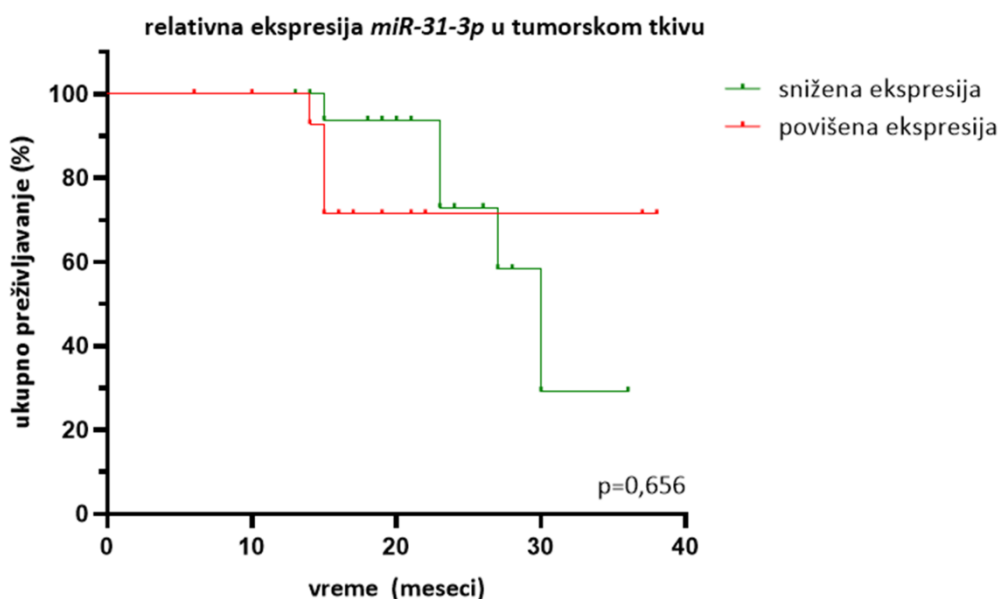
p vrednost je određena χ^2 ili Fišerovim testom. *p<0,05 su predstavljene boldom.

Napomena: tabela je u celosti publikovana na engleskom jeziku u okviru rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

4.8. Prognošički značaj odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma

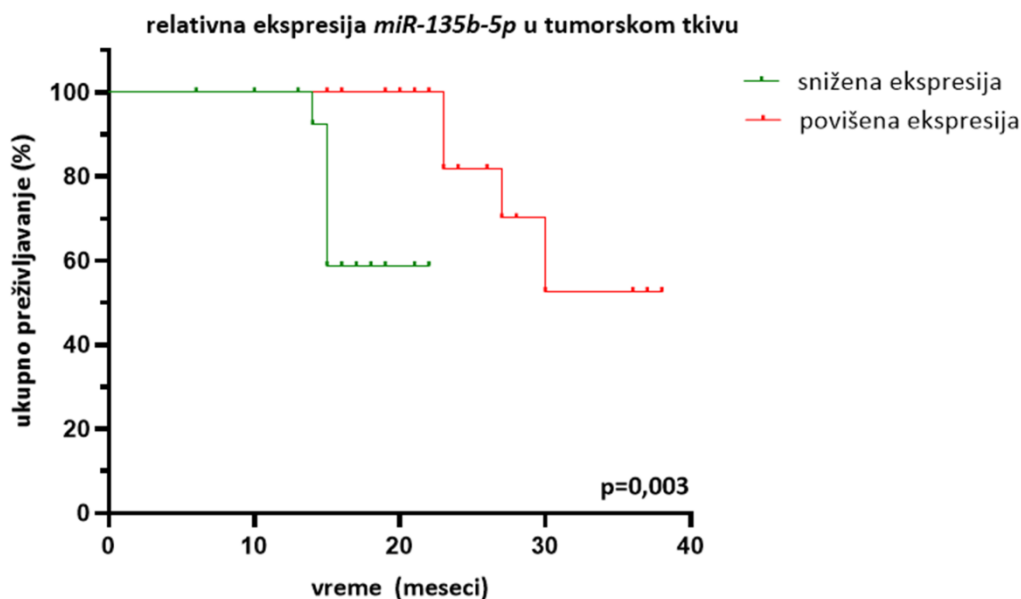
Utvrđivanje prognošičkog značaja odabranih miRNK u oralnom karcinomu je bio jedan od važnih ciljeva ove doktorske disertacije. U tu svrhu su analizirane Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja i određen je rizik negativnog ishoda bolesti proporcionalnom Cox regresionom analizom.

Na Slici 27 su predstavljene krive preživljavanja pacijenata sa oralnim karcinomom koji su klasifikovani u dve kategorije: sniženu i povišenu ekspresiju *miR-31-3p* gena. Kod 17 pacijenata (48,6%) je utvrđena snižena, a kod 18 (51,4%) povišena ekspresija *miR-31-3p* u odnosu na medijanu ekspresije u tkivu oralnog karcinoma. Srednje vreme preživljavanja pacijenata sa sniženom ekspresijom *miR-31-3p* gena je iznosilo $28,917 \pm 2,063$ meseci, što je bilo kraće u odnosu na grupu sa povišenom ekspresijom ($31,357 \pm 2,808$). Nije utvrđeno postojanje značajne razlike u krivama preživljavanja između ove dve grupe ($p=0,656$, log-rank test).



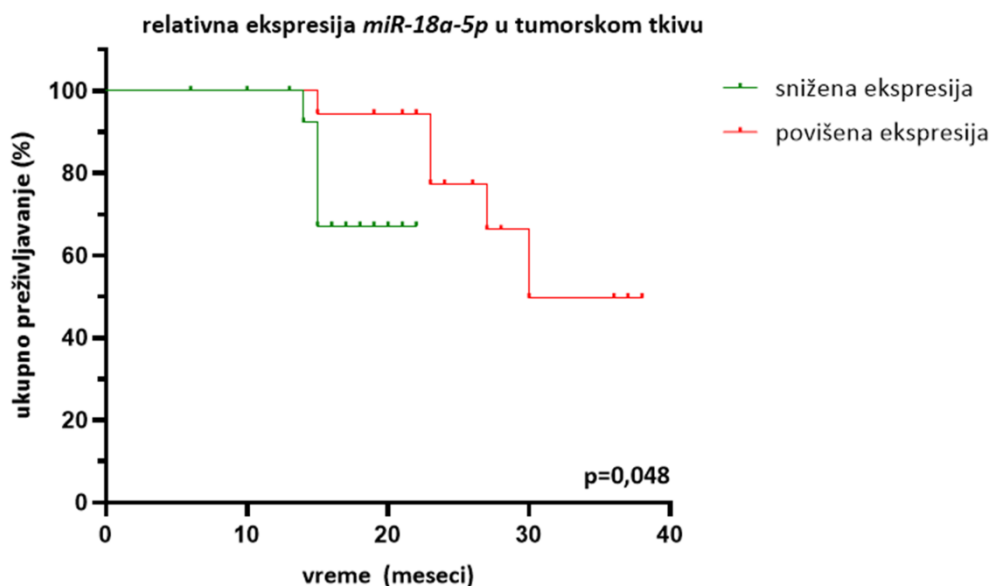
Slika 27. Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja pacijenata sa oralnim karcinomom klasifikovanih u grupe sa povišenom i sniženom relativnom ekspresijom *miR-31-3p* gena. Napomena: slika je publikovana na engleskom jeziku u okviru rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

U slučaju *miR-135b-5p* potvrđeno je da su pacijenti sa povišenom ekspresijom ove miRNK imali značajno lošije preživljavanje u poređenju sa pacijentima sa oralnim karcinomom koji su imali relativnu ekspresiju *miR-135b-5p* nižu od vrednosti medijane u tumorskom tkivu ($p=0,003$, log-rank test), Slika 28. Pacijenti sa povišenom ekspresijom *miR-135b-5p* su preživljavali u proseku $19,035 \pm 1,020$ meseci, što je bilo znatno kraće u odnosu na pacijente sa sniženom ekspresijom čije je srednje vreme preživljavanja iznosilo $32,584 \pm 2,069$ meseca. Ovakvi rezultati ukazuju da bi se *miR-135b-5p* mogla koristiti kao potencijalni prognošički biomarker oralnog karcinoma.



Slika 28. Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja pacijenata sa oralnim karcinomom klasifikovanih u grupe sa povišenom i sniženom relativnom ekspresijom *miR-135-5p* gena. Napomena: slika je publikovana na engleskom jeziku u okviru rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

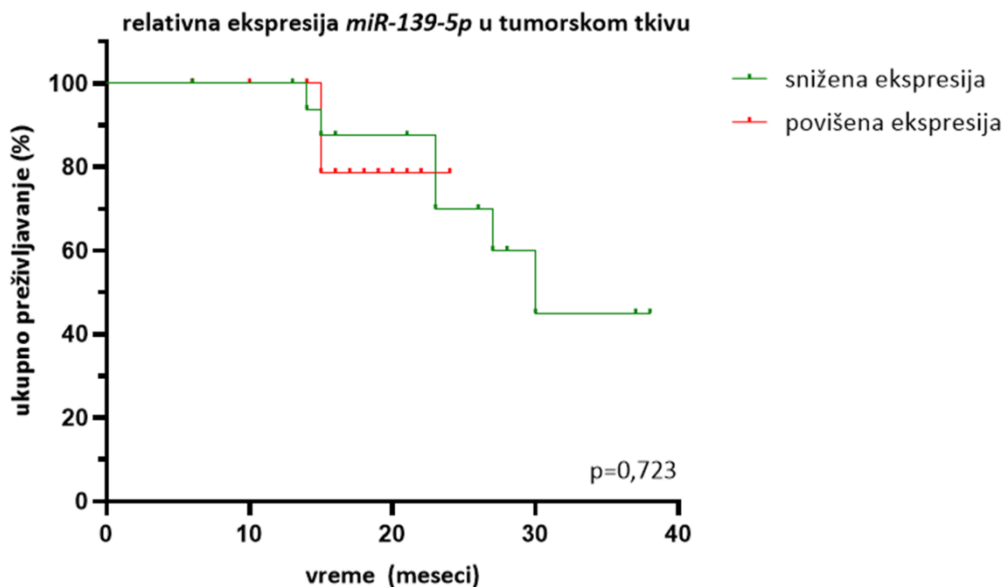
Na Slici 29 su prikazane krive preživljavanja pacijenata sa povišenom i sniženom ekspresijom *miR-18a-5p* gena prema medijani ekspresije u tumorskom tkivu. Pacijenti sa povišenom ekspresijom *miR-18a-5p* su imali značajno kraće vreme ukupnog preživljavanja ($19,622 \pm 0,977$ meseci) u poređenju sa pacijentima sa sniženom ekspresijom, čije je srednje vreme preživljavanja iznosilo $31,608 \pm 2,172$ meseci ($p=0,048$, log-rank test). Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost korišćenja relativne ekspresije *miR-18a-5p* gena kao molekularnog biomarkera prognoze oralnog karcinoma.



Slika 29. Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja pacijenata sa oralnim karcinomom klasifikovanih u grupe sa povišenom i sniženom relativnom ekspresijom *miR-18a-5p* gena. Napomena: slika je publikovana na engleskom jeziku u okviru rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

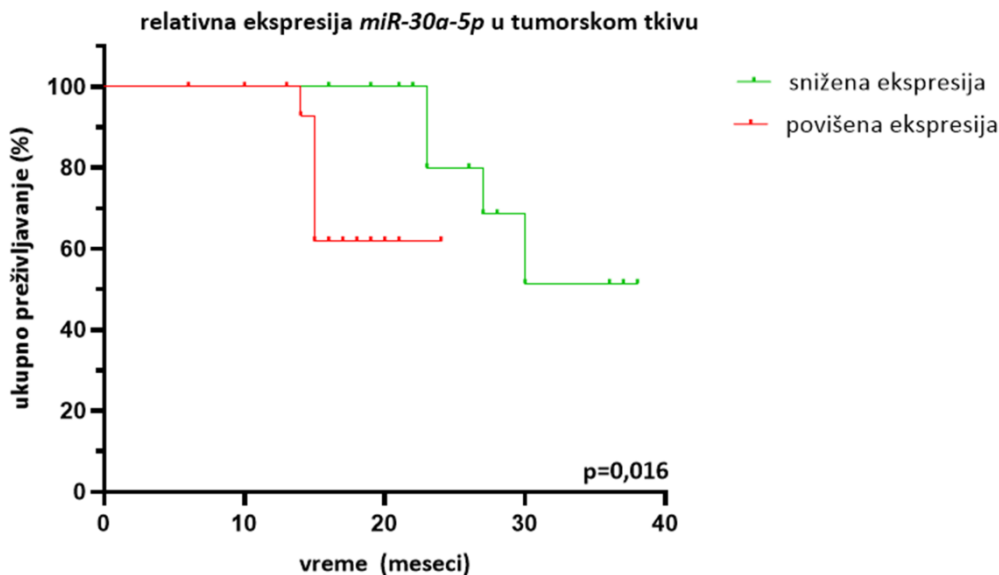
Krive preživljavanja pacijenata klasifikovanih u grupe povišene i snižene ekspresije *miR-139-5p* su prikazane na Slici 30. Prosečna dužina preživljavanja pacijenata sa povišenom ekspresijom *miR-139-5p* je bila kraća i iznosila $22,071 \pm 0,987$ meseci, u poređenju sa pacijentima sa sniženom

ekspresijom ($30,138 \pm 2,375$). Iako je uočena razlika u dužini ukupnog preživljavanja, nije utvrđeno postojanje značajne razlike između kriva preživljavanja ($p=0,723$, log-rank test), što isključuje mogućnost korišćenja *miR-139-5p* kao prognostičkog biomarkera.



Slika 30. Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja pacijenata sa oralnim karcinomom klasifikovanih u grupe sa povišenom i sniženom relativnom ekspresijom *miR-139-5p* gena. Napomena: slika je publikovana na engleskom jeziku u okviru rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

Srednje vreme preživljavanja pacijenata sa povišenom ekspresijom *miR-30a-5p* je bilo $20,500 \pm 1,235$ meseci, što je bilo značajno kraće u odnosu na pacijente sa sniženom ekspresijom koji su preživljavali u proseku $32,371 \pm 2,124$ meseca ($p=0,016$, log-rank test), Slika 31. Mogućnost korišćenja *miR-30a-5p* kao prognostičkog molekularnog biomarkera je podržana dobijenim rezultatima kriva preživljavanja.



Slika 31. Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja pacijenata sa oralnim karcinomom klasifikovanih u grupe sa povišenom i sniženom relativnom ekspresijom *miR-30a-5p* gena. Napomena: slika je publikovana na engleskom jeziku u okviru rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

Rizik negativnog ishoda bolesti je određen računanjem proporcionalne Cox regresione analize (Tabela 16). Univarijantnom analizom je potvrđeno da je veća veličina tumora (T3/4) povezana sa šest puta povećanim rizikom od negativnog, tj. smrtnog ishoda bolesti, kao i povećana ekspresija

miR-30a-5p u tumorskom tkivu. Ove varijable su unete u multivarijantnu Cox regresionu analizu, nakon koje ni jedna od njih nije bila značajno asocirana sa negativnim ishodom bolesti. Veličina tumora niti *miR-30a-5p* nisu nezavisni prognostički indikatori u oralnom karcinomu.

Tabela 16. Univarijantna i multivarijantna hazard ratio Cox regresiona analiza demografskih, kliničkopatoloških odlika i miRNK ekspresije sa ishodom bolesti kod pacijenata sa oralnim karcinomom

Univarijantna Cox regresiona analiza		
Varijabla	HR (95% CI)	p*
Pol (muško vs. žensko)	2,373 (0,636-8,850)	0,198
Starost (medijana godine) (>59 vs. <59 godina)	4,181 (0,945-18,499)	0,059
Unos alkohola (visok/umeren vs. bez unosa)	0,465 (0,125-1,734)	0,254
Pušački status (ikada vs. nikada)	0,465 (0,125-1,734)	0,254
Oralna higijena (loša vs. dobra)	0,863 (0,229-3,258)	0,828
Lokacija primarnog tumora	1,314 (0,556-3,104)	0,534
Histološki gradus	1,942 (0,676-5,577)	0,218
Stadijum (III-IV vs. I-II)	6,432 (0,797-51,886)	0,081
Veličina tumora (T3/4 vs. T1/2)	6,249 (1,248-31,304)	0,026
Nodalni status (N+ vs. N0)	3,550 (0,727-17,337)	0,117
Recidiv (da vs. ne)	250,023 (0,313-199476,645)	0,105
<i>miR-31-3p</i> (povišeno vs. sniženo)	1,346 (0,345-5,251)	0,668
<i>miR-135b-5p</i> (povišeno vs. sniženo)	114,873 (0,60-221215,706)	0,219
<i>miR-18a-5p</i> (povišeno vs. sniženo)	6,339 (0,708-56,755)	0,099
<i>miR-139-5p</i> (povišeno vs. sniženo)	1,325 (0,259-6,777)	0,735
<i>miR-30a-5p</i> (povišeno vs. sniženo)	6,985 (1,142-42,732)	0,035
Multivarijantna Cox-regresiona analiza		
Veličina tumora	4,910 (0,912-26,444)	0,064
<i>miR-30a-5p</i>	4,023 (0,683-23,713)	0,124

HR (95% CI) – hazard ratio sa 95% intervalom poverenja (engl. confidence interval). vs – versus

Povišeno i sniženo se odnosi na nivo ekspresije u odnosu na medijanu. *p<0,05 su predstavljene boldom.

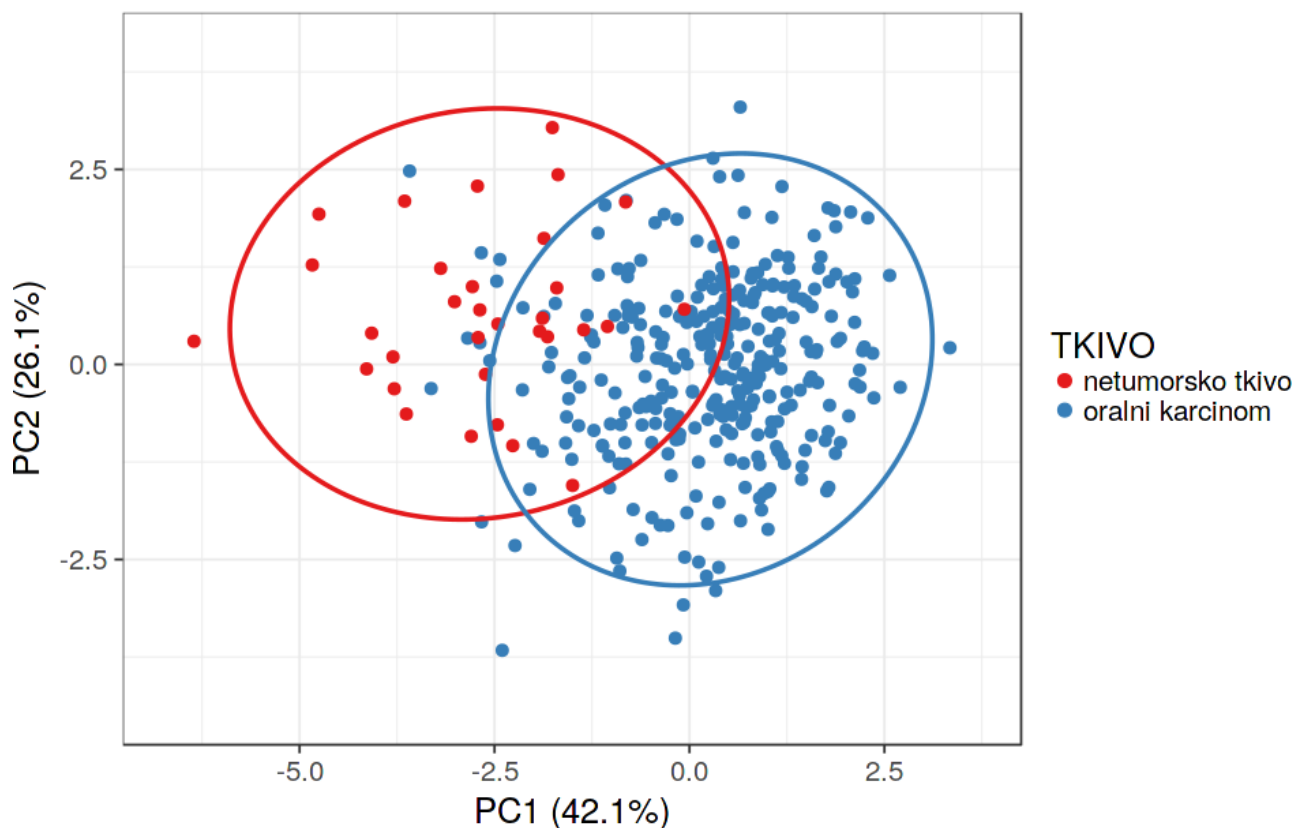
Napomena: tabela je u celosti publikovana na engleskom jeziku u okviru rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

4.9. Validacija relativne ekspresije i dijagnostički potencijal odabranih miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma na uzorcima iz TCGA baze podataka

S obzirom da je studijska grupa uključena u izvođenje ove doktorske disertacije bila ograničene veličine, radi validacije dobijenih rezultata urađena je analiza ekspresije kandidat miRNK na osnovu podataka javno dostupnih u okviru baze podataka TCGA. Podaci o ekspresiji zrelih miRNK molekula u karcinomu glave i vrata analiziranih u okviru TCGA studije su preuzeti sa sajta FireBrowse (<http://firebrowse.org/>) i to TCGA verzija podataka 2016_01_28 za HNSC – karcinom glave i vrata. Bazu je činilo 488 uzoraka HNSC i 44 zdravog tkiva. Iz preuzete baze su ekstrahovani podaci za kandidat miRNK od interesa za ovu doktorsku disertaciju. Na osnovu dostupnih kliničkih podataka, iz baze su uklonjeni podaci o ekspresiji kandidat miRNK koji su se odnosili na uzorke orofarinksa, hipofarinksa, larinksa i tonzila. Na taj način je dobijena homogena TCGA grupa oralnih karcinoma koji su se javljali na anatomskim regijama unutar usne duplje. Konačnu grupu za analizu je činilo 322 oralna karcinoma baze jezika, jezika, usne duplje, tvrdog nepca, alveolarnog grebena i buklane mukoze i 32 uzorka netumorskog tkiva. Ovakvim pristupom je napravljena grupa koja je bila uporedivija sa našom studijskom grupom.

Urađena je analiza glavnih komponenti na osnovu podataka o ekspresiji kandidat miRNK u oralnom karcinomu i zdravom tkivu iz TCGA baze, a rezultati su predstavljani na Slici 32.

Uočavaju se dva klastera koji se delimično preklapaju. Prva komponenta opisuje 42,1% varijabilnosti, dok druga komponenta opisuje 26,1%. Delimično preklapanje predikcionih elipsi se može objasniti relativno malim brojem varijabli koje su analizirane PCA metodom.

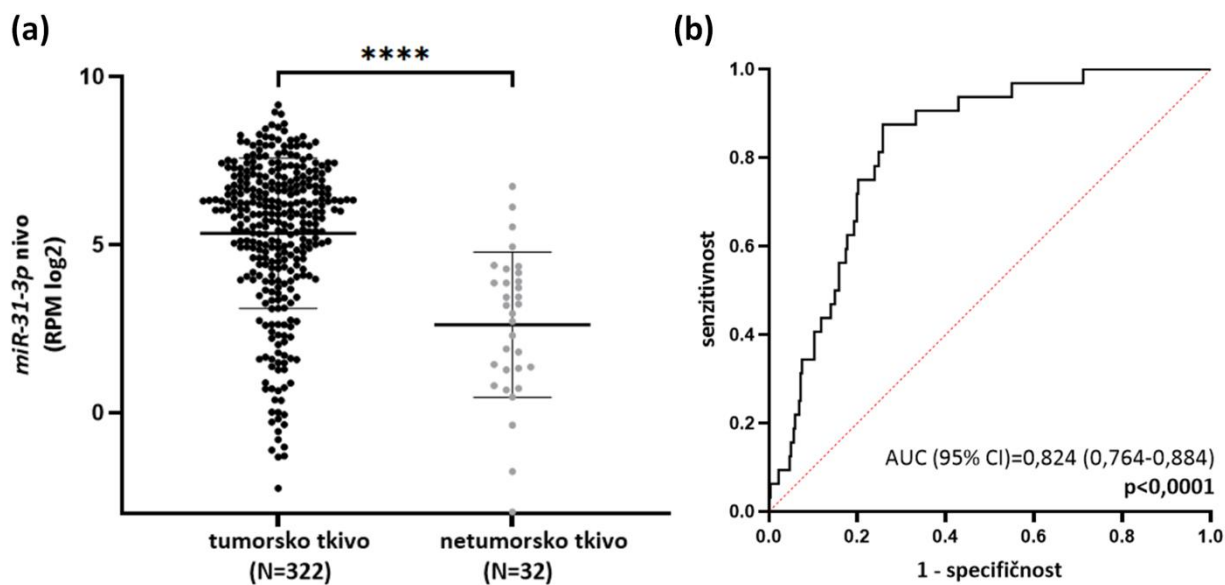


Slika 32. Analiza glavnih komponenti za relativnu ekspresiju odabranih kandidat miRNK u tkivu oralnog karcinoma i netumorskog tkiva – podaci iz TCGA baze. Na X osi je predstavljena glavna komponenta 1 (PC1), a na Y osi glavna komponenta 2 (PC2). Pored svake komponente je data procentualna vrednost koja predstavlja udeo u ukupnoj varijansi. PC – principal component

Na prezetim \log_2 transformisanim (RPM \log_2) i normalizovanim podacima o miRNK ekspresiji iz TCGA baze, urađena je validacija ekspresije pet odabranih najčešće dereguliranih miRNK iz ažuriranog meta potpisa u nezavisnoj grupi od 322 uzorka oralnog karcinoma i 32 uzorka netumorskog tkiva. Analizirane miRNK (*miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p*, *miR-139-5p*, *miR-30a-5p*) su imale nivo ekspresije u tkivu oralnog karcinoma u skladu sa očekivanjima na osnovu nalaza meta-analize i određene relativne ekspresije na našim kliničkim uzorcima. U okviru veće TCGA grupe, potvrđena je značajno povišena ekspresija *miR-31-3p*, *miR-135b-5p* i *miR-18a-5p* ($p < 0,0001$, Mann Whitney U test), dok je u za *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* uočeno značajno niža ekspresija u tkivu oralnog karcinoma u poređenju sa netumorskim tkivom ($p < 0,0001$, Mann Whitney U test). Rezultati validacije ekspresije odabranih miRNK na TCGA kohorti su predstavljeni na Slikama 33-37(a).

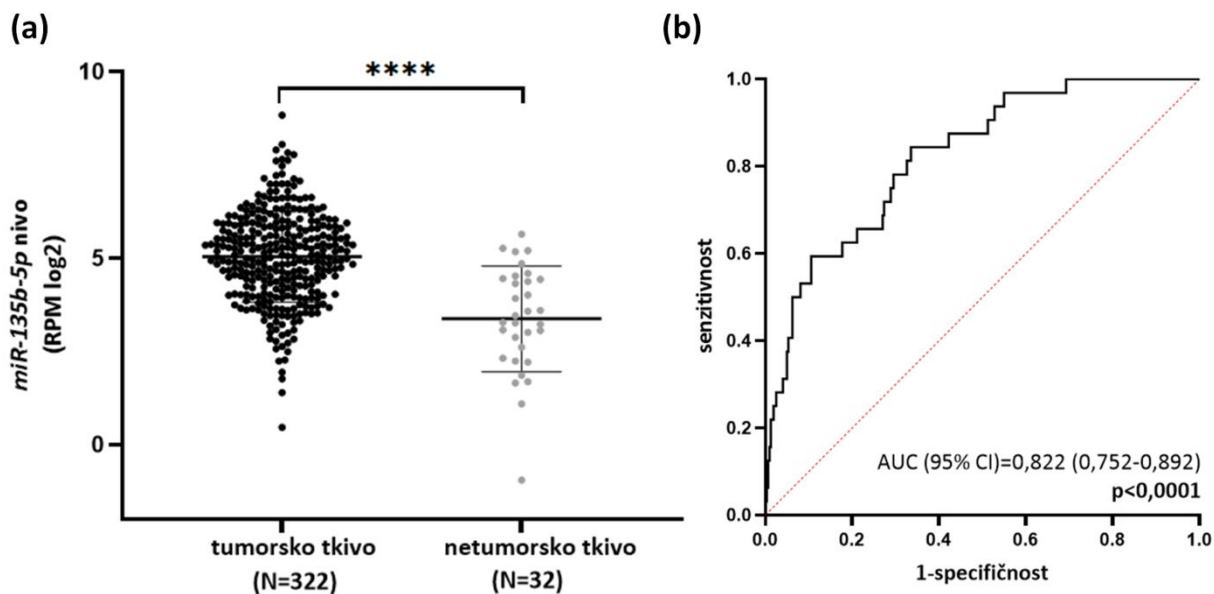
Prezeti podaci o ekspresiji odabranih miRNK su iskorišćeni i za određivanje dijagnostičkog potencijala za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od okolnog netumorskog tkiva. Sprovedena ROC analiza na TCGA podacima ukazala je da je svaka pojedinačna miRNK dobar kandidat za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva, što je potvrđeno površinom ispod krive, 95% intervalom poverenja i p vrednošću, Slike 33-37(b). Vrednosti navedenih parametara su bile približne za svaku analiziranu miRNK, sa AUC vrednostima preko 0,8, ali je najveća površina ispod krive uočena za *miR-30a-5p* (AUC=0,923, 95%CI=0,886-0,961) što ukazuje na najveći dijagnostički potencijal. S obzirom da su podaci korišćeni za ROC analizu bili RPM_{log2}

transformisani, nije određivana granična vrednost za analizirane miRNK, niti specifičnost i senzitivnost.



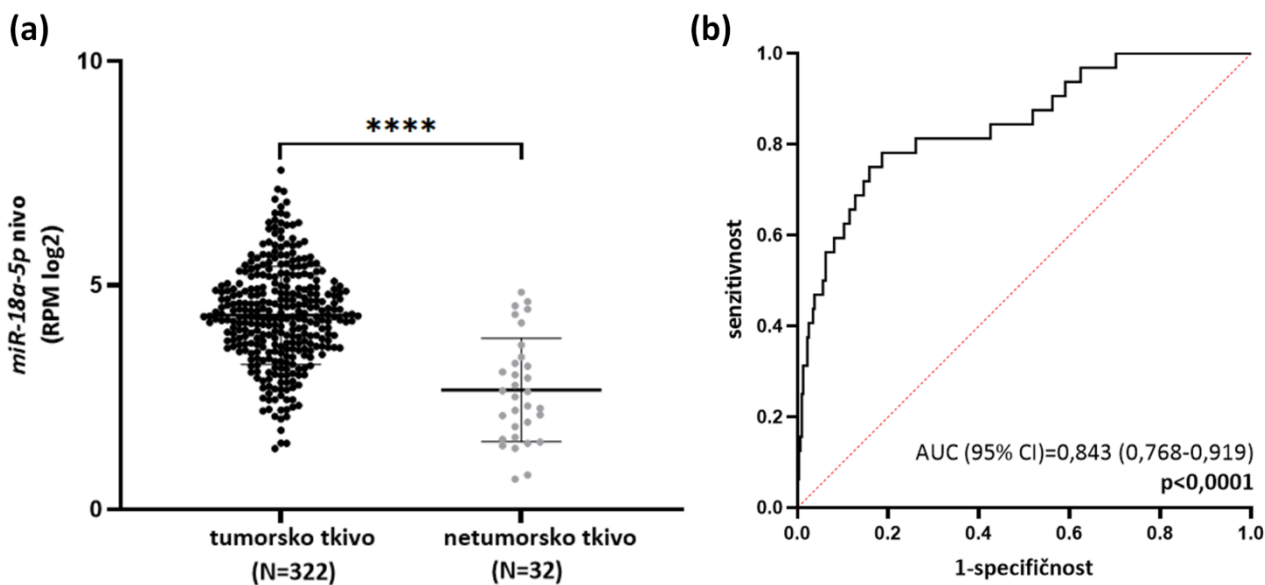
Slika 33. Rezultati analize podataka iz TCGA baze (a) *miR-31-3p* ekspresija u oralnom karcinomu i netumorskom tkivu (b) dijagnostički potencijal *miR-31-3p* za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva. Relativna ekspresija gena je izražena u vrednostima RPM log2. N – broj uzoraka. **** $p<0,0001$.

Napomena: slike su objavljene na engleskom jeziku u okviru dodatka rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).



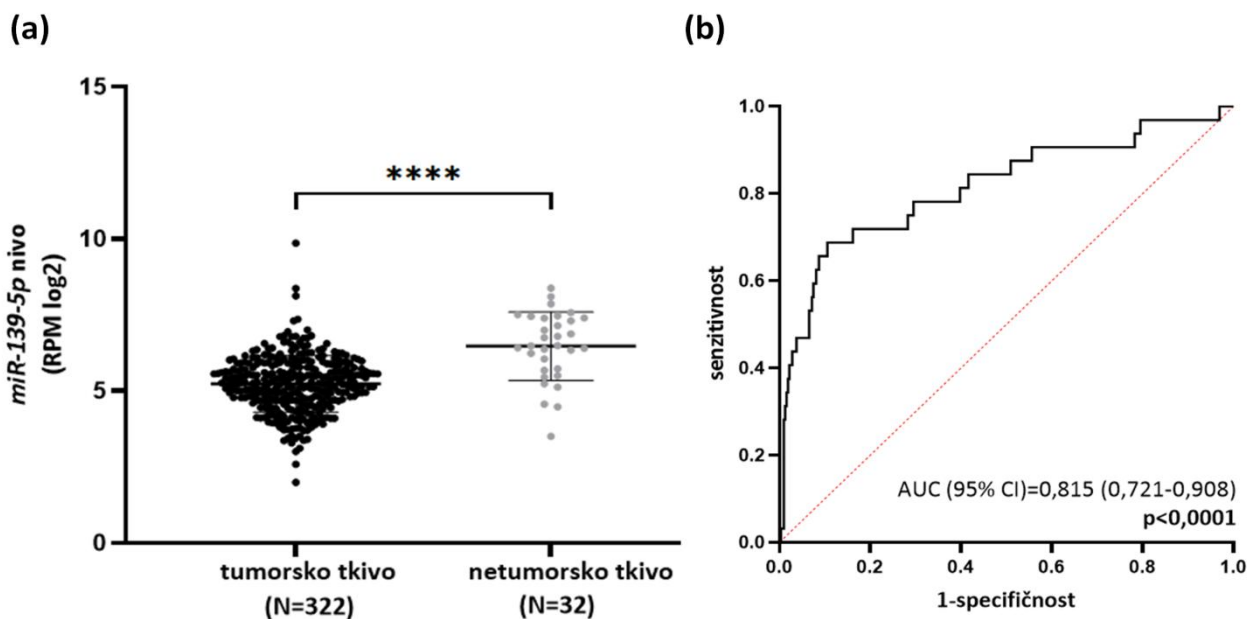
Slika 34. Rezultati analize podataka iz TCGA baze (a) *miR-135b-5p* ekspresija u oralnom karcinomu i netumorskom tkivu (b) dijagnostički potencijal *miR-135b-5p* za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva. Relativna ekspresija gena je izražena u vrednostima RPM log2. N – broj uzoraka. **** $p<0,0001$.

Napomena: slike su objavljene na engleskom jeziku u okviru dodatka rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).



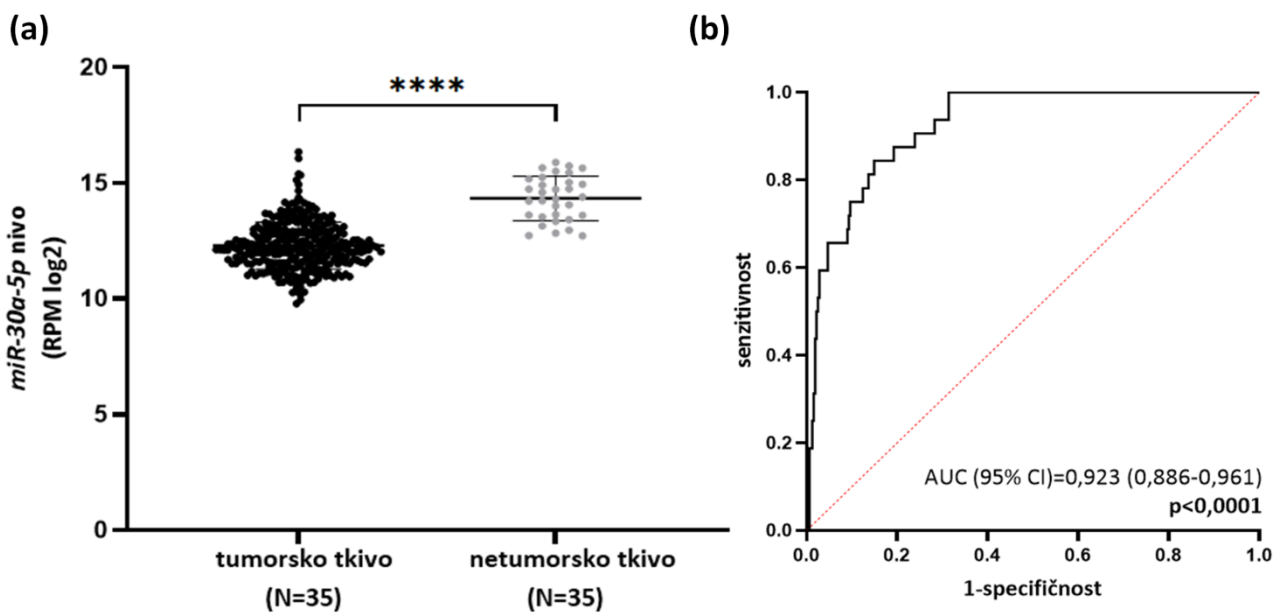
Slika 35. Rezultati analize podataka iz TCGA baze (a) *miR-18a-5p* ekspresija u oralnom karcinomu i netumorskom tkivu (b) dijagnostički potencijal *miR-18a-5p* za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva. Relativna ekspresija gena je izražena u vrednostima RPM log2. N – broj uzoraka. **** $p < 0,0001$.

Napomena: slike su objavljene na engleskom jeziku u okviru dodatka rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).



Slika 36. Rezultati analize podataka iz TCGA baze (a) *miR-139-5p* ekspresija u oralnom karcinomu i netumorskom tkivu (b) dijagnostički potencijal *miR-139-5p* za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva. Relativna ekspresija gena je izražena u vrednostima RPM log2. N – broj uzoraka. **** $p < 0,0001$.

Napomena: slike su objavljene na engleskom jeziku u okviru dodatka rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).



Slika 37. Rezultati analize podataka iz TCGA baze (a) *miR-30a-5p* ekspresija u oralnom karcinomu i netumorskom tkivu (b) dijagnostički potencijal *miR-30a-5p* za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od netumorskog tkiva. Relativna ekspresija gena je izražena u vrednostima RPM log2. N – broj uzoraka. ****p<0,0001.

Napomena: slike su publikovane na engleskom jeziku u okviru dodatka rada proisteklog iz ove doktorske disertacije (Stojkovic et al., 2022).

U okviru TCGA baze su dostupni i podaci o ukupnom preživljavanju pacijenata. Preživljavanje je predstavljeno u danima, od postavljanja dijagnoze do negativnog ishoda bolesti (smrti) ili poslednjeg follow-up-a. Budući da su podaci relativne ekspresije RPM log2 transformisani, nije bilo moguće primeniti iste kriterijume za dihotomizaciju ekspresije miRNK u tkivu oralnog karcinoma na povišenu i sniženu koji su korišćeni u našoj studijskoj grupi. Iz navedenog razloga nije rađena analiza preživljavanja za odabrane miRNK na osnovu dostupnih TCGA podataka.

5. DISKUSIJA

Incidenca oralnog karcinoma je u porastu širom sveta uključujući i našu zemlju. Zabrinjavajući je podatak da se oralni karcinom sve češće javlja među osobama mlađe životne dobi, a da se nakon uspostavljanja dijagnoze i ekscizije tumora, najčešće praćenog adjuvantnom radio i/ili hemioterapijom, u oko 30% slučajeva kod pacijenata javljaju recidivi u naredne dve godine (Capote-Moreno et al., 2020). Pacijenti sa oralnim karcinomom imaju preživaljavanje oko 50% u periodu od pet godina (Capote-Moreno et al., 2020). Ovakvi podaci, nepromenjeni dugi niz godina, nedvosmisleno ukazuju na značaj molekularnog karakterisanja oralnog karcinoma u cilju identifikacije molekularnih biomarkera koji mogu imati ulogu u senzitivnijoj dijagnostici i primeni strategija u hirurškom lečenju, kao i davanju prognoze bolesti. Razvoj i primena visokopropusnih tehnologija u oblasti molekularne biologije i genetike je omogućila da se u relativno kratkom roku identifikuju molekuli, uključujući male nekodirajuće RNK, miRNK, koje su deregulisane u oralnom karcinomu, a čiji se dijagnostički i prognostički potencijal može eventualno iskoristiti za unapređenje molekularno patološke karakterizacije oralnog karcinoma. Do sada sprovedene studije imaju nekonzistentne rezultate po pitanju miRNK, zbog čega je bilo važno sprovesti meta-analizu radi utvrđivanja najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu, koje bi trebalo validirati u kliničkim uzorcima.

Prema našem saznanju, ova doktorska disertacija predstavlja prvu studiju ovog tipa kod nas, ali i u šire, koja je uključila sprovođenje opsežne meta-analize radi utvrđivanja miRNK meta potpisa u oralnom karcinomu, *in silico* karakterizacije miRNK meta potpisa, kao i validaciju selektovanih miRNK i ispitivanje njihovog dijagnostičkog i prognostičkog značaja.

Zahvaljujući razvoju visokopropusnih metoda za utvrđivanje ekspresije velikog broja gena istovremeno, kao što su mikrorej i RNK sekvenciranje, omogućena je brza identifikacija dereguliranih miRNK u različitim patologijama, uključujući oralni karcinom. Ovakav pristup za analizu bioloških uzoraka je olakšao potragu za potencijalnim dijagnostičkim i prognostičkim biomarkerima. Kako su nalazi različitih studija o dereguliranim miRNK u oralnom karcinomu heterogeni, bilo je opravdano sprovođenje meta-analize radi dobijanja jedinstvene liste najčešće dereguliranih miRNK, koja je karakteristična za ovaj malignitet bez obzira na etničko poreklo pacijenata. Pretragom literature, zaključno sa 30.07.2020. godine, smo prema postavljenim kriterijumima izdvojili 10 studija koje su uključene u meta-analizu. Studije se međusobno razlikuju prema: zemlji, broju analiziranih uzoraka, korišćenim platformama za analizu i primenjenim graničnim, tj. cut-off kriterijumima, kao i broju identifikovanih povišeno i sniženo ekspimiranih miRNK. Sve navedeno treba uzeti u obzir prilikom tumačenja uočenih nekonzistentnosti u rezultatima između studija. Različit broj značajno dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu između studija može biti rezultat više činilaca. Jedan od njih je svakako primenjen cut-off, koji može rezultovati identifikacijom većeg ili manjeg broja značajno dereguliranih miRNK. Pored toga, nekonzistentnosti u pogledu identifikovanih miRNK mogu doprineti i različite veličine studijskih grupa, ali i tehnički aspekti uzimanja uzorka tkiva oralnog karcinoma, njihova obrada i čuvanje. Konačno, različite korišćene visokopropusne platforme imaju različit obuhvat za identifikaciju dereguliranih miRNK. Hibridizacione platforme, tj. mikrorej čipovi ili TaqMan[®] array sadrže ograničen broj i tip proba, dok je obuhvat miRNK koje se mogu identifikovati RNK sekvenciranjem značajno veći. Pored navedenog, u obzir treba uzeti i karakteristike samog tkiva oralnog karcinoma. Poznato je da se tumorsko tkivo različitih malignih tumora, kao i oralnog karcinoma, odlikuje inter i intratumorskom heterogenošću, što se može odraziti i na deregulirane miRNK u zavisnosti od dela tkiva koji je korišćen za analizu i njegove histološke diferencijacije (Eriksen et al., 2016; Raychaudhuri et al., 2012; Zandberg et al., 2019). Prema preporukama nekih autora, da bi se dobili što verodostojniji rezultati o miRNK ekspresionim profilima, preporučeno je koristiti više uzoraka istog tkiva sa različitih lokacija unutar zone tumora. Važno je napomenuti da je jedan od kriterijuma za uključivanje studija u meta-analizu bilo da je kao kontrolni uzorak korišćeno odgovarajuće netumorsko tkivo poreklom od istog pacijenta. Poznato je da histopatološki neizmenjeno tkivo

može imati izvesne molekularno genetičke promene (Supic et al., 2011) koje se mogu odraziti na rezultat analize, a samim tim i doprineti nekonzistentnosti rezultata između studija.

Najveći broj studija uključenih u meta-analizu dolazi iz azijskih zemalja. Ovaj podatak nije iznenađujuć, imajući u vidu činjenicu da su karcinomi regiona glave i vrata, a među njima najčešći oralni karcinom, češći u azijskim zemljama, prevashodno regionu južne i jugoistočne Azije (G. Sarode et al., 2020). Ovakva epidemiološka distribucija oralnog karcinoma u svetu se objašnjava stepenom socioekonomskog razvoja i zdravstvene zaštite u pojedinim regionima, ali i navikama u ishrani i konzumaciji alkohola, pušenju i žvakanju duvana, kao i korišćenju biljake betel koja ima dokazan genotoksični efekat (G. Sarode et al., 2020). Budući da oralni karcinom u tim zemljama predstavlja ozbiljan zdravstveni problem, najveći broj studija koje se bave izučavanjem ovog maligniteta potiče upravo iz Azije. U poslednje vreme se može primetiti porast broja publikacija iz oblasti molekularne genetike oralnog karcinoma iz Evropskih zemalja, među koje svakako spadaju sve brojnije studije iz Srbije. Što se tiče opsežnih analiza ekspresije miRNK gena na kliničkim uzorcima oralnog karcinoma pacijenata iz Srbije, prema našem saznanju, ovo je studija koja je do sada među prve tri objavljene u srpskoj grupi pacijenata sa oralnim karcinomom. Ispitivanje istog fenomena u različitim etničkim grupama i pacijentima iz različitih regiona u svetu je svakako značajno, s obzirom da je oralni karcinom entitet koji se razvija iz sadejstva faktora spoljašnje sredine, genetičke i epigenetičke osnove. S obzirom da ljude iz različitih regiona sveta odlikuju različite navike i običaji, izlaganje faktorima rizika iz spoljašnje sredine se nesumnjivo može odraziti na podložnost ka razvoju oralnog karcinoma, ali i različitim identifikovanim deregulisanim miRNK molekulima.

U poređenju sa ranije sprovedenom i publikovanom meta-analizom najčešće deregulisanih miRNK u oralnom karcinomu, koja je uključila sedam studija (Zeljic et al., 2018), u okviru ove doktorske disertacije je analizirano 10 studija u meta-analizi, što se odrazilo i na broj identifikovanih miRNK u meta potpisu. Veći broj uključenih studija u analizu neminovno uslovljava promenu graničnog broja studija u kojima je neophodno da miRNK budu identifikovane kao konzistentno deregulisane, da bi ušle u meta potpis. U prethodnoj meta-analizi, identifikovani miRNK meta-potpis je sadržao 20 miRNK (Zeljic et al., 2018), dok je taj broj u ovoj studiji smanjen na 13. Ovakvi rezultati ukazuju da se povećanjem broja uključenih studija u meta-analizu povećava preciznost identifikovanih miRNK molekula u meta potpisu. S tim u vezi, važno je na dalje pratiti publikacije ovog tipa i raditi ažuriranje meta-analize i posledično miRNK meta potpisa oralnog karcinoma.

Meta-analiza u ovoj doktorskoj disertaciji je sprovedena primenom metode prebrojavanja na način koji je opisan u delu Materijal i metode. Izabrani način sprovođenja meta-analize ima izvesna ograničenja i nedostatke koja proističu iz nepostojanja podataka koji se mogu koristiti za kvantitativnu analizu, što ovaj pristup sprovođenja meta-analize čini statistički neefikasnim usled slabe statističke snage (Tseng, Ghosh, & Feingold, 2012). Važno ograničenje potiče i iz činjenice da metoda prebrojavanja ne uzima u obzir veličinu pojedinačnih studija uključenih u meta-analizu. Iako je važno pomenuti postojeća ograničenja i imati ih u vidu pri interpretaciji rezultata, ranije studije ukazuju da se primenom tzv. prebrojavanja glasova pri sprovođenju meta-analize mogu dobiti vrlo pouzdani podaci o deregulisanim miRNK molekulima, što je potvrđeno u slučaju kolorektalnog karcinoma (Y. Ma et al., 2012) i karcinoma pluća (Rikke, Wynes, Rozeboom, Barón, & Hirsch, 2015). S obzirom na slabu statističku moć metode prebrojavanja glasova, od velike je važnosti validirati rezultate meta-analize na kliničkim uzorcima, što je bio jedan od ciljeva ove doktorske disertacije. Od pet izabranih kandidat miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma, četiri miRNK (*miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-139-5p*, *miR-30a-5p*) su validirane u našoj studijskoj grupi, dok se jedna, *miR-18a-5p*, imala statistički trend za povišenu ekspresiju u tumorskom tkivu, koji je u skladu sa nalazom meta-analize. Rezultati ove doktorske disertacije nedvosmisleno potvrđuju da iako statistički slabe moći, metoda prebrojavanja glasova pri sprovođenju meta-analize daje pouzdane podatke o deregulisanim miRNK molekulima u oralnom karcinomu. Pokazano je da i se

dobijeni rezultati meta-analizom mogu koristiti kao polazište za sprovođenje daljih fokusiranih istraživanja dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu, koje uključuju i ispitivanje njihovog dijagnostičkog i prognostičkog značaja.

U nedostatku mogućnosti za sprovođenje funkcionalnih studija, razvoj bioinformatike je omogućio sprovođenje tzv. *in silico* analiza zarad karakterizacije miRNK od interesa. Do sada su razvijeni brojni softveri koji rade funkcionalne anotacije miRNK molekula. Mi smo se opredelili za korišćenje DIANA miRPath softvera zbog njegovog otvorenog pristupa i jednostavnog baratanja softverom, a takođe su korišćene miRNet i DisGeNET za dodatne analize. S obzirom da je rađena funkcionalna anotacija miRNK iz meta potpisa oralnog karcinoma, bilo je očekivano da miRNK budu asocirane sa različitim tipovima maligniteta i signalnim putevima uključenim u karcinogenezu, što naši rezultati potvrđuju. Sprovedena je i analiza mreža interakcija odabranih miRNK iz meta potpisa. Ovaj bioinformatički pristup je poslužio za verifikaciju odabranih miRNK za dalje analize na kliničkim uzorcima oralnog karcinoma.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je relativna ekspresija *miR-31-3p* bila značajno povišena u tkivu oralnog karcinoma u poređenju sa okolnim netumorskim tkivom u grupi pacijenata sa oralnim karcinomom. Ovakav rezultat ukazuje da *miR-31-3p* gen ima ulogu protoonkogen, tj. onkomir-a, te da njegova povišena ekspresija može dovesti do maligne transformacije oralnih keratocita. S obzirom na ovakav nalaz, potvrđen je i dijagnostički potencijal *miR-31-3p* u diskriminaciji tkiva oralnog karcinoma od okolnog netumorskog tkiva (senzitivnost=54,3%, specifičnost=77,1%). Nakon kombinovanja sa druge dve značajno deregulisane sniženo ekspimirane miRNK, *miR-139-5p* i *miR-30a-5p*, postignuta je veća specifičnost i senzitivnost dijagnostičkog panela miRNK. U literaturi postoje dokazi koji ukazuju na mogućnost korišćenja *miR-31* kao dijagnostičkog biomarkera u oralnom karcinomu, što je u skladu sa našim nalazima. Pokazano je da povišena ekspresija *miR-31* u pljuvački ima potencijal osetljivog molekularnog biomarkera za uspostavljanje rane dijagnoze oralnog karcinoma (C. J. Liu, Lin, Yang, Cheng, & Chang, 2012). Pored toga, isto je potvrđen povišen nivo *miR-31* u slučaju potencijalno malignih oralnih bolesti u poređenju sa normalnom mukozom usne duplje (P. S. Hung et al., 2014). Ukazano je da povišena ekspresija *miR-31* u pljuvački i displazija imaju sinergistički efekat i povećavaju rizik za neoplastičnu transformaciju. (K. F. Hung et al., 2016). Opšti zaključak ovih studija je da bi se nivo *miR-31* potencijalno mogao koristiti za identifikaciju pacijenata sa premalignim lezijama koji imaju povišen rizik za razvoj oralnog karcinoma, ali i generalno kao dijagnostički biomarker u oralnom karcinomu. Studija Lu i saradnika je potvrdila da *miR-31-5p* može biti razmatran kao potencijalni biomarker u oralnom karcinomu (Z. Lu et al., 2019). S obzirom na ovakve literaturne nalaze, može se opravdano pretpostaviti da je uloga *miR-31* u procesu oralne karcinogeneze nevezana za lanac sa kog se ova miRNK sintetiše, te da je uloga *miR-31-3p* i *miR-31-5p* u skvamoznim ćelijama usne duplje istovetna.

Molekularno objašnjenje povišene ekspresije *miR-31* u oralnom karcinomu nije u potpunosti razjašnjeno, ali postoje izvesne naučne potvrde koje rasvetljavaju osnovu onkogene uloge *miR-31*. Potvrđeno je da usled aktivacije *EGFR* onkogen dolazi do povišenja ekspresije *miR-31* u oralnom karcinomu usled aktivacije *EGFR/AKT* signalnog puta i povišene ekspresije *C/EBPβ* (W. C. Lu et al., 2014). U složenom procesu oralne karcinogeneze, povišena ekspresija *miR-31* ostvaruje značajnu ulogu kroz regulaciju kaskade *FIH/HIF/VEGF* (P. S. Hung et al., 2014). Povišen nivo *miR-31* je asociran sa sniženom ekspresijom dokazanog target gena *FIH*, što vodi povišenju nivoa vaskularnog endotelnog faktora rasta (*VEGF*) i sniženju E-kadherina (*E-cad*) (P. S. Hung et al., 2014). To sve rezultuje proliferacijom, migracijom i epitelno mezenhimskom tranzicijom, tj. malignom transformacijom keratinocita usne duplje. Povezanost povišene ekspresije *miR-31* i *FIH/HIF* je potvrđena i u karcinomu glave i vrata (C. J. Liu et al., 2010). *miR-31* deluje kao negativni posttranskripcioni regulator ekspresije *ARID1A* gena što vodi malignoj transformaciji u regionu glave i vrata (W. C. Lu et al., 2016). Postoje eksperimentalne potvrde direktne regulacije ekspresije *SIRT3* gena od strane *miR-31*, što vodi narušavanju funkcije mitohondrija i posledično

oksidativnom stresu što sveukupno rezultuje oralnom karcinogenezom i invazijom (Kao et al., 2019). U *in vitro* uslovima je pokazano da *miR-31* reguliše ekspresiju *RHOA* gena, a što je asocirano sa proliferacijom i potencijalom za migraciju ćelija oralnog karcinoma (K. W. Chang et al., 2013). Ova miRNK ima ulogu u regulaciji proliferacije i ćelijskog ciklusa ćelija oralnog karcinoma kroz regulaciju ciklina D1, *c-myc* i *WLS* gena (Jung, Lee, & Kim, 2020). *NUMB* gen je jedan od target gena čija je ekspresija regulisana od strane *miR-31* u karcinomima glave u vrata. Pokazano je da se na taj način olakšava migracija i invazija ćelija malignog tumora (Chou et al., 2018). Ranije studije su ukazale da *miR-31-5p* reprogramira metabolizam lipida u ćelijama oralnog karcinoma tako što dovodi do snižavanja ekspresije ciljnog gena *ACOX1* (Lai et al., 2018). Istovremeno dovodi do pokretljivosti ćelija i migracije usled povišene ekspresije *ERK-MMP9* (Lai et al., 2018). Dodatno, *miR-31-5p* je bila povezana sa povećanim stepenom proliferacije ćelija oralnog karcinoma (Z. Lu et al., 2019).

Iako nema sumnje da je *miR-31* u oralnom karcinomu, kao i drugim malignitetima glave i vrata povišeno eksprimirana i ima ulogu onkomir-a, interesantno je napomenuti da to nije slučaj u svim malignim tumorima. Pokazano je da *miR-31* u nekim malignim tumorima ima ulogu tumor supresor gena, npr. karcinomu jajnika (Creighton et al., 2010), hepatocelularnom karcinomu (H. S. Kim et al., 2015) i dr. Stoga se *miR-31* svrstava u grupu onih miRNK koje imaju dualnu ulogu u zavisnosti od biološkog konteksta, tj. tumorskog tkiva u kom se eksprimiraju, kao i gena i signalnih puteva u čiju je regulaciju *miR-31* uključena (Stepicheva & Song, 2016; Yu, Ma, Wu, Shu, & Gao, 2018). Zavisno od složenih brojnih interakcija i kombinacije različitih faktora u odgovarajućem tkivu, *miR-31* će imati specifičnu bilo onkogenu ili tumor supresornu ulogu u razvoju i progresiji određenog maligniteta (Stepicheva & Song, 2016). Gen *miR-31* je lociran na 9p21.3 hromozomskoj poziciji. U regionu 9p21-22 se nalaze i geni *CDKN2A* i *CDKN2B* koji sadrže informaciju za sintezu p15 i p16 proteina koji deluju inhibitorno u regulaciji ćelijskog ciklusa. Gubitak ovog hromozomskog regiona može rezultovati sniženom ekspresijom *miR-31* gena i ispoljavanjem njegove tumor supresorske uloge (Yu et al., 2018). Iako je u slučaju oralne karcinogeneze pominje LOH 9p, iz naših rezultata, ali i rezultata drugih studija je očigledno da LOH ovog hromozomskog regiona ne vodi uvek i gubitku *miR-31* gena, barem ne u svim tumorskim tipovima.

Potencijal korišćenja *miR-31* kao prognostičkog biomarkera je diskutabilan. Prema rezultatima ove doktorske disertacije, ne postoji razlika u preživljavanju pacijenata sa povišenom i sniženom ekspresijom *miR-31-3p* u odnosu na medijanu, što ukazuje da se ova miRNK ne može koristiti kao prognostički biomarker u oralnom karcinomu. Naši rezultati nisu u skladu sa rezultatima ranije sprovedene meta-analize koja ukazuje da *miR-31* asocirana sa lošijim preživljavanjem pacijenata sa različitim malignitetima (Y. Ma et al., 2017; S. Wang et al., 2014). U slučaju karcinoma glave i vrata, pacijenti koji su imali nižu ekspresiju *miR-31* su imali duže vreme preživljavanja u poređenju sa onima koji su imali povišenu ekspresiju *miR-31* (Qiang et al., 2019). Evidentno je da su naši rezultati oprečni u odnosu na literaturne podatke. Uočena nekonzistentnost može poticati od primene različitih graničnih vrednosti na osnovu kojih se vrši dihotomizacija ekspresije miRNK u povišenu i sniženu. U ovoj doktorskoj disertaciji je dihotomizacija relativne ekspresije vršena prema medijani, da bi se izbegle eventualne subjektivnosti pri određivanju granične vrednosti ekspresije. Dodatno, postoji i mogućnost da *miR-31* može imati prognostički značaj u nekim malignitetima, ali ne svim.

Ispitivanje korelacije ekspresije odabranih miRNK u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuje da je *miR-31-3p* jako pozitivno korelisana sa *miR-135b-5p* i *miR-18a-5p*, koje su potvrđene kao povišeno eksprimirane u oralnom karcinomu u našoj studiji. Na osnovu tog nalaza, može se pretpostaviti postojanje koekspresije različitih miRNK u oralnom karcinomu, te da se u toku oralne karcinogeneze istovremeno menjaju relativni nivoi onkomir-ova. Budući da se sve tri navedene miRNK nalaze na različitim hromozomskim pozicijama, *miR-31* (9p21.3), *miR-135b* (1q32.1), *miR-18a* (13q31.3), uočena koekspresija se ne može objasniti postojanjem miRNK klastera koji istovremeno transkribuje ove miRNK. Pozitivna korelacija se potencijalno može objasniti istim

genima koje navedene miRNK regulišu na posttranskripcionom nivou, kao i zajednička uloga u regulaciji molekularnih puteva u tumoru. Ove pretpostavke svakako zahtevaju detaljnije eksperimentalne potvrde.

Kada je o reč o povezanosti demografskih i kliničko-patoloških karakteristika pacijenata i relativne ekspresije *miR-31-3p*, u doktorskoj disertaciji je uočena asocijacija između relativne ekspresije *miR-31-3p* i pušenja i konzumacije alkohola. Ovi rezultati su u skladu sa ranije objavljenim rezultatima koji se odnose na ekspresiju *miR-31-5p* kod nepušača i bivših pušača koji imaju oralni karcinom (Kolokythas, Zhou, Schwartz, & Adami, 2015). Povećana ekspresija *miR-31* u karcinomu glave i vrata je potvrđena i nakon tretmana ekstraktom areka oraha (Chou et al., 2018), za koji je poznato da ima genotoksični efekat i da predstavlja jedan od faktora rizika za razvoj oralnog karcinoma. Ovakvi rezultati ukazuju da se usled izlaganja faktorima rizika, kao što su pušenje i žvakanje duvana, areka orahu, alkohol i dr. može modulirati ekspresija *miR-31*, što za posledicu može imati pokretanje složenog procesa maligne transformacije epitelnih ćelija oralne duplje.

Buduća istraživanja bi trebalo usmeriti ka ispitivanju molekularno biološke osnove povišene ekspresije *miR-31-3p* u oralnom karcinomu, kao i funkcionalne studije. Mogućnost korišćenja *miR-31-3p* kao potencijalnog biomarkera za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od okolnog zdravog tkiva bi trebalo dalje ispitati u prospektivnim studijama koje bi uključile veći broj pacijenata sa oralnim karcinomom.

Izučavana u različitim malignim tumorima, *miR-135b* u velikom broju studija je imala povišenu ekspresiju, na osnovu čega se ova miRNK svrstava u grupu onkogenih, tzv. onkomir gena. To je u saglasnosti sa našim rezultatima, prema kojima je *miR-135b-5p* značajno povišeno ekspresirana u tkivu oralnog karcinoma u poređenju sa okolnim netumorskim tkivom. Interesantno je da je u studiji, u kojoj su kao biološki uzorci korišćeni tkivo oralnog karcinoma, okolno netumorsko tkivo od istog pacijenta i uzorci zdrave gingive od drugih osoba bez istorije maligniteta u oralnoj duplji, utvrđeno je da postoji značajna razlika u ekspresiji *miR-135b* između normalne gingive i netumorskog tkiva, ali ne i tkiva oralnog karcinoma i okolnog netumorskog tkiva (Lopes et al., 2018). Ovakvi rezultati podsećaju na postojanje tzv. polja kancerizacije. Kada je reč o ovoj doktorskoj disertaciji, prilikom uzimanja uzorka okolnog netumorskog tkiva od pacijenata uključenih u naše istraživanje je uzorak uziman sa najmanje 2cm udaljenosti od ivice ekscizije tumora. Nekonzistentnost naših rezultata sa nalazima Lopes i sar. može eventualno proisticati iz načina uzorkovanja okolnog netumorskog tkiva.

Prilikom ispitivanja dijagnostičkog potencijala ekspresije *miR-135b-5p*, rezultati ROC analize nisu bili značajni, tako da *miR-135b-5p* nije ispunila kriterijume neophodne da bude razmatrana kao dobar dijagnostički biomarker u oralnom karcinomu prema našim rezultatima. Korišćenjem podataka dostupnih u TCGA bazi, koju je činila veća studijska grupa, *miR-135b-5p* je potvrđena kao značajan dijagnostički biomarker u oralnom karcinomu, sa površinom ispod ROC krive 0,822. Oprečni nalazi dobijeni ispitivanjem dijagnostičkog potencijala *miR-135b-5p* na našim kliničkim uzorcima i TCGA grupi, ukazuje na potencijalni uticaj veličine studijske grupe pri razmatranju ovakvih istraživačkih pitanja.

Literaturni podaci o delovanju *miR-135b* uopšte, uključujući i formu *miR-135b-5p* u oralnom karcinomu su malobrojni. Povišena ekspresija *miR-135b-5p* dovodi do podsticanja proliferacije, migracije i angiogeneze u ćelijskim linijama oralnog karcinoma putem negativne regulacije ekspresije target gena *FIH* (L. Zhang, Sun, Bian, & Kulkarni, 2013). Pokazano je da je *FIH* gen regulisan i od *miR-31* (P. S. Hung et al., 2014; C. J. Liu et al., 2010), čime se može potencijalno objasniti uočena pozitivna korelacija između ekspresije *miR-31-3p* i *miR-135b-5p* u ovoj doktorskoj disertaciji. U ćelijama nazofaringealnog karcinoma, koji spada u grupu karcinoma glave i vrata, je pokazano da *miR-135b-5p* direktno reguliše ekspresiju *SIRT1*, što vodi epitelno-mezenhimskoj

tranziciji i metastazi ćelija (Y. Cheng, 2022). U osnovi ovog procesa je da *miR-135b-5p* uzrokuje narušavanje deacetilacije *c-JUN* posredovane aktivnošću *SIRT1* genom, što vodi povećanju ekspresije *MMP7*, a što za rezultat ima malignizaciju ćelija nazofarinksa (Y. Cheng, 2022). U ćelijskim linijama karcinoma ezofagusa, *miR-135b* je bila povišeno eksprimirana i eksperimentalno je potvrđen njen target gen *TXNIP* (Di et al., 2021). Pokazano je da suprimiranje *miR-135b* dovodi do zaustavljanja progresije karcinoma ezofagusa putem negativne regulacije *TXNIP*. Postoje izvesni dokazi koji mogu da ukažu na povezanost *miR-135b* i metastaziranja oralnog karcinoma. U slučaju oralnog karcinoma sa metastazama je uočena snižena ekspresija *miR-135b* u poređenju sa uzorcima bez metastaza (Scapoli et al., 2010). Ni jedan pacijent sa oralnim karcinomom koji je uključen u našu studiju nije imao udaljene metastaze u periodu praćenja od maksimalno 38 meseci. Samim tim nije bilo moguće ispitati eventualnu povezanost ekspresije *miR-135b-5p* i pojave metastaza.

Kada je reč o povezanosti ekspresije *miR-135b-5p* u tumorskom tkivu i preživljavanju pacijenata, u našoj studiji je potvrđena značajna razlika između pacijenata sa povišenom i sniženom ekspresijom *miR-135b-5p* u odnosu na medijanu. Pacijenti sa povišenom ekspresijom su imali značajno kraće preživljavanje. Ovakav nalaz je u skladu sa postojećim rezultatima u literaturi za oralni karcinom (S. Li et al., 2017) i karcinom ezofagusa (C. Y. Li et al., 2019). Na osnovu ovakvih literaturnih nalaza, može se izneti opravdani zaključak da *miR-135b-5p* predstavlja univerzalni prognostički biomarker lošijeg preživljavanja pacijenata sa različitim tipovima karcinoma, oralnog karcinoma i karcinoma ezofagusa (Stojkovic et al., 2022). Važno je napomenuti da Cox regresionom analizom *miR-135b-5p* ipak nije potvrđen kao nezavisni prognostički biomarker u našoj studiji.

U našoj studijskoj grupi, stariji pacijenti, preko 59 godina starosti su češće imali značajno nižu ekspersiju *miR-135b-5p* u tkivu oralnog karcinoma u poređenju sa pacijentima koji su mlađi od 59 godina. Osim činjenice da se nivo ekspresije sa godinama i starošću može menjati, nemamo potpuno jasno objašnjenje za uočenu povezanost starosti i nivoa ekspresije *miR-135b-5p* u našoj grupi pacijenata sa oralnim karcinomom.

S obzirom na oskudnost podataka o ekspresiji *miR-135b-5p* u oralnom karcinomu, može se reći da rezultati ove doktorske disertacije daju značajan doprinos savremenoj naučnoj literaturi. Dalja istraživanja treba usmeriti na ispitivanje mehanističkog efekta povišene ekspresije *miR-135b-5p*, kao i rasvetljavanju osnove povezanosti *miR-135b-5p* i preživljavanja pacijenata sa oralnim karcinomom, s posebnim fokusom na prospektivne studije.

Nivo ekspresije *miR-18a-5p* je ispitivan u različitim tipovima malignih tumora, uključujući i nekolicinu studija koje su se odnosile na ekspersiju *miR-18a-5p* u oralnom karcinomu. Ranije sprovedena meta-analiza ukazuje da je ova miRNK konzistentno povišeno eksprimirana u oralnom karcinomu (Zeljic et al., 2018), što je potvrđeno i u ažuriranoj meta-analizi ove doktorske disertacije. Potvrđeno je da je relativna ekspresija *miR-18a-5p* povišena u tkivu različitih maligniteta, a isti rezultati su dobijeni i u ćelijskoj liniji oralnog karcinoma SSC9 u poređenju sa neizmenjenim ćelijama (Huang, Song, & Lai, 2019). U ovoj doktorskoj disertaciji je *miR-18a-5p* imala povišenu ekspersiju u tkivu oralnog karcinoma, ali razlika u odnosu na okolno netumorsko tkivo nije bila značajna, iako je postojao statistički trend. Naši rezultati dobijeni ažuriranom meta-analizom nisu validirani u kliničkim uzorcima pacijenata sa oralnim karcinomom uključenih u ovu studiju. Dodatno, u našoj studiji relativni nivo *miR-18a-5p* nije imao dovoljno dobar potencijal za diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od okolnog netumorskog tkiva, što ukazuje da se *miR-18a-5p* ne može koristiti kao dijagnostički biomarker u oralnom karcinomu. Iako je bilo očekivano da se validira povišena ekspresija *miR-18a-5p* i time statistički potvrdi njena uloga kao onkogene miRNA, literaturni podaci ukazuju na dualnu ulogu, tj. onkogenu i/ili tumor supresornu ulogu *miR-18a* u različitim tipovima malignih tumora (Kolenda et al., 2020; Shen, Cao, Zhu, You, & Zhang, 2019).

Funkcionalna analiza *miR-18a-5p* u oralnom karcinomu nije previše ispitivana, tako da je literatura za ovaj malignitet, prema našem saznanju, vrlo oskudna. Gen *SMAD2* je eksperimentalno potvrđen kao ciljani gen čija je ekspresija regulisana od strane *miR-18a-5p* u oralnom karcinomu (Huang et al., 2019). U slučaju nazofaringealnog karcinoma, koji spada u grupu karcinoma glave i vrata, utvrđena je povišena ekspresija *miR-18a-5p*, što je istovremeno vodilo pospešivanju rasta tumora, migraciji i invaziji ćelija. U osnovi procesa je potvrđeno da *miR-18a-5p* reguliše *SMG1* gen usled čega dolazi do aktivacije nishodnog PI3K/AKT/mTOR signalnog puta (Mai et al., 2019). U istoimenoj studiji je nakon primene antagomir-18a u mišjem ksenograftu nazofaringealnog tumora inhibiran rast tumora (Mai et al., 2019). To ukazuje da bi se *miR-18a* gen mogao koristiti kao svojevrsni target za ciljanu terapiju. U ćelijama karcinoma glave i vrata, *miR-18a-5p* je bila povišeno eksprimirana i negativno je regulisala ekspresiju potvrđenog target gena *SORBS2*, što je za posledicu imalo indukciju proliferacije, migracije i invazije ćelija i izbegavanju apoptoze (Q. Chen & Xu, 2021). U ćelijskim linijama karcinoma ezofagusa usled povišene ekspresije *miR-18a* indukovana je proliferacija putem povišene ekspresije ciklina D1 i signalnog puta PTEN/PI3K/AKT/mTOR (W. Zhang, Lei, Fan, & Wang, 2016).

Kada je reč o prognostičkom potencijalu *miR-18a-5p*, naši rezultati ukazuju da je ukupno preživljavanje pacijenata bilo kraće ukoliko je ekspresija *miR-18a-5p* bila povišena u odnosu na medijanu. Primenom Cox regresione analize nije verifikovana *miR-18a-5p* kao nezavisni prognostički biomarker u ovoj disertaciji. Nalazi drugih studija imaju rezultate koji su u saglasnosti sa našim. Rezultati meta-analize ukazuju da je povišen nivo *miR-18a* gena asociran sa lošijim preživljavanjem pacijenata sa karcinomima glave i vrata (Jamali et al., 2015), kao i karcinoma ezofagusa (Xu et al., 2014). U slučaju karcinoma jezika, *miR-18a* je identifikovana kao prognostički biomarker (Berania et al., 2017). Može se pretpostaviti da *miR-18a-5p* ima različitu ekspresiju zavisno od lokacije tumora unutar usne duplje, što posledično vodi i različitoj povezanosti sa ukupnim preživljavanjem pacijenata. Studijska grupa koja je uključena u izvođenje ovog istraživanja je uključivala pacijente sa tumorom na različitim lokacijama unutar usne duplje i to jeziku, podu usne duplje i tvrdom nepcu, pri čemu nije potvrđeno postojanje asocijacije između anatomske lokacije tumora i relativne ekspresije *miR-18a-5p*.

Pacijenti stariji od 59 godina su imali značajno češće sniženu ekspresiju *miR-18a-5p* u odnosu na medijanu u našoj grupi pacijenata. S obzirom da miRNK molekuli imaju ulogu i u regulaciji procesa ćelijskog starenja, moguće je da se sa starošću osoba sa oralnim karcinomom menja ekspresija navedene miRNK. Prema našem saznanju, konkretne eksperimentalne potvrde koje bi detaljnije rasvetlile uočenu vezu između ekspresije *miR-18a-5p* i starosti ne postoje u aktuelnoj literaturi.

miR-139-5p je intenzivno proučavana u različitim tipovima malignih tumora sa aspekta moguće upotrebe u dijagnostičke, prognostičke, prediktivne i terapijske svrhe. Jedinostveni je zaključak većine studija da je ekspresija *miR-139-5p* gena snižena u malignitetima, što ovu miRNK svrstava u grupu tumor supresora (Khalili et al., 2020). U nekolicini studija je uočena povišena ekspresija *miR-139-5p*, na primer u kolorektalnom karcinomu (J. Liu et al., 2019), gastrointestinalnom (Pantaleo et al., 2016) i adrenokortikalnom karcinomu (Agosta et al., 2018). S obzirom na svoju važnu ulogu u procesu maligne transformacije, *miR-139-5p* je viđena kao obećavajući kandidat za molekularni biomarker različitih maligniteta. To je bio jedan od dodatnih razloga zbog kojih je *miR-139-5p* bila jedan od izabраниh kandidata za validaciju u kliničkim uzorcima oralnog karcinoma u ovoj studiji. Uvidom u literaturu je uočeno da ekspresija ove miRNK nije intenzivno proučavana u oralnom karcinomu. Naši rezultati ukazuju da je nivo relativne ekspresije *miR-139-5p* niži u tkivu oralnog karcinoma u odnosu na okolno neizmenjeno tkivo što je u skladu sa nalazima ekspresije ove miRNK u najvećem broju drugih tipova malignih tumora. Dobijeni rezultati doktorske disertacije su u skladu sa rezultatima ranije sprovedenih studija, prema kojima je ekspresija *miR-139-5p* snižena u tkivu oralnog karcinoma, kao i u ćelijskim linijama (Z. Chen et al., 2017; Jiang et al., 2020; K. Wang, Jin, Ma, & Zhai, 2017), što je dodatno potvrđeno i

rezultatima ranije sprovedene meta-analize (Zeljic et al., 2018), kao i ažurirane meta-analize predstavljene u ovoj disertaciji. Kako je višestruko potvrđena snižena ekspresija *miR-139-5p* u oralnom karcinomu, može se tvrditi da ova miRNK ima ulogu tumor supresor gena. To dodatno govori u prilog potvrdi univerzalne tumor supresorske uloge *miR-139-5p* nezavisno od tipa malignog tumora. Molekularno genetička osnova delovanja *miR-139-5p* u oralnom karcinomu nije u potpunosti izučena. Dosadašnje studije pokazuju da je proliferacija, invazija i migracija ćelija oralnog karcinoma bila inhibirana posredstvom *miR-139-5p* koja deluje kao negativan regulator ekspresije *HOXA9* gena (K. Wang et al., 2017) i CXC motiv hemokin receptor 4 gena (*CXCR4*) (Jiang et al., 2020).

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da se *miR-139-5p* može koristiti kao dobar dijagnostički biomarker kako samostalno (senzitivnost=48,6%, specifičnost=91,4%), tako i u kombinaciji sa drugim proučavanim miRNK molekulima i to *miR-31-3p* i *miR-30a-5p*. Dijagnostička moć *miR-139-5p* je potvrđena i u slučaju karcinoma jezika, s obzirom da je utvrđena snižena ekspresija *miR-139-5p* kod pacijenata sa ovim karcinomom pre i nakon operacije u poređenju sa zdravim osobama (Duz et al., 2016). To ukazuje na mogućnost korišćenja *miR-139-5p* kao neinvazivnog dijagnostičkog biomarkera u telesnoj tečnosti, tj. pljuvački, što može biti od neprocenjivog značaja za ranu identifikaciju pacijenata sa oralnim karcinomom. Za razliku od predloženog panela miRNK, koji čine *miR-139-5p*, *miR-31-3p* i *miR-30a-5p* u ovoj doktorskoj disertaciji, *miR-139-5p* je razmatrana kao član dijagnostičkog panela koji su činili još *miR-486-3p* i *miR-21* (Z. Chen et al., 2017). Navedeni rezultati upućuju na važnu ulogu tumor supresorske *mi-139-5p* u razmatranjima dijagnostičkog potencijala bilo samostalno ili u okviru seta predloženih miRNK biomarkera.

Kada je reč o prognostičkom značaju, rezultati doktorske disertacije ukazuju da *miR-139-5p* nije utvrđena kao prognostički biomarker u oralnom karcinomu. U različitim tipovima malignih tumora je potvrđeno da snižena ili povišena ekspresija *miR-139-5p* imaju prognostički značaj. Pokazano je da je snižena ekspresija *miR-139-5p* asocirana sa boljim ukupnim preživljavanjem pacijenata sa karcinomom pankreasa (J. Ma, Zhang, Weng, & Wang, 2018) i adrenokortikalnim karcinomom (Agosta et al., 2018). Nekonzistentnost između studija kada je reč o povezanosti *miR-139-5p* ekspresije i ukupnog preživljavanja pacijenata može poticati od specifičnosti različitih malignih tumora, ali eksperimentalnih dizajna i eventualno različitih kriterijuma koju su primenjivani u studijama pri dihotomizaciji relativne ekspresije *miR-139-5p* na povišenu i sniženu.

miR-139-5p kroz posttranskripcionu regulaciju ekspresije ciljnih gena istovremeno učestvuje u regulaciji nishodnih signalnih puteva PI3K/AKT/mTORC1, Wnt/ β katenin i RTK/RAS/MAPK, koji su važni za proliferaciju ćelija i proces karcinogeneze (Khalili et al., 2020). Postoje brojni eksperimentalni dokazi u različitim tipovima malignih tumora koji ukazuju da *miR-139-5p* ima ulogu u regulaciji migracije i invazije ćelija i epitelno-mezenhimske tranzicije. Ova miRNK je uključena i u proces indukcije programirane ćelijske smrti, apoptoze putem AKR signalnog puta, što je eksperimentalno potvrđeno u ćelijskoj liniji oralnog karcinoma Tca8113 (Ren, Zhu, Chi, Yang, & Xu, 2015). U karcinomu glave i vrata

Potpuna potvrda i značaj translacionog potencijala *miR-139-5p* za senzitivniju diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od okolnog netumorskog tkiva, bi bilo dobro uraditi u narednom periodu kroz sprovođenje prospektivnih studija, kao i dužeg praćenja pacijenata nakon hirurškog lečenja. Tek nakon dodatnih opsežnih potvrda dobijenih u prospektivnim studijama se može potencijalno pribeci upotrebi relativne ekspresije *miR-139-5p* u rutinskoj kliničkoj praksi. S obzirom da već postoje dokazi da se nivo *miR-139-5p* može meriti u telesnim tečnostima, važno bi bilo uraditi merenja relativne ekspresije gena u uzorcima tečnih biopsija, tj. u pljuvački, plazmi i serumu pacijenata koji imaju sumnjive promene u oralnoj duplji, pored standardnih protokola za postavljanje dijagnoze bolesti.

Uvidom u aktuelnu literaturu evidentno je da postoji ograničen broj studija u kojima je ispitivana relativna ekspresija *miR-30a-5p* u oralnom karcinomu. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je ekspresija *miR-30a-5p* snižena u oralnom karcinomu u poređenju sa okolnim neizmenjenim tkivom, što je u skladu sa ranije sprovedenom meta-analizom (Zeljic et al., 2018), kao i rezultatima druge studije u oralnom karcinomu (Ruan, Tao, & Tan, 2018; Shiah et al., 2020). Takvi nalazi ukazuju da je *miR-30a-5p* tumor supresorska miRNK. Tumor supresorska uloga ove miRNK se ostvaruje kroz inhibiciju proliferacije i migracije ćelija, što je demonstrirano u ćelijama oralnog karcinoma, gde *miR-30a-5p* deluje kao direktni posttranskripcioni regulator *FAP* gena koji kodira fibroblast aktivirajući protein α (Ruan et al., 2018). Naši rezultati su u skladu sa do sada postojećim brojnim eksperimentalnim dokazima koji potvrđuju ulogu *miR-30a-5p* kao tumor supresora u različitim malignim tumorima, na primer karcinomu renalnih ćelija (Y. Li et al., 2016), duktalnom adenokarcinomu pankreasa (Nepal et al., 2021), karcinomu žučne kese (Ye et al., 2018) i dr. U ćelijskim linijama melanoma, snižena ekspresija *miR-30a-5p* dovodi do inhibicije proliferacije, invazije i migracije ćelija posredstvom direktne regulacije ekspresije *SOX4* gena (E. Liu, Sun, Li, & Zhang, 2018). Može se zaključiti da *miR-30a-5p* ima nedvosmisleno ulogu tumor supresora u različitim tipovima malignih tumora.

U našoj studiji *miR-30a-5p* se pokazala kao dobar molekularni biomarker za diskriminaciju tumorskog od okolnog neizmenjenog tkiva (specifičnost=77,1%, senzitivnost=54,3%). Dodatno, *miR-30a* je potvrđena kao biomarker u plazmi za oralni karcinom (Pedersen et al., 2018). Pored dijagnostičkog značaja, da *miR-30a* može imati ulogu potencijalnog prediktivnog biomarkera u oralnom karcinomu pokazuju podaci da je ekspresija ove miRNK snižena u egzozomima seruma pacijenata sa oralnim karcinomom sa recidivima nakon hemioterapeutskog tretmana cisplatinom (Kulkarni et al., 2020).

Nedavno publikovana studija ukazuje da *miR-30a-5p* direktno reguliše ekspresiju *DNMT3B* gena u oralnom karcinomu. Ovaj gen kodira enzim DNK metiltransferazu 3B koja ima ulogu u metilaciji promotora *ADHFE1* gena i *ALDH1A2* gena koji su važni za sintezu enzima iz grupe alkoholnih i aldehidnih dehidrogenaza (Shiah et al., 2020).

Pacijenti sa povišenom ekspresijom *miR-30a-5p* su imali lošije preživljavanje i oko sedam puta povišen rizik za negativan ishod bolesti u odnosu na one sa sniženom ekspresijom prema medijani, prema rezultatima ove doktorske disertacije, što ukazuje na potencijalni prognostički potencijal *miR-30a-5p* u oralnom karcinomu. Interesantno je napomenuti da nakon sprovođenja multivarijantne analize koja je uključila i veličinu tumora u Cox regresionu analizu, *miR-30a-5p* nije potvrđena kao nezavisni prognostički biomarker. Molekularna priroda i osnova povezanosti povišene ekspresije *miR-30a-5p* i lošijeg preživljavanja pacijenata sa oralnim karcinomom i dalje ostaje nepoznanica.

Prema rezultatima ove doktorske disertacije, *miR-30a-5p* nije bila asocirana sa kliničkopatološkim karakteristikama studijske grupe. Odsustvo asocijacije se može pripisati ograničenoj veličini studijske grupe, kao i pretpostavci da je deregulacija ekspresije odlika najranijih stadijuma maligne transformacije oralnih keratinocita. To može biti potencijalno objašnjenje odsustva asocijacije sa stadijumom tumora, veličinom tumora, histološkim gradusom i prisustvom recidiva.

Poznato je da ekspresija miRNK može biti modulirana usled izlaganja različitim faktorima spoljašnje sredine. Pokazano je da se ekspresija *miR-30a-5p* snižava nakon izlaganja alkoholu i žvakanju genotoksične biljke betel. Sinergistički efekat izloženosti navedenim faktorima rizika i snižena ekspresija tumor supresorske *miR-30a-5p* mogu da doprinesu procesu karcinogeneze (Shiah et al., 2020). S druge strane, studija ranije sprovedene na ćelijama karcinoma glave i vrata ukazuje da alkohol dovodi do povećanja ekspresije *miR-30a* (Saad et al., 2015). S obzirom na postojanje potpuno oprečnih rezultata, efekat alkohola na modulaciju ekspresije *miR-30a* treba prihvatiti sa

rezervom. Takođe, takvu vezu između alkohola i ekspresije konkretne miRNK je potencijalno teško uspostaviti s obzirom na različite količine konzumiranog alkohola. U našoj studiji nije utvrđena asocijacija ekspresije *miR-30a-5p* u tkivu oralnog karcinoma sa demografskim karakteristikama, među kojima je pušenje i konzumacija alkohola.

Atlas genoma kancera predstavlja izuzetno vredan izvor podataka o genetičkim promenama, tj. mutacijama, varijacijama u broju kopija, DNK metilaciji i ekspresiji gena u oko 20 000 uzoraka primarnih tumora i odgovarajućih netumorskih uzoraka za 33 različita maligniteta, među kojima su i karcinomi glave i vrata (Tomczak, Czerwińska, & Wiznerowicz, 2015) (<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>). Pored ovih podataka, za svaku grupu analiziranih maligniteta su dostupni i klinički podaci. TCGA baza je rezultat projekta koji je pokrenut 2005. godine. Kako su agregatni podaci iz TCGA baze dostupni za preuzimanje i dalju obradu, iskorišćena je njihova dostupnost zarad pojačavanja naše studije i nadomešćivanja ograničene veličine studijske grupe koju je činilo 35 pacijenata sa oralnim karcinomom. Rezultati validacije ekspresije miRNK na osnovu podataka iz TCGA baze su u skladu sa našim podacima dobijenim na kliničkim uzorcima, što potvrđuje verodostojnost naših podataka dobijenih na maloj veličini studijske grupe. Iako je u TCGA bazi na raspolaganju znatno veći broj uzoraka oralnog karcinoma, ne treba zanemariti činjenicu da je broj zdravih uzoraka daleko manji i u slučaju TCGA grupe u našoj studiji je iznosio 32 uzorka zdravog neizmenjenog tkiva. Ovaj podatak ukazuje na važnost sprovođenja analiza ekspresije kandidat gena u nezavisnim setovima kliničkih uzoraka iako su u današnje vreme dostupni podaci u javnim bazama o ekspresiji gena, kakva je TCGA i GEO baza. Zbog činjenice da su podaci o ekspresiji miRNK u TCGA bazi već transformisani i normalizovani, kao i da nije bilo moguće primeniti iste kriterijume za dihotomizaciju ekspresije miRNK u tkivu oralnog karcinoma na povišenu i sniženu koji su korišćeni u našoj studijskoj grupi, smatrali smo da nije opravdano vršiti dalje transformacije podataka radi ispitivanja povezanosti ekspresije kandidat miRNK iz meta potpisa i preživljavanja.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ove doktorske disertacije su izvedeni sledeći zaključci:

- Meta potpis najčešće dereguliranih miRNK u oralnom karcinomu čini 13 miRNK molekula i to: *miR-21-5p*, *miR-31-3p*, *miR-135b-5p*, *miR-31-5p*, *miR-424-5p*, *miR-18a-5p* i *miR-21-3p* koje su identifikovane kao povišeno eksprimirane, *miR-139-5p*, *miR-30a-3p*, *miR-375-3p*, *miR-376c-3p* i *miR-30a-5p* koje su identifikovane kao sniženo eksprimirane, dok je *miR-223-3p* imala nekonzistentnu ekspresiju. Povećanjem broja studija koje su uključene u ažuriranu meta-analizu se dobija miRNK meta potpis koji sadrži manji broj miRNK.
- Funkcionalna karakterizacija miRNK meta potpisa u oralnom karcinomu se može sprovesti *in silico* analizom u odsustvu mogućnosti sprovođenja funkcionalnih studija. miRNK u okviru meta potpisa su bile asocirane sa različitim malignitetima i signalnim molekularnim putevima od značaja za proces karcinogeneze.
- Meta-analiza sprovedena metodom prebrojavanja, iako ima slabu statističku moć, predstavlja pouzdan način za identifikaciju najčešće dereguliranih miRNK molekula u tkivu oralnog karcinoma u poređenju sa okolnim neizmenjenim tkivom. Važno je sprovesti validaciju rezultata meta-analize na što većem broju kliničkih uzoraka. U svrhu povećanja studijske grupe se mogu koristiti podaci dostupni u TCGA bazi.
- Relativna ekspresija *miR-31-3p* i *miR-135b-5p* u tkivu oralnog karcinoma je bila značajno povišena u poređenju sa okolnim netumorskim tkivom, što potvrđuje da ove mikroRNK imaju ulogu onkogeni, tj. onkomir-ova u oralnom karcinomu. Nivo *miR-18a-5p* je bio viši u oralnom karcinomu u odnosu na odgovarajuće netumorsko tkivo, ali uočena razlika nije bila značajna.
- U tkivu oralnog karcinoma je potvrđena značajno snižena relativna ekspresija *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* gena u poređenju sa okolnim netumorskim tkivom, što ukazuje na tumor supresorsku ulogu ovih miRNK molekula u oralnom karcinomu.
- *miR-31-3p*, *miR-139-5p* i *miR-30a-5p* se mogu koristiti pojedinačno, ali i u vidu panela kao potencijalni dijagnostički biomarkeri za precizniju diskriminaciju tkiva oralnog karcinoma od okolnog zdravog tkiva na osnovu molekularno genetičkih analiza relativne ekspresije.
- *miR-135b-5p*, *miR-18a-5p* i *miR-30a-5p* se mogu koristiti kao potencijalni prognostički biomarkeri ukupnog preživljavanja pacijenata sa oralnim karcinomom. U slučaju sve tri navedene miRNK, povišena ekspresija je bila povezana sa kraćim preživljavanjem pacijenata. *miR-30a-5p* je pokazana da je asocirana sa šest puta povećanim rizikom za negativan ishod bolesti, ali ova miRNK nije potvrđena kao nezavisni prognostički indikator.

Nastavak ove studije bi trebalo da uključi veći broj pacijenata sa oralnim karcinomom, duže vreme praćenja pacijenata, kao i uvođenje prospektivnih studija u cilju potpunog potvrđivanja primene odabranih kandidat miRNK i kliničkog značaja dobijenih rezultata. Buduća istraživanja bi mogla biti usmerena i na ispitivanje relativne ekspresije miRNK kandidata iz meta potpisa u telesnim tečnostima (pljuvačka, plazma, serum) i upoređivanje ekspresije sa nalazima iz tumorskog tkiva.

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju dobar osnov za planiranje budućih istraživanja i imaju svoju aplikativnu vrednost prevashodno u unapređenju molekularne patologije oralnog karcinoma.

7. LITERATURA

- Agosta, C., Laugier, J., Guyon, L., Denis, J., Bertherat, J., Libé, R., . . . Cherradi, N. (2018). MiR-483-5p and miR-139-5p promote aggressiveness by targeting N-myc downstream-regulated gene family members in adrenocortical cancer. *Int J Cancer*, *143*(4), 944-957.
- Barger, J. F., Rahman, M. A., Jackson, D., Acunzo, M., & Nana-Sinkam, S. P. (2016). Extracellular miRNAs as biomarkers in cancer. *Food Chem Toxicol*, *98*(Pt A), 66-72.
- Berania, I., Cardin, G. B., Clément, I., Guertin, L., Ayad, T., Bissada, E., . . . Christopoulos, A. (2017). Four PTEN-targeting co-expressed miRNAs and ACTN4- targeting miR-548b are independent prognostic biomarkers in human squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Int J Cancer*, *141*(11), 2318-2328.
- Bracken, C. P., Scott, H. S., & Goodall, G. J. (2016). A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nat Rev Genet*, *17*(12), 719-732.
- Brinkmann, O., Kastratovic, D. A., Dimitrijevic, M. V., Konstantinovic, V. S., Jelovac, D. B., Antic, J., . . . Wong, D. T. (2011). Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population. *Oral Oncol*, *47*(1), 51-55.
- Brocic, M., Supic, G., Zeljic, K., Jovic, N., Kozomara, R., Zagorac, S., . . . Magic, Z. (2011). Genetic polymorphisms of ADH1C and CYP2E1 and risk of oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, *145*(4), 586-593.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., . . . Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(24), 15524-15529.
- Capote-Moreno, A., Brabyn, P., Muñoz-Guerra, M. F., Sastre-Pérez, J., Escorial-Hernandez, V., Rodríguez-Campo, F. J., . . . Naval-Gías, L. (2020). Oral squamous cell carcinoma: epidemiological study and risk factor assessment based on a 39-year series. *Int J Oral Maxillofac Surg*, *49*(12), 1525-1534.
- Chaitanya, N. C., Allam, N. S., Gandhi Babu, D. B., Waghray, S., Badam, R. K., & Lavanya, R. (2016). Systematic meta-analysis on association of human papilloma virus and oral cancer. *J Cancer Res Ther*, *12*(2), 969-974.
- Chang, K. W., Kao, S. Y., Wu, Y. H., Tsai, M. M., Tu, H. F., Liu, C. J., . . . Lin, S. C. (2013). Passenger strand miRNA miR-31* regulates the phenotypes of oral cancer cells by targeting RhoA. *Oral Oncol*, *49*(1), 27-33.
- Chang, L., Zhou, G., Soufan, O., & Xia, J. (2020). miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic Acids Res*, *48*(W1), W244-w251.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., . . . Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, *33*(20), e179.
- Chen, L., Hu, J., Pan, L., Yin, X., Wang, Q., & Chen, H. (2018). Diagnostic and prognostic value of serum miR-99a expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*, *23*(3), 333-339.
- Chen, Q., & Xu, J. (2021). miR-18a-5p Facilitates Malignant Progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells via Modulating SORBS2. *Comput Math Methods Med*, *2021*, 5953881.
- Chen, Z., Yu, T., Cabay, R. J., Jin, Y., Mahjabeen, I., Luan, X., . . . Zhou, X. (2017). miR-486-3p, miR-139-5p, and miR-21 as Biomarkers for the Detection of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Biomark Cancer*, *9*, 1-8.

- Cheng, C. M., Shiah, S. G., Huang, C. C., Hsiao, J. R., & Chang, J. Y. (2016). Up-regulation of miR-455-5p by the TGF- β -SMAD signalling axis promotes the proliferation of oral squamous cancer cells by targeting UBE2B. *J Pathol*, *240*(1), 38-49.
- Cheng, Y. (2022). miR-135b-5p Targets SIRT1 to Inhibit Deacetylation of c-JUN and Increase MMP7 Expression to Promote Migration and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Mol Biotechnol*. doi: 10.1007/s12033-022-00457-5
- Chou, C. H., Tu, H. F., Kao, S. Y., Chiang, C. F., Liu, C. J., & Chang, K. W. (2018). Targeting of miR-31/96/182 to the Numb gene during head and neck oncogenesis. *Head Neck*, *40*(4), 808-817.
- Creighton, C. J., Fountain, M. D., Yu, Z., Nagaraja, A. K., Zhu, H., Khan, M., . . . Anderson, M. L. (2010). Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers. *Cancer Res*, *70*(5), 1906-1915.
- Dexheimer, P. J., & Cochella, L. (2020). MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front Cell Dev Biol*, *8*, 409.
- Di Leva, G., Garofalo, M., & Croce, C. M. (2014). MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, *9*, 287-314.
- Di, Y., Jiang, Y., Shen, X., Liu, J., Gao, Y., Cai, H., . . . Jin, S. (2021). Downregulation of miR-135b-5p Suppresses Progression of Esophageal Cancer and Contributes to the Effect of Cisplatin. *Front Oncol*, *11*, 679348.
- Dimitrijevic, M. (2020). Uticaj lokalne i regionalne proširenosti malignih tumora usne duplje na ishod lečenja. *Monografije naučnih skupova AMN SLD*, *9*(2), 43-57.
- Dimitrijevic, M.V., Jesic, S.D., Konstantinovic, V.S. (2001). Incidence and mortality of oral cavity carcinoma in central Serbia. *J BUON*, *6*, 183–187.
- Dimitrijevic, M.V., Mikic, A., Petrovic, Z., Pendjer, I., Jesic, S., Trivic, A. (2004). Okultne metastaze karcinoma usne duplje. *Acta Chir Iugosl*, *51*, 77–81.
- D'Souza, W., & Kumar, A. (2020). microRNAs in oral cancer: Moving from bench to bed as next generation medicine. *Oral Oncol*, *111*, 104916.
- Duz, M. B., Karatas, O. F., Guzel, E., Turgut, N. F., Yilmaz, M., Creighton, C. J., & Ozen, M. (2016). Identification of miR-139-5p as a saliva biomarker for tongue squamous cell carcinoma: a pilot study. *Cell Oncol (Dordr)*, *39*(2), 187-193.
- Eriksen, A. H., Andersen, R. F., Nielsen, B. S., Sørensen, F. B., Appelt, A. L., Jakobsen, A., & Hansen, T. F. (2016). Intratumoral Heterogeneity of MicroRNA Expression in Rectal Cancer. *PLoS One*, *11*(6), e0156919.
- Farah, C. S., & Fox, S. A. (2018). Integrated miRNA-mRNA spatial signature for oral squamous cell carcinoma: a prospective profiling study of Narrow Band Imaging guided resection. *Sci Rep*, *8*(1), 823.
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, *19*(1), 92-105.
- Fu, Z., Wang, L., Li, S., Chen, F., Au-Yeung, K. K., & Shi, C. (2021). MicroRNA as an Important Target for Anticancer Drug Development. *Front Pharmacol*, *12*, 736323.
- Fukumoto, I., Hanazawa, T., Kinoshita, T., Kikkawa, N., Koshizuka, K., Goto, Y., . . . Seki, N. (2015). MicroRNA expression signature of oral squamous cell carcinoma: functional role of microRNA-26a/b in the modulation of novel cancer pathways. *Br J Cancer*, *112*(5), 891-900.

- Furquim, C. P., Pivovar, A., Amenábar, J. M., Bonfim, C., & Torres-Pereira, C. C. (2018). Oral cancer in Fanconi anemia: Review of 121 cases. *Crit Rev Oncol Hematol*, *125*, 35-40.
- Ganci, F., Sacconi, A., Manciooco, V., Sperduti, I., Battaglia, P., Covello, R., . . . Blandino, G. (2016). MicroRNA expression as predictor of local recurrence risk in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, *38 Suppl 1*, E189-197.
- Garzon, R., Marcucci, G., & Croce, C. M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, *9*(10), 775-789.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., & Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*, *34*(Database issue), D140-144.
- Hill, M., & Tran, N. (2021). miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. *Dis Model Mech*, *14*(4): dmm047662.
- Huang, C., Song, H., & Lai, L. (2019). The role and mechanism of microRNA-18a-5p in oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep*, *20*(2), 1637-1644.
- Hung, K. F., Liu, C. J., Chiu, P. C., Lin, J. S., Chang, K. W., Shih, W. Y., . . . Tu, H. F. (2016). MicroRNA-31 upregulation predicts increased risk of progression of oral potentially malignant disorder. *Oral Oncol*, *53*, 42-47.
- Hung, P. S., Tu, H. F., Kao, S. Y., Yang, C. C., Liu, C. J., Huang, T. Y., . . . Lin, S. C. (2014). miR-31 is upregulated in oral premalignant epithelium and contributes to the immortalization of normal oral keratinocytes. *Carcinogenesis*, *35*(5), 1162-1171.
- Hunter, K. D., Parkinson, E. K., & Harrison, P. R. (2005). Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, *5*(2), 127-135
- Inoue, J., & Inazawa, J. (2021). Cancer-associated miRNAs and their therapeutic potential. *J Hum Genet*, *66*(9), 937-945.
- Irimie, A. I., Ciocan, C., Gulei, D., Mehterov, N., & Atanasov, A. G. (2018). Current Insights into Oral Cancer Epigenetics. *Int J Mol Sci*, *19*(3), 670.
- Jamali, Z., Asl Aminabadi, N., Attaran, R., Pournagiazar, F., Ghertasi Oskouei, S., & Ahmadpour, F. (2015). MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*, *51*(4), 321-331.
- Jiang, Q., Cao, Y., Qiu, Y., Li, C., Liu, L., & Xu, G. (2020). Progression of squamous cell carcinoma is regulated by miR-139-5p/CXCR4. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *25*, 1732-1745.
- Jung, J. E., Lee, J. Y., & Kim, I. R. (2020). MicroRNA-31 Regulates Expression of Wntless in Both *Drosophila melanogaster* and Human Oral Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, *21*(19), 7232.
- Kao, Y. Y., Chou, C. H., Yeh, L. Y., Chen, Y. F., Chang, K. W., Liu, C. J., . . . Lin, S. C. (2019). MicroRNA miR-31 targets SIRT3 to disrupt mitochondrial activity and increase oxidative stress in oral carcinoma. *Cancer Lett*, *456*, 40-48.
- Khalili, N., Nouri-Vaskeh, M., Hasanpour Segherlou, Z., Baghbanzadeh, A., Halimi, M., Rezaee, H., & Baradaran, B. (2020). Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of miR-139-5p in cancers. *Life Sci*, *256*, 117865.
- Kim, H. S., Lee, K. S., Bae, H. J., Eun, J. W., Shen, Q., Park, S. J., . . . Nam, S. W. (2015). MicroRNA-31 functions as a tumor suppressor by regulating cell cycle and epithelial-mesenchymal transition regulatory proteins in liver cancer. *Oncotarget*, *6*(10), 8089-8102.

- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(2), 126-139.
- Kolenda, T., Guglas, K., Kopczyńska, M., Sobocińska, J., Teresiak, A., Bliźniak, R., & Lamperska, K. (2020). Good or not good: Role of miR-18a in cancer biology. *Rep Pract Oncol Radiother*, *25*(5), 808-819.
- Kolokythas, A., Zhou, Y., Schwartz, J. L., & Adami, G. R. (2015). Similar Squamous Cell Carcinoma Epithelium microRNA Expression in Never Smokers and Ever Smokers. *PLoS One*, *10*(11), e0141695.
- Kulkarni, B., Gondaliya, P., Kirave, P., Rawal, R., Jain, A., Garg, R., & Kalia, K. (2020). Exosome-mediated delivery of miR-30a sensitize cisplatin-resistant variant of oral squamous carcinoma cells via modulating Beclin1 and Bcl2. *Oncotarget*, *11*(20), 1832-1845.
- Kumar, M., Nanavati, R., Modi, T. G., & Dobariya, C. (2016). Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther*, *12*(2), 458-463.
- Lai, Y. H., Liu, H., Chiang, W. F., Chen, T. W., Chu, L. J., Yu, J. S., . . . Tan, B. C. (2018). MiR-31-5p-ACOX1 Axis Enhances Tumorigenic Fitness in Oral Squamous Cell Carcinoma Via the Promigratory Prostaglandin E2. *Theranostics*, *8*(2), 486-504.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843-854.
- Lee, Y. S., & Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, *4*, 199-227.
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, *11*(1), 9-22.
- Li, C. C., Shen, Z., Bavarian, R., Yang, F., & Bhattacharya, A. (2020). Oral Cancer: Genetics and the Role of Precision Medicine. *Surg Oncol Clin N Am*, *29*(1), 127-144.
- Li, C. Y., Zhang, W. W., Xiang, J. L., Wang, X. H., Li, J., & Wang, J. L. (2019). Identification of microRNAs as novel biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma: a study based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) and bioinformatics. *Chin Med J (Engl)*, *132*(18), 2213-2222.
- Li, S., Chen, X., Liu, X., Yu, Y., Pan, H., Haak, R., . . . Schmalz, G. (2017). Complex integrated analysis of lncRNAs-miRNAs-mRNAs in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, *73*, 1-9.
- Li, Y., Li, Y., Chen, D., Jin, L., Su, Z., Liu, J., . . . Lai, Y. (2016). miR-30a-5p in the tumorigenesis of renal cell carcinoma: A tumor suppressive microRNA. *Mol Med Rep*, *13*(5), 4085-4094.
- Liu, C. J., Lin, S. C., Yang, C. C., Cheng, H. W., & Chang, K. W. (2012). Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, *34*(2), 219-224.
- Liu, C. J., Tsai, M. M., Hung, P. S., Kao, S. Y., Liu, T. Y., Wu, K. J., . . . Chang, K. W. (2010). miR-31 ablates expression of the HIF regulatory factor FIH to activate the HIF pathway in head and neck carcinoma. *Cancer Res*, *70*(4), 1635-1644.
- Liu, E., Sun, X., Li, J., & Zhang, C. (2018). miR-30a-5p inhibits the proliferation, migration and invasion of melanoma cells by targeting SOX4. *Mol Med Rep*, *18*(2), 2492-2498.
- Liu, J., Li, H., Sun, L., Shen, S., Zhou, Q., Yuan, Y., & Xing, C. (2019). Epigenetic Alternations of MicroRNAs and DNA Methylation Contribute to Liver Metastasis of Colorectal Cancer. *Dig Dis Sci*, *64*(6), 1523-1534.
- Lopes, C. B., Magalhães, L. L., Teófilo, C. R., Alves, A., Montenegro, R. C., Negrini, M., & Ribeiro-Dos-Santos, Â. (2018). Differential expression of hsa-miR-221, hsa-miR-21, hsa-miR-135b, and hsa-miR-29c suggests a field effect in oral cancer. *BMC Cancer*, *18*(1), 721.

- Lu, W. C., Kao, S. Y., Yang, C. C., Tu, H. F., Wu, C. H., Chang, K. W., & Lin, S. C. (2014). EGF up-regulates miR-31 through the C/EBP β signal cascade in oral carcinoma. *PLoS One*, *9*(9), e108049.
- Lu, W. C., Liu, C. J., Tu, H. F., Chung, Y. T., Yang, C. C., Kao, S. Y., . . . Lin, S. C. (2016). miR-31 targets ARID1A and enhances the oncogenicity and stemness of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, *7*(35), 57254-57267.
- Lu, Z., He, Q., Liang, J., Li, W., Su, Q., Chen, Z., . . . Wang, A. (2019). miR-31-5p Is a Potential Circulating Biomarker and Therapeutic Target for Oral Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*, *16*, 471-480.
- Ma, J., Zhang, J., Weng, Y. C., & Wang, J. C. (2018). EZH2-Mediated microRNA-139-5p Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Lymph Node Metastasis of Pancreatic Cancer. *Mol Cells*, *41*(9), 868-880.
- Ma, Y., Chen, Y., Lin, J., Liu, Y., Luo, K., Cao, Y., . . . Cheng, J. (2017). Circulating miR-31 as an effective biomarker for detection and prognosis of human cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, *8*(17), 28660-28671.
- Ma, Y., Zhang, P., Yang, J., Liu, Z., Yang, Z., & Qin, H. (2012). Candidate microRNA biomarkers in human colorectal cancer: systematic review profiling studies and experimental validation. *Int J Cancer*, *130*(9), 2077-2087.
- Mai, S., Xiao, R., Shi, L., Zhou, X., Yang, T., Zhang, M., . . . Wang, H. (2019). MicroRNA-18a promotes cancer progression through SMG1 suppression and mTOR pathway activation in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis*, *10*(11), 819.
- Manasa, V. G., & Kannan, S. (2017). Impact of microRNA dynamics on cancer hallmarks: An oral cancer scenario. *Tumour Biol*, *39*(3), 1010428317695920.
- Manikandan, M., Deva Magendhra Rao, A. K., Arunkumar, G., Manickavasagam, M., Rajkumar, K. S., Rajaraman, R., & Munirajan, A. K. (2016). Oral squamous cell carcinoma: microRNA expression profiling and integrative analyses for elucidation of tumourigenesis mechanism. *Mol Cancer*, *15*, 28.
- Mathur, R., Singhavi, H. R., Malik, A., Nair, S., & Chaturvedi, P. (2019). Role of Poor Oral Hygiene in Causation of Oral Cancer-a Review of Literature. *Indian J Surg Oncol*, *10*(1), 184-195.
- Metsalu, T., & Vilo, J. (2015). ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*, *43*(W1), W566-570.
- Momen-Heravi, F., Trachtenberg, A. J., Kuo, W. P., & Cheng, Y. S. (2014). Genomewide Study of Salivary MicroRNAs for Detection of Oral Cancer. *J Dent Res*, *93*(7 Suppl), 86s-93s.
- Naik, P. P., Panda, P. K., & Bhutia, S. K. (2017). Oral Cancer Stem Cells Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, *1041*, 207-233.
- Nepal, P., Hozaka, Y., Tanaka, T., Wada, M., Asai, S., Minemura, C., . . . Ohtsuka, T. (2021). Impact of Oncogenic Targets Controlled by Tumor-Suppressive miR-30a-5p in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Anticancer Res*, *41*(10), 4821-4836.
- Olsen, P. H., & Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*, *216*(2), 671-680.
- Pantaleo, M. A., Ravegnini, G., Astolfi, A., Simeon, V., Nannini, M., Saponara, M., . . . Angelini, S. (2016). Integrating miRNA and gene expression profiling analysis revealed regulatory networks in gastrointestinal stromal tumors. *Epigenomics*, *8*(10), 1347-1366.

- Pedersen, N. J., Jensen, D. H., Lelkaitis, G., Kiss, K., Charabi, B. W., Ullum, H., . . . von Buchwald, C. (2018). MicroRNA-based classifiers for diagnosis of oral cavity squamous cell carcinoma in tissue and plasma. *Oral Oncol*, 83, 46-52.
- Piñero, J., Ramírez-Anguaita, J. M., Saüch-Pitarch, J., Ronzano, F., Centeno, E., Sanz, F., & Furlong, L. I. (2020). The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. *Nucleic Acids Res*, 48(D1), D845-d855.
- Pirró, S., Matic, I., Colizzi, V., & Galgani, A. (2021). The microRNA analysis portal is a next-generation tool for exploring and analyzing miRNA-focused data in the literature. *Sci Rep*, 11(1), 9007.
- Priya, N. S., Nayak, R., Bhat, K., Kugaji, M., Vijayalakshmi, K., & Rao, K. (2021). Site specificity and expression profile of miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol*, 25(1), 154-158.
- Qiang, H., Zhan, X., Wang, W., Cheng, Z., Ma, S., & Jiang, C. (2019). A Study on the Correlations of the miR-31 Expression with the Pathogenesis and Prognosis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm*, 34(3), 189-195.
- Ramassone, A., Pagotto, S., Veronese, A., & Visone, R. (2018). Epigenetics and MicroRNAs in Cancer. *Int J Mol Sci*, 19(2), 459.
- Raychaudhuri, M., Schuster, T., Buchner, T., Malinowsky, K., Bronger, H., Schwarz-Boeger, U., . . . Avril, S. (2012). Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer. *J Mol Diagn*, 14(4), 376-384.
- Ren, Y., Zhu, H., Chi, C., Yang, F., & Xu, X. (2015). MiRNA-139 regulates oral cancer Tca8113 cells apoptosis through Akt signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(5), 4588-4594.
- Rikke, B. A., Wynes, M. W., Rozeboom, L. M., Barón, A. E., & Hirsch, F. R. (2015). Independent validation test of the vote-counting strategy used to rank biomarkers from published studies. *Biomark Med*, 9(8), 751-761.
- Rishabh, K., Khadilkar, S., & Kumar, A. (2021). MicroRNAs as Modulators of Oral Tumorigenesis-A Focused Review. *Int J Mol Sci*, 22(5), 2561.
- Rivera, C. (2015). Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(9), 11884-11894.
- Ruan, P., Tao, Z., & Tan, A. (2018). Low expression of miR-30a-5p induced the proliferation and invasion of oral cancer via promoting the expression of FAP. *Biosci Rep*, 38(1), BSR20171027.
- Ryan, B. M., Robles, A. I., & Harris, C. C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*, 10(6), 389-402.
- Saad, M. A., Kuo, S. Z., Rahimy, E., Zou, A. E., Korrapati, A., Rahimy, M., . . . Ongkeko, W. M. (2015). Alcohol-dysregulated miR-30a and miR-934 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*, 14, 181.
- Sand, L., & Jalouli, J. (2014). Viruses and oral cancer. Is there a link? *Microbes Infect*, 16(5), 371-378.
- Sarode, G. S., Batra, A., Sarode, S. C., Yerawadekar, S., & Patil, S. (2016). Oral Cancer-related Inherited Cancer Syndromes: A Comprehensive Review. *J Contemp Dent Pract*, 17(6), 504-510.
- Sarode, G., Maniyar, N., Sarode, S. C., Jafer, M., Patil, S., & Awan, K. H. (2020). Epidemiologic aspects of oral cancer. *Dis Mon*, 66(12), 100988.

- Scapoli, L., Palmieri, A., Lo Muzio, L., Pezzetti, F., Rubini, C., Girardi, A., . . . Carinci, F. (2010). MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 23(4), 1229-1234.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3(6), 1101-1108. d
- Schneider, A., Victoria, B., & Lopez, Y. N. (2018). Tissue and serum microRNA profile of oral squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep*, 8(1), 675.
- Shaw, R. (2006). The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35(2), 101-108.
- Shen, K., Cao, Z., Zhu, R., You, L., & Zhang, T. (2019). The dual functional role of MicroRNA-18a (miR-18a) in cancer development. *Clin Transl Med*, 8(1), 32.
- Shi, W., Yang, J., Li, S., Shan, X., Liu, X., Hua, H., . . . Zhou, D. (2015). Potential involvement of miR-375 in the premalignant progression of oral squamous cell carcinoma mediated via transcription factor KLF5. *Oncotarget*, 6(37), 40172-40185.
- Shiah, S. G., Hsiao, J. R., Chang, H. J., Hsu, Y. M., Wu, G. H., Peng, H. Y., . . . Chang, J. Y. (2020). MiR-30a and miR-379 modulate retinoic acid pathway by targeting DNA methyltransferase 3B in oral cancer. *J Biomed Sci*, 27(1), 46.
- Shiah, S. G., Hsiao, J. R., Chang, W. M., Chen, Y. W., Jin, Y. T., Wong, T. Y., . . . Chang, J. Y. (2014). Downregulated miR329 and miR410 promote the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting Wnt-7b. *Cancer Res*, 74(24), 7560-7572.
- Shin, K. H., & Kim, R. H. (2018). An Updated Review of Oral Cancer Stem Cells and Their Stemness Regulation. *Crit Rev Oncog*, 23(3-4), 189-200.
- Slaughter, D. P., Southwick, H. W., & Smejkal, W. (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6(5), 963-968.
- Soga, D., Yoshiba, S., Shiogama, S., Miyazaki, H., Kondo, S., & Shintani, S. (2013). microRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 30(2), 579-583.
- Stasiewicz, M., & Karpiński, T. M. (2021). The oral microbiota and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.11.002
- Stepicheva, N. A., & Song, J. L. (2016). Function and regulation of microRNA-31 in development and disease. *Mol Reprod Dev*, 83(8), 654-674.
- Stojkovic, G., Jovanovic, I., Dimitrijevic, M., Jovanovic, J., Tomanovic, N., Stankovic, A., . . . Zeljic, K. (2022). The meta-signature guided investigation of miRNA candidates as potential biomarkers of oral cancer. *Oral Dis*, doi: 10.1111/odi.14185
- Supic, G., Jovic, N., Zeljic, K., Kozomara, R., & Magic, Z. (2012). Association of VEGF-A genetic polymorphisms with cancer risk and survival in advanced-stage oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol*, 48(11), 1171-1177.
- Supić, G., Kozomara, R., Branković-Magić, M., Jović, N., & Magić, Z. (2009). Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol*, 45(12), 1051-1057.
- Supic, G., Kozomara, R., Jovic, N., Zeljic, K., & Magic, Z. (2011). Prognostic significance of tumor-related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 47(8), 702-708.
- Supic, G., Stefik, D., Ivkovic, N., Sami, A., Zeljic, K., Jovic, S., . . . Stosic, S. (2022). Prognostic impact of miR-34b/c DNA methylation, gene expression, and promoter polymorphism in HPV-negative oral squamous cell carcinomas. *Sci Rep*, 12(1), 1296.

- Supic, G., Zeljic, K., Rankov, A. D., Kozomara, R., Nikolic, A., Radojkovic, D., & Magic, Z. (2018). miR-183 and miR-21 expression as biomarkers of progression and survival in tongue carcinoma patients. *Clin Oral Investig*, 22(1), 401-409.
- Toden, S., Zumwalt, T. J., & Goel, A. (2021). Non-coding RNAs and potential therapeutic targeting in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1875(1), 188491.
- Tomczak, K., Czerwińska, P., & Wiznerowicz, M. (2015). The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Pozn)*, 19(1a), A68-77.
- Tseng, G. C., Ghosh, D., & Feingold, E. (2012). Comprehensive literature review and statistical considerations for microarray meta-analysis. *Nucleic Acids Res*, 40(9), 3785-3799.
- Vlachos, I. S., & Hatzigeorgiou, A. G. (2017). Functional Analysis of miRNAs Using the DIANA Tools Online Suite. *Methods Mol Biol*, 1517, 25-50.
- Vlachos, I. S., Zagkanas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., . . . Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*, 43(W1), W460-466.
- Wang, H., Peng, R., Wang, J., Qin, Z., & Xue, L. (2018). Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clin Epigenetics*, 10, 59.
- Wang, J., Lv, N., Lu, X., Yuan, R., Chen, Z., & Yu, J. (2021). Diagnostic and therapeutic role of microRNAs in oral cancer (Review). *Oncol Rep*, 45(1), 58-64.
- Wang, K., Jin, J., Ma, T., & Zhai, H. (2017). MiR-139-5p inhibits the tumorigenesis and progression of oral squamous carcinoma cells by targeting HOXA9. *J Cell Mol Med*, 21(12), 3730-3740.
- Wang, S., Hu, J., Zhang, D., Li, J., Fei, Q., & Sun, Y. (2014). Prognostic role of microRNA-31 in various cancers: a meta-analysis. *Tumour Biol*, 35(11), 11639-11645.
- Wong, T., & Wiesenfeld, D. (2018). Oral Cancer. *Aust Dent J*, 63 Suppl 1, S91-s99.
- Xu, X. L., Jiang, Y. H., Feng, J. G., Su, D., Chen, P. C., & Mao, W. M. (2014). MicroRNA-17, microRNA-18a, and microRNA-19a are prognostic indicators in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg*, 97(3), 1037-1045.
- Ye, Y. Y., Mei, J. W., Xiang, S. S., Li, H. F., Ma, Q., Song, X. L., . . . Liu, Y. B. (2018). MicroRNA-30a-5p inhibits gallbladder cancer cell proliferation, migration and metastasis by targeting E2F7. *Cell Death Dis*, 9(3), 410.
- Yete, S., & Saranath, D. (2020). MicroRNAs in oral cancer: Biomarkers with clinical potential. *Oral Oncol*, 110, 105002.
- Yete, S., D'Souza, W., & Saranath, D. (2018). High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology*, 94(3), 133-141.
- Yu, T., Ma, P., Wu, D., Shu, Y., & Gao, W. (2018). Functions and mechanisms of microRNA-31 in human cancers. *Biomed Pharmacother*, 108, 1162-1169.
- Zandberg, D. P., Tallon, L. J., Nagaraj, S., Sadzewicz, L. K., Zhang, Y., Strome, M. B., . . . Fraser, C. M. (2019). Intratumor genetic heterogeneity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*, 41(8), 2514-2524.
- Zanoni, D. K., Patel, S. G., & Shah, J. P. (2019). Changes in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging of Head and Neck Cancer: Rationale and Implications. *Curr Oncol Rep*, 21(6), 52.
- Zeljic, K., Jovanovic, I., Jovanovic, J., Magic, Z., Stankovic, A., & Supic, G. (2018). MicroRNA meta-signature of oral cancer: evidence from a meta-analysis. *Ups J Med Sci*, 123(1), 43-49.

- Zeljic, K., Supic, G., & Magic, Z. (2017). New insights into vitamin D anticancer properties: focus on miRNA modulation. *Mol Genet Genomics*, 292(3), 511-524.
- Zeljic, K., Supic, G., Stamenkovic Radak, M., Jovic, N., Kozomara, R., & Magic, Z. (2012). Vitamin D receptor, CYP27B1 and CYP24A1 genes polymorphisms association with oral cancer risk and survival. *J Oral Pathol Med*, 41(10), 779-787.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 302(1), 1-12.
- Zhang, L., Sun, Z. J., Bian, Y., & Kulkarni, A. B. (2013). MicroRNA-135b acts as a tumor promoter by targeting the hypoxia-inducible factor pathway in genetically defined mouse model of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*, 331(2), 230-238.
- Zhang, W., Lei, C., Fan, J., & Wang, J. (2016). miR-18a promotes cell proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells by increasing cyclin D1 via regulating PTEN-PI3K-AKT-mTOR signaling axis. *Biochem Biophys Res Commun*, 477(1), 144-149.

POPIS CITIRANIH INTERNET STRANA

(prema redosledu pojavljivanja u tekstu)

Internet strana	Sadržaj	Datum pristupa
https://ourworldindata.org/causes-of-death	Our world in data	15.03.2022.
https://gco.iarc.fr/	GLOBOCAN	14.03.2022.
https://www.mirbase.org/index.shtml	miRBase	09.03.2022.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/	PubMed baza	16.03.2022.
http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/	DIANA mirPath softver	29.09.2021.
https://biit.cs.ut.ee/clustvis/	ClustVis softver	26.01.2022.
https://www.mirnet.ca/	miRNet	16.03.2022.
https://www.disgenet.org/	DisGeNET	16.03.2022.
http://firebrowse.org/	TCGA podaci	04.12.2021.
https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga	TCGA baza	20.03.2022.

IZVORI SLIKA

Slika, redi broj	Izvor
Slika 1.	Originalna, Goran M. Stojković
Slika 2.	CC0 1.0, By Mikael Häggström, M.D.- Author info- Reusing images- Conflicts of interest:NoneMikael Häggström - Own workSource image, CC0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=78128747
Slika 3.	(Zeljic et al., 2017), modifikovano
Slika 4.	Rađeno prema (Fu et al., 2021), modifikovano
Slika 5-6.	Originalna, Goran M. Stojković
Slika 7.	By UPODMG 1516 irivbrro - Own work, CC BY-SA 4.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=45589825
Slika 8-37.	Originalne, proistekle iz rezultata doktorske disertacije

LISTA SKRAĆENICA

95% CI	95% interval poverenja (engl. <u>c</u> onfidence <u>i</u> nterval)
AUC	Površina ispod krive (engl. <u>a</u> rea <u>u</u> nder <u>c</u> urve)
B-CLL	B ćelijska hronična limfocitna leukemija (engl. <u>B</u> -cell <u>c</u> hronic <u>l</u> ymphocytic leukemia)
CSCs	Kancer stem ćelije (engl. <u>c</u> ancer <u>s</u> tem <u>c</u> ells)
CT	Kompjuterizovana tomografija
DNK	<u>D</u> ezoksiribonukleinska <u>k</u> iselina
DNMT	<u>D</u> NK <u>m</u> etil <u>t</u> ransferaze
FC	Stepen promene (engl. <u>f</u> old <u>c</u> hange)
FDR	engl. <u>f</u> alse <u>d</u> iscovery <u>r</u> ate
FRET	engl. <u>f</u> luorescence <u>r</u> esonance <u>e</u> nergy <u>t</u> ransfer
GEO	engl. <u>g</u> ene <u>e</u> xpression <u>o</u> mnibus
GLOBOCAN	engl. <u>g</u> lobal <u>c</u> ancer <u>o</u> bservatory
HDAC	<u>H</u> iston <u>d</u> eacetylaze
HPV	<u>H</u> umani papiloma <u>v</u> irus
HR	engl. <u>h</u> azard <u>r</u> atio
HSV	<u>H</u> erpes <u>s</u> impleks <u>v</u> irus
iRNK	<u>I</u> nformaciona <u>R</u> NK
lncRNK	Duge nekodirajuće RNK (engl. <u>l</u> ong <u>n</u> on <u>c</u> oding <u>R</u> NA)
LOH	Gubitak heterozigotnosti (engl. <u>l</u> oss <u>o</u> f <u>h</u> eterozygosity)
MGB	engl. <u>m</u> inor <u>g</u> roov <u>b</u> inder
miRNK	<u>M</u> ikro <u>R</u> NK
MR	<u>M</u> agnetna <u>r</u> ezonanca
N	Ukupan broj ispitanika u grupi
NP	<u>N</u> ema podataka
nt	<u>N</u> ukleotid
PCR	Lančana reakcija polimerizacije (engl. <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PET	<u>P</u> ozitronska <u>e</u> misiona <u>t</u> omografija
RNK	<u>R</u> ibonukleinska <u>k</u> iselina
ROC	ROC kriva (engl. <u>r</u> eceiver <u>o</u> perating <u>c</u> urve)
SAD	Sjedinjene <u>A</u> meričke <u>D</u> ržave
SD	Standardna <u>d</u> evijacija
siRNK	Male interferirajuće RNK (engl. <u>s</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> NA)
TCGA	Atlas genoma kancera, baza podataka (engl. <u>t</u> he <u>c</u> ancer <u>g</u> enome <u>a</u> tlas)
TNM	engl. <u>t</u> umor <u>n</u> ode <u>m</u> etastasis

BIOGRAFIJA

Dr Goran Stojković je rođen 25.07.1979. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet u Beogradu je upisao školske 1998/99. godine, a diplomirao 01.02.2005. sa srednjom ocenom 8,00. Opšti lekarski staž je obavio u Kliničkom centru Bežanijska Kosa, a stručni ispit za doktora medicine je položio 2006. godine. Od tada pa do 2011. godine je bio zaposlen u privatnoj klinici za maksilofacijalnu hirurgiju „Beograd-Centar“ gde je radio pod mentorstvom prof. dr Zorana Stajčića. Specijalizaciju iz maksilofacijalne hirurgije je upisao 2008. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a specijalistički ispit je položio 2012. godine s odličnim uspehom. Od 2011. godine je zaposlen u Klinici za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, kao lekar specijalista maksilofacijalne hirurgije pod mentorstvom prof. dr Milovana Dimitrijevića. Specijalističke akademske studije na predmetu hirurška anatomije upisao je 2011. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu, a temu završnog specijalističkog akademskog rada pod nazivom „Savremeni koncept lečenja frontobazalnih povreda“ pod mentorstvom prof. dr Milovana Dimitrijevića je odbranio 2016. godine. Doktorske studije na predmetu rekonstruktivna hirurgije upisao je 2013. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu. 2018. godine izabran je u zvanje kliničkog asistenta na Katedri za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Goran Stojković ima dugogodišnje kliničko iskustvo u oblasti onkologije (maligniteti glave i vrata), plastične i rekonstruktivne hirurgije, traumatologije kostiju lica, hirurgije deformiteta kostiju lica, vilica i rasepa usne i nepca, oralnoj hirurgiji i estetskoj hirurgiji lica. Ove oblasti je u Srbiji usavršavao pod mentorstvom prof. dr Zorana Stajčića, prof. dr Milovana Dimitrijevića i prof. dr Siniše Kojića dok se u inostranstvu usavršavao u Belgiji, Italiji, Ujedinjenom kraljevstvu, Nemačkoj i Češkoj republici.

Autor je ili koautor 9 publikacija u časopisima sa SCI liste.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Goran M. Stojković

Broj indeksa RH-17/13

Izjavljujem

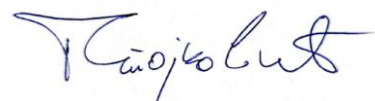
da je doktorska disertacija pod naslovom

“In silico karakterizacija *miRNK* meta potpisa i validacija odabranih *miRNK* kao potencijalnih prognostičkih biomarkera u oralnom karcinomu”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 21.03.2022.

Potpis autora



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Goran M. Stojković

Broj indeksa RH-17/13

Studijski program Rekonstruktivna hirurgija

Naslov rada “In silico karakterizacija *miRNK* meta potpisa i validacija odabranih *miRNK* kao potencijalnih prognostičkih biomarkera u oralnom karcinomu”

Mentor prof. dr Milovan Dimitrijević, Komentor prof. dr Katarina Zeljić

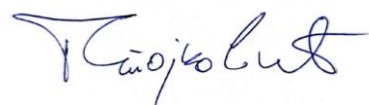
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 21.03.2022.

Potpis autora



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„In silico karakterizacija *miRNK* meta potpisa i validacija odabranih *miRNK* kao potencijalnih prognostičkih biomarkera u oralnom karcinomu”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

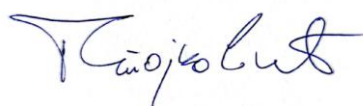
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

U Beogradu, 21.03.2022.

Potpis autora



1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.