

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје
Стоматолошки факултет



Сузана Д. Двојакоевска-Божовиќ

**ПРОГНОСТИЧКА СИГНИФИКАНТНОСТ НА DNA-
МЕТИЛАЦИЈАТА И НИВОТО НА ТУМОР-
СУПРЕСИВНИ *miRNA* КАЈ ОРАЛНИОТ КАРЦИНОМ**

Докторска дисертација

Ментор: проф. д-р Даниела Поповиќ Моневска
Коментор: проф. д-р Александар Димитровски

Скопје, 2015

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје
Стоматолошки факултет



Сузана Д. Двојаковска-Божовиќ

**ПРОГНОСТИЧКА СИГНИФИКАНТНОСТ НА DNA-
МЕТИЛАЦИЈАТА И НИВОТО НА ТУМОР-
СУПРЕСИВНИ *miRNA* КАЈ ОРАЛНИОТ КАРЦИНОМ**

Докторска дисертација

Ментор: проф. д-р Даница Поповиќ-Моневска
Коментор: проф. д-р Александар Димовски

Скопје, 2015

СОДРЖИНА

1.	Вовед	2
1.1.	Поим, инциденца и етиологија на оралниот карцином	2
1.2	Генетска и епигенетска основа на оралната карциногенеза.....	11
1.3.	Епигенетика.....	12
1.3.1.	DNA- метилација.....	14
1.3.2.	miRNAs	18
2.	Преглед од литература.....	23
3.	Цели на трудот.....	47
4.	Материјал и методи.....	48
4.1.	Собирање податоци за пациенти и земање биоптичен материјал -ткивни примероци.....	48
4.2.	Хистолошка анализа на ткивни примероци	50
4.3.	Определување на DNA метилационо ниво на гените во ткивните примероци.....	51
4.4.	Определување на miRNA експресиите во ткивните примероци.....	54
4.5.	Статистичка обработка.....	56
5.	Резултати.....	58
6.	Дискусија	160
7.	Заклучоци	213
8.	Кратка содржина	215
9.	Summary.....	219
10.	Литература.....	222
11.	Список на кратенки.....	241

1. ВОВЕД

1.1. Поим, инциденца и етиологија на оралниот карцином

Карциномот на глава и врат (HNOС) е шеста најчеста малигна неоплазма во светот и е еден од главните светски здравствени проблеми во текот на изминатата деценија. Во САД секој еден час умира по еден пациент од HNOС. Неговата инциденца расте за околу 500 000 нови случаи, секоја година. HNOС е еден од најистражуваните и најмногу проучувани болести, бидејќи според Association of American Cancer Institutes (AACI), статистичката анализа на појава на нови HNOС, се зголемила за околу 25% во текот на последните 5 години⁶, за разлика од целокупните нови случаи на карциноми кои се зголемени само за 5% во истиот период. Од сите карциноми на главата и вратот, најчеста форма (96 %) е оралниот сквамозен карцином (OSCC).

Застапеноста на оралниот карцином, се разликува во зависност од расата, демогеографската местоположба, како и од економската развиеност на земјите. Тоа најверојатно се должи на разликите во: навиките (консумирање на тутун и алкохол)⁴⁷, начинот на исхрана и социо-економските фактори. Пристапноста и можноста на здравствената заштита, недоволната обука и превиди на здравствените работници, како и лимитираната примена на методите за превенција и рана детекција, ја зголемува инциденцата на оралниот карцином²³¹.

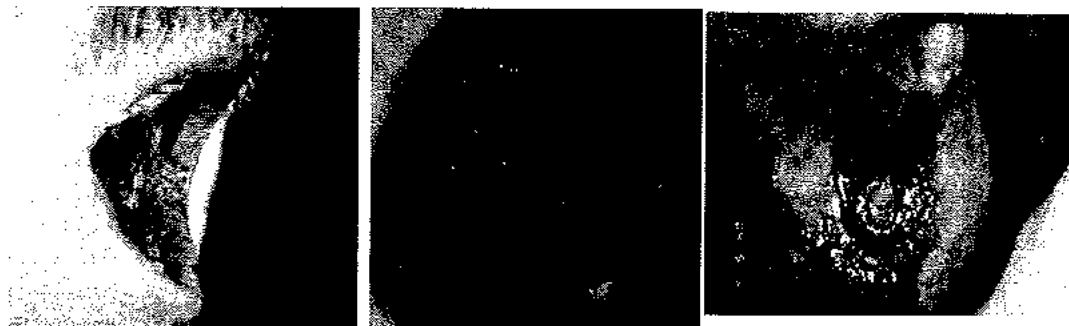
Појавата на премалигните и малигни орални лезии најчесто е асимптоматска и суптилна, па затоа бара сериозен пристап и темелни иследувања кои водат до точна дијагноза, а понатаму и до соодветен и навремен терапевтски третман.

На инвазивниот орален планоцелуларен карцином (OSCC), најчесто му претходи присуство на клинички видлива премалигна промена на оралната слузница. Овие лезии, потекнуваат од епителот на слузницата на усната шуплина и исто како и карциномите, може да се локализираат на: јазикот, подот на усната празнина (ФОМ), букалната мукоза, палатумот, на алвеоларниот гребен, палатумот и ротромоларно¹⁵⁹.

Оралните премалигни лезии (OPMLs) се релативно честа појава, кои се јавуваат кај околу 2,5% од општата популација и нивното рано откривање е клучна цел во превенцијата на карциномот. Посебно треба да се обрне внимание, кога во патолошки докажаните биоптични наоди, се открива дисплазија или carcinoma in situ. Терминот дисплазија е резервирана за лезии кои покажуваат комбинација и различни степени на цитолошка атипичност (на пример, хиперхроматизам, зголемена големина нуклеотидна, плеоморфизам, дискератоза, како и зголемена или абнормални митотички делби). Кога клеточната атипичност се протега на површинскиот слој, тогаш се зборува за тешка дисплазија и carcinoma in situ⁵.

Степенот на малигна трансформација на OPMLs е: 9-18% за леукоплакијата, (~80%) за еритроплакија или erythroleukoplakia, оралната субмукозна фиброза (OSMF) со можност за малигна трансформација кај 7% -

13% од пациентите³¹. Lichen planus е со низок степен на малигна трансформација (9,80%) и други лезии (тутнска кератоза, leukoedema и leukoderma).



Сл.бр.1. Leukoplakia

Lichen planus

erythroplakia co OSMF

Кога овие лезии, перзистираат подолго од 2-4 недели, пациентот веднаш треба да биде соодветно третиран до поставување на дефинитивната дијагноза. Голем број од преканцерозите, кај кои што патохистолошки не е верифицирана дисплазија, може прво да напредуваат во дисплазија, а потоа да подлежат на малигна трансформација²⁷¹.

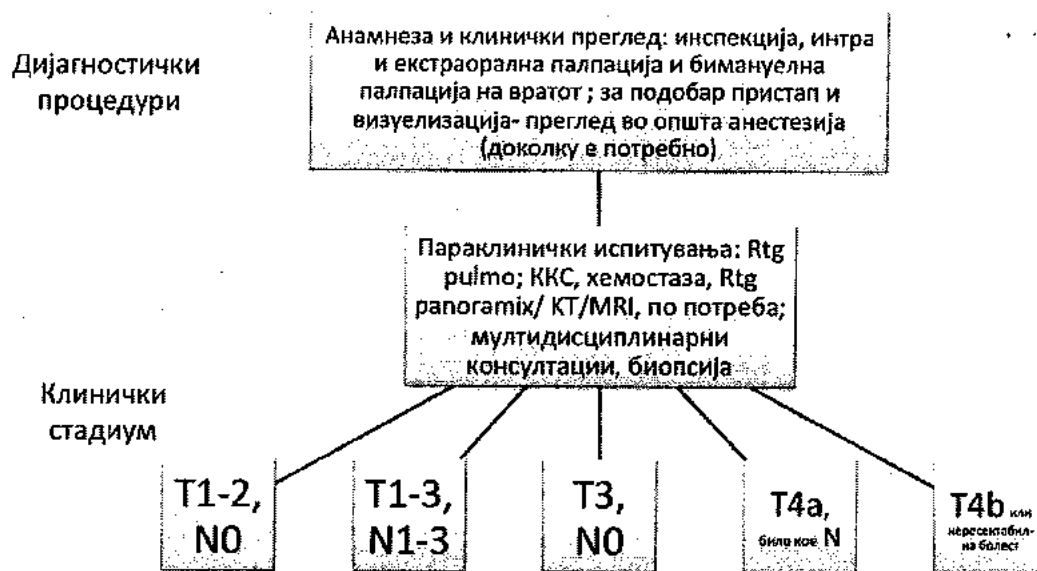
Во развојната фаза на оралниот карцином се забележува присуство на незаздравувачка улцера, а касните симптоми вклучуваат: крварење, расклатување на забите, дисфагија, дизартрија и развој на вратни метастази. Доколку се детектира упорна, незаздравувачка орална лезија, веднаш, без одложување, треба да се изведе биопсија за потврдување на дијагнозата.

Клиничките симптоми и знаци на оралниот карцином се поделени на рани (почетни) и доцни (касни) симптоми.

Рани (почетни) симптоми се: Перзистентна црвена или бели плака/ незаздравувачка улцера, прогресивен оток или невообичаени експанзии на површинските промени, ненадејно расклатување на забите без очигледна причина, спонтани орални крварења или крварења од нос и пролонгирана засипнатост.

Касните (доцни) симптоми вклучуваат: индурирани површини, парестезии, дизестезии на јазикот или усните, опструкција на дишните патишта, хронична болка во увото / otalgia, тризмус, дисфагија, цервикална лимфаденопатија, постојана болка и промени во видот.

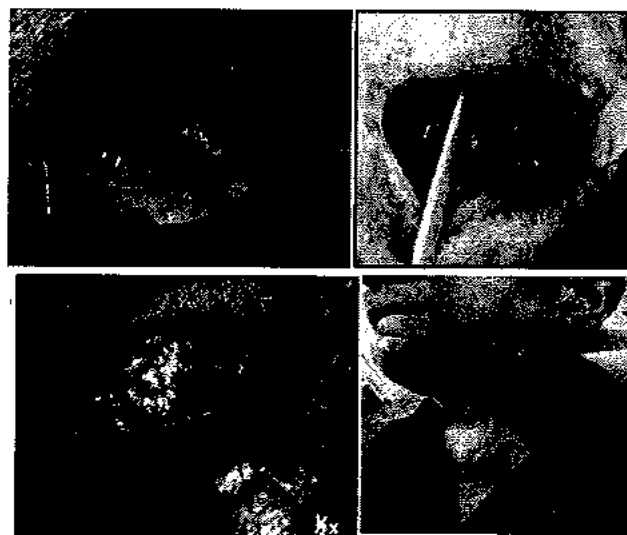
Овие симптомите, може да варираат и да се преплетуваат, па затоа само егзактните и прецизирани постапки на **дијагностички процедури**, на премалигните лезии и OSCC, може да ја дефинираат крајната дијагноза. Примарниот карцином во оралната празнина, може да има и мултифокален раст. Само исцрпна, анамнеза и клинички преглед на целокупната слузокожа на горниот аеродигестивен тракт, доведува до егзактна процена и план за понатамошни дијагностички иследувања.



Сл.бр.2. Шема за дијагностички протокол на OSCC

Бимануелната палпација на лимфни јазли на вратот, е составен дел на понатамошната егзаминација. Кај приближно 90% од пациентите со палпабилни лимфогландули на вратот, се идентификува постоењето на примарниот карцином, а останатите 10% со ("непознато потекло") се метастази од далечен примарен тумор од: пулмо, дојка, матка, простата или лимфоми.

Биопсија, е крајна дијагностичка процедура и се дефинира како постапка која обезбедува ткиво/ или дел од ткиво, за микроскопска и патохистолошка верификација. Биопсијата се користи за евалуација на лезиите во усната празнина, кои перзистираат 2 или повеќе недели и покрај тоа што се отстранети потенцијалните надразнувачи фактори поврзани со инфекција или воспаленија ²⁰⁶.



Сл.бр.3. клиничка манифестација на оралниот карцином, со метастази на врат

Тераписките модалитети на OSCC ²⁰⁶, се базираат на стадиумот т.е. големината на примарниот тумор и присуството или отсуство на метастази.

Третманот на оралниот карцином вклучува:

- *Комплетна хируршка ексцизија на карциномот*, е единствен и најважен прогностички фактор за успех на третманот. Во спротивно, присуството на малигни клетки на ресекционите маргини е главна причина за појава на локални рецидиви, далечни метастаза и намалување на стапката на преживување¹²⁷.

- *Целосна или делумна ресекција на мандибулата* (mandibulectomy partialis /totalis), на максилата (maxillectomy totalis /partialis) се прави кога туморот инфилтрира во виличните коски.

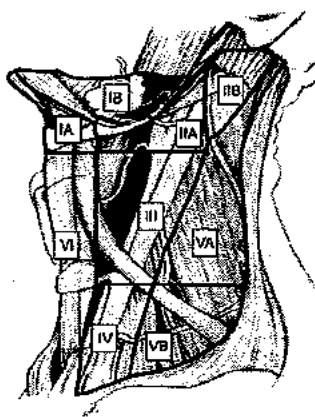
- *Glossectomy partialialis, hemiglossectomy или /totalis* се изведува кога е зафатен дел, пола или цел јазик.

- *Вратната дисекција* е составен дел на третманот но не постои единствен стандардизиран третман на цервикалните метастази.

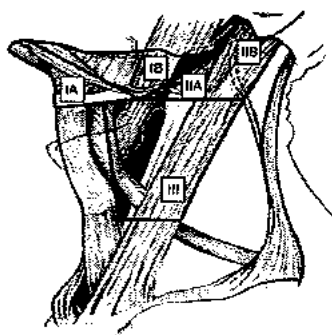
Тековната класификација на дисекции на вратот од страна на *Committee for Head and Neck Surgery u Oncology of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, базарана на принципите со кои се регулира екстензивноста на дисекцијата е следната :

- *Радикална дисекција на вратот (сл.бр.4)*, е en bloc отстранување на фасција- фиброзно- масно ткиво од едната страна на вратот, вклучувајќи ги и лимфни јазли од IV ниво, акцесорниот нерв, внатрешната југуларна вена и стерноклеидомастоидниот мускул.

- *Модифицирана радикална дисекција на вратот*, вклучува отстранување на истите групи на лимфни јазли, како кај радикалната дисекција (IV ниво), но со зачувување на 1 или повеќе од следниве 3 нелимфатични структури: акцесорниот нерв, внатрешната југуларна вена и стерноклеидомастоидниот мускул.



Сл. бр.4. Шесте нивоа на вратот кои се ревидираат во радикалната вратна дисекција



Сл. бр.5. селективна вратна дисекција на I-III ниво со ресекција на мандибула

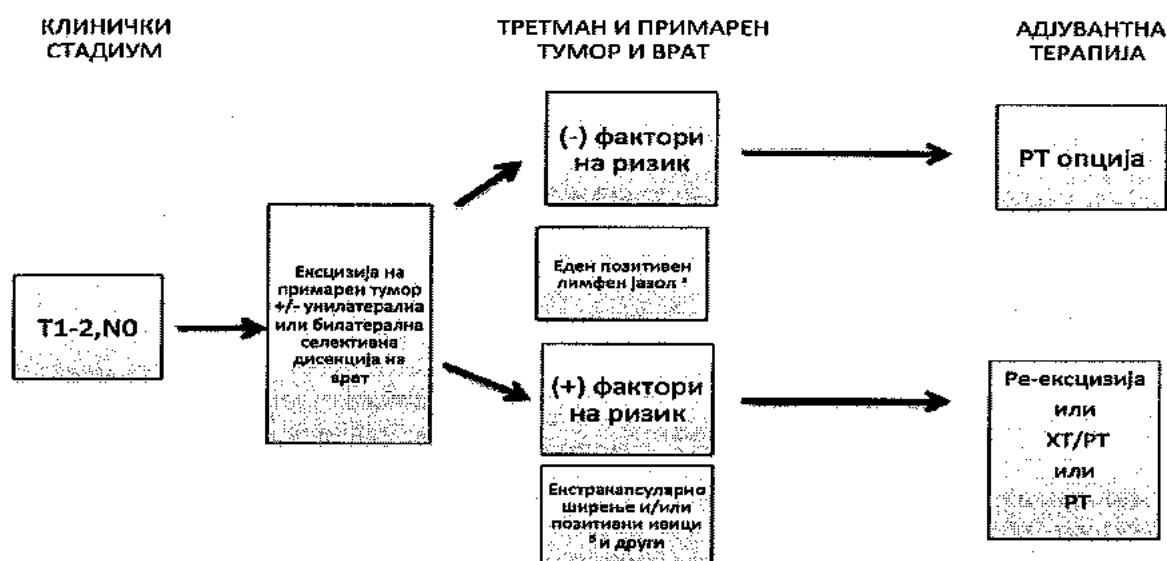
- Селективна дисекција на вратот (сл.бр.5)

Овој термин подразбира отстранување на лимфните јазли од едно или повеќе нивоа и според нивоата на отстранетите лимфни јазли се класифицира во следниве категории : супраомохиодна дисекција (I, II, III нива), латерална дисекција (II, III, IV нива) , антериорна дисекција (VI ниво) и постериолатерално дисекција (II, III, IV, V ниво) .

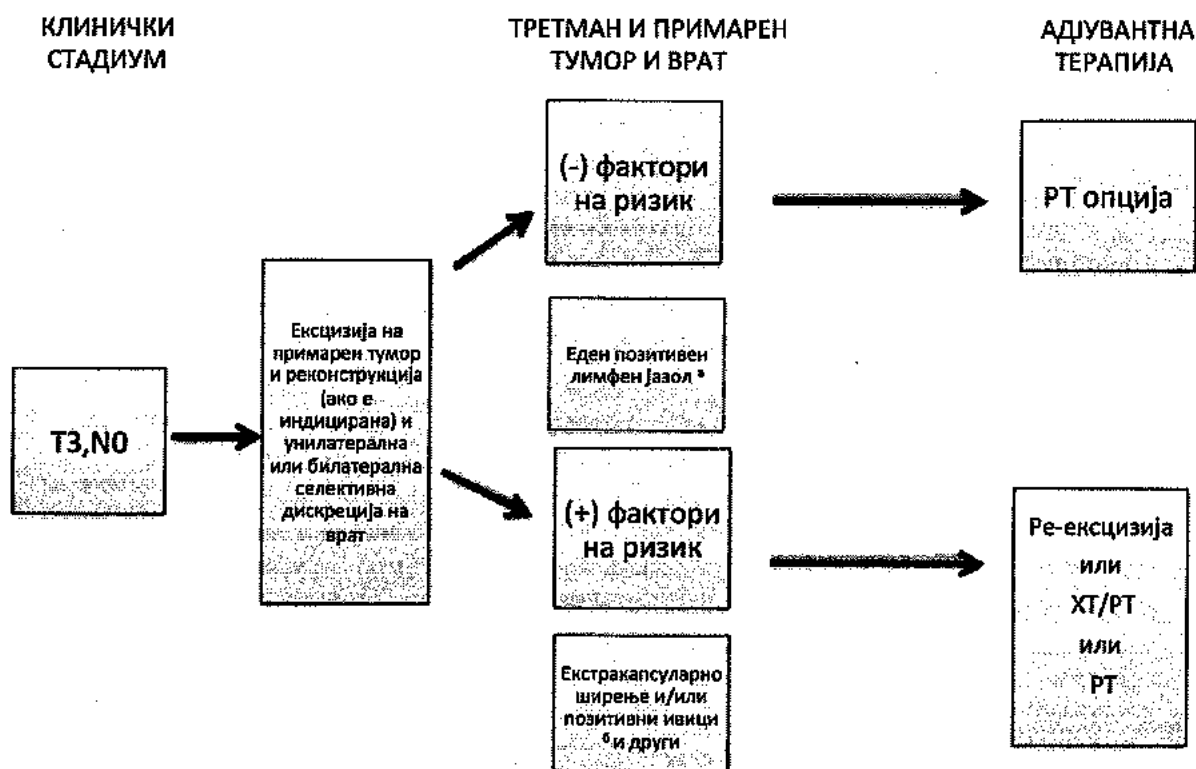
Лимфните метастази се најважниот механизам за ширење на планоцелуларниот орален карцином. Ризикот од појава на метастатски депозити во лимфните јазли варира во зависност од локализацијата, големината на примарниот тумор, хистолошкиот стеиџинг на примарниот тумор, периневралната и периваскуларна инвазија како и екстракапсуларното ширење.

Протоколот за третман на OSCC е во согласност со Американското здружение за карциноми, според кое раната до развојна фаза (стадиум I-III) најчесто се третираат хируршки и со радиотерапија, додека високо- ризичните пациенти кои имаат повеќе патолошки позитивни лимфни јазли и/или метастазите се протегаат надвор од капсулата на лимфните јазли (екстракапсуларно), се третираат и со хемотерапија²⁰⁰ (Сл.бр.6.а и 6.б). Во напредниот (стадиум IV) на болеста, се користи мултидисциплинарен нехируршки пристапи со зголемување на фреквенцијата на радио и хемотерапија со цел да се подобри контролата над болеста, продолжување на животот, и одржување на прифатлив квалитет на живот за пациентите (слика бр.6.ц).

Хируршките marginи се користат како параметар за проценка на успешноста на туморска ресекција²²⁵. Кај оралниот карцином, наод на туморско ткиво на хируршките marginи, е параметар кој укажува на значително намалување на стапката на преживување на пациентите и зголемување на инциденцата на појава на локални рецидиви. Негативни marginи се дефинираат кога од крајната ивица на туморот, следните 5мм на ресецираниот дел, се во здраво.

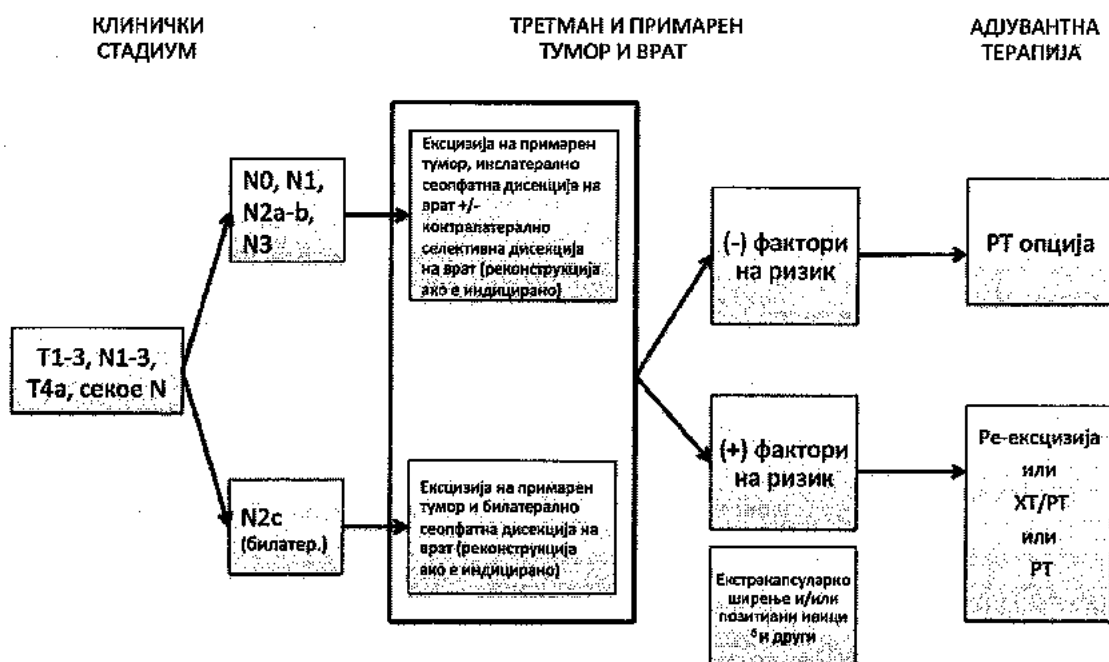


Сл. бр.6.а. Шематски приказ на тераписки модалитети за T1-2,N0



- Фактори на ризик: екстракапсуларно ширење од лимфни јазли, позитивни ивици, pT3 или pT4 примарен тумор, N2 или N3 лимфни јазли, зафатени лимфни јазли од IV или V ниво, перинеурална инвазија, васкуларен емболизам.
- Само за позитивни ивици, ре-ексцизија ако технички е можна

Сл. бр.6.б. Шематски приказ на тераписки модалитети за T3,N0



- а) Фактори на ризик: екстракапсуларно ширење од лимфни јазли, позитивни ивици, pT3 или pT4 примарен тумор, N2 или N3 лимфни јазли, зафатени лимфни јазли од IV или V ниво, перинеурална инвазија, васкуларен емболизам.
- б) Само за позитивни ивици, ре-ексцизија ако технички е можна

Сл.бр.6ц. Шематски приказ на терапевтски модалитети за T1-T3,N1-N3; T4a и секое N

Следењето на овие пациенти се состои во физикален преглед, првата година на секои 1-3 месеци, втората година секои 2-4 месеци, 3-5 год. секои 4-6 месеци, над 5 година секои 6-12 месеци. После зрачен третман е индицирано Rtg-pulmo и TSH на секоја 1 година. Доколку е потребно и рехабилитација на говор, слух и голтање и стоматолошки третман.

Хистолошки маркери на туморската прогресија

Врз основа на TNM класификацијата овозможен е клинички стејџинг на пациентите со орален карцином. Овој стејџинг систем е стандарден начин да се опише и сумира ширењето на карциномот. Најчесто користен систем, со кој се опишува степенот на карциномот е TNM system of the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Системот TNM ги опишува 3-те клучни детерминанти:

- p T - укажува на големината на примарниот тумор.
- p N - го опишува степенот на ширење на околните (регионални) лимфни јазли. Лимфни јазли се мали колекционери на имунолошкиот систем каде се шири карциномот.
- M - укажува дали карциномот се проширил (метастазирал) до другите органи на телото (најчести метастази дава во белите дробови, потоа во црниот дроб и коските.)

Броевите или буквите обезбедуваат детали за секој од овие фактори,

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

броевите од 0 до 4 укажуваат на големината ,а буквата X значи "не може да се процени".

Откако ќе се определи T, N, и M класификацијата , следува групирање за определување на стадиумот- TNM од 0, I, II, III или IV. Стадиумот IV понатаму е поделена на а, b и c.

0 kl.stadium Tis, N0, M0; Tis- Carcinoma in situ
 I kl.stadium T1N0M0
 Ikl.stadium T2N0M0
 IIIkl.stadium T3N0M0, T1, T2 ili T3 N1M0
 IVkl.stadium IVa стадиум: T4N0M0, T4N1M0, T4 N1 M0, T4 N2 M0
 IVb stadium: секое T N2 ili N3M0, IVC stadium: секое T секое NM1.

Прогнозата на овие пациенти, зависи првенствено од клиничкиот стадиум на болеста и тоа од:

1.Површна димензија на примарниот тумор- T, длабочина, хистолошка диференцијација на туморот,начин на инвазија, локализација.

2.Вратниот статус -N; постоење на позитивни лимфни јазли во иницијалниот стадиум на болеста (прв најзначаен самостоен прогностички фактор), број на позитивни лимфни јазли и екстранодуларно ширење на метастатскиот депозит.

3.Постоење на дистални метастази- M, возраст и имунолошки статус.

Најшироко прифатен и употребуван дескриптивен модел, за прецизирање на клеточната диференцијација е Broder's system-от.(слика бр.7.)

Broder's system (дескриптивен систем):	
Туморите се поделени според степените на диференцијација на:	
Добро диференцирани (GI)	< 25% недиференцирани клетки
Умерено диференцирани (GII)	< 50% недиференцирани клетки
Лошо диференцирани (G III)	< 75% недиференцирани клетки
Анапластични (G IV)	> 75% недиференцирани клетки

Слика. бр.7. Broder's system (дескриптивен систем за клеточна диференцијација)

Градуирањето на степенот на малигнитет на примарниот тумор е изведено по системот на Nason Richard, модификација на Jacobsson-овиот модел и опфаќа: степен на клеточна диференцијација, нуклеарен полимофизам, број на митотски делби, длабочина и начин на инвазија на туморот во васкуларните и лимфатични простори, дезмоплазија и инфламаторна реакција на ткивото¹⁷⁵.

Напредниот (III-IV) стадиум на болеста, присуството на метастатски промени во вратните лимфни јазли, периневралната инвазија, екстракапсуларното ширење и васкуларниот емболизам, базирани на хистолошкиот статус, се индикатори за лоша прогноза и се поврзани со значително зголемен ризик во појавата на локални рецидиви и далечни метастази. Сепак, дури и кај хистолошки нормални (во здраво) ресекциони маргини, 10-30% од OSCC пациенти имаат локални рецидиви, што укажува на фактот дека маргиналниот статус не е независно предвидувачки фактор за појава на рецидиви или индикатор за стапката на преживување³⁵.

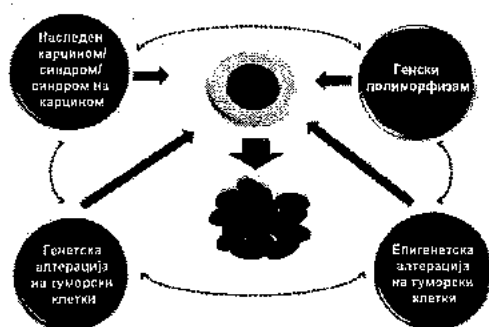
Присуството на метастази (лош прогностички фактор) во лимфните јазли на вратот и длабочината на инвазија на туморот, се главни параметри кои ја одредуваат екстензивноста на третманот- екстирпацијата на туморот, придружен со вратна дисекција. Исто и постоењето на окултни метастатски кај (> 20%) од пациентите со клинички негативен врат, се лош прогностички фактор²⁰⁰. Како резултат на сето горе наведено, пациентот подлежи на високо мутилантни хируршки и радио/хемо терапии, што доведува до губење на оралните ткива, јазикот, забите, плунковите жлезди, и лизирање на коските на лицето отежнат говор и исхрана и многу лош квалитет на живот¹⁶³.

Сите достапни модалитети на третман на карциномите се придружени со значајни несакани ефекти, кои може да имаат големо влијание врз квалитетот на животот кај пациентите. Доста често и пациенти со иста анатомска локализација, ист стеинг и ист третман, имаат различен исход и различен посттретмански морбидитет²⁴⁰.

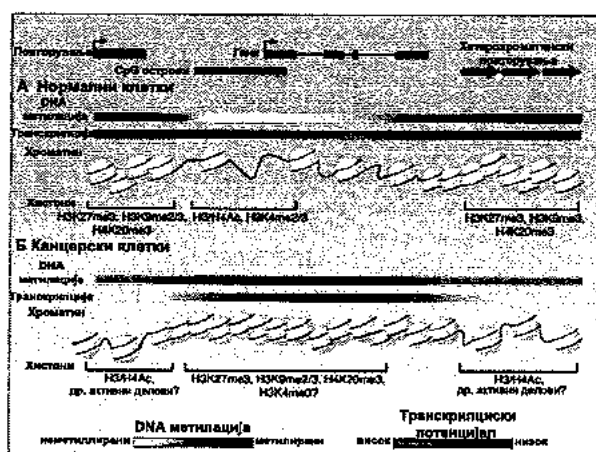
Меѓутоа и покрај сето горе наведено, кога се користи и најдобрата комбинација на хируршки и нехируршки пристапи, повеќе од 50% од пациентите со OSCC доживуваат релапс, без разлика дали на локално ниво, во регионалните или далечните лимфни јазли. Смртноста поврзана со OSCC се зголемила за 25% во текот на последните 5 години, што го прави оралниот карцином "главен убиец" на модерните времиња и голем социо- медицински проблем на денешницата.

Во последната деценија прогресот во генетиката нуди можности за подобро разбирање на молекуларна патогенезата на карциномите и можност за нивно рано дијагностицирање како и објаснување на специфичните молекуларни процеси кои се вклучени во развојот, инвазијата и појавата на метастази²⁵².

Од аспект на молекуларна биологија, неопластичната трансформација е повеќестепен процес на ткивни хомеостатски нарушувања, кои доведуваат до неконтролирана клеточна пролиферација и инхибиција на клеточната смрт-апоптоза. Секое ниво се карактеризира со генетски и епигенетските промени и нивната прогресивна акумулација доведува до малигна трансформација на нормалните клетки (слика бр.8).



Сл.8. Генетски и епигенетски промени во малигна трансформација



Сл.бр.9. DNA метилација и хистон модификација во клетките на карциномите

1.2. Генетска и епигенетска основа на оралната карциногенеза

Клеточната делба е прецизно контролирана од страна на гени, чие протеински продукти претставуваат комплексна мрежа одговорна за прием, пренос и конечна реализација на сигналот за митоза¹⁹⁵. Проширувањето на клоновите или на клеточната маса на клиничко ниво се манифестира како неоплазма, предизвикана од структурните и функционални лезии на специфични генетски локуси, наречени "канцерогени гени". Оралниот карцином започнува како фокален клонален прекумерен раст, на изменетите прогениторски клетки во близина на базалната мембрана на нормалниот епител, кој се проширува во сите правци. Серија на генетски алтерации се потребни за клетката да напредува низ стадиум на дисплазија, carcinoma in situ, инвазија, и метастаза.

Транзицијата од нормален епител во пре-малигнитет (иницијален стадиум) и конечно во орален карцином (прогресија), зависи од акумулација на генетски и епигенетски промени, со кои соматските клетки прогресивно и симултано се стекнуваат. Денешните сознанија за молекуларната патогенеза на оралниот карцином, сугерираат дека и генетски и епигенетските промени се вмешани во овој повеќестепен процес, во кои тие се надополнуваат во последователни фази⁷⁹ (слика бр. 9).

1.3. Епигенетика

Всушност терминот "епигенетика", прв го вовел ембриологот и еволутивен биолог SN Wadington во 1942 година, за да ги опише факторите кои влијаат на процесот на диференцијација на клетките од нивната првична (тотипотентна) состојба во ембрионот.

Епигенетските процеси се важни во физиологијата на нормалните клетки. Во текот на ембрионалниот развој, хиперметилацијата замолчува дел од гените кои го диктираат патот на диференцијација. Дури и возрасните човечки клетки имаат огромен потенцијал за раст (една единствена клетка може да

достигне маса од 1kg за 40 дена со митотички делби). Епигенетските промени се серија на мобилни "проверки и баланси" кои го ограничуваат овој раст, во што се вклучени и тумор супресорните гени кои се активни во нормални клетки, но се замолчени кај карциномите.

Под епигенетските промени, се подразбираат промени во генската експресија (сл.бр.10), кои не се кодирани во DNA нуклеотидните секвенци и се наследни и потенцијално реверзибилни. За подобро да се разјасни оваа дефиниција, важно е да се разбере дека хемиската модификација на DNA и нејзините асоцирани протеини, може да ја алтерираат генската експресија, без промени во основната DNA секвенца на организмот, но може да се пренесат и на повеќе генерации. Овие епигенетските промени преку клеточните делби, можат да траат низ целиот живот на клетката; спротивно, не-генетските фактори предизвикуваат гените на организмот да се однесуваат ("се експресираат") поинаку. За разлика од епигенетиката, генетиката ги проучува промените на DNA секвенцата (генотипот), промените во генската експресија и клеточниот фенотип.

Со оглед на тоа дека генетската аберација ја менува експресијата преку менување на редоследот на аденин (A)-тимин (T) и цитозин (C)-гванин (G) базни парови, епигенетските промени не влијаат на секвенците на основните базни парови¹⁵⁴.



Сл.10. Генската експресија се контролира преку дејството на протеински репресори кои се прикачуваат на замолчените региони на ДНК.

Во суштина, епигенетиката е раководена од промени во две различни класи на гени: тумор- супресорните гени кои го инхибираат растот на клетката и преживувањето и онкогени кои промовираат раст на клетката и опстанок. Клучните генетски промени кои предизвикуваат карциногенеза вклучуваат, активирање на онкогените и деактивирање на тумор- супресорните гени.

Хомеостазата се одржува со помош на рамнотежа која постои помеѓу овие две класи на гени. Со еднакво активирање на онкогени и деактивирање на тумор супресорните гени, доаѓа до нарушување на хомеостазата и почнува да се развива тумор²⁰².

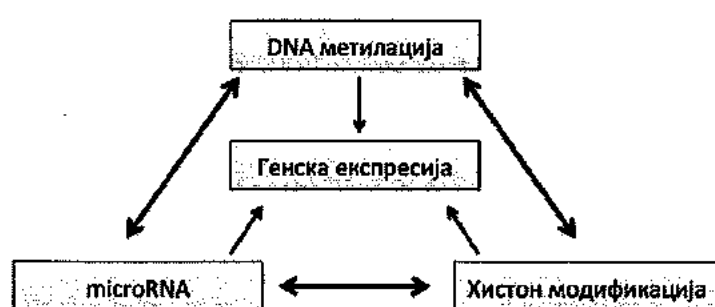
Онкогени и тумор- супресорни гени

Онкогените се гени, чии протеински производи го стимулираат клеточниот раст, поделбата и диференцијацијата преку процесот на сигнализација на регулаторните механизми за трансдукција и транскрипција. Во форма на прото-онкогени (редовно, не-мутирани) покажуваат строго контролирани временски и просторни експресији. Мутацијата на протоонкогените дава онкогени, кои се неконтролирано експресирани и предизвикуваат зголемен раст или зголемен опстанок на клетките кои носат такви промени⁶⁹.

Тумор-супресорните гени (анти-онкогени) се гени кои го инхибираат неконтролираниот раст и размножување на клетките, а со тоа ја инхибираат и неопластичната трансформација преку спречување на клеточната делба²¹⁶. Тие се вклучени во контролата на клеточниот циклус, со спречување на неговата прогресија, додека не се поправат оштетувањата.

Доколку оштетувањата се обемни, тие доведуваат до активирање на програмирана клеточна смрт- апоптоза. Деактивирањето на некои тумор-супресорни гени се припишува на несоодветна хипер-метилација на нивните промотор региони. E-cadherin, p16, p15, hMLH1, MGMT и многу други, се добро познати тумор-супресорните гени, за кои е утврдено дека се инактивирани преку несоодветна метилација кај карциномот на оралната шуплина.²⁶¹

Најчести примери на механизми т.е форми на епигенетски промена⁷ кои предизвикуваат промени во геномот и функцијата на генот се: DNA-метилација, хистон модификацијата, и малите некодирани RNAs, од кои секоја го менува начинот на генската експресија, без менување на основната DNA секвенцата (сл.бр.11).



Взаемното влијание помеѓу генската метилација, хистон модификацијата и влијанието на microRNA во експресијата на генското профилирање

Слика.11. Шема на поврзаност на геномската метилација, хистон модификација и ефектите на miRNAs, во профилите на генската експресија

Овие епигенетски промени, кои се поврзани со иницирање и прогресија на OSCC, сеуште не се доволно разјаснети и истражени. Во текот на последната деценија, докажано е дека несоодветната DNA- метилација игра клучна улога во појавата на оралниот карцином.

1.3.1.DNA- метилација

DNA не постои како самостојна молекула, туку заедно со протеините наречени хистони формира комплексна супстанција позната како хроматин. Промените во структурата на хроматинот имаат големо влијание врз генската експресија. Ако хроматинот е кондензиран (со тесно преплетена структура), факторите инволвирани во генската експресија не можат да добијат пристап до DNA, а со тоа и на генот кој ќе биде „исклучен“. Спротивно на тоа, ако хроматинот е хемиски променет во лабава, поотворена структура, гените може да се „вклучат“³⁷.

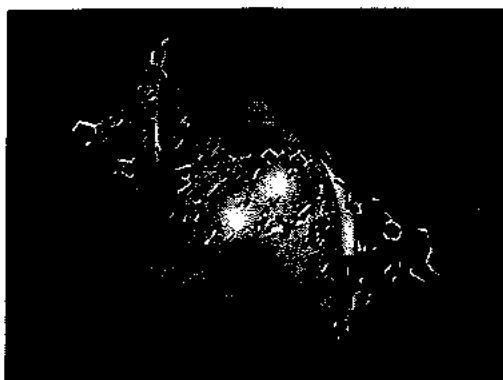
Промените во метилацијата на DNA кај карциномите за првпат биле откриени од Feinberg⁵⁹ во 1983 година и првично се мислело дека тие се поврзани со општиот прекин на клеточниот циклус, кое можеби било ефект, а не причина за малигнитет.

DNA- метилацијата е промена на самата DNA молекула, во која се додаваат метил групи на цитозин нуклеотиди во одредени области на генот од страна на ензимот DNA метилтрансфераза. Метилацијата директно ја замолчува (исклучува) генската експресија преку спречување на врзување на транскрипциски фактори.

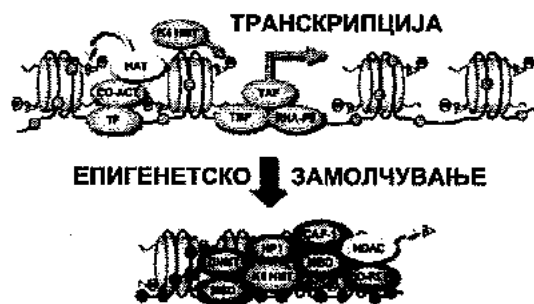
Точната форма на DNA- метилацијата, е потребен предуслов за нормално функционирање на клетката (сл.12.а). Промените на вообичаениот модел на DNA метилацијата, може да предизвика промени во важни клеточни механизми, како што се: контрола на клеточниот циклус, поправка на DNK, отпорност на лекови, апоптоза и ангиогенеза. Промената на моделот на метилација е еден од карактеристиките на туморските клетки. Голем број на човечки болести се поврзани со несоодветна DNA метилација.

Физиолошки, метилација на CpG острови предизвикува долгорочни замолчувања на гените (сл.бр.12.б), а на сличен начин, несоодветната DNA-метилација на промотор регионот на одредени гени се мисли дека е клучен механизам за карциногенезата, кој процес сеуште не е доволно разјаснет.

Хиперметилацијата се одвива во одредени региони на тумор-супресорните гени познати како промотори²²⁷. Тие се карактеризираат со висока густина на цитозин нуклеотиди, познати како CpG острови (цитозин - гванин нуклеотидни спарувања).



Сл.12.а. Илустрација на ДНК на молекулата која е метилирана на двата централни цитозини



Сл.12.б.епигенетско замолчување гените преку негативна транскрипција

Во последната деценија, молекуларната биологија, бележи невидена експанзија на технолошки достигнувања за анализа на DNA- метилацијата. Со овие методи, докажано е дека, хистолошки нормалното ткиво во непосредна близина или далеку од туморот, кај истите пациенти, имаат високо ниво на метилација на некои гени, што е клинички, поврзано со агресивноста, инвазивноста и со малигната трансформација на оралната епителна карциногенеза²²⁶.

Методите кои се на располагање за одредување на метилациониот статус се многубројни и постојат поделени мислењата за прецизноста и веродостојноста на нивните вредности. Најкористена и најпрецизна метода е бисулфитното секвенционирање, кое е златен стандард во анализата на метилацијата, бидејќи само секвенционирањето обезбедува директна детекција на промените во метилацијата. Квантитативната метилација специфични полимераза верижна реакција, PCR (qMSP), е исто така предложена како високо сензибилна платформа за откривање на гените специфични за иницијацијата, раното откривање, дијагностицирање, прогресијата и прогнозата на OSCC/HNSCC¹⁰⁶.

DNA- метилацијата е важен регулатор на генската транскрипција²⁶⁵, поради што нејзината улога во карциногенеза е тема на голем интерес во последните неколку години. Новите достигнувања, во врска со механизмот на метилацијата и нејзината контрола, довеле до откривање на многу регулаторни протеини и ензими. Наодите на потврдување на промените во метилација, кои се јавуваат во телесните ткива и течности во раната и развојната карциногенеза, довеле до поставување на хипотезата за улогата на овој епигенетскиот механизам и неговата потенцијална предиктивна вредност во откривање, дијагностицирање и утврдување на прогнозата на OSCC.

Можноста за деметилирање на веќе променетите гени во карциномите -процес кој е докажан дека е реверзибилен, довел до интензивни истражувања и откривање на нови лекови (5'- azacitidin , decitabine и histone deacetylase инхибиторите), кои веќе се користат во лекување на разни видови на тумори.

Сепак, до денес, не е идентификуван ген –специфичен прогностички или дијагностички маркер за оралниот карцином кои би нашол клиничка примена во

раното откривање, дијагностиката и терапискиот третман на оралниот карцином.

Во контекст на откривање на специфични хиперметиличани промотор региони на гените, најчесто алтерирани кај оралниот карцином, предложени се: p16, DAPK, E-cadherin, MGMT и RAR β 2.

Овие гени имаат различни функции, како на пример: p16 го контролира клеточниот циклус; DAPK апоптозата; E-cadherin-от клеточно/клеточна адхесија; MGMT- DNA репарација и RAR β 2 клеточната пролиферација. Тие се клучни гени во прогресијата на OSCC.

❖ Тумор- супресорниот ген **p16** (CDKN2A- cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, multiple tumor suppressor) е вклучен во контрола на клеточниот циклус преку инхибирање на прогресијата на G1 фазата кај нормалните клетки. p16INK4a – го активира тумор- супресивниот ген RB преку негативна регулација на CDK4, инхибитор на клеточниот циклус. Тој е кодиран од CDKN2A генот, кој се наоѓа на хромозомот 9p21, а мутациите во овој ген се поврзани со зголемен ризик од појава на карциноми. Зголемената експресија на генот p16 со стареењето го намалува бројот на матичните клетки и го забрзува стареењето, а ова намалување на поделбата и производството на матични клетки го штити организмот од карцином⁷⁰.

Клетките на оралниот плоскоклеточен карцином (OSCC), покажуваат значително зголемување во акумулација на метилација во CpG островите во промотор регионот на p16. Оваа епигенетска промена води до губење на тумор- супресорните гени и нивната функција преку два можни механизми: метилацијата физички може да ја инхибира транскрипцијата на генот или метилацијата може да доведе до мобилизирање на транскрипциски фактори кои ја поттикнуваат транскрипцијата. Двата механизми доведуваат до ист краен ефект - хиперметилација на p16 која доведува до надолно регулирање на генската експресија и намалување на нивото на p16 протеините. Се смета дека овој процес е одговорен за развојот на различни видови на карциноми и служи како алтернатива на процесот на генска делеција или мутација.

Овој регулаторен ген е широко експлоатиран во оралниот карцином. Нивото на хиперметилација на p16 е утврдено во голем број на студии, со дијапазон, кој се движи од 17- 76%^{212,206,122}. Епигенетската аберација на p16, е потврдена и во преканцерозните диспластични орални лезии, што покажува дека е вклучен уште во раната фаза на карциногенезата. Наодите за негова инволвираност во васкуларната инвазија, диференцијацијата на туморите и метастазирањето, ја потврдила хиперметилацијата на p16, како специфичен маркер во раната и развојна карциногенеза, како и нивната прогностичка вредност кај пациенти со OSCC⁸¹.

❖ **DAPK1** (death-associated protein kinase1/ протеин киназа 1 поврзана со клеточното изумирање) генот е мапиран на хромозомот 9q34.1. Тој го енкодира про-апоптотичкиот калциум/калмодулин, кој ја регулира серин/треонин киназата и ја поттикнува апоптозата. Овој протеин е посредник на апоптозата предизвикана од интерферон – γ ¹⁶¹. Освен во регулирањето на апоптоза, DAPK гените се вклучени во контрола на автофагијата. Автофагија е механизам кој во клетките во услови на стрес ја одржува клеточната хомеостазата, со катаболизирање на клеточните компоненти кои итно обезбедуваат хранливи материи²⁶⁹. На овој начин инхибицијата на

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

автофагијата, може да доведе до апоптоза. DAPK промотор хиперметилацијата е реверзибилна и може да се промени при третман со ДНК метилтрансфераза (Dnmt инхибитори). Овој процес резултира со повторна експресија на DAPK и негова можна клиничка имплементација во терапијата на карциномите^{267, 221}.

Фреквенцијата на промотор хиперметилацијата на DAPK гените кај примарните OSCC, во литературата, се движи од 18%- 45,3%²². Забележана е и позитивна корелација помеѓу метилацијата на DAPK и присуството на метастази во лимфните јазли кај пациентите со орален карцином, поради што DAPK1 е предложен за потенцијален тумор маркер во молекуларните истражувања^{207, 160, 156}.

❖ **E-Cadherin**-от е транс-мембранозен гликопротеин одговорен за клеточната адхезија, која одржува стабилна структурата на ткивата. Губењето на експресија на овој ген е во корелација со развојната карциногенеза, инвазивноста и метастазирањето на туморите во регионалните лимфни јазли кај OSCC¹²⁶.

CDH1 гџот (cadherin 1 type 1), се наоѓа на хромозомот 16q22.1 и во интеракција со катенините, го енкодира E- cadherin-от (трансмембрански гликопротеин). Оваа молекула е главно вклучена во формирање на адхезивни врски помеѓу епителните клетки, одржување на клеточниот поларитет, интрацелуларната сигнализација и ткивната архитектура^{130,263}.

Голем број на студии, ја евалуирале експресијата на E-cadherin-от кај различни видови на карциноми и ја докажале клучната улога на оваа молекула во текот на туморската прогресија и инвазија¹⁶⁸. Всушност, отсуството на E-cadherin-от, е строго поврзано со алтерирање на клеточната функција, поради што загубата на неговата експресија, се покажала дека игра важна улога во зголемената агресивност на OSCC и метастазирање. Хиперметилацијата на E-cadherin-от (CDH1) интензивно се истражува, поради често потврдуваната негова специфичност за оралната карциногенеза и пријавените фреквенции на негова хиперметилација, се движи помеѓу 7% и 46%^{258, 137, 174,225}.

❖ **MGMT** (methylguanine-DNA methyltransferase) генот, се наоѓа на хромозомот 10q26. Неговата улога се состои во енкодирање на MGMT (O6-methylguanine- DNA methyl transferase)- ензимот за DNA репарација и отстранување на соединенијата предизвикани од алкалните агенси; ваквата поправка на DNA активноста, ја фаворизира резистенцијата на клетките на лекување- индицира апоптоза. Замолчувањето на овој ген овозможува да се акумулира алкализираниот гванин и враќање на апоптозата^{56,268}.

MGMT е инволвиран во многу видови на малигни заболувања. Поточно, MGMT протеинот ги отстранува алкил соединенијата од O6 позицијата на гванинот, спречувајќи ги G>A мутациите во геномот. Инактивацијата или загубата на MGMT, придонесува за развој и прогресија на туморите, но, тоа резултира и со зголемена осетливост на алкални агенси. Потенцијаланата улога на MGMT промотор метилацијата, е во фаза на истражување, но овој ген е сугериран како корисен маркер за предвидување на преживувањето кај пациентите третирани со алкилирачки агенс cyclophosphamide^{154, 221,114,113}.

Фреквенцијата на хиперметилација на овој ген за OSCC, објавена во литературата се движи од 7% до 68%.

❖ **RAR β 2** (ретиноиден киселински рецептор Б2 ген) е тумор-супресивен ген, кој припаѓа на RARB семејството и е мапиран на хромозомот 3p24⁴⁴.

Тој е инактивиран кај карциномите преку хистон деацетилацијата или ДНК метилацијата на неврните регулаторни региони, потврдувајќи ја својата тумор супресивна функција. Механизмот преку кој тој ја врши својата функција е, дерегулацијата на клеточната пролиферација кај туморите и премалигните лезии.

RAR β 2 промотор метилацијата е забележана кај оралниот карцином во (67%) а во значителен процент и во преканцерозните лезии (> 50%). Истражувањата укажуваат на тоа дека, RAR β 2 метилацијата е независна од локализацијата на туморите или stage- фазата, но е поврзана со стареењето (веројатно како експресија на долготрајно делување на канцерогените на мукозниот епител), како и со агресивноста на туморот и лошата прогноза на пациентите^{280, 149, 119, 106}.

1.3.2 miRNAs

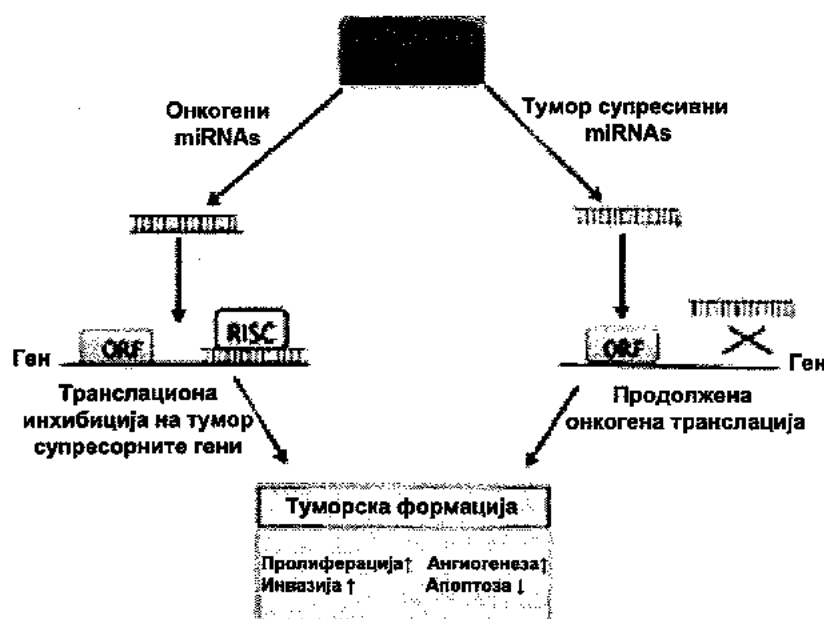
За подобрување на клиничките резултати и наоѓање на нови терапевтски модалитети, за справување со карциномите, направени се интензивни истражувања, во областа на молекуларната биологија, со помош на различни иновативни технологии. Тие довеле до идентификација и пронаоѓање на нови, потенцијални биомаркери, специфични за OSCC, кои поради нивната сигнификантност, во блиска иднина ќе најдат примена во клиничката пракса⁷⁷.

Покрај DNA метилацијата и MicroRNAs (miRNAs), започнале револуција во молекуларната биологија и се појавиле како нови биомаркери и клучни играчи во карциногенезата. Класата на мали некодирани RNAs (miRNAs), од неодамна се истакнати како потенцијални биомаркери во расветлување на централната догма, за почетната и развојна орална карциногења¹⁴⁴.

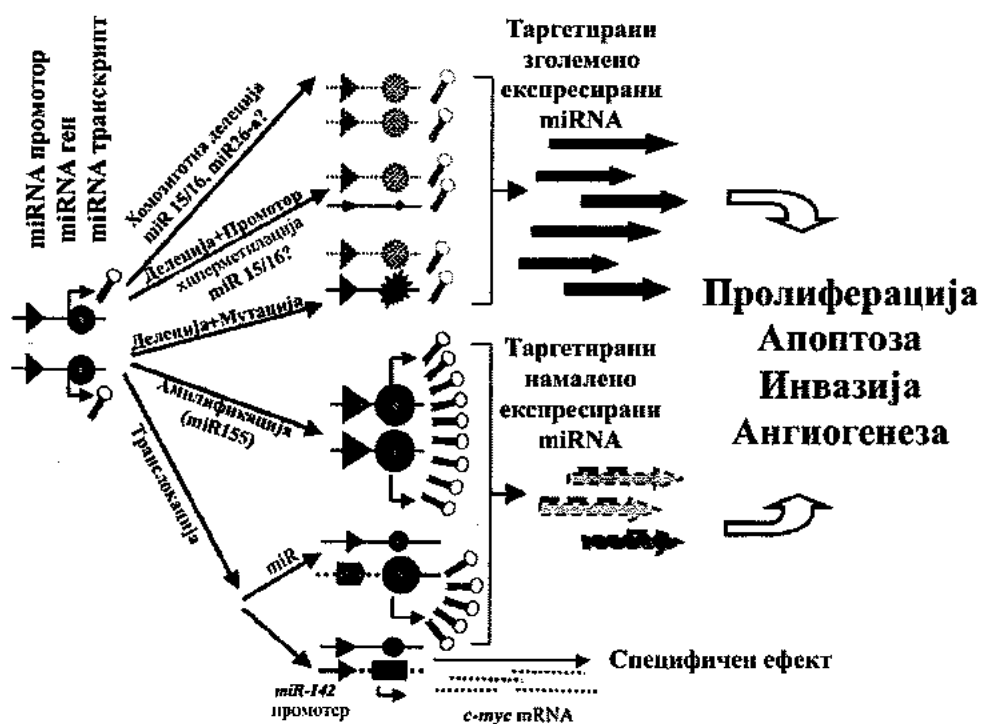
Од нивното откривање во 1993 година, првично во црвите, а подоцна и во човекот, miRNAs (miRNAs) се дефинирани како група на ендегени, мали, не кодирачки протеини со 18-24 нуклеоти по должина на еден низ на miRNAs. Човечкиот геном има 800-1000 miRNAs кои регулираат (директно кодираат) околу 60% од сите протеин- кодирачки гени^{25,97}. Секоја miRNAs таргетира неколку стотици транскрипти, што ја потврдува нивната улога, на најголемо семејството за генската регулација. Тие се вклучени во регулирање на голем број на основни биолошки процеси, како што се: клеточна диференцијација, пролиферација, развој, регулирање на клеточниот циклус, апоптоза, стареење и смрт.

miRNAs ја регулираат генската експресија на пост-транскрипциско ниво, преку два можни механизми: со деградирање на целната Messenger RNAs (mRNAs) или со транслациона инхибиција на целните гени. Регулирањето на целната генска експресија, се врши преку несовршено базно спарување на 3'-непреведените региони (3'-UTR) на целните miRNAs протеин кодирачки гени. Тоа доведува до раскинувањето на хомологната miRNAs или транслациона инхибиција, што ги прави miRNAs да дејствуваат како онкогени или туморски -

супресори²²¹ (сл.бр.13). Процесот на малигна трансформација, се јавува како резултат на намалената експресија на miRNAs на тумор- супресорните гени, и зголемена експресија на онкогените miRNAs, процес кој доведува до онкогена регулација²³⁷. Аберантните специфичните miRNAs експресији, зголемени или намалени, се во корелација со одредени видови на тумори^{9,230}.



Слика.13. Туморска трансформација на карциногените клетки во посредство на онкогени и тумор супресорни miRNAs



Слика.14. Туморска трансформација на карциногените клетки во посредство на онкогени и тумор супресорни miRNAs

Сепак, до денес, малку се знае за Мирна експресионите модели и нивната функција во OSCC^{17,271, 199}.

Досегашните истражувања ги идентификувале аберантните miRNAs експресији во ткивата на OSCC и во клеточните линии²³, како во иницијацијалната фаза и прогресијата, така и во напредните стадиуми на болеста. Нерегулираните miRNAs нивоа, влијаат на карциногенезата на OSCC преку регулирање на пролиферацијата, апоптозата, инвазијата, ангиогенезата, метастазирањето и хеморезистенцијата (сл.бр.14).

MiRNAs е главен посредник на клеточната смрт-апоптоза и метастазирање. Балансот помеѓу развојот и апоптозата е од суштинско значење за одржување на хомеостазата. Доколку се наруши овој баланс и настане хомеостатски колапс, започнува малигната трансформација, преку директно таргетирање на експресијата на антиапоптотичните гени или експресија на проапоптотичните гени⁴¹.

„Канцерогените“ microRNAs, имаат директно влијание на појавата развојот, прогресијата, метастазирањето и лошата прогноза. Тие ја поттикнуваат пролиферацијата, инвазијата, ангиогенезата и апоптозата-механизми кои се директно поттикнати од нивната дисрегулирана (зголемена или намалена) експресија^{27,29,23}.

По првичното откривање на основните членовите на microRNA семејството, lin-4 и let-7, со помош на молекуларно клонирање и биоинформатика, следела идентификација на неколку стотици miRNAs³⁶.

Така на пример ист тип на miRNAs поседуваат различни профили на експресија во оралниот карцином, за разлика од другите видови на карциноми. Исто така, тие покажуваат варијации и во зависност од локализацијата, географската местоположба и методите кои се користат во нивна идентификација.

Достапните технологии го поттикнуваат развојот на бази на податоци за следење и приспособување на овој постојано растечки тренд во идентификација на потенцијално „канцерогени“ микроРНА¹⁹ кај OSCC.

Најновите истражувања одат во насока на утврдување на аберантните нивоа на експресија на miRNAs, како резултат на несоодветна DNA-метилација, а докажано е и дека DNA-метилацијата ја менува експресијата на 30 miRNAs гени кај различни видови на карциноми. Сеопфатните анализи покажале дека околу 50% од miRNAs гените се поврзани со CpG-островите кои ги опфаќаат или се наоѓаат во непосредна близина на Мирна гените^{197, 198, 128}.

Од сите МиРНА²⁸, специфично идентификувани за оралниот карцином, константно зголемена експресија е регистрирана во: miR-374, miR-340, miR-224, miR-10a, miR-140, let-7a, miR-146a, miR-126, miR-31, miR-9, miR-9, mir-21, let-7, mir-155, mir-211.

Намалена експресија е регистрирана во: miR-27a, miR-34b, miR-137, miR-203, , miR-23a, miR-27b, miR-34a, miR-215, miR-299, miR-330, miR-337, miR-107, miR-133, miR-138, miR-193, miR-223, miR-204, miR-370, let-7d, miR-302a, miR-367, let-7g, miR-23b, miR-128a, miR-148a, miR-155, miR-200c, miR-302b, miR-368, miR-122a, miR-371, miR-30e-5p, miR-96, miR-125a, miR-132, miR-200b.

MicroRNA промени, кои постојано се идентификувани во OSCC, а ние ги експлоатиравме во нашата студија, се следните:

- со зголемена експресија (upregulation) mir-21, let-7, mir-155, mir-31, mir-211 и
- со намалена експресија (downregulation), mir-137, mir-133b и mir-193a и mir 125.

DNA- метилацијата и miRNAs како потенцијални биомаркери во дијагноза и прогноза на OSCC

Во последните 4 години, постојано се истражуваат промените во моделите на метилација и досега се идентификувани и документирани голем број на панели на дисрегулираните метилации во различни гени, специфични за OSCC.

Неодамнешниот напредок во техниките и методите за откривање на метилацијата, вклучуваат употреба на мокни алатки како што се: натриум бисулфидната конверзија, DNA microarray, геномски скенирања, и microarrays на CpG островите. Натриум бисулфидната метода се покажала како идеална за мапирање на нормалните и абнормалните модели на метилација. По бисулфидната модификација и секвенционирањето, на располагање била уште една метода, метилација -специфични полимераза верижна. Сите овие методи се користени и во нашата студија за проучување на метилацијата на CpG островите, во промотор регионите на гените специфични за оралната карциногенеза^{12, 37}.

Досегашните истражувања, потврдиле дека, DNA метилационите нивоа и MiRNAs експресиите, се стабилни во здравите ткива и значајно променливи во туморските и нормалните ткива кај истите пациенти.

Неодамнешниот бран на интереси кај истражувачите за варијациите во метилацијата на DNA, покажале дека таа е најдоследна молекуларна промена, која може да се таргетира во терапевтски цели, со цел да се врати изгубената функција на тумор супресивните гени. Исто и MiRNAs, се ново предложени онкогени молекули, кои покажуваат ткивно специфична експресија. Очигледната, нивна дерегулирана модулација во туморските ткива, која се манифестира со зголемена или намалена експресијата, формира уникатен miRNAs модел за оралната туморогенеза. Нивната атрактивна улога во оралната карциногенеза, што е мотив и во нашата студија, е во тек на континуирани истражувања, кои директно се фокусирани на нивната функционална улога во OSCC, како и во востановување на нови маркери за дијагноза, прогноза, како и за предвидување на одговор на терапија.

Значајната разлика помеѓу генетските и епигенетските промени, се состои во тоа што, епигенетските промени можат да се променат со директно нивно таргетирање со употреба на терапевтски агенси. Од терапевска гледна точка, Мирна-базираните терапии, кои се моментално во предклинички и клинички развој, се со многу охрабрувачки резултати. За miRNAs чија експресија е намалена, повторното воведување на „mimics miRNAs“ може да ја

врати целата модулација на првичниот ген. Спротивно, при зголемување на експресија на miRNAs, стратегијата е насочена кон инхибиција, преку употребата на анти-miRNAs. Истиот принцип се однесува и на DNA-метилацијата, која е реверзибилен процес и која ги деметира хиперметираните гени. Овие сознанија, во блиска иднина, ќе допринесат во унапредување на клиничкото менаџирање на OSCC.

Докажано е дека некои miRNAs и DNA хиперметираните гени, се нови потенцијални неинвазивни, дијагностички, прогностички и терапевтски маркери. Сепак, до денес не е идентификуван ген - специфичен прогностички или дијагностички биомаркер за оралниот карцином кои би нашол клиничка примена во раното откривање, дијагностиката и терапевтскиот третман на оралниот карцином. Потребни се континуирани напори¹³⁰, за да се идентификуваат прогностички биомаркери, кои ќе бидат од суштинско значење во остварувањето на поголеми цели за разбирање на биологијата на агресивното однесување на туморите, и во крајна линија и на развојот на нови целни терапии за OSCC, кои би понудиле повисок терапевтски индекс без негативни цитотоксични ефект.

Нашата студија, за прв пат во Македонија, ги идентификува DNA-метилациите на 5 гени, и уште 9 miRNA, најексплоатирани во литературата. Се обидовме да генерираме вредни квантитативните податоци и да обезбедиме релевантни докази за улогата на тумор специфични модели на miRNAs и DNA- хиперметилација, кои ќе допринесат во расветлување на централната догма на епигенетските влијанија во оралната карциногенеза²⁷¹.

Анализата на податоците, во комбинација со патолошките наоди и клинички параметри, ќе допринесат во дефинирање на нивната улога во развојот, неинвазивната дијагноза и прогноза на оралниот карцином.

Во однос на клиничката, хируршка апликабилност, потврдувањето на специфични прогностички биомаркери за OSCC, би било одлучувачки индикатор во донесување на одлуката за екстензивноста на третманот. Наодот на специфични крвни и ткивни биомаркери како предиктивни ризик фактори за лоша прогноза, би биле индикативни за изведување на поагресивен третман, придружен со изведување на вратна радикална дисекција.

Досегашните главни предизвици и сознанија за молекуларната класификација на microRNA и DNA профилирањето на туморските клетки, останува во фаза на дополнителни дефинирања на специфични microRNA и DNA биомаркери за OSCC²²⁵. Во блиска иднина очекуваме, нивна потврда и клиничка апликабилност.

2. ПРЕГЛЕД ОД ЛИТЕРАТУРА

Направен е сеопфатен преглед на релевантната расположива литература од 2002-2014 година, за DNA метилацијата и microRNA дерегулацијата кај оралниот карцином.

Според Choi³⁶ и сор.(2008), во светот OSCC е петтиот најчесто застапен карцином и неговата ескалацијата во последната деценија, го прави еден од главните социо-економски проблеми. Стапката на пет годишно преживување (20-50%) сè уште е на разочарувачки стабилно ниво и покрај значајниот развој на мултимодалитетниот третман на OSCC.

Најраспространетиот класификационен систем за дескрипција на анатомската екстендираност на карциномите е TNM системот²³⁶. Со него се проценува големината на примарниот тумор (T), зафатеноста на регионалните лимфни јазли (N) и присуството на далечни метастази (M). Времето на преживување на пациентите со OSCC е силно поврзано со TNM-класификацијата, кој е најважен водич за третманот, а со морфолошката процена, туморите се класифицирани според диференцијацијата на клетките. Во истражувањето Gasche⁷⁰ и сор.(2012) покажале дека основниот принцип на дијагностичките и терапевтски протоколи за OSCC, кои се темелат на системот „тумор- јазол- метастаза“, дополнети со конвенционалните хистопатолошки проценки на туморот, се покажале како незадоволителни прогностички показатели. Успешното лекување на карциномите, првенствено зависи од раното откривање, целосна ексцизија на туморот со хистопатолошки негативни хируршки маргини, потоа сигурна и репродуктивна класификација на туморот со користење на сите достапни анализи (хистопатолошка, цитогенетска и имунохистохемиска).

Пациентите во почетната и умерена фаза на развој на OSCC (стеиџинг I-III), според Rodriguez²⁰⁶ и сор.(2009), се третираат хируршки, со радиотерапија и со или без хемотерапија (како пост-оперативна адјувантна терапија кај високо-ризичните пациенти кои имаат патолошки позитивни лимфни јазли и / или екстракапсуларно ширење. Во напредниот IV стадиум на болеста, се користи мултидисциплинарен нехируршки пристап, се зголемува фреквенцијата на пост-оперативната адјувантна терапија со цел на подобра контролата над болеста, опстанок и одржување на прифатлив квалитет на живот за пациентите Bernier¹¹ и сор.(2004).

Kademani¹⁰¹ и сор.(2005), направиле анализа на повеќе студии и утврдиле дека, времето на преживување е подолго кај пациентите со добро диференцирани тумори. Ос и Pillai¹⁷⁸ и сор.(2009), нашле слаба корелација помеѓу стапката на преживување и стеиџингот и ги утврдиле факторите на ризик, за лоша прогноза: степенот на диференцијација, напредниот стеиџинг на туморите, вратниот статус и метастазирањето. Но, и покрај досегашните утврдени прогностички параметри стапката на смртност останала висока. Choi, Myers³⁷⁷ и сор.(2008) и Bettendorf¹² и сор.(2004) укажале на фактот дека конвенционалниот пристап со инвазивните хируршки методи, радио и хемотерапија, за жал сè сеуште е единствениот ефикасен начин во лекувањето на OSCC. Поради ограничените прогностички вредноста на овие фактори и униформност на стратемскиот третман, последните неколку децении вниманието е фокусирано на проучување на епигенетските промени

(идентификација на алтерираните гени) кои се користат како биомаркери, во раната дијагностика, биолошкото однесување и прогностички исход кај OSCC.

Студиите на Demokan, Dalay⁴⁹ и *cop.*(2011) и Bird¹⁴ и *cop.*(2007), ги опишале епигенетските аспекти на оралниот карцином и импликацијата на DNA метилација од нормално до пред-неопластично и неопластично ниво на ткивата, процес поврзан со репресијата на тумор супресорните гени (TSG) и геномска нестабилност. Досегашните откритија за фреквенцијата и специфичноста на метилациските промени се сèуште недоволно разјаснети. Ова претставувало предизвик, понатаму да се идентификуваат клучните гени кои се подложни на метилација и кои се директно поврзани со карциногенезата на OSCC. Метилациониот статус се разликувал според: клиничките карактеристики, животната средина, генетските фактори, анатомската локализација, (Demokan⁴⁹ и *cop.*(2011); Liu¹³⁸ и *cop.*(2010) и географска локација. И Shaw²²⁵ и *cop.*(2008), во многугодишните истражувања за присуството на метилација во одредени тумор- супресивни гени во OSCC, потврдил дека тие ја менуваат функцијата на генот преку менување на контролата на клеточниот циклус (cell-ciclus control). Тоа води кон зголемување на ризикот за појава на карцином, а лезиите може да имаат и повисок степен на малигнитет. DNA метилацијата довела до транскрипциони промени во тумор супресорните гени и онкогените, кои можат да послужат како идеални молекуларни маркери.

Во последните десет години Righini²⁰³ и *cop.* (2007) и Demokan и Dalay⁴⁹ и *cop.*(2011), широко ја истражувале новата категорија на не-генетски промени т.н. „епигенетски феномени“ во карциномите кои ги менуваат профилите на генската експресија на епигенетско ниво преку транскрипционото инактивација кое се должи на DNA метилацијата.

За промотор метилациониот статус на гените специфични за OSCC, се предложени голем број на гени²⁴⁰. Најчесто и опширно студирани метилирани гени кај оралниот карцином се, p16, MGMT, DAPK, RAR β 2, и E-cadherin^{53, 20, 279, 61, 153, 106}. Khor G.H¹⁰⁸ и *cop.*(2013) по спроведените обемни истражувања на p16, утврдиле дека, хиперметилацијата на CpG на овој ген, е рана појава во повеќе видови на карциноми, вклучувајќи го карциномот на белите дробови, простатата, дојка и OSCC. Инверзна корелација помеѓу хиперметилацијата на p16 генот и имунореактивноста, сугерирала дека a p16 генот е важен фактор во карциногенезата.

Многубројните студии на (Righini²³⁹ и *cop.*(2007); Hasegawa⁸² и *cop.*(2002); Steinmann²⁴⁰ и *cop.*(2009)) ги истражувале панелите на гени специфични за OSCC и забележале дека од 15 кандидатни гени, со својата значајност се истакнале: p16 (60%), MGMT (53%), DAPK (67%), RAR β 2 (75%), MLH1 (69%) и CDH1 гените (43%), чие ниво на хиперметилација била значително поголема кај туморите отколку во нормалните ткива. Метилацијата на p16, во однос на другите гени, била значително повисока кај лошо диференцираните OSCC ($p = 0.037$).

Проспективната анализа на Sinha²³² и *cop.*(2009), на 38 пациенти со ресециран карцином на јазик, го анализирале проценетот на DNA метилациониот статус во туморските клетки и здравото ткиво со помош на метилација-специфични полимераза верижна реакција. Следењето на пациентите било во времетраење од 17-37 месеци. Околу 86,8% од туморските клетки покажале промотор хиперметилација на p16 генот. Од 30 пациенти со хистолошки потврдено здраво ткиво, 43,3% покажале позитивност во

молекуларната процена, за овој ген. Пациентите со позитивни хируршки маргини имале 6,3-пати зголемен ризик за појава на локални рецидиви, во однос на пациентите со негативни маргини. Затоа заклучиле дека промотор хиперметилацијата на p16 генот, може да послужи како корисен молекуларен биомаркер за предвидување на локална појава на рецидиви кај карциномот на јазик.

Wong²⁶⁹ и сop.(2011) истражувајќи ја метилацијата на p16 промоторите, потврдиле дека 63% од неметастазираните тумори биле со метилирани p16, а 77,8% од метастазираните тумори со неметилирани p16- разлика која не била статистички значајна. Campo-Trapero²⁰ и сop.(2009), вредноста на хиперметилацијата на p16INK4a ја потврдиле кај 76% на OSCC, иако не потврдиле значајна корелација со клиничко-патолошките карактеристики или со прогнозата. Највисока вредност откриле Sinha²³² и сop.(2009) во 86,8% од туморските клетки и 43,3% во хистолошки здравите ткива и покажале голема позитивност во молекуларната процена за овој ген. Затоа заклучиле, дека промотор хиперметилацијата на p16 генот може да служи како корисен молекуларен биомаркер за предвидување на локалната појава на рецидиви кај карциномот на јазик.

Bhatia¹³ и сop.(2014), ја докажале метилација на промотор регионите на MGMT генот кај 76% во ткивните примероци кај OSCC, додека кај само 13% во биоптичните примероци од здраво ткиво. Значајна метилација на промотор регионот на p16 генот била најдена кај 82% кај OSCC и а само 13% во здравите ткива во контролната група. MGMT промотор метилацијата била значително повисока во ткивата на премалигните орални лезии и OSCC, во споредба со здравите, контролни. Метилацијата на MGMT генот кај OSCC, била значително повисока, во однос на премалигните орални лезии ($P = 0,0379$ за ткивото на премалигните орални лезии). Метилацијата за p16 била значајно зголемена во ткивните примероци на премалигните и малигните лезии, во споредба со здравите, контролни.

Koutsimpelas¹¹⁵ и сop.(2012), откриле дека MGMT промотор метилацијата била застапена кај 13 од 23 (57%) анализирани примероци од примарниот OSCC. MGMT експресијата варираше од 478-3485 A.U. (значи $1,599 \pm 976$ A.U.). MGMT експресијата, била статистички значајно ($p < 0.01$) намалена во туморските примероци со хиперметилирани MGMT промотор региони.

Yong-Kie²⁷⁹ и сop.(2011) и Wong YK²⁶⁹ и сop.(2011) ја регистрирале фреквенциите на промотор хиперметилацијата на DAPK и MGMT во ткивата на OSCC од 45,3% и 31,3%. Метилацијата не била најдена во здравата орална слузница. Кај Rosas²⁰⁸ и сop.(2001), овие проценти биле пониски т.е инцидентата на DAPK-33%, а MGMT-23% во туморите. Од страна на голем број на автори, идентификувани се различни инциденти за DAPK метилациите во туморските ткива од 67%, во нормално ткиво 33%, а во литературата стапките на метилација за овој ген била регистрирана со фреквенција од 18%-45,3% кај примарните OSCC¹⁶². Забележана е и позитивна корелација помеѓу метилацијата на DAPK и присуството на метастази во лимфните јазли на пациентите со орален карцином²⁶⁹, поради што DAPK1 се користи како потенцијален тумор маркер во молекуларните истражувања. Schmidt²²² и сop.(2008), воспоставиле ген класификатор кои се состоел од 41 генски локуси од 34 гени, меѓу кои биле и нашите кандидатни гени, за кои покажале дека метилацијата во предоперативното ткиво, била со сензитивност од 83% и специфичноста од 98% за OSCC, во дијагностиката на оралниот

карцином. Li¹³¹ и *сop.*(2013), имале за цел да ја потврдат улогата на хиперметилацијата на DAPK ген промотор регионите во оралниот сквамозен карцином (OSCC), корелирани со истата во примероците од здравото ткиво. Резултатите покажале дека, хиперметилација на DAPK во OSCC ткивата била потврдена во 71,69% (38/53), значително зголемена во OSCC ткивата во споредба со нормалната орална слузница ($p < 0.01$). И во наодите на Steinmann²⁴⁰ и *сop.*(2013), оваа разлика била значајна ($p < 0.05$)

Со цел да се утврдат несоодветните метилации поврзани со намалена експресија на гените, Kazuhiro¹⁰⁵ и *сop.*(2009), ја испитувале DAP- киназата во 13 OSCC клеточни линии. Седум линии покажувале зголемена густина на метилација на DAP- киназата на CpG островите. Лекувањето на клетки со 5-Aza-DC на метилтрансфераза инхибиторот, ја вратиле генската експресија, што укажало на фактот дека несоодветната метилација на DAP- киназата одиграла клучна улога во намалување на експресијата на генот.

Kazuhiro¹⁰⁵ и *сop.*(2009) во својата студија, избрале уникатен панел на гени кои покажале хиперметилација во промотор регионите, познати како предиспонирачки фактори за оралниот карцином. Тие се обиделе да ги мапираат нивните промотор региони со натриум бисулфит DNA модификација и метилација специфични PCR, при што лесно може да се идентификуваат моделите на метилација на гените. Биоптичниот материјал бил земен од орална лигавица од различни локализации. Биле докажани следните протеини што одговараат на гените кои ги избрале за проучување: ретиноидниот киселина рецептор бета (RAR β 2)- протеини кои се знае дека се одговорни за диференцијација; E-cadherin-от (CDH1 протеин одговорен за клеточната адхесија; за туморската клеточна инвазија и метастазирање и O6-methylguanine-ДНК метилтрансфераза (O6 MGMT) одговорна за ДНК поправка на протеините.

Bhatia¹³ и *сop.*(2014), покажале дека хистолошки нормалното ткиво во непосредна близина на тумори, има високо ниво на метилација на некои гени, што укажува дека метилацијата е рана манифестација кај оралната карциногенеза и се појавува пред почетокот на малигната трансформација, во нормалната слузница на пациентите со орален карцином.

Shaw²²⁷ и *сop.*(2006), утврдиле значителна CpG метилација на промотор гените во туморските примероци во 28% за p16, 73% за RAR, 42% за E-cadherin. Промотор метилациите била значително покачени во туморозното ткиво во споредба со здравото ткиво за p16 ($p = 0,048$), но не и во RAR β 2 ($P = 0.088$) или E-cadherin ($p = 0,347$). Сигнификантни разлики во степенот на метилација биле забележани за сите гени, освен за RAR β 2 и овие разлики биле дадени во карактеристичен образец. Истото истражување но со различни наоди за гените било забележано и од страна на Kulkarni¹²⁰ и *сop.*(2004), каде инциденцата на хиперметилацијата на p16 генот била 66,7% во туморите и 50% за ткивото во непосредна близина на туморите

Во истражувањето на Nagata¹⁷⁰ и *сop.*(2012), осум од 13 гени покажале значително повисоки нивоа на DNA метилација во примероци од пациенти со OSCC отколку во контролните. Гените E-cadherin (ECAD), ретиноична киселина рецептор бета (RAR β), и O-6 methylguanine ДНК метилтрансферазата (Mgmt) покажале висока чувствителност ($> 75\%$) и специфичност за откривање на оралниот карцином. OSCC е откриен со 100% сензитивност и 87,5% специфичност, кога се користи комбинација на ECAD, TMEFF2, RAR β , и MGMT. Исто Nagata¹⁷⁰ и *сop.*(2012) ја потврдиле несоодветната промотор

хиперметилација на CDH1 и MGMT гените, била откриени кај 61,8% (47 од 76) и 73,7% (56 од 76) на OSCC, односно, со значајна разлика меѓу болните и здравите контролни хистолошки докажани ткивни примероци, за MGMT ($p = 0,027$). Разликата во CDH1 промотор метилација кај случаите со OSCC и здравата контролна група, не била значајна. Сумирајќи ги резултатите од своето истражување, Bhatia¹³ и сop.(2013) заклучиле дека, овие два гена се хиперметираните кај OSCC, а MGMT метилација може да се смета како потенцијален молекуларен маркер за лоша прогноза, во напредната фаза на OSCC.

Групата на испитаниците на Nagata¹⁷⁰ и сop.(2012), се состоела од примероци добиени од 34 пациенти со OSCC и од 24 здрави лица (контролни). Метилацијата на 13 гени била утврдува со користење на метилација специфични полимераза верижна реакција. Осум од 13^{те} гени имале значително повисоко ниво на DNA- метилација во примероците од пациенти со OSCC отколку во контролните. Гените E-cadherin (ECAD), трансмембрански протеин, ретиноидниот киселински рецептор бета (RAR β), и O-6 methylguanine DNA метилтрансфераза (MGMT) имале висока чувствителност (>75%) и специфичност за откривање на оралниот карцином. OSCC бил откриен со 100% сензитивност и 87,5% специфичност, со користење на комбинација на ECAD, RAR β и MGMT и со 97,1% сензитивност и 91,7% специфичност користење на комбинација на ECAD и MGMT.

Хиперметилацијата на CDH1 била исто така интензивно истражувана и од страна на Viswanathan²⁶⁰ и сop.(2003), каде фреквенција се движела од 7% - 66%. Во еден неодамнешен преглед, Vered²⁵⁹ и сop.(2012), ги анализирале последните литературни статии и ја истакнале сигнификантната вредност на E-cadherin во OSCC и неговата поврзаност со клинички исход. Овој ген бил проучуван и од страна на Feinberg⁵⁹ и сop.(2001) и е потврден како потенцијален биомаркер, присутен во карциномите на белите дробови, абдоменот, езофарингеалниот карцином и во OSCC, каде 46% бил метилиран.

Youssef²⁸⁰ и сop.(2004), во својата студија го испитувале нивото на RAR- β 2 и регистрирале значително поголемо ниво на хиперметилација во туморските ткива во споредба со соседните нормални ткива ($p = 0,002$). RAR β 2 метилацијата, се појавувала во раниот стадиум на карциногенезата на главата и вратот. Зголемени метилации на p16 и RAR β 2 гените, биле објавени и во студијата на Okami¹⁸¹ и сop.(2005) и Santoro²¹⁵ и сop.(2012). Тие анализирајќи ја значително повисоката вредност на RAR-beta-2 метилацијата во туморските примероци, во споредба со нормалните ткива забележале статистички значајни вредности ($p < 0,0001$), во корист на туморските ткива. Во студијата на Wong²⁶⁹ и сop.(2011) оваа сигнификантна разлика била ($p < 0,0003$). Исто и Maruya⁵³ и сop.(2004), регистрирале 47% (15 од 32) за метилираните RAR β 2 во туморските примероци, а во нормалните ткива 50%. Претходно објавените студии, исто така, прикажале дека метилацијата на RAR β 2 гените во премалигни лезии манифестирале намалено изразување, што укажало на поддршка на критичното вклучување на метилацијата на RAR β гените во раната фаза на туморигенезата.

Steinmann²⁴⁰ и сop.(2009), во корелација на RAR β гените, меѓусебно и со патохистолошките и клинички параметри, утврдиле дека метилацијата на RAR β гените, била почеста кај пациенти во напредната фаза и рецидивантните OSCC, за разлика од пациентите без рецидиви.

Lee ES.¹²⁶ и сop.(2008), го утврдиле честиот метилационен статус на RAR β 2 и покажале дека овие гени се значително асоцирани со агресивните туморски фенотипови и времето на преживување.

Со цел на понатамошна евалуација на DNA, многу автори ја истражувале предиктивната вредност на DNA- хиперметилацијата и нејзината улога во прогресијата на OSCC. За утврдуње на корелацијата помеѓу метилацијата на зададените гени во OSCC и прогностичките показатели- клинички и патохистолошки, сите користеле унивалентна и многовариантната логистичка регресија.

Целта на истражувањето на Steele и Meyers²³⁹ и сop.(2011), била да се утврди корелацијата на рекурентноста на туморите поврзана со хиперметилацијата, откриена во хистопатолошките негативни хируршки marginи со цел на востановување на клинички и прогностички маркери. Гените избрани за анализа на метилацијата во оваа студија, опфаќале широк спектар на клеточни процеси, вклучувајќи ги: контрола на клеточниот циклус (p16), апоптоза (DAPK), клеточната адхезија (E-CAD), и DNA поправка (MGMT и hMLH1). DNA метилација била потврдена со мултиплекс вгнездени метилација специфични PCR. 75% од пациентите, биле со позитивни marginи за промотор hypermethylation. Присуство на DAPK промотор хиперметилацијата, била откриена во хируршките marginи и била поврзана со намалено преживување (P = 0.004) и е независен прогностички фактор за вкупното преживување, (95% CI, P = 0.007). Хиперметилацијата на другите туморски гени, се покажале дека има помала сигнификантност и помало прогностичко значење. Овие резултати покажале дека DNA-хиперметилацијата во хистолошки негативни хируршки marginи, може да се користи, како потенцијален биомаркер во раната дијагноза на оралниот карцином. Истражувањата на p16, одат во насока на утврдување на неговата улога како потенцијален прогностички биомаркер и како најсилен показател за текот на болеста. Метилираните p16, се покажало дека можат да бидат моќни биомаркери, поврзани со поповолна прогноза што се мери со карцином-специфичен опстанок (CSS), опстанок без рецидиви (RFS) и локорегионална контрола (ERC).

Sailasree²¹³ и сop.(2008) ја споредувале инактивацијата на p16, при одредување на метилациониот статус и покажале директна корелација на ниски p16 протеински експресији со клиничко-патохистолошките параметри: T-статусот покажал значителна поврзаност со p16 метилацијата (p= 0,0490). Во овој преглед, тие го ажурирале истражувањето на оваа тема кај оралниот карцином и во преканцерозните лезии. Темелно разбирање на овие епигенетски промени, не само што ќе помогне во дијагнозата и прогнозата на орален рак, туку би понудило и нови терапевтски пристапи.

Кај испитаниците на Grønbaek⁷⁹ и сop.(2007), p16 генот бил асоциран со прогресијата на болеста, а неговото ниво било регистрирано дека е 70% во туморските ткива. Неговата фреквенција била почеста кај умерено и лошо диференцираните тумори (G2 и G3), во споредба со добро диференцирани (G1), како и во повеќе инвазивните (T3 и T4) во споредба со помалку инвазивните (T1 и T2). Бројни студии покажале дека фреквенцијата на мутации во овој ген кај карциномите на главата и вратот е 60% во Европа и Америка, што е многу помал процент во споредба со азиското население, што најверојатно се должи на различниот начин на живеење и навики. Ogi¹⁸⁰ и сop.(2002), ја потврдиле промотор метилација на p16 генот кај 96 случаи со

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

OSCC и нашле дека овој ген е во корелација со коскената инвазија и длабоката инвазија на јазикот. Пациентите со примарен орален карцином имале значително лоша прогноза и намалена стапка на преживување. Овие наоди биле потврдени и во студијата на Kaur¹⁰⁴ и *cop.*(2010) и додада дека хиперметилацијата на p16 е поврзана со регионалното метастазирање во лимфните јазли, а не е поврзана со диференцијацијата и големината на туморот.

Во студијата на de Schutter⁴⁸ и *cop.*(2009), биле анализирани MGMT гените, кои покажале многу повисока метилациона стапка, во однос на сите други истражувани гени. Хиперметилацијата на овие гени, била значително поврзана со подобра локорегионална контрола и вкупно преживување т.е. излекување. Хиперметилацијата на P16, MGMT и RAR β била потврдена од Puri¹⁹² и *cop.*(2005) и Maruya¹⁵³ и *cop.*(2004). Хиперметилацијата на овие гени, била поврзана со напредните фази на туморот и недиференцираните карциноми, што првенствено било потврдено и од страна на Foschini⁶³ и *cop.*(2008). Неговите резултатите од линеарно логистички модели, покажале, значајна корелација помеѓу присуството на метастази во лимфните јазли во споредба со T класификацијата со (chi квадрат тестот, 3.9, $p < 0.05$) и со E-cadherin (chi квадрат тест, 7.9, $p < 0.01$). Метастазирањето, било поврзано со метилираните E-cadherin во 76% од случаите, во споредба со неметилираните во 45%, со значајна статистичка разликата ($p < 0.01$). Големата предиктивна вредност на метилираните E-cadherin (88%) во раните стадиуми T1-2 на OSCC, и во T3-4 OSCC (91%), значело дека, кога позитивна асоцијација се наоѓа во еден примерок, веројатноста пациентот да развие метастази е поголема. Ова значи дека кај T1 или T2 во согласност со класификацијата TNM OSCC, без метастази во лимфните јазли, презентацијата на 20 позитивни асоцијација може да обезбеди покачена веројатноста за развој на метастази во лимфните јазли, а негативните асоцијации покачена веројатноста за преостанатите слободни метастази во лимфните јазли.

Повеќе од половина од набљудуваните OSCC 59,7% ($n = 43$) во студијата на Kovtunen¹¹⁶ и *cop.*(2014), се карактеризирале со Ecadherin хиперметилација. Овие вредности биле потврдени и од другите истражувачи (Supic²⁴⁴ и *cop.*(2009) и Kato¹⁰³ и *cop.*(2006)). Во резултатите на Huber⁸⁹ и *cop.*(2011) E-cadherin, во OSCC локализирани на јазикот имале силна корелација со метастазите во регионалните лимфни јазли ($p < 0.003$), но Kovtunen¹¹⁶ и *cop.*(2014), не добил таква зависност. Единствено нашол зависност меѓу туморите со метастази, кои покажале 3,5 пати поголема метилација во однос на неметастазираните. Овие наоди се потврдени од страна на други истражувачи Zhou²⁸⁸ и *cop.*(2014) и Foschini⁶³ и *cop.*(2008).

Во својата студија Fischer⁶¹ и *cop.*(2010), го евалуирале прогностичкото влијание на p16 експресијата кај 102 пациенти со OSCC и го корелирале неговото значење со утврдените прогностички маркери и клиничките стадиум I-IV. Важноста на p16 статусот кај OSCC се покажала правопрпорционална со стеинцингот. Сумирајќи ги резултатите од сите четири TNM стадиуми, тие докажале дека p16-позитивно метилираните OSCC, имале подобра прогноза и 5-годишно преживување (5-YSR) кај 59,3% (95% CI 41% до 73%), отколку p16-негативните тумори кај 24,5% (95% CI 14% до 36%) ($P = 0,0008$). Овој ефект бил уште поназначен, во касните стадиуми (III и IV) на OSCC: p16-позитивните тумори, покажале 5-YSR кај 54,1% (95% CI 34% до 71%), во споредба со 18% (95% CI 9% до 30%) за p16-негативните OSCC ($P = 0,0002$). p16-позитивната

подгрупа на пациенти, во напредната фаза III и IV, покажале слично добра вкупното преживување како и кај I и II стадиум, со 5-YSR од 59,4% (95% CI 34% до 78%) ($P = 0,55$). Пациентите p16-позитивни, во IV стадиум имале стапка на 5-годишно преживување кај 59,2% (95% CI 36% до 77%), во споредба со 18,9% (95% CI 8% до 33%) кај p16-негативните пациенти во IV стадиум OPSCC ($P = 0,0003$). Пациенти p16-позитивни во IV стадиум на OSCC, живеат значително подолго од оние во III стадиум на OSCC, 5-YSR 32,5% (95% CI 13% до 55%) ($P = 0,048$). Влијанието на клиничките параметри и експресијата на p16 во напредната фаза (III и IV), било анализирано и во споредба со класификационната анализа на туморите, покажувајќи дека p16 има најмоќен прогностички ефект, кој е независен од конвенционалниот стејџинг TNM параметрите и диференцијацијата на туморите.

Прекумерната експресија на DAP-киназата, било докажано дека индуцира апоптоза кај клетките¹⁹¹. Од друга страна, истражувањето на Meneses IS¹⁵⁷ и сор.(2010), покажало дека протеинската експресија на DAP-киназата е често намалена или отсутна во туморските клетки (Raveh & Kimchi, 2001; Bai и сор. 2004), како одговор на хиперметилацијата, што пак било асоцирано со висока инвазивност и зголемен метастатски потенцијал на малигните клетки.

Во обид да се докаже сигнификантноста на E-cadherin-от, Feinberg AP⁵⁹ и сор.(2001) присутни во OSCC се застапени со 46% и се во корелација со лоша прогноза и метастазирање, а не со рана дијагноза на туморот. E-cadherin се мобилни адхезивни молекули кои ја одржуваат стабилна структурата на ткивото, а намалената негова експресија е во корелација со појава на регионални метастази кај OSCC.

Направени се напори да се откријат гени за кои промотор метилација ќе биде специфична и присутна во висок процент во малигните ткива, а нема да се пронајде во нормалната орална слузница. Ова ја наметнало потребата од добро контролирани студии и идеални квантитативни и квалитативни методи за анализа на метилацијата. Објавените студии на оваа тема од Díez-Pérez R.⁵³ и сор.(2011) ги избрале особено, метилациите на промотерите на P16, MGMT, DAP-киназа и ги корелирале со клиничкото однесување. Тие ја потврдиле улогата на E-cadherin-от во клеточната адхезија и метастазирањето и улогата на RAR β во предвидувањето на одговорот од хемо-превентивните агенции.

Wong YK.²⁶⁹ и сор.(2011) нотирале дека метилационата стапка на MGMT (50%) и DAPK (55,6%) кај метастазираните OSCC била повисока, од оние за MGMT (23,9%) и DAPK (41,3%) кај неметастазираните карциноми.

Нивната студија покажала дека неметастазираните примарни тумори имале пониски проценти на MGMT и DAPK метилации од метастазираните примарни тумори. Хиперметираните p16 промотори, биле потврдени кај 63% од неметастатските тумори и кај 77,8% од метастатските тумори- разлика која не била статистички значајна.

Gao S.⁶⁷ и сор.(2005), во својата студија не утврдиле сигнификантна корелација на хистопатолошкиот степен на класификација на карциномите и промените на метилација на E-cadherin генот ($P = 0,257$).

Други студии како на пример, студијата на Supic²⁴⁴ и сор.(2011), дала спротивни резултати за E-cadherin-от кој се појавува метилиран во 42,9% (33 од 77) и регистрирале поврзаност со посиромашните севкупното преживување.

Mascolo M.¹⁵⁴ и сop.(2012), ја утврдиле хиперметилацијата на p16, MGMT, DAPK и RARB кај дисплазиите и во хистолошки здравите маргини на ресецираните OSCC, докажувајќи дека, метилација може да се смета како ран ветувачки маркер на малигната прогресија. Сепак, други студии не успеале да ја корелираат хиперметилацијата со прогресијата на OSCC или со појавата на локалните рецидиви на OSCC. Затоа, овој аспект заслужува понатамошна истрага на поголема серија на случаи. E-cadherin/от во неговата студија бил значително асоциран со промени во клучни клеточните функции и појава на метастази, што е во корелација со зголемената агресивност на OSCC.

Huber⁸⁹ и сop.(2011) во ретроспективната студија, анализирале ткивни примероци, од 12 примарни тумори за ECAD експресијата. pT – стеинингот со (p = 0.252), локализацијата на OSCC (p = 0.926), полот (p = 1.000), не корелирале со метастазите во регионалните лимфни јазли и ECAD. Диференцијацијата на клетките, патохистолошкиот стадиум, покажал сигнификантна вредност со (p = 0.018) за E-cadherin. Хиперметилацијата на ECAD, со униваријантната и поливаријантната анализа, силно корелирала со негативниот N статус на метастатски лимфни јазли (P = 0.005).

Во една неодамнешна студија, Di Domenico⁵² и сop.(2011), го истражувале E-cadherin-от во серија од 94 OSCC. Неопластичните ткива покажале значително повисока експресија на овој протеин, од нормалните ткива. Покрај тоа тумори со висока вредност на E-cadherin, биле карактеристични за туморите со поагресивно однесување. Овие податоци сугерирале дека E-cadherin-от може да има потенцијална улога во предвидувањето на биолошкото однесување на OSCC.

MicroRNAs (miRNAs) се мали, на број 21-22 некодирани протеини- RNAs, кои ја регулираат генската експресија на посттранскрипциско ниво. Некои miRNAs се карактеризирани како тумор- супресори (Kozaki K.¹¹⁷ и сop.2008), а други како онкогени onco-miRs (Iorio M.⁹³ и сop.2005). MicroRNA молекулите се строго ткивно специфични и секогаш различни кај нормалните и карциноматоцните клетки. MicroRNA молекуларната експресија кај OSCC била истражувана во голем број на студии Kozaki K.¹¹⁷ и сop.(2008); Chang K.²⁷ и сop.(2008); Wong²⁶⁶ и сop.(2012).

Истражувањата на Xiqiang L.²⁷² и сop.(2009); Tran N.²⁵⁶ и сop.(2010) и Kozomara A.¹¹⁸ и сop.(2011), според акумулираните докази, покажале дека miRNAs играат важна улога кај многу видови на карциноми, вклучувајќи го и HNOC/ OSCC. Тие биле клучни регулатори на различни клеточни процеси, вклучувајќи ја диференцијацијата, апоптозата, опстанокот, мобилноста и морфогенезата. Најновите достигнувања во microRNA експресиите, довеле до подобро разбирање на патогенезата на HNOC/ OSCC и до идентификација на конкретни microRNA експресии кои може да послужат како моќни биомаркери во дијагнозата и прогноза на HNOC. Покрај тоа, овие miRNAs исто така може да послужат и во терапевтски цели, во нови стратегии на превенција и лекување на оралниот карцином.

McCullough M.J.¹⁵⁵ и сop.(2012), правејќи споредба на 139 варијации на профилирање, покажале дека miRNAs се зголемено експресирани кај лошо диференцираните тумори, што во поново време ги менува сознанијата за етиологијата на оралниот карцином, Hui A.B.⁹¹ и сop.(2009). Редукцијата на miRNAs, која ги поттикнува туморите се смета дека резултира со зголемување на онкогените протеини, а со тоа се забрзува онкогената трансформација. Од

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

друга страна, зголемувањето на miRNAs во текот на онкогенезата, можеби е поврзано со деактивирање на тумор- супресорните гени, со што се забрзува онкогената трансформација, како што навеле и Gomes C.⁷⁴ и sor.(2008).

Абнормална miRNAs експресија, била потврдена и во премалигните и малигните клетки. Оттука, се наметнала потребата за истражување на дерегулацијата на miRNAs експресијата во потенцијално малигните орални мукозни лезии, како можен сигурен маркер во раната фаза на малигнитетите, како потенцијална цел за превенција на карциномите. Иако не постојат посебни обрасци за miRNAs експресиите, до денес, некои основни miRNAs се потврдени од голем број на автори, дека играат клучна улога во туморигенезата. Во повеќето студии, направени на големи серии на пациенти, само неколку miRNAs биле избрани за понатамошна евалуација од страна на Childs G.³⁶. Повеќето, трудови ги вклучуваат: со зголемена експресија (upregulation): mir-21, let-7, mir-155, mir-31, mir-211 или со намалена експресија (downregulation) :, mir-137, mir-133b, и mir-193a, mir 125 .

Во досега објавените трудови, нема конзистентност за експресијата и текот на откривањето на нови miRNAs, што ја наметнало потребата од трагање по нови прогностички биомаркери, релевантни за дијагностички цели. Голем број на miRNAs биле прикажани дека се зголемени или намалени експресирани кај OSCC. Tran N.²⁵⁶ и sor.(2010), потврдиле дека, mir -21, и mir-155 се со постојано зголемена експресија (надрегулирани).

Kolokythas¹¹¹ и sor. (2011), направиле анализа на целокупната, постоечка литература од 2000-2011, во однос на потенцијалната улога на miRNAs кај оралниот карцином. Идентификацијата на потенцијално „канцерогените“ miRNAs ги базирала на нивниата различна експресија кај карциномите, во споредба со контролните примероци, од здраво ткиво кај OSCC. Истото го направиле и Jiang J.⁹⁹ и sor.(2005); Lajer CB.¹²² и sor.(2011); Hui AB.⁹⁰ и sor.(2010) и Chang KW.²⁸ и sor.(2013), во своите студии истражувале значителен број туморски примероци од OSCC, за 322 различно регулираните miRNAs во ткивото на OSCC, компарирајќи ги со контролните здрави ткива. Сите горе наведени, пронашле зголемена експресија на 20 mirRNA, меѓу кои и: mir-21, let-7, mir-155, mir-31, mir-211 и 16 mirRNA со намалена експресија: mir-137, mir-133b, и mir-193a, mir 125 и други.

Tran²⁵⁵, идентификувал 33 микроРНА со зголемена експресија и 22 со намалена експресија. Оваа студија била прва што обезбедила толку големо геномско истражување на зрели microRNA во карциномот на оралната празнина. Во наодите, меѓу другите, ги потврдил веќе поранешните идентификувани: mir-155, mir-21, mir-let7 и mir-125b.

Една од најистражуваните microRNA во процесот на оралниот карцином е **microRNA-21 (mir-21)**. Таа е добро востановен онкоген, одговорен за промовирање на клеточната пролиферација и апоптоза.

Профилирањето на карциномот на јазикот било направено во две студии на Wong^{267,268} и sor.(2008,2012), каде регистрирал, mirRNA-21 зголемени експресији, во карциномите, во однос на здравите ткива, а mirRNA 125, и microRNA-133, имале намалена експресија. Тие ја потврдиле и тумор-супресорната функција на mir-21, која го спречува размножувањето на клетките, миграцијата и инвазијата и предизвикува апоптоза кај OSCC.

Danielsson⁴⁶ и sor. (2012) и Shiiba M.²³⁰ и sor.(2010), ја резимирале miRNAs зголемената експресијата на mir-21 и mir -31. mir-21, исто така, била

зголемено експресирана и кај други хематолошки заболувања: кај акутната миелоидна леукемија (AML); хроничната лимфоцитна леукемија (CLL), туморите на дојка, дебело црево, панкреас, бели дробови, простатата, црниот дроб, желудникот и глиобластомот. Овие факти силно сугерираат дека miR-21 може да биде една од најважните miRNAs кај различни видови на карциноми, вклучувајќи го и HNSCC / OSCC. Засега, MicroRNA -21 молекулата, се покажала како добар прогностички маркер (Childs G.³⁵ и сор.(2009)).

Avissar M.⁶ и сор.(2009), ја покажале зголемената експресија на miR-21 и нејзината висока чувствителност и специфичност во предвидување на HNSCC/OSCC. Испитувањата за сензитивноста и специфичноста на експресијата miR-21 во предвидување на текот на болеста, се покажала со сензитивност од 0,99; специфичност од 0,14. Kimura S.¹⁰⁹ и сор.(2010) ја прикажал просечната експресија на miR-21 во ткивните примероци во OSCC, која била 12,70 и 2,77 (SE = 2,91 и 0,59), во споредба со нормалното, здраво ткиво со 1,51 и 1,51 (SE = 0,30 и 0,35); (p = 0,00005 и 0,0377), со што се потврдија значајна статистичка разлика на експресијата на miR-21, со нејзина значително зголемена вредност.

Kolokythas^{110,111,112} и сор.(2010,2011) и Liu X.¹³⁹ и сор.(2009), потврдиле дека microRNA-21 трансфектираните клетки, се со зголемена експресија кај OSCC, во однос на нормалните контролни ткивни примероци и се инволвирани во клеточната инвазија и метастазирањето. Инхибиција на microRNA-21 во клетките на оралниот карцином е независен прогностички фактор за лоша прогноза, намалена стапка на преживување, кај карциномот на јазик. Истото го потврдил и Mydlarz W.¹⁶⁷ и сор.(2014), анализирајќи ја miR-21 со обратна транскрипција квантитативна полимераза верижна реакција (qRT-PCR), кај посебна група од 16 OSCC и 15 нормални мукозни примероци. Microarray и биоинформатичка анализа биле интегрирани, со цел да се идентификуваат потенцијалните целни гени. Податоците на Cervigne N.K.²³ и сор.(2009), користјќи ја Bonferroni корекцијата, прикажале статистички значајна разлика (P < 0,00017) при компарација на експресијата на miR-21.

Според Reis PP.¹⁹⁹ и сор.(2010), зголемената експресија на miR-21 била силно поврзана со прогресијата во пре-малигните лезии и во инвазивниот орален карцином. Истото било потврдено и од страна на Gombos K.⁷² и сор.(2013). Глобалната мета-анализа на Fu X.⁶⁵ и сор.(2011), која вклучувала вкупно 17 студии на различни видови на карциноми, ја издвоила прогностичката вредност на miR-21 експресијата кај оралниот карцином. Наодите сугерирале зголемена експресија на miR-21 во корелација со лоша прогноза (HR 1,46, 95% CI: 1,13-1,87 p = 0,004) и појавата на локални метастази со (HR 1,48, 95% CI: 1,03-1,87, p = 0,004) и заклучиле дека miR-21, има силна прогностичка вредност.

Зголемено експресираните miR-21 го зголемуваат растот на туморите, метастазите и инвазијата и ја намалуваат чувствителноста на хемотерапија, било објавено во студијата на Zhou X.²⁸⁸ и сор.(2014). Пациентите со попокачени нивоа на miR-21 отсекогаш имале полош прогностички исход. Била изведена и мета-анализа за да се испита корелацијата помеѓу miR-21 и опстанок со пресметување на збирни хазард пропорции (HR), при што биле калкулирани следните параметри: локализација, TNM стеининг, методата, вкупниот број на пациенти, време на преживување, повторување на болест (релапс) и резултатите биле со 95% интервал на доверба и P вредност.

Резултатите потврдиле дека зголемената експресија на miR-21 е сигнификантен индикатор за лоша прогноза (HR = 1.87, 95% CI: 1,61-2,16; P < 0.001).

Hedbäck N.J.⁸⁵ и сop.(2014), со помош на Cox regression survival curves (Кокс регресија криви на опстанок), го анализирале односот помеѓу стапката на преживување и miR-21 експресијата, кај 86 пациенти. Кривата на преживување покажала дека пациентите во највисоките пикови на miR-21 експресијата имале значително пократко преживување, во споредба со група на пациенти со најниската експресија на miR-21 (P = 0,032). Во истата студија, било корелирано и времето на преживување со клиничките и хистолошките карактеристики. Само нодалниот статус, далечни метастази, екстра-капсуларната инвазија, перинеуралната инвазија и високиот стеиџинг на болеста, биле поврзани со намалена стапка на преживување.

Childs G.³⁵ и сop.(2009), измериле дека нивото на miR-21 експресијата била повисока кај туморите, во споредба со нормалното ткиво, со ~1.5 пати во просек ($\Delta\Delta Ct = -0.58$, P = 0.002), а Chang S.³⁰ и сop.(2008), нашле слични вредности, т.е. просечната експресија на miR-21 во туморите била 71,6 (CE = 48.9), во споредба со нормалната контролна група која била 0,44 (CE = 0,057) (p = 0,0003).

Hedbäck N.⁸⁵, вршејќи многовариантна анализа на 68 пациенти, забележал значајна корелација помеѓу експресијата на miR-21 кај половите, со повисоки вредности кај машкиот пол. Исто така била забележана и гранична значајна корелација со степенот на диференцијација, G-стадиумот (p = 0.078). Други значајни корелации помеѓу експресијата на miR-21 и клиничките или патолошки карактеристики, не биле најдени. Високата експресија на miR-21, била поврзана со зголемена смртност. Кривата на преживување покажала дека пациентите со највисоки miR-21 експресији имале значително пократко преживување, во споредба со група на пациенти со најниската експресија на miR-21 (P = 0,032). N-фазата и miR-21 останале независни прогностички фактори, а перинеурална инвазија била со гранична значајност од (p = 0.078).

Michael T и Scott M¹⁶⁰ и сop.(2009), истражувале нови детали за microRNA биогенезата, основните функции, како и нивната улога во физиологијата на болестите. Последните технолошки достигнувања во microRNA профилирањето на туморските клетки, се сметаат за главни предизвици кои остануваат во дефинирањето на microRNA биомаркери за предвидување, дијагностика, третман и прогноза на OSCC. let -7, имал етаблирана улога во развојот на карциномите, а губењето на let -7 довело до прекумерна RAS активност, што го прави делумно одговорен за недостатокот на соодветна диференцијација. Присуството на зголемена експресија на let -7 кај премалигните и канцерозните лезии на оралната мукоза, било асоцирано со лоша прогноза и намален постоперативен опстанок. Zhang B.²⁸³ и сop.(2007), ја потврдиле зголемената експресија на let -7 и нивната функција како тумор супресорни гени, кои ја инхибираат карциногенезата, преку регулирање на онкогени и / или гените кои ја контролираат клеточната диференцијација или апоптозата let -7 негативно ги регулира изразувањето на RAS и MYC со насочување на нивните mRNAs за репресија на транслација. Исто така и истражувањето на Roush S.²¹⁰ и сop.(2008) ги посветиле истражувањата на дерегулацијата на let -7 семејството кај карциномите, нивната биолошка улога, регулирана во транскрипционото и пост-транскрипциски ниво. Chang C.J.²⁵ и сop.(2011), конечно покажале дека експресијата на let-7d, во регионалните метастатски лимфни јазли кај OSCC била значително намалена, што укажува на фактот

дека експресијата на *let-7* е во обратно корелирана со факторот на транскрипција, во текот на OSCC туморигенезата.

Childs G.³⁵ и сop.(2009), анализирале 104 пациенти од Бронкс (Њујорк), област со највисок ризик и инциденца на HNSCC/OSCC. Биле анализирани клиничките карактеристики на сите пациенти со примарни тумори OSCC и нормалните соседни ткива, а потоа РНК примероците од истите две групи биле користени за мерење на нивото на *let-7*. *let-7*, покажале 26% поголема дистрибуција на експресија кај туморите и пониски и повисоки експресији *let-7g* во туморските примероци, наспроти нормали, соодветно. Прогностичкото влијание на зголемената експресија на *let-7-7g* во туморските ткива, се покажала дека е независна од анатомската локација, големината на туморот (Т-стеининг) и третманот (хемотерапија-радиотерапија). Покажувајќи (повисока ДСТ) за *mir-let-7*, тие утврдиле значителна прогресијата на OSCC (локо-регионална повторување, далечни метастази) или смртен исход на пациентите HNSCC/ OSCC, што го прави *let-7* значаен индикатор за прогресија (HR = 4,61, Pvalue <0.0001), независно од анатомската локација и големина на туморот.

Chang CJ.²⁵ и сop.(2011), покажале дека експресијата на *let-7* во регионалните метастатски лимфни јазли кај OSCC биле значително намалени, за разлика од примарните тумори каде се зголемени. Овие податоци укажале на фактот дека, *let-7* експресијата била обратно пропорционална со времетраењето на туморигенезата на OSCC.

Peng SC¹⁸⁶ и сop.(2014), проучувајќи ја регулацијата на miRNAs, утврдиле дека само *let-7*, било поврзан со: локалната контрола (OR = 5.917 5,917, p = 0,032), со контрола на вратни метастази (OR = 250, p = 0,009), со појава на далечни метастази (OR = 31,25, p = 0.023) и специфичното време на преживување (OR = 6,329, p = 0.004). Зголемената експресија на *let-7*, била асоцирана со намален ризик од појава на рецидиви, во напредниот стадиум на болеста (46% vs.71%); зголемената експресија на *let-7*, се покажала како индикатор за подолго време на преживување во групата на пациентите во pT3-4 фазата (76% vs. 40%).

Хиперметилацијата на *let-7* го зголемила ризикот од повторување на болеста за 2,6 пати и, што е уште позначајно, ја зголемува смртноста за 12,9 пати. Зголемената експресија на *let-7* била поврзана со пониска инциденца на лоша прогноза кај пациенти во напредните патолошки фази (p = 0,039, Слика 3C). Имено, поголемата експресија на *let-7* е исто така поврзана со подобра специфични стапка на преживување кај пациентите со pT3-4 болест (p = 0.048, 3D слика). Во анализата на пациенти со pT3-4 болест, PN+, или патолошки напредни фази, нивото на *let-7*, било тесно поврзано со преживувањето без болест кај пациенти во напредните патолошки фази (p = 0.053) и специфичната стапка на преживување кај пациентите со pT3-4 болест (p = 0,071). Сублимирани, резултатите покажувале дека процесот на интеграција на традиционалните фактори на ризик и miRNAs потписите, може да ја подобрат прогностичката стратификантност на пациентите со OSCC.

Christensen BC.³⁸ и сop.(2009), утврдиле дека *let-7 microRNA* е поврзана со полоша прогноза кај оралниот карцином и обезбедиле потврда, дека разликите во времето на преживување се поврзани со разликите во фенотипот на туморот. Прво ја анализирале експресијата на *let-7* нивоата, користејќи ги и податоците наведени од Avissar M.⁶ и сop.(2009) ја регистрирале значително зголемената експресија. Истото го истражувале и Sterenczak KA²⁴¹ и сop.(2014),

кои во резултатите на својата студија, покажале дека, нивото на експресија на let-7 се движи од 2,1-5,76 во здравите контролни ткива, а во неопластични примероци од 1,14-3,42 let-7a. miRNAs биле посочени дека се со намалена експресија кај HNSCC/ OSCC и нивоата на изразувањето биле значително намалени во метастатските ткива, во споредба со примарни тумори. Високиот let-7a резултат, било потенцирано дека е поврзан со почетниот T-стадиум и ниската веројатност за метастазирање во регионалните лимфни јазли.

Во студијата на Yu CC.²⁸¹ и sor.(2011), let 7a / експресијата се движела од 1-2,76 во ткивата на неопластичните примероци =1,14-3,42. Let a-7a miRNAs имале значително намалени нивоа на експресија во метастатските ткива, во споредба со примарните тумори. Притоа, високите let-7a нивоата, назначиле дека се поврзани со почетокот на T-фазата, без присуство на метастази во почетокот на патолошки стадиум. microRNA молекула let-7a ја репресира хеморезистентноста и туморогенезата кај OSCC. Scapoli L²²⁰ и sor.(2010), надолната регулација на mir-155 и let-7, потврдиле дека ја карактеризира прогресијата на метастатските тумори.

Zhao X.²⁸⁷ и sor.(2013), во својата студија, ги утврдиле релативните вредности на **mir-155** во OSCC = $4,19 \pm 2,39$ и во контролната слезницата, со вредностите на mir-155 = $1,01 \pm 0,72$. Нивоата експресија на mir-155 во OSCC биле 4,1 пати повисоки од оние во ткивата од контролната слезница; разликата била статистички значајна ($T = 7,714$, $p < 0,001$). Потоа ги анализирале вредностите на mir-155 во корелација со следните параметри: возраста, клеточната диференцијација и T-стеинингот на туморите и не нашле статистички значајна разлика. Нивоата на mir-155 во напредните стадиуми T3-T4, биле повисоки ($4,86 \pm 2,44$), споредени со раните стадиуми T2 ($3,40 \pm 2,10$). Слабо диференцираните туморите и туморите со средна клеточната диференцијација, биле со повисока вредност ($5,01 \pm 2,96$), за разлика од добро диференцираните тумори ($3,61 \pm 1,70$) со статистички сигнификантна разлика ($P=0,021$). Сознанијата од оваа студија укажуваат на тоа дека, mir-155 игра важна улога во текот и развојот на OSCC и може да биде корисен маркер за прогноза и проценка на терапевтските ефекти.

Shi LJ.²²⁸ и sor.(2014), меѓу тринаесет предложените miRNA за OSCC, го анализирале и нивото на miRNA-155, утврдувајќи дека miRNA-155, во OSCC биле надрегулирана (> 2 -пати), споредбено со контролните примероци од здраво ткиво. miRNA-155, била потврдена со значително повисока експресија кај OSCC (t test; $p = 0,041$) и тоа била локализирана во туморското ткиво, воспалителните околни области и васкуларниот ендотел, што ја прави независен прогностички показател за OSCC прогресијата и предвидувањето на лоша прогноза кај пациенти со OSCC.

Kozaki K.¹¹⁷ и sor.(2008) и Courthod G.⁴³ и sor.(2014), ги сублимираle студиите за експресијата на веќе функционално потврдените mir-155, предложени како онкогени во OSCC. Во многу независни студии, како на пример на Barker EV¹⁰ и sor.(2009); Hui A.B⁹¹ и sor.(2009) и Lajer CB¹²² и sor.(2011), регистрирале зголемени експресии на mir-155 во HNSCC.

Истражувајќи ги разликите во изразувањето на Мирна во HNSCC ткивата во однос на нормалното ткиво, Ramdas L.¹⁹⁷ и sor.(2009), регистрирал дека mir-155, биле со повисока експресија во туморски примероци, споредбено со нормалното ткиво, одредени со RT-PCR податоците, а споредени со miRNA microarray и покажале позитивниот сооднос на вредности покажал =2.64. Исто и Gombos K.⁷² и sor.(2013), испитувале четириесет примероци од OSCC и 40

нормални ткива и го процениле нивото на експресија на *mir-155*. Резултатите покажале значителна експресија на *mir-155*, со *t*-тестот и чувствителност/специфичност од над 90%, во процена на оралниот карцином.

Ni YH.¹⁷⁴ и сор.(2014), пријавиле значително зголемување на експресијата на *mir-155* во OSCC клеточните линии и во ткивата на пациенти со OSCC. Анализите покажале добра прогностичка вредност на експресија на *mir-155* во корелација со хистолошкиот стеининг ($P = 0,033$), и зголемување на бројот на *mir-155*. Користејќи квантитативна полимераза верижна реакција, ја проценил експресијата на *mir-155* кај 46 пациенти со OSCC, корелирајќи ја со клиничките параметри. Во своите резултати објавил значително зголемување на експресијата на *mir-155* во ткивата на пациентите со OSCC. Анализата покажала објективно добра прогностичка значајност во корелација со хистолошките стеининг ($P = 0,033$), со што заклучиле дека *mir-155*, во корелација со хистолошкиот стеининг, би можело да се користи како потенцијален прогностички биомаркер.

Резултатите на Gombos K.⁷² и сор.(2013), во нивната студија покажале значително зголемена експресија *mir-155*, и со *t*-тест на чувствителност/утврдил дека специфичноста била над 90%, во случаите на *miR-155* со OSCC, со што ја нагласил улогата на *mir-155* во OSCC како можен причинител за оралната карциногенеза. Истото го прикажал и Chang S.²⁹ и сор.(2008), кои во својата студија покажале, 100% повисока експресија на *mir-155* во туморските ткива, во споредба со здравите, контролни ткива ткиво. Средната сигнал во нормалните ткива е измерен 0,034 ($SD = 0,037$), а во карциноматозните ткива 0,025 ($S=0,011$). Оваа корелација се покажала статистички значајна со разлики во експресијата *P*-вредност, ($P= 0,01$) со Mann-Whitney U-test.

Зголемената експресија на *mir-31* кај OSCC, била регистрирана во студијата на Shiiba M.²³⁰ и сор.(2010) и досега не била пријавена ниту една студија, што го покажала спротивното, што ја прави *mir-31*, востановен, потенцијален биомаркер. Неговата функцијата во туморигенезата на OSCC останала нејасна. Liu X.¹³⁹ и сор.(2009) и Kozaki K¹¹⁷ и сор.(2008), евалуирајќи ја улогата и експресијата на *mir-31*, забележале зголемување на бројот на *mir-31*, кај колоректалниот и хепатоцелуларниот карцином, а намалена експресија на *mir-31* била забележана кај карциномите на дојка и во уротелијален карциноми. *mir-31* дерегулирана и кај HNOC/OSCC, но неговата улога во туморигенезата не е целосно јасна.

Ouyang SB.¹⁸⁴ и сор.(2013), направиле корелација на експресијата на *microRNA* молекулата-31 и нејзината поврзаност со клиничките и патохистолошките карактеристики кај оралниот планоцелуларен карцином (OSCC). Студијата била изведена на 62 пациенти со OSCC и од истите пациенти биле земени и примероци од не-туморските, соседни ткива за компарација на експресијата на *microRNA-31*. Резултатите покажале дека експресијата на *microRNA* молекула-31, била значително повисока во туморските ткива од оние во соседните ткива ($p < 0,05$). Зголемената експресија на *microRNA-31*, била поврзана со појавата на метастази во лимфните јазли ($P < 0,05$) и клеточната диференцијација ($P < 0,05$) кај пациентите со OSCC. Не била најдена значајна асоцираност помеѓу експресијата на *microRNA-31* со: полот, возраста, метастазите во лимфните јазли (N-статусот), големината на туморот и локализацијата. Корелацијата на *microRNA* молекула-31, со клеточната диференцијација резултирала со дијагностичка сензитивност од

70,4% и специфичноста на 89,5%. Од добиените резултати тие заклучиле дека, зголемената експресија на microRNA-31, можеби е поврзана со птогенезата на OSCC.

Liu C.J.¹³⁶ и сop.(2010), користејќи ја квантитативна RT-PCR анализа, идентификувале miR-31 кај 43 пациенти со OSCC и 21 контролни, здрави ткивни примероци. Mann-Whitney test и Wilcoxon test на поврзани парови, биле употребени за да се споредат разликите помеѓу различните клинички варијабли. Резултатите покажале, значително зголемена експресија на miR-31 кај пациентите со OSCC, кои биле пропорционални со возраста, за разлика од избраните контролни лица. Овој показател бил со точност од 0,72 што било дефинирано со тестот на крос-валидација. Покрај тоа, неверојатно намаленото ниво на miR-31 кај пациенти по туморска ресекција, укажало на фактот дека овој маркер, може да има клинички корисен пристап, како нов биомаркер во дијагнозата на OSCC.

Chang KW.²⁸ и сop.(2013), ја користеле qRT-PCR анализата, за да ја прикажат експресијата на miR-31 кај OSCC, премалигните лезии и во нормалните ткива. Нивото на miR-31 било значително повисоко кај (89%) во туморските ткива, а помалку зголемена експресијата кај (70%) во неканцерозните лезии, во однос на нормалните биоптични ткивни примероци. Во својата студија Wang A.²⁶¹ и сop.(2014), покажуваат дека miR-31 била со зголемена експресирана кај сите 68 пациенти со OSCC, во однос на здравта контролна група од 34 пациенти. За да ја истражи експресијата на miR-31, за време на прогресијата на карциномот, спровел PCR (qRT-PCR) анализи, на изолираните РНК од свежо смрзнати примероци од здрава кожа (n = 21), и биоптични примероци од OSCC (n = 13). Се покажало дека, miR-31 е значително надрегулирана во OSCC, во однос на здравата кожа со (p, 0.001). Интересно е дека miR-31 небила надрегулирана во примероците од преканцерозните лезии, во однос на здравата слuzница, што укажува на тоа дека над-регулацијата на miR-31 се случува доцна, во текот на туморигенезата, кога лезиите стануваат инвазивни.

Cervigne NK.²³ и сop.(2009), откриле дека miRNAs-31 е различно експресирана, помеѓу метастатските и неметастатските тумори (со стапка <0,4; 26 неметастатски примероци биле со зголемена регулација и 5 надолно-регулирани во метастатски примероци).

Студијата на Siow MY.²³³ и сop.(2014), имала за цел да ги идентификува различните експресии на miR-31 во оралниот карцином (OSCC) и во нормалните ткивни примероци од здравото, соседно ткиво (NC). Потоа истите биле корелирани со клиничко-патолошките параметри.

Зголемената експресија на miR-31 била потврдена, а потоа поврзаноста меѓу Мирна изразувањето и клиничко-патолошките параметри биле тестирани со униваријантни и мултиваријантни анализи, кои ја покажале експресијата на miR-31, како значително зголемена во почетните стадиуми на карциномот, без метастази во регионалните лимфни јазли (P = 0.025). Поврзаноста меѓу miR-31 експресијата и тумор стеинингот (p= 0.006) и локализацијата, останала сигнификантно асоцирана со клиничко-патолошки параметри, сугерирајќи дека тие би можеле да бидат важни во процесот на оралната туморогенеза

Според локализацијата во усната празнина, анализите покажале дека miR-31 била значително зголемено експресирана кај OSCC во букалната мукоза со RQ(s.d 20.398), со P-value=0.006, во споредба со јазикот RQ(s.d.7.370) и гингива со RQ(s.d 5.980).

Досегашните сознанија за *mir-211*, како потенцијален биомаркер во оралната карциногенеза, ги потврдил и Chang KW.²⁸ и *cop.*(2008). Тие во својата студија ги истражиле клиничките и функционалните импликации на *mir-211* во OSCC. *mir-211* бил изгубен во неоплазмите, вклучувајќи го и HNSCC/OSCC (Natrajan R.¹⁷¹ и *cop.*(2003); Lipton и Tomlinson¹³⁵ и *cop.*(2006); Poetsch и Kleist¹⁸⁹ и *cop.*(2006)). Биле испитани 36 пациенти со примарен OSCC и 9 лица со орални пре-канцерозни лезии (OPL). Примероците од 29 пациенти (81%) со OSCC, покажале намалување на експресијата на *mir-211*. Останатите тумори покажале повисоки *mir-211* експресии од соодветните не-канцерозни примероци од слузница. Сите OPL примероци покажале намалени *mir-211* експресии. Не била најдена значајна разлика помеѓу *mir-211* експресиите во OPL и OSCC. Туморите со N2 (нодален статус) метастази имале значително повисоки *mir-211* експресии ($p = 0.011$), од помалку агресивните тумори. *mir-211* експресијата била значително повисока кај туморите со васкуларна инвазија отколку во другите тумори ($p = 0.002$).

Туморите биле поделени во две групи со средна и 0-DDCt. Туморите со повисоки *mir-211* изразување (DDCt > средна) и не-канцерозните примероци со поголема експресија на *mir-211* (DDCt > 0), биле значајно поврзани со полоша прогноза, прогресија и опстанок, со 95% интервал на доверба. И $p < 0.01$ со *t* тест. Експресијата на *mir-211* не била поврзана со ниту еден друг клинички параметар. Корелацијата помеѓу експресијата *mir-211* во ткивата на оралниот карцином и појавата на метастази била потврдена и од Chen LH³² при што ги потврдил веќе добиените сознанија дека, *mir-211* експресијата е зголемена во туморите и при васкуларната инвазија и биле во корелација со лоша прогноза. Присилното зголемување на *mir-211* нивото, интензивно ја зголемува миграцијата, формираа колонија и ја фафоризира туморогенезата на оралниот сквамозен карцином (OSCC).

Lindenbergh-van der Plas M.L.¹³⁴ и *cop.*(2013), истражувајќи ги miRNAs молекулите и нивната имплификациска улога во прогресијата и агресивноста на оралните карцином и HNSCC, нашле дека зголемената експресија *mir-211*, пропорционално расте со зголемување на степенот на трансформација од премалигни лезии до напредните стадиуми на малигната прогресија (10). *mir-211* зголемената експресија, била прикажана дека е поврзана со лоша прогноза кај карциномите.

Со цел да го истражат целното таргетирање на *mir-211* во оралниот карцином, Chu TH.³⁹ и *cop.*(2013), потврдиле инверзна корелација на *mir-211* и TGF β RII експресијата во метастатските примероци на HNSCC. Покаченото ниво на *mir-211* директно ја промовирала прогресијата на OSCC. Метастазирањето не било поврзано со зголемена *mir-211* експресијата, туку само со лошата прогноза на OSCC.

Mydlarz WK.¹⁶⁸ и *cop.*(2010), користејќи го нивото на *mirna* експресија, откриле дека *mir-211* има голема прогностичка вредност во предвидување на HNSCC со сензитивност и специфичност од 92% и 93%. Gorenchtein M.⁷⁷ и *cop.*(2012), Garzon R.⁶⁹ и *cop.*(2009) и Shiiba M.²²⁹ и *cop.*(2013), сумирајќи ја листата на miRNAs поврзани со оралниот карцином, ја евалуирале зголемената експресија на *mir-211* во ткивата со OSCC и нивната асоцираност со лоша прогноза. Тие утврдиле зголемени вредности на *mir-211* кај туморите со локални метастази, споредбено со пониските зголемени вредности на *mir-211*, во ткивата на примарните тумори, без метастатски

промени. Затоа заклучиле, дека *mir-211*, би можеле да бидат предложени за нови биомаркери со потенцијално круцијална улога во детекција на различни видови на карциноми, вклучувајќи го и OSCC.

Suzuki H.²⁴⁵ и соработници (2012), ги истражувал *mir-137* и нивната метилација која за првпат била забележана во оралниот карцином рак од страна на Kozaki K.¹¹⁷ и соработници (2008) и последователно биле пријавени во дебелото црево и карциномот на желудник кај Chen CX.³⁰ и соработници (2011). Намалената експресија на *mir-137* метилацијата била поврзана со сиромашна стапка на преживување кај пациенти со HNSCC/ OSCC, навеле Langevin SM.¹²⁴ и соработници (2010). Поаѓајќи од фактот дека MicroRNA-137 (*miR-137*) играат улога во контрола на клеточниот циклус и дека се подложни на промотор метилација, тие ја таргетираат *mir-137*, во две групи на испитаници. Едната група била составена од 99 пациенти со планоцелуларен карцином на оралната празнина (орален, фарингеален и ларингеален карцином). Другата група, била контролна, од здраво ткиво, исто од 99 пациенти, со изедначени фреквенции по пол и локализација. Пациентите со орален карцином имале, намалена експресија на *mir-137*, но >12 пати повисока промотор метилација, во однос на контролните (или =12,18, 95% CI: 2,63-56,36). PPV на *mir-137* промотор метилација била 82,4%, а за NPV била 80,7% за туморските ткивни примероци. *mir-137* намалената експресија била пропорционално асоцирана со возраста на пациентите, со $p=0,02$ за повозрасната старосна група. Не била најдена статистички значајна разлика според локализацијата, во однос на дистрибуцијата на *mir-137* ($P>0,99$). Овие наоди, укажале на предложената, утилитарна улога на *mir-137* како тумор супресори и ново предложени биомаркер.

Langevin SM.¹²⁵ и соработници (2011), во две последователни студии, посветени на MicroRNA-137 гените, ги истражувале можните механизми на дисрегулација на нивната експресијата, во ткивата на карциномите. Промотор метилацијата се потврдила како еден механизам, преку кој *mir-137* експресијата можела да се прикрие. Промотор метилација на индивидуалните микроРНА довела до намалување на способноста на клетката да се уапси за време на G1 фазата, што го поттикнало размножувањето и довело до акумулација на оштетување на ДНК и до подобрување на геномната нестабилност. За остварување на својата цел тие обработиле ткивни примероци од 67 пациентите со HNSCC/ OSCC. Во направените анализи, не регистрирале поврзаност на *mir-137* промотор метилација со тумор стејцингот. И покрај неговата наводна вмешаност во контролата на клеточниот циклус, тие, не нашле значајни асоцијации на *miR-137* промотор метилација со други прогностички фактори, вклучувајќи го стадиумот, големината на туморот, метастазите и позитивни хируршки маргина.

Интегративниот преглед на Wong TS.²⁶⁶ и соработници (2012), покажале дека, експресијата на *mir-137* била намалена во клетките на OSCC. Ектопичната експресија на *mir-137* го инхибирала клеточниот раст, во канцерозните клетките на јазикот¹¹⁷. *Mir-137* имала суштинско значење за контрола на клеточниот циклус на HNSCC зголемувајќи ја акумулацијата на клетките во G0-G1 фазата, што значи дека е поврзана со клеточниот циклус во G1-S. Метилациониот статус на *mir-137* е потврдено дека има голема потенцијална клиничка вредност, како главни носители на диференцијацијата на матичните клетки, што било истражувано во голем број на студии, Wiklund ED²⁶⁴ и

cop.(2011). Моделите на miRNAs експресијата на miR-137 биле анализирани во комбинација на qPCR и индивидуални miRNAs анализи, за панелот од 25 OSCC туморски примероци и 8 контролни здрави примероци. За разлика од примероците од основното, во карциногените ткива од оралните карциноми, нашле намалена експресија, на соодветните miR-137 и CpG хиперметилационни нивоа кај ~80% и <10%. Со ова ги потврдиле претходните извештаи на епигенетските замолчувања на miR-137 кај OSCC, но укажале на тоа дека, ова се случувало во одредени типови на клетки и не можело да се пронајде во вкупно, хетерогените туморски примероци. miRNAs експресивните модели биле конзистентни во здравите контролни примероци, но многу променливи и во туморот и ткивата земени од соседните примероци, со што се потенцира хетерогеноста на туморот. Главната miR-137 дерегулација (намалена експресија) се одвивала при туморската прогресија на карциномитен и биле најдени статистички сигнификантни диференцијации помеѓу туморозниот и соодветниот, нормален и/или здрав епител за miR-137. Не биле забележани разлики помеѓу метастатските и не-метастатските тумори. Во согласност со претходните извештаи, miR-137 метилацијата се зголемувала во OSCC со што miR-137 биле силно потиснати со активирање на туморите. Ова покажува дека miRNAs miR-137, потенцијално би можеле да бидат употребувани како, не-инвазивни клинички испитувања на OSCC.

Во продолжение, студијата на Shiiba M.²³⁰ и cop.(2010) и Avissar M.⁶ и cop.(2009), ги определиле намалените експресии на miR-137 и miR-193 кои можеби имаат клучна функција во прогресијата на оралниот карцином, преку нивното замолчување од ДНА хиперметилацијата кај OSCC. Од своите истражувања ги одвоиле miR-137 и miR-193 како можни биомаркери во молекуларна дијагностика на OSCC.

Kozaki K.¹¹⁷ и cop.(2008), сметале дека и двете, miR-137 и miR-193 се замолчени со ДНК хиперметилацијата кај miRNAs. Овие епигенетски влијанија, со замолчување на ектопичната трансфекција на miR-137 и miR-193 во OSCC ја намалиле нивната експресија. Преводот на на циклин-зависните киназа 6 или E2F транскрипцискиот фактор 6, значително биле намалено експресирани. Овие набљудувања биле во согласност со претходните наоди во кои тумор-супресорните улоги на miR-137 и miR-193 биле замолчени во карциномите на хепарот, глиобластомие, меланомот, карциномот на белите дробови и аденокарцином на грлото на матката.

Функциите на microRNA-137 и 193 а microRNA како тумор супресори - Kolokythas A.¹¹² и cop.(2011), ги проучувале заедно и докажале дека microRNA се замолчени од тумор специфичната ДНК хиперметилација, демонстрирани кај оралниот сквамозен карцином. MicroRNA молекула-137 кога е ектопично експресирана во клеточните линии, недостасува нејзината експресија, која го инхибирала растот преку G0-G1 апсење. MicroRNA молекула-193 ги демонстрирала истите резултати со посредство на апоптоза. По тестирањето на потенцијални цели, со помош на компјутерски предвидувања (CDK6, E2F6, NCOA2 / TIF2 за microRNA молекула-137) и (E2F6, KIPAC, MCL1, MYCN, PTK2/FAK за microRNA молекула-193) единствено статистички значајни разлики, биле најдени во нивоата на протеините CDK6, како потенцијална цели за microRNA молекула-137 и E2F6 за microRNA молекула-193.

Chen LH.³² и cop.(2010), ги истражувале ектопичните изразувања на тумор-супресивните miR-137 и **miR-193**, што резултирало со губење на растот на

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

клетките во OSCC, кое сознание може да се користи за предвидување на прогнозата на пациенти со HNSCC.

Lessa AMG¹³⁰ и сop.(2013), во нивната студија, последна го потврдила намалувањето на експресијата на miR-137 и miR-193 и нивното, предизвикано од DNA- хиперметилацијата. Овој процес имал клучна функција во прогресијата на оралниот карцином и може да претставува голема промена во разбирањето на биолошкиот профил на OSCC. Wong TS.²⁶⁷ со сop.(2008), ја идентифицирале miR -193 меѓу 24-те miRNA кај карциномот на јазикот, која била со намалена експресија до три пати помала од нормалната. По отстранувањето на туморот, во контролните ткива значително се намалило и нивото на miR -193. Тестовите за пролиферација покажале намалено ширење на туморот на ресекционите ивици со микросателитска инвазија, по трансфекција со microRNA-193 инхибитор. Во својата подоцнешна студија Wong TS.²⁶⁶ и сop.(2012), продолжиле да го анализира намалувањето на експресијата на miR-193, и нашол намалување на нивото во туморските примероци добиени од букалната слuzница. Намалувањето на експресијата на miR- 193, резултирало со поттиснување на клеточниот раст и индуцирање на апоптоза и во студијата на Kozaki K¹¹⁷ и сop.(2008).

Намалувањето на експресијата на miR-193, во ткивата на оралниот карцином, била прикажана од страна на многу автори (Gao X-N.⁶⁸ и сop.(2011); Almubarak H.M.² и сop.(2012); Yan B.²⁷⁴ и сop.(2012); Chen D.³¹ и сop.(2013)).

Во својот интегративен преглед Wong T.S.²⁶⁶ и сop.(2012); Kozaki¹¹⁷ и сop.(2008) и Shiiba M.²³⁰ и сop.(2010), забележале дека намалената експресија **mir-133b** била поврзана со прогресијата на колоректалниот карцином, карциномите на мочниот меур и карциномот на белите дробови. Во HNSCC/OSCC овие microRNA биле постојано намалено експресирани и имале тумор супресивната функции, инхибирајќи ја пролиферацијата и индуцирајќи апоптоза во канцерските клеточни линии. Тие ја сугерирале можноста дека miR-133a and miR-133b, се поврзани со туморогенезата на оралниот, поточно, карциномот на јазик.

Студијата на Hui AB⁹⁰ и сop.(2010), била цитирана од повеќе автори, поради сеопфатниот преглед на дисрегулираните miR-133 во оралната, ларингеалната и фарингеалната слuzница. Добиените резултати биле компарирани меѓусебно и со контролната група на нормални, здрави ткива. Резултатите покажале значително различни експресии на miRNAs ($P < 0.05$). Сепак, со користење на FDR исклучување од 0.3, само miR-133b останала значително зголемено експресирана со ($P = 0.01$), кај ларингеалниот карцином, споредено со туморите кои биле локализирани, во орофаринкс или хипофаринкс. Во однос на клиничките параметри, студијата покажала разлики во глобалните Мирна профили, помеѓу карциномите кои потекнувале од ларинкс, орофаринксот, или хипофаринксот. Единствен исклучок била miR-133b, која била повеќе експресирана во ларингеалната, наспроти другите две локализации; значење кое останало да се дефинира. Овој недостаток на посебна Мирна експресија, како функционира во различни локализации бил во склад со претходните слични студии, каде се забележани разлики во експресијата помеѓу јазикот, орофарингсот и ларингсот.

Childs³⁵ и сop.(2009) во нивната студија, исто како Hui AB⁹⁰ и сop.(2010), анализираше примероци од 3 локализации на карцином: на орофаринкс, ларинкс и орален карцином. Наодите на експресија на miR-133, ги споредиле со

ткивата на здрави, контролни примероци. Разликата во експресијата на miR-133, била прикажана со вредност: за оралниот карцином $SE^* = -2.57$ (1.38), споредено со контролните примероци со $SE^* = 5.00$; за ларингеалниот карцином вредностите биле $SE^* = -0.92$ (3.97), контролните со $SE^* = 6.64$; за орофарингс. Резултатите покажале статистички значајна разлика во експресиите на miR-133, со значително намалување кај OSCC. Во сеопфатната студија, Lessa AMG¹³⁰ и сор.(2013), прикажала идентични резултати, со претходните автори т.е. слични намалени експресији на miR-133a во OSCC. Исто и Chen LH³² и сор.(2010), го проучувале ектопичните изразувања на тумор-супресивните miR-133 (miR-133a, miR-133b) и прикажале нивна намалена експресија во туморските ткива, што може да се користи за предвидување на прогнозата на пациенти со HNSCC.

Во својата студијата Wong IHN²⁶⁵ и сор.(2006) ги истражувале microRNA-133a и microRNA-133b и докажале дека тие се намалено експресирани во туморските клетки, во споредба со нормалните епителни клетки. За потенцијална цел на генот, била предложена пируват киназа тип M2 (PKM2) која се покажала како цел на двете microRNA-133a и microRNA-133b. Во туморигенезата замената на ткивните специфични PKM од PKM2 допринела за олеснување и адаптација на клетките на потенцијално ниска гликоза и кислород. Со тоа се зголемил потенцијалот на туморските клетки за инвазија, размножување, миграција и апоптоза. Способноста на туморските клетки да се прилагодат на промените на микросредината било клучен елемент за нивниот опстанок и туморската прогресија. Способност на туморските клетки да преживеат под хипоксични услови или во присуство на хемотерапевтски агенси, преку развивање на отпорност, допринело за неуспех при лекувањето.

Интересот на за дисрегулацијата на miRNAs молекулите во HNSCC/OSCC и понатаму продолжил, на што се должеле и новите студии на Wong TS.^{266,267} и сор.(2012). Од сите предложени miRNA, понатаму тие ја евалуирале miR-133 и нејзините 2 изоформи: miR-133a и miR-133b. Намалена експресија на miR-133 била регистрирана во HNSCC, вклучувајќи го OSCC. Cervigne N.²³ со сор.(2009), од сите предложени miRNAs, ги издвоиле miR-133a, miR-133b, кои имале различни нивоа на експресија помеѓу прогресивната дисплазија и OSCC ($p < 0.005$). MiR-133a и miR-133b биле намалено експресирани во двете групи, но со значително различни нивоа, што укажува дека тие би можеле, да бидат рани дијагностички биомаркери за оралниот карцином.

Од деталната листа на предложените вкупно 305 гени за HNSCC, Mutallip M.¹⁶⁶ и сор.(2011), биле претежно фокусирани на функционалната аотација на експериментално потврдените miRNAs miR-125 и miR-133 истакнувајќи ја нивната намалена експресија со (FCH < -1.5 ; p -вредност < 0.001), значи сигнификантна разлика, споредено со здравите контролни ткива. Слични биле и наодите на Капо M.¹⁰² и сор.(2010), кои ја покажале потиснатата експресија на miR-133 во туморските ткива кај 25 пациенти со HNSCC, со (* $P < 0.005$), во однос на нормалните ткива.

Експресијата на miR-133, била истражувана и во деталната анализа на Nohata N.¹⁷⁶ со сор.(2011), чии интерес бил фокусиран посебно на двата изомера на miR-133a: miR-133a, и miR-133b. Експресионите потписи ја потврди надолна регулација на двете miRNAs и тие покажале дека miR-133 функционираат како тумор супресори кои регулираат неколку онкогени во многу видови на карциноми. Споредувајќи ја експресијата на miR-133 во

нормалните ткива и туморите, нашле $p = 0.0033$; сигнификантно намалување во туморските примероци. Cervigne N²³ и сор.(2009), прикажале дека *mir-133a*, *mir-133b*, имале диференцијални нивоа (со значително различни нивоа) на експресија помеѓу прогресивната дисплазија, леукоплакијата и OSCC ($p < 0.005$) и OSCC. *mir-133a*, *mir-133b* и ги потврдиле наодите на намалување на експресија пропорционално во прогресивните дисплазии, леукоплакијата и OSCC.

Студијата на Hui AB.⁹⁰ и сор.(2010), ги презентирала нивоата на експресија на *mir 125*, во нормалната мукоза каде била 0,12, споредбено со споредено со оралниот карцином, со намалена експресија од -2,45. Локализацијата не била асоцирана со нивото на експресија, бидејќи сите тумори од различни локалитети во оралната празнина: подот на уста, јазик, букална мукоза, алвеоларен гребен, ретромоларно, имале слично намалена експресија. Намалувањето на нивото на *mir 125* експресијата, ја инхибирала пролиферацијата на клетките, водела до прогресија на карциномите, што резултирало со смалување на сензитивноста на туморите на јонизирачко зрачење. Ова било потврдено и во студијата на Henson BJ.⁸⁶ и Sun YM.²⁴³, кои ја истражувале функционалната анотација на експериментално потврдените *miRNAs*, како тумор супресорни гени. Тие потврдиле дека нивоата на експресија на *miR-125b* биле значајно намалени во клетките на оралниот карцином, споредбено со контролните нормални ткива.

Peng SC¹⁸⁶ и сор.(2014), истражувајќи голем панел на *miRNAs* гените, ја потврдиле само *mir-125b*, како значаен прогностички фактор: во предвидувањата на контрола на вратните метастази ($OR = 5.015$, $p = 0.054$), во времето на преживување без болест ($OR = 4.444$, $p = 0.01$), опстанок со специфичната болест ($OR = 4.651$, $p = 0.032$), и вкупното преживување ($OR = 4.464$, $p = 0.023$). Кај пациенти со OSCC, во pT3-4 стадиум, *mir-125* експресијата имала значајно влијание врз локалната контрола ($p = 0.018$). Кај пациенти со PN+, ниската *mir-125* експресија била поврзана со зголемен ризик за појава на далечни метастази ($p = 0.043$). Во друг сет на експерименти, била тестирана асоцијацијата помеѓу *miRNA* потписите и клиничкиот исход, во друга група на пациенти со pT3-4 болест и PN+, или пациенти во напредната патолошка фаза. Тие откриле дека кај пациентите со pT3-4 болест, намалувањето на една единица на *mir-125b* експресијата, доведува до зголемување на ризикот од појава на локални рецидиви за 9,5 пати.

Пациентите со значајно намалена експресија на *mir-125b*, имале поголем ризик за лош исход и лоша прогноза, во присуство на специфичните фактори на ризик (p-фаза III-IV, pT3-4 или PN +). Наодите во оваа студија, укажале на фактот дека *mir-125b* имаат големо прогностичко значење за OSCC и можат да ја подобрат прогностичката стратификација во однос на традиционалните фактори на ризик.

Меѓу сите кандидати на *miRNAs* предложени во контекст на OSCC, само *mir -125* биле значително намалено експресирани во примарниот OSCC во споредба со здравите биоптични ткива, што било потврдено и во студијата на Henson BJ.⁸⁶ и сор.(2009). Биолошката функција на трансфекцираните гени како резултат на различно експресираниите *mir-125b* вклучувала, прогресија на клеточниот циклус, имунолошкиот одговор, пролиферација и диференцијација. Трансфектирањето на клетките со егзогена *mir-125b*, значително ја намалило клеточната пролиферација и ја модифицирало експресијата на целните и нецелните гени во OSCC.

Овие набљудувања покажале дека miR-125 дерегулацијата може да биде еден од главните фактори на редукција на пролиферацијата на клетките, алтерирање на глобалната генска експресија и иницирање и прогресија на оралниот карцином.

Неколку други автори ја истражувале miR-125 експресијата во HNSCC/OSCC. Меѓу нив биле Tran N.²⁵⁵ и сор.(2007) и Chang²⁹ и сор.(2008), но тие не нашле значително намалена експресија на miR-125 како во студијата на Henson B.J.⁸⁷ и сор.(2009). Разликите во овие студии можеби се должеле на различни методологии кои биле користени за добивање на податоци за експресијата. Не конзистентните наоди, можеби биле и поради примероците од туморите, добиени од различни локализации: од орофарингс, хипофарингс, ларингс и орален карцином. Сепак, Tran N.²⁵⁵ и сор.(2007) и Wong²⁶⁷ и сор.(2008), со користење qPCR, откриле дека miR-125b биле намалено експресирани во OSCC.

Претходните студии на Shiiba M.²²⁹ и сор.(2013), покажале дека интерцелуларната адхезивна молекула-2 (ICAM2) предизвикува инхибиција на радиосензитивноста на клетките на OSCC. Така ја поставиле хипотезата, дека одредени miRNAs играат клучна улога во радиорезистентноста на OSCC.

Анализите покажале дека miR-125 потенцијално ја регулира ICAM2 експресијата, а со тоа директно влијае на радиорезистентноста. Експресијата на miR-125b била анализирана со реверзна транскриптаза-PCR. За функционална анализа, miR-125 биле трансфицирани во OSCC добиените клетки. Резултатите покажале намалена експресија на miR-125 во OSCC примероците. МиР-125-трансфицираните клетки покажале намалена стапка на пролиферацијата, подобрена радиосензитивност на зрачна терапија и намалена ICAM2 /PNA експресија. Покрај тоа, miR-125 експресијата во корелација со стопирање на растот на OSCC и подобрена стапка на опстанок. Овие наоди сугерирале дека намалената експресија на miR-125, била поврзана со забрзана клеточна пролиферација и радиорезистентност. Така, контролата на експресија или активност на miR-125b, во иднина би можела да придонесе за сузбивање и радиорезистентноста на OSCC.

Експресијата на miR-125 била два пати помала во клетките на OSCC, во споредба со клетките во здравото, контролно ткиво. Пониски нивоа на експресија биле забележани во 39 од 50 (78%) во OSCC примероци, во споредба со нормалните ткива (0,280 и 0,132; $P=0.019$, Student's t-test). Пониската експресија на miR-125, била значително поврзана со лошиот исход кај пациентите со OSCC (ранг тестот откри значителни P -вредности ($P = 0,038$). Експресијата на miR-125b била значително помала во напредните стадиуми (III IV +), за разлика од почетните стадиуми (I - II) со ($p = 0.037$).

Kolokythas A.¹¹¹ и сор (2011), во својата сеопфатна студија, со цел да ги идентификуваат специфичните microRNA за оралниот карцином, ја потврдиле намалената експресија на microRNA-125, во оралниот карцином, со специфичност од 93%.

Ткивни биомаркери во дијагнозата и прогнозата на OSCC

Првичните истражувањата во областа на молекуларната биологија на OSCC, биле насочени кон генетските алтерации. Во текот на последната деценија, епигенетските дерегулации имаат се поголемо значење и признание во етиолопатогенезата на OSCC.

По идентификацијата на првите мирна гени, следеле многу истражувања на miRNAs- специфични за одреден тип на заболувања: леукемија, лимфоми, карциноми, меланоми и други, како и за одредени регии и органи, во човечкиот организам. Овие истражувања, отвориле нови перспективи во изнаоѓање и користење на нови, специфични, ткивни и циркулирачки miRNAs како моќни, не-инвазивни дијагностички биомаркери за дијагноза и прогноза на OSCC/HNOC. Нивната ниска сензитивност и специфичност, засега ја ограничува нивната клиничка примена. Затоа, како цел на нашето истражување, ги поставивме, промените во MicroRNA експресијата на mir-21, let-7, mir-155, mir-31, mir-211; и mir-137, mir-133b, и mir-193a, mir 125, кои засега се нај експлоатирани во OSCC. Резултатите би можеле да допринесат, овие биомаркери да помогнат во понатамошните анализи, како и нивната клиничката апликбилност во дијагностиката, предвидувањето на повторна појава (рецидиви), терапијата и следењето на терапевтските ефекти кај пациентите OSCC¹¹⁰.

Маркерите за ДНК метилацијата, исто така се покажале дека имаат потенцијал да обезбедат уникатна комбинација на специфичност, сензитивност и широк спектар на применливост на клиничко ниво, во иднина. Метиленските маркери, се смета дека нудат и нови тераписки стратегии, поаѓајќи од фактот дека епигенетските промени се реверзибилни, што ги прави погодни во терапевтски цели. Најчесто споменуванит гени во овој контекст, т.е таргетирани од хиперметилација на промотор регионите, во OSCC се: p16, DAPK, E/cadherin, MGMT и RAR β 2, се цел на нашата студија^{81,85}.

Оваа студија, ќе се обиде да даде свој придонес во разрешување на централната догма за откривање на компатибилни податоци за miRNAs и DNA метилационите активности и нивната улога во карциногенезата, развојот и прогресијата на OSCC^{16,137}. Исто така, ќе се обидеме да идентификуваме потенцијални решенија кои би можеле да ги надминат, досегашните извонредни предизвици, во разјаснување на етиопатологијата, дијагнозата и прогнозата на оралниот карцином. Добиените резултати, ќе бидат корисни за генерирање на информации за нови биомаркери, строго спречени за OSCC/HNOC, кои ќе помогнат и ќе дадат свој придонес во новите апликбилни сознанија, за нови дијагностички, прогностички, клинички и терапевтски цели.

3. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ

Со цел оваа студија, да даде свој придонес во разрешување на централната догма, за откривање на компатибилни податоци за miRNAs и DNA метилационниот статус, како и нивната улога во патогенезата, прогресијата и прогнозата на OSCC, ги поставивме следните цели:

➤ Да се детерминира DNA метилационниот статус во промотор регионите на зададените гени, во примарниот орален карцином и во клинички непроменетата слузница, во однос на здравите ткива, со цел на утврдување на нивните предиктивни вредности во почетната и развојна молекуларна орална карциногенеза.

➤ Да се корелира DNA метилационниот статус, со клиничко-патохистолошките параметри: големина на примарниот тумор (pT), N статус(pN), локализација, степен на клеточна диференцијацијата и TNM стадиум, , со цел на утврдување на вредноста на DNA метилацијата во развојот и прогресијата на OSCC .

➤ Да се корелира DNA метилационниот статус на зададените гени и времето на појавата на локални/ регионални рецидиви(вратни метастази) со времето на преживување , со цел да се утврди нивната прогностичката вредност кај пациентите со OSCC.

➤ Да се утврди нивото на експресија на зададените тумор супресивни miRNA во примарниот карцином и во клинички непроменетата оралната мукоза кај пациентите со орален карцином, во однос на miRNA нивото во здравите ткива, со цел да се утврди нивната предиктивна вредност во патогенезата на OSCC.

➤ Да се корелира експресијата на зададените тумор супресивни miRNA, со клиничко-патохистолошки параметри, со цел на утврдување на нивната вредност во развојот и прогресијата на OSCC.

➤ Да се корелираат тумор супресивните miRNA и времето на појавата на локални/регионални рецидиви (вратни метастази), со времето на преживување, со цел да се утврди нивната прогностичката вредност кај пациентите со OSCC.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

➤ 4.1. Собирање податоци за пациенти и земање биоптични материјали- ткивни примероци за анализа

За реализирање на поставените цели, беше спроведена ретроспективна студија на 60 пациенти, од кои беа добиени вкупно 100 биоптични материјали. Пациентите беа амбулантски или хоспитално третирани на Клиниката за максилофацијална хирургија – Скопје, во период од 02.05.2009 година, до 09.01.2015 година.

Сите пациенти, вклучени во стидијата, беа запознаени и потпишаа информативна согласност т.е. институционално етичко одобрување, за употреба на нивните ткива, во научно-истражувачка работа. Беа собрани и детални клинички и демографски информации, за сите пациенти вклучени во студијата: возраст, пол и локализација во оралната празнина.

Возраста на пациентите беше проследена, според старосните групи: 30 - ≤ 39 год.; 40 - ≤ 49 год.; 50 - ≤ 59 год.; 60 - ≤ 69 год.; 70 - ≤ 79 год.; 80 - ≤ 89 год.

Според полот, пациентите беа поделени на: мажи и жени

Според локализацијата и потеклото на примарниот тумор во оралната празнина: карцином на јазик, сублингвално, образ, тврдо и меко непце, ретромоларно и алвеоларен гребен.

Прогресијата на болеста и времето на преживување, беа дефинирани како упорност- појава на локални рецидиви/ вратни метастази, изразено во месеци, после операцијата. Пациентите кои беа живи до јануари 2015 година или пациенти кои починале од други причини, беа следени до последната контрола/ клиничка посета. Овие податоци беа користени, како критериум и беа корелирани со miRNA гените и ДНА промотор метилираните гени, а со добиените резултати го пресметавме можниот ризик за секој пациент. Информациите за пациентите, беа внесени во анамнестичките листи, во безбедна клинички база на податоци.

Пациентите беа селектирани и избрани, со услов, да не биле подложени на зрачна радиотерапија или хемотерапија, пред примарниот хируршки третман или земање на биоптичниот материјал за понатамошна анализа. Беше потпишана согласност од сите пациенти, за изведување на хируршка интервенција. Според одобрените дијагностички и терапевтски протоколи за карцином на орална шуплина, пациентите понатаму беа хируршки третирани, со радикална ексцизија на туморот, придружена со соодветна дисекција на вратот.

Биоптичните материјали (ткивните примероци), беа перспективно собрани за време на операцијата и се состоеја од четири дела, според кои и беа поделени во три групи за понатамошна евалуација:

1.Првата група се состоеше од 40 биоптични материјали,

ткивни примероци од туморско ткиво, земени во време на хируршката екстирпација на туморот, во склоп на примарниот третман. Критериумите за избор на оваа група, вклучуваа: локализација на примарниот тумор (усна шуплина, со различна локализација), земање на 5 mm³ материјал од рамките на туморска маса и хистолошка верификација на туморот (планоцелуларен карцином).

2. Втората група, ја сочинуваа примероци од контралатералното, нормално ткиво, макроскопски нормални биоптични ткива, земени контралатерално од истите пациенти со планоцелуларен карцином, во тек на самата интервенција (за да не се изложуваат пациентите на дополнителен ризик). Критериумите вклучуваа: стандардна биопсија од макроскопски, нормално здраво ткиво, земено од контралатералната страна.. Овие примероци, потоа беа потврдени како бенигни со рутинска патохистопатолошка верификација.

3. Третата група, се состоеше од биоптични материјали, земени од здрава слузница. Овие ткивни примероци беа земени од 20 пациенти кои немаат претходна историја на малигни заболувања, а се јавиле на нашата клиника поради оперативно третирање на различни бенигни патологии, кои беа исто така, патохистолошки верифицирани. Овие примероци, беа анализирани за добивање на референтни, нормални вредности за miRNA експресијата и DNA метилационниот статуси и понатаму користени за корелација со другите вредности, добиени од претходните 2 групи на ткивни примероци.

Податоците за клиничко-патолошките карактеристики беа добивани од: анамнезата, физикалниот преглед, медицинската документација и хистопатолошкиот наод.

Базата на податоци за клиничко-патолошките карактеристики/ параметри на испитаниците ја сочинуваа: големина на туморот -pT, присутвото/отсутво на метастази во регионални вратни лимфни јазли- (нодален статус- pN), TNM стадиум на туморската болест, клеточна диференцијација на тумор (Broders staging), локализација на примарен тумор, прогресија и време на преживување.

Перспективно пациенти беа следени за да се утврди клиничкиот исход и прогресијата на болеста. Следењето се изведуваше од 9 месеци - 5 години по примарната интервенција, со цел да се утврди евентуална рекурентна евиденција (појава на локални рецидиви и регионални и далечни метастази), како и следење на смртниот исход кај дел од пациентите. крајот на следење беше 5 јануари, 2015 година. Преживувањето беше нотирано во месеци поминати од примарниот третман. Последните клинички контроли и телефонските контакти со пациентите/ или блиската нивна фамилија, ни ги обезбедија податоците за смртниот исход на дел од пациентите (непосредна причина за смртта и придружните фактори).

Истражувањето беше изведено во следниве четири институции:

J.З.У. Клиника за максилофацијална хирургија- Скопје, Институт за патолошка анатомија, Истражувачки центар за генетско инженерство и биотехнологија при МАНУ и Фармацевстичкиот факултет при УКИМ.

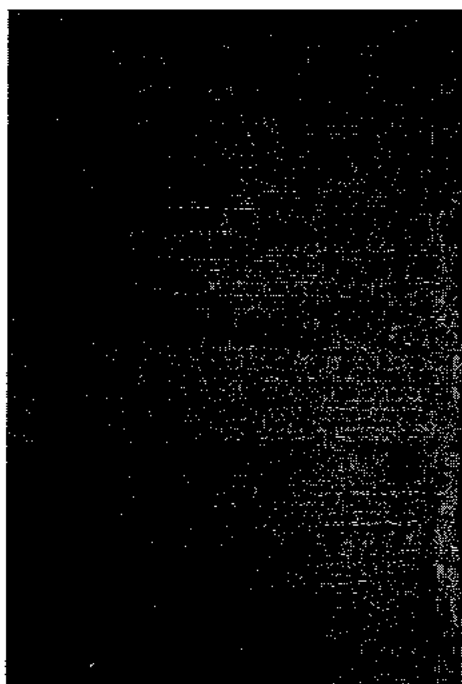
➤ 4.2. Хистопатолошка анализа на ткивните примероци

Сите пациенти вклучени во оваа студија имаа конечен патохистолошки наод. По хируршката ексцизија секој материјал беше поделен во два бита. Едниот веднаш беше замрзнат во течен азот кој се чува на -80° за молекуларни испитувања, а другиот дел се користеше за хистопатолошка анализа според критериумите на C3O.

Патохистолошката анализа беше спроведена на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје. Стандардната хистолошка обработка на ткивата, за светлосно микроскопска анализа, опфаќаше фиксација во 10% формалин, потоа спроведување низ низа алкохоли со различни концентрации и вкалупување на истите во парафин. Вака добиените пресеци беа нанесени на предметни стакленца и беа боени со: hamatoxylin- eosin(HeEo) i trichom Masson и класифицирани според THM стадиумите и клеточната диференцијација на туморот, според Broders staging- системот.

Патохистолошките карактеристики: големина на тумор (T), регионални вратни лимфни јазли (N), далечни метастази (M) и стадиум на туморската болест (S), беа евалуирани според *Tumor-Node-Metastasis* класификациониот систем (AJCC Cancer Staging Manual, 6th ed.) Анамнестичките податоци и физикалните прегледи беа комплетирани со патохистолошкиот стеиџинг за секој пациент поодделно. T- стеиџингот беше понатаму групиран и проследен како, почетен стадиум T1-T2 и и напреден стадиум (T3-4).

(Слика бр.6).



Сл.бр.15. Патохистолошки наод

Градуирањето на степенот на клеточна диференцијација, беше изведен по (Broders staging) системот и туморите беа класифицирани во 4 степени: добро диференцирани (GI), средно (умерено) диференцирани (GII), слабо/недиференцирани (GIII) и анапластични (GIV).

Потоа, следеше обработка на ткивата, за молекуларните истражувања. Примероците од трите биоптични материјали беа ставени во стерилни пластични тубички и истите веднаш беа чувани на температура од -80 °C до почетокот на изолацијата на нуклеинските киселини.

По одмрзнувањето, ткивата беа прочистени со физиолошки раствор а потоа секое ткиво беше поделено на два дела – едниот дел од кој беше изолирана геномска ДНК, додека другиот дел од ткивото беше хомогенизиран во Tri Reagent® solution (Life Technologies) за последователна изолација на вкупна РНК.

➤ 4.3. **Определување на DNA метилационите нивоа на гените, во ткивните примероци**

Изолација на геномска ДНК и микроРНК

За изолацијата на геномска ДНК, клетките беа ресуспендирани во 2.5 mL раствор кој содржеше STE пуфер, 125 µL 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulphat) и 30 µL протеиназа K со концентрација 20 mg/mL. Смесата беше инкубирана на 37°C преку ноќ до потполна дигестија на клеточните структури. Наредниот ден на вискозниот раствор беше додаден еднаков волумен на фенол заситен со 20mM Tris pH 8 по што следеше екстракција со благо промешување на растворот од 5 минути и центрифугирање 5 минути на 3000gpm на температура од 4 °C. Водената фаза беше реекстрахирана со еднаков волумен на хлороформ/изоамил алкохол (24:1 вол/вол) под горенаведените услови. Преципитација на геномската ДНК беше извршена со додавање на 25mL. Добиената геномска ДНК беше промиена со 70% етанол, исушена, растворена во 100-250 µL TE (10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA) пуфер и инкубирана на 37 °C преку ноќ. Определувањето на концентрацијата и чистотата на добиената ДНК беше утврдена на автоматски спектрофотометар Thermo Scientific NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer со мерење на апсорпцијата на 260, 230 и 280nm. Примероците беа чувани на 4°C до почеток на анализите.

Изолацијата на РНК од ткивата хомогенизирани во Tri Reagent® solution се одвиваше според протоколот од производителот кој вклучува екстракција со кисел фенол, преципитација со изоамил алкохол, испирање со 70% етанол и конечно растварање во 20-50µL стерилна вода. Концентрацијата и чистотата на добиената РНК беше одредена спектрофотометриски, како што е опишано погоре за геномската ДНК. Вака изолираната РНК беше складирана на - 80 °C..

4.3.1. In vitro бисулфитна модификација на ДНК

Примероците беа испитувани за присуство на метилни групи на одредени региони од гени со помош на метилација-специфичен PCR. Најпрво сите примероци (ДНК од туморско и контралатерално здраво ткиво од секој пациент, како и ДНК од здравите индивидуи) беа подложени на процес на бисулфитна конверзија: Оваа реакција базира на принципот на деаминација на цитозинот во урацил под дејство на бисулфитен реагенс кај

сите неметилирани CpG секвенци во геномот, додека цитозините кои се наоѓаат до метилиран гванин во CpG островцата остануваат непроменети. На овој начин се индуцира разлика во секвенцата помеѓу метилираните и неметилираните секвенци во одредени региони во геномот која последователно може да се детектира со ПЦР реакција.

Реакцијата за бисулфитна конверзија се изведуваше со помош на реагенси од китот *Imprint DNA Modification kit (Sigma Aldrich)* според протокол од производителот на 50-200 ng почетен материјал на ДНК. Како позитивна контрола се користеше *in vitro* метилирана ДНК со помош на ензимот *CpG Methyltransferase (BioLabs)*. Со оваа процедура се добива комплетна метилација на сите CpG динуклеотиди во целиот геном. Како негативна контрола се користеше ДНК која предходно беше подложена на *in vitro* амплификација на целиот геном користејќи *Whole Genome Amplification* кит на *Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)*. Со оваа процедура се добива де ново синтетизирана ДНК во фрагменти со големина од ~400-500 bp која е репрезентативна за секвенците на целиот геном и во која нема метилирани цитозини во CpG динуклеотидите.

Реакцијата за бисулфитна конверзија се одвиваше во Епендорф тубички од 1.5 мл во кои иницијално се подготвуваше реакциона смеса во вкупен волумен од 120 μ l која содржи 10 μ l геномска ДНК (100 ng) и 110 μ l *DNA Modification Solution*. Тубичките беа инкубирани 6 минути на 99°C и потоа 90 минути на 65°C. По завршување на инкубацијата модифицираната ДНК беше прочистена со течно-цврста екстракција на спин колони со цел за одстранување на сите соли и реагенти и добивање на чист модифициран ДНК примерок, според процедура препорачана од производителот на китот. Модифицираната и прочистена ДНК беше чувана на -20°C до изведување на PCR реакцијата.

4.3.2. Квантитативна полимераза верижна реакција во реално време (Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction – RT-qPCR)

По завршувањето на процесот на бисулфитна конверзија примероците беа подложени на 7 посебни RT-qPCR реакција (во дупликат) со соодветни прајмери и TaqMan проби со кои се детектира присуство само на метилирани секвенци во промоторите на 6-те испитувани гени. Како контролена реакција за успешноста на бисулфитната конверзија на секој ДНК примерок беше користена реакција на амплификација на ACTB1 генот со прајмери лоцирани во региони кои не содржат CpG динуклеотиди, но содржат повеќе цитозини. Присуството на сигнал во оваа реакција укажување на комплетноста на бисулфитната конверзија и на присуство на ДНК примерок кој е адекватен за анализа на метилација во испитуваните региони со другите прајмер сетови.

При секоја анализа беа амплифицирани и ДНК примероци од позитивната и негативната контрола кои даваат информација за валидноста и специфичноста на реакциите, како и слепа проба која укажува на потенцијална контаминација и примерок на немодифицирана ДНК која укажува на специфичноста на амплификацијата само на метилираните региони. Секвенците на прајмерите и пробите се дадени во Табела за секој ген посебно. (табела бр.1)

Табела бр.1. Секвенци на прајмери и TagMan проби кои се користени за детекција на присуство на метилирана ДНК во промотерите на испитуваните гени

Ген	Прајмер/проба	Секвенца 5'-3'
ACTB1	ACTB1 F	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT
	ACTB1 R	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA
	ACTB1 P	6FAM-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-TAMRA
P16	CDKN2A1 F	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC
	CDKN2A1 R	GACCCCGAACCGCGACCGTAA
	CDKN2A1 P	6FAM -AGTAGTATGGAGTCGGCGGGCGGG- TAMRA
DAPK	DAPK F	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC
	DAPK R	CCCTCCCAAACGCCGA
	DAPK P	6FAM -- TTCGGTAATTCGTAGCGGTAGGGTTTGG -- TAMRA
MGMT	MGMT F	GATTTTATTAAGCGGGCGTC
	MGMT R	CTTTTCCTATCACAAAATAATCCG
	MGMT P	JOE TCCTAAAAACGCGCGAAAATCGTAAAA BHQ1
RARβ2	RARβ2 F	CGAGAACGCGAGCGATTTC
	RARβ2 R	GACCAATCCAACCGAAACGA
	RARβ2 P	6FAM-CCTTCCGAATACGTTCCGAATCCTAC-TAMRA
ECDH	ECDH F	AATTTTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT
	ECDH R	TCCCCAAAACGAAACTAACGAC
	ECDH P	6FAM- CGCCACCCGACCTCGCAT-MGB

Секоја PCR реакција се изведуваше во пластични тубички од 0.2 µl во реакциона смеса во вкупен волумен од 25 µl која содржеше 1/10 од бисулфитно модифицираната ДНК, 2.5 µl од 10XPCR Gold buffer, 2 µl од 2.5 mM MgCl₂, 2 µl од 2.5 mmol смеса од сите четири dNTP, 0.25 µl од 10mM раствор од директниот прајмер, 0.25 µl од 10mM раствор од реверзниот прајмер, 0.10 µl од 10mM раствор од TaqMan пробата и 1U Taq полимерза (Ampitaq Gold, Life Technologies, USA). Тубичките беа подложени на реакција на PCR во RealTime Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) апарат под следните услови: 95°C 10 минути и 40 последователни циклуси на 95°C 30 секунди и 60°C 1 минута. Флуоресценцијата која одговара на FAM флуорофорот, беше детектирана континуирано во текот на целата реакција.

Примероците во кои беше детектиран сигнал кој е со поголема јачина од базната линија (ΔCt=0.5) во реакцијата со специфичните прајмери се сметаа за позитивни, односно за ткиво во кое постои метилација во испитуваните секвенци. Примероците во кои не беше детектиран сигнал од специфичните прајмери беа сметани за негативни, само во случај кога во истите се добиваше сигнал за контролната ACTB1 реакција а отсутствуваше сигнал од немодифицираната ДНК и од слепата проба.

➤ 4.4. Определување на miRNA експресиите во ткивните примероци

Беа испитувани 9 miRNA (mir21, let7, mir 155, mir31, mir211, mir137, mir133b, mir193a и mir125a) и 1 miRNA (RNU6B) која служеше како внатрешна контрола со која се нормализираше експресијата на останатите miRNA.

4.4.1. RNA екстракција/ Изолација на вкупна RNA со TRI Reagent (Ambion, Austin, TX, USA) според инструкции на производителот. Примероците на изолирана вкупна РНК се чуваат на температура од -70°C до понатамошна употреба.

Изолација на геномска РНК од свежо ткиво

Свежите примероци од туморското и нормално ткиво, добиени по хируршката ресекција беа чувани на температура од -80 C, до почеток на изолацијата на нуклеинските киселини.

За изолација на РНК, ткивата беа прочистени со физиолошки раствор а потоа поделени во два дела: од едниот дел беше изолирана геномска ДНК, а од другиот дел прво беше хомогенизиран во *Tri Reagent® solution* (Life Technologies) за последователна изолација на РНК. Изолацијата на вкупна РНК од ткивата, се одвиваше според протоколот од производителот кој вклучува екстракција со кисел фенол, преципитација со изоамил алкохол, испирање со 70% етанол и конечно растварање во 20-50 µl стерилна вода. Вака изолираната РНК беа веднаш складирани на -80°C.

RNA беше изолирана, од следните биоптични материјали: од 32 примероци од туморското ткиво, 32 од контралатералното, нормално ткиво и 20 од здраво (контролно) ткиво.

4.4.2. Одредување на концентрација на добиената РНК: спектрофотометриски преку одредување на апсорбанцата на 260nm бранова должина (A_{260}). Одредување на квалитетот на добиената РНК исто така спектрофотометриски преку односот A_{260}/A_{280} како индикатор на нејзината чистота.

4.4.3. Реверзна транскрипција

За оваа намена, беше користена методата на RT-qPCR (Reverse transcription – quantitative PCR, реверзна транскрипција – квантитативен PCR) користејќи комерцијални стандардизирани прајмери од фирмата Applied Biosystems. Оваа реакција се изведува во два чекори; во првиот со процесот на реверзна транскрипција секоја miRNA беше преведена во комплементарна ДНК, а потоа со квантитативен PCR беше одредена експресијата на соодветната miRNA. Од секој пациент во триплат беа анализирани примероци на РНК изолирани од туморското ткиво и контралатералната здрава лигавица. Исто така, нивото за секоја miRNA беше утврдено во РНК примероците изолирани од лигавицата на усната празнина кај здравите индивидуи без малигна болест.

Реверзната транскрипција на секоја од испитуваните miRNKi (во дупликат) се врши во посебни реакции со употреба на stem-looped RT прајмери специфични за 3' крајот од miRNKi молекулата. Реакциите на реверзна транскрипција содржат 10ng на вкупна РНК и се изведувани во

вкупен волумен од 15 μ L како што е дадено во Табела 1. Инкубацијата се врши на следниот начин: 30 минути на 16 °C и 30 минути на 42 °C; следено со 5 минути на 85 °C.

4.4.4. Квантификација на миРНК

RT-qPCR реакцијата беше изведувана во смеша од 20 μ L која содржеше 2 μ L продукт од реверзната транскрипција, 10 μ L TagMan Universal Master Mix No UNG (Applied Biosystems) и соодветни прајмери/проби специфични за секоја miRNA во вкупен волумен 20 μ L. Условите на PCR реакциите, беа следни: 2 минути на 50°C, 10 минути на 95°C и 50 последователни циклуси на 15 секунди 95°C и 1 минута на 60°C. Во текот на реакцијата беше мерено нивото на флуоресценција при што циклусот во кој се добиваше флуоресцентен сигнал за FAM флуорофорот кој е поголем од базната линија ($Ct=0.5$) се земаше за вредност за пресметка на експресијата на соодветната miRNA. Сите примероци, вклучително и калибраторот (здрavo ткиво) се испитуваа паралелно за сите миРНК и ендогената контрола (RNU6B).

4.4.5. Анализа на нивото на експресија

Пресметката за нивото на експресија на секоја miRNA во туморот и во контралатералната лигавица беше спроведено со помош на $\Delta\Delta Ct$ методот по следната формула:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{тумор/контралатерално здраво ткиво}} (Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{RNU6B}}) - \Delta Ct_{\text{здрава лигавица од пациенти без малигна болест}} (Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{RNU6B}})$

Вредноста поголема од 3 од $2^{-\Delta\Delta Ct}$ за секој примерок беше сметана за зголемена експресија, вредноста помала од 0.3 за намалена експресија, додека вредноста помеѓу 0.3 и 3 беше сметана за нормална експресија на одредена miRNA во туморското или контралатералното ткиво.

Нивоата на дерегулација на зададените miRNA и ДНА промотор метилираните гени, беа корелирани со:

- патохистолошките параметри, низ стадиумите на болеста (pT, pN, G TNM статусот од иницијалната фаза до прогресијата);
- појавата на локални рецидиви/ вратни метастази и времето на преживување постоперативно, изразено во месеци, за да се утврди нивното потенцијално прогностичко влијание на исходот од болеста.

Прогресијата на болеста и времето на преживување, беа дефинирани како упорност (појава на локални рецидиви/ вратни метастази) на болеста. Пациентите кои беа живи или починале од OSCC или други причини, беа следени до последната контрола/ клиничка посета, во 2015 год.

➤ 4.5. Статистичка обработка

По утврдување на вредностите на ДНА метилациониот статус и нивото на тумор супресивна miRNA, беше направена статистичка обработка на добиените податоци од интерес за изработката на студијата, со помош на следниве статистички методи:

- статистичките серии, според сите дефинирани варијабли од интерес се табеларно и графички прикажани;
- нумеричките (квантитативни) серии се анализирани со помош на мерките на централна тенденција (просек и медијана) и мерките на дисперзија (стандардна девијација);
- Атрибутивните статистички серии се анализирани со одредување на коефициент на односи, пропорции, стапки и со утврдување на статистичката значајност меѓу откриените разлики; Асоцијација помеѓу метилациониот статус на секој ген и клинички и патолошките варијабли, беа анализирани со многоваријантната анализа со користење на логистички модели на регресија.
- анализа на односите помеѓу атрибутивните статистички серии е направена со Pearson-овиот χ^2 – тест и Fisher exact test; Присуството на несоодветната промотор метилација во секој примерок беше прикажан со користење на добиените вредности на исклучување, а разликата помеѓу OSCC ткивата, контралатералните и здрави ткива, беа анализирани со помош на Fisher exact test;
- анализа на односите помеѓу нумеричките статистички серии е направена со Spearman – ов коефициент на корелација, бидејќи податоците беа со неправилна дистрибуција т.е. за поврзаноста на варијаблите изработен е Spearman-овиот ранг коефициент на корелација.
- тестирање на значајност на разлики помеѓу три и повеќе пропорции кај зависните примероци (во групите) е направено со Friedman Anova (анализа на варијанса);
- тестирање на значајност на разлики помеѓу две пропорции кај зависните примероци (во групите) е направено со Wilkohon Matched Pairs Test;
- тестирање на значајност на разлики помеѓу три и повеќе аритметички средини при неправилна дистрибуција на податоците, како и помеѓу три и повеќе пропорции кај независните примероци (помеѓу групите) направено е со Kruskal Wallis ANOVA;
- тестирање на значајност на разлики помеѓу две пропорции кај независните примероци (помеѓу групите) направено е со Mann Whitney U Test.

Процентуалната застапеност на ДНК метилација на секој ген беше споредена помеѓу OSCC примероците и контролните групи со користење на Mann - Whitney U Test;

- тестирање на значајност на разлики помеѓу две аритметички средини кај независните примероци (помеѓу групите) направено е со Student – t Test при правилна дистрибуција и со Mann Whitney U Test при неправилна дистрибуција на квантитативните податоци;

- дијагностичката вредност/подобност на испитуваните варијабли е одредувана со сензитивност и специфичност;

- ризик – факторите се детерминирани со одредување на Odds Ratio;

- за проценување на времето на преживување користени се Kaplan-Meier – овата крива, Log-Rank Test и Cox-овата регресија. - За сигнификантни се сметани оние резултати каде $p < 0,05$.

5. РЕЗУЛТАТИ

➤ Клинички и патохистолошки карактеристики

Во периодот од 02.05.2009 год. до 14.01.2015 година, на Клиниката за максилофацијална хирургија – Скопје беа анализирани 60 пациенти, од кои беа добиени вкупно 100 биоптични материјали.

Од нив, 40 пациенти со верифициран планоцелуларен карцином, беа подложени на хируршка ексцизија на промените и соодветна вратна дисекција според протоколот (сл. бр.6.а и 6.б). Од овие пациенти беа добиени 80 биоптични материјали: 40 од туморско ткиво и 40 од нормални контралатерални ткива, за понатамошна евалуација и компарација. Третата група се состоеше од 20 примероци од здрави ткива, од пациенти без претходна историја на малигни заболувања, за компарација во нашата студија. Сите беа патохистолошки верифицирани и понатаму проследени.

Од вкупно 40^{те} пациентите со OSCC, 32 (80,0%) беа мажи, а 8 (20,0%) беа од женски пол (табела бр.2 и слика бр.17).

При половата и старосна евалуација на 40^{те} пациентите со OSCC, најдовме дека: 32 (80,0%) беа мажи и 8 (20,0%) беа од женски пол (табела бр.1 и слика бр.1). Разликата на податоци не покажуваат разлика на кај пациенти од двата пола, но поради малиот број на жени во студијата (N = 8), овие податоците не може да бидат значајно информативни.

Табела бр.2. Дистрибуција на пациентите со OSCC според пол

пол	Број на пациенти	(%)
мажи	32	80,0
жени	8	20,0
вкупно	40	100,0

Дистрибуција на пациентите со OSCC според пол



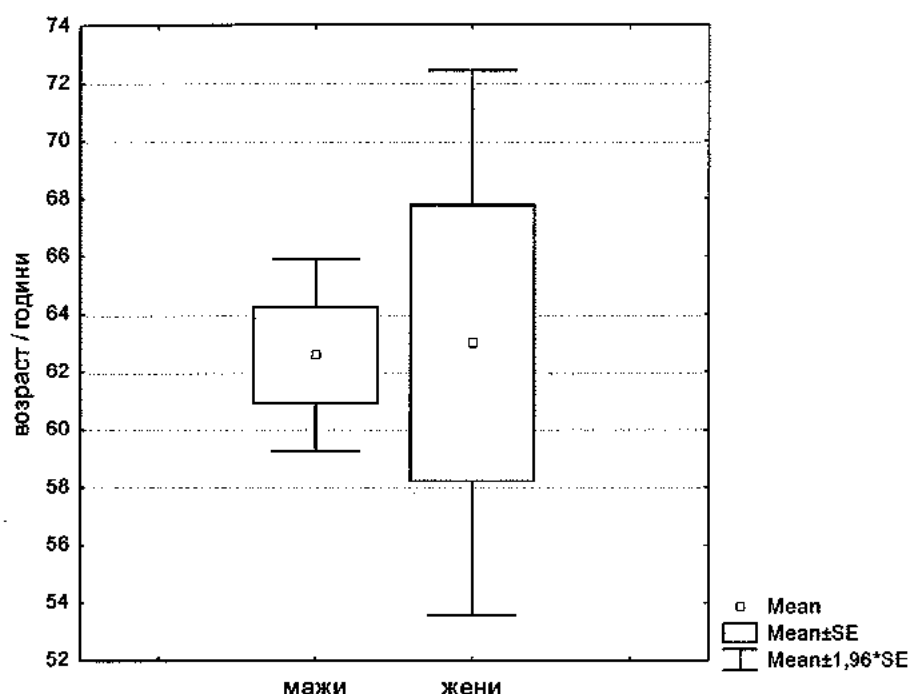
Слика бр.17. Графички приказ на дистрибуција на пациентите со OSCC според пол

Просечната возраст на пациентите со OSCC изнесуваше $62,7 \pm 10,3$ години (min = 39 год; max = 85 год). Просечната возраст на пациентите од

машкиот пол изнесуваше $62,6 \pm 9,6$ години, а за женскиот пол $63,0 \pm 13,6$ години. (табела бр.3. и слика бр.18). Нема значајна разлика во однос на возраста/староста помеѓу пациентите од машки и женски пол кои беа анализирани во студијата (Student – t test: $t = -0,105$ $p = 0,9162$).

Табела бр. 3. Средни вредности на возраста на пациентите со OSCC според пол

пол	просек	СД	Min.	Max.
мажи	62,6	9,6	39,0	85,0
жени	63,0	13,6	41,0	83,0
вкупно	62,7	10,3	39,0	85,0



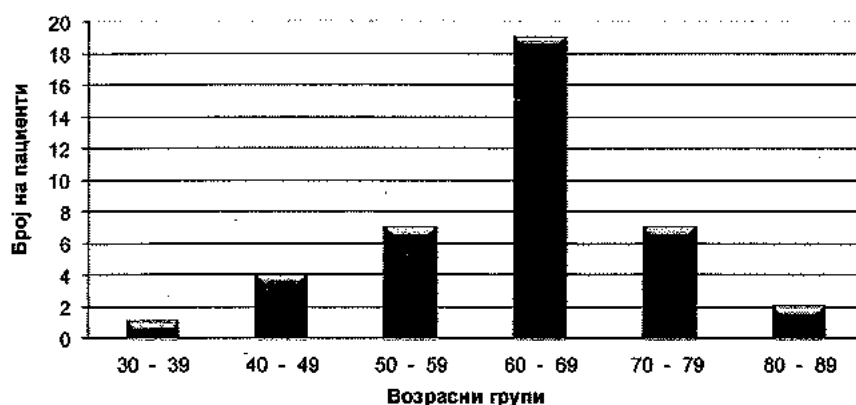
Слика бр.18. Средни вредности на возраста на пациентите со OSCC според пол

Најголем процент од пациентите со орален карцином беа на возраст од 60 до 69 години – 19(47,5%) лица. Најмладиот пациент беше од возрастната група од 30 до 39 години, а над 80 години беа 2(5%) лица. (табела бр.4, слика бр.19).

Табела бр.4. Дистрибуција на пациентите со OSCC според возрасни групи

Возрасни групи (год.)	Број на пациенти	(%)
30 - 39	1	2,5
40 - 49	4	10,0
50 - 59	7	17,5
60 - 69	19	47,5
70 - 79	7	17,5
80 - 89	2	5,0
вкупно	40	100,0

Дистрибуција на пациентите со OSCC според возрасни групи



Слика бр.19. Графички приказ на дистрибуција на пациентите со OSCC според возрасни групи

Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на локализацијата се прикажани во (табела бр.5 и слика бр.20). Најчеста локализација кај пациентите со орален карцином, со застапеност од 57,5% е локализацијата на јазик, потоа следи сублингвалниот карцином со застапеност од 17,5%, ретромоларно со 10,0%, на меко/тврдо непце со 7,5% и образ кај 7,5%, од случаите.

Табела бр.5. Дистрибуција на пациентите со OSCC во однос на локализација

локализација	Број на пациенти	(%)
јазик	23	57,5
непце	3	7,5
сублингвално	7	17,5
ретромоларно	4	10,0
образ	3	7,5
вкупно	40	100,0



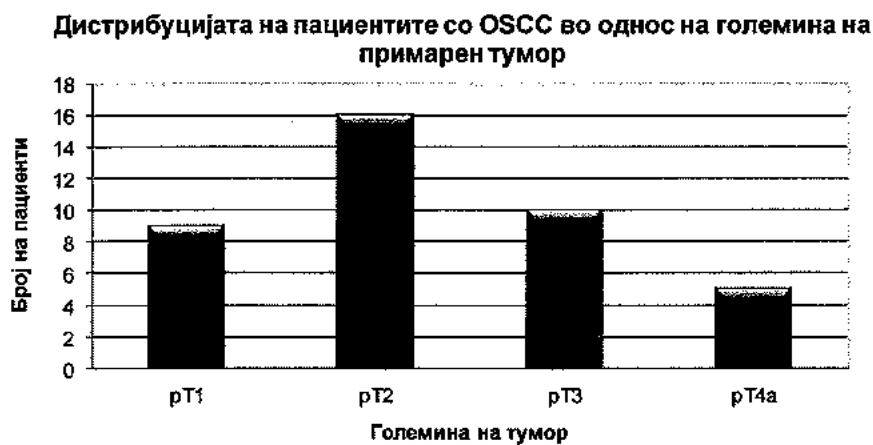
Слика бр.20. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на локализацијата

Според патохистолошкиот стадиум, во времето на поставување на дијагнозата на пациентите со OSCC, дистрибуцијата според големината на примарниот тумор беше следна: најголем број на случаи беа во pT2 – 40,0%, потоа следеше pT3 во 25,0% на случаи, pT1 во 22,5% на случаи, а pT4a беше дијагностициран кај 5(12,5%) пациенти. (табела бр. 6 и слика бр.21)

Бројот на испитаници во (pT1-pT2) почетна и развојна фаза беше 25(62,5%), а во напредната, терминална фаза (pT3-pT4), беше 15(37,5%) пациенти. Процентуалната разлика помеѓу почетна и развојна фаза (pT1 и T2), во однос на касната (напредната, терминална T3-T4) фаза е статистички сигнификантна за $p=0,0282$.

Табела бр. 6. Дистрибуција на пациентите со OSCC во однос на големина на примарен тумор

Големина на тумор	Број на пациенти	(%)
pT1	9	22,5
pT2	16	40,0
pT3	10	25,0
pT4a	5	12,5
вкупно	40	100,0

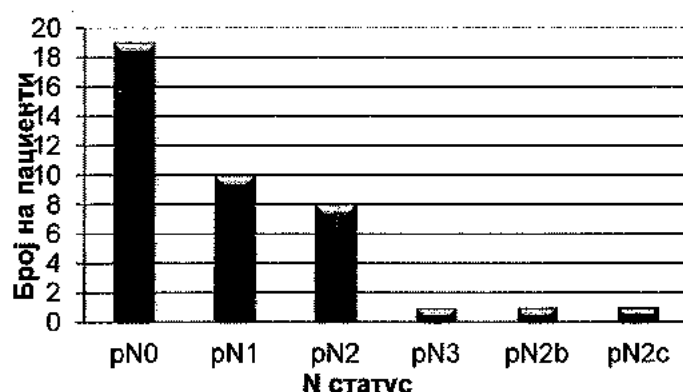


Слика бр.21. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со OSCC во однос на големина на примарен тумор

Во однос на pN - статусот по изведената дисекција на вратот, вратниот статус беше патохистолошки верифициран кај сите 40 пациенти. Според добиените наоди, во pN0-статус беа 19(47,5%) пациенти т.е. без метастази, pN1 беа 10(25%), во pN2 беа 8(20,0%) случаи. По еден од испитаниците кои беа вклучени во студијата имаа pN3, pN2b и pN2c – статус. (табела бр.7 и слика бр.22) Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу pN0 и pN1 е значајна за $p = 0,0358$, помеѓу pN0 и pN2 е значајна за $p = 0,0099$, а помеѓу pN0 и останатите модалитети на N - разликата е статистички значајна за $p < 0,00001$.

Табела бр. 7. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на N статус

N - стадиум	Број на пациенти	(%)
pN0	19	47,5
pN1	10	25,0
pN2	8	20,0
pN3	1	2,5
pN2b	1	2,5
pN2c	1	2,5
вкупно	40	100,0



Слика бр.22. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на N-стејџинг

Од вкупно 40 пациенти со OSCC, кај 21 пациент (52,5%) немаше далечни метастази (pM0), а кај останатите 19(47,5%) лица далечни метастази неможеше да се одредат - pMx. (табела бр. 8 и слика бр.23) Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу pM0 и pMx не е значајна за $p = 0,6559$.

Табела бр. 8. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на далечни метастази (M)

M – далечни метастази	Број на пациенти	(%)
pM0	21	52,5
pMx	19	47,5
вкупно	40	100,0

Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на далечни метастази (M)



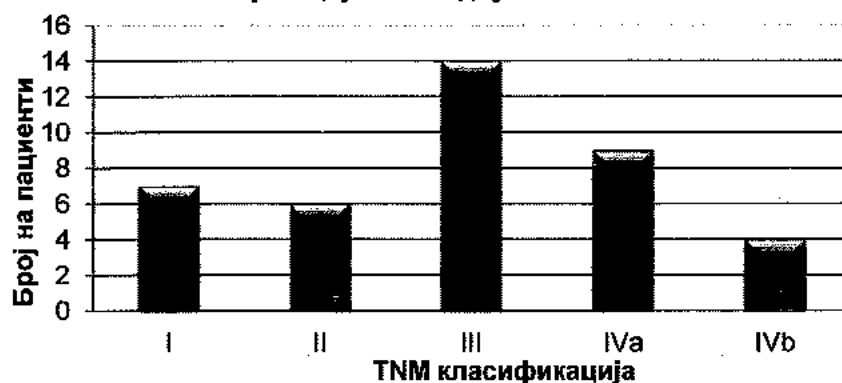
Слика бр.23. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на далечни метастази (M).

Во однос на TNM стадиумот, 7(17,5%) пациенти беа во I стадиум на болеста, 6(15%) во II стадиум, 14(35%) во III стадиум и 13(32,5%) пациенти во IV стадиум на болеста. Пациентите во I и II стадиум на болеста(32,5%), се значајно помалку во однос на пациентите (67,5%) во III и IV стадиум ($p = 0,0032$). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу пациентите во III и IV стадиум на болеста не е значајна ($p = 0,8137$). (табела бр. 9 и слика бр.24).

Табела бр. 9. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на TNM класификацијата / стадиумот

TNM - стадиум	Број на пациенти	(%)
I	7	17,5
II	6	15,0
III	14	35,0
IVa	9	22,5
IVb	4	10,0
вкупно	40	100,0

Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на TNM класификацијата / стадиумот



Слика бр.24. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на TNM класификацијата / стадиумот

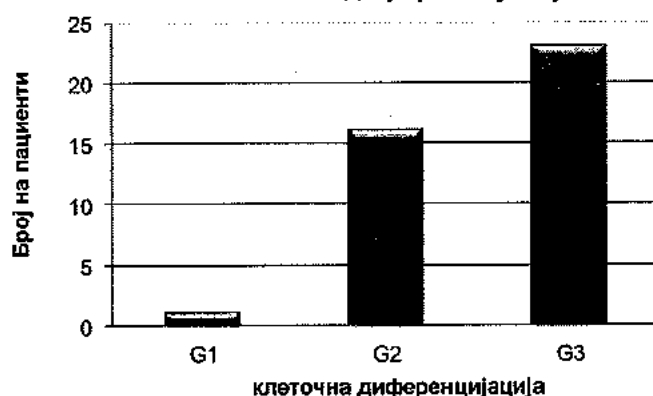
Хистопатолошки, туморите биле класифицирани кај 1(2,5%) како добро диференциран карцином (G1), 16 (40,0%) како умерено диференциран карцином (G2), а 23(57,5%) лошо диференциран карцином (G3). (табела бр.10 и слика бр.25).

Процентуалната разлика која се регистрираше помеѓу клеточната диференцијација - G2 и G3 стадиумот не е значајна ($p = 0,1114$). Кај нашите пациенти, умерено и лошо диференцираниот карцином (G2 и G3) беа значајно позастапени во однос на добро диференцираниот карцином (G1) за $p = 0,0001$.

Табела бр.10. Дистрибуција на пациентите со орален карцином во однос на клеточната диференцијација според (Broders staging)

G – клеточна диференцијација	Број на пациенти	(%)
G1	1	2,5
G2	16	40,0
G3	23	57,5
вкупно	40	100,0

Дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на клеточната диференцијација



Слика бр.25. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите со орален карцином во однос на клеточната диференцијација

Во нашата студија, најголем процент на испитаници со орален карцином, беа мажи (80%), на возраст од 60-69год., со локализација на јазик – 57,5%, во раната фаза (T1 и T2) – 62,5%, N0 – 47,5%, stage III и IV – 67,5%, со лоша клеточна диференцијација во G3 – 57,5%

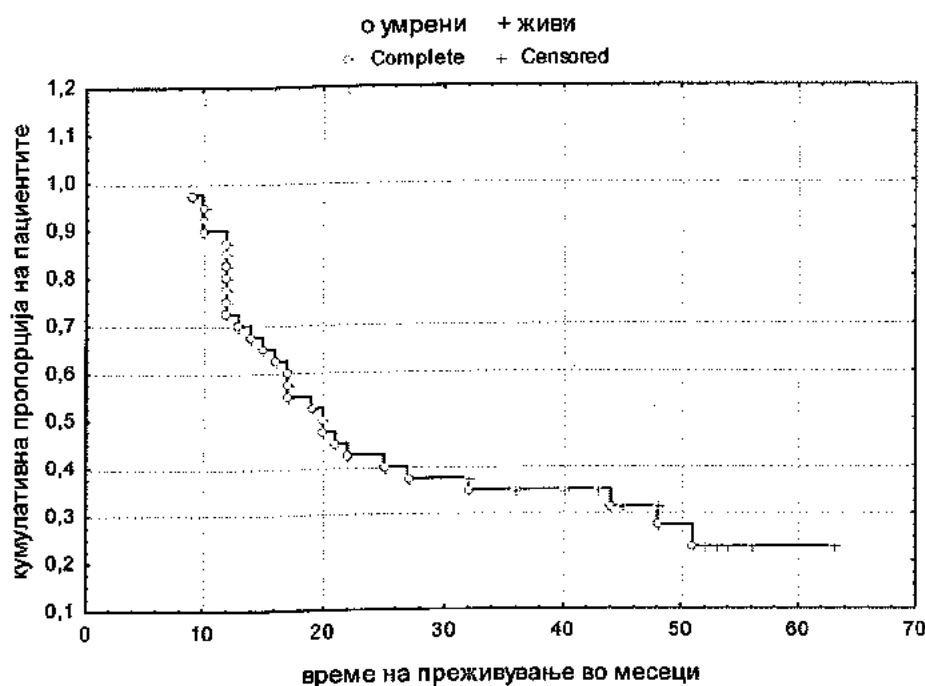
Хируршката ексцизија на туморите, придружена со вратна дисекција, проследена со радио/ или хемотерапија според протоколот (Сл.бр.6 и 7), беше изведена кај сите (100%) пациенти, а потоа следеше период на обсервација.

Времетраењето на следење беше со средна вредност од $27,1 \pm 16,6$ месеци, минимум 9 месеци и максималното времетраење на контролирање на пациентите од 63 месеци – 5 години.

Рекурентност се појави кај 29 (72,5%) пациенти, во смисол на појава на локални рецидиви и вратни метастази. Времето на првата клиничка манифестација на рекурентност на болеста, постоперативно, т.е. времето на појава на првите знаци на рецидивантност (локални или регионална- вратни метастази) беше просечно 8,6 месеци (минимум по 1,5 месеци и максимум по 31 месец).

Во најкраток пост оперативен период (2 до 6 месеца), појавата на рецидиви беше дијагностицирана кај 12(30%) пациенти кои беа во напредната фаза на болеста (T3-T4 стадиум), stage III и IV и со слаба клеточна диференцијација (G3).

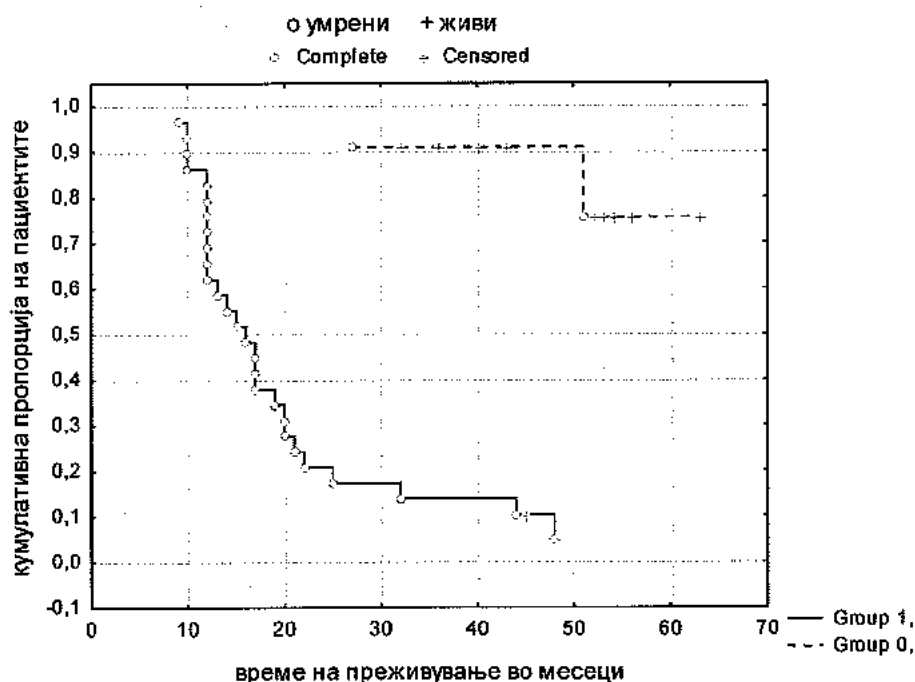
Од вкупно 40 пациенти со OSCC кои беа вклучени во студијата, 29(72,5%) пациенти починаа за време на следењето, а останатите 11(27,5%) се сеуште живи. Главната причина за смртен исход кај пациентите, беше OSCC, а 1 пациент, имаше коморбидитет со друга болест (инсулт), но со метастази на последната контрола, па затоа и тој беше вброен во групата на пациенти кои починале од орален карцином.



Слика бр.26. Kaplan-Meier – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC

Според Kaplan-Meier – овата крива, 40% од пациенти со OSCC преживуваат повеќе од 24 месеца, а 23% од пациентите преживуваат повеќе од 60 месеци.

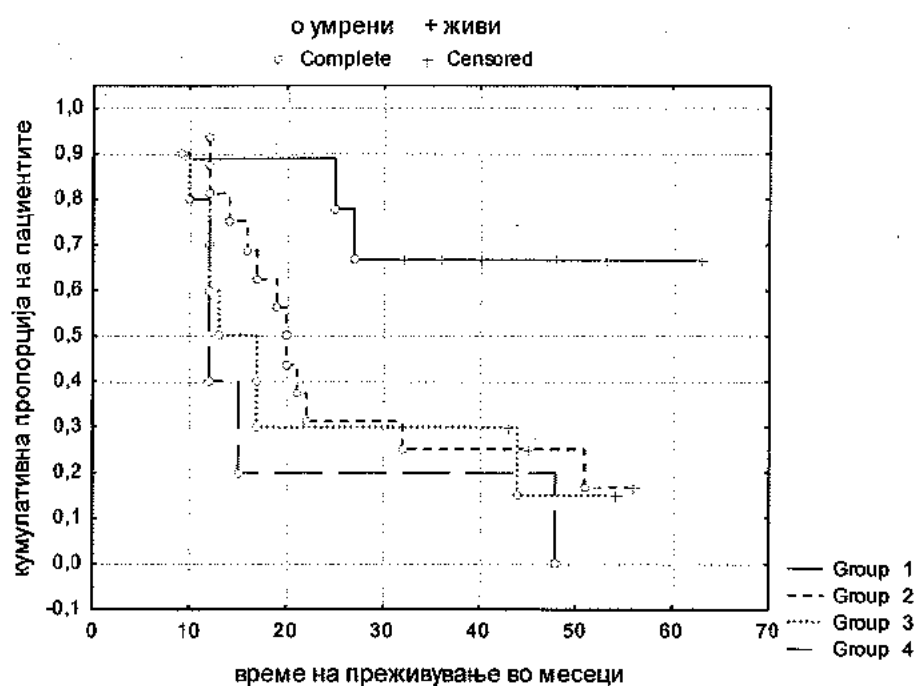
На сл.бр. 27 е прикажана Kaplan-Meier – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC во зависност од појавата на метастази. Според кривата, 76% од пациентите без метастази преживуваат повеќе од 60 месеци. Кај пациентите кај кои се појавиле метастази, смртен исход, воглавно се регистрира во првите 8 до 24 месеци, а 14% од пациентите преживуваат до 48 месеци. (сл.бр.27).



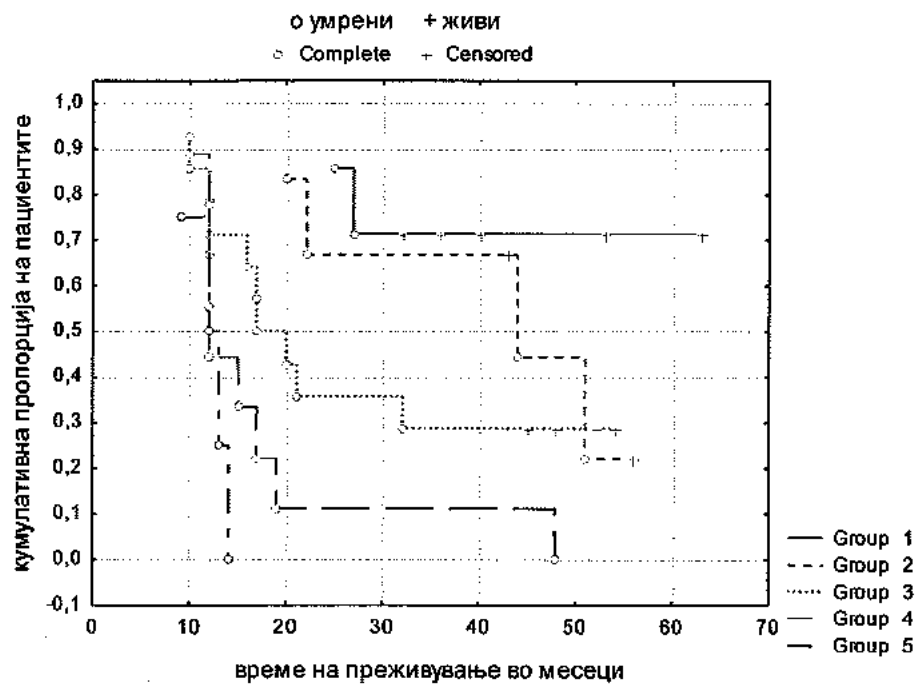
Слика бр. 27. Kaplan-Meier – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC во зависност од појава на метастази

Според Kaplan-Meier – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC во однос на големината на примарниот тумор (слика бр. 28), 68% од пациентите со pT1 и 18% од пациентите со pT2 преживуваат повеќе од 60 месеци, 15% од пациентите со pT3 преживуваат повеќе од 60 месеци, а 20% од пациентите со pT4 преживуваат до 48 месеци.

На слика бр.29, е прикажана Kaplan-Meier – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC во зависност од TNM класификацијата / стадиумот. Според кривата, 72% од пациентите во I стадиум на болеста преживуваат повеќе од 60 месеци. 42% од пациентите во II стадиум на болеста преживуваат повеќе од 48 месеци. 28% од пациентите во III стадиум на болеста преживуваат повеќе од 48 месеци. 12 % од пациентите во IVa стадиум преживуваат повеќе од 36 месеци, а 25 % од болните во IVb стадиум на болеста преживуваат повеќе од 12 месеци.



Слика бр.28. Kaplan-Meier – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC во зависност од pT



Слика бр. 29. Kaplan-Meier – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC во зависност од TNM класификацијата / стадиумот

DNA метилација на гените

➤ **Анализа на ген промотор хиперметилацијата на ECDH, MGMT, DAP-K, RARB2 и CDKN2A1(p16) гените во OSCC**

По утврдувањето на клиничките и патохистолочките параметри, како и зависноста помеѓу нив, беа идентификувани DNA метилационните нивоа на p16, MGMT, DAP-K и E-cadherin и RAR β 2 гените во OSCC.

Нивото на ДНК метилацијата во гените, беше потврдено во проширениот панел на биоптични примероци ($n = 100$). Широкиот спектар на CpG метилациони модели, кои се движеше од целосно метилирани (M+) до неметилирани (M-), го демонстриравме во динамичен опсег и со статистички значајни диференцијални метилационни разлика помеѓу туморите и нормалните, контралатерални ткива, во однос на примероците од здраво ткиво за сите гени одделно.

Од трите групи на биоптичните примероци: I група ($n=40$) туморски ткива; II група ($n=40$) составена од контралатерални, нормални ткива, земени од истите пациенти, патохистолошки верифицирани, и III група ($n=20$) биопсии од здрави индивидуи. За интерпретација на метилационните модели за p16, E-cadherin, DAPK, MGMT и RAR β 2, беа добиени 40, 39, и 20 примероци, соодветно. Тие беа понатаму анализирани и евалуирани, а останатите беа неуспешни при изведување на пробите и не беа вклучени во студијата. Понатаму бисулфитната модификација на ДНК /qMSP и MSPCR, за секој ген поединечно, го покажа следното.

Процентот на метилација на петте избрани гени, во оваа студија во 40^{те} примероци од оралниот карцином изнесуваше: за Ecadherin- 90%, за MGMT- 75%, за DAPK - 75%, за RARB2 - 62,5% и за CDKN2A1(p16)- 52,5%. (Табела бр.11.а)

Во табела бр.11 е прикажана дистрибуцијата на несоодветно промотор метилација во DNA ткивата кај 40 пациенти со OSCC. Секоја колона претставува пациентот, а секој ред метилација статус на дадениот ген во ткивата. Црната засенчена боја укажува на промотор хиперметилацијата, а бела боја покажува недостаток на метилација.

Табела бр.11.а) метилационен статус во OSCC примероците

а)	туморско ткиво					
	ACTB	ECDH	MGMT	DAPK	RARB2	P16
M 03						
M 04						
M 05						
M 06						
M 07						
M 08						
M 09						
M 10						
M 11						
M 12						
M 13						
M 14						
M 15						
M 16						
M 17						
M 18						
M 19						
M 20						
M 21						
M 22						
M 23						
M 24						
M 25						
M 27						
M 28						
M 29						
M 30						
M 31						
M 32						
M 33						
M 35						
M 36						
M 37						
M 38						
M 40						
M 44						
M 45						
M 46						
M 47						
M 48						

Вкупно во OSCC биоптичните примероци (n=40), беа метилирани M+ (71%), од вкупните гени (142/200).Најчесто метилирани гени во туморските примероци беше Ecadherin(90%), MGMT(75%), за DAPK (75%), потоа следеше RARB2 (62,5%), а најретко метилирани беа промоторите на p16 гените - CDKN2A1(p16) кај 52,5%. Неметилирани гени, M - во OSCC беа најдени вкупно кај (29%) гени (58/200).

Табела бр. 11.6) дистрибуција на метилационниот статус во нормалните, контралатерални ткива

б)	нормално ткиво од контралатерална страна					
	ACTB	ECDH	MGMT	DAPK	RARB2	CDKN2A
M 03						
M 04						
M 05						
M 06						
M 07						
M 08						
M 09						
M 10						
M 11						
M 12						
M 13						
M 14						
M 15						
M 16						
M 17						
M 18						
M 19						
M 20						
M 21						
M 22						
M 23						
M 24						
M 25						
M 27						
M 28						
M 29						
M 30						
M 31						
M 32						
M 33						
M 35						
M 36						
M 37						
M 38						
M 40						
M 44						
M 45						
M 46						
M 47						
M 48						

Во контролните, нормални ткива (n=39), метилација беше регистрирана кај 89,7% за ECDH, кај 74,4% за MGMT, кај 33,3% за DAPK, кај 87,2% за RARB2 и кај 7,7% за CDKN2A1(p16). (Табела бр.11.6)

Од сумирањето на метилационните профили на секој од петте гени за OSCC, метилираните гени беа категоризирани како метилирани за било која вредност поголема од нула.

Најчесто метилирани гени во втората група, во нормалните контралатерални примероци беа: E-cadherin (ECDH) со 89,7%, потоа RAR β 2 со 87,2%, MGMT со

74,4%, потоа следеше DAPK со 33,3% и CDKN2A1(p16) со 7,7% кои беа најретко метилирани.

Во нормалните, контралатерални биоптични примероци (n=39), беа метилирани M+ (58%), од вкупните гени (114/195). Неметилирани гени беа најдени вкупно 42% (81/195).

Табела бр.11. в) Дистрибуција на метилационниот статус кај здравите индивидуи, без претходна историја за малигни заболувања

в)	здрави примероци					
	ACTB	ECDH	MGMT	DAPK	RARB2	P16
M 56						
M 58						
M 59						
M 60						
M 61						
M 62						
M 63						
M 64						
M 65						
M57						
M66						
M67						
M68						
M69						
M70						
M71						
M72						
M73						
M74						
M75						

Во здравите ткива, метилација беше регистрирана само кај еден пациент за MGMT - 5%, а сите останати беа неметилирани (Табела бр.11.в). Вредноста на метилација во оваа група на пациенти беше 1% (1/100).

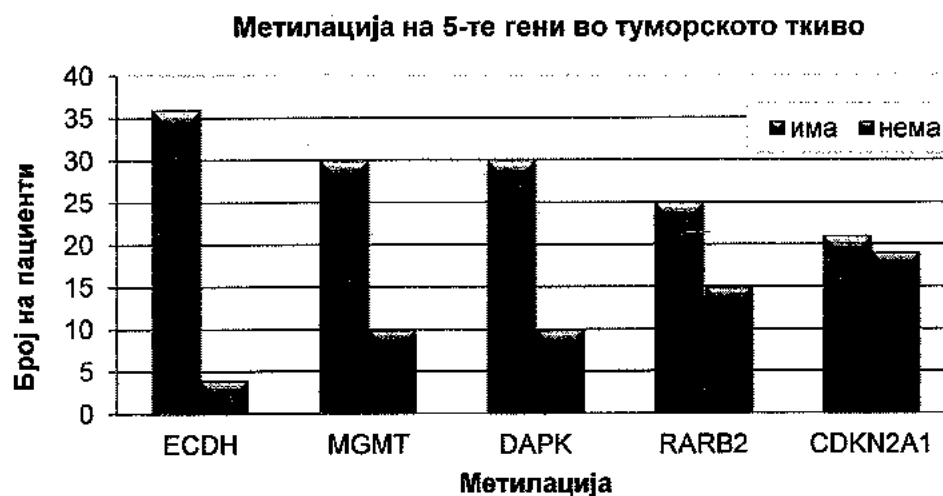
Во OSCC биоптичните примероци (n=40), беа метилирани (M+) 71% од вкупните гени (142/200). Во нормалните контралатерални ткива (n=39), беа метилирани (M+) 58% од вкупните гени (114/195). Во однос на метилацијата на вкупните гени, помеѓу OSCC биоптичните примероци и нормалните контралатерални ткива постои статистички значајна разлика за $p = 0,0072$. Хиперметилацијата присутна кај 71% во OSCC, во однос на наодот на метилирани гени (1%) во здравите ткива е многу значајно поголема ($p = 0,00000$), што значи дека хиперметилацијата има клучна улога во карциногенезата на OSCC.

Во табелата бр.12, се прикажани процентите на метилација на петте избрани гени во 40^{те} примероци од оралниот карцином. Постои статистички значајна разлика во однос на метилацијата помеѓу 5-те гени во примероците од

оралниот карцином (Friedman Anova: Chi Sqr.=17,698 $p = 0,00141$). Во табелата 12а е дадена значајноста на разликите во однос на метилацијата помеѓу гените, поединечно. Анализата покажа дека во туморското ткиво, само Ecadherin-от значајно повеќе метилира во однос на RARB2 и на p16. Помеѓу другите гени, разликите во однос на метилацијата не се статистички значајни. (табела бр. 12, слика 30 и табела бр.12а)

Табела бр.12. Метилација на 5-те гени во туморското ткиво

метилација	ECDH	MGMT	DAPK	RARB2	CDKN2A1
има	36 (90%)	30 (75%)	30 (75%)	25 (62,5%)	21 (52,5%)
нема	4 (10%)	10 (25%)	10 (25%)	15 (37,5%)	19 (47,5%)



Слика бр.30. Метилација на 5-те гени во туморското ткиво

Табела бр.12а. Значајност на разлики во однос на метилацијата помеѓу 5-те гени во туморското ткиво

Споредувани гени	Wilcoxon Matched Pairs Test (p)
ECDH & MGMT	$p = 0,0926$
ECDH & DAPK	$p = 0,0926$
ECDH & RARB2	$p = 0,0071^*$
ECDH & CDKN2A1	$p = 0,0013^*$
MGMT & DAPK	$p = 1,0$
MGMT & RARB2	$p = 0,2868$
MGMT & CDKN2A1	$p = 0,0701$
DAPK & RARB2	$p = 0,2213$
DAPK & CDKN2A1	$p = 0,0853$
RARB2 & CDKN2A1	$p = 0,3793$

*статистички значајна разлика

Табела бр. 12.6. Асоцијација помеѓу 5-те гени во туморското ткиво

гени	MGMT	DAPK	RARB2	CDKN2A1
ECDH	p=0,0697 ; OR=3,3 95% CI = 0,85 -10,54	p=0,0697 ; OR=3,3 95% CI = 0,85 -10,54	p=0,0038 ; OR=5,4 95% CI = 1,60 -18,20	p=0,0002 ; OR=8,14 95% CI = 2,44 -27,17
MGMT		p=1,0 ; OR=1 95% CI = 0,36 -2,75	p=0,2278 ; OR=1,80 95% CI = 0,68 -4,70	p=0,0363 ; OR=2,71 95% CI = 1,05 -6,99
DAPK			p=0,2278 ; OR=1,80 95% CI = 0,68 -4,70	p=0,0363 ; OR=2,71 95% CI = 1,05 -6,99
RARB2				p=0,3657 ; OR=1,50 95% CI = 0,61 -3,67

Кај нашите испитаници, анализата за асоцијацијата во однос на метилацијата помеѓу 5-те гени во туморското ткиво (табела 116) ги покажа следните резултати:

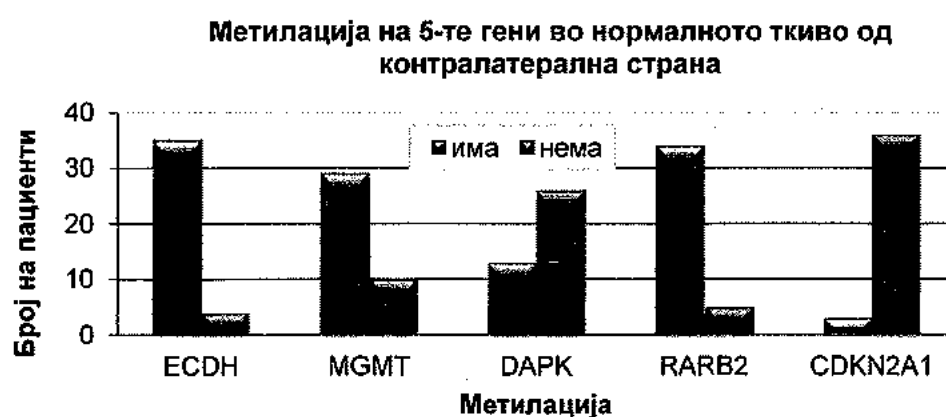
- ✓ Помеѓу ECDH и MGMT непостои асоцираност во однос на метилацијата во туморското ткиво (Fisher exact test: $p = 0,0697$; $CI = 95\% 0,85 < OR < 10,54$);
- ✓ Помеѓу ECDH и DAPK непостои асоцираност во однос на метилацијата во туморското ткиво (Fisher exact test: $p = 0,0697$; $CI = 95\% 0,85 < OR < 10,54$);
- ✓ *Помеѓу ECDH и RARB2 постои асоцираност во однос на метилацијата во туморското ткиво (Fisher exact test: $p = 0,0038$; $CI = 95\% 1,60 < OR < 18,20$);
- ✓ *Помеѓу ECDH и CDKN2A1 постои асоцираност во однос на метилацијата во туморското ткиво (Fisher exact test: $p = 0,0002$; $CI = 95\% 2,44 < OR < 27,17$);
- ✓ Помеѓу MGMT и DAPK непостои асоцираност во однос на метилацијата во туморското ткиво (Pearson Chi-squ.=0,0 $p = 1,0$; $CI = 95\% 0,36 < OR < 2,75$);
- ✓ Помеѓу MGMT и RARB2 непостои асоцираност во однос на метилацијата во туморското ткиво (Pearson Chi-squ.=1,45 $p = 0,2278$; $CI = 95\% 0,68 < OR < 4,70$);
- ✓ *Помеѓу MGMT и CDKN2A1 постои асоцираност во однос на метилацијата во туморското ткиво (Pearson Chi-squ.=4,38 $p = 0,0363$; $CI = 95\% 1,05 < OR < 6,99$);
- ✓ Помеѓу DAPK и RARB2 непостои асоцираност во однос на метилацијата во туморското ткиво (Pearson Chi-squ.=1,45 $p = 0,2278$; $CI = 95\% 0,68 < OR < 4,70$);
- ✓ *Помеѓу DAPK и CDKN2A1 постои асоцираност во однос на метилацијата во туморското ткиво (Pearson Chi-squ.=4,38 $p = 0,0363$; $CI = 95\% 1,05 < OR < 6,99$);
- ✓ Помеѓу RARB2 и CDKN2A1 непостои асоцираност во однос на метилацијата во туморско ткиво (Pearson Chi-squ.=0,82 $p = 0,3657$; $CI = 95\% 0,61 < OR < 3,67$);

Во табела 13 се прикажани процентите на метилација на петте гени во 39^{те} примероци во нормалното, контралатерално ткиво. Постои статистички значајна разлика во однос на метилацијата помеѓу 5-те гени во примероците од контралатералната здрава страна (Friedman Anova: Chi Sqr.=85,191 $p = 0,000001$). Во табелата 13а е дадена значајноста на разликите во однос на метилацијата помеѓу гените. Во примероците на нормалното ткиво од контралатерална страна, разликите во однос на метилацијата не се статистички значајни само помеѓу ECDH и MGMT, како и помеѓу ECDH и RARB2. (табела бр. 13, слика 31 и табела бр.13а)

- ECDH значајно повеќе метилира во однос на DAPK и CDKN2A1.
- MGMT значајно повеќе метилира во однос на RARB2 и CDKN2A1
- RARB2 значајно повеќе метилира во однос на DAPK и CDKN2A1
- DAPK значајно повеќе метилира во однос на CDKN2A1

Табела бр.13. Метилација на 5-те гени во нормалното, контралатерално ткиво

метилација	ECDH	MGMT	DAPK	RARB2	CDKN2A1
има	35 (89,7%)	29 (74,4%)	13 (33,3%)	34 (87,2%)	3 (7,7%)
нема	4 (10,3%)	10 (25,6%)	26 (66,7%)	5 (12,8%)	36 (92,3%)



Слика бр.31. Метилација на 5-те гени во нормалното ткиво од контралатерална страна. (столбест дијаграм – абсолютен број)

Табела бр.13.а. Значајност на разлики во однос на метилацијата помеѓу 5-те гени во нормално ткиво од контралатерална страна

Споредувани гени	Wilkohon Matched Pairs Test (p)
Ecadherin & MGMT	p = 0,0926
Ecadherin & DAPK	p = 0,00004*
Ecadherin & RARB2	p = 0,7353
Ecadherin & p16	p = 0,000001*
MGMT & DAPK	p = 0,0017*
MGMT & RARB2	p = 0,0431*
MGMT & p16	p = 0,000008*
DAPK & RARB2	p = 0,0002*
DAPK & p16	p = 0,0050*
RARB2 & p16	p = 0,000001*

*статистички значајна разлика

Кај испитаниците кои беа вклучени во студијата, анализата за асоцијацијата во однос на метилацијата помеѓу 5-те гени во нормалното ткиво од контралатералната страна (табела 136) ги покажа следните резултати:

Табела бр.13.6. Асоцијација помеѓу 5-те гени во нормалното ткиво од контралатералната страна

гени	MGMT	DAPK	RARB2	CDKN2A1
Ecadherin	p=0,0693 ; OR=3,0 95% CI = 0,85 -10,63	p=0,00001 ; OR=17,5 95% CI = 5,11 -59,88	p=0,5003 ; OR=1,28 95% CI = 0,31 -5,20	p=0,000001 ; OR=105 95% CI = 21,89 -503,49
MGMT		p=0,0003 ; OR=5,8 95% CI = 2,17 -15,44	p=0,1509 ; OR=0,42 95% CI = 0,13 - 1,39	p=0,000001 ; OR=34,8 95% CI = 8,75 - 138,30
DAPK			p=0,00001 ; OR=0,07 95% CI = 0,02 - 0,23	p=0,0050 ; OR=6,0 95% CI = 1,55 - 23,21
RARB2				p=0,000001 ; OR=81,6 95% CI = 18,09 - 367,9

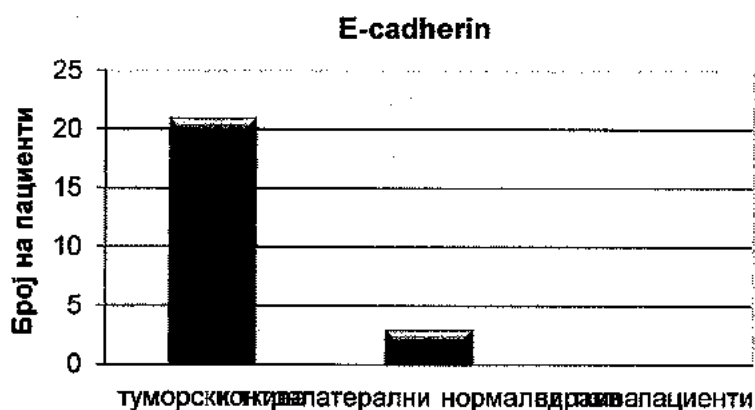
- ✓ Помеѓу Ecadherin и MGMT непостои асоцираност во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Fisher exact test: $p = 0,0692$; CI = 95% $0,85 < OR < 10,63$);
- ✓ *Помеѓу Ecadherin и DAPK постои асоцираност во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Fisher exact test: $p = 0,00001$; CI = 95% $5,11 < OR < 59,88$);
- ✓ Помеѓу Ecadherin и RARB2 непостои асоцираност во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Fisher exact test: $p = 0,5003$; CI = 95% $0,31 < OR < 5,20$);
- ✓ *Помеѓу Ecadherin и p16 постои асоцираност во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Fisher exact test: $p = 0,00001$; CI = 95% $21,89 < OR < 503,49$);
- ✓ *Помеѓу MGMT и DAPK постои асоцираност во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Pearson Chi-squ.=13,21 $p = 0,0003$; CI = 95% $2,17 < OR < 15,44$);
- ✓ Помеѓу MGMT и RARB2 непостои асоцираност во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Pearson Chi-squ.=2,06 $p = 0,1509$; CI=95% $0,13 < OR < 1,39$);
- ✓ *Помеѓу MGMT и p16 постои асоцираност во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Fisher exact test: $p = 0,00001$ CI=95% $8,75 < OR < 138,30$);
- ✓ *Помеѓу DAPK и RARB2 постои асоцираност во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Pearson Chi-squ.= 23,61 $p = 0,00001$; CI=95% $0,02 < OR < 0,23$);
- ✓ *Помеѓу DAPK и p16 постои асоцираност во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Fisher exact test: $p = 0,0050$; CI=95% $1,55 < OR < 23,21$);
- ✓ *Помеѓу RARB2 и CDKN2A1 постои асоцираност во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Fisher exact test: $p=0,000001$; CI=95% $18,09 < OR < 367,96$);

Вредноста на E-cadherin во OSCC и нормалните контралатерални ткива, во однос на истиот во здравите ткива покажа статистички значајни разлики помеѓу трите групи.

Анализата помеѓу трите групи во однос на ECDH (E-cadherin) , покажа дека хиперметилација на E-cadherin гените во OSCC дијагностицираните примероци беше најдена кај 36(90%) пациенти, во контралатералните нормални ткива кај 35(89,7%), а во здравите ткива 0%, односно, немаше метилација. Разликата помеѓу трите испитувани групи во однос на E-cadherinot е статистички значајна (Kruskal-Wallis test: $H = 57,376$ $p = 0,0000$). Всушност, разликата во метилирањето на E-cadherinot е статистички значајна помеѓу примероците од туморското ткиво и ткивото од здравите пациенти ($p=0,0000$), како и помеѓу примероците од контралатералните нормални ткива и здравите ткива ($p=0,0000$). Разликата во однос на метилирањето на E-cadherinot помеѓу примероците од туморското ткиво и примероците од контралатералното нормално ткиво не е статистички значајна (Mann-Whitney U Test: $Z = 0,019$ $p = 0,9843$) (табела бр.14 и слика бр.32.) .

Табела бр.14. Аберантна метилација на ECDH гените во туморските ткива, во контралатералните нормални ткива и здравите ткива

Групи на биоптични примероци	ECDH метилирани гени
туморски ткива	36/40 (90%)
контралатерални нормални ткива	35/39 (89,7%)
здрави пациенти(n=20)	0/20 (0%)



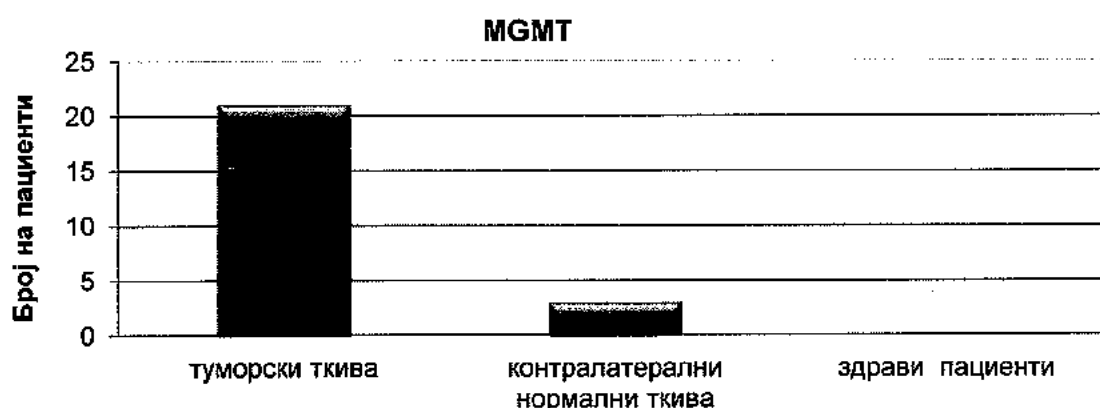
Слика бр.32. Аберантна метилација на ECDH гените во туморските ткива, во контралатералните нормални ткива и здравите ткива

Анализата помеѓу трите групи во однос на MGMT, покажа дека хиперметилација на овие гени во OSCC дијагностицираните примероци беше најдена кај 30(75%) пациенти, во контралатералните нормални ткива кај 29(74,4%), а во здравите ткива кај 1(5%) лице. Разликата помеѓу трите испитувани групи во однос на MGMT е статистички значајна (Kruskal-Wallis test: $H = 32,134$ $p = 0,0000$). Разликата во метилирањето на MGMT е статистички

значајна помеѓу примероците од туморското ткиво и ткивото од здравите пациенти ($p=0,000011$), како и помеѓу примероците од контралатералните нормални ткива и здравите ткива ($p=0,000015$). Разликата во однос на метилирањето на MGMT помеѓу примероците од туморското ткиво и примероците од контралатералното нормално ткиво не е статистички значајна (Mann-Whitney U Test: $Z = 0,049$ $p = 0,9608$) (табела бр.15 и слика бр.33.)

Табела бр.15. Аберантна метилација на MGMT гените во туморските ткива, во контралатералните нормални ткива и здравите ткива

Групи на биоптични примероци	MGMT метилирани гени
туморски ткива	30/40 (75%)
контралатерални нормални ткива	29/39 (74,4%)
здрави пациенти(n=20)	1/20 (5%)



Слика бр.33. Аберантна метилација на MGMT гените во туморските ткива, во контралатералните нормални ткива и здравите ткива

Значително почести метилации на DAPK, беа пронајдени во туморските и контралатералните нормални ткива, во споредба со здравите ткива. Анализата помеѓу трите групи на биоптични материјали, во однос на DAPK, покажа дека хиперметилација на овие гени во OSCC дијагностицираните примероци беше најдена кај 30(75%) пациенти, во контралатералните нормални ткива кај 13(33,3%), а во здравите ткива немаше метилација.

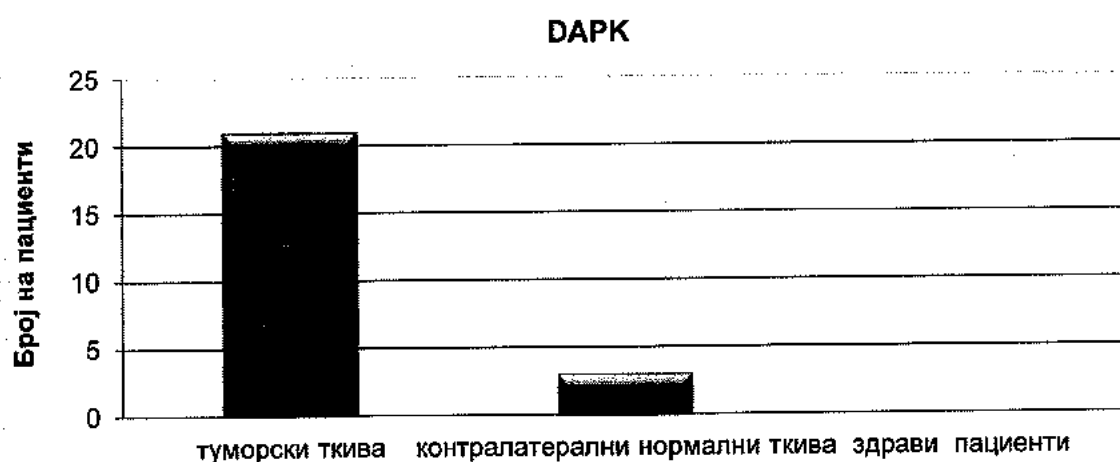
Разликата помеѓу трите испитувани групи во однос на DAPK е статистички значајна (Kruskal-Wallis test: $H = 29,377$ $p = 0,0000$). Разликата во метилирањето на DAPK е статистички значајна помеѓу примероците од туморското ткиво и ткивото од здравите пациенти ($p=0,0000$), како и помеѓу примероците од контралатералните нормални ткива и здравите ткива ($p=0,0000$).

Во однос на метилирањето на DAPK, помеѓу примероците од туморското ткиво и примероците од контралатералното нормално ткиво, постои

статистички значајна разлика (Mann-Whitney U Test: $Z = 3,186$ $p = 0,0014$)
(табела бр.16 и слика бр.34.)

Табела бр.16. Аберантна метилација на DAPK гените во туморските ткива, во контралатералните нормални ткива и здравите ткива

Групи на биоптични примероци	DAPK метилирани гени
туморски ткива	30/40 (75%)
Контралатерални нормални ткива	13/39 (33,3%)
здрави пациенти (n = 20)	0/20 (0%)



Слика бр.34. Аберантна метилација на DAPK гените во туморските ткива, во контралатералните нормални ткива и здравите ткива .

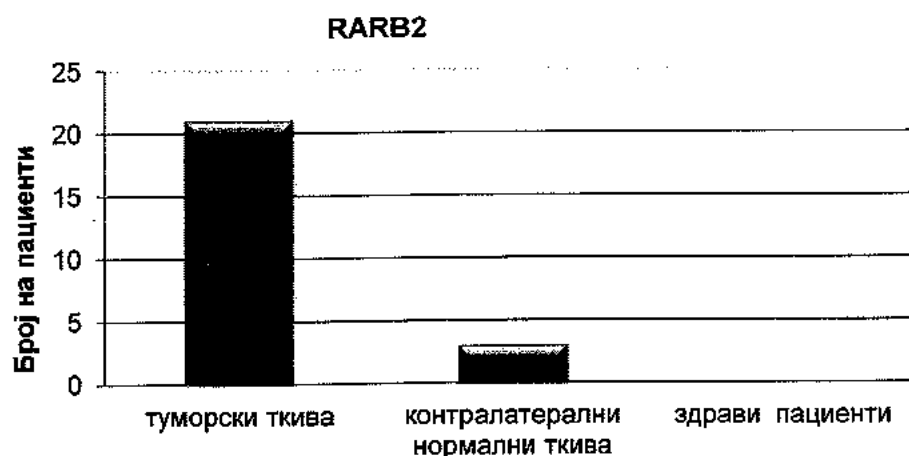
Анализата помеѓу трите групи во однос на RARB2, покажа дека хиперметилација на овие гени во OSCC дијагностицираните примероци беше најдена кај 25 (62,5%) пациенти, во контралатералните нормални ткива кај 34 (87,2%), а во здравите ткива немаше метилација. Разликата помеѓу трите испитувани групи во однос на RARB2 е статистички значајна (Kruskal-Wallis test: $H = 37,117$ $p = 0,0000$). Разликата во метилирањето на RARB2 е статистички значајна помеѓу примероците од туморското ткиво и ткивото од здравите пациенти ($p=0,0000$), како и помеѓу примероците од контралатералните нормални ткива и здравите ткива ($p=0,0000$).

Во однос на метилирањето на RARB2, помеѓу примероците од туморското ткиво и примероците од контралатералното нормално ткиво, постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney U Test: $Z = -2,506$ $p = 0,0122$) (табела бр.17 и слика бр.35.)

Табела бр.17. Аберантна метилација на RARB2 гените во туморските ткива, во контралатералните нормални ткива и здравите ткива

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

Групи на биоптични примероци	RARB2 метилирани гени
туморски ткива	25/40 (62,5%)
контралатерални нормални ткива	34/39 (87,2%)
здрави пациенти(n=20)	0/20 (0%)

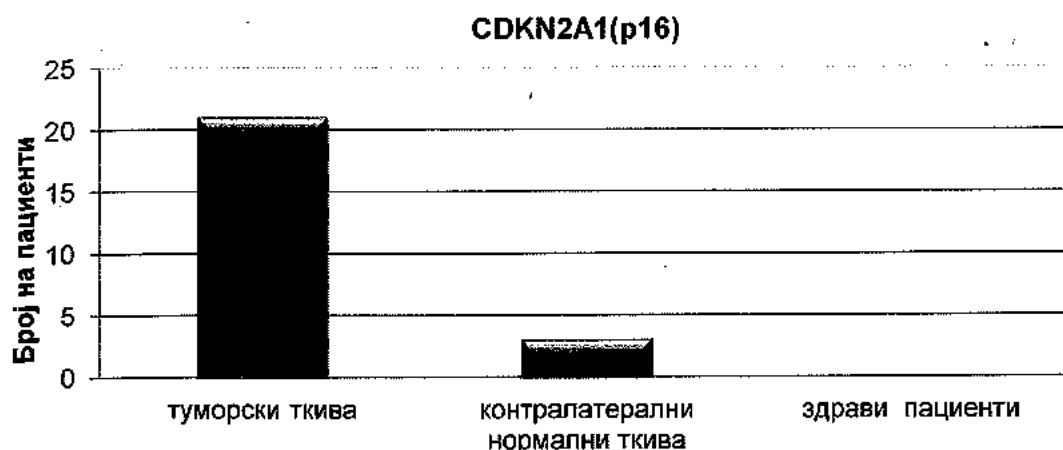


Слика бр.35. Аберантна метилација на RARB2 гените во туморските ткива, во контралатералните нормални ткива и здравите ткива

Дистрибуција на испитаниците според процентот на хиперметилација на p16, покажа дека хиперметилација во OSCC дијагностицираните примероци беше најдена кај 21(52,5%) пациент, во контралатералните нормални ткива само кај 3(7,7%) лица, а во здравите ткива немаше метилација. Разликата помеѓу трите групи и во однос на CDKN2A1 е статистички значајна (Kruskal-Wallis test: $H = 29,308$ $p = 0,0000$). Разликата во метилирањето на p16 е статистички значајна помеѓу примероците од туморското ткиво и ткивото од здравите пациенти ($p=0,0009$), а помеѓу примероците од контралатералните нормални ткива и здравите ткива нема значајна разлика ($p=0,2068$). Во однос на метилирањето на p16, помеѓу примероците од туморското ткиво и оние од контралатералното нормално ткиво, постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney U Test: $Z = 3,427$ $p = 0,0006$) (табела бр.18 и слика бр.36.)

Табела бр.18. Аберантна метилација на CDKN2A1 гените во туморските ткива, во контралатералните нормални ткива и здравите ткива

Групи на биоптични примероци	P16 метилирани гени
туморски ткива	21/40 (52,5%)
контралатерални нормални ткива	3/39 (7,7%)
здрави пациенти(n=20)	0/20 (0%)



Слика бр.36. Аберантна метилација на CDKN2A1(p16) гените во туморските ткива, во контралатералните нормални ткива и здравите ткива

Во табелата 19 се претставени, пресметаните предиктивни вредности според метилацијата на 5-те зададени гени во примарниот орален карцином во однос на метилацијата во здравите ткива.

Табела бр.19. Сензитивност, специфичност, позитивна и негативна предиктивна вредност на метилацијата на 5-те зададени гени во примарниот орален карцином

гени	Сензитивност	Специфичност	(+) предиктивна вредност	(-) предиктивна вредност
ECDH	90%	100%	100%	83,3%
MGMT	75%	95%	96,7%	65,5%
DAPK	75%	100%	100%	66,7%
RARB2	62,5%	100%	100%	57,1%
CDKN2A1	52,5%	100%	100%	51,3%

Според нашите добиени резултати за метилацијата на 5-те зададени гени во примарниот орален карцином во однос на метилацијата во здравите ткива, најголема сензитивност се регистрира за ECDH (90%), MGMT (75%) и DAPK (75%), додека за RARB2(62,5%) и за CDKN2A1(52,5%) сензитивноста е пониска. Тоа значи дека метилацијата на ECDH, MGMT и DAPK во туморските ткива со сигурност од 90% и 75% ги дијагностицираат вистина позитивните/заболениите, односно, имаат голема дијагностичка вредност при откривањето на OSCC. Заедничката сензитивност на овие три гени изнесува 80%.

Комбинацијата од 2 гени - E-cadherin (89,7%) и MGMT (75%), имаат позитивна предиктивна вредност, односно, сигурност во дијагнозата на OSCC од 98,35%. Сензитивност на комбинацијата од овие два гена изнесува 82,5% а специфичност 87,5%.

Специфичноста е многу висока (95% - 100%) за сите пет гени, што значи дека сите зададени гени со сигурност од 95% до 100% ги дијагностицираат вистина негативните, односно здравите лица.

Во табелата бр.20 се прикажани пресметаните предиктивни вредности според метилацијата на 5-те зададени гени во контралатералните нормални ткива во однос на метилацијата во здравите ткива.

Табела бр.20. Сензитивност, специфичност, позитивна и негативна предиктивна вредност на метилацијата на 5-те зададени гени во контралатералните нормални ткива

гени	Сензитивност	Специфичност	(+) предиктивна вредност	(-) предиктивна вредност
ECDH	89,7%	100%	100%	83,3%
MGMT	74,4%	95%	96,7%	65,5%
DAPK	33,3%	100%	100%	43,5%
RARB2	87,2%	100%	100%	80,0%
CDKN2A1	7,7%	100%	100%	35,7%

Според добиените резултати за метилацијата на 5-те зададени гени во контралатералните нормални ткива во однос на метилацијата во здравите ткива, најголема сензитивност се регистрира за ECDH (89,7%), RARB2(87,2%) и MGMT (74,4%), додека за DAPK (33,3%) и за CDKN2A1(7,7%) сензитивноста е значајно пониска. Тоа значи дека метилацијата на ECDH, RARB2 и MGMT во контралатералните нормални ткива со сигурност од 89,7%, 87,2% и 74,4% ги дијагностицираат вистина позитивните/заболениите, односно, имаат голема дијагностичка вредност, како, почетен, ран настан во карциногенезата. Заедничката сензитивност при комбинација на овие три гени изнесува 83,8%.

Комбинацијата од 2 гени - E-cadherin (89,7%) и MGMT (74,4%), имаат позитивна предиктивна вредност, односно, сигурност во дијагнозата на OSCC од 98,35%. Сензитивност на комбинацијата од овие два гена изнесува 82% а специфичност 97,5%.

Специфичноста и тука е многу висока (95% - 100%) за сите пет гени, што значи дека сите зададени гени (неметилираните) со сигурност од 95% до 100% ги дијагностицираат вистина негативните, односно здравите лица.

➤ **Корелација на одредените, промотор метилационни нивоа на предложените гени со клиничко- патохистолошки параметри**

Со цел на понатамошно евалуација и разбирање на етиологијата на специфичните молекуларни појави одговорни за развојот, прогресијата, инвазијата и метастазирањето на OSCC, се обидовме да ја истражime предиктивната вредност на DNA хиперметилацијата и нејзината улога во прогресијата на OSCC. За утврдуње на корелацијата помеѓу метилацијата на зададените гени во OSCC и прогностичките показатели- клинички и патохистолошки, беше користена унивалентна и многовариантната логистичка регресија.

По евалуацијата на клиничките и патохистолошките параметри, сите предложени гени за DNA метилацијата, во биоптични материјали (n=40) од туморските ткива, беа корелирани со: пол, возраст, локализација, (pT), N статус (pN), TNM стадиум и степен на клеточна диференцијација (G),

Добиените резултати од анализирата на промотор метилацијата на *p16*, *Ecadherin*, *DAPK*, *MGMT* и *RAR β2*, во туморските ткивни примероци, во корелација со полот не покажаа сигнификантна разлика, (Fisher exact test: $p = 0,5915$; $p = 0,6065$; $p = 0,6882$; $p = 0,3117$ и $p = 0,6639$), соодветно. Не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација помеѓу метилацијата на 5-те зададени гени и полот.

Асоцираноста на промотор метилацијата на *p16*, *Ecadherin*, *DAPK*, *MGMT* и *RAR β2*, во туморските ткивни примероци, во корелација со возраста покажаа дека:

Непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на *p16* (*CDKN2A1*) и возраста (Pearson chi squ.=0,40 $p = 0,8358$). (табела бр.30 и слика бр.30).

Непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на *ECDH* и возраста (Fisher exact test: $p = 0,2240$).

Непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на *MGMT* и возраста на испитаниците (Fisher exact test: $p = 0,3374$).

Непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на *DAPK* и возраста на испитаниците (Fisher exact test: $p = 0,6626$).

Анализата покажа дека постои корелација помеѓу DNA метилацијата на *RARβ2* и возрасните групи (Pearson chi squ.= 5,76 $p = 0,0164$), односно, значајно повеќе овој ген е метилиран кај повозрасните пациенти (60-69 год).

Во однос на возраста, резултатите покажаа асоцираност само помеѓу метилацијата на *RARβ2*, која се регистрира од 60 до 69 години, кај повозрасната група. Не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација помеѓу метилацијата на останатите гени и возраста.

Фреквенцијата на метилационните стапки на *p16*, *Ecadherin*, *DAPK*, *MGMT* и *RAR β2* промотор гените во OSCC ткивата, во однос на локализацијата покажа дека, не постои статистички значајна разлика помеѓу локализацијата на оралните карциноми и метилираните гени,

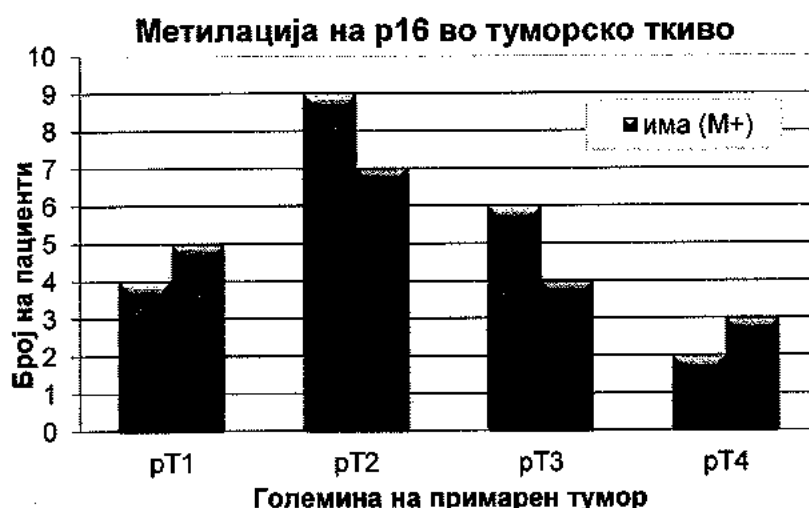
(Pearson chi squ.= 1,52 $p = 0,2176$; Fisher exact test: $p = 0,4263$; $p = 0,0964$; $p = 0,1779$ Pearson chi squ.= 0,83 $p = 0,3637$).

а) Анализата на метилацијата на **p16** во OSCC во однос на: pT, pN, TNM и клеточната диференцијација G- стадиум покажа дека:

Дистрибуцијата според големината на примарниот тумор покажа дека од вкупно 25 лица со pT1 и pT2, метилација имаше кај 13(52,0%) лица, додека кај пациентите со pT3 и pT4 од вкупно 15, метилација на **p16** беше нотирана кај 8(53,3%) лица. Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу метилацијата на p16 и големината на примарниот тумор pT (Pearson chi squ.=0,10 $p = 0,9348$). (Табела бр.21. слика бр.37).

Табела бр.21. Метилација на CDKN2A1 во туморско ткиво според големина на туморот

CDKN2A1 метилација	Големина на примарен тумор				вкупно
	pT1	pT2	pT3	pT4	
има (M+)	4	9	6	2	21
нема (M-)	5	7	4	3	19
вкупно	9	16	10	5	40

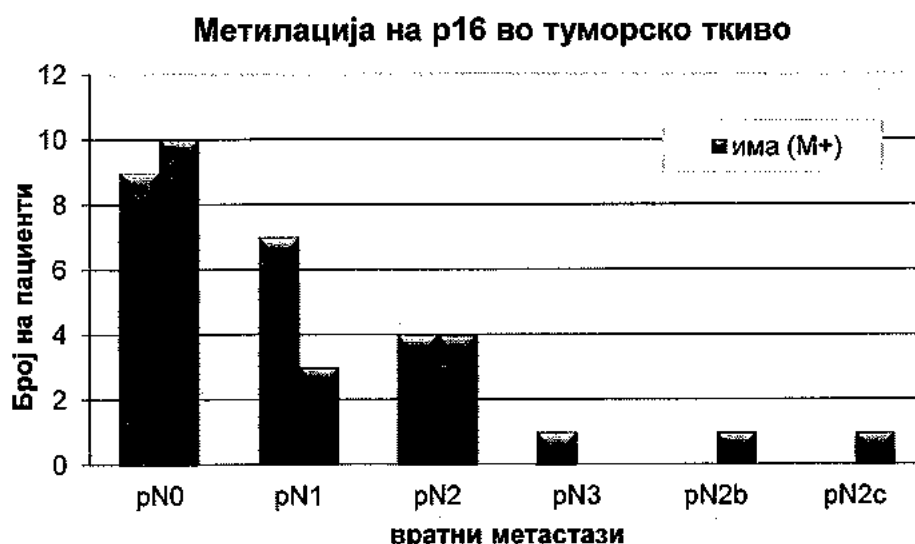


Слика бр.37. Метилација на p16 во туморско ткиво според големина на туморот

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу метилирани и неметилирани p16 и N статусот - Pearson chi squ.=0,38 $p = 0,5365$. Вратните метастатски промени не беа дијагностицирани кај 19 (47,5%) лица, а кај 9 (47,4%) од нив имаше метилација на p16 во туморското ткиво. Со pN1, pN2 и pN3 имаше вкупно 21 пациент, од кои метилација на генот p16 имаа 12(57,1%) лица. Анализата покажа дека нема асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на p16 и појавата на вратни метастази (Табела бр.22. слика бр.38).

Табела бр.22. Метилација на p16 во туморско ткиво според вратни метастази, pN- статусот

метилација	Локални / регионални метастази						вкупно
	pN0	pN1	pN2	pN3	pN2b	pN2c	
има (M+)	9	7	4	1	0	0	21
нема (M-)	10	3	4	0	1	1	19
вкупно	19	10	8	1	1	1	40

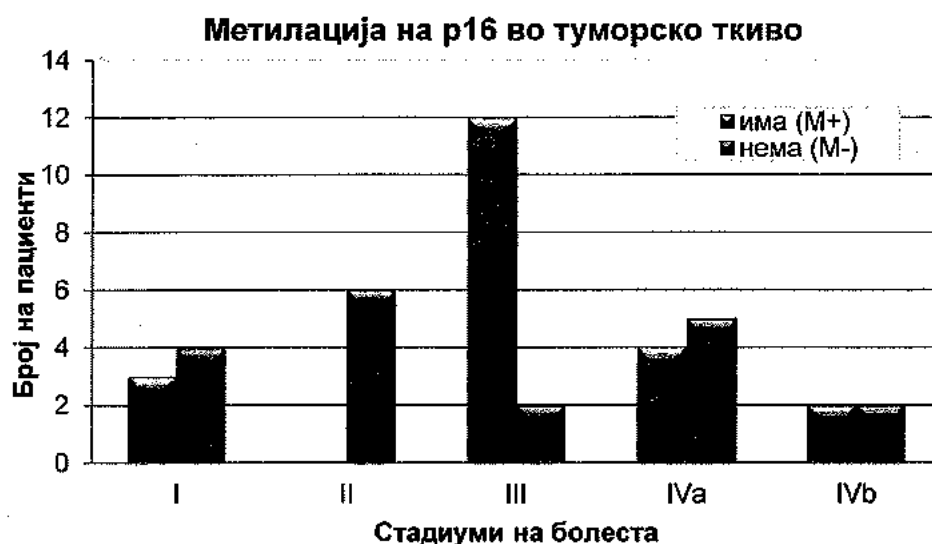


Слика бр.38. Метилација на p16 во туморско ткиво според вратните метастази, pN- статусот

Во I и II- TNM стадиум на болеста беа вкупно 13 лица, од кои метилација на p16 имаше кај 3(23,1%). Од 27 пациенти кај кои беше дијагностициран III и IV стадиум на болеста, метилација на овој ген имаа 18 (66,7%). Се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу метилацијата на p16 и стадиумот на болеста (Fisher exact test: $p = 0,0116$). Значи, метилацијата на p16 е значаен показател за канцерогенезата и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза за болните ($OR = 0,15$ CI=95% $0,032 < OR < 0,684$). (табела бр.23 и слика бр.39)

Табела бр.23 Метилација на p16 во туморско ткиво според стадиумот на болеста

p16 метилација	Стадиуми на болеста					вкупно
	I	II	III	IVa	IVb	
има (M+)	3	0	12	4	2	21
нема (M-)	4	6	2	5	2	19
вкупно	7	6	14	9	4	40

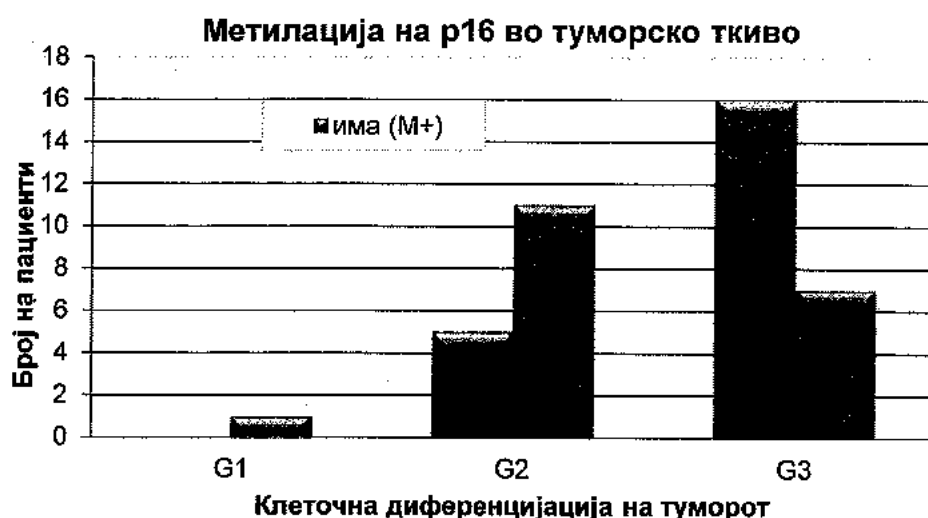


Слика бр.39. Метилација на p16 во туморско ткиво според стадиумот на болеста

Со добра и средна диференцијација на туморот (G1 и G2) беа вкупно 17/40(42,5%) пациенти. Од нив, кај 5/17(29,4%) имаа метилација на p16. Од 23 испитаниците со слаба диференцијација на туморот (G3), кај 16(69,6%) беше регистрирана метилацијата на генот. Анализата покажа дека постои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на p16 и клеточната диференцијација на примарниот тумор кај нашите испитаници (Pearson χ^2 $\text{sq.}=6,32$ $p = 0,0119$). Тоа уште еднаш ја потврдува метилацијата на p16 како значаен предиктор за канцерогенезата на OSCC и укажува на зголемен ризик за неповолна прогноза кај заболените. (OR = 0,182 CI=95% 0,046<OR<0,717). (табела бр.24 и слика бр.40)

Табела бр.24. Метилација на p16 во туморско ткиво според клеточната диференцијација на туморот

P16 метилација	Клеточна диференцијација на туморот			вкупно
	G1	G2	G3	
има (M+)	0	5	16	21
нема (M-)	1	11	7	19
вкупно	1	16	23	40



Слика бр.40. Метилација на p16 во туморско ткиво според клеточната диференцијација на туморот

Резултатите од анализата на метилацијата на p16 во туморските ткива покажаа дека:

Како сигнификантен предиктор за развојот и агресивноста на туморот и прогресирање во напреднатите стадиуми (III- IV и G3) кај оралниот карцином ја потврдиле метилацијата на промотор на генот p16.

Предиктивната прогностичка вредност на p16 во развојот и прогресијата, во однос на напредните TNM и G стадиумот, се покажа статистички значајна т.е. метилациите на p16 [CI 95% (1.634 - 75.564)], сигнификантно го зголемува ризикот за прогресија во касните стадиуми TNM (III-IV) и G3 стадиум, во однос на раниот стадиум (I-II) и G1-2.

Анализата покажа дека постои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на p16 и клеточната диференцијација на примарниот тумор кај нашите испитаници (Pearson chi squ.=6,32 $p = 0,0119$). Тоа уште еднаш ја потврдува метилацијата на p16 како значаен предиктор за развојот и прогресијата на OSCC и укажува на зголемен ризик за неповолна прогноза кај заболените. (OR = 0,182 CI=95% 0,046<OR<0,717)

Со I и II стадиум на болеста беа вкупно 13 лица, од кои метилација на CDKN2A1 имаше кај 3(23,1%). Од 27 пациенти кај кои беше дијагностициран III и IV стадиум на болеста, метилација на овој ген имаа 18(66,7%). Анализата покажа дека постои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на CDKN2A1 и стадиумот на болеста (Fisher exact test: $p = 0,0116$). Значи, метилацијата на CDKN2A1 е значаен показател за канцерогенезата и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза за болните (OR = 0,15 CI=95% 0,032<OR<0,684). (табела бр.34 и слика бр.34).

б) Анализата на метилацијата на Ecadherin во OSCC во однос на: pT,pN, TNM и клеточната диференцијација G- стадиум покажа дека:

Дистрибуцијата според големината на примарниот тумор покажа дека од вкупно 25 лица со (pT1 и pT2) позитивна метилација имаа 21(84%), додека кај

пациентите со (pT3 и pT4) метилација на Ecadherin беше нотирана кај сите 15(100%) лица. Непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на Ecadherin и големината на примарниот тумор (Fisher exact test: $p = 0,1384$). (табела бр.25 и слика бр.41)

Табела бр.25. Метилација на Ecadherin во туморско ткиво според големина на туморот

Ecadherin метилација	Големина на примарен тумор				вкупно
	pT1	pT2	pT3	pT4	
има (M+)	6	15	10	5	36
нема (M-)	3	1	0	0	4
вкупно	9	16	10	5	40

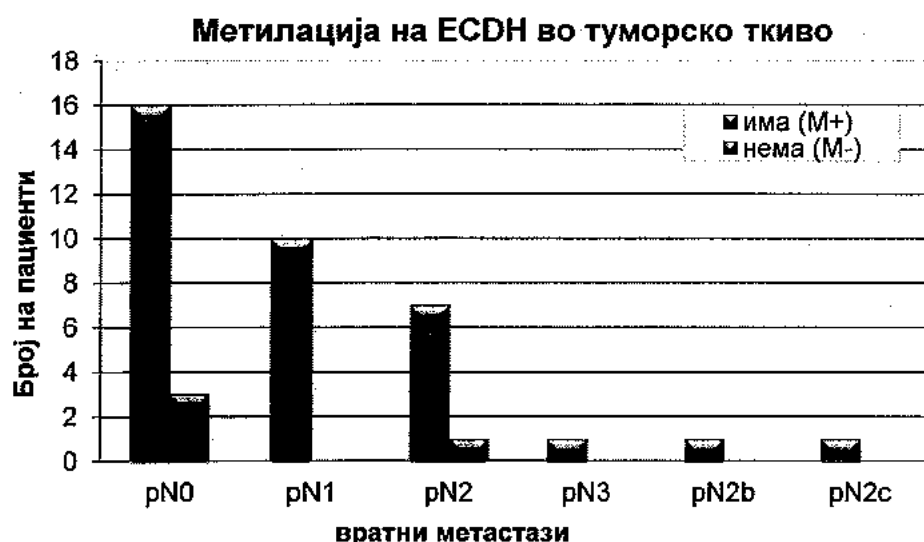


Слика бр.41. Метилација на Ecadherin во туморско ткиво според големина на туморот

Вратните метастатски промени (pN-стадиум) не беа дијагностицирани кај 19(47,5%) лица. Од нив 16(84,2%) имаа метилација на Ecadherin (ECDH) во туморското ткиво. Со pN1, pN2 и pN3 имаше вкупно 21 пациент, од кои метилација на генот ECDH имаа 20(95,2%) лица. Анализата покажа дека нема асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на Ecadherin-от и појавата на вратни метастази pN (Fisher exact test: $p = 0,2651$). (табела бр.26 и слика бр.42)

Табела бр.26. Метилација на Ecadherin во туморско ткиво според регионалните метастази, pN-стадиумот

Ecadherin метилација	pN0	pN1	pN2	pN3	pN2b	pN2c	
има (M+)	16	10	7	1	1	1	36
нема (M-)	3	0	1	0	0	0	4
вкупно	19	10	8	1	1	1	40

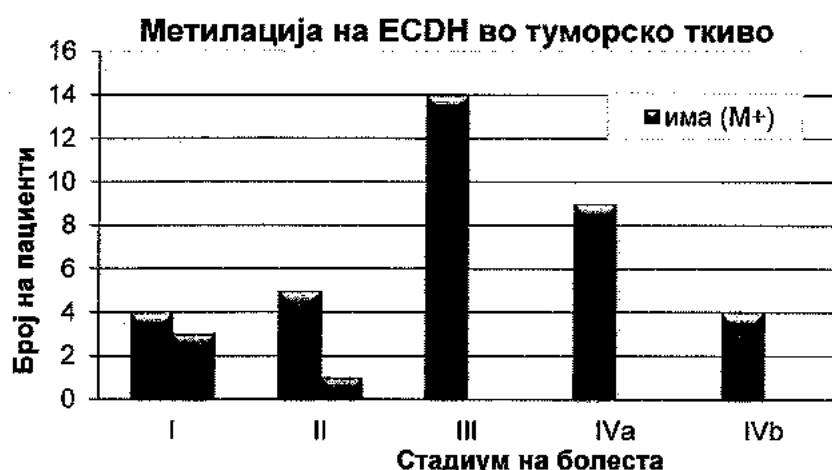


Слика бр.42. Метилација на Ecadherin во туморско ткиво според регионалните метастази, pN-стадиумот

Во I и II стадиум на болеста(TNM) беа вкупно 13 лица, од кои метилација на Ecadherin имаше кај 9(69,2%). Од пациентите кај кои беше дијагностициран III и IV стадиум на болеста, сите 27(100%) имаа метилација на овој ген. Анализата покажа дека постои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на Ecadherin-от и стадиумот на болеста (Fisher exact test: $p = 0,0078$). Метилацијата на Ecadherin-от е значаен показател за канцерогенезата и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза за болните ($OR = 0,38$ $CI=95\% 0,019<OR<0,781$) (табела бр.27 и слика бр.43)

Табела бр.27. Метилација на Ecadherin (ECDH) во туморско ткиво според стадиумот на болеста

ECDH метилација	Стадиуми на болеста					вкупно
	I	II	III	IVa	IVb	
има (M+)	4	5	14	9	4	36
нема (M-)	3	1	0	0	0	4
вкупно	7	6	14	9	4	40

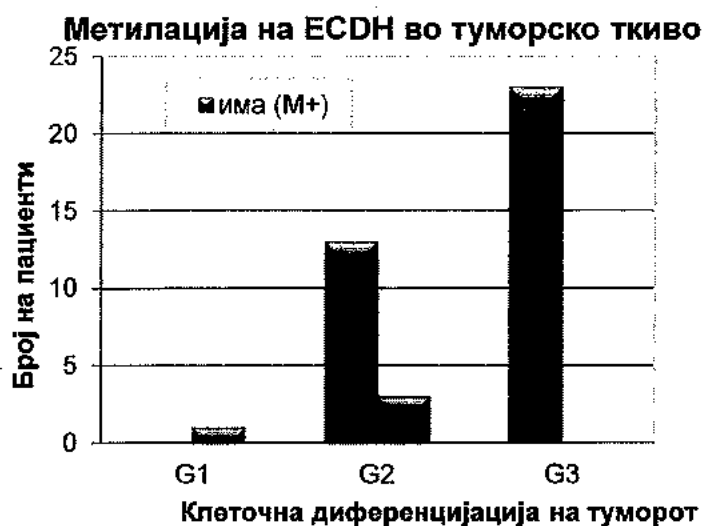


Слика бр.43. Метилација на Ecadherin во туморско ткиво според стадиумот на болеста

Во (G1 и G2 стадиумот), со добра и средна диференцијација на туморот беа вкупно 17/40(42,5%) пациенти. Од нив, кај 13/17(76,4%) имаше метилација на Ecadherin. Кај сите 23(100%) испитаниците со слаба диференцијација на туморот (G3) беше регистрирана метилацијата на генот. Анализата покажа дека постои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на Ecadherin и клеточната диференцијација на примарниот тумор кај нашите испитаници (Fisher exact test: $p = 0,0260$). Тоа уште еднаш ја потврдува метилацијата на Ecadherin како значаен предиктор за развојот и прогресијата на OSCC и укажува на зголемен ризик за неповолна прогноза кај заболените. (OR = 0,063 CI=95% 0,032<OR<0,788). (табела бр.28 и слика бр.44)

Табела бр.28. Метилација на Ecadherin во туморско ткиво според клеточната диференцијација на туморот

ECDH метилација	Клеточна диференцијација на туморот			вкупно
	G1	G2	G3	
има (M+)	0	13	23	36
нема (M-)	1	3	0	4
вкупно	1	16	23	40



Слика бр.44. Метилација на Ecadherin во туморско ткиво според клеточната диференцијација на туморот

Метилацијата на Ecadherin-от, се покажа како значаен показател за канцерогенезата и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза за болните ($OR = 0,38$ $CI=95\%$ $0,019 < OR < 0,781$). Од пациентите кај кои беше дијагностициран III и IV стадиум на болеста, сите 27(100%) имаа метилација на овој ген. Анализата покажа дека постои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на Ecadherin-от и стадиумот на болеста (Fisher exact test: $p = 0,0078$). Значи, метилацијата на ECDH е значаен предиктивен фактор, показател за прогресијата и развојот и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза за болните. (табела бр.28 и слика бр.43)

Кај сите 23(100%) испитаници со слаба диференцијација на туморот (G3) беше регистрирана метилацијата на генот. Анализата покажа дека постои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на Ecadherin и клеточната диференцијација на примарниот тумор кај нашите испитаници (Fisher exact test: $p = 0,0260$). Тоа уште еднаш ја потврдува метилацијата на Ecadherin како значаен предиктор за развојот и прогресијата на OSCC и укажува на зголемен ризик за неповолна прогноза кај заболените. ($OR = 0,063$ $CI=95\%$ $0,032 < OR < 0,788$). (табела бр.28 и слика бр.44)

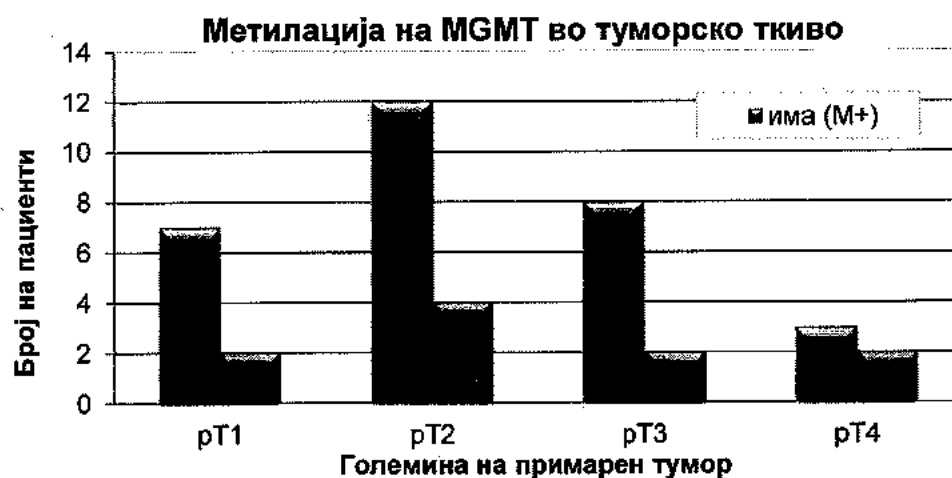
Предиктивната прогностичка вредноста на Ecadherin во развојот и прогресијата на туморите, се покажаа статистички значајна, во однос на TNM и G стадиумот, т.е. во касните стадиуми TNM (III-IV) и напредните стадиуми на клеточна диференцијација G3. Постоенето на метилација на Ecadherin ($OR = 0,063$ $CI=95\%$ $0,032 < OR < 0,788$) и сигнификантно го зголемува ризикот за прогресијата и развојот во напредните стадиуми кај орален карцином во однос на раните стадиуми (I-II) и G1-2. Ecadherin-от го потврдуваме како сигнификантен предиктор во развојот, агресивноста на туморот и прогресијата во напредните стадиуми (III-IV и G3) кај оралниот карцином.

в) Анализата на метилацијата на MGMT во OSCC во однос на: pT, pN, TNM и клеточната диференцијација G- стадиум покажа дека:

Според големината на примарниот тумор, од вкупно 25 лица со pT1 и pT2 метилација имаше кај 19(76%) лице, додека од 15 пациентите со pT3 и pT4 метилација на MGMT беше нотирана кај 11(73,3%) лица. Непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на MGMT и големината на примарниот тумор кај нашите испитаници (Fisher exact test: $p = 0,5680$). (табела бр.29 и слика бр.45)

Табела бр.29. Метилација на MGMT во туморско ткиво според големина на туморот

MGMT метилација	Големина на примарен тумор				вкупно
	pT1	pT2	pT3	pT4	
има (M+)	7	12	8	3	30
нема (M-)	2	4	2	2	10
вкупно	9	16	10	5	40

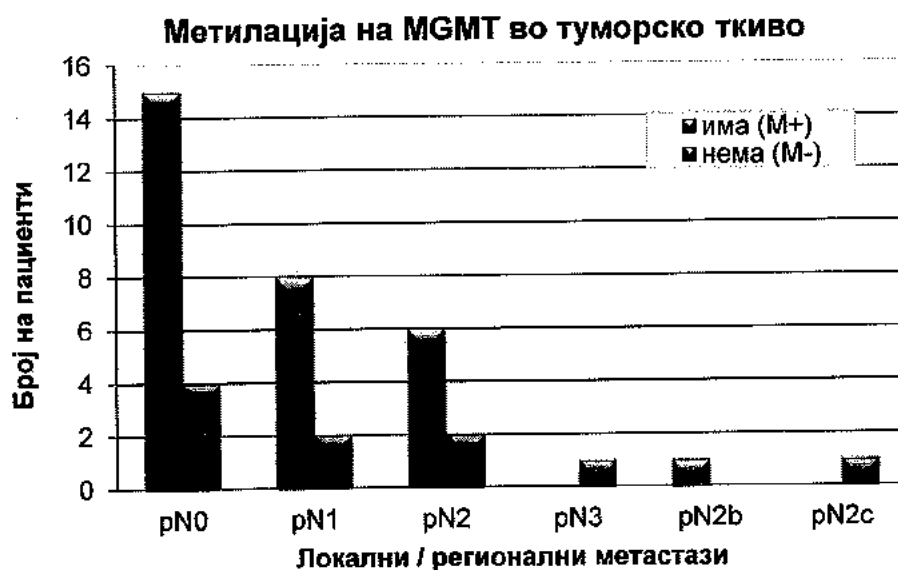


Слика бр.45. Метилација на MGMT во туморско ткиво според големина на туморот.

Во однос на вратниот статус(pN)- метастатски промени не беа дијагностицирани кај 19(47,5%) лица, од кои кај 15(78,9%) имаше метилација на MGMT во туморското ткиво. Со pN1, pN2 и pN3 од вкупно 21 пациент, метилација на генот MGMT беше регистрирана исто така кај 15(71,4%) лица. Не се регистрира асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на MGMT и појавата на метастази (Fisher exact test: $p = 0,4291$). (табела бр.30 и слика бр.46).

Табела бр.30. Метилација на MGMT во туморско ткиво според вратни метастази (pN)

MGMT метилација	Локални / регионални метастази						вкупно
	pN0	pN1	pN2	pN3	pN2b	pN2c	
има (M+)	15	8	6	0	1	0	30
нема (M-)	4	2	2	1	0	1	10
вкупно	19	10	8	1	1	1	40



Слика бр.46. Метилација на MGMT во туморско ткиво според вратни метастази (pN)

Во раните TNM- стадиуми (I и II) на болеста, беа вкупно 13 лица, од кои метилација на MGMT имаше кај 10(76,9%). Од 27 пациентите кај кои беа дијагностицирани напредните (III и IV) стадиуми на болеста 20(74,1%) имаа метилација на овој ген. Не се регистрира асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на MGMT и стадиумот на болеста (Fisher exact test: $p = 0,4291$). (табела бр.31 и слика бр.47)

Табела бр.31, Метилација на MGMT во туморско ткиво според стадиумот на болеста/ TNM

MGMT метилација	Стадиуми на болеста /TNM					вкупно
	I	II	III	IVa	IVb	
има (M+)	6	4	11	7	2	30
нема (M-)	1	2	3	2	2	10
вкупно	7	6	14	9	4	40

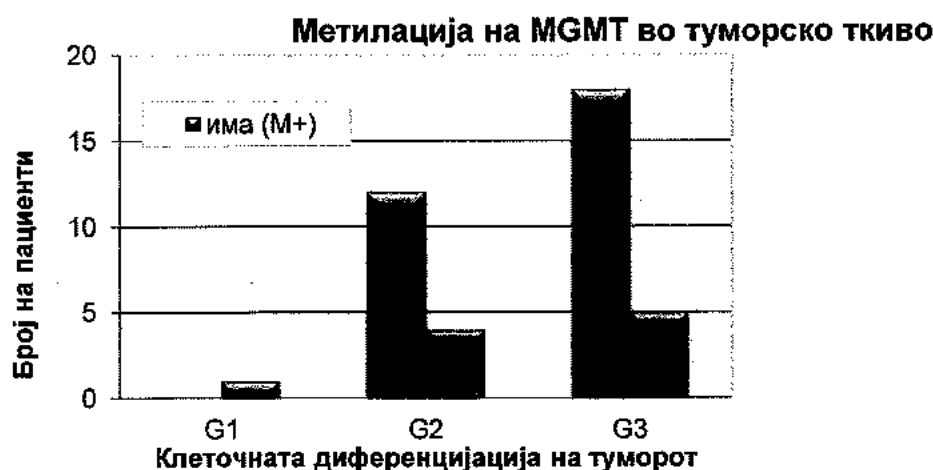


Слика бр.47. Метилација на MGMT во туморско ткиво според стадиумот на болеста/ TNM

Во (G1 и G2)стадиумите, со добра и средна диференцијација на туморот, беа вкупно 17/40(42,5%) пациенти. Од нив, кај 12/17(70,6%) имаше метилација на MGMT. Од 23 испитаниците со слаба диференцијација на туморот (G3) кај 18(78,3%) беше регистрирана метилацијата на генот. Не се регистрира асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на MGMT и клеточната диференцијација на примарниот тумор кај испитаниците кои беа вклучени во студијата (Fisher exact test: $p = 0,4235$). (табела бр.32 и слика бр.48)

Табела бр.32. Метилација на MGMT во туморско ткиво според клеточната диференцијација на туморот

MGMT метилација	Клеточна диференцијација на туморот			вкупно
	G1	G2	G3	
има (M+)	0	12	18	30
нема (M-)	1	4	5	10
вкупно	1	16	23	40



Слика бр.48. Метилација на MGMT во туморско ткиво според клеточната диференцијација на туморот

Не постои значајна асоцираност / корелација, помеѓу DNA метилацијата на MGMT и испитуваните клиничко-патохистолошките параметри.

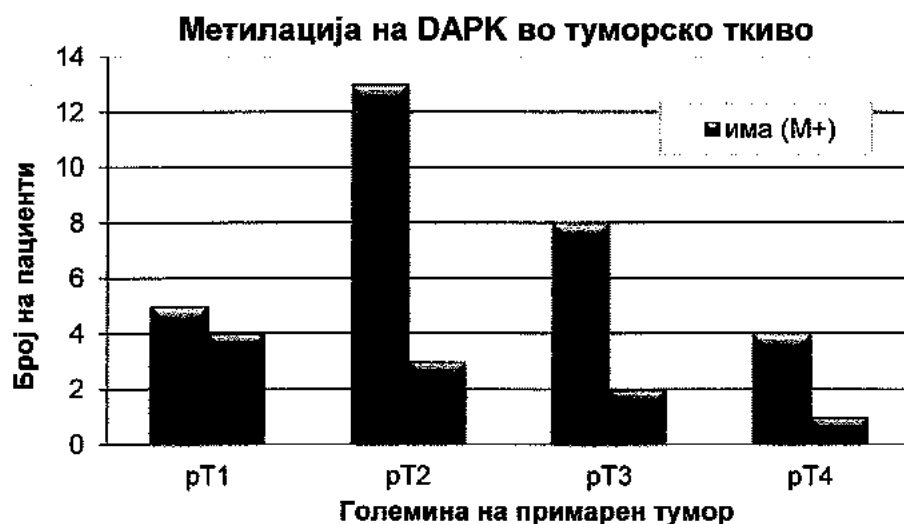
Предиктивната прогностичка вредност на MGMT во развојот и прогресијата туморите, не се покажа статистички значајна, во однос на T,N, TNM и G стадиумот, т.е. корелациите се многу слаби и незначителни. Резултатите од нашата анализа како сигнификантен предиктори во развојот и прогресијата а на оралниот карцином, го потврдија MGMT генот, како не несигнификантен маркер, за развојот и прогресијата на оралниот карцином.

г) Анализата на метилацијата на DAPK во OSCC во однос на: pT,pN, TNM и клеточната диференцијација G- стадиум покажа дека:

Според големината на примарниот тумор, од вкупно 25 лица со pT1 и pT2 метилација имаше кај 18 (72%) лица, додека од 15 пациентите со pT3 и pT4 метилација на DAPK беше нотирана кај 12 (80,0%) лица. Не се регистрира асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на DAPK и големината на примарниот тумор кај нашите испитаници (Fisher exact test: $p = 0,4320$). (табела бр.33 и слика бр.49)

Табела бр.33. Метилација на DAPK во туморско ткиво според големина на туморот/ pT

DAPK метилација	Големина на примарен тумор				вкупно
	pT1	pT2	pT3	pT4	
има (M+)	5	13	8	4	30
нема (M-)	4	3	2	1	10
вкупно	9	16	10	5	40

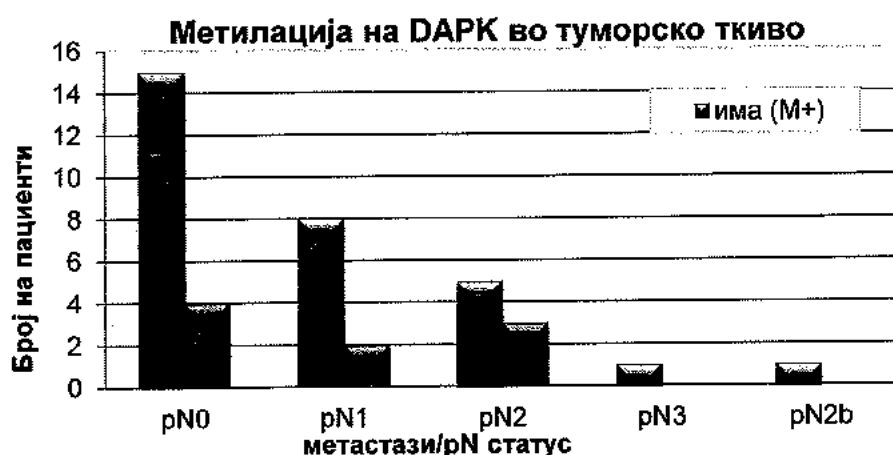


Слика бр.49. Метилација на DAPK во туморско ткиво според големина на туморот

Вратни метастатски промени (pN0) беа дијагностицирани кај 19(47,5%) лица, а кај 15(78,9%) од нив имаше метилација на DAPK во туморските примероци. Со pN1, pN2 и pN3 од вкупно 21 пациент, метилација на генот DAPK беше регистрирана исто така кај 15(71,4%) лица. Не се регистрира асоцијација/корелација помеѓу DNA метилацијата на DAPK и појавата на метастази (Fisher exact test: $p = 0,4291$). (табела бр.34 и слика бр.50)

Табела бр.34. Метилација на DAPK во туморско ткиво според метастази (pN-статус)

DAPK метилација	вратни метастази/- pN статус						вкупно
	pN0	pN1	pN2	pN3	pN2b	pN2c	
има (M+)	15	8	5	1	1	0	30
нема (M-)	4	2	3	0	0	1	10
вкупно	19	10	8	1	1	1	40



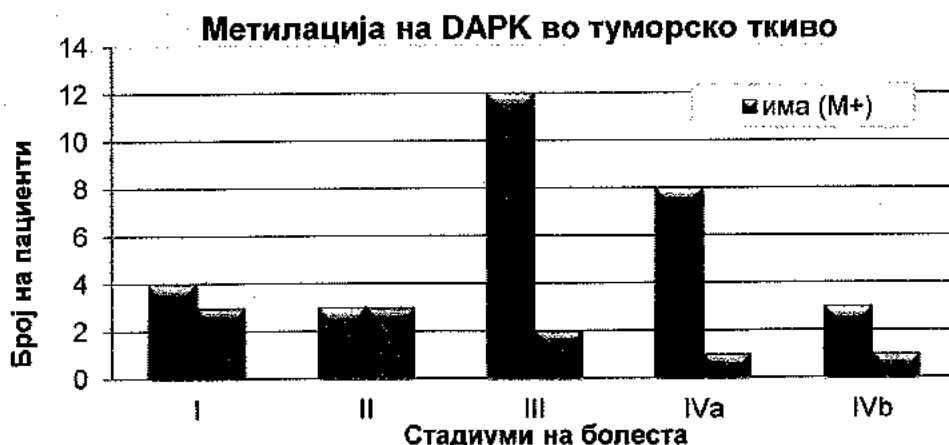
Слика бр.50. Метилација на DAPK во туморско ткиво според метастази (pN-статус)

Во раниот TNM- стадиум (I и II) беа дијагностицирани вкупно 13 лица, од кои метилација на DAPK имаше кај 7(53,8%). Од 27 пациентите кај кои беше дијагностициран III и IV стадиум на болеста 23(85,2%), имаа метилација на овој ген. Се регистрира асоцијација/корелација помеѓу DNA метилацијата на DAPK и стадиумот на болеста (Fisher exact test: $p = 0,0420$). Тоа значи дека метилацијата на DAPK е значаен показател за канцерогенезата и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза за болните ($OR = 0,202$ CI=95% $0,044 < OR < 0,929$). (табела бр.35 и слика бр.51)

Табела бр.35. Метилација на DAPK во туморско ткиво според стадиумот на болеста/ TNM

DAPK метилација	Стадиуми на болеста TNM					вкупно
	I	II	III	IVa	IVb	
има (M+)	4	3	12	8	3	30
нема (M-)	3	3	2	1	1	10
вкупно	7	6	14	9	4	40

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

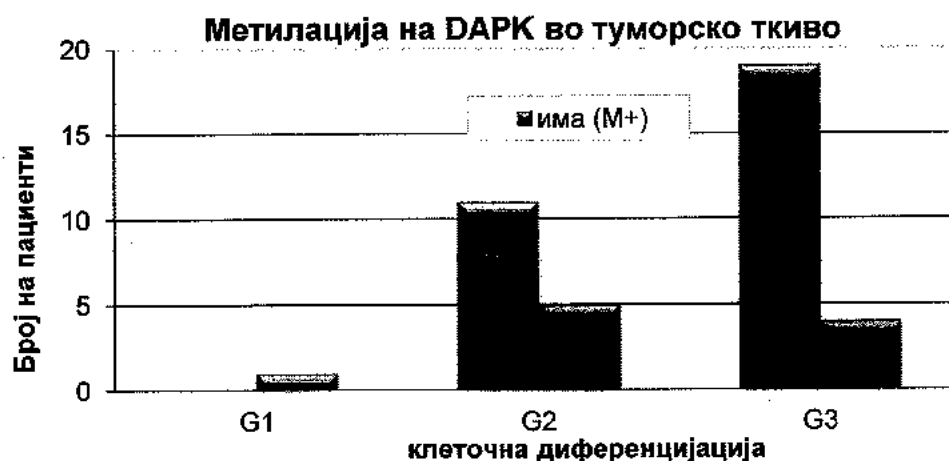


Слика бр.51. Метилација на DAPK во туморско ткиво според стадиумот на болеста/ TNM

Со добра и средна диференцијација на туморот (G1 и G2) беа вкупно 17/40(42,5%) пациенти, од кои, кај 11/(64,7%) имаше метилација на DAPK. Од 23 испитаници со слаба диференцијација на туморот (G3) кај 19(82,6%) регистриравме метилацијата на генот. Анализата покажа дека непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на DAPK и клеточната диференцијација на примарниот тумор кај испитаниците кои беа вклучени во студијата (Fisher exact test: $p = 0,1779$). (табела бр.36 и слика бр.52)

Табела бр.36. Метилација на DAPK во туморско ткиво според клеточната диференцијација на туморот/ G

DAPK метилација	Клеточна диференцијација на туморот			вкупно
	G1	G2	G3	
има (M+)	0	11	19	30
нема (M-)	1	5	4	10
вкупно	1	16	23	40



Слика бр.52. Метилација на DAPK во туморско ткиво според клеточната диференцијација на туморот

Во нашата студија, DAPK метилацијата беше регистрирана кај 23(85,2%) од пациентите, кои беа дијагностицирани во напредните стадиуми (III и IV) на болеста. Се регистрира асоцијација/корелација помеѓу DNA метилацијата на DAPK и стадиумот на болеста (Fisher exact test: $p = 0,0420$), што го потенцира, овој ген како значаен показател за канцерогенезата и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза за болните ($OR = 0,202$ $CI=95\%$ $0,044 < OR < 0,929$), во однос на стадиумот на болеста. (табела бр.36)

Предиктивната прогностичка вредноста на DAPK во развојот и прогресијата туморите, се покажаа статистички значајна, во однос на TNM т.е во касните стадиуми TNM (III-IV) (Fisher exact test: $p = 0,0420$) Постоенето на метилација на DAPK ($OR = 0,202$ $CI=95\%$ $0,044 < OR < 0,929$), сигнификантно го зголемува ризикот за прогресијата и развојот во напреднатите стадиум кај оралниот карцином, во однос на раните стадиуми (I-II).

DAPK генот го потврдилме како сигнификантен предиктор во развојот и прогресијата на оралниот карцином во напреднатите стадиуми (III-IV).

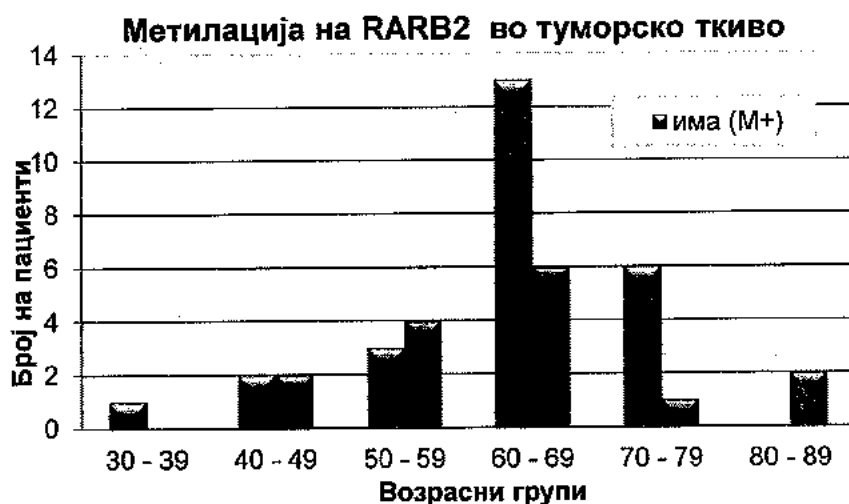
Се регистрира асоцијација/корелација помеѓу DNA метилацијата на DAPK и стадиумот на болеста (Fisher exact test: $p = 0,0420$). Тоа значи дека метилацијата на DAPK е значаен показател за канцерогенезата и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза за болните. (табела бр.35 и слика бр.51)

д) Анализата на метилацијата на RAR β 2 во OSCC во однос на: pT, pN, TNM и клеточната диференцијација G- стадиум покажа дека:

Најголем број од пациентите кај кои имаше метилација на RAR β 2– 13/25 беа во возрастната група од 60 до 69 години. На возраст под 60 години, од вкупно 12 лица кај 6(50%) беше регистрирана метилација, додека на возраст над 60 години од вкупно 28 лица метилација имаше кај 19(67,9%) пациенти. Анализата покажа дека постои корелација помеѓу DNA метилацијата на RAR β 2 и возрастните групи (Pearson chi squ.= 5,76 $p = 0,0164$), односно, значајно повеќе овој ген метилира кај повозрасните пациенти. (табела бр.37 и слика бр.53)

Табела бр.37. Метилација на RAR β 2 во туморско ткиво според возрастни групи

RAR β 2 метилација	возрасни групи						вкупно
	30 - 39	40 - 49	50 - 59	60 - 69	70 - 79	80 - 89	
има (M+)	1	2	3	13	6	0	25
нема (M-)	0	2	4	6	1	2	15
вкупно	1	4	7	19	7	2	40

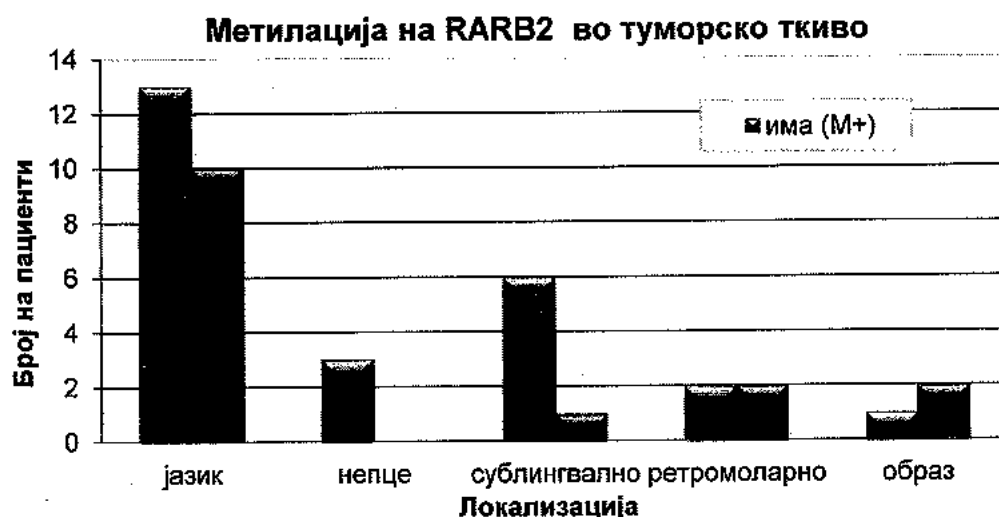


Слика бр.53. Метилација на RARB2 во туморско ткиво според возрасни групи

Од 23 пациенти со локализација на примарниот тумор на јазикот, метилација на RARB2 имаше кај 13(56,5%). Од вкупно 17 лица со други локализации на туморот, кај 12(70,5%) беше регистрирана метилација на генот. Непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на RARB2 и локализацијата на примарниот тумор (Pearson $\chi^2 = 0,83$ $p = 0,3637$). (табела бр.38 и слика бр.54)

Табела бр.38. Метилација на RARB2 во туморско ткиво според локализација

RARB2 метилација	локализација					вкупно
	јазик	непце	сублингвално	ретромоларно	образ	
има (M+)	13	3	6	2	1	25
нема (M-)	10	0	1	2	2	15
вкупно	23	3	7	4	3	40

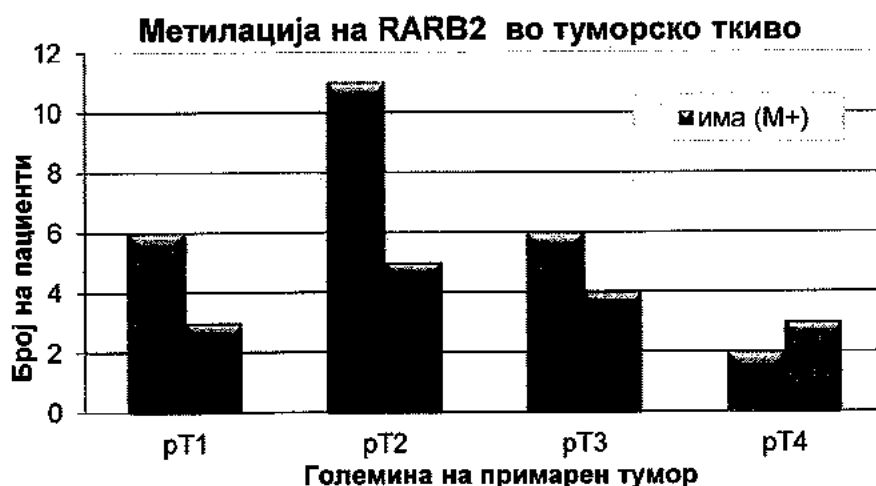


Слика бр.54. Метилација на RARB2 во туморско ткиво според локализација

Според големината на примарниот тумор, од вкупно 25 лица со pT1 и pT2 метилација имаше кај 17(68%) лица, додека од 15 пациентите со pT3 и pT4 метилација на RAR β 2 беше нотирана кај 8(53,3%) лица. Непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на RAR β 2 и големината на примарниот тумор кај нашите испитаници (Pearson chi squ.= 0,86 $p = 0,3536$). (табела бр.39 и слика бр.55)

Табела бр.39. Метилација на RARB2 во туморско ткиво според големина на туморот/ pT

RAR β 2 метилација	Големина на примарен тумор/ pT				вкупно
	pT1	pT2	pT3	pT4	
има (M+)	6	11	6	2	25
нема (M-)	3	5	4	3	15
вкупно	9	16	10	5	40



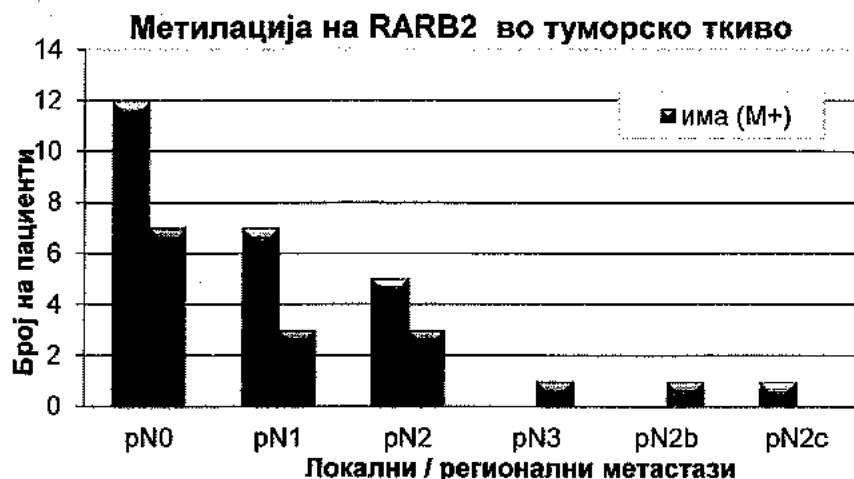
Слика бр.55. Метилација на RAR β 2 во туморско ткиво според големина на туморот/ pT

Отсуство на вратните метастатски промени(pN0), беше дијагностицирано кај 19(47,5%) пациенти, а кај 12(63,2%) од нив имаше метилација на RAR β 2 во туморските примероци. Во pN1, pN2 и pN3-фазата, од вкупно 21 пациент, метилација на RAR β 2 беше регистрирана кај 13(61,9%) лица. Анализата покажа дека нема асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на RAR β 2 и појавата на вратни метастази (Pearson chi squ.= 1,25 $p = 0,2636$). (табела бр.40 и слика бр.56)

Табела бр.40. Метилација на RARB2 во туморско ткиво според вратниот статус, метастази/ pN

RAR β 2 метилација	Локални / регионални метастази						вкупно
	pN0	pN1	pN2	pN3	pN2b	pN2c	
има (M+)	12	7	5	0	0	1	25
нема (M-)	7	3	3	1	1	0	15
вкупно	19	10	8	1	1	1	40

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином



Слика бр.56. Метилација на RARB2 во туморско ткиво според вратниот статус / pN, метастази

Во раните TNM (I и II) стадиуми на болеста беа вкупно 13 лица, од кои метилација на RARB2 имаше кај 7(53,8%). Од 27 пациентите кај кои беше дијагностициран III и IV стадиум на болеста 18(66,7%) имаа метилација на овој ген. Анализата покажа дека непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на RARB2 и стадиумот на болеста (Pearson chi squ.= 0,62 $p = 0,4328$). (табела бр.41 и слика бр.57)

Табела бр.41. Метилација на RARB2 во туморско ткиво според стадиумот на болеста/ TNM

RARB2 метилација	Стадиуми на болеста/ TNM					вкупно
	I	II	III	IVa	IVb	
има (M+)	4	3	12	4	2	25
нема (M-)	3	3	2	5	2	15
вкупно	7	6	14	9	4	40

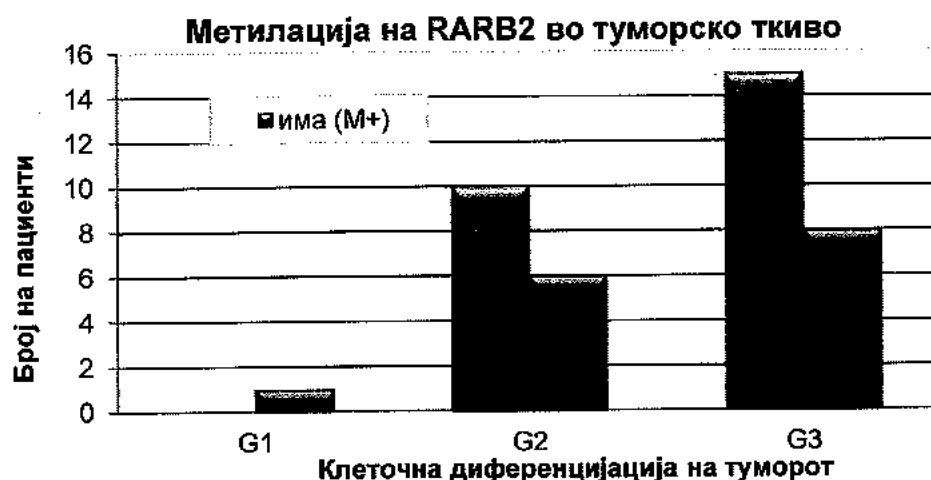


Слика бр.57. Метилација на RAR β 2 во туморско ткиво според стадиумот на болеста/ TNM

Со добра и средна диференцијација на туморот (G1 и G2) беа вкупно 17/40(42,5%) пациенти, од кои, кај 11/(64,7%) имаше метилација на RAR β 2. Од 23 испитаници со слаба диференцијација на туморот (G3) кај 19(82,6%) беше регистрирана метилацијата на генот. Анализата покажа дека непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на RAR β 2 и клеточната диференцијација на примарниот тумор кај испитаниците кои беа вклучени во студијата (Fisher exact test: $p = 0,1779$). (табела бр.42 и слика бр.58)

Табела бр.42. Метилација на RAR β 2 во туморско ткиво според клеточната диференцијација на туморот

RAR β 2 метилација	Клеточна диференцијација на туморот			вкупно
	G1	G2	G3	
има (M+)	0	10	15	25
нема (M-)	1	6	8	15
вкупно	1	16	23	40



Слика бр.58. Метилација на RAR β 2 во туморско ткиво според клеточната диференцијација на туморот

Целокупната анализа покажа дека постои корелација, само помеѓу DNA метилацијата на RAR β 2 и возрастните групи (Pearson χ^2 test: $p = 0,0164$), односно, значајно почести метилации на овој ген има кај повозрасните пациенти(60-69 год). (табела бр.37). Тоа укажува на метилација на овој ген, дека е придобивка во напредната возраст, со стареењето на организмот.

Предиктивната прогностичка вредноста на RAR β 2 во развојот и прогресијата туморите, не се покажа статистички значајна, во однос на T, N, TNM и G стадиумот.

Анализа како сигнификантен предиктори во развојот, прогресијата и агресивноста на оралниот карцином ги потврди метилираните RAR β 2 гени, како несигнификантни.

Сублимирани сите добиени резултати за ДНА метилацијата на 5^{те} гени, во однос на клиничко-патолошките параметри, покажаа дека:

Добиените резултати од анализирата на промотор метилацијата на ECDH (Ecadherin) - $p = 0,6065$; MGMT - $p = 0,6882$; DAPK - $p = 0,3117$; RAR β 2 - $p = 0,6639$ и CDKN2A1(p16) - $p = 0,5915$ во туморските ткивни примероци, во корелација со полот не покажаа сигнификантна разлика. Не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација помеѓу метилацијата на 5-те зададени гени и полот.

Во однос на возраста, резултатите покажаа асоцираност само помеѓу метилацијата на RAR β 2, која се регистрира значајно повеќе кај повозрасната група од 60 до 69 години - $p = 0,0164$. Помеѓу метилацијата на останатите гени и возраста, не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација: ECDH (Ecadherin) - $p = 0,2240$; MGMT - $p = 0,3374$; DAPK - $p = 0,6626$; и CDKN2A1(p16) - $p = 0,8358$.

Разликите во фреквенцијата на метилационните стапки на ECDH (Ecadherin) - $p = 0,4263$; MGMT - $p = 0,1779$; DAPK - $p = 0,0964$; RAR β 2 - $p = 0,3637$ и CDKN2A - $p = 0,2176$ промотор гените во OSCC ткивата, во однос на локализацијата не беа статистички значајни, односно, не постои статистички значајна разлика помеѓу локализацијата на оралните карциноми и метилираните гени.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу фазите на pT(pT1+pT2 и pT3+pT4) и (-M) и (+M) гени во OSCC ткивата: Ecadherin - $p = 0,1384$; MGMT - $p = 0,5680$; DAPK - $p = 0,4320$; RAR β 2 - $p = 0,3536$ и CDKN2A - $p = 0,9348$.

Добиените резултати од анализирата на промотор метилацијата на ECDH (Ecadherin) - $p = 0,2651$; MGMT - $p = 0,2501$; DAPK - $p = 0,4291$; RAR β 2 - $p = 0,2636$ и CDKN2A1(p16) - $p = 0,5365$ во туморските ткивни примероци, во корелација со pN не покажаа сигнификантна разлика. Не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација помеѓу метилацијата на 5-те зададени гени и појавата на локални и регионални рецидиви.

Во однос на стадиумот на болеста, резултатите покажаа асоцираност помеѓу метилацијата на ECDH (Ecadherin) - $p = 0,0078$; DAPK - $p = 0,0420$ и CDKN2A1(p16) - $p = 0,0116$, односно, овие зададени гени значајно повеќе метилираа кај пациентите со III и IV стадиум на болеста, верзус пациентите со I и II стадиум. Помеѓу метилацијата на останатите гени и стадиумот на болеста, не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација (за MGMT - $p = 0,4291$ и за RAR β 2 - $p = 0,4328$).

Според резултатите во однос на клеточната диференцијација на примарниот тумор, постои значајна асоцираност помеѓу метилацијата на ECDH за $p = 0,0260$ и CDKN2A1(p16) за $p = 0,0119$, односно, овие зададени

гени значајно повеќе метилираа кај пациентите со G3, верзус пациентите со G1 и G2. Помеѓу метилацијата на останатите гени и клеточната диференцијација на туморот, не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација (за MGMT - $p = 0,4235$, за DAPK - $p = 0,1779$ и за RAR β_2 - $p = 0,6797$).

Би требало да нагласиме дека, големината на примерокот при статистичките анализи има многу голема важност. Колку е поголем примерокот, толку се посигурни добиените резултати, но и веројатноста да се добијат статистички значајни асоцијации е поголема. Под претпоставка дека бројот на примероци е двојно поголем, а дека процентуалната разлика помеѓу метилираните и неметилираните ќе биде иста, ќе се добие значајна асоцираност во однос и на некои други патохистолошки варијабли од интерес и зададените гени. Тоа сугерира на потребата за продолжување на следењето и анализирањето на примероци од идни пациенти со OSCC во однос на метилацијата на зададените гени.

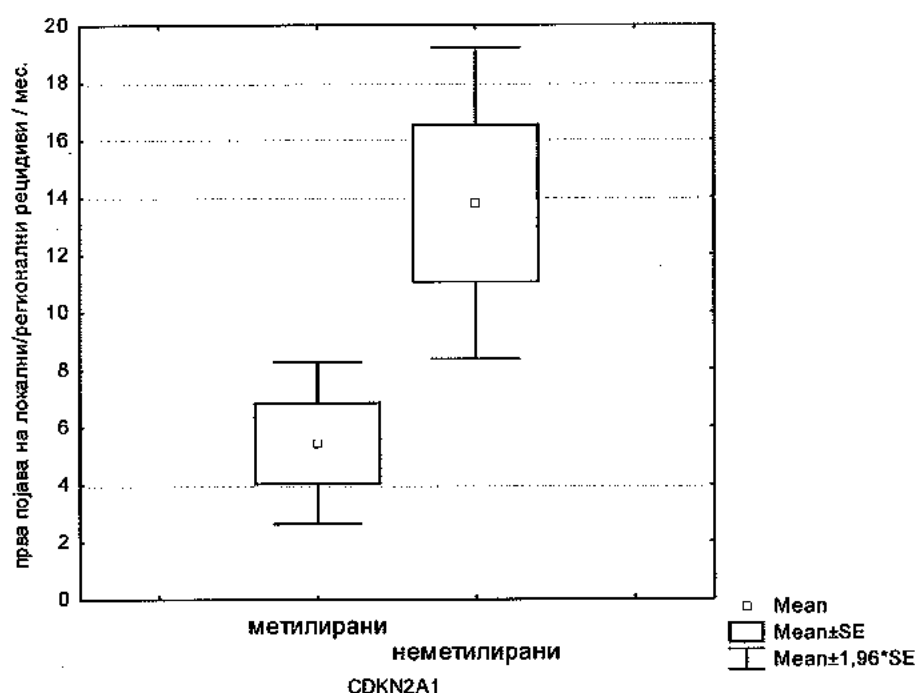
➤ Анализата на DNA метилациониот статус на зададените гени, во корелација со времето на појавата на локални/ регионални рецидиви (вратни метастази) со времето на преживување, беше направена со цел да се утврди нивната прогностичката вредност кај пациентите со OSCC. Резултатите, добиени со Mann-Whitney и Kaplan-Meier – овата крива, Log-Rank Test и Cox-овата регресија покажаа унифициран модел за секој ДНА промотор ген одделно, во однос на варијаблите, во анализите го покажаа следното:

а) При утврдување на вредноста на несоодветната промотор метилација на p16 како прогностички фактор во OSCC, ги добивме следните резултати:

Кај 21(53,5%)пациенти, кај кои имаше метилација на p16(CDKN2A1), просечното време на појавување на први локо/регионални рецидиви изнесуваше од $5,43 \pm 5,14$ месеци. Кај 14/30(46,7%) пациент со (M-)p16, просечното време на појавување на први локални / регионални рецидиви изнесуваше $13,78 \pm 10,34$ месеци. Постои значајна разлика во однос на времето на појава на први рецидиви по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на p16 (Mann-Whitney U Test: $Z = -3,076$ $p = 0,0020$). Времето на појава на рецидиви по операцијата е значајно пократко кај пациентите кај кои е регистрирана метилација на p16. (табела 43, слика 59 и 59a).

Табела бр. 43. Средни вредности на време на појавување на први локални и регионални рецидиви во месеци според метилацијата на p16

P16	просек	СД	Min.	Max.
метилирани	5,43	5,14	1,5	22
неметилирани	13,78	10,34	2	31

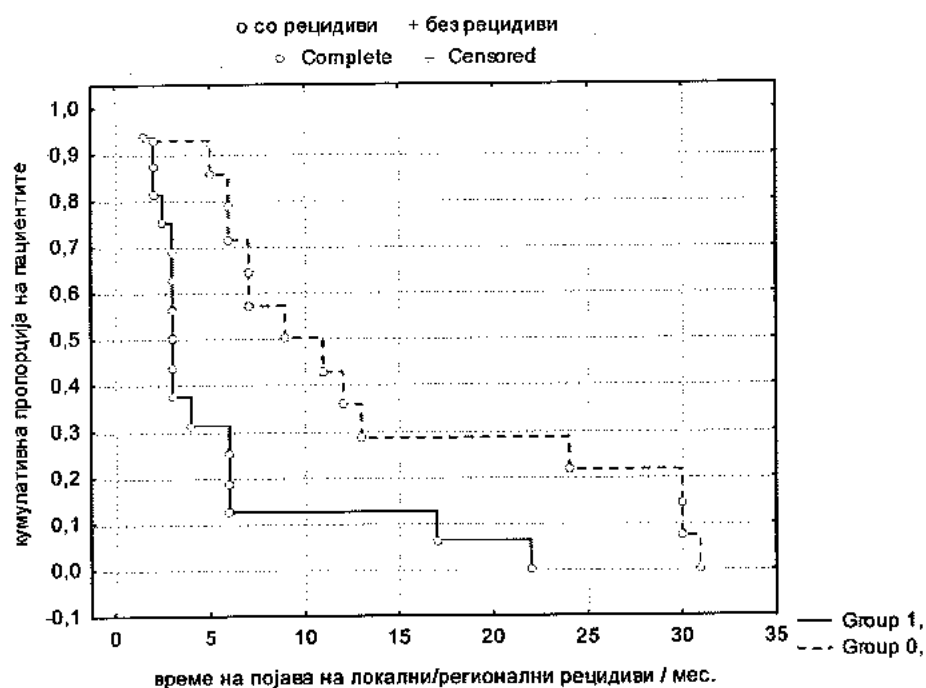


Слика бр. 59. Средни вредности на време на појавување на први локални и регионални рецидиви во месеци според метилацијата на p16

Кај 16(53,3%)пациенти со локални и регионални рецидиви имаше метилација на p16, а кај 14(46,7%) пациенти немаше. Според Kaplan-Meier – овата крива, појавата на локални и регионални рецидиви кај 32% од пациентите со OSCC кои имаат метилација на p16 се регистрира во првите 4 месеци после операцијата. Кај 12% од пациентите рецидиви се јавуваат по 6 месеци, а кај 7% од оние кои имаат метилација на p16 рецидивите се дијагностицираат покасно од 18 месеци од операцијата.

Кај пациентите кои немаат метилација на p16, настанот/појавата на локални и регионални рецидиви најмногу се регистрира во првите 5 до 12 месеци после операцијата. Кај 30% од оние кои немаат метилација на p16 рецидивите се дијагностицираат покасно, после повеќе од 24 месеци од интервенцијата.

Постои значајна разлика во однос на времето на појавување на локални и регионални рецидиви помеѓу пациентите со M+ и M- на p16 (Log-Rank Test: $WW = 6,64$ Sum = 22,837 Test statistic = 2,740 $p = ,00613$). (табела 43, слика 59 и слика 59a).



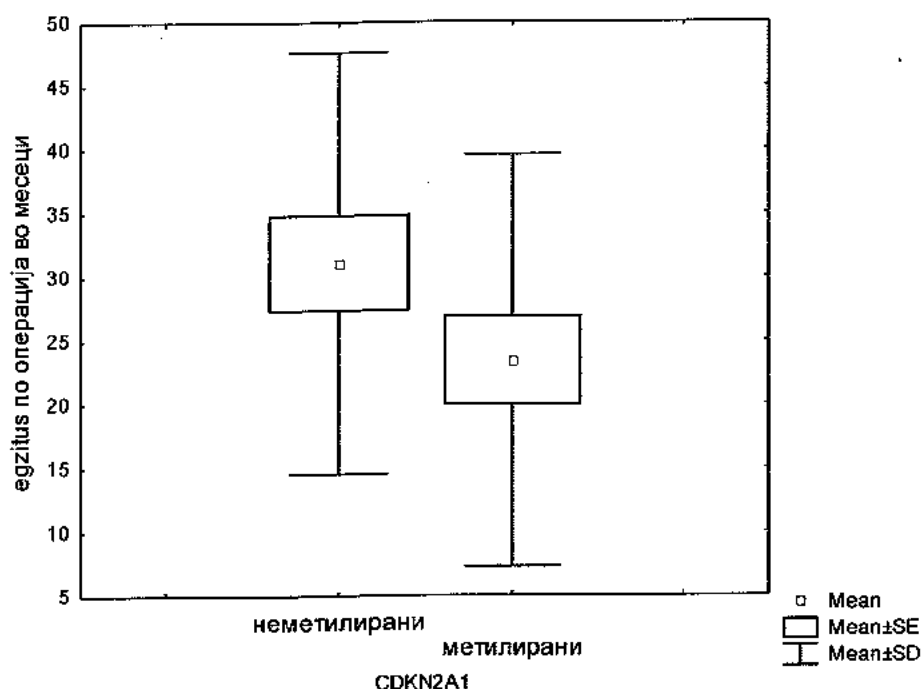
Слика бр.59а. Kaplan-Meier – ова крива на појава на рецидиви кај пациенти со OSCC во зависност од метилација на p16
 Група 1 – метилирани Група 0 – неметилирани

Метилација на p16 беше регистрирана кај 19/29 (65,5%) егзистирани пациенти, а нивното просечното време на преживување беше $23,43 \pm 16,15$ месеци. Кај 10/29 (46,7%) починати пациент кај кои немаше метилација на p16, просечното време на преживување изнесуваше $31,10 \pm 16,52$ месеци.

Постои значајна разлика во однос на времето на преживување по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на p16 (Mann-Whitney U Test: $Z = -2,646$ $p = 0,0082$). Времето на преживување по операцијата е значајно пократко кај пациентите кај кои е регистрирана метилација на p16. (табела 44, сл.бр. 60 и 60а)

Табела бр.44. Средни вредности на време на преживување во месеци според метилацијата на p16 (CDKN2A1)

CDKN2A1	просек	СД	Min.	Max.
метилирани	23,43	16,15	9	63
неметилирани	31,10	16,52	10	56

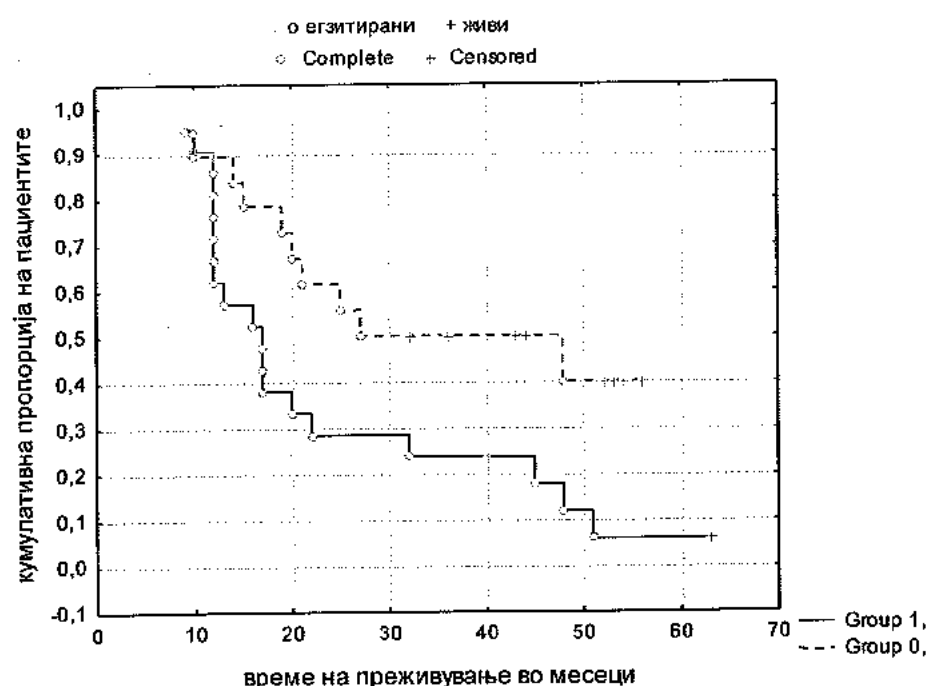


Слика бр.60. Средни вредности на време на преживување во месеци според метилацијата на p16 (CDKN2A1)

Од вкупно 29 егзитирани, кај 19 (65,5%) пациенти имаше метилација на p16, а кај 10 (34,5%) пациенти немаше. Според Kaplan-Meier – овата крива, појавата на настанот кај пациентите со OSCC кои имаа метилација на p16 се регистрира најмногу по 12 месеци од операцијата. Кај 28% од пациентите преживувањето е подолго од 30 месеци, а кај 12% од оние кои имаат метилација на p16 преживувањето е подолго од 48 месеци од операцијата.

Кај пациентите кои немаа метилација на p16, настанот/ егзитусот најмногу се регистрира во периодот од 10 до 20 месеци после операцијата. Кај 50% од оние кои немаат метилација на p16 преживувањето е подолго од 48, а кај 40% подолго од 55 месеци по интервенцијата.

Постои значајна разлика во однос на времето на преживување помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на p16 и оние без метилација (Log-Rank Test: WW = 6,128 Sum = 25,929 Test statistic = 2,379 p = 0,0173).



Слика бр.60а. Kaplan-Meier – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC во зависност од метилација на p16 (CDKN2A1)

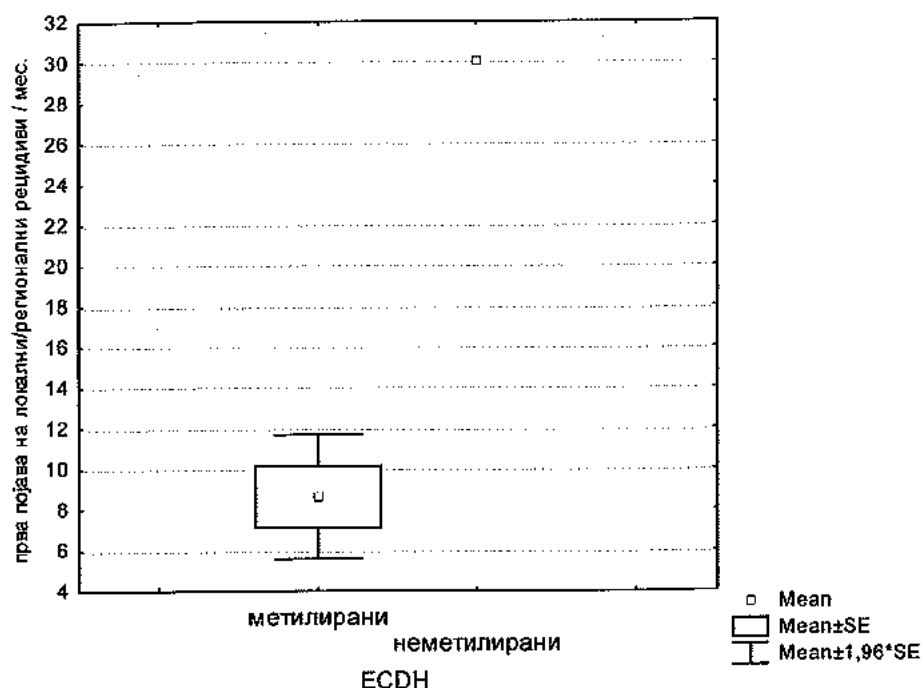
Група 1 – метилирани Група 0 - неметилирани

Од вкупно 40 оперирани пациенти со OSCC, локални и регионални рецидиви се дијагностицираа кај 30(75%) лица. Од нив, кај 29/30 (96,7%)пациенти кај кои имаше метилација на Ecadherin-от (ECDH), просечното време на појавување на први локални и регионални рецидиви изнесуваше $8,62 \pm 8,37$ месеци (неправилна дистрибуција заради екстремно ниски и високи вредности).

Кај 1/30(3,3%) пациент кај кој немаше метилација на Ecadherin-от , просечното време на појавување на први локални / регионални рецидиви изнесуваше 30 месеци. Постои значајна разлика во однос на времето на појава на рецидиви / мес. помеѓу пациентите со и без метилација на Ecadherin-от (Mann-Whitney U Test: $Z = -2,510$ $p = 0,0181$). Кај метилираните времето на појава на локални и регионални рецидиви е значајно пократко. (табела 45, слика 61 и слика 61а)

Табела бр.45. Средни вредности на време на појавување на први локални и регионални рецидиви во месеци според метилацијата на Ecadherin

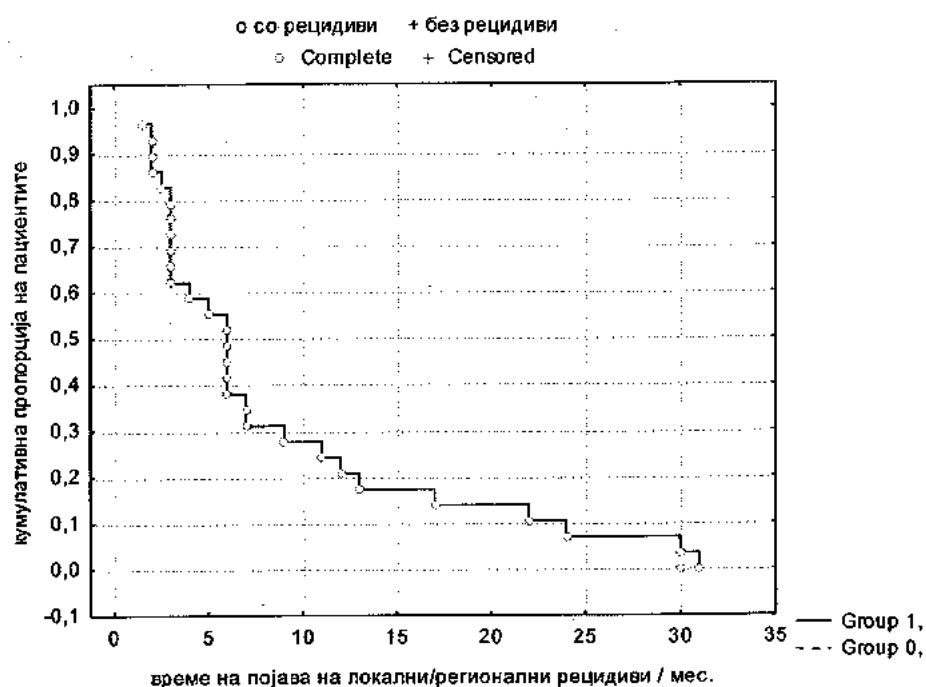
ECDH	просек	СД	Min.	Max.
метилирани	8,62	8,37	1,5	31
неметилирани	30,0	0,0	30	30



Слика бр. 61. Средни вредности на време на појавување на први локални и регионални рецидиви во месеци според метилацијата на Ecadherin-от

Кај 29/30(96,7%)пациенти со локални и регионални рецидиви имаше метилација на Ecadherin-от (ECDH), а кај 1/30(3,3%) пациент немаше. Според Kaplan-Meier – овата крива, настанот/појавата на локо/регионални рецидиви кај пациентите со OSCC кои имаа метилација на Ecadherin-от, најмногу се регистрира во првите 6 месеци постоперативно. 23% од пациентите развиваат рецидиви по 12 месеци, а само кај 10% од оние кои имаат метилација на Ecadherin-от рецидивите се дијагностицираат по 24 месеци од операцијата.

Постои значајна разлика во однос на времето на појавување на рецидиви и метастази помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на Ecadherin-от и оние без метилација (Log-Rank Test: $W = 1,74$ Sum = 22,83 Test statistic = 2,001 $p = 0,04531$) (табела 44, слика 60 и слика 60a)



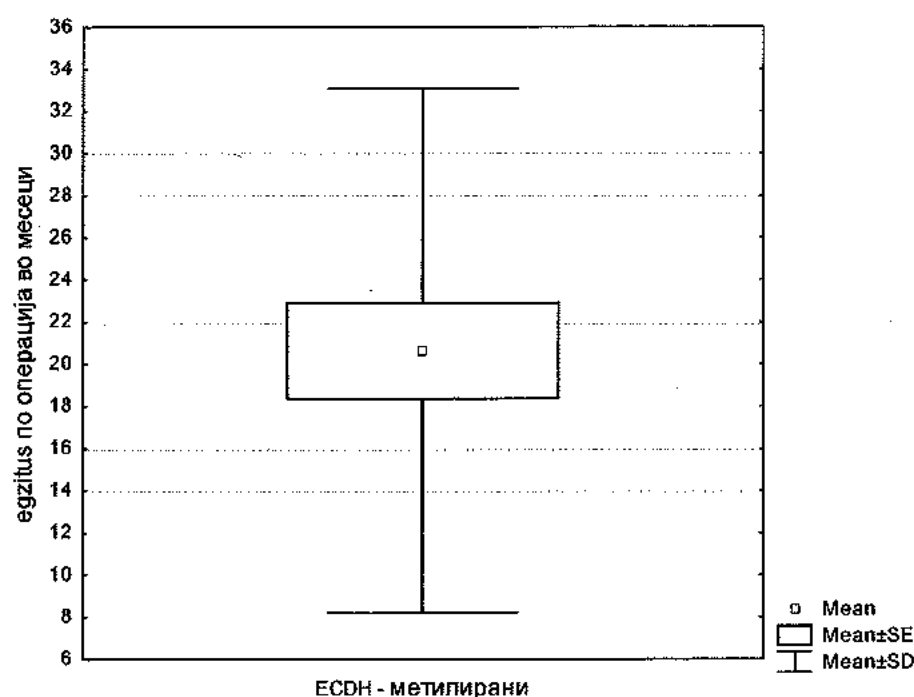
Слика бр. 61а. Kaplan-Meier – ова крива на појава на рецидиви кај пациенти со OSCC во зависност од метилација на Ecadherin-от

Група 1 – метилирани Група 0 – неметилирани

Од вкупно 40 оперирани пациенти со OSCC, за време на следењето егзитираше 29 (72,5%) лица. Кај сите егзитирани 29 (100%) пациенти имаше метилација на ECDH, а просечното време на преживување изнесуваше $20,62 \pm 12,43$ месеци (неправилна дистрибуција заради екстремно ниски и високи вредности). Кај 4-те пациенти кај кои немаше метилација на ECDH, а беа живи за време на следењето, просечното време на преживување изнесуваше $37,7 \pm 20,9$ месеци. (табела 46, слика 62 и слика 62а)

Табела бр. 46. Средни вредности на време на егзитус по операција во месеци според метилацијата на ECDH

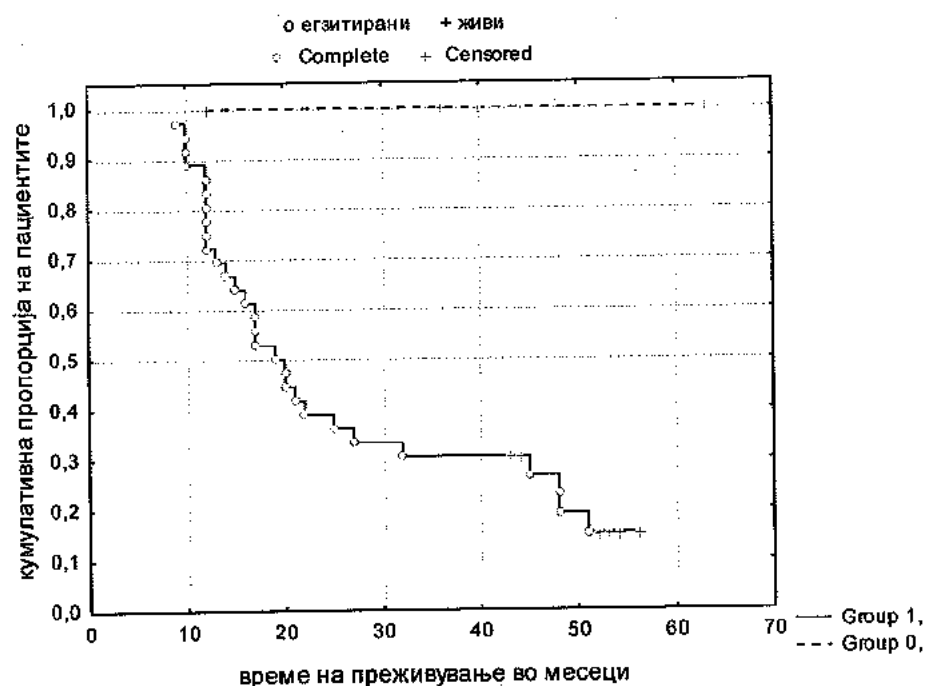
ECDH	просек	СД	Min.	Max.
метилирани	20,62	12,43	9	51
неметилирани	/	/	/	/



Слика бр. 62. Средни вредности на време на егзитус по операција во месеци според метилацијата на ECDH

Од 36 пациенти кај кои имаше метилација на ECDH, 29(80,6%) пациенти егзитуваа за време на следењето. Според Kaplan-Meier – овата крива, настанот/егзитувањето кај пациентите со OSCC кои имаа метилација на ECDH, најмногу се регистрира по 10 до 20 месеци после операцијата. 37% од пациентите преживуваат повеќе од 24 месеци, а 15% од оние кои имаат метилација на ECDH преживуваат повеќе од 50 месеци од операцијата. Сите 4 пациенти кај кои немаше метилација на овој ген, беа живи за време на следењето, односно 100% од пациентите без метилација на ECDH преживуваат повеќе од 60 месеци.

Постои значајна разлика во однос на времето на преживување помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на ECDH и оние без метилација (Log-Rank Test: $WW = 3,709$ Sum = 25,929 Test statistic = 2,397 $p = 0,01649$). (табела бр.46, слика бр.62 и 62.a).



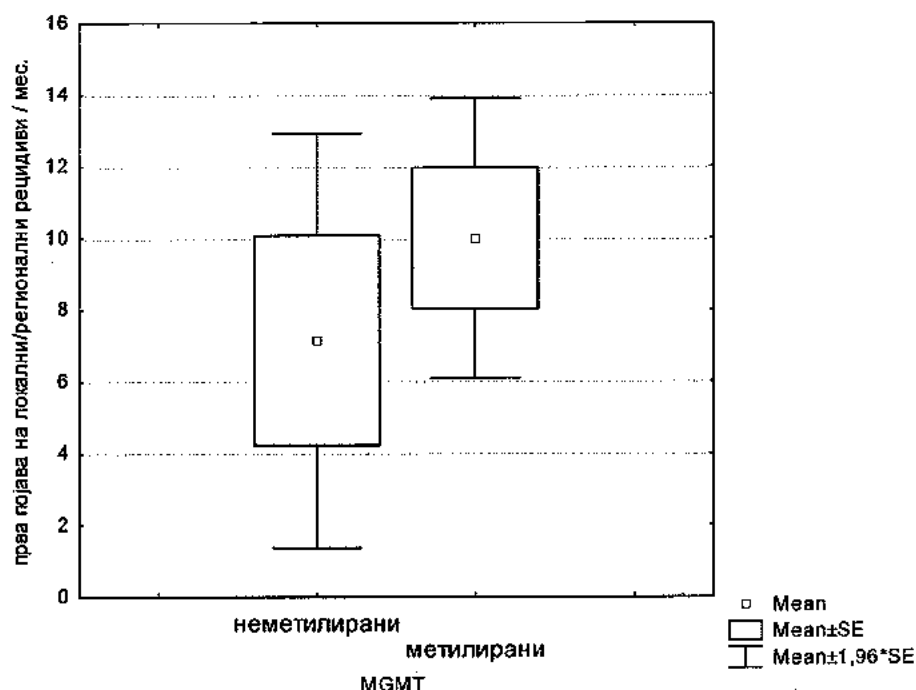
Слика бр.62.а. Kaplan-Meier – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC во зависност од метилација на ECDH

Група 1 – метилирани Група 0 - неметилирани

Од 30 пациенти со локални и регионални рецидиви по операција, кај 23(76,7%) имаше метилација на **MGMT**, а просечното време на појавување на рецидивите изнесуваше $10,0 \pm 9,52$ месеци (неправилна дистрибуција заради екстремно ниски и високи вредности). Кај 7/30(23,3%) пациент кај кои немаше метилација на **MGMT**, просечното време на појавување на први локални / регионални рецидиви изнесуваше $7,14 \pm 7,79$ месеци. Нема значајна разлика во однос на времето на појава на први рецидиви по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на **MGMT** (Mann-Whitney U Test: $Z = -0,858$ $p = 0,3908$). (табела 47, слика 63 и слика 63а)

Табела бр.47. Средни вредности на време на појавување на први локални и регионални рецидиви во месеци според метилацијата на **MGMT**

MGMT	просек	СД	Min.	Max.
метилирани	10,0	9,52	1,5	31
неметилирани	7,14	7,79	2	24

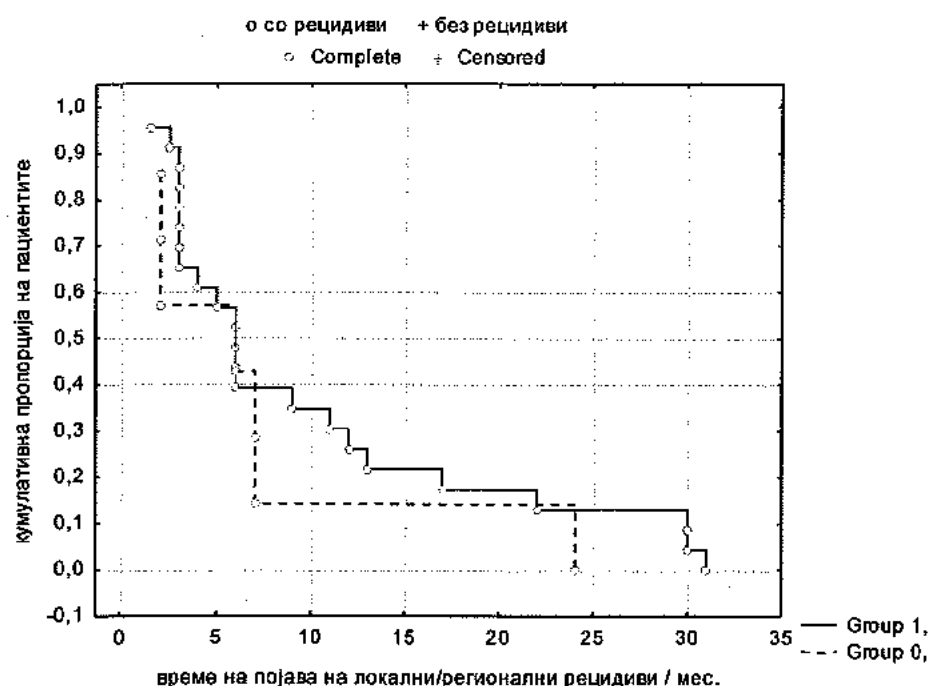


Слика бр.63. Средни вредности на време на појавување на први локални и регионални рецидиви во месеци според метилацијата на MGMT

Кај 23(76,7%)пациенти со локални и регионални рецидиви имаше метилација на MGMT, а кај 7(23,3%) пациенти немаше. Според Kaplan-Meier – овата крива, настанот/појавата на локални и регионални рецидиви кај пациентите со OSCC кои имаат метилација на MGMT, најмногу се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 26% од пациентите рецидиви се јавуваат по 12 месеци, а само кај 10% од оние кои имаат метилација на MGMT рецидивите се дијагностицираат по 30 месеци од операцијата.

Кај пациентите кои немаат метилација на MGMT, настанот/појавата на локални и регионални рецидиви исто така најмногу се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 14% од оние кои немаат метилација на MGMT рецидивите се дијагностицираат по 24 месеци од операцијата.

Непостои значајна разлика во однос на времето на појавување на локални и регионални рецидиви помеѓу пациентите чии примероци имаат метилација на MGMT и оние без метилација (Log-Rank Test: WW = -1,724 Sum = 22,837 Test statistic = -,838539 $p = ,40173$). (табела 47, слика 63 и слика 63a)

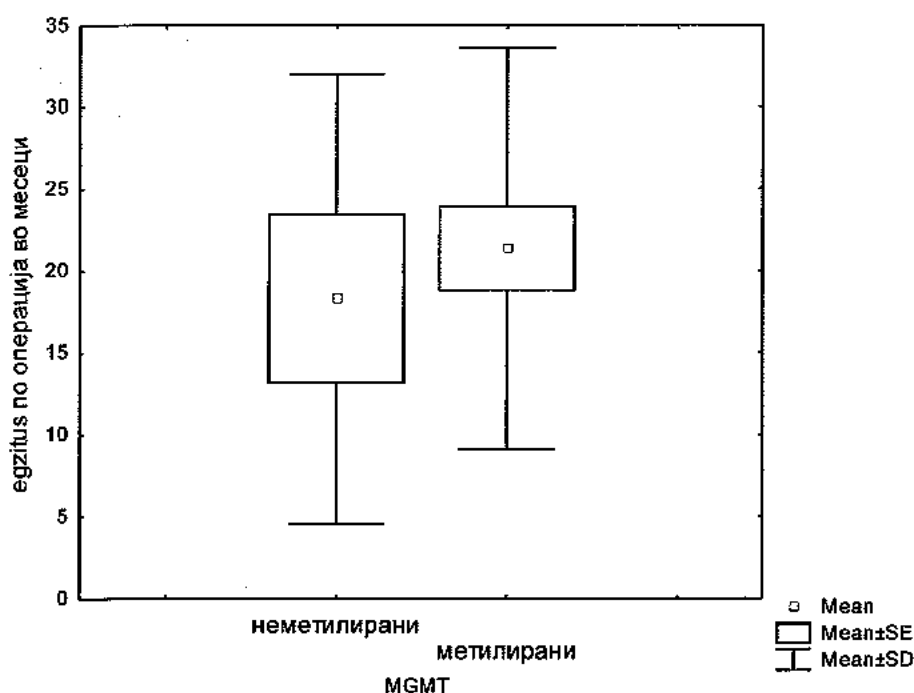


Слика бр.63а. Kaplan-Meier – ова крива на појава на рецидиви кај пациенти со OSCC во зависност од метилација на MGMT
Група 1 – метилирани Група 0 - неметилирани

Од 29 егзитирани пациенти, кај 22(75,9%) имаше метилација на MGMT, а просечното време до настапувањето на смртта изнесуваше $21,36 \pm 12,24$ месеци (неправилна дистрибуција заради екстремно ниски и високи вредности). Кај 7/29(24,1%) пациент кај кои немаше метилација на MGMT, просечното време до егзитирањето изнесуваше $18,28 \pm 13,72$ месеци. Нема значајна разлика во однос на времето на преживување по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на MGMT (Mann-Whitney U Test: $Z = -1,178$ $p = 0,2385$). (табела 48, слика 64 и слика 64а)

Табела бр. 48. Средни вредности на време на егзитус по операција во месеци според метилацијата на MGMT

MGMT	просек	СД	Min.	Max.
метилирани	21,36	12,24	10	51
неметилирани	18,28	13,72	9	48

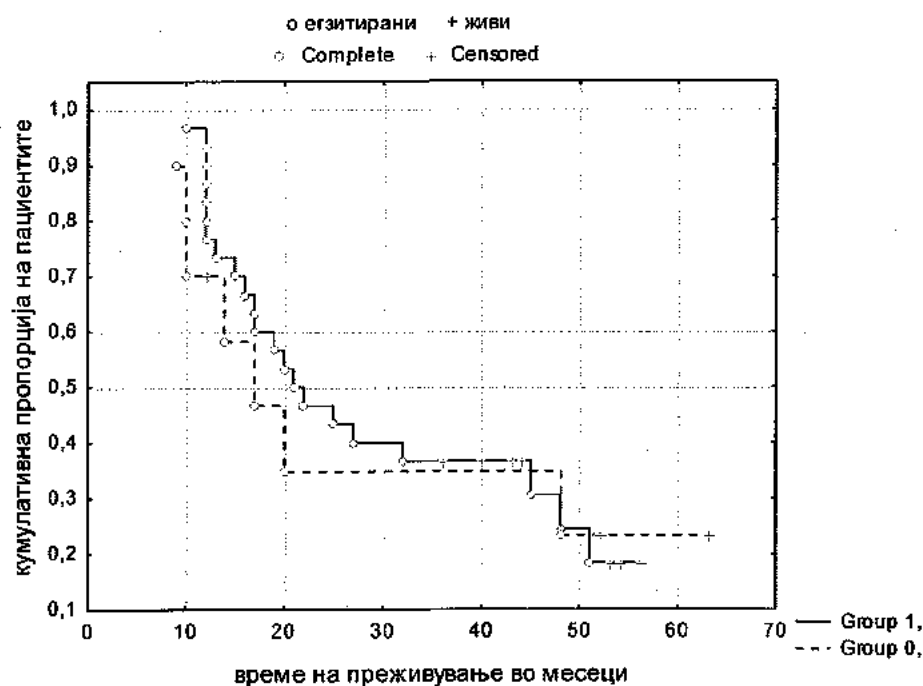


Слика бр.64. Средни вредности на време на егзитус по операција во месеци според метилацијата на MGMT

Кај 22(75,9%) егзитирани пациенти имаше метилација на MGMT, а кај 7(24,1%) пациенти немаше. Според Kaplan-Meier-овата крива, настанот/појавата на егзитусот кај пациентите со OSCC кои имаат метилација на MGMT, најмногу се регистрира во првите 12 месеци после операцијата. Кај 40% од пациентите преживувањето е подолго од 24 месеци, кај 30% е подолго од 40 месеца, а кај 9% од оние кои имаат метилација на MGMT преживуваат повеќе од 55 месеци од операцијата.

Кај пациентите кои немаат метилација на MGMT, настанот/појавата на егзитус најмногу се регистрира во првите 10-12 месеци после операцијата. Кај 35% од оние кои немаат метилација на MGMT преживуваат повеќе од 45 месеци, а 23% преживуваат повеќе од 60 месеци после операцијата.

Непостои значајна разлика во однос на времето на преживување помеѓу пациентите чии примероци имаат метилација на MGMT и оние без метилација (Log-Rank Test : WW = -1,566 Sum = 22,599 Test statistic = -0,756 p = 0,4492) (табела 48, слика 64 и слика 64a)



Слика бр.64а. Kaplan-Meier – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC во зависност од метилација на MGMT

Група 1 – метилирани Група 0 - неметилирани

Со локални и регионални рецидиви по операција, кај 24/30(80,0%) пациенти имаше метилација на DAPK, а просечното време на појавување на рецидивите изнесуваше $9,64 \pm 8,82$ месеци (неправилна дистрибуција заради екстремно ниски и високи вредности). Кај 6/30(20%) пациент кај кои немаше метилација на DAPK, просечното време на појавување на први локални / регионални рецидиви изнесуваше $8,08 \pm 10,98$ месеци.

Нема значајна разлика во однос на времето на појава на први рецидиви по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на DAPK (Mann-Whitney U Test: $Z = 1,148$ $p = 0,2507$). (табела 49, слика 65)

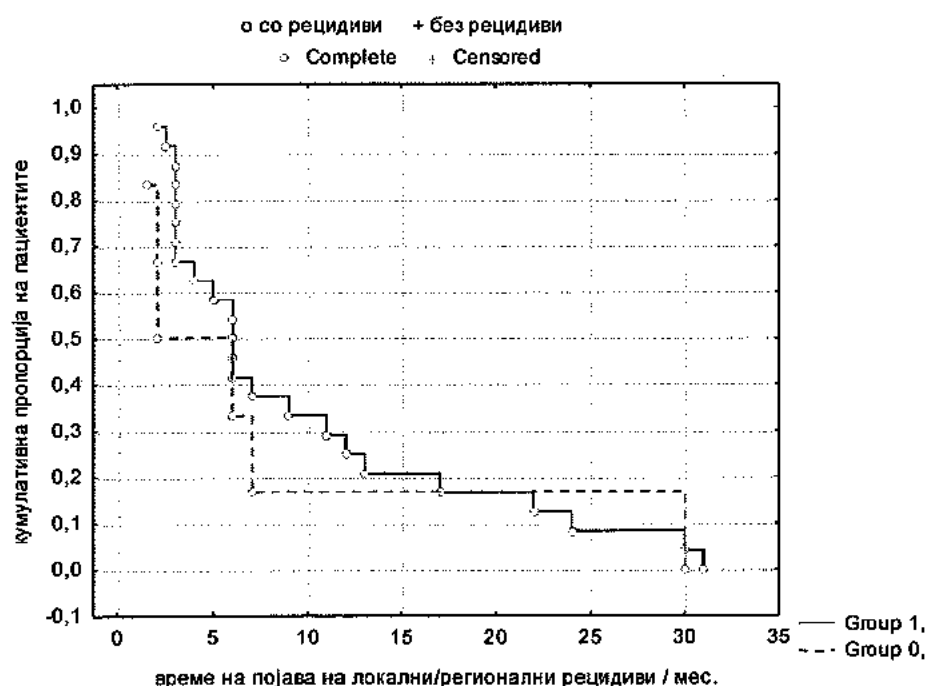
Табела бр.49. Средни вредности на време на појавување на први локални и регионални рецидиви во месеци според метилацијата на DAPK

DAPK	просек	СД	Min.	Max.
метилирани	9,64	8,82	2	31
неметилирани	8,08	10,98	2	30

Кај 24(80%)пациенти со локални и регионални рецидиви имаше метилација на DAPK, а кај 6(20%) пациенти немаше. Според Kaplan-Meier – овата крива, појавата на локални и регионални рецидиви кај 42% од пациентите со OSCC кои имаа метилација на DAPK се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 25% од пациентите рецидиви се јавуваат по 12 месеци, а само кај 8% од оние кои имаат метилација на DAPK рецидивите се дијагностицираат подолго од 24 месеци од операцијата.

Кај пациентите кои немаа метилација на DAPK, настанот/појавата на локални и регионални рецидиви исто така најмногу се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 18% од оние кои немаат метилација на DAPK рецидивите се дијагностицираат по 24 месеци од операцијата.

Непостои значајна разлика во однос на времето на појавување на локални и регионални рецидиви помеѓу (M+) и (M-) DAPK гени. (Log-Rank Test :WW = -1,145 Sum = 22,83 Test statistic = -,5888 p = 0,5559) (табела 49, слика 65 и слика 65a).



Слика бр.65. Kaplan-Meier – ова крива на појава на рецидиви кај пациенти со OSCC во зависност од метилација на DAPK

Група 1 – метилирани Група 0 - неметилирани

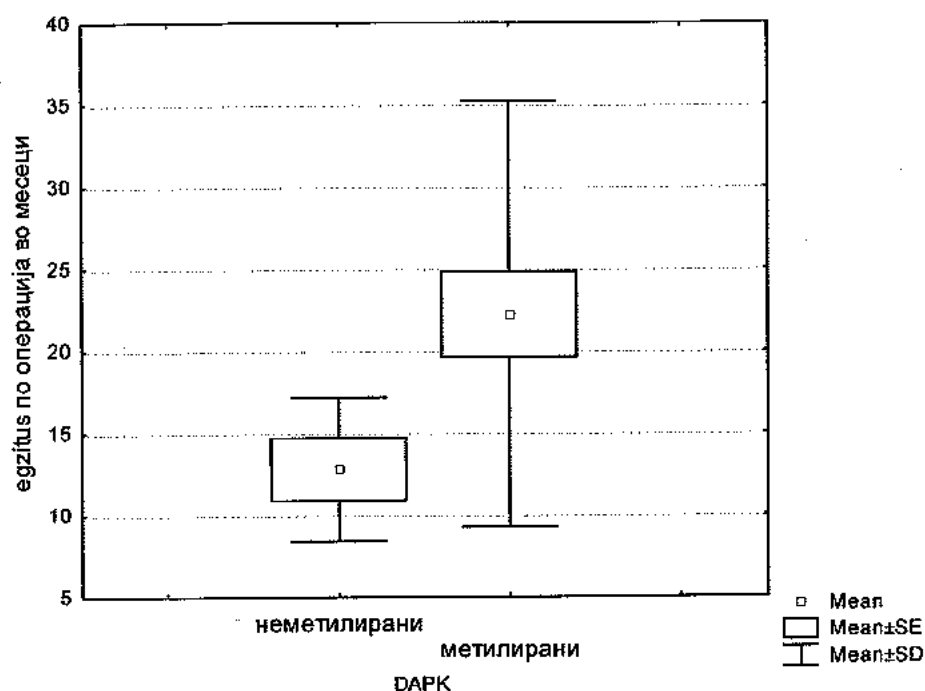
Од вкупно 29 егзитирани по операција, кај 24(82,8%)пациенти имаше метилација на DAPK, а просечното време на преживување кај нив изнесуваше $22,25 \pm 12,98$ месеци. Кај 5/29(17,2%) пациент кај кои немаше метилација на DAPK, просечното време на преживување изнесуваше $12,80 \pm 4,38$ месеци.

Постои значајна разлика во однос на времето на преживување по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на DAPK (Mann-Whitney U Test: Z = 1,991 p = 0,0463). Кај пациентите кај кои е регистрирана метилација

на DAPK времето на преживување е значајно подолго. (табела 50, слика 66 и слика 66a)

Табела бр.50. Средни вредности на време на преживување во месеци според метилацијата на DAPK

DAPK	просек	СД	Min	Max
метирирани	22,25	12,98	9	51
неметирирани	12,80	4,38	10	20

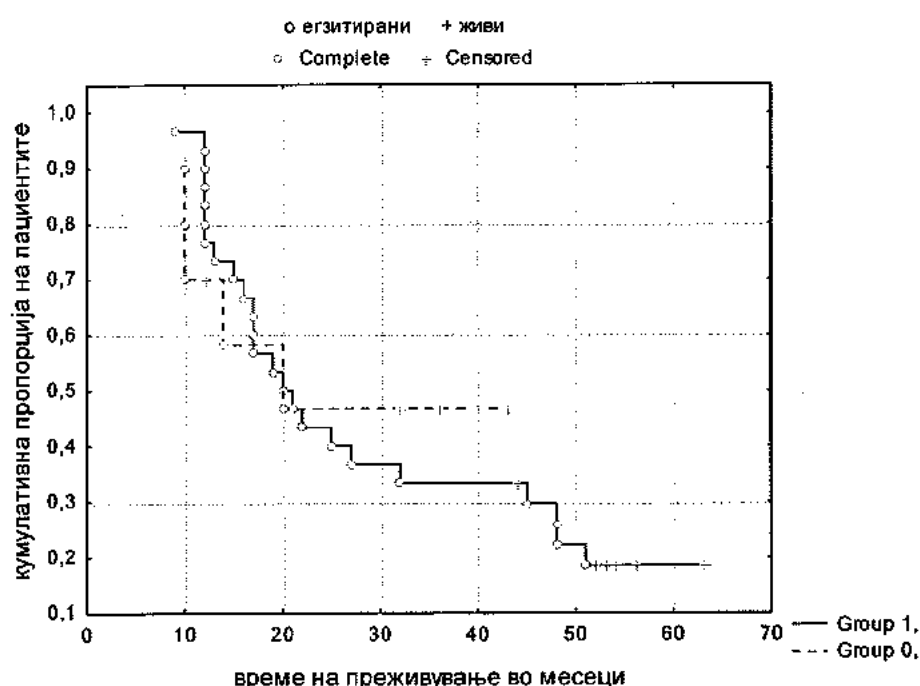


Слика бр.66. Средни вредности на време на преживување во месеци според метилацијата на DAPK

Кај 24(82,8%) егзитирани пациенти имаше метилација на DAPK, а кај 5(17,2%) пациенти немаше. Според Kaplan-Meier – овата крива, настанот кај пациентите со OSCC кои имаа метилација на DAPK најмногу се регистрира во периодот од 12 до 20 месеци после операцијата. 40% од пациентите преживуваат повеќе од 24 месеци, 30% преживуваат повеќе од 45, а кај 9% од оние кои имаат метилација на DAPK преживувањето е подолго од 50 месеци по операцијата.

Кај пациентите кои немаа метилација на DAPK, смртниот исход најмногу се регистрира во првите 10 месеци после операцијата. Кај 48% од оние кои немаат метилација на DAPK преживуваат повеќе од 40 месеци од операцијата. Постои значајна разлика во однос на времето на преживување помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на DAPK и оние без метилација (Log-Rank Test: WW = 3,479 Sum = 24,929 Test statistic = 2,064 p = 0,0396).

Кај пациентите кај кои е регистрирана метилација на DAPK времето на преживување е значајно подолго (табела 50, слика 66 и слика 66а)



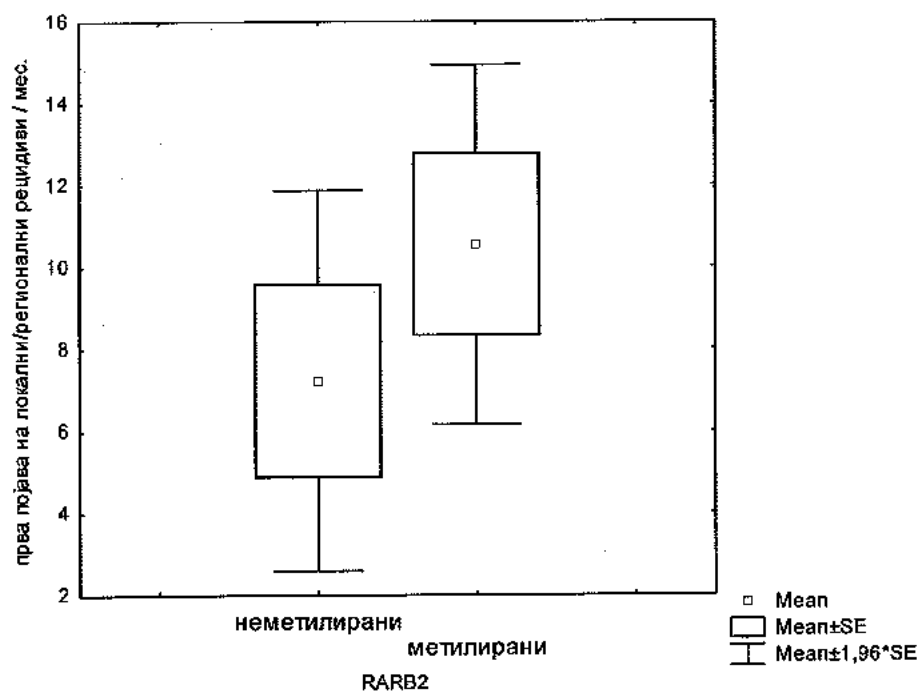
Слика 6р.66.а. *Kaplan-Meier* – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC во зависност од метилација на DAPK

Група 1 – метилирани Група 0 - неметилирани

Од 30 пациенти со рецидиви по операција, кај 19(63,3%) имаше метилација на RAR β 2, со просечното време на појавување на рецидивите од $10,55 \pm 9,75$ месеци. Кај 11/30 (36,7%) пациент кај кои немаше метилација на RAR β 2, просечното време на појавување на први локални / регионални рецидиви изнесуваше $7,22 \pm 7,85$ месеци. Нема значајна разлика во однос на времето на појава на први рецидиви по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на RAR β 2 (Mann-Whitney U Test: $Z = -0,671$ $p = 0,5018$). (табела 51, слика 67 и слика 67а).

Табела 6р.51. Средни вредности на време на појавување на први локални и регионални рецидиви во месеци според метилацијата на RAR β 2

RAR β 2	просек	СД	Min.	Max.
метилирани	10,55	9,75	1,5	31
неметилирани	7,22	7,85	2	30

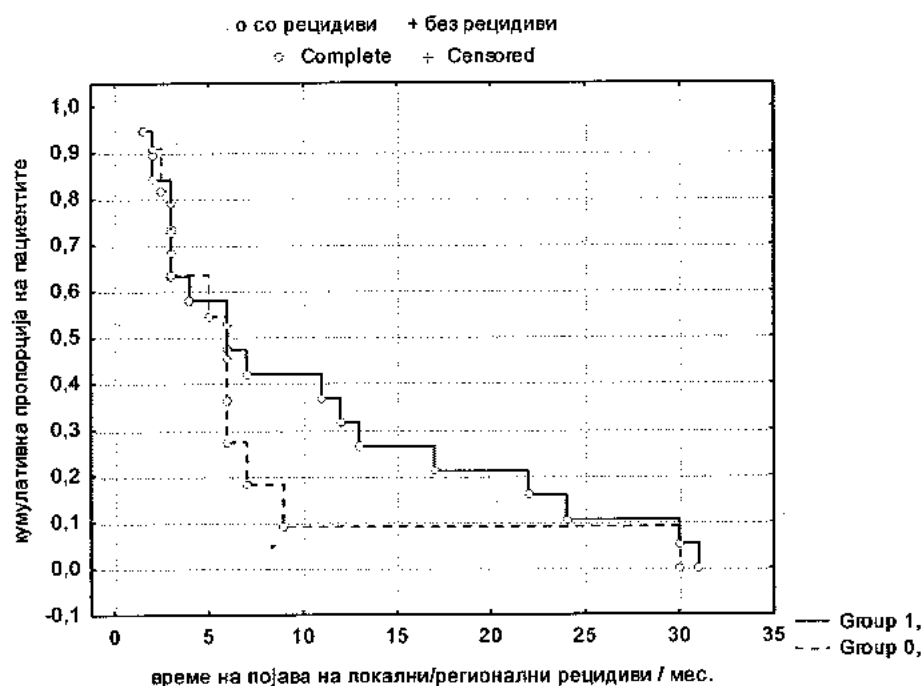


Слика бр.67. Средни вредности на време на појавување на први локални и регионални рецидиви во месеци според метилацијата на RARβ2

Кај 19(63,3%)пациенти со локални и регионални рецидиви имаше метилација на RARβ2, а кај 11(36,7%) пациенти немаше. Според Kaplan-Meier – овата крива, појавата на локални и регионални рецидиви кај 48% од пациентите со OSCC кои имаа метилација на RARβ2 се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 32% од пациентите рецидиви се јавуваат по 12 месеци, а кај 10% од оние кои имаат метилација на RARβ2 рецидивите се дијагностицираат покасно од 24 месеци од операцијата.

Кај пациентите кои немаа метилација на RARβ2, настанот/појавата на локални и регионални рецидиви исто така најмногу се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 10% од оние кои немаат метилација на RARβ2 рецидивите се дијагностицираат покасно, повеќе од 24 месеци од операцијата.

Непостои значајна разлика во однос на времето на појавување на локални и регионални рецидиви помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на RARβ2 и оние без метилација (Log-Rank Test: WW = -2,066 Sum = 22,83 Test statistic = -,882 p = 0,3776) (табела 51, слика 67 и слика 67а)



Слика бр.67а. Kaplan-Meier – ова крива на појава на рецидиви кај пациенти со OSCC во зависност од метилација на RAR β 2

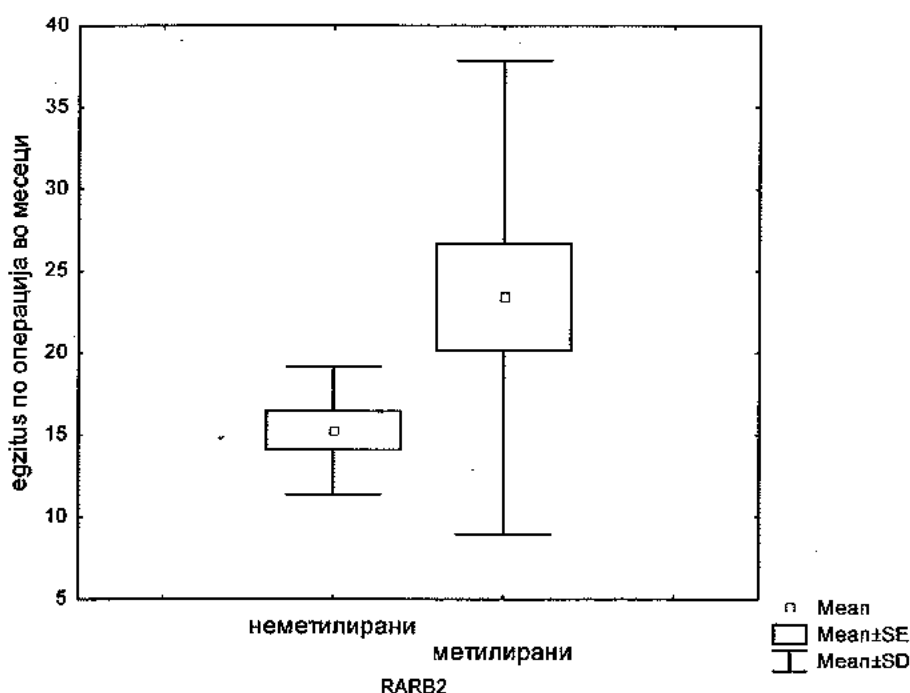
Група 1 – метилирани Група 0 – неметилирани

Од 29 починати пациенти, кај 19(65,5%) имаше метилација на RAR β 2, со просечното време на преживување од $23,42 \pm 14,44$ месеци. Кај 10/29(34,5%) пациент кај кои немаше метилација на RAR β 2, просечното време на преживување изнесуваше $15,30 \pm 3,88$ месеци.

Нема значајна разлика во однос на времето на преживување по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на RAR β 2 (Mann-Whitney U Test: $Z = -1,124$ $p = 0,2609$). (табела 52, слика 68 и слика 68а)

Табела бр.52. Средни вредности на време на преживување во месеци според метилацијата на RAR β 2

RAR β 2	просек	СД	Min.	Max.
метилирани	23,42	14,44	10	51
неметилирани	15,30	3,88	9	20

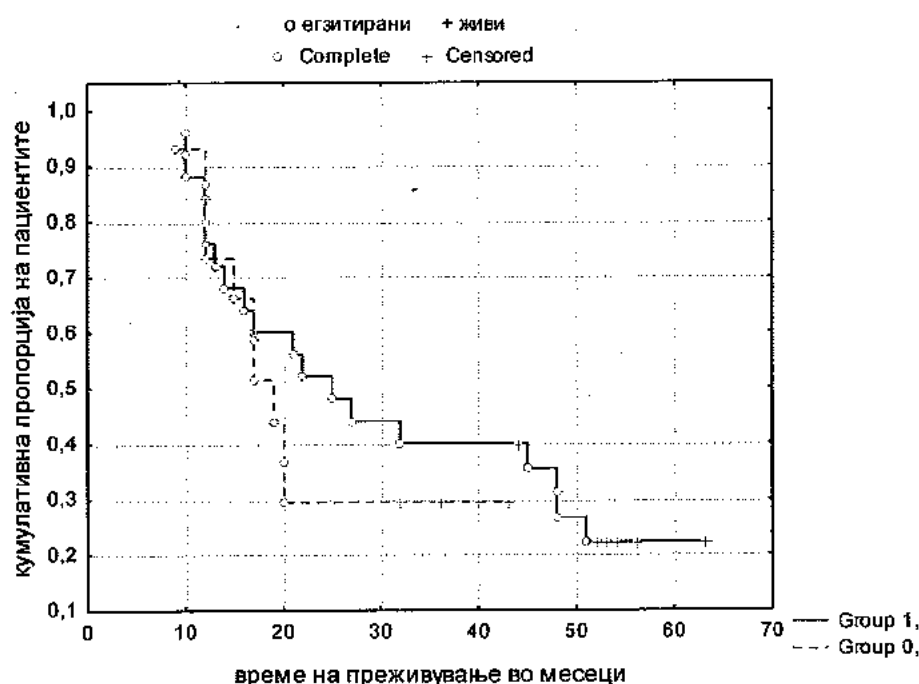


Слика бр.68. Средни вредности на време на преживување во месеци според метилацијата на RARβ2

Кај 19(65,5%) егзитирани пациенти имаше метилација на RARβ2, а кај 10(34,5%) пациенти немаше. Според Kaplan-Meier – овата крива, појавата на настанот/егзитусот кај 48% од пациентите со OSCC кои имаа метилација на RARβ2 се регистрира во периодот од 10 до 24 месеци после операцијата. Кај 40% од пациентите преживувањето е подолго од 40 месеци, а кај 20% од оние кои имаат метилација на RARβ2 преживуваат повеќе од 50 и 60 месеци од операцијата.

Кај пациентите кои немаа метилација на RARβ2, настанот/егзитирањето најмногу се регистрира во првите 12 до 18 месеци после операцијата. Кај 38% од оние кои немаат метилација на RARβ2 преживувањето е подолго од 40 месеци од операцијата.

Непостои значајна разлика во однос на времето на преживување помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на RARβ2 и оние без метилација (Log-Rank Test: WW = -1,642 Sum = 25,929 Test statistic = -0,657675 p = 0,5107). (табела 52, слика 68 и слика 68a)



Слика бр.68а. Kaplan-Meier – ова крива на преживување кај пациенти со OSCC во зависност од метилација на RARB2

Група 1 – метилирани Група 0 - неметилирани

Во Сох-ова регресија зависната варијабла е настанот, временскиот период во месеци на појава на рецидиви и метастази, постоперативно, а предикторни варијабли се зададените гени – нивната метилација (табела бр.60).

Постои значајна поврзаност помеѓу временскиот период во месеци од интервенцијата до појавата на први локални/регионални рецидиви и појавата на метилација кај гени како независни варијабли ($\chi^2 = 13,967$ $p = 0,0158$). Според парцијалните корелации, статистички значајни предикторски варијабли се ECDH ($p = 0,0350$) и p16 ($p = 0,0177$). (табела бр.53).

Табела бр. 53. Survival анализа- Сох-ова регресија

независни варијабли	$\chi^2 = 13,967$ $df = 5$ $p = 0,0158$					
	Beta	S.E	t-value	exponent	Wald	p
ECDH	3,1355	1,487	2,108	23,002	4,4443	0,0350*
MGMT	0,2250	0,759	0,296	1,252	0,0878	0,7668
DAPK	-0,8556	0,882	-0,969	0,424	0,9399	0,3323
RARB2	-0,8198	0,480	-1,705	0,440	2,9103	0,0880
P16	1,0561	0,445	2,370	2,875	5,6214	0,0177*

❖ зависната варијабла : појава на рецидиви/ метастази, во корелација со предикторни варијабли : гените

Во следната табела за Сох-ова регресија зависната варијабла е настанот, временскиот период во месеци на појава на рецидиви и метастази,

постоперативно, а предикторни варијабли се патохистолошките варијабли од интерес за студијата (табела бр.61).

Постои значајна поврзаност помеѓу временскиот период во месеци од интервенцијата до појавата на први локални/регионални рецидиви и патохистолошките параметри како независни варијабли ($\chi^2 = 21,305$ $p = 0,0113$).

Според парцијалните корелации, статистички значајни предикторски варијабли се pT ($p = 0,0210$), pN ($p = 0,0482$) G ($p = 0,0485$) . (табела бр.54).

Табела бр. 54. Survival анализа- Cox-ова регресија

независни варијабли	$\chi^2 = 21,305$ $df = 9$ $p = 0,0113$					
	Beta	S.E	t-value	exponent	Wald	p
пол	0,3554	0,563	0,631	1,426	0,3982	0,5279
возрасни групи	-0,3450	0,347	-0,993	0,708	0,9879	0,3202
возраст/год.	-0,0136	0,030	-0,453	0,986	0,2059	0,6499
локализација	-0,1927	0,158	-1,216	0,824	1,4792	0,2238
pT	0,7618	0,330	2,306	2,142	5,3215	0,0210*
pN	0,5211	0,263	1,974	1,684	3,9005	0,0482*
pM	0,5023	0,510	0,983	1,652	0,9664	0,3255
Stage	-0,1964	0,195	-1,005	0,821	1,0113	0,3145
G	-0,3093	0,170	-5,875	3,247	-1,809	0,0485*

❖ зависната варијабла : појава на рецидиви/ метастази, во корелација со предикторни варијабли: патохистолошките параметри

Во Cox-ова регресија зависната варијабла е настанот, времето на преживување во месеци по интервенцијата, а предикторни варијабли се зададените гени – нивната метилација (табела бр.67).

Во оваа анализа не е вклучен ECDH, бидејќи сите 29(100%) починати лица имаа метилација на овој ген (немаше починати без метилација, па анализата не го зема во обзир овој ген). (Овде зависноста е очигледна.)

Без ECDH, непостои значајна поврзаност помеѓу времето на преживување во месеци по интервенцијата и појавата на метилација кај гените како независни варијабли ($\chi^2 = 6,387$ $p = 0,17203$).

Според парцијалните корелации, статистички значајна предикторска варијабла е $p16$ ($p = 0,0177$), односно неговото метилирање е значаен лош прогностички показател (табела бр.55).

Табела бр. 55. Survival анализа- Cox-ова регресија

независни варијабли	$\chi^2 = 6,387$ $df = 4$ $p = 0,17203$					
	Beta	Standard	t-value	exponent	Wald	p
MGMT	-0,1295	0,441	-0,293	0,878	0,0861	0,7691
DAPK	0,3510	0,620	0,565	1,420	0,3196	0,5718
RARB2	-0,5138	0,510	-1,005	0,598	1,0117	0,3144
$P16$	0,8708	0,397	2,190	2,388	4,8003	0,0284*

Во следната Сох-ова регресија зависната варијабла е настанот, времето на преживување во месеци, а предикторни варијабли се патохистолошките варијабли од интерес за студијата (табела бр.68).

Постои значајна поврзаност помеѓу временскиот период на преживување во месеци по интервенцијата и патохистолошките параметри како независни варијабли ($\chi^2 = 37,78$ $p = 0,00002$).

Според парцијалните корелации, статистички значајни предикторски варијабли се pT ($p = 0,0467$), pN ($p = 0,0094$) G ($p = 0,0408$) . (табела бр.56).

Табела бр. 56. Survival анализа- Сох-ова регресија

независни варијабли	$\chi^2 = 37,78$ $df = 9$ $p = 0,00002$					
	Beta	S.E	t-value	exponent	Wald	p
пол	0,4133	0,555	0,743	1,511	0,5532	0,4569
возрасни групи	-0,2309	0,367	-0,628	0,793	0,3951	0,5296
возраст / год.	-0,0114	0,028	-0,397	0,988	0,1579	0,6910
локализација	0,0322	0,138	0,232	1,032	0,0541	0,8159
pT	0,7648	0,384	1,988	2,148	3,9548	0,0467*
pN	0,6436	0,248	2,594	1,903	6,7331	0,0094*
pM	0,4597	0,496	0,925	1,583	0,8558	0,3548
Stage	0,0120	0,194	0,062	1,012	0,0038	0,9504
G	1,1836	0,578	2,044	3,266	4,1814	0,0408*

Во мултиваријантната регресиона анализа, зависна варијабла е појавата на локални рецидиви/метастази , а независни варијабли се 5-те гени.

Постои значајна парцијална (униваријантна) корелација помеѓу појавата на локални рецидиви и метилацијата на ECDH, RAR β 2 и p16. (Табела бр.57).

Табела бр.57. Мултиваријантна регресиона анализа

Regression Summary for Dependent Variable: prva pojava na lok.recidivi / mes. (SUZANA MAKSILO-BAZA recidivi) R= ,72074012 R ² = ,51946632 Adjusted R ² = ,41935514 F(5,24)=5,1889 p						
	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(24)	p-level
ECDH - T	-0,589432	0,179508	-29,4014	8,954006	-3,28360	0,003135
MGMT - T	-0,093153	0,185591	-1,9720	3,928958	-0,50192	0,620294
DAPK - T	0,363145	0,198129	8,1289	4,435056	1,83287	0,079256
RARB2 - T	0,389602	0,151415	7,2390	2,813381	2,57308	0,0880
p-16 - T	-0,396285	0,147757	-7,1124	2,651892	-2,68202	0,013032

❖ Зависна варијабла – прва појава на локални рецидиви
Независни варијабли – 5-те гени

Во мултиваријантна регресиона анализа, зависна варијабла е првата појава на локални рецидиви и метастази, а независни варијабли се патохистолошките параметри.

Постои значајна парцијална (униваријантна) корелација помеѓу појавата на локални рецидиви и pT, pN и G. (Табела бр.58).

Табела бр.58 Мултиваријантна регресиона анализа

Regression Summary for Dependent Variable: prva pojava na lok.recidivi / mes. (recidivi) R= ,71718511 R²= ,51435448 Adjusted R²= ,29581399 F(9,20)=2,3536 p

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(20)	p-level
Pol	-0,004870	0,169939	-0,11701	4,08293	-0,02866	0,977422
vozrast-kod	-0,063117	0,305848	-0,50911	2,46702	-0,20637	0,838590
vozrast	0,185645	0,252982	0,15414	0,21005	0,73383	0,471569
lokalizacija	0,092654	0,167738	0,58728	1,06319	0,55238	0,586811
pT	-0,442032	0,238529	-4,29576	2,31808	-1,85316	0,018673
pN	-0,347399	0,225234	-2,54543	1,65032	-1,54239	0,038655
pM	-0,177490	0,203192	-3,18555	3,64683	-0,87351	0,392753
Stage	-0,013946	0,228085	-0,08459	1,38354	-0,06114	0,951851
Broders	-0,309325	0,170949	-5,87534	3,24702	-1,80945	0,048543

❖ Зависна варијабла – прва појава на локални рецидиви
Независни варијабли – патохистолошките варијабли

Мултиваријантна регресиона анализа, во која зависна варијабла се живи/умрени, а независни варијабли се патохистолошките варијабли, покажа дека:

Постои значајна парцијална (униваријантна) корелација помеѓу настанот умирање и pT и G, а возраста е гранична (постои значајна корелација). (Табела бр.59).

Табела бр.59 Мултиваријантна регресиона анализа

Regression Summary for Dependent Variable: zivi / umreni (SUZANA MAKSILO-BAZA 1) R= ,70842379 R²= ,50186427 Adjusted R²= ,35242355 F(9,30)=3,3583 p

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(30)	p-level
Intercept			1,420633	0,620440	2,28972	0,029245
Pol	-0,001449	0,139363	-0,001618	0,155569	-0,01040	0,991771
vozrast-kod	-0,373561	0,215548	-0,155924	0,089970	-1,73307	0,093352
vozrast	0,384585	0,191227	0,016853	0,008380	2,01114	0,053372
lokalizacija	-0,056845	0,137977	-0,018792	0,045613	-0,41199	0,683276
pT	-0,436302	0,194618	-0,205425	0,091632	-2,24184	0,032520
pN	-0,269701	0,197307	-0,101869	0,074525	-1,36691	0,181810
pM	0,009007	0,157420	0,008053	0,140756	0,05721	0,954754
Stage	-0,116317	0,217969	-0,032288	0,060505	-0,53364	0,597521
Broders	-0,431824	0,149764	-0,353508	0,122603	-2,88336	0,007211

❖ Зависна варијабла – живи/умрени
Независни варијабли – патохистолошките варијабли

Мултиваријантна регресиона анализа, во која зависна варијабла се живи/умрени, а независни варијабли се 5-те гени покажа дека:

Постои значајна парцијална (униваријантна) корелација помеѓу настанот умирање и метилацијата на ECDH и CDKN2A1. (Табела бр. 60)

Табела бр.60. Мултиваријантна регресиона анализа

Regression Summary for Dependent Variable: zivi / umreni (SUZANA MAKSILO-BAZA 2 z-u) R= ,69578662 R²= ,48411902 Adjusted R²= ,40825417 F(5,34)=6,3813 p

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(34)	p-level
Intercept			1,113536	0,193829	5,74495	0,000002
ECDH - T	-0,564058	0,136542	-0,839533	0,203226	-4,13103	0,000222
MGMT - T	0,144017	0,131709	0,148507	0,135816	1,09344	0,281886
DAPK - T	-0,021136	0,147145	-0,021795	0,151733	-0,14364	0,886630
RARB2 - T	0,040282	0,130581	0,037153	0,120436	0,30848	0,759597
CDKN2A1 - T	-0,428630	0,128762	-0,383258	0,115132	-3,32886	0,002106

❖ Зависна варијабла – живи/умрени
Независни варијабли – 5-те гени

Мултиваријантна регресиона анализа, за времето на преживување постоперативно, во однос на патохистолошките варијабли, покажа дека:

Постои значајна парцијална (униваријантна) корелација помеѓу настанот умирање и pN, pN и G а возраста е гранична (постои значајна корелација). (Табела бр. 61)

Табела бр.61 Мултиваријантна регресиона анализа

Regression Summary for Dependent Variable: egzitus po op. vo meseci (z-u) R= ,75336819 R²= ,56756363 Adjusted R²= ,43783272 F(9,30)=4,3749 p

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(30)	p-level
Intercept			49,88748	21,19110	2,35417	0,025307
Pol	-0,152865	0,129848	-6,25534	5,31344	-1,17727	0,248345
voznast-kod	0,009049	0,200831	0,13846	3,07291	0,04506	0,964359
voznast	0,171075	0,178171	0,27481	0,28621	0,96017	0,344645
lokalizacija	0,023456	0,128556	0,28425	1,55790	0,18246	0,856450
pT	-0,346184	0,181331	-5,97501	3,12970	-1,90913	0,035851
pN	-0,571689	0,183836	-7,91563	2,54540	-3,10978	0,004081
pM	-0,009751	0,146672	-0,31961	4,80753	-0,06648	0,947435
Stage	0,127686	0,203087	1,29929	2,06654	0,62873	0,534287
Broders	-0,298485	0,139539	-8,95738	4,18749	-2,13908	0,040686

❖ Зависна варијабла – време на преживување по операција / мес.
Независни варијабли – патохистолошките варијабли

Мултиваријантна регресиона анализа, за времето на преживување постоперативно, во однос на 5-те гени, покажа дека, постои значајна парцијална (униваријантна) корелација помеѓу настанот умирање и метилацијата на ECDH и CDKN2A1. (Табела бр.62).

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

Табела бр.62. Мултиваријантна регресиона анализа

Regression Summary for Dependent Variable: egzitus po op. vo meseci (z-u) $R = ,54706474$ $R^2 = ,29927983$
Adjusted $R^2 = ,19623275$ $F(5,34) = 2,9043$ p

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(34)	p-level
Intercept			36,0616	8,280984	4,35474	0,000116
ECDH - T	-0,417009	0,159134	-22,7524	8,682480	-2,62049	0,013032
MGMT - T	0,075520	0,153502	2,8547	5,802509	0,49198	0,625894
DAPK - T	0,287164	0,171491	10,8551	6,482514	1,67451	0,103206
RARB2 - T	0,308706	0,152186	10,4374	5,145438	2,02847	0,3144
CDKN2A1 - T	-0,308872	0,150067	-10,1240	4,918811	-2,05823	0,047298

❖ Зависна варијабла – време на преживување , постоперативно/ месеци.

Независни варијабли – 5-те гени

Поради екстензивноста и обемноста на податоците, сублимираните резултатите од третата цел во нашата студија покажаа дека:

Постои значајна разлика во однос на времето на појава на први рецидиви по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на p16 (Mann-Whitney U Test: $Z = -3,076$ $p = 0,0020$). Времето на појава на рецидиви по операцијата е значајно пократко кај пациентите кај кои е регистрирана метилација на p16. Постои значајна разлика во однос на времето на појавување на локални и регионални рецидиви помеѓу пациентите со M+ и M- на p16 (Log-Rank Test: $WW = 6,64$ $Sum = 22,837$ $Test statistic = 2,740$ $p = ,00613$). Постои значајна разлика во однос на времето на преживување по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на p16 (Mann-Whitney U Test: $Z = -2,646$ $p = 0,0082$). Времето на преживување по операцијата е значајно пократко кај пациентите кај кои е регистрирана метилација на p16. (табела 66, слика 65 и слика 65a). Постои значајна разлика во однос на времето на преживување помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на CDKN2A1 и оние без метилација (Log-Rank Test: $WW = 6,128$ $Sum = 25,929$ $Test statistic = 2,379$ $p = 0,0173$). (табела 66, слика 65 и слика 65a)

Постои значајна разлика во однос на времето на појава на рецидиви / мес. помеѓу пациентите со и без метилација на Ecadherin-от (Mann-Whitney U Test: $Z = -2,510$ $p = 0,0181$). Кај метилираните времето на појава на локални и регионални рецидиви е значајно пократко. Постои значајна разлика во однос на времето на појавување на рецидиви и метастази помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на Ecadherin-от и оние без метилација (Log-Rank Test: $WW = 1,74$ $Sum = 22,83$ $Test statistic = 2,001$ $p = 0,04531$) (табела 44, слика 60 и слика 60a) . Постои значајна разлика во однос на времето на преживување помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на ECDH и оние без

метилација (Log-Rank Test: WW = 3,709 Sum = 25,929 Test statistic = 2,397 $p = 0,01649$). (табела 62, слика 61 и слика 61a)
 Постои значајна разлика во однос на времето на преживување по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на DAPK (Mann-Whitney U Test: Z = 1,991 $p = 0,0463$). Кај пациентите кај кои е регистрирана метилација на DAPK времето на преживување е значајно подолго. Постои значајна разлика во однос на времето на преживување помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на DAPK и оние без метилација (Log-Rank Test: WW = 3,479 Sum = 24,929 Test statistic = 2,064 $p = 0,0396$). Кај пациентите кај кои е регистрирана метилација на DAPK времето на преживување е значајно подолго

Анализите со Сох-ова регресија покажаа дек:

Постои значајна поврзаност помеѓу временскиот период во месеци од интервенцијата до појавата на први локални/регионални рецидиви и појавата на метилација кај гени како независни варијабли ($\chi^2 = 13,967$ $p = 0,0158$). Според парцијалните корелации, статистички значајни предикторски варијабли се ECDH ($p = 0,0350$) и p16 ($p = 0,0177$)
 Постои значајна поврзаност помеѓу временскиот период во месеци од интервенцијата до појавата на први локални/регионални рецидиви и патохистолошките параметри како независни варијабли ($\chi^2 = 21,305$ $p = 0,0113$). Според парцијалните корелации, статистички значајни предикторски варијабли се pT ($p = 0,0210$), pN ($p = 0,0482$) G ($p = 0,0485$).

Резултатите во Сох-ова регресија, во која зависната варијабла е настаноти времето на преживување во месеци по интервенцијата, а предикторни варијабли се зададените гени – нивната метилација, покажа дека статистички значајна предикторска варијабла е p16 ($p = 0,0177$), односно неговото метилирање е значаен лош прогностички показател. Во оваа анализа не е вклучен ECDH, бидејќи сите 29 (100%) починати лица имаа метилација на овој ген (немаше починати без метилација, па анализата не го зема во обзир овој ген). Овде зависноста е очигледна.

➤ miRNAs

Користејќи семиквантитативни реверзна транскрипциона (RT) -PCR анализа, независно ги верифициравме податоците во примарните тумори ($n=32$), во корелација со нормалното, контралатерално ткиво ($n=32$) и ткивата од здравите индивидуи ($n=10$), ги идентификувавме 9^{те} различни miRNAs: со зголемена експресија (upregulation) mir-21, let-7, mir-155, mir-31, mir-211 и со намалена експресија (downregulation) mir-137, mir-133b, и mir-193a, mir 125 кај 52 пациенти. Податоците покажаа платформа од точно идентификувани дисрегулирани miRNAs кои ги анализиравме во мостри поединечно за трите групи на биоптични материјали.

Во биоптичните примероци од I група, за интерпретација беа достапни 32 miRNAs, во II група исто толку и во III група 20 miRNAs примероци за понатамошна евалуација, останатите беа неуспешни при изведување на пробите.

Резултатите за добиените шест microRNA гени, зголемено експресирани (mir-21, let-7, mir-155, mir-31, mir-211, mir 125) и за трите microRNA гени намалено експресирани (mir-137, mir-133b, и mir-193a), беа квантифицирани во анализите за нивната дерегулација во трите групи и компарирани меѓусебно.

Разликите во експресиите на miRNAs во OSCC и нормалните клетки од контралатерално, ги корелиравме меѓусебе и со здравите клетки; потоа измерените miRNAs нивоа, ги дефиниравме со користење на медијана и вредностите беа прикажани како негативно експресирани доколку се под средната вредност-медијаната, а како зголемено експресирани вредностите над медијаната.

❖ Во однос на експресијата на mir 21, во табелата бр. 63 се прикажани средните вредности на mir 21 од примероци од туморско ткиво (n=32) и контралатерална клинички непроменетата оралната мукоза (n=32) кај пациентите со орален карцином, во однос на miRNA нивото во здрави ткива (n=20). Просечната вредност на mir 21 во примероците од туморско ткиво изнесуваше $7,75 \pm 2,93$; во клинички непроменетата орална мукоза $4,32 \pm 3,54$ а во здравите ткива $2,43 \pm 0,97$.

Помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на mir 21 постои статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$).

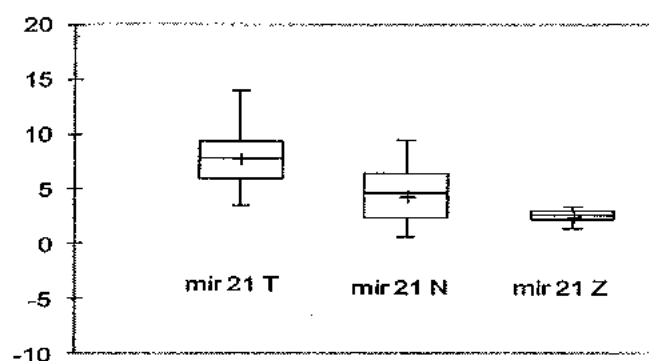
Помеѓу примероците од туморското ткиво и нормалното, контралатерално ткиво постои значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$). Помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$).

Помеѓу примероците од контралатералната непроменета оралната мукоза и здравите ткива исто така постои значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,001$).

Помеѓу вредностите на mir 21 во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, постои умерена незначајна корелација (Spearman rang - correlation : $\rho = 0,301$ $p = 0,094$).

Табела бр. 63. Средни вредности на mir 21

mir21	Minimum	Maximum	Med	Mean	SD
mir 21 T	0,62	14,02	7,73	7,75	2,93
mir 21 N	-8,83	12,48	4,56	4,32	3,54
mir 21 Z	-1,96	3,41	2,62	2,43	0,97



Слика бр.69. Средни вредности на *mir 21*

Квантификацијата на експресијата на *microRNA-21* молекулата во нашиот сет на примероци покажа силна потврда на резултатите за значително зголемена експресија во туморите во однос на здравите ткива. Кај примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на *mir-21* изнесуваше 2,62. Кај здравите испитаници, по 16(50%) лица имаа вредности за *mir-21* над и под медијаната. Во примероците од туморските ткива, кај 31(97%) лице вредностите на *mir-21* беа над 2,62 односно значајно поголеми за $p < 0,0001$. Покачените вредности на *mir-21* претставуваат голем ризик фактор и показател за постоење на карцином, односно, ризикот за развивање на карцином е за 31 пати поголем во однос на лицата каде вредностите на *mir-21* се ниски ($OR=31$ $CI=95\%$ 3,76 $< OR < 255,29$).

Односот на *mir-21* покажа висока дискриминаторски потенцијал, со висока сензитивност од 100% и специфичноста од 94% во разликувањето на туморот од здравото ткиво. Значи *mir-21* со сигурност од 100% ги детектира вистина позитивните – туморските ткива, а специфичноста е ниска бидејќи вистина негативни примероци нема (сите се тумори).

Во однос на контралатералните ткива експресијата на *microRNA-21* во туморските примероци е за 1,3 пати поголема.

Во контралатералните примероци, кај 23(72%) лица вредностите на *mir-21* беа над 2,62 односно значајно повисоки за $p < 0,001$ во однос на здравите лица, при што *mir-21* покажува висока сензитивност од 100% и специфичноста од 56% во разликувањето од здравото ткиво. Бидејќи *mir-21*, покажаа значајна зголемена регулација, ја потврдивме нивната способност за предвидување на потенцијалот за разликување на карциномите од нормалните ткива. (табела бр.64а и бр.64б)

Табела бр.64а. Експресија на *mir-21* во туморско ткиво

<i>mir-21</i> во тумор	<i>mir-21</i> во здрави примероци		вкупно
	над 2,62	под 2,62	
над 2,62	16	15	31
под 2,62	0	1	1
вкупно	16	16	32

Табела бр.64.б. Експресија на на *mir-21* во контралатерално здраво ткиво

<i>mir-21</i> во тумор	<i>mir-21</i> во здрави примероци		вкупно
	над 2,62	под 2,62	
над 2,62	16	7	23
под 2,62	0	9	9
вкупно	16	16	32

❖ Во однос на експресијата на *let 7a*, во табела 65 се прикажани средните вредности на *let 7a*, примероци од туморско ткиво и контралатерална клинички непроменетата оралната мукоза кај пациентите со орален карцином, во однос на *miRNA* нивото во здрави ткива. Просечната вредност на *let 7a* во примероците од туморско ткиво изнесуваше $2,33 \pm 2,13$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $2,79 \pm 3,87$ а во здравите ткива $-4,54 \pm 2,01$.

Помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на *let 7a* постои статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$).

Помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза непостои значајна разлика (Mann-Whitney test: $p < 0,347$).

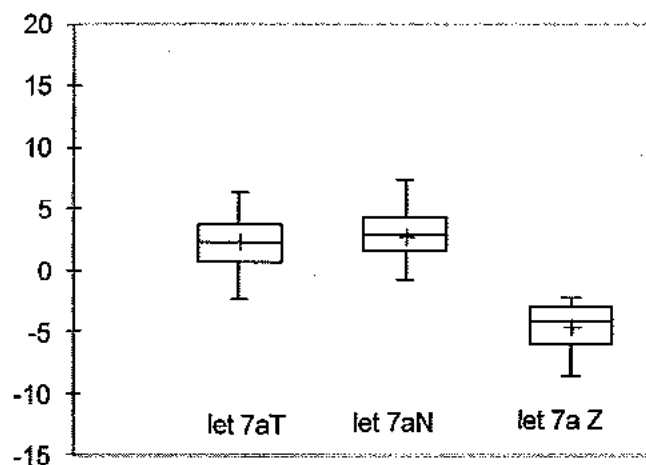
Помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$).

Помеѓу примероците од контралатералната непроменета оралната мукоза и здравите ткива исто така постои значајна разлика (Mann-Whitney test: $p < 0,0001$).

Помеѓу вредностите на *let 7a* во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, постои слаба незначајна корелација (Spearman rang - correlation : $\rho = 0,148$ $p = 0,415$).

Табела бр.65. Средни вредности на *let 7a*

<i>Let 7a</i>	Minimum	Maximum	Median	Mean	SD
<i>let 7aT</i>	-2,30	6,40	2,34	2,33	2,13
<i>let 7aN</i>	-10,81	13,36	2,89	2,79	3,87
<i>let 7a Z</i>	-8,54	-2,23	-4,09	-4,54	2,01



Слика бр.70. Средни вредности на *let 7a*

Квантификацијата на експресијата на microRNA-let7a молекулата во нашите примероци покажа силна потврда на резултатите за значително зголемена експресија во туморите во однос на здравите ткива. Кај примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на let7a изнесуваше -4,09. Кај здравите испитаници, по 16(50%) лица имаа вредности за let7a над и под медијаната. Во примероците од туморските ткива, кај сите 32(100%) лица вредностите на let7a беа над -4,09 односно значајно поголеми за $p < 0,0001$.

Односот на let7a покажа висока дискриминаторски потенцијал, со сензитивност од 100% и специфичноста од 100% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво. Тоа значи дека let7a со 100% сигурност ги детектира вистина позитивните – туморските ткива, а специфичноста е 100% бидејќи вистина негативни примероци нема (сите се тумори и не селектираат негативен резултат).

Помеѓу туморските и контралатералните ткива, во однос на експресијата на let7a не се регистрира разлика.

Во контралатералните примероци, кај 31(97%) лице вредностите на let7a беа над -4,09 односно значајно повисоки за $p < 0,0001$ во однос на здравите лица, при што let7a покажува висока сензитивност од 97% и специфичноста од 6% во разликувањето од здравото ткиво. Високите вредности на let7a во контралатералната непроменета оралната мукоза кај испитаниците претставува значаен ризик фактор, односно, укажува на зголемен ризик за појава на орален карцином ($OR = 31$ $CI=95\%$ $3,76 < OR < 255,29$). Бидејќи let7a, покажаа значајна зголемена регулација, ја потврдивме нивната способност за предвидување на потенцијалот за разликување на карциномите од нормалните ткива. (табела бр.66.а и бр.66.б)

Табела бр.66.а. Експресија на let-7a во туморско ткиво

Let7a во тумор	Let7a во здрави примероци		вкупно
	над -4,09	под -4,09	
над -4,09	16	16	32
под -4,09	0	0	0
вкупно	16	16	32

Табела бр.66.б. Експресија на mir let-7a во контралатерално здраво ткиво

Let7a во тумор	Let7a во здрави примероци		вкупно
	над -4,09	под -4,09	
над -4,09	16	15	31
под -4,09	0	1	1
вкупно	16	16	32

❖ Анализата на нивоата на експресија на mir 155, покажа дека, средните вредности на mir 155 од примероци од туморско ткиво и контралатерална клинички непроменетата оралната мукоза кај пациентите со орален карцином, беа значително зголемени експресирани, во однос на нивото во здравите ткива. Просечната вредност на mir 155 во примероците од туморско ткиво

изнесуваше $7,26 \pm 3,21$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $3,83 \pm 4,12$ а во здравите ткива $5,24 \pm 1,88$. (табела бр.67).

Помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на *mir 155* постои статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0002$).

Помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза постои значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0002$).

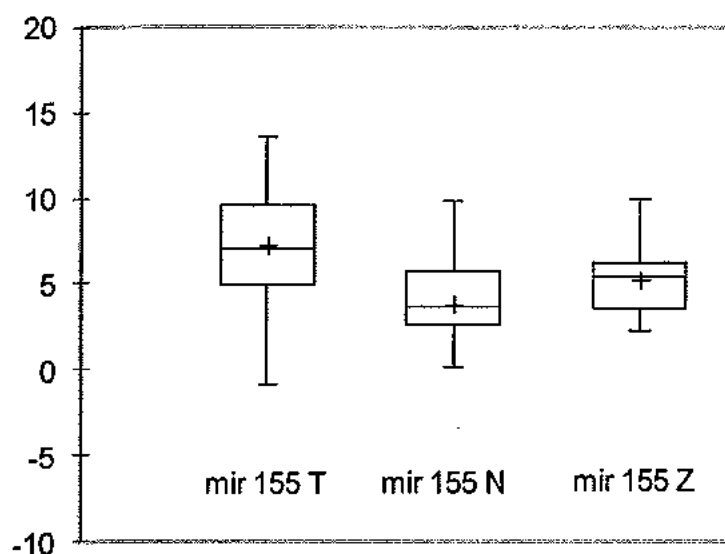
Помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,004$).

Помеѓу примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива непостои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0618$).

Помеѓу вредностите на *mir 155* во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, постои значајна корелација (Spearman rang - correlation : $\rho = 0,447$ $p = 0,011$).

Табела бр.67. Средни вредности на *mir 155*

Mir155	Minimum	Maximum	Median	Mean	SD
mir 155 T	-0,84	13,60	7,04	7,26	3,21
mir 155 N	-7,42	13,47	3,66	3,83	4,12
mir 155 Z	2,30	10,00	5,42	5,24	1,88



Слика бр.71. Средни вредности на *mir 155*

Експресијата на *mir-155* молекулата во нашите примероци покажа потврда на резултатите за значително зголемена експресија во туморите во однос на здравите ткива. Кај примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на *mir-155* изнесуваше 5,42. Кај здравите испитаници, по 16(50%) лица имаа вредности за *mir-155* над и под медијаната. Во примероците од туморските ткива, кај 21(66%) лице вредностите на *mir-155*

беа над 5,42 односно значајно поголеми за $p < 0,004$. Високите вредности на *mir-155* во оралната мукоза претставуваат значаен ризик фактор, односно, укажуваат на зголемен ризик за појава или постоење на орален карцином ($OR = 1,90$ $CI=95\%$ $1,03 < OR < 6,21$).

Односот на *mir-155* покажа висока дискриминаторски потенцијал, со сензитивност од 97% и специфичноста од 69% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво. Тоа значи дека *mir-155* со 97% сигурност ги детектира вистина позитивните – туморските ткива, а со сигурност од 69% ги покажува вистина негативните – здравите ткива.

Во однос на контралатералните ткива експресијата на *mir-155* во туморските примероци е за 2,3 пати поголема.

Во контралатералните примероци, кај 9(28%) лица вредностите на *mir-155* беа над 5,42 но средните вредности не беа значајно повисоки во однос на средните вредности кај здравите лица ($p < 0,0618$), при што *mir-155* покажа сензитивност од 56% и специфичност од 100% во разликувањето на здравото ткиво. Бидејќи *mir-155* покажа значајна зголемена регулација, ја потврдивме нивната способност за предвидување на потенцијалот за разликување на карциномите од нормалните ткива. (табела бр.68.а и бр.68.б).

Табела бр.68.а. Експресија на *mir-155* во туморско ткиво

<i>mir-155</i> во тумор	<i>mir-155</i> во здрави примероци		вкупно
	над 5,42	под 5,42	
над 5,42	16	5	21
под 5,42	0	11	11
вкупно	16	16	32

Табела бр.68.б. Експресија на *mir-155* во контралатерално здраво ткиво

<i>mir-155</i> во тумор	<i>mir-155</i> во здрави примероци		вкупно
	над 5,42	под 5,42	
над 5,42	9	0	9
под 5,42	7	16	23
вкупно	16	16	32

❖ Резултатите од анализата на експресијата на *mir 31*, ја демонстрираа зголемената експресија од примероци од туморско ткиво и контралатералната, непроменетата оралната мукоза кај пациентите со орален карцином, во однос на нивото во здрави ткива, според добиените средни вредности на *mir 31*. Просечната вредност на *mir 31* во примероците од туморско ткиво изнесуваше $9,98 \pm 2,51$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $5,73 \pm 3,89$ а во здравите ткива $8,14 \pm 1,98$. (табелата бр.69 сл.бр.72).

Помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на *mir 31* постои статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$).

Помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза постои значајна разлика (Mann-Whitney test: $p < 0,0001$).

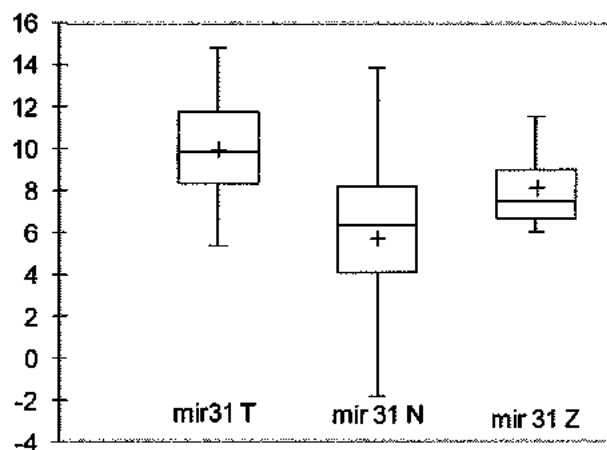
Помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test: $p < 0,002$).

Помеѓу примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test: $p < 0,01$). (најмала)

Помеѓу вредностите на *mir 31* во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, постои значајна корелација (Spearman rang - correlation: $\rho = 0,362$ $p = 0,042$).

Табела бр. 69. Средни вредности на *mir 31*

Mir31	Minimum	Maximum	Median	Mean	SD
mir31 T	5,32	14,79	9,81	9,98	2,51
mir31 N	-3,02	13,89	6,31	5,73	3,89
mir 31 Z	6,03	12,54	7,43	8,14	1,98



Слика бр. 72. Средни вредности на *mir 31*

Експресијата на *mir-31* молекулата во нашите примероци покажа потврда на резултатите за значително зголемена експресија во туморите во однос на здравите ткива. Кај примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на *mir-31* изнесуваше 7,43. Кај здравите испитаници, по 16(50%) лица имаа вредности за *mir-31* над и под медијаната. Во примероците од туморските ткива, кај 25(81%) лица вредностите на *mir-31* беа над 7,43 односно значајно поголеми за $p < 0,002$. Високите вредности на *mir-31* во оралната мукоза претставуваат значаен ризик фактор, односно, укажуваат на зголемен ризик за појава/постојност на орален карцином ($OR = 3,57$ $CI=95\%$ $1,204 < OR < 10,59$).

Односот на *mir-31* покажа висока дискриминаторски потенцијал, со сензитивност од 96% и специфичност од 44% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво. Тоа значи дека *mir-31* со 97% сигурност ги детектира

вистина позитивните – туморските ткива, а со сигурност од 44% ги детектира вистина негативните – здравите ткива.

Во однос на контралатералните ткива експресијата на *mir-31* во туморските примероци е за 1,9 пати поголема.

Во контралатералните примероци, кај 13 (41%) лица вредностите на *mir-31* беа над 7,43 а средните вредности беа значајно повисоки во однос на средните вредности кај здравите лица за $p < 0,01$. *Mir-31* покажа сензитивност од 81% и специфичност од 100% во разликувањето на здравото ткиво. Бидејќи *mir-31* покажаа значајна зголемена регулација, ја потврдивме нивната способност за предвидување на потенцијалот за разликување на карциномите од нормалните ткива. (табела бр.70а и бр.726)

Табела бр.70а. Експресија на *mir-31* во туморско ткиво

<i>mir-31</i> во тумор	<i>mir-31</i> во здрави примероци		вкупно
	над 7,43	под 7,43	
над 7,43	16	9	25
под 7,43	0	7	7
вкупно	16	16	32

Табела бр.70б. Експресија на *mir-31* во контралатерално здраво ткиво

<i>mir-31</i> во тумор	<i>mir-31</i> во здрави примероци		вкупно
	над 7,43	под 7,43	
над 7,43	13	0	13
под 7,43	3	16	19
вкупно	16	16	32

❖ Средните вредности на *mir 211* од примероци од туморско ткиво и контралатерална клинички непроменетата оралната мукоза кај пациентите со орален карцином, во однос на нивото во здрави ткива, се прикажани во табела бр.71. Просечната вредност на *mir 211* во примероците од туморско ткиво изнесуваше $-11,68 \pm 4,72$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $-6,13 \pm 5,19$ а во здравите ткива $-14,66 \pm 3,21$.

Помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на *mir 211* постои статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$).

Помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза постои значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$)*.

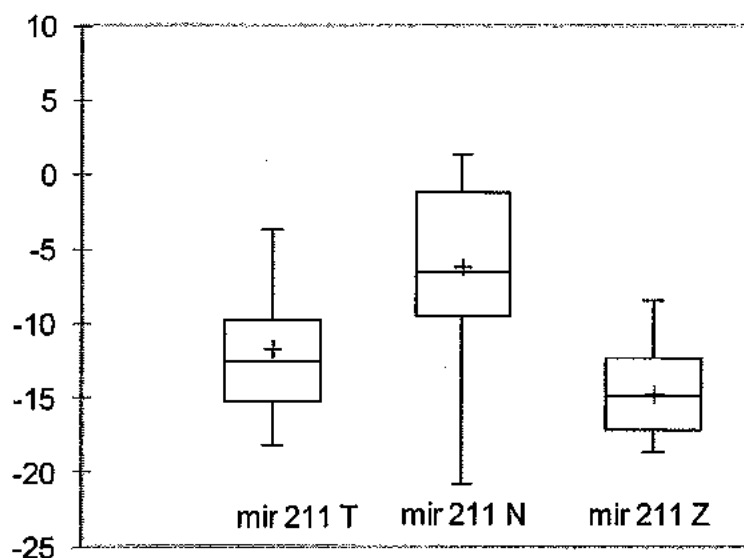
Помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test: $p < 0,011$)*.

Помеѓу примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test: $p < 0,0001$)*.

Помеѓу вредностите на *mir 211* во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, непостои значајна корелација (Spearman rang - correlation : $\rho = 0,187$ $p = 0,305$).

Табела бр. 71. Средни вредности на *mir 211*

Mir 211	Minimum	Maximum	Median	Mean	SD
mir 211 T	-18,15	0,00	-12,54	-11,68	4,72
mir 211 N	-20,82	1,39	-6,55	-6,13	5,19
mir 211 Z	-18,65	-8,45	-14,83	-14,66	3,21



Слика бр. 73. Средни вредности на *mir 211*

Експресијата на *mir-211* молекулата во нашите примероци покажа потврда на резултатите за значително зголемена експресија во туморите во однос на здравите ткива. Кај примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на *mir-211* изнесуваше -14,83. Кај здравите испитаници, по 16(50%) лица имаа вредности за *mir-211* над и под медијаната. Во примероците од туморските ткива, кај 21(66%) лице вредностите на *mir-211* беа над -14,83 односно значајно поголеми за $p < 0,011$. Односот на *mir-211* покажа висока сензитивност од 97% и специфичност од 69% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво. Тоа значи дека *mir-211* со 97% сигурност ги детектира вистина позитивните – туморските ткива, а со сигурност од 69% ги детектира вистина негативните – здравите ткива.

Во однос на контралатералните ткива експресијата на *mir-211* во туморските примероци е за 1,4 пати помала. Во контралатералните примероци, кај 31(97%) лице вредностите на *mir-211* беа над -14,83 а средните вредности беа значајно повисоки во однос на средните вредности кај здравите лица за $p < 0,0001$. Високите вредности на *mir-211* во оралната мукоза на контралатералната страна претставуваат значаен ризик фактор, односно, укажуваат на многу зголемен ризик за појава на орален карцином ($OR = 31$ $CI=95\% \ 3,76 < OR < 255,29$).

Mir-211 покажа сензитивност од 97% и специфичност од 6% во разликувањето на здравото ткиво. Бидејќи *mir-211* покажа значајна зголемена регулација, ја потврдивме нивната способност за предвидување на потенцијалот за разликување на карциномите од нормалните ткива. (табела бр.72а и бр.72б)

Табела бр.72а. Експресија на *mir-211* во туморско ткиво

<i>mir-211</i> во тумор	<i>mir-211</i> во здрави примероци		вкупно
	над -14,83	под -14,83	
над -14,83	16	5	21
под -14,83	0	11	11
вкупно	16	16	32

Табела бр.72.б. Експресија на *mir-211* во контралатерално здраво ткиво

<i>mir-211</i> во тумор	<i>mir-211</i> во здрави примероци		вкупно
	над -14,83	под -14,83	
над -14,83	16	15	31
под -14,83	0	1	1
вкупно	16	16	32

❖ Средните вредности на *mir 137* од примероци од туморско ткиво и контралатерална клинички непроменетата оралната мукоза кај пациентите со орален карцином, во однос на нивото во здрави ткива, се прикажани во табела бр.73. Просечната вредност на *mir 137* во примероците од туморско ткиво изнесуваше $-4,88 \pm 4,20$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $-5,83 \pm 3,66$ а во здравите ткива $-10,55 \pm 2,57$.

Помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на *mir 137* постои статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$).

Помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза непостои значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,452$).

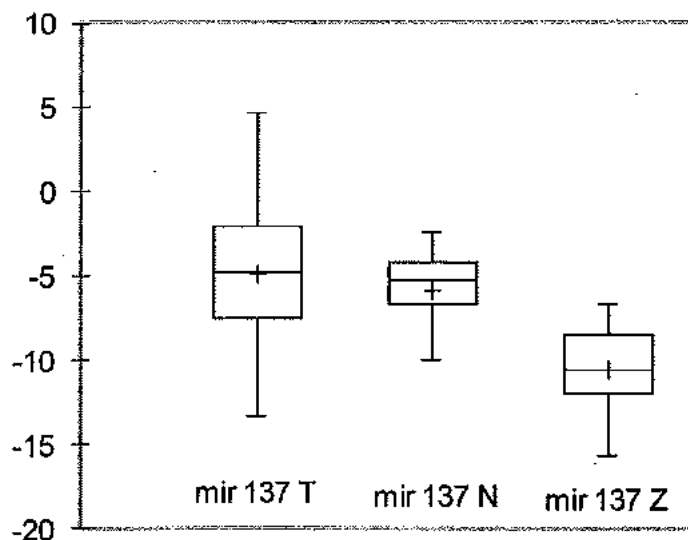
Помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$).

Помеѓу примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$).

Помеѓу вредностите на *mir 137* во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, непостои значајна корелација (Spearman rang - correlation : $p = 0,320$ $p = 0,074$).

Табела бр. 73. Средни вредности на *mir 137*

Mir137	Minimum	Maximum	Median	Mean	SD
<i>mir 137 T</i>	-13,33	4,69	-4,84	-4,88	4,20
<i>mir 137 N</i>	-18,24	1,42	-5,26	-5,83	3,66
<i>mir 137 Z</i>	-15,65	-6,65	-10,55	-10,55	2,57



Слика бр. 74. Средни вредности на *mir* 137

Експресијата на *mir*-137 молекулата во нашите примероци покажа потврда на резултатите за значително зголемена експресија во туморите во однос на здравите ткива. Кај примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на *mir*-137 изнесуваше -10,55. Кај здравите испитаници, 17(53%) лица имаа вредности за *mir*-137 над, а 15(47%) под медијаната. Во примероците од туморските ткива, кај 30(94%) лица вредностите на *mir*-137 беа над -10,55 односно значајно поголеми за $p < 0,0001$. Високите вредности на *mir*-137 во оралната мукоза претставуваат голем ризик фактор, односно, укажуваат на голем ризик за постоење на орален карцином ($OR=13,23$ $CI=95\%$ 2,69 $<OR < 64,95$).

Односот на *mir*-137 покажа висока сензитивност од 97% и специфичност од 13% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво. Тоа значи дека *mir*-137 со 97% сигурност ги детектира вистина позитивните – туморските ткива, а со сигурност од 13% ги детектира вистина негативните – здравите ткива (тука нема здрави ткива).

Помеѓу експресијата на *mir*-137 во туморските и контралатералните ткива, кај нашиот сет од примероци немаше разлика. Во контралатералните примероци, кај 30(94%) лица вредностите на *mir*-137 беа над -10,55 а средните вредности беа значајно повисоки во однос на средните вредности кај здравите лица за $p < 0,0001$. *Mir*-137 покажа сензитивност од 97% и специфичност од 13% во разликувањето на здравото ткиво.

Бидејќи *mir*-137 покажа значајна зголемена регулација, ја потврдивме нивната способност за предвидување на потенцијалот за разликување на карциномите од нормалните ткива. (табела бр.74.а и бр.74.б).

Табела бр.74а. Експресија на miR-137 во туморско ткиво

miR-137 во тумор	miR-137 во здрави примероци		вкупно
	над -10,55	под -10,55	
над -10,55	17	13	30
под -10,55	0	2	2
вкупно	17	15	32

Табела бр.74.б. Експресија на miR-137 во контралатерално здраво ткиво

miR-137 во тумор	miR-137 во здрави примероци		вкупно
	над -10,55	под -10,55	
над -10,55	17	13	30
под -10,55	0	2	2
вкупно	17	15	32

❖ Во табелата бр.75, се прикажани средните вредности на miR 133b од примероци од туморско ткиво и контралатерална клинички непроменетата оралната мукоза кај пациентите со орален карцином, во однос на нивото во здрави ткива. Просечната вредност на miR 133b во примероците од туморско ткиво изнесуваше $1,57 \pm 5,11$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $5,84 \pm 4,33$ а во здравите ткива $-0,02 \pm 0,03$.

Помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на miR 133b постои статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$).

Помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза постои значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,002$).

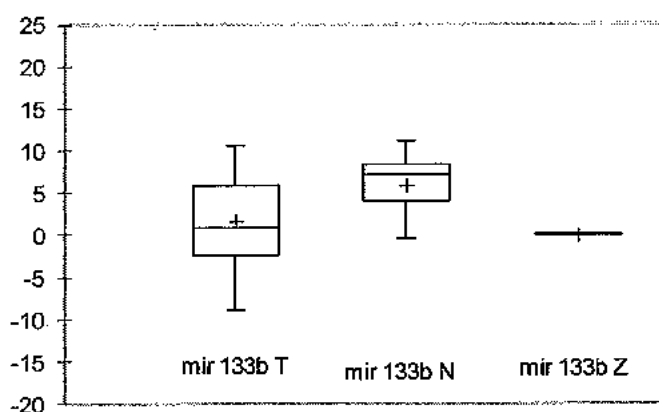
Помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива, непостои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,087$).

Помеѓу примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$).

Помеѓу вредностите на miR 133b во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, непостои значајна корелација (Spearman rang - correlation : $p = 0,213$ $p = 0,240$).

Табела бр.75. Средни вредности на miR 133b

Mir133b	Minimum	Maximum	Median	Mean	SD
mir 133b T	-8,97	10,49	0,75	1,57	5,11
mir 133b N	-5,58	15,06	7,01	5,84	4,33
mir 133b Z	-0,09	0,00	-0,01	-0,02	0,03



Слика бр. 75. Средни вредности на *mir 133b*

Експресијата на *mir-133b* молекулата во нашите примероци не покажа потврда на резултатите за значајни промени во експресија во туморите во однос на здравите ткива. Кај примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на *mir-133b* изнесуваше -0,01. Кај здравите испитаници, 21(66%) лице имаше вредности за *mir-133b* над, а 11(34%) под медијаната. Во примероците од туморските ткива, кај 18(56%) лица вредностите на *mir-133b* беа над -0,01 при што немаше значајна разлика во однос на средните вредности измерени во здравите ткива за $p < 0,087$.

Вредностите на *mir-133b* во оралната мукоза кај нашите пациенти, непретставуваат ризик фактор, односно, неукажуваат на ризик за постоење на орален карцином ($OR=0,67$ $CI=95\%$ $0,24 < OR < 1,84$). Односот на *mir-133b* покажа сензитивност од 86% и специфичност од 100% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво. Тоа значи дека *mir-133b* со 86% сигурност ги детектира вистина позитивните – туморските ткива, а со сигурност од 100% ги детектира вистина негативните – здравите ткива.

Експресијата на *mir-133b* во туморските ткива е намалена во однос на контралатералните ткива кај нашиот сет од примероци за 1,6 пати. Во контралатералните примероци, кај 29(91%) лица вредностите на *mir-133b* беа над -0,01 а средните вредности беа значајно повисоки во однос на средните вредности кај здравите лица за $p < 0,0001$. *Mir-133b* покажа сензитивност од 98% и специфичност од 27% во разликувањето на здравото ткиво. Бидејќи *mir-133b* не покажа значајна зголемена регулација, не ја потврдивме нивната способност за предвидување на потенцијалот за разликување на карциномите од нормалните ткива. (табела бр.76.а и бр.76.б)

Табела бр.76.а. Експресија на *mir-133b* во туморско ткиво

<i>mir-133b</i> во тумор	<i>mir-133b</i> во здрави примероци		вкупно
	над -0,01	под -0,01	
над -0,01	18	0	18
под -0,01	3	11	14
вкупно	21	11	32

Табела бр.76.6. Експресија на на *mir-133b* во контралатерално здраво ткиво

<i>mir-133b</i> во тумор	<i>mir-133b</i> во здрави примероци		вкупно
	над -0,01	под -0,01	
над -0,01	21	8	29
под -0,01	0	3	3
вкупно	21	11	32

❖ Средните вредности на *mir mir 193a*, во примероци од туморско ткиво и контралатерална клинички непроменетата оралната мукоза кај пациентите со орален карцином, во однос на нивото во здрави ткива, се прикажани во табела бр.77. Просечната вредност на *mir 193A* во примероците од туморско ткиво изнесуваше $2,98 \pm 3,00$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $2,83 \pm 2,87$ а во здравите ткива $2,98 \pm 1,60$.

Помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на *mir 193A* непостои статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p = 0,974$).

Помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза непостои значајна разлика (Mann-Whitney test : $p > 0,05$).

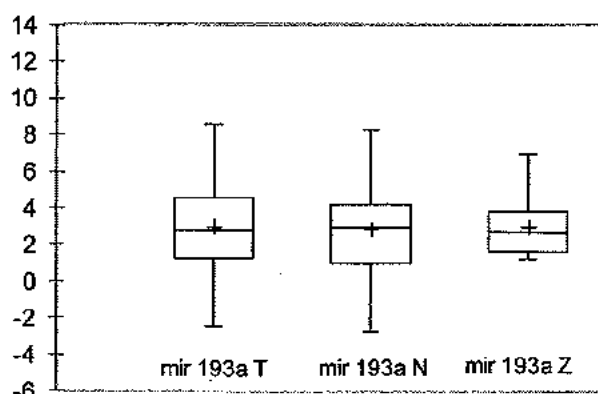
Помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива непостои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p > 0,05$).

Помеѓу примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива непостои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p > 0,05$).

Помеѓу вредностите на *mir 193A* во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, постои значајна корелација (Spearman rang - correlation : $\rho = 0,246$ $p=0,044$).

Табела бр.77. Средни вредности на *mir 193A*

Mir193A	Minimum	Maximum	Median	Mean	SD
<i>mir193a T</i>	-4,26	10,80	2,71	2,98	3,00
<i>mir193a N</i>	-4,02	10,23	2,90	2,83	2,87
<i>mir 193a Z</i>	1,23	6,90	2,68	2,98	1,60



Слика бр. 76. Средни вредности на *mir 193A*

Експресијата на *mir-193a* молекулата во нашите примероци не покажа потврда на резултатите за значително зголемена експресија во туморите во однос на здравите ткива. Кај примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на *mir-193a* изнесуваше 2,68. Кај здравите испитаници, по 16(50%) лице имаа вредности за *mir-193a* над и под медијаната. Во примероците од туморските ткива, кај 14(44%) лица вредностите на *mir-193a* беа над 2,68 при што немаше значајна разлика во однос на средните вредности измерени во здравите ткива ($p > 0,05$). Вредностите на *mir-193a* во оралната мукоза кај нашите пациенти, непретставуваат ризик фактор, односно, неукажуваат на ризик за постоење на орален карцином ($OR=0,78$ $CI=95\%$ $0,29 < OR < 2,08$).

Односот на *mir-193a* покажа сензитивност од 85% и специфичност од 97% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво. Тоа значи дека *mir-193a* со 85% сигурност ги детектира вистина позитивните – туморските ткива, а со сигурност од 97% ги детектира вистина негативните – здравите ткива. Експресијата на *mir-193a* во туморските ткива е намалена во однос на контралатералните ткива кај нашиот сет од примероци за 1,07 пати.

Во контралатералните примероци, кај 15(47%) лица вредностите на *mir-193a* беа над 2,68 при што немаше значајна разлика во однос на средните вредности измерени во здравите ткива ($p > 0,05$). *Mir-193a* покажа сензитивност од 91% и специфичност од 97% во разликувањето на здравото ткиво. Бидејќи *mir-193a* не покажаа значајна зголемена регулација, не ја потврдивме нивната способност за предвидување, односно, за разликување на карциномите од нормалните ткива. (табела бр.78.а и бр.78.б)

Табела бр.78.а. Експресија на *mir-193a* во туморско ткиво

<i>mir-193a</i> во тумор	<i>mir-193a</i> во здрави примероци		вкупно
	над 2,68	под 2,68	
над 2,68	14	0	14
под 2,68	2	16	18
вкупно	16	16	32

Табела бр.78.б. Експресија на *mir-193a* во контралатерално здраво ткиво

<i>mir-193a</i> во тумор	<i>mir-193a</i> во здрави примероци		вкупно
	над 2,68	под 2,68	
над 2,68	15	0	15
под 2,68	1	16	17
вкупно	16	16	32

❖ Средните вредности на **mir 125a**, во примероци од туморско ткиво и контралатерална клинички непроменетата оралната мукоза кај пациентите со орален карцином, во однос на нивото во здрави ткива, се прикажани во табела бр.79.

Во табелата 77 се прикажани средните вредности на **mir 125a** од примероци од туморско ткиво и контралатерална клинички непроменетата оралната мукоза кај пациентите со орален карцином, во однос на нивото во здрави ткива. Просечната вредност на **mir 125a** во примероците од туморско ткиво изнесуваше $2,58 \pm 3,41$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $3,32 \pm 4,07$ а во здравите ткива $-2,29 \pm 0,94$.

Помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на **mir 125a** постои статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$).

Помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза непостои значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,262$).

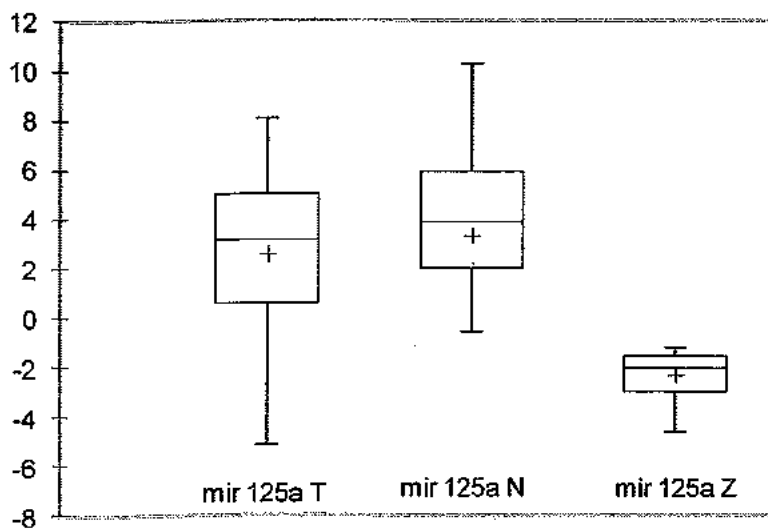
Помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$).

Помеѓу примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$).

Помеѓу вредностите на **mir 125a** во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, постои значајна корелација (Spearman rang - correlation : $p = 0,415$ $p = 0,019$).

Табела бр.79. Средни вредности на mir 125a

Mir 125a	Minimum	Maximum	Median	Mean	SD
mir125a T	-6,72	8,03	3,10	2,58	3,41
mir125a N	-6,85	10,27	3,86	3,32	4,07
mir 125a Z	-4,60	-1,23	-2,03	-2,29	0,94



Слика бр. 77. Средни вредности на mir 125 a

Експресијата на *mir-125a* молекулата во нашите примероци покажа потврда на резултатите за значително зголемена експресија во туморите во однос на здравите ткива. Кај примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на *mir-125a* изнесуваше -2,03. Кај здравите испитаници, 20(63%) лица имаа вредности за *mir-125a* над, а 12(37%) под медијаната. Во примероците од туморските ткива, кај 29(91%) лица вредностите на *mir-125a* беа над -2,03 односно значајно поголеми во однос на нормалните ткива за $p < 0,0001$.

Високите вредности на *mir-125a* во оралната мукоза претставуваат ризик фактор, односно, укажуваат на голем ризик за постоење на орален карцином ($OR=5,8$ $CI=95\%$ $1,44 < OR < 23,22$). Односот на *mir-125a* покажа висока сензитивност од 98% и специфичност од 26% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво. Тоа значи дека *mir-125a* со 98% сигурност ги детектира вистина позитивните – туморските ткива, а со сигурност од 26% ги детектира вистина негативните – здравите ткива.

Помеѓу експресијата на *mir-125a* во туморските и контралатералните ткива, кај нашиот сет од примероци немаше разлика.

Во контралатералните примероци, кај 28(88%) лица вредностите на *mir-125a* беа над -2,03 а средните вредности беа значајно повисоки во однос на средните вредности кај здравите лица за $p < 0,0001$. *Mir-125a* покажа сензитивност од 97% и специфичност од 34% во разликувањето на здравото ткиво. Бидејќи *mir-125a* покажа значајна зголемена регулација, ја потврдивме нивната способност за предвидување и разликување на карциномите од нормалните ткива. (табела бр.80.а и бр.80.б).

Табела бр.80.а. Експресија на *mir-125a* во туморско ткиво

<i>mir-125a</i> во тумор	<i>mir-125a</i> во здрави примероци		вкупно
	над -2,03	под -2,03	
над -2,03	20	9	29
под -2,03	0	3	3
вкупно	20	12	32

Табела бр.80.б. Експресија на *mir-125a* во контралатерално здраво ткиво

<i>mir-125a</i> во тумор	<i>mir-125a</i> во здрави примероци		вкупно
	над -2,03	под -2,03	
над -2,03	20	8	28
под -2,03	0	4	4
вкупно	20	12	32

➤ Сите miRNA покажаа, свој карактеристичен модел (различна дистрибуција на значајности), базиран на сеопфатните истражувања и корелација со традиционалните, патохистолошки анализи.

Со цел да утврдиме, дали постои корелација помеѓу квантификацијата на експресијата на microRNA молекулите во нашиот сет на примероци и патохистолошките варијабли од интерес, направена е Spearman Rang – корелација бидејќи квантитативните податоци беа со неправилна дистрибуција. Резултатите за 9те miRNA одделно во корелација со: T, N, TNM иG стадиум, се прикажани во следните табели, а потоа секоја е засебно евалуирана. (табела бр.81, 81a, 81b, 81в)

Со Spearman Rang – корелацијата на microRNA маркерите со pT-стадиумот, утврдивме дека, постои статистичка асоцијација помеѓу pT-стадиумот и mir137 ($p = 0,003095$), mir133b-T ($p = 0,006376$), и mir133b-N ($p = 0,041880$). (табелата бр.81)

Табела бр.81 . Spearman – ов коефициент на корелација помеѓу експресијата на microRNA молекулите во туморски и контралатерални клинички непроменети слузници во однос на големината на туморот (pT)

варијабли	Spearman	t(N-2)	p-level
pT - kod & mir21-T	0,037902	0,207749	0,836829
pT - kod & mir21-N	0,251534	1,423477	0,164916
pT - kod & let7a-T	0,161947	0,898885	0,375873
pT - kod & let7a-N	0,086142	0,473579	0,639229
pT - kod & mir155-T	0,272208	1,549457	0,131758
pT - kod & mir155-N	0,024122	0,132160	0,895740
pT - kod & mir31-T	0,251534	1,423477	0,164916
pT - kod & mir31-N	0,161947	0,898885	0,375873
pT - kod & mir211-T	-0,175746	-0,977817	0,335985
pT - kod & mir211-N	-0,113707	-0,626866	0,535489
pT - kod & mir137-T	0,051685	0,283470	0,778764
pT - kod & mir137-N	0,506514	3,217573	0,003095
pT - kod & mir133b-T	0,472057	2,932917	0,006376
pT - kod & mir133b-N	0,361796	2,125634	0,041880
pT - kod & mir193a-T	0,168838	0,938234	0,355617
pT - kod & mir193a-N	0,189512	1,057158	0,298878
pT - kod & mir125a-T	0,024120	0,132148	0,895750
pT - kod & mir125a-N	0,099925	0,550063	0,586349

Во табелата бр.81.а, со Spearman Rang – корелација, утврдивме дека постои статистичка асоцијација помеѓу microRNA маркерите и pN-стадиумот за mir137-T ($p = 0,048188$) и mir133b-T ($p = 0,021081$).

Табела бр.81.а . Spearman – ов коефициент на корелација помеѓу експресијата на microRNA молекулите во туморски и контралатерални клинички непроменети слузници во однос на pN - статусот

варијабла	Spearman	t(N-2)	p-level
pN - kod & mir21-T	0,074460	0,408972	0,685465
pN - kod & mir21-N	0,020307	0,111251	0,912158
pN - kod & let7a-T	0,094768	0,521411	0,605908
pN - kod & let7a-N	0,074460	0,408972	0,685465
pN - kod & mir155-T	0,040615	0,222640	0,825325
pN - kod & mir155-N	-0,128625	-0,710411	0,482936
pN - kod & mir31-T	0,067691	0,371613	0,712793
pN - kod & mir31-N	-0,040615	-0,222640	0,825325
pN - kod & mir211-T	-0,030464	-0,166935	0,868541
pN - kod & mir211-N	-0,155690	-0,863276	0,394835
pN - kod & mir137-T	0,351995	2,059776	0,048188
pN - kod & mir137-N	0,128613	0,710344	0,482976
pN - kod & mir133b-T	0,406148	2,434389	0,021081
pN - kod & mir133b-N	0,108306	0,596727	0,555167
pN - kod & mir193a-T	0,000000	0,000000	1,000000
pN - kod & mir193a-N	-0,148921	-0,824871	0,415956
pN - kod & mir125a-T	0,060922	0,334305	0,740475
pN - kod & mir125a-N	0,257227	1,457948	0,155245

Во табелата бр.81.б со Spearman Rang – корелација, утврдивме дека постои статистичка асоцијација помеѓу microRNA markerите и TNM-стадиумот за mir125a-N($p=0,020138$).

Табела бр.81.б. Spearman – ов коефициент на корелација помеѓу експресијата на microRNA молекулите во туморски и контралатерални клинички непроменети слузници во однос на стадиумот на болеста, TNM-стадиумот

варијабли	Spearman	t(N-2)	p-level
Stage - kod & mir21-T	-0,182550	-1,01695	0,317307
Stage - kod & mir21-N	0,080322	0,44137	0,662112
Stage - kod & let7a-T	-0,102228	-0,56287	0,577703
Stage - kod & let7a-N	0,021906	0,12001	0,905273
Stage - kod & mir155-T	-0,153342	-0,84994	0,402091
Stage - kod & mir155-N	-0,233685	-1,31639	0,198011
Stage - kod & mir31-T	0,021906	0,12001	0,905273
Stage - kod & mir31-N	0,014604	0,08000	0,936770
Stage - kod & mir211-T	0,080329	0,44141	0,662083
Stage - kod & mir211-N	0,014604	0,08000	0,936770
Stage - kod & mir137-T	0,065718	0,36073	0,720828

Stage - kod & mir137-N	0,182550	1,01695	0,317307
Stage - kod & mir133b-T	-0,029208	-0,16005	0,873917
Stage - kod & mir133b-N	0,036510	0,20011	0,842747
Stage - kod & mir193a-T	0,029208	0,16005	0,873917
Stage - kod & mir193a-N	-0,124134	-0,68521	0,498473
Stage - kod & mir125a-T	0,007302	0,04000	0,968362
Stage - kod & mir125a-N	0,408912	2,45427	0,020138

Во табелата бр.81в, со Spearman Rang – корелација, утврдивме дека, непостои статистичка асоцијација помеѓу microRNA markerите и G - стадиумот, во ниту една корелација.

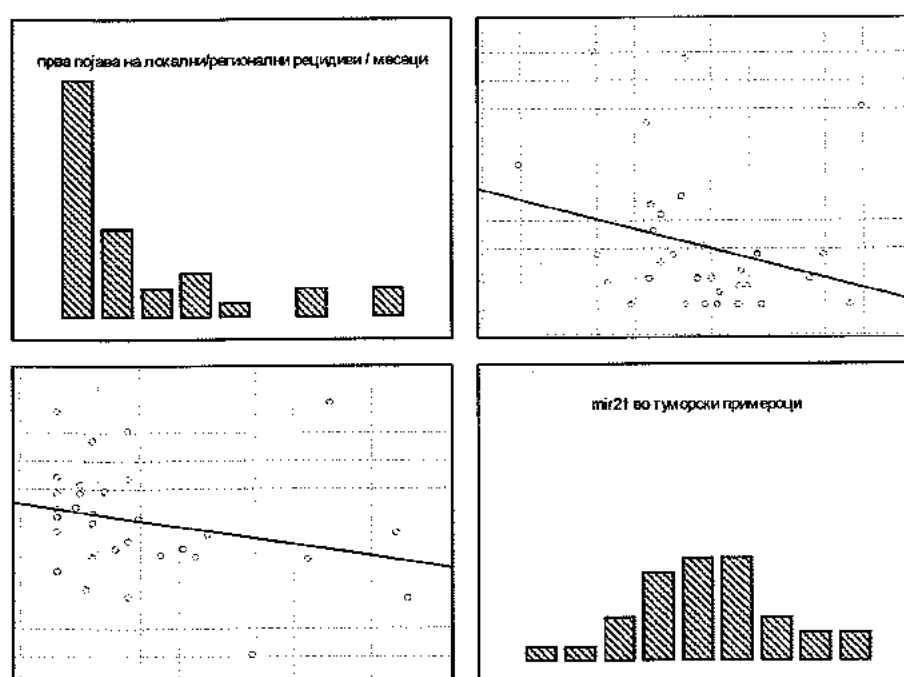
Табела бр.81в. Spearman – ов коефициент на корелација помеѓу експресијата на microRNA молекулите во туморски и контралатерални клинички непроменети слузници во однос на степенот на диференцијација на туморот (G)

Spearman Rank Order Correlations Marked correlations are significant at $p < 0,05000$				
	Valid	Spearman	t(N-2)	p-level
G - kod & mir21-T	32	-0,027291	-0,14953	0,882134
G - kod & mir21-N	32	0,102340	0,56350	0,577285
G - kod & let7a-T	32	-0,054581	-0,29940	0,766700
G - kod & let7a-N	32	0,266083	1,51190	0,141023
G - kod & mir155-T	32	-0,245615	-1,38780	0,175420
G - kod & mir155-N	32	-0,136465	-0,75451	0,456425
G - kod & mir31-T	32	0,034113	0,18695	0,852955
G - kod & mir31-N	32	-0,095517	-0,52557	0,603050
G - kod & mir211-T	32	-0,156935	-0,87035	0,391018
G - kod & mir211-N	32	0,095517	0,52557	0,603050
G - kod & mir137-T	32	-0,231970	-1,30618	0,201418
G - kod & mir137-N	32	-0,095517	-0,52557	0,603050
G - kod & mir133b-T	32	-0,115985	-0,63959	0,527292
G - kod & mir133b-N	32	-0,027291	-0,14953	0,882134
G - kod & mir193a-T	32	-0,040936	-0,22440	0,823965
G - kod & mir193a-N	32	-0,143275	-0,79293	0,434043
G - kod & mir125a-T	32	0,081872	0,44994	0,655988
G - kod & mir125a-N	32	0,143275	0,79293	0,434043

❖ Во примероците од примарниот тумор, помеѓу експресијата на microRNA-21 молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman = 0,037 $p=0,8368$), pN - статусот при интервенцијата (Spearman = 0,074 $p=0,6854$), стадиумот на болеста (Spearman = -0,182 $p=0,3173$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,027 $p=0,8821$) непостојат значајни корелации.

Во примероците од контралатералната клинички непроменетата слузница, помеѓу експресијата на microRNA-21 молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman = 0,251 $p=0,1649$), pN - статусот при интервенцијата (Spearman = 0,0203 $p=0,9121$), стадиумот на болеста (Spearman = 0,0803 $p=0,6621$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = 0,1023 $p=0,5772$) непостојат значајни корелации. (табела бр.81, 81а, 81б, 81в)

Помеѓу квантитативните податоци за експресијата на microRNA молекулите и времето / мес. на појава на први локални/регионални рецидиви, во нашиот сет на примероци добивме значајна негативна корелација само во однос на mir-21 во туморските примероци (Spearman = - 0,378 $p=0,0326$). Тоа значи дека кај пациентите кај кои првите рецидиви се јавиле брзо по операцијата (по мал број на месеци), вредностите на mir-21 се високи. (со растење на бројот на месеците, добиените вредности за mir-21 се помали / се намалуваат) (Слика бр. 78)



Слика бр.78. Корелација помеѓу вредностите на mir-21 во туморските примероци и времето на појава на први локални/регионални рецидиви во месеци

Во нашиот сет на примероци, кај сите други microRNA молекули, помеѓу квантитативните податоци за експресијата и времето / мес. на појава на први локални/регионални рецидиви немаше значајни корелации (за сите $p > 0.05$)

Во табелата бр.82, е прикажана Spearman Rang – корелација, за утврдување на корелациите помеѓу експресијата на microRNA молекулите во нашиот сет на примероци и клиничката варијабла од интерес, време на прва појава на локални рецидиви и вратни метастази, прикажана во месеци,

постоперативно. Овие корелации покажаа неправилна дистрибуција и значајна асоцијација само со *mir21*, во туморското ткиво ($p=0,032681$).

Табела бр.82 . Spearman Rang – корелација на *microRNA* markerите со појава на локални рецидиви и метастази

Spearman Rank Order Correlations Marked correlations are significant at $p < 0,05000$				
	Valid	Spearman	t(N-2)	p-level
рецидиви / вратни метастази / мес. & <i>mir21</i> -T	32	-0,378476	-2,23960	0,032681
рецидиви / вратни метастази / мес & <i>mir21</i> -N	32	-0,020543	-0,11254	0,911142
рецидиви / вратни метастази / мес. & <i>let7a</i> -T	32	-0,161755	-0,89779	0,376447
рецидиви / вратни метастази / мес. & <i>let7a</i> -N	32	0,157498	0,87355	0,389300
рецидиви / вратни метастази / мес & <i>mir155</i> -T	32	-0,335354	-1,94971	0,060611
рецидиви / вратни метастази / мес & <i>mir155</i> -N	32	-0,181667	-1,01187	0,319694
рецидиви / вратни метастази / мес. & <i>mir31</i> -T	32	-0,126035	-0,69587	0,491864
рецидиви / вратни метастази / мес. & <i>mir31</i> -N	32	-0,045713	-0,25064	0,803798
рецидиви / вратни метастази / мес & <i>mir211</i> -T	32	0,079219	0,43527	0,666484
рецидиви / вратни метастази / мес & <i>mir211</i> -N	32	-0,044233	-0,24251	0,810036
рецидиви / вратни метастази / мес. & <i>mir137</i> -T	32	-0,108268	-0,59652	0,555305
рецидиви / вратни метастази / мес & <i>mir137</i> -N	32	-0,018692	-0,10240	0,919120
рецидиви / вратни метастази / мес. & <i>mir133b</i> -T	32	-0,245038	-1,38433	0,176469
рецидиви / вратни метастази / мес & <i>mir133b</i> -N	32	-0,023134	-0,12675	0,899988
рецидиви / вратни метастази / мес. & <i>mir193a</i> -T	32	-0,328876	-1,90744	0,066078
рецидиви / вратни метастази / мес & <i>mir193a</i> -N	32	-0,039421	-0,21608	0,830385
рецидиви / вратни метастази / мес. & <i>mir125a</i> -T	32	-0,262990	-1,49301	0,145877
рецидиви / вратни метастази / мес & <i>mir125a</i> -N	32	0,208949	1,17029	0,251097

❖ Во примероците од примарниот тумор, помеѓу експресијата на *microRNA-let7a* молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman = 0,161 $p=0,3758$), pN - статусот при интервенцијата (Spearman = 0,094 $p=0,6059$), стадиумот на болеста (Spearman = -0,102 $p=0,5777$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,054 $p=0,7667$) непостојат значајни корелации. (табела бр.81, 81a, 81b, 81в)

Во примероците од контралатералната клинички непроменетата слузница, помеѓу експресијата на *microRNA-let7a* молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman = 0,086 $p=0,6392$), pN - статусот при интервенцијата (Spearman = 0,074 $p=0,6854$), стадиумот на болеста (Spearman = 0,021 $p=0,9052$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = 0,266 $p=0,1410$) непостојат значајни корелации. (табела бр.81, 81a, 81b, 81в)

Во примероците од контралатералната клинички непроменетата слузница, помеѓу експресијата на *microRNA-let7a* молекулата и лошиот исход, смртноста (Spearman = -0,359551 $p=0,043263$), како и со времето на преживување (Spearman = -0,377372 $p=0,033234$), постои значајна негативна корелација. (табела бр. 83 и 84). Тоа значи дека кај пациентите кај кои вредностите на *let7a* во контралатералните примероци се високи, преживувањето после операцијата е пократко

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни *miRNA* кај оралниот карцином

Табела бр.83. Spearman Rang – корелација на microRNA маркерите со лошиот исход- смртност

Spearman Rank Order Correlations Marked correlations are significant at p <,05000

	Valid	Spearman	t(N-2)	p-level
живи/умрени & mir21-T	32	0,007816	0,04281	0,966134
живи/умрени & mir21-N	32	-0,132877	-0,73431	0,468460
живи/умрени & let7a-T	32	-0,211041	-1,18255	0,246275
живи/умрени & let7a-N	32	-0,359551	-2,11048	0,043263
живи/умрени & mir155-T	32	-0,070347	-0,38626	0,702028
живи/умрени & mir155-N	32	0,136798	0,75638	0,455318
живи/умрени & mir31-T	32	-0,218857	-1,22851	0,228806
живи/умрени & mir31-N	32	0,062531	0,34317	0,733867
живи/умрени & mir211-T	32	0,070353	0,38630	0,702002
живи/умрени & mir211-N	32	0,007816	0,04281	0,966134
живи/умрени & mir137-T	32	0,054714	0,30013	0,766147
живи/умрени & mir137-N	32	-0,109428	-0,60299	0,551050
живи/умрени & mir133b-T	32	-0,164143	-0,91141	0,369346
живи/умрени & mir133b-N	32	0,078163	0,42943	0,670678
живи/умрени & mir193a-T	32	-0,187592	-1,04605	0,303893
живи/умрени & mir193a-N	32	0,179775	1,00098	0,324843
живи/умрени & mir125a-T	32	-0,046898	-0,25715	0,798816
живи/умрени & mir125a-N	32	-0,211041	-1,18255	0,246275

Табела бр.84 . Spearman Rang – корелација на microRNA маркерите со време на преживување

Spearman Rank Order Correlations Marked correlations are significant at p <,05000

	Valid	Spearman	t(N-2)	p-level
егзитус по оп./мес & mir21-T	32	-0,044711	-0,24513	0,808021
егзитус по оп./мес & mir21-N	32	-0,224473	-1,26169	0,216784
егзитус по оп./мес & let7a-T	32	-0,125116	-0,69072	0,495054
егзитус по оп./мес & let7a-N	32	-0,377372	-2,23198	0,033234
егзитус по оп./мес & mir155-T	32	-0,129900	-0,71757	0,478573
егзитус по оп./мес & mir155-N	32	0,040114	0,21989	0,827444
егзитус по оп./мес & mir31-T	32	-0,183074	-1,01998	0,315895
егзитус по оп./мес & mir31-N	32	0,019871	0,10886	0,914037
егзитус по оп./мес & mir211-T	32	0,241698	1,36429	0,182626
егзитус по оп./мес & mir211-N	32	0,194850	1,08809	0,285220
егзитус по оп./мес & mir137-T	32	-0,116652	-0,64332	0,524902
егзитус по оп./мес & mir137-N	32	-0,240112	-1,35478	0,185602
егзитус по оп./мес & mir133b-T	32	-0,435146	-2,64715	0,012808
егзитус по оп./мес & mir133b-N	32	-0,044527	-0,24412	0,808797

Табела бр.83. Spearman Rang – корелација на microRNA маркерите со лошиот исход- смртност

Spearman Rank Order Correlations Marked correlations are significant at $p < 0,05000$

	Valid	Spearman	t(N-2)	p-level
живи/умрени & mir21-T	32	0,007816	0,04281	0,966134
живи/умрени & mir21-N	32	-0,132877	-0,73431	0,468460
живи/умрени & let7a-T	32	-0,211041	-1,18255	0,246275
живи/умрени & let7a-N	32	-0,359551	-2,11048	0,043263
живи/умрени & mir155-T	32	-0,070347	-0,38626	0,702028
живи/умрени & mir155-N	32	0,136798	0,75638	0,455318
живи/умрени & mir31-T	32	-0,218857	-1,22851	0,228806
живи/умрени & mir31-N	32	0,062531	0,34317	0,733867
живи/умрени & mir211-T	32	0,070353	0,38630	0,702002
живи/умрени & mir211-N	32	0,007816	0,04281	0,966134
живи/умрени & mir137-T	32	0,054714	0,30013	0,766147
живи/умрени & mir137-N	32	-0,109428	-0,60299	0,551050
живи/умрени & mir133b-T	32	-0,164143	-0,91141	0,369346
живи/умрени & mir133b-N	32	0,078163	0,42943	0,670678
живи/умрени & mir193a-T	32	-0,187592	-1,04605	0,303893
живи/умрени & mir193a-N	32	0,179775	1,00098	0,324843
живи/умрени & mir125a-T	32	-0,046898	-0,25715	0,798816
живи/умрени & mir125a-N	32	-0,211041	-1,18255	0,246275

Табела бр.84 . Spearman Rang – корелација на microRNA маркерите со време на преживување

Spearman Rank Order Correlations Marked correlations are significant at $p < 0,05000$

	Valid	Spearman	t(N-2)	p-level
егзитус по оп./мес & mir21-T	32	-0,044711	-0,24513	0,808021
егзитус по оп./мес & mir21-N	32	-0,224473	-1,26169	0,216784
егзитус по оп./мес & let7a-T	32	-0,125116	-0,69072	0,495054
егзитус по оп./мес & let7a-N	32	-0,377372	-2,23198	0,033234
егзитус по оп./мес & mir155-T	32	-0,129900	-0,71757	0,478573
егзитус по оп./мес & mir155-N	32	0,040114	0,21989	0,827444
егзитус по оп./мес & mir31-T	32	-0,183074	-1,01998	0,315895
егзитус по оп./мес & mir31-N	32	0,019871	0,10886	0,914037
егзитус по оп./мес & mir211-T	32	0,241698	1,36429	0,182626
егзитус по оп./мес & mir211-N	32	0,194850	1,08809	0,285220
егзитус по оп./мес & mir137-T	32	-0,116652	-0,64332	0,524902
егзитус по оп./мес & mir137-N	32	-0,240112	-1,35478	0,185602
егзитус по оп./мес & mir133b-T	32	-0,435146	-2,64715	0,012808
егзитус по оп./мес & mir133b-N	32	-0,044527	-0,24412	0,808797

егзитус по оп./мес & mir193a-T	32	-0,140387	-0,77662	0,443461
егзитус по оп./мес & mir193a-N	32	0,096229	0,52952	0,600339
егзитус по оп./мес & mir125a-T	32	-0,008832	-0,04838	0,961738
егзитус по оп./мес & mir125a-N	32	-0,198898	-1,11162	0,275133

Во нашиот сет на примероци, помеѓу квантитативните податоци за експресијата на microRNA-let7a и времето / мес. на појава на први локални/регионални рецидиви немаше значајни корелации ($p > 0.05$)

❖ Во примероците од примарниот тумор, помеѓу експресијата на **microRNA-155** молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman = 0,272 $p=0,1317$), pN - статусот при интервенцијата (Spearman = 0,040 $p=0,8253$), стадиумот на болеста (Spearman = -0,153 $p=0,4020$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,245 $p=0,1754$) непостојат значајни корелации.

Во примероците од контралатералната клинички непроменетата слузница, помеѓу експресијата на microRNA-155 молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman = 0,024 $p=0,8957$), pN - статусот при интервенцијата (Spearman = -0,128 $p=0,4829$), стадиумот на болеста (Spearman = -0,233 $p=0,1980$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,136 $p=0,4564$) непостојат значајни корелации.

Во нашиот сет на примероци, помеѓу квантитативните податоци за експресијата на microRNA-155 и времето / мес. на појава на први локални/регионални рецидиви немаше значајни корелации ($p > 0.05$)

❖ Во примероците од примарниот тумор, помеѓу експресијата на **microRNA-31** молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman = 0,251 $p=0,1649$), pN - статусот при интервенцијата (Spearman = 0,067 $p=0,7127$), стадиумот на болеста (Spearman = 0,021 $p=0,9052$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = 0,034 $p=0,8529$) непостојат значајни корелации. (табела бр.81, 81a, 81b, 81в)

Во примероците од контралатералната клинички непроменетата слузница, помеѓу експресијата на microRNA-31 молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman=0,16 $p=0,3758$), pN - статусот при интервенцијата (Spearman=-0,040 $p=0,8253$), стадиумот на болеста (Spearman=0,014 $p=0,9367$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman= -0,095 $p=0,6030$) непостојат значајни корелации.

Во нашиот сет на примероци, помеѓу квантитативните податоци за експресијата на microRNA-31 и времето/мес. на појава на први локални/регионални рецидиви немаше значајни корелации ($p > 0.05$)

❖ Во примероците од примарниот тумор, помеѓу експресијата на **microRNA-211** молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman = -0,175 $p=0,3359$), pN - статусот при интервенцијата (Spearman = -0,030 $p=0,8685$), стадиумот на болеста (Spearman = 0,080 $p=0,6620$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,156 $p=0,3910$) непостојат значајни корелации.

Во примероците од контралатералната клинички непроменетата слузница, помеѓу експресијата на microRNA-211 молекулата и големината на

примарниот тумор (Spearman=-0,113 p=0,5354), pN-статусот при интервенцијата (Spearman=-0,155 p=0,3948), стадиумот на болеста (Spearman = 0,014 p=0,9367) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = 0,095 p=0,6030) непостојат значајни корелации.

Во нашиот сет на примероци, помеѓу квантитативните податоци за експресијата на mir -211 и времето /мес. на појава на први локални/регионални рецидиви немаше значајни корелации ($p > 0.05$)

Во туморското ткиво, Cox – ова регресиона анализа на време на преживување, покажа дека постои асоцијација помеѓу експресијата на microRNA-211 молекулата и времето на преживување ($p=0,031228$), постои значајна корелација. (табела бр. 85)

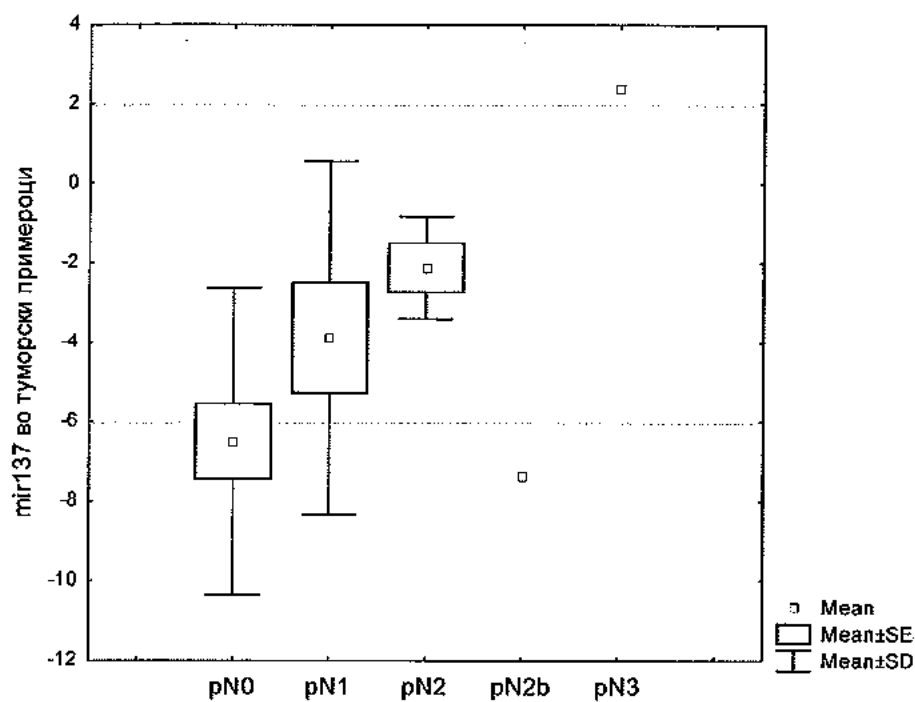
Табела бр.85. Cox – ова регресиона анализа на време на преживување

Dependent Variable: egzitus po op. vo meseci Censoring var.: zivi / umreni
Chi² = 12,3741 df = 9 p = ,19309

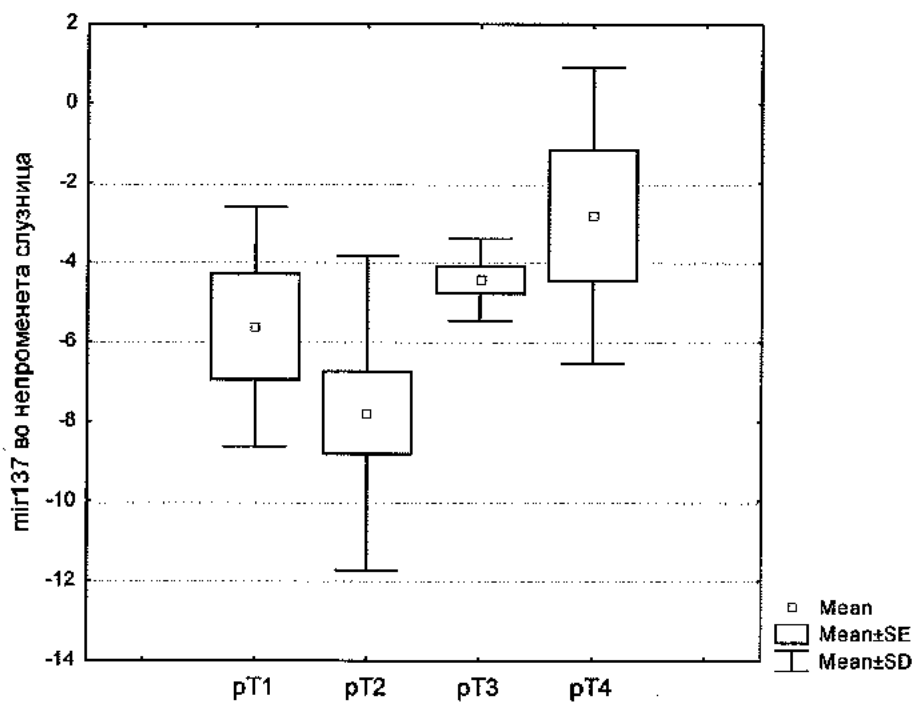
	Beta	Standard	t-value	exponent	Wald	p
mir21-T	-0,262248	0,176084	-1,48934	0,769320	2,218117	0,136409
let7a-T	0,193829	0,146880	1,31964	1,213888	1,741458	0,186964
mir155-T	-0,171818	0,178202	-0,96418	0,842132	0,929639	0,334964
mir31-T	0,221005	0,156393	1,41314	1,247330	1,996964	0,157624
mir211-T	-0,153372	0,071195	-2,15425	0,857811	4,640777	0,031228
mir137-T	0,114760	0,092317	1,24310	1,121604	1,545305	0,213839
mir133b-T	0,154611	0,073623	2,10006	1,167204	4,410238	0,035732
mir193a-T	0,058492	0,120019	0,48736	1,060237	0,237520	0,626007
mir125a-T	0,056226	0,084345	0,66661	1,057837	0,444375	0,505023

❖ Во примероците од примарниот тумор, помеѓу експресијата на microRNA-137 молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman= 0,051 p=0,7787), стадиумот на болеста (Spearman = 0,065 p=0,7208) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,231 p=0,2014) непостојат значајни корелации (табела бр.81, 81a, 81b, 81в). Помеѓу pN - статусот при интервенцијата и експресијата на microRNA-137 постои значајна позитивна корелација (Spearman=0,351 p=0,0481), односно, експресијата расте со степенот на pN и значајно е највисока кај пациентите со pN3. (Слика бр. 79)

Во примероците од контралатералната клинички непроменетата слузница, помеѓу експресијата на microRNA-137 молекулата и pN-статусот при интервенцијата (Spearman = 0,128 p=0,4829), стадиумот на болеста (Spearman = 0,182 p=0,3173) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,095 p=0,6030) непостојат значајни корелации. Помеѓу големината на примарниот тумор и експресијата на microRNA-137 постои значајна позитивна корелација (Spearman=0,506 p=0,0030), односно, експресијата расте со растењето (големината) на примарниот тумор и значајно е највисока кај пациентите со pT4. (Слика бр. 80)



Слика бр.79. Средни вредности на експресијата на *microRNA-137* во туморски примероци според pN статусот

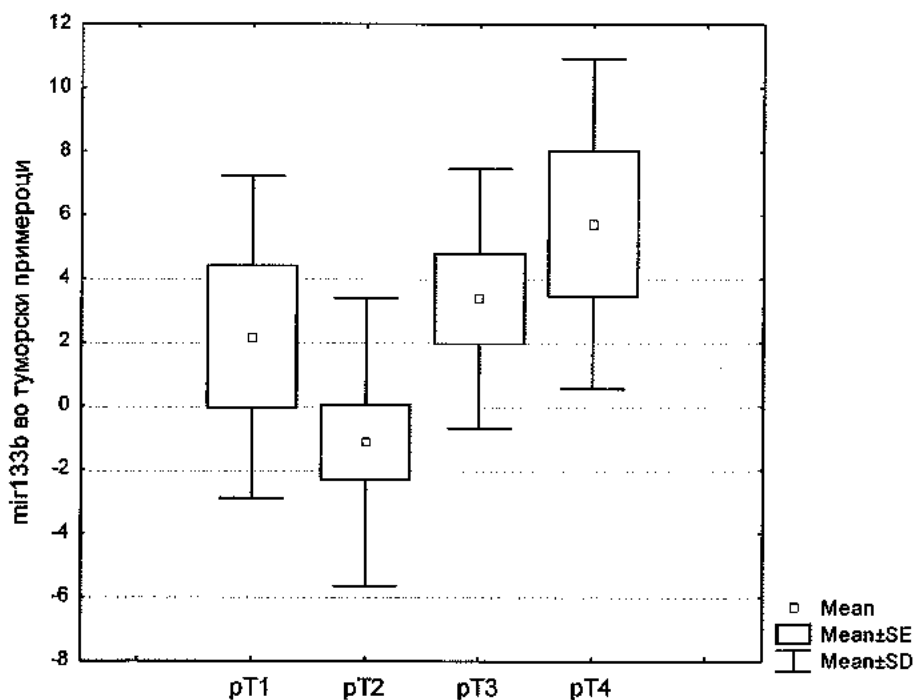


Слика бр. 80. Средни вредности на експресијата на *microRNA-137* во примероците од контралатералната клинички непроменетата слезница според pT

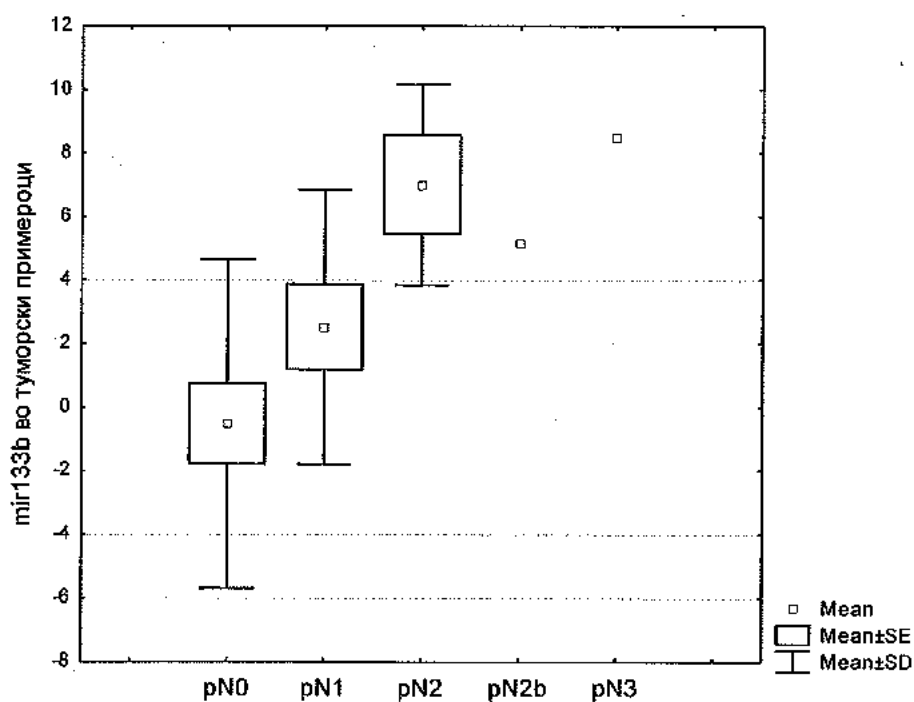
❖ Во примероците од примарниот тумор, помеѓу експресијата на **microRNA-133b** молекулата и стадиумот на болеста (Spearman = -0,029 $p=0,8739$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,115 $p=0,5272$) не постојат значајни корелации. Помеѓу големината на примарниот тумор и експресијата на **mir-133b** постои значајна позитивна корелација (Spearman = 0,472 $p=0,0063$), што значи дека експресијата расте со растењето на примарниот тумор. (Слика бр.81) Помеѓу **pN** - статусот при интервенцијата и експресијата на **microRNA-133b** постои значајна позитивна корелација (Spearman=0,406 $p=0,0210$), односно, експресијата расте со растењето на степенот на **pN** и највисока е кај пациентите со **pN3**. (Слика бр. 82)

Во примероците од контралатералната клинички непроменетата слезница, помеѓу експресијата на **microRNA-133b** молекулата и **pN** - статусот при интервенцијата (Spearman = 0,108 $p=0,5551$), стадиумот на болеста (Spearman = 0,036 $p=0,8427$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,027 $p=0,8821$) не постојат значајни корелации.

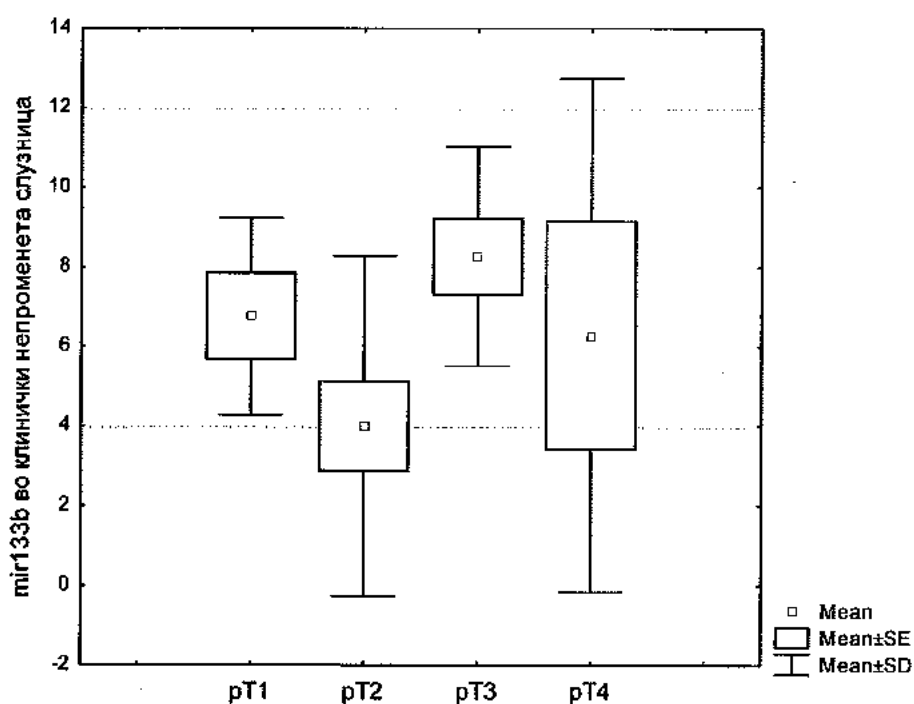
Помеѓу големината на примарниот тумор и експресијата на **microRNA-133b** постои значајна позитивна корелација (Spearman=0,361 $p=0,0418$), односно, експресијата расте со растењето на големината на примарниот тумор – кај овој сет на примероци значајно е највисока кај пациентите со **pT3**. (Слика бр. 83)



Слика бр. 81. Средни вредности на експресијата на **microRNA-133b** во туморски примероци според **pT**



Слика бр. 82. Средни вредности на експресијата на *microRNA-133b* во туморски примероци според pN статусот



Слика бр. 83. Средни вредности на експресијата на *microRNA-133b* во примероците од контралатералната клинички непроменетата слјузница според pT

Во нашиот сет на примероци, помеѓу квантитативните податоци за експресијата на *mir-133b* и времето / мес. на појава на први локални/регионални рецидиви немаше значајни корелации ($p > 0.05$)

Во туморските примероци, помеѓу експресијата на *mir-133b* и времето на преживување постои значајна негативна корелација (Spearman = -0,435146 $p=0,012808$). Тоа значи дека кај пациентите кај кои вредностите на *mir-133b* во туморските ткива се високи, преживувањето после операцијата е пократко (табела бр.86 слика бр. 83.а)

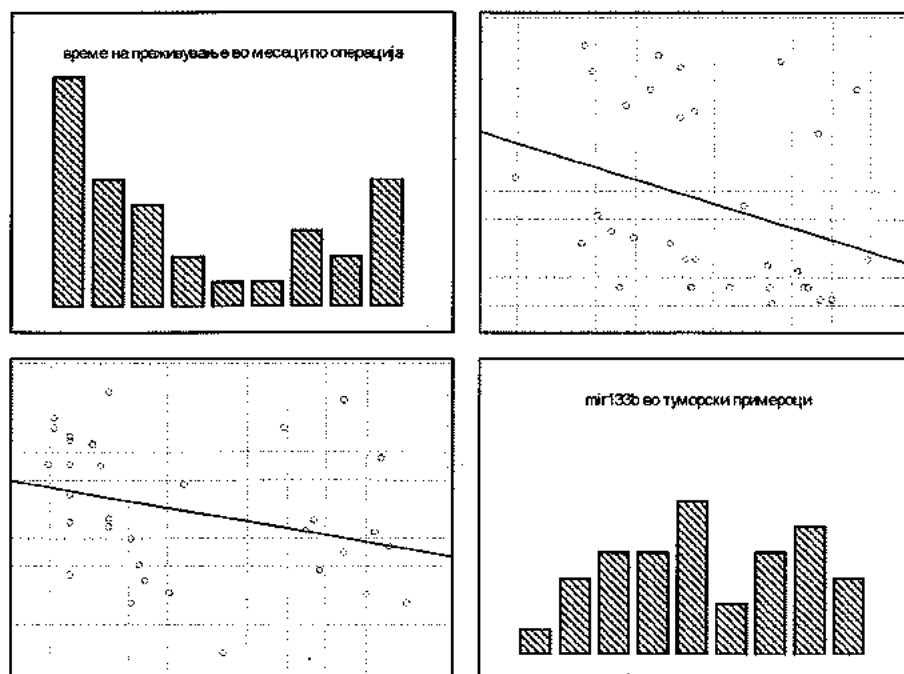
Табела бр.86. Spearman Rang – корелација на microRNA markerите со време на преживување

Spearman Rank Order Correlations Marked correlations are significant at $p < 0,05000$				
	Valid	Spearman	t(N-2)	p-level
егзитус по оп./мес & mir133b-T	32	-0,435146	-2,64715	0,012808

Во туморското ткиво, Cox – ова регресиона анализа на време на преживување, покажа дека постои асоцијација помеѓу експресијата на *mir133b-T* молекулата и времето на преживување ($p=0,035732$), постои значајна корелација. (табела бр.87)

Табела бр.87. Cox – ова регресиона анализа на време на преживување

Dependent Variable: egzitus po op. vo meseci Censoring var.: zivi / umreni Chi ² = 12,3741 df = 9 $p = ,19309$						
	Beta	Standard	t-value	exponent	Wald	p
mir133b-T	0,154611	0,073623	2,10006	1,167204	4,410238	0,035732



Слика бр. 83.а. Корелација помеѓу вредностите на *mir-133b* во туморските примероци и времето на преживување во месеци

❖ Во примероците од примарниот тумор, помеѓу експресијата на **microRNA-193a** молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman = 0,168 $p=0,3556$), pN - статусот при интервенцијата (Spearman = 0,00 $p=1,0$), стадиумот на болеста (Spearman = 0,029 $p=0,8739$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,040 $p=0,8239$) непостојат значајни корелации.

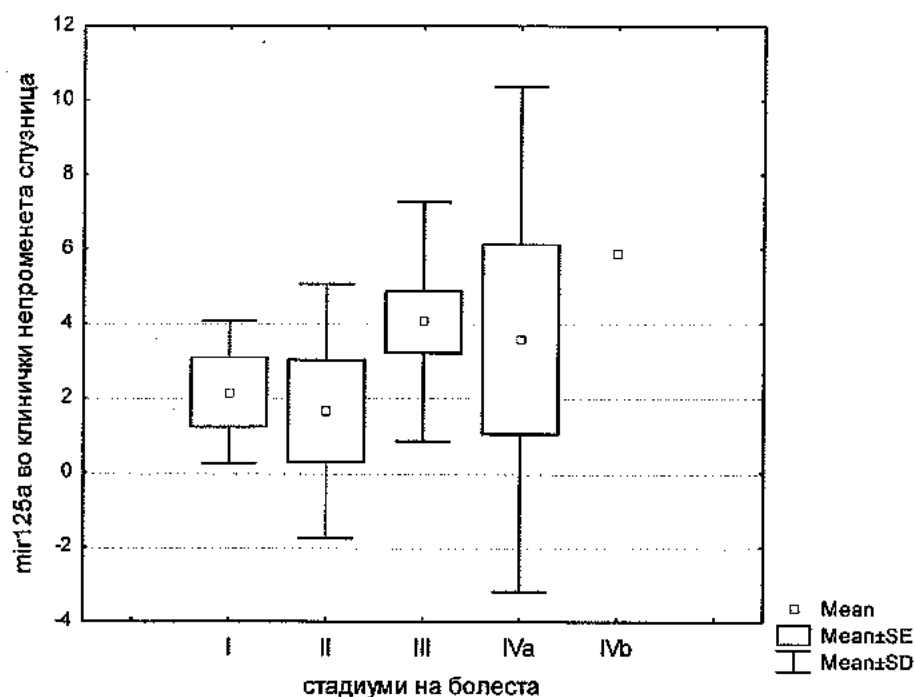
Во примероците од контралатералната клинички непроменетата слузница, помеѓу експресијата на **microRNA-193a** молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman=0,189 $p=0,2988$), pN-статусот при интервенцијата (Spearman=-0,148 $p=0,4159$), стадиумот на болеста (Spearman = -0,124 $p=0,498$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,143 $p=0,4340$) непостојат значајни корелации.

Во нашиот сет на примероци, помеѓу квантитативните податоци за експресијата на **mir-193a** и времето / мес. на појава на први локални/регионални рецидиви немаше значајни корелации ($p > 0.05$).

❖ Во примероците од примарниот тумор, помеѓу експресијата на **microRNA-125a** молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman = 0,024 $p=0,8957$), pN - статусот при интервенцијата (Spearman = 0,060 $p=0,7404$), стадиумот на болеста (Spearman = 0,007 $p=0,9683$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = 0,081 $p=0,6559$) непостојат значајни корелации.

Во примероците од контралатералната клинички непроменетата слузница, помеѓу експресијата на **microRNA-125a** молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman+0,099 $p=0,5863$), pN-статусот при интервенцијата (Spearman=0,257 $p=0,1552$), и клеточната диференцијација (Spearman=0,143 $p=0,4340$) непостојат значајни корелации.

Помеѓу стадиумот на болеста и експресијата на **mir-125a** постои значајна позитивна корелација (Spearman=0,408 $p=0,0201$), односно, експресијата расте со растење на стадиумот на болеста. (Слика бр. 84)



Слика бр.84. Средни вредности на експресијата на *microRNA-125a* во примероци од контралатерална клинички непроменета слузница според стадиумот на болест

Во нашиот сет на примероци, , помеѓу квантитативните податоци за експресијата на *microRNA-125a* молекулата и времето / мес. на појава на први локални/регионални рецидиви немаше значајни корелации ($p > 0.05$).

6. ДИСКУСИЈА

➤ Во последната деценија, епигенетиката, стана главен фокус на бројни истражувања, со што ја обезбеди својата клучна улога во етиопатогенезата на OSCC²¹⁵. Идентификацијата и анализите на епигенетски таргетираните гени со дисрегулирани ДНК метилации и MicroRNAs експресии, овозможија напредок во разбирањето на молекуларните механизми во иницијацијата, прогресијата и експанзијата на OSCC. Но сепак, до денес суште не е идентификуван специфичен ген, кој би бил дијагностички или прогностички биомаркер за OSCC, би нашол клиничка апликабилност во дијагностички и терапевтски цели¹⁰⁷.

Затоа, во нашата студија, се обидовме да обезбедиме сеопфатна продуктивност во истражувањето за потврдување на гените кандидати, специфични за DNA хиперметилацијата кај OSCC.

Поаѓајќи од фактот дека, ген специфичните ДНК метилационни промени - Puri¹⁹², можат да се користат за диференцијација на пациентите со и без OSCC, а со цел на востановувањето на нивната можна улога во иницијација, прогресија и прогноза, ги истраживме нивоата на метилација на најексплоатираниите гени во литературата: p16, DAPK, E/cadherin, MGMT и RARβ^{22, 225, 188}.

Истражувањето го спроведовме на 40 пациенти со OSCC и за прв пат во Македонија, прикажавме ДНК метилационни модели специфични за оралниот карцином, со динамичен опсег и статистички значајни диференцијални разлики помеѓу туморските и нормалните, контралатерални ткива, во однос на примероците од здравите ткива, за сите гени одделно.

Во нашата студија, анализата на 90 биоптични примероци составени од: (n=40) туморски ткива; (n=39) биопсии од контралатерално-земени од истите пациенти и (n=20) биопсии од здрави пациенти, изведена за секој ген поединечно го покажа следното. Вкупно во OSCC биоптичните примероци, беа метилирани M+142/200 (71%). Најчесто метилирани гени во туморските примероци беа E-cadherin 36/40(90%), MGMT 30/40(75%), DAPK 30/40(75%), потоа следеше RARβ2 25/40(62,5%), а најретко метилирани беа промоторите на p16 гените 21/40(52,5%). Неметилирани гени беа најдени вкупно 58/200(29%). Слично како и нашите наоди со висок процент од 80% метилации за сите анализирани гени во оралниот карцином регистрирал и Asokan⁵, останатите 20% од примероците биле неметилирани.

Шесте, најчесто метилирани гени, во студијата на Righini²⁰³ биле: RARB2 (42%), ECAD (36%), MGMT (29%), p16 (29%), DAPK (27%), неговиот процент на метилација, бил многу понизок од истиот во нашата студија, но наодот на метилацијата на 4 гени била значително различна меѓу туморските и нормалните ткива ($p < 0.001$), како и во нашата студија со сигнификантна разлика од ($p < 0.001$).

Многу автори покажале различна позитивност во молекуларната процена, за овие гени во оралниот карцином, а нашите наоди диференцијално се совпаднаа со вредностите на одделни гени, во различни студии. Shaw²²⁷, утврдил значителна CpG метилација на промотор

генот во туморските примероци во 28% за p16, 73% за RAR β 2, 42% за E-cadherin, 65% за MGMT; Steinmann²⁴³ и соп. ја потврдиле хиперметилацијата кај оралниот карцином за: p16 (60%), MGMT (53%), RAR β (75%), DAPK (69%) и CDH1 (43%); Asokan⁵, регистрирал 60% за p16, 40% за MGMT, 60% за E-cadherin гените. Најчести метилации, објавени во литературата, прикажале Wong²⁶⁵ и Yong²⁸⁰ за три гени: p16, MGMT, и DAPK во 77%, 75 и 94% во туморските примероци и 70,3%, 64% и 71% во соседните ткива; и Kulkarni¹²⁰, со сличен, многу висок процент за E-cadherin од 86,7% во примарниот тумор и 76,7% во соседната нормална лигавица. Во анализата на Dikshit⁵⁴, промотор метилација била успешна во (54%) за p16, во (90%) за MGMT, во (91%) за DAP-K, и во (81%) за E-cadherin. Во контралатералните ткива хиперметилацијата била пропорционално измерена, 44% за p16, 27% за MGMT, 42% за DAP-K, и 43% за E-cadherin.

Во нашето истражување метилацијата на сите 5 промотор целни гени (100%) во OSCC беше забележана кај 11(27,5%) пациенти; сите 4 гени беа метилирани исто така кај 11(27,5%) пациенти, метилација на 3 гени беше регистрирана кај 9(22,5%) пациенти, со метилирани 2 гени беа 8(20%) пациенти, а кај 1 пациент (2,5%) сите предложени гени беа неметилирани. Последниот пациент беше во старосна група до 39 години, т.е. меѓу најмладите во нашата студија, пушач, со напреден стадиум, лоша прогноза и смртен исход од 10 месеци, постоперативно. Во студијата на Lee¹²⁶, овие проценти се инверзно регистрирани, т.е. најголем број на пациенти имале само по еден метилиран ген во 38% (26 од 69) на тумори, а истовремена метилација на сите 5 гени, не била најдена ниту кај еден пациент (0%), што се покажа спротивно на нашите резултати¹²⁶. Исто и студијата на Taioli²⁴⁸, покажала ниски вредности на метилација на гените во туморското ткиво, со наод од само 10% за три истовремено метилирани гени кај една индивидуа, што сугерира дека и покрај сличната хистологија и локација, присутни се различни патишта во процесот на карциногезата.

Во нормалните, контралатерални ткива, нашите наоди покажаа метилации кај 58% од испитаниците, за p16 (7,7%), E/cadherin (89,7%), DAP-K, (33,3%), MGMT (74,4%) и за RAR β (87,2%), соодветно за секој ген. Во оваа група, добиената вкупна метилација од 58%, од вкупните гени (114/195), беше во прилог на најчесто метилирани гени E/cadherin 89,7%, RAR β 2- 87,2%, MGMT- 74,4%, DAPK- 33,3%, а најретко беа метилирани p16- 7,7%. Исто и за оваа група, постојат различни нивоа на метилации објавени во литературата, кои се движат за секој презентирани ген, одделно. Најниски вредности за четирите гени прикажала Maruya¹⁵³ од 0–22%, само за RAR β 2 била најдена висока вредност од 50%, а нашите наоди се во ранг на прикажаните вредности на Righini²⁰³ 53%; Hasegawa⁸² 46,2%; и Sinha²³³ 43,3%, Shaw²²⁶, 47% и други.

Во здравите ткива, фреквенцијата на метилација беше забележана само кај еден пациент за MGMT, значи 5% (Табела бр.11.6). Вредноста на метилација во оваа група на пациенти од 1%, покажа дека пациентите, застапени со различна возраст, пол и навики, не беа метилирани во промотор регионите на зададените гени. Овие наоди во целост се совпаднаа со наодите на сите други автори^{12, 70, 120, 281}, кои регистрираа 0% метилација за сите гени кај здравите индивидуи.

p16 е регулаторен ген, кој е широко експлоатиран во оралниот карцином и фреквенцијата на неговата хиперметилација, објавена во

литературата се движи од 17- 86,8 % кај OSCC, а Hall⁸¹ и Carvalho²² забележале дека метилацијата на p16/ CDKN2A се движи 0-85% кај оралниот карцином.

Steinmann²⁴¹, ја потврдил хиперметилацијата кај 60% од пациентите со орален карцином, слично како и Šupić²⁴⁵ кај 66,7%; Puri¹⁹² во 52%; Kato¹⁰³ регистрирал 72,7% во OSCC и 27,27% контралатерално; Mielcarek-Kuchta¹⁶² (33.9 %) во OSCC, наспроти (18.8 %); Bhatia¹³ објавила ист процент од 82% и 50%, наспроти нормалното, контралатерално со метилирани 13% и 31,3%, Sinha P²³³ во 86,8%, што е највисоко објавена стапка до сега, споредбено со 43,3% позитивност во молекуларната процена за p16, во нормалното, контралатерално ткиво; Campo- Trapero²⁰, во 76% наспроти 14%, во нормалните ткива. Shaw²²⁶ утврдил значително помали нивоа на CpG метилацијата на промотор генот p16 од 28%, а Ogi¹⁸⁰ покажал најниско ниво на метилирани p16 во OSCC 16,6%; Gasche⁷⁰ нагласила дека процентуалната епигенетски аберации на p16 била најдена во 70% во туморските ткива, во однос на 6% кај нормалните контралатерални ткива, што е најголема дискрепанца, досега објавена; Wong²⁶⁵, во 50% во хируршките marginи на туморите, во однос на 31.3% контралатерално.

Сите автори, во своите истражувања за метилацијата на p16, во биоптичните примероци од здравите пациенти, утврдиле дека тие се неметилирани т.е. со ниво за ДНА метилација од 0%. Bhatia¹³, Jacqueline A Gasche⁷⁰, Viraj Kulkarni¹²⁰, Yong-Kie Wong²⁸⁰, идентично со нашите наоди, со наод на неметилирани гени од 1%.

Инциденцата на Maruya¹⁵³, за p16 во здравите ткива била 3%, во нормалните контралатерални 16%, а во карциномите 33%.

Grønbaek⁷⁹ и Okami¹⁸¹, во своите две независни студии покажале дека фреквенцијата на хиперметилација на p16 кај оралниот карцином е 60% во Европа и Америка што е многу помал процент во споредба со азиското население со 86% метилации. Спротивно на овие наоди Kaur¹⁰⁴, покажал дека нивото на метилирани p16 изнесувало 37,5% (9/24) во OSCC кај американската популација; во споредба со Demokan⁵⁰ 47,8% и Yong²⁸¹ 67,2%, во индиската популација. Овие наоди најверојатно се должат на различниот начин на живеење, навики и етничките и родови разлики.

Инциденцата на метилација на p16 кај нашите испитаници со 52,5% +M, во OSCC, е во ранг на наодите на Demokan⁵⁰, Wong²⁶⁵, Satoru²¹⁸, Grønbaek⁷⁹ и Okami¹⁸¹, а за нормалните контралатерални ткива од 7,7, се совпаѓаат со наодите на Maruya¹⁵³, Ogi¹⁸⁰, Campo- Trapero²⁰ и Mielcarek-Kuchta¹⁶².

Во нашето истражување, процентуалната разлика во застапеноста на хиперметилациите помеѓу p16 гените во OSCC и нормалните, контралатерални ткива од $p = 0,0006$ се покажа статистички сигнификантна, кои наод се совпаѓа со голем број на студии кои анализирајќи ја промотор хиперметилацијата на p16, во туморските и здравите ткива, покажале статистички значајна разлика: Steinmann²⁴¹ ($P = 0,0324$); и Shaw²²⁶ ($p = 0,0029$). Bhatia¹³ со $p = 0,0001$ за нормалните, контралатерални ткива и OSCC. Исто и Hui⁹⁰, во својата анализата на p16 метилационното ниво, забележал значително повисоко ниво кај туморите отколку кај нормалните ткива ($p < 0,0002$) и во студијата на Yong-Kie Wong²⁸⁰, метилационната стапка на туморските ткива и соодветните контралатерални нормални ткива била статистички значајна $P < 0.05$. Единствено студијата на Bujeeb¹⁸ не открила статистички значајна разлика $p = 0.89$, помеѓу туморските ткива и нормалните

ткива, поради што заклучиле дека, p16 не е соодветен маркер за оралната малигна трансформација. Ова се должелo најверојатно на малата некохерентна група на испитаници, која не можела да даде релевантни резултати.

Разликата помеѓе туморските, контралатералните, нормални и здравите ткива (*Kruskal-Wallis test*: $H = 29,308$ $p = 0,0000$) за p16, во нашата студија, се покажа дека е значајно сигнификантна, што укажува, дека овој ген учествува во прогресијата на одредени туморски клетки т.е. во различни фази на инвазијата.

Односот на контралатералните, нормални и здравите ткива, не се покажа статистички значајна ($p=0,2068$) за p16.

Нашите наоди, како и наодите на сите останати, покажуваа дека p16 е хиперметиран во туморските ткива, незначително метиран во нормалните контралатерални ткива, а не е метиран кај здравите индивидуи. Овие резултати сами по себе говорат дека, метилацијата на овие гени учествува во патогенезата на оралниот карцином, а ограничениот број на метилрани p16 гени (7,7%), во нормалните и контралатерални ткива, покажуваат дека не е ран настан, кој се случува во туморогенезата.

Сублимирани сите квалитативни податоци за метиланите p16, во нашата студија, како и во останатите студии^{162, 120, 90}, покажаа дека p16 е вклучен во доцната патогенеза, веројатно во прогресијата и покажува високо тумор специфичен модел за транзицијата и малигна трансформација на клетките на OSCC. Метиланите p16 гени се појавуваат со пролиферативната активност и се најверојатно одговорни за инвазивниот тек на оралниот карцином. Исто така нискиот процент на метилацијата во нормалната лигавица и нејзиното отсуство во здравите ткива, зборува за иницирање на туморогенезата како глобален ефект врз целата усна лигавица. Овој факт може да биде одговорен за мултифокална прогресија, а ја покажува и морфолошката хетерогеност на анализираниите текстури на целокупната лигавица.

Исто како што покажал и Shaw²²⁶ и останатите, вкупните резултати во нашата студија укажуваат на докажани динамични, но различно регулирани p16 со епигенетски аберации во патогенезата на оралниот карцином.

Метилацијата на DAPK, во нашата студија се покажа како многу важна компонента во маркер панелите за детекција и скрининг на туморите. Неговото ниво во ткивните примероци на OSCC изнесуваше 75%(30/40); во биопсиите од нормалното, контралатерално ткиво 33,3%(13/39) и во здравите примероци 0% (0/20).

Во однос на застапеноста на хиперметилацијата на DAPK кај оралниот карцином, во литературата, според Kaur¹⁰⁴ нивото се движи од 33 – 87%.

Нашите наоди се во ранг на највисоко застапените метилации на DAPK, објавени во литературата, како во студиите на Steele T, Meyers²³⁹ од 75%; потоа Li¹³¹ кај 71,69% (38/53); Kulkarni¹²⁰ - 86,7% и Steinmann K.²⁴¹ со 69% и 67% во студијата на Rosas²⁰⁸. Потоа следат студиите на Rettori²⁰¹, кој DAPK го регистрирал кај 51%; Kulkarni¹²⁰ кај 48,3%; Díez-Pérez R.⁵³ 48,8%; Maruya¹⁵³ во 45,3% од основните OSCC ткива; Yong²⁸⁰ кај 45,3% (29/64); Smith²³⁶ (36%), а најниски инциденци од 19% за DAP-K во туморите и 10% во контралатералното ткиво, биле објавени од страна на Maruya¹⁵³ и Bhatia¹³ со

25% во OSCC, наспроти 15% во нормалните ткива, кои се спротивни на нашите резултати.

Нивото на хиперметилација на DAPK во контралатералните ткива, во нашата студија беше најдено во 33,3%. Другите автори регистрираше метилационни нивоа на DAPK од 40,6% (26/64) во студијата на Wong Yong²⁸⁰, Kulkarni¹²⁰ објавил слични резултати како Wong²⁶⁸ од 40%; и Steinmann²⁴⁰ и Rosas²⁰⁸ во 33%. Нашите наоди се совпаѓаат со наодите на Steinmann²⁴⁰, Kulkarni¹²⁰ и Wong²⁶⁸. Сите автори ја потврдиле метилираноста на промотор регионите на DAPK од 0 %, во здравите ткива, што беше во ранг на нашите резултати. Во здравите индивидуи, во литературата, како и во нашата студија се прикажани 0% метилации за DAPK.

Во нашето истражување, високата фреквенција на хиперметилација на промотор регионот беше забележана за DAPK гените како во оралниот карцином, така и во соодветната нормална слuzница, демонстрирајќи динамичниот опсег и статистички значајни диференцијални метилационни разлика помеѓу туморот и нормалното, контралатерално ткиво, во однос на примероците од здраво ткиво (*Kruskal-Wallis test: H = 29,377 p = 0,0000*). Само студијата на Maruya¹⁵³, докажала дека стапката на метилација во туморските примероци била 19% за DAPK, во хистолошки нормалната лигавица покажала повисоко ниво на метилација од 22% и во здравото ткиво 0%, што ја прави оваа студија уникатна, во смисол на поголемо метилационно ниво на овој ген, во нормалното контралатерално ткиво, во однос на туморското ткиво, што не беше случај и во нашата студија.

Нашите резултатите покажаа сигнификантно повисока инциденца на метилација на DAPK, во однос на p16(CDKN2A1) и беше најдена нивна взаемна асоцираност во однос на метилацијата во туморското ткиво (Pearson Chi-squ.=4,38 p = 0,0363; CI=95% 1,05<OR<6,99);

Вредностите на DAPK беа пониски, во однос на повеќе метилираните RAR β 2, MGMT и Ecadherin, но не беше најдена асоцираност во однос на метилацијата во туморските ткива, меѓу овие гени: со RAR β 2, (Pearson Chi-squ.=1,45 p = 0,2278; CI=95% 0,68<OR<4,70); со Ecadherin-от (Fisher exact test: p = 0,0697; CI = 95% 0,85<OR<10,54) како и со MGM (Pearson Chi-squ.=0,0 p = 1,0 ; CI = 95% 0,36<OR<2,75).

Резултатите на LI¹³¹, покажале дека, хиперметилација на DAPK во OSCC ткивата е 71,69% (38/53), значително зголемена во OSCC, во споредба со нормалната оралната слuzница со (p <0.01), што се совпадна со нашите наоди каде беше потврдена статистички значајна разлика (*Mann-Whitney U Test: Z = 3,186 p = 0,0014*) (табела бр.16 и слика бр.34.) Оваа статистички значајна разлика била најдена и во студијата на Steinmann²⁴⁰ P <0.05, што е многу слична со нашите наоди.

Разликата во метилацијата на DAPK беше многу, статистички значајна и помеѓу примероците од туморското ткиво и ткивото од здравите пациенти (p=0,0000), како и помеѓу примероците од контралатералните нормални ткива и здравите ткива (p=0,0000), наод кои е во ранг на резултатите на Steinmann²⁴⁰, Kulkarni¹²⁰ и Wong²⁶⁸.

Нашите резултати покажува дека епигенетските промена на овој ген се честа појава во OSCC и се ран настан, забележан во нормалната оралната слuzница^{120, 244}. Со ова ја поддржуваме хипотезата на Wong²⁶⁸, за минимална резидуална болест во слuzницата во околината на туморот, која не е потврдена со патохистолошка анализа. Алтернативно, епигенетските влијанија се

појавуваат во почетокот на карциногенезата како резултат на изложеност на карциномот, што резултира со хетерогена структура (поликлоналност на клетките на туморот и околната слузница).

Фактот дека хиперметилацијата ја потврдилме во мултиплекс вгнездени хиперметилации, укажува дека промотор регионот на DAPK, може да биде важен чекор во нарушување на клетките, што доведува до зголемување на клеточната пролиферација во текот на карциногенезата.

Во нашата студија, најуникатен ген, избран од панелот на гени кои покажа највисока специфичност за OSCC, беше **E-cadherin (CDH1)** протеинот, одговорен за клеточната адхезија¹⁰⁵.

Анализата за асоцијацијата во однос на метилацијата помеѓу 5-те гени во туморските ткива, во нашата студија (табела 136), покажа дека, E-cadherin-от е значајно повеќе метилиран во однос на DAPK и p16 (Fisher exact test: $p = 0,0697$; $CI = 95\% 0,85 < OR < 10,54$) и (Fisher exact test: $p = 0,0002$; $CI = 95\% 2,44 < OR < 27,17$), соодветно.

Во ткивните биопсии од нормалното, контралатерално ткиво, резултатите од анализата за асоцијацијата во однос на метилацијата помеѓу 5-те покажа дека, е најдена силна асоцираност помеѓу Ecadherin и DAPK и помеѓу Ecadherin и p16, во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Fisher exact test: $p = 0,00001$; $CI = 95\% 5,11 < OR < 59,88$) и (Fisher exact test: $p = 0,00001$; $CI = 95\% 21,89 < OR < 503,49$);

Вредноста на *E-cadherin* во OSCC и нормалните контралатерални ткива, во однос на истите во здравите ткива, во нашата студија, покажа статистички значајни разлики помеѓу трите групи. Анализата помеѓу трите групи во однос на ECDH (*E-cadherin*), покажа дека хиперметилација на *E-cadherin* гените во OSCC дијагностицираните примероци беше најдена кај 36(90%) пациенти, во контралатералните нормални ткива кај 35(89,7%), а во здравите ткива 0%, односно, немаше метилација. Разликата помеѓу трите испитувани групи во однос на *E-cadherin-om* е статистички значајна (Kruskal-Wallis test: $H = 57,376$ $p = 0,0000$).

Според тоа, вредноста на *E-cadherin-om* во OSCC и нормалните контралатерални ткива, во однос на истиот во здравите ткива, се докажа со сигнификантно повисока инциденца, со што овие гени се покажаа супериорни над другите метилирани гени, во детекција и скрининг на OSCC.

Во обид да ја докажат сигнификантноста на E-cadherin во карциногенезата на OSCC, многу автори утврдиле широк дијапазон на метилација на овој ген во OSCC. Foschini⁶³ според податоците од литературата, нашол дека, позитивноста на метилацијата на E-cadherin се движи од (10%-85%), а за истиот дијапазон на метилација на E-cadherin Viswanathan²⁶⁰, објавил вредности кои се движат од 7% - 66%. Метилацијата на E-cadherin, во нашата студија се покажа како најважна компонента од гените за детекција и скрининг на туморите, чие ниво во ткивните примероци во OSCC изнесуваше 90% (36/40), највисоко ниво на метилација, досега објавено.

Díez-Pérez R.⁵³ во својата студија регистрирал значајно различна (85,4%) во примероците на OSCC, наспроти (33,3%) во нормалните ткива Carvalho A²² го регистрирал нивото на E-cadherin-от во нормалните контралатерални ткива од 30.3% (19.6-42.9), за разлика од туморските ткива со 37.9 % (29.1-47.4) и отсуство на метилација на овој ген кај здравите индивидуи. Feinberg⁵⁹, утврдил ниво на E-cadherin-от од 46%; Shaw²²⁷, (42%); Nagata S¹⁷⁰ (42,9%)

Viswanathan²⁶⁰, (42,9%); Liu¹³⁸ E- забележал 84% во карциномите и во оклното ткиво (54%) Díez-Pérez R.⁵³, (85,4%) во примероците на OSCC и (33,3%) во нормалното ткиво.

Анализата на нашите резултати покажа дека застапеноста на хиперметилацијата на E-cadherin во нашата студија е слично со наодот на Díez-Pérez R.⁵³ (85,4% %) и Liu¹³⁸ (84%), а отстапува од наодите на Maruya¹⁵³ (31%), Carvalho A²² (37.9 %) и Feinberg⁵⁹ (46%).

Само во двете студии на Kulkarni¹²⁰ и Maruya¹⁵³ (31% во нормалните ткива, наспроти 13% во OSCC), за метилацијата на E-cadherin-от, постои интересен податок, кои вели дека, за разликата од другите гени, E-cadherin-от, манифестира повисока инциденца на метилација во хистолошки нормална лигавица отколку во туморските примероци. Овие наоди го исклучуваат овој потенцијален биомаркер во дијагнозата на оралниот карцином, а неговите метилации се препишувале на стареењето и на епигенетската нестабилност, како последица од пушењето, што е спротивно на нашите наоди.

Всушност, разликата во метилирањето на E-cadherin-от, се покажа статистички значајна помеѓу примероците од туморското ткиво и ткивото од здравите пациенти ($p=0,0000$), како и помеѓу примероците од контралатералните нормални ткива и здравите ткива ($p=0,0000$). Разликата во однос на метилирањето на E-cadherin-от помеѓу примероците од туморското ткиво и примероците од контралатералното нормално ткиво не беше статистички значајна (Mann-Whitney U Test: $Z = 0,019$ $p = 0,9843$) (табела бр.14). Истото било потврдено и од страна на Shaw²²⁷, каде промотор метилацијата на E-cadherin-от била значително покачени во туморските ткива, во споредба со нормалната околна лигавица но не нашол значајна разлика, помеѓу овие два параметри ($p = 0,347$) исто како и Kovtunen¹¹⁶ ($p < 0,231$). И Nagata¹⁷⁰, не регистрирала значајна разлика во CDH1 промотор метилација во однос на случаите со OSCC и здравата контролна група.

Нашите податоци покажуваат дека ECAD промотор метилација е со најголема тумор специфичност од сите пет гени во детекцијата на оралниот карцином. Нашите резултати покажуваат дека епигенетските промена на овие гени е чест случај кај оралниот карцином, а е исто толку и ран настан, забележан во нормалната оралната слузница на пациентите. Ова укажува на критичната важност на метилацијата на E-cadherin-от, како епигенетска промена, сигнификантно поврзана со оралната карциногенеза, но и дека се потребни дополнителни студии за поддршка на ова тврдење, кои би потврдиле можни терапевтски цели на овој ген.

Меѓу избраната палета на ДНА метилирани, специфични промотор гени за оралниот карцином, во нашата студија, беше и MGMT генот. Промотор хипер-метилација на MGMT во OSCC е регистрирана во литературата во широк опсег од 12,2- 73,7% и се сметаат меѓу најзначајните гени, поврзани со оралната карциногенезата²¹⁵. Резултатите на нашите анализи, за асоцијацијата во однос на метилацијата помеѓу MGMT и 5-те гени во туморското ткиво (табела 116) покажа дека: постои значајна асоцираност помеѓу MGMT и CDKN2A1 и RAR β 2 во однос на метилацијата во туморското ткиво (Pearson Chi-squ.=4,38 $p = 0,0363$; CI=95% 1,05<OR<6,99), исто како и во наодите на (Kato¹⁰³; Kordi-Tamandani¹¹⁴; Taioli и Ragin²⁴⁷ и Santoro²¹⁵).

Несоодветната промотор хиперметилација на MGMT гените во нашата студија, беше анализирана помеѓу трите групи во однос на MGMT, а

результатите покажаа дека хиперметилација на овие гени во OSCC дијагностицираните примероци беше најдена кај 30/40 (75%) пациенти, во контралатералните нормални ткива кај 29 (74,4%), а во здравите ткива кај 1(5%) лице. Со овие наоди, потврдивме дека разликата помеѓу трите испитувани групи во однос на MGMT е статистички значајна (Kruskal-Wallis test: $H = 32,134$ $p = 0,0000$). Ова е потврдено и во студијата на Rettori²⁰², кои регистрирал силна поврзаност помеѓу хиперметилационниот модел на трите групи на пациенти.

Нашиот наоди за метилациите на MGMT, во туморското ткиво, се во согласност со наодите на високо објавените проценти на метилации за овој ген, како во наодите на: Nagata¹⁷¹ од 73,7% во OSCC; Kordi-Tamandani¹¹⁴ од 73,7%; и Santoro²¹⁵ 71%; Bhatia¹³ од 76%; Puri¹⁹² со 65%.

Компарирано со наодите од другите автори, нашите добиени резултати не спаѓаат во пониско објавените инциденци што се најдени во студиите на Taioli и Ragin²⁴⁷ од 29,6% во OSCC и 11,5% во контралатералните, нормални ткива; во студијата на Yong-Kie²⁸⁰, каде хиперметилација на MGMT во OSCC била 31,3%, во контралатерални ткива 25%, во здрави индивидуи 0%; во студијата на Viswanathan²⁶⁰, несоодветната хиперметилационна инциденца беше 41% и Rosas²⁰⁸, во 23%.

Средни вредности за метилацијата на MGMT, кои беа пониски од нашите наоди, беа објавени во истражувањата на: Kato¹⁰³ -56,4% за OSCC и 68,18% во контралатералното нормално ткиво; Wong²⁶⁷, објавил фреквенции на промотор хиперметилацијата на MGMT во ткивата на OSCC биле 45,3%/versus 31,3%, во нормалните ткива. Kulkarni¹²⁰, со 51,7% versus 26,7%.

Само Maruya¹⁵³, во својата студија објавила дека нивото на метилација на MGMT во туморите било 0% за разлика од хистолошки нормалната лигавица која исто покажала ниско ниво на метилација од 3%, а високите наоди во останатите студии, ги објаснила со историјата на пушење, особено во индиската популација^{120,260}, што не беше случај и во нашата студија. Hall⁸¹ и Carvalho²², регистрирале почести метилации во околните, нормални ткива 40,6% и 56%, за разлика од туморските 31,3% и 44%, соодветно. Метилација на MGMT не беше регистрирана во здравата орална слузница во сите истражувања, што беше потврдено и во нашата студија.

Во нашето истражување, беше утврдено дека разликата во метилирањето на MGMT е статистички значајна помеѓу примероците од туморското ткиво и ткивото од здравите пациенти ($p=0,000011$), како и помеѓу примероците од контралатералните нормални ткива и здравите ткива ($p=0,000015$). Разликата во однос на метилирањето на MGMT помеѓу примероците од туморското ткиво и примероците од контралатералното нормално ткиво не е статистички значајна (Mann-Whitney U Test: $Z = 0,049$ $p = 0,9608$) (табела бр.15.). Споредено со останатите податоци од литературата, нашите наоди се во ранг на наодите на Bhatia¹³, Kordi-Tamandani¹¹⁴ кој регистрирал значајни разлики меѓу туморското и здравото ткиво ($P = 0,027$), Bhatia¹³ ($p = 0,0379$), Yong²⁸⁰ ($P < 0,05$), Nagata Satoshi¹⁷⁰ ($p = 0,027$).

Martone¹⁵², регистрирала дека оваа асоцијација била ($p = 0,54$), што се разликува од нашите наоди каде не беше најдена статистички значајна разлика во метилацијата на MGMT помеѓу примероците од туморското ткиво и примероците од контралатералното нормално ткиво (Mann-Whitney U Test: $Z = 0,049$ $p = 0,9608$)

Во студијата на de Schutter⁴⁸, анализираниите MGMT генски метилации, покажале повисока метилационна стапки, од сите други гени, а во нашата студија приоритетот беше докажан за Ecadherin-от со 90%.

Нашата студија регистрира висока фреквенција на хиперметилации на MGMT во туморските ткива и клинички нормални ткива, што ја објаснува нивната значајна улога во индицирање на молекуларната патологија, односно епигенетските аберации и релативно повисокиот ризик од прогресија кон малигни промени. Оваа метилационна нестабилност во нормалната лигавица и отсуството на истата во здравата, укажува дека хиперметилацијата е важен настан и најверојатно рано случување во оралната карциногенеза, поврзано со нејзината прогресија, а исто така може да биде корисна во рано откривање на карциномите.

Потребни се дополнителни скрининг студии на општата популација, за поддршка на ова хипотеза, за да се процени неговата применливост како дијагностичка метода за молекуларната процена на овој ген во дијагностички, прогностички и терапевтски цели^{103,120}.

Нашата студија, успешно ги идентификува промотор метилациите и во RAR β гените и најде нивна сигнификантна асоцираност со процесот на карциногенезата. За RAR β гените, процентот на метилација, варира во карактеристичен модел, кој е репродуциран во туморските и контралатералните, нормални примероци, во однос на здравите субјекти.

Резултатите од анализата помеѓу трите групи во однос на RAR β гените, во нашата студија, покажаа дека хиперметилација на овие гени во OSCC дијагностицираните примероци беше најдена кај 25(62,5%) пациенти, во контралатералните нормални ткива кај 34/40 (87,2%), а во здравите ткива немаше метилација. Разликата помеѓу трите испитувани групи во однос на RAR β е статистички значајна (Kruskal-Wallis test: $H = 37,117$ $p = 0,0000$).

Во консултираната литература, застапеноста на RAR β во туморските ткива е со фреквенција од 47- 73%. Нашите резултати се конзистентни со наодите на речиси сите нивоа на метилации прикажани во студиите на Steinman²⁴⁰ (65%) во туморите, наспроти 50% во нормалното ткиво; во студијата на Mascolo¹⁵⁴ фреквенциите беа 67%, versus 47%; Shaw²²⁷ и Viswanathan²⁶⁰ утврдиле најчести CpG метилација на промотор генот на RAR β во туморските примероци во 73%, Youssef²⁸¹, регистрирал 66%, Mariya¹⁵³, регистрирала 47% метилирани RAR β во туморските примероци, а во нормалните ткива 50%; Youssef²⁸¹, 62%, во нормалното, околно ткиво а 53% во карциномите. Santoro²¹⁵ 66%.

Компарирано со наодите од други автори, овој наш наод не се совпадна само со студијата на Hasegawa⁸², со најниско објавени метилации, од 45% за RAR β во OSCC.

Нашите податоци, 34/40 (87,2%) за метилираните RAR β во нормалните примероци, во однос на 62,5% во туморските ткива, покажаа силна поддршка на постоечката теорија, дека промотор метилацијата на RAR β , широко распространета во навидум нормалните ткива и е почеток на карциногенезата. Метилацијата на RAR β гените во нормалната, контралатерална слузница, манифестираа почести метилации, што укажа на поддршката на критичното вклучување на метилацијата на RAR β гените во раната фаза на туморигенезата.

Разликата во метилирањето на RAR β 2, во нашето истражување, покажа дека е статистички значајна помеѓу примероците од туморското ткиво и ткивото од здравите пациенти ($p=0,0000$), како и помеѓу примероците од контралатералните нормални ткива и здравите ткива ($p=0,0000$). Во однос на метилирањето на RARB2, помеѓу примероците од туморското ткиво и примероците од контралатералното нормално ткиво, истотака беше потврдена статистички значајна разлика (Mann-Whitney U Test: $Z = -2,506$ $p = 0,0122$) (табела бр.17.)

Нашето истражување за разликата која се регистрира помеѓу примероците од туморското ткиво и ткивото од здравите пациенти, споредени со податоците од другите истражувања, покажа дека е во ранг на наодите на Santoro²¹⁵, кој забележал значајна разлика ($p < 0,0001$) во корист на туморските ткива; во студијата на Wong²⁶⁸ оваа сигнификантна разлика била ($p < 0,0003$); Youssef²⁸¹ ($p = 0.002$) Нашиот наод не се совпадна само со наодите на Shaw²²⁷, кој нагласил дека промотор метилациите не била значително зголемена во туморозното ткиво во споредба со здравото ткиво за RAR β 2 ($P = 0.088$).

Тоа значи дека RAR β 2, се широко распространети во нормалните и туморските ткива, со значајна статистичка зависност, а се неметилирани во здравите ткива 0%, што повторно ја потврдува неговата улога и критична инволвираност во раната фаза на *развојната карциногенеза*. Во нашата студија, метилацијонното профилирање, јасно ја покажа сегрегираниот шема на здравите од туморските примероци, што е во согласност со претходно пријавените податоци.

Со цел да ја потврдиме врската помеѓу метилациониот статус на RAR β 2 гените, со останатите гени (covariates) и значајност на разлики во однос на метилацијата помеѓу 5-те гени во туморското ткиво и присуството на карциномот (response variable), со логистичката регресија, добивме дека постои асоцираност помеѓу ECDH и RAR β 2, во однос на метилацијата во туморското ткиво (Fisher exact test: $p = 0,0038$; CI = 95% 1,60<OR<18,20).

Оваа корелација во нормалните ткива, покажала асоцираност помеѓу RARB2 и P16(CDKN2A1), во однос на метилацијата во нормалното ткиво од контралатерална страна (Fisher exact test: $p=0,000001$; CI=95% 18,09<OR<367,96), наоди кои беа конзистентни со наодите на Shaw²²⁸ кој утврдил значајна корелација, помеѓу метилацијата на RAR β , со P16 ($p = 0,29$, ранг $P = 0,01$ Spearman).

Оваа очигледна меѓузависност на промотор метилацијата на гените, неодамна била опишана како "сложена метилација, а подоцна била потврдена со (χ^2 : 12.8 со 5 df, $P = 0,03$ користење на метилационна стапка > 5%, за секој ген, со цел да се изведе очекуваниот број на метилации, како независни вредности).

Анализата на добиените податоци, во нашата студија, за метилацијата во сите три групи на биоптични материјали, сугерираат дека епигенетскиот механизам на аберантни метилации на гените се појавуваат рано во карциногенезата на OSCC и играат клучна улога во настанувањето на оралниот карцином, Asokan⁵. Во овој процес секој ген има своја улога, прикажана во високо тумор специфичен модел, соодветно за секој ген.

Нашата анализа на промотор метилацијата откри вредни квантитативните податоци за ДНК метилацијата. Гените избрани во нашата студија, се покажаа дека се строго специфични и обезбедија доказ за

концептот на молекуларните промени, кои се здобиваат за време на малигната трансформацијата. При идентификацијата на DNA метилационниот статус во промотор регионот на **p16, MGMT, DAP-K и E-cadherin, RARB** гените, забележавме широк спектар на CpG метилациони модели, кои демонстрираа динамичниот опсег и статистички значајни диференцијални метилационни разлика помеѓу туморот и нормалното, контралатерално ткиво, во однос на примероците од здраво ткиво за сите гени одделно

Она што произлегува од критички осврт на податоците во нашата студија е дека метилационниот статус на промотори се чини дека не е валиден параметар за да се предвиди онкопротеинската експресија. Од друга страна, значително честите метилационни профили, во трите групи на примероци, не можат да се занемарат. Материјалната страна на оваа студија, во однос на вклучување на поголема група на испитаници, ја лимитира нашата студија за добивање на поспецифични, зависни и вредносни параметри, во корелација помеѓу сите варијабли. Во нашето истражување, потврдивме дека, хиперметилациите во тумор супресорните гени во оралната слузница се јавуваат како предупредување, вклучувања во почетокот на малигната трансформација, како некој вид на „молекуларни отпечатоци“ кои доведуваат до зголемување на клеточната пролиферација во почетокот на карциногенезата, кои можат да бидат многу корисни во дијагнозата на оралниот карцином.

Делумно метилациите забележани во нашата студија, можеби и се поврзани со гаметниот прв „удар-хит“. Врз основа на овој модел, епигенетскиот прв „хит“ ќе го деактивира едениот алел на двата гени во сите клетки. Делумно метилираните клетки тогаш би можеле да се здобијат со соматскиот втор „удар-хит“ и почеток во прогресијата на карцином.

Подобро разбирање на оваа епигенетската промена не само што би можело да помогне во дијагнозата и прогнозата на OSCC, но исто така може да отвори нови терапевтски пристапи. Присуството на метилација во одредени тумор супресорните гени ја менува нивната функција и контролата на клеточниот циклус, па пациентите може да имаат зголемен ризик за развој на карцином и повисок степен на малигнитет.

Хиперметилационното профилирање е скапа процедура, која иако во моментов ретко се практикува, а анализирана со прецизна техничка чувствителност, која бара многу стандардизации, би имала одличен потенцијал како биомаркер во иднина.

Поради екстензивноста на материјалот и големиот број на податоци, сублимирани резултатите од првата цел покажаа:

Вкупно во OSCC биоптичните примероци, беа метилирани M+142/200 (71%) а неметилирани вкупно- M 58/200(29%). Најчесто метилирани гени во туморските примероци беа E-cadherin 36/40(90%), MGMT 30/40(75%), DAPK 30/40(75%), потоа следеше RAR β 25/40(62,5%) , а најретко метилирани беа промоторите на p16 гените 21/40(52,5%). Во нивото на метилација на 5^{те} (M+) гени, помеѓу примероците од туморското 142/200(71%) ткиво и здравите примероци 1/20(5%) беше најдена статистички значајна разлика од $p = 0,000001$.

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

Во туморските примероци, во комбинација, 3 најмногу метилирани гени беа E-cadherin (90%) MGMT (75%) и DAPK 75% и вкупната нивна метилација изнесуваше 80%, со сензитивност од 80% и специфичност од 98,3%. Тоа значи дека овие три гени заедно, во 80% од случаите го детектираат туморското ткиво (вистина позитивното), а во 98,3%. Позитивната предиктивна вредност за трите гени заедно изнесува 98,9% што значи дека со толкава веројатност ја потврдуваат оралната туморогенеза. Комбинацијата од 2 гени - E-cadherin (90%) и MGMT (75%), имаат позитивна предиктивна вредност, односно, сигурност во дијагнозата на OSCC од 98,35%. Сензитивност на комбинацијата од овие два гена изнесува 82,5% и специфичност- 87,5%.

Воопшто, DNA хиперметилационните модели беа конзистентни низ здрави примероци, но променливи во туморите и нормалните контралатералните примероци, што ја нагласи туморската хетерогеност и ја потврди улогата на ДНА метилацијата на 5-те зададени гени во туморските ткива, како клучен и непобитен фактор во оралната карциногенеза.

Вкупно во нормалните, контралатерални биоптични примероци, беа метилирани (M+) 114/195(58,5%) гени .Најчесто метилирани гени беа E-cadherin 35/39(89,7%), RARB2 34/39(87,2%), MGMT 29/39(74,4%), потоа следеше DAPK 13/39(33,3%), а најретко метилирани беа промоторите на CDKN2A1(p16) гените 3/39(7,7%). Неметилирани гени беа најдени вкупно 81/195(41,5%).

Во контралатералните здрави биоптични примероци, во комбинација, 3 најмногу метилирани гени беа E-cadherin (89,7%), RARB2 (87,2%) и MGMT (74,4%), при што вкупната нивна метилација изнесуваше 83,8%, со сензитивност од 83,8% и специфичност од 98,3%. Тоа значи дека овие три гени заедно, во 83,8% од случаите го детектираат раниот настан во карциногенезата на OSCC (вистина позитивното), а во 98,3% од случаите не метилираат во здраво ткиво, односно, го детектираат вистина здравото ткиво. Позитивната предиктивна вредност за трите гени заедно изнесува 98,9% што значи дека со толкава веројатност ја потврдуваат аберантната метилација на гените , во раното појавување(иницијација во карциногенезата на OSCC и играат клучна улога во настанувањето на оралниот карцином.

Во однос на здравите ткива, специфичноста беше многу висока (95% - 100%) за сите пет гени, што значи дека сите зададени гени (-M) со сигурност од 95% до 100% ги дијагностицираат вистина негативните, односно здравите лица.

Во оралната карциногенеза, секој ген има своја улога, прикажана во високо тумор специфичен модел, соодветно за секој ген.

Податоци за метилираните p16, во нашата студија, покажаа дека p16 е вклучен во доцната патогенеза, веројатно во прогресијата и покажува високо тумор специфичен модел за транзицијата и малигна трансформација на клетките на OSCC. Исто така нискиот процент на метилацијата во нормалната лигавица (7,7%) и нејзиното отсуство во здравите ткива(0%), зборува дека не е вклучен во иницирање на туморогенезата како глобален ефект врз целата усна лигавица.

Нашите резултати покажува дека епигенетските промена на DAPK гените се многу честа појава во OSCC и е ран настан, забележан во нормалната оралната слузница. Со ова ја поддржуваме хипотезата за резидуална болест во слузницата во околината на туморот, која не е потврдена со патохистолошка анализа.

ECAD промотор метилација, во нашата студија, покажа најголема тумор специфичност и во туморските и соодветните контралатерални ткива, од сите пет гени во детекцијата на оралниот карцином. Нашите резултати покажаа дека епигенетските промена на овие гени е најчест случај во оралниот карцином, а е исто толку и ран настан, забележан во нормалната оралната слузница на пациентите.

Нашата студија покажа висока фреквенција на хиперметилации на MGMT во туморските ткива и клинички нормални ткива. Оваа метилационна нестабилност во нормалната лигавица и отсуството на истата во здравата, укажува дека хиперметилацијата е важен настан и најверојатно рано случување во оралната карциногенеза.

RAR β 2, се широко распространети во нормалните и туморските ткива, со значајна статистичка зависност, а се неметилирани во здравите ткива 0%, што ја потврди неговата улога и критична инволвираност во раната фаза и развојната карциногенеза.

➤ Откривање и евалуацијата на несоодветната ген промотор метилација во нормалните и патолошките биолошки процеси и нејзината употреба како прогностички маркери за OSCC, се предмет на истражување во голем број на студии. Затоа, тргнавме од претпоставката дека, резултатите за епигенетските метилационни промени- анализи засновани на профилот на метилација на гените во комбинација со клинички-патолошките наод ќе бидат корисни во разбирањето на етиопатогенезата, развојот, инвазијата, и прогресијата (метастазирањето) на OSCC низ стадиумите на болеста. Нивоата на метилација на сите гени во туморските ткива, покажа специфична конзистентност и засебна зависност и важност во прогресијата на оралниот карцином, па затоа сите гени беа евалуирани и корелирани со клиничко-патолошките наоди Arantes³, Yong-Kie Won²⁸⁰, Maruya¹⁵³, Dong Y⁵⁵, Mielcarek-Kuchta¹⁶².

По евалуацијата на клиничките и патохистолошките параметри, сите предложени гени за DNA метилацијата, во туморските биоптични материјали (n=40), беа корелирани со: пол, возраст, локализација, (pT), N статус (pN), TNM стадиум и степен на клеточна диференцијација (G).

Во нашата студија, најголем процент на испитаниците со орален карцином, беа со локализација на јазик – 57,5%, најзастапена возрасна група е од 60 до 69 години – 47,5%, во раната фаза (T1 и T2) – 62,5%, N0 – 47,5%, stage III и IV – 67,5% и со најчеста клеточна диференцијација во G3 стадиумот- 57,5%.

Добиените резултати од анализирата на промотор метилацијата на p16, *Ecadherin*, DAPK, MGMT и RAR β 2, во туморските ткивни примероци, во корелација со полот, во нашата студија не покажаа значајна разлика (p = 1.000), поради значајна поголема застапеност на машкиот пол, во однос на жените, помеѓу испитаниците.

Во нашата студија, не беше утврдена статистички сигнификантна асоцијација помеѓу метилациите на *Ecadherin*, *DAPK*, *MGMT* и *p16*, и **возраста**. Корелацијата беше незначително сигнификантна само во однос на RAR β_2 , со статистички значајна разлика ($p = 0,045$), со најголема инциденца, регистрирани кај возрасната група од 60 до 69 год. Од консултираната литература, само Hasegawa⁸² прикажала значителна асоцијација на метилации те со возраста и тоа за *p16* генот ($p < 0.03$) Khor¹⁰⁷, со значајна разлика ($p = 0.050$) за *MGMT*.

Во однос на локализацијата, во нашата студија беа застапени најчести локализации на јазикот 57,5%, но не најдовме статистички значајна разлика помеѓу локализацијата на оралните карциноми и метилираните гени. Овие наоди се конзистентни со наодите на речиси сите други студии, а се разликуваат од студиите на Dong Y⁵⁵, каде фреквенцијата на *p16* била најчеста во букалната слузница со 63.3%, со значајна разлика ($p = 0.004$) и во студијата на Khor¹⁰⁷, кој регистрирал статистички значајна разлика за локализацијата на образот и јазикот ($p = 0.001$).

Нивоата на метилација на сите гени во туморските ткива, покажа специфична конзистентност и засебна зависност и важност во прогресијата на оралниот карцином, па затоа сите гени беа евалуирани засебно и корелирани со клиничко-патолошките наоди^{3, 280, 55, 153, 162} и други.

❖ Во нашето истражување, резултатите добиени со Pearson - овиот χ^2 – тест покажаа дека, не постои асоцираност /корелација помеѓу DNA метилацијата на *p16(CDKN2A1)* и локализацијата. Исто така, регистрираната асоцијација помеѓу големината на примарниот тумор *pT* (Pearson χ^2 $\text{sq.} = 0,10$ $p = 0,9348$), и *N* статусот (Pearson χ^2 $\text{sq.} = 0,38$ $p = 0,5365$), во однос на метилацијата на *p16* промоторот, не се покажа статистички сигнификантна (Табела бр. 21 и 22). Потврдивме, дека нема асоцираност/корелација помеѓу метилацијата на *p16* и големината на туморот (*pT*) и појавата на вратни метастази, *N* статусот (*pN*), кај пациентите со OSCC.

Овој наш наод е во согласност со наодите на 2011; Wong²⁶⁹, кој објавил зголемување на стапката на метастазирање кај 77,8%, за разлика од 63% кај неметастазираните тумори (*pN*- статусот), но не можел да воспостави статистички значајна разлика, помеѓу овие два параметри (за *p16* и *pN*). И Maruya¹⁵³, објавила дека *p16* е малку веројатно дека е поврзан со појавата на вратните метастази (*N*- статусот). Останатите автори Rosas²⁰⁸; Khor¹⁰⁷; Huang⁸⁸; Hasegawa⁸², не регистрирале корелација за овие два параметри.

Спротивни на нашите наоди, се студиите на Ishida⁹⁴ и Shaw²²⁶, кои објавиле значајна асоцијација помеѓу хиперметилацијата на *p16* промоторот и метастазирањето во вратните лимфни јазли и регистрирале дека овој ген бил почесто метилиран во метастатските OSCCs отколку во не-метастатските тумори. И Kaur¹⁰⁴, во својата студија објавила дека хиперметилацијата на *p16* е асоцирана само со регионалното метастазирање во лимфните јазли (*pN*), а не е поврзана со диференцијацијата *G* и големината на туморот (*pT*).

Во однос на метилациониот статус на *p16* и големината на примарниот тумор (*pT*), нашите наоди се во ранг на студиите на Shaw²²⁶, Maruya¹⁵³, Kulkarni¹²⁰, Viswanathan²⁶⁰, Hall⁸¹ и Campo- Трагеро²⁰, а се спротивни на наоди Sailasree²¹³, Dong⁵⁵ и Ogi¹⁸⁰, покажале директна корелација и значително поврзаност со *T*- статусот (*T3-T4*) ($p = 0,049$) ($p = 0.01$), соодветно. Пациентите

со примарен орален карцином имале значително лоша прогноза и намалена стапка на преживување.

Во однос на TNM (I,II,III,IV) стадиумот, во нашата студија утврдивме, дека постои статистички сигнификантна асоцијација со метилацијата на p16 (Fisher exact test: $p = 0,0116$). Асоцираноста помеѓу метилацијата на p16 и TNM стадиумот на болеста, во раните (I,II-23,1%) и напредните (66,7%- III, IV) стадиуми, регистриравме дека е статистички сигнификантна. Консултирајќи ја литературата, најдовме дека овој наш наод е во ранг на наодите на Hall⁸¹, Grønbaek⁷⁹, Ogi¹⁸⁰, Maruya¹⁵⁵, кои не регистрирале значајна корелација помеѓу метилациониот статус на p16 генот и клиничко-патохистолошките параметри, вклучувајќи возраст, локализација, и хистолошка диференцијација, туку нашле дека метилацијата на p16 промоторот, била сигнификантна со прогресија на туморот (II / III наспроти IV стадиум, $P = 0,068$), како и во нашата студија. Значи, метилацијата на p16 е значаен показател за и прогресијата и развојот и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза кај OSCC, (OR = 0,15 CI=95% 0,032<OR<0,684). (табела бр.23).

Истотака, во нашата студија потврдивме, статистички сигнификантна асоцијација помеѓу метилацијата на p16 и клеточната диференцијација (G1,G2 и G3) (Pearson chi squ.=6,32 $p = 0,0119$). Пациентите со лоша клеточна диференцијација (G3) имаа 69,6% метилирани, а пациентите со добра и умерена диференцијација на туморот (G1 и G2- 42,5%) имаа 29,4% метилирани p16 гени. Тоа уште еднаш ја потврди метилацијата на p16 како значаен предиктор за развојот и прогресијата на OSCC и укажа на зголемен ризик за неповолна прогноза кај заболениите. (OR = 0,182 CI=95% 0,046<OR<0,717) (табела бр.24).

Нашите наоди укажуваат на фактот дека метилацијата на p16 промотор регионот, предизвикува губење на неговата тумор супресивна функцијата во текот на развојот и прогресијата на туморите. Со ова потврдивме дека, предиктивната прогностичка вредноста на p16 во развојот и прогресијата, во однос на напредните TNM и G стадиумот, се покажа статистички значајна т.е. метилациите на p16 [OR = 0,182 CI=95% 0,046<OR<0,717], сигнификантно го зголемија ризикот за прогресија во касните стадиуми TNM (III-IV) и G3 стадиум, во однос на раниот стадиум (I-II) и G1-2.

Нашата студија е во согласност со студиите на Grønbaek⁷⁹ и Ogi¹⁸⁰, кои регистрирале силни зависност помеѓу хиперметилацијата на p16 и зголемувањето на прогресијата на болеста, со почести фреквенции и застапеност кај умерено и лошо диференцираните тумори (G2 и G3) во споредба со добро диференцирани (G1), како и во повеќе инвазивните карциноми. TNM (III и IV) во споредба со помалку инвазивните (I и II). Во овој контекст и Dong⁵⁵, потврдил дека p16 метилацијата била значајно поврзана со големината на туморот T ($p = 0,01$), со диференцијација ($p = 0,006$), но нашол асоцираност и со метастазирањето ($p = 0,027$).

Campro- Trapego²⁰, иако објавил високи метилации на p16 кај 76% во OSCC, тој не нашол значајна корелација со ниеден клиничко-патолошки параметар, ниту со прогнозата. Истите наоди, биле потврдени и од страна на група на автори (Shaw²²⁷; Rosas²⁰⁸; Khor¹⁰⁷; Huang⁸⁸; Hasegawa⁸²; Hall⁸¹; Kulkarni¹²⁰ и Viswanathan²⁶⁰ $p>0,05$).

Нашата студија го покажала ефектот на p16 метилација и неговата поврзаност со напредни OSCC и клеточната диференцијација. Истото е

објавени и од страна на неколку последни проспективни студии, кои објавија дека p16 хиперметилацијата е значително зголемена во напредниот и терминалниот T3-T4 стадиум т.е. повисока стапка во развојот и прогресијата на OSC. Овие наоди потврдуваат дека метилација во тумор супресорните гени го потврдуваат растот на клетката кои придонесуваат во процесот на туморогенезата и прогресијата на карциномите

p16 генот има важна улога во развојот и прогресијата на оралниот карцином и можеби е добар показател за агресивното клинички однесување на туморите. Сепак, овие заклучоци не се докрај разјаснети поради малиот примерок на примероци и финансиската ограниченост, но можат да дадат свој придонес при утврдувањето на p16 промотор метилација како потенцијален биомаркер и независен прогностички фактор.

❖ По направениот скрининг и идентификација на значајните клиничко-патохистолошки параметри, проучувани диференцијално во однос на хиперметилацијата на **E-cadherin**-от, во нашата студија утврдивме дека:

Не беше најдена корелација помеѓу метилацијата на E-cadherin-от и полот, локализацијата и возраста на нашите испитаници.

Во однос на дистрибуцијата според големината на примарниот тумор, од вкупно 25 со (pT1 и pT2), 21(84%) покажаа метилација, додека кај останатите 15 OSCC примероци со (pT3 и pT4) сите 100% Ecadherin (ECDH) гени, беа метилирани. Овој наод покажа дека непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на Ecadherin-от и големината на примарниот тумор (Fisher exact test: $p = 0,1384$). Исти наоди како нашите, во однос на големината на примарниот тумор, нотирале и Huber⁸⁹ ($p = 0,252$), Vered²⁵⁹ и Khor¹⁰⁷ ($p > .0,05$), а спротивни на нашите наоди беа студиите на Maruya¹⁵⁴, која регистрирала статистички значајна разлика за (T2 / T3 наспроти T4, $P = 0,068$); Foschini⁶³ и Hasegawa⁸², навеле дека E-cadherin има висока предиктивна вредност во развојот на туморите, во однос на pT.

Во однос на дијагностицираните вратни метастатски промени pN, во нашата студија, pN0 беше најден кај 19(47,5%) лица. Кај 16 (84,2%) од нив имаше метилација на Ecadherin-от во туморското ткиво. Со pN1, pN2 и pN3 имаше вкупно 21 пациент, од кои метилација на генот Ecadherin-от имаа 20(95,2%) лица. Со ова потврдивме дека нема социраност/корелација помеѓу DNA метилацијата на Ecadherin-от и појавата на вратни метастази pN (Fisher exact test: $p = 0,2651$). (табела бр.27).

Нашиот наод е во ранг на наодите на Kaur¹⁰⁴, Vered²⁵⁹, Khor¹⁰⁷ и Huber⁸⁹, кои во своите ретроспективни студии, нотирале дека, не нашле корелација помеѓу метастазите во регионалните лимфни јазли и ECAD ($p=1.000$). Најобесхрабрувачка студија за вредноста на Ecadherin-от, објавил Shaw 2006²²⁷, чиј податоци покажуваат дека ECAD промотор метилација е најмалку тумор специфичен ген, од петте испитувани гени ($P = 0,347$) за OSCC, за кои нашол дека, постои слаба корелација помеѓу ECAD и метастатскиот потенцијал pN фазата. Ова е спротивно на податоци кои го имплицираат овој протеин, силно корелиран со развојот на инвазивниот фенотип во OSCC и го поврзуваат со метастазите во лимфните јазли, како што е објавено во студиите на Magić²⁴⁴, Díez-Pérez⁵³, Feinberg A⁵⁹, Mehendiratta¹⁵⁶, Campo-

Траперо²⁰, со што се зголемува прогресијата на болеста. Ова го потврдил и Mascolo¹⁵⁴, кои после употреба на многуваријантни анализи ($OR = 3,55$, $95\% CI: 1,450-8,694$, $P = 0,006$), потврдил дека, E-cadherin е строго поврзано со промени во клучните клеточните функции, појава на метастази и со зголемената агресивност на OSCC. Овие наоди се подржани и од Foschini⁶³ и Kovtunen¹¹⁶, кои нашле силна корелација со метастазирањето во регионалните лимфни јазли ($p < 0,003$), но ние не добивме таква зависност.

Во нашата студија во однос на TNM стадиумот, во I и II стадиум на болеста беа потврдени (69,2%) со позитивна метилација на ECDH. Сите останати во III и IV стадиум на болеста (100%), имаа позитивни метилации на овој ген. Со овие резултати потврдивме дека постои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на Ecadherin-от и стадиумот на болеста (Fisher exact test: $p = 0,0078$). Значи, метилацијата на Ecadherin-от е значаен предиктивен фактор, показател за прогресијата и развојот и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза за болните ($OR = 0,38$ $CI=95\%$ $0,019 < OR < 0,781$). (табела бр.28).

Овие наши резултати се подржани од страна на Di Domenico M⁵², Foschini⁶³, Maruya¹⁵³, Magić²⁴⁴, Gao⁶⁷ и Huber⁸⁹, кои пријавиле сигнификантни вредности ($p = 0,018$) за корелацијата на E-cadherin-от и метастазирањето. Спротивно на нашите наоди и претходно наведените, беа наодите на Kaur¹⁰⁴, Vered²⁵⁹ и Khor¹⁰⁷. Речиси идентичен наод со резултатите добиени во нашата студија, објавил Huber⁸⁹, кои регистрирал дека диференцијацијата на клетките и патохистолошкиот стадиум, покажале сигнификантна вредност со ($p = 0,018$) за E-cadherin. Нашите наоди ја потврдија високата предиктивна вредност на E-cadherin, карактеристична за туморите во касните стадиуми, со поагресивно однесување кои се поврзани со прогресијата на карциномите. Значи E-cadherin-от, придонесува во напредокот и можеби е предводник за лоша прогноза, развој и инвазивен фенотип во OSCC.

Во однос на клеточната диференцијација, 42,5% од пациентите, имаа добра и средна диференцијација (G1 и G2 стадиумот), од кои (76,4%) имаа хиперметилација на Ecadherin-от. Кај сите 100% испитаниците со слаба диференцијација на туморот (G3) беа регистрирана метилацијата на генот. Анализата покажа дека постои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на Ecadherin-от и клеточната диференцијација на примарниот тумор кај нашите испитаници (Fisher exact test: $p = 0,0260$). Тоа уште еднаш ја потврдува метилацијата на Ecadherin-от како значаен предиктор за развојот и прогресијата на OSCC и укажува на зголемен ризик за неповолна прогноза кај заболениите. ($OR = 0,063$ $CI=95\%$ $0,032 < OR < 0,788$) (табела бр.29). Повеќето автори ги потврдија нашите резултати, Kovtunen¹¹⁶, Mahomed¹⁴⁶, Kaur¹⁰⁴ и Mehendiratta¹⁵⁵, со многу сигнификантни асоцијации ($p = 0,018$) па дури и ($p < 0,0001$) помеѓу E-cadherin и конвенционалниот Broders стеининг. Нашите наоди се спротивни на наодите на Kaur¹⁰⁴, Vered²⁵⁹ и Khor¹⁰⁷, кои не нашле статистички значајни разлики меѓу метилациите на E-cadherin-от и метастазирањето во регионалните лимфни јазли.

Во нашето истражување, предиктивната прогностичка вредноста на Ecadherin во развојот и прогресијата туморите, се покажаа статистички значајна, во однос на **TNM и G стадиумот**, т.е во касните стадиуми **TNM (III-IV)** и напредните стадиуми на клеточна диференцијација **G3**. **Постоењето на метилација на Ecadherin ($OR = 0,38$ $CI=95\%$ $0,019 < OR < 0,781$) сигнификантно го зголемува ризикот за прогресијата и**

развојот во напреднатите стадиуми кај оралот карцином во однос на раните стадиуми (I-II) и G1-2. Метилацијата на E-cadherin –от, ја потврдивме, како важен прогностички фактор и потенцијален биомаркер во развојот и прогресијата на туморите предводени од лошата диференцијација и прогресијата во инвазивните напредни стадиуми на OSCC.

Потребни се дополнителни поголеми студии за понатаму да се истражат патишта на соматски инактивации, кои доведуваат до развој и прогресијата и завршуваат со малиген фенотип. Во иднина, со комбинација на ECAD –молекуларните и хистоморфолошките параметри, можеби ќе се групираат пациентите според ризикот за лош исход.

❖ Резултатите од анализата на метилацијата на **MGMT** во OSCC во однос на: pT, pN, TNM и клеточната диференцијација G- стадиум покажаа дека:

Дистрибуцијата на испитаниците, според големината на примарниот тумор, покажа дека од вкупно 25(60,2%) во pT1 и pT2- фазата, метилација имаше кај 19(76%) лице, додека од 15 пациентите со pT3 и pT4 метилација на MGMT беше нотирана кај 11(73,3%) лица. Со овие наоди и со (Fisher exact test: $p = 0,5680$), потврдивме дека, непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на MGMT и големината на примарниот тумор кај нашите испитаници (табела бр.29). Наодите за непостоење на корелација помеѓу големината на туморот и метилацијата на MGMT во нашето истражување е многу блиска со наодите на една мала група на истражувачи Hall⁸¹, Khor¹⁰⁷ и Wong²⁶⁹, според кои клиничките податоци добиени за фреквенциите на метилација на MGMT ген промоторот, не се разликуваат во различните pT – фази на туморите ($p > 0.05$).

Спротивни на нашите наоди се наодите на Maruya¹⁵³, која објавила дека сепак, метилацијата на MGMT, може да е поврзана со прогресија на туморот (T2 / T3 наспроти T4, $P = 0,068$) и наодите на Hasegawa M⁸², која исто така открила поврзаност со T статус ($OR = 2.7$, $p < 0.05$), кај овие гени.

Во однос на вратниот статус во (pN0)- фазата без метастатски промени во вратните лимфни јазли, беа дијагностицирани 19 (47,5%) лица, од кои кај 15(78,9%) имаше метилација на MGMT во туморското ткиво. Со pN1, pN2 и pN3- вратниот статус од вкупно 21 пациент, метилација на генот MGMT беше регистрирана исто така кај 15 (71,4%) лица. Анализата на нашите резултати, покажа дека непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на MGMT и појавата на локални / регионални метастази (Fisher exact test: $p = 0,4291$). (табела бр.30). Овој наш наод е во согласност со наодите на Maruya¹⁵³, Hall⁸¹, Khor¹⁰⁷, а е спротивен на Wong²⁶⁹, кој регистрирал дека метилационната стапка на MGMT (50%) кај метастазираните OSCC била повисока од оние за MGMT (23,9%) кај неметастазираниот OSCC. Единствено студијата на Dikshit⁵⁴, објавила инверзна корелација помеѓу метилацијата на MGMT и инволвираноста на вратните метастази ($OR, 0.18$; 95% CI, 0.04–0.83).

Во нашето истражување, во однос на туморскиот стејџинг, дистрибуцијата на пациентите во раните TNM- стадиуми (I и II) на болеста, покажа дека беа вкупно 13 лица, од кои метилација на MGMT имаше кај

10(76,9%). Од 27 пациентите кај кои беа дијагностицирани напредните (III и IV) стадиуми на болеста 20(74,1%) имаа метилација на овој ген. Анализата покажа дека непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на MGMT и стадиумот на болеста (Fisher exact test: $p = 0,4291$). (табела бр.31). Овој наш наод е во ранг на наодите на Bhatia¹³, Khor¹⁰⁷, Maruya¹⁵³, Hall⁸¹ и Wong²⁶⁹, а е спротивен на студиите на Smith²³⁵, Sawhney²¹⁸ и Foschini⁶³, кои потврдиле дека хиперметилацијата на овие гени, била поврзана со напредните фази на туморот и недиференцираните карциноми. Тие заклучиле дека, во OSCC, а поврзаност на MGMT со доцните клинички стадиуми и нодалните метастази, сугерира поврзаност со агресивно однесување на туморот и прогресијата на оралниот карцином, нагласувајќи го неговиот потенцијал како кандидат за предвидлив маркер за метастазирањето и лоша прогноза на болеста, што е спротивно на нашите наоди. Единствено студијата на de Schutter⁴⁸ покажала дека анализираните MGMT гени, покажале повисока метилационна стапки, од било кои други гени и дека нивната хиперметилација, била значително поврзана со подобра локорегионална контрола и вкупно преживување т.е. излекување.

Во нашата студија, во однос на клеточната диференцијација на туморите, во (G1 и G2) стадиумите, со добра и средна диференцијација на туморот, беа вкупно 17/40(42,5%) пациенти. Од нив, кај 12/17(70,6%) имаше метилација на MGMT. Од 23 испитаниците со слаба диференцијација на туморот (G3) кај 18(78,3%) беше регистрирана метилацијата на генот. Анализата покажа дека непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на MGMT и клеточната диференцијација на примарниот тумор кај испитаниците кои беа вклучени во студијата (Fisher exact test: $p = 0,4235$). (табела бр.32). Нашите наоди се конзистентни со резултатите добиени за негативна корелација на MGMT со клеточната диференцијација на туморите, во студиите на Hall⁸¹, Maruya¹⁵³, Hasegawa⁸² и Khor¹⁰⁷, а се спротивни на de Schutter⁴⁸, Sawhney²¹⁸ и Foschini⁶³.

Од сите горе наведени резултати, можеме да заклучиме дека непостои значајна асоцираност/корелација, помеѓу DNA метилацијата на MGMT и испитуваните клиничко-патохистолошките параметри. Нашите наоди на негативна корелација за сите параметри, комплетно се поклопуваат со наодите на Khor¹⁰⁷ и Maruya¹⁵³, кои не регистрирале статистички значајна поврзаност помеѓу демографските, возраст, пол, етничката припадност, навики, pT, N, TNM и G - стадиумот ($p > .0.05$).

Предиктивната прогностичка вредноста на MGMT во развојот и прогресијата туморите, не се покажа статистички значајна, во однос на T, N, TNM и G стадиумот, бидејќи корелациите беа многу слаби и незначителни.

Резултатите од нашата анализа, го потврдија MGMT генот, како не сигнификантен маркер во развојот и прогресијата на оралниот карцином.

❖ Анализата на метилацијата на **DAPIK** во OSCC во однос на: pT, pN, TNM и клеточната диференцијација (G-стадиум) покажа дека, варира во карактеристичен модел, кој е репродуциран во туморските примероци различно за секоја клиничко-патохистолошка варијабла.

Во однос на големината на примарниот тумор pT- фазите, од вкупно 62% лица, кај (72%) имаше метилација во pT1 и pT2 фазата, додека кај останатите 38% со pT3 и pT4 нотиравме метилација на DAPK кај 12(80,0%). Не регистриравме асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на DAPK и големината на примарниот тумор кај нашите испитаници (Fisher exact test: $p = 0,4320$). (табела бр.33). Нашите наоди се совпаѓаат со наодите Wong²⁶⁹, Rosas²⁰⁷, Towle²⁵⁴, Khor¹⁰⁷ и Maruya¹⁵³ и Dikshit⁵⁴, за негативни корелации помеѓу фреквенцијата на DAPK и pT- фазите, а во литературата најдовме само еден спротивен наод, Hasegawa⁸².

Нашите резултати во однос на pN – статусот, покажаа дека вратни метастатски промени не беа дијагностицирани кај 47,5% лица(pN0), а од нив 78,9% имаа метилација на DAPK. Со pN1, pN2 и pN3 од вкупно 21 пациент, метилација на генот DAPK беше регистрирана исто така кај 15(71,4%) лица. Анализата покажа дека нема асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на DAPK и појавата на локални / регионални метастази (Fisher exact test: $p = 0,4291$). (табела бр.34 и слика бр.50). Компаративно со другите студии нашето истражување се совпаѓа со наодите на Khor¹⁰⁷ и Towle²⁵⁴. Помногубројни се студиите, во кои промотор метилација на DAPK била значително поврзани со метастазирањето во лимфните јазли (Smith²³⁵, Towle²⁵⁴, Rosas²⁰⁷, Wong²⁶⁹, Calmon¹⁹), спротивни на нашето истражување. Тие забележале позитивна корелација помеѓу метилацијата на DAPK и присуството на метастази во лимфните јазли на пациентите со орален карцином¹⁵, поради што DAPK1 го предложила, како потенцијален тумор маркер во молекуларните истражувања на OSCC.

Во однос на TNM –класификацијата, во раниот TNM- стадиум (I и II) беа дијагностицирани вкупно 13 лица, од кои метилација на DAPK имаше кај 7(53,8%). Од 27пациентите кај кои беше дијагностициран III и IV стадиум на болеста 23(85,2%), имаа метилација на овој ген. Регистриравме асоцијација/корелација помеѓу DNA метилацијата на DAPK и стадиумот на болеста (Fisher exact test: $p = 0,0420$). Тоа значи дека метилацијата на DAPK е значаен показател за канцерогенезата и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза за болните ($OR = 0,202$ CI=95% $0,044 < OR < 0,929$). (табела бр.35 и слика бр.51).

Споредено со процентите на метилација на неметастатските и метастатските примарни тумори, во однос на DAPK метилациите нашата студија покажа конзистентност со студиите на Michie AM¹⁶¹, Smith²³⁵, LI¹³¹, Maruya¹⁵³ и Meneses¹⁵⁶. Само Khor¹⁰⁷, Díez-Pérez⁵³, не регистрирале корелација помеѓу TNM- стадиумите и DAPK.

Резултатите од анализата на зависноста помеѓу DAPK и (G1,G2 и G3-стадиумите), покажаа дека, со добра и средна диференцијација на туморот (G1 и G2) беа вкупно 17/40(42,5%) пациенти, од кои 11/(64,7%) имаа метилација на DAPK. Од 23 испитаници со слаба диференцијација на туморот (G3) кај 19(82,6%) регистриравме метилацијата на генот. Анализата покажа дека, непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на DAPK и клеточната диференцијација на примарниот тумор кај испитаниците кои беа вклучени во студијата (Fisher exact test: $p = 0,1779$). (табела бр.36). Нашите наоди се во согласност на наодите на Khor¹⁰⁷, Towle²⁵⁴ и Díez-Pérez⁵³, а се спротивни на Yong²⁸⁰, Meneses¹⁵⁶ и Rajesh¹⁹⁶, кои покажале дека DAP киназата е често метилирана во туморските клетки и е поврзана со висока инвазивност и зголемен метастатски потенцијал на малигните клетки, што не беше случај и

во нашата студија. Повторно, ова може да биде резултат на функцијата на ткивата хетерогеност, која постои во рамките на оралниот карцином.

Предиктивната прогностичка вредноста на DAPK во развојот и прогресијата туморите, се покажаа статистички значајна, во однос на **TNM** т.е во касните стадиуми **TNM** (III-IV) (Fisher exact test: $p = 0,0420$) Постоенето на метилација на DAPK ($OR = 0,202$ $CI=95\%$ $0,044 < OR < 0,929$), сигнификантно го зголемува ризикот за прогресијата и развојот во напреднатите стадиум кај оралниот карцином, во однос на раните стадиуми (I-II). Тоа значи дека метилацијата на DAPK е значаен показател за канцерогенезата и укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза за болните.

DAPK генот го потврдивме како сигнификантен предиктор во развојот и прогресија на оралниот карцином во напреднатите стадиуми (III-IV).

❖ Податоците во литературата, кои се однесуваат на зависноста на метилациите на **RARβ2** во корелација со клиничко-патохистолошките параметри за оралниот карцином, не се униформни, како и за сите претходни гени. Резултатите од анализата на метилацијата на **RARβ2** во OSCC во однос на: возраст, пол, локализација покажаа дека, постои корелација помеѓу DNA метилацијата на **RARβ2** и возрасните групи (Pearson chi squ.= 5,76 $p = 0,0164$), односно, значајно повеќе овој ген метилира кај повозрасните пациенти од 60-69 години.

Во однос на големината на примарниот тумор, од вкупно 25 лица со pT1 и pT2- статус, метилација имаше кај 17(68%) лица, додека од 15 пациентите со pT3 и pT4 метилација на **RARβ2** беше нотирана кај 8(53,3%) лица. Не регистриравме асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на **RARβ2** и големината на примарниот тумор кај нашите испитаници (Pearson chi squ.= 0,86 $p = 0,3536$).

Нашата студија е компатибилна со наодите на сите други автори, без исклучок (Righini²⁰³, Hasegawa⁸³, Magic²⁴⁴, Okami¹⁸¹, Carvalho²² и Mascolo¹⁵⁴).

Отсуство на вратните метастатски промени(pN0), беа дијагностицирани кај 19(47,5%) лица, а кај 12(63,2%) од нив имаше метилација на **RARβ2** во туморските примероци. Во pN1, pN2 и pN3-фазата, од вкупно 21 пациент, метилација на **RARβ2** беше регистрирана кај 13(61,9%) лица. Анализата покажа дека нема асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на **RARβ2** и појавата на вратни метастази (Pearson chi squ.= 1,25 $p = 0,2636$). (табела бр.40 и слика бр.56).

Компарирани со останатите наоди нашата студија е во ранг на Okami¹⁸¹ и Wong²⁶⁵, а е спротивна на студиите на Díez-Pérez⁵³, Lee¹²⁶, Magic²⁴⁴, Santoro²¹⁵ и Carvalho²², кои утврдиле дека метилационниот статус на **RARβ2**, кое се покажало дека е значително поврзано со агресивните туморските фенотипови, метастазирањето и времето на преживување.

Во раните **TNM** (I и II) стадиуми на болеста беа вкупно 13 лица, од кои метилација на **RARβ2** имаше кај 7(53,8%). Од 27 пациентите кај кои беше дијагностициран III и IV стадиум на болеста 18(66,7%) имаа метилација на овој ген. Анализата покажа дека непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на **RARβ2** и стадиумот на болеста (Pearson chi squ.= 0,62 $p = 0,4328$). Овие наоди се компаративни со наодите на автори (Okami¹⁸¹, Wong²⁶⁵, Carvalho²² и Mascolo¹⁵⁴), а се спротивни на Lee¹²⁶ и Magic²⁴⁴).

Во однос на G-стадиумот, со добра и средна диференцијација на туморот (G1 и G2) беа вкупно 17/40(42,5%) пациенти, од кои, кај 11/(64,7%) имаше метилација на RAR β 2. Од 23 испитаници со слаба диференцијација на туморот (G3) кај 19(82,6%) беше регистрирана метилацијата на генот. Анализата покажа дека непостои асоцираност/корелација помеѓу DNA метилацијата на RAR β 2 и клеточната диференцијација на примарниот тумор кај испитаниците кои беа вклучени во студијата (Fisher exact test: $p = 0,1779$). (табела бр.42). Нашиот наод не е компатибилен со наодите на Lee¹²⁶ и Wong²⁶⁵, кои објавиле инциденцата на почести метилации на RAR β 2, во однос на клеточната диференцијација, а се согласни со наодите на негативни корелации како кај Okami¹⁸¹, Carvalho²² и Mascolo¹⁵⁴.

Анализата покажа дека постои корелација, само помеѓу DNA метилацијата на RAR β 2 и возрастните групи (Pearson chi squ.= 5,76 $p = 0,0164$), односно, значајно почести метилации на овој ген има кај повозрасните пациенти(60-69 год). (табела бр.37). Тоа укажува на метилација на овој ген кој се добива со стареењето на организмот.

Предиктивната прогностичка вредноста на RAR β 2 во развојот и прогресијата туморите, не се покажа статистички значајна, во однос на T, N, TNM и G стадиумот.

Поради екстензивноста и обемот на податоците ги сублимираме сите добиени резултати за зависноста на DNA метилацијата на 5^{те} гени во клинички-патохистолошките параметри, покажаа:

Добиените резултати од анализирата на промотор метилацијата на ECDH (*Ecadherin*) - $p = 0,6065$; MGMT - $p = 0,6882$; DAPK - $p = 0,3117$; RAR β 2 - $p = 0,6639$ и CDKN2A1(*p16*) - $p = 0,5915$ во туморските ткивни примероци, во корелација со полот не покажаа сигнификантна разлика. Не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација помеѓу метилацијата на 5-те зададени гени и полот.

Во однос на возраста, резултатите покажаа асоцираност само помеѓу метилацијата на RAR β 2, која се регистрира значајно повеќе кај повозрасната група од 60 до 69 години - $p = 0,0164$. Помеѓу метилацијата на останатите гени и возраста, не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација: ECDH (*Ecadherin*) - $p = 0,2240$; MGMT - $p = 0,3374$; DAPK - $p = 0,6626$; и CDKN2A1(*p16*) - $p = 0,8358$.

Разликите во фреквенцијата на метилационните стапки на ECDH (*Ecadherin*) - $p = 0,4263$; MGMT - $p = 0,1779$; DAPK - $p = 0,0964$; RAR β 2 - $p = 0,3637$ и CDKN2A - $p = 0,2176$ промотор гените во OSCC ткивата, во однос на локализацијата не беа статистички значајни, односно, не постои статистички значајна разлика помеѓу локализацијата на оралните карциноми и метилираните гени.

Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу фазите на pT(pT1+pT2 и pT3+pT4) и метилирањето и неметилирањето на промотор гените во OSCC ткивата: *Ecadherin* - $p = 0,1384$; MGMT - $p = 0,5680$; DAPK - $p = 0,4320$; RAR β 2 - $p = 0,3536$ и CDKN2A - $p = 0,9348$.

Добиените резултати од анализирата на промотор метилацијата на *ECDH* (*Ecadherin*) - $p = 0,2651$; *MGMT* - $p = 0,2501$; *DAPK* - $p = 0,4291$; $RAR\beta_2$ - $p = 0,2636$ и *CDKN2A1(p16)* - $p = 0,5365$ во туморските ткивни примероци, во корелација со pN не покажаа сигнификантна разлика. Не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација помеѓу метилацијата на 5-те зададени гени и појавата на локални и регионални рецидиви.

Во однос на стадиумот на болеста, резултатите покажаа асоцираност помеѓу метилацијата на *ECDH* (*Ecadherin*) - $p = 0,0078$; *DAPK* - $p = 0,0420$ и *CDKN2A1(p16)* - $p = 0,0116$, односно, овие зададени гени значајно повеќе метилираа кај пациентите со III и IV стадиум на болеста, верзус пациентите со I и II стадиум. Помеѓу метилацијата на останатите гени и стадиумот на болеста, не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација (за *MGMT* - $p = 0,4291$ и за $RAR\beta_2$ - $p = 0,4328$).

Според резултатите во однос на клеточната диференцијација на примарниот тумор, постои значајна асоцираност помеѓу метилацијата на *ECDH* за $p = 0,0260$ и *CDKN2A1(p16)* за $p = 0,0119$, односно, овие зададени гени значајно повеќе метилираа кај пациентите со G3, верзус пациентите со G1 и G2. Помеѓу метилацијата на останатите гени и клеточната диференцијација на туморот, не утврдивме статистички сигнификантна асоцијација (за *MGMT* - $p = 0,4235$, за *DAPK* - $p = 0,1779$ и за $RAR\beta_2$ - $p = 0,6797$).

Би требало да нагласиме дека големината на примерокот при статистичките анализи има многу голема важност. Колку е поголем примерокот, толку се посигурни добиените резултати, но и веројатноста да се добијат статистички значајни асоцијации е поголема. Под претпоставка дека бројот на примероци е двојно поголем, а дека процентуалната разлика помеѓу метилираните и неметилираните ќе биде иста, ќе се добие значајна асоцираност во однос и на некои други патохистолошки варијабли од интерес и зададените гени. Тоа сугерира на потребата за продолжување на следењето и анализирањето на примероци од идни пациенти со OSCC во однос на метилацијата на зададените гени.

➤ Податоците добиени во нашата студија кои се однесуваат на зависноста на метилациите на гените во корелација со клиничко-патохистолошките параметри за оралниот карцином, не беа униформни, како и за сите претходни гени, репродуцирани во карактеристичен модел за секој од предложените гени.

Согласно, целта на нашата студија, да се утврди вредноста на хиперметилација на p16 како прогностички фактор во OSCC, по валидизацијата на варијаблите, потврдивме дека, просечното време на појавување на први локо/регионални рецидиви и метастази изнесуваше од $5,43 \pm 5,14$ месеци, кај 53,5% од пациентите со M+ на p16(CDKN2A1), за разлика од просечното време на појавување на први локални / регионални рецидиви од $13,78 \pm 10,34$ месеци, кај 46,7% од пациент со (M-)p16. Беше најдена значајна разлика во однос на времето на појава на први рецидиви по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на p16 (Mann-Whitney U

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

Test: $Z = -3,076$ $p = 0,0020$). (Log-Rank Test: $WW = 6,64$ $Sum = 22,837$ Test statistic = 2,740 $p = 0,00613$). Времето на појава на рецидиви по операцијата е значајно пократко кај пациентите кај кои е регистрирана метилација на p16. (табела 43). Локорегионалната контрола кај p16-позитивните карциноми, се покажа значително полоша отколку оние забележани кај p16-негативните тумори.

Истото беше потврдено со Kaplan-Meier кривата и во Сох-ова регресија во која зависната варијабла беше настанот на појава на локорегионални рецидиви, временскиот период е во месеци, а предикторна варијабла генот-маркер p16, во која овој маркер покажа статистички значајна предикторска вредност ($p = 0,0177$).

Беше регистрирана и значајна разлика во однос на времето на преживување по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на p16 (Mann-Whitney U Test: $Z = -2,646$ $p = 0,0082$), (Log-Rank Test: $WW = 6,128$ $Sum = 25,929$ Test statistic = 2,379 $p = 0,0173$). Времето на преживување по операцијата е значајно пократко кај пациентите кај кои е регистрирана метилација на p16. Во мултиваријантната регресиона анализа времето на преживување постоперативно, во однос на p16, покажа дека, постои значајна парцијална (униваријантна) корелација помеѓу настанот умирање и метилацијата на CDKN2A1 ($p = 0,047298$). (Табела бр.53).

Нашите наоди се во согласност со студиите на Al-Kaabi¹ и Dong⁵⁵, кои регистрирале дека p16-позитивните карциноми, имале три пати поголем ризик за повторување на болеста ($RR = 3.3$). Но хиперметилацијата на овој маркер не покажала и корелација со стапката на севкупното преживување. Во нивното истражување постоела зависност помеѓу p16 и сите патохистолошките параметри и нивната поврзаност со општата стапка на преживување и позитивна корелација со локорегионалната контрола на болеста, со униваријантна Кокс регресивна анализа ($P = 0,030$), но во многоваријантната анализа оваа асоцијација не била статистички значајни. Исто и Ogi¹⁸⁰, Sinha²³³ и Puri¹⁹², регистрирале значително лоша прогноза и намалена стапка на преживување кај +M p16, во однос на времето на појава на рецидивантност на болеста и заклучиле дека промотор хиперметилацијата на p16 генот може да служи како корисен молекуларен биомаркер за предвидување на локалната појава на рецидиви и метастази кај оралниот карцином.

Khor¹⁰⁶, иако не забележал асоцираност на метилацијата на p16 со патохистолошките варијабли, покажал дека тие се поврзани со лошата прогноза и намалена стапка на преживување.

Нашите наоди за прогностичката вредност на p16-позитивните карциноми, ги поддржуваат овие наоди на значителна поврзаност со појавата на локални рецидиви и метастази и лошата прогноза.

Спротивни наоди на нашите се објавени во студиите на Kozomara¹¹⁸, Supic²⁴⁴, Hasegawa⁸², Fischer⁶¹, кои регистрирал инверзна корелација со појавата на локорегионални рецидиви-вратни метастази ($p < 0,001$, OR 95%CI 0,03-0,4). И Langendijk⁰, во својата студија објавил дека, локорегионалната контрола на тумор кај p16-позитивните карциноми била значително подобра отколку оние забележани кај пациенти со p16-негативни тумори т.е. подолго време на преживување и подобра локо/регионална контрола на болеста, што не е во согласност со нашите наоди. Спротивни на претходните студии во кои е постигната зависност помеѓу маркерот p16 и клиничките параметри, Khor¹⁰⁷, Martone¹⁵² и Mielcarek-Kuchta¹⁶² покажале дека, хиперметилацијата не влијае

на појавата на рецидиви и стапката на преживување ($p > 0.05$), што повторно се разликува од нашите добиени резултати.

Во нашата анализа го потврдивме **p16**, како сигнификантен прогностички маркерот во појавата на локални рецидиви и метастази и лоша прогноза кај оралниот карцином.

Идентификацијата на овој ген како прогностички биомаркер за лоша прогноза, би рефлектирало во донесување на одлука за поагресивен хируршки третман, со цел на продолжување и подобрување на квалитетот на живот и намалување на трошоци за здравствениот систем. Тоа би значело, дека при идентификација на метилација на **p16** генот, индициран е поагресивен хируршки пристап, со изведување на вратна дисекција (селективна или радикална). Меѓутоа, и покрај тврдењата на многу студии за значајноста на прогностичкото значење на **p16**, базирано на моментално достапните податоци, пристапот кон поагресивен третман на овие пациенти, се уште не е оправдан.

Во нашата студија беше вклучен и **E-cadherin** како молекуларен маркер во откривањето на прогностичко значење на OSCC.

Од вкупно 40 оперирани пациенти со OSCC, локални рецидиви и метастази се појавија кај 30(75%) лица. Од нив, кај (96,7%) пациенти со +M на Ecadherin-от (ECDH), просечното време на појавување на први локални и регионални рецидиви изнесуваше $8,62 \pm 8,37$ месеци (неправилна дистрибуција заради екстремно ниски и високи вредности). Кај (3,3%) пациент со -M на Ecadherin-от, просечното време на појавување на рецидивантност изнесуваше 30 месеци. Најдовме дека постои значајна разлика во однос на времето на појава на рецидиви / мес. помеѓу пациентите со и без метилација на Ecadherin-от (Mann-Whitney U Test: $Z = -2,510$ $p = 0,0181$). Кај метилираните Ecadherin, времето на појава на локални и регионални рецидиви беше значајно пократко. (табела 44, слика 60 и слика 60a). Беше потврдена и значајна разлика во однос на времето на преживување помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на ECDH и оние без метилација (Log-Rank Test: $WW = 3,709$ $Sum = 25,929$ $Test statistic = 2,397$ $p = 0,01649$).

Метилација на Ecadherin-от кај нашите испитаници имаше во (96,7%) со локални рецидиви и метастази, а кај (3,3%) од пациентите немаше. Според Kaplan-Meier – овата крива, настанот/ појавата на локални и регионални рецидиви кај пациентите со OSCC кои имаа метилација на Ecadherin-от, најмногу се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. 23% од пациентите развиваат рецидиви по 12 месеци, а само кај 10% од оние кои имаат метилација на Ecadherin-от рецидивите се дијагностицираат по 24 месеци од операцијата.

Регистриравме, значајна разлика во однос на времето на појавување на локални и регионални рецидиви помеѓу пациентите чии примероци се со +M и -M на Ecadherin-от (Log-Rank Test: $WW = 1,74$ $Sum = 22,83$ $Test statistic = 2,001$ $p = 0,04531$) (табела 44, слика 60 и слика 60a). Истото беше потврдено и во Сох-ова регресија во која зависната варијабла беше настанот на појава на локорегионални рецидиви, временскиот период е во месеци, а предикторна варијабла генот-маркер Ecadherin, во која овој маркер покажа статистички значајна предикторска вредност ($p = 0,0350$). Во Сох-ова регресија, во однос на смртниот исход, не беше вклучен ECDH, бидејќи сите 29(100%) починати

лица имаа метилација на овој ген (немаше починати без метилација, па анализата не го зема во обзир овој ген) (Овде зависноста е очигледна.)

Метилациите на E-cadherin беше објавена во корелација со значително лоша прогноза, појава на локо/регионални рецидиви и посиромашните севкупното преживување.од страна на Mehendiratta¹⁵⁶, Nagata¹⁷⁰, Santoro²¹⁵ и Campo-Trapero²⁰.

Vered²⁶⁰, ги анализираше последните литературни статии и ја истакнал сигнификантната вредност на E-cadherin во OSCC и неговата поврзаност со клинички исход, што е потврдено и од страна на Feinberg A⁵⁹, во корелација со лоша прогноза и метастазирањето. Chang²⁶ и Supic²⁴⁴ покажале дека, +M на E-cadherin-от, е поврзана со рецидивантноста на OSCC, лошата прогноза и посиромашно севкупното преживување ($p = 0.039$). Magic²⁴⁵, исто како во нашата студија, објавил дека +M на Ecadherin-от, во напредните OSCC стадиуми имале значително полоша 3 и 5-годишна стапка на преживување и ECAD го предложил како независен прогностички фактор во оралниот карцином.

Bosch¹⁶, во согласност со добиената високо значителната асоцијација на +M E-cadherin, бил зголемен ризикот за појава на рецидиви и метастази ($p = 0.0007$) и далечни метастази ($p < 0.0001$) и е најсилен независен прогностички фактор, посилен и од хистолошкиот стадиум.

Речиси идентични со нашите резултати се наодите на Huber⁸⁹, за севкупната корелација на метилација E-cadherin-от и сите параметри: 90% хиперметилација во OSCC, асоцираност со TNM и G стадиумот и корелација со инвазијата и метастазите и лош исход.

Спротивно од нашите резултати, останатите автори, Bánkfalvi⁸ и Mielcarek-Kuchta¹⁶², прикажале дека пациентите со +E-CAD промотор метилација имале пониски стапки на локално повторувања и подобро преживување и исходот, што укажува на тоа дека улогата на +M на E-CAD генот во тот карциномите не е целосно разјаснета и е контраверзна. Овие контраверзии, се обиделе да ги објаснат повеќе автори, кои покажале дека карциномите со намалена експресија на E-cadherin во туморите, развивале многу почесто рецидиви и имале лоша прогноза, во споредба со туморите кои не рецидивирале ($p < 0.001$). Високата експресија на E-cadherin-от ($p < 0.001$) биле значително поврзана со подобрување на преживувањето и со намалена инциденца на појава на рецидиви и метастази($p = 0.022$). Во контекст на овие наоди е и студијата на Marsit¹⁵¹, Пациентите кои имале +M E-cadherin, имале значително подобро севкупното преживување во споредба со пациенти со -M ($p < 0.02$; log-rank test).

Во нашата студија, кога беа присутни метилациите на Ecadherin, времето на појава на локални и регионални рецидиви беше значајно пократко и пациентите беа со значајно лоша прогноза, што веројатно се објаснува со хипотезата на претходните автори, дека Ecadherin -от, во нашата студија е со намалена експресија, па затоа има лоша прогноза и скратено време на преживување. Во нашата анализа го потврдивме Ecadherin-от, како сигнификантен прогностички маркер во појавата на локални рецидиви и метастази и лоша прогноза кај оралниот карцином.

Истражувањето на **MGMT**, како предиктивен прогностички маркер за појавата на рецидиви / метастази и времето на преживување, покажа дека, од 30 пациенти со локо/регионални рецидиви по операција, 23(76,7%) имаа +M на **MGMT**, а просечното време на појавување на рецидивите изнесуваше $10,0 \pm 9,52$ месеци (неправилна дистрибуција заради екстремно ниски и високи вредности). Кај (23,3%) од пациент со -M на **MGMT**, просечното време на појавување на први локални / регионални рецидиви изнесуваше $7,14 \pm 7,79$ месеци. Во нашето истражување, не најдовме значајна разлика во однос на времето на појава на први рецидиви по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на **MGMT** (Mann-Whitney U Test: $Z = -0,858$ $p = 0,3908$). (табела 45). Кај 23(76,7%)пациенти со локални и регионални рецидиви имаше метилација на **MGMT**, а кај 7(23,3%) пациенти немаше. Според Kaplan-Meier – овата крива, настанот/појавата на локални и регионални рецидиви кај пациентите со OSCC кои имаа метилација на **MGMT**, најмногу се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 26% од пациентите рецидиви се јавуваат по 12 месеци, а само кај 10% од оние кои имаат метилација на **MGMT** рецидивите се дијагностицираат по 30 месеци од операцијата.

Кај пациентите кои немаа метилација на **MGMT**, настанот/појавата на локални и регионални рецидиви исто така најмногу се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 14% од оние кои немаат метилација на **MGMT** рецидивите се дијагностицираат по 24 месеци од операцијата. Во нашата студија, непостои значајна разлика во однос на времето на појавување на локални и регионални рецидиви помеѓу пациентите чии примероци имаа + метилација на **MGMT** и оние со- метилација. (Log-Rank Test: $WW = -1,724$ $Sum = 22,837$ $Test statistic = -0,838539$ $p = 0,40173$) (табела 56, слика 57 и слика 57a) и Непостои значајна разлика во однос на времето на преживување помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на **MGMT** и оние без метилација (Log-Rank Test : $WW = -1,566$ $Sum = 22,599$ $Test statistic = -0,756$ $p = 0,4492$)

Овој наш наод е во согласност со наодите на: Puri¹⁹³ и Sun²⁴⁵, кои не регистрирале асоцираност помеѓу **MGMT** и појавата на рецидиви и метастази, како и со времето на преживување. (CCNA1, HR $\frac{1}{4}$ 1.72; 95% CI: 0.94–3.15; **MGMT**, HR $\frac{1}{4}$ 1.57, 95% CI: 0.93–2.64. Истото го потврдиле и со Cox regression анализата, со што повторно не била регистрирана статистичка значајност на **MGMT** како индикатор за преживување и рекурентност; Šupić²⁴⁴, потврдил дека **MGMT** гените немаат прогностичка сигнификантност, а de Schutter⁴⁸ покажал дека промотор хиперметираните **MGMT** гени биле значително поврзани со подобра локорегионална контрола и вкупно преживување т.е. излекување.

Споредени соподатоците од литературата, спротивни на нашите наоди, објавиле Zhang²⁸⁴, Kaur¹⁰⁴, Kato¹⁰³ и Sawhney²¹⁹, кои го потврдиле потенцијалот на **MGMT** како предиктивен маркер за прогнозата на болеста. Towle²⁵⁵, за разлика од другите, објавил дека, **MGMT** промотор метилацијата била значително инверзно поврзана со севкупното преживување ($p = 0,049$;) и преживување без болест ($p = 0,013$), наод кој го потврдил и со Каплан-Маеровата крива и во многовариантниот Кокс модел, (HR = 2.17, 95 % CI: 1,11–4,23), Инверзниот тренд на стапката на преживување и рецидивите биле забележани кај оние со највисок степен на хиперметилација на **MGMT** асоцирано со полоша стапка на преживување. Затоа е разбирливо дека со

зголемување на степенот на метилација опаѓа и се нарушува геномската стабилност како резултат на намалување на MGMT изразување, што ќе доведе до полоша прогноза. Кога би се раководеле со оваа хипотеза, тогаш нашата студија би спаѓала во средно изразените метилации на овој ген кај нашите испитаници, па затоа не добивме асоцираност со прогностичките параметри.

Нашите резултати сугерираат дека MGMT хиперметилацијата не се покажа како значаен прогностички фактор, во однос на појава на рецидиви и метастази (Mann-Whitney U Test: $Z = -0,858$ $p = 0,3908$) и времето на преживувањето и (Log-Rank Test: $WW = -1,724$ $Sum = 22,837$ $Test statistic = -0,838539$ $p = 0,40173$) и времето на преживување Log-Rank Test : $WW = -1,566$ $Sum = 22,599$ $Test statistic = -0,756$ $p = 0,4492$). Со ови резултати ја потврдивме несигнификантноста на MGMT промотор метилација во прогнозата и неговата предиктивна вредност во предвидување на стапката на преживување и лошиот исход од болеста.

Овие сознанија, го исклучија MGMT, како потенцијален предикторен маркер во развојот и прогресијата на оралниот карцином

Во нашата студија беа вклучени и DAPK гените така потенцијални молекуларни маркери за утврдување на нивната предиктивна, прогностичка вредност кај OSCC.

Резултатите покажаа дека кај 80,0% од пациентите со +M на DAPK, просечното време на појавување на рецидивите изнесуваше $9,64 \pm 8,82$ месеци (неправилна дистрибуција заради екстремно ниски и високи вредности). Кај 6/30 (20%) пациент кај кои немаше метилација на DAPK, просечното време на појавување на први локо/регионални рецидиви/метастази изнесуваше $8,08 \pm 10,98$ месеци. Во нашето истражување не најдовме значајна разлика во однос на времето на појава на први рецидиви по операцијата (Mann-Whitney U Test: $Z = 1,148$ $p = 0,2507$). (табела 46, сл. 62 и 62a). Кај 24(80%) пациенти со локални и регионални рецидиви имаше метилација на DAPK, а кај 6(20%) пациенти немаше. Според Kaplan-Meier – овата крива, појавата на локални и регионални рецидиви кај 42% од пациентите со OSCC кои имаа метилација на DAPK се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 25% од пациентите рецидиви се јавуваат по 12 месеци, а само кај 8% од оние кои имаат метилација на DAPK рецидивите се дијагностицираат подолго од 24 месеци од операцијата.

Пациентите, кај кои не беше нотирана метилација на DAPK, настанот/појавата на локални и регионални рецидиви исто така најмногу се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 18% од оние кои немаат метилација на DAPK рецидивите се дијагностицираат по 24 месеци од операцијата.

Нашите резултати во однос на зависноста на DAPK метилацијата и времето на преживување/ смртен исход, покажаа дека постои значајна разлика во однос на времето на преживување по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на DAPK (Mann-Whitney U Test: $Z = 1,991$ $p = 0,0463$). Кај пациентите кај кои е регистрирана метилација на DAPK времето на преживување е значајно подолго.

Уште еднаш потврдивме дека не постои значајна разлика во однос на времето на појавување на локални и регионални рецидиви помеѓу (M+) и (M-) DAPK гени. (Log-Rank Test : $WW = -1,145$ $Sum = 22,83$ $Test statistic = -0,5888$ p

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

= 0,5559) (табела 46 сл. 62a) (Log-Rank Test: WW = 3,479 Sum = 24,929 Test statistic = 2,064 p = 0,0396) и инверзна корелација со времето на преживување (Log-Rank Test: WW = 3,479 Sum = 24,929 Test statistic = 2,064 p = 0,0396) помеѓу пациентите со и без метилација на DAPK. Присуството на промотор метилацијата на DAPK, во нашата студија се покажа дека не асоцира со локо/регионалната рецидивантност, метастазирање и целокупното преживување.

Towle²⁵⁵, најдетално го истражил прогностичкото влијание на хиперметилацијата на DAPK и нагласил дека DAPK се поврзани со зголемена веројатност во појавата на рецидиви и вратни метастази, иако овие резултати не секогаш постигнале статистичка значајност. Други група на автори не пријавиле асоцијации меѓу овие клинички карактеристики. Повторно, ова може да биде во функција на ткивната хетерогеност, која постои во рамките на категоризацијата на оралниот карцином. Откривањето на DAPK промотор хиперметилацијата е во корелација со намалено вкупно преживување, со што е потврдена неговата улога како биомаркер за насочување на пациентите за следење и предвидување на прогнозата. Како и со MGMT и DAPK хиперметилацијата, тие ја поврзуваат со лошите навики, пушењето.

Според податоците во консултираната литература, нашите наоди се во ранг на наодите на Rosas²⁰⁸, Dricu⁵⁶, Šupić²⁴⁵ и Sun²⁴⁴, кои утврдиле дека, присуството на промотор хиперметилацијата на MGMT, било значително поврзано со стапката на преживување. Кај пациентите кај кои присуството на промотор метилација на DAPK, било забележано во однос на појавата на рецидивантност на карциномот, постоперативно и севкупното преживување биле 1,92 (95% CI: 0,99-3,72), 1,93 (95% CI: 1,10-3,39), 4,42 (95% CI: 1,88-10,41), соодветно. Сепак, многовариантната анализа, во однос на рецидивите и метастазите, не покажала статистичка значајност како предиктивни фактори за вкупното преживување.

Спротивни на нашите наоди се студиите, на Santoro²¹⁵ и Kozomara¹¹⁸, кои објавиле дека присутната DAPK промотор метилацијата е сигнификантен независен прогностички фактор за севкупното преживување. И Dong⁵⁵, Guerrero-Preston⁸⁰ и Meneses¹⁵⁷, утврдиле сигнификантна корелација помеѓу +M DAPK и појавата на рецидиви и метастази, со времето на преживување, т.е. лоша прогноза. Но нагласиле и дека се потребни дополнителни студии, за придобивање на неговата улога за евалуација на стапката на преживување и прогнозата на карциномите на оралната слузница.

Резултатите од нашата анализа за хиперметилацијата на DAPK гените, се покажаа несигнификантни како предиктори за лоша прогноза (појава на рецидиви и метастази), и ја отфрлија неговата улога како биомаркер во развојот и прогнозата на OSCC.

Во нашата сепаратна анализа на предложените гени, ја утврдивме и улогата на RARβ2, како прогностички биомаркер, во предвидувањето на текот и исходот од карциномот. Од 30 пациенти со постоперативна појава на рецидиви и метастази, (63,3%) имаа метилација на RARβ2, со просечно време на појавување на рецидивите од 10,55 ± 9,75 месеци. Кај 11/30 (36,7%) пациенти кај кои немаше метилација на RARβ2, просечното време на појавување на први локо / регионални рецидиви изнесуваше 7,22 ± 7,85 месеци. Овие резултати покажаа дека, нема значајна разлика во однос на времето на појава на први рецидиви по операцијата помеѓу пациентите со и без

метилација на RARB2 (Mann-Whitney U Test: $Z = -0,671$ $p = 0,5018$). (табела 47, слика 63 и слика 63a). 63,3% од пациенти со локални и регионални рецидиви имаа метилација на RARB2 гените, а (36,7%) од пациенти беа со неметилирани неметилирани RARB2. Според Kaplan-Meier – овата крива, појавата на локални и регионални рецидиви кај 48% од пациентите со OSCC кои имаа метилација на RARB2 се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 32% од пациентите рецидиви се јавуваат по 12 месеци, а кај 10% од оние кои имаат метилација на RARB2 рецидивите се дијагностицираат покасно од 24 месеци од операцијата.

Кај пациентите кои немаа метилација на RARB2, настанот/појава на локални и регионални рецидиви исто така најмногу се регистрира во првите 6 месеци после операцијата. Кај 10% од оние кои немаат метилација на RARB2 рецидивите се дијагностицираат покасно, повеќе од 24 месеци од операцијата.

Непостои значајна разлика во однос на времето на појавување на локални и регионални рецидиви помеѓу пациентите чии примероци имаа метилација на RARB2 и оние без метилација (Log-Rank Test: $WW = -2,066$ $Sum = 22,83$ $Test statistic = -0,882$ $p = 0,3776$) (табела 47, слика 63 и слика 63a)

Во однос на асоцираноста помеѓу метилацијата на RARB2 и времето на преживување, утврдивме дека не постои значајна разлика во однос на времето на преживување по операцијата помеѓу пациентите со и без метилација на RARB2 (Mann-Whitney U Test: $Z = -1,124$ $p = 0,2609$). Кај пациентите кои немаа метилација на RARB2, настанот/егзитирањето најмногу се регистрира во првите 12 до 18 месеци после операцијата. Кај 38% од оние кои немаат метилација на RARB2 преживувањето е подолго од 40 месеци од операцијата. Истото беше потврдено и со (Log-Rank Test: $WW = -1,642$ $Sum = 25,929$ $Test statistic = -0,657675$ $p = 0,5107$).

За улогата на RARB2, како прогностички фактор, не постојат многу студии, но воглавно доминираат тие, во кои хиперметилацијата на RARB2 нема прогностичка сигнификантност во предвидувањето на исходот на оралниот карцином, како во нашата студија (Mielcarek-Kuchta¹⁶², Dricu⁵⁶, Rosas²⁰⁸, Okami¹⁸¹, и Šupić²⁴⁴). Нашите резултати не се во ранг на објавените студии на Yang Z²⁷⁹, Lee¹²⁶, кој при утврдување на метилационниот статус на RARB2, покажал дека е значително поврзан со агресивните туморските фенотипови, појавата на рецидиви и метастази и времето на преживување. Mascolo¹⁵⁴, објавил дека RARB2 метилација е независна од големината на туморите, диференцијацијата или стеинингот, но била поврзана со напредната возраст на пациентите (веројатно како израз на долго време на акција на канцерогените на мукозниот епител) и агресивноста на тумори и лошата прогноза на пациентите.

Резултатите од нашата анализа за хиперметилацијата на RARB2 гените, како предиктори за лоша прогноза (појава на рецидиви и метастази), се покажаа несигнификантни и ја отфрлија неговата улога како биомаркер со прогностичка вредност за OSCC.

Молекуларната идентификација на ткивните биомаркери како прогностички фактори, во иднина, би можела да ги идентификува пациентите изложени на висок ризик за развој на OSCC, и да ги селектира пациенти кои би имале корист од поагресивен хирушки третман, придружен со радикална или селективна дисекција на вратот. Од друга стана, идентификацијата на специфични биомаркери, нискоризични предиктори,

за добра прогноза, би помогнале во селекција на пациентите и во избегнување на мутилантните и агресивни третмани. Меѓутоа, потребни се обемни, многубројни, дополнителни истражувања до нивната примена во клиничката пракса.

miRNAs

➤ Ова е прва студија во Македонија, во која е направена сеопфатна идентификација и мерење на 9^{те} најчесто експроатирани, различно транскрибирани miRNAs во OSCC^{234,35}. Користејќи семиквантитативна реверзна транскрипциона (RT) -PCR анализа, независно ги верифициравме податоците во примарните тумори (n=32), во корелација со нормалното, контралатерално ткиво (n=32) и ткивата од здравите индивидуи (n=10).

Нашата анализа покажа платформа од точно идентификувани дисрегулирани miRNAs, кои ги анализиравме во мостри поединечно за трите групи на биоптични материјали.

При идентификацијата на потенцијално "канцерогени" микроРНА, базирани на нивниата различна експресија кај оралниот карцином, во споредба со контролните примероци и здравите ткива ги добивме следните резултати

Сите идентификувани miRNAs, беа значително различно експресирани во туморските ткива во споредба со аналогените нормални и здрави ткива. Од 9-те микроРНА во оваа група:

четири miRNAs молекули беа идентификувани дека се намалено експресирани *mir-125*, *mir-137*, *mir-133b* и *mir-193a* и

пет miRNA дека се зголемено експресирани *mir-21*, *let-7*, *mir-155*, *mir-31*, *mir-211*^{139,87,110,108}. Нашите наоди целосно се совпаднаа со сите останати студии во однос на нивото на регулација на miRNAs експресиите, но со отстапувања во нивниот квалитативен дел²²⁵.

Секоја микроРНА одделно ја идентификувавме во различно експресирани панели за трите групи, а потоа сите предложени miRNAs, специфични за OSCC, ги компариравме со клиничко-патохистолошките параметри и ги опишавме во карактеристични модели, соодветен за секоја^{139,256}.

➤ *mir-21*

Во нашата студија прва од избраните специфични дисрегулирани miRNA за оралниот карцином беше *mir-21*, што се покажа дека е значително зголемено експресирана кај OSCC и аналогните контралатерални ткива, во однос на здравите⁶. Измерената просечната вредност на *mir-21* во туморските примероци изнесуваше $7,75 \pm 2,93$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза изнесуваше $4,32 \pm 3,54$ а во здравите ткива $2,43 \pm 0,97$. Во нашето истражување за средните вредности на *mir-21*, помеѓу трите

испитувани групи на примероци, беше најдена статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$). Истата беше потврдена и помеѓу контралатералната непроменета оралната мукоза и здравите ткива (Mann-Whitney test: $p < 0,0001$) и помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива (Mann-Whitney test: $p < 0,0001$). Вредностите на miR-21, измерена во примероците од туморското ткиво и контралатералната нормална оралната мукоза, покажаа дека постои умерена незначајна корелација (Spearman rang - correlation: $p = 0,301$ $p = 0,094$), помеѓу овие две групи. Покачените вредности на miR-21 претставуваат голем ризик фактор и показател за постоење на карцином, односно, ризикот за развивање на карцином е за 31 пати поголем во однос на лицата каде вредностите на miR-21 се ниски (OR=31 CI=95% 3,76 <OR< 255,29).

Квантификацијата на експресијата на microRNA-21 молекулата во нашиот сет на примероци, покажа силна потврда на резултатите за значително зголемување на експресија во туморските и контралатералните аналогни ткива, во однос на здравите ткива ($p < 0,0001$). Бидејќи miR-21, покажа значајна зголемена експресија⁶, ја потврдивме нивната улога во предвидување на потенцијалот за разликување на карциномите од нормалните ткива. Односот на miR-21 покажа висока дискриминаторски потенцијал, со осетливост од 92% и специфичноста на 93% во разликувањето на туморите од нормалните ткива и е вашен предиктор, со голема сензитивност и специфичност (0,92 и 0,93 соодветно), во разликување на туморските од здравите ткива во процесот на оралната туморогенеза¹²².

Сите студии идентификувајќи ја потенцијално „канцерогената“ microRNA-21 сугерираат исти резултати како во нашата студија (Kimura¹⁰⁸, Avissar⁶, Sethi²²⁵, Kolokythas¹¹⁰, Chang²⁹, Hui⁹⁰, Christensen³⁸, Tran²⁵⁵, Liu¹³⁹, Hu⁸⁷ и Childs³⁵), со разлика само во квантификацијата на експресијата на miR-21 нивоата во ткивата со 2,62 пати зголемена експресија. Истражувајќи ја дистрибуцијата на miRNA експресијата Kimura¹⁰⁸, ја прикажале просечната експресија на miR-21 во OSCC, 12,70 и 2,77 (SE = 2,91 и 0,59), во споредба со нормалното, здраво ткиво со 1,51 и 1,51 (SE = 0,30 и 0,35); ($p = 0,00005$ и $0,0377$); Cervigne²³, користјќи ја Bonferroni корекцијата, прикажале статистички значајна разлика ($p < 0,00017$); Fischer⁶¹, $p < 0,01$ и $q < 0,06$ и Childs³⁵, $p = 0,002$). Avissar⁶, Liu¹³⁹ и Fischer⁶¹, исто така ја ја потврдиле зголемената експресија на miR-21 и нејзината висока чувствителност 0,99 и специфичност 0,14, во предвидувањето на HNSCC/ OSCC.

Значително, зголемената експресија на miR-21, во нашата студија ја етаблира оваа молекула како онкогена microRNA, која ја зголемува клеточната пролиферацијата и е вклучена во раната туморигенезата. Наодот на ниски вредности на miR-21 во здравото ткиво, а 2,62 пати зголемено ниво во туморските и 1,3 воконтралатералните, нормални ткива, сугерира на фактот дека miR-21, активно се вклучени во почетокот и развојот на оралната туморогенеза^{29,139}. Потврдата на дисрегулираните изрази на MicroRNAs- miR-21, во нашето истражување докажа дека, таа е е важен чекор за идентификација и конкретен потенцијален механизми во карциногенезата бидејќи овие отстапувања го прикажуваат раното случување во иницирањето и прогресијата на болеста. Овие податоци укажуваат дека експресиите на miR-21, имаат значителен клинички потенцијал како microRNA молекуларни биомаркери, во туморогенезата, но дека се неопходно потребни понатамошни иследувања за потврдување на нивната клиничка апликабилност како

самостоен биомаркер за предвидување на развојот на оралната карциногенеза.

Бидејќи *mir-21*, се покажа како потенцијален биомаркер во туморогенезата на OSCC, понатамошните истражувања, беа со цел да се утврди нејзината улога во развојот на туморот, и нејзината поврзаност со прогресијата на болеста.

Потоа од генерираните податоци, ја утврдивме асоцираноста меѓу *mir-21* и патолошките карактеристики кај OSCC. Во стратификациската споредбата на патохистолошките карактеристики на пациенти, врз основа на експресираните нивоа на *mir-21*, во нашата студија не најдовме корелација меѓу *mir-21* и возраста, полот, диференцијација на клетките, pT, pN, и TNM стадиумите- непостојат значајни статистички асоцијации. Само наодот на зголемена експресија на *mir-21* и полот -0,373, покажа значајна корелација во корист на машкиот пол, што е компатибилно со наодите на Hedbäck⁸⁵, кои вршејќи многовариантна анализа, забележал значајна корелација помеѓу експресијата на *mir-21* кај половите, со повисоки вредности кај машкиот пол.

Помеѓу квантитативните податоци за експресијата на microRNA молекулите и времето/мес. на појава на први локални/регионални рецидиви, во нашиот сет на примероци добивме значајна негативна корелација само во однос на *mir-21* во туморските примероци (Spearman = - 0,378 p=0,0326). Тоа значи дека кај пациентите кај кои првите рецидиви се јавиле брзо по операцијата (по мал број на месеци), вредностите на *mir-21* се високи, со што таа ја покажа својата улога, како негативен прогностички фактор. Сличен наод објавил и Hedbäck⁸⁵ и навел дека, повисоката експресија на *mir-21*, била поврзана со зголемен ризик од прогресија и појавување на, метастази, во споредба со група на пациенти со најниска експресија на *mir-21* (P = 0,032).

Во однос на корелацијата со патохистолошките параметри, нашите наоди се во согласност со наодите на Chang²⁹ и Hu⁸⁷. Исто и Hedbäck⁸⁵ забележанал, слаби, гранични корелации помеѓу зголемувањето на степенот на диференцијација (p = 0.078). Други значајни корелации помеѓу експресијата на *mir-21* и клиничките или патолошки карактеристики, не биле најдени, исто како и во нашето истражување.

Во однос на зголемување на експресијата на *mir-21* и нивната корелација со појавата на рецидиви и метастази, нашата студија е во согласност со наодите на Hu⁸⁷, Zhou²⁹⁰ и Avissar⁷. Исто и Childs³⁵, кои утврдиле значителна корелација, со брзата прогресијата на карциномот (појава на локорегионални рецидиви и метастази), но спротивно на нашите наоди објавил и намалена стапка на преживување. Во нашата студија не најдовме корелација на експресијата на *mir-21* и времето на преживување, што не беше случај и во студиите на Avissar⁷ и Zhou²⁸. Santaro²¹⁵ открил дека *mir-21* има голема прогностичка вредност во одредувањето на преживување на пациентите со OSCC и била предложена како независен предиктор за сиромашната стапка на преживување и силна асоцијација на високото ниво на експресија на *miR21* и значително намалено 5-годишно преживување (Cervigne²³, Reis²⁰⁰)

Речиси уникатна е студијата на Christensen³⁸, која укажува на силна поврзаност помеѓу нивото *mir-21* нивоа и речиси сите клиничко-патолошките параметри, што се покажа спротивно на нашите наоди, па го предложил *mir-21* како нов биомаркер во развојот, инвазијата и и прогресијата на карциномот. Santoro²¹⁵ открил дека *mir-21* има голема прогностичка вредност во

одредувањето на преживување на пациентите со OSCC и била предложена како независен предиктор за сиромашната стапка на преживување и силна асоцијација на високото ниво на експресија на miR21 и значително намалено 5-годишно преживување (Cervigne²³, Reis²⁰⁰)

Значително, зголемената експресија на miR-21, во нашата студија ја етаблира оваа молекула како онкогена microRNA, која ја зголемува клеточната пролиферацијата и е важен чекор за идентификација и конкретен потенцијален механизми во карциногенезата бидејќи овие отстапувања го прикажуваат раното случување во иницирањето и прогресијата на болеста. е вклучена во раната туморигенеза. Наодот на ниски вредности на miR-21 во здравото ткиво, многу зголемени нивоа во туморските и зголемено експресирани во контралатералните, нормални ткива, сугерира на фактот дека miR-21, активно се вклучени во почетокот и развојот на оралната туморогенеза. Овие константно зголемени експресији на *Мир-21* во туморските и контралатералните ткива, добиени во нашата студија, ги потврдија Мир-21 како моќен предиктор за оралната карциногенеза, како во почетната фаза на туморогенезата, така и во прогресија и развојот на OSCC. Прогностичкото влијание на зголемената експресија на miR-21 во однос на појавата на рецидиви и метастази кај оралниот карцином, се покажа како независен предиктивен фактор во прогресијата на карциномите, независен од другите клинички и патохистолошки параметри.

➤ mir let-7a

Од петте microRNA зголемено експресирани, во нашата студија за квантификација на молекулрните гени врз основа на постоечките докази за нивната дерегулација беше избрана и let-7a.

Значителен напредок е направен во идентификација на овие miRNAs кои постојано се зголемено експресирани во оралниот карцином, што беше потврдено и во нашата студија⁹⁵.

Резултатите во нашата студија покажаа значајни разлики во експресиите на let-7a во OSCC во нормалните контралатерални и здравите ткива. Просечната вредност на Let 7a во примероците од туморско ткиво изнесуваше $2,33 \pm 2,13$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $2,79 \pm 3,87$ а во здравите ткива $-4,54 \pm 2,01$. Во студијата на Yu CC²⁸³ let 7a експресијата се движела од 1-2,76 во ткивата на неопластичните примероци =1,14-3,42, а Sterenczak²⁴², во резултатите на својата студија, покажал ниво на експресија на let-7 од 2,1-5,76 во контролните ткива, а во неопластични примероци од 1,14-3,42, квантитативно, различно од нашите нивоа на експресија. Разликата е во наодот на намалени експресији, кои се појавуваат во здравите ткива, во нашата студија.

Помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на Let 7a, утврдивме статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$). Во односот помеѓу примероците од туморското ткиво и

контралатералната непроменета оралната мукоза, не регистриравме значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,347$). Помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива, утврдивме дека кај сите 32(100%) лица вредностите на let7a беа над -4,09 односно значајно поголеми за Mann-Whitney test : $p < 0,0001$. постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$).

Во контралатералните примероци, кај 31(97%) пациент, вредностите на let7a беа над -4,09 односно значајно повисоки за $p < 0,0001$, во однос на здравите (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$), при што let7a покажува висока сензитивност од 100% и специфичноста од 94% во разликувањето од здравото ткиво. Високите вредности на let7a во контралатералната непроменета оралната мукоза кај испитаниците претставува значаен ризик фактор, односно, укажува на зголемен ризик за малигна трансформација ($OR = 31$ $CI=95\%$ $3,76 < OR < 255,29$) и е рано случување во клетките на оралната лигавица. Помеѓу вредностите на let7a во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, постои слаба незначајна корелација (Spearman rang-correlation: $\rho = 0,148$ $p=0,415$). Бидејќи let7a, покажаа значајна зголемена експресија, ја потврдивме нивната способност за предвидување на потенцијалот за разликување на карциномите од здравите ткива.

Односот на let-7 покажа висока дискриминаторски потенцијал, со сензитивност од 100%, во разликувањето на туморските од здравите ткива и се покажа како значаен показател за развојната туморогенеза. Во нашето истражување, високите вредности на let7a во контралатералната непроменета оралната мукоза кај испитаниците претставува значаен ризик фактор, односно, укажуваат на зголемен ризик за малигна трансформација ($OR = 31$ $CI=95\%$ $3,76 < OR < 255,29$) и рано случување во клетките на оралната карциногенеза.

Наодите на постојано, зголемено експресирана let-7a, во туморските и контролните ткива, се потврдени од голем број на автори (Scapoli²²⁰, Kimura¹⁰⁸, Jakymiw⁹⁵, Zhang B.²⁸³ Roush S²¹⁰, Chang C.J.²⁵, Liu¹³⁹, Childs³⁵ и Chang²⁵). Сите автори ја потврдиле високата експресија на let-7a во OSCC во споредба со здравиот сквамозен епител ($p < 0,005$). Michael T и Scott M¹⁶⁰ (2009), истражувајќи нови детали за microRNA биогенезата, основните функции, како и нивната улога во физиологијата на карциномите, регистрирал дека let-7 експресијата, доведува до прекумерна RAS активност, што го прави делумно одговорен за недостатокот на соодветна диференцијација. Присуството на зголемена експресија на let-7 кај премалигните и канцерозните лезии на оралната мукоза, било поврзано со лоша прогноза и намален постоперативен опстанок.

Во корелација со клиничко-патохистолошките параметри во нашата студија, експресијата на let-7a, не покажа асоцираност со pT, pN, TNM и G стадиумите, што е во согласност со наодите на Childs G.³⁵ и Chang²⁵, кој регистрирал дека влијанието на зголемената експресија на let-7a во туморските ткива, се покажало дека е независна од анатомската локација и големината на туморот (Т-стеининг). Chang²⁶, покажал дека експресијата на let-7a во регионалните метастатски лимфни јазли на OSCC ткивата, се значително намалени, за разлика од примарните тумори каде се зголемени. Овие податоци укажувале на фактот дека, let-7 експресијата била обратно пропорционална со времетраењето на туморигенезата на OSCC, што не беше потврдено во нашите наоди.

Во консултиранта литература, нашите наоди не беа во ранг на наодите на Zhang²⁸⁵ и Scapoli²²⁰, кои потврдил дека експресијата на *let-7*, ја карактеризира прогресијата на метастатските тумори, независно од локализацијата. Christensen³⁸ утврдил дека *let-7* microRNA е поврзана со лоша прогноза кај оралниот карцином и обезбедиле потврда, дека разликите во времето на преживување се поврзани со разликите во фенотипот на туморот. Avissar⁶, регистрирал значително зголемена експресија во позитивните pT, pN, а *let-7a* биле посочени дека се со намалена експресија во HNSCC/ OSCC и нивоата на изразувањето било значително намалено во метастатските ткива, во споредба со примарни тумори. Во студијата на Yu CC.²⁸³ и *Let-7a* била силно асоцирана со почетокот на Т-фазата, pN стадиумите и во почетните патолошки стадиуми. Scapoli L²²⁰, исто така ја потврдил намалената експресија на *let-7*, дека ја карактеризира прогресијата на метастатските тумори, што во нашиот случај, експресијата растеше право пропорционално со прогресијата на туморот.

Во нашата студија, времето на преживување во однос на експресијата на високите *let-7a* нивоа, покажа статистички значајна разлика ($p = 0,033234$). Зголемената експресија на *let-7* не беше асоцирана со зголемен ризик од појава на рецидиви и метастази, туку само се покажала како индикатор за лоша прогноза и зголемена смртност, независно од традиционалните патохистолошки параметри. Нашите наоди се конзистентни со наодите на Michael T и Scott M¹⁶⁰, кој утврдиле дека присуството на зголемена експресија на *let-7* во канциномите на оралната мукоза, е поврзано со лоша прогноза и намален постоперативен опстанок, потоа Childs³⁵, регистрирал значителна прогресијата на OSCC (локо-регионална повторување, далечни метастази) или смртен исход на пациентите HNSCC/ OSCC, што го прави *let-7* значаен индикатор за прогресија (HR = 4,61, Pvalue < 0.0001), независно од анатомската локација и големијата на туморот. проучувајќи ја регулацијата на miRNAs. И Peng¹⁸⁶, се сложил со претходните наоди дека *let-7*, била поврзана со: локалната контрола (OR = 5.917 5,917, $p = 0,032$), со контрола на вратни метастази (OR = 250, $p = 0,009$), со појава на далечни метастази (OR = 31,25, $p = 0,023$) и специфичното време на преживување (OR = 6,329, $p = 0,004$). Во неговата студија хиперметилацијата на *let-7* го зголемила ризикот од повторување на болеста за 2,6 пати и, што е уште позначајно, ја зголемува смртноста за 12,9 пати.

Wong²⁶⁶, Kolokythas¹¹² и Kozaki¹¹⁷, исто ја подржиле значајната корелација со клиничкиот исход и а *let-7* ги потврдиле како значајни предвесници на прогресијата на карциномите и лошиот исход, независно од локализацијата.

Во нашата студија ги резимиравме предностите и слабостите на *let-7* и нејзината константна зголемена експресија во туморските и соодветните контралатерални ткива, versus нормалната експресија во здравите ткива, што ја потврди нејзината значајна улога во оралната патогенеза. Зголемената експресија на *let-7*, не беше асоцирана со зголемен ризик од појава на рецидиви и метастази, туку само со времето на преживување, независно од патохистолошките параметри. Зголемувањето на експресијата на *let-7*, е потенцијален предиктивен индикатор за лоша прогноза и зголемена смртност.

➤ mir- 155

Следен избран ген, за понатамошна евалуација беше mir-155, кој во литературата е константно зголемено експресиран. Во обид ја процениме неговата улога во развојот прогресијата, дијагнозата, и во прогнозата на OSCC, прво направивме директна споредба на зададените miRNAs во OSCC туморските примероци, во нормалното контралатерално ткиво и ги споредивме со здравите ткива, со цел да ги измериме нивните, несоодветно регулирани нивоа во OSCC.

Генерираните податоци од резултатите во нашето истражување, за експресија на mir-155, покажаа дека просечната вредност на mir 155, измерена во примероците од туморско ткиво изнесуваше $7,26 \pm 3,21$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $3,83 \pm 4,12$ а во здравите ткива $5,24 \pm 1,88$. Утврдивме дека постои статистички значајна разлика помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на mir 155 (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0002$). Помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза (Mann-Whitney test: $p < 0,0002$) и помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива (Mann-Whitney test: $p < 0,004$), регистриравме статистички значајна разлика, но помеѓу примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива не најдовме статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0618$). Вредностите на mir 155 во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, покажаа значајна корелација (Spearman rang - correlation : $\rho = 0,447$ $p = 0,011$). Кај здравите испитаници, 16 (50%) лица имаа вредности за mir-155 над и под медијаната. Во примероците од туморските ткива, кај 21(66%) лице вредностите на mir-155 беа над 5,42 односно значајно поголеми за $p < 0,004$, од здравите ткива . Високите вредности на mir-155 во оралната мукоза претставуваат значаен ризик фактор, односно, укажуваат на зголемен ризик за појава или постоење на орален карцином (OR = 1,90 CI=95% 1,03 < OR < 6,21).

Односот на mir-155, во туморските и здравите ткива, покажа висок дискриминирачки потенцијал, со сензитивност од 100% и специфичноста од 69% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво.

Квантификацијата на експресијата на mir-155 молекулата во нашиот сет на примероци покажа, силна потврда на резултатите за значајно зголемена експресија во туморите во однос на контралатералната непроменета слuzница (Mann-Whitney test : $p < 0,0002$) и помеѓу примероците од од туморското ткиво и здравите ткива (Mann-Whitney test : $p < 0,004$).

Нашите наоди, не се во согласност само со наодите на Childs³⁵, кој објавил незначителна намалена експресија на miR- 155, во туморите, но тоа се должело на HPV позитивни клетки во OSCC и нормалната слuzница. Сите останати автори Kozaki¹¹⁷ и Courthod⁴³, ги сублимираше студиите за експресијата на веќе функционално потврдените mir-155, предложени како

онкогени во OSCC. Hui⁹⁰, Gombos⁷², Chang²⁹, Ramdas¹⁹⁷ и Lajer CB¹²², регистрирале зголемени експресији на *mir-155* во OSCC и нормалните ткива.

Во своето истражување Gombos⁷², прикажал значајна сензитивност/специфичност од над 90% за *mir-155*, а Chang²⁹ - 100%, што е слично со наодите во нашата студија со сензитивност од 100% и специфичноста од 69% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво.

Во однос на релативните вредности на средните сигнали во нормалните ткива и во туморските ткива, во нашата студија е регистрирана значајна разлика во експресијата на *mir-155* ($p=0,011$). Овие значајни разлики се потврдени од речиси сите останати автори, Rather¹⁹⁸ и Zhao²⁸⁹ и др.

Понатаму, во нашата студија, ја истраживме предиктивната вредност на *miR-155* и клиничкопатохистолошките параметри: pT, pN, TNM и G, утврдивме дека непостои значајна асоцијацијата помеѓу *miR-155* и сите варијабли.

Во корелација со клиничко-патохистолошките параметри во нашата студија експресијата на *miR-155*, не покажа асоцираност со pT, pN, TNM и G стадиумите, што е во согласност со наодите на Childs³⁵, Rather¹⁹⁸ и Chang²⁹, кои нотирале дека, влијание на зголемената експресија, не е во корелација со патолошките параметри. Во овој контекст, Scapoli²²⁰, покажал инверзна корелација помеѓу надолната експресија на *mi-155* и pN, во прогресијата на метастските тумори, независно од локализацијата.

Спротивни на нашите наоди се наодите на Zhao²⁸⁹, кој во својата студија, ги утврдиле релативните вредности на *mir-155* во OSCC, кои во корелација со патохистолошките параметри, регистрирале дека нивото на *mir-155* во напредните стадиуми T3- T4 биле повисоки, споредени со раните стадиуми T1-T2 и пропорционално зголемени во G2-G3, во однос на G1. Исто и Ni¹⁷⁴, пријавиле значително зголемување на експресијата на *mir-155* во корелација со хистолошкиот стадиум и заклучил дека оваа корелација, би можела да се користи како потенцијален прогностички биомаркер, што не се совпаѓа со нашите наоди.

Во нашето истражување, времето на преживување во однос на експресијата на високите *miR-155* нивоа, покажа гранична статистички значајна разлика ($p = 0,060611$). Во расположивата литература, најдовме само два труда кои ја истражувале корелацијата на *miR-155* нивоа, со појавата на локални рецидиви и времето на преживување, кои се спротивни на нашите наоди. Студијата на Rather¹⁹⁸ објавила силна корелација со лошата прогноза и смртниот исход, па дури го предложила овој ген, погоден за таргетирана терапија. Во овој контекст и Shi²²⁹, ја потврдил *miRNA-155*, со значително повисока експресија кај OSCC, како независен прогностички показател за OSCC прогресијата и предвидувањето на лоша прогноза кај пациенти со OSCC.

Зголемувањето на експресиите на *miR-155* влијае на нормалните биолошки процеси кои доведуваат до малигна трансформација на OSCC. Нашата студија идентификува зголемена експресија на *miR-155*, во туморските и контралатералните ткива, споредбено со здравата слезница и ја потврди оваа *miRNAs* како важен регулаторен механизам во оралната туморогенеза и функционално потврдување на *mir-155*, предложени како онкогени во OSCC.

Во однос на улогата на *miR-155*, во развојот и прогресијата на оралниот карцином, како и нејзината прогностичка вредност во

предвидување на исходот од болеста, miR-155 не се покажа како значаен маркер во прогресијата и прогнозата на OSCC.

➤ miR-31

Како уште едно дополнување и потврдување на miRNAs, во нашето истражување ја избравме и miR-31, претходно предложена како онкогена microRNA молекула, специфична за OSCC.

Последователно ги анализиравме туморски примероци и соодветните нормални контралатерални биопсии во споредбена анализа со мирна нивоата во здравите ткива и потврдивме статистички значајна разлика помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на miR-31 (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$).

Анализата на резултатите за просечната вредност на miR-31 во примероците од туморско ткиво, во нашето истражување, покажаа $9,98 \pm 2,51$; во контралатералната орална мукоза $5,73 \pm 3,89$ а во здравите ткива $8,14 \pm 1,98$. Наод на значајни нивоа беа најдени во компарацијата помеѓу OSCC и контралатералните ($p < 0,0001$; Spearman rang - correlation : $p = 0,362$ $p = 0,042$); помеѓу туморските и здравите ткива ($p < 0,002$) и помеѓу примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива ($p < 0,01$).

Квантификациската анализа на нивоата на експресијата на miR-31 молекулата во нашите примероци, покажа потврда на резултатите за значително зголемување на експресијата во туморите во однос на здравите ткива. Кај примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на miR-31 изнесува 7,43. Здравите испитаници, 16 (50%) имаа вредности за miR-31 над и под медијаната, а во туморските ткива кај 25 (81%), вредностите на miR-31, се над 7,43 односно значајно поголеми за $p < 0,002$. Високите вредности на miR-31 во оралната мукоза, се покажаа како значаен ризик фактор, кој укажува на зголемен ризик за појава / постоење на орален карцином (OR = 3,57 CI=95% 1,204 < OR < 10,59).

Во нашето истражување разликите во зголемувањето на експресиите на miR-31, покажаа висок дискриминирачки потенцијал, со сензитивност од 100% и специфичност од 56% во разликување на туморските од здравите ткива, што значи дека miR-31 со 100% сигурност ги детектира вистина позитивните туморските ткива, а со сигурност од 56% ги детектира вистина негативните здрави ткива.

Во однос на контралатералните ткива експресијата на miR-31 во туморските примероци, утврдивме дека е за 1,9 пати поголема од здравите ткива. miR-31 покажа сензитивност од 81% и специфичност од 100% во разликувањето на контралатералните од здравите ткива. Во нашата студија, miR-31 покажа значајно зголемена експресија, што ја потврди нејзината улога како онкогена молекула, во процесот на малигната трансформација и карциногеза.

Нашите наоди се согласни со претходните студии- на значително повисоки нивоа на изразување miR-31 во туморите, објавени од страна на Brian³⁴, Liu¹³⁶, Wang²⁶², Wong²⁶⁷, Kozaki¹¹⁷ и Shiiba²³⁰, кои ја резимирале miR-31 зголемената експресија и поради фактот дека досега не била пријавена ниту една студија, што го покажала спротивното, ја предложила miR-31 за востановен потенцијален биомаркер, иако неговата функцијата во

Прогностичка сигнификантност на DNA метилација и нивото на тумор супресивни miRNA кај оралниот карцином

туморигенезата на OSCC останува сеуште неразјаснета. Досега највисоко експресирана miR-31, која била зголемена за 6,9 пати во туморските ткива во однос на здравите ткива била објавена од страна на Fischer⁶¹. Разликите во квантитативниот дел на експресија на нивоата на miR-31, во студиите на Siow MY,²³⁴ била: $2,1 \pm 0,9$ наспроти $3,8 \pm 1,2$, $p < 0.001$); Lajer¹²² објавил $P < 0.01$ and $q < 0,06$ за 31 miRNAs помеѓу OSCC и контролните примероци; а резултатите Ouyang¹⁸⁴ покажале дека експресијата на microRNA молекула-31, била значително повисока во туморските ткива од оние во соседните ткива ($p < 0.05$).

Liu¹³⁶, користејќи ги анализите на поврзани парови, регистрирал значително зголемена експресија на miR-31 во OSCC и во напредната возраст. Во мерењата на нивото на miR-31 по туморската ресекција, утврдил дека доаѓа до намалување на нивните нивоа, со што потврдил дека овој маркер, може да има клинички корисен пристап, како нов биомаркер во дијагнозата на OSCC.

Во нашето истражување разликата во зголемата експресија на miR-31 покажа висока дискриминаторски потенцијал, со сензитивност од 100% и специфичност од 56% во разликувањето на туморот од здравите, вредност која се разликува од дијагностичката вредност на туморските ткива, во истражувањето на Chang²⁹ и Siow²³⁴, кои нотирале 89% вредност во дијагнозата на туморските ткива и Ouyang¹⁸⁴, со дијагностичка сензитивност од 70,4% за различните експресији на miR-31 во оралниот карцином (OSCC) и во нормалните ткивни примероци.

Зголемувањето на експресијата на miR 31 во туморските и контралатералните ткива, во нашата студија ја потврди нивната способност за предвидување на потенцијалот за разликување на карциномите од нормалните ткива и нивниот голем потенцијал во дијагностицирањето на карциномите.

Понатаму во истражувањата на предиктивната вредност на miR-31, во корелација со клиничкопатохистолошките параметри: pT, pN, TNM и G, утврдивме дека непостои значајна асоцијацијата помеѓу експресиите на miR 31 и клиничко-патохистолошките варијабли: pT, pN, TNM и G. Нашата студија, е во ранг на наодите на Lajer¹²², а спротивна на студиите на Ouyang¹⁸⁴ и Serrano²²⁴, кои нотирале дека, влијанието на зголемената експресија на microRNA-31, била поврзана со појавата на метастази во лимфните јазли и клеточната диференцијација, кај пациентите со OSCC, а не со: полот, возраста, големината на туморот и локализацијата, што не беше случај и во нашата студија. Спротивно на сите студии е истражувањето на Siow²³⁴, кој потврдил, значајни асоцијации со сите патохистолошки параметри.

Во нашата студија, во однос на појавата на метастази и рецидиви ($p = 0,491864$) и времето на преживување во однос на експресијата на во однос на високите miR-31 нивоа, регистриравме дека непостои статистички значајна разлика ($p = 0,315895$). Во расположивата литература, најдовме само два труда кои ја истражувале корелацијата на miR 31 со клиничките параметри и тие не беа во ранг на нашите наоди Siow²³⁴ и Soga²³⁸. Тие објавиле, силна асоцираност на miR-31 експресијата со статусот на повторување на болеста/рекурентност ($p = 0.01$), со прогресијата ($p = 0.01$) и смртниот исход ($p = 0.006$) на пациенти.

Во нашата студија, miR 31 покажа значајна зголемена експресија во туморските и контралатералните ткива, со што ја потврдивме нивната способност во предвидување на потенцијалот за детекција на

оралниот карцином. Високиот дискриминирачки потенцијал во разликувањето на тумор од нормалното ткиво, со сензитивност од 100% и специфичност од 56%, ја потврди неговата предиктивна вредност како онкогена молекула во оралната карциногенеза, независна од неговата прогресивна и прогностичка вредност.

> mir-211

Една од miRNA дерегулираните молекули инволвирани во онкогените клеточни процеси, специфични за OSCC е и mir-211, која беше селектирана за понатамошно истражување во нашата студија. Нејзините аберантни експресији, досега е објавено дека се поврзани со специфични клинички фенотипови како што се прогресијата на болеста, појавата на локални рецидиви и метастази, како и нејзината прогностичка вредност во стапката на преживување и зголемена смртност.

Нашата студија, истражувајќи ја полезноста на mir-211 како дијагностичка и прогностичка алатка и како потенцијален биомаркер во оралната карциногенеза, последователно ги анализира туморските и соодветните нормални примероци, во споредбена анализа со мирна нивоа во здравите ткива. Утврдивме статистички значајна разлика помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на mir-211 (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$). Добиената просечната вредност на mir-211 во примероците од туморско ткиво изнесуваше $-11,68 \pm 4,72$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $-6,13 \pm 5,19$, а во здравите ткива $-14,66 \pm 3,21$. Наоди на значајно зголемени експресији на mir-211, беа утврдени во компарација помеѓу OSCC и нормалните

Ткива (Mann-Whitney test $p < 0,0001$); помеѓу туморските и здравите ткива (Mann-Whitney test : $p < 0,011$) и помеѓу примероците од нормалната оралната мукоза и здравите ткива (Mann-Whitney test: $p < 0,0001$ -статистичка значајност).

Квантификациската анализа на експресијата на mir-211 молекулата во нашите примероци, покажа потврда на резултатите за значително зголемување на експресија во туморите во однос на здравите ткива, со наод на над $-14,83$ во примероците од туморските ткива односно значајно поголеми за $p < 0,011$ во однос на здравите испитаници. Односот на mir-211, во нашата студија, покажа висока сензитивност од 100% и специфичност од 69% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво. Тоа значи дека mir-211 со 100% сигурност ги детектира вистина позитивните – туморските ткива, а со сигурност од 69% ги детектира вистина негативните – здравите ткива.

Во однос на контралатералните ткива, експресијата на mir-211 во туморските примероци, беше намалена за 1,4 пати.

Нашите наоди беа конзистентни со претходните студии на Gorenchtein⁷⁷, Ganci⁶⁶, Liu¹³⁹, Veerla²⁵⁹, Garzon⁶⁹, Shiiba²³⁰, Lindenbergh-van der Plas¹³⁴ и Mydlarz¹⁶⁸, кои потврдило значително зголемување на експресија во туморските и контралатералните ткива, во однос на здравите ткива.

Досегашните сознанија за miR-211, како потенцијален биомаркер во оралната карциногенеза, ги потврдил и Chang²⁷, кој во својата студија ги истражил клиничките и функционалните импликации на miR-211 во OSCC и потврдил дека miR-211 ја губи својата експресија во неоплазмите, вклучувајќи го и OSCC (Natrajan¹⁷²; Lipton и Tomlinson¹³⁵; Poetsch и Kleist¹⁸⁹). (81%) од примероците на OSCC, покажале намалување на експресијата на miR-211. Останатите тумори покажале повисоки miR-211 експресији од соодветните не-канцерозни примероци од слезница. Исто и во студијата на Hui⁹⁰, miR-221 не била значително експресирана и затоа не ја обсервирале понатаму; Последните два наоди се спротивни на нашите резултати.

Во нашето истражување односот на miR-211 експресиите во туморските и здравите ткива, покажа висок дискриминаторски потенцијал во разликувањето на туморското од нормалното ткиво, со сензитивност од 100% и специфичноста на 69% во предвидување на потенцијалот за малигна трансформација и потврдување на нивната улога во оралната карциногенеза. Mydlarz¹⁶⁸, утврдил многу поголема прогностичка вредност на miR-211 во споредба со нашите резултати, со сензитивност и специфичност од 92% и 93% во предвидување на OSCC. Бидејќи miR-211, покажаа значајна зголемена експресија во туморските и контралатералните ткива, нашата студија ја потврди нивната способност и во разликување на карциномите од нормалните ткива.

Понатаму, во нашата студија, истражувајќи ја предиктивната вредност на miR-211 во однос на: pT, pN, TNM и G, утврдивме дека непостои значајна асоцијацијата помеѓу miR-211 и патохистолошките варијабли. Измерените вредности во примероците од примарниот тумор, помеѓу експресијата на micro RNA-211 молекулата и големината на примарниот тумор (Spearman = -0,175 p=0,3359), pN - статусот при интервенцијата (Spearman = -0,030 p=0,8685), стадиумот на болеста (Spearman = 0,080 p=0,6620) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,156 p=0,3910), покажаа дека непостојат значајни корелации, во однос на традиционалните патохистолошки параметри.

Овие наши резултати се подржани од страна на Hui⁹⁰, а се спротивни на наодите на Garzon⁶⁹, Ganci⁶⁶, Shiiba²³⁰, Mydlarz¹⁶⁸ и Chang²⁷, кои нотирале дека, зголеменото ниво на miR-211 има голема прогностичка вредност во корелација со N2, а Lindenberg-van der Plas¹³⁴, регистрирал дека зголемената експресија miR-211, пропорционално расте со зголемување на степенот на трансформација, во напредните стадиуми на малигната прогресија.

Во нашата студија, со мултиваријантната анализа на зголемената miR-211 експресијата во однос на појавата на метастази и рецидиви (p=0,666484) и времето на преживување (p=0,285220), утврдивме дека непостои статистички значајна разлика. Меѓутоа, во Cox-ова регресија во која зависната варијабла беше времето на преживување во месеци по интервенцијата, а предикторна варијабла беа квантитативните податоци за експресијата на miR-211 молекулите во туморските примероци, со парцијалните корелации, miR-211 (p=0,0312), се покажа статистички значајна предикторска вредност. Со ова утврдивме дека, зголемената

експресија во туморското ткиво, во однос на времето на преживување ја потврди, неговата улога како значаен лош прогностички показател.

Во расположивата литература, сите истражувања за корелацијата на miR-211 нивоата и клиничките параметри (Liu¹³⁹, Ganci⁶⁶; Gorenchtein⁷⁷; Lipton и Tomlinson¹³⁵; Garzon⁶⁹ и Shiiba²²⁹), беа во ранг на нашите наоди. Сите овие автори, сумирајќи ја листата на miR-211 нивоата во туморските клетки, ја евалуирале зголемената експресија на miR-211 во ткивата со OSCC и ја потврдиле нивната асоцираност со лоша прогноза и смртниот исход.

Нашата студија истражувајќи ја полезноста на miR-211 како дијагностичка и прогностичка алатка и како потенцијален биомаркер во оралната карциногенеза, ја утврди нејзината потенцијална улога во развојот и прогнозата на оралниот карцином.

Во нашата студија miR 211 покажаа значително зголемување на експресијата и висок и потенцијал во разликувањето на туморските од нормалните ткива, со што ја потврдивме нивната значајна улога во туморогенезата на оралниот карцином. Зголемената експресија на miR-211 забележана во оралниот карцином, во нашата студија, покажа дека е инволвирана во онкогените клеточни процеси и е добар прогностички фактор за вкупното преживување. Промените на miR-211, во нашата студија ја потврдија оваа молекула, дека е поврзана со специфични клинички фенотипови, како предикторен фактор во постоперативното преживување, независно од патохистолочките параметри. Поради неговата значајност во оралната карциногенеза, голем број на студии ја истражуваат полезноста на miR 211 како дијагностичка и прогностичка алатка и како потенцијален медиум за терапевтски цели.

➤ miR-133b

Во нашето истражување се обидовме да ја процениме и улогата на miR-133b во развојот, прогресијата, дијагнозата и прогнозата на OSCC. Направивме директна споредба на miR-133b, во OSCC туморските примероци, во нормалното контралатерално ткиво и ги споредивме со здравите ткива, со цел да ги измериме нивните, несоодветно регулирани нивоа во OSCC.

Според генерираните податоци за нивоата на експресија на miR-133b, утврдивме статистички значајна разлика помеѓу трите испитувани групи на примероци, во однос на средните вредности на miR-133b (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$).). Добиената просечната вредност на miR-133b во примероците од туморско ткиво изнесуваше $-1,57 \pm 5,11$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $5,84 \pm 4,33$ и во здравите ткива $-0,02 \pm 0,03$.

Помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива, не резистриравме статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,087$). Експресиите на miR-133 во OSCC и здравите ткива, беа значајно

намалени во однос на нормалните, контралатерални ткива. Во нашата студија утврдивме дека постои значајна разлика помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза (Mann-Whitney test : $p < 0,002$) и помеѓу примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$).

Претходните објавени студии на Kolokythas¹¹², Mascolo¹⁵⁴, Wong²⁶⁶, Lessa¹³⁰, Kozaki¹¹⁷, Wiklund²⁶⁶, Childs³⁵ и Shiiba²³⁰ ги потврдиле нашите резултати и во своите интегративни прегледи, забележале дека *mir-133b* биле со тренд на постојано намалување на експресијата ($1,05 \pm 0,63$ наспроти $2,92 \pm 0,98$, $p < 0,0010$, сугерирајќи ја нивната улога во туморогенезата и прогресијата на OSCC поточно, карциномот на јазик. Студијата на Childs³⁵, била цитирани од повеќе автори, поради сеопфатниот преглед на дисрегулираните *mir-133b* во оралната, ларингеалната и фарингеална слузница. Добиените резултати покажале значително различни експресии на *miRNAs* ($P < 0,05$) во туморските ткива, со позитивни експресији во другите две локализации, наспроти намалената експресија во оралната лигавица, со вредност за оралниот карцином $SE^* = -2,57$ ($1,38$), споредено со контролните примероци со $SE^* = 5,00$.

Интересот за дисрегулацијата на *mir-133* молекулите во HNSCC/ OSCC, се покажал во трите последователни студии на Wong^{265, 266, 267}, во кои потврдил дека тие се намалено експресирани во туморските клетки, во споредба со нормалните епителни клетки $p = < 0,001$, исто како во нашата студија.

Mutallip¹⁶⁶ и Cervigne²³ ги издвоила *mir-133b* и прикажале дека значително се намалено експресирани во туморите, во однос на здравите ткива, но со значително пропорционално намалување во туморските ткива, што укажува дека тие би можеле, да бидат рани дијагностички биомаркери за оралниот карцином. Во нашето истражување, во корелациите меѓу трите групи на примероци, единствено вредностите на *mir-133b*, помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, не покажаа значајна корелација (Spearman rang - correlation : $p = 0,213$ $p = 0,240$), што укажува на фактот на менување на целата орална мукоза, под влијание на константна изложеност на епигенетските влијание и контакт со молекуларните промени во малигната туморогенеза.

Во нашето истражување експресијата на *mir-133b* молекулата во нашите примероци не покажа потврда на резултатите за значително зголемена експресија во туморите во однос на здравите ткива. Кај примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на *mir-133b* изнесуваше $-0,01$. Кај здравите испитаници, 21(66%) лице имаше вредности за *mir-133b* над, а 11 (34%) под медијаната. Во примероците од туморските ткива, кај 18 (56%) лица вредностите на *mir-133b* беа над $-0,01$ при што немаше значајна разлика во однос на средните вредности измерени во здравите ткива за $p < 0,087$. Вредностите на *mir-133b* во оралната мукоза кај нашите пациенти, не претставуваат ризик фактор, односно, не укажуваат на ризик за постоење на орален карцином ($OR = 0,67$ $CI = 95\%$ $0,24 < OR < 1,84$).

Односот на *mir-133b* покажа сензитивност од 86% и специфичност од 100% во разликувањето на туморот од нормалното ткиво. Тоа значи дека *mir-133b* со 86% сигурност ги детектира вистина позитивните –

туморските ткива, а со сигурност од 100% ги детектира вистина негативните – здравите ткива.

Експресијата на miR-133b во туморските ткива регистриравме дека е намалена 1,6 пати, во однос на контралатералните ткива во нашиот сет на примероци.

Во контралатералните примероци, кај 29(91%) лица вредностите на miR-133b беа над -0,01 а средните вредности беа значајно повисоки во однос на средните вредности кај здравите лица за $p < 0,0001$. MiR-133b покажа сензитивност од 100% и специфичност од 73% во разликувањето на здравото ткиво.

Идентификацијата на намалената експресија на miR-133, покажа несоодветно профилирање во OSCC и контралатералните ткива во споредба со здравите ткива. Во нашиот сет на примероци miR-133b не покажа значајна промена на експресијата, помеѓу туморското и здравото ткиво, поради што miR-133b не се потврдија како значаен предиктивен фактор во детемтирање на OSCC и не претставуваат ризик фактор, односно, неукажуваат на ризик за постоење на орален карцином ($OR=0,67$ CI=95% 0,24 < OR < 1,84).

Наодот на сигнификантно намалена експресија на miR-133b беше потврдена во компарацијата помеѓу OSCC и контралатералните ткива и помеѓу контралатералните и здрави ткива, со што ја потврдивме неговата улогата на онкогена молекула во оралната карциногенеза. Значајно зголемената експресија во нормалното, контралатерално ткиво, во однос на здравите ткива, укажува на фактот на менување на целата орална мукоза, под влијание на константна изложеност на епигенетските влијание и контакт со молекуларните промени во малигната туморогенеза.

Во корелација со клиничкопатохистолошките параметри во нашата студија, експресијата на microRNA-133b молекулата, со стадиумот на болеста (Spearman = -0,029 $p=0,8739$) и клеточната диференцијација на карциномот – G (Spearman = -0,115 $p=0,5272$) не покажа значајни корелации.

Помеѓу големината на примарниот тумор и експресијата на miR-133b постои значајна позитивна корелација (Spearman = 0,472 $p=0,0063$), што значи дека експресијата расте со растењето на примарниот тумор. Помеѓу pN - статусот и експресијата на microRNA-133b постои значајна позитивна корелација (Spearman=0,406 $p=0,0210$), односно, експресијата расте со растењето на степенот на pN и највисока е кај пациентите со pN3.

miR-133, покажа значајна асоцираност со pN-статусот ($p=0,0210$) во туморските клетки, со pT- стадиумот во туморските клетки со ($p=0,0063$) и во контралатералните ткива ($p=0,0418$). Нашите резултати во однос на другите патохистолошки параметри, TNM и G стадиумите, не покажаа значајна корелација. Со ова, ја потврдивме позитивната корелација на miR-133b, со големината на примарниот тумор и метастазирањето, што претставува важен инструмент за прогностички анализи и нови перспективни разбирања на клеточната малигна трансформација.

Во однос на патохистолошките параметри, нашите наоди се во ранг на наодите на Lessa¹³⁰, Ganci⁶⁶ и Chen³², кои објавиле дека експресијата на miR-133b во туморските ткива може да се користат за предвидување на прогресијата и развојот и прогнозата на пациенти со HNSCC. Ganci⁶⁶, објавила значајна асоцијација со повисоките експресији на miR-133 и најнапредните pN-фази на вратни метастази.

Спротивни на нашите наоди се наодите на Childs³⁵, каде прогностичкото влијание miR-133 за времето на преживување и смртноста ја потврдиле како независен маркер од патохистолошките параметри, кои се покажале незначајни во неговото истражување.

Во нашата студија времето на преживување во однос на експресијата на високите miR-133 нивоа, покажа статистички значајна разлика ($p = 0,0128$), но не и со појавата на локални рецидиви и метастази ($p = 0,176469$).

Во расположивата литература, најдовме само два труда кои ја истражувале корелацијата на miR-133 и нејзиното прогностичко значење, при што нашите резултати се конзистентни со наодите на Ganci⁶⁷ и Chang²⁹, кои пониските експресији на miR-133, ги посочиле како предиктивен маркер за напредните pN-фази, вратни метастази и лоша прогноза. Во сеопфатната студија, Lessa¹³⁰, прикажал идентични резултати, со претходните автори т.е. намалени експресији на miR-133 во OSCC. Исто и Chen LH.³² со сор. (2010), ги проучувале ектопичните изразувања на тумор-супресивните miR-133 (miR-133a, miR-133b) и прикажале нивна намалена експресија во туморските ткива, што може да се користи за предвидување на прогнозата на пациенти со HNSCC.

Идентификацијата на намалената експресија на miR-133, покажа несоодветно профилирање во OSCC и контралатералните ткива во споредба со здравите ткива, што ја потврдува како значаен механизам во оралната карциногенеза. Намалената експресија на miR-133 укажува на зголемен ризик од прогресија, инвазија на туморите и метастазирање. Прогностичкото влијание на намалените вредности на miR-133 во туморите, се покажало како значаен индикатор за лошата прогноза и смртноста.

Нашата студија истражувајќи ја улогата на miR-133 како потенцијален биомаркер во оралната карциногенеза, ја потврди неговата функција во развојната и рана патогенеза на оралниот карцином. Неговата предиктивна вредност, беше потврдена и во прогресијата, развојот, агресивноста и прогнозата на туморите, како најзначаен во нашата студија.

Резултатите од акумулираните податоци во нашата студија, ја потврдија miR-133 како еден од највредните биомаркери во нашето тековно OSCC истражување. Во текот на последните години, овој тренд на истражувачко поле еволуира во насока на истражување на молекуларната мрежи и врските помеѓу miR-133 и сигналните патишта кои се вклучени во прогресијата на OSCC.

➤ mir- 125

Во нашата студија направивме и сеопфатна идентификација на mir 125, една од најчесто експроатираниите, различно транскрибирани miRNAs во OSCC.

Добиените резултати за mir 125 избраните гени, во нашата студија покажаа зголемена експресија во туморските и контралатералните ткива и во понатамошната евалуација се обидовме да ја процениме нивната улога во прогресијата, дијагнозата, и во прогнозата на OSCC.

Направивме директна споредба на зададените miRNAs во OSCC туморските примероци, во нормалното контралатерално ткиво и ги споредивме со здравите ткива, со цел да ги измериме нивните, несоодветно регулирани нивоа во OSCC и евентуално да ги потврдиме како соодветни маркери во дијагнозата и карциногенезата.

Во анализата на генерираните податоци добивме дека просечната вредност на mir 125a во примероците од туморско ткиво изнесуваше $2,58 \pm 3,41$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $3,32 \pm 4,07$ а во здравите ткива $-2,29 \pm 0,94$. Утврдивме статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$), помеѓу трите групи на примероци, во однос на средните вредности на mir 125. Помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза не најдовме значајна разлика (Mann-Whitney test: $p < 0,262$), во утврдување на вредноста на mir 125 (Spearman rang - correlation : $p = 0,415$ $p = 0,019$) помеѓу истите примероци утврдивме дека постои значајна корелација. Во однос на корелацијата помеѓу туморското ткиво и здравите ткива (Mann-Whitney test: $p < 0,0001$) и примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива (Mann-Whitney test: $p < 0,0001$), утврдивме дека постои статистички значајна разлика.

Во примероците од туморските ткива, кај 29(91%) лица вредностите на mir-125a потврдивме дека се над $-2,03$ односно значајно поголеми во однос на здравите ткива за $p < 0,0001$. Високите вредности на mir-125a во туморските ткива претставуваат ризик фактор, односно, укажуваат на голем ризик за постоење на орален карцином (OR=5,8 CI=95% 1,44 <OR< 23,22). Во контралатералните примероци, кај 28(88%) лица вредностите на mir-125a беа над $-2,03$ а средните вредности беа значајно повисоки во однос на средните вредности кај здравите лица за $p < 0,0001$. Односот на mir-125a покажа зголемување на експресијата во идентификација на туморските ткива со специфичност од 75%.

Квантификацијата на експресијата на mir 125a молекулата во нашиот сет на примероци покажа, силна потврда на резултатите за значајно зголемена експресија во туморите во однос на контралатералната непроменета и здравата слuzница, што ја потврдува нејзината значајна улога во оралната карциногенеза и малигната трансформација.

Kolokythas¹¹², во својата сеопфатна студија, со цел да ги идентификува специфичните microRNA за оралниот карцином, ја потврдиле намалената експресија на microRNA – 125, во оралниот карцином, со специфичност од 93%, која во нашата студија, беше измерена со помала вредност, 75% во разликување на ткивата со зголемената експресија на miR-125a. Во пребарувањето на литературата посветена на miR 125a, најголем број на автори го потврдиле трендот на намалување на нејзината експресија, асоцирана со туморогенезата, што е спротивно на нашите наоди, за константно зголемена експресија на miR 125a, во туморските и контралатералните ткива. Намалено експресираната miR 125a, во клетките на туморите и нормалното ткиво, со значајни корелации, била потврдена од страна на голем број автори. Така на пр. студијата на Hui⁹⁰, ги презентирала нивоата на експресија на miR 125, во нормалната мукоза 0,12, споредбено со оралниот карцином, со намалена експресија од -2,45. Локализацијата не била асоцирана со нивото на експресија, бидејќи сите тумори од различни локалитети во оралната празнина: подот на уста, јазик, букална мукоза, алвеоларен гребен, ретромоларно, имале слично намалена експресија. Ова било потврдено и во студијата на, Wiklund²⁶⁴, Peng¹⁸⁵, Tran²⁵⁵, Kolokythas¹¹¹, Childs³⁵, Shiiba²²⁹ и Sun²⁴⁴, кои потврдиле дека нивоата на експресија на miR-125b биле значајно намалени во клетките на оралниот карцином, споредбено со контролните нормални ткива.

Останата, група на автори, во своите студии објавиле зголемена експресија на miR-125 (Chang²⁹, Henson⁸⁶ и Ramdas¹⁹⁷) во туморските наспроти нормалните и здравите ткива, наоди кои се во согласност со нашите резултати. Henson⁸⁶ ова го објаснил дека најверојатно се должи на различните методологии кои биле користени за добивање на податоците за експресијата. Не конзистентните наоди, можеби биле и поради примероците од туморите, добиени од различни локализации: од орофарингс, хипофарингс, ларингс и орален карцином. Меѓутоа и Wong²⁶⁶ и Tran²⁵⁵, со користење qPCR, истата методата како во нашето истражување, и земени примероци од јазик, како и најчестата локализација на примероците во нашата студија, сепак утврдиле дека miR-125b биле намалено експресирани во OSCC.

Во нашата студија потврдиле значајна корелација, само помеѓу зголемувањето на експресијата на miR-125a во контралатералната слузница и стадиумот на болеста (Spearman=0,408 p=0,0201), односно, експресијата расте во напредните стадиуми на болеста.

Нашите наоди се во согласност со наодите на Shiiba²²⁹, која објавила дека експресијата на miR-125, била значително помала во напредните стадиуми (III, IV), за разлика од почетните стадиуми (I - II), како и во нашата студија. Исто и Peng¹⁸⁶, открил дека, намалувањето на експресијата доведува до зголемување на ризикот на пациентите во pT3-4 болест и PN +, или пациенти во напредната патолошка фаза. Овие наоди сугерираат дека зголемената експресија на miR-125, била поврзана со забрзана клеточна пролиферација и со намалена контрола на прогресија на карциномите.

Во нашата студија времето на појава на локални рецидиви и метастази, постоперативно (p = 0,145877) како и времето на преживување

($p = 0,275133$) во однос на експресијата на високите miR-125 нивоа, не покажа статистички значајна разлика.

Во расположивата литература, најдовме само два труда кои ја истражувале оваа корелацијата. Peng¹⁸⁶, ги издвоил, од сите регулирани miRNAs, само miR-125 се покажала како значаен прогностички фактор: во предвидувањата на контрола на вратните метастази, времето на преживување без болест и вкупното преживување ($OR = 4.464$, $p = 0.023$). Кај пациенти со OSCC, во pT3-4 стадиум, miR-125 експресијата имала значајно влијание врз локалната контрола ($p = 0.018$). Во неговата студија пациентите по повеќе намалена експресија на miR-125b, имале поголем ризик за лош исход и лоша прогноза, во присуство на специфичните фактори на ризик (p-фаза III-IV, pT3-4 или PN +), што не беше случај и во нашата студија. Меѓутоа, може да назначиме дека во неговата студија ниската експресија е асоцирана со лоша прогноза, што значи дека во нашата студија инверзно поставени овие две варијабли, т.е. растечкиот тренд на експресија на miR-125b, го смалува ризикот од појава на локални рецидиви и метастази и го подобрува времето на преживување.

Зголемената експресија на miR-125, во туморите и контралатералните ткива, во однос на здравите, уште еднаш ја потврдија неговата улога во малигната трансформација што укажува на фактот на менување на целата орална мукоза под влијание на константна изложеност на епигенетските влијание и контакт со молекуларните промени во малигната туморогенеза.

Улогата на miR-125 како потенцијален биомаркер во прогресијата и прогнозата на оралниот карцином, не се покажа како значаен прогностички фактор.

➤ miR-137 и miR-193

Меѓу сите кандидати, предложени miRNAs, во контекст на OSCC ги издвоивме и miR-137 и miR-193, кои заедно ќе бидат претставени во нашата студија, бидејќи во најголем број на истражување тие одат во пар, како намалено експресирани.

Во неодамнешните студии на Lessa¹³⁰, Langevin¹²⁵, Kolokythas¹¹² и Kozaki¹¹⁷, функцијата на овие две miRNAs, miR-137 и miR-193, биле замолчени со ДНК хиперметилацијата. Овие епигенетски влијанија, со замолчување на ектопичната трансфекција на miR-137 и miR-193 во OSCC ја намалува нивната експресија, што не беше цел на нашето истражување. Меѓутоа со ова можеби ќе ја отфрлиме хипотезата на намалување на експресијата на miR-137 замолчени од ДНА метилацијата, бидејќи наодот на зголемување на експресијата кај карциномите во нашата студија, го отфрла овој механизам, како можен начин на малигна трансформација.

Како значително намалено експресирани во примарниот OSCC во споредба со здравите биоптични ткива, тие се етаблирани во повеќе студии, а можеби се и едни од главните фактори на редукција на пролиферацијата на клетките, алтерирање на глобалната генска експресија и иницирање и прогресија на оралниот карцином.

Во нашето истражување се обидовме да ја процениме нивната улога во прогресијата, дијагнозата, и во прогнозата на OSCC. Направивме директна споредба на зададените miRNAs, како и за сите претходни, во туморските примероци, во нормалното контралатерално ткиво и ги споредивме со здравите ткива, со цел да ги измериме нивните, несоодветно регулирани нивоа во OSCC. Генерираните податоци за сите нивоа на експресија на miR-137 и miR-193, беа искажани, одделно за двете miRNAs, како зголемени или намалени во споредба со медијаната, добиена од нивоа на експресија од здравите ткива.

- miR-137

Добиените резултати од анализата покажаа дека просечната вредност на miR 137 во примероците од туморско ткиво изнесуваше $-4,88 \pm 4,20$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $-5,83 \pm 3,66$ и во здравите ткива $-10,55 \pm 2,57$. Во однос на средните вредности на miR 137, помеѓу трите испитувани групи на примероци, утврдивме статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$). Значајна разлика беше најдена помеѓу примероците од туморското ткиво и здравите ткива постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$) и помеѓу примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива постои (Mann-Whitney test : $p < 0,0001$). Разликата не беше значајна помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза (Mann-Whitney test: $p < 0,452$), потврдено и со (Spearman rang-correlation : $p = 0,320$ $p = 0,074$ при утврдување на вредноста помеѓу miR 137 во примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза, непостои значајна корелација.

Во примероците од туморските ткива кај 30(94%), вредностите на miR-137 беа над $-10,55$ односно значајно поголеми за $p < 0,000$. Вредностите на значајното намалување на експресијата на miR-137 во оралната мукоза, претставува голем ризик фактор, односно, укажуваат на голем ризик за постоење на орален карцином (OR=13,23 CI=95% 2,69 <OR< 64,95).

Вредноста на намалувањето на трендот на експресија на miR-137 покажа висока сензитивност од 100% и специфичност од 87% во потврдување на туморот во однос на здравото ткиво. Квантификацијата на експресијата на miR 137 молекулата во нашиот сет на примероци покажа, силна потврда на резултатите за значајно намалување на експресија во туморите и контралатералната непроменета слезница во однос на здравите, што ја потврдува нејзината улога во оралната карциногенеза и малигната трансформација.

Нашите наоди се потврдени во студијата на Wiklund²⁶⁵, каде miR-137 експресивните модели, биле конзистентни во здравите контролни примероци, но многу променливи и во туморот и ткивата земени од соседните примероци, со што се потенцира хетерогеноста на туморот. Главната miR-137 дерегулација, во нашата студија (намалување на експресијата во туморските ткива и нормалните, во однос на здравите експресија) се одвивала при туморската прогресија на карциномите.

Suzuki²⁴⁶, ги истражувала *mir-137* и нивната метилација која за првпат била забележана во оралниот карцином рак од страна на Kozaki¹¹⁷ и последователно биле пријавени во дебелото црево и карциномот на желудник, од кога и расте интересот за аберантните експресији на *mir-137*, дури ги потврдува како можни клучни играчи во прогресијата на оралниот карцином, што не беше потврдено во нашето истражување.

Во консултираната литература, Kozaki¹¹⁷, Liu¹³⁹, Shiiba²³⁰, Avissar⁶, Suzuki²⁴⁶, Wiklund²⁶⁵, Chen³⁰, Wong²⁶⁶, истражувајќи ги овие корелации утврдиле намалени експресији кај оралните карциноми, што ги прави конзистентни со нашите наоди. Во литературата, само интегративниот преглед на Wong²⁶⁶, покажал дека *mir-137* молекула сама по себе, небила значајна за карциногенезата, туку метилационниот статус на *mir-137* промоторот имал поголема потенцијал на клиничка вредност.

Во корелација со клиничко-патохистолошките параметри во нашата студија експресијата на *mir-137*, во туморските клетки, покажа значајна асоцираност само со pN статусот (Spearman=0,351 $p=0,0481$), односно, експресијата расте со степенот на pN и значајно е највисока кај пациентите со pN3. Во однос на другите патохистолошки параметри pT, TNM - стадиумот и G стадиумите, не покажаа асоцираност.

Нашите наоди во однос на асоцираност и зголемениот ризик на нодална инволвираност е во ранг на наодите на Langevin¹²⁵, кој утврдил, намалени експресији кај метастатските тумори во однос на неметастатските, а се спротивни со наодите на Wiklund²⁶⁵, кој утврдил дека *miR-137* промотор метилација во однос на стадиумот, големината на туморот, клеточната диференцијација не покажала прогностичка вредност.

Во нашата студија времето на појава на локални рецидиви и метастази, постоперативно ($p = 0,919120$) како и времето на преживување ($p = 0,524902$) во однос на експресијата на високите *mir-137* нивоа, не покажаа статистички значајна разлика. Во однос на појавата на локални рецидиви и метастази, нашата студија е во согласност со Wiklund²⁶⁵, а се спротивни на студиите на Langevin¹²⁵, Liu¹⁴⁰ и Chen³¹, кои при идентификацијата на дерегулираните *microRNA-137*, во корелација со клиничките параметри, регистрирале сиромашна стапка на преживување кај пациенти со OSCC, проследени со многу инвазивен тек.

Главната *mir-137* дерегулација, во нашата студија (намалување на експресијата во туморските ткива и нормалните, во однос на здравите експресија) покажа, силна потврда за нејзината улога во оралната карциногенеза и малигната трансформација.

се одвивала при туморската прогресија на карциномите, а не во раната фаза на туморогенезата. Во корелација со клиничкопатохистолошките параметри во нашата студија експресијата на *mir-137* во туморските клетки, покажа значајна асоцираност само со N статусот, со што ја потврди неговата улога во агресивноста на туморите, а ја отфрли како можен прогностички фактор во развојот и прогнозата на оралниот карцином

✓ *mir-193*

Во однос на последно, таргетираната miR-193, во нашата студија, треба да нагласиме дека таа беше предложена заедно со miR-137 молекула, регулирана од ДНА метилацијата, како потенцијален прогностички маркер во оралната карциногенеза. Во текот на последните години, овој тренд на истражување во miRNAs и OSCC, еволуирале само во потрага на молекуларната мрежи и врски помеѓу miRNAs и сигналните патишта кои ги менуваат miRNAs, кои се вклучени во прогресијата, развојот и инвазијата на OSCC.

Во анализата на генерираните податоци во нашата студија, утврдивме дека просечната вредност на miR 193 во примероците од туморско ткиво изнесуваше $2,98 \pm 3,00$; во контралатералната клинички непроменетата орална мукоза $2,83 \pm 2,87$ а во здравите ткива $2,98 \pm 1,60$. Утврдивме дека не постои статистички значајна разлика (Kruskal-Wallis test: $p < 0,974$), помеѓу трите групи на примероци, во однос на средните вредности на miR 137. Помеѓу примероците од туморското ткиво и контралатералната непроменета оралната мукоза не регистриравме значајна разлика (Mann-Whitney test : $p < 0,05$), а во утврдувањето на вредноста на miR 193, со (Spearman rang - correlation: $\rho = 0,246$ $p = 0,044$) помеѓу истите примероци утврдивме дека постои значајна корелација. Во однос на корелацијата помеѓу туморското ткиво и здравите ткива (Mann-Whitney test: $p < 0,05$) и примероците од контралатералната оралната мукоза и здравите ткива (Mann-Whitney test: $p < 0,05$), утврдивме дека непостои статистички значајна разлика.

Во примероците од здравите испитаници, вредноста на медијаната на miR-193a изнесуваше 2,68. Вредностите на miR-193a молекулата во нашите примероци не покажа потврда на резултатите за значително зголемена експресија во туморите во однос на на средните вредности измерени во здравите ткива ($p > 0,05$). Вредностите на miR-193a во оралната мукоза кај нашите пациенти, непретставуваат ризик фактор, односно, неукажуваат на ризик за постоење на орален карцином ($OR = 0,78$ $CI = 95\%$ $0,29 < OR < 2,08$). Експресијата на miR-193a во туморските ткива е намалена во однос на контралатералните ткива кај нашиот сет од примероци за 1,07 пати.

Во контралатералните примероци, кај 15 (47%) лица вредностите на miR-193a беа над 2,68, со што не потврдивме значајна разлика во однос на средните вредности измерени во здравите ткива ($p > 0,05$). MiR-193a покажа сензитивност од 93% и специфичност од 100% во разликувањето на здравото ткиво. Бидејќи miR-193a не покажа значајна зголемена експресија, не ја потврдивме нивната способност за предвидување, односно, за разликување на карциномите од нормалните ткива. Резултатите потврдија дека, квантификацијата на експресијата на miR 193 молекулата во нашиот сет на примероците, покажа потврда на резултатите за несигнификантни зголемувања во експресијата во туморите во однос на контралатералната непроменета слузница и здравото ткиво т.е. помеѓу трите групи на примероци, што ја исклучува нејзината улога во оралната карциногенеза и малигната трансформација.

Во консултираната литература, нашите наоди се спротивни на наодите на Lessa¹³⁰, Wong²⁶⁷, Kozaki¹¹⁷, Gao⁶⁸, Almubarak², Chen³⁰, Mascolo¹⁵⁴ и Liu¹³⁹, кои регистрирале намалена експресија на miR-193, во туморските ткива, што беше спротивно на нашите наоди.

Во корелација со клиничко-патохистолошките параметри во нашата студија експресијата на *mir-193*, во туморските клетки, не покажа значајна асоцираност ниту со еден од патохистолошките параметри (*pT*, *TNM* - стадиумот и *G* стадиумите). Овие наоди се во спротивност на наодите на Liu¹³⁹, кој нотираше дека намалената експресија на *mir-193*, служи како прогностички фактор за инвазивноста и агресивноста на оралниот карцином.

Во нашата студија времето на појава на локални рецидиви и метастази, постоперативно ($p = 0,830385$) како и времето на преживување ($p = 0,443461$) во однос на експресијата на *mir-193* нивоа, не покажаа статистички значајна разлика, во однос на зголемената експресија на *mir-193*. Во расположивата литература, најдовме само еден труд во кој Chen³², го потенцира ектопичното изразување на тумор-супресивните *mir-193*, како предиктивен фактор за прогнозата и исходот во OSCC.

Сумирани резултатите за таргетираната *mir-193* во нашата студија, ја исклучија нивната улога, како потенцијално онкогени молекули во оралната карциногенеза, во развојот и прогресијата, како и нивната прогностичка вредност во OSCC.

Конечно, валидацијата на *microRNA* профилите во нашето истражување ги прошири нашите познавања за улогата на *miRNAs* во развојната орална карциногенеза и во потврдување на нивниот дијагностички, прогресивен и прогностички потенцијал кај оралниот карцином.

Би требало да нагласиме дека големината на примерокот, во статистичките анализи има многу голема важност. Колку е поголем примерокот, толку се посигурни добиените резултати, но и веројатноста да се добијат статистички значајни асоцијации е поголема. Под претпоставка дека бројот на примероци е двојно поголем, а дека процентуалната разлика помеѓу метилираните и неметилираните ќе биде иста, ќе се добие значајна асоцираност во однос и на некои други патохистолошки варијабли од интерес на зададените гени. Тоа сугерира на потребата за продолжување на следењето и анализирањето на кохерентни, повеќебројни примероци од идни пациенти со OSCC во однос на метилацијата на гените и тумор супресивните, специфични *microRNA* експресии.

Акумулираните податоци во нашата студија, за профилирањето на различно експресираниите *microRNA* молекули, ќе доведат до подобрување на разбирање на оралната патогенеза и ќе дадат свој придонес во идентификување на конкретни механизми на OSCC за иницирањето и прогресија на болеста. Нашата анализа ќе даде свој придонес, во идентификацијата на специфични *microRNA* експресии, кои може да бидат потенцијални биомаркери во дијагнозата и прогнозата, таргетираната терапија и нови стратегии за превенција и лекување на оралниот карцином.

7. ЗАКЛУЧОЦИ

Сублимирајќи ги податоците во нашето истражување, за важните транслациски импликации на епигенетските механизми во востановување на нови дијагностички и прогностички маркери за оралната карциногенеза, ги потврдивме следните заклучоци :

✓ DNA метилационите модели се конзистентно неметирирани во здравите примероци, често метилирани во туморските и поретко во нормалните контралатерални примероци, со што се нагласува туморската хетерогеност и потенцијалната улога на сите зададени гени, како непобитен фактор во оралната карциногенезата

✓ Во OSCC примероците, најчесто метилираа E-cadherin (90%), MGMT (75%), DAPK (75%), RAR β 2 (62,5%), а најретко промоторите на p16 во (52,5%). Комбинацијата од 3^{те} најмногу метилирани гени: E-cadherin, MGMT и DAPK, покажаа позитивната предиктивна вредност од 98,35%, т.е. веројатност во детектирање на OSCC

✓ Во контралатералните, нормални примероци, најчесто метилирани гени се E-cadherin (89,7%), RARB2 (87,2%), MGMT (74,4%), потоа следеше DAPK (33,3%), најретко p16 гените со (7,7%). Наодот на високи фреквенции на (M+) во нормалните ткива, индицира епигенетски промени и почетната малигна трансформација, односно релативно повисокиот ризик во прогресијата кон малигни промени

✓ Хиперметилацијата на DNA, во корелација со клиничко-патохистолошките параметри, како сигнификантни предиктори во развојот, инвазивноста, прогресијата и прогнозата кај пациентите со OSCC, со висок дискриминаторски потенцијал ги потврди гените:

- Ecadherin и p16 во напредните TNM и G стадиуми во развојот на инвазивниот фенотип и нивната значајна прогностичката вредност во појава на рецидиви и зголемена смртност

- DAPK генот во развојот во напредните TNM стадиуми, независен од другите клиничко-патохистолошки параметри

✓ Квантификацијата на дерегулираните онкогени MicroRNAs, во туморските и нормалните, во однос на здравите ткива, ги потврди константно зголемените експресији на (mir-21, let-7, mir-155, mir-31, mir-211, mir 125) и намалените експресираните (mir-137, mir-133b, и mir-193a)

✓ Развојната орална карциногенеза варира во карактеристични аберантно експресирани MicroRNAs модели во :

- mir 31, mir 125, let-7, mir 155, mir 137, mir 21, mir 211, репродуцирани во туморските versus здравите ткива

- mir-21, let-7, mir-31, mir 125, mir-137 и mir-133b, во нормалното versus здравото ткиво и ја потврдува мултифокалната прогресија, раното случување и морфолошката хетерогеност на целокупната лигавица

✓ Аберантните MicroRNAs експресији, кај пациентите со орален карцином, во однос на клиничко-патохистолошките параметри, покажаа сигнификантни корелации помеѓу:

- mir137 и mir133 и големината на туморот (pT-статусот)

- mir133 и зафатеноста на регионалните лимфни јазли (pN- статусот)

- mir21 и зголемувањето на ризикот од појава на локо/регионални рецидиви, го потврдува како независен прогностички маркер во прогресијата на OSCC

- let-7 и mir 211 и зголемената стапка на смртност, ги потврдува како потенцијални прогностички маркери за лоша прогноза, независни од другите клиничко-патолошки параметри

- mir133 и значајното пократко време на преживување, во потврдување на неговата улога како сигнификантен прогностички показател за лоша прогноза и зголемена смртност, зависен од големината на туморот (pT) и зафатеноста на регионалните лимфни јазли (pN)

✓ Нашата студија, ги потврди E-cadherin-от, p16 и mir133, како потенцијални предиктивни маркер во развојот, прогресијата и прогнозата на оралниот карцином и ја истакна нивната значајност во донесување на одлуката за обемот на хируршката интервенција и следење на пациентите со орален карцином.

8. КРАТКА СОДРЖИНА

Третманот на оралниот карцином, се состои од мултидисциплинарни пристапи со хируршки и нехируршки методи, кои и во најдобра комбинација, резултираат со неуспех кај повеќе од 50% од пациентите. Појавата на рецидиви на локално ниво, во регионалните или далечните лимфни јазли, резултираат со лош исход и зголемување на стапката на смртност кај OSCC за 5% во текот на изминатите 5 години.

Со цел на подобрување на клиничките резултати и наоѓање на нови терапевтски модалитети за справување со карциномите, во последната деценија направени се интензивни истражувања во полето на молекуларната биологија, со посебен осврт на епигенетските механизми.

Нашата студија се базира на досегашните сознанија и аспекти за молекуларното microRNA и DNA профилирање на туморските клетки, кои се сметаат за главен предизвик, кој останува во фаза на дефинирање на специфични microRNA и ДНК биомаркери за OSCC.

Целите на нашата студија, ги поставивме поаѓајќи од фактот дека ген специфичните ДНК метилациони и тумор супресивни MiRNAs промени можат да се користат како биомаркери, за востановување на нивната можна улога во туморогенезата, развојот, прогресијата и прогнозата на OSCC.

Ги евалуиравме нивоата на метилација на најексплоатираните гени, во литературата, специфични за OSCC: p16, DAPK, E/cadherin, MGMT и RAR β , како и аберантите експресији на тумор супресивните MicroRNAs (mir-21, let-7, mir-155, mir-31, mir-211, mir-137, mir-133b, и mir-193a, mir 125). Потоа секој од испитуваните транскрипти, беше компариран помеѓу трите групи на биоптични материјали: туморско ткиво, нормално контралатерално и здраво ткиво, соодветно за секој примерок.

За остварување на зададените цели беше спроведено проспективно истражување кај 40 пациенти со орален карцином и 20 здрави (компаративни) испитаници кои беа оперативни третирани и следени најмногу 5 години, после операција. Биоптичните материјали од секој пациент, беа групирани во 3 групи на примероци:

1. Туморско ткиво (~5мм³) земено од ексцидираниот тумор, со вратен дисектат за хистопатолошка верификација и за молекуларни анализи
2. Контралатерално, нормално ткиво (патохистолошки верифицирано како здраво за молекуларни анализи)
3. Здрава слезница (~5мм³) земена од пациенти без претходна историја на малигни заболувања за молекуларни анализи

Базата на податоци за клиничко-патолошките параметри на испитаниците ја сочинуваа: пол, возраст, локализација, големина на туморот, присутни/отсутни метастази во регионални вратни лимфни јазли, стадиум на, клеточна диференцијација, појава на локални рецидиви/ метастази и време на преживување (смртност), изразено во месеци, после третманот.

DNA хиперметилационите модели беа конзистентно (неметилирани) во здравите примероци, а често метилирани во туморите и нормалните контралатералните примероци. Секој ген во студијата покажа свој карактеристичен модел со различно значење и улога.

Најчесто метилирани гени во туморските примероци беа, E-cadherin-от (90%), MGMT (75%), DAPK (75%), потоа следеше RAR β 2 (62,5%), а најретко метилирани беа промоторите на p16 гените (52,5%), што ја потврди хиперметилацијата како клучен играч во оралната карциногенеза.

Комбинацијата од 2^{та}, најчесто метилирани гени, E-cadherin и MGMT, покажаа позитивна предиктивна вредност, односно, сигурност во детекцијата на OSCC од 98,35%.

Најзначајни фреквенции на метилација, покажа Ecadherin-от, метилиран во (90%) во туморските ткива и (89,7%) во контралатералните, нормални ткива, што ја потенцира неговата улога како потенцијален биомаркер во оралната карциногенеза.

Во контралатералната слузница, регистрираните фреквенции беа E-cadherin (89,7%), RARB2 (87,2%), MGMT (74,4%), потоа следеше DAPK (33,3%), а најретко метилирани беа промоторите на p16 гените (7,7%). Овој наод ја потврдува туморската хетерогеност и улогата на ДНА метилацијата, како клучен и непобитен фактор во иницирање на оралната карциногенеза, како глобален ефект врз целата орална лигавица. Ова не го вклучува p16 генот, чии ретки метилации во контралатералната слузница и најниски нивоа во туморските ткива, ја потврдија неговата улога, во касното вклучување во туморогенезата.

Хиперметилацијата на гените кај оралниот карцином, покажа висок дискриминаторски потенцијал, во утврдување на нивната предиктивна вредност во развојот, прогресијата, рецидивантноста и преживување на пациентите.

✓ Метилацијата на гените, непокажа корелација со pT и pN-стадиумот. Во однос на TNM и G стадиумот значајно повеќе метилираат Ecadherin ($p = 0,0078$; $p = 0,0260$) и p16 ($p = 0,0116$; $p = 0,0119$), соодветно. Сигнификантни предиктори за развојот и агресивноста на туморот и прогресирането во напредните стадиуми (III-IV и G3) кај оралниот карцином се Ecadherin-от и p16. Метилацијата во овие гени укажува на зголемен ризик и неповолна прогноза кај болните, соодветно ($OR = 0,38$ $CI=95\%$ $0,019 < OR < 0,781$) и ($OR = 0,15$ $CI=95\%$ $0,032 < OR < 0,684$). DAPK генот, во однос на TNM-стадиумот ($p = 0,0420$), се покажа како значаен предиктивен фактор во развојот, независен од другите клиничко-патохистолошки параметри.

✓ Во однос на прогностичката вредност на хиперметилацијата, нашите наоди, уште еднаш ги потврдија високите предиктивни вредности на p16 (Log-Rank Test: WW = 6,64 Sum = 22,837 Test statistic = 2,740 $p = ,00613$) и E-cadherin-от (Log-Rank Test: WW = 1,74 Sum = 22,83 Test statistic = 2,001 $p = 0,04531$), во прогресијата на карциномите и појава на локални рецидиви и метастази. Исто утврдивме и дека времето на преживување, беше значајно пократко кај пациентите кај кои беше регистрирана метилација на p16 и E-cadherin-от (Log-Rank Test: WW = 3,709 Sum = 25,929 Test statistic = 2,397 $p = 0,01649$).

Постигнат е значаен напредок во идентификација на одредени микроРНА, кои покажуваат константно абнормални експресији во туморските и контралатералните, во однос на здравите ткива. Резултатите за добиените шест microRNA гени, зголемено експресирани (mir-21, let-7, mir-155, mir-31, mir-211, mir 125) и за трите microRNA гени намалено експресирани (mir-137, mir-133b, и mir-193a), беа квантифицирани во анализите за нивната дерегулација во трите групи и компарирани меѓусебно.

За секој ген, нивото на експресија варираше во карактеристичен модел, кој беше репродуциран помеѓу туморските versus здравите ткива, потврдувајќи ги аберантните експресији, како важен механизам во развојната карциногенеза и детекцијата на оралниот карцином. Ова најдобро се илустрира во mir31, mir125, let-7, mir155, mir 137 и mir21, mir 211, освен во mir 133 каде разликата помеѓу туморското и здравите ткива беше неситицифичантна. Исклучок беше mir-193a, каде не се регистрираа разлики помеѓу трите групи на примероци, што ја исклучува нејзината улога како биомаркер, специфичен за оралната карциногенеза.

Константно зголемување на експресиите и значајни асоцијации на MicroRNAs во нормалните versus здравите ткива покажаа сите гени, освен mir155 и mir211. Овие наоди ја потврдија нивната важност и одговорност за мултифокалната прогресија, раното случување и морфолошката хетерогеност на анализираните текстури на целокупната лигавица.

Резултатите од нашата анализа, како ситицифичантни предиктори во развојот и прогресија, ги потврди следните MicroRNAs онкогени молекули:

- ситицифичантна корелација, утврдивме помеѓу pT и mir137 и mir133;
- во однос на pN, значајна асоцираност беше потврдена само за mir133.

Поединечната валидација на MicroRNAs, наведени во нашата студија, во однос на клиничките параметри: појава на локо/регионални рецидиви и време на преживување, покажа дека:

- Во корелација со појавата на локо/регионалните рецидиви, значајни вредности беа регистрирани само за mir-21;
- Со времето на преживување, значајна корелација беше утврдена за let-7, mir133 и mir 211, наод што ги потврди како потенцијални предиктивни индикатори за лоша прогноза и зголемена смртност;

Во нашиот сет на примероци, кај сите други microRNA молекули, помеѓу квантитативните податоци за експресијата и клиничко-патохистолошките параметри, немаше значајни корелации (за сите $p > 0.05$).

Сублимираните резултатите од аберантните тумор супресивни miRNA и DNA метилации, во утврдувањето на нивната потенцијална вредност како биомаркери во развојот, дијагнозата, прогресијата и прогнозата на оралниот карцином ги истакна:

E-cadherin-от и **p16**, како најзначајни биомаркери во развојот, прогресијата и прогнозата т.е. предиктивни фактори за лоша прогноза и инвазивен фенотип во OSCC.

Зголемувањето на експресијата на **mir133**, ја потврди оваа онкогена молекула, како потенцијален предиктивен индикатор во агресивното и

инвазивно однесување во напредните стадиуми, како и сигнификантен прогностички показател за лоша прогноза и зголемена смртност.

Резултатите во нашата студија, ги потврдија **E-cadherin**-от, **p16** и **mir133**, како потенцијални предиктивни маркер во развојот, прогресијата и прогнозата на оралниот карцином и ја истакнаа нивната значајност во донесување на одлуката за обемот на хируршката интервенција и следење на пациентите со орален карцином.

Во нашата студија, се обидовме да обезбедиме сеопфатна и висока продуктивност во истражувањето на податоците за потврдување на гените кандидати, специфични за OSCC. Добиените уникатни профили за DNA хиперметилацијата и miRNA моделите, ќе допринесат во напредокот и подобро разбирање на молекуларните механизми во иницијацијата, прогресијата и експанзијата на OSCC. Во блиска иднина, овие потенцијално реверзибилни епигенетски промени, ќе бидат насочени во терапевски цели и нивна клиничка импликација.

Клучни зборови: епигенетика, miRNA експресија, DNA хиперметилација, клиничко- патохистолошки параметри

9. SUMMARY

Oral cancer treatment, comprising surgical and non-surgical methods, multidisciplinary approaches in which the best combination, resulting in failure in more than 50% of patients. Poor outcome and increased mortality rate of 5%, every year, resulting of occurrence of local and regional recurrence or distant metastases.

In order to improve clinical outcomes and finding new therapeutic modalities for dealing with cancers in the last decade have made intensive research in the field of molecular biology, with special emphasis on epigenetic mechanisms.

Our study, based on the the current knowledge and molecular aspects of DNA and microRNA profiling of tumor cells, which are considered to be a major challenge, which remains in the phase of the definition of specific microRNA and DNA biomarkers for OSCC.

The objectives of our study, starting from the fact that the gene-specific DNA methylation and tumor suppressive MiRNAs changes, can be used as biomarkers for the establishment of their possible role in tumorigenesis, development, progression and prognosis of OSCC.

We evaluated the level of methylation of the genes most exploited in the literature, specific for OSCC: p16, DAPK, E / cadherin, MGMT and RAR β , and aberrant expression of tumor suppressive MicroRNAs (mir-21, let-7, mir-155, mir -31, mir-211, mir-137, mir-133b, and mir-193a, mir 125). Each of the examined transcripts was compared between the three groups of biopsy material, tumor tissue and normal contralateral healthy tissue, respectively for each sample.

In order to achieve the objectives, we conducted a prospective study in 40 patients with oral cancer and 20 healthy (comparative) respondents, who were treated surgically and followed up to 5 years ,after the surgical treatment. Bioptic material from each patient were clustered into three groups of samples:

1. tumor tissue (~ 5mm³), taken from the excised tumor for for further histopathology verifications and molecular analyzes
2. contralateral, normal tissue (pathologically verified as healthy for molecular analysis)
3. Healthy mucosa (~ 5mm³) taken from the patient's, without a history of malignant disease for molecular analysis.

The data base of clinical-pathological parameters of respondents consisted of: sex, age, localization, tumor size, presence / absence metastases in regional neck lymphatic metastasis, TNM stage, cell differentiation, the occurrence of local recurrence / metastasis and survival rate (mortality), expressed in months after the treatment.

DNA hypermethylation patterns were consistent (unmethylated) in healthy samples, a commonly methylated in the tumor and often in contralateral, normal

samples. Each gene in the study showed its characteristic pattern with a different importance and role.

The most often methylated genes in tumor samples were, E-cadherin in (90%), MGMT (75%), DAPK (75%), followed by RAR β 2 (62,5%), and least often were methylated promoters of p16 genes (52,5%), which confirmed hypermethylation as a key player in oral carcinogenesis.

The combination of mostly methylated 2 genes, E-cadherin and MGMT, showed a positive predictive value, security in detection of OSCC of 98.35%.

The most important frequencies of methylation showed Ecadherin, methylated in (90%) in tumor tissues and (89.7%) in the contralateral, normal tissues, which emphasizes its role as a potential biomarker in oral carcinogenesis.

In the contralateral mucosa, registered frequencies in E- cadherin (89,7%), RARB2 (87,2%), MGMT (74,4%), followed by DAPK (33.3%), and least often was methylated p16 gene promoter (7.7%). This finding confirms the tumor heterogeneity and the role of DNA methylation as a key and indisputable factor in the initiation of oral carcinogenesis, as a global effect on the entire oral mucosa. This does not include the p16 gene, whose rare methylation in contralateral mucosa and lowest levels in tumor tissues, confirmed his role, including later in tumorigenesis.

✓ Methylated genes in oral cancer showed high discriminatory potential in determining their predictive value in the development, progression, recurrence, relaps and patient survival rate.

No correlation was found between DNA methylation and pT and pN-stage. In terms of the TNM and G staging, significantly more methylated were Ecadherin ($p = 0,0078$; $p = 0,0260$) and p16 ($p = 0,0116$; $p = 0,0119$) respectively. Significant predictors for tumor development, aggressiveness and progression in advanced stages (III-IV and G3) of oral cancer, are Ecadherin and p16. Methylation of these genes indicates an increased risk and poor prognosis in patients, respectively ($OR = 0,38$ $CI = 95\% 0,019 <OR <0,781$) and ($OR = 0,15$ $CI = 95\% 0,032 <OR <0,684$). DAPK gene regarding TNM- stage ($p = 0,0420$), were proved as an important predictive factor in development, independent of other clinical and pathological parameters.

Concerning the prognostic value of methylation, our findings, confirmed predictive high values of p16 (Log-Rank Test: $WW = 6,64$ $Sum = 22,837$ $Test statistic = 2,740$ $p = 0,00613$) and E-cadherin (Log-Rank Test: $WW = 1,74$ $Sum = 22,83$ $Test statistic = 2,001$ $p = 0,04531$) in the progression of carcinomas and the occurrence of local recurrence and metastasis. It found that survival rate was significantly shorter in patients who registered methylation of p16 and E-cadherin (Log-Rank Test: $WW = 3,709$ $Sum = 25,929$ $Test statistic = 2,397$ $p = 0,01649$).

The significant progress has been made in the identification of specific microRNAs, showing constant abnormal expressions in tumor and contralateral, relative to healthy tissues. The results for six microRNA genes, which were upregulated (mir-21, let-7, mir-155, mir-31, mir-211, mir 125) and three downregulated (mir-137, mir-133b, and mir-193a), were quantified for their deregulation, compared with each other in the three groups.

✓ For each gene, the level of expression varied in a characteristic model, which was reproduced between tumor versus healthy tissue, confirming aberrant expression as an important mechanism in carcinogenesis and the development of oral cancer detection. This is best illustrated in mir31, mir125, let-7, mir155, mir 137

and mir21, mir 211, except mir 133, where the difference between the tumor and healthy tissue was not significant. The exception, was mir-193a, which doesn't show differences in methylation, between the three groups of samples, which excludes its role as a biomarker specific to oral carcinogenesis.

Constantly increased expression and significant associations of MicroRNAs in normal versus healthy tissue showed all genes, except mir155 and mir211. These findings confirmed their importance and responsibility for multifocal progression, early occurrence and morphological heterogeneity of the analyzed texture overall mucosa.

✓ Our study, confirmed following oncogenes MicroRNAs molecules, as a significant predictors in oral cancer development and progression :

- significant correlation was determined between pT and mir137 and mir133;
- compared to pN, significant association was verified only for mir133;

✓ The individual validation of microRNAs, listed in our study, in correlation with the clinical parameters: loco / regional recurrence and survival rate, proved that:

- significant values were registered for mir-21, in association with the loco / regional recurrence,
- significant correlation was determined between expression of let-7, mir133 and mir 211 and the survival rate, which confirmed this microRNA , as potential predictive markers of poor prognosis and increased mortality;
- other microRNA molecules doesn't shows significant correlations between quantitative expression data and clinical pathohystological parameters ($p > 0.05$).

✓ Sublimated results of aberrant tumor suppressive miRNA and DNA methylation, in establishing their potential value as biomarkers in the development, diagnosis, progression and prognosis of oral cancer emphasized:

E-cadherin and **p16**, as the most significant biomarkers in the development, progression and prognosis and their predictive value in poor prognosis and invasive phenotype in OSCC.

Increasing expression of **mir133**, confirmed this oncogene molecule as a potential predictive marker for aggressive and invasive behavior in advanced stages, and their significant prognostic value in poor prognosis and increased mortality.

The results in our study confirmed the **E-cadherin**, **p16** and **mir133**, as a potential predictive marker in the development, progression and prognosis of oral cancer and their importance in making decision for the extensiveness of surgery and follow-up of the oral cancer patients .

In our study, we've made a attempted to ensure a comprehensive and high productivity of the data, to confirm the candidate genes specific for OSCC. The unique DNA hypermethylation and miRNA models will contribute towards progress and a better understanding of the molecular mechanisms in the initiation, progression and expansion of OSCC. In the near future, these potentially reversible epigenetic changes, will be targeted in therapeutic purposes and will find their clinical implications.

Keywords: epigenetics, miRNA expression, DNA methylation, clinical and pathological parameters

10. ЛИТЕРАТУРА

1. Al-Kaabi A, van Bocke LW, Pothen AJ, Willems SM. p16^{INK4A} and p14^{ARF} Gene Promoter Hypermethylation as Prognostic Biomarker in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Disease Markers*. Volume 2014, Article ID 260549, 8 pages.
2. Almubarak HM, Meiller T, Mao L. The Role of miRNAs in Early Detection of Oral Cancer, 2012 <http://hdl.handle.net/10713/2326>.
archive.hshsl.umaryland.edu/handle/10713/2326.
3. Arantes LM, de Carvalho AC, Melendez ME, Carvalho AL, Goloni-Bertollo EM. Methylation as a biomarker for head and neck cancer. *Oral Oncology*, 2014;50(6):587–592.
4. Argiris A, Karamouzis V, Raben D, Ferris R. Head and neck cancer. *The Lancet*, 2008;371 no. 9625:1695–1709.
5. Asokan GS, Jeelani S, Gnanasundaram N. Promoter hypermethylation profile of tumour suppressor genes in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *J Clin Diagn Res*, 2014;8(10):ZC09–12.
6. Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2009;15(8):2850–5.
7. Avissar M, McClean MD, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival. *Carcinogenesis*, 2009;30:2059–2063.
8. Bánkfalvi A, Krassort M, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Deranged expression of the E-cadherin/beta-catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*, 2002;31:450–7.
9. Barh D, Carpi A, Verma M. *Cancer Biomarkers: Minimal and Noninvasive Early Diagnosis and Prognosis Hardcover*, 2014; ISBN-13: 978-1466584280.
10. Barker EV, Cervigne NK, Reis PP, Goswami RS, Xu W, Weinreb I, Irish JC, Kamel-Reis S. microRNA evaluation of unknown primary lesions in the head and neck. *Mol. Cancer*, 2009;8:27.
11. Bernier J, Domenge C, Mahmut O, Katarzyna M, Jean-Louis L, Greiner R, Jordi G, Philippe M, Frédéric R, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A, van Glabbeke M. Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*, 2004;350:1945–1952.
12. Bettendorf O, Piffkó J, Bánkfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncology*, 2004;40(2):110–119.
13. Bhatia V, Goel MM, Makker A, Tewari S, Yadu A, Shilpi P, Kumar S, Agarwal SP, Goel SK. Promoter Region Hypermethylation and mRNA Expression

of MGMT and p16 Genes in Tissue and Blood Samples of Human Premalignant Oral Lesions and Oral Squamous Cell Carcinoma. *BioMed Research International*. Volume 2014; Article ID 248419,10.

14. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 2007;447(7143):396-8.
15. Borges FT, Garbin CA, Carvalhosa AA, Castro PH, Hidalgo LR. Oral cancer epidemiology in a public laboratory in Mato Grosso State, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 2008;24:1977-82.
16. Bosch FX, Andl C, Abel U, Kartenbeck J. E-cadherin is a selective and strongly dominant prognostic factor in squamous cell carcinoma: a comparison of E-cadherin with desmosomal components. *Int. J. Cancer*, 2005;114:779-790.
17. Brito ARJ, Gomes CC, Guimarães LSA, Campos K, Gomez SR. Relationship between microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 2014;48(3):211-216.
18. Buajeeb W, Poomsawat S, Punyasingh J, Sanguansin S. Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med*, 2009;38(1):104-8.
19. Calmon MF, Colombo J, Carvalho F. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007;173:31-37.
20. Campo-Trapero J, Cano-Sanchez J, Palacios-Sanchez B, Sanchez-GUutierrez MA, Gonzalez-Moles J, Bascones- Martinez A. Update on Molecular Pathology in Oral Cancer and Precancer. *Anticancer Research*, 2008;28:1197-1206.
21. Cao J, Zhou J, Gao Y. Methylation of p16 CpG Island Associated with Malignant Progression of Oral Epithelial Dysplasia: A Prospective Cohort Study. *Clinical cancer research*, 2009;15:5178-5183.
22. Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*, 2005;114(5):806-16.
23. Cervigne NK, Reis PP, Machado J, Sadikovic B, Bradley G, Galloni NN, Pintilie M, Jurisica I, Perez-Ordóñez B, Gilbert R, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet*, 2009;18(24):4818-29.
24. Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, Kumar Shukla N, Ralhan R. Retinoic acid receptor- α as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2003;103:544-549.
25. Chang CJ, Hsu CC, Chang CH, Tsai LL, Chang YC, Lu SW, Yu CH, Huang HS, Wang JJ, Tsai CH, et al. Let-7d functions as novel regulator of epithelial-mesenchymal transition and chemoresistant property in oral cancer. *Oncol Rep*, 2011;26(4):1003-10.
26. Chang HW, Chow V, Lam KY, Wei WI, Yuen A. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer*, 2002;94:386-392.
27. Chang K, Liu J, Chu T, Cheng H, Hung W. Association between High *miR-21* microRNA Expression and the Poor Prognosis of Oral Carcinoma. *J Dent Res*, 2008;87(11):1063-8.
28. Chang KW, Kao SY, Wu YH, Tsai MM, Tu HF, Liu CJ, Lui MT, Lin SC. Passenger strand miRNA *miR-31** regulates the phenotypes of oral cancer cells by targeting *RhoA*. *Oral Oncol*, 2013;49(1):27-33.
29. Chang S, Jiang W, Smith I, Poeta LM, Begum S, Glazer C, Shan S, Westra W, Sidransky D, Califano JA. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2008;123(12):2791-7.

30. Chen CX, Fan MZQ, Luo S, Cao X. miR-137 is frequently down-regulated in gastric cancer and is a negative regulator of Cdc42. *Dig. Dis. Sci*, 2011;56:2009–2016.
31. Chen D, Cabay RJ, Jin Y, Wang A, Lu Y, Shah-Khan M, Zhou X. MicroRNA Deregulations in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *J Oral Maxillofac Res*, 2013;4(1):e2.
32. Chen LH, Tsai KL, Chen YW, Yu CC, Chang KW, Chiou S-H, Ku HH, Chu PY, Tseng LM, Huang PI, Lo WL. MicroRNA as a Novel Modulator in Head and Neck Squamous Carcinoma. *Journal of Oncology* Volume 2010, Article ID 135632, 15 pages.
33. Chen RH, Wang WJ, Kuo JC. The tumor suppressor DAP-kinase links cell adhesion and cytoskeleton reorganization to cell death regulation. *J. Biomed. Sci*, 2006;13:193-9.
34. Chi T, Viet and Brian L, Schmidt S. Methylation Array Analysis of Preoperative and Postoperative Saliva DNA in Oral Cancer Patients. *acrjournals.org*. 2011;10.
35. Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, Chen Q, Burk RD, Smith RV, Prystowsky MB, Belbin TJ, Schlecht NF. Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol*, 2009;174:736–745.
36. Choi P, Jordan D, Mendez E, Houck J, Yueh B, Farwell DG, Futran N, Chen C. Examination of Oral Cancer Biomarkers by Tissue Microarray Analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008;134(5):539-546.
37. Choi S, Myers JN. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. *JDR*, 2008;87(1):14-32.
38. Christensen BC, Moyer B, Avissar M, Ouellet LG, Plaza S, McClean M, Marsi C, Kelsey K. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis*, 2009;30(6):1003-1007.
39. Chu TH, Yang CC, Liu CJ, Lui MT, Lin SC, Chang KW. miR-211 promotes the progression of head and neck carcinomas by targeting TGF β RII. *Cancer Lett*, 2013;337(1):115-24.
40. Clague J, Jie L, Yohei H, Pheroze T, Christopher G, Xifeng W. Genetic variations in microRNA-related genes are associated with survival and recurrence in patients with carcinoma. *Carcinogenesis*, 2010;31(10):1805-12.
41. Clague J, Scott M, Lippman, et al. Genetic Variation in MicroRNA Genes and Risk of Oral Premalignant Lesions. *Molecular carcinogenesis*, 2010;49:183-189.
42. Cortesina G, Martone T. Molecular metastases markers in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 2006;26(6):317-325.
43. Courthod G., Franco P, Palermo L, Pisconti S, Numico G. The Role of microRNA in Head and Neck Cancer: Current Knowledge and Perspectives. *Molecules*, 2014;19(5):5704-5716.
44. Coyle KM, Sultan M, Thomas M, Kashani AV, Marcato P. Retinoid Signaling in Cancer and its Promise for Therapy. *J Carcinogene Mutagenesis*, 2013; S7:006. ISSN: 2157-2518.
45. Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, Gazit D, Patel V, Ben-Yehuda D. Das PM Singal R. DNA Methylation and Cancer. *JCO*, 2004;22(22):4632-4642.
46. Danielsson K, Wahlin YB, Gu X, Boldrup L, Nylander K. Altered expression of miR-21, miR-125b and miR203 indicates a role for these mircoRNAs in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*, 2012;41(1):90-5.

47. de Camargo Cancela M, Voti L, Guerra-Yi M, Chapuis F, Mazuir M, Curado MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck*, 2010;32(3):357-67.
48. De Schutter H, Geeraerts H, Verbeken E, Nuyts S. Promoter methylation of TIMP3 and CDH1 predicts better outcome in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy only. *Oncol Rep*, 2009;21:507-513.
49. Demokan S, Dalay N. Role of DNA methylation in head and neck cancer. *Clinical Epigenetics*, 2011;2(2):123-150.
50. Deng D, Liu Z, Du Y. Epigenetic Alterations as Cancer Diagnostic, Prognostic, and Predictive Biomarkers. *Advances in Genetics*, 2010; 71 0065-2660/10.
51. Deschamps D, Spencer HJ, Kokoska MS, Spring PM, Vural EA, Stack B. Implications of head and neck cancer treatment failure in the neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010;142(5):722-7.
52. Di Domenico M, Pierantoni GM, Feola A, Esposito F, Laino L, de Rosa A, Rullo R, Mazzotta M, Martano M, Sanguedolce F. Prognostic significance of N-cadherin expression in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 2011;12:4211-4218.
53. Díez-Pérez R, Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, López-Durán M, Gonzalez-Moles MA, Bascones-Ilundain J, Bascones-Martinez A. Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions. *Oncol Rep*, 2011;25(5):1203-9.
54. Dikshit RP, Gillio-Tos A, Brennan P, Marco L, Fiano V, Martinez-Peñuela JM, Boffetta P, Merletti F. Hypermethylation, risk factors, clinical characteristics, and survival in 235 patients with laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Cancer*, 2007;110(8):1745-51.
55. Dong F, Wang X, Zhang Y. The correlations between alteration of p16 gene and clinicopathological factors and prognosis in squamous cell carcinomas of the buccal mucosa. *J Oral Pathol Med*, 2012;41(6):463-9.
56. Dricu A. Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment. Publisher: Inst za onkologiju i radiol, 2012; 9535108816, 9789535108818. books.google.com/books?isbn=9535108816.
57. Emile M, Youssef D, Lotan D, Jean-Pierre I, Kenichi W, You-Hong F, Mao L. Hypermethylation of the *Retinoic Acid Receptor-β2* Gene in Head and Neck. *Carcinogenesis Clin Cancer Res*, 2004;1(10):1733-9.
58. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *Engl J Med*, 2008;358:1148-59.
59. Feinberg AP. Cancer epigenetics takes center stage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2001;98(6):392-394.
60. Fendri A, Masmoudi A, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Ghorbel A, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Inactivation of RASSF1A, RARbeta2 and DAP-kinase by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 2009;8(5):444-51.
61. Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, Green E, Tornillo L, Lugli A, Wolfensberger M, Terracciano LM. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann Oncol*, 2010;21(10):1961-1966.
62. Forman JJ, Legesse-Miller A, Collier HA. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008;105:14879-14884.
63. Foschini MP, Cocchi R, Morandi L. E-Cadherin loss and DNP73L expression in oral squamous cell carcinomas showing aggressive behavior. *Head Neck*, 2008;30:1475-1482.

64. Freitas Cordeiro-Silva M, Oliveira ZF, de Podestá JR, Gouvea SA, von Zeidler SV, Louro ID. Methylation analysis of cancer-related genes in non-neoplastic cells from patients with oral squamous cell carcinoma. *Mol. Biol. Rep.* 2011;38:5435-5441.
65. Fu X, Han Y, Wu Y, Zhu X, Lu X, Mao F, Wang X, He X, Zhao Y, Zhao Y. Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(11):1245-53.
66. Ganci F, Sacconi A, Manciocco V, Covello R, Spriano G, Fontemaggi G, Blandino G, Regina E. Molecular Genetics and Biology of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Implications for Diagnosis, Prognosis and Treatment. *Medicine » Oncology » "Head and Neck Cancer"*, book edited by Mark Agulnik, ISBN 978-953-51-0236-6.
67. Gao S, Eiberg H, Kroghdal A, Liu CJ, Sorensen JA. Cytoplasmic expression of E-cadherin and b-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 2005;34:116-9.
68. Gao XN, Lin J, Li Y-H, Gao L, Wang XR, Wang W, Kang HY, Yan GT, Wang LL, Yu L. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor. *Oncogene.* 2011;30:3416-3428.
69. Garzon R, Calin G.A., Croce C.M. MicroRNAs in Cancer. *Annu. Rev. Med.* 2009;60:167-179.
70. Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol.* 2012;8(11):1407-1425.
71. Georgolios A, Eleftheriadou A, Batistatou A, Charalabopoulos K. Role of the recently identified dysadherin in E-cadherin adhesion molecule downregulation in head and neck cancer. *Med Oncol.* 2012;29(3):1463-7.
72. Gombos K, Horváth R, Szele E, Juhász K, Gocze K, Somlai K, Pajkos G, Ember I, Olasz L. miRNA expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 2013;33(4):1511-8.
73. Gomes CC, de Sousa SF, Gomez RS. MicroRNAs: small molecules with a potentially role in oral squamous cell carcinoma. *Curr Pharm Des.* 2013;19(7):1285-91.
74. Gomes CC, Gomez RS. MicroRNA and oral cancer: Future perspectives. *Oral Oncology.* 2008;44(10):910-914.
75. González-Ramírez García-Cuellar C, Sánchez-Pérez Y, Granados-García M. DNA methylation in oral squamous cell carcinoma: molecular mechanisms and clinical implications. *Oral Dis.* 2011;17(8):771.
76. González-Ramírez I, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Sánchez-Pérez Y, Anaya-Saavedra G, Granados-García M, García-Vázquez F, García-Cuellar CM. hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer. *Oral Oncol.* 2011;47(1):22-6.
77. Gorenchtein M, Poh CF, Saini R, Garnis C. MicroRNAs in an oral cancer context - from basic biology to clinical utility. *J Dent Res.* 2012;91(5):440-6.
78. Gray SE, Kay EW, Leader M, Mabruk M. Analysis of APC Allelic Imbalance/Loss of Heterozygosity and APC Protein Expression in Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Genomics and Proteomics.* 2011;8(3):149-155.
79. Gronbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS.* 2007;115(10):1039-59.
80. Guerrero-Preston R, Soudry E, Acero J, Orera M, Moreno-Lopez L, Macna-Colyn G, Jaffe A, Berdasco M, Ili-Gangas C, Brebi-Mieville P, Fu Y, Engstrom C,

Irizarry RA, Esteller M, Westra W, Koch W, Califano J, Sidransky D. NID2 and HOXA9 Promoter Hypermethylation as Biomarkers for Prevention and Early Detection in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma Tissues and Saliva. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011;4(7):1061-72.

81. Hall GL, Shaw RJ, Field EA, Rogers SN, Sutton DN, Woolgar JA, Lowe D, Liloglou T, Field JK, Risk JM. p16 Promoter methylation is a potential predictor of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008;17:2174-2179.

82. Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene*, 2002;21:4231-4236.

83. Hasegawa M, Viet CT, Jordan RC, Schmidt BL. DNA promoter hypermethylation in saliva for the early diagnosis of oral cancer. *J. Calif. Dent. Assoc*, 2007;35:844-849.

84. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk J. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*, 2007;6:5.

85. Hedbäck N, Jensen DH, Specht L, Fiehn A-MK, Therkildsen MH, et al. MiR-21 Expression in the Tumor Stroma of Oral Squamous Cell Carcinoma: An Independent Biomarker of Disease Free Survival, 2014. *PLoS ONE* 9(4): e95193.

86. Henson BJ, Bhattacharjee S, O'Dee DM, Feingold E, Gollin SM. Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy. *Genes. Chromosomes and Cancer*, 2009;48(7):569-582.

87. Hu A, Huang JJ, Xu WH, Jin XJ, Li JP, Tang YJ, Huang XF, Cui HJ, Sun GB. miR-21 and miR-375 microRNAs as candidate diagnostic biomarkers in squamous cell carcinoma of the larynx: association with patient survival. *Am J Transl Res*, 2014;6(5):604-13.

88. Huang MJ, Yeh KT, Shih HC, Wang YF, Lin TH, Chang JY, Shih MC, & Chang JG. The correlation between CpG methylation and protein expression of P16 in oral squamous cell carcinomas. *Int.J.Mol.Med*, 2002;10: 551-554.

89. Huber GF, Züllig L, Soltermann A, Roessle M, Graf N, Haerle SK, Studer G, Jochum W. Down regulation of E-Cadherin (ECAD) - a predictor for occult metastatic disease in sentinel node biopsy of early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *BMC Cancer*, 2011;11:217.

90. Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, Perez-Ordóñez B, Jurisica I, O'Sullivan B, Waldron J, Gullane P, Cummings B, Liu FF. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2010;16(4):1129-39.

91. Hui AB, Shi W. Robust Global micro - RNA profiling with formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues. *Laboratory Investigation*, 2009;89:597-606.

92. Hussain MA, Timothy M, Mao Li. The Role of miRNAs in Early Detection of Oral Cancer, 2012. <http://hdl.handle.net/10713/2326>
archive.hshsl.umaryland.edu/handle/10713/2326.

93. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005;65:7065-7070.

94. Ishida E, Nakamura M, Ikuta M. Promotor hypermethylation of p14ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 2005;41:614-622.
95. Jakymiw A, Patel RS, Deming N, Bhattacharyya I, Shah P, Lamont RJ, Stewart CM, Cohen DM, Chan EK. Overexpression of dicer as a result of reduced let-7 MicroRNA levels contributes to increased cell proliferation of oral cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010;49(6):549-59.
96. Jemal A, Murray T, Ward E. Cancer statistic Cancer Journal for Clinicians, 2008;56(2):71-96.
97. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistic. *Cancer J Clin*, 2010;60(5):277-300.
98. Ji J, Wang XW. A Yin-Yang balancing act of the lin28/let-7 link in tumorigenesis. *J Hepatol*, 2010;53(5):974-975.
99. Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res*, 2005;33(17):5394-403.
100. Jithesh PV, Risk JM, Schache AG, Dhanda J, Lane B, Liloglou T, Shaw RJ. The epigenetic landscape of oral squamous cell carcinoma. *Molecular Diagnostics, British Journal of Cancer*, 2013;108:370-379.
101. Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, Homer L. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg*, 2005;14(11):1599-1605.
102. Kano M, Seki N, Kikkawa N, Fujimura L, Hoshino I, Akutsu Y, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Matsubara H. miR-145, miR-133a and miR-133b: tumor suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2010;127:2804-2814.
103. Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, Shibata T. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006;132:735-743.
104. Kaur J, Demokan S, Tripathi, SC, Macha MA, Begum S, Califano JA, Ralhan R. Promoter hypermethylation in Indian primary oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2010;127:2367-2373.
105. Kazuhiro O, Minoru T, Mutsumi O, Nobuyuki T, Makoto N, Tomoko C. Aberrant Methylation of Multiple Genes and Clinicopathological Features in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2009;29(8):3164.
106. Khor GH, Anisah Froemming GR, Binti Zain R, Mannil TA, Effat O, Tan SK, Tan AC, Vincent-Chong VK, Thong KL. DNA Methylation Profiling Revealed Promoter Hypermethylation-induced Silencing of p16, DDAH2 and DUSP1 in Primary Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Med Sci*, 2013;10(12):1727-1739.
107. Khor GH, Froemming GA, Tan AC. Pathways Deregulation in Oral Squamous Cell Carcinoma using Methylation Profiling. *Journal Dental Research*, 2011;91(Special issue C):47.
108. Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hirono Y, Yamaguchi A, Fujieda S, Sano K, Itoh H. Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. *Oncol Rep*, 2010;23(6):1625-33.
109. Kitano K, Watanabe K, Emoto N, Kage H, Hamano E, Nagase T, Sano A, Murakawa T, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. CpG

island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of cancer. *Cancer Science*, 2011;102(12):2126–2131.

110. Kolokythas A, Michael M, Xiaofeng Z. Review of MicroRNA Proposed Target Genes in Oral Cancer. Part II. *J Oral Maxillofac Res*, 2010.

111. Kolokythas A, Miloro M, Zhou X. Review of MicroRNA Deregulation in Oral Cancer. Part I. *J Oral Maxillofac Res*, 2011;2(2):e1.

112. Kolokythas A, Miloro M, Zhou X. Review of MicroRNA Proposed Target Genes in Oral Cancer. Part II. *Journal of Oral & Maxillofacial Research*, 2011;2(2):e2.

113. Kong W, Yang H, He L, Zhao JJ, Coppola D, Dalton SW, Cheng JQ. MicroRNA-155 Is Regulated by the Transforming Growth Factor β /Smad Pathway and Contributes to Epithelial Cell Plasticity by Targeting RhoA. *Mol Cell Biol*, 2008;28(22):6773–84.

114. Kordi-Tamandani DM, Moazeni-Rood AK, Rigi-Ladiz MA, Hashemi M, Birjandian E, Torkamanzehi A. Promoter hypermethylation and expression profile of *MGMT* and *CDH1* genes in oral cavity cancer. *Archives of Oral Biology*, 2010;55(10):809–814.

115. Koutsimpelas D, Pongsapich W, Heinrich U, Mann S, Mann WJ, Brieger J. Promoter methylation of *MGMT*, *MLH1* and *RASSF1A* tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma: pharmacological genome demethylation reduces proliferation of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncol Rep*, 2012;27(4):1135–1141.

116. Kovtunen O, Shponka I, Tymchuk S, Poslavskay O, Bereznyuk D. Analysis of Expression Markers Intracellular Adhesion in Patients with Oropharyngeal Squamous Cell Cancer. *The Advanced Science Journal*, 2014;12:15.

117. Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*, 2008;68:2094–2105.

118. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* (2011) 39, D152–D157. 2011;39:D152–D157.

119. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. - *Adv Genet*, 2010 - books.google.com

120. Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol*, 2004;40(2):145–53.

121. Laco J, Nekvindova J, Novakova V, Celakovsky P, Dolezalova H, Tucek L, Vosmikova H, Vosmik M, Neskudlova T, Cermakova E, Hacova M, Sobande FA, Ryska A. Biologic importance and prognostic significance of selected clinicopathological parameters in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, with emphasis on smoking, protein p16(INK4a) expression, and HPV status. *Neoplasma*, 2012;59(4):398–408.

122. Lajer CB, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Norrild B, Borup R, Rossing M. Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer*, 2011;104(5):830–40.

123. Langendijk JA. The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. *Ann Oncol*, 2010;21(10):1931–1934.

124. Langevin SM, Stone RA, Bunker CH, Grandis JR, Sobol RW. MicroRNA-137 promoter methylation in oral rinses from patients with squamous cell carcinoma of

the head and neck is associated with gender and body mass index. *Carcinogenesis*, 2010;31:864–870.

125. Langevin SM, Stone RA, Bunker CH, Lyons-Weiler MA, Laframboise WA. MicroRNA-137 promoter methylation is associated with poorer overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 2011;117(7):1454-62.

126. Lee ES, Issa JP, Roberts DB, Williams MD, Weber RS, Kies MS, El-Naggar AK Quantitative promoter hypermethylation analysis of cancer-related genes in salivary gland carcinomas: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. *Clin Cancer Res*, 2008;14(9):2664-72.

127. Lee J, Chung WY. Advanced Developments in Neck Dissection Technique: Perspectives in Minimally Invasive Surgery, Neck Dissection - Clinical Application and Recent Advances, 2012. ISBN: 978-953-51-0104-8, InTech, DOI: 10.5772/31114.

128. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs: small but potent oncogenes or tumor suppressors. *Curr Opin Investig Drugs*, 2006;7(6):560-4.

129. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*, 2007;21:1025–1030.

130. Lessa AMG, Valverde LF, Dias RB, Machado MCM, Santos JN, Rocha CAG. The role of microRNAs in oral squamous cell carcinoma pathogenesis: a literature review. *Applied Cancer Research*, 2013;33(4):198-205.

131. Li C, Wang L, Su J, Zhang R, Fu L, Zhou Y. mRNA expression and hypermethylation of tumor suppressor genes apoptosis protease activating factor-1 and death-associated protein kinase in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 2013;6(1):280-286.

132. Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, Wu D, Lin Z, Zeng C, Yao Y, Zhang P, Song E. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin. Cancer Res*, 2009;15:3998–4008.

133. Li-Hsin C, Kun-Ling T, Yi-Wei C, Cheng Y, Kuo C, Shi-Hwa C, Hung-Hai K, Pen-Yuan C, Ling-Ming T, Pin I H, Wen-Liang L. MicroRNA as a Novel Modulator in Head and Neck Squamous Carcinoma. *Journal of Oncology*. Volume. 2010, Article ID 135632, 15 p

134. Lindenbergh-van der Plas ML, Martens-de Kemp SR, de Maaker M, van Wieringen WN, Ylstra B, Agami R, Cerisoli F, Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. Identification of Lethal microRNAs Specific for Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res*, 2013;19:5647.

135. Lipton L, Tomlinson I. The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Fam Cancer*, 2006;5:221-226.

136. Liu CJ, Kao SY, Tu HF, Tsai MM, Chang KW, et al. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Diseases*, 2010;16:360–364.

137. Liu CJ, Lin SC, Yang CC, Cheng HW, Chang KW. EXPLOITING SALIVARY miR-31 AS A CLINICAL BIOMARKER OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA, 2011. DOI:10.1002/hed.21713.

138. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/ β -catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Modern Pathology*, 2010;23:213–224.

139. Liu X, Chen Z, Yu J, Xia J, Zhou X. MicroRNA profiling and head and neck cancer. *Comp Funct Genomics*, 2009;110:837514.

140. Louis B. Harrison, Roy B. Sessions, Waun Ki Hong - 2009 - Medical. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. books.google.com/books?isbn=078177136. *N Engl J Med*, 2004;350(19):1937-1944.
141. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet A. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature Biotechnol*, 2005;435(7043):834-8.
142. Lu WC, Kao SY, Yang CC, Tu HF, Wu CH. EGF Up-Regulates miR-31 through the C/EBP β Signal Cascade in Oral Carcinoma. 2014. *PLoS ONE* 9(9): e108049.
143. Lu YC, Chen YJ, Wang HM, Tsai CY, Chen WH, Huang YC, Fan KH, Tsai CN, Huang SF, Kang CJ, Chang JT, Cheng AJ. Oncogenic function and early detection potential of miRNA-10b in oral cancer as identified by microRNA profiling. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012;5(4):665-74.
144. Ma R, Jiang T, Kang X. Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2012;31:38.
145. Maeda G, Chiba T, Aoba T, Imai K. Epigenetic inactivation of E-cadherin by promoter hypermethylation in oral carcinoma cells. *Odontology*, 2007;95(1):24-9.
146. Magić Z, Supić G, Branković-Magić M, Jović N. DNA Methylation in the Pathogenesis of Head and Neck Cancer . Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment, Anica Dricu (Ed.), ISBN: 978-953-51-0881-8.
147. Mahomed F, Altini M, Meer S. Altered E-cadherin/ β -catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. *Oral Dis*, 2007;13:386-392.
148. Makoto S, Yoshino I. Identification of MicroRNAs Caused by DNA Methylation That Induce Metastasis. *Future Oncology*, 2008;4(6):775-777.
149. Manikandan M, Rao A K D M, Munirajan A K . Analyzing the expression of candidate microRNAs in primary tumors of oral squamous cell carcinoma. *Molecular Cytogenetics*, 2014,7(Suppl 1):P7.
150. Marcinkiewicz M, Katarzyna M, Gudas, Lorraine J. Epigenetic Changes in Retinoid Signaling in Oral Cavity Carcinogenesis . *Exp Cell Res*, 2014;320(1):128-43.
151. Marsit CJ, Posner MR, McClean MD, Kelsey KT. Hypermethylation of E-Cadherin Is an Independent Predictor of Improved Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer*, 2008;113(7):1566-1571.
152. Martone T, Gilliom-Tos A, De Marco L, Fiano V, Maule M, Cavalot A, Garzaro M, Merletti F, Cortesina G. Association Between Hypermethylated Tumor and Paired Surgical Margins in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2007;13:5089.
153. Maruya S, Issa JP, Weber RS, Rosenthal DI, Haviland JC, Lotan R, El-Naggar AK. Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: Incidence and potential implications. *Clin. Cancer Res*, 2004;10:3825-3830.
154. Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, De Rosa G, Staibano S. Epigenetic Disregulation in Oral Cancer . *Int J Mol Sci*, 2012;13(2):2331-2353.
155. McCullough MJ, McCullough MJ, Prasad G, Zhao S, and Farah CS. The Changing Aetiology of Oral Cancer and the Role of Novel Biomarkers to Aid in Early Diagnosis MiRNAs. Oral oncology, book edited by Kalu U. E. Ogbureke, 2012. ISBN 978-953-51-0228-1.
156. Mehendiratta M, Solomon MC, Boaz K, Guddattu V, Mohindra A. Clinico-pathological correlation of E-cadherin expression at the invasive tumor front of Indian

oral squamous cell carcinomas: An immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2014;18:217-22.

157. Meneses IS, Souza RR, Jeraldo OVL, Cavalcante RR, Reis FP, Albuquerque JRC. Death-associated protein kinase is underexpressed in high-grade oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Morphol*, 2010;28(2):609-613.

158. Merletti F, Cortesina G. Association Between Hypermethylated Tumor and Paired Surgical Margins in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2007;13:5089.

159. Messadi DV, Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions. *International Journal of Oral Science*, 2013;5:59-65.

160. Michael T, Scott M, Hammond J. Micro-RNAs as Oncogenes and Tumour Suppressors. chap22, 2009; DOI: 10.1002/9780470025079.

161. Michie AM, McCaig AM, Nakagawa R, Vukovic M. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer. *FEBS Journal*, 2010;277(1):74-80.

162. Mielcarek-Kuchta D, Paluszczak J, Seget M, Kiwerska K, Biczysko W, Szyfter K, Szyfter W. Prognostic factors in oral and oropharyngeal cancer based on ultrastructural analysis and DNA methylation of the tumor and surgical margin. *Tumor Biol*, 2014;35:7441-7449.

163. Minghua G, Zhiyuan G, Zhun J, Han C. Modified functional neck dissection: a useful technique for oral cancers. *Oral Oncology*, 2005;41(10):978-983.

164. Mingli L, Lei Feng, Ximing T, Shanchun G. Gene promoter hypermethylation in leukoplakia of the oral mucosa. *Pathology and Laboratory Med. Int*, 2010;(2):71-77.

165. Mitra S, Das S, Ghosal S, Chakrabarti J. HNOCDDB: A comprehensive database of genes and miRNAs relevant to head and neck and oral cancer. *Oral Oncology*, 2012;8(2):117-9.

166. Mutallip M, Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Horiguchi S, Fujimura L, Kawakami K, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) suppresses cell apoptosis and its regulation by miR-133alpha in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) *Int J Mol Med*, 2011;27:345-352.

167. Mydlarz W, Uemura M, Ahn S, Hennessey P, Chang S, Demokan S, Sun W, Shao C, Bishop J, Krosting J, Mambo E, Westra W, Ha P, Sidransky D, Califano JC. Clusterin is a gene-specific target of microRNA-21 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2014;20(4):868-77.

168. Mydlarz WK, Hennessey PT, Califano JA. Advances and Perspectives in the Molecular Diagnosis of Head and Neck Cancer. *Expert Opin Med Diagn*, 2010;4(1):53-65.

169. Nagadia R, Pandit P, Coman WB, Cooper-White J, Punyadeera C. miRNAs in head and neck cancer revisited. *Cell Oncol (Dordr)*, 2013;36(1):1-7.

170. Nagata S, Hamada T, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Kanmura Y, Nomura M, Kamikawa Yi, Yonezawa S, Sugihara K. A noninvasive method for detection of oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 2012;118(17):4298-4308.

171. Nakayama S, Sasaki A, Mese H, Alcalde RE, Tsuji T, Matsumura T. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer*, 2001;93:667-673.

172. Natrajan R, Louhelainen J, Williams S, Laye J, Knowles MA. High-resolution deletion mapping of 15q13.2-q21.1 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, 2003;63:7657-7662.

173. Neville B.W, Terry A. Oral Cancer and Precancerous Lesions Cancer. Journal for Clinicians, 2002;52(4):195-215.
174. Ni YH, Huang XF, Wang ZY, Han W, Deng RZ, Mou YB, Ding L, Hou YY, Hu QG. Upregulation of a potential prognostic biomarker, miR-155, enhances cell proliferation in patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 2014;117(2):227-233.
175. Nisha J. D'Silva, Brent B. WardCEL. Tissue biomarkers for diagnosis & management of oral squamous cell carcinoma. Journal Article The Alpha omegan, 2007;100(4):182-9.
176. Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Mutallip M, Fujimura L, Yoshino H, Kawakami K, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Caveolin-1 mediates tumor cell migration and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Oncol, 2011;38:209-217.
177. Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Sakurai D, Fujimura L, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M. Tumour suppressive microRNA-874 regulates novel cancer networks in maxillary sinus squamous cell carcinoma. Br. J. Cancer, 2011;105:833-841.
178. Oc P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, Rhys-Evans P. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. Oral Oncol, 2009;14(4):386-390.
179. Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M. Features in Oral Squamous Cell Carcinoma. Clin Cancer Res, 2009;8:3164-3171.
180. Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, Tanaka N, Noguchi M, Sonoda T, Kohama G, Tokino T. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, 2002;8:3164-3171.
181. Okami K, Sakai A, Onuki J, Hamano T, Iida M, Takahashi M. Promoter hypermethylation of tumor-associated genes in head and neck cancer. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho, 2005;108:207-213.
182. Olasz J, Juhász A, Remenár E, Engi H, Bak M, Csuka O, Kásler M. RAR beta2 suppression in head and neck squamous cell carcinoma correlates with site, histology and age. Oncol Rep, 2007;18(1):105-12.
183. Oom AL, Humphries BA, Yang C. MicroRNAs: Novel Players in Cancer Diagnosis and Therapies. BioMed Research International Volume. 2014; Article ID 959461, 13 pages
184. Ouyang SB, Wang J, Huang ZK, Liao L. Expression of microRNA-31 and its clinicopathologic significance in oral squamous cell carcinoma. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2013;48(8):481-4.
185. Patrick K, Joseph A Califano M. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. The Lancet Oncology, 2006;7(1):77-82.
186. Peng S-C, Liao C-T, Peng C-H, Cheng A-J, Chen S-J, et al. MicroRNAs MiR-218, MiR-125b, and Let-7g Predict Prognosis in Patients with Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. 2014. PLoS ONE 9(7): e102403
187. Pérez-Sayáns M, Pilar GD, Barros-Angueira F, Suárez-Peñaranda JM, Fernández AC, Gándara-Rey JM, García-García A. Current trends in miRNAs and their relationship with oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med, 2012;41(6):433-43.
188. Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñarandac JM, Herranz-Carnero M, Gayoso-Diz P, Barros-Angueiraf F, Gándara-Reya JM, García-Garcíaa A. The role of the

adenomatous polyposis coli (APC) in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 2012;48(1):56-60.

189. Poetsch M, Kleist B. Loss of heterozygosity at 15q21.3 correlates with occurrence of metastases in head and neck cancer. *Mod Pathol*, 2006;19:1462-1469.

190. Pratt AJ, MacRae IJ. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem*, 2009; 284(27):17897-901.

191. Pulling LC, Vuilleminot BR, Hutt JA, Devereux TR, Belinsky SA. Aberrant promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene is early tumors induced by cigarette smoke and tobacco carcinogens. *Cancer Res*, 2004;64:3844-8.

192. Puri SK, Si L, Fan CY, Hanna E. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol*, 2005;26:12-17.

193. Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, *et al*. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *J Craniomaxillofac Surg*, 2007;35:1-9

194. Qian ZR, Asa SL, Siomi H, Siomi MC, Yoshimoto K, Yamada S, Lu Wang E, Rahman M, Inoue H, Itakura M, Kudo E, Sano T. Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. *Modern Pathology*, 2009;22:431-441.

195. Radhakrishnan R, Kabekkodu S, Satyamoorthy K. DNA hypermethylation as an epigenetic mark for oral cancer diagnosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 2011;40(9):665-676.

196. Rajesh P, Dikshit D, Gillio T, Brennan P, Marco L, Fiano B, Jose M. Hypermethylation, risk factors, clinical characteristics, and survival in 235 patients with laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Cancer*, 2007;110(8):1745-1751.

197. Ramdas L, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, Story MD. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck*, 2009;31(5):642-54.

198. Rather M, Nagashri MN, Swamy SS, Gopinath KS, Kumar A. Oncogenic microRNA-155 down-regulates tumor suppressor CDC73 and promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation: implications for cancer therapeutics. *J Biol Chem*, 2013;288(1):608-18.

199. Reis PP, Tomenson M, Cervigne NK, Machado J, Jurisica I, Pintilie M *et al*. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*, 2010;9:238.

200. Reis PP, Waldron L, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Galloni NN, Xuan Y, Cervigne NK, Warner GC, Makitie AA, Simpson C, Goldstein D, Brown D, Gilbert R, Gullane P, Irish J, Jurisica I, Kamel-Reid S. A gene signature in histologically normal surgical margins is predictive of oral carcinoma recurrence. *BMC Cancer*, 2011;11(11):437.

201. Rettori MM, de Carvalho AC, Longo AL, de Oliveira CZ, Kowalski LP, Carvalho AL, Vettore AL. *TIMP3* and *CCNA1* hypermethylation in HNSCC is associated with an increased incidence of second primary tumors. *Journal of Translational Medicine*, 2013;11:316.

202. Richard S. The epigenetics of oral cancer. *Int.J Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2006;35(2):101-108.

203. Righini CA, Fraipont F, Timsit JF, Faure C, Brambilla E, Reyt E, Favrot MC. Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence. *Clin Cancer Res*, 2007;13:1179–1185.
204. Rigi-Ladiz MA, Kordi-Tamandani DM, Torkamanzehi A. Analysis of hypermethylation and expression profiles of APC and ATM genes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clinical Epigenetics*, 2011;3(1):6.
205. Rikardsen O G, Bjerkli I-Hi, Steigen SE. Clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma in Northern Norway: a retrospective study. *BMC Oral Health*, 2014;14:103.
206. Rodriguez PC, Adelstein DJ. Advances in Chemotherapy Options for Head and Neck Cancer. *US Oncological Review*, 2009;5(1):36-9.
207. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Leonart M E, Castellvi J, Ramony SC. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*, 2011;30:2087–2097.
208. Rosas SLB, Koch W, Carvalho M, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D. Promoter Hypermethylation Patterns of *p16*, *O6-Methylguanine-DNA-methyltransferase*, and *Death-associated Protein Kinase* in Tumors and Saliva of Head and Neck Cancer Patients. *Cancer Res*, 2001;61:39.
209. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol*, 2008;26(4):462-9.
210. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*, 2008;18(10):505-16.
211. Roy R, De Sarkar N, Ghose S, Paul RR, Pal M, Bhattacharya C, Chowdhury SK, Ghosh S, Roy B. Genetic variations at microRNA and processing genes and risk of oral cancer. *Tumour Biol*, 2014;35(4):3409-14.
212. Rusthoven KE, Raben D, Song JI, Kane M, Altoos TA, Chen C. Survival and patterns of relapse in patients with oral tongue cancer. *J Oral Maxillofac Surg*, 2010;68(3):584-9.
213. Sailasree_R, Abhilash AM, Sathyan K, Nalinakumari R, haji Thomas S. Differential Roles of p16INK4A and p14ARF Genes in Prognosis of Oral Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008;17(8):414–421.
214. Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2012;22:50–55.
215. Santoro A, Pannone G, Papagerakis S, Serpico R, Guida AL, Muzio L, Bufo P. Epigenetic Profiling of Oral Cancer, *Oral Cancer*, (2012) Dr. Kalu U. E. Ogbureke (Ed.), ISBN: 978-953-51-0228-1, InTech, DOI: 10.5772/31386.
216. Sasaki A, Mese H, Alcalde RE, Tsuji T, Matsumura T. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer*, 2001;93:667–673.
217. Satish K, Gerd P. Identification of driver and passenger DNA methylation in cancer by epigenomic analysis. *Adv Genet*. 2010;70(7):277–308.
218. Satoru S. Inactivation of the p14^{ARF}, p15^{INK4B} and p16^{INK4A} genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas, *oral oncology*, 2001;37(6):498–504.
219. Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, et al: MGMT expression in oral pre-cancerous and cancerous lesions: correlation with progression, nodal metastasis and poor prognosis. *Oral Oncol*, 2007;43:515-522.

220. Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, Pezzetti F, Rubini C, Girardi A. MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2010;23(4):1229-34.
221. Schickel R, Boyerinas B, Park S-M and Peter M E . MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*, 2008;27:5959-5974.
222. Schmidt L, Chi TV. Methylation Array Analysis of Preoperative and Postoperative Saliva DNA in Oral Cancer Patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008;17:3603-3611.
223. Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Hanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 2008;455:58-63.
224. Serrano NA, Xu C, Liu Y, Wang P, Fan W, Upton PM, Houck JR, Lohavanichbutr P, Kao M, Zhao LP, Schwartz SM, Chen C, Méndez E. Integrative Analysis in Oral Squamous Cell Carcinoma Reveals DNA Copy Number-Associated miRNAs Dysregulating Target. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2012;147(3):501-508.
225. Shaw R. The epigenetics of oral cancer. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg*, 2006;35:101-108.
226. Shaw RJ, Hall GL, Lowe D, Liloglou T, Field J.K, Sloan P, Risk JM. The Role of Pyrosequencing in Head and Neck Cancer Epigenetics. Correlation of Quantitative Methylation Data With Gene Expression. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008;134(3):251-256.
227. Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, Brown JS, Vaughan ED, Lowe D, Field JK, Risk JM. Promoter methylation of P16, RAR β , E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *British Journal of Cancer*, 2006;94:561-568.
228. Shi LJ, Zhang CY, Zhou ZT, Ma JY, Liu Y, Bao ZX, Jiang WW. MicroRNA-155 in oral squamous cell carcinoma: Overexpression, localization, and prognostic potential. *Head Neck*. 2014. doi: 10.1002/hed.23700
229. Shiiba M, Shinozuka K, Saito K, Fushimi K, Kasamatsu A, Ogawara K, Uzawa K, Ito H, Takiguchi Y, Tanzawa H. MicroRNA-125b regulates proliferation and radioresistance of oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 2013;108(9):1817-21.
230. Shiiba M, Uzawa K, Tanzawa H. MicroRNAs in head and neck squamous cell Carcinoma (HNSCC) and oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Cancers (Basel)*, 2010;2:653-69.
231. Silverman S.JR. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. *The Journal of the American Dental Association*, 2001;132(1):7S-11S.
232. Sinha P, Bahadur S, Thakar A, Matta A, Macha M, Ralhan R, Gupta SD. Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue. *Head Neck*, 2009;31(11):1423-1430.
233. Siow MY, Ng LP, Chong VK, Jamaludin M, Abraham MT, Abdul Rahman ZA, Kallarakkal TG, Yang YH, Cheong SC, Zain RB. Dysregulation of miR-31 and miR-375 expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma. *Oral Dis*, 2014;20(4):345-51.
234. Slaby O, Svoboda M, Fabian P. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*, 2007;72(5-6):397-402.
235. Smith LT, C Plass. DNA methylation leaves its mark in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas (HNSCC). *Current Genomics*, 2004;5(6).

236. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours. 7th edition. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009.
237. Soga D, Yoshida S, Shioyama S, Miyazaki H, Kondo S, Shintani S. microRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 2013;30(2):579-83.
238. Spriano G, Pellini R, Manciooco V, Ruscito P. Treatment of advanced neck metastases. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 2006;26(6):360-369.
239. Steele To, Meyers A. Early detection of premalignant lesions and oral cancer. *Otolaryngol Clin North Am*, 2011;44(1):221-9
240. Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, Dammann RH. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 2009;22:1519-1526.
241. Sterenczak K. A., Eckardt A, Kampmann A., Willenbrock S, Eberle N, Länger F, Kleinschmidt S, Hewicker-Trautwein M, Kreipe H, Nolte I, Escobar HM, Gellrich NC. HMGA1 and HMGA2 expression and comparative analyses of HMGA2, Lin28 and let-7 miRNAs in oral squamous cell carcinoma *BMC Cancer*, 2014;14:694.
242. Su PF, Huang WL, Wu HT, Wu CH, Liu TY, Kao SY. *p16^{INK4A}* promoter hypermethylation is associated with invasiveness and prognosis of oral squamous cell carcinoma in an age-dependent manner. *Oral oncology*, 2010;46(10):734-739.
243. Sun YM, Lin KY, Chen YQ. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *Journal of Hematology & Oncology*, 2013;6:6.
244. Supic G, Kozomara R, Jovic N, Zeljic K, Magic Z. Prognostic significance of tumor-related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 2011;47(8):702-708.
245. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer *Molecular Oncology*, 2012;6(6):567-578.
246. Suzuki M, Yoshino I. Identification of MicroRNAs Caused by DNA Methylation That Induce Metastasis. *Future Oncology*, 2008;4(6):775-777.
247. Taioli E, Ragin C, Wang XH, Chen J, Langevin SM, Brown AR, Gollin SM, Garte S, Sobol RW. Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative MGMT promoter methylation. *BMC Cancer*, 2009;9:354.
248. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, 2004;3753-3756.
249. Tan HK, Saulnier P, Auperin A, Lacroix L, Casiraghi O, Janot F, Fouret P, Temam S. Quantitative methylation analyses of resection margins predict local recurrences and disease-specific deaths in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Br J Cancer*, 2008;99:357-363.
250. Tang, X-H, Albert M, Scognamiglio T, Gudas LJ. A DNA Methyltransferase Inhibitor and *All-trans* Retinoic Acid Reduce Oral Cavity Carcinogenesis Induced by the Carcinogen 4-Nitroquinoline 1-Oxide. *Cancer Prev Res*, 2009;2:1100-1110.
251. Tanic N, Dedovic-Tanic N, Popovic B, Kosanovic R, Milain J. Moleculobiological Characteristics of Oral Squamous Cell Carcinomas. *Serbian Dental Journal*, 2011;58(2):67.
252. Thong, KL, Khor GH, Zain RB. *Pathways Deregulation in Oral Squamous Cell Carcinoma using Methylation Profiling*. *Journal Dental Research*, 2011.
253. Tokumaru S, Suzuki M, Yamada H, Nagino M, Takahashi T. let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis*, 2008;29:2073-2077.

254. Towle R, Garnis C. Methylation-Mediated Molecular Dysregulation in Clinical Oral Malignancy. *Journal of Oncology*, 2012; Article ID 170172:12 pages.
255. Tran N, McLean T, Zhang X, Zhao CJ, Thomson JMi, O'Brien Cr, Rose B. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007;358(1):12-17.
256. Tran N, O'Brien CJ, Clark J, Rose B. Potential Role of Micro - RNAs in head and Neck Tumorigenesis. *Head Neck*, 2010;32(8):1099-111.
257. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol*, 2007;43(6):523-34.
258. Veerla S, Lindgren D, Kvist A, Frigyesi A, Staaf J, Persson H, Liedberg F, Chebil G, Gudjonsson S, Borg Å, Månsson W, Rovira C, Höglund M. MiRNA expression in urothelial carcinomas: Important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. *Int. J. Cancer*, 2009;124:2236–2242.
259. Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. E-cadherin in oral SCC: An analysis of the confusing literature and new insights related to its immunohistochemical expression. *Histol. Histopathol*, 2012;27:141–150.
260. Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2003;105(1):41-6.
261. Wang A, Landén NX, Meisgen F, Lohcharoenkal W, Stähle M. MicroRNA-31 Is Overexpressed in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Regulates Cell Motility and Colony Formation Ability of Tumor Cells, 2014. *PLoS ONE* 9(7): e103206.
262. Warner GC, Reis PP, Jurisica I, Sultan M, Arora S, Macmillan C, Makitie AA, Grenman R, Reid N, Sukhai M, Freeman J, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S. Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlated with nodal metastasis. *Int J Cancer*, 2004;110:857–868.
263. Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer*, 2007;43(10):1529-44.
264. Wiklund ED, Gao S, Hulf T, Sibbritt T, Nair S, Costea DE, Villadsen SB, Bakholdt V, Bramsen JB, Sørensen JA, Kroghdahl A, Clark SJ, Kjems J. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. 2011;6(11):e27840.
265. Wong IHN. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction-based methods for DNA methylation analyses. *Methods in Molecular Biology*, 2006;336:33–43.
266. Wong TS, Gao W, Ho W-K, Chan J Yu-Wai, Wei Wl, Tsang R.K-Y. MicroRNA Dysregulation in Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, 2012. ISBN: 978-953-51-0024-9.
267. Wong TS, Liu B, Wong B, Yuen W, Wei I. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue. *Clinical Cancer Research*, 2008;14(9):2588–2592.
268. Wong TS, Liu XB, Chung-Wai Ho A, Po-Wing Yuen A, Wai-Man NgR. Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. *Int J Cancer*, 2008;123(2):251-7.
269. Wong YK, Lee LT, Liu CJ. Hypermethylation of MGMT and DAPK genepromoters is associated with tumorigenesis and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Dental Sciences*, 2011;6(3):158-164.

270. Worsham MJ, Chen KM, Stephen JK, Havard S, Benninger MS. Novel approaches to global mining of aberrantly methylated promoter sites in squamous head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010;143:116-121.
271. Wu BH, Xiong XP, Jia J, Zhang WF. MicroRNAs: new actors in the oral cancer scene. *Oral Oncol*, 2011;47(5):314-9.
272. Xiqiang L, Zugen C, Jinsheng Y, James X, Xiaofeng Z. MicroRNA Profiling and Head and Neck Cancer. *Comparative and Functional Genomics*, 2009; Article ID 837514;11.
273. Yalniz Z, Demokan S, Suoglu Y, Ulsan M, Dalay N. Simultaneous methylation profiling of tumor suppressor genes in head and neck cancer. *DNA Cell Biol*, 2011;30:17-24.
274. Yan B, Fu Q, Lai L, Tao X, Fei Y, Shen J, Chen Z, Wang Q. Downregulation of microRNA 99a in oral squamous cell carcinomas contributes to the growth and survival of oral cancer cells. *Molecular medicine reports*, 2012;6(3):1791-2997.
275. Yang Liu, Zeng-Tong Zhou, Qing-Bo He, Wei-Wen Jiang. DAPK promoter hypermethylation in tissues and body fluids of oral precancer patients. *Medical Oncology*, 2012;29(2):729-733.
276. Yang M, Shen H, Qiu C, Ni Y, Wang L, Dong W, Liao Y, Du J. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 2013;49(3):604-15.
277. Yang Z, Guan B, Men T, Fujimoto J, Xu X. Comparable molecular alterations in 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral and esophageal cancer in mice and in human esophageal cancer, associated with poor prognosis of patients. *In Vivo*, 2013;27(4):473-84.
278. Yeh KT, Shih MC, Lin TH, Chen JC, Chang JY, Kao CF, Lin KL, Chang JG. The correlation between CpG methylation on promoter and protein expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 2002;22(6C):3971-5.
279. Yong-Kie W. Hypermethylation of MGMT and DAPK gene promoters is associated with tumorigenesis and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Dental Sciences*, 2011;6(3):158-164.
280. Youssef EM, Lotan D, Issa JP, Wakasa K, Fan YH, Mao L, Hassan K, Feng L, Lee JJ, Lippman SM, Hong WK, Lotan R. Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 2004;10(5):1733-42.
281. Yu CC, Chen YW, Chiou GY, Tsai LL, Huang PI, Chang CY, Tseng LM, Chiou SH, Yen SH, Chou MY, Chu PY, Lo WL: MicroRNA let-7a represses chemoresistance and tumourigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation. *Oral Oncol*, 2011;47(3):202-210.
282. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, Kimchi A. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep*, 2009;10:285-92.
283. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNA as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 2007;302(1):1-12.
284. Zhang S, Guo C, Kong W, Liu Z. Promoter hypermethylation of DNA repair gene MGMT in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2006;26(1):101-104.
285. Zhang S, Kong WJ. Hypermethylation of the death-associated protein kinase promoter in laryngeal squamous cell cancer. *Zhonghua Zhong liu za zhi [Chinese Journal of Oncology]*, 2004;26(8):469-471.

286. Zhang X, Yang H, Lee JJ, Kim E, Lippman SM, Khuri FR, Spitz MR, Lotan R, Hong WK, Wu X. MicroRNA-related genetic variations as predictors for risk of second primary tumor and/or recurrence in patients with early-stage head and neck cancer. *Carcinogenesis*, 2010;31(12):2118-2123.
287. Zhao X, Zhang W, Liang H, Ji W. Overexpression of miR -155 Promotes Proliferation and Invasion of Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via Targeting SOCS1 and STAT3, 2013. *PLoS ONE* 8(2): e56395.
288. Zhou X, Wang X, Huang Z, Wang J, Zhu W. Prognostic Value of miR-21 in Various Cancers: An Updating Meta-Analysis, 2014. *PLoS ONE* 9(7): e102413.
289. Zhu E, Zhao F, Xu G, Hou H, Zhou L, Li X, Sun Z, Wu J. microRNA profiling and discovery based on high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res*, 2010;38:392-7.