

**mgr inż. Agnieszka Sobecka**

# **Wartość wybranych metod biologii molekularnej w diagnostyce, terapii oraz określeniu rokowania u chorych z nowotworami złośliwymi głowy i szyi**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

**Promotor: dr hab. n. med. Paweł Golusiński, prof. UZ**



Katedra i Klinika Chirurgii Głowy, Szyi  
i Onkologii Laryngologicznej

Kolegium Nauk Medycznych

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

Poznań, 2021

*Składam podziękowania*

*Promotorowi – Panu dr hab. n. med. Pawłowi Golusińskiemu, prof. UZ*

*za cenne uwagi merytoryczne.*

*Serdecznie dziękuję*

***Pani dr hab. n. med. Wiktorii M. Suchorskiej, prof. UM,***

*oraz **Koleżankom i Kolegom z Pracowni Radiobiologii***

*za ogromną życzliwość, nieocenione wsparcie*

*oraz wyjątkowo inspirującą współpracę naukową.*

*Pracę dedykuję Najbliższym,  
wyrażając głęboką wdzięczność za wyrozumiałość,  
bezwarunkowe wsparcie,  
oraz wiarę, że to, co robię, ma sens.*

## Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW .....	9
1. WSTĘP.....	13
1.1. Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi.....	13
1.2. Nowoczesne markery molekularne w diagnostyce, terapii oraz określeniu rokowania u chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi .....	15
1.2.1. Krążące komórki nowotworowe .....	16
1.2.2. Krążący nowotworowy DNA.....	18
1.2.3. Egzosomy .....	21
1.3. Mikro RNA .....	24
1.3.1. Biogeneza .....	25
1.3.2. Funkcja .....	28
1.3.3. Mikro RNA w nowotworach głowy i szyi .....	29
1.3.4. Mikro RNA hsa-miR-6510-3p .....	31
2. CEL PRACY .....	33
3. MATERIAŁY I METODY .....	34
3.1. Komercyjnie dostępne linie komórkowe.....	34
3.1.1. Linia komórkowa FaDu .....	34
3.1.2. Linia komórkowa H103 .....	34
3.2. Tkanki nowotworowe oraz prawidłowe pobrane od chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi.....	35
3.3. Hodowla komórkowa .....	37

3.4.	Transfekcja .....	38
3.5.	Izolacja RNA.....	38
3.6.	Analiza ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p z wykorzystaniem ilościowego PCR w czasie rzeczywistym .....	39
3.6.1.	Odwrotna transkrypcja .....	39
3.6.2.	Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym.....	43
3.7.	Ocena morfologii.....	44
3.8.	Analiza ekspresji genów na poziomie transkryptu metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.....	45
3.8.1.	Odwrotna transkrypcja .....	45
3.8.2.	PCR w czasie rzeczywistym .....	45
3.9.	Analizy cytometryczne.....	47
3.9.1.	Analiza cyklu komórkowego.....	47
3.9.2.	Analiza procesu śmierci komórkowej .....	48
3.9.3.	Ocena poziomu dwuniciowych pęknięć DNA .....	49
3.9.4.	Analiza poziomu ekspresji markerów macierzystości .....	49
3.10.	Analiza migracji komórkowej metodą <i>wound healing assay</i> .....	50
3.11.	Analiza proliferacji komórkowej z wykorzystaniem testu MTT .....	50
3.11.1.	Wyznaczenie stężenia IC50 .....	51
3.11.2.	Analiza proliferacji komórkowej .....	52
3.12.	Analiza statystyczna wyników .....	52

4. WYNIKI.....	53
4.1. Analiza poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w tkankach nowotworowych pochodzących od chorych z HNSCC.....	53
4.2. Analiza poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w komórkach linii FaDu i H103 transfekowanych miR-6510.....	56
4.3. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na morfologię komórek linii FaDu i H103	57
4.4. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego linii FaDu i H103.....	59
4.5. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na proliferację komórek linii FaDu i H103	62
4.6. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na procesy migracji komórkowej linii FaDu i H103.....	62
4.7. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na macierzystość komórek linii FaDu i H103	65
4.8. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na indukcję procesu apoptozy w komórkach linii FaDu i H103 .....	67
4.8.1. Analiza poziomu ekspresji markerów apoptozy na poziomie transkryptu .....	67
4.8.2. Analiza cytometryczna poziomu apoptozy .....	68
4.9. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na radiowrażliwość komórek linii FaDu i H103.....	70
4.10. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na chemiowrażliwość komórek linii FaDu i H103.....	72
5. DYSKUSJA .....	73
6. WNIOSKI .....	86

STRESZCZENIE .....	87
ABSTRACT .....	89
PIŚMIENNICTWO .....	91
WYKAZ RYCIN.....	106
WYKAZ TABEL .....	109



## WYKAZ SKRÓTÓW

Ago2 - białko Argonauta 2 (ang. *Argonaute 2*)

AIF - czynnik indukujący apoptozę (ang. *Apoptosis-Inducing Factor*)

ATCC - Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych (ang. *American Type Culture Collection*)

BSA - albumina surowicy bydlęcej (ang. *Bovine Serum Albumin*)

cDNA - komplementarny DNA (ang. *complementary DNA*)

cfDNA - krążący DNA (ang. *cellular-free DNA*)

CTCs - krążące komórki nowotworowe (ang. *Circulating Tumour Cells*)

ctDNA - krążący DNA nowotworowy (ang. *circulating tumour DNA*)

ddPCR - emulsyjny PCR (ang. *Droplet Digital PCR*)

DGCR8 - białko mikroprocesora (ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*)

DMEM - podłoże Eagle'a zmodyfikowane metodą Dulbecco (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO - dimetylosulfotlenek (ang. *Dimethyl Sulfoxide*)

DNA - kwas deksyrybonukleinowy (ang. *Deoxyribonucleic Acid*)

DSBs - podwójnoniciowe pęknięcia DNA (ang. *Double-Strand Breaks*)

dsRBD - domena wiążąca podwójnoniciowy RNA (ang. *double-stranded RNA Binding Domain*)

dsRNA - podwójnoniciowy RNA (ang. *double-stranded RNA*)

ECACC - europejska kolekcja linii komórkowych (ang. *European Collection of Authenticated Cell Cultures*)

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

EMT - przejście epithelialno-mezenchymalne (ang. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*)

EpCAM - antygen adhezyjny komórek nabłonkowych (ang. *Epithelial Cell Adhesion Molecule*)

EVs - pęcherzyki pozakomórkowe (*Extracellular Vesicles*)

FBS - surowica płodowa bydłęca (ang. *Fetal Bovine Serum*)

FDA - Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)

GAPDH - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*)

HNSCC - rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (ang. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*)

HPV - wirus brodawczaka ludzkiego (ang. *Human Papilloma Virus*)

IC50 - stężenie hamujące w 50% funkcje biologiczne i biochemiczne (ang. *Inhibitory Concentration*)

KRAS - onkogen z rodziny RAS (ang. *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue*)

LSCC - rak płaskonabłonkowy krtani (ang. *Laryngeal Squamous Cell Carcinoma*)

MACS - aktywowane magnetycznie sortowanie komórek (ang. *Magnetic-Activated Cell Sorting*)

miRNA - mikroRNA (ang. *microRNA*)

mRNA - informacyjny RNA (ang. *messenger RNA*)

MTT - bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenylotetrazoliowy (ang. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

MVs - mikropęcherzyki (ang. *Microvesicles*)

ncRNA - niekodujący RNA (ang. *non-coding RNA*)

NGS - sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*)

nt - nukleotyd (ang. *nucleotide*)

OS - wskaźnik ogólnego przeżycia (ang. *Overall Survival*)

OSCC - rak płaskonabłonkowy jamy ustnej (ang. *Oral Squamous Cell Carcinoma*)

PAZ - domena białka Dicer (ang. *Piwi/Argonaute/Zwille*)

PBS - buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. *Phosphate Buffered Saline*)

PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

PFS - wskaźnik przeżycia wolnego od progresji choroby (ang. *Progression-Free Survival*)

pre-miRNA - prekursorowy miRNA (ang. *precursor-miRNA*)

pre-rRNA - prekursorowy rRNA (ang. *precursor-rRNA*)

pri-miRNA - transkrypt pierwotny miRNA (ang. *primary miRNA*)

PRR - domena bogata w reszty proliny (ang. *Proline-Rich Region*)

pz - para zasad (bp, ang. *base-pair*)

RFS - wskaźnik przeżycia wolnego od wznowy (ang. *Recurrence-Free Survival*)

RIIID - domena Rnazy III (ang. *Rnase III Domain*)

RISC - kompleks wyciszający indukowany RNA (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*)

RNA - kwas rybonukleinowy (ang. *Ribonucleic Acid*)

RS - domena bogata w reszty seryny i argininy (ang. *RS-rich domain*)

RT-qPCR - ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. *Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*)

SEC - chromatografia wykluczania (ang. *Size Exclusion Chromatography*)

TDE - egzosomy pochodzenia nowotworowego (ang. *Tumour-Derived Exosomes*)

TRBP - domena białkowa kompleksu RISC (ang. *Transactivation Response RNA Binding Protein*)

UTR - region niepodlegający translacji (ang. *Untranslated Region*)

# 1. WSTĘP

## 1.1. Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi

Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (HNSCC, ang. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) rozwija się w obrębie nabłonka wielowarstwowego płaskiego błony śluzowej pokrywającej wspólny górny odcinek układu oddechowego i przewodu pokarmowego. Z uwagi na lokalizacje anatomiczne obejmujące jamę ustną, jamę nosową wraz z zatokami przynosowymi, gardło oraz krtani stanowi klinicznie heterogenną grupę nowotworów (Sanderson i Ironside 2002). Aktualne dane wskazują, że pod względem częstości występowania HNSCC zajmuje szóste miejsce na świecie pośród wszystkich nowotworów złośliwych. Rocznie odnotowuje się około 500 tysięcy nowych zachorowań, co stanowi 6% wszystkich diagnozowanych przypadków złośliwych chorób nowotworowych (Thomas i Grandis, 2009; Suh, Amelio i wsp., 2014; Bray, Ferlay i wsp., 2018). Wykazano, że ekspozycja na kancerogeny zawarte w dymie tytoniowym oraz wysokoprocentowy alkohol znamienne podwyższa ryzyko zachorowania na HNSCC. Do istotnych czynników ryzyka rozwoju niektórych HNSCC należą również zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV, ang. *Human Papilloma Virus*) ze szczególnym uwzględnieniem onkogennych typów HPV16 oraz HPV18 (Thomas i Grandis, 2009; Maiti, Mondal i wsp., 2013; Martinez-Useros i Garcia-Foncillas, 2015).

Ostatnie badania sugerują, że ze względu na duże zróżnicowanie cech molekularnych oraz odmienne rokowania kliniczne, nowotwory HPV-pozytywne [HPV (+)] oraz HPV-negatywne [HPV (-)] należy traktować jako dwie odrębne jednostki chorobowe (Leemans, Snijders i wsp., 2018). W procesie kancerogenezy indukowanej zakażeniem wirusem HPV dochodzi do aktywacji transformacji komórkowej i zatrzymania procesu apoptozy za pośrednictwem wirusowych białek E6 oraz E7. Posiadają one zdolność do blokowania aktywności białek supresorowych p53 (ang. *Tumor Protein 53*) oraz RB1 (białko gładkiej siatkówki, ang. *Retinoblastoma Protein*) (Hammerman, Hayes i wsp., 2015; Canning, Guo i wsp., 2019). W przypadku HPV (+) HNSCC rzadziej obserwuje się mutacje w genach *TP53* i *RB1* (Westra, Taube i wsp., 2008). Liczne badania wskazują ponadto na znacząco niższe obciążenie genetyczne tych nowotworów w stosunku do HNSCC HPV-niezależnych (Stransky, Egloff i wsp., 2011; Hanna, Lizotte i wsp., 2018). Inne dowodzą, że ogólna częstość występowania mutacji w obu grupach nowotworów jest podobna, jednak podkreślają

ich odmienny profil (Hammerman, Hayes i wsp., 2015; Seiwert, Zuo i wsp., 2015). W przypadku nowotworów HPV-zależnych większość z tych aberracji dotyczy jednak amplifikacji onkogenów *PIK3CA* (3-kinaza fosfatidyloinozytolo-4,5-bisfosforanu, katalityczna podjednostka alfa; ang. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*) oraz *E2F1* (ang. *E2F Transcription Factor 1*) biorących udział w regulacji cyklu komórkowego (Hammerman, Hayes i wsp., 2015; Keck, Zuo i wsp., 2015; Denechaud, Fajas i wsp., 2017; Leemans, Snijders i wsp., 2018). Do często obserwowanych należą również delecje w genie *TRAF3* (czynnik 3 związany z receptorem TNF; ang. *TNF Receptor-Associated Factor 3*) zaangażowanym w regulację szlaku sygnałowego NFκB (Hayes, Van Waes i wsp., 2015).

HPV-negatywne nowotwory głowy i szyi charakteryzują się szerokim spektrum mutacji genowych, amplifikacji i modyfikacji epigenetycznych, których występowanie związane jest z agresywnym przebiegiem choroby oraz wykształceniem oporności na zastosowane leczenie. Do najczęściej występujących należą mutacje punktowe i strukturalne w genach supresorowych *TP53*, *RBI* i *CDKN2A* (zależny od cykliny inhibitor kinazy 2A; ang. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*) (Leemans, Snijders i wsp., 2018). W około 5-10% HNSCC notuje się także mutacje w genie *HRAS* kodującym białko p21 (ang. *Transforming Protein 21*) zaangażowane w regulację proliferacji komórkowej (Seiwert, Zuo i wsp., 2015). Z dużą częstością występują również zmiany w strukturze i sekwencji genów zaangażowanych w procesy różnicowania komórkowego (geny *NOTCH1*, *TP53*), odpowiedzi na stres oksydacyjny (*NFE2L2*, *KEAP1*) oraz utrzymanie właściwości macierzystych komórki (*FAT1*, *AJUBA*; szlak sygnałowy WNT/β-katenina) (Leemans, Snijders i wsp., 2018; Canning, Guo i wsp., 2019).

Obecnie leczenie HNSCC, uwzględniając lokalizację anatomiczną, stopień zaawansowania i etiopatogenezę, obejmuje złożone schematy składające się z metod chirurgicznych, radioterapii, chemioterapii oraz immunoterapii (Suh, Amelio i wsp., 2014; Ahn, Choi i wsp., 2015; Leemans, Snijders i wsp., 2018). Pomimo znaczącego postępu w udoskonalaniu tych strategii terapeutycznych w ostatnich latach, wskaźniki 5-letniego przeżycia u chorych z rakiem głowy i szyi nie uległy znaczącej poprawie i wynoszą średnio jedynie około 50% (Thomas i Grandis, 2009). Jest to związane z faktem, że HNSCC stanowi wysoce heterogenną jednostkę chorobową o bardzo zróżnicowanej etiologii oraz profilu molekularnym (Leemans, Snijders i wsp., 2018). Konieczne stało się zatem lepsze

zrozumienie biologii nowotworów głowy i szyi, identyfikacja nowych, specyficznych markerów biologicznych oraz cząsteczek, które mogłyby stanowić cele w terapii molekularnej HNSCC. Pozwoli to na lepszą personalizację leczenia oraz wczesne wykrywanie i monitorowanie przebiegu choroby. Obiecującym narzędziem pozwalającym na zrealizowanie wymienionych powyżej wyzwań wydają się być metody biologii molekularnej.

## **1.2. Nowoczesne markery molekularne w diagnostyce, terapii oraz określeniu rokowania u chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi**

Poszerzenie stanu wiedzy, które nastąpiło w ostatnich latach w dziedzinie medycyny i nauki, pozwoliło na dokładniejsze poznanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw inicjacji kancerogenezy, progresji nowotworu oraz wykształcenia mechanizmów oporności na zastosowaną terapię. Znaczący rozwój technologii pozwolił natomiast na opracowanie innowacyjnych metod, umożliwiających wykrywanie i analizę nowoczesnych markerów molekularnych wielu chorób, w tym nowotworów złośliwych.

W ostatnim czasie rosnące zainteresowanie zyskuje tzw. płynna biopsja (ang. *Liquid Biopsy*), czyli metoda diagnostyczna umożliwiająca wykrycie we krwi lub innych płynach ustrojowych pacjenta materiału genetycznego pochodzącego z komórek guza (Bellairs, Hasina i wsp., 2017). Podstawową zaletą tej techniki jest łatwość pozyskania materiału, a co za tym idzie – jej niewielka inwazyjność. Z tego względu płynna biopsja może być wykonywana kilkakrotnie, na różnych etapach leczenia nowotworu, co stwarza możliwość monitorowania przebiegu choroby, określenia odpowiedzi guza na zastosowaną terapię oraz wczesne wykrywanie nawrotu choroby nowotworowej po niepowodzeniu zastosowanego leczenia (Bellairs, Hasina i wsp., 2017; Ribeiro, de Melo i wsp., 2019). Metoda ta pozwala ponadto na wykonanie szerokiego spektrum analiz obejmujących badanie profilu mutacji obecnych w genomie komórek nowotworowych, specyficznych markerów białkowych czy też cząstek uwalnianych przez komórki guza do płynów ustrojowych, takich jak egzosomy czy niekodujące RNA (Spector, Farlow i wsp., 2018; Ribeiro, de Melo i wsp., 2019).

### 1.2.1. Krążące komórki nowotworowe

Jednym z markerów izolowanych metodą płynnej biopsji są krążące komórki nowotworowe (CTCs, ang. *Circulating Tumour Cells*). CTCs są komórkami uwolnionymi z guza nowotworowego i krążącymi we krwi obwodowej chorego. Po raz pierwszy opisane zostały w 1869 roku przez Thomasa Ashwortha, który zaobserwował obecność wolnych komórek we krwi chorego z przerzutami nowotworowymi i, analizując ich morfologię, udowodnił, że pochodzą z guza (Ashworth 1869). Mechanizm uwalniania CTCs do krwiobiegu nie został do końca poznany. Przypuszcza się, że jest związany z utratą właściwości adhezyjnych i uzyskaniem przez komórki zdolności do migracji na drodze przejścia epithelialno-mezenchymalnego (EMT, ang. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*) (Kulasinghe, Perry i wsp., 2015; Payne, Brooks i wsp., 2019).

Obecnie prowadzone są liczne badania nad opracowaniem skutecznej metody wykrywania i izolacji CTCs. Stanowi to pewne wyzwanie, gdyż, jak wykazano, krążące komórki nowotworowe stanowią jedynie około 0,004% ogółu komórek jednojądrzastych krwi (Dong, Skelley i wsp., 2013). Według innych badań, na miliard wszystkich komórek krążących we krwi, tylko jedna jest krążącą komórką nowotworową (McMullen, Chalmers i wsp., 2016). Metody izolacji CTCs można podzielić na dwie grupy: (i) te wykorzystujące właściwości fizyczne, takie jak rozmiar, kształt, gęstość, potencjał elektryczny oraz (ii) te, które wykorzystują cechy biologiczne, m. in. specyficzne markery białkowe.

Pierwsze badania nad wykrywaniem CTCs oparte były na metodzie ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR, ang. *Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*). Metoda ta pozwalała na wykrywanie w próbce RNA (kwas rybonukleinowy, ang. *Ribonucleic Acid*) specyficznego dla krążących komórek nowotworowych, nie dawała jednak możliwości precyzyjnego określania ich liczby oraz analizowania fenotypu (McMullen, Chalmers i wsp., 2016). Obecnie jedyną rekomendowaną przez Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) metodą izolacji CSCs jest zastosowanie systemu CellSearch® opartego na wykrywaniu antygenu adhezyjnego komórek nabłonkowych (EpCAM, ang. *Epithelial Cell Adhesion Molecule*), który fizjologicznie nie występuje na komórkach krwi. Metoda ta posiada jednak pewne ograniczenia. Jak zauważono, w procesie przejścia epithelialno-mezenchymalnego poziom ekspresji charakterystycznego dla komórek nabłonkowych



markera EpCAM znacznie spada. Wpływa to na jakość analiz wykonywanych z wykorzystaniem systemu CellSearch®, gdyż zapewnia wysoką specyficzność, ale jednocześnie ogranicza jego czułość w oznaczaniu CTCs m. in. w przypadku raka płaskonabłonkowego głowy i szyi.

Alternatywnymi metodami stosowanymi w izolacji krążących komórek nowotworowych są techniki cytometrii przepływowej, wykorzystanie komór mikroprzepływowych czy też aktywowanego magnetycznie sortowania komórek (MACS, ang. *Magnetic-Activated Cell Sorting*). To ostatnie przeprowadzane jest z użyciem kulek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałem skierowanym przeciwko antygenom nowotworowym. W badaniach nad CTCs w nowotworach głowy i szyi zastosowanie przeciwciała anti-EpCAM pozwalało na przeprowadzenie wydajnej izolacji (Guney, Yoldas i wsp., 2007).

Obecnie prowadzone są liczne badania nad przydatnością krążących komórek nowotworowych jako markerów diagnostycznych, prognostycznych i predykcyjnych w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi. Hristozova i wsp., (2012) metodami cytometrii przepływowej analizowali liczbę CTCs w grupie 42 chorych z zaawansowanym, nieoperecyjnym HNSCC. Naukowcy wykazali istotny statystycznie związek pomiędzy podwyższoną liczbą CTCs a występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych. Nie zaobserwowano jednak korelacji pomiędzy podwyższonym odsetkiem komórek krążących a wzrastającym stopniem zaawansowania choroby. Mogło to mieć związek z małą czułością zastosowanej metody detekcji. Obecność CTCs naukowcy byli w stanie wykryć jedynie u 18 na 42 uczestników badania (Hristozova, Konschak i wsp., 2011). Kawada i wsp., (2017) z wykorzystaniem systemu CellSieve wykrywali obecność CTCs w próbkach pobranych od 32 chorych z HNSCC. Czułość metody okazała się stosunkowo wysoka, gdyż krążące komórki wykryto u 29 na 32 badanych chorych. Wykazano, że wyższy odsetek CTCs był istotnie statystycznie związany z wyższym stopniem zaawansowania choroby (stadium III i IV). Nie wykazano jednak powiązania pomiędzy podwyższoną liczbą CTCs i występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych (Kawada, Takahashi i wsp., 2017).

Jatana i wsp., (2010), badając przydatność prognostyczną CTCs, analizowali ich liczbę w próbkach uzyskanych od 48 chorych z HNSCC, z których większość posiadała III lub IV stopień zaawansowania choroby. Wykazali oni, że wykrywalny poziom CTCs

(zaobserwowany u 71% badanych) związany był ze obniżeniem wskaźnika przeżycia wolnego od choroby (DFS, ang. *Disease-Free Survival*). Ponadto naukowcy dowiedli, że chorzy, u których liczba CTCs przekraczała 25 komórek/ml posiadali znacznie mniej zadowalający wynik kliniczny (Jatana, Balasubramanian i wsp., 2010). Zbliżone wyniki uzyskali Grisanti i wsp., (2014), którzy w badaniu z udziałem 54 chorych z HNSCC wykazali, że pacjenci posiadający powyżej 2 CTCs/ml krwi charakteryzowali się obniżonymi wskaźnikami ogólnego przeżycia (OS, ang. *Overall Survival*) oraz przeżycia wolnego od progresji choroby (PFS, ang. *Progression-Free Survival*) (Grisanti, Almici i wsp., 2014). Podobne rezultaty w swoich badaniach uzyskali także Partridge i wsp., (2003) oraz Gröbe i wsp., (2014), udowadniając, że CTCs mogą stanowić potencjalny marker prognostyczny w HNSCC (Partridge, Brakenhoff i wsp., 2003; Gröbe, Blessmann i wsp., 2014).

Buglione i wsp., (2012) oceniali przydatność CTCs w przewidywaniu odpowiedzi na zastosowane leczenie. Analiza liczby komórek krążących z wykorzystaniem systemu CellSearch® przeprowadzona w grupie 73 chorych z HNSCC wykazała, że pacjenci, u których odsetek CTCs znajdował się poniżej poziomu detekcji lub obniżał się podczas terapii, znacznie lepiej odpowiadali na zastosowane leczenie. Odwrotny efekt naukowcy zaobserwowali w grupie chorych, u których notowano wzrost poziomu CTCs w kolejnych etapach terapii (Buglione, Grisanti i wsp., 2012). Zbliżone wyniki uzyskali Inhestern i wsp., (2015), którzy analizowali poziom CTCs u 40 chorych z HNSCC przed i po leczeniu metodami chirurgii, chemioterapii indukcyjnej oraz adiuwantowej radiochemioterapii. Naukowcy wykazali, że pacjenci, u których początkowa liczba komórek krążących znajdowała się powyżej wartości mediany gorzej odpowiadali na leczenie i posiadali znacznie obniżony wskaźnik przeżycia wolnego od wznowy (RFS, ang. *Recurrence-Free Survival*) (Inhestern, Oertel i wsp., 2015). Rezultaty te potwierdzili Wang i wsp., (2019), porównując liczbę CTCs u 47 chorych z HNSCC przed i 2-4 tygodnie po odbytej radiochemioterapii. Badacze udowodnili, że obniżenie poziomu komórek krążących w wyniku zastosowanego leczenia jest istotnie statystycznie powiązane z bardziej korzystnymi wskaźnikami PFS i OS w badanej grupie (Wang, Wu i wsp., 2019).

### **1.2.2. Krążący nowotworowy DNA**

Krążący DNA (cfDNA, ang. *Cellular-Free DNA*) to pozakomórkowy DNA, który może występować w krwi obwodowej oraz innych płynach ustrojowych, takich jak ślina,

mocz, płyn opłucnowy czy płyn mózgowo-rdzeniowy (Peng, Chen i wsp., 2017). Po raz pierwszy zidentyfikowany został w osoczu krwi w 1948 roku przez zespół Mandel i Mateis (Mandel i Metais, 1948). Uwalnianie DNA z komórek zachodzi na drodze mechanizmów zarówno patogenicznych, jak i fizjologicznych, takich jak apoptoza, nekroza czy egzocytoza (Thierry, El Messaoudi i wsp., 2016). cfDNA ulega szybkiej degradacji przez nukleazy występujące we krwi i jest eliminowany przez wątrobę, śledzionę i nerki. Jego okres półtrwania jest stosunkowo krótki i wynosi około 10 – 15 minut (Thierry, El Messaoudi i wsp., 2016).

W 1977 roku Leon i wsp., jako pierwsi opisali przypadek pacjenta nowotworowego, u którego rozpoznano podwyższony poziom krążącego DNA we krwi. Wysłano wtedy hipotezę, że DNA ten został uwolniony przez komórki guza nowotworowego (Leon, Shapiro i wsp., 1977). Założenie to częściowo potwierdzili Stroun i wsp., (1989), identyfikując w sekwencji krążących cząsteczek zmiany genetyczne charakterystyczne dla komórek nowotworowych (Stroun, Anker i wsp., 1989). W 1994 roku Sorenson i wsp., wykazali w badanych cząsteczkach cfDNA mutacje punktowe w onkogenie KRAS (ang. *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue*), ostatecznie udowadniając, że fragmenty te są pochodzenia nowotworowego (Sorenson, Pribish i wsp., 1994). Obecność specyficznych dla komórek nowotworowych zmian w genomie (takich jak mutacje punktowe) pozwala zatem na rozróżnianie krążącego nowotworowego DNA (ctDNA, ang. *Circulating-Tumour DNA*) od DNA uwalnianego przez prawidłowe komórki (Esposito, Criscitiello i wsp., 2016; Thierry, El Messaoudi i wsp., 2016).

Stężenie cfDNA we krwi zdrowej osoby wynosi zwykle około 5 ng/ml, podczas gdy u pacjentów nowotworowych może osiągać nawet do kilkuset ng/ml krwi (Jahr, Hentze i wsp., 2001; Thierry, El Messaoudi i wsp., 2016). Przyczyny tego zjawiska nie zostały jeszcze do końca poznane. Przypuszcza się jednak, że wraz ze wzrostem rozmiaru guza i jego postępującą hipoksją, dochodzi do nekrozy niedotlenionych komórek i uwolnienia z nich fragmentów materiału genetycznego (Esposito, Criscitiello i wsp., 2016; Thierry, El Messaoudi i wsp., 2016). Inna teoria głosi, że ctDNA może dostawać się do krwiobiegu w wyniku lizy krążących komórek nowotworowych (Ahn, Chan i wsp., 2014).

Jak dotąd nie wyjaśniono, czy ctDNA odgrywa aktywną rolę w procesie onkogenezy, czy może jest tylko produktem ubocznym wydzielanym przez komórki nowotworowe.

García-Olmo i wsp., (1991) zasugerowali, że krążący DNA posiada zdolność indukowania przerzutów poprzez aktywną transfekcję komórek prawidłowych. Naukowcy zaindukowali onkogenezę u zdrowych szczurów, używając surowicy krwi pochodzącej od szczurów z guzem nowotworowym (García-Olmo, Ontañón i wsp., 1999). Podobne rezultaty ten sam zespół badawczy uzyskał, inkubując prawidłowe komórki *in vitro* z surowicą krwi pobraną od chorych z rakiem jelita grubego (García-Olmo, Domínguez i wsp., 2010).

Metody biologii molekularnej służące detekcji i analizie cząsteczek krążącego nowotworowego DNA ewoluowały na przestrzeni ostatnich dekad. Początkowo analiza ctDNA opierała się na amplifikacji docelowych sekwencji genowych metodami PCR w czasie rzeczywistym, emulsyjnym PCR (ddPCR, ang. *Droplet Digital PCR*) czy też sekwencjonowaniem metodą Sangera (Malapelle, Pisapia i wsp., 2016). Obecnie wiodącą metodą stosowaną w badaniu krążącego nowotworowego DNA jest sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, ang. *Next Generation Sequencing*), które dzięki swej wysokiej przepustowości pozwala na jednoczesne oznaczenie wielu mutacji w licznych genach przy zachowaniu wysokiej specyficzności i czułości analizy (Malapelle, Pisapia i wsp., 2016).

Prowadzone obecnie badania nad rolą ctDNA w przebiegu choroby nowotworowej narządów głowy i szyi wykazały, że stężenie tych cząsteczek we krwi obwodowej może stanowić przydatne narzędzie diagnostyczne i prognostyczne. Mazurek i wsp., (2016) analizowali liczbę cząsteczek cfDNA we krwi obwodowej 200 chorych z HNSCC. Naukowcy wykazali, że średnie stężenie cfDNA w grupie badanej było znacznie większe niż w grupie kontrolnej, jednak po niżej poziomie istotności statystycznej. Wykazano natomiast, że w przypadku chorych z rakiem części ustnej gardła stężenie to było istotnie statystycznie wyższe niż w przypadku pacjentów z guzem umiejscowionym w innych lokalizacjach. Badacze udowodnili również istotne powiązanie pomiędzy liczbą cząsteczek cfDNA a stadium zaawansowania choroby oraz tworzeniem przerzutów nowotworowych w węzłach chłonnych (Mazurek, Rutkowski i wsp., 2016).

Hamana i wsp., (2005) porównywali poziom ctDNA przed i po interwencji chirurgicznej w grupie 64 chorych z HNSCC zlokalizowanym w jamie ustnej. W fazie przedoperacyjnej naukowcy byli w stanie wykryć ctDNA u 44% (28/64) chorych. Po zastosowaniu leczenia chirurgicznego, cząsteczki te były wykrywalne jedynie u 4 pacjentów z tej grupy, u których już w ciągu czterech tygodni od zakończenia terapii

zdiagnozowano przerzuty odległe. Przerzutów nie wykrył natomiast żaden z chorych, u których po zabiegu ctDNA znajdowało się na poziomie niewykrywalnym (Hamana, Uzawa i wsp., 2005). Wang i wsp., (2015) badali obecność ctDNA w pooperacyjnych próbkach osocza krwi obwodowej 9 chorych z HNSCC. Krążący nowotworowy DNA był wykrywalny u 3 z 9 przebadanych osób, u których, odpowiednio po 15, 9 i 1 miesiącu od pobrania próbki, zdiagnozowano wznowę miejscową (Wang, Springer i wsp., 2015). Ten sam zespół badaczy identyfikował obecność mutacji punktowych w sześciu genach (TP53, PIK3CA, CDKN2A, FBXW7, HRAS, NRAS) odgrywających istotną rolę w patogenezie HNSCC. W tym celu przeanalizowano próbki osocza oraz śliny pochodzące od 47 chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi, z których większość znajdowała się w zaawansowanym (III – IV) stadium choroby. ctDNA w próbkach śliny był wykrywalny u 100% chorych z rakiem jamy ustnej oraz u 47-70% chorych z guzem umiejscowionym w innych lokalizacjach. Po przeanalizowaniu próbek osocza, krążący nowotworowy DNA wykryto u 80% pacjentów z HNSCC jamy ustnej oraz u 91%, 86% i 100% u chorych odpowiednio: z rakiem części ustnej gardła, rakiem krtani i rakiem części krtaniowej gardła. Naukowcy wykazali tym samym, że ślina stanowi preferowane źródło ctDNA w przypadku raka jamy ustnej, natomiast osocze krwi obwodowej jest bardziej pożądanym materiałem w badaniach nad nowotworami umiejscowionymi w pozostałych lokalizacjach (Wang, Springer i wsp., 2015).

### **1.2.3. Egzosomy**

Egzosomy to małe pęcherzyki pozakomórkowe (EVs, ang. *Extracellular Vesicles*) produkowane przez wszystkie rodzaje komórek i obecne we wszystkich płynach ustrojowych organizmu (Tkach i Théry, 2016; Whiteside, 2016). Komórki zdolne są do uwalniania kilku typów EVS o różnych rozmiarach i funkcjach. Należą do nich: ciała apoptotyczne (1000 – 5000 nm), mikropęcherzyki (MVs, ang. *Microvesicles*; 200 – 1000 nm) oraz najmniejsze, zbliżone rozmiarem do cząstek wirusowych, egzosomy (30 – 150 nm) (Brinton, Sloane i wsp., 2015). Pierwotnie uważano, że egzosomy stanowią dla komórek jedynie drogę pozbywania się niepotrzebnych metabolitów (Stoorvogel, Kleijmeer i wsp., 2002). Najnowsze badania wskazują jednak na ich istotne znaczenie w utrzymywaniu homeostazy organizmu oraz w patofizjologii wielu chorób. Wykazano, że pęcherzyki te biorą udział w komunikacji międzykomórkowej oraz posiadają zdolność do modulowania aktywności komórek, takich jak

makrofagi (Bellmunt, López-Puerto i wsp., 2019) czy komórki dendrytyczne (Cui, Liu i wsp., 2019).

Komórki nowotworowe wydzielają znaczną ilość egzosomów (egzosomy pochodzenia nowotworowego, TDE, ang. *Tumour-Derived Exosomes*), które promują progresję nowotworu poprzez oddziaływanie z otaczającymi guz prawidłowymi tkankami. Posiadają one zdolność do aktywacji szlaków sygnałowych zaangażowanych w proliferację komórkową, angiogenezę czy tworzenie przerzutów (Liu, Yu i wsp., 2006; Webber, Steadman i wsp., 2010; Hood, San i wsp., 2011; King, Michael i wsp., 2012). Z tego względu pęcherzyki te uważa się za istotny składnik mikrośrodowiska guza oraz czynnik odgrywający znaczącą rolę w progresji choroby nowotworowej (Whiteside 2016).

Obecnie znanych jest kilka różnych technik izolacji egzosomów z płynów ustrojowych, do których należą m. in. chromatografia wykluczania (SEC, ang. *Size Exclusion Chromatography*), precypitacja w obecności roztworów polimerowych, oczyszczanie oparte na powinowactwie immunologicznym, zastosowanie komór mikroprzepływowych czy ultrawirowanie różnicowe (Li, Kaslan i wsp., 2017; Gurunathan, Kang i wsp., 2019). To ostatnie polega na wirowaniu próby z zastosowaniem różnych przyspieszeń w celu wyodrębnienia EVs o różnych rozmiarach. Metoda ta – choć często stosowana ze względu na swoją wydajność i stosunkowo niskie koszty – posiada jednak pewne ograniczenia. Pozwala bowiem na uzyskanie czystej frakcji egzosomów z medium hodowlanego. Uzyskanie podobnej jakości preparatu z płynów ustrojowych, takich jak mocz czy surowica krwi, jest zazwyczaj trudne lub niemożliwe. Często obserwuje się koprecypitację agregatów białek, ciałek apoptotycznych oraz fragmentów komórek wraz z izolowanymi mikropęcherzykami, co wymaga zastosowania dodatkowej metody ich oczyszczania (np. poprzez wirowanie w gradiencie gęstości) (Momen-Heravi, Balaj i wsp., 2013; Gurunathan, Kang i wsp., 2019; Zhang, Liu i wsp., 2019). Na uwagę zasługują również komercyjnie dostępne zestawy do izolacji egzosomów, takie jak ExoQuick (System Bioscience, CA, Stany Zjednoczone) (Brennan, Martin i wsp., 2020) czy Total Exosome Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, Stany Zjednoczone) (Zhou, Woodson i wsp., 2018). Produkty te zapewniają wydajną, powtarzalną i stosunkowo szybką metodę izolacji opartą o wielkość izolowanych cząstek (Li, Kaslan i wsp., 2017; Zhang, Liu i wsp., 2019).

Ostatnie badania wykazały, że egzosomy, jako obecne w płynach ustrojowych nośniki biologicznych cząsteczek, takich jak białka, lipidy czy kwasy nukleinowe, mogą stanowić nieinwazyjne, istotne klinicznie biomarkery progresji nowotworu oraz odpowiedzi na zastosowane leczenie (Whiteside 2016; Nonaka i Wong, 2018; Theodoraki, Hoffmann i wsp., 2018). Sharma i wsp., (2011), badając próbki śliny pochodzące od grupy chorych z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej oraz od zdrowych ochotników udowodnili, że ogólna liczba egzosomów w ślinie pacjentów z HNSCC jest istotnie podwyższona w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto badacze wykazali istotne różnice w morfologii oraz wielkości normalnych mikropęcherzyków oraz EVs pochodzenia nowotworowego (odpowiednio: kształt kulisty,  $67.4 \pm 2.9$  nm; kształt nieregularny,  $98.3 \pm 4.6$  nm) (Sharma, Gillespie i wsp., 2011). Kannan i wsp., (2017) badali profil mutacji oraz profil białkowy egzosomów wyizolowanych z surowicy krwi pochodzącej od chorych z HPV-pozytywnym rakiem migdałka. Naukowcy wykazali, że analiza tych mikropęcherzyków pozwala na wykrywanie infekcji wirusem HPV oraz może stanowić potencjalny biomarker we wczesnym wykrywaniu i monitorowaniu przebiegu choroby (Kannan, Hertweck i wsp., 2017). Zlotogorski-Hurvitz i wsp., (2019), stosując metodę spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera, analizowali widmo egzosomów obecnych w ślinie 21 chorych z rakiem jamy ustnej (OSCC, ang. *Oral Squamous Cell Carcinoma*) oraz 13 zdrowych ochotników. Badacze udowodnili, że zapis widm pozwala na odróżnienie egzosomów pochodzących od pacjentów z OSCC i mikropęcherzyków pobranych od osób z grupy kontrolnej ze 100-procentową czułością, 89-procentową specyficznością oraz 95-procentową dokładnością. Naukowcy zasugerowali tym samym, że metoda ta może stanowić potencjalne narzędzie diagnostyczne już na wczesnych etapach rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (Zlotogorski-Hurvitz, Dekel i wsp., 2019).

Najnowsze badania szczególną uwagę przywiązują do obecnych w egzosomach niekodujących RNA (ncRNAs, ang. *Non-coding RNAs*). Uważa się, że komórki nowotworowe mają zdolność do selektywnego „pakowania” określonych cząsteczek do wnętrza tych mikropęcherzyków. Za ich pośrednictwem kwasy nukleinowe są transportowane do odległych tkanek, gdzie mogą spełniać rolę onkogenów lub supresorów nowotworowych (Wang, Zhou i wsp., 2014; Huang, Yang i wsp., 2018; Qin, Guo i wsp., 2019). Li i wsp., (2016) w swoich badaniach z wykorzystaniem linii komórkowych raka płaskonabłonkowego jamy ustnej wykazali, że środowisko niedoboru tlenu może stymulować

komórki nowotworowe do wydzielania egzosomów przenoszących mikro RNA (miRNA, ang. MicroRNA) miR-21 - jeden z wiodących miRNA indukowanych hipoksją, posiadający właściwości antyapoptotyczne. Naukowcy udowodnili, że miR-21, dostając się za pośrednictwem mikropęcherzyków do komórek znajdujących się w warunkach normoksji, ma zdolność do nadawania im zdolności do przerzutowania (Li, Li i wsp., 2016). Wang i wsp., (2014) badali poziom ekspresji egzosomalnego miR-21 w surowicy krwi pochodzącej od 52 chorych z płaskonabłonkowym rakiem krtani (LSCC, ang. *Laryngeal Squamous Cell Carcinoma*). Wykazano, że poziom ten był istotnie podwyższony w surowicy krwi pochodzących od pacjentów z LSCC w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto wyższa ekspresja miR-21 korelowała ze stadiem zaawansowania choroby oraz obecnością przerzutów do węzłów chłonnych (Wang, Zhou i wsp., 2014). Gai i wsp., (2018), porównując profil ekspresji egzosomalnych miRNA w ślinie 21 chorych z OSCC oraz 11 zdrowych ochotników, wytypowali panel cząsteczek (m. in. miR-302b-3p, miR-517b-3p, miR-512-3p), które mogą stanowić potencjalne markery diagnostyczne w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej (Gai, Camussi i wsp., 2018).

### 1.3. Mikro RNA

Mikro RNA są klasą krótkich (18-25 pz), niekodujących RNA, które, poprzez oddziaływanie z regionem 3' UTR (region niepodlegający translacji, ang. *Untranslated Region*) mRNA (informacyjny RNA, ang. *Messenger RNA*), biorą udział w regulacji ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Pierwsze doniesienia o istnieniu tych cząsteczek pochodzą z lat 90. XX wieku, gdy podczas badań nad cyklem życiowym nicienia *Caenorhabditis elegans* wykazano obecność dwóch transkryptów genu *lin-4* warunkującego prawidłowe przejście ze stadium larwalnego L1 do L2. Krótszy z nich (21 nt) charakteryzował się komplementarnością wobec sekwencji zlokalizowanej w obszarze 3' UTR mRNA genu *lin-14* oraz zdolnością do jego negatywnej regulacji (Zhang, Kolb i wsp., 2004; Ouellet, Perron i wsp., 2006). Zasugerowano wówczas istnienie mechanizmu regulacji translacji białek poprzez oddziaływanie antysensownych RNA z mRNA. Odkrycie to zostało potwierdzone w 1998 przez Fire i wsp., którzy w swoich badaniach nad *Caenorhabditis elegans* wykazali, że wprowadzenie dwuniciowego RNA do komórek nicienia wycisza ekspresję genu, którego mRNA zawiera sekwencję komplementarną do wprowadzonej cząsteczki (Fire, Xu i wsp., 1998). Zjawisko to określono terminem interferencji RNA.



Za jego opisanie Andrew Z. Fire oraz Craig C. Mello otrzymali w 2006 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii.

### 1.3.1. Biogeneza

Geny kodujące mikro RNA mogą być zlokalizowane w intronach, egzonach, a także w regionach niepodlegających translacji genów strukturalnych (25-40% wszystkich miRNA). Mogą również znajdować się w obszarach międzygenowych (Volpe, Kidner i wsp., 2002; Chendrimada, Finn i wsp., 2007; Li, Tang i wsp., 2007; Isik, Korswagen i wsp., 2010; Wang 2010). Z punktu widzenia badań rolą tych cząsteczek w procesie nowotworzenia istotny wydaje się fakt, że ponad połowa genów dla miRNA człowieka leży w tych obszarach w genomie, które podczas transformacji nowotworowej szczególnie często podlegają amplifikacji, delecji czy rearanzacji (Chendrimada, Finn i wsp., 2007). Sekwencje kodujące miRNA często zorganizowane są w skupiskach transkrybowanych jako policistronowe jednostki transkrypcyjne (Lee, Jeon i wsp., 2002; Volpe, Kidner i wsp., 2002).

Większość genów dla mikro RNA ulega transkrypcji za pośrednictwem polimerazy RNA II; tylko nieliczne transkrybowane są z udziałem polimerazy RNA III (Lee, Kim i wsp., 2004; Borchert, Lanier i wsp., 2006; Li, Tang i wsp., 2007). Policistronowe geny miRNA stanowią zwykle samodzielne transkryptomy. Transkrypcja sekwencji zlokalizowanych wewnątrz genów strukturalnych zazwyczaj odbywa się pod kontrolą sekwencji regulatorowych „genu gospodarza” (Ouellet, Perron i wsp., 2006; Shomron i Levy, 2009). Transkrypt pierwotny miRNA zwany pri-miRNA (ang. *primary miRNA*) wyposażony jest w zbudowaną z 7-metyloguanozyny czapkę (ang. *cap*) na końcu 5' oraz ogon poli(A) zlokalizowany na końcu 3' cząsteczki. W obrębie liczącej kilka tysięcy kb sekwencji pri-miRNA znajduje się 60-70-nukleotydowy fragment o strukturze „spinki do włosów” (ang. *hairpin*) (Gregory i Shiekhattar, 2005; Ouellet, Perron i wsp., 2006; Xie, Li i wsp., 2013). Procesy dalszej obróbki pri-miRNA zachodzą z udziałem dwóch enzymów z rodziny rybonukleazy III: Drosha i Dicer (Xie, Li i wsp., 2013; O'Brien, Hayder i wsp., 2018) (Ryc. 1.3.1.).

Drosha jest endonukleazą klasy II, która po raz pierwszy opisana została jako białko zaangażowane w obróbkę pre-rRNA. Podobnie jak inne enzymy z tej rodziny, zbudowana jest z pięciu domen:

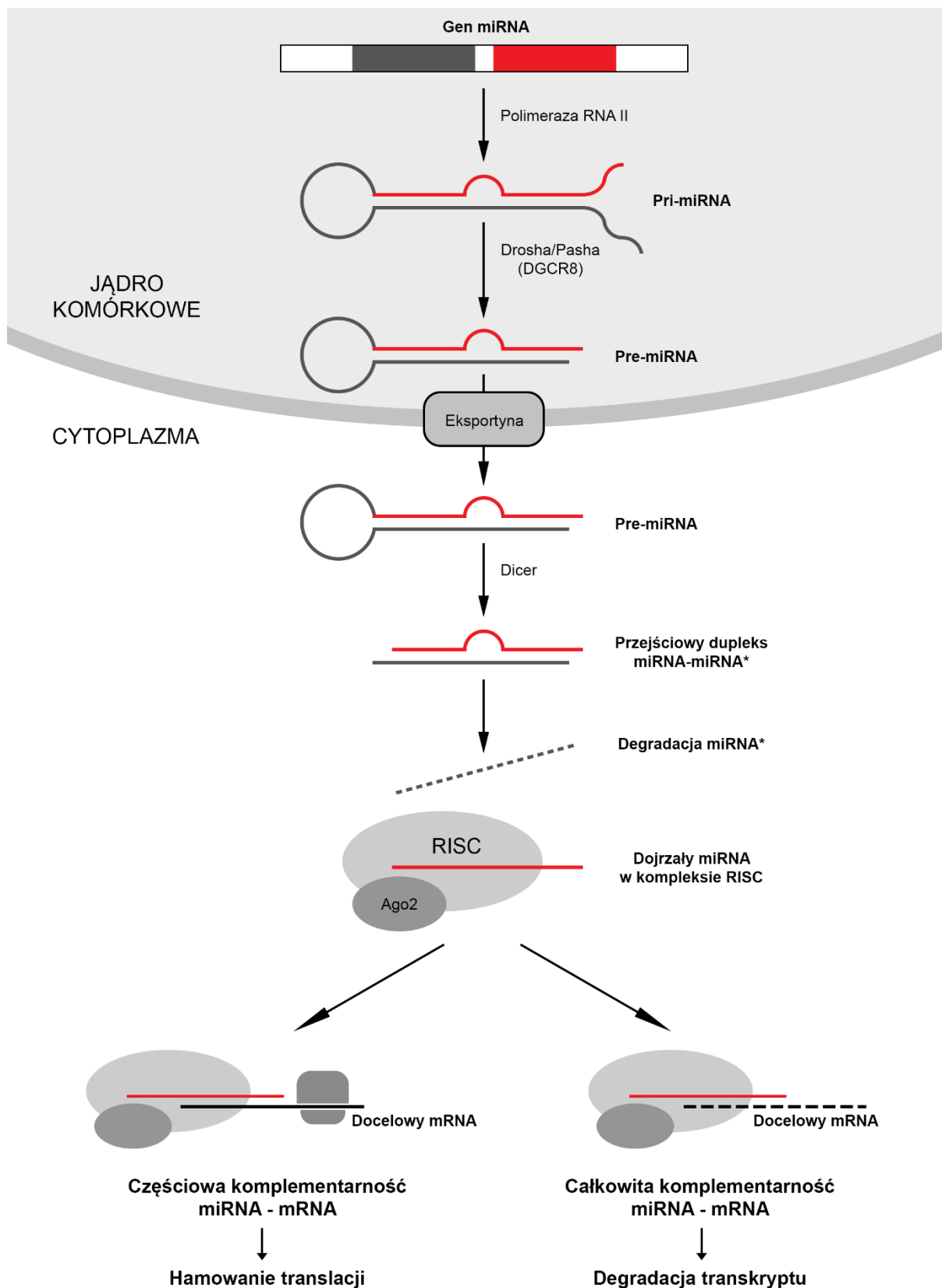
- a) domeny wiążącej podwójnoniciowy RNA (dsRBD, ang. *double-stranded RNA binding domain*) zlokalizowanej na końcu C,
- b) podwójnej domeny RNazy III (RIIIda, RIIIdb, ang. *RNase III domain*),
- c) domeny bogatej w reszty proliny (PRR, ang. *proline-rich region*),
- d) domeny bogatej w reszty seryny i arginy (RS) zlokalizowanej na końcu N (Nicholson 2014).

Kofaktorem dla Drosha, decydującym o jej specyficzności, jest białko DGCR8 (ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) wchodzące w skład Mikroprocesora – jądrowego kompleksu enzymatycznego o masie ~650 kDa (Gregory, Yan i wsp., 2004). Białko to posiada dwie domeny dsRBD oraz domenę WW zdolną do wiązania się z regionem PRR enzymu Drosha (Johanson, Lew i wsp., 2013; Nicholson 2014). Domeny RIIIda i RIIIdb Drosha posiadają zdolność do tworzenia wewnątrzcząsteczkowego dimeru, co umożliwia im przecięcie pri-miRNA u podstawy struktury spinki do włosów. Powstała w ten sposób cząsteczka pre-miRNA o długości około 70 nukleotydów za pośrednictwem należącej do rodziny białek karioferynowych eksportyny 5 (ang. *Exportin 5*) transportowana jest z jądra do cytoplazmy, gdzie podlega dalszej obróbce przy udziale rybonukleazy Dicer (Johanson, Lew i wsp., 2013; Nicholson 2014).

Dicer to białko o masie około 200 kDa występujące w komórkach człowieka głównie w obszarze cytoplazmy i siateczki endoplazmatycznej. Posiada cztery domeny:

- a) N-końcowej domeny o aktywności ATPazy/helikazy,
- b) domeny PAZ (*Piwi/Argonaute/Zwille*) wiążąca 2-nukleotydowy wystający koniec 3' dsRNA,
- c) domeny DUF283, której funkcja nie została jak dotąd poznana,
- d) C-końcowej domeny RIIID zbudowanej z dwóch domen katalitycznych o aktywności rybonukleazy oraz domeny wiążącej dsRNA (Johanson, Lew i wsp., 2013; Nicholson 2014).

Aktywność katalityczna enzymu Dicer zależna jest od ATP. Każda z jego domen RIIID wykonuje niezależne cięcie cząsteczki pre-miRNA z jednej strony pętli niesparowanych nukleotydów. W wyniku tego procesu tworzy się niestabilna, dwuniciowa forma miRNA (kompleks miRNA – miRNA\*) o długości około 20 nukleotydów. Łańcuchy tworzące dwuniciową cząsteczkę bardzo szybko ulegają rozdzieleniu. Jeden z nich (miRNA\*)



**Rycina 1.3.1. Biogeneza i mechanizmy działania mikro RNA.** DGCR8 - białko kofaktorowe dla endonukleazy Drosha (ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*); Pri-miRNA - transkrypt pierwotny miRNA (ang. *Primary miRNA*); Pre-miRNA - prekursorowy miRNA (ang. *Precursor-miRNA*); miRNA - stabilna nić kompleksu dwuniciowego miRNA wchodząca w skład RISC; miRNA\* - niestabilna nić kompleksu dwuniciowego miRNA ulegająca degradacji; RISC - kompleks wyciszający indukowany RNA (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*); Ago2 - białko Argonauta 2 (ang. *Argonaute 2*); informacyjny RNA (ang. *messenger RNA*).

ulega degradacji, natomiast drugi (miRNA) przyłącza się do kompleksu RISC (kompleks wyciszający indukowany RNA, ang. *RNA-induced silencing complex*) (Ryc. 1.3.1.) (Michlewski i Cáceres, 2019).

RISC to złożony kompleks o masie około 500 kDa i aktywności nukleazy, który do swego prawidłowego funkcjonowania wymaga obecności kilku domen białkowych:

- a) nukleazy Dicer,
- b) białka Argonaut 2 (Ago2) – silnie zasadowego białka o masie około 100 kDa, posiadającego zdolność wiązania końca 3' miRNA,
- c) białka TRBP (ang. Transactivation Response RNA Binding Protein) niezbędnego dla aktywności endonukleolitycznej Dicer oraz rekrutacji białka Ago2 do miejsca wiązania kompleksu z mRNA (Nakanishi 2016).

### 1.3.2. Funkcja

Dojrzały mikro RNA włączone do kompleksu RISC posiada zdolność do rozpoznawania mRNA genu docelowego i wpływania na poziom jego ekspresji. Mechanizm tej regulacji uzależniony jest od stopnia komplementarności miRNA wobec regionu 3' UTR transkryptu .

Jeśli komplementarność ta jest pełna, zachodzi przecięcie mRNA na dwie części oraz ich nukleolityczna degradacja. Cięcie dokonywane jest bez udziału ATP, pomiędzy nukleotydami sparowanymi z 10 i 11 nt cząsteczki mikro RNA. Po zakończonym procesie, kompleks RISC oddysocjowuje i, będąc wciąż związany z „miRNA – przewodnikiem”, zachowuje zdolność do wiązania kolejnych mRNA (Ryc. 1.3.1.) (Krutzfeldt, Rajewsky i wsp., 2005; Ameres, Horwich i wsp., 2010; Jo, Shin i wsp., 2015).

W przypadku jedynie częściowej komplementarności miRNA do sekwencji 3' UTR transkryptu (która znacznie częściej ma miejsce w komórkach zwierzęcych) (Jonas i Izaurralde, 2015) regulacja ekspresji genów zachodzi na drodze zahamowania translacji (Ryc. 1.3.1.). Mechanizm ten nie został jeszcze do końca poznany, jednak przypuszcza się, że jest on związany z asocjacją kompleksu RISC z kompleksem białkowym MOV10 pełniącym rolę represora translacji, białkami podjednostki 60S rybosomu oraz z czynnikiem antyasocjacyjnym eIF6 blokującym połączenie dwóch podjednostek rybosomu. Zakłada

się zatem, że w tym przypadku regulacja ekspresji genów polegałaby na zahamowaniu translacji wskutek braku możliwości utworzenia funkcjonalnego rybosomu (Chendrimada, Finn i wsp., 2007).

### **1.3.3. Mikro RNA w nowotworach głowy i szyi**

Uważa się, że nieprawidłowości w ekspresji miRNA (zachodzące pod wpływem mutacji genetycznych, regulacji epigenetycznych czy też zmian w ekspresji czynników transkrypcyjnych) mogą przyczyniać się do inicjacji procesu kancerogenezy (Sethi, Wright i wsp., 2014; Puram i Rocco, 2015). Całogenomowe badania nad profilem ekspresji mikro RNA, w których realizację w ramach projektu TCGA (Atlas Genomu Raka, ang. *The Cancer Genome Atlas*) zaangażowany był nasz zespół badawczy, wykazały, że w niemal wszystkich typach nowotworów (z uwzględnieniem HNSCC) dochodzi do wykształcenia charakterystycznego profilu ekspresji miRNA, spośród których niektóre mogą funkcjonować jako supresory nowotworowe (Kikkawa, Hanazawa i wsp., 2010; Ayaz, Gorur i wsp., 2013; Victoria Martinez, Dhahbi i wsp., 2015), podczas gdy inne spełniają rolę onkogenów (Ramdas, Giri i wsp., 2009; Hui, Lenarduzzi i wsp., 2010; Cao, Zhou i wsp., 2013; Gombos, Horvath i wsp., 2013; Victoria Martinez, Dhahbi i wsp., 2015). Wykazano, że miRNA nie funkcjonują wyłącznie w obrębie komórki, w której doszło do ich biogenezy. Dane literaturowe donoszą, że cząsteczki te obecne są w licznych płynach ustrojowych, takich jak łzy, ślina, mocz, mleko czy surowica krwi obwodowej (Cortez, Bueso-Ramos i wsp., 2011). Mechanizm wydzielania pozakomórkowych miRNA nie został do końca poznany, jednak zaproponowano trzy alternatywne ścieżki, na których może ono zachodzić: (i) pasywny wyciek ze zniszczonych komórek, (ii) aktywne wydzielanie przez mikropęcherzyki, w tym egzosomy, (iii) aktywne wydzielanie z udziałem białek wiążących RNA (Chen, Liang i wsp., 2012; Corrado, Raimondo i wsp., 2013; Schneider i Simons, 2013). Uważa się, że miRNA wydzielane na zewnątrz komórki mogą brać udział w komunikacji międzykomórkowej, wpływając na ekspresję genów zarówno w sąsiadujących, jak i odległych tkankach. Z tego powodu mogą być traktowane jako potencjalne wiarygodne i nieinwazyjne markery diagnostyczne, prognostyczne i predykcyjne w licznych stanach chorobowych, z uwzględnieniem choroby nowotworowej (Chen, Liang i wsp., 2012).

Liczne źródła wskazują na istotne znaczenie cząsteczek mikro RNA w inicjacji i progresji wielu typów nowotworów (Vosa, Vooder i wsp., 2013; Chen, Han i wsp., 2017;

Liu, Zhang i wsp., 2017; Mu, Wu i wsp., 2017; Pashaei, Pashaei i wsp., 2017; Song, Chen i wsp., 2018; Liu, Wu i wsp., 2019; Peng, Duan i wsp., 2019; Xiao, Zhong i wsp., 2019; Yang, Li i wsp., 2019; Zhang, Chen i wsp., 2019), w tym również nowotworów głowy i szyi (Jamali, Asl Aminabadi i wsp., 2015; Lubov, Maschietto i wsp., 2017; Zeljic, Jovanovic i wsp., 2018; Kumarasamy, Madhav i wsp., 2019; Lamichhane, Thachil i wsp., 2019; Sabarimurugan, Kumarasamy i wsp., 2019).

Arantes i wsp., (2017) w swoich badaniach z udziałem 71 chorych ze zdiagnozowanym rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi w różnych lokalizacjach wykazali, że chorzy z relatywnie podwyższonym poziomem ekspresji mikro RNA hsa-miR-21 w tkance guza wykazywali statystycznie istotnie gorszą odpowiedź na zastosowaną terapię oszczędzającą oraz posiadali istotnie niższy współczynnik przeżywalności (Arantes, Laus i wsp., 2017). Wyniki te potwierdzili Avissar i wsp., (2009), którzy analizowali ekspresję miR-21 w tkance nowotworowej pochodzącej od 169 chorych z HNSCC. Wykazali oni, że podwyższona ekspresja tej cząsteczki koreluje ze spadkiem wskaźnika 5-letniego przeżycia u badanych pacjentów (Avissar, McClean i wsp., 2009). Podobne rezultaty w swoich badaniach nad związkiem pomiędzy ekspresją miR-21 i rokowaniem u chorych z HNSCC uzyskali Jung i wsp. (2012) oraz Li i wsp., (2009) (Li, Huang i wsp., 2009; Jung, Phillips i wsp., 2012).

Harris i wsp., (2012) z wykorzystaniem mikromacierzy RNA analizowali ekspresję mikro RNA hsa-miR-375 w tkance nowotworowej pochodzącej od 123 chorych z HNSCC w odniesieniu do sąsiadującej prawidłowej tkanki. Naukowcy wykazali, że obniżony poziom ekspresji tego miRNA w tkance guza koreluje z obniżonym współczynnikiem przeżywalności oraz większym prawdopodobieństwem wykształcenia przerzutów odległych (Harris, Jimenez i wsp., 2012). Podobne wyniki uzyskali Romeo i wsp., (2018), którzy badali poziom ekspresji miR-375 w surowicy krwi obwodowej u 17 chorych z rakiem tarczycy. Badacze udowodnili, że ekspresja ta jest istotnie podwyższona u chorych w porównaniu do pacjentów stanowiących grupę kontrolną oraz pacjentów w stadium remisji choroby. Zaobserwowano również, że podwyższony poziom ekspresji miR-375 związany jest z niekorzystnym rokowaniem oraz obniżonym współczynnikiem 5-letniego przeżycia w badanej grupie (Romeo, Colombo i wsp., 2018). Interesujący wydaje się fakt, że do zupełnie przeciwnych wniosków doszli Hudcova i wsp., (2016), którzy wykazali, że poziom ekspresji miR-375 jest istotnie podwyższony w tkance nowotworowej w porównaniu do sąsiadującej tkanki

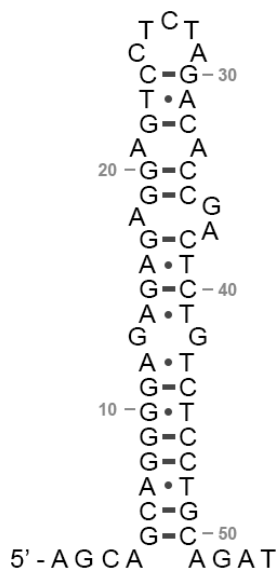
prawidłowej, jednak nie zaobserwowali związku pomiędzy poziomem ekspresji miR-375 a wskaźnikami przeżycia: ogólnym, wolnym od choroby i wolnym od wznowy (Hudcova, Raudenska i wsp., 2016).

Hess i wsp., (2017) prowadzili badania nad poziomem ekspresji hsa-miR-155 w tkankach nowotworowych pochodzących od 149 chorych z HNSCC oraz jego związkiem z efektywnością zastosowanej radiochemioterapii. Naukowcy wykazali, że podwyższona ekspresja miR-155 była związana z lepszą odpowiedzią na terapię opartą na 5-Fluorouracylu i cisplatynie. Nie zaobserwowano jednak korelacji pomiędzy ekspresją miR-155 a efektywnością leczenia mitomycyną (Hess, Muer i wsp., 2017). Zbliżone wyniki w swoich badaniach nad mikro RNA-155 uzyskali Shi i wsp., (2014), którzy wykazali, że cząsteczka ta ulega podwyższonej ekspresji w raku jamy ustnej, co przekłada się na obniżony współczynnik przeżycia oraz niekorzystne rokowanie u chorych z tym nowotworem (Shi, Zhang i wsp., 2015).

Opisane powyżej przykłady to tylko nieliczne z ponad sześćdziesięciu mikro RNA, którym przypisano znaczenie w przewidywaniu prognozy i odpowiedzi na leczenie u chorych z nowotworami głowy i szyi. Charakterystyczny profil ekspresji tych cząsteczek w komórkach nowotworowych pozwala zakładać, że odgrywają one istotną rolę w inicjacji procesu kancerogenezy, a także w licznych procesach związanych z progresją nowotworu.

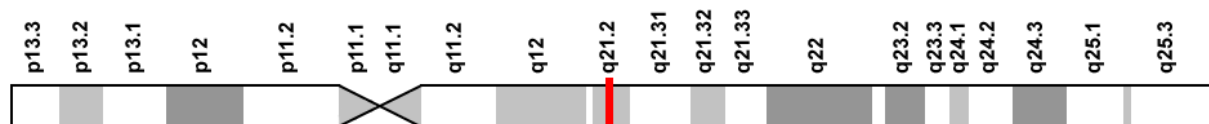
#### **1.3.4. Mikro RNA hsa-miR-6510-3p**

Mikro RNA hsa-miR-6510-3p jest 21-nukleotydomową cząsteczką kodowaną na ramieniu 3' prekursora o strukturze spinki do włosów hsa-miR-6510 (identyfikator miRbase: MI0022222; <http://www.mirbase.org/>) (Ryc. 1.3.4.1.). Region kodujący miR-6510 zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 17 (17q21.2), w pozycji chr17:41,517,164-41,517,217 (według genomu referencyjnego GRCh38; <https://genome.ucsc.edu/>) (Ryc. 1.3.4.2.).



Rycina 1.3.2. Struktura drugorzędowa mikro RNA hsa-miR-6510. Zmodyfikowano wg <http://www.ensembl.org/>.

### Chr 17



Rycina 1.3.3. Lokalizacja chromosomowa regionu kodującego dla hsa-miR-6510 (oznaczone kolorem czerwonym). Zmodyfikowano wg <https://www.genecards.org/>.

Dane literaturowe dotyczące hsa-miR-6510-3p są bardzo ograniczone. W wyniku wstępnych analiz przeprowadzonych przez nasz zespół badawczy wykazano, że poziom ekspresji tej cząsteczki w tkance nowotworowej pochodzącej od chorych z HNSCC jest niemal 6-krotnie obniżony w stosunku do prawidłowej tkanki uzyskanej od tych chorych. Ponadto udowodniono, że obniżona ekspresja hsa-miR-6510-3p koreluje ze wzrostem śmiertelności oraz stopniem zaawansowania guza. Przytoczone wyżej dane sugerują, że hsa-miR-6510-3p może odgrywać istotną rolę w patogenezie raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, funkcjonując jako supresor nowotworowy. Nie istnieją jednak żadne doniesienia naukowe potwierdzające funkcję cząsteczki oraz jej znaczenie w procesie nowotworzenia, co znacznie podnosi nowatorski charakter niniejszej rozprawy.



## 2. CEL PRACY

Celem głównym niniejszej pracy jest zbadanie przydatności mikro RNA hsa-miR-6510-3p w diagnostyce, terapii oraz określeniu rokowania u chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi.

Cele szczegółowe obejmują:

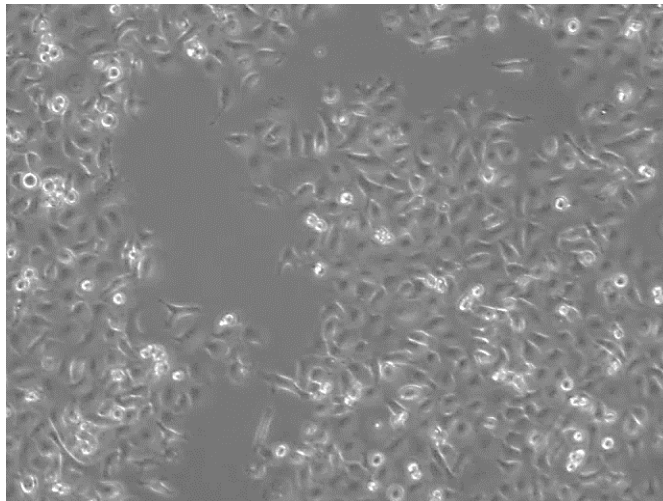
1. Analiza ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej (w odniesieniu do sąsiadującej tkanki prawidłowej) pochodzącej od chorych z histologicznie potwierdzonym rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi.
2. Analiza wpływu hsa-miR-6510-3p na komórki HNSCC:
  - 2.1. Opracowanie modelu badawczego linii komórkowych HNSCC transfekowanych cząsteczką hsa-miR-6510-3p, jej inhibitorem oraz kontrolnym miRNA o niespecyficznej sekwencji.
  - 2.2. Analiza wpływu hsa-miR-6510-3p na procesy biologiczne zachodzące w komórkach HNSCC: cykl komórkowy, proliferację, migrację, indukcję śmierci komórkowej.
  - 2.3. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na chemo- i radiowrażliwość komórek HNSCC.

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. Komercyjnie dostępne linie komórkowe

##### 3.1.1. Linia komórkowa FaDu

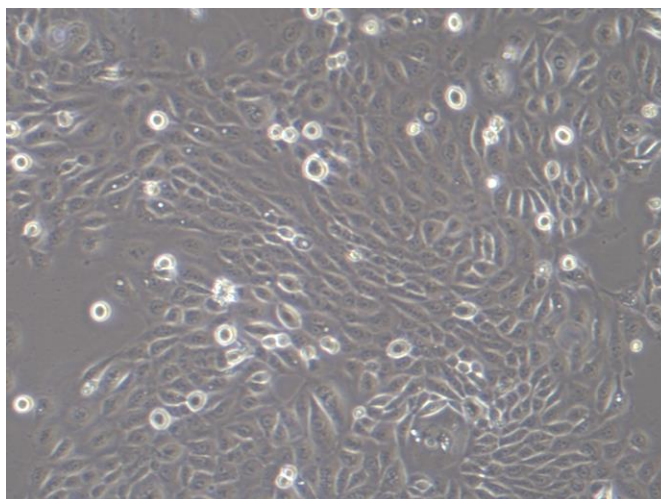
Linia FaDu (ATCC® HTB-43™) (Ryc. 3.1.1) to ustalona linia komórkowa adherentnych komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi wyizolowanych w 1968 roku z guza części krtaniowej gardła 56-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej. Komórki posiadają mutację w genie TP53. Charakteryzują się również hipodiploidią oraz hipertriploidią. Linię pozyskano dzięki uprzejmości Profesora Michaela Baumanna (OncoRay - National Center for Radiation Research in Oncology, Technische Universität Dresden).



**Rycina 3.1.1. Fotografia mikroskopowa komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi linii FaDu.** Mikroskop Opta-Tech MW-100 FL, powiększenie obiektywu 20x

##### 3.1.2. Linia komórkowa H103

Linia H103 (ECACC, 06092001) (Ryc. 3.1.2) to ustalona linia komórkowa adherentnych komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi uzyskanych z guza języka 32-letniego mężczyzny. Komórki charakteryzują się aneuploidalnym kariotypem 45, X0. Posiadają również mutację w genie TP53 (kodon 244, egzon 7, G>T). Linię pozyskano z zasobów ECACC (ang. *European Collection of Authenticated Cell Cultures*).



**Rycina 3.1.2.** Fotografia mikroskopowa komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi linii H103. Mikroskop Opta-Tech MW-100 FL, powiększenie obiektywu 20x.

### **3.2. Tkanki nowotworowe oraz prawidłowe pobrane od chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi**

#### **Grupa badawcza**

Grupę badawczą stanowiło 37 chorych z histopatologicznie potwierdzonym pierwotnym rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi o różnych lokalizacjach i stopniach zaawansowania (Tabela 3.2.1.). Chorzy byli poddawani leczeniu w Katedrze i Klinice Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Protokół badania został pozytywnie oceniony przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (numer decyzji 412/18). Wszyscy uczestnicy wyrazili świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu.

#### **Kryteria wyłączenia z badania**

Z udziału w badaniu wyłączono: 1) chorych u których guz stanowił wznowę miejscową lub drugi guz pierwotny; 2) chorych z pozytywnym wynikiem testu na obecność wirusa HPV w tkance guza; 3) chorych uprzednio poddawanych leczeniu chemio- i/lub radioterapią w jakiegokolwiek formie.

#### **Pobieranie próbek**

Próbki tkanki nowotworowej o wielkości około 1 mm<sup>3</sup> pozyskiwano w trakcie zabiegu operacyjnego bezpośrednio z preparatu chirurgicznego metodą biopsji. Próbki tkanki

**Tabela 3.2.1. Charakterystyka chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi stanowiących grupę badawczą.**  
 K – kobieta; M – mężczyzna; T – stopień zaawansowania guza; N – stopień zaawansowania przerzutów do węzłów chłonnych; M – stopień zaawansowania przerzutów odległych; G – stopień zróżnicowania nowotworu.

<b>Chory</b>	<b>Lokalizacja guza</b>	<b>Płeć</b>	<b>Wiek</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>G</b>
P1	Jama ustna	K	63	2	0	0	G1
P2	Jama ustna	K	40	2	2	0	G2
P3	Jama ustna	K	49	1	1	0	G3
P4	Jama ustna	K	59	2	2	0	G2
P5	Jama ustna	K	65	1	0	0	G2
P6	Jama ustna	M	54	2	0	0	G2
P7	Jama ustna	M	54	1	0	0	G2
P8	Jama ustna	M	26	2	0	0	G2
P9	Jama ustna	M	50	4	2	0	G2
P10	Jama ustna	M	49	2	2	0	G1
P11	Jama ustna	M	65	4	1	0	G2
P12	Jama ustna	M	54	2	2	0	G2
P13	Jama ustna	M	45	4	1	0	G2
P14	Jama ustna	M	61	4	2	0	G3
P15	Jama ustna	M	64	3	1	0	G2
P16	Jama ustna	M	62	3	0	0	G1
P17	Jama ustna	M	59	4	2	0	G2
P18	Jama ustna	M	58	2	0	0	G2
P19	Jama ustna	M	50	4	2	0	G2
P20	Gardło	K	68	2	0	0	G1
P21	Gardło	M	54	2	3	0	G1
P22	Gardło	M	68	2	1	0	G2
P23	Krtań	K	52	2	2	0	G2
P24	Krtań	K	68	3	1	0	G3
P25	Krtań	K	91	2	0	0	G2
P26	Krtań	K	57	3	2	0	G3
P27	Krtań	M	64	4	0	0	G2
P28	Krtań	M	65	4	1	0	G3
P29	Krtań	M	61	4	2	0	G2
P30	Krtań	M	76	4	2	0	G2
P31	Krtań	M	69	3	1	0	G2
P32	Krtań	M	75	2	0	0	G3
P33	Krtań	M	60	4	2	0	G2
P34	Krtań	M	43	3	2	0	G2
P35	Krtań	M	59	3	1	0	G2
P36	Krtań	M	80	4	0	0	G1
P37	Krtań	M	67	3	3	0	G3

prawidłowej pobierano wykonując biopsję prawidłowej tkanki ze strony przeciwnej w stosunku do lokalizacji guza. Niezwłocznie po pobraniu tkanki zamrażano z wykorzystaniem ciekłego azotu, a następnie przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu dalszych analiz.

### **3.3. Hodowla komórkowa**

Hodowlę komórkową prowadzono w warunkach standardowych, w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ , w atmosferze wzbogaconej 5% dwutlenku węgla i wilgotności 100% w inkubatorze BINDER (BINDER GmbH, Niemcy) na płytkach 100 mm (Corning Incorporated, NY, Stany Zjednoczone).

W hodowli komórek FaDu stosowano zmodyfikowane metodą Dulbecco medium Eagle'a (DMEM, ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Biowest, Francja) suplementowane 10% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. *Fetal Bovine Serum*) (Biowest, Francja) oraz 1% mieszaniny penicyliny/streptomycyny (Biowest, Francja).

Pożywkę stosowaną w hodowli komórek H103 stanowiła mieszanina w stosunku 1:1 medium DMEM oraz medium Ham's F12 (Biowest, Francja) z dodatkiem 10% FBS, 1% mieszaniny penicyliny/streptomycyny oraz 1% L-Glutaminy (Biowest, Francja).

Pożywkę zmieniano co 72 godziny. Przed podaniem świeżego medium komórki przemywano roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS, ang. *Phosphate Buffered Saline*) (Biowest, Francja).

Pasaż komórek przeprowadzano w sposób następujący: zbierano pożywkę z warstwy komórek, a następnie monowarstwę przemywano roztworem PBS. Komórki inkubowano 5 minut w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  z 1 ml 10X roztworu trypsyny/EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy) (Biowest, Francja) w celu odtrawienia od podłoża. Trypsynę inaktywowano, podając porcję świeżego medium hodowlanego. Zawiesinę komórek wirowano 5 minut z prędkością 1200 obrotów/minutę. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w pożywce i przenoszono na płytki hodowlane.

Wszystkie czynności wykonywano w warunkach sterylnych z użyciem komory z laminarnym przepływem powietrza Telstar BioVanguard (Telstar Lifesciences, Hiszpania).

### **3.4. Transfekcja**

Komórki linii FaDu i H103 wysiewano na płytki 6-dołkowe, a następnie poddawano transfekcji cząsteczkami hsa-miR-6510-3p (MirVana miRNA Mimic, nr kat. 4464066 Thermo Fisher Scientific, MA, Stany Zjednoczone), jej inhibitorem (MirVana miRNA Inhibitor, nr kat. 4464084, Thermo Fisher Scientific, MA, Stany Zjednoczone) oraz niespecyficznym kontrolnym miRNA o losowej sekwencji (MirVana miRNA Negative Control, nr kat. 4464059, Thermo Fisher Scientific, MA, Stany Zjednoczone) w stężeniu 20 nM z użyciem odczynnika do transfekcji Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Scientific, MA, Stany Zjednoczone) oraz medium bezsurowiczego Opti-MEM® (Thermo Scientific, MA, Stany Zjednoczone) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

1,7 µl miRNA o stężeniu 1 µM zawieszano w 170 µl medium bezsurowiczego Opti-MEM® (Thermo Scientific, MA, Stany Zjednoczone). W osobnej probówce typu Eppendorf w 170 µl Opti-MEM zawieszono 3,5 µl Lipofectamine® RNAiMAX. W kolejnym etapie zawiesinę miRNA przenoszono do próbki zawierającej Lipofectamine w Opti-MEM, a następnie mieszaninę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, pozwalając na uformowanie się kompleksu miRNA-Lipofectamine. Po zakończeniu inkubacji, mieszaninę nakraplano do dołków płytki hodowlanej zawierających 2 ml pełnego medium hodowlanego.

### **3.5. Izolacja RNA**

Izolację całkowitego RNA (zawierającego frakcję miRNA) z hodowli komórkowej oraz tkanek przeprowadzono z użyciem komercyjnie dostępnego zestawu miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Niemcy; nr kat. 217004) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Zamrożone tkanki rozcierano w moździerz, a następnie zawieszano w 1 ml buforu do lizy Qiazol (QIAGEN, Niemcy; nr kat. 79306) i przenoszono do probówek typu Eppendorf. Próbkę dodatkowo homogenizowano z użyciem igły o średnicy 0,4 mm i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Hodowlę komórkową poddawano trawieniu enzymatycznemu z użyciem 10X roztworu trypsyny/EDTA, a następnie zawieszano w medium hodowlanym i wirowano 5 minut z prędkością 1200 obrotów/minutę. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 1 ml odczynnika Qiazol i przenoszono do próbki typu Eppendorf. Zawiesinę inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej.

W kolejnym etapie do próbki dodawano 200 µl chloroformu (Amresco, OH, Stany Zjednoczone), mieszaninę intensywnie wytrząsano przez 20 sekund z użyciem mieszadła typu Vortex (VWR, Niemcy), a następnie inkubowano 3 minuty w temperaturze pokojowej. Próbkę wirowano 15 minut z prędkością 13 000 obrotów/minutę w temperaturze 4°C. Supernatant przenoszono do świeżej próbki typu Eppendorf, dodawano 1,5 objętości 100% etanolu (Merck, Niemcy; nr kat. 108543) i mieszano przez pipetowanie. Mieszaninę przenoszono na kolumnę (RNeasy Mini Spin Column; Qiagen, Niemcy) i wirowano 15 sekund z prędkością 13 000 obrotów/minutę. Przesącz usuwano, na kolumnę dodawano 350 µl buforu do oczyszczania RWT (Qiagen, Niemcy). Próbkę wirowano 15 sekund z prędkością 13 000 obrotów/minutę. Przesącz usuwano, a na kolumnę dodawano 10 µl DNAzy zawieszanej w 70 µl buforu RDD (RNase-Free DNase Set, Qiagen, Niemcy; nr kat. 79256). Próbkę inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej. Na kolumnę dodawano 350 µl buforu RWT, a następnie wirowano 15 sekund z prędkością 13 000 obrotów/minutę. W kolejnym etapie kolumnę dwukrotnie przepłukiwano buforem do oczyszczania RPE (Qiagen, Niemcy) (15 sekund, 13 000 obrotów/minutę). W celu osuszenia membrany kolumnę przenoszono do świeżej próbki typu Eppendorf i wirowano 1 minutę z prędkością 13 000 obrotów/minutę. Następnie kolumnę ponownie przenoszono do świeżej próbki typu Eppendorf i nakładano na membranę 50 µl H<sub>2</sub>O wolnej od nukleaz (Qiagen, Niemcy). Elucji oczyszczonego RNA dokonywano poprzez wirowanie próbki 1 minutę z prędkością 13 000 obrotów/minutę. Analizy stężenia oraz czystości preparatu dokonywano z wykorzystaniem spektrofotometru DeNovix DS-11 (DeNovix, NC, Stany Zjednoczone) przy długości fali 260 nm. Integralność RNA oceniano za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym (AppliChem, Niemcy) wybarwionym bromkiem etydydy (Alfa Aesar, MA, Stany Zjednoczone). RNA przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz.

### **3.6. Analiza ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p z wykorzystaniem ilościowego PCR w czasie rzeczywistym**

#### **3.6.1. Odwrotna transkrypcja**

W celu przygotowania matrycy cDNA (komplementarny DNA, ang. *complementary DNA*) przeprowadzono 4-etapowy proces odwrotnej transkrypcji wyizolowanego RNA z wykorzystaniem zestawu TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo

Fisher Scientific, MA, Stany Zjednoczone; nr kat. A28007) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

W pierwszym etapie przeprowadzono reakcję poliadenylacji mikro RNA polegającą na przyłączeniu do końca 3' tych cząsteczek szeregu nukleotydów adeninowych zwanych ogonem poli(A). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 3.6.1.

**Tabela 3.6.1. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji poliadenylacji mikro RNA.**

	Objętość [ $\mu$ l]	Stężenie końcowe
Bufor poli(A) 10x stężony	0,5	1x
ATP	0,5	5 mM
Polimeraza poli(A)	0,3	0,3 U/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O wolna od nukleaz	1,7	-
RNA (5 nl/ul)	2	10 ng
Objętość końcowa	5	

Reakcję przeprowadzano w probówkach PCR o pojemności 0,2 ml w aparacie T100™ Thermal Cycler (Bio-rad, CA, Stany Zjednoczone). Profil temperaturowy reakcji przedstawiono w Tabeli 3.6.2.

**Tabela 3.6.2. Profil temperaturowy reakcji poliadenylacji mikro RNA.**

	Temperatura	Czas
Poliadenylacja	37°C	45 minut
Inaktywacja	65°C	10 minut
Chłodzenie	4°C	5 minut

W kolejnym etapie przeprowadzano reakcję ligacji do końca 5' miRNA adapterów stanowiących miejsce wiązania startera wykorzystywanego w późniejszym procesie preamplifikacji badanych miRNA. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 3.6.3.



**Tabela 3.6.3. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji ligacji adapterów.**

	Objętość [ $\mu$ l]	Stężenie końcowe
Bufor do ligacji 5x stężony	3	1x
50% glikol polietylenowy	4,5	15%
Adapter 25x stężony	0,6	1x
Ligaza RNA	1,5	1 U/ $\mu$ l
RNA (5 nl/ul)	2	10 ng
H <sub>2</sub> O wolna od nukleaz	0,4	-
Produkt reakcji poliadenylacji	5	-
Objętość końcowa	15	

Reakcję przeprowadzano w probówkach PCR o pojemności 0,2 ml w aparacie T100™ Thermal Cycler. Profil temperaturowy reakcji przedstawiono w Tabeli 3.6.4.

**Tabela 3.6.4. Profil temperaturowy reakcji ligacji adapterów.**

	Temperatura	Czas
Ligacja	16°C	60 minut
Chłodzenie	4°C	5 minut

Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji miRNA w celu uzyskania komplementarnego DNA. W reakcji wykorzystano uniwersalny starter wiążący się do ogona poli(A). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 3.6.5.

**Tabela 3.6.5. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji odwrotnej transkrypcji miRNA.**

	Objętość [ $\mu$ l]	Stężenie końcowe
Bufor do odwrotnej transkrypcji 5x stężony	6	1x
Mieszanina deoksynukleotydów (25 mM)	1,2	1 mM
Starter do odwrotnej transkrypcji 20x stężony	1,5	1x
Odwrotna transkryptaza 10x stężona	3	1x
H <sub>2</sub> O wolna od nukleaz	3,3	-
Produkt reakcji ligacji adapterów	15	-
Objętość końcowa	30	

Reakcję przeprowadzano w probówkach PCR o pojemności 0,2 ml w aparacie T100™ Thermal Cycler. Profil temperaturowy reakcji przedstawiono w Tabeli 3.6.6.

**Tabela 3.6.6. Profil temperaturowy reakcji odwrotnej transkrypcji miRNA.**

	Temperatura	Czas
Odwrotna transkrypcja	42°C	15 minut
Inaktywacja odwrotnej transkryptazy	85°C	5 minut
Chłodzenie	4°C	5 minut

W celu zwiększenia liczby cząsteczek cDNA przeprowadzono reakcję jego preamplifikacji z wykorzystaniem polimerazy DNA oraz pary uniwersalnych starterów. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 3.6.7.

**Tabela 3.6.7. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji preamplifikacji cDNA.**

	Objętość [ $\mu$ l]	Stężenie końcowe
Bufor do preamplifikacji 2x stężony	25	1x
Mieszanina starterów 20x stężona	2,5	1x
H <sub>2</sub> O wolna od nukleaz	17,5	-
Produkt reakcji odwrotnej transkrypcji	5	-
Objętość końcowa	30	

Reakcję przeprowadzano w probówkach PCR o pojemności 0,2 ml w aparacie T100™ Thermal Cycler. Profil temperaturowy reakcji przedstawiono w Tabeli 3.6.8.

**Tabela 3.6.8. Profil temperaturowy reakcji preamplifikacji cDNA.**

	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Aktywacja polimerazy	95°C	5 minut	1
Denaturacja	95°C	3 sekundy	14
Przylączenie starterów i elongacja	60°C	30 sekund	
Inaktywacja polimerazy	99°C	10 minut	1
Chłodzenie	4°C	5 minut	1

### 3.6.2. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym

Przygotowany cDNA rozcieńczano 10-krotnie, a następnie na jego matrycy przeprowadzano reakcję real-time PCR z wykorzystaniem zestawu TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, Stany Zjednoczone; nr kat. 4444557) oraz zestawu starterów i sond oligonukleotydowych specyficznych wobec badanych miRNA TaqMan™ Advanced miRNA Assay (Thermo Fisher Scientific, MA, Stany Zjednoczone; nr kat. A25576). Wykaz wykorzystywanych par starterów i sond znajduje się w Tabeli 3.6.9.

**Tabela 3.6.9. Wykaz starterów stosowanych w reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.**

<b>mikroRNA</b>	<b>Identyfikator miRbase</b>	<b>Sekwencja</b>	<b>Nr oznaczenia</b>
hsa-miR-6510-3p	MIMAT0025477	CACCGACUCUGUCUCCUGCAG	480744_mir
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	477860_mir

Otrzymane wyniki normalizowano względem referencyjnego mikro RNA hsa-miR-16-5p. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 3.6.10.

**Tabela 3.6.10. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.**

	Objętość [ $\mu$ l]	Stężenie końcowe
TaqMan® Fast Advanced Master Mix 2x stężony	10	1x
TaqMan® Advanced miRNA Assay 20x stężony	1	1x
H <sub>2</sub> O wolna od nukleaz	4	-
cDNA	5	-
Objętość końcowa	20	

Reakcję przeprowadza na płytkach 96-dołkowych w aparacie LightCycler®96 (Roche, Niemcy). Profil temperaturowy reakcji przedstawiono w Tabeli 3.6.11.

**Tabela 3.6.11. Profil temperaturowy reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.**

	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Aktywacja polimerazy	95°C	20 sekund	1
Denaturacja	95°C	3 sekundy	55
Przyłączanie starterów i elongacja	60°C	20 sekund	
Chłodzenie	4°C	5 minut	1

### 3.7. Ocena morfologii

Oceny morfologii komórek dokonywano w odstępach 24-godzinnych przez okres 7 dni od transfekcji. Obserwacje oraz dokumentację fotograficzną prowadzono za pomocą mikroskopu Opta-Tech MW-100 FL wyposażonego w kamerę.

### 3.8. Analiza ekspresji genów na poziomie transkryptu metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym

#### 3.8.1. Odwrotna transkrypcja

W celu uzyskania komplementarnego DNA przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji wyizolowanego RNA z wykorzystaniem zestawu iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories Ltd, CA, Stany Zjednoczone) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Mieszaninę reakcyjną przygotowywano poprzez dodanie do 4 µl 5x stężonego buforu do odwrotnej transkrypcji 1 µl odwrotnej transkryptazy oraz objętości zawiesiny RNA odpowiadającej 1 µg jego całkowitej masy. Mieszaninę uzupełniano wodą wolną od nukleaz do całkowitej objętości 20 µl. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w probówkach PCR o pojemności 0,2 ml z użyciem aparatu T100™ Thermal Cycler. Profil temperaturowy reakcji przedstawiono w Tabeli 3.8.1.

Tabela 3.8.1. Profil temperaturowy reakcji odwrotnej transkrypcji.

	Temperatura	Czas
Przyłączanie heksamerów i oligo(dT)	25°C	5 minut
Synteza cDNA	46°C	20 minut
Inaktywacja odwrotnej transkryptazy	95°C	1 minuta
Chłodzenie	4°C	5 minut

#### 3.8.2. PCR w czasie rzeczywistym

Przygotowany cDNA rozcieńczano 10-krotnie, a następnie na jego matrycy przeprowadzano reakcję real-time PCR z wykorzystaniem zestawu FastStart Essential Probes Master set (Roche Diagnostics, Niemcy), sondy hydrolizującej UPL typu TaqMan (ang. *Universal Probe Library*, Roche Diagnostics, Niemcy) oraz pary specyficznych starterów. Wykaz wykorzystywanych par starterów i sond przedstawiono w Tabeli 3.8.2. Uzyskane wyniki normalizowano względem genu referencyjnego GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, ang. *GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase*).

**Tabela 3.8.2. Wykaz starterów i sond stosowanych w reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.**

<b>Gen</b>	<b>Sekwencja startera F</b>	<b>Sekwencja startera R</b>	<b>Sonda</b>
CASP3	TTGTGGAATTGATGCGTGAT	GGCTCAGAAGCACACAAACA	#68
BAX	ATGTTTTCTGACGGCAACTTC	ATCAGTTCCGGCACCTTG	#57
BCL2	GCACCTGCACACCTGGAT	AGCCAGGAGAAATCAAACAGAG	#57
GAPDH	TCCACTGGCGTCTTCACC	GGCAGAGATGATGACCCTTTT	#45

Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 3.8.3.

**Tabela 3.8.3. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.**

	<b>Objętość [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
FastStart Essential Probes Master 2x stężony	5	1x
Starter F (20 $\mu$ M)	0,4	0,8 $\mu$ M
Starter R (20 $\mu$ M)	0,4	0,8 $\mu$ M
Sonda (10 $\mu$ M)	0,2	0,2 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O wolna od nukleaz	1,9	-
cDNA	2,5	-
<b>Objętość końcowa</b>	<b>20</b>	

Reakcję PCR przeprowadzono na płytkach 96-dolkowych w aparacie LightCycler®96. Profil temperaturowy reakcji przedstawiono w Tabeli 3.8.4.

**Tabela 3.8.4. Profil temperaturowy reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.**

	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95°C	5 minut	1
Denaturacja	95°C	10 sekund	
Przylączenie starterów	60°C	30 sekund	55
Elongacja	72°C	1 sekunda	
Chłodzenie	40°C	30 sekund	1

### **3.9. Analizy cytometryczne**

W celu wykonania analiz cytometrycznych badane komórki poddawano trawieniu enzymatycznemu z użyciem 10X roztworu trypsyny/EDTA, a następnie zawieszano w medium hodowlanym i wirowano 5 minut z prędkością 1200 obrotów/minutę. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 1 ml PBS i przepłukiwano poprzez wirowanie 5 minut z prędkością 1200 obrotów/minutę. W kolejnym etapie, po usunięciu supernatantu, osad komórkowy ponownie zawieszano w 1 ml PBS i rozpipetowywano do probówek typu Eppendorf celem przygotowania do dalszych analiz (jak opisano w pkt. 3.9.1 – 3.9.4).

#### **3.9.1. Analiza cyklu komórkowego**

Zawiesinę komórek wirowano 5 minut z prędkością 1200 obrotów/minutę, supernatant usuwano. W celu utrwalenia do osadu komórek dodawano kroplami roztwór 70% etanolu, jednocześnie intensywnie mieszając próbkę na mieszadle typu Vortex. Zawiesinę wirowano 5 minut z prędkością 3000 obrotów/minutę, po czym dwukrotnie przemywano roztworem PBS (3000 obrotów/minutę, 5 minut) i przenoszono do probówki cytometrycznej (VWR, Niemcy). Po zwirowaniu i usunięciu supernatantu, do osadu komórkowego dodawano 200 µl składającej się z 10 µl jodku propidyny o stężeniu 1000 µg/ml (Cayman Chemicals, MI, Stany Zjednoczone) pełniącego funkcję fluorochromu interkalującego w strukturę kwasów nukleinowych, 2 µl rybonukleazy A o stężeniu 5 mg/ml (AppliChem, Niemcy) w celu eliminacji sygnału pochodzącego od RNA oraz 188 µl PBS. Próbę mieszano na mieszadle typu Vortex, po czym inkubowano 30 minut w 37°C, bez dostępu światła. Następnie komórki

przemywano buforem PBS i wirowano 5 minut z prędkością 3000 obrotów/minutę, a następnie zawieszano w 200 µl PBS i dokonywano analizy cytometrycznej.

Analizę prowadzono z wykorzystaniem cytometru przepływowego CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, Stany Zjednoczone). Wzbudzenia fluorochromu dokonywano promieniowaniem o długości fali 496 nm, natomiast pomiar fluorescencji prowadzono przy długości fali 612 nm. Wyniki analizowano przy pomocy oprogramowania FlowJoV10 (FLOWJO, LLC Data Analysis Software, OR, Stany Zjednoczone).

### **3.9.2. Analiza procesu śmierci komórkowej**

W celu oznaczenia poziomu śmierci komórkowej, badane komórki barwiono z wykorzystaniem zestawu Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, CA, Stany Zjednoczone) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Zawiesinę zawierającą  $1 \times 10^5$  komórek przenoszono do próbówki cytometrycznej i wirowano z prędkością 1200 obrotów/minutę. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 100 µl 1X Binding Buffer. Następnie do zawiesiny dodawano 5 µl aneksyny V sprzężonej z fluorochromem APC (BD Biosciences, CA, Stany Zjednoczone; nr kat. 550475) oraz 5 µl jodku propidyny (BD Biosciences, CA, Stany Zjednoczone; nr kat. 556463). Próbę mieszano na mieszadle typu Vortex, a następnie inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Po upływie czasu inkubacji, do zawiesiny dodawano 400 µl 1X Binding Buffer, po czym dokonywano analizy cytometrycznej. Analizę prowadzono z wykorzystaniem cytometru przepływowego CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, Stany Zjednoczone). Wzbudzenia fluorochromu dokonywano promieniowaniem o długości fali 496 nm, natomiast pomiar fluorescencji prowadzono przy długości fali 612 nm. Wyniki analizowano przy pomocy oprogramowania FlowJoV10.

Analizę prowadzono z wykorzystaniem cytometru przepływowego CytoFLEX. Wzbudzenia jodku propidyny dokonywano promieniowaniem o długości fali 496 nm, natomiast pomiar fluorescencji prowadzono przy długości fali 612 nm. Barwnik APC wzbudzano światłem laserowym o długości fali 640 nm, natomiast odczyt prowadzono przy długości fali 660 nm. Wyniki analizowano przy pomocy oprogramowania FlowJoV10 (FLOWJO, LLC Data Analysis Software, OR, Stany Zjednoczone).



### **3.9.3. Ocena poziomu dwuniciowych pęknięć DNA**

W celu zbadania poziomu dwuniciowych pęknięć DNA (DNA DSBs, ang. DNA *Double-Strand Breaks*) komórki poddawano barwieniu przeciwciałem skierowanym przeciwko  $\gamma$ H2AX – ufosforylowanej formie histonu H2AX będącej markerem tych uszkodzeń. W tym celu wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw Apoptosis, DNA Damage and Cell Proliferation Kit (BD Biosciences) zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta. Komórki wirowano 5 minut z prędkością 1200 obrotów/minutę, supernatant usuwano, a osad zawieszano w 100  $\mu$ l BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permabilization Solution (BD Biosciences, CA, Stany Zjednoczone) celem utrwalenia. Zawiesinę inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie dodawano 1 ml 1x Perm/Wash Buffer (BD Biosciences, CA, Stany Zjednoczone), następnie próbkę wirowano 5 minut z prędkością 1500 obrotów/minutę. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 100  $\mu$ l Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permabilization Buffer (BD Biosciences, CA, Stany Zjednoczone). Zawiesinę inkubowano 10 minut w lodzie, po czym ponownie dodawano 1 ml Perm/Wash Buffer i wirowano 5 minut z prędkością 1500 obrotów/minutę. Po usunięciu supernatantu osad zawieszano w 100  $\mu$ l Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permabilization Solution celem ponownego utrwalenia i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Komórki przepłukiwano 1 ml Perm/Wash Buffer (1500 obrotów/minutę, 5 minut), po czym zawieszano w 20  $\mu$ l odczynnika i dodawano 2,5  $\mu$ l mysiego przeciwciała anty- $\gamma$ H2AX sprzężonego z barwnikiem APC. Zawiesinę inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła, a następnie dodawano 1 ml Perm/Wash Buffer i wirowano 5 minut z prędkością 1500 obrotów/minutę. Supernatant usuwano, osad zawieszano w 1 ml PBS i poddawano analizie cytometrycznej z wykorzystaniem cytometru przepływowego CytoFLEX. Fluorescencję barwnika APC wzbudzano światłem laserowym o długości fali 640 nm, natomiast odczyt prowadzono przy długości fali 660 nm. Wyniki analizowano przy pomocy oprogramowania FlowJoV10.

### **3.9.4. Analiza poziomu ekspresji markerów macierzystości**

W celu oznaczenia poziomu ekspresji markerów macierzystości, badane komórki poddawano barwieniu przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenom CD44 (antygen różnicowania komórkowego, ang. *cluster of differentiation*) (BD Biosciences, CA, Stany Zjednoczone; nr kat. 559942) oraz CD133 (BD Biosciences, CA, Stany Zjednoczone; nr kat.

566593). Komórki wirowano z prędkością 1200 obrotów/minutę przez 5 minut. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 90 µl buforu PBS z 1% BSA (albumina surowicy bydlęcej, ang. *Bovine Serum Albumin*). Do zawiesiny dodawano 5 µl przeciwciała mysiego anti-CD44 sprzężonego z barwnikiem APC oraz 5 µl przeciwciała mysiego anti-CD133 sprzężonego z barwnikiem PE. Mieszaninę inkubowano 30 minut w 4°C, po czym przepłukiwano dwukrotnie buforem PBS, za każdym razem wirując przez 5 minut z prędkością 1200 obrotów/minutę. Supernatant usuwano, osad zawieszano w 1 ml PBS, a następnie poddawano analizie cytometrycznej z wykorzystaniem cytometru przepływowego CytoFLEX. Fluorescencję barwnika APC wzbudzano światłem laserowym o długości fali 640 nm, natomiast odczyt prowadzono przy długości fali 660 nm. Wzbudzenia barwnika PE dokonywano promieniowaniem o długości fali 564 nm, natomiast pomiar fluorescencji prowadzono przy długości fali 573 nm. Wyniki analizowano przy pomocy oprogramowania FlowJoV10.

### **3.10. Analiza migracji komórkowej metodą *wound healing assay***

W celu oceny zdolności badanych komórek do migracji wykonywano test gojenia się rany (ang. *wound healing assay*). Po osiągnięciu 100% konfluencji, pełne medium hodowlane zastępowano pożywką bezsurowiczą. Komórki inkubowano 20 godzin w standardowych warunkach, po czym za pomocą końcówki do pipet automatycznych (200 µl) wykonywano ranę w monowarstwie komórkowej. Migrację komórkową obserwowano i dokumentowano w 12-godzinnych (linia H103) oraz 24-godzinnych (linia FaDu) odstępach czasowych z użyciem mikroskopu świetlnego wyposażonego w kamerę cyfrową. Wyniki analizowano za pomocą programu ImageJ (National Institutes of Health, NY, Stany Zjednoczone). Stopień zamknięcia rany obliczano według wzoru:

$$C = \frac{A(0) - A(t)}{A(0)} \times 100\%$$

gdzie: A(0) – początkowa powierzchnia rany; A(t) – powierzchnia rany w czasie t.

### **3.11. Analiza proliferacji komórkowej z wykorzystaniem testu MTT**

Proliferację komórkową badano za pomocą testu MTT. Jest on oparty na zdolności enzymu - dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania pomarańczowej,

rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenyloctetrazoliowy; MTT) do nierozpuszczalnego formazanu, będącego ciemnoniebieskim produktem powyższej reakcji.

### 3.11.1. Wyznaczenie stężenia IC50

W celu wyznaczenia stężenia hamującego w 50% funkcje biologiczne i biochemiczne (IC50; ang. *Inhibitory Concentration*) komórki wysiewano na płytce 96-dołkowej w liczbie: 2000 komórek/dołek (linia FaDu) oraz 1500 komórek/dołek (linia H103). Po upływie 24 godzin do komórek dodawano roztwór cisplatyny w stężeniach 0,00 – 10,00  $\mu\text{M}$ , w przedziałach co 0,50  $\mu\text{M}$ . Następnie komórki inkubowano 72 godziny w standardowych warunkach, po czym usuwano pożywkę i zastępowano ją 100  $\mu\text{l}$  MTT rozcieńczonego w medium hodowlanym do końcowego stężenia 0,5 mg/ml. Komórki inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C, w celu utworzenia widocznych kryształów formazanu. W kolejnym etapie z dołków usuwano medium z MTT, a następnie dodawano 100  $\mu\text{l}$  dimetylosylfotlenku (DMSO, ang. *Dimethyl Sulfoxide*). Płytkę wytrząsano 20 minut w temperaturze 37°C aż do całkowitego rozpuszczenia kryształów. Wartość absorbancji mierzono przy długości fali 570 nm z wykorzystaniem czytnika płytek Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™). Względny poziom proliferacji obliczano ze wzoru:

$$\text{Proliferacja [\%]} = \frac{A_x - A_0}{A_{ctr} - A_0} \times 100\%$$

gdzie:

$A_x$  – absorbancja próby badanej, inkubowanej z cisplatyną w stężeniu  $x$ ;

$A_0$  – absorbancja próby ślepej (niepoddanej inkubacji z MTT);

$A_{ctr}$  – absorbancja próby kontrolnej (niepoddanej inkubacji z cisplatyną).

Krzywą zależności odpowiedzi od dawki oraz współczynnik IC50 wyznaczono w oprogramowaniu statystycznym GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, CA, Stany Zjednoczone) z wykorzystaniem narzędzia *Dose-response – Inhibition*.

### 3.11.2. Analiza proliferacji komórkowej

W celu zbadania proliferacji komórkowej komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w liczbie: 2000 komórek/dołek (linia FaDu) oraz 1500 komórek/dołek (linia H103). Po upływie 24 godzin do komórek dodawano roztwór cisplatyny w stężeniach 1,5  $\mu\text{M}$  (linia FaDu) oraz 1  $\mu\text{M}$  (linia H103). Następnie komórki inkubowano 72 godziny w standardowych warunkach, po czym usuwano pożywkę i zastępowano ją 100  $\mu\text{l}$  MTT rozcieńczonego w medium hodowlanym do końcowego stężenia 0,5 mg/ml. Komórki inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C, w celu utworzenia widocznych kryształów formazanu. W kolejnym etapie z dołków usuwano medium z MTT, a następnie dodawano 100  $\mu\text{l}$  dimetylosylfotlenku (DMSO, ang. *Dimethyl Sulfoxide*). Płytkę wytrząsano 20 minut w temperaturze 37°C aż do całkowitego rozpuszczenia kryształów. Wartość absorbancji mierzono przy długości fali 570 nm z wykorzystaniem czytnika płytek Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™). Względny poziom proliferacji obliczano ze wzoru wskazanego w sekcji 3.12.1.

### 3.12. Analiza statystyczna wyników

Analizy statystycznej otrzymanych dokonywano z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, CA, Stany Zjednoczone) z zastosowaniem testów: t-Studenta, Manna-Whitneya, ANOVA, ANOVA Kruskalla-Walisa oraz testów post-hoc: Tukeya i Dunnetta. Poziom istotności przyjęto jako mniejszy lub równy 0,05.

Kolejne stopnie istotności oznaczono następująco:

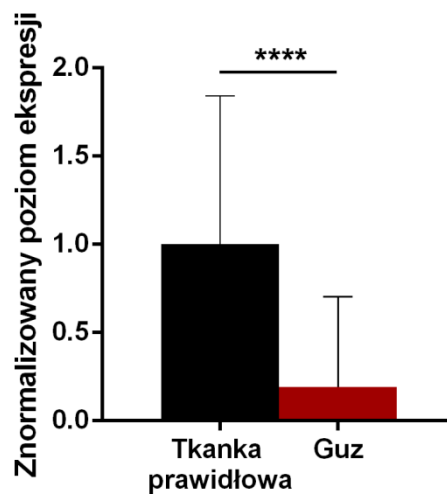
Wartość p	Istotność statystyczna:
< 0,0001	****
0,0001 do 0,001	***
0,001 do 0,01	**
0,01 do 0,05	*

## 4. WYNIKI

### 4.1. Analiza poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w tkankach nowotworowych pochodzących od chorych z HNSCC

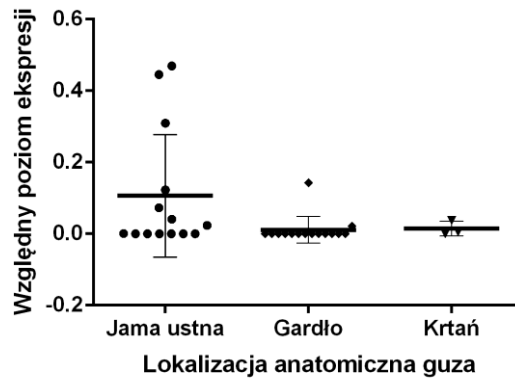
W celu zbadania poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-651-3p w tkankach nowotworowych pochodzących od chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym poprzedzoną odwrotną transkrypcją RNA do cDNA. W reakcji PCR wykorzystano startery specyficzne wobec analizowanego hsa-miR-6510-3p oraz wobec mikro RNA hsa-miR-16-5p, który w analizie stanowił gen referencyjny, umożliwiając normalizację uzyskanych wyników. Względny poziom ekspresji hsa-miR-6510-3p w komórkach guza wyznaczano poprzez odniesienie wyniku do poziomu ekspresji badanego miRNA w tkance prawidłowej pochodzącej od tego samego pacjenta.

Wykazano, że poziom ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej jest dziesięciokrotnie obniżony w odniesieniu to tkanki prawidłowej w badanej grupie chorych (100% vs. 19,23%;  $p > 0,0001$ ) (Ryc. 4.1.1).

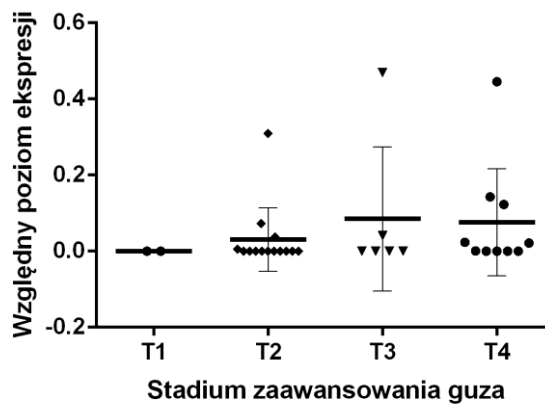


Rycina 4.1.1. Analiza poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej pochodzącej od chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi.

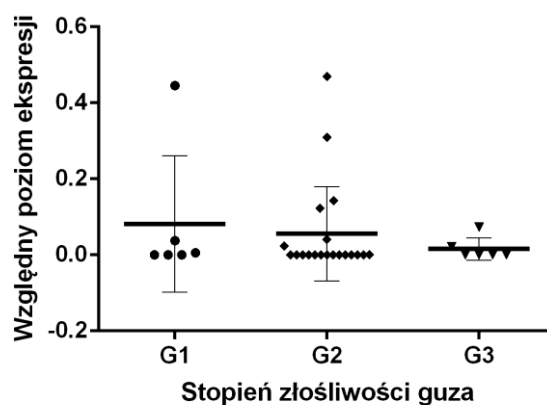
Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej w zależności od lokalizacji guza ( $p=0,0564$ ) (Ryc. 4.1.2), stopnia jego zaawansowania ( $p=0,3559$ ) (Ryc. 4.1.3), złośliwości ( $p=0,7590$ ) (Ryc. 4.1.4), czy też stadium zaawansowania przerzutów do węzłów chłonnych ( $p=0,2575$ ) (Ryc. 4.1.5).



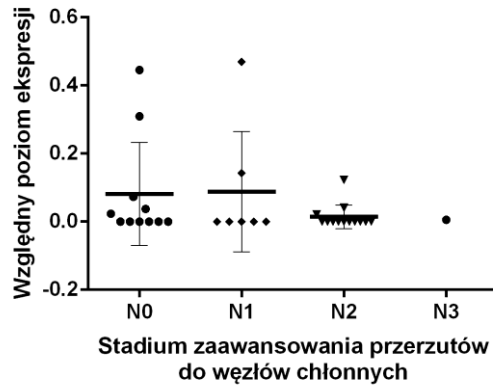
Rycina 4.1.2. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od lokalizacji anatomicznej guza. Wynik zaprezentowano jako średni poziom ekspresji  $\pm$  SD.



Rycina 4.1.3. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od stadium zaawansowania guza. Wynik zaprezentowano jako średni poziom ekspresji  $\pm$  SD.

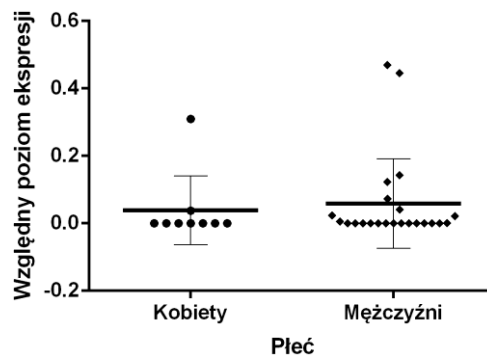


Rycina 4.1.4. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od stopnia złośliwości guza. Wynik zaprezentowano jako średni poziom ekspresji  $\pm$  SD.

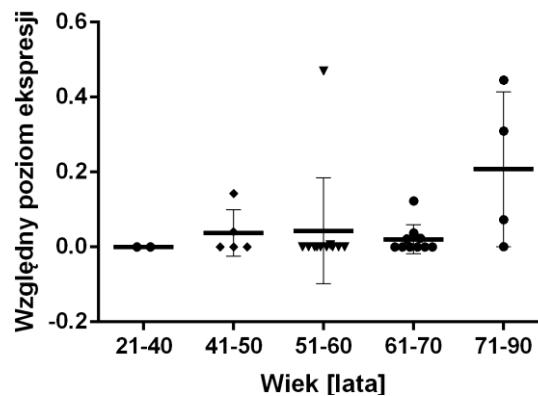


Rycina 4.1.5. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od stopnia zaawansowania przerzutów do węzłów chłonnych. Wynik zaprezentowano jako średni poziom ekspresji  $\pm$  SD.

Nie zaobserwowano również związku pomiędzy poziomem ekspresji hsa-miR-6510-3p i płcią ( $p=0,1774$ ) (Ryc. 4.1.6) oraz wiekiem ( $p=0,0732$ ) (Ryc. 4.1.7) badanych chorych.



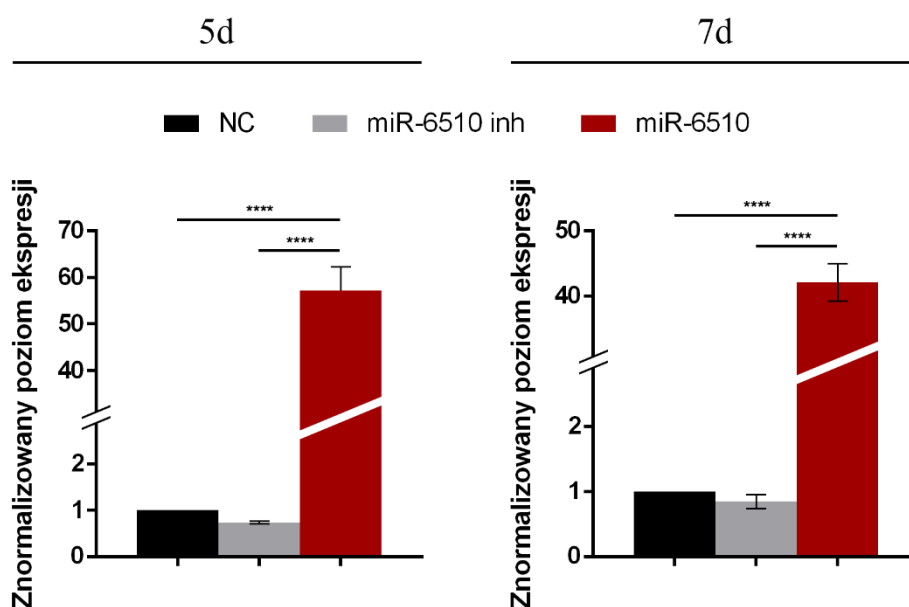
Rycina 4.1.6. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od płci. Wynik zaprezentowano jako średni poziom ekspresji  $\pm$  SD.



Rycina 4.1.7. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od wieku. Wynik zaprezentowano jako średni poziom ekspresji  $\pm$  SD.

## 4.2. Analiza poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w komórkach linii FaDu i H103 transfekowanych miR-6510

W celu oceny poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w komórkach linii FaDu i H103 transfekowanych miR-6510 oraz jego inhibitorem przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym poprzedzoną odwrotną transkrypcją RNA do cDNA. W reakcji PCR wykorzystano startery specyficzne wobec analizowanego hsa-miR-6510-3p oraz wobec mikro RNA hsa-miR-16-5p, który w analizie stanowił gen referencyjny, umożliwiając normalizację uzyskanych wyników. Względny poziom ekspresji hsa-miR-6510-3p w transfekowanych komórkach wyznaczano poprzez odniesienie wyniku do poziomu ekspresji badanego miRNA w komórkach traktowanych kontrolnym, niespecyficznym mikro RNA. Analizę wykonano w 5. oraz 7. dniu po transfekcji.

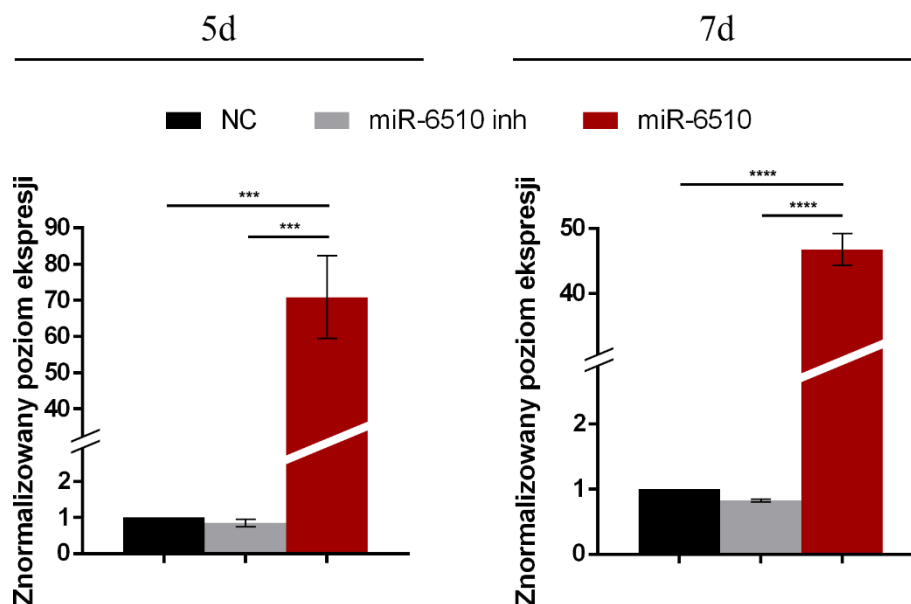


**Rycina 4.2.1.** Analiza poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w komórkach linii FaDu transfekowanych miR-6510. NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; 5d – komórki analizowane w 5. dniu po transfekcji; 7d – komórki analizowane w 7. dniu po transfekcji.

Wykazano, że w przypadku linii FaDu transfekcja hsa-miR-6510-3p pozwoliła na uzyskanie 57-krotnie podwyższonego poziomu ekspresji tej cząsteczki w 5. dniu po transfekcji ( $p < 0,0001$ ) oraz 42-krotnej nadekspresji miR-6510 w 7. dniu po transfekcji ( $p < 0,0001$ ) (Ryc. 4.2.1) w odniesieniu do komórek kontrolnych.



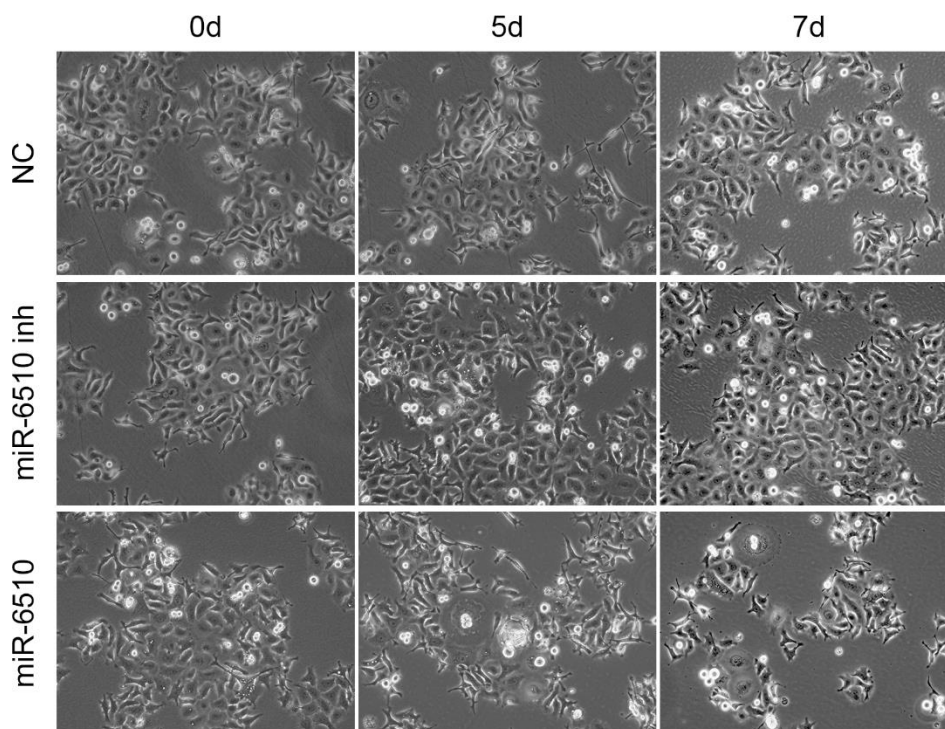
W przypadku komórek linii H103 zaobserwowano 71-krotne podwyższenie poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w 5. dniu po transfekcji ( $p < 0,0001$ ) oraz 47-krotną nadekspresję cząsteczki w 7 dniu po transfekcji ( $p < 0,0001$ ) (Ryc. 4.2.2.).



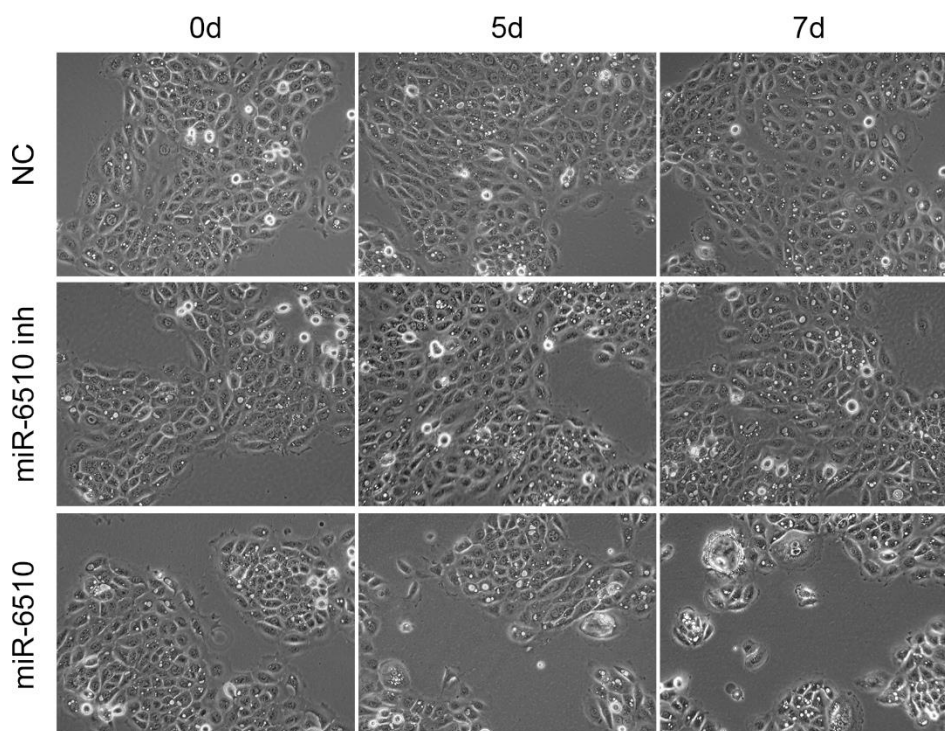
**Rycina 4.2.2. Analiza poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w komórkach linii H103 transfekowanych miR-6510.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; 5d – komórki analizowane w 5. dniu po transfekcji; 7d – komórki analizowane w 7. dniu po transfekcji.

### 4.3. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na morfologię komórek linii FaDu i H103

W celu oceny wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na morfologię komórek prowadzono obserwacje mikroskopowe w odstępach 24-godzinnych przez 7 kolejnych dni po transfekcji. Zarówno w przypadku linii FaDu (Ryc. 4.3.1.), jak i H103 (Ryc. 4.3.2.) w komórkach transfekowanych miR-6510-3p zaobserwowano liczne ziarnistości w cytoplazmie oraz istotne zmiany w ich kształcie (komórki płaskie, powiększone). Zmiany te świadczą o starzeniu komórkowym indukowanym przez miR-6510-3p.



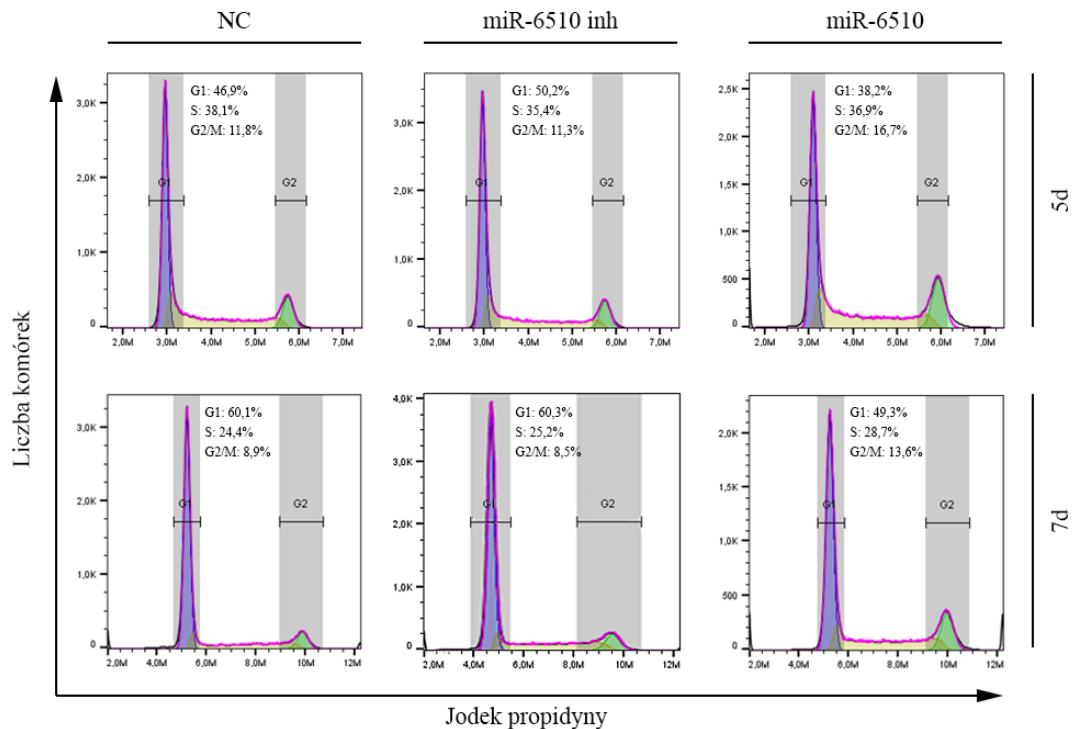
**Rycina 4.3.1. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na morfologię komórek linii FaDu.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; 0d – komórki analizowane w dniu transfekcji; 5d – komórki analizowane w 5. dniu po transfekcji; 7d – komórki analizowane w 7. dniu po transfekcji.



**Rycina 4.3.2. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na morfologię komórek linii H103.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; 0d – komórki analizowane w dniu transfekcji; 5d – komórki analizowane w 5. dniu po transfekcji; 7d – komórki analizowane w 7. dniu po transfekcji.

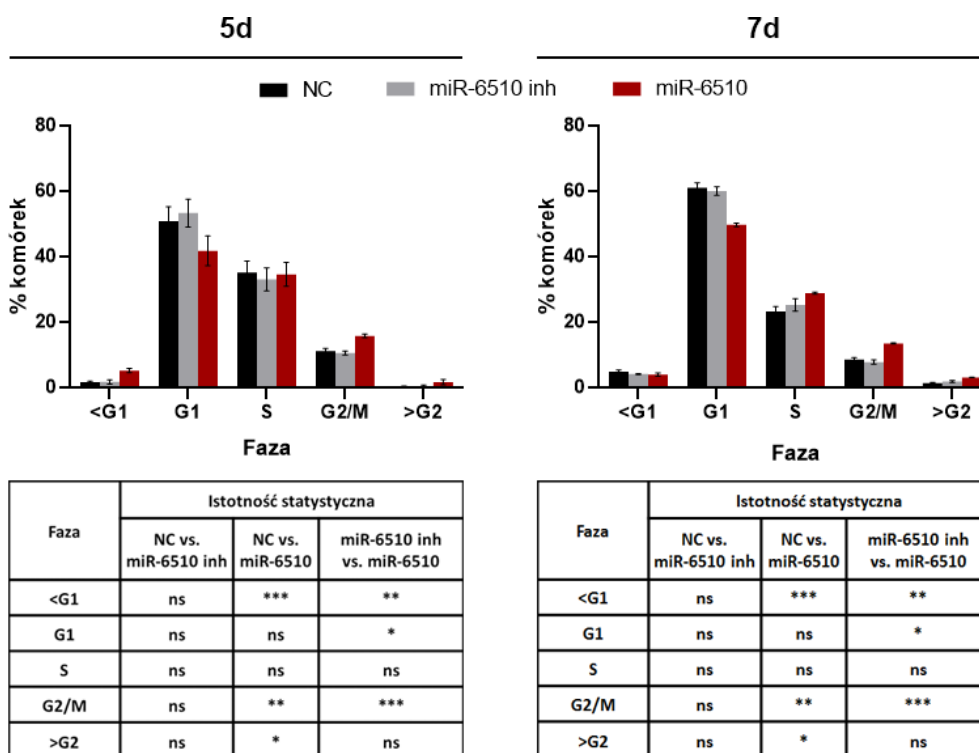
#### 4.4. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego linii FaDu i H103

W celu oceny wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego, komórki linii FaDu i H103 poddawano barwieniu jodkiem propidyny, a następnie analizowano metodami cytometrii przepływowej. Badanie wykonano w 5. oraz 7. dniu po transfekcji.



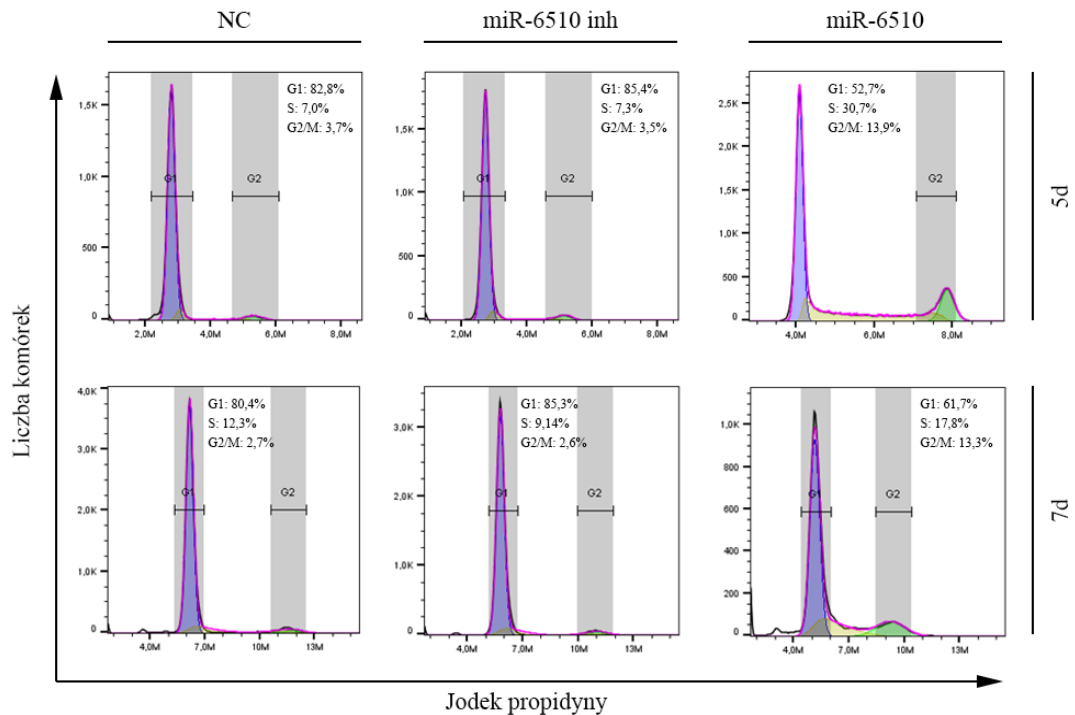
**Rycina 4.4.1. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego linii FaDu.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; 5d – komórki analizowane w 5. dniu po transfekcji; 7d – komórki analizowane w 7. dniu po transfekcji.

W przypadku linii komórkowej FaDu w 5. dniu po transfekcji miR-6510-3p zaobserwowano istotny statystycznie wzrost udziału komórek apoptotycznych w stosunku do komórek kontrolnych (z 1,84% do 5,39%;  $p=0,000899$ ). W tym samym punkcie czasowym zauważono również wzrost frakcji komórek w fazie G2/M (z 11,39% do 16,00%;  $p=0,001235$ ) oraz obniżenie udziału frakcji G1 (z 51,01% do 41,99%;  $p=0,069032$ ), co sugeruje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M. Podobny efekt obserwowano również w 7. dniu po transfekcji. Odsetek komórek w fazie G1 obniżył się wówczas z 61,23% do 49,90% ( $p=0,000288$ ) przy jednoczesnym wzroście udziału komórek w fazie G2/M z 8,74% do 13,66% ( $p=0,000115$ ) (Ryc. 4.4.1; Ryc. 4.4.2).

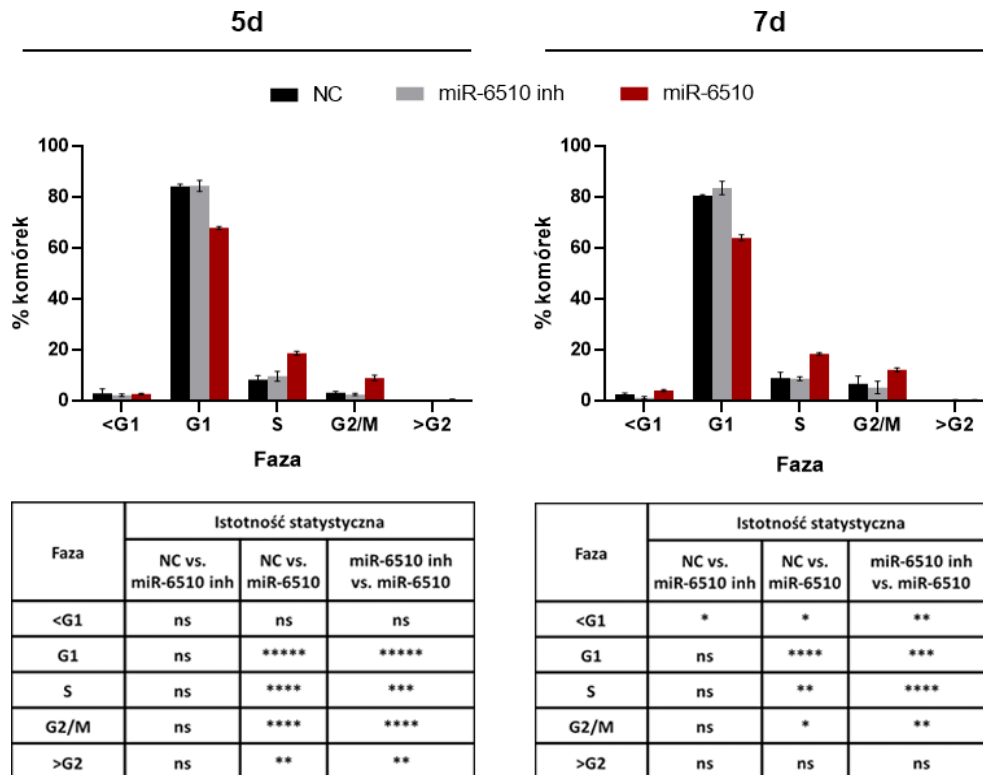


**Rycina 4.4.2. Analiza statystyczna wpływu hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego linii FaDu.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; 5d – komórki analizowane w 5. dniu po transfekcji; 7d – komórki analizowane w 7. dniu po transfekcji; ns – zmiana nieistotna statystycznie.

W przypadku linii komórkowej H103 wzrost udziału komórek apoptotycznych w stosunku do wariantu kontrolnego zaobserwowano w 7. dniu po transfekcji hsa-miR-6510-3p (2,79% vs. 4,27%;  $p=0,015589$ ). W komórkach linii H103 również zauważono zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M w obu analizowanych punktach czasowych. W 5. dniu po transfekcji w komórkach transfekowanych miR-6510-3p udział frakcji komórek w fazie G1 uległ obniżeniu z 84,46% do 68,11% ( $p<0,000001$ ) w porównaniu do komórek kontrolnych z jednoczesnym wzrostem odsetka komórek w fazie G2/M z 3,48% do 9,23% ( $p=0,000053$ ). W 7. dniu po transfekcji zaobserwowano spadek udziału komórek w fazie G1 z 80,76% do 64,23% ( $p=0,000016$ ) oraz istotny statystycznie wzrost odsetka komórek w fazie G2/M (z 6,98% do 12,46%;  $p=0,037619$ ) w komórkach badanych w porównaniu do wariantu kontrolnego (Ryc. 4.4.3; Ryc. 4.4.4).



**Rycina 4.4.3. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego linii H103.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; 5d – komórki analizowane w 5. dniu po transfekcji; 7d – komórki analizowane w 7. dniu po transfekcji.

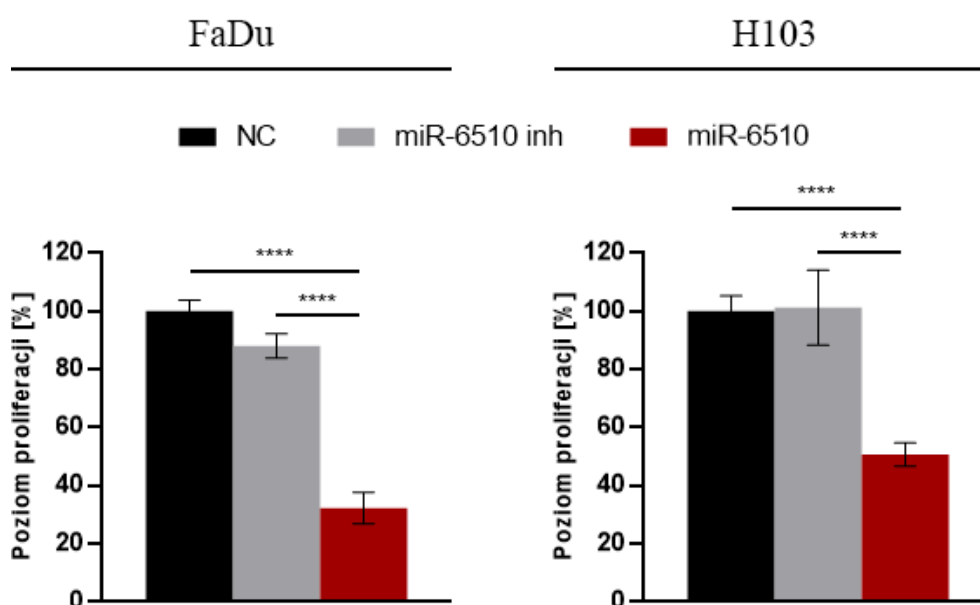


**Rycina 4.4.4. Analiza statystyczna wpływu hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego linii H103.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; 5d – komórki analizowane w 5. dniu po transfekcji; 7d – komórki analizowane w 7. dniu po transfekcji; ns – zmiana nieistotna statystycznie.

#### 4.5. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na proliferację komórek linii FaDu i H103

W celu zbadania wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na proliferację komórkową wykonano test MTT oparty na pomiarze aktywności metabolicznej badanych komórek. Analizę wykonano w 7. dniu po transfekcji hsa-miR-6510-3p.

W przypadku linii FaDu zaobserwowano spadek poziomu proliferacji w porównaniu z wariantem kontrolnym (100%) zarówno w komórkach transfekowanych miR-6510-3p (32,33%;  $p < 0,0001$ ), jak i w tych, którym podano jego inhibitor (88,01%;  $p = 0,0219$ ) (Ryc. 4.5.1.). Analizy przeprowadzone na linii H103 wykazały istotne statystycznie obniżenie proliferacji w komórkach transfekowanych miR-6510-3p (50,76%;  $p = 0,0002$ ) w stosunku do wariantu kontrolnego (Ryc. 4.5.1.).



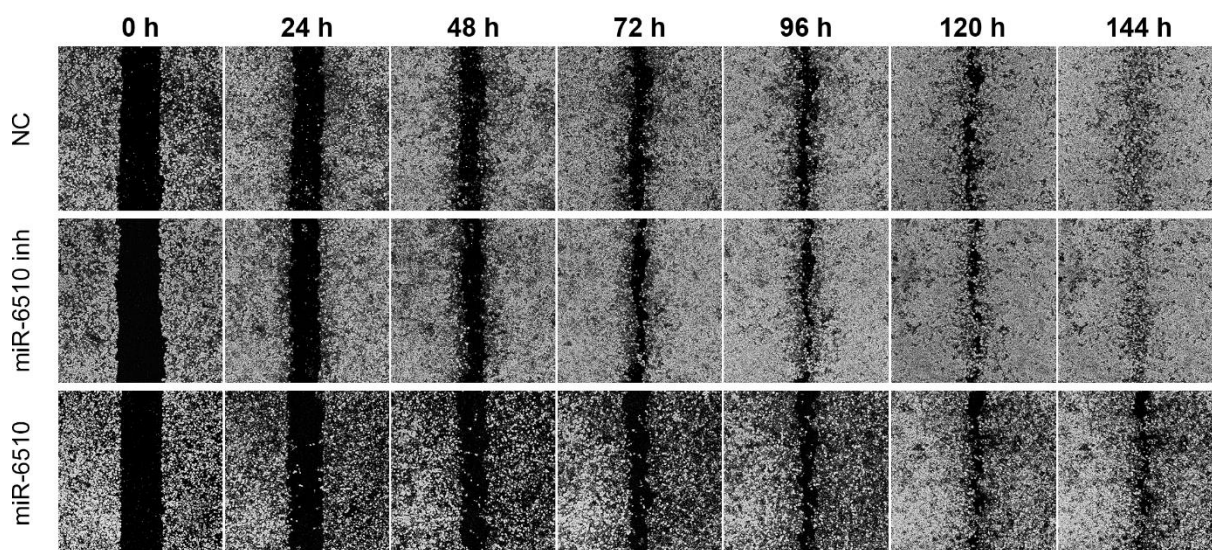
Rycina 4.5.1. Analiza wpływu hsa-miR-6510-3p na proliferację komórkową. NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p

#### 4.6. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na procesy migracji komórkowej linii FaDu i H103

W celu oceny wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na zdolność badanych komórek do migracji w 5. dniu po transfekcji hsa-miR-6510-3p wykonywano test gojenia się rany.

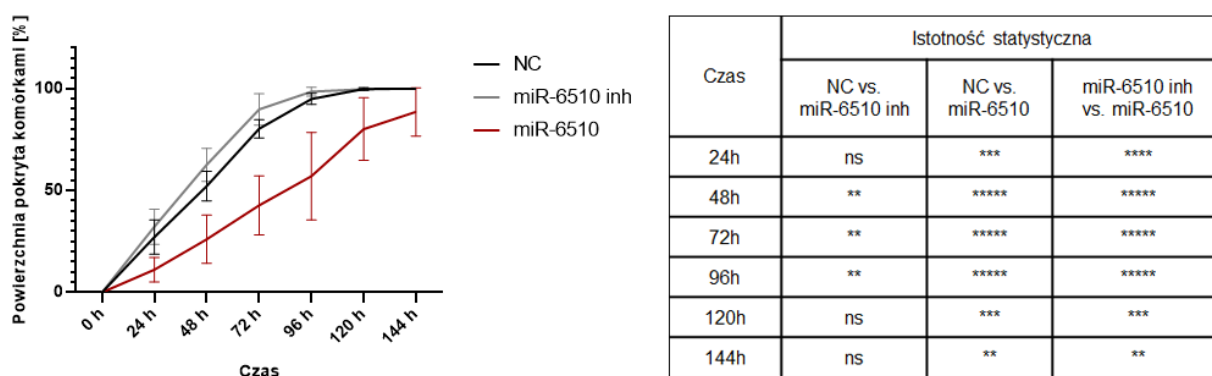


Migrację komórkową obserwowano i dokumentowano w 12-godzinnych (linia H103) oraz 24-godzinnych (linia FaDu) odstępach czasowych.

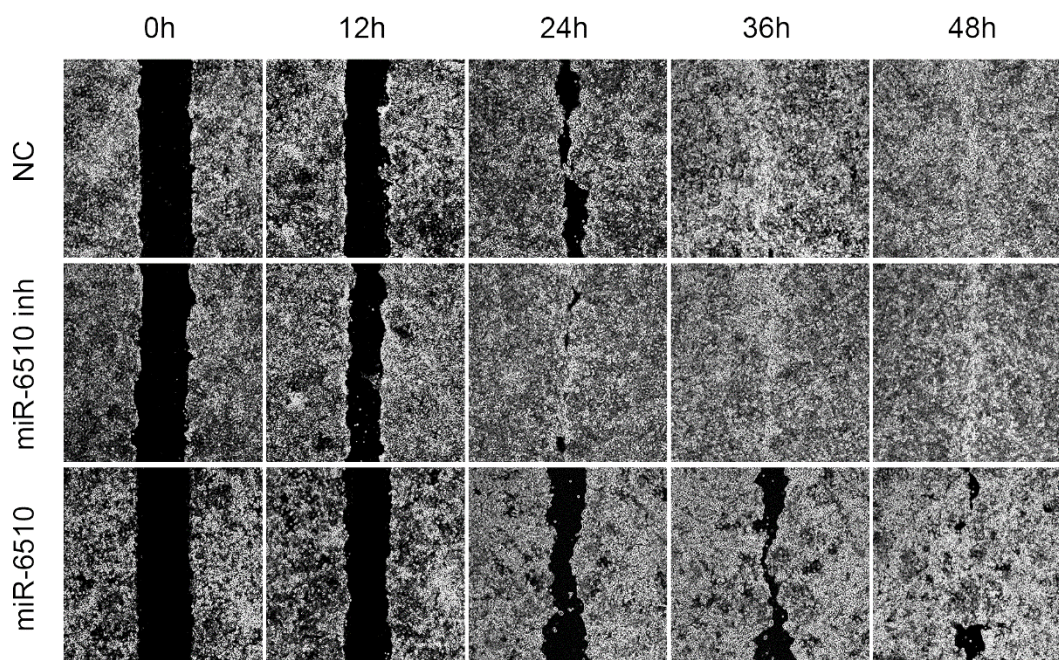


**Rycina 4.6.1. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na zdolność do migracji komórek linii FaDu. Test gojenia się rany.** Mikroskop Zeiss Axio Vert.A1, powiększenie obiektywu 10x; NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p.

W przypadku linii FaDu we wszystkich punktach czasowych analizy obserwowano istotne statystycznie obniżenie zdolności do migracji w komórkach transfekowanych miR-6510-3p w porównaniu do komórek kontrolnych (24h,  $p=0,000208$ ; 48h,  $p=0,000009$ ; 72h,  $p<0,000001$ ; 96h,  $p=0,000009$ ; 120h,  $p=0,000284$ ; 144h,  $p=0,003446$ ) oraz komórek, którym podano inhibitor miR-6510-3p (24h,  $p=0,000011$ ; 48h,  $p<0,000001$ ; 72h,  $p<0,000001$ ; 96h,  $p=0,000003$ ; 120h,  $p=0,000289$ ; 144h,  $p=0,003446$ ) (Ryc. 4.6.1.; Ryc. 4.6.2.).

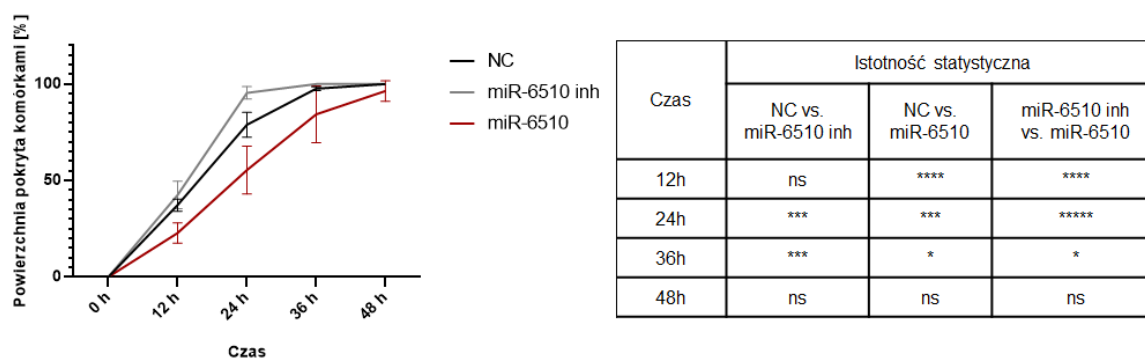


**Rycina 4.6.2. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na zdolność do migracji komórek linii FaDu.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; ns – zmiana nieistotna statystycznie.



**Rycina 4.6.3. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na zdolność do migracji komórek linii H103. Test gojenia się rany.** Mikroskop Zeiss Axio Vert.A1, powiększenie obiektywu 10x; NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p.

Analizy przeprowadzone na linii H103 wykazały, że w punktach czasowych 12h, 24h oraz 36h zdolność do migracji komórek badanych była istotnie obniżona w stosunku do komórek kontrolnych (odpowiednio:  $p=0,000042$ ;  $p=0,000953$ ;  $p=0,047515$ ) oraz komórek transfekowanych inhibitorem miR-6510-3p ( $p=0,000016$ ;  $p<0,000001$ ;  $p=0,014313$ ) (Ryc. 4.6.3.; Ryc. 4.6.4.).

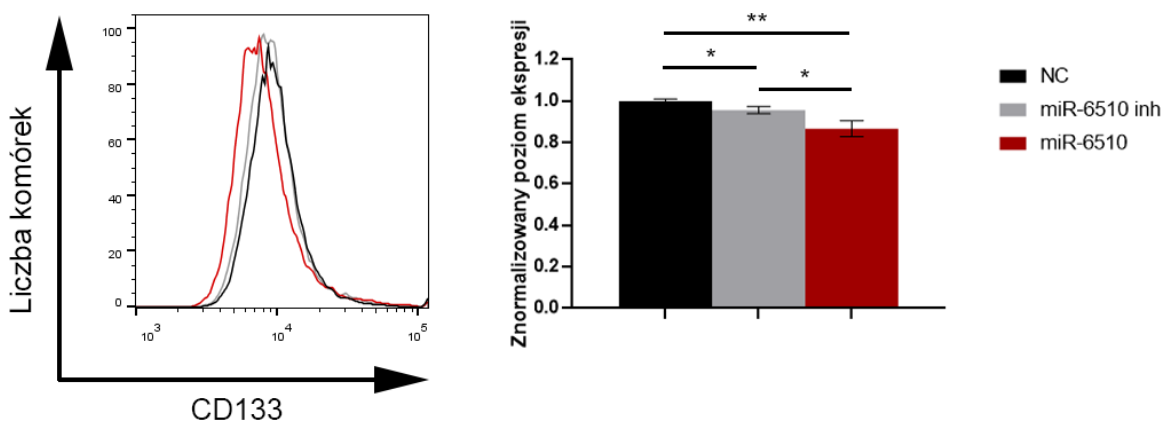


**Rycina 4.6.4. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na zdolność do migracji komórek linii H103.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; ns – zmiana nieistotna statystycznie.

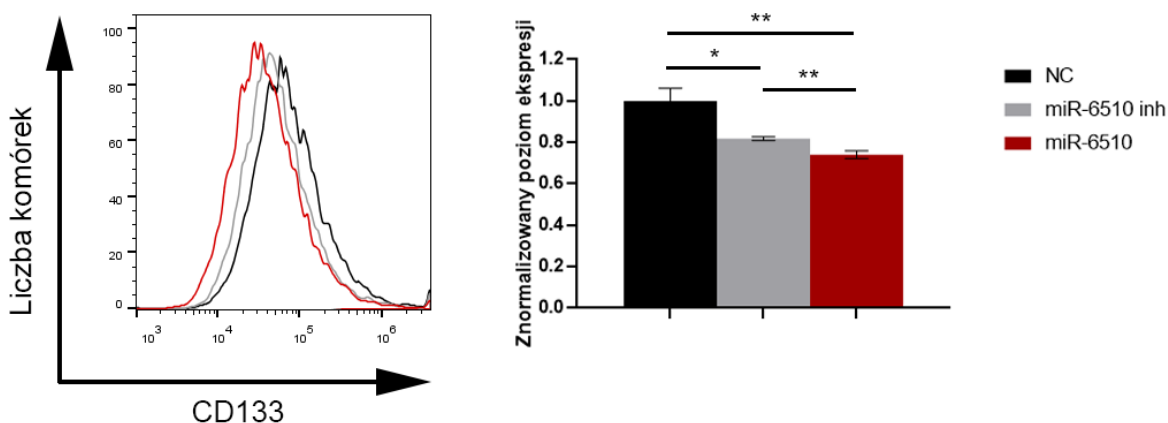


#### 4.7. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na macierzystość komórek linii FaDu i H103

W celu zbadania wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na fenotyp macierzysty komórek linii FaDu i H103 wykonano analizę cytometryczną ekspresji CD44 oraz CD133 – antygenów powierzchniowych uznawanych za markery fenotypu macierzystego w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi.



Rycina 4.7.1 Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na poziom ekspresji antygeny powierzchniowego CD133 w komórkach linii FaDu. NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p.

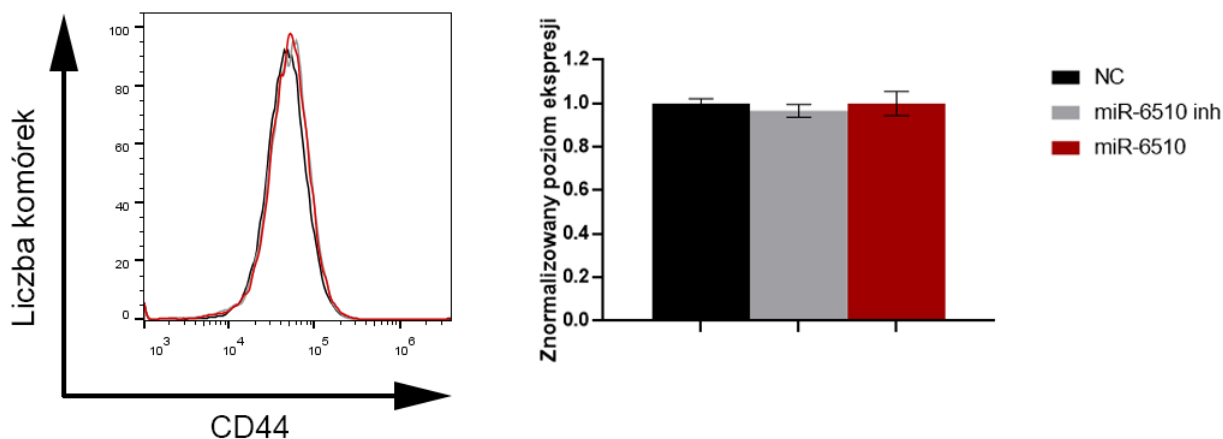


Rycina 4.7.2. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na poziom ekspresji antygeny powierzchniowego CD133 w komórkach linii H103. NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p.

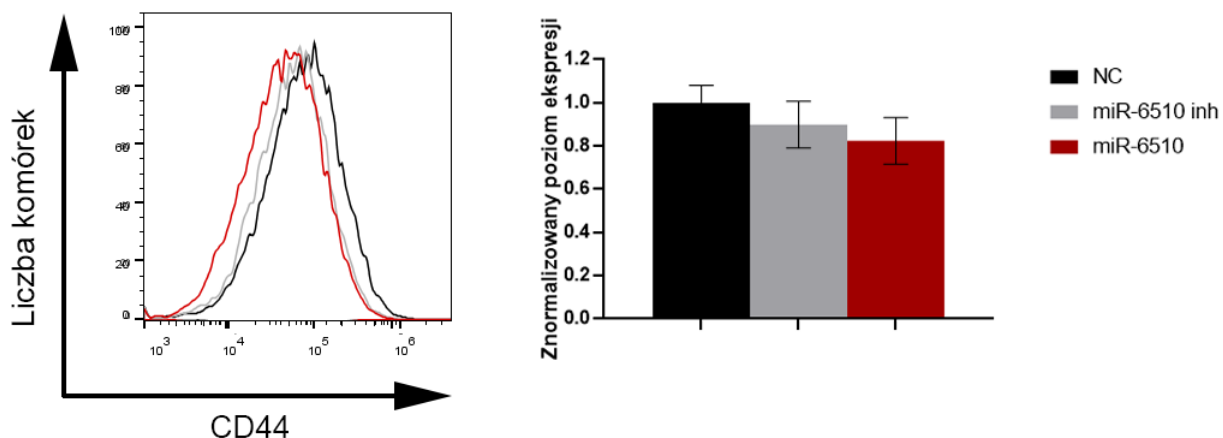
Analiza ekspresji CD133 wykazała, że transfekcja hsa-miR-6510-3p powoduje obniżenie poziomu ekspresji tego markera w odniesieniu do komórek kontrolnych zarówno w przypadku linii komórkowej FaDu ( $p=0,0042$ ; Ryc. 4.7.1), jak i H103 ( $p= 0,0051$ ; Ryc. 4.7.2). W obu liniach komórkowych zaobserwowano również spadek poziomu ekspresji tego

markera w przypadku komórek transfekowanych inhibitorem miR-6510-3p (FaDu:  $p=0,0189$ ; H103:  $0,0117$ ) (Ryc. 4.7.1; Ryc. 4.7.2).

Analiza poziomu ekspresji antygenu powierzchniowego CD44 w komórkach linii FaDu i H103 nie wykazała istotnych statystycznie zmian w ekspresji tego markera pod wpływem transfekcji zarówno cząsteczką hsa-miR-6510-3p, jak i jej inhibitorem (Ryc. 4.7.3; Ryc. 4.7.4).



**Rycina 4.7.3. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na poziom ekspresji antygenu powierzchniowego CD44 w komórkach linii FaDu.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p.



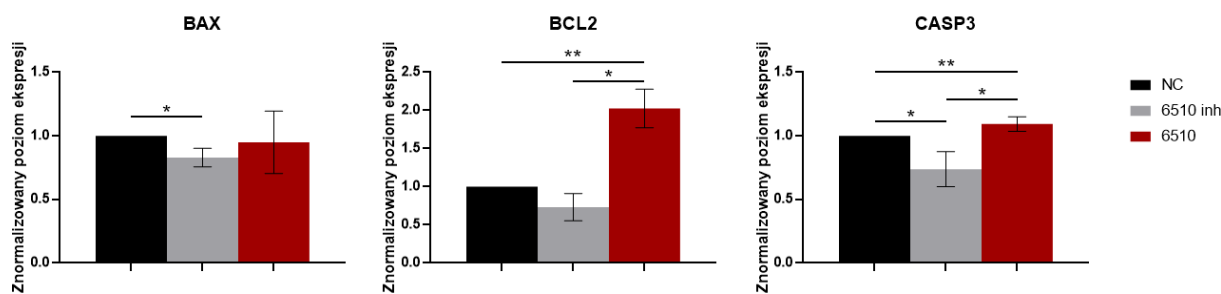
**Rycina 4.7.4. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na poziom ekspresji antygenu powierzchniowego CD44 w komórkach linii H103.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p.

## 4.8. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na indukcję procesu apoptozy w komórkach linii FaDu i H103

### 4.8.1. Analiza poziomu ekspresji markerów apoptozy na poziomie transkryptu

W celu zbadania wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na indukcję apoptozy w komórkach FaDu i H103 wykonano analizę ekspresji genów na poziomie transkryptu z wykorzystaniem ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym poprzedzonej odwrotną transkrypcją. Analizę wykonano w 5 dniu po transfekcji miR-6510-3p. Oceniano ekspresję trzech genów zaangażowanych w szlak programowanej śmierci komórki.

W przypadku linii FaDu w komórkach transfekowanych miR-6510-3p wykazano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji genu CASP3 kodującego *kaspazę 3* – jedną z kaspaz efektorowych, białko odpowiedzialne za hydrolizę cytoszkieletu oraz błony jądrowej w fazie wykonawczej apoptozy. Istotny wzrost ekspresji tego genu w komórkach badanych zaobserwowano zarówno w odniesieniu do wariantu kontrolnego NC ( $p= 0,048194$ ) jak i komórek transfekowanych inhibitorem miR-6510-3p ( $p= 0,036366$ ). W komórkach linii FaDu zaobserwowano również istotny statystycznie spadek ekspresji genu BAX (kodującego białko *Bax* – jeden z aktywatorów apoptozy) w komórkach traktowanych inhibitorem hsa-miR-6510-3p w porównaniu do wariantu kontrolnego ( $p= 0,015112$ ) (Ryc. 4.8.1).

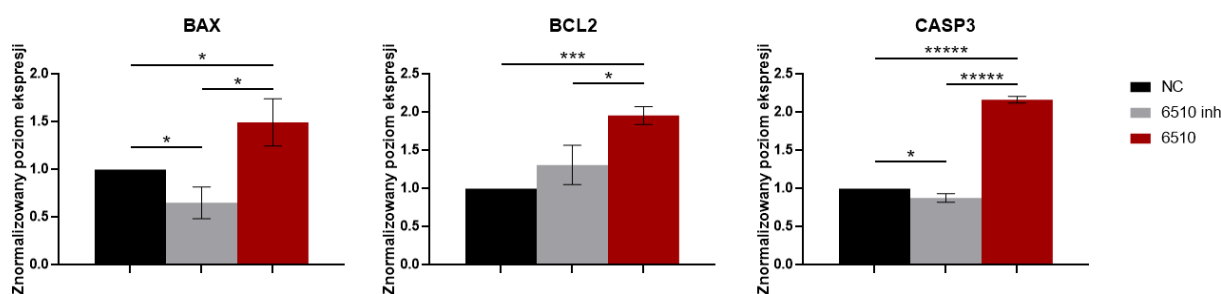


**Rycina 4.8.1. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na indukcję procesu apoptozy w komórkach FaDu.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p.

W przypadku linii H103 również zauważono podwyższenie poziomu ekspresji genu CASP3 w komórkach transfekowanych hsa-miR-6510-3p w odniesieniu do wariantu kontrolnego ( $p=0,000001$ ) oraz traktowanego inhibitorem miR-6510-3p ( $p=0,000006$ ). Zaobserwowano również spadek ekspresji tego genu w komórkach transfekowanych inhibitorem miR-6510-3p w porównaniu do komórek kontrolnych ( $p=0,020835$ ). Podobne obserwacje poczyniono w dla genu BAX. Wykazano wzrost jego ekspresji w komórkach

transfekowanych miR-6510-3p zarówno w porównaniu do wariantu kontrolnego ( $p=0,025265$ ), jak i traktowanego inhibitorem miR-6510-3p ( $p=0,025590$ ). Obniżenie poziomu ekspresji genu BAX było natomiast istotne statystycznie w komórkach transfekowanych inhibitorem miR-6510-3p w odniesieniu do komórek kontrolnych ( $p=0,029007$ ) (Ryc. 4.8.2).

W przypadku obu linii komórkowych zaobserwowano, że transfekcja hsa-miR-6510-3p powoduje wzrost ekspresji genu BCL2 kodującego białko *Bcl-2* – czynnik hamujący uwalnianie cytochromu c oraz czynnika indukującego apoptozę (AIF, ang. *Apoptosis-Inducing Factor*) z mitochondrium na etapie indukcji procesu apoptozy. Wykazano, że poziom ekspresji tego genu w komórkach poddawanych transfekcji hsa-miR-6510-3p wzrasta o około 100% w odniesieniu do komórek kontrolnych zarówno w przypadku linii FaDu ( $p=0,004481$ ), jak i H103 ( $p=0,0005870$ ). W przypadku obu badanych linii komórkowych zanotowano również istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji genu BAX w komórkach transfekowanych miR-6510-3p w porównaniu do wariantu traktowanego jego inhibitorem (FaDu:  $p=0,027376$ ; H103:  $p=0,049513$ ) (Ryc. 4.8.1; Ryc. 4.8.2).



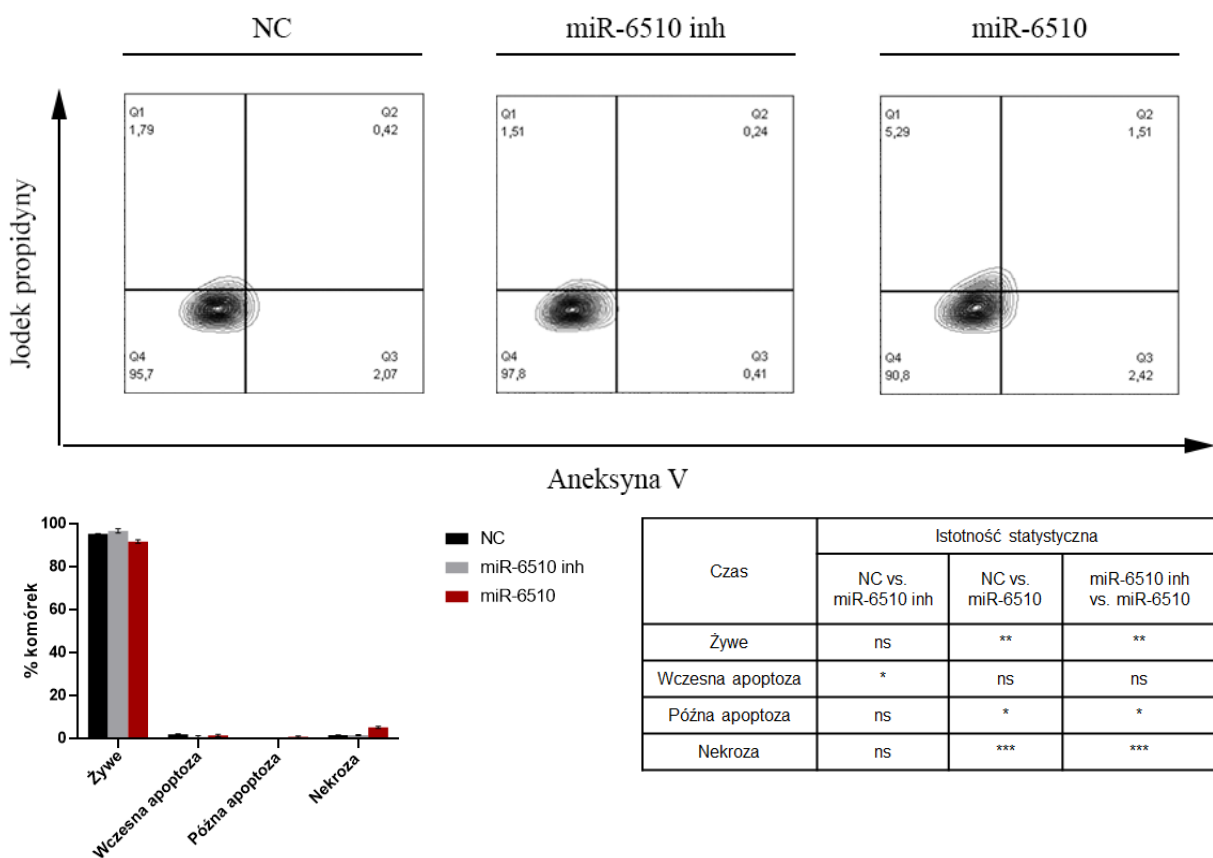
**Rycina 4.8.2. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na indukcję procesu apoptozy w komórkach FaDu.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 – komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p.

#### 4.8.2. Analiza cytometryczna poziomu apoptozy

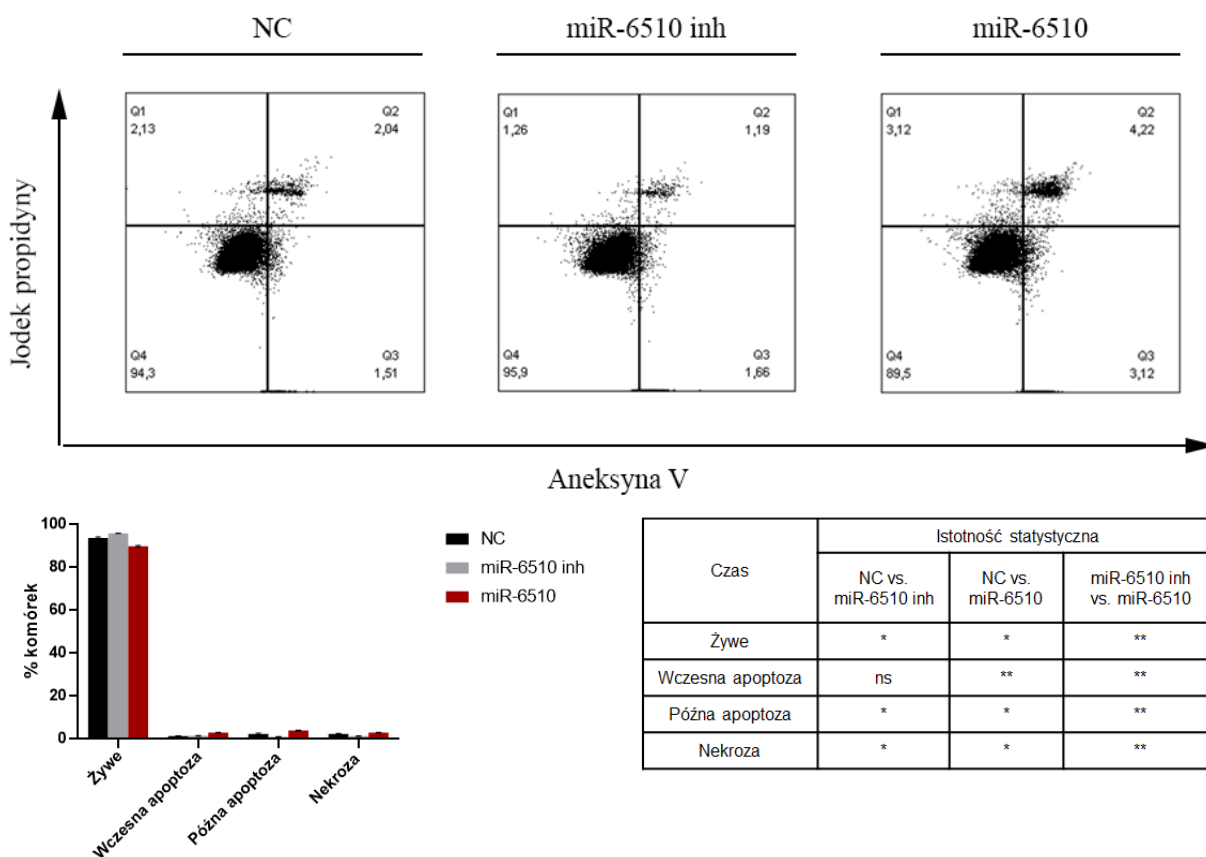
W celu zbadania wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na indukcję procesów śmierci komórkowej, wykonano analizę metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem zestawu Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, CA, Stany Zjednoczone) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Test wykonywano w 7. dniu po transfekcji miR-6510-3p.

W przypadku linii FaDu w komórkach transfekowanych miR-6510-3p wykazano istotny statystycznie spadek udziału komórek żywych (91,93%) w porównaniu do komórek kontrolnych (95,57%;  $p = 0,001754$ ), a także wzrost odsetka komórek w stadium późnej apoptozy (0,45% vs. 1,04%;  $p = 0,039511$ ) oraz nekrozy (1,82% vs. 5,39%;  $p = 0,000314$ ) (Ryc. 4.8.3.).

Badanie komórek linii H103 wykazało, że transfekcja miR-6510-3p powoduje obniżenie udziału komórek żywych (89,90%) w stosunku do wariantu kontrolnego (93,76%;  $p = 0,015245$ ) oraz wzrost odsetka komórek w stadium wczesnej apoptozy (1,44% vs. 3,04%;  $p = 0,002500$ ) i późnej apoptozy (2,41% vs. 4,02%;  $p = 0,031640$ ) (Ryc. 4.8.4.).



**Rycina 4.8.3. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na indukcję procesu apoptozy w komórkach FaDu.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; ns – zmiana nieistotna statystycznie.

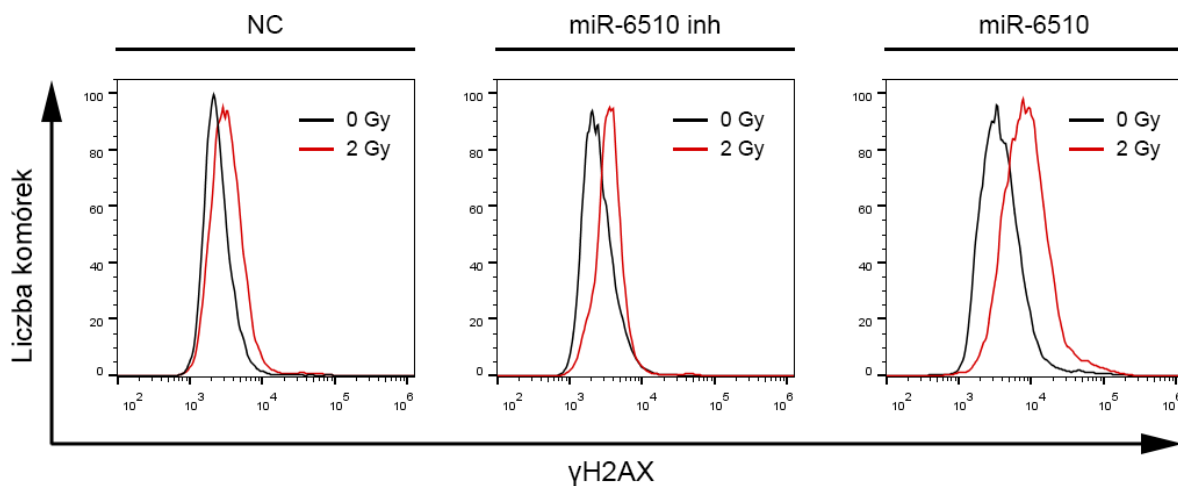


**Rycina 4.8.4. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na indukcję procesu apoptozy w komórkach FaDu.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; ns – zmiana nieistotna statystycznie.

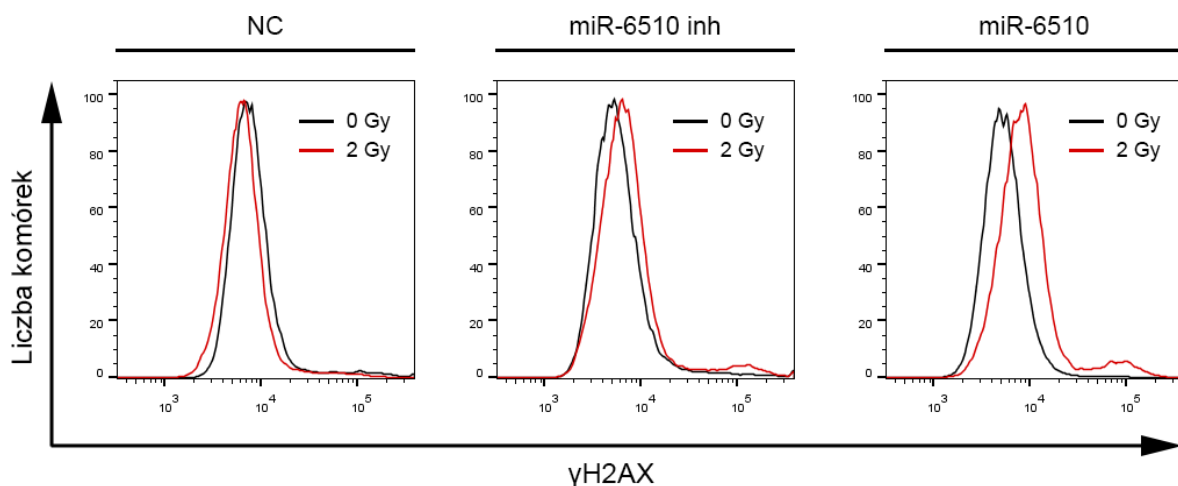
#### 4.9. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na radiowrażliwość komórek linii FaDu i H103

W celu zbadania wpływu hsa-miR-6510-3p na odpowiedź komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi komórki poddano ekspozycji na działanie promieniowania jonizującego w dawce 2 Gy, a następnie dokonano cytometrycznej analizy ekspresji  $\gamma$ H2AX – markera podwójnoniciowych pęknięć DNA.

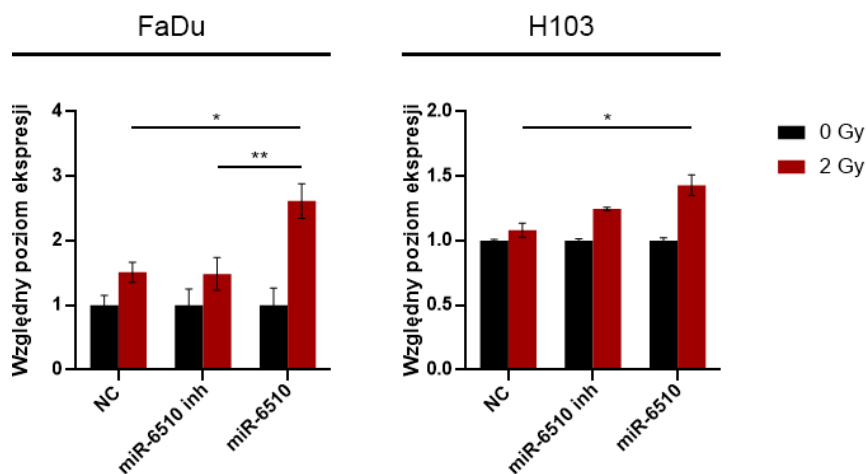
W przypadku linii komórkowej FaDu zaobserwowano istotny statystycznie wzrost odpowiedzi na promieniowanie w komórkach traktowanych hsa-miR-6510-3p zarówno w odniesieniu do wariantu kontrolnego (NC,  $p= 0,0258763$ ), jak i do komórek transfekowanych jego inhibitorem ( $p= 0,028343$ ) (Ryc. 4.9.1). Analiza wykonana dla komórek linii H103 wykazała istotny statystycznie wzrost odpowiedzi w komórkach transfekowanych miR-6510-3p w odniesieniu do wariantu kontrolnego ( $p= 0,0361516$ ) (Ryc. 4.9.2; Ryc. 4.9.3).



**Rycina 4.9.1. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na odpowiedź komórek linii FaDu na działanie promieniowania jonizującego.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p.



**Rycina 4.9.2. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na odpowiedź komórek linii H103 na działanie promieniowania jonizującego.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p.

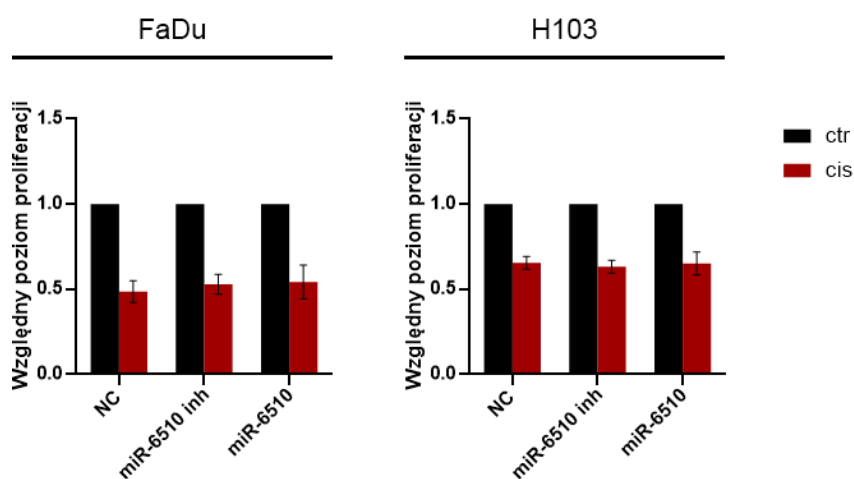


**Rycina 4.9.3. Analiza statystyczna odpowiedzi komórek linii FaDu i H103 na działanie promieniowania jonizującego.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p.

#### 4.10. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na chemiowrażliwość komórek linii FaDu i H103

W celu zbadania odpowiedzi komórek HNSCC na zastosowanie cytostatyków, w 4. dniu po transfekcji badane komórki poddano 72-godzinnej inkubacji z cisplatyną w stężeniu równym IC50 (1,5  $\mu$ M dla linii FaDu; 1,0  $\mu$ M dla linii H103). Następnie z wykorzystaniem testu MTT zbadano proliferację komórkową.

W przypadku obydwu linii komórkowych nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w odpowiedzi na zastosowanie cytostatyku pod wpływem transfekcji cząsteczką hsa-miR-6510-3p (Ryc. 4.10.1).



**Rycina 4.10.1. Ocena odpowiedzi komórek linii FaDu i H103 na zastosowanie cytostatyków.** NC – komórki transfekowane niespecyficznym, kontrolnym miRNA; miR-6510 inh – komórki transfekowane inhibitorem hsa-miR-6510-3p; miR-6510 - komórki transfekowane hsa-miR-6510-3p; ctr – wariant kontrolny (0  $\mu$ M cis); cis – wariant traktowany cisplatyną w stężeniu IC50 (FaDu: 1,5  $\mu$ M; H103: 1,0  $\mu$ M).



## 5. DYSKUSJA

Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi jest szóstym pod względem częstości występowania nowotworem złośliwym na świecie, rozwijającym się w obrębie nabłonka wielowarstwowego płaskiego błony śluzowej pokrywającej wspólny górny odcinek układu oddechowego i przewodu pokarmowego. Stanowi przyczynę około 500 tysięcy nowych zachorowań w skali roku, co stanowi 6% wszystkich diagnozowanych przypadków złośliwych chorób nowotworowych. Leczenie HNSCC obejmuje złożone schematy składające się z metod chirurgicznych, radioterapii, chemioterapii oraz immunoterapii. W zależności od lokalizacji anatomicznej, stopnia zaawansowania i etiopatogenezy, nowotwory te różnią się przebiegiem klinicznym i odpowiedzią na zastosowaną terapię. Jest to związane z faktem, że HNSCC stanowi wysoce heterogenną jednostkę chorobową o bardzo zróżnicowanym profilu molekularnym. Konieczne stało się zatem lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw inicjacji kancerogenezy i rozwoju tego nowotworu. Istotnym wyzwaniem jest również identyfikacja nowych, specyficznych markerów biologicznych pozwalających na wczesne wykrywanie oraz monitorowanie przebiegu choroby i odpowiedzi na zastosowaną terapię.

Obecnie, wśród markerów tych rosnące zainteresowanie zyskują cząsteczki mikroRNA – krótkich, niekodujących RNA, które, poprzez oddziaływanie z regionem 3' UTR mRNA, biorą udział w regulacji ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Uważa się, że nieprawidłowości w ekspresji miRNA (zachodzące pod wpływem mutacji genetycznych, regulacji epigenetycznych czy też zmian w ekspresji czynników transkrypcyjnych) mogą przyczyniać się do inicjacji procesu kancerogenezy (Sethi, Wright i wsp., 2014; Puram i Rocco, 2015). Całogenomowe badania nad profilem ekspresji mikro RNA wykazały, że w niemal wszystkich typach nowotworów (w tym również w HNSCC) dochodzi do wykształcenia charakterystycznego profilu ekspresji miRNA, spośród których niektóre mogą funkcjonować jako supresory nowotworowe (Kikkawa, Hanazawa i wsp., 2010; Ayaz, Gorur i wsp., 2013; Victoria Martinez, Dhahbi i wsp., 2015), podczas gdy inne spełniają rolę onkogenów (Ramdas, Giri i wsp., 2009; Hui, Lenarduzzi i wsp., 2010; Cao, Zhou i wsp., 2013; Gombos, Horvath i wsp., 2013; Victoria Martinez, Dhahbi i wsp., 2015).

Aktualne dane literaturowe wymieniają ponad sześćdziesiąt różnych cząsteczek mikroRNA, którym przypisuje się znaczenie w przewidywaniu prognozy i odpowiedzi

na leczenie u chorych z nowotworami głowy i szyi. Jedną z nich jest mikroRNA hsa-miR-6510-3p - 21-nukleotydowa cząsteczka kodowana na długim ramieniu chromosomu 17. Dane literaturowe dotyczące hsa-miR-6510-3p są bardzo ograniczone. We wstępnych badaniach prowadzonych we współpracy z Burnett School of Biomedical Sciences (University of Central Florida, Orlando, FL, Stany Zjednoczone) wykazano, że poziom ekspresji miR-6510-3p w tkance nowotworowej pochodzącej od chorych z HNSCC jest niemal 6-krotnie obniżony w stosunku do prawidłowej tkanki uzyskanej od tych chorych (Schneider, Victoria i wsp., 2018). Ponadto udowodniono, że obniżona ekspresja hsa-miR-6510-3p koreluje ze wzrostem śmiertelności oraz stopniem zaawansowania guza (Nunez Lopez, Victoria i wsp., 2018). Przytoczone wyżej dane sugerują, że hsa-miR-6510-3p może odgrywać istotną rolę w patogenezie raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, funkcjonując jako supresor nowotworowy. Nie istnieją jednak żadne doniesienia naukowe potwierdzające mechanistyczną funkcję cząsteczki oraz jej znaczenie w procesie nowotworzenia.

W niniejszej rozprawie podjęto próbę zbadania przydatności mikro RNA hsa-miR-6510-3p w diagnostyce, terapii oraz określeniu rokowania u chorych z rakiem płaskonabłonkowymi głowy i szyi. W tym celu zbadano poziom ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej uzyskanej od chorych z histopatologicznie potwierdzonym HNSCC w różnych stadiach zaawansowania i lokalizacjach. Celem zbadania wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na procesy biologiczne zachodzące w komórkach raka płaskonabłonkowego głowy i szyi opracowano również model badawczy, który stanowiły dwie ustalone linie komórkowe HNSCC (FaDu, H103) transfekowane cząsteczką hsa-miR-6510-3p, jej inhibitorem oraz kontrolnym mikroRNA o niespecyficznym sekwencji.

W pracy analizowano poziom ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w tkankach nowotworowej pochodzących od chorych z histopatologicznie potwierdzonym HNSCC w odniesieniu do tkanki prawidłowej pochodzącej od tego samego pacjenta. Uzyskane wyniki zestawiano następnie z danymi klinicznymi dotyczącymi lokalizacji guza oraz stadium zaawansowania choroby. Wykazano, że średni poziom ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej jest dziesięciokrotnie obniżony w odniesieniu do tkanki prawidłowej w badanej grupie chorych. Nie zaobserwowano jednak istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej w zależności od lokalizacji guza, stopnia jego zaawansowania, złośliwości, czy też stadium zaawansowania przerzutów

do węzłów chłonnych. Nie wykazano również związku pomiędzy poziomem ekspresji hsa-miR-6510-3p a płcią oraz wiekiem badanych chorych.

Dane literaturowe na temat poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w komórkach nowotworowych są bardzo ograniczone. Schneider i wsp., (2018) w swoich badaniach przeprowadzonych w grupie 5 chorych z HNSCC z wykorzystaniem metody sekwencjonowania nowej generacji wykazali, że poziom ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej jest niemal 6-krotnie obniżony w porównaniu do sąsiadującej tkanki prawidłowej (Schneider, Victoria i wsp., 2018). Wynik ten potwierdzili Nunez Lopez i wsp., (2018), analizując dane z sekwencjonowania RNA 497 chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi zgromadzone w bazie TCGA. Badacze wykazali niemal 5-krotne obniżenie poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance guza w odniesieniu do tkanki prawidłowej pochodzącej od chorych z HNSCC. Zaobserwowano ponadto, że obniżony poziom ekspresji badanego mikro RNA koreluje ze stopniem zaawansowania guza oraz wzrostem śmiertelności w badanej grupie (Nunez Lopez, Victoria i wsp., 2018). Zbliżone wyniki uzyskano, analizując dane zdeponowane w bazie TCGA dotyczące poziomu ekspresji hsa-miR-6510 u chorych z rakiem płaskonabłonkowym szyjki macicy. Wykazano, że w grupie wykazującej obniżony poziom ekspresji cząsteczki współczynnik pięcioletniego przeżycia jest istotnie niższy ( $p=0,016$ ) niż u chorych wykazujących wyższą ekspresję badanego mikro RNA (Nagy i wsp., 2018). Podobne rezultaty zaobserwowano u chorych z rakiem nerkowokomórkowym ( $p<0,0001$ ), rakiem wątrobowokomórkowym ( $p<0,0001$ ) czy też rakiem żołądka ( $p=0,014$ ) (Nagy i wsp., 2018). Co interesujące, odwrotny związek obserwuje się pomiędzy ekspresją miR-6510-3p i przeżywalnością u chorych z rakiem pęcherza. Analiza przeprowadzona w grupie 408 chorych wykazała, że mediana czasu przeżycia u osób wykazujących niższy poziom ekspresji badanej cząsteczki jest istotnie wyższa niż u pacjentów charakteryzujących się podwyższoną ekspresją miR-6510 (44,93 miesięcy vs. 20,57 miesięcy;  $p=0,022$ ). Podobną zależność zaobserwowano również u chorych z rakiem jajnika ( $p=0,003$ ) czy rakiem trzonu macicy ( $p=0,0077$ ) (Nagy i wsp., 2018).

Nie istnieją inne doniesienia literaturowe na temat analizy poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p zarówno w HNSCC, jak i innych nowotworach. Wymienia się jednak inne cząsteczki mikro RNA, których zmieniona ekspresja w tkance nowotworowej powiązana jest z rokowaniem czy odpowiedzią chorych na zastosowane leczenie. González-Arriagada i wsp., (2018), analizując poziom ekspresji cząsteczki hsa-miR-26 w tkance nowotworowej

pochodzącej od chorych z HNSCC wykazali, że miR-26 ulega zwiększonej ekspresji u chorych, u których występują przerzuty do węzłów chłonnych. Zaobserwowano ponadto, że podwyższony poziom ekspresji hsa-miR-26 koreluje z większym poziomem agresywności guza, wyższym prawdopodobieństwem wykształcenia wznowy oraz obniżonym współczynnikiem przeżycia wolnego od choroby (González-Arriagada, Olivero i wsp., 2018). Podobne wyniki naukowcy uzyskali badając poziom ekspresji hsa-miR-125b, który również okazał się podwyższony w grupie chorych z przerzutami do węzłów chłonnych. Wykazano również, że zwiększona ekspresja tego mikro RNA związana jest z obniżoną przeżywalnością badanych chorych (González-Arriagada, Olivero i wsp., 2018). Re i wsp., (2015) analizowali poziom ekspresji hsa-miR-34c-5p w tkance nowotworowej pochodzących od chorych z rakiem krtani oraz jego związek z przeżywalnością chorych w badanej grupie. Badacze wykazali, że spadek ekspresji analizowanego miRNA związany jest z obniżonym współczynnikiem przeżycia wolnego od choroby oraz ogólnego przeżycia. Zaobserwowano również związek pomiędzy obniżonym poziomem ekspresji miR-34c-5p i zwiększonym ryzykiem wykształcenia wznowy (Re, Ćeka i wsp., 2015). Liu i wsp., (2013) w swoich badaniach nad rakiem nosogardzieli wykazali, że u chorych z obniżonym poziomem ekspresji miR-451 w tkance nowotworowej notuje się niższy współczynnik przeżycia wolnego od choroby oraz ogólny współczynnik przeżycia (Liu, Jiang i wsp., 2013). Podobne wyniki uzyskali Chang i wsp., (2013) w badaniach nad rolą mikro RNA hsa-miR-17 w raku jamy ustnej (Chang, Yang i wsp., 2013), He i wsp., (2017), badając znaczenie miR-300 w LSCC (He, Liu i wsp., 2017) czy Jiang i wsp., (2017) analizując związek pomiędzy ekspresją hsa-miR-212 i rokowaniem u chorych z rakiem płaskonabłonkowym nosogardzieli (Jiang, Wang i wsp., 2017).

W niniejszej pracy podjęto próbę opracowania modelu badawczego linii komórkowych HNSCC transfekowanych cząsteczką hsa-miR-6510-3p, jej inhibitorem oraz kontrolnym miRNA o niespecyficznej sekwencji. Wykazano istotne podwyższenie ekspresji miR-6510-3p zarówno w linii komórkowej FaDu, jak i H103 w dwóch analizowanych punktach czasowych (5. oraz 7. dzień po transfekcji).

Aby ocenić zdolność mikro RNA hsa-miR-6510-3p do hamowania podziałów komórkowych, w pracy analizowano wpływ transfekcji badaną cząsteczką na przebieg cyklu komórkowego w komórkach linii FaDu i H103. Analizę wykonano w dwóch punktach czasowych – 5 i 7 dni po transfekcji. W przypadku obu badanych linii komórkowych,

wykazano że transfekcja miR-6510-3p powoduje istotny statystycznie wzrost udziału procentowego fazy G2/M w badanej populacji komórek, co może świadczyć o zatrzymaniu cyklu komórkowego w tej właśnie fazie.

Obecnie nie istnieją dane literaturowe dotyczące wpływu hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego zarówno w przypadku HNSCC, jak i innych nowotworów. Opisano jednak kilka innych cząsteczek miRNA, które mogą odgrywać rolę w regulacji tego procesu w komórkach raka płaskonabłonkowego głowy i szyi. Gao i wsp., (2017) w swoich badaniach nad miR-145-5p wykazali, że niski poziom ekspresji tej cząsteczki u chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani związany jest z wyższym stopniem zaawansowania choroby oraz niekorzystnym rokowaniem. Naukowcy, indukując nadekspresję tej cząsteczki w dwóch ustalonych liniach komórkowych LSCC, zaobserwowali, że wpływa ona na zatrzymanie przebiegu cyklu komórkowego w fazie G1 (Gao, Zhang i wsp., 2019). Nohata i wsp., (2013) badali funkcję miR-874, którego ekspresja jest istotnie statystycznie obniżona w tkance nowotworowej pochodzącej od chorych z HNSCC. Badacze wykazali, że nadekspresja badanej cząsteczki w liniach komórkowych SAS i FaDu związana była z zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G2/M (Nohata, Hanazawa i wsp., 2013). Zbliżone wyniki otrzymali Li i wsp., (2019), którzy udowodnili, że nadekspresja cząsteczki mikroRNA hsa-miR-206 w komórkach HNSCC powoduje wzrost udziału komórek w fazie G1 cyklu komórkowego (Li, Qin i wsp., 2019). Podobny efekt zaobserwowali również Zhao i wsp., (2017) w badaniach nad znaczeniem hsa-miR-124 w rozwoju HNSCC (Zhao, Ling i wsp., 2017), czy też zespół badawczy Sannigrahi i wsp., (2017), badając rolę miR-139-3p w patogenezie HPV-pozytywnego raka płaskonabłonkowego głowy i szyi (Sannigrahi, Sharma i wsp., 2017).

Aby ocenić zdolność mikro RNA hsa-miR-6510-3p do hamowania charakterystycznej dla komórek nowotworowych, niekontrolowanej proliferacji w niniejszej pracy zbadano wpływ miR-6510 na regulację tego procesu w komórkach linii FaDu i H103. W przypadku obu badanych linii wykazano istotne obniżenie poziomu proliferacji pod wpływem transfekcji miR-6510-3p w porównaniu do komórek transfekowanych jego inhibitorem oraz do wariantu kontrolnego.

Z powodu braku doniesień na temat wpływu hsa-miR-6510-3p na proliferację komórkową (zarówno w HNSCC, jak i w innych nowotworach) niemożliwe jest porównanie

uzyskanych wyników z innymi źródłami. Istnieją jednak badania wskazujące na znaczenie innych cząsteczek mikroRNA w regulacji proliferacji komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi. Severino i wsp., (2013) w swoich badaniach nad funkcją hsa-miR-10b wykazali, że jego ekspresja jest obniżona w tkance nowotworowej w stosunku do tkanki prawidłowej pochodzącej od chorych z HNSCC. Badacze udowodnili również, że indukcja nadekspresji tej cząsteczki w badanych ustalonych liniach raka płaskonabłonkowego głowy i szyi (SCC9, SCC25, FaDu) powoduje obniżenie poziomu proliferacji komórkowej (Severino, Brüggemann i wsp., 2013). Hersi i wsp., (2018) analizowali wpływ miR-9 na procesy biologiczne zachodzące w komórkach HNSCC. Naukowcy z wykorzystaniem testu MTT wykazali, że transfekcja plazmidem niosącym cząsteczkę hsa-miR-9 powoduje obniżenie poziomu proliferacji w badanej linii komórkowej HSC3 o 33% w stosunku do komórek kontrolnych (Hersi, Raulf i wsp., 2018). Kumar i wsp., (2012) w swoich badaniach nad rolą mikroRNA hsa-miR-34a w patogenezie HNSCC udowodnili, że transfekcja miR-34a wywołująca nadekspresję cząsteczki w komórkach linii HNSCC SSC-74A związana jest z obniżeniem proliferacji komórkowej niemal o 60% (Kumar, Yadav i wsp., 2012). Zbliżone wyniki uzyskali Zhang i wsp., (2015) w swoich badaniach nad miR-124. Naukowcy zaobserwowali, że wprowadzenie cząsteczki do komórek HNSCC linii SCC15 powoduje obniżenie poziomu ich proliferacji o 59,6% w punkcie czasowym 96h po transfekcji (Zhang, Piao i wsp., 2015). Efekt hamowania proliferacji komórkowej w modelach *in vitro* raka płaskonabłonkowego głowy i szyi zaobserwowano również dla cząsteczek miR-145-5p (Gao, Zhang i wsp., 2019), miR-874 (Nohata, Hanazawa i wsp., 2013), miR-206 (Li, Qin i wsp., 2019), miR-139 (Sannigrahi, Sharma i wsp., 2017), czy miR-29 (Koshizuka, Kikkawa i wsp., 2018).

W niniejszej rozprawie oceniano również wpływ mikroRNA hsa-miR-6510-3p na ekspresję markerów fenotypu macierzystego komórek HNSCC. Dane literaturowe wskazują, że niezróżnicowana populacja nowotworowych komórek macierzystych obecnych w guzie odpowiedzialna jest za zdolność nowotworu do samoodnowy i przerzutowania. W celu zbadania roli hsa-miR-6510-3p w regulacji tych właściwości wykonano cytometryczną analizę ekspresji antygenów powierzchniowych CD44 oraz CD133. W przypadku obu badanych linii komórkowych zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie ekspresji markera CD133 w komórkach transfekowanych miR-6510-3p

w odniesieniu do wariantu kontrolnego. W przypadku markera CD44 nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian jego ekspresji po transfekcji miR-6510-3p.

Nie istnieją doniesienia literaturowe na temat wpływu hsa-miR-6510-3p na macierzystość komórek zarówno w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi, jak i w innych nowotworach. Lu i wsp., (2017) badali natomiast wpływ mikroRNA hsa-miR-520b na właściwości pluripotencjne komórek HNSCC linii OECM1 i SAS. Naukowcy wykazali, że indukcja nadekspresji tej cząsteczki w badanych komórkach spowodowała obniżenie ekspresji markerów (CD44, Nestyna) oraz regulatorów (Twist, Nanog, Oct4) pluriopotencji o 32-85%. Uzyskane wyniki potwierdzono, analizując zdolność badanych komórek do tworzenia sferoidów. W przypadku obu linii komórkowych proces ten zachodził o ok. 50% mniej wydajnie w komórkach transfekowanych miR-520b niż w wariacie kontrolnym (Lu, Cheng i wsp., 2017). Zbliżone wyniki uzyskali również Yuan i wsp., (2018) w badaniach nad rolą miR-320a w patogenezie płaskonabłonkowego raka krtani. Badacze wykazali, że nadekspresja miR-320a wywołana metodą transfekcji w komórkach linii HEP-2 powodowała istotne statystycznie obniżenie poziomu ekspresji markerów pluripotencji, takich jak CD44, CD133, Nanog czy MYC (Yuan, Xiu i wsp., 2018). Badania nad rolą cząsteczek miRNA w utrzymywaniu właściwości macierzystych przez komórki HNSCC prowadzili również Lu i wsp., (2016). Naukowcy wykazali, że u chorych charakteryzujących się wysoką ekspresją hsa-miR-31 w tkance nowotworowej obserwuje się również stosunkowo wysoki poziom ekspresji regulatorów pluripotencji, takich jak Nanog, Oct4 czy Sox2. Wyciszenie ekspresji tego mikroRNA w liniach komórkowych HNSCC (SAS, OECM1, FaDu, HSC3) za pomocą wektora lentiwirusowego wiązało się z istotnym statystycznie obniżeniem poziomu ekspresji markerów macierzystości w badanych komórkach (Lu, Liu i wsp., 2016).

Aby ocenić zdolność mikro RNA hsa-miR-6510-3p do hamowania zdolności komórek nowotworowych do przerzutowania, w niniejszej pracy oceniano również wpływ badanej cząsteczki na potencjał migracyjny komórek HNSCC linii FaDu i H103. W tym celu wykonano test gojenia się rany. Migrację komórkową obserwowano i dokumentowano w 12-godzinnych (linia H103) oraz 24-godzinnych (linia FaDu) odstępach czasowych. W przypadku linii FaDu we wszystkich punktach czasowych analizy obserwowano istotne statystycznie obniżenie zdolności do migracji w komórkach transfekowanych miR-6510-3p w porównaniu do komórek kontrolnych. Analizy przeprowadzone na linii H103 wykazały, że w punktach czasowych 12h, 24h oraz 36h zdolność do migracji komórek badanych była

istotnie obniżona w stosunku do komórek kontrolnych oraz komórek transfekowanych inhibitorem miR-6510-3p.

Z informacji autorki wynika, że dotychczas w literaturze niedostępne są doniesienia na temat wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na migrację komórkową. Istnieją jednak liczne doniesienia na temat roli innych mikroRNA w regulacji tego procesu. Islam i wsp., (2014) w swoich badaniach nad rolą miR-138 w patogenezie raka płaskonabłonkowej jamy ustnej wykazali, że indukcja nadekspresji tej cząsteczki w badanych liniach komórkowych OSCC związana była z obniżeniem zdolności do migracji komórek HNSCC niemal o 50% (Islam, Datta i wsp., 2014). Zhang i wsp., (2020) w swoich badaniach nad miR-30e-5p wykazali, że poziom ekspresji tej cząsteczki w tkance nowotworowej pochodzącej od chorych z HNSCC jest znacznie obniżony w stosunku do tkanki prawidłowej. Niska ekspresja miR-30e-5p koreluje ponadto z niekorzystnym rokowaniem klinicznym. Naukowcy stworzyli model badawczy linii komórkowych HNSCC (FaDu, JHU011) wykazujących nadekspresję miR-30e-5p. Z wykorzystaniem testu gojenia się rany udowodniono, że w komórkach tych nastąpiło obniżenie zdolności do migracji o około 40% w linii FaDu oraz 50% w linii JHU011 (Zhang, Li i wsp., 2020). Podobne wyniki uzyskali Koshizuka i wsp., (2017) udowadniając zdolność do obniżania poziomu migracji komórek HNSCC przez cząsteczki mikroRNA z rodziny hsa-miR-199 (Koshizuka, Hanazawa i wsp., 2017), a także Shuang i wsp., (2017), wskazując na znaczenie cząsteczki miR-195 w regulacji zdolności do migracji komórek raka płaskonabłonkowej krtani (Shuang, Li i wsp., 2017).

W niniejszej rozprawie zbadano również wpływ transfekcji cząsteczką hsa-miR-6510-3p na indukcję procesów śmierci komórkowej w komórkach HNSCC. W tym celu dokonano analizy poziomu ekspresji genów zaangażowanych w proces apoptozy na poziomie transkryptu. Wykonano również analizę cytometryczną komórek barwionych Aneksyną V oraz jodkiem propidyny celem określenia udziału frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych w badanej populacji komórek. W obu badanych liniach komórkowych zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji genów BAX (kodującego białko *Bax* – jeden z aktywatorów apoptozy) oraz CASP3 (kodującego kaspazę 3 – białko zaangażowane w fazę wykonawczą apoptozy) w komórkach transfekowanych miR-6510-3p w porównaniu do wariantu kontrolnego. Wykazano również, że transfekcja miR-6510-3p w obu badanych liniach komórkowych powodowała obniżenie udziału frakcji komórek żywych przy jednoczesnym wzroście udziału procentowego komórek w stadium wczesnej



apoptozy (linia FaDu), późnej apoptozy (linia FaDu i H103) oraz nekrozy (linia FaDu i H103). Obserwacje te potwierdziła również analiza cytometryczna cyklu komórkowego, która wykazała pojawienie się frakcji komórek apoptotycznych (sub-G1) po transfekcji hsa-miR-6510-3p zarówno w komórkach FaDu, jak i H103.

Obecnie nie istnieją doniesienia literaturowe badające wpływ hsa-miR-6510-3p na indukcję procesów śmierci komórkowej. Znaczenie w indukcji procesu apoptozy w komórkach HNSCC przypisano jednak kilku innym cząsteczkom mikroRNA. Zhao i wsp., (2017) w swoich badaniach nad rolą miR-124 w patogenezie raka płaskonabłonkowego głowy i szyi wykazali, że ekspresja tej cząsteczki w tkance guza jest niemal 4,5-krotnie obniżona w stosunku do tkanki prawidłowej, a wywołanie jej nadekspresji w komórkach HNSCC linii JHU-22 powoduje indukcję procesu apoptozy oraz podwyższenie poziomu ekspresji białek proapoptotycznych, takich jak Bax i BAD przy jednoczesnym spadku ekspresji białek antyapoptotycznych (Bcl-2, Bcl-xL) (Zhao, Ling i wsp., 2017). Shuang i wsp., (2017) badali wpływ mikroRNA hsa-miR-195 na procesy biologiczne zachodzące w komórkach płaskonabłonkowego raka krtani. Nadekspresja tej cząsteczki w badanej linii komórkowej związana była ze wzrostem ekspresji markerów procesu apoptozy oraz wzrostem udziału frakcji wczesnoapoptotycznej w populacji komórek analizowanych metodami cytometrii przepływową (Shuang, Li i wsp., 2017). Li i wsp., (2015) analizowali wpływ mikroRNA hsa-miR-512-5p na procesy biologiczne zachodzące w komórkach HNSCC wykazujących wysoką aktywność telomerazy. Naukowcy wykazali, że hTERT – katalityczna podjednostka kompleksu enzymatycznego telomerazy stanowi gen docelowy, którego ekspresja może być regulowana na poziomie posttranskrypcyjnym przez miR-512-5p. Ponadto badacze udowodnili, że nadekspresja miR-512 zaindukowana w badanych liniach komórkowych powoduje znaczne skrócenie sekwencji telomerowych oraz skierowanie komórki na drogę apoptozy (Li, Lei i wsp., 2015). Lamperska i wsp., (2017) w badaniach wykorzystujących model komórkowy wykazujący różne poziomy ekspresji mikroRNA hsa-let-7d wykazali istotną statystycznie korelację pomiędzy wzrastającym poziomem ekspresji let-7d a ekspresją markerów apoptozy (BAX, CASP3) na poziomie transkryptu (Lamperska, Kolenda i wsp., 2017). Zbliżone wyniki uzyskali również Nohata i wsp., (2013) w swoich badaniach nad rolą miR-874 w patogenezie HNSCC (Nohata, Hanazawa i wsp., 2013), Li i wsp., (2019) w badaniach nad miR-206 (Li, Qin i wsp., 2019), czy też Gao i wsp., (2019), badając

znaczenie mikroRNA-145-5p w rozwoju płaskonabłonkowego raka krtani (Gao, Zhang i wsp., 2019).

Aby zbadać potencjalną zdolność mikro RNA hsa-miR-6510-3p do zwiększania wrażliwości komórek nowotworowych na leczenie metodą radioterapii w niniejszej pracy zbadano również odpowiedź komórek HNSCC na zastosowanie promieniowania jonizującego. W tym celu komórki poddano ekspozycji na promieniowanie w dawce 2 Gy, a następnie dokonano cytometrycznej analizy ekspresji  $\gamma$ H2AX – markera podwójnoniciowych pęknięć DNA. W przypadku obydwu badanych linii komórkowych w wariancie traktowanym miR-6510-3p zaobserwowano istotny statystycznie wzrost odpowiedzi na promieniowanie jonizujące w porównaniu z wariantem kontrolnym.

Obecnie nie istnieją doniesienia literaturowe na temat wpływu hsa-miR-6510-3p na radiowrażliwość komórek zarówno w HNSCC, jak i w innych nowotworach. Dane naukowe wskazują jednak kilka innych cząsteczek miRNA, które mogą regulować mechanizmy radiowrażliwości komórek HNSCC. Lu i wsp., (2017) badali wpływ hsa-miR-520b na odpowiedź komórek HNSCC na promieniowanie jonizujące, analizując ich potencjał klonogeny. Badacze wykazali, że w komórkach linii SAS i OECM1 wykazujących nadekspresję miR-520b potencjał ten został istotnie statystycznie obniżony w porównaniu do wariantu kontrolnego (Lu, Cheng i wsp., 2017). Zbliżone wyniki uzyskali Weng i wsp., (2016) w swoich badaniach nad miR-494-3p. Naukowcy udowodnili, że indukcja nadekspresji tej cząsteczki w komórkach linii SAS związana jest ze wzrostem radiowrażliwości komórek HNSCC i obniżeniem potencjału klonogennego o 40% przy dawce 2 Gy oraz o 70% w przypadku dawki 4 Gy (Weng, Yu i wsp., 2016). Kang i wsp., (2016) wykazali, że miR-24 odgrywa istotną rolę w regulacji odpowiedzi na promieniowanie jonizujące w raku płaskonabłonkowym nosogardzieli. Badacze udowodnili, że w modelu komórkowym wykazującym stabilną nadekspresję miR-24 potencjał klonogeny komórek poddanych ekspozycji na działanie promieniowania jonizującego NPSCC uległ obniżeniu nawet o 40% w stosunku do wariantu kontrolnego (Kang, Xiao i wsp., 2016). Podobne wyniki uzyskali również Li i wsp., (2014), badając rolę miR-185-3p w radiooporności raka płaskonabłonkowego nosogardzieli (Li, Wang i wsp., 2014) oraz Vahabi i wsp., (2019) w badaniach nad miR-96-5p (Vahabi, Pulito i wsp., 2019).

Aby zbadać zdolność mikroRNA hsa-miR-6510-3p do zwiększania odpowiedzi komórek HNSCC na zastosowanie leczenia metodą chemioterapii w niniejszej pracy oceniono również wpływ hsa-miR-6510-3p na chemowrażliwość komórek HNSCC. W tym celu komórki linii FaDu i H103 w 5 dniu po transfekcji poddano 72-godzinnej inkubacji z cisplatyną w stężeniu 1,5 uM (FaDu) oraz 1,0 uM (H103), a następnie wykonano test MTT celem oznaczenia poziomu proliferacji komórkowej. W przypadku obu badanych linii komórkowych nie wykazano istotnych statystycznie zmian w odpowiedzi na zastosowanie chemoterapeutyku pod wpływem transfekcji cząsteczką hsa-miR-6510-3p.

Obecnie nie istnieją doniesienia literaturowe badające wpływ hsa-miR-6510-3p na chemowrażliwość komórek nowotworowych zarówno w przypadku HNSCC, jak i innych nowotworów. Dostępne źródła naukowe wskazują jednak na udział innych cząsteczek mikroRNA w regulacji odpowiedzi na zastosowanie chemioterapeutyków. Lu i wsp., (2017) w swoich badaniach nad miR-520b wykazali, że nadekspresja tej cząsteczki w komórkach HNSCC linii SAS i OECM1 powoduje uwrażliwienie komórek na zastosowanie cisplatyny i obniżenie ich potencjału klonogenego o niemal 70% (Lu, Cheng i wsp., 2017). Zbliżone wyniki uzyskali Lamperska i wsp., (2017), analizując wpływ mikroRNA let-7d na chemowrażliwość komórek HNSCC linii FaDu. Badacze wykazali, że nadekspresja let-7d w komórkach HNSCC powoduje ich uwrażliwienie na zastosowanie chemioterapeutyków takich jak cisplatyna, 5-Fluorouracyl, Paklitaksel i Doksorubicyna (Lamperska, Kolenda i wsp., 2017). Yuan i wsp., (2018), badając wpływ mikroRNA hsa-miR-320b na chemowrażliwość komórek płaskonabłonkowego raka krtani wykazali, że nadekspresja tej cząsteczki w komórkach LSCC powoduje wzmocnienie ich odpowiedzi na cisplatinę i indukcję procesu apoptozy po zastosowaniu chemioterapeutyku (Yuan, Xiu i wsp., 2018).

Niniejsza rozprawa miała na celu zbadanie przydatności mikro RNA hsa-miR-6510-3p w diagnostyce, terapii oraz określeniu rokowania u chorych z nowotworami złośliwymi głowy i szyi. W tym celu zbadano poziom ekspresji miR-6510-3p w tkance nowotworowej pochodzącej od chorych z histopatologicznie potwierdzonym HNSCC, a następnie uzyskane wyniki zestawiono z danymi klinicznymi dotyczącymi lokalizacji guza oraz stadium zaawansowania choroby.

Obecnie nie istnieją doniesienia naukowe dotyczące wpływu hsa-miR-6510-3p na biologię komórki. Niniejsza rozprawa jest pierwszą próbą wyjaśnienia roli, jaką cząsteczka

ta odgrywa w patogenezie nowotworów głowy i szyi. Z wykorzystaniem modelu badawczego ustalonych linii komórkowych HNSCC transfekowanych cząsteczką hsa-miR-6510-3p, jej inhibitorem oraz kontrolnym, niespecyficznym miRNA, zbadano również wpływ mikroRNA hsa-miR-6510-3p na procesy biologiczne zachodzące w komórkach HNSCC, takie jak cykl komórkowy, proliferacja, migracja, czy indukcja śmierci komórkowej.

Wykazano, że transfekcja miR-6510-3p powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego oraz obniżenie poziomu proliferacji w badanych komórkach. Charakterystyczne dla komórek nowotworowych, niekontrolowane podziały komórkowe związane są z nierzadko występującym, szybkim rozrostem ogniska nowotworowego i bardziej agresywnym przebiegiem choroby. Uzyskane w pracy wyniki sugerują, że cząsteczka miR-6510 może wpływać hamująco na przebieg tych procesów, spowalniając tym samym wzrost guza nowotworowego.

W niniejszej pracy badano wpływ mikro RNA hsa-miR-6510-3p na potencjał migracyjny komórek HNSCC. Właściwość ta zapewnia komórkom nowotworowym zdolność do przedostawania się do naczyń krwionośnych i limfatycznych, przemieszczania do odległych w stosunku do pierwotnego ogniska nowotworowego tkanek oraz formowania guzów wtórnych. Zjawisko to przyczynia się do rozsiewu komórek nowotworowych w obrębie organizmu, prowadząc do bardziej inwazyjnego przebiegu choroby. W pracy wykazano, że miR-6510-3p posiada zdolność do hamowania migracji badanych komórek HNSCC, obniżając tym samym ich zdolność do przerzutowania.

W niniejszej pracy wykazano, że transfekcja cząsteczką hsa-miR-6510-3p wywołuje również indukcję procesów śmierci komórkowej w komórkach HNSCC. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że cząsteczka ta może stanowić swego rodzaju element wspomagający w tradycyjnej terapii HNSCC, zwiększając wrażliwość komórek nowotworowych na zastosowane leczenie. Podobne wnioski sformułować można na podstawie analizy wpływu hsa-miR-6510-3p na odpowiedź komórek HNSCC na promieniowanie jonizujące. Wykazano, iż transfekcja miR-6510-3p powoduje zwiększenie wrażliwości badanych komórek na zastosowanie tego czynnika. Wynik ten sugeruje, że cząsteczka miR-6510-3p mogłaby przyczynić się do uzyskania bardziej zadowalających efektów leczenia HNSCC metodami radioterapii.

W pracy analizowano również wpływ hsa-miR-6510-3p na właściwości macierzyste komórek HNSCC, które odpowiedzialne są za zdolność nowotworu do samoodnowy i przerzutowania. Wykazano, że transfekcja miR-6510-3p wywołuje obniżenie ekspresji jednego z badanych markerów fenotypu macierzystego w komórkach HNSCC. Uzyskane dane pozwalają twierdzić, że miR-6510 może odgrywać istotną rolę w procesie różnicowania komórek nowotworowych, pozbawiając je właściwości macierzystych komórek nowotworowych o szczególnie agresywnym charakterze.

Wyniki uzyskane w pracy świadczą o tym, że mikroRNA hsa-miR-6510-3p bierze udział w regulacji procesów związanych z progresją choroby nowotworowej i może funkcjonować jako potencjalny supresor nowotworowy. Ponadto wyniki przeprowadzonych eksperymentów posiadają potencjał translacyjny i umożliwiają zaplanowanie dalszych doświadczeń przedklinicznych mających na celu opracowanie nowych, molekularnych metod terapeutycznych służących personalizacji leczenia.

## 6. WNIOSKI

1. Proces kancerogenezy w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi związany jest z istotnym obniżeniem poziomu ekspresji mikroRNA hsa-miR-6510-3p w komórkach nabłonka płaskiego.
2. Nie zaobserwowano związku pomiędzy poziomem ekspresji hsa-miR-6510-3p i stadium zaawansowania choroby oraz lokalizacją guza nowotworowego.
3. Transfekcja cząsteczką hsa-miR-6510-3p pozwoliła na uzyskanie modelu badawczego linii komórkowych HNSCC wykazujących nadekspresję badanego mikroRNA.
4. Nadekspresja mikroRNA hsa-miR-6510-3p powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach HNSCC linii FaDu i H103.
5. Transfekcja cząsteczką miR-6510-3p związana jest z obniżeniem poziomu proliferacji oraz potencjału migracyjnego badanych komórek, co wpływa na hamowanie ich zdolności do samoodnowy i przerzutowania.
6. MikroRNA hsa-miR-6510-3p wpływa na utratę właściwości macierzystych komórek HNSCC odpowiedzialnych za występowanie przerzutów i nawrotów choroby nowotworowej.
7. Nadekspresja miR-6510-3p w komórkach linii FaDu i H103 powoduje indukcję procesów śmierci komórkowej.
8. MiR-6510-3p zwiększa odpowiedź komórek HNSCC na działanie promieniowania jonizującego.

## STRESZCZENIE

Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (HNSCC, ang. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) jest szóstym pod względem częstości występowania nowotworem złośliwym na świecie diagnozowanym u około 500 tysięcy pacjentów w skali roku. Leczenie HNSCC obejmuje złożone schematy składające się z metod chirurgicznych, radioterapii, chemioterapii oraz immunoterapii. Ze względu na swoją heterogenność, w zależności od lokalizacji anatomicznej, stopnia zaawansowania i etiopatogenezy, nowotwory te różnią się przebiegiem klinicznym i odpowiedzią na zastosowaną terapię. Konieczne stało się zatem lepsze zrozumienie ich biologii oraz identyfikacja nowych, specyficznych markerów molekularnych pozwalających na wczesne wykrywanie oraz monitorowanie przebiegu choroby i odpowiedzi na zastosowaną terapię. Obecnie, wśród markerów tych rosnące zainteresowanie zyskują cząsteczki mikroRNA – krótkich, niekodujących RNA posiadających zdolność do regulacji ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Uważa się, że niektóre z tych cząsteczek mogą funkcjonować jako supresory nowotworowe, podczas gdy inne spełniają rolę onkogenów. W wyniku wstępnych badań naszego zespołu wytypowano cząsteczkę mikroRNA hsa-miR-6510-3p, której poziom ekspresji jest niemal 6-krotnie obniżony w tkance nowotworowej pochodzącej od chorych z HNSCC. Udowodniono, że obniżona ekspresja hsa-miR-6510-3p koreluje ze wzrostem śmiertelności oraz stopniem zaawansowania guza. Przytoczone wyżej dane sugerują, że hsa-miR-6510-3p może odgrywać istotną rolę w patogenezie raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, funkcjonując jako supresor nowotworowy, jednak jego rola w biologii nowotworów nie została dotąd zbadana.

W niniejszej rozprawie podjęto próbę zbadania przydatności mikroRNA hsa-miR-6510-3p w diagnostyce, terapii oraz określeniu rokowania u chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi. W tym celu dokonano analizy poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej uzyskanej od chorych z histopatologicznie potwierdzonym HNSCC w różnych stadiach zaawansowania i lokalizacjach. Celem zbadania wpływu mikroRNA hsa-miR-6510-3p na procesy biologiczne zachodzące w komórkach raka płaskonabłonkowego głowy i szyi opracowano również model badawczy ustalonych linii HNSCC wykazujący podwyższony poziom badanej cząsteczki.

Wykazano, że poziom ekspresji hsa-miR-6510-3p jest niemal 10-krotnie obniżony w tkance nowotworowej pochodzącej od chorych z HNSCC w odniesieniu

do tkanki prawidłowej. Nie zaobserwowano jednak związku pomiędzy poziomem ekspresji hsa-miR-6510-3p i stadium zaawansowania choroby oraz lokalizacją guza nowotworowego. Udowodniono, że transfekcja komórek HNSCC cząsteczką hsa-miR-6510-3p powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M oraz związana jest z obniżeniem poziomu ich proliferacji oraz potencjału migracyjnego. MikroRNA hsa-miR-6510-3p wpływa na utratę właściwości macierzystych komórek HNSCC odpowiedzialnych za występowanie przerzutów i nawrotów choroby nowotworowej, a także powoduje indukcję procesów śmierci komórkowej. Cząsteczka wpływa również na zwiększenie odpowiedzi komórek HNSCC na działanie promieniowania jonizującego.

Wyniki uzyskane w pracy świadczą o tym, że mikroRNA hsa-miR-6510-3p bierze udział w regulacji procesów związanych z progresją choroby nowotworowej i może funkcjonować jako potencjalny supresor nowotworowy. Rezultaty przeprowadzonych eksperymentów posiadają potencjał translacyjny i umożliwiają zaplanowanie dalszych doświadczeń przedklinicznych mających na celu opracowanie nowych, molekularnych metod terapeutycznych służących personalizacji leczenia.



## **ABSTRACT**

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer worldwide, representing over 500 thousand of new cases every year. Currently, the treatment of choice for HNSCC is surgery, followed by postoperative radio-, chemo- and/or immunotherapy. Due to their heterogeneity, these neoplasms differ in their clinical course and response to the therapy, depending on their anatomical location, stage and etiopathogenesis. Therefore, it became necessary to better understand their biology and identify new, specific molecular markers allowing for early detection, monitoring of the disease course and response to the applied therapy. Currently, microRNA molecules are gaining increasing interest among these markers. MicroRNAs (miRNAs) are a class of short (18-25 bp), non-coding RNAs that function as post-transcriptional regulators of genes expression. They have been shown to be directly involved in oncogenesis, acting as tumor suppressors or oncogenes. In our preliminary studies we identified hsa-miR-6510-3p, which is nearly 6-fold downregulated in tumor cells compared to healthy tissue specimens derived from HNSCC patients. Moreover, we observed a significant association between hsa-miR-6510-5p downregulation, HNSCC patients' standardized mortality and cancer T stage. The data cited above suggest that hsa-miR-6510-3p may play an important role in the pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma, acting as a tumor suppressor, however its role in cancer biology has not yet been investigated.

This dissertation attempts to investigate the usefulness of microRNA hsa-miR-6510-3p in the diagnosis, therapy and prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinoma. For this purpose, the expression level of has-miR-6510-3p was analysed in tumour tissue obtained from patients with histopathologically diagnosed HNSCC at various stages and localisations. In order to investigate the influence of the microRNA hsa-miR-6510-3p on HNSCC cells biology, a research model of established HNSCC lines showing an increased level of the tested molecule was also developed.

It has been shown that has-miR-6510-3p is 10-fold downregulated in cancer tissue when compared to normal tissue obtained from HNSCC patients. However, no relationship was observed between the level of hsa-miR-6510-3p expression and the stage of disease and the tumour site.

It has been demonstrated that the transfection of HNSCC cells with the hsa-miR-6510-3p causes the cell cycle arrest in G2/M phase and is associated with a decrease of cell proliferation and migration of cancer cells. It has been also observed that transfection with has-miR-6510-3p induces cell death and causes a loss of the stemness properties responsible for the occurrence of metastases and relapses of the disease. The miR-6510-3p molecule also increases the response of HNSCC cells to the ionizing radiation.

The results obtained in the study show that the microRNA hsa-miR-6510-3p is involved in the regulation of processes related to the progression of neoplastic disease and may function as a potential tumour suppressor. The results of the conducted experiments have a translational potential and enable the planning of further preclinical experiments aimed at developing new molecular therapeutic methods for personalized treatment.

## PIŚMIENICTWO

Ahn, S. H., J. Y. Choi, D. W. Kim, D. Y. Lee, E. H. Jeon, W. J. Jeong and J. H. Paik (2015). "Targeting HIF1alpha peri-operatively increased post-surgery survival in a tongue cancer animal model." (1534-4681 (Electronic)).

Ahn, S. M., J. Y. K. Chan, Z. Zhang, H. Wang, Z. Khan, J. A. Bishop, W. Westra, W. M. Koch and J. A. Califano (2014). "Saliva and plasma quantitative polymerase chain reaction-based detection and surveillance of human papillomavirus-related head and neck cancer." JAMA otolaryngology-- head & neck surgery **140**(9): 846-854.

Ameres, S. L., M. D. Horwich, J.-H. Hung, J. Xu, M. Ghildiyal, Z. Weng and P. D. Zamore (2010). "Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs." Science (New York, N.Y.) **328**(5985): 1534-1539.

Arantes, L. M. R. B., A. C. Laus, M. E. Melendez, A. C. de Carvalho, B. P. Sorroche, P. R. M. De Marchi, A. F. Evangelista, C. Scapulatempo-Neto, L. de Souza Viana and A. L. Carvalho (2017). "MiR-21 as prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma patients undergoing an organ preservation protocol." Oncotarget **8**(6): 9911-9921.

Ashworth, T. (1869). "A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death." Medical Journal of Australia **14**: 146.

Avissar, M., M. D. McClean, K. T. Kelsey and C. J. Marsit (2009). "MicroRNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival." Carcinogenesis **30**(12): 2059-2063.

Ayaz, L., A. Gorur, H. Y. Yaroglu, C. Ozcan and L. Tamer (2013). "Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma." J Cancer Res Clin Oncol **139**(9): 1499-1506.

Bellairs, J. A., R. Hasina and N. Agrawal (2017). "Tumor DNA: an emerging biomarker in head and neck cancer." Cancer Metastasis Rev **36**(3): 515-523.

Bellmunt, À. M., L. López-Puerto, J. Lorente and D. Closa (2019). "Involvement of extracellular vesicles in the macrophage-tumor cell communication in head and neck squamous cell carcinoma." PloS one **14**(11): e0224710-e0224710.

Borchert, G. M., W. Lanier and B. L. Davidson (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." (1545-9993 (Print)).

Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." (1542-4863 (Electronic)).

Brennan, K., K. Martin, S. P. FitzGerald, J. O'Sullivan, Y. Wu, A. Blanco, C. Richardson and M. M. Mc Gee (2020). "A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum." Scientific reports **10**(1): 1039-1039.

- Brinton, L. T., H. S. Sloane, M. Kester and K. A. Kelly (2015). "Formation and role of exosomes in cancer." Cellular and molecular life sciences : CMLS **72**(4): 659-671.
- Buglione, M., S. Grisanti, C. Almici, M. Mangoni, C. Polli, F. Consoli, R. Verardi, L. Costa, F. Paiar, N. Pasinetti, A. Bolzoni, M. Marini, E. Simoncini, P. Nicolai, G. Biti and S. M. Magrini (2012). "Circulating tumour cells in locally advanced head and neck cancer: preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival." European journal of cancer (Oxford, England : 1990) **48**(16): 3019-3026.
- Canning, M., G. Guo, M. Yu, C. Myint, M. W. Groves, J. K. Byrd and Y. Cui (2019). "Heterogeneity of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Immune Landscape and Its Impact on Immunotherapy." Front Cell Dev Biol **7**: 52.
- Cao, P., L. Zhou, J. Zhang, F. Zheng, H. Wang, D. Ma and J. Tian (2013). "Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma." Head Neck **35**(5): 720-728.
- Chang, C. C., Y. J. Yang, Y. J. Li, S. T. Chen, B. R. Lin, T. S. Wu, S. K. Lin, M. Y. Kuo and C. T. Tan (2013). "MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma." Oral Oncol **49**(9): 923-931.
- Chen, X., H. Liang, J. Zhang, K. Zen and C. Y. Zhang (2012). "Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication." Trends Cell Biol **22**(3): 125-132.
- Chen, Z., Y. Han, C. Song, H. Wei, Y. Chen, K. Huang, S. Li, D. Ma, S. Wang, J. Wang and Q. Lu (2017). "Systematic review and meta-analysis of the prognostic significance of microRNAs in cervical cancer." Oncotarget **9**(24): 17141-17148.
- Chendrimada, T. P., K. J. Finn, X. Ji, D. Baillat, R. I. Gregory, S. A. Liebhaber, A. E. Pasquinelli and R. Shiekhattar (2007). "MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6." (1476-4687 (Electronic)).
- Corrado, C., S. Raimondo, A. Chiesi, F. Ciccia, G. De Leo and R. Alessandro (2013). "Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications." International journal of molecular sciences **14**(3): 5338-5366.
- Cortez, M. A., C. Bueso-Ramos, J. Ferdin, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood and G. A. Calin (2011). "MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers." Nature reviews. Clinical oncology **8**(8): 467-477.
- Cui, X., Y. Liu, S. Wang, N. Zhao, J. Qin, Y. Li, C. Fan, Z. Shan and W. Teng (2019). "Circulating Exosomes Activate Dendritic Cells and Induce Unbalanced CD4+ T Cell Differentiation in Hashimoto Thyroiditis." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **104**(10): 4607-4618.
- Denechaud, P. D., L. Fajas and A. Giralt (2017). "E2F1, a Novel Regulator of Metabolism." Front Endocrinol (Lausanne) **8**: 311.
- Dong, Y., A. M. Skelley, K. D. Merdek, K. M. Sprott, C. Jiang, W. E. Pierceall, J. Lin, M. Stocum, W. P. Carney and D. A. Smirnov (2013). "Microfluidics and Circulating Tumor Cells." The Journal of Molecular Diagnostics **15**(2): 149-157.

- Esposito, A., C. Criscitiello, M. Locatelli, M. Milano and G. Curigliano (2016). "Liquid biopsies for solid tumors: Understanding tumor heterogeneity and real time monitoring of early resistance to targeted therapies." *Pharmacology & therapeutics* **157**: 120-124.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-811.
- Gai, C., F. Camussi, R. Broccoletti, A. Gambino, M. Cabras, L. Molinaro, S. Carossa, G. Camussi and P. G. Arduino (2018). "Salivary extracellular vesicle-associated miRNAs as potential biomarkers in oral squamous cell carcinoma." *BMC cancer* **18**(1): 439-439.
- Gao, W., C. Zhang, W. Li, H. Li, J. Sang, Q. Zhao, Y. Bo, H. Luo, X. Zheng, Y. Lu, Y. Shi, D. Yang, R. Zhang, Z. Li, J. Cui, Y. Zhang, M. Niu, J. Li, Z. Wu, H. Guo, C. Xiang, J. Wang, J. Hou, L. Zhang, R. F. Thorne, Y. Cui, Y. Wu, S. Wen and B. Wang (2019). "Promoter Methylation-Regulated miR-145-5p Inhibits Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Progression by Targeting FSCN1." *Mol Ther* **27**(2): 365-379.
- García-Olmo, D., J. Ontañón, E. Martínez and M. Vallejo (1999). "Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis." *Histology and histopathology* **14**(4): 1159-1164.
- García-Olmo, D. C., C. Domínguez, M. García-Arranz, P. Anker, M. Stroun, J. M. García-Verdugo and D. García-Olmo (2010). "Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells." *Cancer research* **70**(2): 560-567.
- Gombos, K., R. Horvath, E. Szele, K. Juhasz, K. Gocze, K. Somlai, G. Pajkos, I. Ember and L. Olasz (2013). "miRNA expression profiles of oral squamous cell carcinomas." *Anticancer Res* **33**(4): 1511-1517.
- González-Arriagada, W. A., P. Olivero, B. Rodríguez, C. Lozano-Burgos, C. E. de Oliveira and R. D. Coletta (2018). "Clinicopathological significance of miR-26, miR-107, miR-125b, and miR-203 in head and neck carcinomas." *Oral Dis* **24**(6): 930-939.
- Gregory, R. I. and R. Shiekhattar (2005). "MicroRNA biogenesis and cancer." (0008-5472 (Print)).
- Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch and R. Shiekhattar (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." (1476-4687 (Electronic)).
- Grisanti, S., C. Almici, F. Consoli, M. Buglione, R. Verardi, A. Bolzoni-Villaret, A. Bianchetti, C. Ciccamese, M. Mangoni, L. Ferrari, G. Biti, M. Marini, V. D. Ferrari, P. Nicolai, S. M. Magrini and A. Berruti (2014). "Circulating Tumor Cells in Patients with Recurrent or Metastatic Head and Neck Carcinoma: Prognostic and Predictive Significance." *PLOS ONE* **9**(8): e103918.
- Gröbe, A., M. Blessmann, H. Hanken, R. E. Friedrich, G. Schön, J. Wikner, K. E. Effenberger, L. Kluwe, M. Heiland, K. Pantel and S. Riethdorf (2014). "Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients

with squamous cell carcinoma of the oral cavity." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **20**(2): 425-433.

Guney, K., B. Yoldas, G. Ozbilim, A. T. Derin, S. Sarihan and E. Balkan (2007). "Detection of micrometastatic tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. A possible predictor of recurrences?" Saudi Med J **28**(2): 216-220.

Gurunathan, S., M.-H. Kang, M. Jeyaraj, M. Qasim and J.-H. Kim (2019). "Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes." Cells **8**(4): 307.

Hamana, K., K. Uzawa, K. Ogawara, M. Shiiba, H. Bukawa, H. Yokoe and H. Tanzawa (2005). "Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma." British journal of cancer **92**(12): 2181-2184.

Hammerman, P. S., D. N. Hayes and J. R. Grandis (2015). "Therapeutic insights from genomic studies of head and neck squamous cell carcinomas." Cancer Discov **5**(3): 239-244.

Hanna, G. J., P. Lizotte, M. Cavanaugh, F. C. Kuo, P. Shivdasani, A. Frieden, N. G. Chau, J. D. Schoenfeld, J. H. Lorch, R. Uppaluri, L. E. MacConaill and R. I. Haddad (2018). "Frameshift events predict anti-PD-1/L1 response in head and neck cancer." JCI Insight **3**(4).

Harris, T., L. Jimenez, N. Kawachi, J.-B. Fan, J. Chen, T. Belbin, A. Ramnauth, O. Loudig, C. E. Keller, R. Smith, M. B. Prystowsky, N. F. Schlecht, J. E. Segall and G. Childs (2012). "Low-level expression of miR-375 correlates with poor outcome and metastasis while altering the invasive properties of head and neck squamous cell carcinomas." The American journal of pathology **180**(3): 917-928.

Hayes, D. N., C. Van Waes and T. Y. Seiwert (2015). "Genetic Landscape of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer and Comparison to Tobacco-Related Tumors." J Clin Oncol **33**(29): 3227-3234.

He, F. Y., H. J. Liu, Q. Guo and J. L. Sheng (2017). "Reduced miR-300 expression predicts poor prognosis in patients with laryngeal squamous cell carcinoma." Eur Rev Med Pharmacol Sci **21**(4): 760-764.

Hersi, H. M., N. Raulf, J. Gaken, N. Folarin and M. Tavassoli (2018). "MicroRNA-9 inhibits growth and invasion of head and neck cancer cells and is a predictive biomarker of response to plerixafor, an inhibitor of its target CXCR4." Mol Oncol **12**(12): 2023-2041.

Hess, A. K., A. Muer, F. D. Mairinger, W. Weichert, A. Stenzinger, M. Hummel, V. Budach and I. Tinhofer (2017). "MiR-200b and miR-155 as predictive biomarkers for the efficacy of chemoradiation in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma." Eur J Cancer **77**: 3-12.

Hood, J. L., R. S. San and S. A. Wickline (2011). "Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis." Cancer research **71**(11): 3792-3801.

Hristozova, T., R. Kanschak, C. Stromberger, A. Fusi, Z. Liu, W. Weichert, A. Stenzinger, V. Budach, U. Keilholz and I. Tinhofer (2011). "The presence of circulating tumor cells (CTCs) correlates with lymph node metastasis in nonresectable squamous cell carcinoma of the head

and neck region (SCCHN)." Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology **22**(8): 1878-1885.

Huang, Q., J. Yang, J. Zheng, C. Hsueh, Y. Guo and L. Zhou (2018). "Characterization of selective exosomal microRNA expression profile derived from laryngeal squamous cell carcinoma detected by next generation sequencing." Oncology reports **40**(5): 2584-2594.

Hudcova, K., M. Raudenska, J. Gumulec, H. Binkova, Z. Horakova, R. Kostrica, P. Babula, V. Adam and M. Masarik (2016). "Expression profiles of miR-29c, miR-200b and miR-375 in tumour and tumour-adjacent tissues of head and neck cancers." Tumour Biol **37**(9): 12627-12633.

Hui, A. B., M. Lenarduzzi, T. Krushel, L. Waldron, M. Pintilie, W. Shi, B. Perez-Ordenez, I. Jurisica, B. O'Sullivan, J. Waldron, P. Gullane, B. Cummings and F. F. Liu (2010). "Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas." Clin Cancer Res **16**(4): 1129-1139.

Inhestern, J., K. Oertel, V. Stemmann, H. Schmalenberg, A. Dietz, N. Rotter, J. Veit, M. Görner, H. Sudhoff, C. Junghanß, C. Wittekindt, K. Pachmann and O. Guntinas-Lichius (2015). "Prognostic Role of Circulating Tumor Cells during Induction Chemotherapy Followed by Curative Surgery Combined with Postoperative Radiotherapy in Patients with Locally Advanced Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Cancer." PloS one **10**(7): e0132901-e0132901.

Isik, M., H. C. Korswagen and E. Berezikov (2010). "Expression patterns of intronic microRNAs in *Caenorhabditis elegans*." Silence **1**(1): 5-5.

Islam, M., J. Datta, J. C. Lang and T. N. Teknos (2014). "Down regulation of RhoC by microRNA-138 results in de-activation of FAK, Src and Erk1/2 signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma." Oral Oncol **50**(5): 448-456.

Jahr, S., H. Hentze, S. Englisch, D. Hardt, F. O. Fackelmayer, R. D. Hesch and R. Knippers (2001). "DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells." Cancer research **61**(4): 1659-1665.

Jamali, Z., N. Asl Aminabadi, R. Attaran, F. Pournagiazar, S. Ghertasi Oskouei and F. Ahmadpour (2015). "MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis." Oral Oncol **51**(4): 321-331.

Jatana, K. R., P. Balasubramanian, J. C. Lang, L. Yang, C. A. Jatana, E. White, A. Agrawal, E. Ozer, D. E. Schuller, T. N. Teknos and J. J. Chalmers (2010). "Significance of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: initial results." Archives of otolaryngology--head & neck surgery **136**(12): 1274-1279.

Jiang, C., H. Wang, L. Zhou, T. Jiang, Y. Xu and L. Xia (2017). "MicroRNA-212 inhibits the metastasis of nasopharyngeal carcinoma by targeting SOX4." Oncol Rep **38**(1): 82-88.

Jo, M. H., S. Shin, S. R. Jung, E. Kim, J. J. Song and S. Hohng (2015). "Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs." Mol Cell **59**(1): 117-124.

- Johanson, T. M., A. M. Lew and M. M. W. Chong (2013). "MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Droscha and Dicer." Open biology **3**(10): 130144-130144.
- Jonas, S. and E. Izaurralde (2015). "Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing." Nat Rev Genet **16**(7): 421-433.
- Jung, H. M., B. L. Phillips, R. S. Patel, D. M. Cohen, A. Jakymiw, W. W. Kong, J. Q. Cheng and E. K. L. Chan (2012). "Keratinization-associated miR-7 and miR-21 regulate tumor suppressor reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) in oral cancer." The Journal of biological chemistry **287**(35): 29261-29272.
- Kang, M., J. Xiao, J. Wang, P. Zhou, T. Wei, T. Zhao and R. Wang (2016). "MiR-24 enhances radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma by targeting SP1." Cancer Med **5**(6): 1163-1173.
- Kannan, A., K. L. Hertweck, J. V. Philley, R. B. Wells and S. Dasgupta (2017). "Genetic Mutation and Exosome Signature of Human Papilloma Virus Associated Oropharyngeal Cancer." Scientific reports **7**: 46102-46102.
- Kawada, T., H. Takahashi, K. Sakakura, S. Ida, I. Mito, M. Toyoda and K. Chikamatsu (2017). "Circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma: Feasibility of detection and quantitation." Head & neck **39**(11): 2180-2186.
- Keck, M. K., Z. Zuo, A. Khattri, T. P. Stricker, C. D. Brown, M. Imanjili, D. Rieke, K. Endhardt, P. Fang, J. Brägelmann, R. DeBoer, M. El-Dinali, S. Aktolga, Z. Lei, P. Tan, S. G. Rozen, R. Salgia, R. R. Weichselbaum, M. W. Lingen, M. D. Story, K. K. Ang, E. E. Cohen, K. P. White, E. E. Vokes and T. Y. Seiwert (2015). "Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes." Clin Cancer Res **21**(4): 870-881.
- Kikkawa, N., T. Hanazawa, L. Fujimura, N. Nohata, H. Suzuki, H. Chazono, D. Sakurai, S. Horiguchi, Y. Okamoto and N. Seki (2010). "miR-489 is a tumour-suppressive miRNA target PTPN11 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC)." British journal of cancer **103**(6): 877-884.
- King, H. W., M. Z. Michael and J. M. Gleadle (2012). "Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells." BMC cancer **12**: 421-421.
- Koshizuka, K., T. Hanazawa, N. Kikkawa, T. Arai, A. Okato, A. Kurozumi, M. Kato, K. Katada, Y. Okamoto and N. Seki (2017). "Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer." Cancer Sci **108**(8): 1681-1692.
- Koshizuka, K., N. Kikkawa, T. Hanazawa, Y. Yamada, A. Okato, T. Arai, K. Katada, Y. Okamoto and N. Seki (2018). "Inhibition of integrin  $\beta$ 1-mediated oncogenic signalling by the antitumor microRNA-29 family in head and neck squamous cell carcinoma." Oncotarget **9**(3): 3663-3676.
- Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan and M. Stoffel (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." Nature **438**(7068): 685-689.



- Kulasinghe, A., C. Perry, L. Jovanovic, C. Nelson and C. Punyadeera (2015). "Circulating tumour cells in metastatic head and neck cancers." Int J Cancer **136**(11): 2515-2523.
- Kumar, B., A. Yadav, J. Lang, T. N. Teknos and P. Kumar (2012). "Dysregulation of microRNA-34a expression in head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor growth and tumor angiogenesis." PLoS One **7**(5): e37601.
- Kumarasamy, C., M. R. Madhav, S. Sabarimurugan, S. Krishnan, S. Baxi, A. Gupta, K. M. Gothandam and R. Jayaraj (2019). "Prognostic Value of miRNAs in Head and Neck Cancers: A Comprehensive Systematic and Meta-Analysis." Cells **8**(8): 772.
- Lamichhane, S. R., T. Thachil, H. Gee and N. Milic (2019). "Circulating MicroRNAs as Prognostic Molecular Biomarkers in Human Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis." Disease markers **2019**: 8632018-8632018.
- Lamperska, K. M., T. Kolenda, A. Teresiak, A. Kowalik, M. Kruszyna-Mochalska, W. Jackowiak, R. Bliźniak, W. Przybyła, M. Kapałczyńska and P. Kozłowski (2017). "Different levels of let-7d expression modulate response of FaDu cells to irradiation and chemotherapeutics." PLoS One **12**(6): e0180265.
- Lee, Y., K. Jeon, J.-T. Lee, S. Kim and V. N. Kim (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." The EMBO journal **21**(17): 4663-4670.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." The EMBO journal **23**(20): 4051-4060.
- Leemans, C. R., P. J. F. Snijders and R. H. Brakenhoff (2018). "The molecular landscape of head and neck cancer." Nat Rev Cancer **18**(5): 269-282.
- Leon, S. A., B. Shapiro, D. M. Sklaroff and M. J. Yaros (1977). "Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy." Cancer research **37**(3): 646-650.
- Li, G., Y. Wang, Y. Liu, Z. Su, C. Liu, S. Ren, T. Deng, D. Huang, Y. Tian and Y. Qiu (2014). "miR-185-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radioresistance by targeting WNT2B in vitro." Cancer Sci **105**(12): 1560-1568.
- Li, J., H. Huang, L. Sun, M. Yang, C. Pan, W. Chen, D. Wu, Z. Lin, C. Zeng, Y. Yao, P. Zhang and E. Song (2009). "MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor." Clin Cancer Res **15**(12): 3998-4008.
- Li, J., H. Lei, Y. Xu and Z. Z. Tao (2015). "miR-512-5p suppresses tumor growth by targeting hTERT in telomerase positive head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo." PLoS One **10**(8): e0135265.
- Li, L., C. Li, S. Wang, Z. Wang, J. Jiang, W. Wang, X. Li, J. Chen, K. Liu, C. Li and G. Zhu (2016). "Exosomes Derived from Hypoxic Oral Squamous Cell Carcinoma Cells Deliver miR-21 to Normoxic Cells to Elicit a Prometastatic Phenotype." Cancer research **76**(7): 1770-1780.
- Li, P., M. Kaslan, S. H. Lee, J. Yao and Z. Gao (2017). "Progress in Exosome Isolation Techniques." Theranostics **7**(3): 789-804.

- Li, S. C., P. Tang and W. C. Lin (2007). "Intronic microRNA: discovery and biological implications." (1044-5498 (Print)).
- Li, T., Y. Qin, Z. Zhen, H. Shen, T. Cong, E. Schiferle and S. Xiao (2019). "Long non-coding RNA HOTAIR/microRNA-206 sponge regulates STC2 and further influences cell biological functions in head and neck squamous cell carcinoma." Cell Prolif **52**(5): e12651.
- Liu, C., S. Yu, K. Zinn, J. Wang, L. Zhang, Y. Jia, J. C. Kappes, S. Barnes, R. P. Kimberly, W. E. Grizzle and H.-G. Zhang (2006). "Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **176**(3): 1375-1385.
- Liu, N., N. Jiang, R. Guo, W. Jiang, Q.-M. He, Y.-F. Xu, Y.-Q. Li, L.-L. Tang, Y.-P. Mao, Y. Sun and J. Ma (2013). "MiR-451 inhibits cell growth and invasion by targeting MIF and is associated with survival in nasopharyngeal carcinoma." Molecular Cancer **12**(1): 123.
- Liu, Y., Y. Zhang, Q. Li, J. Li, X. Ma, J. Xing, S. Rong, Z. Wu, Y. Tian, J. Li and L. Jia (2017). "MiRNAs Predict the Prognosis of Patients with Triple Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis." PloS one **12**(1): e0170088-e0170088.
- Liu, Z., S. Wu, L. Wang, S. Kang, B. Zhao, F. He, X. Liu, Y. Zeng and J. Liu (2019). "Prognostic Value of MicroRNA-497 in Various Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis." Disease markers **2019**: 2491291-2491291.
- Lu, W. C., C. J. Liu, H. F. Tu, Y. T. Chung, C. C. Yang, S. Y. Kao, K. W. Chang and S. C. Lin (2016). "miR-31 targets ARID1A and enhances the oncogenicity and stemness of head and neck squamous cell carcinoma." Oncotarget **7**(35): 57254-57267.
- Lu, Y. C., A. J. Cheng, L. Y. Lee, G. R. You, Y. L. Li, H. Y. Chen and J. T. Chang (2017). "MiR-520b as a novel molecular target for suppressing stemness phenotype of head-neck cancer by inhibiting CD44." Sci Rep **7**(1): 2042.
- Lubov, J., M. Maschietto, I. Ibrahim, A. Mlynarek, M. Hier, L. P. Kowalski, M. A. Alaoui-Jamali and S. D. da Silva (2017). "Meta-analysis of microRNAs expression in head and neck cancer: uncovering association with outcome and mechanisms." Oncotarget **8**(33): 55511-55524.
- Maiti, G. P., P. Mondal, N. Mukherjee, A. Ghosh, S. Ghosh, S. Dey, J. Chakrabarty, A. Roy, J. Biswas, S. Roychoudhury and C. K. Panda (2013). "Overexpression of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma is associated with inactivation of SH3GL2 and CDC25A genes." PloS one **8**(5): e63440-e63440.
- Malapelle, U., P. Pisapia, D. Rocco, R. Smeraglio, M. di Spirito, C. Bellevicine and G. Troncone (2016). "Next generation sequencing techniques in liquid biopsy: focus on non-small cell lung cancer patients." Translational lung cancer research **5**(5): 505-510.
- Mandel, P. and P. Metais (1948). "The nucleic acids of blood plasma in humans." Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales **142**(3-4): 241-243.

Martinez-Useros, J. and J. Garcia-Foncillas (2015). "The challenge of blocking a wider family members of EGFR against head and neck squamous cell carcinomas." (1879-0593 (Electronic)).

Mazurek, A. M., T. Rutkowski, A. Fiszer-Kierzkowska, E. Małusecka and K. Składowski (2016). "Assessment of the total cfDNA and HPV16/18 detection in plasma samples of head and neck squamous cell carcinoma patients." Oral oncology **54**: 36-41.

McMullen, K. P., J. J. Chalmers, J. C. Lang, P. Kumar and K. R. Jatana (2016). "Circulating tumor cells in head and neck cancer: A review." World journal of otorhinolaryngology - head and neck surgery **2**(2): 109-116.

Michlewski, G. and J. F. Cáceres (2019). "Post-transcriptional control of miRNA biogenesis." RNA (New York, N.Y.) **25**(1): 1-16.

Momen-Heravi, F., L. Balaj, S. Alian, P.-Y. Mantel, A. E. Halleck, A. J. Trachtenberg, C. E. Soria, S. Oquin, C. M. Bonebreak, E. Saracoglu, J. Skog and W. P. Kuo (2013). "Current methods for the isolation of extracellular vesicles." Biological chemistry **394**(10): 1253-1262.

Mu, K., Z.-Z. Wu, J.-P. Yu, W. Guo, N. Wu, L.-J. Wei, H. Zhang, J. Zhao and J.-T. Liu (2017). "Meta-analysis of the association between three microRNA polymorphisms and breast cancer susceptibility." Oncotarget **8**(40): 68809-68824.

Nagy Á, Lániczky A, Menyhárt O, Gyórfy B. Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Sci Rep.* 2018 Jun 15;8(1):9227. doi: 10.1038/s41598-018-27521-y.

Nakanishi, K. (2016). "Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins?" Wiley interdisciplinary reviews. RNA **7**(5): 637-660.

Nicholson, A. W. (2014). "Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage." Wiley interdisciplinary reviews. RNA **5**(1): 31-48.

Nohata, N., T. Hanazawa, T. Kinoshita, A. Inamine, N. Kikkawa, T. Itesako, H. Yoshino, H. Enokida, M. Nakagawa, Y. Okamoto and N. Seki (2013). "Tumour-suppressive microRNA-874 contributes to cell proliferation through targeting of histone deacetylase 1 in head and neck squamous cell carcinoma." Br J Cancer **108**(8): 1648-1658.

Nonaka, T. and D. T. W. Wong (2018). "Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer: Promises and Challenges." Journal of dental research **97**(6): 701-708.

Nunez Lopez, Y. O., B. Victoria, P. Golusinski, W. Golusinski and M. M. Masternak (2018). "Characteristic miRNA expression signature and random forest survival analysis identify potential cancer-driving miRNAs in a broad range of head and neck squamous cell carcinoma subtypes." Rep Pract Oncol Radiother **23**(1): 6-20.

O'Brien, J., H. Hayder, Y. Zayed and C. Peng (2018). "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation." Frontiers in endocrinology **9**: 402-402.

- Ouellet, D. L., M. P. Perron, L.-A. Gobeil, P. Plante and P. Provost (2006). "MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all." Journal of biomedicine & biotechnology **2006**(4): 69616-69616.
- Partridge, M., R. Brakenhoff, E. Phillips, K. Ali, R. Francis, R. Hooper, K. Lavery, A. Brown and J. Langdon (2003). "Detection of rare disseminated tumor cells identifies head and neck cancer patients at risk of treatment failure." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **9**(14): 5287-5294.
- Pashaei, E., E. Pashaei, M. Ahmady, M. Ozen and N. Aydin (2017). "Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy." PloS one **12**(6): e0179543-e0179543.
- Payne, K., J. Brooks, R. Spruce, N. Batis, G. Taylor, P. Nankivell and H. Mehanna (2019). "Circulating Tumour Cell Biomarkers in Head and Neck Cancer: Current Progress and Future Prospects." Cancers **11**(8): 1115.
- Peng, M., C. Chen, A. Hulbert, M. V. Brock and F. Yu (2017). "Non-blood circulating tumor DNA detection in cancer." Oncotarget **8**(40): 69162-69173.
- Peng, Z., F. Duan, J. Yin, Y. Feng, Z. Yang and J. Shang (2019). "Prognostic values of microRNA-130 family expression in patients with cancer: a meta-analysis and database test." Journal of Translational Medicine **17**(1): 347.
- Puram, S. V. and J. W. Rocco (2015). "Molecular Aspects of Head and Neck Cancer Therapy." Hematology/oncology clinics of North America **29**(6): 971-992.
- Qin, X., H. Guo, X. Wang, X. Zhu, M. Yan, X. Wang, Q. Xu, J. Shi, E. Lu, W. Chen and J. Zhang (2019). "Exosomal miR-196a derived from cancer-associated fibroblasts confers cisplatin resistance in head and neck cancer through targeting CDKN1B and ING5." Genome biology **20**(1): 12-12.
- Ramdas, L., U. Giri, C. L. Ashorn, K. R. Coombes, A. El-Naggar, K. K. Ang and M. D. Story (2009). "miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue." Head & neck **31**(5): 642-654.
- Re, M., A. Çeka, C. Rubini, L. Ferrante, A. Zizzi, F. M. Gioacchini, M. Tulli, L. Spazzafumo, S. Sellari-Franceschini, A. D. Procopio and F. Olivieri (2015). "MicroRNA-34c-5p is related to recurrence in laryngeal squamous cell carcinoma." Laryngoscope **125**(9): E306-312.
- Ribeiro, I. P., J. B. de Melo and I. M. Carreira (2019). "Head and neck cancer: searching for genomic and epigenetic biomarkers in body fluids - the state of art." Mol Cytogenet **12**: 33.
- Romeo, P., C. Colombo, R. Granata, G. Calareso, A. V. Gualeni, M. Dugo, L. De Cecco, M. G. Rizzetti, A. Zanframundo, A. Aiello, M. L. Carcangiu, A. Gloghini, S. Ferrero, L. Licitra, A. Greco, L. Fugazzola, L. D. Locati and M. G. Borrello (2018). "Circulating miR-375 as a novel prognostic marker for metastatic medullary thyroid cancer patients." Endocr Relat Cancer **25**(3): 217-231.

- Sabarimurugan, S., C. Kumarasamy, S. Baxi, A. Devi and R. Jayaraj (2019). "Systematic review and meta-analysis of prognostic microRNA biomarkers for survival outcome in nasopharyngeal carcinoma." PloS one **14**(2): e0209760-e0209760.
- Sanderson, R. J. and J. A. D. Ironside (2002). "Squamous cell carcinomas of the head and neck." BMJ (Clinical research ed.) **325**(7368): 822-827.
- Sannigrahi, M. K., R. Sharma, V. Singh, N. K. Panda, V. Rattan and M. Khullar (2017). "Role of Host miRNA Hsa-miR-139-3p in HPV-16-Induced Carcinomas." Clin Cancer Res **23**(14): 3884-3895.
- Schneider, A. and M. Simons (2013). "Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders." Cell and tissue research **352**(1): 33-47.
- Schneider, A., B. Victoria, Y. N. Lopez, W. Suchorska, W. Barczak, A. Sobecka, W. Golusinski, M. M. Masternak and P. Golusinski (2018). "Tissue and serum microRNA profile of oral squamous cell carcinoma patients." Sci Rep **8**(1): 675.
- Seiwert, T. Y., Z. Zuo, M. K. Keck, A. Khattri, C. S. Pedamallu, T. Stricker, C. Brown, T. J. Pugh, P. Stojanov, J. Cho, M. S. Lawrence, G. Getz, J. Brägelmann, R. DeBoer, R. R. Weichselbaum, A. Langerman, L. Portugal, E. Blair, K. Stenson, M. W. Lingen, E. E. Cohen, E. E. Vokes, K. P. White and P. S. Hammerman (2015). "Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas." Clin Cancer Res **21**(3): 632-641.
- Sethi, N., A. Wright, H. Wood and P. Rabbitts (2014). "MicroRNAs and head and neck cancer: reviewing the first decade of research." (1879-0852 (Electronic)).
- Severino, P., H. Brüggemann, F. M. Andreghetto, C. Camps, F. Klingbeil Mde, W. O. de Pereira, R. M. Soares, R. Moyses, V. Wunsch-Filho, M. B. Mathor, F. D. Nunes, J. Ragoussis and E. H. Tajara (2013). "MicroRNA expression profile in head and neck cancer: HOX-cluster embedded microRNA-196a and microRNA-10b dysregulation implicated in cell proliferation." BMC Cancer **13**: 533.
- Sharma, S., B. M. Gillespie, V. Palanisamy and J. K. Gimzewski (2011). "Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human-saliva-derived exosomes." Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids **27**(23): 14394-14400.
- Shi, L. J., C. Y. Zhang, Z. T. Zhou, J. Y. Ma, Y. Liu, Z. X. Bao and W. W. Jiang (2015). "MicroRNA-155 in oral squamous cell carcinoma: Overexpression, localization, and prognostic potential." Head Neck **37**(7): 970-976.
- Shomron, N. and C. Levy (2009). "MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing crosstalk." Journal of biomedicine & biotechnology **2009**: 594678-594678.
- Shuang, Y., C. Li, X. Zhou, Y. Huang and L. Zhang (2017). "MicroRNA-195 inhibits growth and invasion of laryngeal carcinoma cells by directly targeting DCUN1D1." Oncol Rep **38**(4): 2155-2165.

Song, C.-J., H. Chen, L.-Z. Chen, G.-M. Ru, J.-J. Guo and Q.-N. Ding (2018). "The potential of microRNAs as human prostate cancer biomarkers: A meta-analysis of related studies." Journal of cellular biochemistry **119**(3): 2763-2786.

Sorenson, G. D., D. M. Pribish, F. H. Valone, V. A. Memoli, D. J. Bzik and S. L. Yao (1994). "Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood." Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology **3**(1): 67-71.

Spector, M. E., J. L. Farlow, C. T. Haring, J. C. Brenner and A. C. Birkeland (2018). "The potential for liquid biopsies in head and neck cancer." Discov Med **25**(139): 251-257.

Stoorvogel, W., M. J. Kleijmeer, H. J. Geuze and G. Raposo (2002). "The biogenesis and functions of exosomes." Traffic (Copenhagen, Denmark) **3**(5): 321-330.

Stransky, N., A. M. Egloff, A. D. Tward, A. D. Kostic, K. Cibulskis, A. Sivachenko, G. V. Kryukov, M. S. Lawrence, C. Sougnez, A. McKenna, E. Shefler, A. H. Ramos, P. Stojanov, S. L. Carter, D. Voet, M. L. Cortés, D. Auclair, M. F. Berger, G. Saksena, C. Guiducci, R. C. Onofrio, M. Parkin, M. Romkes, J. L. Weissfeld, R. R. Seethala, L. Wang, C. Rangel-Escareño, J. C. Fernandez-Lopez, A. Hidalgo-Miranda, J. Melendez-Zajgla, W. Winckler, K. Ardlie, S. B. Gabriel, M. Meyerson, E. S. Lander, G. Getz, T. R. Golub, L. A. Garraway and J. R. Grandis (2011). "The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma." Science **333**(6046): 1157-1160.

Stroun, M., P. Anker, P. Maurice, J. Lyautey, C. Lederrey and M. Beljanski (1989). "Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients." Oncology **46**(5): 318-322.

Suh, Y., I. Amelio, T. Guerrero Urbano and M. Tavassoli (2014). "Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer." Cell death & disease **5**(1): e1018-e1018.

Theodoraki, M. N., T. K. Hoffmann, E. K. Jackson and T. L. Whiteside (2018). "Exosomes in HNSCC plasma as surrogate markers of tumour progression and immune competence." Clinical and experimental immunology **194**(1): 67-78.

Thierry, A. R., S. El Messaoudi, P. B. Gahan, P. Anker and M. Stroun (2016). "Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology." Cancer metastasis reviews **35**(3): 347-376.

Thomas, S. M. and J. R. Grandis (2009). "The current state of head and neck cancer gene therapy." Human gene therapy **20**(12): 1565-1575.

Tkach, M. and C. Théry (2016). "Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go." Cell **164**(6): 1226-1232.

Vahabi, M., C. Pulito, A. Sacconi, S. Donzelli, M. D'Andrea, V. Manciooco, R. Pellini, P. Paci, G. Sanguineti, L. Strigari, G. Spriano, P. Muti, P. P. Pandolfi, S. Strano, S. Safarian, F. Ganci and G. Blandino (2019). "miR-96-5p targets PTEN expression affecting radiochemosensitivity of HNSCC cells." J Exp Clin Cancer Res **38**(1): 141.

Victoria Martinez, B., J. M. Dhahbi, Y. O. Nunez Lopez, K. Lamperska, P. Golusinski, L. Luczewski, T. Kolenda, H. Atamna, S. R. Spindler, W. Golusinski and M. M. Masternak (2015). "Circulating small non-coding RNA signature in head and neck squamous cell carcinoma." Oncotarget **6**(22): 19246-19263.

Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, G. Hall Im Fau - Teng, S. I. S. Teng G Fau - Grewal, R. A. Grewal Si Fau - Martienssen and R. A. Martienssen (2002). "Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi." (1095-9203 (Electronic)).

Vosa, U., T. Vooder, R. Kolde, J. Vilo, A. Metspalu and T. Annilo (2013). "Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer." Int J Cancer **132**(12): 2884-2893.

Wang, H.-M., M.-H. Wu, P.-H. Chang, H.-C. Lin, C.-D. Liao, S.-M. Wu, T.-M. Hung, C.-Y. Lin, T.-C. Chang, Y. Tzu-Tsen and J. C.-H. Hsieh (2019). "The change in circulating tumor cells before and during concurrent chemoradiotherapy is associated with survival in patients with locally advanced head and neck cancer." Head & neck **41**(8): 2676-2687.

Wang, J., Y. Zhou, J. Lu, Y. Sun, H. Xiao, M. Liu and L. Tian (2014). "Combined detection of serum exosomal miR-21 and HOTAIR as diagnostic and prognostic biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma." Medical oncology (Northwood, London, England) **31**(9): 148-148.

Wang, Y., S. Springer, C. L. Mulvey, N. Silliman, J. Schaefer, M. Sausen, N. James, E. M. Rettig, T. Guo, C. R. Pickering, J. A. Bishop, C. H. Chung, J. A. Califano, D. W. Eisele, C. Fakhry, C. G. Gourin, P. K. Ha, H. Kang, A. Kiess, W. M. Koch, J. N. Myers, H. Quon, J. D. Richmon, D. Sidransky, R. P. Tufano, W. H. Westra, C. Bettegowda, L. A. Diaz, Jr., N. Papadopoulos, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and N. Agrawal (2015). "Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas." Science translational medicine **7**(293): 293ra104-293ra104.

Wang, Z. (2010). "MicroRNA: A matter of life or death." World journal of biological chemistry **1**(4): 41-54.

Webber, J., R. Steadman, M. D. Mason, Z. Tabi and A. Clayton (2010). "Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation." Cancer research **70**(23): 9621-9630.

Weng, J. H., C. C. Yu, Y. C. Lee, C. W. Lin, W. W. Chang and Y. L. Kuo (2016). "miR-494-3p Induces Cellular Senescence and Enhances Radiosensitivity in Human Oral Squamous Carcinoma Cells." Int J Mol Sci **17**(7).

Westra, W. H., J. M. Taube, M. L. Poeta, S. Begum, D. Sidransky and W. M. Koch (2008). "Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck." Clin Cancer Res **14**(2): 366-369.

Whiteside, T. L. (2016). "Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression." Advances in clinical chemistry **74**: 103-141.

- Xiao, W., Y. Zhong, L. Wu, D. Yang, S. Ye and M. Zhang (2019). "Prognostic value of microRNAs in lung cancer: A systematic review and meta-analysis." Molecular and clinical oncology **10**(1): 67-77.
- Xie, M., M. Li, A. Vilborg, N. Lee, M.-D. Shu, V. Yartseva, N. Šestan and J. A. Steitz (2013). "Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA." Cell **155**(7): 1568-1580.
- Yang, F. R., H. J. Li, T. T. Li, Y. F. Zhao, Z. K. Liu and X. R. Li (2019). "Prognostic Value of MicroRNA-15a in Human Cancers: A Meta-Analysis and Bioinformatics." BioMed research international **2019**: 2063823-2063823.
- Yuan, Z., C. Xiu, K. Song, R. Pei, S. Miao, X. Mao, J. Sun and S. Jia (2018). "Long non-coding RNA AFAP1-AS1/miR-320a/RBPJ axis regulates laryngeal carcinoma cell stemness and chemoresistance." J Cell Mol Med **22**(9): 4253-4262.
- Zeljic, K., I. Jovanovic, J. Jovanovic, Z. Magic, A. Stankovic and G. Supic (2018). "MicroRNA meta-signature of oral cancer: evidence from a meta-analysis." Upsala journal of medical sciences **123**(1): 43-49.
- Zhang, H., F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof and W. Filipowicz (2004). "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III." Cell **118**(1): 57-68.
- Zhang, M., L. Piao, J. Datta, J. C. Lang, X. Xie, T. N. Teknos, A. K. Mapp and Q. Pan (2015). "miR-124 Regulates the Epithelial-Restricted with Serine Box/Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Axis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." Mol Cancer Ther **14**(10): 2313-2320.
- Zhang, S., G. Li, C. Liu, S. Lu, Q. Jing, X. Chen, H. Zheng, H. Ma, D. Zhang, S. Ren, Z. Shen, Y. Wang, Z. Lu, D. Huang, P. Tan, J. Chen, X. Zhang, Y. Qiu and Y. Liu (2020). "miR-30e-5p represses angiogenesis and metastasis by directly targeting AEG-1 in squamous cell carcinoma of the head and neck." Cancer Sci **111**(2): 356-368.
- Zhang, Y., J. Chen, Q. Xue, J. Wang, L. Zhao, K. Han, D. Zhang and L. Hou (2019). "Prognostic Significance of MicroRNAs in Glioma: A Systematic Review and Meta-Analysis." BioMed research international **2019**: 4015969-4015969.
- Zhang, Y., Y. Liu, H. Liu and W. H. Tang (2019). "Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential." Cell & bioscience **9**: 19-19.
- Zhao, Y., Z. Ling, Y. Hao, X. Pang, X. Han, J. A. Califano, L. Shan and X. Gu (2017). "MiR-124 acts as a tumor suppressor by inhibiting the expression of sphingosine kinase 1 and its downstream signaling in head and neck squamous cell carcinoma." Oncotarget **8**(15): 25005-25020.
- Zhou, W., M. Woodson, B. Neupane, F. Bai, M. B. Sherman, K. H. Choi, G. Neelakanta and H. Sultana (2018). "Exosomes serve as novel modes of tick-borne flavivirus transmission from arthropod to human cells and facilitates dissemination of viral RNA and proteins to the vertebrate neuronal cells." PLoS pathogens **14**(1): e1006764-e1006764.



Zlotogorski-Hurvitz, A., B. Z. Dekel, D. Malonek, R. Yahalom and M. Vered (2019). "FTIR-based spectrum of salivary exosomes coupled with computational-aided discriminating analysis in the diagnosis of oral cancer." Journal of cancer research and clinical oncology **145**(3): 685-694.

## WYKAZ RYCIN

Rycina 1.3.1. Struktura drugorzędowa mikro RNA hsa-miR-6510.....	32
Rycina 1.3.2. Lokalizacja chromosomowa regionu kodującego dla hsa-miR-6510.....	32
Rycina 3.1.1. Fotografia mikroskopowa komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi linii FaDu.....	34
Rycina 3.1.2. Fotografia mikroskopowa komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi linii H103.....	35
Rycina 4.1.1. Analiza poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej pochodzącej od chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi. ....	53
Rycina 4.1.2. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od lokalizacji anatomicznej guza.....	54
Rycina 4.1.3. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od stadium zaawansowania guza. ....	54
Rycina 4.1.4. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od stopnia złośliwości guza.....	54
Rycina 4.1.5. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od stopnia zaawansowania przerzutów do węzłów chłonnych .....	55
Rycina 4.1.6. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od płci. ....	55
Rycina 4.1.7. Analiza poziomu ekspresji hsa-miR-6510-3p w tkance nowotworowej chorych z HNSCC w zależności od wieku.. ....	55
Rycina 4.2.1. Analiza poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w komórkach linii FaDu transfekowanych miR-6510 .....	56
Rycina 4.2.2. Analiza poziomu ekspresji mikro RNA hsa-miR-6510-3p w komórkach linii H103 transfekowanych miR-6510.. ....	57

Rycina 4.3.1. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na morfologię komórek linii FaDu.....	58
Rycina 4.3.2. Ocena wpływu mikro RNA hsa-miR-6510-3p na morfologię komórek linii H103.....	58
Rycina 4.4.1. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego linii FaDu.....	59
Rycina 4.4.2. Analiza statystyczna wpływu hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego linii FaDu .....	60
Rycina 4.4.3. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego linii H103.....	61
Rycina 4.4.4. Analiza statystyczna wpływu hsa-miR-6510-3p na przebieg cyklu komórkowego linii H103 .....	61
Rycina 4.5.1. Analiza wpływu hsa-miR-6510-3p na proliferację komórkową.....	62
Rycina 4.6.1. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na zdolność do migracji komórek linii FaDu. Test gojenia się rany.....	63
Rycina 4.6.2. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na zdolność do migracji komórek linii FaDu.....	63
Rycina 4.6.3. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na zdolność do migracji komórek linii H103. Test gojenia się rany.....	64
Rycina 4.6.4. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na zdolność do migracji komórek linii H103.....	64
Rycina 4.7.1 Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na poziom ekspresji antygenu powierzchniowego CD133 w komórkach linii FaDu.....	65
Rycina 4.7.2. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na poziom ekspresji antygenu powierzchniowego CD133 w komórkach linii H103.....	65

Rycina 4.7.3. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na poziom ekspresji antygenu powierzchniowego CD44 w komórkach linii FaDu.....	66
Rycina 4.7.4. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na poziom ekspresji antygenu powierzchniowego CD44 w komórkach linii H103.....	66
Rycina 4.8.1. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na indukcję procesu apoptozy w komórkach linii FaDu.....	67
Rycina 4.8.2. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na indukcję procesu apoptozy w komórkach linii H103.....	68
Rycina 4.8.3. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na indukcję procesu apoptozy w komórkach linii FaDu.....	69
Rycina 4.8.4. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na indukcję procesu apoptozy w komórkach linii H103.....	70
Rycina 4.9.1. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na odpowiedź komórek linii FaDu na działanie promieniowania jonizującego .....	71
Rycina 4.9.2. Ocena wpływu hsa-miR-6510-3p na odpowiedź komórek linii H103 na działanie promieniowania jonizującego .....	71
Rycina 4.9.3. Analiza statystyczna odpowiedzi komórek linii FaDu i H103 na działanie promieniowania jonizującego .....	71
Rycina 4.10.1. Ocena odpowiedzi komórek linii FaDu i H103 na zastosowanie cytostatyków.....	72

## WYKAZ TABEL

Tabela 3.2.1. Charakterystyka chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi stanowiących grupę badawczą .....	36
Tabela 3.6.1. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji poliadenylacji mikro RNA.....	40
Tabela 3.6.2. Profil temperaturowy reakcji poliadenylacji mikro RNA. ....	40
Tabela 3.6.3. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji ligacji adapterów.....	41
Tabela 3.6.4. Profil temperaturowy reakcji ligacji adapterów. ....	41
Tabela 3.6.5. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji odwrotnej transkrypcji miRNA. ....	41
Tabela 3.6.6. Profil temperaturowy reakcji odwrotnej transkrypcji miRNA.....	42
Tabela 3.6.7. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji preamplifikacji cDNA. ....	42
Tabela 3.6.8. Profil temperaturowy reakcji preamplifikacji cDNA.....	43
Tabela 3.6.9. Wykaz starterów stosowanych w reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. ....	43
Tabela 3.6.10. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. ....	44
Tabela 3.6.11. Profil temperaturowy reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. ....	44
Tabela 3.8.1. Profil temperaturowy reakcji odwrotnej transkrypcji. ....	45
Tabela 3.8.2. Wykaz starterów i sond stosowanych w reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. ....	46
Tabela 3.8.3. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. ....	46
Tabela 3.8.4. Profil temperaturowy reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. ....	47

# Załącznik 1. Opinia Komisji Bioetycznej



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum  
ul. Bukowska 70  
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36  
www.bioetyka.ump.edu.pl

## Uchwała nr 412/18

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2017, poz. 125 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania Komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2016, poz. 2142 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespożywanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. I w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkwalifikacyjnych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

**Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 05 kwietnia 2018 r.**

**rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.**

**Kierownik projektu i główny badacz:**

**dr hab. n. med. Paweł Golusiński**

**Miejsce prowadzenia badań:**

**Katedra i Klinika Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

**Członkowie zespołu**

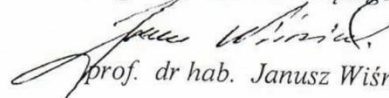
**badawczego: profesor nadzwyczajny, dr Michał M. Masternak,  
mgr Wojciech Barczak  
mgr inż. Agnieszka Sobecka**

**Temat badań:**

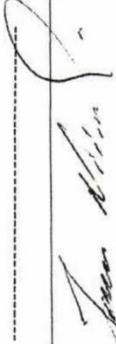











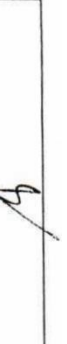

**„Identyfikacja profilu sncRNA w surowicy krwi obwodowej chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi”.**

**Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku**

Zastępca Przewodniczącego Komisji

  
prof. dr hab. Janusz Wiśniewski

Podpisy członków Komisji Bioetycznej podejmujących Uchwałę nr ..... z dnia 05.04.2018r.

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy	Podpis
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UMP, ZOZ MSWiA, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań.	
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, 61-614 Poznań.	
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań	
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Kancelaria Rady Prawnego, dr Krystyna Babiak, ul. Czartoria 1/2, 61-102 Poznań.	
5.	prof. dr hab. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
6.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
7.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
8.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów UMP, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.	
9.	prof. dr hab. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Zakład Zdrowia Publicznego UMP, ul. Dąbrowskiego 79, 60-529 Poznań.	
10.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
11.	prof. dr hab. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
12.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UMP, ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań.	
13.	prof. dr hab. Joanna Twarowska-Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
14.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, 61-111 Poznań.	
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Wyższa Szkoła Pedagogiki i Administracji im. Mieszka I w Poznaniu, ul. Bułgarska 55, 60-320 Poznań.	