

Accepted Manuscript (Uncorrected Proof)

Title: Association Between PIC3KA and CRNDE Gene Expression and HPV Involvement With Risk Factors and Clinical Characteristics of HNSCC Patients

Authors: Laleh Karimi Sani¹, Abbas Shakoory Garakani², Sayeh Jafari¹, Ebrahim Razmpa^{3*}

1. Department of Biology, Basic Science Faculty, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

2. Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Otolaryngology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

***Corresponding Author:** Ebrahim Razmpa, Email: ebrazmpa@gmail.com

To appear in: **Journal of Arak University of Medical Sciences**

Received date: 2021/06/07

Accepted date: 2021/11/13

First Online Published: 2022/03/13



This is a “Just Accepted” manuscript, which has been examined by the peer-review process and has been accepted for publication. A “Just Accepted” manuscript is published online shortly after its acceptance, which is prior to technical editing and formatting and author proofing. **Journal of Arak University of Medical Sciences** provides “Just Accepted” as an optional service which allows authors to make their results available to the research community as soon as possible after acceptance. After a manuscript has been technically edited and formatted, it will be removed from the “Just Accepted” Website and published as a published article. Please note that technical editing may introduce minor changes to the manuscript text and/or graphics which may affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Please cite this article as:

Karimi Sani L, Shakoory Garakani A, Jafari S, Razmpa E. [Association Between PIC3KA and CRNDE Gene Expression and HPV Involvement With Risk Factors and Clinical Characteristics of HNSCC Patients (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences. Forthcoming 2022. Doi: <http://dx.doi.org/10.32598/jams.24.6.6553.1>

Doi: <http://dx.doi.org/10.32598/jams.24.6.6553.1>



نسخه پذیرفته شده پیش از انتشار

عنوان: همراهی بین بیان ژن های PIC3KA و CRNDE و درگیری HPV عوامل خطر و مشخصات بالینی بیماران مبتلا به HNSCC

نویسندگان: لاله کریمی ثانی^۱، عباس شکوری فراهانی^۲، دکتر سایه جعفری مرنندی^۱، دکتر ابراهیم رزم پاشا^{۳*}

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران..

۲. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳. گروه گوش و حلق و بینی، دانشکده پزشکی، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران. -

- گروه گوش و حلق و بینی، دانشکده پزشکی، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

ایمیل: ebrazmpa@gmail.com

نشریه: مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

تاریخ دریافت: 1400/03/17

تاریخ پذیرش: 1400/08/22



این نسخه «پذیرفته‌شده پیش از انتشار» مقاله است که پس از طی فرایند داوری، برای چاپ، قابل پذیرش تشخیص داده شده است. این نسخه در مدت کوتاهی پس از اعلام پذیرش به صورت آنلاین و قبل از فرایند ویراستاری منتشر می‌شود. مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک گزینه «پذیرفته‌شده پیش از انتشار» را به عنوان خدمتی به نویسندگان ارائه می‌دهد تا نتایج آن‌ها در سریع‌ترین زمان ممکن پس از پذیرش برای جامعه علمی در دسترس باشد. پس از آنکه مقاله‌ای فرایند آماده سازی و انتشار نهایی را طی می‌کند، از نسخه «پذیرفته‌شده پیش از انتشار» خارج و در یک شماره مشخص در وبسایت نشریه منتشر می‌شود. شایان ذکر است صفحه آرایی و ویراستاری فنی باعث ایجاد تغییرات صوری در متن مقاله می‌شود که ممکن است بر محتوای آن تأثیر بگذارد و این امر از حیطه مسئولیت دفتر نشریه خارج است.

لطفا این گونه استناد شود:

Karimi Sani L, Shakoory Garakani A, Jafari S, Razmpa E. [Association Between PIC3KA and CRNDE Gene Expression and HPV Involvement With Risk Factors and Clinical Characteristics of HNSCC Patients (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences. Forthcoming 2022. Doi: <http://dx.doi.org/10.32598/jams.24.6.6553.1>

Doi: <http://dx.doi.org/10.32598/jams.24.6.6553.1>



Abstract:

Introduction: Head and Neck Squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth common cancer worldwide. An important feature of HNSCC is its poor prognosis. Factors such as smoking and alcohol consumption, HPV infection and genetic factors play a role in HNSCC pathogenesis. This study aimed to investigate the relationship between PIC3KA and CRNDE gene expression levels and HPV involvement with risk factors and clinical characteristics of patients.

Materials and Methods: In this case-control study, the expression of PIC3KA and CRNDE genes in the tumor tissues and adjacent non-cancerous tissues of 50 HNSCC patients were evaluated by Real-Time PCR. Also, HPV infection was evaluated by Reverse Line Blot method. Finally, the association of these two parameters with the demographic and clinical characteristics of patients was statistically evaluated.

Ethical Considerations: This study was registered with the Ethics Committee of Tehran University of Medical Sciences under code IR.TUMS.DENTISTRY.REC.1397.021.

Results: The results of the present study showed that the expression of CRNDE ($P = 0.0005$) and PIK3CA ($P = 0.0322$) genes in tumor tissue had a significant increase compared to adjacent non-cancerous tissue. Increased PIK3CA expression was significantly associated with smoking, location, stage, size, and grade of the tumor, whereas increased CRNDE expression was associated with alcohol consumption and lymph node involvement. It was also found that HPV infection was associated with larger tumor size and more advanced stage ($P = 0.02$).

Conclusions: Considering the association of PIK3CA expression with parameters such as stage, size and grade of the tumor, it can be concluded that the expression of these two genes is involved in the progression of HNSCC disease. In addition, according to the present results, HPV infection is also associated with disease progression.

Keywords: Head and Neck Squamous cell carcinoma, Gene expression, Prognosis, Human Papilloma Virus



چکیده:

مقدمه: سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن (HNSCC) ششمین سرطان شایع در دنیاست. یکی از ویژگی‌های مهم HNSCC پیش‌آگهی ضعیف آن است. HNSCC یک بیماری چند عاملی بوده و فاکتورهایی نظیر استعمال دخانیات و الکل، عفونت HPV و عوامل ژنتیکی در بیماریزایی آن نقش دارند. هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط میزان بیان ژن های PIC3KA و CRNDE و درگیری HPV با عوامل خطر و مشخصات بالینی بیماران است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی میزان بیان ژن های PIC3KA و CRNDE در 50 نمونه بافت توموری و بافت غیر توموری مجاور بیماران مبتلا به HNSCC به روش Real-Time PCR مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین این بیماران از لحاظ وجود آلودگی به HPV به روش Reverse Line Blot بررسی شدند و در نهایت همراهی این دو پارامتر با عوامل خطر و مشخصات بالینی بیماران ارزیابی شد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد اخلاق IR.TUMS.DENTISTRY.REC.1397.021 در کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه علوم پزشکی تهران به ثبت رسیده است.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ژن های CRNDE ($P=0.0005$) و PIC3KA ($P=0.0322$) در بافت توموری در مقایسه با بافت غیر توموری مجاور افزایش معناداری داشت. بیان PIC3KA در افراد سیگاری، دارای تومورهای موجود در حفره دهانی، مرحله بالاتر بیماری، اندازه بزرگ تر و گرید پیشرفته تر تومور بیشتر بود، در حالی که بیان CRNDE در افراد مصرف کننده الکل و دارای درگیری گره لنفاوی بیشتر بود. همچنین مشخص شد که آلودگی به ویروس HPV با اندازه بزرگتر و مرحله پیشرفته تر تومور در ارتباط است ($P=0.02$).

نتیجه گیری: با توجه به همراهی بیان PIC3KA با پارامترهایی چون مرحله، اندازه و گرید تومور می توان نتیجه گرفت که بیان این دو ژن در روند پیشرفت بیماری HNSCC نقش دارند. به علاوه بر اساس نتایج حاضر آلودگی به HPV نیز با پیشرفت بیماری در ارتباط است.

کلمات کلیدی: سرطان سلول های سنگفرشی سر و گردن، بیان ژن، ویروس پاپیلومای انسانی، پیش آگهی، فاکتور های خطر



مقدمه

سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن (HNSCC) شامل گروهی از تومورهای هتروژن است که در حفره دهان، نازوفارنکس، اوروفارنکس، هایپوفارنکس، حنجره، سینوس، حفره بینی و غدد بزاقی بروز می‌کنند و بطور کلی از لحاظ بیولوژیکی تهاجمی می‌باشند (1). سرطان سر و گردن حدود 4٪ از بدخیمی‌های سراسر جهان و 5٪ از مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها را به خود اختصاص می‌دهد و ششمین سرطان شایع در دنیاست که بیش از 90٪ سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن منشأ سلول‌های اپیتلیالی دارند که سطوح مخاطی سر و گردن را دربر می‌گیرند (2). سرطان حفره دهان (OSCC) و اوروفارینکس دهان و حلق (OPSCC) شایع‌ترین نوع HNSCC هستند. در سال 2008، حدود 363900 مورد جدید به OSCC و OPSCC مبتلا شدند که 12800 مورد از آنها زندگی خود را از دست دادند (3).

ویژگی‌هایی نظیر میزان مرگ و میر بالا و عوارض شدید نشان دهنده اهمیت ویژه درمان این سرطان هستند. نیمی از بیماران در پنج سال اول بیماری، جان خود را از دست می‌دهند و علی‌رغم پیشرفت در درمان‌های چند جانبه، نرخ بقای پنج ساله، بهبود زیادی پیدا نکرده است. بیش از 75٪ موارد HNSCC با مصرف سیگار و الکل همراهی دارد. افراد سیگاری 10 برابر بیشتر نسبت به افراد غیرسیگاری در معرض خطر ابتلا به این نوع سرطان هستند. همچنین مصرف سنگین الکل به عنوان یک عامل مستقل و در همراهی با مصرف سیگار موجب افزایش خطر ابتلا می‌شود (2، 4). در نتیجه اقدامات بهداشت عمومی در راستای کاهش مصرف دخانیات بروز HNSCC در 30 سال اخیر در کشورهای پیشرفته کاهش یافته است. با این حال به علت بروز عفونت ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) افزایش قابل ملاحظه‌ای در بروز سرطان‌های لوزه و قاعده زبان، صورت گرفته است (5).

انواع HPV های پرخطر نقش چشمگیری در بدخیمی‌های ویروسی داشته و مسئول حدود 5٪ از سرطان‌هایی هستند که سالانه در جهان رخ می‌دهند. مطالعات اخیر یک بروز افزایش یافته حدودا 50٪ عفونت HPV را در بیماران مبتلا به HNSCC نشان داده است (5-8).

اکثر محققان پذیرفته اند که مرحله‌بندی بیماری، نقاط مختلف آناتومیک بروز بیماری، سائز تومور و انتشار متاستاتیک این کارسینوم که اکثراً از طریق عروق لنفاوی است و همچنین grade تومور تاثیر بسیار مهم و اساسی در نتیجه بیماری دارد (8-11).

همچنین پروفایل ژنتیکی مبتلایان به HNSCC که HPV+ از منظر ثبات کروموزومی و الی و همچنین بیان ژن و متیلاسیون DNA با مبتلایان HPV- متفاوت است (12). علاوه بر این‌ها، عملکرد نامناسب مسیرهای پیام‌رسانی نیز در سرطان نقش دارند (13). اختلال عملکرد ژن PIK3CA در نتیجه تغییراتی از جمله جهش، تکثیر یا افزایش بیان در بیماری زایی HNSCC نقش دارد. این ژن در حدود 55 درصد از بیماران چه با درگیری ویروس پاپیلومای انسانی یا بدون آن دچار تغییر می‌شود (14، 15).

یکی دیگر از فاکتورهای ژنتیکی مهم در تنظیمات مسیرهای مولکولی حیاتی مرتبط با رشد و توسعه ی سرطان های مختلف lncRNA ها هستند (16، 17). یک lncRNA با نام "colorectal neoplasia differentially expressed" (CRNDE)



در برخی از سرطان ها از جمله CRC، GC، گلیوماها، و HCC الگوی افزایش بیان از خود نشان می دهد. این الگوی افزایش بیان پیشنهادکننده ی این واقعیت است که CRNDE می تواند در برخی مسیرهای تومورزایی از جمله رشد، تکثیر، مهاجرت سلولی، تهاجم، متابولیسم، آنژیوژنز و سرکوب آپوپتوز نقش داشته باشد (18).

در این مطالعه سطوح بیانی PIC3KA و CRNDE و درگیری HPV را در بیماران مبتلا به HNSCC مورد بررسی قرار گرفت و سپس ارتباط سطوح بیانی PIC3KA و CRNDE و درگیری HPV با عوامل خطر و مشخصات بالینی بیماران مبتلا به HNSCC بررسی شد.

متدولوژی

بیماران

این مطالعه مورد-شاهدی بر روی جمعیتی شامل 50 بیمار مبتلا به کارسینومای بافت سنگفرشی سر و گردن (HNSCC) انجام شد. 50 نمونه بافت توموری (به عنوان مورد) و 50 نمونه بافت غیر توموری مجاور از همان بیماران (ANCTs) (به عنوان شاهد) مورد بررسی قرار گرفت. افراد شرکت کننده در مطالعه، افراد مبتلا به کارسینومای سلول های سنگفرشی سر و گردن بوده و جهت جراحی و برداشتن تومور به اتاق جراحی مراجعه کرده بودند که توسط پاتولوژیست تشخیص داده شده و بیماری آنها تایید شده بود. در ابتدا با استفاده از پرسشنامه استاندارد، اطلاعاتی نظیر سن و جنس افراد، آلودگی به HPV، مصرف سیگار و الکل، مکان تومور اولیه، مرحله بیماری، سائز تومور، درگیری گره لنفاوی و گرید تومور جمع آوری شد. پس از اخذ رضایت نامه از بیماران با رعایت تمام شئون اخلاقی و پزشکی، توسط متخصص جراحی در اتاق عمل نمونه های بافت توموری و غیرتوموری مجاور در کرایو تیوب جمع آوری و بلافاصله نمونه ها به فریزر -70°C منتقل و برای انجام کارهای بعدی ذخیره شدند. جمع آوری بخشی از نمونه ها طی حدود یک سال از طریق مرکز جراحی سرطان بیمارستان امام خمینی و بخش جراحی بیمارستان ولیعصر (عج) انجام شد و باقی نمونه ها نیز از بانک تومور انستیتو کنسر بیمارستان امام خمینی خریداری گردید.

تعیین تیپ HPV

استخراج DNA به منظور بررسی ابتلا به HPV از نمونه های بافت تازه منجمد شده با استفاده از کیت TriPure (Roche Molecular Diagnostics) بر اساس دستورالعمل سازنده انجام شد و سپس به منظور تکثیر قطعات ویروسی بر روی DNA های استخراج شده PCR با استفاده از کیت Ampliquality HPV-Type Express PCR طبق پروتکل سازنده انجام گرفت. به طور خلاصه، پروتکل دمایی برای آزمایش PCR به شرح زیر بود: 10 دقیقه در دمای 95 درجه سانتیگراد، به دنبال آن 50 چرخه دناتوراسیون به مدت 30 ثانیه در 95 درجه سانتیگراد، آنیلینگ برای 30 ثانیه در 50 درجه سانتیگراد و 30 ثانیه در 72 درجه سانتیگراد برای تکثیر، و در نهایت مرحله تکثیر نهایی در 72 درجه سانتیگراد برای 5 دقیقه. ژنوتیپ HPV با استفاده از روش Single Step PCR و Reverse Line Blot بر روی محصولات PCR انجام شد که قادر به شناسایی 40 ژنوتیپ مختلف HPV می باشد. با استفاده از این روش، تیپ HPV به صورت یک باند بر روی استریپ مترادف با ژنوتیپ HPV گزارش می شود.

سنجش بیان ژن (انجام Quantitative real-time RT-PCR)



استخراج RNA به منظور آنالیز سطوح بیان از بافت با استفاده از کیت TriPure بر اساس پروتکل سازنده انجام گرفت و سپس cDNA با استفاده از کیت PrimeScript™ RT شرکت TaKaRa بر اساس بروشور کیت سنتز گردید. سپس میزان بیان CRNDE و PIK3CA با روش RealTime مبتنی بر سایبرگرین با استفاده از SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara) و در دستگاه Rotor-Gene Q (Qiagen) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ژن SDHA به عنوان کنترل داخلی به کار رفت. جدول 1 پرایمرهای طراحی شده بوسیله نرم افزار Primer3 برای بررسی میزان بیان ژنهای مورد نظر را نشان می دهد. بیان نسبی ژنهای هدف با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Cq}$ محاسبه گردید. برای تایید نتایج، هر ران Real Time PCR دوبار انجام شد و میانگین نتایج بیان شد.

جدول 1: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژنهای مورد مطالعه

نام ژن مربوطه	توالی پرایمرهای فروارد (Forward) و ریورس (Reverse)
PIK3CA	F: GGGATGATTACGGCAAGATATG R: CTCAATAAGTCCCACACAGTCAC
CRNDE	F: TTCTCTTG TAGGATGCCACTGGA R: CACAGGAAATTTCAAAGACCAACGG
SDHA	F: GTGCGGATTGATGAGTACGATTAC R: ATCACGGGTCTATATCCAGAGTG

آنالیزهای آماری

پس از اندازه گیری میزان بیان نسبی مربوط به هر ژن و HPV تایپینگ مربوط به هر بیمار، همراهی میزان بیان هر ژن و درگیری HPV بیماران با عواملی چون مصرف سیگار، الکل، مکان اولیه تومور، مرحله تومور و سائیز تومور و درگیری گره لنفاوی و grade مورد بررسی قرار گرفت. جهت آنالیز همراهی و رسم نمودارها از نرم افزار آماری graphpad PRISM ورژن 8 استفاده شد. به منظور بررسی داده های کمی مربوط به بیان، پس از بررسی داده ها از نظر توزیع نرمال توسط تست Shapiro-Wilk از روش آماری تی تست و ANOVA به منظور بررسی داده های نرمال و از تست mann-whitney و کروسکال والیس برای بررسی داده های با توزیع غیرنرمال استفاده شد. از طرف دیگر جهت بررسی داده های کیفی مربوط به HPV از تست کای-اسکوئر استفاده گردید و مقادیر ($p \text{ value} < 0.05$) به مفهوم تفاوت معنادار در نظر گرفته شده اند.

یافته ها

جدول 2 اطلاعات دموگرافیک و بالینی بیماران را نشان می دهد.



جدول ۲: یافته های دموگرافیک و بالینی 50 فرد مبتلا به HNSCC

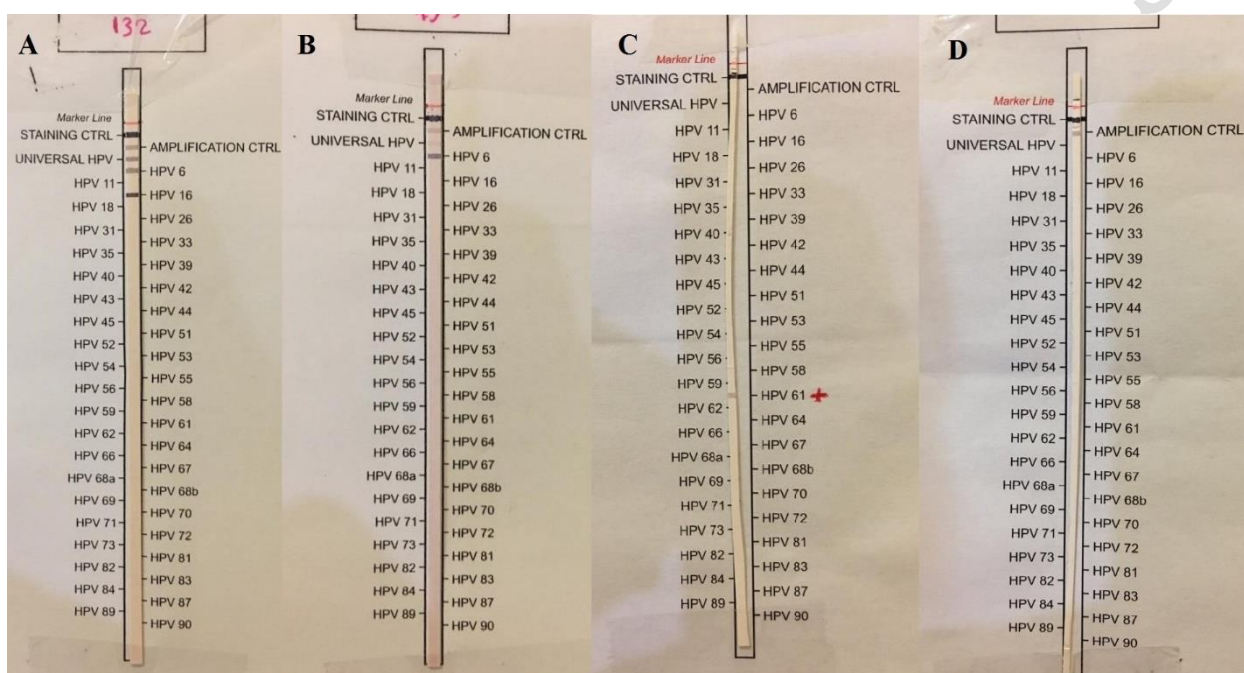
تعداد (%)	متغیر	
8 (16%) 42 (84%)	≤ 40 y > 40 y	سن *
39 (78%) 11 (22%)	مرد زن	جنس
14 (28%) 36 (72%)	مثبت منفی	HPV
30 (60%) 20 (40%)	بلی خیر	مصرف سیگار
6 (12%) 44 (88%)	بلی خیر	مصرف الکل
39 (78%) 5 (10%) 4 (8%) 2 (4%)	Larynx Oral cavity Pharynx others	مکان تومور اولیه
20 (40%) 30 (60%)	I+II III+IV	مرحله بیماری
29 (58%) 21 (42%)	$\geq 2/5$ cm $< 2/5$ cm	سایز تومور
13 (26%) 37 (74%)	بلی خیر	درگیری گره لنفاوی
18 (36%) 20 (40%) 12 (24%)	Well-differentiated Moderately differentiated Poorly differentiated	گرید تومور

* سن در افراد مورد مطالعه به معنی سن در زمان شرکت در مطالعه است.



HPV تایپینگ

50 نمونه بافت توموری از منظر وجود آلودگی و تیپ ویروس HPV با استفاده از روش Reverse Line Blot مورد آنالیز قرار گرفتند (تصویر 1). 14 مورد (28٪) از نظر داشتن DNAی مربوط به این ویروس مثبت اعلام شدند. در بررسی تایپ ویروس HPV-16 در 8 مورد از 14 مورد (57/1٪) به صورت تنها و در ترکیب با سایر تایپ ها (چند ژنوتایپی) مشاهده شد. HPV16 و 18 و 6 و 61 به صورت تنها به ترتیب در 6 و 3 و 1 و 1 نمونه مشاهده شد. ضمناً در سه نمونه آلودگی چند ژنوتایپی مشاهده شد که در دو نمونه به صورت HPV6/16 و در یک نمونه به صورت HPV6/11 تشخیص داده شد.



تصویر 1: چند نمونه از استریپ های مربوط به تایپینگ HPV ویروس. (A) نمونه ای با سویه 6 و 16 مثبت. (B) نمونه ای با سویه 6 مثبت. (C) نمونه ای با سویه 61 مثبت. (D) نمونه ای بدون آلودگی HPV

نتایج بررسی بیان CRNDE و PIK3CA در بافت توموری در مقایسه با بافت غیر توموری مجاور

همانگونه که در جدول 3 نشان داده شده است، آنالیز آماری بیان نشان داد که میزان بیان ژن های CRNDE ($P=0.0005$) و PIK3CA ($P=0.032$) در بافت توموری در مقایسه با بافت غیر توموری مجاور افزایش معناداری نشان داده است.

جدول 3: نتایج آنالیز آماری مقایسه سطوح بیانی PIC3KA و CRNDE بین بافت توموری و بافت غیرتوموری مجاو

نام ژن	میانگین بیان نسبی		P-value
PIK3CA	بافت توموری	1/782±0/81	0/032
	بافت غیرتوموری مجاور	1/47±0/38	
CRNDE	بافت توموری	3/578±0/36	0/0005
	بافت غیرتوموری مجاور	3/179±0/86	

بررسی همراهی میزان بیان PIC3KA و CRNDE با ویژگی های دموگرافیک و بالینی بیماران

نتایج مربوط به همراهی عوامل خطر و مشخصات بالینی بیماران با میزان بیان ژن های PIC3KA و CRNDE به طور مفصل در جدول 4 آورده شده است. نتایج آنالیزهای آماری نشان داد افزایش بیان PIC3KA با مصرف سیگار همراهی معنی داری دارد ($P=0.003$)، با این وجود همراهی معنی داری در مورد CRNDE دیده نشد (تصویر 2A). همانطور که در تصویر 2B مشاهده می کنید، در بیمارانی که الکل مصرف می کردند افزایش بیان معنی داری در بیان ژن CRNDE داشت ($P=0.006$)، در حالیکه مصرف الکل تاثیری روی سطوح بیانی ژن PIC3KA در بافت توموری در مقایسه با بافت غیر توموری مجاور نشان نداد. نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده ارتباط معنی داری بین افزایش بیان ژن PIC3KA با مکان تومور بود ($p=0.022$). به طوری که در موارد *oral cavity* افزایش بیان بیشتری مشاهده شد. این در حالی بود که میزان بیان CRNDE با مکان تومور ارتباطی نداشت (تصویر 2C). تصویر 2D نشان دهنده همراهی معنادار بیان افزایش یافته PIC3KA با مرحله بالاتر بیماری است ($P<0.0001$)، در صورتی که در مورد CRNDE این چنین نبود. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، افزایش بیان ژن PIC3KA ارتباط معنی داری با سایز تومور نشان داد ($P=0.007$)، ولی سطوح بیانی ژن CRNDE در بیماران با سایز توموری مختلف تفاوتی نداشت (تصویر 2E). سطوح بیانی ژن PIC3KA در افراد با درگیری گره لنفاوی و افراد فاقد آن تفاوتی نداشت، در حالی که ژن CRNDE در افرادی که درگیری گره لنفاوی داشتند افزایش بیان معنی داری را نسبت به افراد بدون درگیری گره لنفاوی از خود نشان داد ($P=0.002$). تصویر 2F. افزایش بیان PIC3KA ارتباط معنی داری با grade تومور نشان داد ($p=0.035$)، در حالیکه سطوح بیانی CRNDE ارتباطی با grade بیمار نداشت (تصویر 2G).

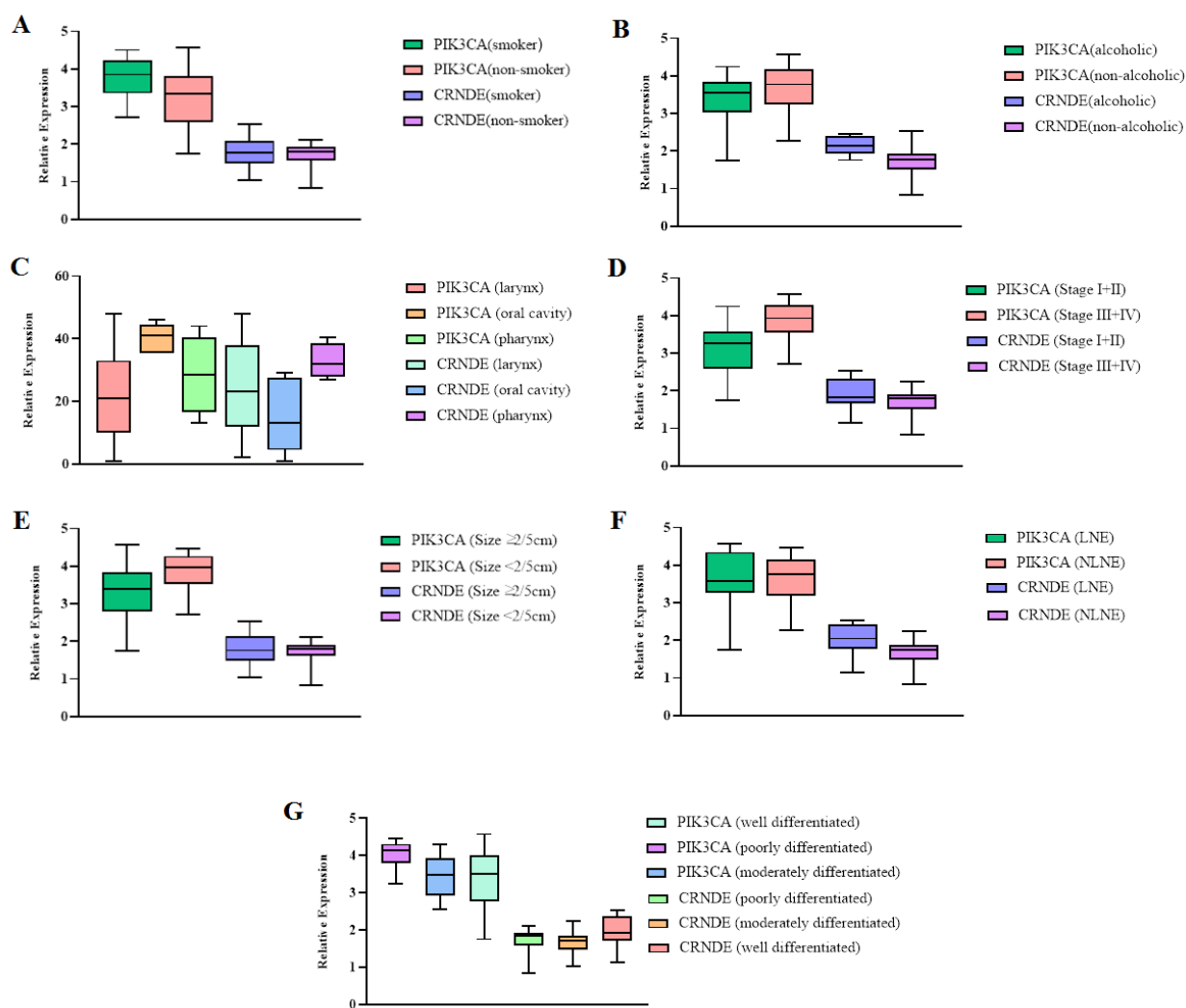


جدول ۴: نتایج بررسی همراهی میانگین بیان نسبی ژن ها در بافت توموری و مجاور تومور با عوامل خطر و مشخصات بالینی بیماران

P-value	میانگین± انحراف معیار بیان نسبی		نام ژن
PIK3CA			
0/003	3/79±0/77	دارد	مصرف سیگار
	3/25±0/81	ندارد	
0/587	3/38±0/65	دارد	مصرف الکل
	3/6±0/52	ندارد	
0/022	3/46±0/22	Larynx	مکان تومور
	4/27±0/31	Oral cavity	
	3/82±0/11	Pharynx	
<0/0001	3/09±0/09	I+II	مرحله بیماری
	3/89±0/85	III+IV	
0/007	3/36±0/83	≥2/5cm	سایز تومور
	3/87±0/8	<2/5cm	
0/945	3/58±0/07	بلی	درگیری گره لنفاوی
	3/57±0/14	خیر	
0/035	3/41±0/09	Well-differentiated	گرید بیماری
	3/46±0/85	Moderatelydifferentiated	
	4/01±0/88	Poorly differentiated	
CRNDE			
0/491	1/81±0/74	دارد	مصرف سیگار
	1/73±0/55	ندارد	
0/006	2/14±0/41	دارد	مصرف الکل
	1/73±0/04	ندارد	
0/168	1/8±0/8	Larynx	مکان تومور
	1/48±0/21	Oral cavity	
	1/92±0/4	Pharynx	
0/216	1/89±0/06	I+II	مرحله بیماری
	1/7±0/65	III+IV	
0/857	1/81±0/62	≥2/5cm	سایز تومور
	1/74±0/36	<2/5cm	
0/002	2/06±0/87	بلی	درگیری گره لنفاوی
	1/68±0/45	خیر	
0/062	1/93±0/7	Well-differentiated	گرید بیماری



	1/66±0/08	Moderately differentiated	
	1/74±0/44	Poorly differentiated	



تصویر ۲: مقایسه میزان بیان نسبی ژن‌های PIK3CA و CRNDE در (A) بین افراد سیگاری و غیرسیگاری، (B) بین افراد الکلی و غیرالکلی، (C) بین مکان‌های اولیه تومور، (D) بین افراد در مراحل مختلف بیماری، (E) بین بیماران با سایز متفاوت تومور، (F) در بیماران با یا بدون درگیری گره لنفاوی و (G) در بیماران با grade مختلف بیماری. LNE: درگیری غدد لنفاوی، NLNE: عدم درگیری غدد لنفاوی.



نتایج بررسی همراهی درگیری HPV بیماران با مکان اولیه تومور، مرحله تومور وسایز تومور و درگیری گره لنفاوی و grade.

همانطور که در جدول 4 آورده شده است، وجود آلودگی به HPV با پیشرفته بودن مرحله تومور ($P=0.024$) و سایز بزرگ تر تومور ($P=0.021$) همراهی معنی داری دارد.

جدول ۴: نتایج بررسی همراهی فاکتورهای کلینیکی با درگیری با ویروس HPV

متغیر		آلودگی به HPV
OR	p-value	
-	0/524	مکان اولیه تومور
0/24	0/023	مرحله تومور
6/7	0/021	سایز تومور
1/41	0/737	درگیری گره لنفاوی
-	0/142	Grade بیماری

بحث

کارسینوم های سلول سنگفرشی سر و گردن هتروژنیته قابل ملاحظه ای را در سطح بالینی و مولکولی از خود نشان می دهند که به وسیله ی مارکرهای بالینی که در حال حاضر استفاده می شوند قابل پیش بینی نیست، بنابراین توسعه ی بیومارکرهای جدید ژنتیکی برای پیش بینی سیر بیماری ارزشمند خواهد بود (19).

در این مطالعه میزان آلودگی به ویروس HPV در بیماران مبتلا به HNSCC مورد بررسی قرار گرفت از سوی دیگر تلاش شد تا علاوه بر اندازه گیری تغییرات سطوح بیانی PIC3KA و CRNDE در بافت توموری بیماران نسبت به بافت سالم مجاور، ارتباط و همراهی این سطوح بیانی با فاکتورهای بالینی و ریسک فاکتور های مهم درگیر در نتیجه ی نهایی بیماری بتوانیم در جهت بهبود پیش بینی پیش آگهی بیماران بیومارکرهای جدید ژنتیکی را شناسایی کنیم.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که 28٪ از بیماران HNSCC از نظر HPV مثبت بودند و شایع ترین نوع HPV در جمعیت مورد مطالعه HPV 16 بود. در سال 2014 ، جلیوند و همکاران یک مرور سیستماتیک انجام دادند و دریافتند که شیوع HPV در سرطان های سر و گردن در جامعه ایران 4/32 درصد است. آنها همچنین نشان دادند که شایع ترین انواع HPV در جمعیت ما HPV 16 و 18 هستند (20). مطابق با داده های آنها، در مطالعه حاضر نیز فراوانی قابل توجهی از عفونت HPV در بیماران HNSCC یافت شد. مطالعه دیگری که در سال 2017 توسط کربلایی و همکاران با استفاده از سه روش مختلف شامل واکنش PCR معمولی اختصاصی HPV-16، روش تعیین ژنوتیپ HPV INNO-LiPA و PCR / تعیین توالی یابی انجام شد، نشان داد که 3.2٪ از بیماران HPV مثبت بودند که توسط هر سه روش تایید شدند. آنها نوع از HPV شامل انواع 16 ، 2 ، 27 و 43 را



در پنج نمونه از بیماران مورد مطالعه مشاهده کردند (21). روش متفاوت مورد استفاده برای تعیین نوع HPV در مطالعه ما که توانای تشخیص طیف گسترده تری از انواع HPV پرخطر را دارد، ممکن است این تفاوت بزرگ بین فراوانی ابتلا به HPV در جمعیت مورد بررسی در مطالعه حاضر با مطالعه کربلایی و همکاران را توضیح دهد. در مطالعه دیگری که اسودی کرمانی و همکارانش در سال 2011، بر روی 40 بلوک پارافینه FFPE از بیماران مبتلا به HNSCC از منطقه شمال غربی ایران با استفاده از توالی Nested-PCR / توالی یابی انجام دادند، انواع HPV پرخطر را در 6 بیمار (42/8٪) تشخیص دادند که HPV-18 بیشترین نوع تکرار شونده بود (22). این نتایج نشان می دهد که شیوع HPV و فراوانی انواع مختلف آن در مناطق مختلف جغرافیایی ایران متفاوت است. مطالعات مختلفی در سایر کشورها وجود دارد که وضعیت HPV را در بیماران HNSCC ارزیابی می کند، در سه مطالعه اخیر در بنگلادش (23)، رومانی (24) و سوئد (25)، شیوع HPV به ترتیب 21٪، 12.2٪ و 39٪ گزارش شده است. نوع شایع HPV در هر سه کشور HPV-16 بود.

سالهاست که مصرف تنباکو به عنوان مهم ترین عامل درگیر در HNSCC شناخته شده است و این در حالیست که این بیماری در افراد غیرسیگاری نیز به طور روزافزون در حال افزایش است که این مساله بیانگر محدودیت درک ما از مکانیسم های مولکولی زمینه است. ثابت شده است که آنالیزهای توالی یابی RNA در این بیماری در شناخت اتیولوژی بیماری بسیار ارزشمند هستند. در مطالعه ای متشکل از 86 نمونه توموری و 86 نمونه نرمال از نظر مصرف سیگار مورد مقایسه قرار گرفتند و نتایج آنالیز توالی یابی RNA نشان داد در افراد سیگاری 2194 ژن و در افراد غیرسیگاری 2073 ژن دچار تغییرات بیانی شده اند (26). نتایج مطالعه ما در مورد همراهی تغییرات سطوح بیانی دو ژن مورد مطالعه و مصرف سیگار نشان داد افزایش بیان PIC3KA با مصرف سیگار همراهی معنی داری دارد و ولی در مورد CRNDE همراهی دیده نشد. اگرچه مطالعات فراوانی ارتباط معنادار مصرف الکل و HNSCC را ثابت کرده اند (27). در این مطالعه بر اساس نتایج در بیمارانی که الکل مصرف می کردند CRNDE افزایش بیان معنا داری داشت در حالیکه مصرف الکل تاثیری روی سطوح بیانی PIC3KA نشان نداد. در این ارتباط در مطالعه ی حاضر به دلیل درصد پایین مصرف کنندگان احتمال می رود به دلایل فرهنگی بیان مصرف الکل از طرف بسیاری از بیماران انکار شده باشد. بنابراین نتایج مطالعه برخلاف مطالعات قبلی در کشورهای دیگر احتمال دارد بیانگر واقعی همراهی بین میزان بیان و مصرف الکل نباشد.

در ارتباط با درگیری گره لنفاوی در بیماران مبتلا به HNSCC طی مطالعه ای سطوح بیانی ژن های درگیر در این بیماری همچون *EGFR*, *VEGF*, *claudin7*, *maspin*, *survivin* در بیماران مبتلا به تومور اولیه و افرادی که دچار متاستاز از طریق گره لنفاوی شده بودند مورد مقایسه قرار گرفت، نتیجه اینکه تمام ژن های مورد مطالعه به غیر از *survivin* در دو گروه مورد مقایسه دچار تغییرات بیانی شده بودند، بنابراین می توان تغییرات این ژن ها را به عنوان نوعی پروگنوز بد در نظر گرفت. در نتیجه ی مطالعه فوق الذکر و مطالعه ی حاضر می توان تغییرات سطوح بیانی ژن هایی همچون *EGFR*, *VEGF*, *claudin7*, *maspin*, *CRNDE* را به عنوان یک نشانگر برای پیش آگهی و سیر بالینی بیماری در نظر گرفت و در صورت مشاهده ی تغییرات بیانی خاصی پروتکل درمانی را به سمت بیمار پرخطر تغییر داد و نهایتاً از انجام رژیم درمانی سفت و سخت برای افراد در معرض خطر کمتر چشم پوشید. علاوه بر این با در نظرگیری سایر پارامترهای درگیر در پیش آگهی بیماران همچون سائز تومور، مکان تومور اولیه، مرحله و grade بیماری در ترکیب با بررسی سطوح بیانی ژن های درگیر در HNSCC بیمار را می توان بسیار هدفمند تر به سمت درمان پیش برد. پیش تر مطالعاتی در ارتباط با بررسی همراهی فاکتور سائز و مکان تومور اولیه با میزان سطوح بیان



ژن های مختلف درگیر در بیماری انجام شده است. طی یک بررسی بیان شد که سطوح بیانی cortactin مستقیماً با سایز تومور، تکثیر سلولی و متعاقباً پیش آگهی این بیماری در ارتباط است (28). در مطالعه ی دیگری الگوی بیانی ژنها را در 60 بیمار مبتلا به HNSCC مورد آنالیز قرار دادند. نهایتاً نتیجه اینکه، الگوی بیانی ژن های مختلفی از جمله EGFR به عنوان مهم ترین ژن در بیماران با سایز تومور و مکان اولیه تومور متفاوت بوده و بر این اساس می توان بیماران را در کلاس های مختلفی با الگوی بیانی خاص قرار داد (19). در مطالعه ی حاضر نیز PIC3KA تغییرات بیانی معناداری را از منظر سایز و مکان مختلف تومور نشان داد. در مطالعه ای که بر روی 63 نمونه بیمار HNSCC پیش از شروع درمان در پی بررسی ردپای مارکرهای مولکولی مرتبط با مرحله و grade و نهایتاً پیش آگهی بیماری، تغییرات یک پنل ژنی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشانگر ارتباط الگوی بیانی ژن های مختلف در پیشرفت، پیش آگهی و بروز مجدد بیماری بوده است (29). در این مطالعه نیز PIC3KA در افراد با مرحله و grade بالاتر میزان بیان افزایش یافته ای را نسبت به بیماران دیگر از خود نشان داد. اگرچه بررسی و مطالعه سطوح بیانی ژن ها در ارتباط با فاکتورهای بالینی کمک کننده است، در اختیار داشتن یک پنل ژنی شامل ژن های متنوع به منظور مقایسه سطوح بیانی در بیماران به مراتب ارزشمندتر خواهد بود. از طرفی تقسیم بندی بیماران در کلاس های مختلف بر اساس پروفایل بیانی پروسه ی درمانی هدفمندتری را برای بیماران به ارمغان خواهد آورد.

حضور DNA ویروس در بخش قابل توجهی از کارسینوم های سر و گردن، این سوال را مطرح می کند که آیا HPV بر نتیجه ی سرطان سر و گردن اثرگذار است یا خیر. امروزه، یافته های متناقضی در این باب وجود دارد. برخی از مطالعات، به وضوح کاهش خطر مرگ در بیماران مبتلا به کارسینوم سر و گردن HPV مثبت را نسبت به افراد مبتلا به کارسینوم سر و گردن HPV منفی بیان کردند، در حالیکه برخی تحقیقات هیچ تفاوتی در میزان طول عمر و بقا در این دو گروه گزارش نکردند. یک مطالعه بزرگ انجام شده توسط Gillison و همکاران نشان داده است که بیماران مبتلا به تومورهای HPV مثبت، کاهش 60٪ در میزان مرگ ناشی از سرطان و بهبود قابل توجه در بقای خاص بیماری را در مقایسه با بیمار مبتلا به تومور HPV منفی دارند (30). همچنین schwartz و همکاران، ارتباطی قوی بین حضور DNA سویه HPV-16 در کارسینوم سر و گردن و بقای طولانی مدت بیماران پیدا کردند (31). این یافته ها این نظریه را تایید کردند که، ظاهراً ارتباطی بین عفونت HPV و پیش آگهی بهتر بیماران وجود دارد (32). در مطالعه ی حاضر نیز مرحله و سایز تومور با ابتلای بیماران به ویروس HPV ارتباط معناداری را نشان داد به طوری که بیماران مبتلا به ویروس به طور قابل توجهی در مراحل پایین تر بیماری قرار داشتند. اگرچه سایز تومور در بیماران درگیر ویروس نسبت به بیماران غیردرگیر به طور معناداری بزرگتر بود.

در مطالعه ی دیگری تخمین زده شده است که احتمال مثبت بودن تومورهای اوروفارنکس از نظر HPV، 5 برابر تومورهای حفره دهانی، لارینکس، هایپوفارینکس است (33). در مطالعه ی حاضر همراهی معناداری از نظر مکان تومور با ابتلا به HPV وجود نداشت. به نظر می رسد به دلیل ناهمگونی تعداد نمونه ها از لحاظ مکان تومور و این واقعیت که تعداد نمونه های توموری لارینکس به طور قابل ملاحظه ای بیشتر از سایر انواع تومورها بوده اند می تواند دلیل تفاوت نتیجه ی این مطالعه بوده باشد. در هر صورت با توجه به نتایج مطالعات دیگر و مطالعه ی حاضر درگیری HPV تاثیر غیرقابل انکاری در پیشرفت و پیش آگهی بیماران ایفا می کند، که با در نظرگیری این واقعیت می توان در جهت درمان هدفمند بیماران با انتخاب رژیم درمانی مناسب گام برداشت. از جمله محدودیت های این مطالعه میتوان به حجم نمونه های مورد بررسی اشاره کرد. بطور حتم با بررسی یک جامعه وسیع تر با تنوع قومیتی وسیع تر می توان نتایج قابل اتکا تری بدست آورد. از سوی دیگر از آنجا که می دانیم ژن های درگیر در فرایند



بیماری زایی در مسیرهای مشخص تاثیر مستقیم بر روند بیماری بخصوص دارند، در آینده و با بررسی مسیرهای درگیر در شروع و پیشرفت تومورهای HNSCC می توان با انتخاب یک پائل گسترده تر از ژن های درگیر در تومورزایی می توان در جهت شناخت فرایند پیشرفت چنین تومورهایی و نیز یافتن نشانگرهای مناسب برای تشخیص یا پیش آگهی HNSCC با در نظر گرفتن فاکتور های خطر قدم برداشت.

نتیجه گیری

به طور خلاصه می توان نتیجه گرفت بیان ژن های درگیر در فرایند رگ زایی نظیر PIC3KA و CRNDE با تظاهرات بالینی مرتبط با پیشرفت تومور دارای همراهی معنی داری بوده که نشان دهنده نقش چنین ژنهایی در فرایند پیشرفت HNSCC است. در مورد ارتباط آلودگی به HPV و توسعه سرطان به نظر می رسد که آلودگی به HPV علاوه بر نقش در شروع بیماری با پیشرفت سرطان HNSCC در ارتباط است و این تاثیر به نظر میرسد با تغییر بیان ژن های درگیر در فرایند تومور زایی انجام می گیرد. در نهایت به نظر می رسد با بررسی طیف وسیع تری از ژن های درگیر در بیماران مبتلا به HNSCC و دارای درگیری HPV می توان چشم اندازی از نحوه عملکرد این ویروس در فرایند تومور زایی بدست آورد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاق IR.TUMS.DENTISTRY.REC.1397.021 در کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه علوم پزشکی تهران به ثبت رسیده است.

حامی مالی

این مقاله از رساله دکتری گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، استخراج شده است.

سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی در نگارش این مقاله وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از کارکنان مجتمع بیمارستانی امام خمینی، دانشگاه و بیماران مشارکت کننده در مطالعه حاضر تقدیر و تشکر می گردد.



منابع:

1. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008;371(9625):1695-709.
2. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(10):777-89.
3. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2009;45(4):309-16.
4. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*. 2013;31(36):4550-9.
5. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26(4):612-9.
6. Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A, Pienkowski P, Pazdrowski J, Luczewski L, et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiol Oncol*. 2014;48(1):1-10.
7. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*. 2010;11(8):781-9.
8. Jafari H, Gharehmoammadlou R, Fakhrjou A, Ebrahimi A, Nejati-Koshki K, Nadri M, et al. Genotyping of Human Papillomavirus and TP53 Mutations at Exons 5 to 7 in Lung Cancer Patients from Iran. *Bioimpacts*. 2013;3(3):135-40.
9. Leite IC, Koifman S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol*. 1998;34(5):347-52.
10. Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(1):67-76.
11. Munoz-Guerra MF, Marazuela EG, Martin-Villar E, Quintanilla M, Gamallo C. Prognostic significance of intratumoral lymphangiogenesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 2004;100(3):553-60.
12. Dahlgren L, Mellin H, Wangsa D, Heselmeyer-Haddad K, Bjornestal L, Lindholm J, et al. Comparative genomic hybridization analysis of tonsillar cancer reveals a different pattern of genomic imbalances in human papillomavirus-positive and -negative tumors. *Int J Cancer*. 2003;107(2):244-9.
13. Seshacharyulu P, et al. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(1):15-31.
14. Beck TN, Golemis EA. Genomic insights into head and neck cancer. *Cancers Head Neck*. 2016;1.
15. Garcia-Escudero R, Segrelles C, Duenas M, Pombo M, Ballestin C, Alonso-Riano M, et al. Overexpression of PIK3CA in head and neck squamous cell carcinoma is associated with poor outcome and activation of the YAP pathway. *Oral Oncol*. 2018;79:55-63.
16. Yang QQ, Deng YF. Long non-coding RNAs as novel biomarkers and therapeutic targets in head and neck cancers. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(4):1286-92.



17. Zou AE, Ku J, Honda TK, Yu V, Kuo SZ, Zheng H, et al. Transcriptome sequencing uncovers novel long noncoding and small nucleolar RNAs dysregulated in head and neck squamous cell carcinoma. *RNA*. 2015;21(6):1122-34.
18. He TY, Li SH, Huang J, Gong M, Li G. Prognostic value of long non-coding RNA CRNDE in gastrointestinal cancers: a meta-analysis. *Cancer Manag Res*. 2019;11:5629-42.
19. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell*. 2004;5(5):489-500.
20. Jalilvand S SZaHR. Human papillomavirus burden in different cancers in Iran: a systematic assessment. . *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:7029-35.
21. Karbalaie Niya MH STF, Panahi M, et al. . Human Papillomavirus Investigation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Initial Report from the Low Risk HPV Types Associations. . *Asian Pac J Cancer Prev* 2017;18:2573-9.
22. Kermani IA SS, Dolatkah R, et al. . Human papilloma virus in head and neck squamous cell cancer. *Iranian journal of cancer prevention* 2012;5:21.
23. Shaikh MH KA, Sadat A, et al. Prevalence and types of high-risk human papillomaviruses in head and neck cancers from Bangladesh. . *BMC Cancer* 2017;17:792.
24. Ursu RG DM, Spiridon IA, et al. Role of mucosal high-risk human papillomavirus types in head and neck cancers in Romania. . *PLoS One* 2018;13:e0199663.
25. Faust H EAE, Roslin A, et al. . Prevalence of human papillomavirus types, viral load and physical status of HPV16 in head and neck squamous cell carcinoma from the South Swedish Health Care Region. *J Gen Virol* 2016;97:2949-56.
26. Shaikh I, Ansari A, Ayachit G, Gandhi M, Sharma P, Bhairappanavar S, et al. Differential gene expression analysis of HNSCC tumors deciphered tobacco dependent and independent molecular signatures. *Oncotarget*. 2019;10(58):6168-83.
27. Irimie AI, Braicu C, Cojocneanu R, Magdo L, Onaciu A, Ciocan C, et al. Differential Effect of Smoking on Gene Expression in Head and Neck Cancer Patients. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(7).
28. Clark ES, Brown B, Whigham AS, Kochaishvili A, Yarbrough WG, Weaver AM. Aggressiveness of HNSCC tumors depends on expression levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon. *Oncogene*. 2009;28(3):431-44.
29. Pavon MA, Parreno M, Tellez-Gabriel M, Sancho FJ, Lopez M, Cespedes MV, et al. Gene expression signatures and molecular markers associated with clinical outcome in locally advanced head and neck carcinoma. *Carcinogenesis*. 2012;33(9):1707-16.
30. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(6):407-20.
31. Schwartz S. Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology*. 2013;445(1-2):187-96.
32. Massano J, et al. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. . *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;102(1):67-76.
33. Combes JD, Franceschi S. Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers. *Oral Oncol*. 2014;50(5):370-9.



نسخه پذیرفته شده پیش از انتشار

