



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση

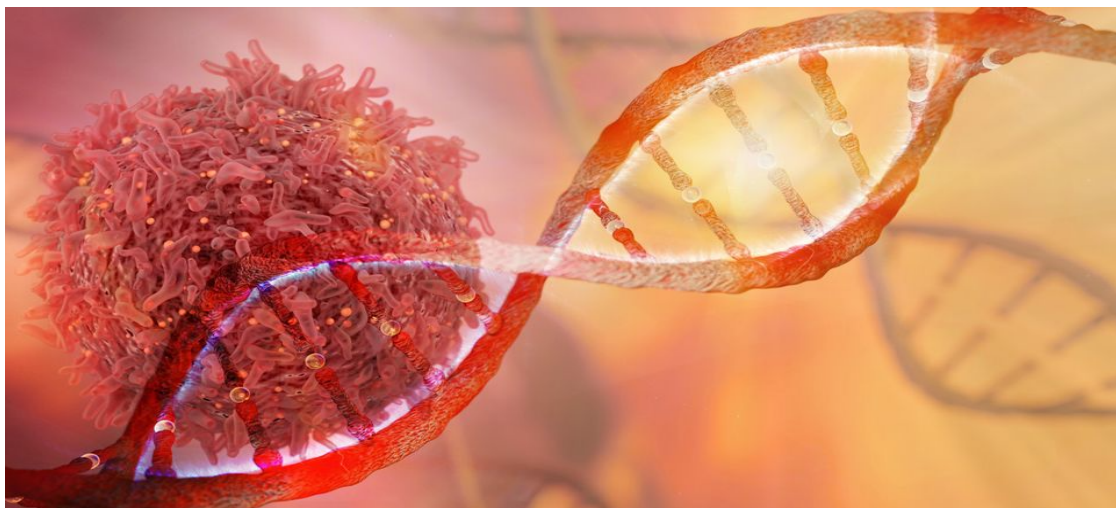


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανάλυση προφίλ μεταλλάξεων σε καρκινικές σειρές κεφαλής
και τραχήλου μέσω NGS

POST GRADUATE THESIS

Analysis of mutation profiles in head and neck cancer series by NGS



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ (ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

Αουρέλα Ματάι

Aourela Mataj

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Chrysanthi Vogiatzaki

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Analysis of mutation profiles in head and neck cancer series by NGS

Mataj Aourela

DML21016

Dml21016@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR

Chrysanthi Vogiatzaki

SECOND SUPERVISOR

Rampias Theodwros

AIGALEO 2024

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 5/7/2024

Όνόματα εξεταστών

Υπογραφή

1^{ος} Εξεταστής Χρυσάνθη Βογιατζάκη

2^{ος} Εξεταστής Θεόδωρος Ράμπιας



Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ματάι Αουρέλα του Ιζμίρ με αριθμό μητρώου DML21016 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βιοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και κάθε βοήθεια είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, καταγράφονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Ματάι Αουρέλα

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, στο τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών πιο συγκεκριμένα στο Μεταπτυχιακό Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στην Διάγνωση το έτος 2024.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους επιβλέποντες καθηγητές αυτής της διπλωματικής την κα. Βογιατζάκη Χρυσάνθη για την ευκαιρία που μου έδωσε σε αυτό το μεταπτυχιακό πρόγραμμα να ανοίξω του ορίζοντές μου, τον κ. Ράμπια Θεόδωρο για τις πολύτιμες συμβουλές του την αμέριστη βοήθεια του. Επίσης θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και τις προσπάθειες που κατέβαλαν για να βοηθήσουν στην κατάκτηση της γνώσης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που υπήρξε πάντα ένα ανεκτίμητο στήριγμα σε όλη την εκπαιδευτική μου σταδιοδρομία και έναν κοντινό μου άνθρωπο τον Θεοκλή Ζαούτη για την αμέριστη συμπαράσταση του.

Αφιερώσεις

*Η διπλωματική εργασία είναι αφιερωμένη στους γονείς μου
Βαλμπόνα Ματάι & Ιζμίρ Ματάι για την πίστη τους σε εμένα και τις δυνατότητες μου,
καθώς και για την αστείρευτη συναισθηματική και ψυχολογική υποστήριξη που μου έδειξαν
όλα αυτά τα χρόνια.*

Περίληψη

Ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου αποτελεί έναν από τους πιο συχνούς τύπους καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο. Τα πλακώδη κύτταρα αποτελούν ένα είδος κυττάρων που συνδέεται με την ανάπτυξη καρκίνου κεφαλής και τραχήλου. Σημαντική είναι η ανίχνευση και η ανάλυση των μεταλλάξεων, προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες μέθοδοι πρόληψης και θεραπείας του καρκίνου αυτού. Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η μετά-ανάλυση των προφίλ μεταλλάξεων σε τέσσερα κλινικά δείγματα από ασθενείς που νοσούν από καρκίνο κεφαλής και τραχήλου. Στο παρακάτω κείμενο αναφέρονται οι παράγοντες που προκαλούν καρκίνο HNSCC, όπως για παράδειγμα Ηρν -αρνητικά, κάπνισμα, αλκοόλ, Epstein-Barr, αναιμία Fanconi, χημικά προϊόντα, ακτινοβολία, HPV θετικά (ιός ανθρωπίνων θηλωμάτων). Επισυνάπτονται σημαντικές ενδείξεις για την επιδημιολογία της νόσου και θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου. Γίνεται αναφορά για την τεχνολογία αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), πού χρησιμεύει και τις δυνατότητες που προσφέρει σαν μοριακή τεχνική. Τα δεδομένα που συλλέγονται από τη μελέτη αναλύονται με σκοπό την ανάδειξη συμπερασμάτων, που σε σύγκριση με τα ευρήματα άλλων μελετών μπορούν να οδηγήσουν στην εξέλιξη της έρευνας για το εν λόγω ζήτημα.

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος κεφαλής και τραχήλου, HPV, θεραπεία, NGS, γονιδιακές μεταλλάξεις

Abstract

Head and neck cancer is one of the most common types of cancer worldwide. Squamous cells are a type of cells associated with the development of head and neck cancer. The detection and analysis of mutations is important in order to find the best methods of prevention and treatment of this cancer. The aim of this research work is the meta-analysis of the mutation profiles in four clinical samples from patients suffering from head and neck cancer. In the text below, there are stated the factors that cause HNSCC cancer, such as Hpv-negative, Hpv-positive and HBV etc. Important clues about the epidemiology of the disease and therapeutic approaches for the treatment of head and neck cancer are also presented. The use of the next-generation NGS technology and the potential that it offers as a molecular technique are reported. The data collected in this study are analyzed in order to draw conclusions, which compared to the findings of other studies can lead to the development of research on this scientific field.

Key words: Head and neck cancer, HPV, treatment, NGS, gene mutations

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας	iv
Ευχαριστίες	v
Αφιερώσεις	vi
Περίληψη	vii
Abstract.....	viii
Συνομογραφίες	xi
Πρόλογος	1
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή.....	2
Κυρίως μέρος.....	3
1. Επιδημιολογία.....	3
2. Αιτιολογικοί παράγοντες.....	6
2. 1 Χρήση αλκοόλ και καπνού	6
2. 2 Ιοί (HPV /EPSTEIN-BAR).....	6
2. 3 Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα Κεφαλής και Τραχήλου σχετιζόμενο με τον ιό Epstein-Barr (HBV)	9
2. 4 Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα Κεφαλής και Τραχήλου σχετιζόμενο με αναιμία Fanconi.....	10
2. 5 Χημικά και ακτινοβολία	11
3. Μοριακοί μηχανισμοί	12
3. 1 Μοριακός χαρακτηρισμός των όγκων κεφαλής και τραχήλου	13
4. Θεραπεία καρκίνου κεφαλής και τράχηλου	16
4. 1 Ακτινοθεραπεία	16
4. 2 Χημειοθεραπεία.....	17
4. 3 Στοχευμένη θεραπεία	17
4. 4 Αναστολείς EGFR.....	18
4. 5 Θεραπείες για επαναπρογραμματισμό του καρκίνου.....	19

4. 6 Ανοσοθεραπεία.....	19
5. Ιατρική Ακρίβειας στον Καρκίνο Κεφαλής και Τραχήλου με χρήση του NGS	21
5. 1 Ανίχνευση μεταλλάξεων μεσω NGS.....	21
6. Σκοπός και μεθοδολογία.....	23
6. 1 Σκοπός.....	23
6. 2 Μέθοδος και εργαλεία/ υπολογιστικά εργαλεία	23
6. 3 Παραγωγή NGS δεδομένων με την χρήση του KitIlluminaTSO 500.....	29
6. 4 Υπολογιστικά εργαλεία.....	30
Cosmic (https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic).....	30
Gnomad (https://gnomad.broadinstitute.org/).....	31
Clinvar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/).....	32
7. Αποτελέσματα	33
Συζήτηση.....	37
FAT1	37
CDKN2A.....	38
PIK3CA.....	39
NOTCH1	40
PTEN.....	40
TP53	41
KMT2C.....	42
Συμπέρασμα	44
Αναφορές	45
Πηγές Εικόνων	50
Λίστα Πινάκων	52

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Κέντρο Ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων
CSC	Cancer stem-like cells	Αδιαφοροποιημένα Κύτταρα
CSCs	Cancer stem cells	Καρκινικά Βλαστοκύτταρα
EBV	Epstein-Barr virus	Ιός Επστεϊν-Μπαρ
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Υποδοχέας Επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	Καρκίνος κεφαλής και τραχήλου
HPV	Human Papillomavirus	Ιός ανθρώπινων Θηλωμάτων
ICD	International Classification of Diseases	Διεθνής Ταξινόμηση Νοσημάτων
NPC	Nasopharyngeal Carcinoma	Ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα
OPSCC	Orapharyngeal Squamous Cell Carcinoma	Στοματοφαρυγγικός καρκίνος
SCC	Squamous Cell Carcinoma	Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα
NGS	Next Generation Sequencing	Αλληλουχία επόμενης γενιάς
FANC	Fanconi Anemia Complementation	Συμπλήρωμα αναιμίας Fanconi
MRT	Intensity Modulated Radioation Therapy	Ακτινοθεραπεία με ρυθμιζόμενη ένταση
OSCC	Oral Squamous Cell Carcinoma	Στοματικό Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
OS	Overall Survival	Συνολική επιβίωση
NTRK	Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase	Νεαροτροφική Κινάση
TMB	Tumor Mutation Burden	Επιβάρυνση μετάλλαξης όγκου
WES	Whole Exome Sequencing	Ολοκληρωμένη ανάλυση επόμενης γενιάς
MSI	Microsatellite Instability	Μικροδορυφορική αστάθεια
FFPE	Formalin Fixed Paraffin-Embedded	Φορμόλη σε σταθερή Παραφίνη
VAF	Variant Allele Frequency	Συχνότητα παραλλαγής Αλληλόμορφων

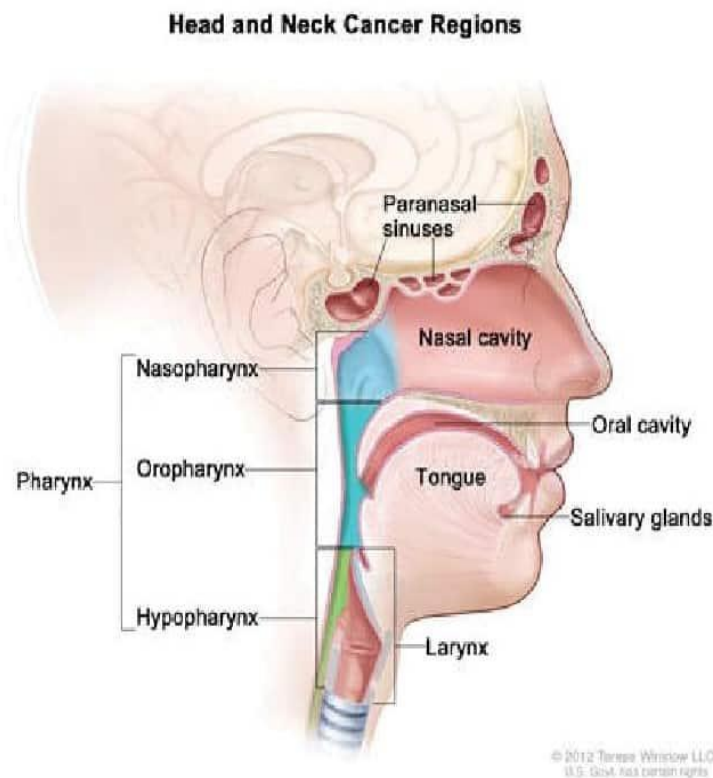
Πρόλογος

Ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου είναι ο έβδομος σε συχνότητα εμφάνισης παγκοσμίως, με περισσότερες από 660. 000 νέες περιπτώσεις και 325. 000 θανάτους ετησίως. Περίπου το 90% των νεοπλασμάτων (Head and Neck Cancer, HNC) εμφανίζονται στο πλακώδες επιθήλιο, στις περιοχές της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα και του λάρυγγα και ταξινομούνται ως ακανθοκυτταρικά καρκινώματα.

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στο ζήτημα του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου και συγκεκριμένα στις μεταλλάξεις αυτού. Το προφίλ των μεταλλάξεων των καρκινικών σειρών αναλύεται μέσω (Next generation sequencing, NGS). Η εργασία στηρίζεται τόσο στην ανασκόπηση της υπάρχουσας διεθνούς βιβλιογραφίας όσο και στην προσωπική έρευνα και βάσεις δεδομένων. Η βιβλιογραφική ανασκόπηση βοηθάει τον αναγνώστη να πληροφορηθεί για τα επιδημιολογικά δεδομένα, τους αιτιολογικούς παράγοντες και τους κύριους μοριακούς μηχανισμούς που εμφανίζονται στις διάφορες μορφές καρκίνου κεφαλής και τραχήλου. Δίνεται επίσης έμφαση σε θεραπευτικές μεθόδους για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, που περιλαμβάνουν εκτός των άλλων την ακτινοθεραπεία, τη χημειοθεραπεία, τους αναστολείς EGFR και την ανοσοθεραπεία. Η αξιοποίηση του NGS συμβάλλει στην ιατρική ακρίβεια διάγνωσης των μορφών καρκίνου κεφαλής και τραχήλου, εντοπίζοντας και αναλύοντας τις διάφορες μεταλλάξεις. Η ερευνητική εργασία παρουσιάζει αναλυτικά τον σκοπό της μελέτης, τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε. Επίσης παρουσιάζονται τα κυριότερα ευρήματα της μελέτης, που θα οδηγήσουν στα τελικά συμπεράσματα της εργασίας. Παρατίθεται λίστα με τις βιβλιογραφικές πηγές που χρησιμοποιήθηκαν.

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Τα πλακώδη κύτταρα είναι ένας τύπος κυττάρων που μπορούν να συσχετιστούν με τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου. Πιο αναλυτικά τα πλακώδη κύτταρα καλύπτουν την επιφάνεια των βλεννογόνων της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινική κοιλότητα, στοματική κοιλότητα, στοματοφάρυγγα, λάρυγγα, και των άλλων συναφών ανατομικών περιοχών). Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα είναι ένας καρκίνος που αναπτύσσεται και μπορεί να επηρεάσει περιοχές όπως τους σιελογόνους αδένες, τα ιγμόρεια, και άλλα μέρη της κεφαλής και του τραχήλου, είναι λιγότερο συνηθισμένος από άλλες μορφές καρκίνου, συνήθως εξαπλώνεται τοπικά και σπάνια στους λεμφαδένες του λαιμού ειδικά όταν ο όγκος είναι μικρός (28).



Εικόνα 1. Περιοχές που εμφανίζεται ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου. Χαρακτηριστικά στην θέση των παραρρινίων κόλπων, της ρινικής κοιλότητας, της στοματικής κοιλότητας, της γλώσσας, των σιελογόνων αδένων, του λάρυγγα και του φάρυγγα, επίσης του ρινοφάρυγγα, του στοματοφάρυγγα και του υποφάρυγγα.

Πηγή: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet#what-are-cancers-of-the-head-and-neck>

1. Επιδημιολογία

Τα στατιστικά της συχνότητας εμφάνισης και θνησιμότητας του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου δείχνουν μια σημαντική αύξηση την τελευταία δεκαετία ειδικά η περίπτωση του καρκίνου του στοματοφάρυγγα τόσο στο Ηνωμένο Βασίλειο όσο και παγκοσμίως, όπου σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοόλ, και τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων. Η αύξηση των ποσοστών επίπτωσης, νοσηρότητας και θνησιμότητας του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου αποτελεί μείζον πρόβλημα στη δημόσια υγεία παγκοσμίως, ενδεχομένως λόγω παραγόντων όπως ο αυξημένος αριθμός καπνιστών στις ανεπτυγμένες χώρες, ωστόσο η πρόληψη και η ενημέρωση για τους παράγοντες κινδύνου είναι σημαντικές προκειμένου να μειωθεί η συχνότητα εμφάνισης και οι αρνητικές επιπτώσεις του.

Ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου είναι πράγματι μια σοβαρή παγκόσμια υγειονομική πρόκληση με τον αριθμό των περιστατικών να φτάνει 660. 000 και 325. 000 θανάτους ετησίως (14), με αποτέλεσμα να ταξινομείται στην έκτη θέση ανάμεσα στους πιο συχνούς καρκίνους που εμφανίζονται παγκοσμίως, το 2018 καταγράφηκαν 890. 000 νέοι ασθενείς και 450.000 θάνατοι, με χαρακτηριστικά πιο υψηλό κίνδυνο εμφάνισης HNSCC στους άνδρες, ενώ το 2020 τα αντίστοιχα ποσοστά του HNSCC ήταν περίπου 750. 000 νέοι ασθενείς και 360.000 θάνατοι (10).

Ο καθορισμός του τύπου καρκίνου είναι σημαντικός για τον προσδιορισμό της κατάλληλης θεραπείας. Το 90% των περιπτώσεων καρκίνου κεφαλής και τραχήλου αφορά το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα. Ο καρκίνος του στόματος εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα συγκεκριμένα στις περιοχές της Νοτιοανατολικής Ασίας και Ασίας-Ειρηνικού όπου έχει αποδειχτεί ότι σχετίζεται με το μάσημα ενός καρπού που ονομάζεται (betelquid), αντίθετα στις ΗΠΑ και στην Ευρώπη η αύξηση του καρκίνου εμφανίζεται κυρίως στις περιοχές του στοματοφάρυγγα άλλα λόγω διαφορετικών παραγόντων που σχετίζονται με τις αρνητικές επιπτώσεις του καπνίσματος, αλλά και τον ιό HPV. Αυτή η τάση αύξησης εμφάνισης του καρκίνου του στοματοφάρυγγα που σχετίζεται με τον ιό HPV είναι πράγματι αξιοσημείωτη και έχει επισημανθεί από πολλούς ερευνητές. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης καρκίνων που σχετίζονται με τον ιό HPV του στοματοφάρυγγα έχει παρατηρηθεί σε πολλές χώρες όπως οι ΗΠΑ, ο Καναδάς, το Χονγκ Κονγκ και η Κορέα. Αυτό έχει οδηγήσει σε προβλέψεις ότι τα περισσότερα κρούσματα HNC θα είναι σχετιζόμενα με

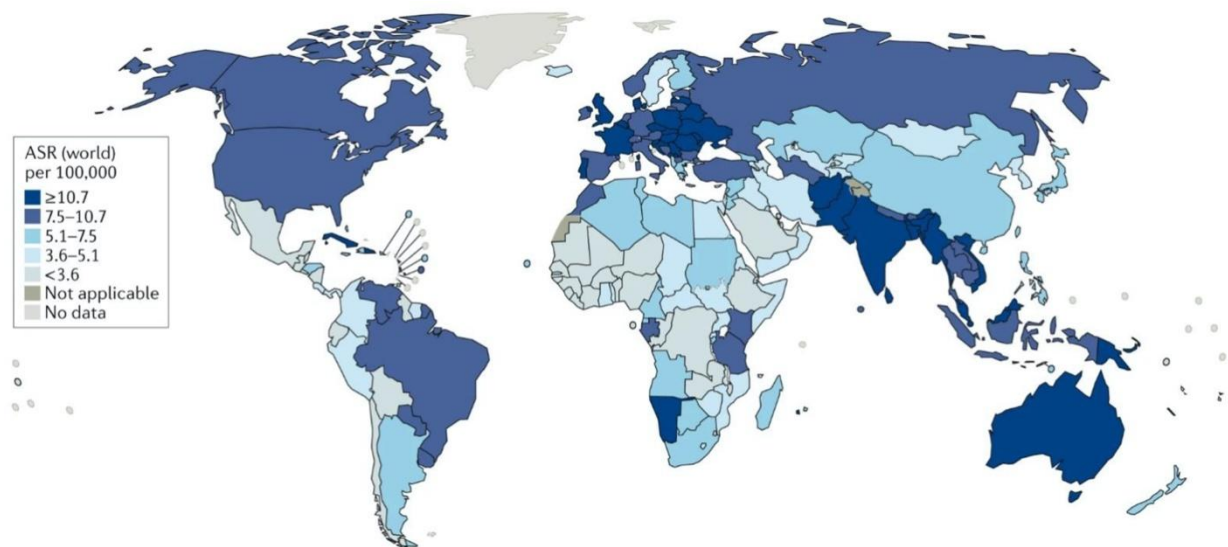
τον HPV (ιός ανθρωπίνων θηλωμάτων) μέσα στα επόμενα 20 χρόνια. Αυτή η τάση απαιτεί λήψη περαιτέρω προληπτικών μέτρων και εκσυγχρονισμένες θεραπείες. Επιπλέον, φαίνεται πολύ ανησυχητικό το γεγονός ότι οι καρκίνοι του λάρυγγα αυξήθηκαν κατά 23% τα τελευταία δέκα χρόνια (14).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ηλικιακή ομάδα που σχετίζεται με τη συχνότερη εμφάνιση καρκίνου κεφαλής και τραχήλου. Η μέση συχνότερη ηλικία εμφάνισης είναι περίπου στα 66 έτη σε περιπτώσεις που δεν υπάρχει ιογενής αιτιολογία, ενώ όταν η καρκινογένεση σχετίζεται με τον EBV και HPV είναι σε νεότερες ηλικίες, περίπου στα 50-53 έτη. Σύμφωνα με αποτελέσματα επιδημιολογικής παρατήρησης τις τελευταίες τρεις δεκαετίες η επιβίωση του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου έχει βελτιωθεί σημαντικά, για παράδειγμα η 5ετής επιβίωση αυξήθηκε από 55% από την περίοδο 1992-1996 σε 66% κατά την περίοδο 2002-2006 (21). Είναι σημαντικό να παρακολουθείται η εξέλιξή του και οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα εμφάνισής του σε διάφορες περιοχές του κόσμου. Οι άνδρες φαίνεται να επηρεάζονται 2 η 4 φορές περισσότερο από τις γυναίκες με αποτέλεσμα να φτάνουν από 20. 000 σε 100. 000, υπάρχει όμως μια μείωση της συχνότητας εμφάνισης σε ορισμένες χώρες και μια αύξηση σε άλλες, αυτό είναι ένα ενδιαφέρον στοιχείο που αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Ωστόσο, η εμφάνιση του καρκίνου του στόματος και του στοματοφάρυγγα τα τελευταία χρόνια έχει μειωθεί σημαντικά στους άντρες σε συγκεκριμένες χώρες όπως στη Γαλλία -12, 6 %, στη Σλοβακία -4%, στην Ισπανία -10, 8%, στη Βραζιλία -26, 7% και στο Χονγκ Κονγκ -10, 5% ενώ αντίθετα στο Ηνωμένο Βασίλειο αυξήθηκε κατά 18, 8%, στην Αυστραλία 8, 7%, στην Ιαπωνία 21, 3% και στις ΗΠΑ 3. 7% Μελέτες έχουν δείξει ότι μεταξύ της χρονολογίας 1995 έως 2011 στο Ηνωμένο Βασίλειο η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του στοματοφάρυγγα έχει αυξηθεί σημαντικά, κατά 7, 3% για τους άνδρες και 6, 5% για τις γυναίκες ενώ για τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας εμφανίζει αύξηση κατά 2, 8% τους άνδρες και 3, 0 % στις γυναίκες. Μια μελέτη για τον καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου στο Ηνωμένο Βασίλειο ανέφερε ότι το 58, 5% των περιστατικών διαγνώστηκαν με στάδιο καρκίνου 3 και 4 σύμφωνα με τον Atlas TNM. Πιο αναλυτικά, το στάδιο 4 συνήθως υποδηλώνει μεγάλη επέκταση του καρκίνου στη στοματική κοιλότητα και στον στοματοφάρυγγα, ενώ το στάδιο 1 είναι πιο κοινό στον καρκίνο του λάρυγγα (14).

Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι οι νεότερες γυναίκες σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες μπορεί να έχουν αυξημένη τάση για κατανάλωση καπνού και αλκοόλ, που ενδέχεται

να σχετίζεται με την αύξηση των κρουσμάτων σε αυτήν την ομάδα. Ο ιός ανθρώπινων θηλωμάτων HPV τύπου 16 είναι ένας από τους πιο επικίνδυνους παράγοντες για την εμφάνιση καρκίνου του στοματοφάρυγγα και ο τρόπος μετάδοσης του μπορεί να γίνει μέσω στοματικής σεξουαλικής επαφής (14). Επιπλέον, οι γενετικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τον κίνδυνο εμφάνισης κυρίως του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας και HNSCC.



Global incidence of head and neck squamous cell carcinoma

Εικόνα 2. Τα εκτιμώμενα ποσοστά ηλικίας (ASR) της επίπτωσης του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) παγκοσμίως παρουσιάζονται για άνδρες και γυναίκες στην εικόνα (οι αντομικές περιοχές που εντοπίζεται ο καρκίνος είναι χαρακτηριστικά στον υποφάρυγγα, λάρυγγα, χείλη, στοματική κοιλότητα, ρινοφάρυγγα και στοματοφάρυγγα)

Πηγή: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33243986/>

2. Αιτιολογικοί παράγοντες

2. 1 Χρήση αλκοόλ και καπνού

Ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου είναι το ενεργητικό και παθητικό κάπνισμα, ιδιαίτερα στη στοματική και φάρυγγική κοιλότητα. Η πιθανότητα εμφάνισης του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος αυξάνεται όταν συνδυάζεται η χρήση αλκοόλ και καπνού (29).

2. 2 Ιοί (HPV /EPSTEIN-BARR)

Ο ιός HPV και συγκεκριμένα ο τύπος 16 έχει την ικανότητα να προκαλέσει καρκίνωμα στη στοματοφαρυγγική κοιλότητα. Το καρκίνωμα οφείλεται τις περισσότερες φορές στον τύπο 16 χαρακτηρίζεται για το μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας περίπου $\frac{3}{4}$ όπως αναφέρθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες. Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) περιλαμβάνει πάνω από 170 διαφορετικούς τύπους ιών, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν το επιθήλιο του ανθρώπινου σώματος (33). Ορισμένοι από αυτούς τους τύπους HPV μπορούν να προκαλέσουν μολύνσεις που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου. Πράγματι, ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με καρκίνους του στόματος και του λαιμού, ειδικά με τους καρκίνους του στοματοφάρυγγα. Οι επιδημιολογικές κλινικές μελέτες και αναλύσεις μοριακών χαρακτηριστικών βοηθάει στην κατανόηση της εξέλιξης και της αντιμετώπισης αυτών των μορφών καρκίνου. Το πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) είναι μια ομάδα κακοηθιών που επηρεάζουν διάφορες περιοχές του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, όπως ο ρινοφάρυγγας, οι παραρρινιοί κόλποι, η στοματική κοιλότητα, ο στοματοφάρυγγας και ο υπολάρυγγας. Τις τελευταίες δεκαετίες, ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) έχει άμεση συσχέτιση όχι μόνο με καρκίνους όπως αυτούς του στοματοφάρυγγα (OPSCC), αλλά και με άλλους καρκίνους της κεφαλής και του τραχήλου.

Τα στατιστικά δεδομένα δείχνουν ότι οι καρκίνοι της στοματικής κοιλότητας και του λάρυγγα (HNSCC) είναι συχνότεροι σε εμφάνιση παγκοσμίως. Οι επίπτωση και η θνησιμότητα από αυτούς τους καρκίνους φαίνεται να είναι υψηλότερες στην Ευρώπη συγκριτικά με τις ΗΠΑ. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως οι διαφορές όσον αφορά τη διατροφή, τον τρόπο ζωής, τη γενετική προδιάθεση ή και διάφορες πρακτικές στον τομέα της υγείας. Όσον αφορά τον HNSCC (Καρκίνος της Κεφαλής και του Τραχήλου) φαίνεται να υπάρχει μεγαλύτερη προδιάθεση προς εμφάνιση και ανάπτυξη σε άνδρες με ποσοστά επιπλοκής περίπου από 2 έως 4 φορές πιο υψηλά σε σύγκριση με τις γυναίκες. Η διάγνωση συνήθως εμφανίζεται σε ηλικίες μεταξύ 50 και 70 ετών (33).

- **HPV –αρνητικό ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα Κεφαλής και Τραχήλου**

Το HPV αρνητικό δείχνει ότι η εμφάνιση καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου (HNSCC) δεν σχετίζεται με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). Συνήθως όμως συνδέεται με χαμηλότερη κοινωνικοοικονομική κατάσταση και με χαμηλότερα επίπεδα στοματικής

υγιεινής (33). Ο καπνός είναι ένας επικίνδυνος παράγοντας που έχει την δυνατότητα να προκαλέσει γονιδιακές αλλοιώσεις, με αποτέλεσμα η κατανάλωση καπνού να είναι ένας επίσης σημαντικός παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, {HPV-αρνητικό καρκίνο κεφαλής και του τραχήλου (HNSCC)}. Ο καπνός περιέχει 5000 διαφορετικές χημικές ουσίες που έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκινικών κυττάρων. Η μακροχρόνια έκθεση σε αυτές τις ουσίες μπορεί να αυξήσει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

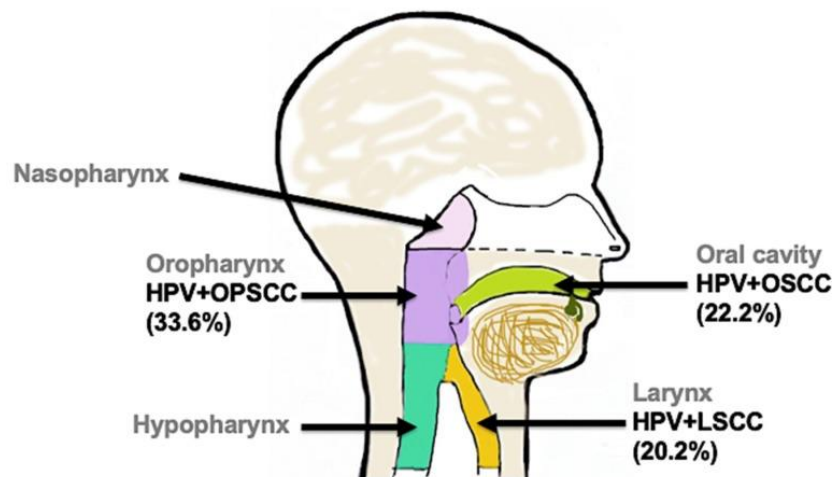
Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) αποτελούν ομάδα χημικών ουσιών που συχνά σχετίζονται με τις καρκινογόνες επιδράσεις του καπνίσματος. Οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες συμπεριλαμβάνουν βενζο (α)πυρένιο, νιτροζαμίνες, 4-(μεθυλνιτροζαμίνης)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη και N-νιτροσονορνικοτίνη. Οι μεταβολίτες ορισμένων καρκινογόνων ουσιών μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές αλλαγές στο DNA, οδηγώντας σε μεταλλάξεις που μπορούν να προκαλέσουν γενετικές ανωμαλίες. Επίσης, μπορεί να επηρεάζεται η ισορροπία μεταξύ μεταβολικής δραστηριότητας, αποτοξίνωσης και επιδιόρθωσης του DNA στον οργανισμό. Τέλος η χρήση προϊόντων καπνού συνδέεται με φλεγμονή στους ιστούς. Η φλεγμονή μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή κυτοκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων που συνδέονται με τον πολλαπλασιασμό της αγγειογένεσης, προκαλώντας πιθανά προβλήματα καρκινογένεσης (21). Η μεταβολική ενεργοποίηση καρκινογόνων ουσιών μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό μεταβολιτών που μπορούν να προκαλέσουν την σύνδεση μεγάλου μεγέθους χημικών ομάδων στο DNA, ενδεχομένως οδηγώντας σε καρκίνο.

Η ακριβής και πιστή αποκατάσταση της βλάβης του DNA μπορεί να μειώσει τις συνέπειες, αντιθέτως η ανεπαρκής ή λανθασμένη επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμες αλλαγές όπως μεταλλάξεις, διαγραφές ή προσθήκες στο γενετικό υλικό με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί συσσώρευση μεταλλάξεων σε ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως Trp53 και CDKN2A και σε μονοπάτια σηματοδότησης (όπως φωσφοϊνοσιτιδική 3-κινάση (PI3K)–AKT–mTOR και RAS–MAPK γονίδια οδού) που συνδέεται με την εξέλιξη της νόσου (21). Οι ασθενείς που πάσχουν από την συγκεκριμένη νόσο και με τις μεταλλάξεις αυτές έχουν την τάση για δυσμενή πρόγνωση. Οι τυπικές προσεγγίσεις φροντίδας για τους ασθενείς με καρκίνο HPV-αρνητικό περιλαμβάνουν τη χρήση σισπλατίνης και ακτινοβολίας στην θεραπεία τους (33).

- **HPV- θετικό ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα Κεφαλής και Τραχήλου**

Το HPV-θετικό έχει την δυνατότητα να προκαλέσει στοματοφαρυγγικό καρκίνωμα, το οποίο έχει αποδειχτεί ότι έχει καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με το HPV-αρνητικό καρκίνωμα. Συνήθως ανταποκρίνεται καλύτερα σε θεραπείες όπως η ακτινοθεραπεία και τα αντικαρκινικά φάρμακα, με υψηλότερες πιθανότητες επιβίωσης. Το OPSCC (στοματοφαρυγγικό καρκίνωμα) αποτελεί ένα μεγάλο ποσοστό των περιστατικών HNSCC (καρκίνος της κεφαλής και του τραχήλου) (33). Τονίζεται ότι η λοίμωξη από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνων κεφαλής και τραχήλου (HNC), όπως χαρακτηριστικά το στοματικό ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, το στοματοφαρυγγικό πλακώδες καρκίνωμα και τον ακανθοκυτταρικό καρκίνο του λάρυγγα.

Εξωτερικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του HPV-σχετιζόμενου καρκίνου, επηρεάζοντας την ισχύ του ανοσοποιητικού συστήματος (40). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο εμβολιασμός κατά του HPV έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός στην πρόληψη των όγκων του στοματοφάρυγγα που σχετίζονται με τον ιό. Η χρήση εγκεκριμένων εμβολίων HPV, κυρίως εναντίον των στελεχών HPV-16 και HPV- 18, συνιστά σημαντικό βήμα για την προστασία από τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του στοματοφάρυγγα. Η μετάδοση του HPV, μπορεί να οδηγήσει σε HNSCC, το οποίο συμβαίνει συχνά μέσω στοματικού σεξ. Η αύξηση των περιστατικών HPV-θετικού HNSCC αναδεικνύει πόσο σημασία έχει ο εμβολιασμός κατά του HPV για την πρόληψη του καρκίνου και την μείωση του (21). Το εμβόλιο HPV είναι σχεδιασμένο για να προστατέψει ενάντια του ιού ανθρώπινων θηλωμάτων προσφέροντας προστασία τόσο για τον τράχηλο της μήτρας όσο και για τον καρκίνο του στοματοφάρυγγα. Η εμβολιαστική σειρά σύμφωνα με το CDC ξεκινά συνήθως σε ηλικία 11 έως 12 ετών , άλλα μπορεί να δοθεί και σε ενήλικες έως 26 ετών, η έγκριση εμβολιασμού μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου που σχετίζεται με τον ιό HPV (18).



Εικόνα 3. Κατανομή καρκίνων κεφαλής και τραχήλου που σχετίζονται με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV+ HNC).

Πηγή: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31600915/>

2. 3 Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα Κεφαλής και Τραχήλου σχετιζόμενο με τον ιό Epstein-Barr (EBV)

Ο ιός EBV παίζει μεγάλο ρόλο στον καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου, συγκεκριμένα στις περιοχές (φάρυγγα, λάρυγγα, ρινοφάρυγγα, στοματοφάρυγγα, στοματική και ρινική κοιλότητα, και σιελογόνους αδένες) (12).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου της ρινοφαρυγγικής κοιλότητας (Nasopharyngeal Carcinoma, NPC) διακρίνεται σε 3 τύπους. Ο τύπου 1 ονομάζεται ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (SCC), ο τύπου 2 (μη κερατινοποιητικά καρκινώματα) και ο τύπου 3 αδιαφοροποίητα ή λεμφοεπιθηλιώματα και αναπλαστικά καρκινώματα. Σχετικά με το αποτέλεσμα της μελέτης που διερευνήθηκε για τον ιό EBV, αποδείχθηκε ότι οι όγκοι που δημιουργούνται οφείλονται στον τύπο 2 και 3 με ποσοστό 85% ανάμεσα σε 114 ασθενείς, και 16% που προκαλούνται από το τύπου 1 ανάμεσα σε 37 ασθενείς (37).

Ο ιός Epstein -Barr συνδέεται εδραιωμένα με τις κακοήθειες της κεφαλής και του τραχήλου, συγκεκριμένα στο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα (NPC) και του λεμφώματος Burkitt, σύμφωνα με τις γονιδιακές μελέτες έκφρασης στα οποία ανιχνεύτηκε μεγάλο ιικό φορτίο DNA (37). Η ακριβής θεραπεία για το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα NPC εξαρτάται από το

στάδιο της νόσου, όπως η ακτινοθεραπεία ακριβείας για πρώιμα στάδια και η συμβατική θεραπεία για προχωρημένα στάδια, που μπορεί να περιλαμβάνει χημειοακτινοθεραπεία (12).

Ο ιός Epstein-Barr είναι ένας ερπητοϊός του ανθρώπινου DNA το οποίο μολύνει σε μεγάλο ποσοστό τον ενήλικο πληθυσμό. Συνήθως η λοίμωξη εμφανίζεται στο στοματοφαρυγγικό επιθήλιο με το σύνδρομο λοιμώδους μονοκυρήνωσης, με την ικανότητα μολυνθούν τα Β λεμφοκύτταρα. Η επιμόλυνση του επιθηλίου προκαλείται από την συνεχή μόλυνση στα Β κύτταρα λόγω της αρχικής κυτταροτοξικής απόκρισης Τ κυττάρων που επικρατεί κυρίως σε λανθάνουσα φάση. Στην συνέχεια ακολουθεί και δεύτερη κυτταροτοξική απόκριση Τ κυττάρων. Συνοψίζοντας, η λανθάνουσα ιική πρωτεΐνη EBV παίζει μεγάλο ρόλο στον μετασχηματισμό των κυττάρων κατά την διάρκεια της ογκογένεσης. Το ογκογονίδιο EBNA1 εκφράζεται σε όλες τις κυρίαρχες μορφές καρκίνων, λόγω μόλυνσης από EBV και το LMP1 εκφράζεται στους τύπους λανθάνουσα χρόνου 2 και 3 που σχετίζεται με NPC και λεμφοπολλαπλασιαστική νόσο (37).

2. 4 Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα Κεφαλής και Τραχήλου σχετιζόμενο με αναιμία Fanconi
Η αναιμία Fanconi δημιουργείται από υποκείμενες γενετικές διαταραχές που έχουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου. Η αναιμία Fanconi έχει την δυνατότητα να εμφανίζει προκαρκινικές αλλοιώσεις σε μικρή ηλικία (30).

Η συγκεκριμένη αναιμία ταξινομείται σε σπάνια γενετική ασθένεια, που προκαλεί αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου της στοματικής κοιλότητας (HNSCC) και οφείλεται στην εξασθένηση της επιδιόρθωσης του DNA λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια FANC. Οι αλλαγές στα γονίδια της οδού της αναιμίας Fanconi μπορεί να συνδέονται με τον εκφυλισμό των κυττάρων και να συμβάλλουν στην ανάπτυξη καρκίνου του λαιμού και του στόματος (HNSCC). Ωστόσο, η ακριβής σχέση ανάμεσα στην αναιμία Fanconi και τον καρκίνο παραμένει ακόμη αόριστη και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα. Σύμφωνα με τις μετά-αναλύσεις η ανίχνευση πολυμορφισμών σε γονίδια απέδειξε ότι συνδέεται με τον μεταβολισμό των καρκινογόνων ουσιών και την ανοσία που μπορεί να συνδέεται με τον αυξημένο κίνδυνο καρκίνου. Τέτοιοι πολυμορφισμοί αφορούν τα γονίδια CTLA4 (rs231775 και rs4553808 II10 (1082A>G), κυτόχρωμα P450 1A1 (SV6TLYP)-τρανσφέρση μ1 (GSTM1) (21).

2. 5 Χημικά και ακτινοβολία

Ουσιαστικός παράγοντας εμφάνισης καρκίνου είναι επίσης οι χημικές ουσίες που εισπνέουν ορισμένοι λόγω έκθεσης στην εργασία, για παράδειγμα η φορμαλδεΐδη, η σκόνη νικελίου ή ξύλου. Οι αναφερόμενες ουσίες αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στους παραρρίνιους κόλπους και στην ρινική κοιλότητα. Επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που προκαλεί κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου κεφαλής και τραχήλου είναι η ηλιακή ακτινοβολία που προκαλεί καρκίνο στους σιελογόνους αδένες λόγω αυξημένης έκθεσης σε αυτήν (30).

3. Μοριακοί μηχανισμοί

Το HNSCC (καρκίνος κεφαλής και τραχήλου) αναπτύσσεται συχνά από τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου, τα οποία καλύπτουν (στοματική κοιλότητα, φάρυγγα, λάρυγγα και ρινική οδό) του επιθηλίου του κεφαλής και του τραχήλου (HNSCC). Η πορεία αυτής της νόσου συνήθως αρχίζει με την υπερπλασία επιθηλιακών κυττάρων και προχωρά σε διαδοχικά στάδια δυσπλασίας, πριν φτάσει στο στάδιο του καρκίνου *in situ* και στο διηθητικό καρκίνωμα. Σίγουρα, την ετερογένεια του HNSCC επηρεάζει το κύτταρο προέλευσης και οι αιτιολογικοί παράγοντες. Τα βλαστοκύτταρα ή προγονικά κύτταρα θεωρούνται πιθανοί πρόδρομοι των καρκινικών βλαστοκυττάρων, με ικανότητα αυτοανανέωσης και πολυδυναμίας, που μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου μέσω ογκογόνου μετασχηματισμού.

Στην παρούσα παράγραφο θα γίνει αναφορά στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53, το οποίο βρίσκεται μεταλλαγμένο περίπου στους μισούς όγκους HNSCC. Το TP53 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17p13, αποτελείται από 11 εξόνια εκ των οποίων το πρώτο είναι μη κωδικοποιημένο και αποτελείται από 393 αμινοξέα σε τέσσερις κύριες περιοχές. Η πρωτεΐνη TP53 περιλαμβάνει την κεντρική περιοχή όπου γίνεται η δέσμευση DNA, την c-τερματική περιοχή που εμπεριέχει και χωρίζεται σε 2 περιοχές, η πρώτη είναι η ρυθμιστική περιοχή και η δεύτερη ο τετραμερισμός, που επικοινωνεί με το κεντρικό τμήμα και αναστέλλει συγκεκριμένη αλληλεπίδραση πρωτεΐνης DNA. Τέλος, το N-τερματικό τμήμα που είναι η περιοχή που βοηθά στη μετενεργοποίηση της πρωτεΐνης TP53, η οποία είναι σημαντική για την ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης. Η πρωτεΐνη TP53 είναι απαραίτητη για την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την επιδιόρθωση του DNA.

Όταν ανιχνεύεται βλάβη στο DNA οι κυτταρικοί αισθητήρες ενεργοποιούν την Trp53 για την ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου, ώστε να διακόψει τον κυτταρικό κύκλο και να επιτρέψει την επιδιόρθωση της βλάβης του DNA, αν δεν πραγματοποιηθεί η επιδιόρθωση της βλάβης, το κύτταρο θα υποστεί απόπτωση. Το γονίδιο Trp53 είναι γνωστό για τον ρόλο του στην πρόληψη του καρκίνου και την διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού. Οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο μπορούν να συνδεθούν με πρόωρη εμφάνιση καρκίνου κεφαλής και τραχήλου. Ο καρκίνος της στοματικής κοιλότητας προκαλεί δυσπλαστικές βλάβες με αποτέλεσμα τα ποσοστά αλλοιώσεων να έχουν αυξηθεί από 15% σε 27% των περιπτώσεων. Η παρουσία των μεταλλάξεων του Trp53 έχει την ικανότητα να καθοδηγήσει την εξέλιξη της ιστολογικής κακοήθειας από πρώιμο καρκίνο σε διηθητικό καρκινώμα (24).

Η υψηλή αστάθεια που εμφανίζει το HNSCC σχετίζεται με τις χρωμοσωμικές αλλαγές, όπως οι διαγραφές στις περιοχές 3p και 8p, καθώς και προσθήκες τις περιοχές 3q, 5q και 8q. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια όπως τα TP53, CDKN2A, CASP8 και NSD1, EGFR, PIK3CA, CCND1, NOTCH1, FAT1 και HRAS, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη του καρκίνου κεφαλής και του τραχήλου. Τα TP53, EGFR, PIK3CA, HRAS αφορούν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, ενώ τα CDKN2A και CCND1 ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο. Το NOTCH1 σχετίζεται με την κυτταρική διαφοροποίηση, ενώ το FAT1 αφορά την κυτταρική προσκόλληση και σηματοδότηση εισβολής (11).

Η βλάβη του DNA μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες στον κυτταρικό κύκλο. Η μετατόπιση της p53 μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης. Επιπλέον, η p16 από το CDKN2A στο 9p21 αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στη φάση S εμποδίζοντας την Κυκλίνη D1, και η έλλειψη της μπορεί να συμβάλει στη δυσπλασία λόγω ανεπάρκειας του σταδίου γήρανσης κυττάρων (11). Η ανοδική ρύθμιση ή ενεργοποίηση άλλων RTKs, όπως είναι το c-MET, μπορεί να λειτουργήσει ως μηχανισμός αντίστασης σε θεραπείες που στοχεύουν τον EGFR. Η ενεργοποίηση του c-MET σχετίζεται με αυξημένη εισβολή και μετάσταση στον καρκίνο, προωθώντας την αντίσταση στην σωστή θεραπεία. Η έρευνα σχετικά με τους ρόλους του HGF/c-MET στην εισβολή και μετάσταση του HNSCC έχει αποκαλύψει ότι η υπερέκφραση αυτών των παραγόντων σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση και χαμηλότερη συνολική επιβίωση σε ασθενείς. Το C-MET υπερεκφράζεται στη μετάσταση των λεμφαδένων, ενώ το HGF προάγει την αντίσταση για την μετάσταση από τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου στους λεμφαδένες. Αυτά τα ευρήματα αναδεικνύουν τη σημασία της κατανόησης αυτών των μηχανισμών για την αντιμετώπιση του HNSCC (1).

3. 1 Μοριακός χαρακτηρισμός των όγκων κεφαλής και τραχήλου

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) είναι συχνή η αδρανοποίηση ορισμένων γονιδίων, όπως τα CDKN2A και p53 που μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του. Οι μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια μπορούν να οδηγήσουν σε ανάπτυξη καρκίνου σε πρώιμα στάδια επίσης είναι χρήσιμο να τονιστεί ότι οι μοριακοί βιοδείκτες, όπως τα CD44, CD133 και ALDH1, έχουν προταθεί για την ανίχνευση των HNSCC, CSCs και έχουν επικυρωθεί για τον ρόλο τους σε προγνωστική σημασία. Οι έρευνες έχουν δείξει συσχετίσεις μεταξύ αυτών των βιοδεικτών και της εξέλιξης της νόσου, αλλά η χρήση τους ως προγνωστικοί δείκτες χρειάζονται περαιτέρω ερευνητική διερεύνηση (21).

Τα κύτταρα HNSCC (καρκίνος κεφαλής και τραχήλου) με υψηλά επίπεδα CD44 έχουν συνδεθεί με ικανότητα αυτοανανέωσης και μπορεί να σχετίζονται με την μετάσταση και την κακή πρόγνωση σε όγκους HNSCC. Η CD44 είναι μία διαφορετική εκδοχή μίας πρωτεΐνης που μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και την πρόοδο του καρκίνου ομοίως και η πρωτεΐνη CD133 που έχει συνδεθεί με διάφορες διεισδυτικές ιδιότητες και έχει προκαλέσει μετάσταση σε διάφορους τύπους καρκίνου (21). Το HRAS είναι ένα από τα τρία γονίδια της οικογένειας RAS και εμφανίζει ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στον καρκίνο της κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) με συχνότητα 6, 3%. Υπάρχουν ερευνητικές ενδείξεις ότι η αναστολή της φαρνεσυλτρανσφεράσης μπορεί να επιδρά ετικά σε μεταλλαγμένες πρωτεΐνες RAS, όπως HRAS, αναστρέφοντας τις επιπτώσεις των μεταλλάξεων και επαναφέροντας τη λειτουργικότητά τους. Είναι ενδιαφέρον να αναφέρουμε ότι το Tirifarnib έχει εμφανίσει υψηλή αντινεοπλασματική δράση σε προχωρημένους όγκους με μεταλλάξεις που ενεργοποιούν το HRAS σε φάση II μελέτη (27).

Ο υποδοχέας αυξητικού παράγοντα ErbB, όπως ο EGFR, παίζει κρίσιμο ρόλο στη βιολογία του καρκίνου της κεφαλής και τραχήλου (SCCHN), ωστόσο η υπερέκφραση η υπερδραστηριότητα του EGFR σχετίζεται με την ανάπτυξη και την εξάπλωση του καρκίνου. Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας ενεργοποιεί τον υποδοχέα κινάση τυροσίνης, προκαλώντας ποικίλα μονοπάτια που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, το μεταστατικό δυναμικό και την αγγειογένεση στα κύτταρα. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης EGFR συνδέεται με κακή έκβαση σε περισσότερες από το 90% των περιπτώσεων Καρκίνου Κεφαλής και Τραχήλου. Η επιτυχής θεραπεία έχει προκύψει από τη στόχευση αυτού του υποδοχέα (2).

Το ALDH1 είναι ένα ενδοκυτταρικό ένζυμο που συμμετέχει στη μετατροπή της ρετινόλης σε ρετινοϊκό οξύ, παίζοντας ρόλο στην αποτοξίνωση, επίσης είναι ένας δείκτης για τα κανονικά βλαστοκύτταρα και τα CSC (κύτταρα καρκίνου με στελέχωση). Η υψηλή έκφρασή του σχετίζεται με αυτοανανέωση, εισβολή και μετάσταση, μπορεί να έχει προγνωστική σημασία στον καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου (HNSCC), επιπλέον τα κύτταρα HNSCC έχουν την δυνατότητα να εκφράζουν αυξημένο ποσοστό στα βλαστοκύτταρα OCT3, OCT4, SOX2 και NANOG. Το επίπεδο αύξησης των πρωτεϊνών σχετίζεται με τον βαθμό καρκινώματος στην στοματική κοιλότητα που βρίσκονται σε μικρή απόσταση <100 μm με τα αιμοφόρα αγγεία (21).

Είναι κοινά επιστημονικά αποδεκτό ότι οι ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις ανακαλύπτουν το περίπου 80% των όγκων HNSCC που έχουν ALDH1 οι οποίες είναι σημαντικές για την κλινική κατανόηση ευρημάτων. Η ανάπτυξη πρωτοπαθών όγκων (SPTs) είναι ένα σημαντικό φαινόμενο που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη διάγνωση και την αντιμετώπιση του HNSCC, αντιθέτως solitary pulmonary tumors (SPT) εμφανίζονται σε αυξημένο επίπεδο στην αρχή των πρωτοπαθών όγκων τα οποία είναι διακριτά στις ανατομικές θέσεις της κεφαλής και του τραχήλου (21).

4. Θεραπεία καρκίνου κεφαλής και τράχηλου

4.1 Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία είναι μια θεραπευτική μέθοδος που χρησιμοποιεί ακτίνες υψηλής ενέργειας για την καταστροφή καρκινικών κυττάρων. Συνήθως απαιτεί πολλαπλές συνεδρίες σε ένα συγκεκριμένο χρονικό πλαίσιο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες, όπως η χειρουργική επέμβαση ή η χημειοθεραπεία, για την καλύτερη αντιμετώπιση του καρκίνου, τη μείωση συμπτωμάτων ή την θεραπεία της νόσου. Ωστόσο η προετοιμασία πριν από την ακτινοθεραπεία είναι σημαντική, καθώς η φροντίδα των οδοντικών προβλημάτων πριν την θεραπεία μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο επιπλοκών, διότι η ακτινοθεραπεία μπορεί να επηρεάσει την υγεία των δοντιών και του στόματος. Οι παρενέργειες μπορεί να περιλαμβάνουν τερηδόνα, ξηρότητα του στόματος και ευαισθησία στα ούλα. Η συχνές επισκέψεις στον οδοντίατρο πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την ακτινοθεραπεία μπορούν να βοηθήσουν στη διατήρηση της υγείας του στόματος. Αυτά τα

συμπτώματα μπορεί να προκύψουν σε ασθενείς που υφίστανται ακτινοθεραπεία για καρκίνο του στόματος.

Η έγκαιρη θεραπεία ομιλίας και κατάποσης πριν από την έναρξη της ακτινοθεραπείας μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη ή την ελαχιστοποίηση των μακροχρόνιων προβλημάτων με την ομιλία και την κατάποση. Η ακτινοθεραπεία στην περιοχή της στοματικής κοιλότητας και του λαιμού μπορεί να επηρεάσει τους σιελογόνους αδένες και να προκαλέσει ξηροστομία. Η χρήση της Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT) ή άλλων μεθόδων ακτινοθεραπείας με στόχευση τη μείωση της ακτινοβολίας που κατευθύνεται στους σιελογόνους αδένες συνιστάται από την ASCO για να μειωθεί ο κίνδυνος παρενεργειών. Επίσης η ακτινοθεραπεία κεφαλής και τραχήλου μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό του δέρματος, οίδημα, πόνο στα οστά, ναυτία, κόπωση και άλλα συμπτώματα. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες μπορεί να εξαφανιστούν μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, αλλά ορισμένες όπως η απώλεια ακοής ή το λεμφοίδημα μπορεί να παραμείνουν μακροπρόθεσμα. Μια ακόμη σημαντική παρενέργεια που προκαλεί η ακτινοθεραπεία είναι στην περιοχή του αυχένα το οποίο μπορεί να επηρεάσει τον θυρεοειδή αδέν. Ο έλεγχος της λειτουργίας του θυρεοειδούς και η συζήτηση με την ομάδα υγειονομικής περίθαλψης είναι σημαντικά για την πρόληψη ή αντιμετώπιση των πιθανών παρενεργειών (17).

4. 2 Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιεί φάρμακα που επιτίθενται και εμποδίζουν την ανάπτυξη και την διαίρεση των καρκινικών κυττάρων, βοηθώντας έτσι στην εξάλειψη ή τη μείωση του καρκίνου. Κάθε σχήμα χημειοθεραπείας είναι προσαρμοσμένο στις ανάγκες του ασθενούς και τον τύπο του καρκίνου. Μπορεί να περιλαμβάνει ένα μόνο φάρμακο ή συνδυασμό πολλών, προσφέροντας τα κατάλληλα χημειοθεραπευτικά σχήματα για κάθε περίπτωση. Οι παρενέργειες της χημειοθεραπείας μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το άτομο και τη δόση που χρησιμοποιείται. Οι παρενέργειες που μπορεί να προκύψουν είναι κόπωση, κίνδυνος μόλυνσης, ναυτία και εμετός, απώλεια μαλλιών, απώλεια όρεξης και διάρροια είναι συνηθισμένες, αλλά συνήθως υποχωρούν μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας (17).

Η συνδυασμένη θεραπεία με cetuximab και χημειοθεραπεία βασισμένη σε πλατίνα έχει εγκριθεί ως θεραπεία πρώτης γραμμής για υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (HNSCC), το οποίο συμπεριλαμβάνει και την περιοχή OSCC (Oral Squamous Cell Carcinoma). Επιπλέον, το cetuximab μόνο του έχει εγκριθεί ως θεραπεία

δεύτερης γραμμής για HNSCC που είναι ανθεκτικό στην πλατίνα. Η προσθήκη του cetuximab στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα φαίνεται να συνδέεται με σημαντική επέκταση στη συνολική επιβίωση του HNSCC, από 7, 4 σε 10, 1 μήνες, καθώς και στη μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη, που αυξάνεται από 3, 3 σε 5, 6 μήνες. Το pembrolizumab και το nivolumab έχουν δείξει αποτελεσματικότητα ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με προχωρημένο squamous cell carcinoma (HNSCC), είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Αυτή η προσέγγιση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις HPV-θετικής νόσου (11).

4. 3 Στοχευμένη θεραπεία

Η στοχευμένη θεραπεία στοχεύει σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του καρκίνου, όπως γονίδια, πρωτεΐνες ή στην περιοχή των ιστών, με στόχο να εμποδίσει την ανάπτυξη και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων, ενώ παράλληλα προσπαθεί να περιορίσει την επίδραση στα υγιή κύτταρα του οργανισμού. Η στοχευμένη θεραπεία έχει ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα να εξετάζει γονίδια, πρωτεΐνες και άλλους παράγοντες στον όγκο που μπορεί να βοηθήσει τους γιατρούς να εξατομικεύσουν τη θεραπεία για κάθε ασθενή. Η εξέλιξη των ερευνών συνεχίζει να φέρνει στο φως νέες θεραπείες που έχουν συγκεκριμένους μοριακούς στόχους στον καρκίνο και άλλους όγκους. Επίσης οι μοριακές στοχευμένες θεραπείες στον καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου (HNSCC) έχουν εξελιχθεί, εστιάζοντας σε διάφορους μοριακούς στόχους όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και η 3-κινάση της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) (17).

4. 4 Αναστολείς EGFR

Τα φάρμακα που στοχεύουν τον υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) έχουν χρησιμοποιηθεί στην θεραπεία ορισμένων τύπων καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου. Αυτά τα φάρμακα μπορούν να επιβραδύνουν την ανάπτυξη του καρκίνου ή βοηθούν στην αντιμετώπισή του (17). Η αναστολή του EGFR στην θεραπεία HNSCC συχνά επιτυγχάνεται μέσω φαρμάκων που επιδρούν είτε στην εξωκυτταρική περιοχή του EGFR, διακόπτοντας τη σύνδεσή του με προσδέματα υποδοχέων, είτε στην κυτταροπλασματική περιοχή εμποδίζοντας την αυτοφωσφορυλίωσή του. Αυτή η παρέμβαση επηρεάζει την απόπτωση των κυττάρων, εμποδίζοντας την ανάπτυξη του καρκίνου. Το cetuximab αποτελεί ένα σημαντικό μονοκλωνικό αντίσωμα στο πλαίσιο της θεραπείας του καρκίνου, δεσμεύοντας τον τομέα III

του EGFR. Η δράση του βασίζεται στην απόπτωση και την αναστολή του πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης του καρκίνου, παρέχοντας σημαντικά κλινικά οφέλη στον ασθενή (13).

Το cetuximab αποτελεί μια υποσχόμενη θεραπεία για τον καρκίνο της κεφαλής και τραχήλου (HNSCC), καθώς αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του EGFR, αποτρέποντας τη μετάδοση σημάτων στο κύτταρο. Ο συνδυασμός με ακτινοθεραπεία έχει δείξει αύξηση στον διάμεσο χρόνο επιβίωσης (OS) και στον χρόνο προόδου της νόσου (PFS), οδηγώντας στην έγκρισή του από το USFDA το 2006 για την θεραπεία HNSCC. Η έρευνα με τα μονοκλωνικά αντισώματα EGFR, όπως το ranitumumab, το zalutumumab και το nimotuzumab, συνεχίζεται με την αξιολόγησή τους ως πιθανές μονοθεραπείες ή συνδυαστικές θεραπείες σε κλινικές δοκιμές. Τα ευνοϊκά, αλλά περιορισμένα αποτελέσματα σε ασθενείς με HNSCC υπογραμμίζουν τη σημασία της συνεχούς έρευνας για να κατανοηθεί πλήρως η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια αυτών των θεραπειών (13).

4. 5 Θεραπείες για επαναπρογραμματισμό του καρκίνου

Η λαροτρεκτινίμη και η εντρεκτινίμη ανήκουν στην κατηγορία των φαρμάκων που λέγονται θεραπείες επαναπρογραμματισμού του καρκίνου. Αυτά τα φάρμακα στοχεύουν τη γενετική αλλαγή στα γονίδια (Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase, NTRK) που μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη καρκίνου κεφαλής και τραχήλου. Η παρουσία αυτής της γενετικής αλλαγής συσχετίζεται με μια υποομάδα καρκίνων των σιελογόνων αδένων, που ονομάζονται εκκριτικά καρκινώματα και επιτρέπει την αποτελεσματική χρήση αυτών των φαρμάκων σε ασθενείς με αυτόν τον τύπο καρκίνου. Η λαροτρεκτινίμη και η εντρεκτινίμη είναι φάρμακα που έχουν εγκριθεί για την θεραπεία όγκων που φέρουν γενετική ανωμαλία στο NTRK, ιδίως σε περιπτώσεις που ο όγκος είναι μεταστατικός ή δεν μπορεί να αφαιρεθεί με χειρουργική επέμβαση (17).

4. 6 Ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού για να αναγνωρίσει και να επιτεθεί στα καρκινικά κύτταρα, βοηθώντας έτσι στην καταπολέμηση του καρκίνου. Τα δύο φάρμακα που έχουν εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία υποτροπιάζοντος, ή μεταστατικού ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου, είναι το Pembrolizumab (Keytruda) και το Nivolumab (Opdivo) (17).

Το Pembrolizumab χρησιμοποιείται είτε μόνο του, είτε σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, ειδικά σε περιπτώσεις όπου ο καρκίνος εκφράζει υψηλά επίπεδα PD-L1, ή σε περιπτώσεις όπου η ανάπτυξη του καρκίνου συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας με πλατινούχα αντικαρκινικά φάρμακα. Για την χορήγηση ανοσοθεραπείας συνεκτιμάται επίσης η κλινική κατάσταση του ασθενούς και τα χαρακτηριστικά του καρκίνου (17).

Η θεραπεία πρώτης γραμμής με pembrolizumab αποτελεί επιλογή για ασθενείς με όγκους που εκφράζουν υψηλά επίπεδα PD-L1 ή μικροδορυφορική αστάθεια, εκτός αν υπάρχει ένδειξη υποκείμενης αυτοάνοσης διαταραχής. Σύγχρονες κλινικές μελέτες απέδειξαν ότι ο συνδυασμός ανοσοθεραπείας (με βάση το pembrolizumab) και χημειοθεραπείας προσφέρει περισσότερο όφελος στον ασθενή σε σχέση με την συνδυαστική χορήγηση χημειοθεραπείας και cetuximab. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη διάρκεια επιβίωσης και συγκρίσιμα αποτελέσματα ανταπόκρισης και τοξικότητας. Επίσης, σε ασθενείς με υψηλή έκφραση PD-L1, η μονοθεραπεία με pembrolizumab έδειξε υψηλότερη επιβίωση σε σχέση με τη χημειοθεραπεία συν cetuximab, αν και η ανταπόκριση ήταν υψηλότερη με τον συνδυασμό των δύο θεραπειών (9). Με βάση τις νεότερες κλινικές έρευνες, το pembrolizumab σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία είναι προτιμώμενο για μεγαλύτερους όγκους με υψηλή έκφραση, ενώ η μονοθεραπεία καταπολεμά τους χαμηλότερους όγκους με υψηλή έκφραση PD-L1 (21).

Το nivolumab είναι ένας τύπος ανοσοθεραπείας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ορισμένους τύπους καρκίνου. Συνήθως, η χρήση του εξετάζεται είτε ως πρώτη γραμμή θεραπείας είτε ως μέρος της δεύτερης γραμμής θεραπείας, κυρίως εάν η νόσος εξελίσσεται κατά τη διάρκεια ή μετά από προηγούμενη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα (17).

5. Ιατρική Ακρίβειας στον Καρκίνο Κεφαλής και Τραχήλου με χρήση του NGS

Ο προσδιορισμός αλληλουχίας επόμενης γενιάς NGS είναι ο όρος που περιγράφει την πιο σύγχρονη τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας DNA, που σχετίζεται με την γονιδιωματική έρευνα (15). Η εφαρμογή της τεχνολογίας αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) στην έρευνα και θεραπεία του καρκίνου ανοίγει νέες προοπτικές καθώς επιτρέπει τον εντοπισμό νέων μεταλλάξεων και παρέχει στοιχεία για εξατομικευμένες θεραπείες, ενισχύοντας έτσι την

κλινική ογκολογία. Επιπρόσθετα, το NGS (Next Generation Sequencing) έχει σημαντικό ρόλο στην επιτάχυνση της διάγνωσης ασθενειών και στον εντοπισμό φαρμακογενετικών δεικτών, προσφέροντας νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις (19). Επίσης μπορεί να αποκαλύψει πληροφορίες που θα συμβάλλουν στην κατανόηση της ετερογενούς φύσης του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) και ίσως να οδηγήσει στην ανάπτυξη βιοδεικτών για ακριβέστερη πρόγνωση και εξατομίκευση της ιατρικής αντιμετώπισης (39).

Τα δέκα τελευταία χρόνια η NGS έδωσε την δυνατότητα στο επιστημονικό προσωπικό να αποκτήσει πολλές πληροφορίες για την γονιδιωματική αλληλουχία σε ελάχιστο χρόνο και μειωμένο κόστος (41). Δυο μεγάλες πλατφόρμες NGS είναι η ILLUMINA και η IONTORRENT από κορυφαίες εταιρείες στον τομέα της αλληλούχισης DNA, αναπτύσσουν και κατασκευάζουν μηχανές προσδιορισμού αλληλουχίας που χρησιμοποιούνται για γονιδιωματική έρευνα, διαγνωστική και άλλες εφαρμογές. Οι πλατφόρμες τους είναι γνωστές για την υψηλή ακρίβεια, την επεκτασιμότητα και την ικανότητα να δημιουργούν τεράστιες ποσότητες δεδομένων αλληλουχίας με αποτέλεσμα (41).

5. 1 Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω NGS

Η αλληλουχία επόμενης γενιάς στη μοριακή ανάλυση του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου προσφέρει ενισχυμένη ιατρική ακρίβεια, αναδεικνύοντας προγνωστικές και ενεργές γονιδιωματικές αλλοιώσεις με αποτέλεσμα να ενδυναμώνει την θεραπεία όπως στην περίπτωση του cetuximab (αντίσωμα κατά του EGFR) (38).

Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονται για τον καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου είναι τα γονίδια TP53, CDKN2A, PIK3CA και για πρώτη φορά ανιχνεύτηκε γονίδιο NOTCH1, η οποία είναι η δεύτερη πιο κοινή μετάλλαξη του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου. Σίγουρα, οι νέες τεχνολογίες αλληλούχισης, όπως η γονιδιωματική ανάλυση και η ακολουθία DNA, προσφέρουν σημαντικές δυνατότητες για την πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου. Επίσης μπορούν να βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των μεταλλάξεων που οδηγούν στην ανάπτυξη του καρκίνου και στην εξατομικευμένη προσέγγιση της θεραπείας, προσφέροντας ελπίδα για πιο αποτελεσματικές θεραπείες και καλύτερη διαχείριση της ασθένειας. Η ανάλυση γονιδιωμάτων με τη χρήση της Next Generation Sequencing (NGS) έχει διευκολύνει την κατανόηση των διαφορών μεταξύ του φυσιολογικού ανθρώπινου γονιδιώματος και των μεταλλάξεων που συνδέονται με διάφορους τύπους καρκίνου.

Αυτός ο χάρτης των μεταλλάξεων βοηθάει στην κατανόηση των παθολογιών και στην ανάπτυξη θεραπειών που είναι πιο εξατομικευμένες για κάθε ασθένεια. Η κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της καρκινογένεσης βοηθά επίσης στην ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών θεραπειών, εστιάζοντας στα συγκεκριμένα μόρια που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Αυτό επιτρέπει τη δημιουργία στοχευμένων θεραπειών που μπορούν να επιδράσουν ακριβώς στις καρκινικές κυτταρικές διαδικασίες, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες επιτυχίας της θεραπείας. Η πρόοδος στη γενετική και την ιατρική βιολογία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αναλύσεων γονιδιωμάτων που θα επιτρέπουν την ακριβή πρόβλεψη κινδύνου του καρκίνου και την εξατομικευμένη αντιμετώπιση μέσω πιο αποτελεσματικών και προσαρμοσμένων θεραπειών.

6. Σκοπός και μεθοδολογία

6.1 Σκοπός

Ο σκοπός της ερευνητικής διπλωματικής εργασίας είναι η βιοπληροφορική ανάλυση και επεξεργασία των NGS δεδομένων αλληλούχισης DNA. Η εργασία αποσκοπεί να ανιχνεύσει το προφίλ μεταλλάξεων σε κάθε όγκο που έχουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση (Driver mutations), ενώ παράλληλα να απομακρύνει από την τελική λίστα μεταλλάξεων κάθε όγκου σε εκείνες που εμφανίζονται ως ψευδώς θετικές.

6.2 Μέθοδος και εργαλεία/ υπολογιστικά εργαλεία

Στην παρούσα διπλωματική έρευνα πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση NGS δεδομένων. Η NGS αλληλουχοποίηση πραγματοποιήθηκε με το kit της illumina TSO 500 (βλ. Πίνακα 1). Ο Πίνακας 1 αναδεικνύει διάφορους τύπους μεταλλάξεων με αναφορά σε 523 γονίδια του DNA που συνδέονται με τον καρκίνο. Το πρώτο βήμα που ακολουθήθηκε είναι το φιλτράρισμα και καθάρισμα δεδομένων από τα 4 excel spreadsheets που προέκυψαν από την πρωτογενή επεξεργασία των NGS δεδομένων. Το φιλτράρισμα αυτό πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια δικτυακών εργαλείων τα οποία θα παρουσιαστούν αναλυτικά στη συνέχεια.

Πίνακας 1: Γονίδια DNA που συνδέονται με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου

DNA content included in TruSight Oncology 500 and TruSight Oncology 500 High-Throughput

ABL1	BCR	CHEK1	EPHA7	FGF23	GSK3B	IDH2	MAP3K1	NF2	PIK3CA	RAD51D	SMAD4	TGFBR2
ABL2	BIRC3	CHEK2	EPHB1	FGF3	H3F3A	IFNGR1	MAP3K1	NFE2L2	PIK3CB	RAD52	SMARCA	TMEM12
							3				4	7
ACVR1	BLM	CIC	ERBB2	FGF4	H3F3B	INHBA	MAP3K1	NFKBIA	PIK3CD	RAD54L	SMARCB	TMPRSS2
							4				1	
ACVR1B	BMPR1A	CREBBP	ERBB3	FGF5	H3F3C	INPP4A	MAP3K4	NKX2-1	PIK3CG	RAF1	SMARCD	TNFAIP3
											1	
AKT1	BRAF	CRKL	ERBB4	FGF6	HGF	INPP4B	MAPK1	NKX3-1	PIK3R1	RANBP2	SMC1A	TNFRSF1
												4
AKT2	BRCA1 ^a	CRLF2	ERCC1	FGF7	HIST1H1C	INSR	MAPK3	NOTCH1	PIK3R2	RARA	SMC3	TOP1
AKT3	BRCA2 ^a	CSF1R	ERCC2	FGFR1	HIST1H2B	IRF2	MAX	NOTCH2	PIK3R3	RASA1	SMO	TOP2A
					D							
ALK	BRD4	CSF3R	ERCC3	FGFR2	HIST1H3A	IRF4	MCL1	NOTCH3	PIM1	RB1	SNCAIP	TP53
ALOX12B	BRIP1	CSNK1A1	ERCC4	FGFR3	HIST1H3B	IRS1	MDC1	NOTCH4	PLCG2	RBM10	SOCS1	TP63
ANKRD1	BTG1	CTCF	ERCC5	FGFR4	HIST1H3C	IRS2	MDM2	NPM1	PLK2	RECQL4	SOX10	TRAF2
											1	
ANKRD2	BTK	CTLA4	ERG	FH	HIST1H3D	JAK1	MDM4	NRAS	PMAIP1	REL	SOX17	TRAF7
											6	
APC	C11orf30	CTNNA1	ERRFI1	FLCN	HIST1H3E	JAK2	MED12	NRG1	PMS1	RET	SOX2	TSC1
AR	CALR	CTNNA1	ESR1	FLI1	HIST1H3F	JAK3	MEF2B	NSD1	PMS2	RFWD2	SOX9	TSC2
ARAF	CARD11	CUL3	ETS1	FLT1	HIST1H3G	JUN	MEN1	NTRK1	PNRC1	RHEB	SPEN	TSHR
ARFRP1	CASP8	CUX1	ETV1	FLT3	HIST1H3H	KAT6A	MET	NTRK2	POLD1	RHOA	SPOP	U2AF1
ARID1A	CBFB	CXCR4	ETV4	FLT4	HIST1H3I	KDM5A	MGA	NTRK3	POLE	RICTOR	SPTA1	VEGFA
ARID1B	CBL	CYLD	ETV5	FOXA1	HIST1H3J	KDM5C	MITF	NUP93	PPARG	RIT1	SRC	VHL
ARID2	CCND1	DAXX	ETV6	FOXL2	HIST2H3A	KDM6A	MLH1	NUTM1	PPM1D	RNF43	SRSF2	VTCN1
ARID5B	CCND2	DCUN1D	EWSR1	FOXO1	HIST2H3C	KDR	MLL	PAK1	PPP2R1A	ROS1	STAG1	WISP3
											1	
ASXL1	CCND3	DDR2	EZH2	FOXP1	HIST2H3D	KEAP1	MLLT3	PAK3	PPP2R2A	RPS6KA	STAG2	WT1
											4	
ASXL2	CCNE1	DDX41	FAM123	FRS2	HIST3H3	KEL	MPL	PAK7	PPP6C	RPS6KB	STAT3	XIAP
			B								1	
ATM	CD274	DHX15	FAM175	FUBP1	HLA-A	KIF5B	MRE11A	PALB2	PRDM1	RPS6KB	STAT4	XPO1
			A								2	
ATR	CD276	DICER1	FAM46C	FYN	HLA-B	KIT	MSH2	PARK2	PREX2	RPTOR	STAT5A	XRCC2
ATRX	CD74	DIS3	FANCA	GABRA6	HLA-C	KLF4	MSH3	PARP1	PRKAR1	RUNX1	STAT5B	YAP1
									A			
AURKA	CD79A	DNAJB1	FANCC	GATA1	HNF1A	KLHL6	MSH6	PAX3	PRKCI	RUNX1T	STK11	YES1
											1	
AURKB	CD79B	DNMT1	FANCD2	GATA2	HNRNPK	KMT2B	MST1	PAX5	PRKDC	RYBP	STK40	ZBTB2
AXIN1	CDC73	DNMT3A	FANCE	GATA3	HOXB13	KMT2C	MST1R	PAX7	PRSS8	SDHA	SUFU	ZBTB7A
AXIN2	CDH1	DNMT3B	FANCF	GATA4	IGF1	KMT2D	MTOR	PAX8	PTCH1	SDHAF2	SUZ12	ZFHX3
AXL	CDK12	DOT1L	FANCG	GATA6	IGF1R	KRAS	MUTYH	PBRM1	PTEN	SDHB	SYK	ZNF217
B2M	CDK4	E2F3	FANCI	GEN1	IGF2	LAMP1	MYB	PDCD1	PTPN11	SDHC	TAF1	ZNF703
BAP1	CDK6	EED	FANCL	GID4	IKBKE	LATS1	MYC	PDCD1LG	PTPRD	SDHD	TBX3	ZRSR2
									2			
BARD1	CDK8	EGFL7	FAS	GLI1	IKZF1	LATS2	MYCL1	PDGFRA	PTPRS	SETBP1	TCEB1	
BBC3	CDKN1A	EGFR	FAT1	GNA11	IL10	LMO1	MYCN	PDGFRB	PTPRT	SETD2	TCF3	
BCL10	CDKN1B	EIF1AX	FBXW7	GNA13	IL7R	LRP1B	MYD88	PDK1	QKI	SF3B1	TCF7L2	

<i>BCL2</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>EIF4A2</i>	<i>FGF1</i>	<i>GNAQ</i>	<i>INHA</i>	<i>LYN</i>	<i>MYOD1</i>	<i>PDPK1</i>	<i>RAB35</i>	<i>SH2B3</i>	<i>TERC</i>
<i>BCL2L1</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>EIF4E</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>LZTR1</i>	<i>NAB2</i>	<i>PGR</i>	<i>RAC1</i>	<i>SH2D1A</i>	<i>TERT^b</i>
<i>BCL2L11</i>	<i>CDKN2C</i>	<i>EML4</i>	<i>FGF9</i>	<i>GPR124</i>	<i>HSD3B1</i>	<i>MAGI2</i>	<i>NBN</i>	<i>PHF6</i>	<i>RAD21</i>	<i>SHQ1</i>	<i>TET1</i>
<i>BCL2L2</i>	<i>CEBPA</i>	<i>EP300</i>	<i>FGF10</i>	<i>GPS2</i>	<i>HSP90AA1</i>	<i>MALT1</i>	<i>NCOA3</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>RAD50</i>	<i>SLIT2</i>	<i>TET2</i>
<i>BCL6</i>	<i>CENPA</i>	<i>EPCAM</i>	<i>FGF14</i>	<i>GREM1</i>	<i>ICOSLG</i>	<i>MAP2K</i>	<i>NCOR1</i>	<i>PIK3C2B</i>	<i>RAD51</i>	<i>SLX4</i>	<i>TFE3</i>
1											
<i>BCOR</i>	<i>CHD2</i>	<i>EPHA3</i>	<i>FGF19</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>ID3</i>	<i>MAP2K</i>	<i>NEGR1</i>	<i>PIK3C2G</i>	<i>RAD51B</i>	<i>SMAD2</i>	<i>TFRC</i>
2											
<i>BCORL1</i>	<i>CHD4</i>	<i>EPHA5</i>	<i>FGF2</i>	<i>GRM3</i>	<i>IDH1</i>	<i>MAP2K</i>	<i>NF1</i>	<i>PIK3C3</i>	<i>RAD51C</i>	<i>SMAD3</i>	<i>TGFBR1</i>
4											

a. Large rearrangements (exon-level CNVs) detected for *BRCA1* and *BRCA2*.

b. *TERT* promoter region only covered for variant calling.

CNV calling is available for all genes except: *HIST2 H3A*, *HIST2 H3C*, *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *KMT2B*, *KMT2C*, *KMT2D*, *TERT*

Πηγή: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trusight-oncology-500-data-sheet-m-gl-00173/trusight-oncology-500-and-ht-data-sheet-m-gl-00173.pdf>

• Φιλτράρισμα

Το φιλτράρισμα παραλλαγής είναι ένα σημαντικό βήμα στην ανάλυση των δεδομένων Next Generation Sequencing (NGS). Καθώς οι τεχνολογίες NGS εξελίσσονται, η ποσότητα των δεδομένων που παράγονται αυξάνεται δραματικά, οδηγώντας σε μεγάλο αριθμό πιθανών παραλλαγών. Ωστόσο δεν είναι όλες οι παραλλαγές εξίσου αξιόπιστες ή σημαντικές. Το βήμα του φιλτραρίσματος παραλλαγής στοχεύει στην αφαίρεση των παραλλαγών που μπορεί να είναι ψευδείς ή μη αξιόπιστες. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει παραλλαγές που προέκυψαν από τεχνικούς παράγοντες, όπως τυχαία λάθη στη σειρά DNA ή σφάλματα στη διαδικασία ανάγνωσης. Επίσης, μπορεί να απομακρύνει παραλλαγές που εντοπίστηκαν σε περιοχές του γονιδιώματος που είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν υψηλό βαθμό γενετικής ποικιλομορφίας, χωρίς να υπάρχει συνδυασμός με κλινικά συμπτώματα (26).

Αν και το φιλτράρισμα παραλλαγής έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει σημαντικά την ακρίβεια των παραλλαγών, συχνά αποτελείται από βαθύτερες αναλύσεις λόγω της πιο πολύπλοκης φύσης της διαδικασίας. Ωστόσο, η ολοένα και μεγαλύτερη σημασία της ακρίβειας και της αξιοπιστίας στην ερμηνεία των δεδομένων NGS μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη ενσωμάτωση αυτού του βήματος στη διαδικασία ανάλυσης. Ένα επίσης σημαντικό βήμα στη διαδικασία ανάλυσης δεδομένων NGS είναι η ροή των εργασιών, η

οποία συνήθως περιλαμβάνει τη φάση του φιλτραρίσματος των παραλλαγών και την ιεράρχηση τους. Αυτό το στάδιο επιτρέπει την επιλογή των σημαντικών γενετικών παραλλαγών και την απόρριψη των ασήμαντων ή τυχαίων παραλλαγών. Για την αποτελεσματική επεξεργασία και την ανάλυση των NGS δεδομένων είναι κρίσιμη η επιλογή των κατάλληλων εργαλείων και η σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων (34).

- **Ιεράρχηση παραλλαγών**

Η ιεράρχηση των παραλλαγών είναι πράγματι κρίσιμη για τον εντοπισμό των μεταλλάξεων που έχουν καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση (Driver Mutations). Λόγω του μεγάλου όγκου παραλλαγών που συνήθως προκύπτει σε κάθε δείγμα η ιεράρχηση τους είναι απαραίτητη έτσι ώστε να διαχωριστούν οι παθογόνες μεταλλάξεις από τις καλοήθεις (neutral or passive mutations). Αυτό γίνεται με την αξιολόγηση του πιθανού αντικτύπου της μετάλλαξης στη λειτουργία του γονιδιώματος ή του προϊόντος του γονιδιώματος (όπως μια πρωτεΐνη), καθώς και με την εξέταση άλλων παραγόντων όπως η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης σε πληθυσμούς και η σχετική πληροφορία από διάφορες βάσεις δεδομένων.

Η τεχνολογία του Next Generation Sequencing (NGS), όπως το Whole Exome Sequencing (WES) ή το Whole Genome Sequencing (WGS), παράγει μεγάλου όγκου δεδομένα που περιλαμβάνουν χιλιάδες παραλλαγές. Κατά μέσο όρο, το WES ανιχνεύει περίπου 20.000–30.000 SNVs και (indelcalls) στα ανθρώπινα δείγματα. Η ιεράρχηση αυτών των παραλλαγών βοηθά στην εστίαση στις πιο σημαντικές μεταλλάξεις και ελαχιστοποιεί τον αριθμό των υποψήφιων μεταλλάξεων που απαιτούν περαιτέρω εξέταση. Αυτό βελτιώνει την απόδοση της γενετικής διάγνωσης και επιταχύνει την εφαρμογή θεραπευτικών παρεμβάσεων. Η ιεράρχηση των παραλλαγών είναι μια διαδικασία που μπορεί να επιταχύνει και να απλοποιήσει την ερμηνεία των γενετικών παραλλαγών επειδή βοηθά στο να προσδιοριστούν ποιες από αυτές είναι πιο πιθανό να επηρεάσουν τη λειτουργία ενός γονιδίου. Μέσω αυτής της διαδικασίας, τα αποτελέσματα των γενετικών δοκιμών, όπως η δοκιμή NGS (Next-Generation Sequencing), μπορούν να φιλτραριστούν και να αξιολογηθούν με βάση τη σημασία τους. Οι παραλλαγές που εντοπίζονται μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την πιθανότητα επιδράσεων τους στη λειτουργία του γονιδίου, καθιστώντας πιο εύκολο τον εντοπισμό των παραλλαγών που είναι πιθανό να έχουν σημασία για την υγεία ή τη νόσο (32).

Τρεις βασικές προκλήσεις στο φιλτράρισμα και την ιεράρχηση των παραλλαγών

- 1) Η διαδικασία φιλτραρίσματος και ιεράρχησης παραλλαγών σε μια διαχειρίσιμη λίστα μπορεί να είναι αρκετά περίπλοκη, ειδικά όταν πρέπει να συμπεριλάβει πολλές ξεχωριστές πηγές δεδομένων. Μια από τις κύριες προκλήσεις είναι η εύρεση σχέσεων γονιδίου-φαινοτύπου από διάφορες βάσεις δεδομένων. Η διαδικασία αυτή μπορεί να περιλαμβάνει την αποκατάσταση, τον συντονισμό και τη σύγκριση δεδομένων από πολλαπλές πηγές, προκειμένου να προκύψουν συνολικές πληροφορίες για τις παραλλαγές που εξετάζονται. Η επιλογή παραλλαγών που συμπεριλαμβάνονται στην λίστα συνήθως λαμβάνουν υπόψη παράγοντες όπως είναι η συχνότητα εμφάνισης της παραλλαγής στην πληθυσμιακή βάση, η πιθανότητα παθογένειας, η κληρονομικότητα και άλλοι κλινικοί παράγοντες. Όσον αφορά τις ιδιωτικές βάσεις δεδομένων, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτές μπορεί να περιέχουν πληροφορίες που δεν είναι διαθέσιμες στις δημόσιες βάσεις δεδομένων. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν σπάνιες ή καινούριες παραλλαγές, καθώς και δεδομένα που προέρχονται από ερευνητικά έργα ή κλινικές δοκιμές. Επομένως, η ενσωμάτωση των δεδομένων από ιδιωτικές βάσεις δεδομένων μπορεί να είναι κρίσιμη για μια ολοκληρωμένη κατανόηση των γενετικών παραλλαγών και των συνεπειών τους.
- 2) Η πιο σχετική, ακριβής και συνοπτική λίστα είναι ο κλειδάριθμος για την ταχύτερη και πιο ακριβή ανάλυση. Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι ένα μεταφραστικό εργαστήριο χρησιμοποιώντας φίλτρα και ιεραρχημένη ροή εργασιών είχε περίπου 600 παραλλαγές ανά περίπτωση, αναλυμένες από δύο άτομα σε τρίωρο διάστημα, με απόδοση περίπου 100 παραλλαγών ανά ανθρώπινη ώρα.
- 3) Η τυποποίηση, το φιλτράρισμα και η ιεράρχηση των παραλλαγών σε μια διαδικασία δευτερογενούς ανάλυσης NGS είναι κρίσιμα βήματα για την εξασφάλιση της σωστής και αξιόπιστης ερμηνείας των δεδομένων. Ωστόσο, η χρήση πολλαπλών εργαλείων λογισμικού μπορεί να οδηγήσει σε πολυπλοκότητα και ασυνεπή ροή εργασίας. Η χρήση ενός λογισμικού με αυτοματοποιημένο και τυποποιημένο σχολιασμό, φιλτράρισμα και ιεράρχηση των παραλλαγών, είναι σημαντικά βήματα για την αντιμετώπιση του προβλήματος.

Μια τέτοια ενοποιημένη προσέγγιση δεν θα απλοποιήσει μόνο τη ροή εργασίας, αλλά θα βοηθήσει επίσης στην εξασφάλιση της συνέπειας και της αξιοπιστίας των

αποτελεσμάτων. Επιπλέον, θα διευκολύνει την αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων και θα διευκολύνει τη σύγκριση μελετών από διαφορετικά εργαστήρια (32).

- **Κατηγορίες παραλλαγών κατά το φιλτράρισμα**

Οι κύριες κατηγορίες παραλλαγών που υπόκεινται στην διαδικασία φιλτραρίσματος περιλαμβάνουν:

1. Παραλλαγές απλών νουκλεοτιδίων (SNVs): Μορφές μεταλλαγών όπου μια μοναδική βάση νουκλεοτιδίου αλλάζει σε ένα άλλο νουκλεοτίδιο.
2. Πολλαπλές παραλλαγές νουκλεοτιδίων (MNVs): Αυτές οι παραλλαγές εμπεριέχουν περισσότερες από μία μεταλλαγή νουκλεοτιδίων σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος.
3. Εισαγωγές και διαγραφές (indels): Αυτές οι παραλλαγές περιλαμβάνουν εισαγωγές (προσθήκες) ή διαγραφές (αφαιρέσεις) μικρών κομματιών DNA, συνήθως μήκους έως 50 βάσεων νουκλεοτιδίων.
4. Σύντομες διαδοχικές επαναλήψεις (STR): Περιοχές του γονιδιώματος που περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, όπως τα τελομερή (20).

6.3 Παραγωγή NGS δεδομένων με την χρήση του KitIllumina TSO 500

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε επεξεργασία σε NGS δεδομένα τα οποία δημιουργήθηκαν με την χρήση του kit TSO 500 της εταιρείας Illumina. Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιείται για την δημιουργία βιβλιοθήκης εμπλουτισμένης για 523 γονίδια τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα της χρήσης του συγκεκριμένου kit είναι η ικανότητα του να έχει υψηλή απόδοση σε καρκινικά δείγματα τα οποία έχουν εγκλειστεί σε παραφίνη, καθώς και η δυνατότητα να εξαχθούν πληροφορίες σχετικές με το συνολικό φορτίο μεταλλάξεων του όγκου (TMB, tumor mutation burden) και την μικροδορυφορική αστάθεια (MSI, Microsatellite Instability) (20).

Τα κύρια βήματα χρήσης του kit, περιλαμβάνουν την παρασκευή διατμημένου γενομικού DNA (gDNA) και την προσθήκη adaptors στα θραύσματα gDNA. Σε ένα επόμενο βήμα, ακολουθεί ο εμπλουτισμός της βιβλιοθήκης ο οποίος περιλαμβάνει την υβριδοποίηση των υπο μελέτη γονιδιακών περιοχών της βιβλιοθήκης με την χρήση βιοτυνιλιωμένων

ιχνηθετών και την δέσμευση των υβριδοποιημένων μορίων με την χρήση σφαιριδίων στρεπταβιδίνης. Τέλος ακολουθεί η έκλουση τους και ο εμπλουτισμός της βιβλιοθήκης. Η διαδικασία της υβριδοποίησης έχει το πλεονέκτημα ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και αυτό καθιστά τη μέθοδο ιδανική για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και την ανίχνευση γενετικών μεταλλάξεων. Επιπλέον, η διαδικασία της υβριδοποίησης αποδίδει λιγότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε σύγκριση με άλλες μεθόδους που είναι περισσότερο βασισμένες στον πολλαπλασιασμό περιοχών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και έχει την ικανότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων σε μικρό όγκο δείγματος.

Η παραγωγή NGS δεδομένων με την χρήση του Kit Illumina TS0500 είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε δείγματα FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded), τα οποία συνήθως είναι φτωχά σε ποσότητα και ποιότητα DNA. Συγκεκριμένα, η διαδικασία της υβριδοποίησης που ακολουθεί το kit επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλάξεων ακόμη και όταν οι συχνότητες εμφάνισής τους είναι πολύ χαμηλές, με VAF (Variant Allele Frequency) χαμηλότερα και από 5%. Αυτή η συνολική διαδικασία αυξάνει την ακρίβεια της ανάλυσης γενετικών μεταλλάξεων σε δείγματα FFPE (20).

6.4 Υπολογιστικά εργαλεία

Cosmic (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)

Ο Κατάλογος Σωματικών Μεταλλάξεων στον Καρκίνο είναι μια σημαντική πηγή πληροφοριών για μεταλλάξεις που σχετίζονται με την καρκινογένεση (6). Συγκεντρώνει παγκοσμίως δεδομένα από γονίδια και μεταλλάξεις, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για την κατανόηση της γενετικής βάσης του καρκίνου, επίσης παρέχει δεδομένα σχετικά με τη δομή και τα περιεχόμενα των μεταλλάξεων, καθώς και πληροφορίες για τα πεδία που καλύπτονται, όπως γονίδια, τύποι καρκίνου κ. ά. Το COSMIC περιλαμβάνει 2 τύπους δεδομένων τα οποία είναι τα εξής το COSMIC που ασχολείται με την βάση δεδομένων που εμπεριέχει γενετικές πληροφορίες για μεταλλάξεις σε καρκινικά κύτταρα και το CellLines το οποίο συγκεντρώνει δεδομένα μεταλλάξεων για περισσότερες από 1000 κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στην έρευνα του καρκίνου (6).

Στην διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε από την πλατφόρμα COSMIC, το εργαλείο Cancer Mutation Census (CMC) για την ανάλυση και την ταξινόμηση των γενετικών μεταλλάξεων με βάση τον κατάλογο COSMIC. Το συγκεκριμένο εργαλείο, βοηθά στον

εντοπισμό παραλλαγών που έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση σε διάφορους τύπους καρκίνου (Driver mutations). Το CMC είναι μια εφαρμογή που συγκεντρώνει και ενσωματώνει πληροφορίες για σωματικές μεταλλάξεις από την COSMIC, συνδυάζοντας τεκμηριωμένα δεδομένα από διάφορες πηγές όπως βιολογικές και βιοχημικές πληροφορίες από πολλαπλές πηγές και επεξεργασία μέσω υπολογιστικών αναλύσεων. Ένας εξαιρετικά πλούσιος πόρος δεδομένων για την ανάλυση γονιδιακών μεταλλάξεων είναι η χρήση συνδυασμένων δεδομένων από πολλαπλές πηγές, όπως ClinVar, dN/dS, gnomAD και COSMIC, που πράγματι μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη, στην μέτρηση, στην αναλογία και στις συχνότητες παραλλαγών σε κανονικούς πληθυσμούς μεταλλάξεων που ενδέχεται να έχουν κλινικές επιπτώσεις στο ανθρώπινο καρκινικό γονιδίωμα (6). Η CMC εφαρμογή ταξινομεί τις πολύ σημαντικές σωματικές μεταλλάξεις σε δυο διαφορετικές βαθμίδες (Βαθμίδα 1 και Βαθμίδα 2). Η βαθμίδα 1 περιλαμβάνει μεταλλάξεις για τις οποίες υπάρχει απόλυτη/πολύ ισχυρή συσχέτιση με την διαδικασία της καρκινογένεσης. Η συσχέτιση αυτή, βασίζεται σε διεξοδικές μελέτες που έχουν δείξει την επίδραση της μετάλλαξης στην ανάπτυξη ή πρόγνωση του καρκίνου.

Στην Βαθμίδα 1 ανήκουν πολλές μεταλλάξεις που απενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια, ή ενεργοποιούν συγκεκριμένα ογκογονίδια. Τέλος περιλαμβάνει μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται στην κανονική λειτουργία του κυττάρου και ρυθμίζουν την ανάπτυξη του (6). Η βαθμίδα 2 περιλαμβάνει μεταλλάξεις για τις οποίες υπάρχει λιγότερο ισχυρή συσχέτιση με την διαδικασία της καρκινογένεσης αλλά οι αποδείξεις για τον ρόλο τους είναι πιο περιορισμένες σε σχέση με αυτές που υπάρχουν για τις μεταλλάξεις της βαθμίδας 1 (6).

Gnomad (<https://gnomad.broadinstitute.org/>)

Η πλατφόρμα Gnomad μας δίνει την δυνατότητα να μελετήσουμε την συχνότητα με την οποία εμφανίζεται μια μετάλλαξη στον γενικό πληθυσμό βοηθώντας έτσι στην εξήγηση της γενετικής ποικιλομορφίας. Η βάση Δεδομένων gnomAD είναι μία από τις μεγαλύτερες δημόσιες βάσεις δεδομένων για παραλλαγές πληθυσμού. Η διαθέσιμη πλατφόρμα περιήγησης στο διαδίκτυο του gnomAD επιτρέπει την εύκολη πρόσβαση και ανάλυση των παραλλαγών του γονιδιώματος και αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την ερμηνεία γενετικών παραλλαγών που κληρονομούνται μέσω της γαμετικής σειράς και την συχνότητα αλληλομόρφων. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι καθοριστικά για τον χαρακτηρισμό των

μεταλλάξεων και την εκτίμηση του κλινικού αντικτύπου τους (16). Επιπρόσθετα η gnomAD διαθέτει μια πλούσια βάση δεδομένων που αναφέρεται σε συνώνυμες παραλλαγές. Υπάρχουν δύο κύριες εκδόσεις του GnomAD, η v2 και η v3. Κάθε νέα έκδοση προσφέρει βελτιώσεις και ενημερώσεις σε σχέση με τις προηγούμενες εκδόσεις, συμπεριλαμβανομένων νέων δεδομένων για τον ανθρώπινο γονιδιωματικό πολυμορφισμό.

Η βάση δεδομένων ExAC (Exome Aggregation Consortium) ήταν η προκάτοχος του GnomAD, και η GnomAD v2 συνδυάζει δεδομένα από την ExAC με πρόσθετες βελτιώσεις και ενημερώσεις. Η GnomAD v3 περιλαμβάνει επιπλέον δεδομένα και βελτιώσεις που δεν είναι διαθέσιμα στην ExAC ή στην προηγούμενη έκδοση του GnomAD. Το gnomAD v2 περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό εξονικών αλληλουχιών όπως 125.748 και γονιδιωμάτων όπως 15.708 που ευθυγραμμίζονται με το GRCh37, και αυτό μπορεί να είναι προτιμότερο εάν η βάση πληροφοριών είναι στην συγκεκριμένη αναφορά γενομικής ακολουθίας. Από την άλλη πλευρά, το gnomAD v3 περιλαμβάνει περισσότερα γονιδιώματα όπως 76.156 που ευθυγραμμίζονται με το GRCh38, παρέχοντας επιπλέον δεδομένα για περιοχές που μπορεί να μην καλύπτονται καλά στο v2, αυτό μπορεί να είναι χρήσιμο εάν χρειάζεται εκτεταμένη κάλυψη για μη κωδικοποιητικές περιοχές ή περιοχές κωδικοποίησης που είναι δύσκολο να καλυφθούν με το v2.

Το 81% των γονιδιωμάτων που παρατίθενται στην έκδοση v2 είναι επίσης παρόντα στην έκδοση v3, ενώ το 6% των γονιδιωμάτων που παρατίθενται στην έκδοση v2 εμφανίζονται επίσης στην έκδοση v3. Αυτό σημαίνει ότι περίπου το 14% των ατόμων με δεδομένα γονιδιωμάτων ή εξονικών αλληλουχιών στην έκδοση v2 αντιπροσωπεύονται επίσης στην έκδοση v3. Επιπλέον, το 26% των ατόμων στην έκδοση v3 είναι παρόν και στην έκδοση v2. Με την προσθήκη δεδομένων από τις εκδόσεις v2 και v3, καθώς και την προσθήκη νέων δεδομένων για να δημιουργηθεί μια προγραμματισμένη έκδοση v4, υπάρχει η δυνατότητα να βελτιωθεί η ανάλυση των σπάνιων ασθενειών. Επιπλέον, η αύξηση του αριθμού των δειγμάτων που είναι ευθυγραμμισμένα στο GRCh38 στα 500.000 δείγματα καθιστά το σύνολο δεδομένων πιο πλήρες και αναπτύσσει τη βάση δεδομένων αναφοράς για τις γενετικές αναλύσεις (16).

Clinvar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)

Το ClinVar είναι ένας πολύ χρήσιμος διαδικτυακός πόρος για την κατανόηση των σχέσεων μεταξύ γενετικών παραλλαγών και ανθρώπινων φαινοτύπων. Παρέχει στοιχεία που είναι

χρήσιμα για τη διερεύνηση πιθανών συνδέσεων μεταξύ γενετικών μεταλλάξεων και κλινικού φαινοτύπου (31).

Το ClinVar είναι μια βάση δεδομένων που διαχειρίζεται από το National Center for Biotechnology Information (NCBI) ενσωματώνοντας δεδομένα από διάφορες πηγές, οι οποίες είναι τα εξής:

1. dbSNP: Η βάση δεδομένων SNP του NCBI που περιέχει πληροφορίες για μονοπληθείς πολυμορφισμούς (SNPs).
2. dbVar: Μια βάση δεδομένων που περιλαμβάνει πληροφορίες για μεγάλες διακυμάνσεις στο DNA.
3. MedGen: Μια βάση δεδομένων που παρέχει πληροφορίες για τον φαινότυπο και τις γενετικές παθήσεις.
4. Τα ανθρώπινα RefSeqs: Οι αναφορές σε ανθρώπινα γονίδια και πρωτεΐνες που διατίθενται από το NCBI (23).
- 5.

7. Αποτελέσματα

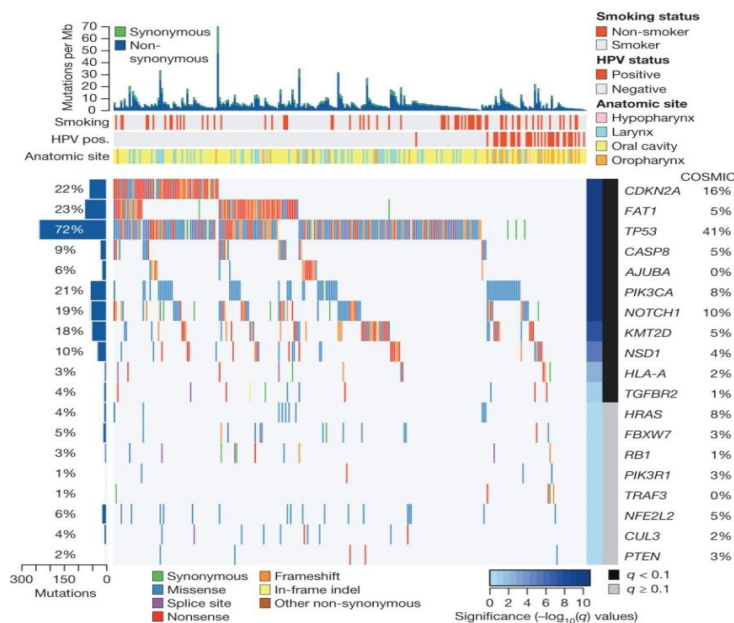
Τα αποτελέσματα της μελέτης αναφέρονται στην βιοπληροφορική αναλύση στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου. Το γενωμικό DNA συλλέχθηκε από τα χειρουργικά δείγματα και η πραγματοποίηση της απομόνωσης και ανάλυσης των δειγμάτων έγινε μέσω του NGS KitIllumina TSO 500, που έδωσε και την αρχική λίστα των μεταλλάξεων που περιλαμβάνει τα NGS data (next generation sequencing data) για τον κάθε ασθενή. Με τη βοήθεια του φιλτραρίσματος δόθηκε η δυνατότητα να αφαιρεθούν τα ψευδή ή μη αξιόπιστα αποτελέσματα. Επίσης, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην μελέτη που είχε δημοσιευτεί το 2015 από το “the Cancer Genome Atlas TCGA” για τις μεταλλάξεις του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου και σύμφωνα με τη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν τα γονίδια που σχετίζονται με τον συγκεκριμένο καρκίνο που αναγράφονται στον Πίνακα 2. Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης (TCGA), το γονίδιο PIC3CA συσχετίστηκε με τον ιό ανθρωπίνων θηλωμάτων (θετικούς όγκους HPV) και τα γονίδια TP53, CDKN2A, HRAS, PIK3CA, CASP8, NOTCH1, TP53 NSD1, FAT1 με τους αρνητικούς όγκους HPV (5).

Για την διπλωματική εργασία, η ποσότητα των δεδομένων από την αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) ήταν ιδιαίτερα μεγάλη. Για τη διαχείριση αυτού του όγκου δεδομένων και την αφαίρεση των ψευδών και μη αξιόπιστων αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε η

διαδικασία του φιλτραρίσματος παραλλαγών. Μέσω αυτής της διαδικασίας αφαιρέθηκαν πολυμορφισμοί που παρουσίαζαν υψηλό βαθμό γενετικής ποικιλομορφίας. Η διαδικασία αυτή υποστηρίχθηκε σημαντικά από την πλατφόρμα gnomad που έδωσε την δυνατότητα να παρατηρηθεί η συχνότητα των μεταλλάξεων που εμφανίζονται στον γενικό πληθυσμό και να αφαιρεθούν οι πολυμορφισμοί με την γενετική ποικιλομορφία. Επίσης ο κατάλογος σωματικών μεταλλάξεων COSMIC έχει την ιδιότητα να εντοπίζει μεταλλάξεις που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση (driver mutations), επιπλέον συγκεντρώνει πληροφορίες που βοηθούν στην κατανόηση της γενετικής βάσης των μεταλλάξεων, την θέση αντικατάστασης των νουκλεοτιδίων στα γονίδια και την πιθανότητα παθογένειας. Ωστόσο ο διαδικτυακός πόρος ClinVar έδωσε πληροφορίες για τον κλινικό φαινότυπο των γονιδίων, την αντικατάσταση γονιδιωματικής θέσης στο χρωμόσωμα που προκαλείται η μετάλλαξη, και τον εντοπισμό των παθογόνων παραλλαγών. Στον Πίνακα 2. παρουσιάζεται η συχνότητα των μεταλλάξεων στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου σύμφωνα με τη μελέτη <<The Cancer Genome Atlas Network>> η συχνότητα των μεταλλάξεων σύμφωνα με το Cosmic (6), επίσης αναφέρεται σε ποιά γονιδιωματική θέση δημιουργείται η μετάλλαξη σύμφωνα με το NCBI Gene. Στον Πίνακα 3 αναλύονται οι παραλλαγές που έχουν ανιχνευθεί σε κάθε γονίδιο, η θέση αντικατάστασης των νουκλεοτιδίων στο γονίδιο και η πιθανότητα παθογένειας. Στον Πίνακα 4 ενδεικτικά αναφέρει 3 περιπτώσεις μεταλλάξεων που μου έδωσε ο κατάλογος Cosmic, ώστε να δώσω πληροφορίες για τους ιστούς προέλευσης που ανιχνεύονται σε άλλους τύπους καρκίνου και η συχνότητα τους σε ένα ποσοστό δειγμάτων.

Πίνακας 2. Η συχνότητα μεταλλάξεων σύμφωνα με τη μελέτη “The Cancer Genome Atlas Network” και Cosmic και η γονιδιωματική θέση από NCBI Gene

Γονίδια	“The Cancer Genome Atlas Network”	Γονιδιωματική θέση από NCBI Gene	Cosmic.
TP53	72%	17p13.1	41%
FAT1	23%	4q35.2	5%
CDKN2A	22%	9q21.3	16%
PIK3CA	21%	3q26.32	8%
NOTCH1	19%	9q34.3	10%
KMT2D	18%	12q13.12	5%
NSDI	10%	5q35.3	4%
CASP8	9%	2q33.1	5%
FBXW7	4%	4q31.3	3%
HRAS	4%	11q15.5	8%
PTEN	2%	10q23.31	3%



Significantly mutated genes in HNSCC.

Εικόνα 4. Γονίδια (σειρές) με σημαντικά μεταλλαγμένα γονίδια (που προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο MutSigCV, $q < 0, 1$) ταξινομημένα κατά τιμή q . Παρουσιάζονται επίσης επιπρόσθετα γονίδια με τάση προς τη στατιστική σημαντικότητα. Τα δείγματα (στήλες, $n = 279$) είναι διατεταγμένα για να τονίσουν την αμοιβαία αποκλειστικότητα μεταξύ των μεταλλάξεων. Αριστερά, ποσοστό μετάλλαξης στο TCGA. Δεξιά, ποσοστό μετάλλαξης σε COSMIC (ιστός «ανώτερου αεροπεπτικού σωλήνα»). Κορυφαία, συνολικός αριθμός μεταλλάξεων ανά megabase. Η χρωματική κωδικοποίηση υποδεικνύει τον τύπο μετάλλαξης.

Πηγή: <https://www.nature.com/articles/nature14129/figures/2>

Πίνακας 3. Παρουσίαση παραλλαγών των γονιδίων και μεταλλάξεις των νουκλεοτιδίων στα γονίδια που ανιχνευτήκαν στους τέσσερις συμμετέχοντες ασθενείς

Γονίδια	Παραλλαγές του ασθενή TR002	Παραλλαγές του ασθενή TR005	Παραλλαγές του ασθενή TR0011	Παραλλαγές του ασθενή TR006	A. A μετάλλαξη Αντικατάσταση - Missense, θέσης	Μετάλλαξη CDS	Κατανομή ιστού
TP53		p. R77X	p. Y181C		p. Y181C=> θέση 181 Y=>C	c. 542A>C θέση 542 A>G	Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα
FAT1				p. G855R	p. G855R=> θέση 855 G=>R	c. 2563G=>A θέση 2563 G=>A	
CDKN2A			p. P1265				
PIK3CA		p. E542K			p. E542K=> θέση 542 E=>K	c. 1624G>A θέση 1624 G=>A	Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα
NOTCH1		p. R1279H,			p. R1279H=> θέση 1279 R>H	c. 3836G>A θέση 3836 G>A	Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα
KMT2D							
NSD1							
CASP8							
EP300							
KMT2C	p. R886H, p. D348N	p. W1056X	p. D348N	p. 51248L	1)p. R886H=> θέση 886 R>H 2)p. D348N=> θέση 348 D>N 3)p. S1248L=>θέση 1248 S>L	1)c. 2657G>A θέση 2657 G>A 2)c. 1042G=> θέση 1042 G>A 3)c. 3743C =>T θέση 3743 C>T	Η παραλλαγή p. D348N προκαλεί Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα
FBXW7							
HRAS							
ATR							
BRCA2							
ATM							
PTEN				p. G129R	p. G129=>129 θέση G>R	c. 385G=>C θέση 385 G>C	
BRCA1							

Πίνακας 4. Τύποι καρκίνου			
Γονίδια	Παραλλαγές	Ιστός προέλευσης	Ποσοστό δειγμάτων με ανίχνευση μετάλλαξης
TP53	p. Y181C	Αιμοποιητικό και λεμφικό σύστημα Στήθος Ωοθήκη Πνεύμονας Οισοφάγος	81% 78% 65% 62% 58%
PIK3CA	p. E542K	Στήθος Παχύ έντερο Ουροποιητικό σύστημα Ενδομήτριο	628% 486% 199% 86%
NOTCH1	p. R1279H	Προστάτης Δέρμα Μήνιγγας Νεφρό Ανώτερο αεροπεπτικό σύστημα	17% 5% 3% 1% 1%

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη που πραγματοποιήθηκε, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στα ακόλουθα γονίδια: Fat1, Trp53, CDKN2A, PIK3CA, NOTCH1, KMT2C, PTEN, στα οποία θα γίνει αναφορά - ανάλυση ακολούθως. Για τη σημασία των ευρημάτων αυτών θα πραγματοποιηθεί εκτενής συζήτηση παρακάτω.

FAT1

Το γονίδιο FAT1 διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε πολλούς τύπους καρκίνου, με το HNSCC να αποτελεί έναν από τους τύπους όπου παρουσιάζει σημαντικές μεταλλάξεις. Η κατανόηση της λειτουργίας του FAT1 μπορεί να οδηγήσει σε νέες προσεγγίσεις θεραπείας ή προγνωστικές δοκιμές. Η λειτουργία του γονιδίου FAT1 διαθέτει την ικανότητα να κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως είναι η ρύθμιση της επαφής κυττάρων και η επίπεδη πολικότητα. Η λειτουργία της μπορεί να επηρεάσει τη μιτοχονδριακή αναπνοή και τη σηματοδότηση μεταξύ κυττάρων. Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) είναι αντιμέτωπο με πολλαπλές προκλήσεις λόγω της ποικιλομορφίας του σε τοποθεσίες και γενετικές διαφοροποιήσεις. Η ετερογένεια αυτή

μπορεί να δυσκολέψει την ακριβή διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου, καθιστώντας σημαντικό πεδίο έρευνας για να βρεθούν πιο αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Ωστόσο, οι γονιδιακές μεταλλάξεις του καρκίνου είναι η λύση για την ακριβή κατανόηση των μεταλλάξεων, που μπορούν να οδηγήσουν σε πιο στοχευμένες θεραπείες για κάθε ασθενή, βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την πρόγνωση τους.

Πιο αναλυτικά, το Fat1 μεταλλάσσεται σε πολλούς καρκίνους, όμως το υψηλότερο ποσοστό μεταλλάξεων έχει εντοπιστεί στο HNSCC με 23%, σχετικά με τις αναφορές που έχουν γίνει. Το γονίδιο Fat1 κατατάσσεται ως δεύτερο μεταλλαγμένο γονίδιο στον καρκίνο κεφαλής και καρκίνου μετά από το TP53, το οποίο κατέχει τον σπουδαιότερο ρόλο αναφορικά με τον καρκίνο αυτόν. Μάλιστα, ορισμένες δημοσιεύσεις υποδηλώνουν ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο Fat1 ανιχνεύεται με ποσοστό 28% στο αρνητικό HPV που αποτελεί και την πιο συχνή μορφή, ενώ αντίθετα στο θετικό HPV ανιχνεύεται μόλις στο 2, 8%. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το γονίδιο Fat1 ανιχνεύεται με ποσοστό 29, 8% στους συμπαγείς όγκους (7). Το μεταλλαγμένο γονίδιο FAT1 φαίνεται να είναι πιο διαδεδομένο σε κάποιες ομάδες ανθρώπων, όπως για παράδειγμα στους ασθενείς που δεν παρουσιάζουν τον ιό HPV, στις γυναίκες και στους ηλικιωμένους. Επιπλέον, φαίνεται να σχετίζεται με πρωτοπαθείς όγκους της στοματικής κοιλότητας, του λάρυγγα και του υποφάρυγγα.

Η μετάλλαξη του γονιδίου FAT1 συνδέεται με χαμηλότερη έκφραση στο γονίδιο, αλλά με αυξημένη έκφραση στις πρωτεΐνες HER3_pY1289, IRS1 και CAVEOLIN1. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσει σημαντικές επιπτώσεις στη λειτουργία των κυττάρων και την ανάπτυξη διαφόρων παθήσεων. Η μετάλλαξη του γονιδίου FAT1 σε καρκίνο του στόματος συνδέεται με κορυφαία μεταλλαγμένα γονίδια TP53 και CASP8. Επίσης, η μετάλλαξη του γονιδίου FAT1 συνδέεται κυρίως με το HPV (-) HNSCC και μπορεί να επηρεάσει την αντίσταση στην θεραπεία που στοχεύει στον EGFR. Οι βιοπληροφορικές και στατιστικές αναλύσεις αποκαλύπτουν σημαντικές πληροφορίες για μελλοντικές κλινικές έρευνες και στοχευμένες θεραπείες στον τομέα του HNSCC (7).

CDKN2A

Οι μεταλλάξεις σε γονίδια όπως το CDKN2A είναι συχνές σε αυτόν τον τύπο καρκίνου και συνδέονται με την ανάπτυξή του. Οι αλλαγές σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα (3p, 18q, 3q, 8q) συνδέονται με την πορεία και το βαθμό εξέλιξης του καρκίνου. Το γονίδιο CDKN2A, πριν ξεκινήσει η αλληλουχία επόμενης γενιάς, ήταν από τους βιοδείκτες που είχε αποκαλυφθεί

σε διερευνήσεις μελετών για τις αλλαγές κυτταρικής σηματοδότησης και επιβεβαίωση γονιδιωματικών αλλοιώσεων. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι το γονίδιο CDKN2A προσφέρει τη δυνατότητα σε κάθε περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου να παρουσιάσει διαφορετική μετάλλαξη. Το γονίδιο CDKN2A διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Παράλληλα, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής κατάστασης, ενώ η τροποποίησή του μπορεί να οδηγήσει σε διακυμάνσεις που ευνοούν την ανάπτυξη καρκίνου.

Το CDKN2A παράγει την p16 (πρωτεΐνη p16), η οποία εμποδίζει τη δράση της Κυκλίνης D1 και αποτρέπει τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, που είναι σημαντική για την αναστολή αλλά και για τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και την πρόληψη της ανεξέλεγκτης κυτταρικής διαίρεσης. Η ανεπάρκεια στη γήρανση των κυττάρων σχετίζεται με τη διακοπή της δράσης του p16, ένα γονίδιο που συμβάλλει στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Η έλλειψη αυτού του ελέγχου μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργίες των κυττάρων και να προάγει την ανάπτυξη δυσπλασίας. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, οι όγκοι που είναι θετικοί στον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) φάνηκε να έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τους HPV-αρνητικούς όγκους. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο CDKN2A είναι συχνότερες στους HPV-αρνητικούς όγκους, και λιγότερο πιθανές στους HPV-θετικούς όγκους (11). Σύμφωνα με την κλίμακα της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ιατρικής Ογκολογίας (ESMO) και την κλινική δραστηριοποίηση των μοριακών στόχων (ESCAT), το θέμα της θεραπείας αναγνωρίστηκε ως βασική προτεραιότητα. Μια από τις δραστικές αλλαγές των γονιδίων είναι οι αλλοιώσεις του γονιδίου CDKN2A και η ενίσχυση του EGFR, το οποίο κατατάσσεται σε βαθμίδα IIA λόγω της αποτελεσματικότητας του *palbociclib* (αναστολέας CDK4/6) και του *afatinib* (αναστολέας κινάσης -τυροσίνης) στη θεραπεία (27).

PIK3CA

Η μετάλλαξη της καταλυτικής υπομονάδας άλφα της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινάσης PIK3CA είναι συνήθης σε πολλούς τύπους καρκίνου και με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου. Η μετάλλαξη αυτή ενεργοποιεί την πρωτεΐνη p110α, η οποία μπορεί με τη σειρά της να ενεργοποιήσει μη αυξητικούς μηχανισμούς ανάπτυξης. Ορισμένες μελέτες έχουν αποδείξει ότι το γονίδιο PIK3CA έχει υψηλή έκφραση στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, που μπορεί να συνδέεται με υψηλό κίνδυνο υποτροπής μετά τη

θεραπεία. Επιπλέον, το γονίδιο PIK3CA περιλαμβάνει την πλειοψηφία εμφάνισης καρκίνου κεφαλής και τραχήλου που σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων, ενώ σπανιότερα παρουσιάζεται λόγω HPV αρνητικό. (11).

Η οδός PI3K/Akt/mTOR αποτελεί σημαντικό μονοπάτι στη ρύθμιση της κυτταρικής πρόληψης και της ανάπτυξης στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (HNSCC). Η απορρύθμιση αυτής της οδού είναι συνήθης, προκαλώντας αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο, την επιβίωση και τη μετανάστευση των κυττάρων. Αυτή η πληροφορία μπορεί να έχει σημασία για τις θεραπείες που στοχεύουν σε αυτήν την οδό για την αντιμετώπιση του HNSCC. Το PI3KCA είναι υπεύθυνο για περίπου 16% των μεταλλάξεων στο HNSCC. Τα ενζύματα PI3Ks είναι σημαντικά για την κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και επιβίωση. Ενεργοποιούνται από RTKs, όπως για παράδειγμα το EGFR. Είναι γνωστό ότι τα μέλη του μονοπατιού σηματοδότησης PI3K/Akt/mTOR περιλαμβάνουν τα σύμπλοκα mTOR (mTORC1 και mTORC2) και το Akt. Το mTORC2 είναι σημαντικό για τη φωσφορυλίωση του Akt και την ενεργοποίηση άλλων μορίων σηματοδότησης, όπως το SGK1, στο πλαίσιο της οδού PI3K (1).

NOTCH1

Η πρωτεΐνη NOTCH1 αντιπροσωπεύει έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα με εξωκυτταρική περιοχή που περιλαμβάνει 36 περιοχές παρόμοιες με το (Epidermal Growth factor, EGF) και παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορους ιστούς και οργανισμούς. Αυτή η εξωκυτταρική περιοχή περιέχει συναινετικές αλληλουχίες δέσμησης Ca²⁺ που συμβάλλουν στη λειτουργία του υποδοχέα. Η απενεργοποίηση του NOTCH1 φαίνεται να σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των πλακωδών κυττάρων και τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου κεφαλής και τραχήλου (HNSCC). Επιπλέον, η ρύθμιση του NOTCH1 φαίνεται να επηρεάζει τη διαδικασία διαφοροποίησης του πλακώδους επιθηλίου. Τα ερευνητικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι το NOTCH1 ενδέχεται να είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο στην ανάπτυξη καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου (HNSCC), που είναι παρόμοια με τα καρκινώματα πλακωδών κυττάρων του δέρματος (42).

Συγκεκριμένα, οι γονιδιωματικές μελέτες απέδειξαν ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο NOTCH1 εμφανίζονται σε σημαντικό ποσοστό στους καρκίνους του στοματοφάρυγγα, ιδίως σε αυτούς που προκαλούνται από τον ιό HPV. Η συχνότητα αυτών των μεταλλάξεων σε HPV-θετικούς καρκίνους είναι περίπου 10%, το οποίο είναι χαμηλότερο από το μισό του ποσοστού που εμφανίζεται σε HPV-αρνητικούς καρκίνους κεφαλής και τραχήλου. Ακόμη, τα πρόσθετα

γενετικά στοιχεία που παρουσίασαν αποδεικνύουν ότι το NOTCH1 διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην καρκινογένεση πλακωδών καρκινωμάτων που προκαλούνται από τον HPV. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ένα εκτενές μοντέλο μεταλλαξιγένεσης με παρεμβολή σε ποντίκια, με τη μεσολάβηση τρανσποζονίων και υπό όρους συνέκφραση του HPV E6/E7 στο βασικό επιθήλιο. Τα δεδομένα που παρουσίασαν οι ίδιοι υποδηλώνουν ότι η απουσία λειτουργικότητας του NOTCH1 μπορεί να συμβάλει στην καρκινογένεση του HPV- θετικού και αρνητικού HNSCC, ειδικά όταν υπάρχουν οδηγοί όπως τα E6/E7. Αυτή η υπόθεση μπορεί να εξηγήσει τη μειωμένη /περιορισμένη ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων NOTCH1 σε HPV-θετικούς HNSCC. Τέλος, το γονίδιο NOTCH1 ανιχνεύεται στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία HNSCC (35).

PTEN

Το γονίδιο PTEN επικεντρώνεται στην εξέλιξη του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου (HNSCC). Εστιάζοντας στον ρόλο της μεθυλίωσης του DNA, της απομεθυλίωσης 5-AZA-2'-deoxycytidine (5-AZA), και στα βλαστοκύτταρα καρκίνου (CSCs), τα οποία παρουσιάζουν δυσλειτουργικό PTEN, αναφερωμένο ως ογκοκατασταλτικό. Η απώλεια του PTEN επηρεάζει τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου, ενώ το 5-AZA φαίνεται να έχει ανασταλτική επίδραση στα κυτταρικά αδιαφοροποιημένα κύτταρα (CSC) και τις μοριακές διαδραστικές οδούς NF-κB και EMT. Η απώλεια λειτουργίας του γονιδίου PTEN σχετίζεται με αυξημένη επιθετικότητα στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (HNSCC).

Οι μηχανισμοί ρύθμισης της λειτουργίας του PTEN περιλαμβάνουν φωσφορυλίωση, ουβικουιτίνη, οξειδωση και ακετυλίωση. Το PTEN είναι ένα σημαντικό γονίδιο που συχνά συνδέεται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την πρόληψη της καρκινογένεσης. Η απώλεια λειτουργίας του PTEN μπορεί να συνδέεται με τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την εξέλιξη συμπαγών όγκων. Επιπλέον, η υπερμεθυλίωση του DNA είναι ένα επιπλέον στοιχείο που μπορεί να επηρεάσει την προστατευτική λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) (4).

TP53

Η μετάλλαξη TP53 συνδέεται στενά με τον ακανθοκυτταρικό καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (HNSCC), ενισχύοντας τη συσσώρευση της πρωτεΐνης p53 στα καρκινικά κύτταρα. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν την p53 σε HNSCC χωρίζονται σε κατηγορίες που

αντιστοιχούν σε υποτύπους με WTp53, μεταλλαγμένο p53 και HPV-θετικό HNSCC. Η πρώτη κατηγορία σχετίζεται με τα PM2, RITA, nutlin-3 και CH1iB, που επιδρούν στην αποικοδόμηση ή την άμεση αναστολή του WTp53. Αυτό επιτυγχάνει την επανενεργοποίηση της p53 είτε επηρεάζοντας αναστολείς της p53, όπως οι MDM2 και MDMX/4, είτε αποτρέποντας τη διάσπαση της p53 μέσω της αναστολής του πρωτεασωμικού συμπλέγματος.

Η δεύτερη κατηγορία σχετίζεται με τις ενώσεις, όπως είναι η PRIMA-1, η APR-246, η COTI-2 και η CP-31398, που έχουν εξεταστεί για τη δυνατότητά τους να επηρεάζουν τη μεταλλαγμένη p53. Αυτές οι ενώσεις προσπαθούν να δεσμεύσουν τη μεταλλαγμένη p53 ώστε να αποκαταστήσουν τη φυσική τους κατάσταση (WT) και τη μεταγραφική δραστηριότητά της. Η τρίτη κατηγορία ασχολείται με τις θεραπείες για τον καρκίνο που σχετίζεται με τον ιό HPV που είναι σε εξέλιξη. Οι θεραπείες που στοχεύουν στα ιικά ένζυμα E6/E7, που είναι το Ad-E6/E7-As και η βορτεζομίμη, εξετάζονται για την αναστολή της δράσης τους στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Η ανασταλτική μετάλλαξη του p53 ευθύνεται για τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας, του ρινοφάρυγγα, του υποφάρυγγα και του λάρυγγα με ποσοστό 75-85 % που σχετίζεται με τον HPV (3).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης p53 και της πρωτεΐνης HPV E6 σε ασθενείς με HPV+ HNSCC μπορεί να οδηγήσει στην απενεργοποίηση της p53, επηρεάζοντας τον κυτταρικό κύκλο και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ στο HPV- HNSCC μεταλλάσσεται συνέχεια. Η μετάλλαξη TP53 συνδέεται συχνά με σημαντική επίδραση στον χρόνο επιβίωσης και την ανταπόκριση σε θεραπείες, όπως είναι η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία, σε ασθενείς με HNSCC (καρκίνο κεφαλής και τραχήλου). Ο προσδιορισμός της μετάλλαξης TP53 μπορεί να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τη διαστρωμάτωση του κινδύνου και το προγνωστικό προφίλ της νόσου, καθιστώντας τον ένα χρήσιμο και αξιόλογο παράγοντα για τον κλινικό προσανατολισμό (42).

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου είναι μια ετερογενής νόσος με κακή πρόγνωση, ιδίως όταν γίνεται μεταστατική. Η ποικιλία των μεταλλάξεων σε διάφορα σημεία της πρωτεΐνης μπορεί να επηρεάσει το βιολογικό αποτέλεσμα. Στο γονίδιο TP53 είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ανιχνεύεται με μικρότερη συχνότητα στις μεταστάσεις, σε αντίθεση με τους πρωτοπαθείς όγκους στους οποίους το γονίδιο TP53 υπερισχύει και εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα. Στις περιοχές όπου δεσμεύεται το DNA, μάλιστα, μπορεί να προκαλέσει σε μεγάλο βαθμό λανθασμένες μεταλλάξεις οι οποίες οφείλονται στην υπερέκφραση του γονιδίου στο χρωμόσωμα 11. Τέλος, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53

συνδέονται συχνά με υψηλότερο βαθμό στις συχνότητες Μεταλλάξεων Φορτίου (TMB) σε μεταστατικούς όγκους. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι ασθενείς με αυτές τις μεταλλάξεις εμφανίζουν πιο χαμηλή ανταπόκριση στους αναστολείς του ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου (22).

KMT2C

Το γονίδιο KMT2C, που αναφέρεται ως μεθυλτρανσεράση της λυσίνης 2c, είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που συσχετίζεται με πολλά μυελοειδή κύτταρα και επιθήλια που προκαλούν συμπαγείς όγκους. Σχετικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι ασθενείς με τον γονότυπο TC ή CC εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο για τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας, σε σύγκριση με ασθενείς που παρουσιάζουν τον γονότυπο TT. Επιπλέον, σημαντικό είναι να επισημανθεί ότι ο γονότυπος TC + CC του γενετικού πολυμορφισμού rs4725443 συνδέεται με το προχωρημένο στάδιο καρκίνου σε ανθρώπους που δήλωσαν πως δεν καταναλώνουν αλκοόλ, όπως και για πληθυσμό που δήλωσαν πως καταναλώνουν αλκοόλ, λόγω της κακής διαφοροποίησης των κυττάρων (36). Επιπρόσθετα, ο υποφαρυγγικός καρκίνος οφείλεται κατά κύριο λόγο στο μεταλλαγμένο γονίδιο KMT2C και ανιχνεύεται με μεγάλη συχνότητα. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν διερευνήσει την απώλεια λειτουργίας του γονιδίου, έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα πως παρουσιάζει αυξημένο σχηματισμό και πολλαπλασιασμό αποικιών. Τέλος, ερευνητικές μελέτες ανακάλυψαν ότι το γονίδιο KMT2C στο HNSCC παίζει μεγάλο ρόλο σαν καταστολέας του όγκου, με αποτέλεσμα να υπάρχουν νέες προοπτικές για την αναζήτηση στοχευμένων θεραπειών (25).

Συμπέρασμα

Η παρούσα ερευνητική εργασία που πραγματοποιήθηκε σχετικά με τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, έδειξε ότι ο καρκίνος αυτός ταξινομείται στην έκτη θέση συχνότητας εμφάνισης παγκοσμίως, λόγω του ακανθοκυτταρικού καρκίνου. Οι παράγοντες που οδηγούν στην ανάπτυξη του καρκίνου αυτού περιλαμβάνουν τα HPV αρνητικά ή HPV θετικά που έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν καρκινογένεση. Σύμφωνα με το προφίλ των μεταλλάξεων που απέδειξε η ερευνητική εργασία, φάνηκε πως τα μεταλλαγμένα γονίδια που ανιχνεύτηκαν στους τέσσερις ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη, είχαν την ικανότητα να προκαλέσουν σημαντικές επιπτώσεις στη λειτουργία των κυττάρων, να δημιουργήσουν γενετικούς

πολυμορφισμούς, γενετικές διαφοροποιήσεις και γενετικές αλλοιώσεις. Επιπλέον, οι γονιδιωματικές μεταλλάξεις φάνηκε να απορρυθμίζουν την κυτταρική λειτουργία, με αποτέλεσμα να υπάρχει δυσλειτουργία και απόπτωση των κυττάρων. Οι αιτίες αυτές που αναφέρθηκαν προηγουμένως οδηγούν την κατάσταση των κυττάρων σε μια ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση που συμβάλλει σταδιακά στο να δημιουργηθεί καρκίνος κεφαλής και τραχήλου.

Αναφορές

1. Alsahafi, E., Begg, K., Amelio, I., Raulf, N., Lucarelli, P., Sauter, T., & Tavassoli, M. (2019). Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death and Disease*, *10*, 540.
2. Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D., & Ferris, R. L. (2020). Head and Neck Cancer. *Lancet*, *371* (9625), 1695-1709.
3. Bakker EM, Witkamp FE, Luu KLN, van Dongen SI, Raijmakers NJH, van Roij J, van der Heide A, Rietjens JAC. (2022) Caregiver activation of relatives of patients with advanced cancer. *Eur J Cancer Care (Engl)*, *31* (6), doi: 10. 1111/ecc. 13656. Epub 2022
4. Borgato, G. B., Borges, G. A., Souza, A. P., Squarize, C. H., & Castilho, R. M. (2020). Loss of PTEN sensitizes head and neck squamous cell carcinoma to 5-AZA-2'-deoxycytidine. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *130* (2), 181-190.
5. The Cancer Genome Atlas Network. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, *517*. [https://doi: 10. 1038/nature14129](https://doi.org/10.1038/nature14129)
6. *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*. (2023). Retrieved December 16, 2023, from <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
7. Chen, Z., Zhang, C., Chen, J., Wang, D., Tu, J., Van Waes, C., Saba, N. F., Chen, Z. G., & Chen, Z. (2021). The proteomic landscape of growth factor signaling networks associated with FAT1 mutations in head and neck cancers. *Cancer Res*, *81* (17), 4402-4416.
8. Chen, Z. G., Saba, N. F., & Teng, T. (2022). The diverse functions of FAT1 I cancer progression: good, bad, or ugly? *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *41* (248).
9. Cirillo, A., Marinelli, D., Romeo, U., Messineo, D., De Felice, F., De Vincentiis, M., Valentini, V., Mezi, S., Valentini, F., Vivona, L., Chiavassa, A., Cerbelli, B., Santini, D., Bossi, P., Polimeni, A., Marchetti, P., & Botticelli, A. (2024). Pembrolizumab-based first-line treatment for PD-L1-positive, recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective analysis. *BMC cancer*, *24* (1), 430.
10. Dongre, H. N., Haave, H., Fromreide, S., Erland, F. A., Moe, S. E. E., Dhayalan, S. M., Riis, R. K., Sapkota, D., Costea, D. E., Aarstad, H. J., & Vintermyr, O. K. (2021). Targeted Next-generation sequencing of cancer related genes in a Norwegian patient cohort with head and neck squamous cell carcinoma reveals novel actionable mutations and correlations with pathological parameters. *Front Oncol*, *11*, 734134.
11. Farah, C. (2021). Molecular landscape of head and neck cancer and implications for therapy. *Annals of Translational Medicine*, *9* (10), 915.
12. Fernandes, Q., Menhi, M., Raza, A., Inchakalody, V. P., Abdelouahab, N., Zar Gul, A. R., Uddin, S., & Dermime, S. (2018). Role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of head and neck cancers and its potential as an immuotherapeutic target. *Front Oncol*, *8*, 257.
13. Goel, B., Tiwari, A. K., Pandey, R. K., Singh, A. P., Kumar, S., Sinha, A., Jain, S. K., & Khattri, A. (2022). Therapeutic approaches for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma- An update on clinical trials. *Transl Oncol*. 10. 1016/j. tranon. 2022. 101426
14. Gormley, M., Creaney, G., Schache, A., Ingarfield, K., & Conway, D. I. (2022). Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *British Dental Journal*, *233*, 780-786.

15. Guan, Y. F., Li, G. R., Wang, R. J., Yi, Y. T., Yang, L., Jiang, D., Zhang, X. P., & Peng, Y. (2012). Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chin J Cancer*, 31 (10), 463-470. 10. 5732/cjc. 012. 10216
16. Gudmundsson, S., Singer-Berk, M., Watts, N. A., Phu, W., Goodrich, J. K., Solomonson, M., Genome Aggregation Database Consortium, Rehm, H. L., MacArthur, D. G., & O'Donnell-Luria, A. (2021). Variant interpretation using population databases: Lessons from gnomAD. *Human Mutation, Variants, Informatics and Disease*. <https://doi.org/10.1002/humu.24309>
17. *Head and neck cancer: types of treatment*. (2023). American Society for Clinical Oncology, Cancer. Net. Retrieved December 5, 2023, from <https://www.cancer.net/cancer-types/head-and-neck-cancer/types-treatment>
18. *HPV and Oropharyngeal Cancer*. (2023). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/cancer/hpv/oropharyngeal-cancer.html>
19. Hussen, B. M., Abdullah, S. T., Salihi, A., Sabir, D. K., Sidiq, K. R., Rasul, M. F., Hidayat, H. J., Ghafouri-Fard, S., Taheri, M., & Jamali, E. (2022). The emerging role of NGS in clinical oncology and personalized medicine. *Pathology-Research and Practice*, 230.
20. Illumina. (2020). *TruSight Oncology 500 Reference Guide* [Document # 1000000067621 v05].
21. Johnson, D. E., Burtneess, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, 6 (1), 92.
22. Klinakis, A., & Chiocca, S. (2020). Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *Br J Cancer*, 122 (3), 306-314.
23. Landrum, M. J., Li, J. M., Riley, G. R., Jang, W., Rubinstein, W. S., Church, D. M., & Maglott, D. R. (2013). *ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype* (2nd ed.). The NCBI Handbook. 10. 1093/nar/gkt1113
24. Loyo, M., Li, R. J., Bettegowda, C., Pickering, C. R., Frederick, M. J., Meyers, J. N., & Agrawal, N. (2013). Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head Neck*, 35 (3), 454-463. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22907887/>. 10. 1002/hed. 23100
25. Machnicki, M. M., Rzepakowska, A., Janowska, J. I., Pepek, M., Krop, A., Pruszczyk, K., Stawinski, P., Rydzanicz, M., Grzybowski, J., Gornicka, B., Wnuk, M., Ploski, R., Osuch-Wojcikiewicz, E., & Stoklosa, T. (2022, May 19). Analysis of Mutational Profile of Hypopharyngeal and Laryngeal Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Identifies KMT2C as a Potential Tumor Suppressor. *Front Oncol*. 10. 3389/fonc. 2022. 768954
26. Mahjoubeh, J. S. D., & Gamieldien, J. (2017). A practical guide to filtering and prioritizing genetic variants. *Biotechniques*, 62 (1), 18-30. 10. 2144/000114492
27. Marret, G., Bieche, I., Dupain, C., & et al. (2021). Genomic alternations in head and neck squamous cell carcinoma: level of evidence according to ESMO scale for clinical actionability of molecular targets (ESCAT). *JCO Precision Oncology*, 5, 215-226.
28. National Cancer Institute. (2021, May 25). *What are cancers of the head and neck?* National Cancer Institute. Retrieved June 7, 2024, from <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>
29. National Cancer Institute. (2023). *How common are head and neck cancers?* National Cancer Institute. Retrieved November 13, 2023, from <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>
30. National Cancer institute. (2023). *What causes cancers of the head and neck ?* National Cancer institute. Retrieved November 11, 2023, from <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>

31. National Center for Biotechnology Information. (2023). *What is ClinVar?* National Institutes of Health. National Center for Biotechnology Information. Retrieved December 16, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/>
32. Patel, Z. H., Kottyan, L. C., Lazaro, S., Williams, M. S., Ledbetter, D. H., Tromp, H., Rupert, A., & Kohram, M. (2014). The struggle to find reliable results in exome sequencing data: filtering out Mendelian errors. *Front Genet.* 10. 3389/fgene. 2014. 00016
33. Sabatini, M. E., & Chiocca, S. (2020). Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *Br J Cancer*, 122 (3), 306-314.
34. Sami, A., El-Metwally, & Rashad, M. Z. (2024). MAC-ErrorReads: machine learning-assisted classifier for filtering erroneous NGS reads. *BMC Bioinformatics*, 25 (1), 61. 10. 1186/s12859-024-05681-1.
35. Shah, P. A., Huang, C., Li, Q., Kazi, S. A., Byers, L. A., Wang, J., & Frederick, M. J. (2020). NOTCH1 Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cells*, 9 (12), 2677.
36. Shieu, M. -K., Ho, H. -Y., Lin, S. -H., Lo, Y. -S., Lin, C. -C., Chuang, Y. -C., Hsieh, M. -J., & Chen, M. -K. (2022). Association of KMT2C genetic variants with the clinicopathologic development of oral cancer. *Int J Environ Res Public Health*, 19 (7), 3974.
37. Sisk, E. A., Bradford, C. R., Carey, T. E., Paulino, A., & Robertson, E. (2023). Epstein-Barr Virus detected in a head and neck squamous cell carcinoma cell line derived from an immunocompromised patient. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129 (10), 1115-1124.
38. Solis, R. N., Silverman, D. A., & Birkeland, A. C. (2022). Current trends in precision medicine and next-generation sequencing in head and neck cancer. *Current Treat Options Oncol*, 23 (2), 254-267.
39. Tabatabaeifar, S., Kruse, T. A., Thomassen, M., & Larsen, M. J. (2014, November). Use of next generation sequencing head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Oral Oncol*, 50 (11), 1035-1040. 10. 1016/j.oraloncology. 2014. 08. 013
40. Tumban, E. (2019). A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. *Viruses*, 11 (10), 922.
41. Yin, Y., Butler, C., & Zhang, Q. (2021). Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Hum Immunol*, 82 (11), 812-819.
42. Zhou, G., Liu, Z., & Myers, J. N. (2016). TP53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma and their impact on disease progression and treatment response. *J Cell Biochem*, 117 (12), 2682-2692. 10. 1002/jcb. 25592

Πηγές Εικόνων

Εικόνα (σελίδα)	Περιγραφή /πηγή
Εικόνα 1. Περιοχές που εμφανίζεται ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου (σελ. 2)	Χαρακτηριστικά στην θέση των παραρρίνιων κόλπων, της ρινικής κοιλότητας, της στοματικής κοιλότητας, της γλώσσας, των σιελογόνων αδένων, του λάρυγγα και του φάρυγγα, επίσης του ρινοφάρυγγα, του στοματοφάρυγγα και του υποφάρυγγα. https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet#what-are-cancers-of-the-head-and-neck
Εικόνα 2. Τα εκτιμώμενα ποσοστά ηλικίας (ASR) της επίπτωσης του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) παγκοσμίως (σελ. 5)	Παρουσιάζονται για άνδρες και γυναίκες στην εικόνα (οι ανατομικές περιοχές που εντοπίζεται ο καρκίνος είναι χαρακτηριστικά στον υποφάρυγγα, λάρυγγα, χείλη, στοματική κοιλότητα, ρινοφάρυγγα και στοματοφάρυγγα) https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33243986/
Εικόνα 3. Κατανομή καρκίνων κεφαλής και τραχήλου που σχετίζεται με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV+ HNC) (σελ. 9)	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31600915/
Εικόνα 4. Γονίδια (σειρές) με σημαντικά μεταλλαγμένα γονίδια (που προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο MutSigCV, $q < 0, 1$) ταξινομημένα κατά τιμή q. παρουσιάζονται επίσης επιπρόσθετα γονίδια με τάσεις προς τη σημασία Τα δείγματα (στήλες, n = 279) είναι διατεταγμένα για να τονίσουν την αμοιβαία αποκλειστικότητα μεταξύ των μεταλλάξεων (σελ. 35)	Αριστερά, ποσοστό μετάλλαξης στο TCGA. Δεξιά, ποσοστό μετάλλαξης σε COSMIC (ιστός «ανώτερου αεροπεπτικού σωλήνα»). Κορυφαία, συνολικός αριθμός μεταλλάξεων ανά megabase. Η χρωματική κωδικοποίηση υποδεικνύει τον τύπο μετάλλαξης. Πηγή: https://www.nature.com/articles/nature14129/figures/2

Λίστα Πινάκων

Πίνακας	Περιγραφή /πηγή
Πίνακας 1. Γονίδια DNA που συνδέονται με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (σελ. 24-25)	https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trusight-oncology-500-data-sheet-m-gl-00173/trusight-oncology-500-and-ht-data-sheet-m-gl-00173.pdf
Πίνακας 2. Η συχνότητα μεταλλάξεων σύμφωνα με τη μελέτη “The Cancer Genome Atlas Network” και Cosmic και η γονιδιωματική θέση από NCBI Gene (σελ. 34)	Ανάλυση αποτελεσμάτων ερευνητικής μελέτης
Πίνακας 3. Παρουσίαση παραλλαγών των γονιδίων και μεταλλάξεις των νουκλεοτιδίων στα γονίδια που ανιχνεύθηκαν στους τέσσερις συμμετέχοντες ασθενείς (σελ. 36)	Ανάλυση αποτελεσμάτων ερευνητικής μελέτης
Πίνακας 4. Τυποι Καρκίνου (σελ. 37)	Ανάλυση αποτελεσμάτων ερευνητικής μελέτης