

السمات الجينية واللاجينية للسرطانات التي تنشأ من الخلايا الحرشفية المبطنة لأجزاء الرأس والرقبة.

عبير عبدالرحمن السفياي

اسم المشرفين على الرسالة
أ.د جلال الدين أعظم خان
د. أشرف دلول

المستخلص

مقدمة: في السنوات القليلة الماضية كان هناك وعي متزايد لسرطان الخلايا الحرشفية المبطنة لأعضاء الرأس والرقبة. حيث تشمل سرطانات الرأس و الرقبة كُلاً من سرطانات التجويق الفموي والجيوب الأنفية والحلق والحنجرة والعُقد اللمفية في الرقبة. مُعظم هذه السرطانات تنشأ من الأنسجة الحرشفية المخاطية (Squamous Cell Carcinomas) التي تبطن اجزاء الرأس و الرقبة. عالمياً يحتل سرطان الرأس والرقبة حُرشي الخلية المراتب العشرة الأوله من بين السرطانات الاخرى من حيث عدد الاصابات و الوفيات. حيث قدر عدد الحالات في المملكة العربية السعودية، لحالات السرطان الجديدة ما يقارب ٣٩ حالة من الذكور و ٣٢ حالة من الإناث. بجانب العوامل الوراثية و الطفرات الجينية يعد استهلاك المشروبات الروحية (الكحولية) وتدخين التبغ او مضغة من أشهر العوامل الخطيره التي تزيد من خطر الاصابة بهذا السرطان. كما اشارة الدراسات الحديثة ان الاصابة بفيروس بابيلوما البشري عاملاً مسبباً للإصابة ببعض أنواع سرطانات الخلايا الحرشفية في الرأس والرقبة .

على الرغم من كفاءة النظم العلاجية لعلاج هذا المرض، لا تزال عدد الوفيات مرتفعة. في كثير من الحالات حيث يتم تشخيص هذا المرض في مراحل المتأخره، لذلك من المهم التشخيص المبكر و البحث عن اي مؤشر حيوي لهذا المرض الذي من الممكن أن يؤدي إلى تحسين نتائج العلاج والتنبؤ بتحسن المريض.

الأهداف: تهدف هذه الدراسة بشكل اساسي لفهم المتغيرات الجينية و مافوق الجينية لمجموعة من الجينات السرطانية والكابحه للسرطان. هذه الدراسه أيضا تهدف الى تقدير مدى انتشار فيروس الورم الحليمي البشري بين المرضى المصابين بسرطانات الرأس و الرقبة و فهم العلاقة بين الاصابه بهذا الفيروس بالمتغيرات الجينية وما فوق الجينية المسببه لسرطانات الرأس و العنق. ومن ثم ربط النتائج بالفحوصات السريرية و المخبريه للمريض.

منهجية البحث: هذه الدراسة شملت ١٥٦ حالة مرضية شخصة بسرطان الرأس و الرقبة حُرشي الخلايا الذين قاموا بمراجعة كل من مستشفى جامعة الملك عبدالعزيز و مدينة الملك عبدالعزيز الطبية بالحرس الوطني خلال الفترة مابين ٢٠٠٥ الى ٢٠١٤. بعد الحصول على الموافقه الاخلاقية من المستشفى تم جمع المعلومات الاكلينيكية والتاريخية

الخاصة بكل مريض من السجلات الطبية التابعة للمستشفى. تم استخلاص الحمض النووي (DNA) من الانسجة المثبتة في البارافين والتي تحتوي على الخلايا السرطانية ومن ثم استخدام هذا المسخلص للفحص المخبري. لقد تمت دراسة التغيرات الجينية لخمسين جينا سرطاني و كاجح للسرطان التي تم تعطيلها في كثير من انواع السرطانات وذلك باستخدام جهاز التتابع المتسلسل للجينات (Ion Torrent Sequencer) الذي يستهدف ٢٠٧ منطقة في الخمس جين. كم تم دراسة ميثيلة الحمض النووي (DNA methylation) لسبعة جينات كاجحة للسرطان وذلك عن طريق استخدام تقنيه الميثايلوم التي تعتمد اساسا على البلمرة الكمية (qPCR) للحمض النووي المعدل كميائياً. كما تم إجراء تحليل بتفاعل البوليمريز المتسلسل (PCR) لاختبار وجود فيروس الورم الحليمي البشري في انسجة المرضى المصابين بمرض سرطان الرأس و الرقبة.

النتائج: : اظهرت النتائج ان تحليل التسلسل الجيني لسرطان اللسان وجود أنواع مختلفة من الطفرات في الجينات المستهدفة. حيث احتل جين TP53 المرتبه الاولى من حيث اكثر الجينات اعتلالاً وذلك بنسبة ٦٤% يليه كل من VHL (36%) ، PIK3CA (31%) ، CDKN2A (24%) ، EGFR (22%) ، APC (22%) ، PTEN (18%) ، NOTCH1 (16%) ، FGFR3 (16%) و BRAF (11%). كم اظهرت النتائج وجود عدد من الطفرات المتكرره لبعض الجينات مثل p.Arg248Gln\Trp و p.Ala1060Thr. كما اظهرت النتائج ان الطفره الجينه لجين TP53 سائداً عند كبار السن وخصوصاً عند النساء. كما وجد أن الطفره الجينية لجين KDR مؤشر سيئ لحالة المريض العمرية على عكس الطفرة الجينية لجين PIK3CA و TP53 الذي يعتبر مؤشر جيد لحالة المرض العمرية.

كما أظهرت نتائج دراسة ميثيلة الحمض النووي ان تردد ميثيلية جين SLIT2 كان الاعلى بنسبة ٦٣% مقارنة بالجينات الاخرى RASSF1A (41.3%) ، SFRP1 (40.7%) ، RARB (34.9) ، KL (30.7%) و CKDN2B (29.6%) و CKDN2A (٢٩,١%). كما اظهرت النتائج انا ميثيلية كلاً من جين KL و SFRP1 كانت سائده في اوارم البلعوم الانفي. كما وجد ان ميثيلية جين KL مؤشر جيد للتنبؤ بتحسن حالة المريض العمرية على عكس ميثيلة جين SFRP1.

كما بينت الدراسة أن حوالي ٧% من عينات المرضى تحتوي على فيروس الورم الحليمي البشري. حيث وجد أن الفيروس ينتشرا بصورة واضحة في عضو اللسان و خاصة عند الرجال. كما وجدة علاقة بين هذا الفيروس وبين حجم الورم. كما وجد أن وجود هذا الفيروس مؤشر ضعيف لتحسن حالة المريض.

الخلاصة: نتائج هذه الدراسة تشير الى ان التغيرات الجينية و مافوق الجينية يمكن ان تستخدم كامؤشر حيوي للكشف المبكر للسرطان و للتكهن بمراحل السرطان. أيضاً هذه الدراسة تظهر الفائدة المحتملة لفحص فيروس الورم الحليمي البشري لمجموعة كبيره من العينات.

Genetic and Epigenetic Signatures in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck

By

Abeer Abdulrahman Alsofyani

Supervised By

Prof. Dr. Jalaludden Azam.Awlia

Dr. Ashraf Dallol

Abstract

Background: In the last few years there has been a growing awareness of squamous cell carcinomas of the head and neck (HNSCC). Worldwide, the HNSCC ranks among the top ten cancers for both mortality and morbidity, affecting around 650,000 new patients each year. In Saudi Arabia, estimated annual numbers of new cancer cases were 39 males and 32 females. Despite the efficiency of therapeutic regimens to treat such disease, significant morbidity remains unacceptably high. Furthermore, compared to cancers of the breast and colon, HNSCC remains less well studied worldwide. Biomarkers for the disease are lacking or remain to be validated across ethnic groups. Therefore, Detection of DNA promoter methylation and genetic mutations in HNSCC Saudi patients from Saudi Arabia adds to the search of is promising biomarkers for early stage cancer detection and cancer progression that may lead to improved treatment outcomes.

Objective: The aim of this study is to profile the genetic and epigenetic alterations in HNSCC patients, also to determine the prevalence of the human papilloma viruses (HPV) and correlate their detection with patients' clinicopathological parameters as well as to investigate their role as disease biomarkers.

Material and methods: In the present cohort DNA material was extracted from 156 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sections from patient with HNSCC and 45 corresponding non-cancerous tissues normal. The samples were retrieved from the

National Guard Hospital and King Abdulaziz University Hospital, covering the period from 2005 to 2014. The pertinent clinicopathologic data (gender, age, grade, and lymph node status) were taken retrieved from the patients' records after obtaining the relevant ethical approvals. Methylation patterns in a panel of key genes including RARB, CDKN2A, CDKN2B, SLIT2, RASSF1A, and KL genes were profiled utilizing the semi-quantitative MethyLight assay. Targeted sequencing of 45 patients with oral tongue oral squamous cell carcinoma was performed using Ion Torrent Personal Genome Machine. The Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 was utilized, targeting 207 regions in 50 genes found to be frequently mutated in cancer. The variants were compared to dbSNP and COSMIC. GP5+/GP6+ oligonucleotides primers-PCR was used as a direct screening method to detect viral DNA (HPV) in 156 HNSCC FFPE blocks.

Results: Interestingly, SLIT2 methylation frequency was the highest (64.6%) followed by RASSF1A (41.3%) then RARB (40.7%), SFRP1 (34.9), KL (30.7%), CKDN2B gene (29.6%) and CKDN2A gene (29.1%). Moreover, our results showed that KL and SFRP1 methylation were more predominant in nasopharyngeal tumors ($p=0.001$ and $p=0.031$, respectively). Promoter methylation of KL gene was a frequent event in young female nasopharyngeal cancer patients ($p=0.033$). Kaplan–Meier analysis showed that patients with moderately differentiated tumors and display SFRP1 methylation have significantly worse overall survival. On the other hand, a better clinical outcome was seen in patients with KL methylation.

The sequencing analysis displays different kinds of missense, nonsense and frameshift mutations in the hotspot regions of the targeted genes. TP53 (64 %) was the highest most frequently mutated gene in OTSCC followed by PIK3CA (36%), CDKN2A (31%), EGFR (24%), APC (22 %), PTEN (22%), VHL (18%), NOTCH1 (16%), FGFR3 (16%) and BRAF (11%).

This study also shows that a total of 11/156 (7%) samples tested were positive for the presence of HPV-DNA and 145/156 (93%) was negative for HPV-DNA. Sanger sequencing method of the positive PCR products was performed to confirm the presence of HPV (type-18). Also, tongue organ was the most organ affected by HPV, especially in the male gender.

Conclusion: the frequent mutations and methylations detected in our cohort could serve as predictive biomarkers for HNSCC either for early detection, prognosis, and treatment response. Furthermore, this study is showing the potential benefit to screen HPV in a large cohort.