

<http://dx.doi.org/10.18778/8142-991-7>

Badanie podłoża molekularnego rozwoju nowotworów jamy ustnej na podstawie analizy ekspresji wybranych genów



WYDAWNICTWO
UNIWERSYTETU
ŁÓDZKIEGO

Anna Bielecka-Kowalska

Badanie podłoża molekularnego rozwoju nowotworów jamy ustnej na podstawie analizy ekspresji wybranych genów



**WYDAWNICTWO
UNIwersYTETU
ŁÓDZKIEGO**

Łódź 2020

Anna Bielecka-Kowalska

RECENZENCI

Hanna Gerber

Michał Arabski

REDAKTOR INICJUJĄCY

Beata Koźniewska

KOREKTA

Beata Wojtania

SKŁAD I ŁAMANIE

AGENT PR

KOREKTA TECHNICZNA

Anna Sońta

PROJEKT OKŁADKI

Agencja Reklamowa Efectoro

Zdjęcie wykorzystane na okładce: © Depositphotos.com/egorovartem

© Copyright by Anna Bielecka-Kowalska, Łódź 2020

© Copyright for this edition by Uniwersytet Łódzki, Łódź 2020

Wydane przez Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego

Wydanie I. W.09825.20.0.M

Ark. wyd. 7,0; ark. druk. 10,0

ISBN 978-83-8142-991-7

e-ISBN 978-83-8142-992-4

Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego

90-131 Łódź, ul. Lindleya 8

www.wydawnictwo.uni.lodz.pl

e-mail: ksiegarnia@uni.lodz.pl

tel. (42) 665 58 63

Mojemu mężowi Michałowi –
osobie, która wspierała mnie i wierzyła, że praca ta powstanie
– serdecznie dziękuję

Panu Profesorowi Januszowi Szemrajowi
dziękuję za życzliwość i pomoc w mojej pracy laboratoryjnej

Panu Profesorowi Tomaszowi Śliwińskiemu
dziękuję za serdeczną przyjaźń

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń	11
Wstęp	17
Rozdział 1	
Patofizjologia, mutageneza, onkogeneza tkanek	19
Rozdział 2	
Stany przednowotworowe	23
Rozdział 3	
Patologie nowotworowe – podział	27
Rozdział 4	
Przegląd nowotworów jamy ustnej	31
Rozdział 5	
Diagnostyka nowotworów jamy ustnej	37
Rozdział 6	
Markery molekularne stanów przednowotworowych jamy ustnej	39
Rozdział 7	
Wpływ profilowania molekularnego na udoskonalenie strategii leczenia raka jamy ustnej	45
Rozdział 8	
Strategie chirurgiczne	47
Rozdział 9	
Wpływ mikrobiomu jamy ustnej na rozwój zmian nowotworowych	49

Rozdział 10	
Cel pracy	55
Rozdział 11	
Materiały i metody	57
Rozdział 12	
Wyniki	77
Rozdział 13	
Dyskusja	119
Rozdział 14	
Wnioski	133
Rozdział 15	
Streszczenie	135
Bibliografia	139

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

ΔNp63	– białko p63 należące do rodziny białek p53, izoforma pozbawiona regionu domeny transaktywacyjnej
AA	– aminy aromatyczne (<i>aromatic amines</i>)
ABL2	– gen kodujący kinazę tyrozynową
ADAM17	– ADAM <i>metallopeptidase domain</i> 17
AgNORs	– srebrnochłonne regiony organizujące jąderko (<i>silver-absorbent regions organize nucleoli</i>)
APC	– gen kodujący u człowieka białko APC (<i>Adenomatous Polyposis Coli</i> – gruczolakowata polipowatość okrężnicy)
ATM	– białko (<i>ataxia telangiectasia mutated protein</i>)
B7-DC	– receptor komórek nowotworowych
BCL1	– białko antyapoptotyczne
BRCA1	– ludzki gen supresorowy (<i>BReast CAncer genes 1</i>)
CCDN3	– białko uczestniczące w proliferacji komórek poprzez CDK14
CD31	– przeciwciało przeciw komórkom naczyń (<i>angiosarcoma</i>)
Cdc2	– kinaza białkowa (<i>cell division cycle 2</i>)
CDK14	– gen kodujący cyklino zależną kinazę 14 (<i>cyclin dependent kinase14</i>)
CHFR	– gen kodujący ligazę proteolitycznej degradacji białek, aktywowaną przez czynniki stresowe w punkcie kontrolnym profazy (<i>checkpoint with forkhead and ring finger domains</i>)
CDH13	– gen kodujący białko kadheryny H (13)
CDK	– kinaza zależna od cytokin (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CDKN1B	– inhibitor cyklinozależnej kinazy 1B (<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>)
CDLE	– ogniskowa przewlekła postać tocznia rumieniowatego układowego (<i>lupus erythematosus</i>) (LE)
cDNA	– komplementarny DNA (<i>complementary DNA</i>)
c-fos	– komórkowy protoonkogen, należący do genów wczesnej odpowiedzi komórkowej, koduje czynnik transkrypcyjny FOS
CNV	– polimorfizm liczby kopii (<i>copy number ariation</i>)
COX-2	– gen cyklooksygenazy-2

CSF	– czynnik stymulujący wzrost kolonii (<i>colony-stimulating factor</i>)
CSF1	– receptor
CT	– tomografia komputerowa (<i>computed tomography</i>)
Ct	– poziom krytyczny fluoroscencji (<i>threshold cycle</i>)
CXC	– gen związany z procesem zapalnym i nowotworzeniem (<i>chemokiny</i>)
CYGB	– cytoglobina
DLGAP1	– disks-large-associated protein 1
DMEN	– podłoże Duplecco Modified (substrates Dulbecco Modified)
DTT	– ditiotritol
E1AF	– czynnik transkrypcji
EFNA5	– gen Efryna A5
EGF	– naskórkowy czynnik wzrostu (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	– receptor naskórkowego czynnika wzrostu (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
eIF4E	– eukariotyczny czynnik inicjujący translację
ELISA	– test immunoenzymatyczny (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Etk/BMX	– kinaza
Ets-1	– zewnętrzne sekwencje transkrybowane-1 (<i>extremal transcribed spacers 1</i>)
FadA	– białko adhezyjne z <i>fusobacterium nucleatum</i> (<i>adhesive protein with fusobacterium nucleatum</i>)
FGF	– czynnik wzrostu fibroblastów (<i>fibroblasts growth factor</i>)
FMRP	– fragile X mental retardation protein
G1	– rak wysokorozóżnicowany niski stopień złośliwości
G2	– rak średnioróżnicowany pośredni stopień złośliwości
GEC	– komórki epidermalne skóry
GKAP	– kinaza guanylowa (<i>guanyl kinase</i>)
GLUT-1	– transporter glukozy (<i>glucose transporters</i>)
GRO1	– protoonkogen
GRPR	– receptor uwalniający peptyd gastryny
GST	– transferaza S-glutationowa (<i>glutathione S-transferase</i>)
GSTT1	– transferaza S-glutationowa T1 (<i>glutathione S-transferase T1</i>)
GTP	– ganozyna-5-trifosforan (<i>guanosine 5-triphosphate</i>)
HGF	– czynnik wzrostu hepatocytów (<i>hepatocyt growth factor</i>)
HhaI	– enzym restrukcyjny wrażliwy na metylację
HIV	– ludzki wirus niedoboru odporności (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HNSCC	– nowotwory głowy i szyi (<i>head and neck tumors</i>)
HPV	– wirus brodawczaka ludzkiego (<i>human papilloma virus</i>)

IGF	– insulinopodobny czynnik wzrostu (<i>insulin-like growth factor</i>)
IL	– interleukina (<i>interleukin</i>)
lncRNA	– długie niekodujące cząsteczki RNA
HOTAIR	
INF (γ)	– interferon gamma
INK4A	– gen supresorowy p16
iNOS	– indukowana syntetaza tlenku azotu (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IRAK1	– kinaza-1 skojarzona z receptorem interleukin (<i>interleukin-receptor--associated kinase 1</i>)
JAK1	– kinaza Janusowa-1 (<i>Janus activated kinase 1</i>)
K	– tkanka bez zmiany nowotworowej
LCA	– wspólne antygeny limfocytów (<i>lymphocyte common antigen</i>)
LDLR	– gen receptor frakcji lipoprotein LDL w surowicy krwi (<i>serum lipoprotein LDL fraction receptor gene</i>)
LE	– toczeń rumieniowaty (<i>lupus erythematosus</i>)
MAPK	– kinazy białkowe aktywujące replikację DNA
MARKCCS	– substrat alaniny bogaty w kinazy C (<i>myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate</i>)
MGMT	– metylotransferaza 0-6-metyloguaninowa (<i>0-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>)
miRNA	– mikro RNA
MMP-9	– metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (<i>matrix metalloproteinase 9</i>)
MMP	– metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (<i>matrix metalloproteinase</i>)
MMP-14	– metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej-14 (<i>matrix metalloproteinase 14</i>)
MMP-2	– metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej-2 (<i>matrix metalloproteinase 2</i>)
MMP-8	– metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej-8 (<i>matrix metalloproteinase 8</i>)
MMPs	– macierz metaloproteinaz (<i>matrix metalloproteinases</i>)
MPL	– receptor dla trombopoetyny (<i>receptor for thrombopoietrine</i>)
MPN	– nowotwór mieloproliferacyjny (<i>myeloproliferative neoplasm</i>)
mRNA	– matrycowy/informacyjny RNA (<i>messenger RNA</i>)
MS	– białka szlaku cieplnego (<i>heat shock factor</i>)
MSF1	– białka szlaku cieplnego-F1 (<i>heat shock factor F1</i>)
N	– tkanka zmieniona nowotworowo
NAT	– transferaza N-acetylowa (<i>acetyl N-transferase</i>)

NC	– stała normalizacji (<i>normalisation constant</i>)
NGS	– sekwencjonowanie nowej generacji (<i>new generation sequencing</i>)
NMDA	– kwas N-metylo-D-asparaginowy (<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>)
NMDAR	– receptor komórkowy (<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>)
NMR	– magnetyczny rezonans jądrowy (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NNA	– N-nitrozaminy (<i>N-nitrosamines</i>)
NSE	– przeciwciała przeciw komórkom nerwowym (<i>neurosarcoma</i>)
OGG1	– glikozylaza DNA
OSCC	– kompleksowe profilowanie molekularne
OSMF	– włóknienie podśluzówkowe jamy ustnej (<i>oral submucosus fibrosis</i>)
P2X7	– receptor purynergiczny (<i>purynergic receptor</i>)
p27Kip1	– inhibitor cyklino-zależnej kinazy (<i>cycle inhibitor with dependent kinase</i>)
p38	– kinaza białkowa 38 (<i>protein kinase 38</i>)
p53	– białko 53 (<i>tumor protein 53</i>)
PCNA	– jądrowy antygen komórek proliferujących (<i>proliferating cell nuclear antygen</i>)
PCR	– łańcuchowa reakcja polimeryzacji (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDCD4	– czynnik programowanej śmierci komórki (<i>programmed cell death protein</i>)
PDGF	– płytkowy czynnik wzrostu (<i>platelet derived growth factor</i>)
PET-CT	– pozytonowa tomografia emisyjna (<i>position emissive tomography</i>)
PI3K	– inhibitor szlaku 3-kinazy (<i>fosfatydyloinozylan phosphatidylinositide 3-kinases</i>)
pmirGLO	– wektor/plazmid
Pro-MMP-9	– metaloproteinaza pro-macierzowa-9 (<i>pro matrix metaloproteinase 9</i>)
PTEN	– phosphatase and tensin homolog delated of chromosome ten
PWA	– węglowodory aromatyczne (<i>aromatic hydrocarbons</i>)
RB6	– receptory jądrowe dla retinoidów (<i>nuclear receptors for retinoids</i>)
RCC2	– telefazowe białko krążkowe (<i>telophase disc protein</i>)
ROS	– reaktywne formy tlenu (<i>reactive oxygen species</i>)
RT	– odwrotna transkryptaza (<i>reverse transcriptase</i>)
RW	– rak wargi (<i>carcinoma labii</i>)
SCC-25	– linia komórkowa ludzkich komórek raka płaskonabłonkowego języka
SLE	– postać układowa LE (<i>lupus erythematosus systemicus</i>)
SMA	– przeciwciała przeciw mięśniom gładkim (<i>leiomyosarcoma</i>)

SNP	– polimorfizm pojedynczych nukleotydów (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
Stat3	– kinaza
TAD	– domena transaktywacyjna (<i>transactivation domain</i>)
TAE	– bufor TRIS-octan-EDTA
TAp63	– polimorficzne białko-63 (<i>polimorphic protein 63</i>)
TGF	– transformujący czynnik wzrostu (<i>transforming growth factor</i>)
TGF (betaB)	– transformujący czynnik wzrostu beta (<i>transforming growth factor beta</i>)
TIM Ps	– tkankowy inhibitor metaloproteinaz (<i>tissue inhibitors of MMPs</i>)
TIMP	– inhibitor metaloproteinazy (<i>metaloproteinase inhibitor</i>)
TIMP3	– tkankowy inhibitor metaloproteinazy 3 (<i>metaloproteinase inhibitor 3</i>)
TNF	– (alfa) czynnik martwiczcy guza
TNM	– guz-węzły chłonne-przerzuty odległe (<i>tumor-nodules-metastases</i>)
TP53	– gen 53 położony na chromosomie 17 (<i>gen 53-locus 17p13</i>)
TPM1	– tropomyosin alpha 1
Xba	– enzym restrykcyjny
XPD	– białko naprawy, helikaza ATP zależna
XRCC1	– białko znakowane naprawy DNA

WSTĘP

Nowotwór jest rozrostem patologicznych komórek, które stają się niepodatne na działanie czynników ustrojowych, regulujących rozmnażanie, różnicowanie i dojrzewanie. Taki stan powoduje niekontrolowany rozrost komórek potomnych, niezgodnych z potrzebami organizmu i coraz bardziej opornych na sygnały regulacyjne [1–4].

Jednocześnie w komórkach nowotworowych/rakowych dochodzi do załamania mechanizmów kontrolujących prawidłowy wzrost komórki. Wzrost i różnicowanie komórki prawidłowej podlega wielu mechanizmom kontrolnym różnych typów. W przypadku transformacji nowotworowej dochodzi do całkowitej utraty kontroli nad komórkami wywołującymi tę transformację.

Statystycznie tylko choroby układu sercowo-naczyniowego wywołują większą śmiertelność, a nowotwory to druga w kolejności przyczyna zgonów w Europie i Ameryce Północnej [5, 6].

Przewidziano, że w ciągu najbliższych 25 lat dojdzie do podwojenia zachorowalności na nowotwory, a około 70% dotyczyć ma państw rozwijających się [7–9].

Nowotwory nabłonkowe jamy ustnej stanowią około 3% wszystkich nowotworów złośliwych na świecie, co stanowi około 500 tysięcy nowych przypadków rocznie [8, 9]. Tak duża liczba chorych stanowić zaczyna istotny problem zdrowotny wśród ludności. Występowanie raka jamy ustnej obserwuje się najczęściej u osób po 40 roku życia i z badań wynika, iż mężczyźni dwukrotnie częściej zapadają na tę chorobę [12–14].

Zmiany te można stosunkowo wcześniej wykryć i leczyć [15], ale nadal spory procent społeczeństwa nie przykłada do tego wagi. Część osób zaniebija badania w obawie przed wykryciem niepokojących zmian lub twierdzi, że nic im nie zagraża [15]. Dopiero powiększający się guz w obrębie twarzy, okolicy podżuchwowej lub szyi skłania chorego do szukania pomocy lekarskiej. Bardzo często są to już liczne przerzuty do węzłów chłonnych, którym może towarzyszyć ból twarzy [16, 17]. Dlatego bardzo ważna jest profilaktyka przeciwnowotworowa, dokładne badanie jamy ustnej i zebrany wywiad w gabinetach stomatologicznych [15].

ROZDZIAŁ 1

PATOFIZJOLOGIA, MUTAGENEZA, ONKOGENEZA TKANEK

Jama ustna to jedno z miejsc najbardziej narażonych na działanie czynników zewnętrznych – zarówno fizycznych, jak i chemicznych. Bezpośrednimi istotnymi czynnikami karcynogennymi są różnorakie używki, gdzie palenie tytoniu, karcynogeny – głównie węglowodory aromatyczne (PWA), N-nitrozaminy (NNA) oraz aminy aromatyczne (AA) i spożywanie alkoholu stanowią istotne czynniki ryzyka, między innymi w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej. Ich skojarzenie daje efekt synergiczny. Palenie papierosów zawierających różne ilości substancji smolistych, zwiększa ryzyko wystąpienia raka jamy ustnej 8–16 krotnie [13, 11, 16]. Alkohol może zawierać substancje karcynogenne np. etanol, który ulega przemianom metabolicznym pod wpływem dehydrogenazy alkoholowej i w pewnym stopniu cytochromu P450 do acetaldehydu [17].

Większość mutagenów jest karcynogenna. Wśród mutagenów fizycznych przypomnieć należy szkodliwe działanie promieniowania jonizującego X i gamma oraz niejonizującego UV. W tym ostatnim przypadku większą uwagę skupić należy na bezustannie kreowanej modzie na intensywną opaleniznę. Z punktu widzenia patofizjologii tkanek produktami uszkodzenia DNA, wskutek nadmiernego naświetlania promieniami UV, są dimery pirymidynowe. Nadmierne narażenie na działanie promieni słonecznych może spowodować zachorowanie na raka wargi [7, 18, 19, 20].

Także żucie tytoniu – praktykowane np. w niektórych częściach Azji lub nawyk stosowania orzechów arekibetelu, potwierdziły zwiększenie zachorowalności na nowotwory błony śluzowej. Nieprawidłowa higiena jamy ustnej, próchnica, źle dopasowane uzupełnienia protetyczne stanowią istotne ryzyko zachorowania [11, 15]. W znacznej części przypadków leukoplakii guzkowatej występuje infekcja grzybami rodzaju *Candida* [22, 23]. Również wirusy mogą indukować nowotwory przez zmianę DNA i chromosomów komórek oraz poprzez stymulowanie zaburzonej proliferacji [11, 16]. Sugeruje się, że czynnikiem odgrywającym rolę w powstaniu raka jamy ustnej jest też wirus brodawczaka ludzkiego (HPV), a także wskazuje się na rolę wirusa ludzkiego niedoboru odporności (HIV) [24, 14, 25]. Indywidualna podatność na raka może być związana z konkretnym genotypem, skutkującym zwiększoną ekspozycją na karcynogen w wyniku zaburzeń metabolizmu. Najważniejszymi

z karcynogenów chemicznych są jednak aminy aromatyczne (arylaminy i aminy heterocykliczne) [17]. Czynniki alkilujące i aryłujące wytwarzają różne związki addycyjne, które mogą blokować transkrypcję i replikację oraz powodować mutacje przez bezpośrednią lub pośrednią mutagenezę. W przypadku tej pierwszej – jeśli w macierzystym DNA znajdzie się analog zasady lub zasada zmodyfikowana o odmiennych właściwościach tworzenia par, która nie zostanie usunięta przed przejściem widełek replikacyjnych, to do potomnego DNA może zostać włączona niewłaściwa zasada. Druga runda replikacji utrzyma tę zmianę jako mutację stałą. Większość uszkodzeń DNA ulega korelacji szlakami mechanizmów naprawy przed przejściem widełek replikacyjnych.

W przypadku mutagenazy pośredniej przy braku naprawy, zgodnie ze wspomnianym wyżej mechanizmem, może dojść do błędnej syntezy DNA z udziałem wyspecjalizowanej polimerazy DNA i jedna lub więcej zasad zostanie wbudowana naprzeciw uszkodzenia [7, 10, 18, 19, 20].

Inną z wielu przyczyn mogą być czynniki genetyczne. Sprzyjają one kontroli wzrostu, natomiast ich mutacje mogą uniemożliwić działanie mechanizmów kontrolnych. Z jednej strony udowodniono, że wystąpienie nowotworu ma podłoże genetyczne, ale to akumulacja pewnych mutacji w komórkach odpowiada za karcynogenezę.

Wyodrębniono 3 grupy genów odpowiedzialnych, w zależności od kierunku dalszych przemian, za nabycie lub utratę funkcji poprzez mutacje.

Bezpośrednią przyczyną powstania nowotworzenia na poziomie tkanek jest ekspresja onkogenów. Proonkogeny to ich nieaktywna forma w tkankach. Ulegając mutacji, prowadzą do syntezy onkoprotein (odpowiadają za pobudzenie do namnażania i podziałów komórek, będących dotychczas w fazie spoczynkowej) lub syntezy zmutowanej formy tego białka. Mutacje w proonkogenach (mutacje punktowe, translokacje czy amplifikacje) prowadzą bardzo często do ich niekontrolowanej aktywacji. Zidentyfikowano ponad 500 proonkogenów, wśród nich najczęściej protoonkogeny RAS. Zmutowane wersje proonkogenu RAS lokalizowano w nowotworach głowy i szyi. Ich produktami są białka o aktywności kinazy, przenoszące sygnały z receptorów powierzchni komórek do ich wnętrza, wpływając na proliferację i dojrzewanie. Innym proonkogenem, również związanym z występowaniem nowotworów głowy i szyi, jest gen BCL1, którego zmutowana forma wpływa na pobudzenie proliferacji komórek. Z kolei warto wspomnieć o „strażniku genomu” – gen TP53. W komórkach z mutacją lub utratą tego genu uszkodzenie DNA nie zatrzymuje cyklu komórkowego ani nie uruchamia genów naprawy [14, 26, 27, 28].

Zaobserwowano wytwarzanie fenotypu nowotworowego komórek wskutek zmian w kontroli cyklu komórkowego, apoptozy, czy naprawy DNA. Bezpośrednią

przyczyną są zmiany epigenetyczne, w postaci hipermetylacji DNA w obrębie genów supresorowych, powodujące zablokowanie ich funkcji [27].

W wyniku nieustannej ekspozycji na karcynogeny i niedostatecznej naprawy uszkodzeń DNA dochodzi do przesunięcia równowagi uszkodzenie–naprawa w kierunku uszkodzeń. Doprowadza to do sytuacji, w której uszkodzenia DNA zaczynają wpływać na nieprawidłową syntezę istotnych dla komórki białek, między innymi białka p16. Innym przykładem o kluczowym znaczeniu jest uszkodzenie genu kodującego białko p53. W wyniku tego następuje utrata kontroli nad cyklem komórkowym i w konsekwencji niekontrolowane podziały komórkowe. Białko p53 jest sensorem uszkodzeń w DNA, jak również czynnikiem transkrypcyjnym dla niektórych genów związanych z procesem apoptozy oraz aktywatorem genów kodujących proteazy zwane kaspazami. W kontroli mechanizmów prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego ważną rolę odgrywają również produkty białkowe genu RB1. Białko RB1 w komórce odgrywa rolę platformy dokującej dla czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F. Czynniki te są aktywatorami wczesnych genów fazy G1, rodzin genów FOS, JUN. Na tym samym etapie, ale w odmiennym mechanizmie, działanie prokarcynogenne wykazują wirusy HPV. Poprzez integrację własnego materiału genetycznego z DNA gospodarza zmuszają komórki do produkcji białka E6, które z kolei oddziałuje z białkiem p53, powodując jego inaktywację [29].

Istotną rolę w utrzymaniu homeostazy komórek pełnią ich mitochondria, które zawierają własny kod genetyczny. W mechanizmach hamujących apoptozę, efektem ubocznym mogą być pojedyncze mutacje ich genomu. Stwierdzono akumulację bursztynianów, hamujących degradację czynnika HIF-1alfa, a więc tendencję do wydłużenia życia. Sam czynnik indukuje angiogenezę, czyli istotny proces z punktu widzenia przetrwania komórki nowotworowej [30].

W nowotworach jamy ustnej zaobserwowano pogarszające rokowania w leczeniu, zjawisko nadekspresji EGFR (receptora naskórkowego czynnika wzrostu). Tę nadekspresję zaobserwowano w ponad 80% przypadków nowotworów jamy ustnej, w których deregulacje receptora poprzez jego fosforylację dają proliferację i inwazję.

Wśród badań molekularnych w wykrywaniu nowotworów jamy ustnej korzysta się z oznaczeń: cykliny D1, Ki67, angiogenezy na podstawie receptora EGFR, kariotypowania utraty 1p, 11q13 [31].

Niezwykłe interesujące są obserwacje wpływu polimorfizmów genów kodujących białka enzymatyczne na stymulację procesów nowotworowych. Katalizująca acetylację amin – NAT (transferaza N-acetylowa), czy GST (transferaza S-glutationowa) detoksykująca, to przykłady enzymów z udowodnionym wzrostem aktywności w obserwowanych zjawiskach. Innym przykładem są polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w nadekspresji

cyklooksygenazy 2, w potencjalnie złośliwych zmianach i rakach płasko-nabłonkowych jamy ustnej [27].

Zaobserwowane zmiany w ekspresji genów regulujących szlaki metaboliczne glukozy, prześledzone na podstawie mutacji GLUT-1, wykazały, że wzmożona aktywność metaboliczna może odpowiadać za przyspieszenie przejścia stanów dysplazji nabłonka jamy ustnej w proces nowotworowy, za który odpowiada mutacja [32].

Udowodniono, że nacieki i zmiany w węzłach chłonnych poprzez zwiększoną migrację komórek zmienionych nowotworowo mogą być stymulowane zwiększoną aktywnością metaloproteinaz (MMP) i deregulacją inhibitorów metaloproteinaz (TIMP) [30].

Destrukcja błony podstawnej oraz nacieki komórek nowotworowych błony łącznotkankowej może prowadzić do przerzutów w początkowych fazach rozwoju nowotworów nabłonkowych. Zaobserwowane wzrosty poziomów metaloproteinaz i ich inhibitorów towarzyszą wzrostom uwalnianych mediatorów zapalnych i enzymów proteolitycznych [33].

W rozwoju raka jamy ustnej początkowo stwierdza się pojedyncze mutacje DNA, które zaobserwowano w obrębie genów krytycznych, w następnej fazie (promocji) dochodzi do rozwoju guza w wyniku proliferacji komórek zmutowanych. Wreszcie w ostatnim, trzecim etapie, dochodzi do destrukcji struktur macierzy komórkowych i wzrostu aktywności metaloproteinaz: MMP-2, MMP-9, MMP-14, a zwłaszcza MMP-8 [11, 23].

Inną grupą białek, wpływającą na angiogenezę i regulację stanu zapalnego, są cytokiny. Zaburzone w raku jamy ustnej regulacje wytwarzania i wpływ na wzrost zaobserwowano, badając polimorfizmy TNF-alfa, IL-beta, IL-6 i IL-8 [34].

ROZDZIAŁ 2

STANY PRZEDNOWOTWOROWE

W większości przypadków powstanie raka jamy ustnej poprzedzają zmiany przednowotworowe takie jak: leukoplakia, erytroplakia, włóknienie podśluzówkowe (*oral submucosal fibrosis OSMF*), liszaj płaski (*oral submucosis*), zapalenie czerwieni wargowej (*actinic cheilitis*), toczeń rumieniowaty (*lupus erythematosus*), pośrodkowe romboidalne zapalenie języka (*glossitis rhomboidea mediana*) [13, 28, 35].

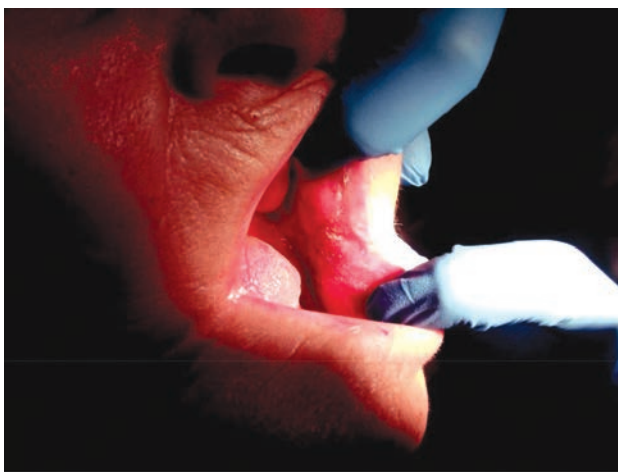
Leukoplakia – najczęściej spotykana zmiana w jamie ustnej, obserwowana przez lekarzy stomatologów i najbardziej przewlekła (ryc. 1) [14]. Jest definiowana przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) jako „biała łata lub płytka, której nie można zeszkobać i na jej podstawie rozpoznać klinicznie oraz histopatologicznie jakiegokolwiek innej choroby” [24]. To nadmierne, łagodne rogowacenie bardzo często przekształca się w zmianę nowotworową, zwłaszcza iż bardzo często zmianom towarzyszy uzyskiwana w wywiadzie cecha nadmiernego palenia tytoniu lub/i picia alkoholu [16].



Rycina 1. Leukoplakia kąta ust¹

¹ Wszystkie ryciny i tabele zostały opracowane przez autorkę.

Rzadziej występującą zmianą, która predysponuje do przekształcenia się w zmianę nowotworową, jest erytroplakia (ryc. 2) [24]. Według WHO jest to jakakolwiek zmiana na błonie śluzowej jamy ustnej lub krtani, objawiająca się jako jaskrawoczerwona aksamitna otoczka, której nie można scharakteryzować klinicznie lub patologicznie jako jakakolwiek inną chorobę [36]. Zmiana rozwija się zazwyczaj na dnie jamy ustnej (28%), w okolicy trójkąta zatrzonowcowego, na dziąsłach w żuchwie oraz na trzonie i bocznej powierzchni języka. Chociaż rogowacenie czerwone nie jest częste, to stopień jego zezłośliwienia jest największy.



Rycina 2. Erytroplakia policzka lewego

W 1978 roku zaliczony przez WHO do stanów przedrakowych został także liszaj płaski. Występuje on najczęściej u dorosłych kobiet. Nie stwierdzono w nim mutacji białka supresorowego p53 [37]. W jamie ustnej na błonie policzka na wysokości linii zgryzu widzimy białe lub białoszare wykwity, często bardzo bolesne, które układają się w lekko wyniosłą siateczkę. Równie często obserwuje się zmiany zanikowe rogowaciejące, pęcherzowe, nadżerkowe i wrzodziejące. Pacjent zgłasza uczucie pieczenia, palenia, obecności ciała obcego, mrowienia, wzmożonego napięcia, metalicznego posmaku, suchości błony śluzowej lub wzmożonego wydzielania śliny [38].

Inną zmianą przednowotworową, którą można zaobserwować w jamie ustnej, jest romboidalne zapalenie środkowej części języka (*glossitis rhomboidea mediana*). Klinicznie zmiana ta umiejscowiona jest na grzbiecie tylnej części języka, tuż przed brodawkami okolonowymi, blisko nasady języka. Zmiana pozbawiona jest brodawek językowych. Ma kształt romboidalny o żywoczerwonej barwie, powierzchni gładkiej lub z polipowatymi wyniosłościami, błyszcząca,

wyraźnie odgraniczona od sąsiadującej błony śluzowej. Wśród czynników etiopatogenetycznych obecnie uważa się zakażenie grzybicze, przewlekły stan zapalny, a także wadę rozwojową – przetrwanie nieparzystego guzka języka. Zmianę tę częściej opisywano u chorych leczonych immunosupresyjnie, chorych na cukrzycę lub AIDS. Zapalenie to nie daje dolegliwości subiektywnych i jest odporne na leczenie [37].

Toczeń rumieniowaty LE (*lupus erythematosus*) to choroba skóry i błon śluzowych zaliczana do grupy kolagenoz. Toczeń rumieniowaty występuje w trzech postaciach: ogniskowej przewlekłej (*lupus erythematosus* – CDLE) dotyczącej tylko skóry, układowej (*lupus erythematosus systemicus* – SLE) zajmującej liczne narządy wewnętrzne oraz jako postać podostra skórna z objawami układowymi. W CDLE zmiany charakterystyczne w postaci motyla występują symetrycznie na grzbiecie nosa. W jamie ustnej wykwity śródustne w LE obserwujemy na wardze (czerwone zmiany obwodowe z białym lub srebrnym brzegiem, pokrytym łuskami) lub na błonie śluzowej policzków, podniebienia, dziąsła (odosobniona biała blaszka) [43].

Włóknienie podśluzówkowe jamy ustnej (*oral submucous fibrosis* – OSMF) to przewlekła, postępująca choroba, w której w jamie ustnej dochodzi do zmiany elastyczności błony podśluzowej. Odczuwalne objawy to uczucie palenia i ból, utrata smaku, obecność białych pasm włóknistych oraz sztywność błony śluzowej jamy ustnej i gardła. Może dojść nawet do szczękocisku. Włóknienie podśluzówkowe występuje w Indiach i Azji Południowo-Wschodniej i wiąże się z żuciem orzechów areki. W 3–19% może dojść do rozwoju raka płaskonabłonkowego [17].

Zapalenie czerwieni wargowej (*actinic cheilitis*) występuje w obrębie wargi dolnej, gdzie obserwuje się suchość warg, zaczerwienienie, obrzęk, złuszczenie naskórka, owrzodzenia i strupy. Występuje głównie u mężczyzn w starszym wieku [43].

ROZDZIAŁ 3

PATOLOGIE NOWOTWOROWE – PODZIAŁ

Proces nowotworowy może rozwinąć się w każdej tkance ustroju oraz w każdym okresie życia człowieka i wykrywany jest on najczęściej dość przypadkowo. Charakterystykę komórek nowotworowych przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1. Charakterystyka komórek nowotworowych

Cechy nabywane podczas procesu powstawania nowotworu złośliwego	
Nieograniczony potencjał proliferacyjny	
Niereagowanie na czynniki przeciwwzrostowe	
Samowystarczalność pod względem czynników wzrostu	
Unikanie apoptozy	
Zdolność do naciekania i dawania przerzutów	
Podtrzymywanie angiogenezy	
Unikanie wykrycia przez układ immunologiczny	
Dodatkowe cechy komórek nowotworu złośliwego	
Cecha	Opis
Stres metaboliczny	Prawidłowe komórki uzyskują energię głównie za pomocą mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej. Komórki nowotworowe uzyskują energię w mniej efektywnym procesie glikolizy, podczas którego powstaje kwas mlekowy. Powoduje to wzrost zapotrzebowania na glukozę w komórkach nowotworu. Ta zmiana w metabolizmie pozwala komórkom nowotworowym, rozwijać się w niesprzyjającym środowisku ubogim w tlen i zakwasza mikrośrodowisko guza, sprzyjając naciekaniu i upośledzeniu odpowiedzi immunologicznej
Stres proteotoksyczny	Stan ten wpływa na aktywację białek szoku cieplnego. Ich aktywację wywołuje podniesienie temperatury, ale także inne czynniki uszkodzające, również te związane z nowotworzeniem, głównie z aneuploidią

Tabela 1 (cd.)

Cecha	Opis
Stres mitotyczny	Niestabilność genomu przejawia się m.in. w niestabilności chromosomalnej i prowadzi do nieprawidłowej segregacji chromosomów podczas mitozy
Stres oksydacyjny	Stan braku równowagi pomiędzy działaniem reaktywnych form tlenu (<i>reactive oxigene species</i> ; ROS) a biologiczną zdolnością do detoksykacji lub naprawy powstałych zmian
Uszkodzenia DNA	Niestabilność genomu prowadzi do kumulacji mutacji punktowych, delecji, rearanzacji chromosomalnych i aneuploidii. Uszkodzenie DNA prawidłowej komórki hamuje proliferację i zapoczątkowuje apoptozę. Komórki nowotworu kontynuują proliferację w obecności uszkodzonego DNA

Określenie „rak jamy ustnej” obejmuje nowotwory złośliwe wywodzące się z nabłonka, które rozwijają się w tkankach jamy ustnej, z czego największy odsetek to rak płaskonabłonkowy. Aby rozpocząć leczenie, należy dokonać oceny stopnia zaawansowania procesu chorobowego [9, 39].

W odniesieniu do nowotworów złośliwych głowy i szyi stosuje się klasyfikację zaawansowania klinicznego TNM (*tumor-node-metastasis*) i patomorfologicznego (pTNM) rekomendowaną przez Union Internationale Cancer oraz American Joint Committee on Cancer (UICC/AJCC) (2009) [14–16].

Klasyfikacja stopnia klinicznego zaawansowania raków narządów głowy i szyi – guz:

Tx – nie można ocenić guza pierwotnego;

To – brak klinicznych cech guza pierwotnego;

Ti – nowotwór przedinwazyjny – rak in situ;

T1 – guz nieprzekraczający 2 cm w największym wymiarze;

T2 – guz nieprzekraczający 4 cm w największym wymiarze;

T3 – guz przekraczający 4 cm w największym wymiarze;

T4 (warga) – guz przekracza korową warstwę kości, nacieka nerw zębodołowy dolny, dno jamy ustnej lub skórę twarzy;

T4a (jama ustna) – guz nacieka struktury otaczające (poprzez korową warstwę – kości głębokie, zewnętrzne mięśnie języka: bródkowo-językowy, gnykowo-językowy, podniebiennie-językowy oraz zatokę szczękową, skórę twarzy);

T4b – guz nacieka mięśnie żwacze, wyrostek skrzydłowy, podstawę czaszki i/lub tętnicę szyjną wewnętrzną.

Klasyfikacja oceny węzłów chłonnych szyi – cecha N (klasyfikacja stopnia klinicznego zaawansowania raków narządu głowy i szyi – UICC/AJCC TNM z 2009 r.).

Wspólna dla wszystkich lokalizacji:

Nx – regionalne węzły chłonne nie mogą być oceniane;

No – brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych;

N1 – przerzut w pojedynczym węźle chłonnym po stronie guza, osiągający w największym wymiarze <3 cm;

N2 – przerzuty zaawansowane, w których węzły chłonne osiągają wymiary >3 cm.

Ocena przerzutów w odległych narządach – cecha M (klasyfikacja stopnia klinicznego zaawansowania raków narządu głowy i szyi – UICC/AJCC TNM z 2009 r.).

Wspólna dla wszystkich lokalizacji:

Mx – przerzuty odległe nie są ocenione;

Mo – przerzuty odległe nieobecne;

M1 – przerzuty odległe obecne.

Amerykańskie Kolegium Patologów (College of American Pathologists – CAP) zaleca ocenę nacieku raka poza głębokością, jego obecność w świetle naczyń chłonnych i limfatycznych oraz perineurium [40].

ROZDZIAŁ 4

PRZEGLĄD NOWOTWORÓW JAMY USTNEJ

Rokowanie i długość przeżycia u pacjentów z rakiem jamy ustnej zależy od wielu czynników. Najważniejszy to stopień zaawansowania nowotworu [41]. Niewątpliwym wpływem na ostateczny wynik leczenia mają też: ogólny stan zdrowia, choroby współistniejące, odżywianie (spożywanie warzyw bogatych w beta-karoten i cytrusów) oraz sprawność układu immunologicznego [42, 43].

W jamie ustnej często można zaobserwować objawy, które mogą świadczyć o możliwości wystąpienia raka jamy ustnej [14, 22]. Są to niegojące się nadżerki, biała lub czerwona plama na dziąsłach, języku, migdałkach, która nie daje się zetrzeć. Czasem ból gardła lub uczucie ciała obcego w gardle. Trudności w żuciu i połykaniu albo trudności w poruszaniu żuchwą bądź językiem. Drętwienie języka lub innej okolicy jamy ustnej. Obrzęk tkanek miękkich jamy ustnej, szczęki lub żuchwy wynikający ze źle dopasowanego uzupełnienia protetycznego. Rozchwianie zębów niewynikające z paradontozy, zmiana głosu, utrata masy ciała albo guzka wyczuwalna na policzku, ewentualnie na szyi [13, 17].

Okolo 90% raków jamy ustnej i szyi stanowią raki płaskonabłonkowe (*carcinoma planoepitheliale*), które wywodzą się z nierogowaciejącego nabłonka wielowarstwowego płaskiego (ryc. 3) [5, 6, 44].



Rycina 3. Rak płaskonabłonkowy dziąsła części żęboldowej żuchwy

W obrębie jamy ustnej, krtani i krtaniowej części gardła najczęściej występują raki płaskonabłonkowe wysoko i średnio zróżnicowane (stopnie G1 i G2). Stopień zróżnicowania wpływa na przebieg chorób i podatność na leczenie. Raki o wysokim i średnim zróżnicowaniu mają względnie powolną progresję, a odnotowywane przerzuty są najczęściej do regionalnych węzłów chłonnych (ryc. 4). Przerzuty do odległych narządów stanowią 10–20% [5, 41].



Rycina 4. Przerzut raka płaskonabłonkowego dna jamy ustnej do węzłów chłonnych podżuchwowych z zajęciem przyległej skóry okolicy podżuchwowej

Tabela 2. Terminologia w ocenie patologii onkologicznej

Określenie	Znaczenie
Anaplazja	Odróżnicowanie
Atypia	Nieprawidłowa budowa komórek. Termin ten często kojarzony jest z przemianą nowotworową komórek, powinien jednak być sprecyzowany, czy chodzi o atypię nowotworową, np. w zmianach przedrakowych, czy atypię o charakterze, np. degeneracyjnym. Znaczenie ma kontekst, w jakim określenie atypia jest użyte
Chłoniak	Nowotwór złośliwy wywodzący się z komórek chłonnych systemu immunologicznego. Nowotwory te tworzą lite guzy, zbudowane z komórek nowotworowych pochodzenia limfatycznego. Prezentują immunohistochemicznie reakcję barwną po zastosowaniu przeciwciał przeciw LCA (ang. <i>lymphocyte common antigen</i>). Dodatkowe przeciwciała wraz z cechami morfologicznymi pozwalają określić specyficzne cechy komórek chłonnych i ustalić ich typ CD3 (komórki T), CD20 (komórki B) i in.

Czerniak	Jest to nowotwór złośliwy, wywodzący się z melanocytów. Nowotwory te prezentują immunohistochemicznie reakcję barwną po zastosowaniu przeciwciał przeciw melanocytom (np. melan A, HMB45 i in.)
Desmoplazja	Rozrost tkanki łącznej (zrębu) towarzyszący nowotworowi
Dysplazja	Nieprawidłowe dojrzewanie komórek
Guz	W polskiej medycynie termin guz używany jest zarówno dla określenia guzów nowotworowych jak i o innej etiologii. W terminologii angielskiej określenie guz (tumor) jest synonimem nowotworu
Hiperplazja	Zwiększenie liczby komórek
Metaplazja	Zmiana jednego typu komórek w inny
Mięsak (ang. <i>sarcoma</i>)	Nowotwór złośliwy wywodzący się z tkanki łącznej (z mezodermy) z tkanek: kostnej, chrzęstnej, tłuszczowej, naczyniowej, mięśniowej, nerwowej. Nowotwory te określane są również nowotworami tkanek miękkich. Prezentują immunohistochemicznie reakcję barwną po zastosowaniu przeciwciał przeciw wimentynie (vimentin). Różnicowanie w tej grupie nowotworów może odbywać się na podstawie cech morfologicznych lub np. immunohistochemicznych: SMA – przeciwciało przeciw mięśniom gładkim – leiomyosarcoma, CD31 – przeciwciało przeciw komórkom naczyń – angiosarcoma, NSE – przeciwciało przeciw komórkom nerwowym – neurosarcoma i in.
Neoplazja	Nieprawidłowa proliferacja; nowotworzenie
Nowotwór potencjalnie złośliwy	Nienaciekający, jednak w części przypadków pozostawiony bez leczenia może przekształcić się w nowotwór złośliwy
Nowotwór	To nieprawidłowa masa tkankowa, będąca wynikiem neoplazji – nieprawidłowego i niekontrolowanego rozrostu komórek
Nowotwór łagodny	Nieprawidłowemu i niekontrolowanemu rozrostowi komórek nie towarzyszy naciekanie otaczających tkanek i możliwość przerzutowania
Nowotwór złośliwy	Nieprawidłowemu i niekontrolowanemu rozrostowi komórek towarzyszy naciekanie otaczających tkanek i możliwość przerzutowania
Rak	W polskiej terminologii określenie rak oznacza nowotwór złośliwy, wywodzący się z nabłonka (nowotwór pochodzenia ektodermalnego). W terminologii angielskiej określenie rak (cancer) jest synonimem każdego nowotworu złośliwego. Synonimem polskiego znaczenia raka jest w angielskim termin carcinoma. Nowotwory te prezentują immunohistochemicznie reakcję barwną po zastosowaniu przeciwciał przeciw cytokeratynom. W diagnostyce stosowane są różne cytokeratyny, z których niektóre charakterystyczne są dla lokalizacji narządowej raka, np. CK AE1/3, CAM5.2, CK7 (piersć, płuco, jajnik), CK20 (skóra, przewód pokarmowy) i in.

W okolicach migdałków i łuków podniebiennych oraz podniebienia miękkiego i tylnej części gardła częściej występują raki płaskonabłonkowe nisko zróżnicowane (G3) oraz niezróżnicowane. Charakteryzuje je szybki wzrost miejscowy, wczesne przerzuty w węzłach chłonnych i częstsze przerzuty do odległych narządów [5, 43].

Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej jest szóstym co do częstości występowania nowotworem na świecie [7, 45]. Może rozwijać się w każdej części jamy ustnej. Najczęstszym i mającym najlepsze rokowania jest rak wargi. Wśród raków śródustnych, nowotwory najczęściej występują na: brzuszej powierzchni języka – 40%, dnie jamy ustnej – 30%, dolnej wardze, podniebieniu miękkim oraz dziąsłach [24, 45, 29]. Jako główne przyczyny rozwoju nowotworu płaskonabłonkowego jamy ustnej podaje się skojarzone działanie kilku czynników.

Brak higieny jamy ustnej oraz choroby przyzębia jako długotrwały czynnik drażniący sprzyjają zakażeniom bakteryjnym, mikro urazom, owrzodzeniom, a w konsekwencji mogą prowadzić do rozwoju nowotworu jamy ustnej. U osób starszych, wraz z współistniejącymi schorzeniami, czynnik stomatologiczny (np. źle dopasowane protezy, odleżyny itp.) może predysponować do powstania np. raka trzonu języka [21].

Inne czynniki mogące doprowadzić do zmian nowotworowych w jamie ustnej, to nadużywanie alkoholu wraz z paleniem tytoniu, długotrwałe narażenie na promieniowanie UV, niedobory witamin A, B, C, zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (*human papilloma virus* – HPV) HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, zakażenie wirusem Epsteina-Barr (*Epstein-Barr-Virus*). Również dieta, niedobory witamin, np. ryboflawiny, żelaza oraz zmiany na podłożu kiły i tocznia mogą wpływać na rozwój nowotworu [10, 29].

Początkowy wzrost nowotworu ogranicza się do nabłonka i błony śluzowej, powodując powstawanie powierzchownych ubytków i owrzodzeń lub ograniczonych zgrubień nabłonka.

Szczególą złośliwość i dynamikę rozwoju przedstawia rak języka i dna jamy ustnej oraz trójkąta zatrzonowcowego [5]. Raki jamy ustnej cechuje wysokie ryzyko wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, czemu sprzyja bogate unaczynienie chłonne.

Rak płaskonabłonkowy wczesnym stadium ma wygląd wypukłej, twardej, perłowej blaszki lub nieregularnego, chropowatego zgrubienia błony śluzowej. Z czasem zmiany ulegają owrzodzeniu, które początkowo nie dają dolegliwości bólowych [4, 14]. Jednak przewlekły charakter choroby doprowadza do powiększania się zmian, tworzenia kraterów pokrytych na środku żółtoszarą martwiczą masą. Mogą tworzyć się również czerwone surowicze ogniska, których granice pozostają twarde, a z czasem mogą rosnąć w kształcie grzyba [15, 16].

Najczęściej rak płaskonabłonkowy jamy ustnej rozprzestrzenia się miejscowo, zanim da przerzuty do węzłów chłonnych szyi, śródpiersia, płuc, a nawet wątroby.

Rak wargi (*carcinoma labii* – RW) powstaje na podłożu rogowacenia czerwieni wargi (*vermilion border*). Początkowo mamy do czynienia z tarczką lub niebolesną nadżerką. Z czasem zmiana przekształca się w łatwo krwawiącą ziarninę, po czym zaczyna naciekać czerwień warg, przechodzi na błonę śluzową jamy ustnej, skórę policzka i brody. Rak wargi występuje najczęściej u mężczyzn powyżej 40. roku życia, palących tytoń i o zwiększonym narażeniu na promieniowanie słoneczne. Rokowanie jest w 80% pomyślne [16].

Rak języka (*carcinoma linguae*) występuje w przedniej ruchomej części języka, na jego bocznym brzegu, końcu, grzbiecie oraz u młodszych osób u nasady języka. W jamie ustnej widzimy guzek, szczelinowate pęknięcie lub owrzodzenie, które z biegiem czasu może rozprzestrzeniać się do dna jamy ustnej lub ku tyłowi, przechodząc na łuk podniebiennie-językowy. Ze względu na brak barier w języku transformacja nowotworu ze stadium przedinwazyjnego (*carcinoma in situ*) do stadium inwazyjnego T2, T3 zachodzi bardzo szybko. Rak ten jest spotykany częściej u mężczyzn po 50. roku życia i stanowi 0,7% nowotworów [8]. Wczesnym objawem jest narastający ból, a następnie zaburzenia w połykaniu, wzmożone wydzielanie śliny oraz ograniczona ruchomość języka [14].

Rak dna jamy ustnej (*carcinoma fundii oris*) stanowi ok 30% raków jamy ustnej, często rozwijających się na podłożu leukoplakii (ryc. 5). Zmiana nowotworowa to bardzo często twardy naciek w środkowej okolicy podjęzykowej.



Rycina 5. Rak płaskonabłonkowy rogowaciejący dna jamy ustnej

W miarę rozrostu nowotworowego i nacieku mięśni języka następuje ograniczenie ruchów języka. Rak często nacieka żuchwę, język i mięśnie dna jamy ustnej.

Rak wyrostka zębodołowego żuchwy diagnozowany jest na działle wokół zębów, gdzie szerzy się wzdłuż szpary ożębnej, niszczy kość wyrostka zębodołowego i powoduje rozchwanie jednego lub kilku zębów.

W przypadku bezzębna rak pojawia się na błonie śluzowej, jako owalny lub podłużny guz o szerokiej podstawie i powierzchni, która bardzo łatwo ulega krwawieniu. W dalszym etapie niszczy blaszkę zbitą i szybko rozrasta się w gąbczastej kości żuchwy [14, 24].

Rak błony śluzowej policzka (*carcinoma mucosae buccae*) rozwija się najczęściej na podłożu rogowacenia białego w linii zgryzowej lub kątach ust, wolno nacieka okoliczne tkanki i może wnikać do przestrzeni przygardłowej. Gdy wystąpi ból i przykurcz żuchwy, rak ma już bardzo zaawansowaną postać [15].

Rak błony śluzowej podniebienia (*carcinoma mucosae palati*) występuje rzadko i może stwarzać trudności w rozpoznaniu punktu wyjścia. Zdaża się, że występuje na pograniczu podniebienia miękkiego i łuku podniebiennojęzykowego, ale często jest to nowotwór zatoki szczękowej naciekający w kierunku jamy ustnej. Rak ten jest związany z kością i rozwija się wolno. U osób używających protez zębowych, guz ten powoduje ich nieprzyleganie [6].

Rak szczęki (*carcinoma maxillae*) stanowi 90% złośliwych guzów szczęki. W zależności od miejsca wyjścia nowotworu wyróżnia się raka działła górnego, dolnego, zatoki szczękowej.

Rak działła górnego (*carcinoma gingivae superioris*) to postać głębokiego owrzodzenia o nieregularnym kształcie i wałowatych brzegach, który w miarę naciekania doprowadza do rozchwania zębów.

Rak zatoki szczękowej (*carcinoma sinus maxillaris*) to guz trudny do wykrycia z powodu jego rozwoju w „zamkniętej puszcze kostnej”. Objawy kliniczne są późne i zależą od kierunku wzrostu guza. Wśród rzadziej występujących guzów zostały odnotowane m.in.: gruczolakorak (*adenocarcinoma*) i rak gruczolowotorbielowaty (*carcinoma adenoides cysticum cylindroma*) [21].

Rak działła dolnego (*carcinoma gingivae inferioris*) najczęściej pojawia się w okolicy zębów trzonowych, jako twarde nacieczenie błony śluzowej wyrostka zębodołowego. W pierwszym etapie obserwuje się mało bolesne zaczerwienienie lub zblednięcia błony śluzowej. Często współistnieje z leukoplakią, przez co granice zmiany są trudne do określenia. Początkowe płaskie lub lekko uwypuklone zmiany błony śluzowej ulegają owrzodzeniu, co sugeruje, iż rak nacieka w głąb i niszczy kość. Powoduje rozchwanie zębów, a nawet ich utratę [16, 24].

ROZDZIAŁ 5

DIAGNOSTYKA NOWOTWORÓW JAMY USTNEJ

Podjęcie decyzji o chorobie nowotworowej lekarz stomatolog nabiera w czasie zbierania wywiadu i prowadzenia badania fizykalnego. Każda pojedyncza zmiana utrzymująca się powyżej 3 tygodni, powinna budzić podejrzenia. Poza jamą ustną należy sprawdzić węzły chłonne podbródkowe, podżuchwowe i szyjne. Wczesnym objawem może być ubytek błony śluzowej, owrzodzenie dające uczucie dyskomfortu i drażnienia. Późniejszymi objawami może być np. ograniczenie ruchomości języka, ślinotok, szczękocisk, chrypka, zaburzenie mowy, guz na szyi, fotor ex ore, odpływ krwiastej wydzieliny oraz utrata masy ciała. Uszkodzenia nowotworowe nie można dokładnie przewidzieć jedynie na podstawie cech klinicznych. Ocena histologiczna jest niezbędna dla wszystkich zmian. Wykonywana jest więc biopsja wycinkowa chirurgiczna ze zmiany pierwotnej i cienkoigłowa z węzłów chłonnych. Wyniki badań histologicznych niestety wskazują jedynie, że dane uszkodzenie może mieć potencjalne zmiany dysplazji. Tak więc obecność dysplazji wskazuje jedynie, że zmiany chorobowe jamy ustnej mogą mieć zwiększone ryzyko transformacji nowotworowej [17].

Tabela 3. Typy badań w patologii onkologicznej

Badanie	Definicja
1	2
Biopsja	Badanie mikroskopowe fragmentu tkanki pochodzącej ze zmiany
Biopsja cienkoigłowa	Badanie cytologiczne (mikroskopowe) komórek pobranych ze zmiany w postaci rozmazu na szkiełku podstawowym
Biopsja gruboigłowa	Badanie histologiczne wałeczka tkankowego pobranego ze zmiany
Biopsja chirurgiczna	Badanie histologiczne fragmentu zmiany pobranego chirurgicznie
Badanie śródoperacyjne	Badanie materiału tkankowego lub komórkowego podczas zabiegu chirurgicznego. Materiał tkankowy (bądź jego fragment) nadany do zakładu patomorfologii jest mrożony, co pozwala na wykonanie skrawków histologicznych do oceny mikroskopowej. Pozwala to na ocenę mikroskopową bez konieczności utrwalania i przeprowadzania materiału tkankowego. Jakość takich preparatów jest jednak z reguły gorsza, niż wykonywanych rutynowo

Tabela 3 (cd.)

1	2
Badanie pooperacyjne	Materiał pooperacyjny w postaci usuniętego guza, guza z otaczającą tkanką, narządem lub też z towarzyszącymi regionalnymi węzłami chłonnymi badany jest histologicznie po uprzednim utrwaleniu (12–24 h), pobraniu wycinków i przeprowadzeniu w odpowiednich odczynnikach i zabarwieniu. Trwa to najczęściej w rutynowych warunkach 3–5 dni. Ponadto w wybranych przypadkach wykonuje się badania dodatkowe (histochemiczne, immunohistochemiczne lub technikami biologii molekularnej). Wymaga to dodatkowych 1–3 dni
Badanie po wcześniejszym leczeniu (chemioterapii i/lub radioterapii)	Ocena histologiczna materiału z uwzględnieniem zmian, jakie spowodowało leczenie w obrębie utkania nowotworowego
Badanie autopsyjne (sekcyjne)	Badanie pośmiertne, na które składają się tak oględziny zewnętrzne, jak i ocena makroskopowa zawartości jam ciała z pobraniem wycinków z narządów

Badania obrazowe np. pantomografia przy naciekaniu żuchwy/szczęki pokazują rozległość guza, zajęcie procesem nowotworowym tkanek miękkich, nerwów i części kostnych.

Przy zmienionych węzłach chłonnych szyi ważne są: ultrasonografia szyi, scyntygrafia kości. Najdokładniejszym i najbardziej jednoznacznym badaniem dla wyznaczenia zakresu i sposobu leczenia jest tomografia komputerowa w trzech modalnościach: CT – tomografia komputerowa z kontrastem, NMR – jądrowy rezonans magnetyczny, ewentualnie pozytronowa tomografia emisyjna – PET-CT [11, 16, 47, 48, 49].

CT – tomografia komputerowa pozwala ocenić wielkość guza, obszar naciekania tkanek miękkich i struktur kostnych.

NMR – magnetyczny rezonans jądrowy pozwala zobrazować tkanki miękkie czy naciekanie okołonerwowe.

PET-CT – pozytronowa tomografia emisyjna pozwala ocenić nawroty choroby oraz przerzuty odległe [52].

Jeśli pacjent ma potwierdzoną diagnozę raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, podejmowane jest leczenie adekwatne do stadium choroby. Najczęściej jest to leczenie chirurgiczne – usunięcie całych kilku poziomów, nawet gdy nie stwierdza się ich powiększenia.

Wydaje się, że rak jamy ustnej powinien być jednym z szybciej zdiagnozowanych nowotworów ze względu na stosunkowo łatwy dostęp w badaniu klinicznym. Jednakże jest to nadal jeden z najczęstszych raków, których nowo wykrywaną liczbę ocenia się na 500 000 przypadków w skali roku [22, 26].

ROZDZIAŁ 6

MARKERY MOLEKULARNE STANÓW PRZEDNOWOTWOROWYCH JAMY USTNEJ

W diagnostyce i leczeniu chorób nowotworowych, w tym nowotworów jamy ustnej, istotne znaczenie mają markery molekularne i biologiczne, pozwalające wcześniej wykryć zmiany nowotworowe, zastosować terapię celowaną, pogłębić wiedzę na temat procesów zachodzących w komórkach prawidłowych i nowotworowych.

Gwałtowny rozwój technik biologii molekularnej, coraz czulsze testy immunohistochemiczne pozwalają na możliwość wykorzystania ich w diagnostyce onkologicznej, przede wszystkim w celu rozpoznania wczesnych zmian przedrakowych nowotworów jamy ustnej. Poszukiwania nowych, czulszych, specyficznych markerów stanów przednowotworowych w celu progresji nowotworów, pozwolą na ocenę stanu choroby w przypadku nowotworów oraz różnicowania możliwości stopnia ich zezłośliwienia. Pomimo intensywnych badań nie znaleziono do tej pory specyficznego markera serologicznego raka płaskonabłonkowego głowy i szyi. Markerami zaakceptowanymi, intensywnie badanymi są: receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) czy infekcja HPV [53].

W inicjacji i progresji rozwoju nowotworów płaskonabłonkowych podstawowymi markerami są keratyny, których wzór ekspresji jest charakterystyczny dla typu nabłonka i stadium różnicowania poszczególnych warstw komórek. W trakcie rozwoju nowotworu zmienia się ekspresja genów kodujących poszczególne keratyny. W badaniach wykazano, że w obrębie nowotworów jamy ustnej zwiększonej ekspresji ulegają keratyny: K8, K18, K17 i K14 [54–61], natomiast obniżoną aktywność wykazują: K4, K5, K13 i K19 [54, 55, 58, 59, 62–64]. Z kolei keratyna K76 jest charakterystyczna dla warstw obejmujących komórki różnicujące się, obniżenie ekspresji genu KRT76 może mieć związek z hiperproliferacją, prowadzącą do powstania zmian przednowotworowych. Nie wykazano zmniejszonej aktywności transkrypcyjnej genu KRT76 w przypadku zwiększonej proliferacji błony śluzowej, indukowanej zranieniem lub stanem zapalnym [57, 65, 66].

Jednym z genów bardzo intensywnie badanych pod kątem wykorzystania w diagnostyce nowotworowej jest gen TP53, jak również jego produkt białkowy p53. Białko to, jako produkt genu supresorowego, bierze udział w ochronie organizmu przed uszkodzeniami wywołanymi czynnikami mutagennymi, stymulując procesy naprawy DNA lub kierując komórkę na drogę apoptozy. Dodatkowo

jest zaangażowane w regulujące proliferację różnicowania starzenia się i śmierci komórki [54]. W różnych komórkach nowotworowych człowieka częstość mutacji w genie TP53 przekracza 50%, co przekłada się na ilość białka p63, p73, która nie przekracza 1% [67]. Wynikiem mutacji w komórce, poprzez kumulację uszkodzeń DNA i zahamowanie kinaz cyklinozależnych, dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego na etapie fazy G, w czym bierze udział białko genu P21 (*WIF1*). Dodatkowo białko p53 indukuje procesy apoptozy, eliminując nieprawidłowe komórki. Wzrost ekspresji białka p53 od zdrowego nabłonka poprzez zmiany łagodne, przedrakowe do raka płaskonabłonkowego może świadczyć o gromadzeniu się zmian genetycznych w procesie karcynogenezy w jamie ustnej. Narastające stężenie białka p53 w zmieniającej się histopatologicznie błonie śluzowej oraz zmianach przedrakowych, świadczy o podwyższonym ryzyku przemiany w złośliwą. Palenie papierosów wpływa na wystąpienie mutacji w genie TP53 komórek nabłonka jamy ustnej. Palenie tytoniu i spożywanie alkoholu mogą być czynnikami ryzyka, zwiększającymi częstość mutacji w genie TP53. Badania wykazały, że stopień ryzyka wystąpienia i rozwoju nowotworu płaskonabłonkowego zależy od ekspresji genu TP53, związanej z ekspresją genu cykliny D, EGFR – naskórkowego czynnika wzrostu, podczas gdy analiza ekspresji genu TP53 z białkiem Ets-1 i P-glikoproteiną może być wykorzystana w celu oceny stopnia zaawansowania raka płaskonabłonkowego. Do rodziny białek p53 zalicza się białka p63, p73. Znanych jest 10 polimorficznych białek p63. Posiadają one dwie grupy różniące się N-końcem białka: jedna TAp63 zawiera domenę aktywującą transkrypcję TAD I, druga Δ Np63 nie posiada domeny TAD I [68]. Białko TAp63, które w komórce syntetyzowane jest w niewielkich stężeniach, ulega szybkiej degradacji, stymuluje apoptozę, hamuje cykl komórkowy. Myszy TAp63(–) częściej zapadały na nowotwory i występowały u nich liczne przerzuty [69, 70]. Białka Δ Np63 (uznawane są za onkogeny) hamują działanie genów TP53 i TAp63 przez tworzenie kompleksów z tymi białkami lub wiązanie się z receptorami p53, pobudzają proliferację i kancerogenezę [70]. Badania prowadzone przez Sinha i wsp., wykazały wzrost ekspresji p63 w przypadku dysplazji płaskonabłonkowego nowotworu jamy ustnej w porównaniu z prawidłową błoną śluzową [71]. W niezmienionym chorobowo nabłonku p63 ulega ekspresji głównie w warstwie podstawnej. W obszarze dysplazji zaobserwowano ekspresję p63 w warstwie podstawnej i warstwach wyższych nabłonka w przypadku nowotworu płaskonabłonkowego, ekspresję p63 obserwowano w warstwie brzegowej wysp nowotworowych [70]. Rola genów p63 i p73 w supresji nowotworów jest procesem złożonym. Utrata funkcjonalności genów p63 i p73 skutkuje nowotworzeniem [67, 71].

Cykliny i cyklinozależne kinazy (CDK) to białka regulujące cykl komórkowy. Są one aktywne w specyficznych fazach cyklu komórkowego i z kolei

aktywują cyklinozależne kinazy, umożliwiające komórce przejście pomiędzy fazami cyklu. Na skutek amplifikacji lub translokacji powstaje ich nadmierna ilość. Polimorfizm genetyczny cykliny D1 znacznie podnosi ryzyko rozwoju stanów przednowotworowych, najczęściej dotyczy to leukoplakii. W nowotworach głowy i szyi zaobserwowano zwiększenie częstości występowania genu kodującego cyklinę D1 oraz inaktywację obydwu alleli p16 (INK4A), których produkt hamuje kompleks cyklina D1/CDK4 [72].

Innym białkiem zaangażowanym w kontrolę cyklu komórkowego jest białko p27Kip1 – inhibitor cyklino-zależnej kinazy – które hamuje przejście z fazy G1-S, wpływając na aktywność cykliny E. Wzrost aktywności biologicznej kompleksu cykliny (E-CDK2) z kinazą, przy jednoczesnym zmniejszeniu stężenia białka p27Kip1, stwierdzono podczas rozwoju i progresji raka płaskonabłonkowego i śluzowonaskórkowego jamy ustnej.

Białko NF- κ B jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym, regulującym ekspresję genów niezbędnych do proliferacji komórek, odgrywających rolę w reakcjach zapalnych i adhezji komórek [73]. W zwierzęcym modelu doświadczalnym u myszy z przeszczepionymi komórkami nowotworowymi U14, zaobserwowano wzrost stężenia markerów stanów zapalnych NF- κ B oraz powolny wzrost w trakcie inokulacji ekspresji genu cyklooksygenazy-2 (COX-2) i indukowanej syntetazy tlenu azotu (iNOS – *inducible nitric oxide synthase*) na poziomie mRNA białka. Ekspresja genu COX-2 jest ściśle związana z procesem zapalnym jak i nowotworzeniem. W nowotworach głowy i szyi w 75%, a w 18% w nowotworach jamy ustnej obserwuje się wysoką ekspresję genu COX-2 na poziomie mRNA białka [69].

Receptory jądrowe RAR dla retinoidów (pochodne witaminy A), w tym receptor RAR- β , kontrolują przejście komórki z fazy G1 w fazę S cyklu komórkowego. Hamują proces nowotworzenia w jamie ustnej, indukując apoptozę. Wraz ze stopniem zaawansowania choroby zmniejsza się ilość syntetyzowanego białka oraz wzrasta hipermetylacja miejsc promotorowych dla RAR- β , cytoglobiny CYGB, p16, MGMT, E-kadheryny, cykliny A1 [74, 75].

Odrębną grupę czynników stanowią infekcje wirusowe – w szczególności związane z wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV – *human papilloma virus*) [76, 77]. Zakażenia wirusem HPV (*human papilloma virus*) są czynnikiem indukującym powstawanie zmian nowotworowych jamy ustnej oraz raka szyjki macicy i okolicy odbytu. Infekcje wirusem stwierdza się u ok. 20–30% przypadków raka jamy ustnej. Infekcji towarzyszy wzrost ilości białek wirusowych E6 i E7, w ten sposób zmniejszając aktywność genu supresorowego p16 (INK4A). Gopalakrishnan i wsp. wykazali korelację zakażenia wirusem HPV ze zmianami przedrakowymi leukoplakii brodawkowej rozrostowej. Onkoproteina E6 wirusa HPV 16 jest jednym z czynników odpowiedzialnych za

indukcję telomerazy, której aktywność stwierdzono w 75–80% raków płaskonabłonkowych jamy ustnej.

Jądrowe antygeny: AgNORs (srebrochłonne regiony organizujące jąderko), PCNA (jądrowy antygen komórek proliferujących) są wykorzystywane do oceny aktywności podziałowej komórek nowotworowych. W stanach przedrakowych czy nowotworach płaskonabłonkowych jamy ustnej analizowana jest ekspresja genów PCNA i Ki-67 na poziomie białka. Zwiększona ilość antygenów wiąże się ze wzrostem stopnia dysplazji nabłonkowej. Wysoka aktywność podziałowa w połączeniu z nadekspresją genu TP53 stanowią gorsze czynniki rokownicze, prognostyczne w badanych przypadkach zmian o charakterze leukoplakii [78].

Utrata heterozygotyczności występuje w różnym stopniu we wszystkich stanach przednowotworowych, szczególnie na chromosomie 9p21. Do oceny ryzyka zmian przedrakowych o typie leukoplakii największą wartość prognostyczną wydaje się mieć utrata heterozygotyczności na ramionach krótkich chromosomów 3, 9, 17, 21. W stanach przedrakowych jamy ustnej stwierdzono częstą inaktywację genu supresorowego p16 (INK4A), hamującego podział komórki przez blokowanie cyklozależnych kinaz, zlokalizowanego w pozycji 21 krótkiego ramienia chromosomu 9 (9p21), również 17p13 lokalizacji genu TP53. W procesie nowotworzenia poza utratą materiału genetycznego może dojść do jego zwielokrotnienia. Badania wykazały obecność polisomii chromosomów 7 i 17 u chorych na leukoplakię i erytroplakię. Wraz z coraz częstszym występowaniem polisomii wzrasta ryzyko zezłośliwienia procesu nowotworowego.

Kolejną grupę genów zaangażowanych w proces nowotworzenia stanowią czynniki wzrostu takie jak: płytkowy czynnik wzrostu PDGF, czynnik wzrostu naskórka EGF, transformujący czynnik wzrostu TGF β , czynnik wzrostu hepatocytów HGF (wykrywany w rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, wpływający na indukcję ekspresji czynnika transkrypcji E1AF i aktywację genów metaloproteinaz MMPs, odpowiedzialnych za naciekanie i przerzuty raka), czynnik wzrostu fibroblastów FGF, insulinopodobny czynnik wzrostu IGF-polimorfizm, IGF-2 (u osób żujących tytoń predysponuje do wzrostu ryzyka rozwoju raka jamy ustnej) oraz cytokiny (interleukiny, interferon β , czynnik martwicy guza TNF- α). Nadmierna aktywacja receptorów dla czynników wzrostu lub ich mutacje, jak np. mutacja punktowa genu Ret kodującego receptor CSF-1, która prowadzi do produkcji nieprawidłowego białka receptorowego o stałej aktywności, może powodować nadmierny i nieograniczony wzrost i podział komórek oraz nowotworzenie.

Transformujący czynnik wzrostu β wydzielany jest między innymi przez zaktywowane makrofagi w odpowiedzi na ich stymulację przez czynniki zewnętrzne. Jednym z czynników prowadzących do aktywacji makrofagów i wzmożonego wydzielania przez nie TGF β jest zakażenie wirusowe. Zgodnie

z hipotezą obecność wirusa HPV w nabłonku błony śluzowej uaktywnia makrofagi i powoduje produkcję TGF β , który oddziałując na receptor EGFR, powoduje niekontrolowany wzrost komórki. TNF- α i EGF to markery wczesnego wykrywania zezłośliwienia leukoplakii przez określenie stopnia dysplazji komórek nabłonka jamy ustnej.

Protoonkogeny stanowią grupę genów, które obok genów supresorowych odgrywają podstawową rolę w zainicjowaniu procesu transformacji nowotworowej. Mutacje w protoonkogenach prowadzą do nadekspresji onkobiałek. Protoonkogen GRO-1, zaliczany do rodziny chemokin (CXC), reguluje cykl komórkowy i jest autokrynnym czynnikiem wzrostu w czerniaku. Jego nadekspresja wykrywana jest w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej. GRO-1 promuje progresję raka przez wpływ na angiogenezę i przerzuty do węzłów chłonnych. Inny rodzaj onkogenu jest odpowiedzialny za ekspresję białka LRP 12 z rodziny LDLR oraz pełni rolę w przetwarzaniu sygnału jądrowego. Zlokalizowany jest na chromosomie 8q22. Jego nadekspresja związana jest z wczesną fazą rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Białka z grupy Ras są innym rodzajem protoonkogenów, zaliczanych do protein wiążących GTP. Wskutek mutacji punktowej dochodzi do utraty wewnętrznej aktywności GTP-azy, następuje brak rozkładu GTP do GDP i białko pozostaje w formie aktywnej. Należy podkreślić, że mutacje Ras występują rzadko. RAB1A – nadekspresja jest obserwowana w zmianach przedrakowych szczególnie w leukoplakii i w raku płaskonabłonkowym języka.

TROP-2 – antygen powierzchni trofoblastów – został niedawno odkryty i uznany za niezależny biomarker, pomocny w określeniu stopnia rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Zaobserwowano nadekspresję tego antygeny w karcinogenezie regionu jamy ustnej. Wykrywany metodami immunohistochemicznymi w 58% guzów jamy ustnej, rozpoznany jest jako rak płaskonabłonkowy.

Ogromną rolę w progresji nowotworów oraz tworzeniu przerzutów odgrywają metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs – *matrix metalloproteinases*) [79].

Z MMPs powiązane są tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs – *tissue inhibitors of MMPs*). W wielu pracach wykazano wzrost ekspresji MMP-2 i MMP-9 w komórkach nowotworowych przy jednoczesnym spadku ekspresji TIMP-1 i TIMP-2 [79].

Etap indukcji i progresji nowotworu związany jest z coraz większą niestabilnością genomu, interakcją z genami kodującymi mikroRNA (miRNA). Ekspresję wielu genów na poziomie posttranskrypcyjnej interakcji z mRNA regulują miRNA [69, 80]. Deregulacja ekspresji miRNA obserwowana jest na różnych etapach rozwoju nowotworu. Jedną z takich cząsteczek jest miR-21,

uważany za onkogen. Wzrost ekspresji miR-21 koreluje ze spadkiem ekspresji genu PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*), którego produkt białkowy jest inhibitorem szlaku 3-kinazy fosfatidyloinozytolu (PI3K – *phosphatidylinositide 3-kinases*). Częsteczki miR-21 wiążąc się z mRNA genu PTEN, wpływają na wzrost, proliferację i hamowanie procesu apoptozy [81]. W przypadku pacjentów z nowotworami głowy i szyi obserwuje się wzrost ekspresji miR-7, miR-147b, miR-155, miR-130b, miR-233, miR-34b oraz spadek ekspresji miR-100, miR-99a, miR-125b, miR-375, miR-424, Let7a, miR-6836, miR-6873 i miR-7152 [69, 80].

ROZDZIAŁ 7

WPŁYW PROFILOWANIA MOLEKULARNEGO NA UDOSKONALENIE STRATEGII LECZENIA RAKA JAMY USTNEJ

Podczas gdy XX wiek charakteryzował się znacznymi postępami medycznymi, szczególnie w zakresie diagnostyki czy obrazowania, medycyna molekularna może być jednym z przełomów na początku XXI wieku. Poznanie sekwencji genomu człowieka, spadek kosztów sekwencjonowania czy też rozwój nowoczesnych technologii takich jak sekwencjonowanie nowej generacji oraz generowanie ogromnych ilości danych stworzyło nowe nadzieje i pozwoliło na powstanie nowatorskich metod terapeutycznych w dziedzinie onkologii molekularnej [82]. Kompleksowa charakterystyka molekularna wielu różnych rodzajów nowotworów zapewniła silne uzasadnienie dla „medycyny spersonalizowanej”, która polega na personalizacji strategii leczenia ze względu na określone zmiany molekularne, wykryte w guzie danego pacjenta. Ponieważ HNSCC są niejednorodne na poziomie klinicznym i molekularnym, medycyna precyzyjna jest szczególnie istotna w przypadku tej choroby. Pozytywnie ocenia się leki dla terapii spersonalizowanej, oparte na określonych zmianach w genomie (NCT01774409) [83, 84]. W ukierunkowanym sekwencjonowaniu DNA głównym celem jest identyfikacja docelowych zmian genomowych (mutacje i/lub zmiany liczby kopii) w guzie danego pacjenta, w celu dostosowania leczenia do zmiany genomowej. Mniej niż połowa pacjentów może czerpać korzyści głównie z tych molekularnych strategii leczenia, ponieważ zidentyfikowanie zmian genomowych nie jest często celem u pacjentów ze stanami zaawansowanymi czy też opornymi na leczenie.

Jednym z podejść terapeutycznych może być immunoterapia, której stosowanie zapewnia niespotykane postępy w leczeniu HNSCC [85]. Również radioterapia odgrywa ważną rolę w leczeniu HNSCC i przynosi korzyści dla około 75% pacjentów [86]. Jednak złożona anatomia górnego odcinka przewodu pokarmowego utrudnia bezpieczne dostarczenie skutecznej dawki promieni do guza. Chociaż różny molekularny mechanizm lub biomarkery zostały powiązane z wrażliwością na promieniowanie/ opornością na promieniowanie w HNSCC [87], medycyna precyzyjna w radiologii onkologicznej została słabo zbadana. HPV-dodatnia część ustna guzów gardła jest związana

z wyższą wrażliwością na promieniowanie ze względu na nadekspresję p16, która zmniejsza zdolność naprawy DNA poprzez hamowanie rekrutacji RAD51 do miejsca uszkodzenia DNA [88]. W oparciu o to racjonalne protokoły leczenia deeskalacyjnego są oceniane w badaniach klinicznych w miejscu występowania guza, aby zmniejszyć zachorowalność i zwiększyć skuteczność leczenia [89–91]. Co ciekawe, wykazano znaczenie modelu opartego na zmianach w genomie w dostosowywaniu dawki radioterapii (GARD), na wrażliwość na promieniowanie guza. GARD pochodzi z indeksu czułości na promieniowanie związanego z ekspresją genów, jako wskaźnik zaproponowany wcześniej w HNSCC [92]. Wysokość wartości GARD przewidywała wysoki efekt terapeutyczny radioterapii w dużej grupie pacjentów cierpiących na różne rodzaje raka. Wykazano, iż mediana GARD była wyższa u pacjentów z SCC jamy ustnej i gardła w porównaniu do HNSCC bez części ustnej gardła. Zatem GARD może służyć jako podstawa medycyny spersonalizowanej w radioterapii HNSCC.

ROZDZIAŁ 8

STRATEGIE CHIRURGICZNE

Ponieważ jama ustna jest złożonym anatomicznie miejscem krytycznym dla mowy, połykania i wyglądu, operacja raka jamy ustnej wiąże się z dwoma głównymi wyzwaniami, sprowadzającymi się do: wykonania pełnej resekcji guza (R0), w tym pierwotnego miejsca guza i regionalnych węzłów chłonnych w celu wyleczenia pacjenta; wykonania funkcjonalnej i estetycznej rekonstrukcji w celu poprawy jakości życia pacjenta.

Bardzo ważne podczas leczenia nowotworu są marginesy wokół tkanki zmienionej nowotworowo. Marginesy dodatnie są rozpoznawane jako silny zły czynnik prognostyczny w OSCC [93-96]. Śródoperacyjne pobieranie próbek marginesowych opiera się przede wszystkim na wzrokowej i dotykowej ocenie chirurga. Aby kontrolować margines bez niepotrzebnego wycinania prawidłowej tkanki, 0,7 cm opisano jako idealną odległość w jamie ustnej w przypadku raka płaskonabłonkowego [93].

Histopatologia jest złotym standardem w ocenie marginesów, jednak podczas operacji patologiczna ocena stanu marginesów może być trudna z powodu kurczenia się tkanki, niedokładnego pobierania próbek i niewłaściwej orientacji [95]. Ponadto korelacja orientacji/lokalizacji pomiędzy guzem i podścieliskiem guza często ulega zniekształceniu po jego wycięciu [97]. Co ciekawe, zastosowanie biomarkerów p53 i ekspresja immunohistochemiczna eIF4E [98], proponowane są dla określenia histopatologicznego ujemnego marginesu, w celu określenia nawrotu choroby.

Ostatnio opisano kilka technologii śródoperacyjnej wizualizacji guza [99]. Optyczne obrazowanie fluorescencyjne, oparte na wariacji fluorescencji między tkanką prawidłową a nowotworową, wymaga środka fluoroforowego, który jest autogeny (autofluorescencja) lub egzogeny (docelowa sonda fluorescencyjna). W porównaniu do nieukierunkowanych sond fluorescencyjnych (np. zieleń indocyjaninowa), ukierunkowane sondy fluorescencyjne (odpowiadające określonym cząsteczkom) mogą być bardziej specyficzne dla tkanki nowotworowej i poprawiać precyzję operacji. Specyficzne sondy fluorescencyjne są wybierane zgodnie z „Kryteriami wyboru kryteriów” (TASC). Prezentują miejsca zmian, w tym procent docelowej nadekspresji, a także stosunek komórek nowotworowych do komórek prawidłowych [99]. Kompleksowe profilowanie molekularne OSCC może pomóc w identyfikacji najlepszych kandydatów do obrazowania

fluorescencyjnego z ukierunkowaną sondą przy użyciu bliskiej podczerwieni. Wykazano znaczenie receptora uwalniającego peptyd gastryny (GRPR) i jego wiązania z peptydem TM1-IR680, do chirurgicznego przewidywania marginesów w mysim ortotopowym modelu raka jamy ustnej [100]. Alternatywnym podejściem do udoskonalania strategii wycinania marginesów może być przewidywanie przedoperacyjne prawdopodobieństwa dodatnich marginesów, tak jak ma to miejsce w przypadku raka piersi [101]. Molekularna przedoperacyjna ocena prawdopodobieństwa dodatniego marginesu zgodnego z biologią guza może zatem udoskonalić strategię chirurgiczną, szczególnie klasyczny 1 cm margines. W badaniu wykorzystuje się również wygląd węzłów chłonnych. Rozwarstwienie węzłów chłonnych szyjnych jest uznanym sposobem leczenia klinicznego z węzłowopozytywnym OSCC (cN+). We wczesnym etapie (cT1–T2) i cN0 OSCC należy wykonać planowe wycięcie węzłów szyjnych, gdy prawdopodobieństwo utajonej choroby węzłowej jest większe niż 20% [102]. Zbadano, że częstość występowania utajonego przerzutu do szyjki macicy wyniosła 9,8% w przypadku twardego podniebienia podskórnego i zębodołu szczękowego SCC [103]. Podpoliczkowe OSCC wiązało się z częstością 1,8% i 10,6% odpowiednio dla guzów cT1 i cT2. Na podstawie tych wyników zaproponowano strategię „czujnego oczekiwania” dla wczesnych etapów SCC twardego podniebienia i zębodołu szczękowego. Zaproponowano, aby sygnatura ekspresji genu powodującego występowanie nowotworu, była powiązana z przerzutami do węzłów chłonnych w HNSCC [104], a następnie zwalidowana w OSCC do prognozowania dodatniego węzła chłonnego [105]. Zatem przedoperacyjna molekularna ocena prawdopodobieństwa wystąpienia choroby utajonej może udoskonalić strategię chirurgiczną na wczesnym etapie OSCC z twardego podniebienia i zębodołu.

Nowe technologie mogą wypełnić lukę między badaniami podstawowymi a praktyką kliniczną.

Są one bardzo istotne z punktu widzenia skutecznego leczenia w radioterapii, terapiach celowanych oraz strategiach chirurgicznych. Aby dokonać szybkiej i właściwej oceny materiału pacjenta w technologiach na poziomie molekularnym, opracowano umieszczanie próbek pacjenta osadzonych w formalinie z zatopioną parafiną (FFPE). Umożliwia to ukierunkowane sekwencjonowanie DNA/RNA. Zabiegi te mogą pomóc wypełnić lukę między podstawowymi badaniami a praktyką kliniczną [106].

Karcynogeneza jamy ustnej rozpatrywana na poziomie molekularnym może pozwolić na rozwój nowych technologii profilowania molekularnego, dostępnych w rutynowej praktyce klinicznej i udoskonalenie strategii leczenia u pacjentów cierpiących na nowotwory jamy ustnej. Tak więc medycyna spersonalizowana i chirurgia mogą zmniejszyć znaczną zachorowalność i śmiertelność związaną z rakiem jamy ustnej.

ROZDZIAŁ 9

WPŁYW MIKROBIOMU JAMY USTNEJ NA ROZWÓJ ZMIAN NOWOTWOROWYCH

W ludzkim organizmie identyfikuje się trzy grupy drobnoustrojów należących do archeonów, eubakterii, eukariota. Zasadlające organizm człowieka mikroorganizmy są niezbędne do jego prawidłowego funkcjonowania, między innymi utrzymania statusu odpornościowego [107, 108]. Są to symbionty, komensale bytujące w przewodzie pokarmowym, jak również w jamie ustnej, układzie oddechowym, moczowo-płciowym, a przede wszystkim skórze, z drugiej strony są drobnoustrojami wywołującymi zapalenia, różne stany patologiczne z chorobami zakaźnymi na czele [109, 110]. Największe siedlisko drobnoustrojów stanowi skóra. Innym bardzo dobrym do kolonizacji miejscem w organizmie człowieka, podlegającym dynamicznym zmianom, jest jama ustna, poprzez kontakt bezpośredni z pożywieniem i powietrzem. Część z drobnoustrojów bierze udział bezpośrednio lub pośrednio w metabolizmie produktów odżywczych. Zarówno skład jakościowy, jak i ilościowy drobnoustrojów zmienia się w trakcie życia człowieka. Od pierwszych pojawiających się drobnoustrojów w okresie niemowlęcym: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, po te pojawiające się w wieku dorosłym: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eubacteria*, *Lactobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus* i *Propionibacterium* [111–114].

Mikrobiom jamy ustnej, na który składa się ponad 700 drobnoustrojów jest bardzo zróżnicowany. Na jego skład jakościowy i ilościowy ma wpływ dieta, temperatura, potencjał oksydacyjno-redukcyjny, pH, zasolenie, codzienna higiena związana z płukaniem jamy ustnej, szczotkowaniem zębów czy lokalizacja geograficzna [109, 110]. Badania składu bakterii śliny osób pochodzących z różnych stref geograficznych, pozwoliło na odkrycie około 40 nowych, nieopisanych dotąd bakterii, spośród 100 rodzajów kolonizujących tę część przewodu pokarmowego takich jak: *Veillonella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Rothia*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Scardovia*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Alloscardovia*, *Parascardovi* [115, 116]. Innym miejscem jamy ustnej, gdzie osiedlają się drobnoustroje, jest język, na którym stwierdzono bakterie z rodzajów: *Streptococcus*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, a u chorych przede wszystkim bakterie z rodzajów *Streptococcus*, *Prevotella*,

Leptotrichia, *Actinomyces*, *Veilonella* [117]. Z kolei w płytce bakteryjnej podziąsłowej w warunkach prawidłowych występują: *Campylobacter* spp., *Actinobacillus* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium* należące do bakterii gram-ujemnych, natomiast w płytce bakteryjnej naddziąsłowej: *Lactobacillus* spp., *S. motis*, *S. mutants*, *S. salivarius*, z gram-dodatnich [118, 119]. Analiza składu mikrobiomu w jamie ustnej osób zdrowych oprócz bakterii wykazała obecność bakteriofagów i grzybów takich jak: *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Scopularis* spp., *Penicillium* spp., *Geotrichum* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. czy *Phoma Malassezia*, *Aurebasidium*, *Epicoccum* [120, 121]. Jama ustna stanowi doskonale środowisko dla rozwoju mikrobiomu. Temperatura 37°C i pH 6,5–7,5 stwarzają stabilne, idealne środowisko do rozwoju drobnoustrojów. Bakterie tlenowe i beztlenowe razem tworzą biofilmy w jamie ustnej, które zapobiegają zmianom w ich środowisku. Zmiany warunków środowiska jamy ustnej zwiększają potencjał bakterii chorobotwórczych do wywoływania chorób w tej części przewodu pokarmowego, w tym zmian nowotworowych.

W ostatniej dekadzie ukazuje się coraz więcej doniesień naukowych z zakresu onkologii, wskazujących na zależność przyczynowo-skutkową występowania określonych gatunków/rodzajów drobnoustrojów w jamie ustnej, z rozwijającym się przewlekłym stanem zapalnym, a powstawaniem i rozwojem nowotworów złośliwych głowy i szyi. Od dawna znany jest szereg bakterii takich jak: *Helicobacter pylori*, biorących udział w powstawaniu nowotworu żołądka, *Salmonella typhi* – raka pęcherzyka moczowego, *Streptococcus bovis* – raka okrężnicy. Szereg badań naukowych wskazuje na podwyższone ryzyko powstawania i rozwoju raka jamy ustnej u pacjentów z chorobami przyzębia. W badaniu Moraes i wsp. [122] analizowano związek między stopniem nasilenia stanu zapalnego przyzębia a wystąpieniem nowotworów jamy ustnej i gardła. Badania przeprowadzone na 35 pacjentach z nowotworem jamy ustnej, wykazały u 85% ciężkie przewlekłe zapalenie przyzębia [122]. Przewlekły stan zapalny w tkankach przyzębia czy ostry w błonie śluzowej jamy ustnej powodowany między innymi przez *P. gingivalis* i *F. nucleatum*, wpływa na powstawanie zmian przednowotworowych – leukoplakii, prowadzących do rozwoju nowotworu [122–125] poprzez aktywację cytokin prozapalnych (IL8), aktywację dróg sygnałowych stymulujących procesy podziałowe, migrację komórek, inwazję komórkową, hamowanie apoptozy [126, 127]. Określone rodzaje drobnoustrojów wydzielając toksyny zaburzające cykl komórkowy, początkowo stymulują powstawanie przewlekłych stanów zapalnych. Dochodzi do zmian w ekspresji genów kodujących białka pRb, Bcl-2, prowadząc do zahamowania zaprogramowanej śmierci komórki (apoptozy). Z drugiej strony bakterie poprzez aktywację cykliny D1 kinaz

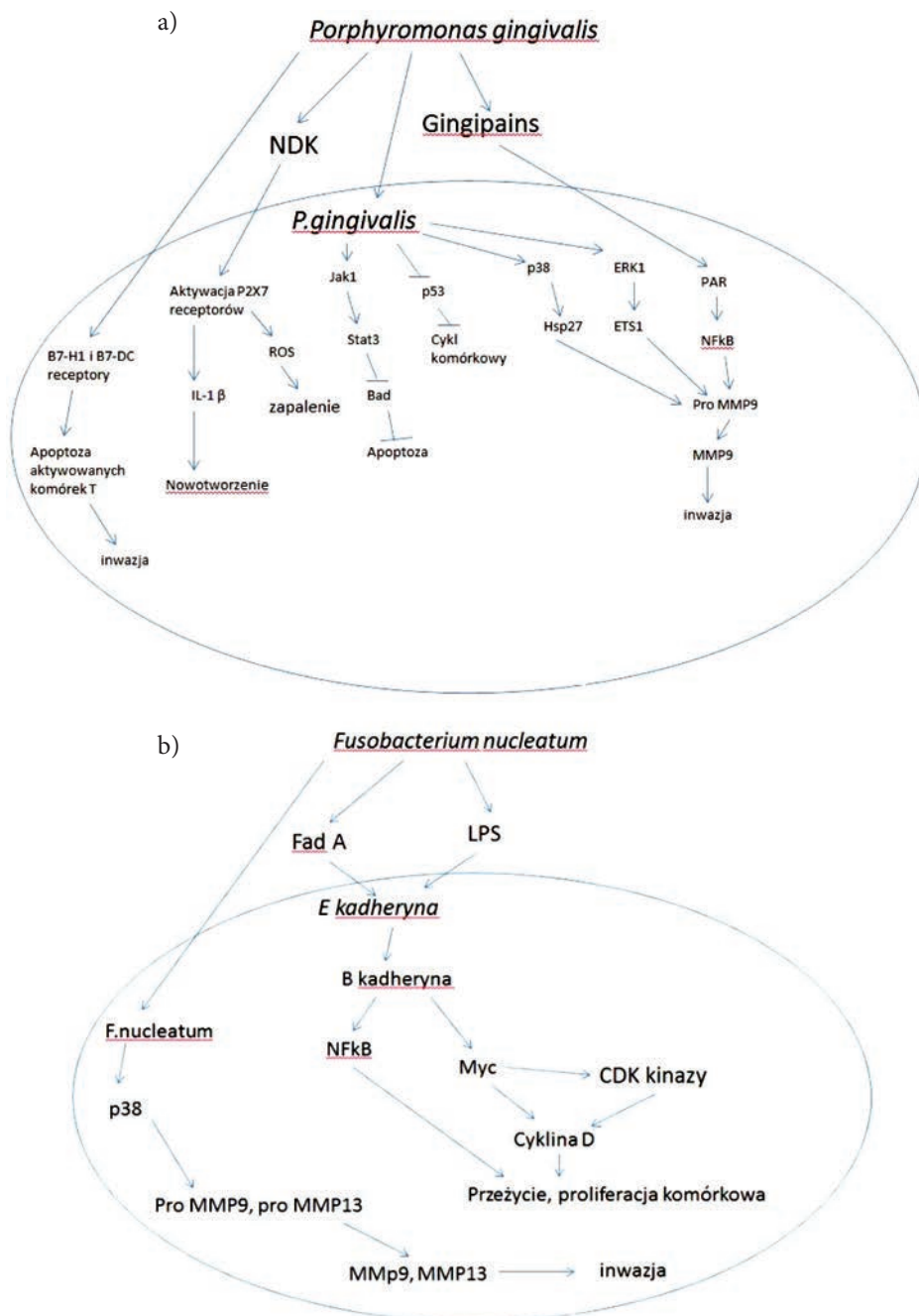
białkowych (MAPK) aktywują replikację DNA, a w konsekwencji podział komórek, jednocześnie przekształcając alkohol etylowy w aldehyd octowy, prowadzą do powstawania uszkodzeń w DNA, upośledzając ich naprawę [127–130].

Ogromny postęp w badaniach metagenomicznych, opartych między innymi na sekwencjonowaniu NGS (*new generation sequencing*), pozwala na identyfikację drobnoustrojów związanych z inicjacją i rozwojem procesu nowotworowego. Analizy metagenomiczne prowadzące do ustalenia zmian ilościowych i jakościowych drobnoustrojów jamy ustnej w procesie nowotworowym, pozwalają na identyfikację gatunków bakterii, grzybów odpowiedzialnych za powstawanie i rozwój zmian prowadzących do rozwoju raka. Tego rodzaju badania, identyfikując określone drobnoustroje, pozwolą na opracowanie narzędzi diagnostycznych, określających ryzyko rozwoju raka jamy ustnej, jak również precyzyjnej, personalizowanej strategii leczenia tego rodzaju nowotworów.

Analiza porównawcza mikrobiomu jamy ustnej pacjentów ze zmianami nowotworowymi z osobami nie wykazującymi takich zmian, pozwoliła na identyfikację drobnoustrojów: *Porphyromonas gingivalis* i *Fusobacterium nucleatum* – odpowiedzialnych za inwazję komórkową w płaskonabłonkowym nowotworze jamy ustnej (ryc. 6). *Porphyromonas gingivalis* jest bakterią kojarzoną przede wszystkim z zaawansowanymi przypadkami przewlekłego zapalenia przyzębia [131–133]. Jest gram-ujemną, niefermentującą pałeczką, która indukuje nadekspresję receptorów B7-H1 i B7-DC w komórkach nabłonka jamy ustnej. Odpowiada za powstawanie i progresję przewlekłego stanu zapalnego poprzez zwiększoną produkcję cytokin IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- α , zapobiegając wydzielaniu IL-1b i IFN- γ z komórek T CD8 β [134]. *Porphyromonas gingivalis* jest jednym z najbardziej wirulentnych i patogennych drobnoustrojów. Wytwarza niskocząsteczkowe substancje toksyczne takie jak kwas masłowy, amoniak oraz enzymy proteolityczne, które najprawdopodobniej niszczą bezpośrednio tkanki przyzębia. Bakterie *Porphyromonas gingivalis* występują przede wszystkim w płytce poddziąsłowej u osób z ciężkimi przypadkami przewlekłego zapalenia przyzębia [135–138].

Obecność i miano tych bakterii są skorelowane ze stopniem zaawansowania procesów destrukcyjnych przyzębia. Czynnikiem wirulentnym tych bakterii są rzęski, za pomocą których, dzięki zdolności przyczepiania się do komórek nabłonka, biorą znaczący udział w mechanizmach niszczących struktury przyzębia. Są odpowiedzialne za aktywację metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w tym MMP-1, -9, -10. Bakterie *Porphyromonas gingivalis* zakażając komórki, wywołują nadekspresję metaloproteinazy pro-macierzowej-9 (pro-MMP-9) poprzez pobudzenie ścieżki sygnalizacyjnej

ERK1/2-ETS1, p38/HSP27 i PAR/NF- κ B. Proteinyzyny cysteinowe bakterii *P. gingivalis* przekształcają nieaktywną formę metaloproteinyzyny proenzymu pro-MMP-9 w MMP-9, promując w ten sposób inwazję, migrację i przerzut komórek płaskonabłonkowego nowotworu jamy ustnej. Zwiększając ekspresję na poziomie białka MMP-1 i MMP-10, odpowiadają za przemieszczanie się cząsteczek od nabłonka epitelialnego do mezenchymalnego. Wpływają na podziały komórek, aktywując fosforylację zależnej od cykliny kinazy i zmniejszając ekspresję białka supresorowego TP53, przyspieszając progresję fazy S cyklu [134]. W komórkach nabłonka policzka indukują proliferację komórek, aktywując białko β -kateniny i zależną od gingipainy proteolizę białek. Z drugiej strony wpływają na proces apoptozy w komórkach epitelialnych działając GEC, hamując chemicznie indukowany wewnętrzny mitochondrialny szlak programowanej śmierci poprzez receptor purynergiczny P2X7. Aktywując kinazę JAK1, wpływają na szlak sygnalizacyjny PI3K/Akt/Stat 3 [139]. Bakterie *Porphyromonas gingivalis* dodatkowo indukując nadekspresję cząsteczek miR-203, które są zaangażowane w wyciszenie szlaku sygnalizacji cytokin 3, dodatkowo hamują apoptozę [139]. Lipopolisacharyd ściany bakterii *Porphyromonas gingivalis* zawierający fosforylowany 2-keto-3-deoksyoktonian, hamuje wewnętrzny mitochondrialny szlak apoptozy komórek nabłonkowych, poprzez blokowanie uwalniania cytochromu c z mitochondriów [139–142]. Bakterie *Fusobacterium nucleatum* z kolei aktywują proliferację, inwazję i migrację komórek nabłonka jamy ustnej poprzez aktywację 12 kinaz. Pobudzając między innymi aktywowaną mitogenem kinazę białkową p38, kinazy: Etk/BMX, S6 kinazę p70 i RhoA, indukują nadprodukcję metaloproteinyzyny MMP-13 (kolagenaza 3) [143, 144]. Białko adhezyjne FadA z *Fusobacterium nucleatum* wiąże się z kadheryną E i aktywuje β -kateninę. Powstawanie i magazynowanie nukleocytoplazmatycznej β -kateniny reguluje komórki proliferacyjne i odpowiedź zapalną w onkogenezie, zwiększa agresywność i/lub potencjał przerzutowy komórek nowotworowych. *Fusobacterium nucleatum* synergistycznie z innymi bakteriami, grzybami, wirusami mogą wywoływać prozapalne mikrośrodowisko, poprzez rekrutację naciekających guza komórek odpornościowych sprzyjających powstawaniu nowotworów (ryc. 6 b).



Rycina 6. Schemat działania bakterii *Porphyromonas gingivalis*: (a) *Fusobacterium nucleatum*; (b) na rozwój komórek nowotworowych jamy ustnej

ROZDZIAŁ 10

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy jest analiza ekspresji genów zaangażowanych w proces karcynogenezy nowotworów jamy ustnej, czynników epigenetycznych, które mogą wpływać na ilość powstającego mRNA białka.

Cele szczegółowe:

- Ocena stopnia metylacji 16 genów pełniących rolę w organizmie człowieka, w tym genów supresorowych i protoonkogenów, z wykorzystaniem zestawu ME001 (MRC-Holland, Holandia), u pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej i leukoplakią. Analiza dotyczy tkanki nowotworowej w porównaniu z tkanką nieobjętą zmianą nowotworową tego samego pacjenta, a także tkanką pacjenta z leukoplakią. Wybór genów wykazujących zmieniony stopień metylacji w porównaniu z tkanką prawidłową. Analiza ekspresji wybranych genów na poziomie transkrypcji, translacji.
- Ocena korelacji ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA białka, a ich stopniem metylacji w rejonach promotorowych.
- Ocena korelacji występowania określonych wariantów polimorficznych sekwencji pojedynczego nukleotydu (SNP) z ekspresją wybranych genów na poziomie mRNA białka.
- Analiza ekspresji panelu miRNA w tkance zmienionej nowotworowo i odpowiadającej jej tkance prawidłowej pacjentów z nowotworami jamy ustnej. Wybór cząsteczek miRNA potencjalnie związanych z procesem nowotworowym jamy ustnej.
- Analiza bioinformatyczna wybranych miRNA pod kątem zdolności do potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów, zaangażowanych w proces nowotworowy jamy ustnej na poziomie translacji.

ROZDZIAŁ 11

MATERIAŁY I METODY

Materialy

Materiał do badań stanowiły bloczki parafinowe, pochodzące od pacjentów z nowotworami jamy ustnej leczonych w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Grupę badaną stanowiło 120 pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej oraz 20 z leukoplakią. Kontrolą do zmiany nowotworowej był pobrany od tego samego pacjenta fragment tkanki nieobjętej procesem nowotworowym, oddalony około 1–3 cm od towarzyszącej mu zmiany.

Grupę badaną stanowili pacjenci zróżnicowani pod kątem płci, wieku, rodzaju zmiany nowotworowej, jej wielkości, charakteru, stopnia zaawansowania klinicznego (tab. 4).

Tabela 4. Zróżnicowanie pacjentów pod względem analizowanych cech

Analizowana cecha		Liczba pacjentów
Płeć	Kobieta	51
	Mężczyzna	69
Klasyfikacja TNM	Ta	21
	T1	61
	T2	38
Klasyfikacja histologiczna zróżnicowanie	G1	37
	G2	83
Wielkość zmiany	<3 cm	48
	≥3 cm	72
Charakter zmiany	Pierwotna	120

Wiek pacjentów wynosił średnio 62 lata (46–76). Dane pacjentów dotyczące ich wieku i płci, rozpoznania, lokalizacji guzów, stopnia zróżnicowania

tkanki nowotworowej oraz stopnia zaawansowania choroby, pochodzą z analizy danych patomorfologicznych i klinicznych. Wyizolowany materiał genetyczny (DNA, RNA) był przechowywany do momentu badań w -800°C .

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN/317/13/KE 17 grudnia 2013 r.

Kolejną część badań w ramach pracy habilitacyjnej wykonano na zakupionej linii komórkowej ludzkich komórek raka płaskonabłonkowego języka linii SCC-25 (CRL-1628, ATCC). Prace doświadczalne z linią komórkową oraz analizy molekularne zostały przeprowadzone w Zakładzie Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za zgodą i pod opieką pana prof. dr. hab. Janusza Szemraja. W pracy przeprowadzano również hodowlę bakterii szczepu JM 109 *Escherichia coli*, zakupionego w firmie Promega (Promega Corporation MD, USA). Bakterie JM 109 transformowano rekombinowanymi plazmidami (celem ich namnożenia i izolacji), które w dalszym etapie badań wykorzystywano do transfekcji komórek linii SCC-25.

Sondy, startery, enzymy do przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji wyizolowanych miRNA, mRNA, sondy do analizy wybranych polimorfizmów w badanych genach pochodziły z firmy Apply Biosystem (Carlsbad, CA USA). System reporterowy pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector z firmy Promega Corp.

Metody

Isolacja DNA z blochków parafinowych

W celu pozbycia się parafiny z utrwalonego materiału genetycznego przeprowadzono 4–5 płukań próbek w ksylenie (4–8 krotnie), a następnie w alkoholu etylowym (99,8%, 3–4 krotnie). Niewielki fragment tkanki (~ 10 – 30 mg po deparafinizacji) dodano do probówki, która zawierała 0,5 ml buforu lizującego (1% Triton X-100, 2% sarcosyl, 20 mM EDTA, 200 mM Tris, pH 8,0, 0,8 M mocznik, 0,4 M NaCl), rozdrobniono homogenizatorem Tissue Ruptor (QIAGEN), następnie inkubowano przez 15 min w 55°C . W dalszej kolejności do probówki dodano 10 μl RNazy (20mg/ml) i inkubowano przez 1 godz. w 55°C , następnie 10 μl proteinazy K (20mg/ml) przeprowadzając odbiałczenie 1 godz. w 55°C . Po inkubacji dodano 0,5 ml mieszaniny fenol: chloroform (1 : 1), wirując 3 min, 13 000 g. Z DNA w fazie wodnej (górna) wytacono 100 μl 10 M octanu amonu, 1 ml zimnego 96% etanolu. Osad po wirowaniu zawieszano w buforze LoTE (3 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM EDTA). DNA po izolacji przechowywano w temperaturze -20°C .

Analiza stopnia metylacji rejonów promotorowych wybranych genów

Metoda MS-MLPA (*Methylation Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*)

Metoda wykorzystuje specyficzne sondy połówkowe, które hybrydują dopełniającym fragmentem analizowanego DNA, na którym znajduje się miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny HhaI wrażliwy na metylację. Całkowite przyłączenie się obu oligonukleotydów do sekwencji docelowej za pośrednictwem ligazy jest niezbędne do utworzenia matrycy do przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy. Od każdego pacjenta utworzono dwie próbki: jedna po ligacji była wykorzystywana do analizy CNV (*Copy Number Variants*), druga trawiona enzymem HhaI w celu oceny stopnia metylacji [MRC Holland.MS-MLPA General Protocol, 2016, dostęp online <http://www.mlpa.com>]. W trakcie hybrydyzacji do niezmetylowanego miejsca, specyficzne sondy podlegały kolejno ligacji, a następnie strawieniu przez enzym (nieobecność pików z powodu braku amplifikacji), podczas gdy przyłączenie sondy do metylowanego miejsca chronionego przed trawieniem pozwala na zajęcie reakcji łańcuchowej polimerazy (pik obecna amplifikacja zaszła). W celu oszacowania procentowego stopnia metylacji dzielono wartość NC (stała normalizacji – *Normalisation Constant*) próbki poddanej trawieniu przez wartość NC próbki nietrawionej badanego fragmentu [145]. Schemat postępowania wyglądał następująco: każdorazowo próbkę denaturowano w buforze TE w końcowej objętości 5 μ l przez 5 min w 98°C. W celu przeprowadzenia hybrydyzacji do każdej analizowanej próbki dodawano 3 μ l mieszaniny hybrydyzacyjnej składającej się z buforu MLPA, probemix ME001 (zawierającego specyficzne startery) i inkubowano 20 godz. w temperaturze 60°C.

W dalszej kolejności przygotowano dwie mieszaniny: jedną do ligacji (8,5 μ l dH₂O, 1,5 μ l buforu Ligase Buffer B, 0,25 μ l enzymu ligazy – Ligase DNA), drugą do ligacji-trawienia (dodatkowo zawierała 0,5 μ l enzymu Hha I).

Do ochłodzonych po procesie ligacji próbek (200°C) dodawano 3 μ l Ligase buffer A oraz 10 μ l H₂O.

Obie mieszaniny umieszczono w 480°C i przeprowadzono reakcję PCR (3,5 μ l dH₂O, 1 μ l SALSA PCR primer mix oraz 0,25 μ l polimerazy DNA).

Do każdej próbki w temperaturze pokojowej dodano 5 μ l przygotowanej mieszaniny (punkt 2) w celu przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy.

Tabela 5. Schemat etapów przeprowadzanej reakcji łańcuchowej polimerazy

Denaturacja DNA		
1	98°C	5 min
2	25°C	stop
Hybrydyzacja		
3	90°C	1 min
4	60°C	20 godz.
5	20°C	stop
Ligacja oraz ligacja plus trawienie		
6	48°C	stop
7	48°C	30 min
8	98°C	5 min
9	20°C	stop
PCR		
10	35 cykli	95°C 30 s
		60°C 30 s
		72°C 60 s
		72°C 20 min

Ostatnim etapem analizy stopnia metylacji próbek DNA pochodzących od pacjentów była elektroforeza kapilarna.

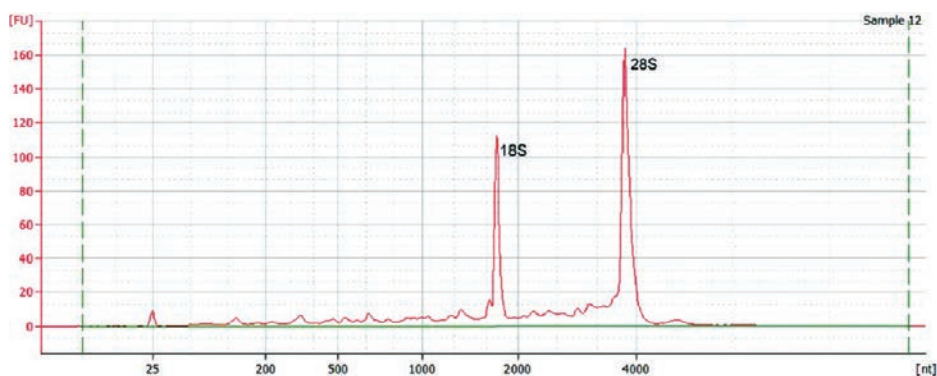
W tej odmianie elektroforezy – polimer i elektrolit został umieszczony w cienkich kapilarach 50–100 μm [146]. Produkty rozdziału reakcji MS przeprowadzono na sekwenatorze ABI-3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

Isolacja RNA z blozków parafinowych

Tkankę po usunięciu parafiny (procedura identyczna jak w przypadku izolacji DNA) suszono, następnie homogenizowano w buforze denaturującym (4M izotiocyanian guanidyny; 0,25 M cytrynian sodu, 0,5% sarkosyl, 0,1 M merkaptioetanol) wraz z roztworem proteinazy K (o stężeniu 20 mg/ml), wykorzystując homogenizator TissueRuptor (QIA-GEN), następnie inkubowano w 55°C przez noc (16–18 h). Po inkubacji próbkę odwirowywano (14 000 g, 5 min, 4°C) [115]. RNA z tkanki nowotworowej i nieobjętej procesem

nowotworowym izolowano, wykorzystując zestaw *mirVana™* miRNA Isolation Kit (Ambion) zgodnie z zaleceniami producenta. Do supernatantu po wirowaniu dodawano 30 μ l miRNA Homogenate Additive i inkubowano w 4°C 10 min. Do homogenatu tkankowego w następnej kolejności dodano 300 μ l mieszaniny kwaśny fenol: chloroform i wirowano (5 min, 10 000 g). Frakcję górną (wodną) przeniesiono do świeżej probówki, zawierającej 375 μ l 96% etanolu i przeniesiono do probówki zawierającej kolumnę z filtrem. Kolumnę z filtrem po odwirowaniu (15 s, 10 000 g) przeniesiono do nowych probówek i płukano w 700 μ l miRNA Wash Solution 1, wirowano (10 s, 10 000 g). Po dwukrotnym przemyciu kolumny w 500 μ l Wash Solution 2/3 wirowano (1 min, 10 000 g). Z kolumny wyizolowane RNA eluowano 30 μ l wody wolnej od nukleaz o temperaturze 95°C. Ilość i jakość wyizolowanego materiału oceniano wstępnie spektrofotometrycznie (Picodrop) przy $\lambda = 260$ nm. Otrzymane RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

Dokładną analizę wyizolowanego RNA przeprowadzano wykorzystując zestaw Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) zgodnie z zaleceniami producenta. Do próbki zawierającej 65 μ l Agilent RNA 6000 Nano gel matrix dodawano 1 μ l RNA 6000 Nano dye, a następnie wirowano (10 min, 13 000 g). Uzyskaną mieszaninę żelu z barwnikiem fluorescencyjnym nakładano na Nano chipa, umieszczonego w stacji roboczej. W następnej kolejności dodawano po 5 μ l RNA Nano markera. Jakość wyizolowanego RNA określano za pomocą analizatora 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Stopień hydrolizy wyizolowanego całkowitego RNA określano w oparciu o otrzymany elektroforegram (ryc. 7) oraz uzyskane wartości RIN. Tylko próbki charakteryzujące się wartością RIN > 7 poddawano dalszej analizie.



Rycina 7. Przykładowy elektroforegram RNA (RIN10)

Wyizolowany RNA posłużył do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji.

Odwrotna transkrypcja (RT)

W celu przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano zestaw AccuScript PfuUltra II RT-PCR Kit (Stratagene, La Jolla CA, USA) według zaleceń producenta (tab. 6).

Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystywanej do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji

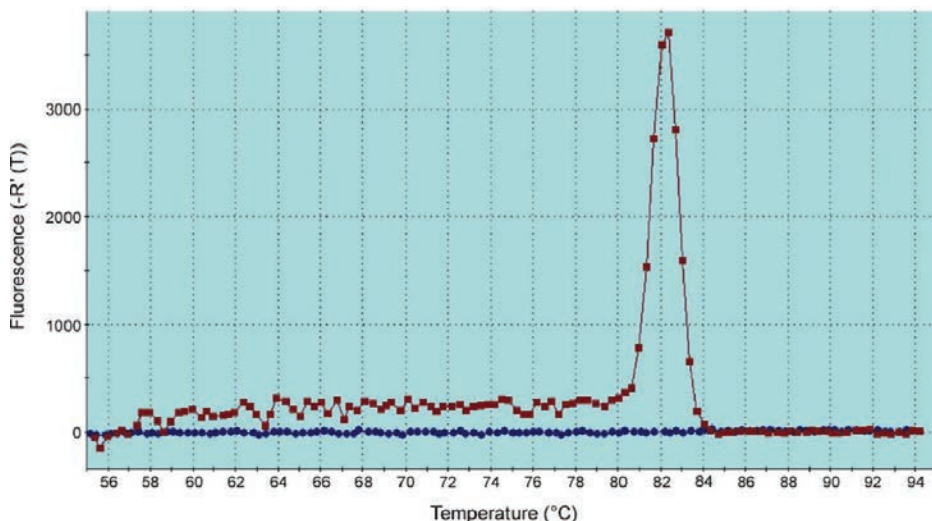
Skład	Objętość [μ l]	Stężenie końcowe
10 x AccuScript RT reaction buffer	2,0	1x
Oligo(dT) primer (100 ng/ μ l)	1,2	6 ng/ μ l
dNTP mix (10 mM)	2,0	1 mM
Woda wolna od nukleaz	9,8	N/A
Całkowite RNA (200 ng)	2,0	20 ng/ μ l
DTT (100 mM)	2,0	10 mM
AccuScript High-Fidelity RT	1,0	N/A

Mieszaninę przed dodaniem DTT i odwrotnej transkryptazy inkubowano (5 min w 65°C oraz 5 min w 22°C), następnie po dodaniu DTT (ditiotreitol) i enzymu mieszaninę reakcyjną umieszczono w termocyklerze na 30 min w temperaturze 42°C. Otrzymane w ten sposób cDNA po zamrożeniu przechowywano w temperaturze –20°C.

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR)

Reakcja Real-Time PCR wykonana została z użyciem zestawu TaqMan® Universal PCR Master Mix, No UNG (Applied Biosystems, Carlsbad, CA USA), według protokołu dostarczonego przez producenta. Do powielania analizowanych cDNA wykorzystano sondy TaqMan: Hs00191052_m1, Hs1548034_m1, Hs01002012_m1, Hs03043884_g1, Hs0392097_g1 specyficzne dla genu *DLGAP1*, *WIF1*, *NMDAR2B*, *RPL13A*, *GADPH*. Każda sonda była amplifikowana w oddzielnym dołku na 96-studzienkowej płytce. Wszystkie próbki były inkubowane wstępnie w 50°C przez 2 min i w 95°C przez 10 min, a następnie cyklicznie: w temperaturze 95°C przez 30 s, w 60°C przez 30 s i w 72°C przez 60 s. Przeprowadzono 40 cykli. Do obliczenia względnej ekspresji badanych genów wykorzystano metodę porównawczą Ct [116], wyznaczając progowy poziom krytyczny fluorescencji Ct (threshold cycle). Poziom ekspresji genów normalizowano wobec genu referencyjnego *RPL13A*. Analiza wyników została przeprowadzona za pomocą oprogramowania ABI Prism 7000 (SDS Software).

W ocenie ekspresji mRNA wykorzystano kontrole bez reakcji odwrotnej transkrypcji czy cDNA. Po zakończeniu reakcji wykonano krzywą topnienia, w celu sprawdzenia jakości otrzymanych produktów PCR (ryc. 8).



Rycina 8. Przykład krzywej topnienia łańcuchowej reakcji polimerazowej w czasie rzeczywistym

Do obliczenia względnej ekspresji genów wykorzystano metodę porównawczą Ct [147]. Wartości Ct odczytywano z krzywej amplifikacji (ryc. 9). Poziom ekspresji genów w poszczególnych tkankach normalizowano wobec genu referencyjnego RPL13A i obliczano według wzoru:

$$\Delta Ct = CtG - CtR$$

gdzie:

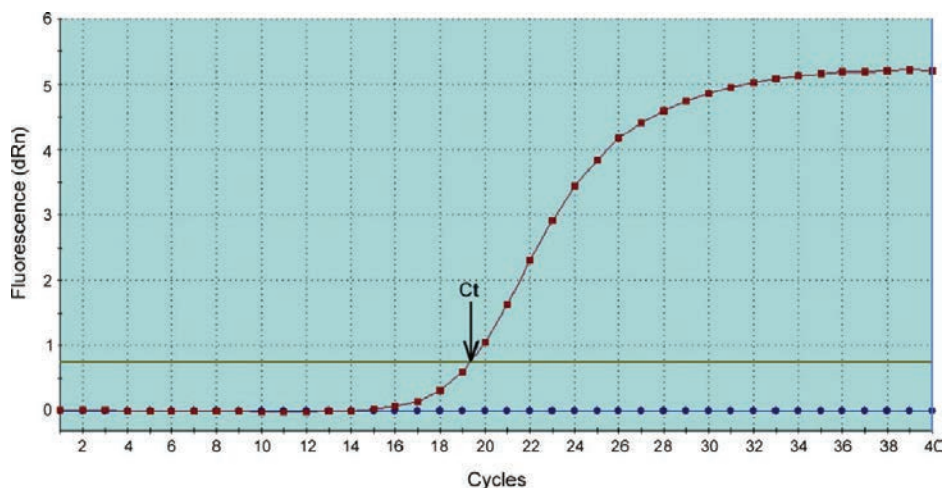
- R – ilość badanego transkryptu w próbce;
- CtG – wartość Ct uzyskana dla danego genu;
- CtR – wartość Ct uzyskana dla genu referencyjnego.

W celu obliczenia względnej ekspresji genu, przedstawionej jako zmianę poziomu ekspresji badanego genu pomiędzy tkanką ze zmianą nowotworową a tkanką prawidłową bez zmiany, posłużono się wzorem:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta CtN - \Delta CtK$$

gdzie:

- R – ilość analizowanego transkryptu genu w próbce, wyrażona jako wielokrotność kalibratora;
- ΔCtN – wartość ΔCt dla tkanki nowotworowej;
- ΔCtK – wartość ΔCt dla tkanki nieobjętej procesem nowotworowym (kalibratora).



Rycina 9. Przykładowa krzywa amplifikacji otrzymana dla reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

Analiza ekspresji panelu mirna

Reakcja odwrotnej transkrypcji – panel miRNA

Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonano za pomocą zestawu TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), według protokołu dostarczonego przez producenta, używając starterów Megaplex™ RT Primers Human Pool A i B (Applied Biosystems). Składniki mieszaniny reakcyjnej zostały przedstawione w tab. 7.

Tabela 7. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia reakcji RT

Skład	Objętość [μ l]	Stężenie końcowe
Megaplex™ RT Primers Human Pool A, B (10x)	0,8	1x
dNTPs (100 mM)	0,2	2,5 mM
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ μ l)	1,5	10 U/ μ l
10x RT Buffer	0,8	1x
MgCl ₂ (25 mM)	0,9	3 mM
RNase Inhibitor (20 U/ μ l)	0,1	0,25 U/ μ l
Woda wolna od nukleaz	0,2	N/A
Całkowite RNA (500 ng)	3,0	65 ng/ μ l
Objętość końcowa	7,5	–

Przeprowadzono 40 cykli reakcji odwrotnej transkrypcji, na którą składały się trzy etapy (2 min w 16°C; 1 min w 42°C; 1 s w 50°C). Inaktywację odwrotnej transkryptazy przeprowadzono przez 5 min w 85°C. cDNA przechowywano w temperaturze –80°C.

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym – przeszukiwanie panelu miRNA

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono, wykorzystując zestaw TaqMan® Universal PCR Master Mix, No UNG (Applied Biosystems), według protokołu dostarczonego przez producenta. Składniki wchodzące w skład mieszaniny przedstawiono w tab. 8. Przygotowaną mieszaninę nanoszono na płytkę TaqMan® Human miRNA Array A, B (Applied Biosystems). Reakcję przeprowadzono w aparacie 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Względnej ekspresji genów miRNA szacowano w oparciu o metodę porównawczą Ct [147]. Poziomą ekspresję genów miRNA w poszczególnych tkankach normalizowano wobec genu referencyjnego U6 small nuclear RNA.

Tabela 8. Składniki mieszaniny reakcyjnej PCR w czasie rzeczywistym

Skład	Objętość [μl]	Stężenie końcowe
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No UNG (2x)	450	1x
Woda wolna od nukleaz	444	N/A
cDNA (400 ng)	6	0,45 ng/μl
Końcowa objętość mieszaniny	900	–

Analizę względnej ekspresji niewielkiej grupy pacjentów (5%) przeprowadzono dla ponad 700 genów miRNA. miRNA o zmienionym profilu ekspresji wybrano do dalszych badań (tab. 8). Bazę danych DIANA Database wykorzystano w celu ustalenia homologii pomiędzy sekwencją miRNA oraz regionem 3'UTR docelowego transkryptu.

Analiza ekspresji wybranych mirna

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym – wybranych miRNA

Do przepisania sekwencji nukleotydowej z wybranych miRNA w cDNA wykorzystano zestaw TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), całkowitego RNA TaqMan Reverse

Transcription kit (Applied Biosystems). Próbkę inkubowano 30 min w 16°C i 30 min w temperaturze 42°C. Odwrotna transkryptaza została inaktywowana (5 min w 85°C), a uzyskany cDNA przechowywano w –80°C. mirVana 5 nmol Mimic (cel-miR-39) użyto jako kontrolę endogenną warunków odwrotnej transkrypcji. Do powielania analizowanych cDNA wykorzystano specyficzne sondy TaqMan: 478587_mir, 477975_mir, 479448_mir, 478623_mir, 478214_mir, 478606_mir dla miR: 29a-5p, 21-5p, 30a-5p, 106a-5p, 92a-5p, 30d-5p. Każda sonda była amplifikowana w oddzielnym dołku na 96-studzienkowej płytce. Wszystkie próbki były inkubowane wstępnie w 50°C przez 2 min i w 95°C przez 10 min, a następnie cyklicznie: w temperaturze 95°C przez 30 s, w 60°C przez 30 s i w 72°C przez 60 s. Przeprowadzono 40 cykli. Analiza wyników została przeprowadzona za pomocą oprogramowania ABI Prism 7000 (SDS Software). W ocenie ekspresji miRNA wykorzystano kontrole bez reakcji odwrotnej transkrypcji czy cDNA. Po zakończeniu reakcji wykonano krzywą topnienia w celu sprawdzenia jakości otrzymanych produktów PCR. Poziomą ekspresję genów miRNA w poszczególnych tkankach normalizowano wobec genu referencyjnego U6 small nuclear RNA.

Genotypowanie

Ilość i jakość wyizolowanego DNA analizowano za pomocą Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc, De, USA). Analizę polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) wykonano techniką dyskryminacji alleli (ang. *allelic discrimination*) z użyciem sond typu TaqMan: C_27275860_10, C_27275861_10, C_90347381_10, C_344796424_10, C_342877415_10, C_32807625_10, specyficznych dla polimorfizmu: rs34203757-WIF1, rs34505206-WIF1, rs56900803-WIF1, rs765474396-DLGAP1, rs369140549-DLGAP1, rs16946051-DLGAP1. Mieszanina reakcyjna (5 µl) zawierała DNA (10 ng). W oznaczeniach wykorzystano zestaw TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems Inc. Carlsbad, CA), sondy FAM i VIC (200 nM) oraz specyficzne primery dla TaqMan Genotyping Assay z Applied Biosystems. Reakcje PCR były wykonywane w systemie Real Time PCR 7900 HT (Applied Biosystems) przez 15 min w temperaturze 95°C, a następnie 30 cykli (15 s w 92°C i 60 s w 60°C). Analizę dyskryminacyjną alleli przeprowadzono na produkcie po PCR. Analizy produktów amplifikacji zostały wykonane przy użyciu oprogramowania SDS 1.2. Jako kontrolę negatywną użyto mieszaniny pozbawionej genomowego DNA.

Oczyszczanie produktów PCR

Oczyszczanie otrzymanych produktów PCR przeprowadzono, wykorzystując zestaw Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). 15 µl produktu PCR mieszano z 15 µl Membrane Binding Solution, następnie naniesiono je na kolumnę z filtrem, inkubowano 1 min w 25°C. Po odwirowaniu (1 min, 15 000 g) kolumnę przepłukiwano przy użyciu 700 µl Membrane Wash Solution, a następnie wirowano (1 min, 15 000 g). Produkt PCR eluowano z kolumny 30 µl wody wolnej od nukleaz poprzez wirowanie (1 min, 15 000 g). Absorbancję oczyszczonego produktu PCR oznaczano, wykorzystując spektrofotometr (Picodrop) przy $\lambda = 260$ nm. DNA przechowywano w temperaturze 4°C.

Analiza sekwencji DNA

Sekwencje produktów PCR potwierdzano poprzez sekwencjonowanie DNA (Gemomed Warszawa, CoreLab UM Łódź). W celu określenia polimorfizmu (SNP) uzyskane wyniki sekwencjonowania porównywano z prawidłową sekwencją referencyjną z banku genów, za pomocą programu CLUSTALW Software.

Analiza ekspresji genu na poziomie białka

Przygotowanie homogenatów tkankowych

Homogenaty tkankowe przygotowano z deparafinizowanych tkanek guza oraz tkanek prawidłowych. Niewielki fragment tkanki (~30 mg) płukano w zimnym 20 mM buforze PBS, pH 7,2, następnie przenoszono do próbówki zawierającej 1 ml 10 mM buforu PBS, pH 7,4, uzupełnionego inhibitorami proteaz Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche). Tkankę rozdrabniano homogenizatorem Tissue Ruptor (QIAGEN), a powstałą zawiesinę dwukrotnie zamrażano i rozmrażano w celu przerwania ciągłości błony komórkowej. Homogenat po wirowaniu przechowywano w temperaturze -20°C.

Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka całkowitego w lizatach tkanek guza oraz tkanek prawidłowych oznaczano zestawem Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC) zgodnie z zaleceniami producenta, wyznaczając krzywą wzorcową dla albuminy ($R^2 = 0,9951$). Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Absorbancję próbek mierzono za pomocą mikropłytkowego czytnika fotometrycznego Multiskan Ascent (Thermo Labsystems) przy $\lambda = 570$ nm.

Test immunoenzymatyczny (ELISA)

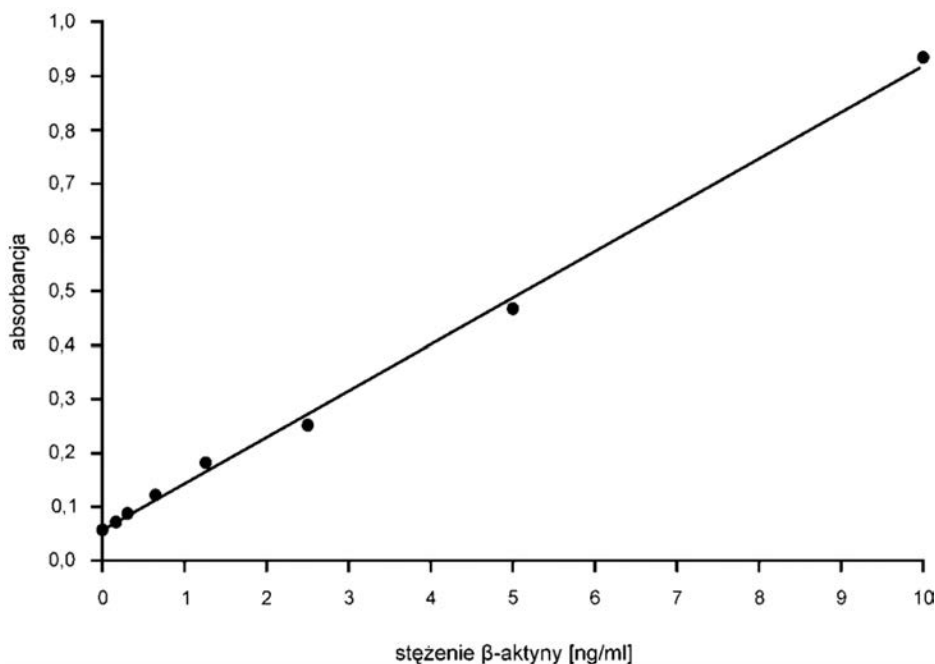
Stężenie białek *WIF1* i *DLGP1* w lizatach tkanek guza oraz tkanek prawidłowych oznaczano zestawami Human *WIF1* ELISA Kit (LifeSpan Biosciences), Human *DLGP1* ELISA Kit (Antibodies), Human GRIN2B/NMDAR2B/NR2B ELISA Kit (LifeSpan Biosciences Inc.), według protokołów dostarczonych przez producenta. Kontrolą endogenną dla obliczenia stężenia białka w próbkach stanowiła β -aktyna Human Actin Beta (ACTb) ELISA Kit (BMASAY) zgodnie z zaleceniami producenta (ryc. 10). Absorbancję próbek mierzono za pomocą mikropłytkowego czytnika fotometrycznego Multiskan Ascent (Thermo Labsystems) przy $\lambda = 450$ nm.

Stężenie β -aktyny obliczano z równania krzywej wzorcowej:

gdzie:

$\rho_{\beta\text{-aktyny}}$ – stężenie β -aktyny [ng/ml];

Abs – absorbancja.



Rycina 10. Krzywa kalibracyjna wyznaczona dla β -aktyny ($R^2 = 0,9977$)

Metoda Western Blot

Komórki SSC-25 przed i po transfekcji oraz po odwirowaniu homogenizowano w buforze: 25 mM Tris-HCl, pH 7,4 z mieszaniną inhibitorów proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH). Ilość białka w homogenacie oznaczano metodą Lowry'ego. Homogenat komórek (50 µg białka/studzienkę) inkubowano w roztworze: 0,125 M TRIS, 10% glicerol, 0,22% błękit bromofenolowy, 2% SDS, 0,1% 2-merkaptoetanol, przez 5 min w temperaturze 100°C. Zdenaturowane białka rozdzielano na 10% żelu poliakrylamidowym wg metody Laemmli przy napięciu 100V. Rozdzielone białka przenoszono na błonę nitrocelulozową (0,2 µm, Hybond-ECL, Amersham) metodą elektroblotingu przez 1,5 godz. przy natężeniu prądu 350 mA. Po trzykrotnym (przez 5 min) przepłukaniu błony nitrocelulozowej w buforze TBST (50 mM TRIS, 153 mM NaCl, Tween 0,05%, pH 7,5) blokowano niespecyficzne wiązania przez inkubację w 5% odtłuszczonego mleku w TBST przez 1 godz. Po kolejnym trzykrotnym płukaniu w TBST błonę nitrocelulozową poddano inkubacji ze specyficznymi przeciwciałami poliklonalnymi, anty receptor NMDAR2B lub anty β-aktyna (Sigma) w rozcieńczeniu 1 : 1000 w 5% mleku w TBST i pozostawiono na noc w 4°C. Następnego dnia po standardowym przepłukaniu w TBST błonę inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej z wtórnym, poliklonalnym przeciwciałem IgG, połączonym z peroksydazą chrzanową, rozcieńczonym w stosunku 1 : 1000 w 5% mleku w TBST. Do detekcji białka użyto metody chemiluminescencyjnej ECL, wykorzystując zestaw firmy PIERCE. Jako białko odniesienia oznaczono β-aktynę.

Hodowla bakterii JM 109 (Promega Corp)

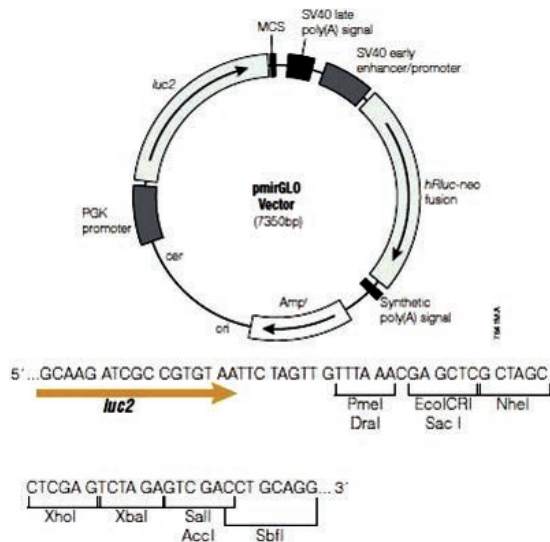
Baterie *E.coli* szczep JM 109 hodowano na płynnej pożywce LB (Luria-Bertani) 16–18 godz. w obecności antybiotyku ampicyliny w stężeniu 100 µg/ml w 37°C.

Synteza oligonukleotydów zawierających sekwencję 3'UTR genu *DLGAP1* zawierającego sekwencję miejsca, z którą potencjalnie wiąże się wybrana cząsteczka miR-30a-5p

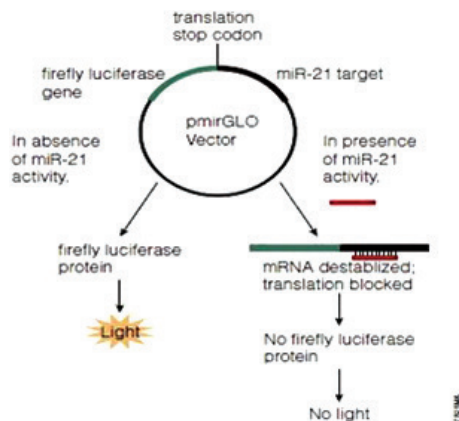
Analiza bazy Target Scan Human 5.1, Diana, platformy miRSystem posłużyła do zaprojektowania oligonukleotydów o długości 53 pary zasad (tab. 9), odpowiadających fragmentowi 3'UTR transkryptu genu *DLGAP1*, które zawierały prawidłowe oraz zmutowane miejsca wiązania badanego miR-30a-5p. Zaprojektowane oligonukleotydy zawierały na końcach miejsca rozpoznawalne przez enzymy restrykcyjne SacI, XbaI. Syntezę oligonukleotydów przeprowadzono w firmie Genomed (Warszawa). Zsyntetyzowane oligonukleotydy sens i antysens hybrydyzowano 95°C 3 min, 370°C 15 min w termocyklerze firmy Biometra (TGradient).

Klonowanie syntetycznych oligonukleotydów w wektorze pmirGLO (Promeg Corp)

Zarówno wektor pmirGLO (ryc. 11a, b), jak i syntetyczne oligonukleotydy trawiono enzymami Xba I, Sac i w buforze FastDigest przez 30 min w temperaturze 370°C. Kompletność strawienia wektora potwierdzono na 2% żelu agarozowym i w buforze TAE (bufor TRIS-octan-EDTA). Zhydrolizowane za pośrednictwem enzymów restrykcyjnych oligonukleotydy i wektor pmirGLO ligowano w buforze Rapid ligation buffer przez 30 min w temperaturze pokojowej, wykorzystując ligazę DNA T4.



Rycina 11a. Schemat budowy wektora pmirGLO z miejscami do klonowania



Rycina 11b. Mechanizm działania wektora pmirGLO

Synteza oligonukleotydów zawierających sekwencję 3'UTR genu *DLGAP1* zawierającego sekwencję miejsca, z którą potencjalnie wiąże się wybrana cząsteczka miR-30a-5p

Analizę oddziaływania wybranego miR-30a-5p z transkryptami genu *DLGAP1* przeprowadzono z wykorzystaniem systemu reporterowego pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega Corp), wykorzystującego aktywność lucyferazy. Analiza bazy Target Scan Human posłużyła do zaprojektowania oligonukleotydów o długości 53 nukleotydów zakończonych miejscami rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne *SacI* i *XhoI* (tab. 9) odpowiadające fragmentowi 3'UTR transkryptu genu *DLGAP1*, które zawierały prawidłowe oraz zmutowane miejsca wiązania badanego miRNA. Syntezę oligonukleotydów przeprowadzono w firmie Genomed (Warszawa). Zsyntetyzowane oligonukleotydy sens i antysens hybrydyzowano: 3 min w 95°C, 15 min w 37°C w termocyklerze firmy Biometra (TGradient).

Tabela 9. Sekwencje nukleotydowe oligonukleotydów odpowiadające rejonowi 3'UTR transkryptu genu *DLGAP1*

Wstawka 21-28 UTR	5'AGTCGAGT CCTGCAITCAGTCCTGCTGTTTACAATGTGAAATCTCGAGATCG 3' 3'TCAGCTCGA GGACGTAAGTCAGGACGACAAATGTTACACTTTAG AGCT CTAGCS'
Wstawka 21-28 UTR zmutowana	5'AGTCGAGT CCTGCAITCAGTCCTGCTGTAATCAATGTGAAATC TCGA GATCG3' 3' TCAGCTCGA GGACGTAAGTCAGGACGACATTAGTTACACTTTAG AGCT CTAGCS'
Wstawka 74-81 UTR	5' AGTCGAGCT CCATTGTAATGACAATGTTTACATAGTAATCATTC TCGA GATCG 3' TCAGCTCGA GGTAACATTACTGTTACAAATGTATCATTAGTAAG AGCTCTAGCS'
Wstawka 74-81 UTR zmutowana	5' AGTCGAGCT CCATTGTAATGACAATGTAATTATAGTAATCATTC TCGAGATCG3' 3' TCAGCTCGA GGTAACATTACTGTTACATTAAATATCATTAGTAAG AGCTCTAGCS'

Transformacja kompetentnych bakterii JM 109 z zastosowaniem DMSO

Do 100 μl komórek kompetentnych, rozmrażanych w łaźni lodowej w temperaturze 4°C, dodano DNA plazmidowy i inkubowano przez 15 min. Następnie dodano 920 μl mieszaniny o składzie: 850 μl LB 6,1, 50 μl DMSO, 20 μl 1 M glukozy. Próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min, a następnie przez 1 godz. w temperaturze 37°C z wytrząsaniem. Po inkubacji komórki wysiewano na podłoże selekcyjne (L-agar) z dodatkiem ampicyliny w stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [148].

Izolowanie DNA plazmidowego

Plazmidowy DNA oczyszczano korzystając z gotowych zestawów Wizard Plus SV MiniPreps firmy Promega lub izolując bez użycia gotowych zestawów [149]. W przypadku zestawów gotowych izolacji plazmidów dokonano wg instrukcji producenta. Komórki *E. coli* zawieszano w kolejnych buforach zestawu. Po rozpuszczeniu i lizie komórek bakterii supernatant z DNA plazmidowym nanoszono na złożę zamieszczone w zestawie, a następnie przemywano kolumnę buforem przemywającym. DNA plazmidowe związane ze złożem wymywano 60–100 μl wody wolnej od nukleaz. Końcowe stężenie wyizolowanego DNA oznaczano spektrofotometrycznie.

Preparatyka DNA plazmidowego – mikropreparatyka

W celu wyizolowania plazmidowego DNA hodowle bakterii *E. coli* prowadzono w pożywce LB z dodatkiem ampicyliny w stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ z wytrząsaniem. Pojedynczą kolonię bakterii, która wyrosła na stałym podłożu LB z dodatkiem agaru i ampicyliny (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) przesiewano do 3 ml (minipreparatyka) lub do 100 ml (makropreparatyka) podłoża namnażającego (LB z ampicyliną). Inkubację prowadzono przez noc w 37°C z ciągłym wytrząsaniem.

Celem wstępnego wyselekcjonowania klonów zawierających zrekombinowany plazmid 3 ml całonocnej hodowli odwirowano (2–3 min, 13 000 obr/min). Do osadu dodano 100 μl odczynnika RI, wymieszano i inkubowano w 4°C przez 15 min. Po tym czasie dodano 200 μl RII i pozostawiono na 5 min w temperaturze pokojowej. Następnie do mieszaniny dodano 150 μl RIII i inkubowano przez 30 min w 4°C. Odwirowano 10 min w mikrowirówce (13 000 obr/min). Do supernatantu dodano 340 μl izopropanolu. Po odwirowaniu osad przepłukano 70% etanolem, ponownie wirowano 10 min i dokładnie wysuszono. Osad rozpuszczono w 30 μl buforu LoTE i inkubowano z RN-azą o stężeniu 1 mg/ml przez 30 min w łaźni wodnej o temperaturze 56°C, następnie próby naniesiono na 1% żel agarozowy z dodatkiem barwnika obciążającego.

Poprawność konstruktu pmirGLO-oligonukleotyd potwierdzono sekwencyjnie (CorLab Uniwersytet Medyczny, Łódź).

Hodowla komórkowa

Linie komórkową SCC-25 ludzkiego raka płaskonabłonkowego języka (ATCC CRL-1628) hodowano zgodnie z zaleceniami producenta, wykorzystując mieszaninę podłoża Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) i Ham's F12 (w stosunku 50 : 50), suplementowaną 10% bydlęcą surowicą płodową podlegającą inaktywacji termicznej. Pożywkę wzbogacano 400 ng/ml hydrokortyzonu oraz mieszaniną antybiotyków o stężeniu końcowym: 100 UI/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 0,25 mg/ml amfoterycyny B. Hodowle komórek prowadzono w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej 5% dwutlenku węgla (CO₂), w inkubatorze firmy NuAire In-vitroCell. Pasaż hodowli komórkowej przeprowadzano wykorzystując 0,25% roztwór trypsyny z EDTA, następnie wysiewano do nowego naczynia hodowlanego w stosunku 1 : 4.

Transfekcja komórek SCC-25 ludzkiego raka płaskonabłonkowego języka zarówno miR-30a-5p, jak i plazmidami zawierającymi miejsce wiązania miR-30a-5p

Założono hodowlę ludzkich komórek SCC-25 ludzkiego raka płaskonabłonkowego języka w 25 ml butelce do hodowli komórkowej, w standardowej pożywce hodowlanej o gęstości 2,5 x 10⁵ komórek/kolbę (60–80% konfluencji). Po 24 godz. pożywka wzrostowa została zastąpiona przez świeżą pożywkę bez surowicy, uzupełnioną mieszaniną 50 pM miR-30a-5p mimic, lub miRNA jako mimic negative control (Apply Biosystems), 100 ng/ml plazmidu pmirGLO zawierającym prawidłowe lub zmutowane miejsce wiązania miRNA na genie *DLGAP1*, lub wektorem pmirGLO nie zawierającym wstawki (w celu sprawdzenia czy miRNA nie oddziałuje z transkryptem lucyferazy), 5 µl Lipofectaminy 3000 (Invitrogen) w 100 µl medium (wcześniej w celu utworzenia kompleksu inkubowanych w temperaturze 20°C) i inkubowano przez 5–7 godz. Po inkubacji pożywkę usunięto oraz zastąpiono normalną pożywką z surowicą i inkubowano przez odpowiednio 24, 48, 72 godz. Wydajność transfekcji oceniano po 24 godz., na podstawie luminescencji emitowanej przez lucyferazę pochodzącą z żebroplawa (*Renilla reniformis*). Aktywność lucyferazy mierzono po 24, 48, 72 godz. Komórki zamrożono i utrzymywano w temperaturze –80°C dla dalszych eksperymentów.

Analiza aktywności lucyferazy

Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega Corp) zgodnie z załączoną instrukcją został wykorzystany do pomiaru aktywności lucyferazy na luminometrze GloMax. Aktywność lucyferazy normalizowano do luminescencji emitowanej przez lucyferazę pochodzącą z żebroplawa (*Renilla reniformis*).

Ocena aktywności cytotoksycznej w teście MTT

Wpływ wyciszania bądź zwiększania ekspresji genu *DLGAP1* po transfekcji komórek miR-30a-5p na proliferację oraz apoptozę komórek rakowych badano przy użyciu testu MTT oraz cytometrii przepływowej. Zastosowany test MTT z bromkiem 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-dimetylotetrazolu, polegał na kolorymetrycznej ocenie aktywności metabolicznej komórek nowotworowych, opartej na konwersji soli tetrazoliowej do nierozpuszczalnego formazanu. Ilość utworzonego formazanu była proporcjonalna do ilości żywych komórek. W celu oceny właściwości cytotoksycznych badanych związków, wprowadzanych do komórek linii SCC-25, komórki wysiewano na płytki 96 stanowiskowe w liczbie 5000 komórek na studzienkę, a następnie dodawano odpowiedniej pożywki hodowlanej w ilości 0,2 ml. Komórki nowotworowe pozostawiono na 72 godz. w celu osiągnięcia wzrostu logarytmicznego. Po upływie tego czasu pożywkę usuwano i na płytki do odpowiednich stanowisk dodano syntetyczne oligonukleotydy RNA. Komórki hodowano przez 24, 48 i 72 godz. w celu oceny wpływu cytotoksycznego badanych związków. Po upływie tego czasu do każdej studzienki dodawano roztwór MTT (Sigma-Aldrich) w pożywce hodowlanej o końcowym stężeniu 2 mg/ml. Komórki pozostawiono z roztworem barwnika na 4 godz. Po tym czasie pożywkę usuwano i do każdej studzienki dodawano po 200 μ l dimetylosulfotlenku w celu rozpuszczenia powstałych kryształów formazanu. Odczytu absorbancji dokonywano przy użyciu czytnika do mikropłytek (BioTek Instruments) przy długości fali 570 nm. Stopień cytotoksyczności obliczono według następującego wzoru: procent cytotoksyczności (martwe komórki) = $(1 - [\text{absorbancja badanej próbki} / \text{absorbancja kontroli}]) \times 100\%$.

Analiza procesu apoptozy z zastosowaniem cytometrii przepływowej

Apoptozę oraz nekrozę komórek płaskonabłonkowych raka języka linii SCC-25 traktowanych miR-30a oceniano przy użyciu zestawu Muse Annexin V and Dead Cell Assay Kit (Millipore) zgodnie z instrukcją obsługi i instrukcją producenta. Po zakończonej ekspozycji komórki nowotworowe trypsynizowano i przemywano dwukrotnie jałowym roztworem PBS. Sporządzano zawiesinę komórek w podłożu, tak aby końcowe stężenie wynosiło 1×10^5 komórek/ml.

Protokół barwienia obejmował dodanie 100 μ l zawiesiny komórek do 100 μ l odczynnika Muse Annexin V and Dead Cell Assay Kit i wymieszanie roztworu. Próbkę inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Odsetek komórek apoptotycznych analizowano metodą cytometrii przepływowej przy użyciu systemu Muse Cell Analyzer (Millipore) i wyrażono jako udział procentowy komórek apoptotycznych. Jako kontrolę negatywną użyto czystego podłoża z dodatkiem surowicy FBS. Jako kontrolę pozytywną zastosowano pożywkę z dodatkiem paklitakselu w stężeniu 100 nmol. Test ten pozwala na rozróżnienie czterech populacji komórek: nieapoptotycznych (żywych) o fenotypie aneksyna V (–) i 7-AAD (–), wczesnoapoptotycznych o fenotypie aneksyna V (+) i 7-AAD (–), późnoapoptotycznych i martwych o fenotypie aneksyna V (+) i 7-AAD (+) oraz nekrotycznych o fenotypie aneksyna V (–) i 7-AAD (+).

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono w programie STATISTICA StatSoft Version 10. Do oceny różnic pomiędzy średnimi dla zmiennych powiązanych (tkanka nowotworowa i prawidłowa) wykorzystano test t dla prób zależnych. W celu sprawdzenia istotności pomiędzy średnimi, w poszczególnych grupach pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej, przeprowadzono analizę wariancji (jednoczynnikowa ANOVA) oraz test post-hoc (test Tukeya). Analizę związku korelacyjnego pomiędzy zmiennymi ilościowymi wykonano za pomocą współczynnika korelacji liniowej Pearsona. Analizę zmiennych wyróżniających poszczególne grupy badanych przeprowadzono z wykorzystaniem analizy dyskryminacyjnej. Istotność statystyczną ustalono na poziomie $p < 0,05$.

ROZDZIAŁ 12

WYNIKI

Analiza stopnia metylacji wybranych genów

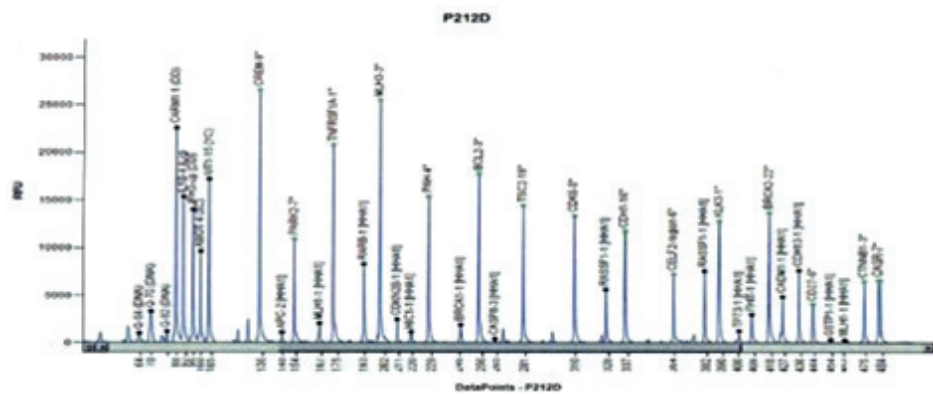
W analizie stopnia metylacji posłużono się programem firmy MRC-Holland. Procent metylacji analizowanych genów szacowano, porównując pliki uzyskane w elektroforegramie dla próbki metylowanej i odpowiadającej jej nietrawionej próbki.

$$\% \text{ metylacji} = \text{IR próbka trawiona} / \text{IR próbka nietrawiona} \times 100\%$$

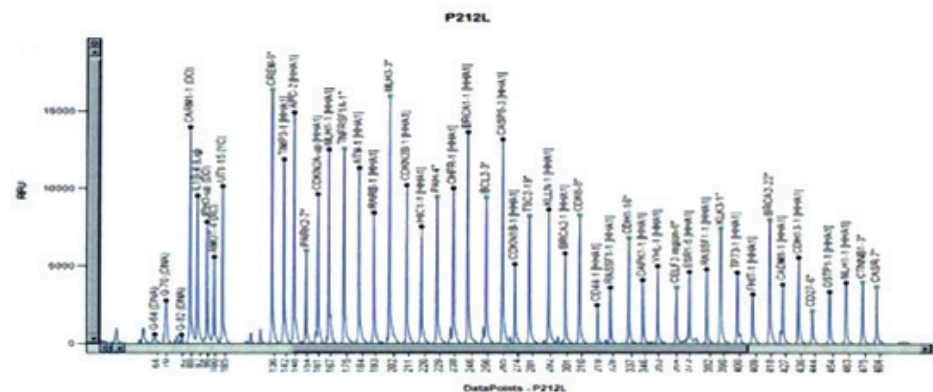
Współczynnik IR (International Normalized Ratio) otrzymany przez podział intensywności sygnału próbki przez wartość sygnału próby referencyjnej. Procent metylacji w tkance nowotworowej badanych genów uzyskano przez odjęcie wartości dla części tkanki nieobjętej procesem nowotworowym od tej, w której nie obserwowano zmian nowotworowych. Podobnego wyliczenia dokonano dla pacjentów z leukoplakią.

Jedną z bardzo wczesnych i powszechnych zmian w nowotworach głowy i szyi jest delecja rejonu 9p21 chromosomu, na którym zlokalizowane są geny CDKN2B i CDKN2A. Na podstawie analizy CNV badanych próbek, poddanych tylko ligacji, zaobserwowano delecję homozygotyczną tego właśnie fragmentu chromosomu (ryc. 12, 13). W analizie statystycznej nie brano ich pod uwagę [84, 85].

a)

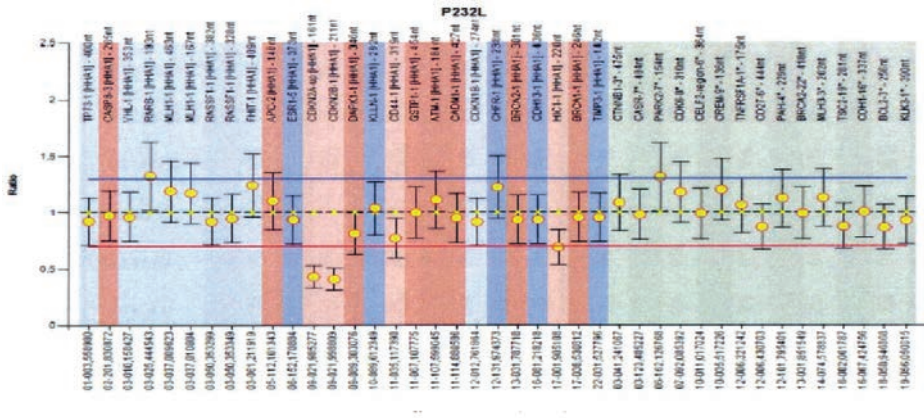


b)

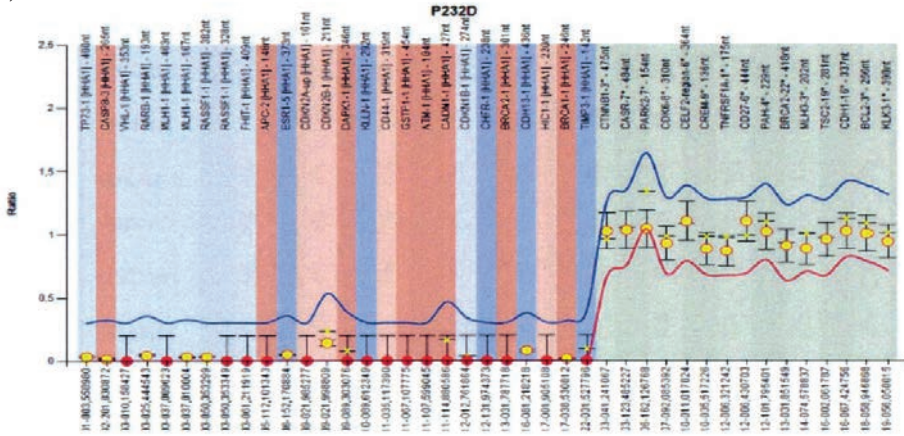


Rycina 12. Przykładowy rozdział próbki pacjenta otrzymany na sekwencjonatorze z wykorzystaniem oprogramowania Coffanalyser.Net. (a) Rozdział próbki po ligacji i trawieniu; (b) Rozdział próbki tylko po ligacji. Kropki zielone odpowiadają CNV analizie, czarne metylacji badanych fragmentów genów

a)



b)



Rycina 13. Przykładowa graficzna prezentacja rozdziału: (a) Fragment z delecją heterozygotyczną genów CDKN2A i 2B po ligacji; (b) Ten sam fragment po ligacji, a następnie trawieniu

Stopień metylacji analizowanych genów przedstawiono w tab. 10. Za zmetylowany gen przyjęto wartość % metylacji równą lub wyższą od 15%. Wartość odciętą wybrano zgodnie z literaturą [86]. Wybranymi do analiz genami były: CDKN2B, ATM, TIMP3, APC, CDKN2A, MLH1, RARB, CHFR, *DLGAP1*, C2orf40, GPX3, CDKN1B, EPB41L3, TP73, CDH13, *WIF1*.

Tabela 10. Analiza stopnia metylacji u pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej i leukoplakią wyrażona w % (wartości dodatnie dotyczą hypermetylacji względem tkanki nieobjętej procesem nowotworowym, ujemne hypometylacji)
a) Pacjenci z nowotworem płaskonabłonkowym jamy ustnej

Lp.	CDKN2B	ATM	TIMP3	APC	CDKN2A	MLH1	RARB	CHFR	DLGAP1	C2orf40	GPX3	CDKN1B	EPB41L3	TP73	CDH13	WIF1
1	7	0	0	13	0	13	5	5	-10	9	9	0	7	0	0	7
2	18	0	0	7	0	0	12	9	-7	14	6	15	0	0	0	10
3	30	0	4	12	0	16	6	4	-8	11	16	0	9	5	0	37
4	8	0	3	8	0	11	10	0	-3	0	0	3	6	0	13	9
5	22	0	0	7	0	18	6	0	-11	9	11	0	8	9	3	7
6	45	0	5	30	14	0	13	0	-32	0	21	5	7	0	36	31
7	31	0	0	0	0	29	4	0	-9	10	15	0	12	0	4	20
8	9	0	7	3	0	4	7	15	-7	8	7	0	13	8	7	5
9	32	0	9	16	0	20	21	0	-11	0	15	3	9	3	5	13
10	40	0	0	9	0	37	16	0	-28	14	19	0	13	9	9	11
11	69	0	4	19	0	26	12	0	-47	36	33	0	22	3	35	26
12	9	0	0	6	0	7	3	0	-7	9	7	3	3	8	7	13
13	22	11	1	9	0	9	12	0	-13	11	11	3	7	4	6	12
14	25	0	1	8	7	21	4	5	-14	6	13	2	5	3	5	20
15	21	0	0	19	0	2	6	0	-11	0	10	0	7	8	11	7
16	35	0	5	0	0	12	12	0	-23	11	13	0	10	7	9	14
17	42	0	4	23	0	4	14	0	-30	0	25	3	14	3	13	30
18	16	0	0	9	5	9	6	0	-5	5	7	4	6	2	5	7
19	28	0	2	14	0	18	8	0	-14	13	14	2	9	2	7	9
20	45	0	0	14	0	3	12	0	-13	18	21	0	14	3	32	7
21	27	0	4	25	0	4	8	0	-16	8	12	4	9	9	5	31
22	59	0	0	0	0	26	29	0	-41	22	29	5	34	1	8	22
23	41	0	0	17	0	15	10	0	-9	17	21	0	12	8	13	39

24	37	0	6	0	2	11	19	0	-25	14	17	1	8	6	4	26
25	25	0	0	8	0	18	10	0	-13	11	12	4	10	5	9	10
26	36	0	0	5	0	7	10	0	-24	0	14	9	14	9	13	19
27	41	0	3	4	0	18	12	6	-32	19	20	0	9	2	27	13
28	16	0	0	9	0	2	2	0	-5	7	8	13	7	0	11	7
29	24	0	0	13	0	7	4	0	-13	12	11	9	6	8	13	9
30	8	0	4	9	0	19	5	0	-15	6	24	11	11	12	10	7
31	33	0	0	17	0	10	14	0	-22	14	14	13	8	6	29	20
31	27	0	0	0	0	4	12	8	-6	12	12	6	13	2	14	6
32	13	0	0	25	0	0	6	0	-4	0	0	6	4	0	7	11
33	44	0	6	21	0	11	24	0	-32	19	20	11	13	13	14	21
34	39	0	0	15	0	17	13	2	-27	8	14	9	14	7	8	8
35	38	0	0	28	5	8	36	0	-27	7	23	8	12	6	14	24
36	51	0	7	30	0	4	27	0	-42	23	19	9	24	27	9	43
37	42	0	0	11	0	6	9	0	-29	20	20	5	14	9	13	37
38	32	0	0	4	0	9	14	0	-21	0	14	13	9	3	13	31
39	18	0	5	23	0	3	6	0	-16	5	7	8	10	0	10	14
40	15	0	0	6	0	5	8	3	-6	6	6	6	14	0	8	11
41	39	0	0	35	0	10	14	0	-27	18	17	7	7	8	14	9
42	46	0	7	8	0	14	21	0	-35	22	22	10	14	15	9	37
43	40	0	0	29	0	17	19	0	-29	19	19	12	9	9	13	29
44	33	0	0	3	0	14	12	0	-21	13	17	19	13	5	5	25
45	29	0	9	39	0	6	13	0	-18	15	22	14	6	3	9	13
46	25	0	0	0	0	2	11	0	-14	11	12	11	4	1	13	23
47	30	0	0	9	0	15	13	0	-21	13	14	9	8	3	14	31
48	33	0	0	24	0	5	13	0	-25	14	17	14	14	4	14	8
49	16	0	3	18	0	0	6	0	-8	9	6	8	9	0	6	11
50	27	0	3	27	0	3	12	0	-14	14	10	11	8	3	13	9
51	23	0	0	11	0	2	10	0	-11	12	11	13	8	1	9	20
52	15	0	2	16	0	0	5	0	-6	7	8	14	2	0	6	7
53	7	0	0	4	0	2	13	0	-9	14	13	9	9	0	14	29
54	29	0	0	5	0	3	14	0	-8	13	14	13	3	1	8	11
55	20	0	1	9	0	0	8	6	-9	9	8	6	14	0	9	9
56	33	0	1	3	0	16	12	0	-11	6	15	7	0	2	11	8
57	25	0	0	9	0	2	12	0	-14	11	13	11	4	0	13	14

Tabela 10a (cd.)

Lp.	CDKN2B	ATM	TIMP3	APC	CDKN2A	MLH1	RARB	CHFR	DLGAP1	C2orf40	GPX3	CDKN1B	EPB41L3	TP73	CDH13	WIFI
58	10	8	0	0	0	0	4	0	-2	3	4	8	3	0	4	9
59	44	0	5	18	0	13	19	0	-31	19	14	9	14	13	14	40
60	49	0	0	7	0	15	23	0	-36	21	22	8	17	14	8	39
61	34	0	6	3	0	9	14	0	-26	15	16	9	11	3	14	38
62	29	0	0	13	0	6	9	0	-7	12	14	7	8	6	6	14
63	18	0	0	0	0	0	7	0	-6	7	7	4	0	0	9	36
64	47	0	8	11	0	15	13	0	-4	23	22	13	19	14	7	32
65	19	0	0	19	0	3	9	0	-10	8	8	7	1	0	10	13
66	66	0	18	0	3	35	29	15	-51	31	28	12	15	24	18	51
67	33	0	0	7	0	22	14	0	-24	14	17	9	4	2	13	24
68	26	0	5	10	0	10	11	0	0	12	13	4	7	0	10	13
69	30	0	0	12	0	11	13	0	-8	14	14	14	9	2	14	11
70	32	0	3	19	0	13	12	0	-14	7	12	13	10	4	11	26
71	23	0	8	14	0	4	10	0	-12	11	21	12	3	0	12	43
72	49	0	11	25	0	18	22	0	-13	23	13	6	13	11	14	39
73	27	0	2	16	0	3	14	0	-8	12	10	9	5	0	10	21
74	15	0	2	8	0	0	5	0	-6	7	9	3	0	0	6	11
75	19	0	0	9	0	1	9	0	-8	8	8	5	2	0	7	14
76	44	0	0	13	0	13	14	0	-32	20	22	13	13	13	9	38
77	63	0	21	19	0	24	19	0	-50	9	30	14	29	29	11	52
78	27	0	4	7	0	6	8	0	-14	13	19	9	4	1	14	12
79	39	0	8	6	0	22	13	0	-31	14	18	14	14	5	13	24
80	31	0	0	7	0	12	14	0	-13	11	14	10	7	2	12	23
81	29	0	4	19	0	10	14	0	-6	13	11	8	6	0	9	19
82	51	0	0	3	2	29	24	0	-40	23	29	11	23	18	24	46
83	40	0	6	7	0	17	7	0	-29	14	20	13	14	9	12	55
84	33	0	6	5	0	19	14	3	-11	20	19	9	11	1	12	21
85	8	0	0	4	0	3	13	0	-9	5	11	6	9	2	5	7
86	8	0	7	6	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	10
87	20	0	8	8	0	2	9	0	-9	9	6	5	5	0	8	14

88	22	0	0	14	0	15	11	2	-13	11	9	6	14	1	14	11
89	41	5	15	0	0	13	9	0	-29	9	23	14	13	13	14	14
90	7	0	4	4	4	3	13	0	-6	12	13	6	12	2	6	30
91	18	0	3	7	2	5	10	0	-9	10	8	4	9	13	6	11
92	29	0	5	21	0	18	11	0	-7	14	12	10	13	8	14	14
93	33	0	0	5	0	0	13	0	-12	14	16	11	7	11	13	24
94	15	6	0	8	0	17	8	0	-3	5	0	2	8	10	5	7
95	22	0	2	33	0	8	13	0	-11	12	10	5	14	9	14	11
96	47	0	0	11	0	23	22	0	-38	17	21	14	9	13	14	43
97	73	0	0	6	0	32	28	0	-49	32	37	12	5	14	41	67
98	25	0	3	0	0	7	14	5	-13	9	12	5	10	7	6	21
99	28	0	0	11	0	10	11	0	-7	11	14	6	13	8	14	6
100	33	0	0	6	0	14	14	0	-10	14	15	11	12	13	13	13
101	0	0	4	9	0	13	0	0	-5	0	0	0	1	0	4	7
102	25	0	0	12	0	0	14	0	-6	8	12	4	13	11	11	6
103	34	0	6	13	0	9	10	0	-11	11	13	11	12	14	9	8
104	8	0	0	8	4	4	2	0	-3	4	0	0	2	0	13	11
105	24	0	0	0	0	2	5	0	-13	5	11	6	9	5	14	13
106	17	0	0	12	0	5	6	0	-6	6	9	2	12	3	9	12
107	27	0	7	13	0	9	13	7	-8	12	14	9	14	8	6	14
108	31	0	0	19	0	1	14	0	-13	10	15	10	7	4	8	26
109	25	0	0	8	0	0	13	0	-14	13	11	6	12	3	11	22
110	30	0	4	6	0	3	13	0	-11	14	14	11	11	2	14	26
111	37	0	4	8	0	15	8	0	-25	12	18	6	10	3	10	10
112	43	0	0	23	0	16	11	0	-34	23	21	14	13	9	6	7
113	8	6	0	0	0	3	0	0	-3	2	0	0	11	0	4	9
114	40	0	3	29	0	11	14	0	-8	20	16	8	12	7	14	30
115	48	0	15	9	3	19	18	0	-36	23	27	13	14	12	9	34
116	35	0	0	7	0	15	7	0	-23	11	17	6	9	2	14	29
117	8	0	0	5	0	6	4	5	-6	5	12	6	12	5	4	4
118	37	0	3	12	0	2	8	0	-8	12	20	14	14	1	6	32
119	51	0	0	30	0	9	24	0	-39	26	24	13	21	9	32	43
120	8	0	1	9	1	5	9	0	-6	9	7	12	4	4	7	7

b) Pacjenci z leukoplakią

Lp.	CDKN2B	ATM	TIMP3	APC	CDKN2A	MLH1	RARB	CHFR	DLGAP1	C2orf40	GPX3	CDKN1B	EPB41L3	TP73	CDH13	WIF1
1	0	0	0	0	0	1	3	0	1	2	1	0	0	0	2	4
2	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	3	0	0	2	2	0	1	2	2	2	5
4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	4	5
5	3	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	0	1	3	0	2	4
7	6	0	1	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
8	9	0	1	0	0	0	0	0	2	0	2	3	0	0	2	8
9	0	1	0	0	0	0	5	0	3	2	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
11	4	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8
12	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0
13	9	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	1	0	0
14	0	0	0	0	0	1	0	0	4	4	3	1	2	0	1	3
15	4	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
16	0	0	0	0	0	3	2	0	0	4	0	0	0	2	0	3
17	6	0	0	0	0	0	4	0	2	0	0	0	0	0	1	0
18	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1	2
19	8	1	0	0	0	0	7	0	2	1	0	0	0	0	3	2
20	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2	0	1	1	1

Genami najczęściej ulegającymi metylacji w badanej grupie były: *WIF1* (46,6%), *GPx* (41,6%). Najrzadziej: *CHFR* (1,6%), *CDK1B* (1,6%). W przypadku genu *DLGAP1* zaobserwowano obniżenie metylacji w stosunku do tkanki prawidłowej (–35,8%) – hypometylację. U pacjentów z leukoplakią procent metylacji analizowanych genów pozostawał na niskim poziomie (poniżej 10%).

Porównanie stopnia metylacji analizowanych genów z klinicznym zaawansowaniem choroby. Klasyfikacja TNM

Testu Chi2 Pearsona użyto do porównania stopnia metylacji badanych antyjonkogenów: ATM, TIMP3, APC, MLH1, RARB, CHFR, *DLGAP1*, *C2orf40*, GPX3, CDKN1B, EPB41L3, TP73, CDH13, *WIF1* ze stopniem klinicznej klasyfikacji Ta, T1, T2. W analizie statystycznej przyjęto wartość p – prawdopodobieństwa za istotną statystycznie jeżeli wynosiła poniżej 0,05.

Tabela 11. Stopień metylacji analizowanych genów pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej według klasyfikacji TNM

Gen	Ta (liczba pacjentów)	T1 (liczba pacjentów)	T2 (liczba pacjentów)	Wartość p
<i>TIMP3</i>	0	0	0	0,33
<i>ATM</i>	0	0	0	–
<i>APC</i>	8	11	13	0,63
<i>MLH1</i>	7	16	13	0,48
<i>RARβ</i>	3	6	9	0,99
<i>CHFR</i>	2	0	0	0,41
<i>DLGAP1</i>	1	11	31	0,03
<i>C2f40</i>	4	14	9	0,36
<i>GPX</i>	3	16	31	0,07
<i>CDK1B</i>	2	0	0	0,41
<i>EPB</i>	0	3	5	0,55
<i>TP73</i>	1	3	0	0,61
<i>CDH13</i>	0	0	9	0,11
<i>WIF1</i>	5	16	35	0,2

Analiza statystyczna wykazała istotnie statystyczną korelację stopnia metylacji badanych genów z klinicznym stopniem zaawansowania choroby TNM tylko w przypadku genu *DLGAP1* (tab. 11).

Porównanie stopnia metylacji analizowanych genów ze stopniem złośliwości nowotworu G

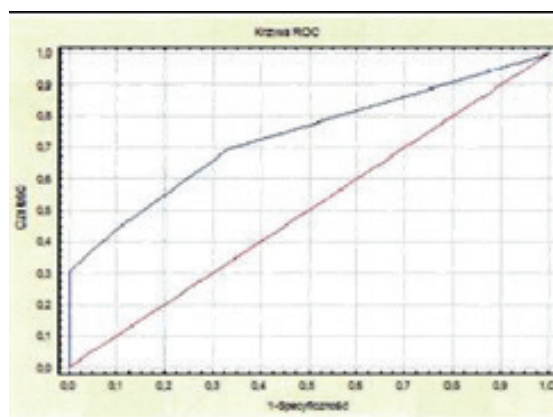
Testu Chi2 Pearsona użyto do porównania stopnia metylacji badanych anty-onkogenów: ATM, TIMP3, APC, MLH1, RARB, CHFR, *DLGAP1*, C2orf40, GPX3, CDKN1B, EPB41L3, TP73, CDH13, *WIF1* ze stopniem złośliwości nowotworu według klasyfikacji G. Grupę badaną stanowili pacjenci z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej o stopniu złośliwości nowotworu G1 (rak wysokozróżnicowany – niski stopień złośliwości), G2 (rak średnierzóżnicowany – pośredni stopień złośliwości). W analizie statystycznej przyjęto wartość p – prawdopodobieństwa za istotną statystycznie jeżeli wynosiła poniżej 0,05.

Tabela 12. Stopień metylacji analizowanych genów pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej według klasyfikacji G

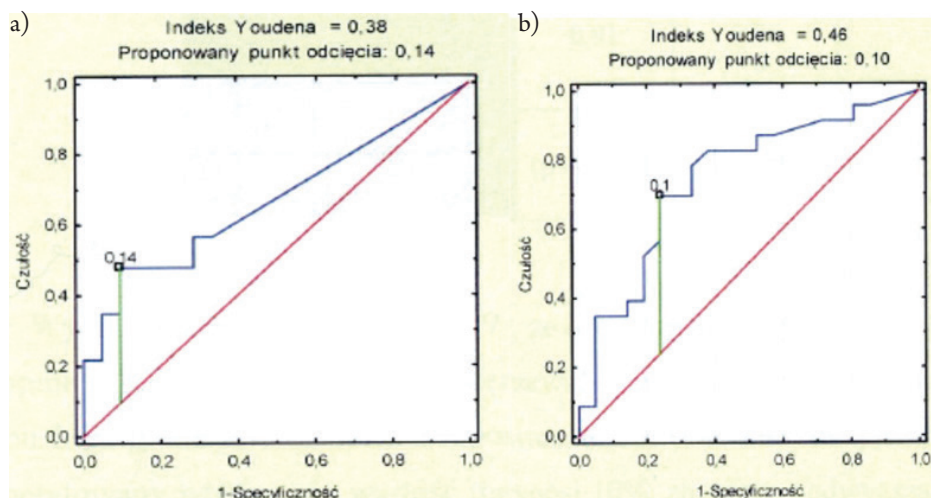
Gen	Częstość %	G1 (liczba pacjentów)	G2 (liczba pacjentów)	Wartość p
TIMP3	3,33	0	4	0,95
ATM	0	0	0	–
APC	26	22	10	0,06
MLH1	30	18	18	0,84
RAR β	15	12	6	0,32
CHFR	16	2	0	0,96
<i>DLGAP1</i>	35,8	8	35	0,01
C2f40	22,9	10	17	0,84
GPX	41,6	13	27	0,17
CDK1B	1,6	2	0	0,96
EPB 41L3	6,6	0	8	0,51
TP73	3,33	2	2	0,51
CDH13	7,5	0	9	0,51
<i>WIF1</i>	46,6	15	41	0,03

Analizowane geny wykazywały zróżnicowany stopień metylacji, jeżeli chodzi o stopień złośliwości nowotworu. Wyższą częstość metylacji dla stopnia złośliwości nowotworu G1 względem G2 wykazywały geny: RAR β , APC, CHFR, przeciwną częstość geny: TIMP3, *DLGAP1*, C2orf40, GPX3, CDKN1B, EPB41L3, CDH13, *WIF1*. Tylko 2 geny *DLGAP1* ($p = 0,01$) i *WIF1* ($p = 0,03$) wykazywały istotnie statystycznie różnice w stopniu metylacji, porównując złośliwość badanych nowotworów w skali G1, G2 – niższą w G1, wyższą w G2 (gen *WIF1*), obniżoną bardziej u pacjentów z G2 w porównaniu z G1.

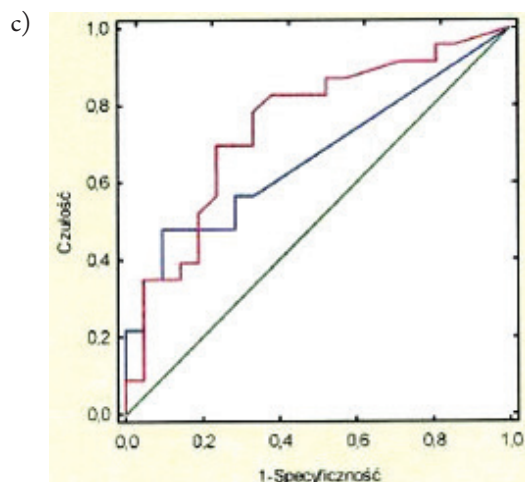
Dalszą analizę przeprowadzono dla wybranych genów *DLGAP1* i *WIF1*. Przydatność przeprowadzonych oznaczeń stopnia metylacji genów: *DLGAP1* i *WIF1* w ocenie stopnia złośliwości guza G1, G2, wykonano w oparciu o model regresji logistycznej, wykorzystując jako zmienne objaśniające metylacje w analizowanych genach, następnie wykonano krzywe ROC (ryc. 14, 15). Analiza ilorazu szans wykazała, że prawdopodobieństwo wystąpienia stopnia G2 złośliwości guza jest ponad 6,5-krotnie wyższe w przypadku genu *DLGAP1*, 4-krotnie w przypadku genu *WIF1*.



Rycina 14. Przykładowa krzywa określająca przydatność analizy stopnia metylacji genów *DLGAP1* i *WIF1*



Rycina 15. Określenie przydatności oznaczenia stopnia metylacji badanych genów *DLGAP1* i *WIF1* (ROC) w ocenie stopnia złośliwości nowotworu: (a) gen *DLGAP1*; (b) gen *WIF1*; (c) oba analizowane geny. Zielony kolor na wykresie oznacza punkt odcięcia



Rycina 15 (cd.)

Na podstawie oznaczonych parametrów czułości, specyficzności (przy punkcie odcięcia 15%), w oparciu o rozszerzone badania na zdecydowanie większej populacji uzupełnionej o pacjentów ze stopniem złośliwości G1 i G2, można wnioskować, że ocena metylacji (hiper, hypometylacji) analizowanych genów może być potencjalnie przydatna w ocenie stopnia złośliwości (tab. 11).

Tabela 13. Ocena stopnia metylacji genów *DLGAP1*, *WIF1* jako markerów pozwalających na rozpoznanie stopnia złośliwości nowotworu przy punkcie odcięcia 15%

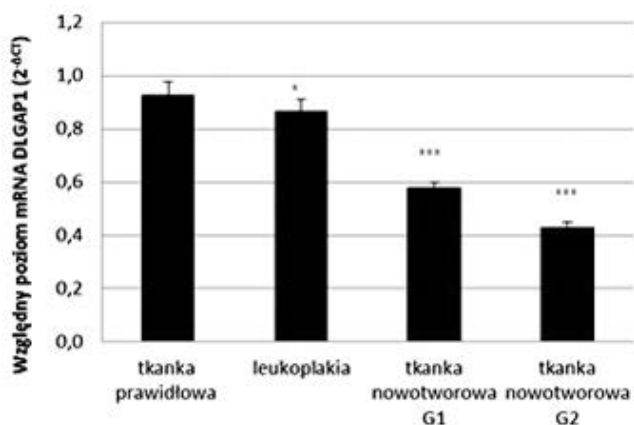
	Gen <i>DLGAP1</i>	Gen <i>WIF1</i>
Czułość 15 % punkt odcięcia	0,43	0,56
Czułość punkt odcięcia proponowany	0,93	0,73
Specyficzność 15% punkt odcięcia	0,45	0,74
Specyficzność punkt odcięcia proponowany	0,95	0,71
AUC	0,64 (p = 0,0434)	0,70 (p = 0,0011)

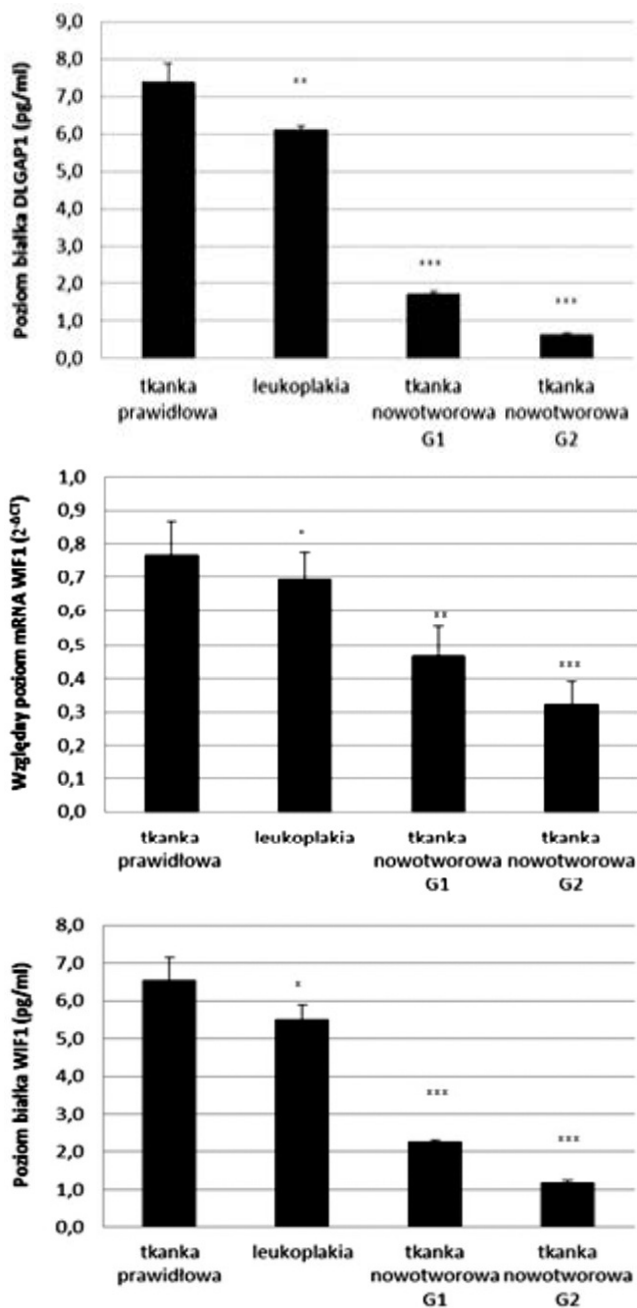
Analiza przedstawionych w tab. 13 wyników wskazuje, że zarówno gen *DLGAP1*, jak i *WIF1* mógłby potencjalnie służyć do odróżnienia stopnia złośliwości nowotworu G1, G2.

W dalszych analizach zmian molekularnych w genomie pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej skoncentrowano się na dwóch genach: *DLGAP1* (obniżonym stopniu metylacji) i *WIF1* (podwyższonym stopniu metylacji).

Analiza ekspresji genów *DLGAP1*, *WIF1* na poziomie mRNA białka u pacjentów z leukoplakią i płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej

W kolejnej części pracy postanowiono zanalizować ekspresję wybranych genów: *DLGAP1* i *WIF1* na poziomie transkrypcji, translacji genów, które w przedstawionych wcześniej badaniach ulegały metylacji w procesie nowotworowym. Ekspresję genów w tkance nowotworowej skorelowano ze stopniem złośliwości nowotworu G1, G2, jak również ze zmienioną przednowotworowo tkanką (leukoplakia). Kontrolę dla zmiany przednowotworowej, jak i nowotworowej stanowiła tkanka tego samego pacjenta nie wykazująca zmiany nowotworowej. Zaobserwowano wzrost ekspresji genu *DLGAP1* o 6,1% w komórkach pacjentów z leukoplakią, natomiast u chorych z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej o 37,6% (stopień złośliwości G1), 46,6% (stopień złośliwości G2) na poziomie mRNA i odpowiednio 17,3% u pacjentów z leukoplakią, 76,5% (stopień złośliwości G1), 91,3% (stopień złośliwości G2) na poziomie produktu translacji genu białka *DLGAP1*, w porównaniu do tkanek nie zmienionych nowotworowo. Analiza ekspresji genu *WIF1* wskazała na odwrotną korelację. Na poziomie transkrypcji ekspresja genu zmalała o 9,5% u pacjentów z leukoplakią, a u pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej odpowiednio: 39,4% (stopień złośliwości G1), 57,2% (stopień złośliwości G2) na poziomie translacji 16% (leukoplakia), 65,5% (G1), 81,9% (G2), w porównaniu z tkanką nie zmienioną nowotworowo (ryc. 16).





Rycina 16. Analiza ekspresji genów *WIF1* i *DLGAP1* na poziomie transkrypcji, translacji.

Różnice między średnimi dla tkanki prawidłowej w porównaniu z tkanką zmienioną oszacowano testem t dla prób zależnych, a istotność statystyczną oznaczono jako * ($p < 0,05$), ** $p < (0,01)$ *** ($p < 0,001$)

Analiza polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w badanych genach *DLGAP1* i *WIF1* pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej i leukoplakią

W wytypowanych genach *DLGAP1* i *WIF1* podjęto próbę analizy znanych z literatury miejsc polimorficznych sekwencji nukleotydowej i ich potencjalnej korelacji z ekspresją genu. W genie *DLGAP1* poddano analizie trzy polimorfizmy SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu): rs1081062, rs20491161, rs1694605, w genie *WIF1*: rs34203757, rs34505206, rs56900803. Grupę kontrolną stanowiły komórki jednojądrzaste krwi, izolowane od 100 zdrowych ochotników bez zmian przednowotworowych i nowotworowych.

Wyniki analizy przedstawiono w tab. 14.

Tabela 14. Rozdział genotypów i alleli analizowanych polimorfizmów genów *DLGAP1* i *WIF1* Polimorfizm rs1081062 gen *DLGAP1*

Genotyp/allel	Kontrola %	Zmiana nowotworowa %	Leukoplakia %	p ^x
TT	11	52,6	36,6	0,521
CT	10,8	54,0	35,2	0,287
CC	7,1	54,6	38,3	0,528

$\chi^2 = 1,350$, $p = 506$ p^x – porównanie z kontrolą

Stężenie białka

Genotyp/allel	Tkanka bez zmiany	Zmiana nowotworowa	Leukoplakia
TT	7,25 ± 0,06	1,57 ± 0,2	6,01 ± 0,05
CT	7,18 ± 0,05	1,28 ± 0,3	6,19 ± 0,04
CC	7,39 ± 0,05	1,07 ± 0,3	6,07 ± 0,04

Polimorfizm rs20491161 gen *DLGAP1*

Genotyp/allel	Kontrola %	Zmiana nowotworowa %	Leukoplakia %	p ^x
GG	44,9	31,6	23,5	0,256
GT	51,3	24,9	23,8	0,208
TT	47,8	30,5	21,7	0,873

$\chi^2 = 1,602$, $p = 0,442$

Tabela 14 (cd.)

Stężenie białka

Genotyp/allel	Tkanka bez zmiany	Zmiana nowotworowa	Leukoplakia
GG	7,37 ±0,32	0,831 ±0,21	6,12 ±0,06
GT	7,20 ±0,41	1,52 ±0,28	6,07 ±0,05
TT	7,32 ±0,29	0,961 ±0,25	6,17 ±0,07

Polimorfizm rs16946051 gen *DLGAP1*

Genotyp/allel	Kontrola %	Zmiana nowotworowa %	Leukoplakia %	p ^x
AA	43,6	33,3	23,1	0,441
AG	49,8	32,1	24,1	0,305
GG	45,7	31,0	23,3	0,633

$$\chi^2 = 1,056, p = 0,588$$

Stężenie białka

Genotyp/allel	Tkanka bez zmiany	Zmiana nowotworowa	Leukoplakia
AA	7,19 ±0,34	0,707 ±0,102	6,19 ±0,04
AG	7,24 ±0,4	1,64 ±0,15	6,16 ±0,03
GG	7,33 ±0,44	0,958 ±0,097	6,24 ±0,06

Polimorfizm rs34203757 gen *WIFI*

Genotyp/allel	Kontrola %	Zmiana nowotworowa %	Leukoplakia %	p ^x
AA	3,39	27,8	68,3	0,089
AG	4,15	28,4	67,4	0,097
GG	3,6	28,1	68,3	0,854

$$\chi^2 = 2,931, p = 0,231$$

Stężenie białka

Genotyp/allel	Tkanka bez zmiany	Zmiana nowotworowa	Leukoplakia
CC	6,43 ±0,1	1,23 ±0,6	5,37 ±0,17
CG	6,52 ±0,09	1,51 ±0,6	5,12 ±0,21
GG	6,22 ±0,025	1,47 ±0,5	5,35 ±0,16

Polimorfizm rs34505206 gen *WIF1*

Genotyp/allel	Kontrola %	Zmiana nowotworowa %	Leukoplakia %	p ^x
CC	3,61	25,19	71,2	0,317
CG	4,38	27,82	67,8	0,171
GG	4,09	27,41	68,5	0,547

$$\chi^2 = 1,958, p = 0,371$$

Stężenie białka

Genotyp/allel	Tkanka bez zmiany	Zmiana nowotworowa	Leukoplakia
CC	6,28 ±0,11	1,2 ±0,51	5,49 ±0,06
CG	6,17 ±0,24	2,1 ±0,23	5,51 ±0,04
GG	6,54 ±0,06	1,9 ±0,07	5,55 ±0,04

Polimorfizm rs56900803 gen *WIF1*

Genotyp/allel	Kontrola %	Zmiana nowotworowa %	Leukoplakia %	p ^x
GG	1,13	22,46	76,41	0,953
GT	1,92	20,12	77,96	0,708
TT	1,52	21,66	76,82	0,411

$$\chi^2 = 0,821, p = 0,659$$

Tabela 14 (cd.)
Stężenie białka

Genotyp/allel	Kontrola	Zmiana nowotworowa	Leukoplakia
GG	6,34 ±0,13	1,6 ±0,6	5,38 ±0,21
GT	6,58 ±0,1	1,8 ±0,4	5,47 ±0,09
TT	6,47 ±0,11	1,5 ±0,4	5,41 ±0,16

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotności statystycznej częstości występowania określonych genotypów, alleli w analizowanych polimorfizmach SNP genu *DLGAP1*, *WIF1*, w tkance prawidłowej w porównaniu z leukoplakią czy tkanką zmienioną nowotworowo. Nie wykazano korelacji pomiędzy określonymi allelami genu a stężeniem białka zarówno w tkance nowotworowej, leukoplakii, jak i tkance prawidłowej.

Analiza ekspresji miRNA w tkance zmienionej nowotworowo i prawidłowej pacjentów z nowotworami jamy ustnej

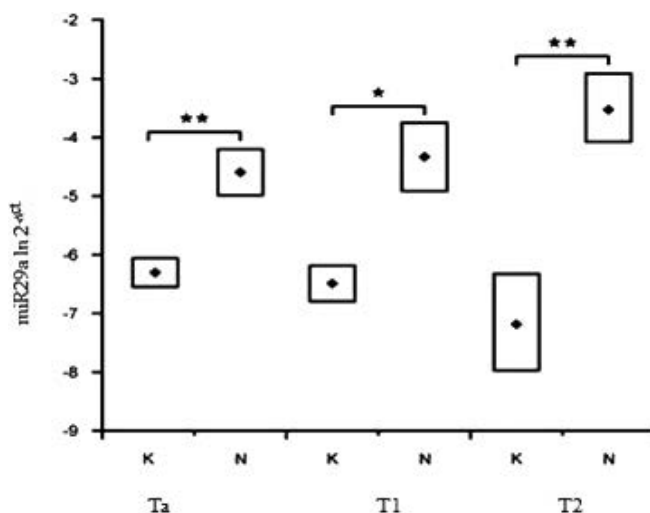
Wstępna analiza względnej ekspresji 700 miRNA przeprowadzona na małej grupie pacjentów (7%) wykazała istotne różnice pomiędzy tkanką prawidłową a zmienioną nowotworowo. Około 10–20% analizowanych miRNA różniło się ekspresją w obu typach tkanek. Wzrost ekspresji w tkance nowotworowej wykazywały między innymi miRNA: 29a, 21, 30d, 7d, 375, 345, 181b, 146a, 649, 518b, 191, 155, 19a, 31, obniżony poziom: 125b, 30a, 106a, 92, 145, 20, 143 (tab. 15).

Tabela 15. Analiza ekspresji miRNA w tkance zmienionej nowotworowo i prawidłowej, przedstawiona jako wartości $\ln 2 \cdot \Delta Ct$

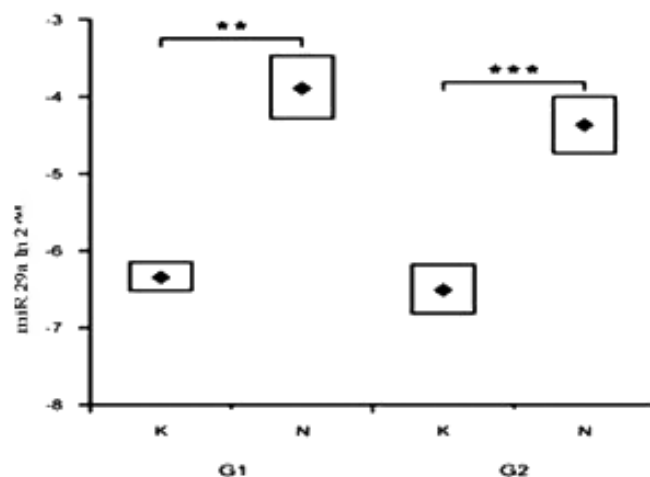
Gen	Tkanka nowotworowa		Tkanka prawidłowa		Istotność statystyczna
	Średni poziom ekspresji	Błąd standardowy	Średni poziom ekspresji	Błąd standardowy	
1	2	3	4	5	6
miR-29a	-4,078	1,37	-6,435	1,05	p < 0,001
miR-21	-0,697	1,45	-2,000	1,66	p < 0,001
miR-30d	-6,123	1,73	-7,410	1,67	p < 0,001

1	2	3	4	5	6
miR-7d	-7,548	1,77	-8,082	1,30	p = 0,082
miR-375	-4,195	2,34	-4,538	2,16	p = 0,158
miR-345	-6,173	2,28	-6,254	1,97	p = 0,640
miR-181b	-6,812	2,44	-7,562	2,90	p = 0,166
miR-146a	-7,028	2,13	-7,850	2,15	p = 0,046
miR-649	-7,315	1,68	-7,440	1,39	p = 0,979
miR-518b	-7,630	1,59	-8,535	1,49	p = 0,017
miR-191	-7,291	1,50	-7,716	1,18	p = 0,397
miR-155	-8,426	2,91	-8,719	2,77	p = 0,182
miR-19a	-2,353	1,07	-2,590	1,09	p = 0,140
miR-31	-6,979	1,10	-7,131	0,81	p = 0,389
miR-30a	-2,106	2,14	0,098	1,54	p < 0,001
miR-125b	0,921	1,01	1,031	0,812	P = 153
miR-106a	1,398	2,36	3,226	1,44	p < 0,001
miR-92	-6,092	1,32	-4,732	1,48	p < 0,001
miR-145	1,241	0,943	1,471	0,093	P = 992
miR-20	-1,623	0,638	-0,747	1,051	p = 0,041
miR-143	-7,225	0,69	-7,152	0,58	p = 0,876

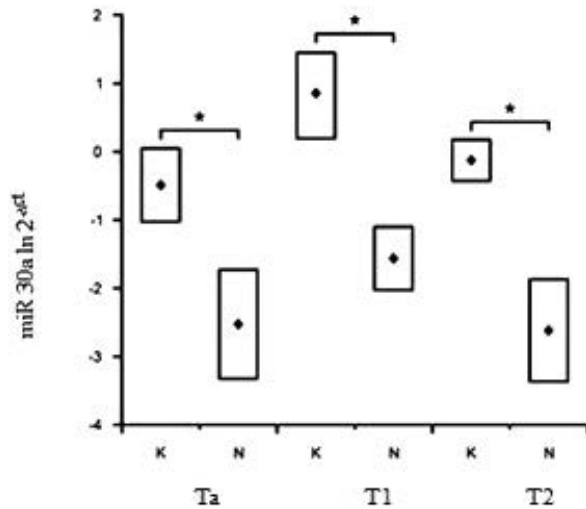
Spośród analizowanych ekspresji miRNA do dalszej analizy na pozostałych 100 próbkach wybrano sześć miRNA związanych z procesem nowotworzenia: miR-29a, miR-21, miR-30a, miR-106a, miR-92, miR-30d. Analizę ekspresji wyselekcjonowanych miRNA z uwzględnieniem klasyfikacji TNM i stopnia zróżnicowania guza przedstawiają ryc. 17–28.



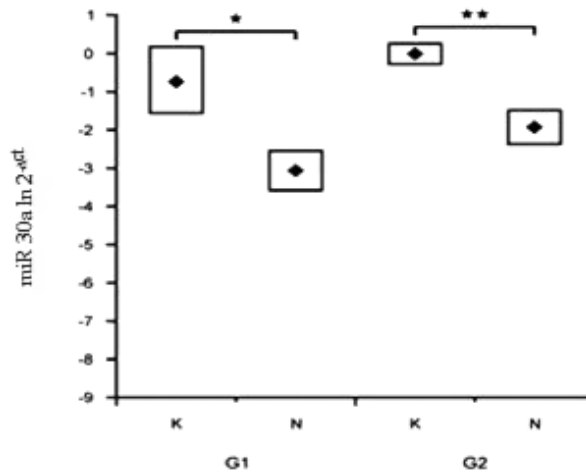
Rycina 17. Analiza ekspresji miR-29 w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stadia Ta, T1, T2 zgodnie z klasyfikacją TNM. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$)



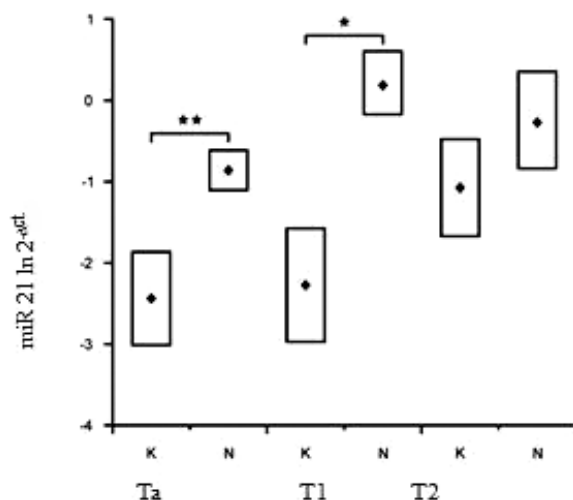
Rycina 18. Analiza ekspresji miR-29 w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stopień zróżnicowania tkanki guza. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)



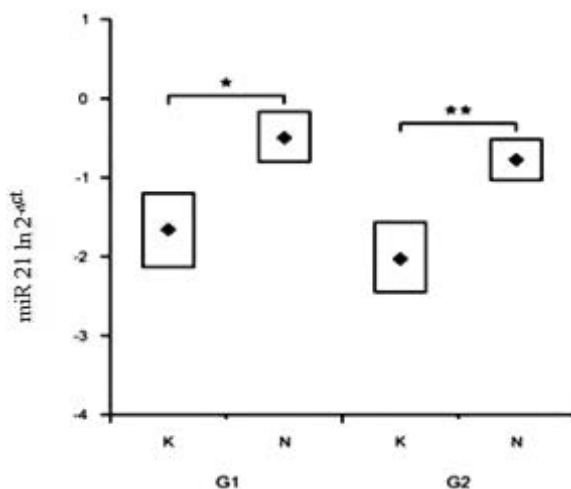
Rycina 19. Analiza ekspresji miR-30a w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stadia T₂, T₁, T₂ zgodnie z klasyfikacją TNM. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$)



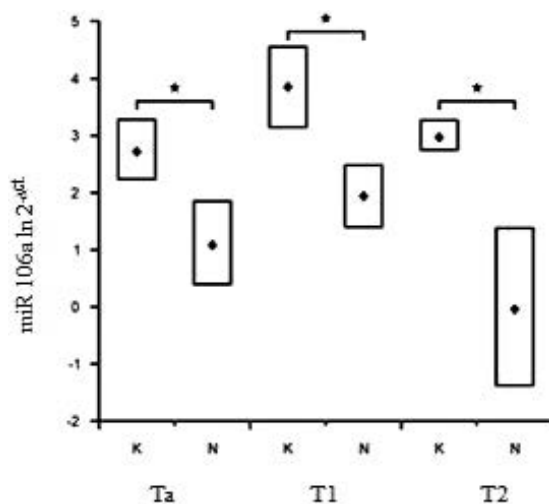
Rycina 20. Analiza ekspresji miR-30a w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stopień zróżnicowania tkanki guza. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$)



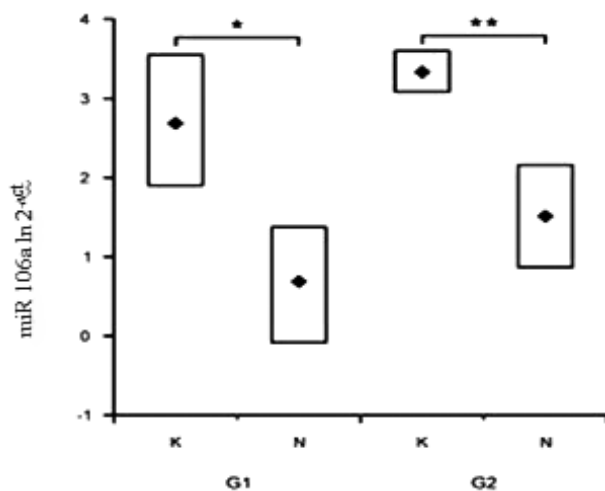
Rycina 21. Analiza ekspresji miR-21 w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stadia Ta, T1, T2 zgodnie z klasyfikacją TNM. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$)



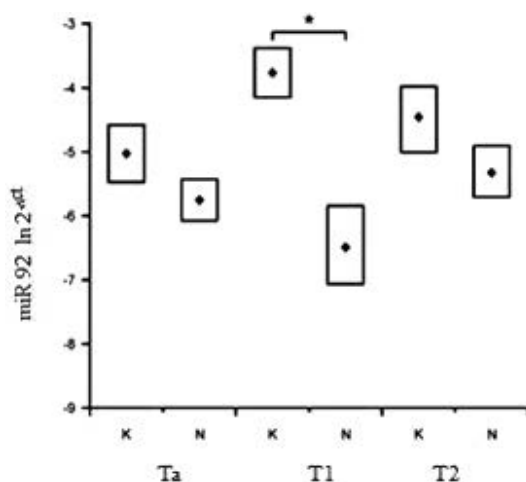
Rycina 22. Analiza ekspresji miR-21 w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stopień zróżnicowania tkanki guza. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$)



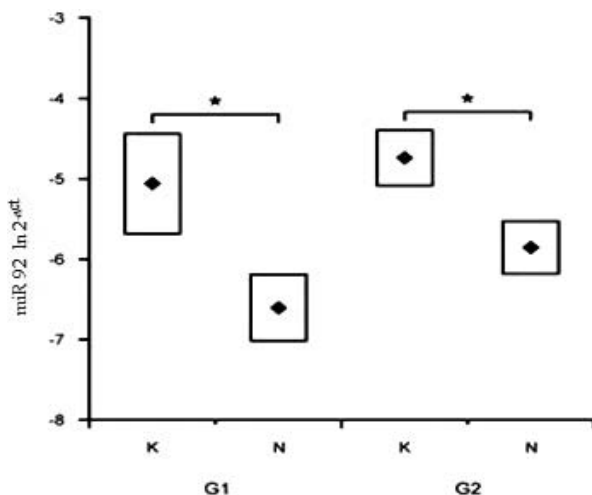
Rycina 23. Analiza ekspresji miR-106a w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stadia Ta, T1, T2 zgodnie z klasyfikacją TNM. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$)



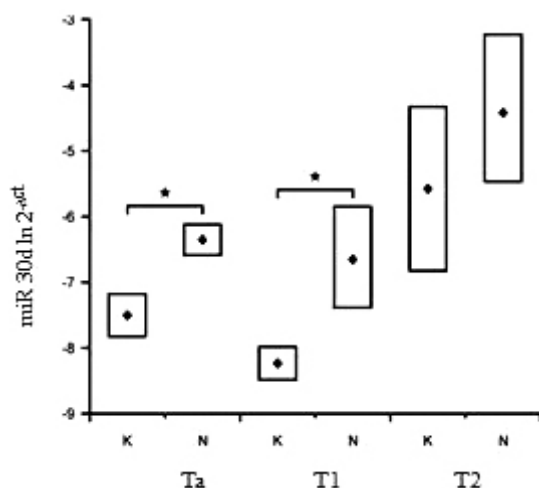
Rycina 24. Analiza ekspresji miR-106a w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stopień zróżnicowania tkanki guza. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$)



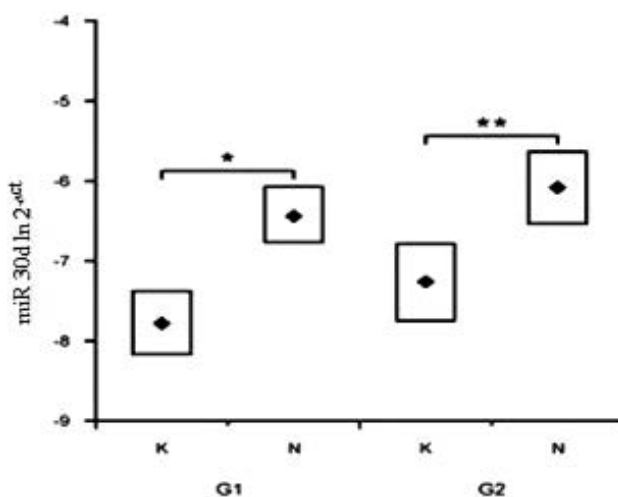
Rycina 25. Analiza ekspresji miR-92 w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stadia Ta, T1, T2 zgodnie z klasyfikacją TNM. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$)



Rycina 26. Analiza ekspresji miR-92 w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stopień zróżnicowania tkanki guza. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$)



Rycina 27. Analiza ekspresji miR-30d w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stadia Ta, T1, T2 zgodnie z klasyfikacją TNM. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$)



Rycina 28. Analiza ekspresji miR-30d w tkance zmienionej nowotworowo (N) i pochodzącej od tego samego pacjenta tkance bez zmiany (K) w podziale na stopień zróżnicowania tkanki guza. Przedstawione wyniki są średnią ($\pm$ błąd standardowy) ekspresji badanego miRNA ($\ln 2-\Delta Ct$) dla poszczególnych grup. Test t dla prób niezależnych wykorzystano do oceny różnic pomiędzy przedstawionymi średnimi, istotność statystyczną przedstawiono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$)

Przedstawiona analiza, przeprowadzona na większej grupie badawczej ekspresji wybranych miRNA, potwierdziła wcześniejsze obserwacje. Ekspresję badanych miRNA analizowano i próbowano skorelować ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej czy zróżnicowania guza. Uzyskane wyniki wykazują pozytywną korelację zmian w ekspresji (spadek czy wzrost) badanych miRNA ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej czy zróżnicowania guza. W tab. 16a i 16b przedstawiono % przypadków z podwyższoną lub obniżoną ekspresją miRNA w analizowanych grupach.

Tabela 16a. Odsetek przypadków z podwyższoną względną ekspresją wybranych miRNA w różnych grupach pacjentów

Klasyfikacja TNM	miR-29a	miR-21	miR-30d
Ta	31%	23%	23%
T1	42%	58%	42%
T2	45%	52%	53%
Stopień zróżnicowania tkanki guza	miR-29a	miR-21	miR-30d
G1	25%	38%	31%
G2	28%	49%	39%

Tabela 16b. Odsetek przypadków z obniżoną względną ekspresją wybranych miRNA w różnych grupach pacjentów

Klasyfikacja TNM	miR-30a	miR-92	miR-106a
Ta	21%	23%	15%
T1	37%	48%	17%
T2	35%	59 %	25%
Stopień zróżnicowania tkanki guza	miR-30a	miR-92	miR-106a
G1	37%	21%	28%
G2	38%	27%	31%

Analiza wyników wykazała, że zarówno dla miRNA wykazujących podwyższoną czy obniżoną ekspresję, wraz ze stopniem zaawansowania choroby i stopniem zróżnicowania guza ilość przypadków w różnych grupach pacjentów wykazuje tendencję wzrostową.

Przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy ekspresją badanych miRNA a stopniem zróżnicowania tkanki guza i stopniem zaawansowania choroby (tab. 17).

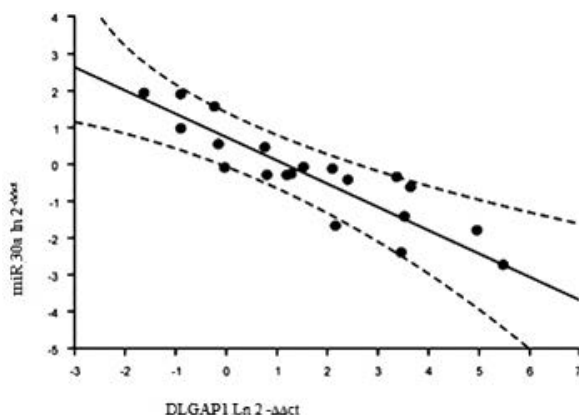
Tabela 17. Korelacja pomiędzy względną ekspresją genów strukturalnych i/lub miRNA w zależności od stopnia zaawansowania choroby

	Stopień Ta		Stopień T1		Stopień T2	
	Współ- czynnik korelacji	Istotność statystyczna	Współ- czynnik korelacji	Istotność statystycz- na	Współ- czynnik korelacji	Istotność statystyczna
miR-29a vs. miR-106a	$r = -0,09$	$p = 0,779$	$r = 0,12$	$p = 0,847$	$r = -0,84$	$p = 0,006$
miR-29a vs. miR-30d	$r = 0,58$	$p = 0,038$	$r = 0,56$	$p = 0,325$	$r = 0,11$	$p = 0,830$
miR-30a vs. miR-106a	$r = 0,81$	$p = 0,001$	$r = 0,79$	$p < 0,001$	$r = 0,37$	$p = 0,473$
miR-30a vs. miR-92	$r = 0,77$	$p = 0,002$	$r = 0,79$	$p = 0,109$	$r = 0,76$	$p = 0,132$
miR-21 vs. miR-106a	$r = 0,29$	$p = 0,394$	$r = -0,67$	$p = 0,211$	$r = -0,24$	$p = 0,645$
miR-21 vs. miR-30d	$r = 0,52$	$p = 0,067$	$r = 0,45$	$p = 0,445$	$r = 0,83$	$p = 0,007$
miR-106a vs. miR-92	$r = 0,88$	$p < 0,001$	$r = 0,80$	$p = 0,102$	$r = 0,79$	$p = 0,114$
miR-106a vs. miR-30d	$r = -0,60$	$p = 0,032$	$r = -0,47$	$p = 0,430$	$r = -0,21$	$p = 0,692$
<i>DLGAP1</i> vs. miR-30a	$r = 0,29$	$p = 0,369$	$r = 0,34$	$p = 0,571$	$r = -0,76$	$p = 0,002$
<i>WIF1</i> vs. miR-29a	$r = -0,37$	$p = 0,219$	$r = -0,09$	$p = 0,884$	$r = -0,87$	$p = 0,025$

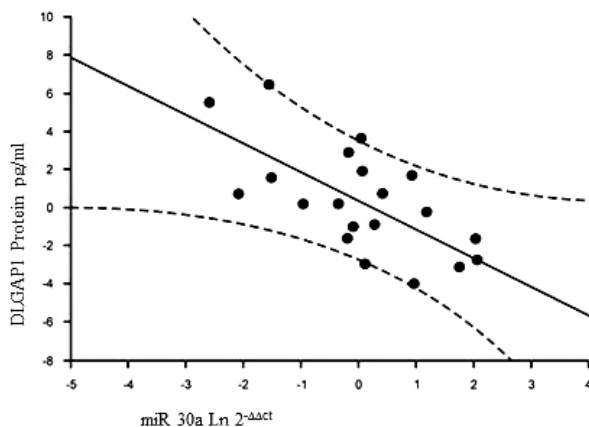
Wybrane do badań 6 rodzajów miRNA analizowano pod kątem genów docelowych, na których mRNA działają. Dwa z miRNA: 29a i 30a wykazują homologię do 3'UTR mRNA analizowanych wcześniej genów: *DLGAP1*, *WIF1* (miR-29a – *WIF1*, miR-30a – *DLGAP1*).

Analiza poziomu ekspresji badanych genów z miRNA wykazała silną negatywną korelację dla ekspresji miR-30a z ekspresją genu *DLGAP1*, miR-29a z *WIF1* u pacjentów z bardziej zaawansowaną chorobą nowotworową (tab. 17).

Badania porównawcze ekspresji miR-30a z genem *DLGAP1* wykazały silną negatywną korelację ekspresji miR-30a z genem *DLGAP1* zarówno na poziomie mRNA, jak i białka (ryc. 29a, 29b).



Rycina 29a. Analiza korelacji ekspresji genów *DLGAP1* vs. miR-30a u pacjentów ($n = 38$) ze średnio zaawansowanym stadiem raka jamy ustnej (stopień II). Względęną ekspresję genów oszacowano wykorzystując wzór $\ln 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Współczynnik korelacji Pearsona wynosił $r = -0,76$ ($p = 0,002$). Przerywanymi liniami przedstawiono 95% przedział ufności



Rycina 29b. Analiza korelacji ekspresji genu miR-30a ze stężeniem produktu białkowego genu *DLGAP1* pacjentów ($n = 38$) ze średnio zaawansowanym stadiem raka jamy ustnej (stopień II). Względęną ekspresję genów oszacowano wykorzystując wzór $\ln 2^{-\Delta\Delta Ct}$, ilość białka przedstawiono w pg/ml. Współczynnik korelacji Pearsona wynosił $r = -0,79$ ($p = 0,045$). Przerywanymi liniami przedstawiono 95% przedział ufności

22–24 nukleotydowe, jednoniciowe cząsteczki RNA (miRNA) poprzez komplementarne przyłączanie do mRNA genu docelowego mogą wpływać na jego negatywną potranskrypcyjną regulację ekspresji. Taki mechanizm powoduje „wyciszenie” pewnych genów i tym samym potencjalnie pozwala na zatrzymanie niekorzystnego mechanizmu aktywowanego np. w komórce nowotworowej. Stąd też wynika duże zainteresowanie tymi cząsteczkami w kontekście terapii przeciwnowotworowej.

W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy habilitacyjnej, na tkankach nowotworowych pobranych od pacjentów z rakiem jamy ustnej, wykazano znacznie obniżony poziom ekspresji cząsteczki miR-30a-5p względem zdrowej tkanki nieobjętej procesem nowotworowym. Dalsze badania miały na celu określić jej potencjalnie terapeutyczne działanie na komórki raka jamy ustnej. Na podstawie analizy bioinformatycznej gen *DLGAP1* (*disks large-associated protein 1*) kodujący białko GKAP (*guanylate kinase-associated protein*), został określony jako przypuszczalny gen docelowy dla analizowanego miR-30a-5p. Według najnowszych badań białko to bierze udział w regulacji aktywności receptora NMDAR (*Nmethyl-D-aspartic acid*), występującego między innymi w komórkach raka płuca, gdzie może wywierać wpływ na procesy związane ze wzrostem i rozwojem komórek nowotworowych.

Celem dalszych badań było określenie, czy cząsteczka miR-30a-5p faktycznie ma możliwość potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genu *DLGAP1* oraz, czy ma pozytywne – antynowotworowe działanie w komórkach raka jamy ustnej.

Rola miR-30a-5p w patogenezie nowotworów jamy ustnej

Analiza bioinformatyczna wykorzystująca algorytm Target Scan Human (http://www.Targetscan.org/vert_72), Diana czy miRDB (<http://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>), wykazała geny stanowiące potencjalne miejsca przyłączania dla badanego miR-30a-5p (geny: *BCL1A*, *NT5E*, *SAIL*). Jednym z nich okazał się gen *DLGAP1*, wykazujący występowanie w rejonie 3'UTR genu dwóch potencjalnych miejsc wiązania miR-30a-5p (ryc. 30a, b).

pozwoili na ich wprowadzenie do wektora pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega Corp) hydrolizowanego tymi samymi enzymami (ryc. 31). Otrzymane w ten sposób dwa rekombinowane wektory: pmirGLO-1 pierwszy zawierajcy sekwencj 21–28, pmirGLO-2 drugi z sekwencj 74–81, wykorzystano do transfekcji linii komrkowej SCC-25 (ryc. 32). Dodatkowo zaplanowano syntezy par oligonukleotydów, które nastpnie wprowadzono do plazmidu pmirGLO (negatywna kontrola), posiadajcych zmienione sekwencje wiązania miR-30a-5p o długości 53 pz. Poprawnosc sekwencji nukleotydowej sklonowanych fragmentów potwierdzono przez sekwencjonowanie.

Wstawka 21–28 UTR

AGTCGAGCT CCTGCATT**CAGTC**CCTGCTGTTTACAATGTGAAATC TCGA GATCG

Wstawka 74–81 UTR

AGTCGAGCT CCATTGTAATGACAATGTTTACATAGTAATCATTC TCGA GATCG

Rycina 31. Sekwencje oligonukleotydowe zawierajce miejsca wiązania z zaznaczonymi miejscami restrykcyjnymi

Wstawka 21–28 UTR

5'AGTCGAGCT CCTGCATT**CAGTC**CCTGCTGTTTACAATGTGAAATC
TCGAGATCG3'

3'TCAGCTCGA GGACGTAAGTCAGGACGACAAATGTTACACTTTAG
AGCTCTAGC5'

Wstawka 21–28 UTR zmutowana

5' AGTCGAGCT CCTGCATT**CAGTC**CCTGCTGTAATCAATGTGAAATC
TCGAGATCG3'

3' TCAGCTCGA GGACGTAAGTCAGGACGACATTAGTTACACTTTAG
AGCTCTAGC5'

Wstawka 74–81 UTR

5' AGTCGAGCT CCATTGTAATGACAATGTTTACATAGTAATCATTC TCGA GATCG

3' TCAGCTCGA GGTAACATTACTGTTACAAATGTATCATTAGTAAG AGCTCTAGC5'

Wstawka 74–81 UTR zmutowana

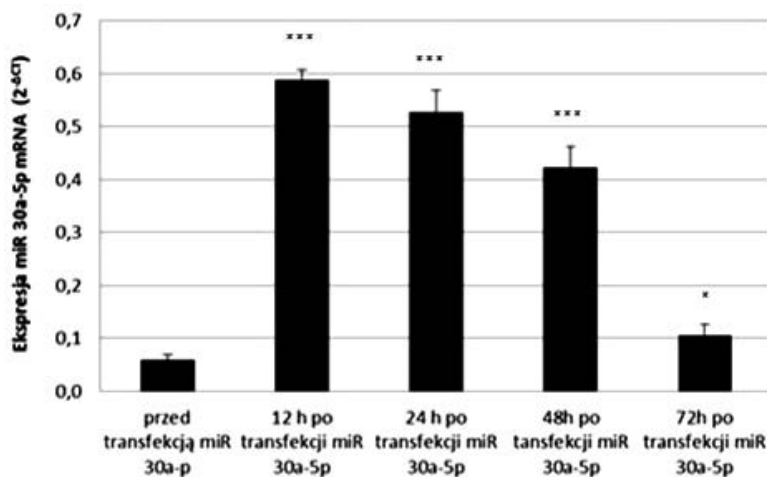
5' AGTCGAGCT CCATTGTAATGACAATGTAATTATAGTAATCATTC TCGAGATCG3'

3' TCAGCTCGA GGTAACATTACTGTTACATTAATATCATTAGTAAG AGCTCTAGC5'

Rycina 32. Sekwencje oligonukleotydów sklonowane w plazmidach pmiGLO

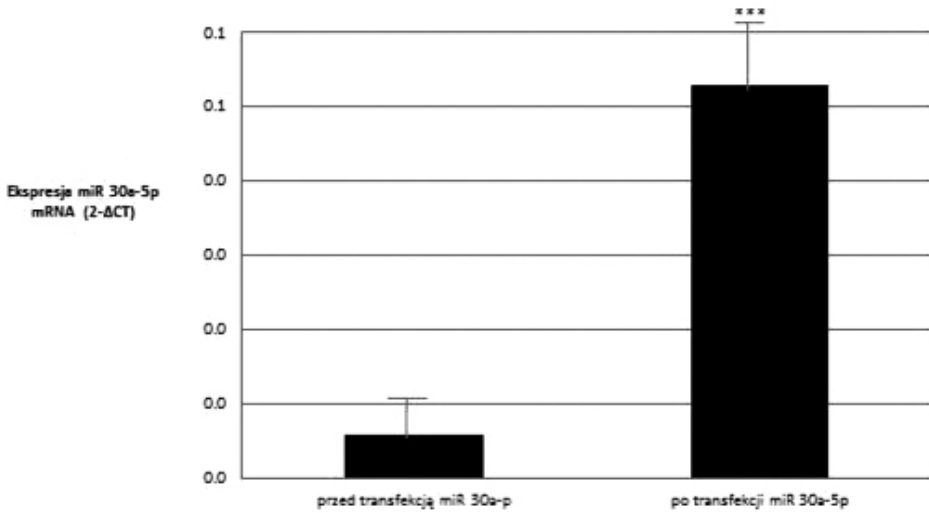
Transfekcja komórek SCC-25 miR-30a-5p

Analizę oddziaływania cząsteczek miR-30a-5p z potencjalnymi miejscami ich wiązania w rejonie 3'UTR genu *DLGAP1* przeprowadzono na linii komórkowej SCC-25. Komórki linii SCC-25 transfekowano cząsteczkami miR-30a-5p. Analiza efektów transfekcji komórek cząsteczką miR-30a-5p wykazała wzrost jej ekspresji odpowiednio 9 razy po 12 godz. i 8 razy po 24 godz. (ryc. 33, 34). Ekspresja miRNA-30a-5p w transfekowanych komórkach ulegała stopniowemu obniżeniu odpowiednio w 48 i 72 godz. (około 27% w 48 godz., 83% w 72 godz. w porównaniu do 12 godz. po transfekcji). Analiza ekspresji potencjalnego genu docelowego dla miR-30a-5p *DLGAP1* po transfekcji miR-30a-5p uległa zmianie. W trzech niezależnych eksperymentach zaobserwowano po transfekcji komórek miR-30a-5p obniżenie ekspresji genu *DLGAP1*, w przypadku mRNA o 12% jego produktu białkowego – białka GKAP o 83% (ryc. 35, 36). Transfekcja komórek SCC-25 cząsteczkami miR-205a-5p nie wpłynęła na zmianę ekspresji genu *DLGAP1* zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji (ryc. 36).

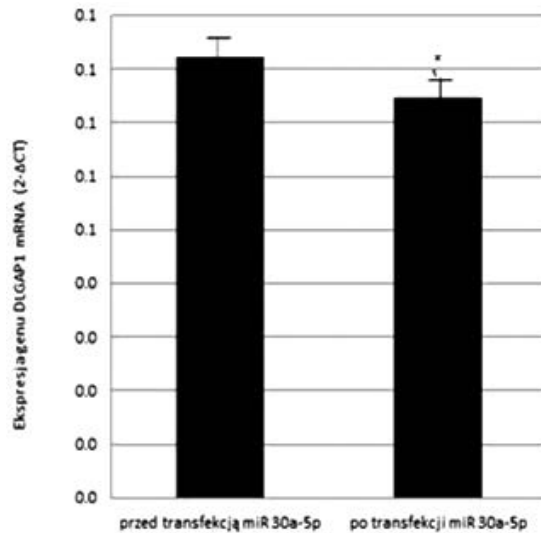


Rycina 33. Ekspresja miR-30a-5p w komórkach SSC-25 w 12, 24, 48, 72 godz. po transfekcji cząsteczką miR-30a-5p. Różnice między średnimi uzyskanymi dla oceny ekspresji miR-30a-5p w komórkach przed transfekcją w porównaniu z komórkami po transfekcji miR-30a-5p oszacowano testem t dla prób zależnych, a istotność statystyczną oznaczono jako

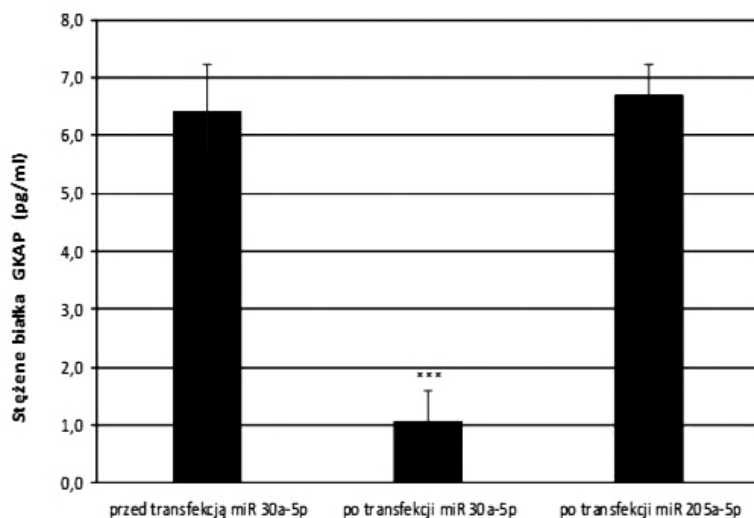
* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)



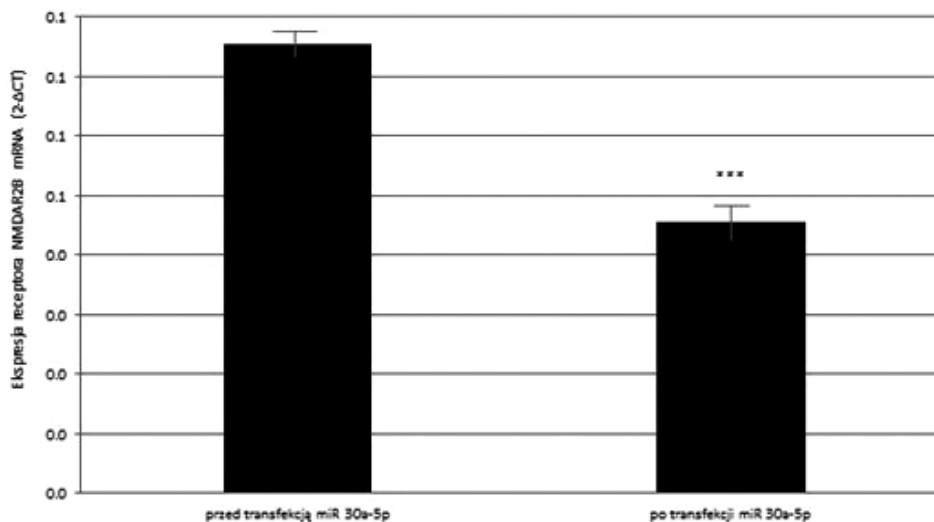
Rycina 34. Ekspresja miR-30a-5p w komórkach SCC-25 w 24 godz. po transfekcji cząsteczką miR-30a-5p. Różnice między średnimi uzyskanymi dla oceny ekspresji miR-30a-5p w komórkach przed transfekcją w porównaniu z komórkami po transfekcji miR-30a-5p oszacowano testem t dla prób zależnych, a istotność statystyczną oznaczono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)



Rycina 35. Ekspresja genu *DLGAP1* na poziomie mRNA w komórkach SCC-25 w 24 godz. po transfekcji cząsteczką miR-30a-5p. Różnice między średnimi uzyskanymi dla oceny ekspresji genu *DLGAP1* w komórkach przed transfekcją w porównaniu z komórkami po transfekcji miR-30a-5p oszacowano testem t dla prób zależnych, a istotność statystyczną oznaczono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)

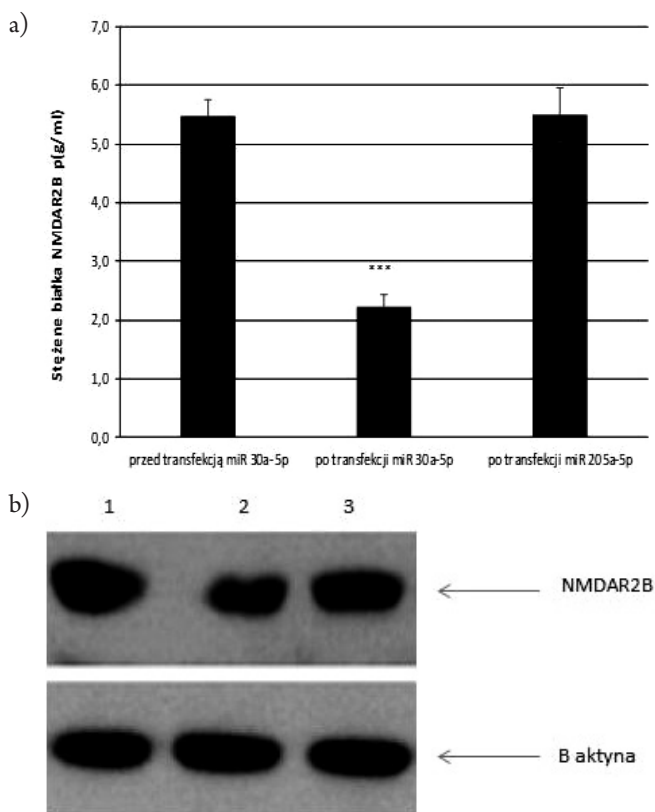


Rycina 36. Ekspresja genu *DLGAP1* na poziomie jego białka GKAP w komórkach SCC-25 w 24 godz. po transfekcji cząsteczką miR-30a-5p. Różnice między średnimi uzyskanymi dla oceny ekspresji genu na poziomie translacji w komórkach przed transfekcją w porównaniu z komórkami po transfekcji miR-30a-5p oszacowano testem t dla prób zależnych, a istotność statystyczną oznaczono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)



Rycina 37. Ekspresja genu receptora NMDAR2B na poziomie mRNA w komórkach SCC-25 w 24 godz. po transfekcji cząsteczką miR-30a-5p. Różnice między średnimi uzyskanymi dla oceny ekspresji genu NMDAR2B w komórkach przed transfekcją w porównaniu z komórkami po transfekcji miR-30a-5p oszacowano testem t dla prób zależnych, a istotność statystyczną oznaczono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)

W komórkach linii komórkowej ludzkiego nowotworu jamy ustnej SCC-25 potwierdzono na poziomie mRNA (metodą real time PCR) białka (metodą ELISA z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych) ekspresję na ich powierzchni receptora NMDAR2B (ryc. 37, 38). Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Transfekcja komórek SCC-25 cząsteczką miR-30a-5p wpłynęła na zmianę ekspresji genu receptora NMDAR2B zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, powodując jej obniżenie odpowiednio o 35% (mRNA), 26% (białko) (ryc. 37, 38). Transfekcja komórek SCC-25 cząsteczkami miR-205a-5p nie wpłynęła na zmianę ekspresji genu kodującego receptor NMDAR2B zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji (ryc. 38).



Rycina 38. (a) Ekspresja receptora NMDAR2B w komórkach SCC-25 w 24 godz. po transfekcji cząsteczką miR-30a-5p. Różnice między średnimi uzyskanymi dla oceny ekspresji genu NMDAR2B na poziomie białka w komórkach przed transfekcją w porównaniu z komórkami po transfekcji miR-30a-5p oszacowano testem t dla prób zależnych, a istotność statystyczną oznaczono jako *** ($p < 0,001$); (b) Ekspresja receptora NMDAR2B w komórkach SCC-25 w 24 godz. po transfekcji cząsteczką miR-30a-5p (Western blot). 1. Przed transfekcją miR-30a-5p; 2. Po transfekcji miR-30a-5p; 3. Po transekcji cząsteczkami miR-205a-5p

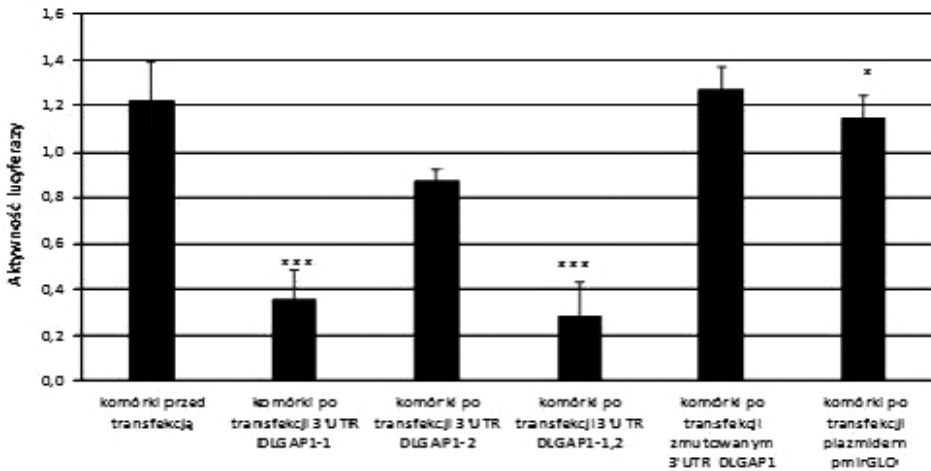
Wiązanie cząsteczek miR-30a-5p z genem docelowym przy pomocy genu reporterowego lucyferazy

Analizę wiązania się cząsteczek miR-30a-5p z potencjalnymi miejscami w rejonie 3'UTR genu *DLGAP1* przeprowadzono, wykorzystując komercyjnie dostępny zestaw Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega Corp) oparty na systemie lucyferazowym. Komórki linii SCC-25 były transfekowane cząsteczkami miR-30a-5p lub kontrolnymi cząsteczkami mirVana miRNA negative control i kotransfekowane jednym z wcześniej skonstruowanych plazmidów w sześciu wersjach:

- I. plazmid pmirGLO-1 (21–28 UTR),
- II. plazmid pmirGLO-1 zmutowany,
- III. plazmid pmirGLO-2 (74–81 UTR),
- IV. plazmid pmirGLO-2 zmutowany,
- V. plazmid pmirGLO-1 razem z plazmidem pmirGLO-2,
- VI. plazmid pmirGLO bez wstawki (nagi).

W komórkach SCC-25 transfekowanych plazmidami zawierającymi sklonowane miejsca wiązania 1, 2 lub oba miejsca 1 i 2 razem, zaobserwowano spadek aktywności lucyferazy.

W przypadku 1 miejsca (21–28 UTR) spadek wynosił 70% ($p < 0,001$), 2 miejsca (74–81) 27,5% ($p < 0,001$), obu miejsc 1 i 2 odpowiednio 80% ($p < 0,001$). Nie zaobserwowano spadku aktywności względnej lucyferazy po transfekcji plazmidami zawierającymi zmutowane miejsca 1 lub 2, jak również pozbawionym wstawki pustym plazmidem pmirGLO (ryc. 33). Obserwowano brak zmian w aktywności lucyferazy, wykorzystując do transfekcji komórek miRNA negative control zamiast miR-30a-5p cząsteczek kontrolnych mirVana. Brak zmian w aktywności lucyferazy dla plazmidów zawierających zmutowane miejsca wiązania miR czy nagiego plazmidu, a statystycznie znamieny spadek w przypadku plazmidów zawierających miejsca 1, 2 lub oba, świadczy o specyficznym wiązaniu cząsteczek miR-30a-5p z tymi miejscami. Przeprowadzone eksperymenty wykazały różnice w wiązaniu z miejscem 1, porównując z 2. Większy spadek obserwowano dla miejsca 1 w porównaniu z 2, co może świadczyć o większej specyficzności wiązania miejsca 1. Spadek aktywności był największy w przypadku transfekcji komórek dwoma plazmidami 1 i 2 równocześnie, co świadczy o możliwości przyłączenia cząsteczek miR-30a-5p w obu miejscach w rejonie 3'UTR genu *DLGAP1* (ryc. 39).



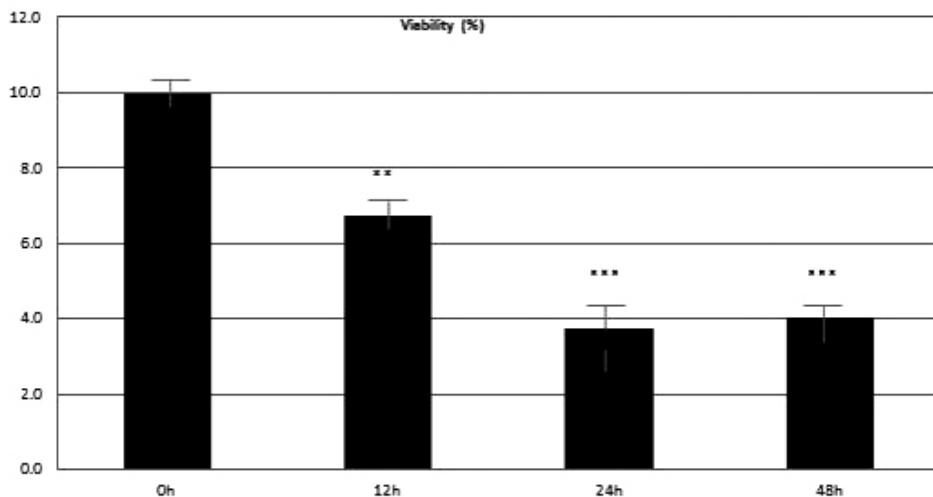
Rycina 39. Względny spadek aktywności lucyferazy w komórkach transfekowanych miR-30a-5p i kotransfekowanych jednym z 6 układów plazmidów. Różnice między średnimi uzyskanymi dla oceny aktywności lucyferazy w komórkach przed transfekcją w porównaniu z komórkami po transfekcji oszacowano testem t dla prób zależnych, a istotność statystyczną oznaczono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)

Analiza żywotności komórek SSC-25 po transfekcji miR-30a-5p

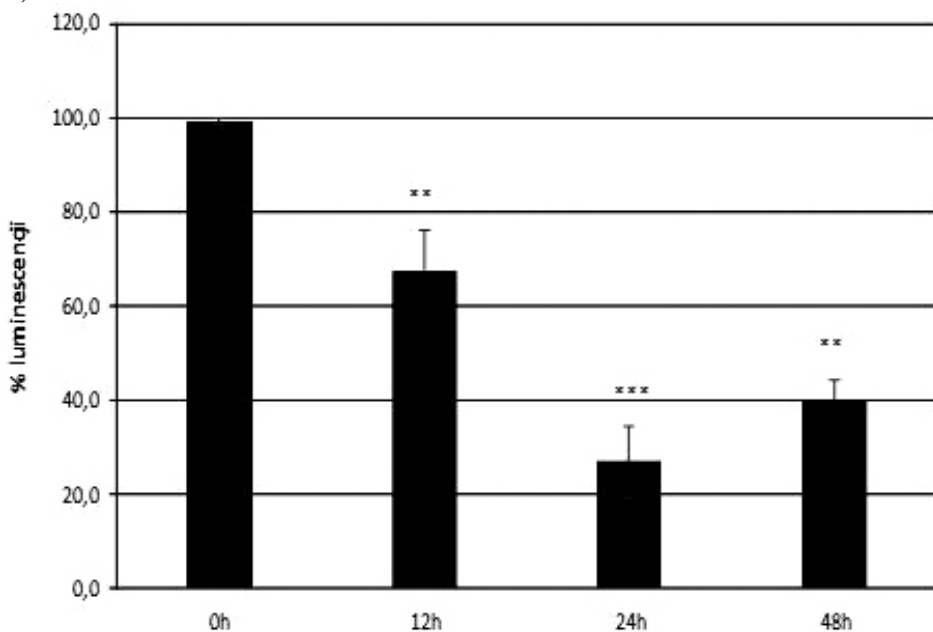
Wpływ wyciszania genu *DLGAP1* przez cząsteczki miR-30a-5p w transfekowanych komórkach SCC-25 na proliferację komórek rakowych badano przy użyciu testu MTT. Test MTT ocenia żywotność komórek za pomocą reakcji redukcji soli tetrazolowej (MTT – substratu rozpuszczalnego w wodzie o zabarwieniu białym lub żółtym) do nierozpuszczalnego formazanu (o zabarwieniu ciemno-niebieskim). Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki.

Uzyskane wyniki wskazują na spadek ilości zdolnych do przeżycia komórek po transfekcji miR-30a-5p odpowiednio 30% po 12 godz., 61% po 24 godz. (ryc. 40a, b).

a)



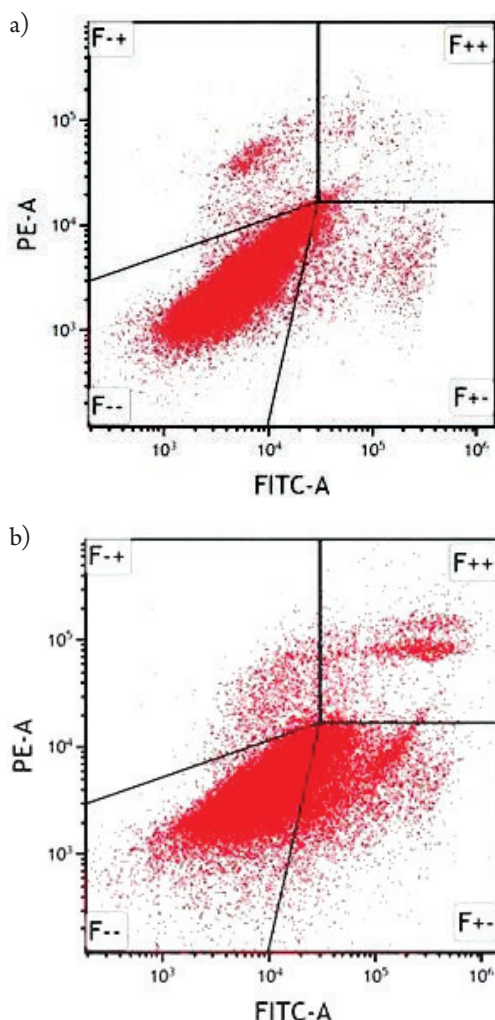
b)



Rycina 40. Analiza żywotności komórek SCC-25 po transfekcji cząsteczkami miR-30a-5p wykonana testem MTT. Przedstawione wyniki stanowią średnią ($\pm$ SD) z trzech oddzielnych eksperymentów. Różnice między średnimi uzyskanymi dla oceny żywotności komórek przed transfekcją w porównaniu z komórkami po transfekcji oszacowano testem t dla prób zależnych, a istotność statystyczną oznaczono jako ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)

Analiza procesu apoptozy z zastosowaniem cytometrii przepływowej

Komórki SCC-25 po transfekcji cząsteczkami miR-30a-5p analizowano przy pomocy cytometrii przepływowej z użyciem odczynników, których użyto do uwidaczniania komórek apoptotycznych (AneksynaV-FITC) i nekrotycznych (jodek propidyny). Przeprowadzona analiza wykazała różnice pomiędzy liczbą komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych w komórkach nietransfekowanych i transfekowanych miR-30a-5p (ryc. 41, 42; tab. 18).

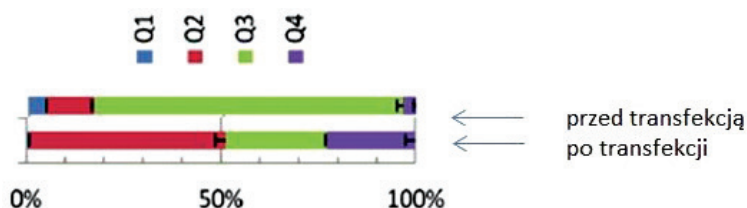


Rycina 41. Wpływ transfekcji miR-30a-5p na apoptozę komórek linii SCC-25

Histogram przedstawia wyniki eksperymentu zmierzone za pomocą cytometrii przepływowej z aneksyną V i jodkiem propidyny. W kwadrancie F-- znajdują się komórki żywe; w F+- komórki wczesnoapoptotyczne; w F++ komórki późnoapoptotyczne; w F-+ komórki nekrotyczne. FITC-A oznacza fluorescencję aneksyny V; PE-A – jodku propidyny.

A) komórki kontrolne;

B) komórki po transfekcji miR-30a-5p.



Rycina 42. Różnice procentowe w liczbie komórek populacji Q1–Q4 dla komórek transfekowanych i nietransfekowanych miR-30a-5p. Q1 – komórki nekrotyczne, Q2 – komórki późnoapoptotyczne, Q3 – komórki żywe, Q4 – komórki wczesnoapoptotyczne

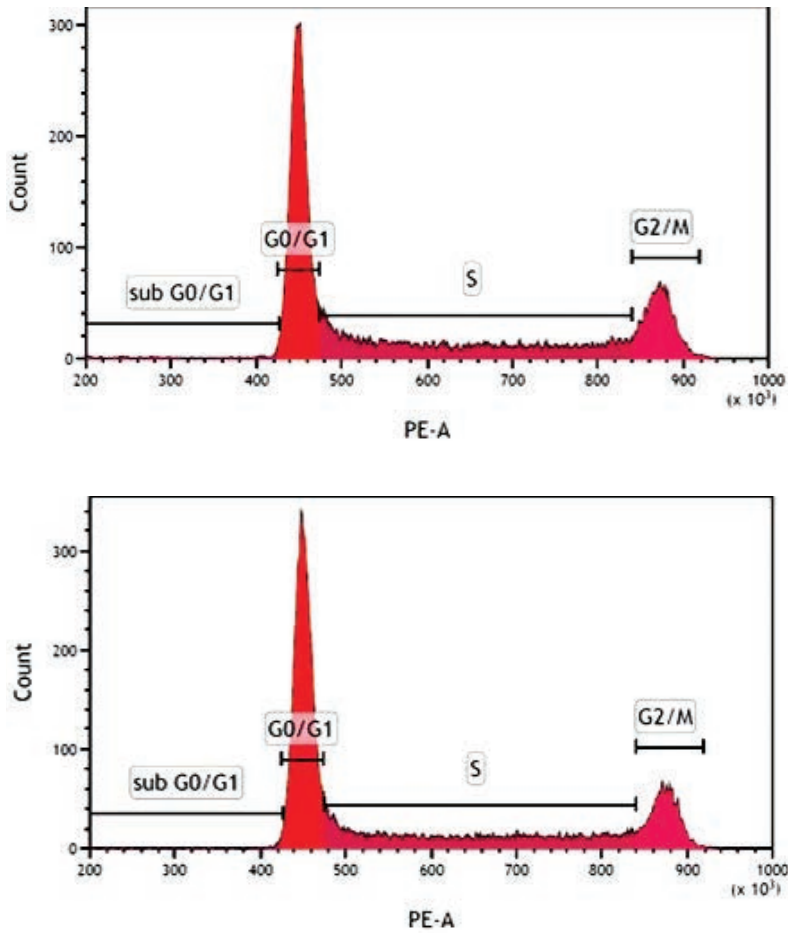
Tabela 18. Liczebność populacji komórek (średnie procentowe) transfekowanych i nie transfekowanych cząsteczkami miR-30a-5p dwóch eksperymentów, w trzech powtórzeniach

	Q1	Q2	Q3	Q4
Nietransfekowane	4,40 ±0,06	12,30 ±0,49	79,50 ±1,48	3,90 ±1,16
Transfekowane	0,73 ±0,07	50,43 ±2,38	26,20 ±0,42	22,63 ±2,55

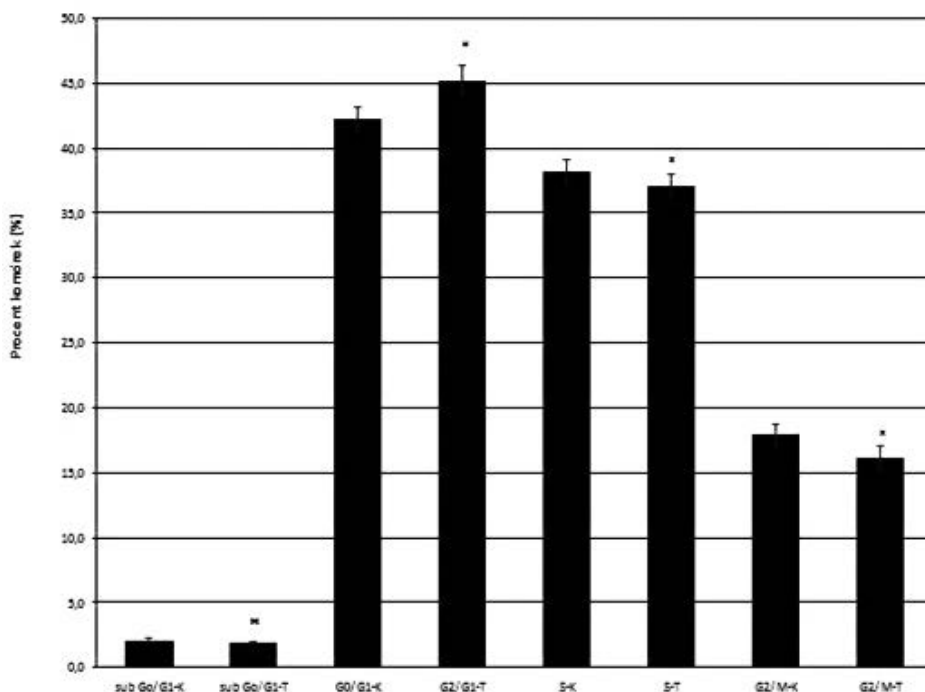
* Q1 – komórki nekrotyczne, Q2 – komórki późnoapoptotyczne, Q3 – komórki żywe, Q4 – komórki wczesnoapoptotyczne w 24 godz. po transfekcji. Przedstawione wyniki stanowią średnią (± SD) z trzech oddzielnych eksperymentów.

Przeprowadzona analiza wykazała zmiany % w rozkładzie komórek. Transfekcja miR-30a-5p zmniejszyła ilość komórek żywych o 67%, zwiększyła ilość komórek późno apoptotycznych o 75% i wczesno apoptotycznych o 82,5%. Oznaczenia przeprowadzono w 24 godzinie po transfekcji.

Analizowano wpływ miR-30a-5p pod kątem cyklu komórkowego. W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, że transfekcja komórek SCC-25 cząsteczkami miR-30a-5 indukuje procesy apoptozy w komórkach, nie wywołując nekrozy. Konsekwencją zachodzących procesów jest najprawdopodobniej zatrzymanie cyklu komórkowego, poprzez blokowanie podziału komórek nowotworowych (ryc. 43, 44).



Rycina 43. Histogram przedstawia cykl komórkowy komórek linii SCC-25 po transfekcji miR-30a-5p. Są to wyniki jednego eksperymentu zmierzone za pomocą cytometrii przepływowej z jodkiem propidyny. PE-A oznacza fluorescencję jodku propidyny; Count – ilość zliczeń komórek w danej fazie cyklu komórkowego



Rycina 44. Procent komórek linii SCC-25 nie transfekowanych (kontrolnych K) i po transfekcji (transfekowanych T) znajdujących się w poszczególnych etapach cyklu komórkowego. Komórki poddano inkubacji z ARA12 przez 24 godz. Wyniki są przedstawione jako średnia trzech powtórzeń $\pm$ SEM. Różnice między średnimi uzyskanymi dla komórek przed transfekcją w porównaniu z komórkami po transfekcji oszacowano testem t dla prób zależnych, a istotność statystyczną oznaczono jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)

ROZDZIAŁ 13

DYSKUSJA

W ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się istotny wzrost ilości zachorowań jak również śmiertelności z powodu nowotworów złośliwych, w tym rejonu głowy i szyi. Zdecydowana większość nowotworów głowy i szyi jest pochodzenia płaskonabłonkowego. Płaskonabłonkowe nowotwory głowy i szyi zajmują szóste miejsce, jeżeli chodzi o częstość występowania na świecie. Co roku wykrywanych jest 600 000 nowych przypadków tego rodzaju nowotworów, które stanowią przyczynę ponad 350 000 zgonów. Badania histologiczne wskazują, że w około 95% tego rodzaju nowotworów występuje rak płaskonabłonkowy, znacznie rzadziej inne typy jak rak gruczolowy, brodawkowaty czy nabłonkowy. Głównym czynnikiem egzogennym powstawania i rozwoju nowotworów głowy i szyi, w tym raka języka, są kancerogeny – substancje zawarte w dymie tytoniowym, wysokoprocentowe alkohole czy infekcje wirusowe. Dużym problemem w leczeniu tego rodzaju nowotworów są ograniczone możliwości zastosowania chemioterapii z powodu ich niewielkiej chemiowrażliwości. Intensywnie poszukuje się nowych związków, które modyfikowane chemicznie wspomogą aktywność chemioterapeutyczną lub standardową chemioterapię [150–156].

W ostatnich latach w wielu doniesieniach naukowych zwracana jest uwaga na istotną rolę epigenetycznej kontroli ekspresji genów związanych z regulacją cyklu komórkowego, naprawą DNA, apoptozą, która obok zmian w genomie w postaci mutacji w określonych genach, odgrywa bardzo ważną rolę w patogenezie zmian nowotworowych. Dokładna analiza modyfikacji epigenetycznej genów zaangażowanych w proces nowotworzenia, pozwoli na poznanie procesu transformacji nowotworowej oraz praktyczne zastosowanie jej w diagnostyce i terapii przeciwnowotworowej. Najlepiej poznaną modyfikacją epigenetyczną jest metylacja DNA.

Metylacja DNA [157–159], kowalencyjna modyfikacja histonów, stanowi sposób, za pośrednictwem którego na genom człowieka działają związki o charakterze chemoprewencyjnym czy chemioterapeutyki, modyfikując ekspresję genów zaangażowanych w powstawanie i rozwój nowotworów. Hypermetylacja rejonów promotorowych genów supresorowych, hipometylacja proto-onkogenów prowadzi do ich inaktywacji lub, jak w przypadku drugiej grupy genów, pobudzenia. W warunkach fizjologicznych metylacja jest procesem

bardzo istotnym w obronie komórki przed obcym DNA, bierze między innymi udział w wyłączaniu jednego z chromosomów X czy piętnowaniu rodzicielskim. Modyfikacje histonów poprzez ich acetylację, metylację DNA są procesami zintegrowanymi ze sobą, pozwalającymi na prawidłowe funkcjonowanie komórki. Zakłócenie tego powiązanego ze sobą układu prowadzi do: wyciszenia genów supresorowych, aktywacji protoonkogenów, destabilizacji struktury chromosomów, a w konsekwencji do niestabilności i rearanzacji chromosomów, co zapoczątkowuje zmiany w prawidłowo funkcjonujących komórkach, przekształcając je w komórki nowotworowe [160, 161]. Metylacja DNA w komórkach nowotworowych, w porównaniu z prawidłowymi, ulega poważnemu zaburzeniu, prowadząc między innymi do hipermetylacji wysp CpG genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego (RB, p15 INK4a, p16 INK4a, p14 ARF), naprawy uszkodzeń w DNA (MGMT, BRCA1), procesu apoptozy (TMS1, DAPK), detoksykacji, różnicowania komórek, oporności lekowej czy angiogenezy. W prawidłowych tkankach metylacja reszt cytozyny w DNA jest szacowana na poziomie 0,75–1% wszystkich nukleotydów w DNA. 5-metylocytozyna zlokalizowana głównie w sekwencjach CpG bogatych u pacjentów z nowotworami głowy i szyi, w tym jamy ustnej, występuje w 70% [160, 161]. Na podstawie zintegrowanej analizy bioinformatycznej [162] zidentyfikowano geny o różnym poziomie metylacji w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej: 24 geny o obniżonej metylacji (hipometylowane) i 28 genów o podwyższonej metylacji (hipermetylowanych), zaangażowanych w procesy regulacji odpowiedzi immunologicznej, głównie związanej ze szlakami sygnalizacji komórkowej PI3K-AKT i EMT.

W grupie analizowanych genów o zmienionym profilu metylacji wyodrębniono trzy onkogeny ulegające hipometylacji (ABL2, IL7R, CDK14), zaangażowane m.in. w procesy związane z wrodzonym układem odpornościowym, transportem nabłonek-mezenchyma, transportem glicerolu z adipocytów do wątroby za pośrednictwem akwaporyny i cztery hipermetylowane geny supresorowe (C2orf40, EPB41L3, GPX3, WIF1) związane z zapoczątkowaniem obrony immunologicznej, zapalnej cytotoksyczności komórek, adhezji komórkowej, odontogenezy czy transportu transferryny. Analizowane geny supresorowe są zaangażowane w szlak sygnalizacyjny mTOR, PI3K klasy I, w którym pośredniczy białko AKT, szlak insulinowy i szlak proteoglikanowo-syndykanowy, podczas gdy onkogeny są zaangażowane w szlak TGF- β , jądrowy SMAD-2 receptora Trk, p75(NTR) czy $\alpha 6 \beta 4$ integryny. Proces nowotworzenia jest ściśle związany z odpornością. Układ immunologiczny powinien rozpoznawać i niszczyć komórki nowotworowe. Zmiany fenotypowe, które dokonują się w komórce nowotworowej, powodują, że nie podejmuje ona odpowiedzi immunologicznej poprzez mechanizmy tzw. ucieczki immunologicznej. Szlak

sygnalizacyjny PI3K-AKT-mTOR [163] odgrywa w komórce kluczową rolę, regulując podziały komórkowe, wzrost, przeżycie czy angiogenezę komórek rakowych.

Inną bardzo ważną funkcją tego szlaku jest wyciszanie procesu apoptozy komórki poprzez hamowanie powstawania czynników proapoptotycznych, a aktywację antyapoptotycznych. Szlak sygnalizacji komórkowej PI3K jest hamowany przez kinazę PTEN [164], której zmniejszoną ekspresję, a wzmożoną aktywność szlaku PI3K-AKT-mTOR obserwuje się w onkogenezie. Ostatnie dane sugerują [165], że szlak PI3K-AKT-mTOR odgrywa kluczową rolę w samoodnawianiu komórek macierzystych, oporności na chemioterapię lub radioterapię. Trzema hypometylowanymi onkogenami były geny: ABL2, IL7R, CDK14. Gen ABL2 koduje białko, które należy do niereceptorowych kinaz białkowych tyrozyny. Podobnie jak produkt białkowy onkogeny, c-ABL bierze udział w zmianach związanych z przegrupowaniem włókien białkowych w obrębie cytoszkieletu komórki [166]. Ulega ekspresji zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych, biorąc między innymi udział w translokacji genu ETV6 w białaczkach [166]. Wysoka ekspresja genu ABL2 źle rokuje w raku wątrobowokomórkowym, a jego nadekspresja sprzyja migracji i inwazji komórek rakowych raka piersi i gruczołu krokowego [167–170].

Produkt białkowy genu IL7R jest receptorem dla interleukiny 7 (IL7) i odgrywa istotną rolę w procesie rekombinacji V(D)J podczas rozwoju limfocytów [171–173]. Mutacje tego genu mogą być związane z ciężkim złożonym niedoborem odporności (SCID) [174]. Hypometylacja genu IL7R prowadzi do jego wysokiej ekspresji w płaskonabłonkowych nowotworach języka, co może wpływać na przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną podczas karcynogenezy. Białko CDK14, członek rodziny kinaz białkowych związanych z CDC2, reguluje progresję cyklu komórkowego i proliferację komórek przez interakcję z białkiem CCND3 [171]. Wysoka ekspresja genu CDK14 jest związana ze złym rokowaniem w kostniakomięsaku [172], a w nowotworach płaskonabłonkowych jamy ustnej może działać jako promotor proliferacji tego typu nowotworów. Trzy geny, które ulegały hypometylacji, co wiązało się z ich nadekspresją, mogą odgrywać istotną rolę w procesie nowotworzenia raków płaskonabłonkowych jamy ustnej. Analiza bioinformatyczna wykazała hypermetylację genów: C2orf40, EPB41L3, GPX3, *WIF1*. Gen C2orf40 koduje białko związane bezpośrednio z takimi chorobami jak rak przełyku [175]. W organizmie stymuluje starzenie komórek prekursorowych oligodendrocytów i komórek nerwowych, powodując zatrzymanie fazy G1 cyklu komórkowego, defosforylację białka RB i przyspieszoną degradację proteosomalną białek: CCND1, CCND3 [176]. Białko EPB41L3 jest uznawane za supresor nowotworów, hamujący proliferację komórek, pobudzający proces apoptozy [177]. Niska

ekspresja genu białka EPB41L3 w nowotworach przełyku, raka wątrobowokomórkowego sprzyja migracji, inwazji komórek i jest związana ze złym rokowaniem [178–180]. Produkt białkowy genu GPX3 należy do rodziny peroksydaz glutationowych, które katalizują reakcje redukcji organicznych wodorotlenków, nadtlenu wodoru przez glutation, chroniąc w ten sposób komórki przed uszkodzeniem oksydacyjnym [181]. Obniżenie ekspresji tego genu w wyniku hipermetylacji obserwowano w nowotworach tarczycy, raku wątrobowokomórkowym, przewlekłej białaczce szpikowej. Niska ekspresja genu GPX3 jest biomarkerem złego rokowania w raku pęcherzyka żółciowego, a jego wyciszenie sprzyja przerzutowaniu w nowotworach tarczycy [182, 183]. Białko, produkt translacji genu *WIF1*, hamuje ekspresję białek Wnt, które są zewnątrzkomórkowymi cząsteczkami sygnałowymi, odgrywającymi ważną rolę w rozwoju embrionalnym [184]. Wyciszenie genu supresorowego *WIF1* w bardziej zaawansowanych stadiach obserwowano w różnych nowotworach takich jak: rak gruczołu krokowego, sutka, pęcherza moczowego [185]. Działając jako inhibitor szlaku sygnałowego, Wnt może regulować ekspresję genów SKP2, c-Myc, prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1, hamowania proliferacji w komórkach pęcherza moczowego [186, 187].

Luca Morandi i wsp. [188] w swojej pracy analizowali stopień metylacji sekwencji promotorowych 8 wybranych genów: GP1BB, ZAP70, KIF1A, p16 [CDKN2A], CDH1, miR137 i miR375 u pacjentów ze zmianami przednowotworowymi, porównując z chorymi, u których zdiagnozowano płaskonabłonkowy nowotwór jamy ustnej. Wykazano znaczące różnice w stopniu metylacji badanych genów w dwóch analizowanych grupach pacjentów. Promotor genu ZAP70 jest hipermetylowany w 100% u pacjentów ze zmianami nowotworowym, a 28,6% u pacjentów ze zmianami przednowotworowymi. Hipometylację sekwencji nukleotydowej promotora genu GP188 stwierdzono u 90,9% chorych ze zmianami nowotworowymi, a 25% u pacjentów ze zmianami przednowotworowymi. Wykazano ponadto, że hipermetylacja genu KIF1A jest bezpośrednio związana z mutacjami w genie supresorowym TP53, który jest odpowiedzialny m.in. za kontrolę cyklu komórkowego, procesy apoptozy [188].

Z przeprowadzonych w ramach pracy habilitacyjnej badań, w oparciu o wcześniejsze badania i doniesienia literaturowe, wybrano 16 genów (pełniących w organizmie rolę genów supresorowych, protoonkogenów) w celu analizy stopnia ich zmetylowania u 20 pacjentów z leukoplakią i u 120 pacjentów ze zmianami nowotworowymi. Kontrolę każdorazowo w stosunku do tkanki zmienionej nowotworowo i przednowotworowo stanowiła tkanka zdrowa. Do analiz wybrano geny: CDKN2B, ATM, TIMP3, APC, CDKN2A, MLH1, RARB, CHFR, *DLGAP1*, C2orf40, GPX3, CDKN1B, EPB41L3, TP73, CDH13, WIF. Analiza stopnia metylacji wykazała, że genami, które najczęściej ulegały

metylacji w badanej grupie chorych ze zmianami nowotworowymi, były: *WIF1* (46,6%), *GPx* (41,6%), najrzadziej: *CHFR* (1,6%), *CDK1B* (1,6%).

W przypadku genu *DLGAP1* zaobserwowano obniżenie metylacji w stosunku do tkanki prawidłowej (–35,8%) – hypometylację. U pacjentów z leukoplakią procent metylacji analizowanych genów pozostawał na niskim poziomie (poniżej 10%). W kolejnym etapie badań próbowano skorelować stopień metylacji genów z klinicznym zaawansowaniem choroby (klasyfikacja TNM). Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istotnie statystyczną korelację stopnia metylacji badanych genów z klinicznym stopniem zaawansowania choroby TNM tylko w przypadku genu *DLGAP1*. Analizowane geny wykazywały zróżnicowany stopień metylacji wraz ze stopniem złośliwości nowotworu. Wyższą częstość metylacji, jeżeli chodzi o stopień złośliwości nowotworu G1 względem G2, wykazywały geny: *RARβ*, *APC*, *CHFR*, przeciwnie – niższą częstość geny: *TIMP3*, *DLGAP1*, *C2orf40*, *GPX3*, *CDKN1B*, *EPB41L3*, *CDH13*, *WIF1*. Dalszą analizę przeprowadzono dla wybranych dwóch genów: *DLGAP1* i *WIF1*. Badania genów *DLGAP1* i *WIF1* w oparciu o model regresji logistycznej, wykorzystując jako zmienne objaśniające metylacje w analizowanych genach, wykreślone krzywe ROC – wykazały, że ocena stopnia metylacji (hiper, hypometylacji) analizowanych genów może być potencjalnie przydatna w ocenie stopnia złośliwości nowotworu G1, G2. Analiza ilorazu szans wykazała, że prawdopodobieństwo wystąpienia stopnia G2 złośliwości guza jest ponad 6,5-krotnie wyższe w przypadku zmian metylacji genu *DLGAP1*, 4-krotne w przypadku genu *WIF1*. Kolejny etap badań stanowiła analiza ekspresji genów *DLGAP1*, *WIF1* na poziomie mRNA białka u pacjentów z leukoplakią, płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej oraz próba korelacji stopnia metylacji genów z ich ekspresją. Zmiany w ekspresji badanych genów obserwowano zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Wzrost ekspresji genu *DLGAP1* obserwowano u chorych z leukoplakią jak i chorych z różnym stopniem złośliwości nowotworu płaskonabłonkowego jamy ustnej. Analiza ekspresji genu *WIF1* wykazała odwrotną korelację. Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę metylacji jako czynnika epigenetycznego w regulacji ekspresji genów *DLGAP1*, *WIF1*.

Od wielu lat badania z zakresu biologii molekularnej, diagnostyki molekularnej człowieka skoncentrowane są na poszukiwaniu miejsc polimorficznych w sekwencjach genów, szczególnie zmian jednonukleotydowych (SNP – *single nucleotide polymorphism*), korelacji występowania określonych genotypów alleli genów z ekspresją genu na poziomie mRNA białka. W przedstawionej do oceny pracy postanowiono sprawdzić na ile znane miejsca polimorficzne w sekwencji genów *DLGAP1* i *WIF1*, różnią się częstością występowania alleli, genotypów i czy zmiany mają wpływ na poziom ekspresji genów. W badanych genach

u pacjentów z leukoplakią i zmianami nowotworowymi przeprowadzono analizę trzech polimorfizmów pojedynczego nukleotydu dla każdego genu: rs1081062, rs20491161, rs16946051 w genie *DLGAP1*, *WIF1* rs34203757, rs34505206, rs56900803. Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotności statystycznej częstości występowania określonych genotypów, alleli w analizowanych polimorfizmach SNP genu *DLGAP1*, *WIF1* w tkance prawidłowej w porównaniu z leukoplakią czy tkanką zmienioną nowotworowo. Nie wykazano korelacji pomiędzy występowaniem określonych genotypów, alleli genu, a stężeniem białka zarówno w tkance nowotworowej oraz tkance z leukoplakią, w porównaniu z tkanką prawidłową. Badane w pracy habilitacyjnej polimorfizmy w genie *DLGAP1* analizowano w różnych jednostkach chorobowych w tym w schizofrenii [156]. W DNA pacjentów chorych na schizofrenię analizowano sześć opisanych w literaturze zmian sekwencji nukleotydowej w genie *DLGAP1* pięciu SNP (rs145691437, rs3786431, rs201567254, rs3745051, rs11662259) i jedną rzadką mutację typu missense (c.1922A>G). Przeprowadzone analizy nie wykazały zależności częstości występowania odpowiednich genotypów badanych SNP pomiędzy pacjentami ze schizofrenią a grupą kontrolną [156].

W pracy Li i wsp. [189] analizowano inne miejsce polimorficzne w genie *DLGAP1* rs11081062 i rs26728 genu *EFNA5* (Efryna-A-5) – członka genów efryny, którego produkt białkowy zapobiega wiązaniu aksonów u pacjentów z zaburzeniami depresyjno-kompulsywnymi. Nie znaleziono związku między polimorfizmem SNP rs11081062 genu *DLGAP1*, rs11081062 i rs26728 genu *EFNA5* (Efryna-A5) – członka genów efryny, którego produkt białkowy zapobiega wiązaniu aksonów u pacjentów z zaburzeniami depresyjno-kompulsywnymi populacji chińskiej. Nie wykazano zależności statystycznych w występowaniu alleli w obu analizowanych polimorfizmach.

Powiązania zaobserwowano natomiast u pacjentów z zaburzeniami depresyjno-kompulsywnymi, prezentującymi różne podfenotypy. Zhang i wsp. analizowali polimorfizm rs2049161 genu *DLGAP1* u dzieci z zespołem nadpobudliwości ADHD [190]. Wykazano związek częstości występowania alleli polimorfizmu rs2049161 genu *DLGAP1* z elastycznością poznawczą oraz szlakiem wzrostu neurytów związanych z objawami ADHD.

Innym rodzajem zmian epigenetycznych, którym ulegają geny na poziomie mRNA, są cząsteczki miRNA. Odgrywają one bardzo ważną rolę w regulacji ekspresji genów. miRNA to jednoniciowe 20–22 nukleotydowe cząsteczki RNA powstające w cytoplazmie ze swoich prekursorów pre miRNA, transkrybowanych w jądrze komórkowym. Rozpoznając określone sekwencje w regionie 3'-UTR docelowych cząsteczek matrycowych RNA i wiążąc się z nimi, przeprowadzają ich hydrolizę, w ten sposób hamują biosyntezę konkretnego

białka. Regulując ekspresję genów biorą udział w licznych procesach komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie, embriogeneza, angiogeneza, apoptoza, czy kontrola syntezy licznych onkogenów i genów supresorowych zaangażowanych w proces nowotworowy. Dzięki temu, że miRNA są odporne na działanie endo i egzogennych RNAz w osoczu, surowicy, świeżo mrożonych tkankach czy bloczkach parafinowych, są doskonałym materiałem diagnostycznym, terapeutycznym. Duża stabilność cząsteczek nawet w temperaturze pokojowej pozwala traktować cząsteczki miRNA jako potencjalne biomarkery, biorąc pod uwagę – z diagnostycznego punktu widzenia, potrzebę wielokrotnego mrożenia i rozmrażania. Ekspresja ponad 30% ludzkich genów kontrolowana jest przez odpowiednie cząsteczki miRNA. W DNA geny miRNA są często zlokalizowane w rejonach miejsc łamliwych chromosomów (*fragile sites*) podatnych na uszkodzenia. Zmiany w genomie powstałe w wyniku uszkodzeń takie jak delecje, amplifikacje, translokacje, włączanie obcych cząsteczek DNA np. wirusa HPV (*human papilloma virus*), mogą mieć wpływ zarówno na ekspresję genów kodujących białka związane z procesem nowotworowym: geny supresorowe, protoonkogeny białek będących supresorami nowotworzenia jak i ekspresję miRNA. Zmiana ekspresji miRNA jest obserwowana w różnego rodzaju nowotworach [191]. Różnorodność genów, których ekspresja jest regulowana przez cząsteczki miRNA, powoduje, że w procesie nowotworowym mogą zachowywać się jak onkogeny i jak supresory transformacji.

Na podstawie analizy poziomu ekspresji konkretnych miRNA można próbować identyfikować tkanki zmienione nowotworowo. Profilowanie ekspresji określonych cząsteczek mikro-RNA, może być uzupełniającym narzędziem diagnostycznym wykorzystywanym w ocenie stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, określenia potencjalnego czasu przeżycia, czy być bardzo istotnym czynnikiem przy wyborze spersonalizowanego leczenia. Szereg badań opublikowanych w ostatnim czasie wskazuje na takie możliwości. Przykładowo wysoka ekspresja cząsteczek z grupy miR-183 takich jak miR-96, miR-182, miR-183 zarówno w surowicy, jak również w komórkach nowotworowych może być istotnym czynnikiem w diagnostyce niedrobnokomórkowego raka płuc.

Przeprowadzone badania wykazały, że nadekspresja cząsteczek miR-182 jest związana z wystąpieniem przerzutów do węzłów chłonnych, podczas gdy nadekspresja cząsteczek miR-183 z zahamowaniem procesu apoptozy, migracji, naciekania na sąsiadujące tkanki, procesem tworzenia przerzutów [192] – co jest bezpośrednio związane ze skróceniem przeżycia organizmu. Dodatkowo Sarver i Subramanian [6] wskazują na możliwość obniżania ekspresji genów supresorowych: EGR1 (*early growth response 1*) i PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) [193] przez nadekspresję cząsteczek miR-183. W pracy Wang XC i wsp. [194] skorelowano związek obniżonej ekspresji miR-451

w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc z przerzutami do węzłów chłonnych, co przekłada się na stopień zaawansowania choroby, skrócony czas przeżycia w szczególności u osób palących. Ekspresja cząsteczek miR-21 jest istotna w rozwoju nowotworów prostaty. Nadekspresja miR-21 wpływa na rozrost tkanki nowotworowej, migrację komórek guza, naciekanie sąsiadujących komórek, a w konsekwencji przerzutowanie – najprawdopodobniej w wyniku wyciszenia tak istotnych genów jak: TPM1 (*tropomyosin alpha-1*), PDCD4 (*programmed cell death protein 4*), czy MARKCS (*myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate*) [195]. Inne cząsteczki – miR-141, miR-200b i miR-200c – wydzielane do krwiobiegu mogą być istotne we wczesnym wykrywaniu nowotworów prostaty [196].

Nadekspresja cząsteczki miR-21, posiadającej funkcję onkogeny, w komórkach raka trzustki związana jest ze złym rokowaniem oraz wystąpieniem przerzutów do węzłów chłonnych, podczas gdy obniżona ekspresja miR-150 – określanego jako supresor nowotworu, wpływa na zwiększoną produkcję białka mucyny-4, odpowiedzialnego za ruchliwość i przerzuty [196]. Podwyższona ekspresja miRNA-21 prawdopodobnie związana jest z agresywnym typem przewodowego gruczolakoraka trzustki, stymulując jego powstawanie i rozwój. Cząsteczki miR-21 mogą wyciszać szereg genów związanych z procesem nowotworzenia tkankowego inhibitora metaloproteinazy 3 (TIMP3) i czynnika programowanej śmierci komórki 4 – PDCD4 – *programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)* [197]. W powstawaniu i rozwoju nowotworów żołądka obserwuje się obniżoną ekspresję miR-148a, co koreluje z krótszym czasem przeżycia chorych [198]. Obniżona ekspresja miR-146a, dla której celem są mRNA genów IRAK1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 1*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*), odpowiada za proces przerzutów [199]. Kolejna grupa 37 miRNA związana jest z nowotworami piersi, dla 23 rodzajów miRNA obserwuje się wzrost ekspresji, a dla 14 rodzajów miRNA spadek [200]. Trzy cząsteczki o obniżonej ekspresji: miR-10b, miR-125b oraz miR-145 pełnią funkcję supresorów, dwie o podwyższonej ekspresji: miR-21 i miR-155 pełnią funkcję onkogenów. Podobnie w nowotworach szyjki macicy obserwuje się zmienioną ekspresję 70 rodzajów miRNA, z których dla 68 rodzajów udowodniono podwyższoną ekspresję, a dla dwóch: miR-149 i miR-203 obniżoną. Jedną z cząsteczek ulegającą nadekspresji miRNA-127 jest prawdopodobnie odpowiedzialna za tworzenie przerzutów [201]. W nowotworach jelita grubego dla 6 cząsteczek ulegających nadekspresji: miR-21, miR-31, miR-183, miR-17-5p, miR-20a oraz miR-92 i dwóch: miR-21, miR-31 wykazano korelację z rozwojem tego rodzaju nowotworu [202]. Z cząsteczek miRNA o zmienionej ekspresji (obniżonej) w nowotworach złośliwych wątroby bardzo ważną rolę przypisuje się miR-122. Cząsteczki miR-122 biorą aktywny udział w zmniejszaniu

ekspresji genu *ADAM17* (*ADAM metalloproteinase domain 17*), odpowiedzialnego za tworzenie przerzutów oraz aktywność antyapoptotyczną [203]. Ze zmienioną ekspresją miRNA mamy do czynienia w nowotworach głowy i szyi, w tym nowotworach jamy ustnej. Metaanaliza 35 publikacji obejmująca ponad pięć tysięcy osób, przeprowadzona przez Can i wsp. [204], zwróciła uwagę na 28 miRNA ulegających nadekspresji i 11 miRNA o obniżonej ekspresji, z których miR-15a, miR-22, miR-31, miR-451 i miR-1297 miały wysoką wartość diagnostyczną. W kolejnej metaanalizie – obejmującej 15 badań u 1200 osób – przeprowadzonej przez Troiano i wsp. [205], podjęto próbę oceny prognostycznej tkankowych miRNA i korelacji zmian w ekspresji z przeżyciem pacjentów z nowotworami jamy ustnej. Złe rokowanie dla pacjentów związane było z podwyższonymi 9 miRNA (miR-21, miR-455-5p, miR-155-5p, miR-372, miR-373, miR-29b, miR-1246, miR-196a i miR-181) i obniżonymi 7 miRNA (miR-204, miR-101, miR-32, miR-20a, miR-16, miR-17 i miR-125b).

W badaniach [206] celem była analiza udziału miRNA w chorobach przyzębia podczas zapalenia przyzębia i raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Analiza miRNA wykazała, że miR-142-3p, miR-146a, miR-155, miR-203 i miR-223 są najważniejszymi miRNA w chorobach przyzębia i raku płaskonabłonkowym jamy ustnej.

Cząsteczki miRNA były również badane pod kątem możliwości ich wykorzystania jako nieinwazyjnych biomarkerów, oznaczanych w komórkach jamy ustnej pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej [207]. Celem tego badania była analiza ekspresji panelu miRNA w komórkach nabłonkowych zebranych przez szczotkowanie doustne, u pacjentów z nowotworami jamy ustnej, z obszarów regeneracyjnych po zabiegu resekcji guza i w odpowiednio odległej prawidłowej błonie śluzowej. Analiza ekspresji ośmiu miRNA: miR-21, miR-375, miR-345, miR-181b, miR-146a, miR-649, miR-518b i miR-191 wykazała istotne różnice między analizowanymi grupami pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej a zdrowymi osobami, w szczególności dla miR-21 ($F = 6,58$, $p < 0,001$), miR-146a ($F = 6,974$, $p < 0,001$) i miR-191 ($F = 17,07$, $p < 0,001$). Nie zaobserwowano istotnie statystycznych różnic pomiędzy komórkami pobranymi ze zmiany nowotworowej, a normalnymi odległymi komórkami błony śluzowej tego samego pacjenta. Zmienioną ekspresję miR-146a i miR-191 obserwowano w obszarach resekcji zmiany nowotworowej.

W ramach pracy habilitacyjnej przeprowadzono analizę ekspresji miRNA w tkance zmienionej nowotworowo i prawidłowej u pacjentów z nowotworami płaskonabłonkowymi jamy ustnej. Wybrano 6 miRNA o podwyższonej lub obniżonej ekspresji, związanych z procesem nowotworzenia: miR-29a, miR-21, miR-30a, miR-106a, miR-92, miR-30d. Ekspresję badanych miRNA

korelowano ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej lub ze stopniem różnicowania guza. Uzyskane wyniki wykazują korelację zmian w ekspresji (spadek lub wzrost) badanych miRNA ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej czy zróżnicowania guza. Analiza wyników uzyskanych zarówno dla miRNA wykazujących podwyższoną, jak i obniżoną ekspresję skorelowaną ze stopniem zaawansowania choroby, stopniem zróżnicowania guza, wykazała tendencję wzrostową w znaczącej ilości przypadków dla różnych grup pacjentów. Wybrane do badań 6 rodzajów miRNA analizowano również pod kątem genów docelowych, na które potencjalnie działają powstałe podczas transkrypcji mRNA. Dwa z analizowanych miRNA: miR-29a i miR-30a wykazywało homologię do 3'UTR mRNA analizowanych wcześniej genów: *DLGAP1*, *WIF1* (miR-29a – *WIF1*, miR-30a – *DLGAP1*).

Korelacja poziomu ekspresji badanych genów: *DLGAP1*, *WIF1* z miRNA wykazała silną negatywną zależność dla ekspresji miR-30a-5p z ekspresją genu *DLGAP1*, a pozytywną miR-29a z *WIF1* u pacjentów z bardziej zaawansowaną chorobą nowotworową. Badania porównawcze ekspresji miR-30a z ekspresją genu *DLGAP1* wykazały silną negatywną korelację zarówno na poziomie mRNA, jak i białka.

W przeprowadzonych badaniach wykazano znacznie obniżony poziom ekspresji cząsteczki miR-30a-5p w tkankach nowotworowych, pobranych od pacjentów z rakiem jamy ustnej, w porównaniu do zdrowej tkanki nieobjętej procesem nowotworowym. Dalsze badania miały na celu, określić potencjalnie terapeutyczne działanie miR-30a-5p na komórki raka jamy ustnej. Na podstawie analizy bioinformatycznej gen *DLGAP1* kodujący białko GKAP, został określony jako przypuszczalny gen docelowy dla analizowanego miR-30a-5p.

Istnieje pięć białek, produktów translacji genów *DLGAP*: *DLGAP1*–*DLGAP5*, z których *DLGAP1*–*4* związany jest z sygnalizacją neuronalną. Gen *DLGAP1* jest zlokalizowany na chromosomie 18p11.31 i koduje białko GKAP kinazę guanylową, biorącą udział w patofizjologii zaburzeń psychicznych takich jak zaburzenia obsesyjno-kompulsywne, schizofrenia, depresja, choroba Alzheimera, ataksja mózdkowa [208–211]. Białko GKAP wchodzi w interakcję z członkami rodziny klastrowych synaptycznych białek skupiających kanały jonowe PSD95, które z kolei wiążą się bezpośrednio z receptorami N-metylo-D-asparaginanu (NMDA) i kanałami potasowymi typu Shaker [212, 213]. Białko NMDA (receptor N-metylo-D-asparaginowy) jest heterotetramerycznym integralnym białkiem błonowym – receptorem dla glutaminianu, selektywnie aktywowanym przez kwas N-metylo-D-asparaginowy (NMDA). Jest to receptor jonotropowy, występujący w neuronach ośrodkowego układu nerwowego, odpowiadający za procesy uczenia się, zapamiętywania, plastyczność mózgu, regulujący proliferację, migrację neuronów,

powstawanie neuronów z komórek progenitorowych hipokampa, przewodzący kationy sodu (Na^+), potasu (K^+) i wapnia (Ca^{2+}) [214]. Do aktywacji oprócz glutaminianu wymaga przyłączenia glicyny lub seryny. Obecność receptorów NMDAR wykazano na powierzchni komórek rakowych kilku linii komórkowych [215–218]. Nadaktywność receptora NMDAR w komórkach rakowych jest związana ze szlakiem sygnałowym mTOR, wpływając na ich podziały komórkowe, złośliwość, inwazyjność [219–222]. Stepulak i wsp. [215] wykazali możliwość hamowania aktywności receptora NMDAR w komórkach raka płuc przez niekompetycyjnych antagonistów: dizociplinę i memantynę. Antagoniści wiążąc się z receptorem NMDAR, hamowali szlaki sygnałowe aktywowane przez czynniki wzrostu (insulinowy czynnik wzrostu IGF, naskórkowy czynnik wzrostu EGF, czynnik wzrostu fibroblastów FGF) w komórkach raka płuc, wpływając na istotne obniżenie ich aktywności podziałowej. Tego rodzaju korelacja skłoniła autorów publikacji do wniosku, że potencjalne terapie skierowane bezpośrednio na zahamowanie aktywności receptora NMDAR, mogą mieć działanie antyproliferacyjne i nieinwazyjne w stosunku do komórek posiadających na swojej powierzchni tego rodzaju receptory. Istotnym pytaniem wynikającym z przeprowadzonych przez Stepulaka i wsp. badań, na które postanowiono odpowiedzieć w trakcie dalszej realizacji przedstawionej do oceny pracy było, czy białko kinaza guanylowa GKAP kodowane przez gen *DLGAP1* jest zaangażowane w modulację aktywności receptora NMDAR w komórkach raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Rola białka GKAP w szlaku NMDAR w komórkach nowotworowych została przedstawiona w publikacji Li i wsp. [223]. Autorzy wykazali, że białko GKAP wraz z białkami szoku cieplnego HSF1 (*heat shock factor*), FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) stanowią białka rusztowania receptora NMDAR. W badaniach *in vitro*, *in vivo* na modelu nowotworu trzustki wykazali ich rolę w inwazyjności komórek nowotworowych.

Ekspresja genu *DLGAP1* na poziomie białka GKAP, analizowana na modelu mysim raka trzustki, jest wyższa w komórkach inwazyjnych nowotworu w porównaniu z nieinwazyjnymi. Wyciszenie genu kodującego białko GKAP w badaniach na modelu wysoce inwazyjnego raka trzustki skutkuje zmniejszoną fosforylacją białka NMDAR, co przekłada się na obniżenie jego aktywności sygnalizacyjnej. W kolejnym badaniu Li i wsp. [224] wykorzystując narzędzia bioinformatyczne, analizowali rolę białka GKAP w nowotworach żołądka. Analizowano wszystkie formy genu *DLGAP*. Wykazano podwyższoną ekspresję wszystkich genów, z wyjątkiem *DLGAP3*, skorelowaną z czasem przeżycia u wszystkich badanych pacjentów z nowotworami żołądka. Szczególną uwagę zwrócono na gen *DLGAP4*, którego wysoka ekspresja na poziomie mRNA białka, korelowała z krótszym czasem przeżycia pacjentów, wskazując na jego

istotną rolę w powstawaniu i rozwoju nowotworów żołądka. Young i wsp. [225] w badaniach *in vivo* wykorzystując model zwierzęcy *Apc⁺/min*, zaobserwowali, że brak ekspresji *Dlg1*, *DLGAP1* sprzyjał rozwojowi nowotworów jelita, zmniejszał przeżycie u myszy *Apc⁺/min*, potwierdzając jego rolę jako genu supresorowego nowotworu w jelicie. Zmniejszenie ekspresji *Dlg1* prowadzi do opóźnienia przechodzenia komórek przez kryptę jelitową. W innych badaniach dotyczących nowotworów skóry – czerniaków – analizowano 108 polimorfizmów sekwencji nukleotydowej genów u 891 pacjentów pod kątem możliwości diagnozowania osobniczych predyspozycji do rozwoju tego nowotworu [226]. Przeprowadzone analizy wykazały istotne statystycznie korelacje odpowiednich wariantów genotypów w dwóch polimorfizmach badanych genów: rs7538876 genu *RCC2* (*telophase disk protein*) i rs9960018 *DLGAP1*, z przeżyciem pacjentów bez nawrotów choroby, wskazując na możliwość wykorzystania badań w ocenie ryzyka zachorowania na ten rodzaj nowotworu.

W badaniach przeprowadzonych przez Kwiatkowskiego i wsp. [227], wykazano negatywny wpływ produktu translacji genu *DLGAP1* na szybkość wzrostu komórek krwiotwórczych, zależnych od białka MPL (receptor dla trombopoetyny) i poliploidyzację megakariocytów.

Na podstawie uzyskanych wyników autorzy badań sugerują rolę produktu białkowego genu *DLGAP1* jako nowego, silnego czynnika wpływającego na sygnalizację związaną z białkiem MPL w obrębie kaskady JAK-STAT, wzrost i różnicowanie megakariocytów, najprawdopodobniej istotnego w rozwoju MPN (nowotwór mieloproliferacyjny ang. *Myeloproliferative Neoplasm*).

W pracy Zheng i wsp. [228] analizowano regulacyjną rolę układu: długie niekodujące cząsteczki RNA – lncRNA HOTAIR/miR-146a/gen *DLGAP1* na wzrost, ruchliwość oraz inwazyjność komórek nowotworowych guza głowy i szyi *in vitro*. Nadekspresja długich ponad 200pz cząsteczek lnc RNA HOTAIRM1 w komórkach nowotworowych regulowała ich proliferację, migrację, inwazję. Wykazano, wykorzystując system Dual-luciferase reporter assay, że cząsteczki lnc RNA HOTAIRM1 mają miejsce wiązania na cząsteczkach miR-146a, z kolei cząsteczki miR-146a na genie *DLGAP1*. Cząsteczki lnc RNA HOTAIRM1 wiążąc się z miR-146a, zmniejszały jego ilość, a w ten sposób zwiększały ekspresję genu docelowego *DLGAP1*. Potwierdzono rolę supresorową cząsteczek lnc RNA HOTAIRM1, które wiążąc się z miR-146a, wpływały na ekspresję genu *DLGAP1* w komórkach nowotworowych guza głowy i szyi.

W kolejnym etapie przedstawianej pracy postanowiono sprawdzić, analizując drogę sygnałową miR-30a-5p/*DLGAP1*/NMDAR2B, na ile wybrana cząsteczka miRNA faktycznie ma możliwość potranskrypcyjnego wyciszenia ekspresji genu *DLGAP1* oraz czy knockdown genu *DLGAP1* będzie miał terapeutyczne – antynowotworowe działanie na komórki raka jamy ustnej.

W rejonie 3'UTR genu *DLGAP1* znajdują się dwa potencjalne miejsca wiązania miR-30a-5p. Fragmenty 53 nukleotydowe zawierające potencjalne miejsca wiązania cząsteczki miR-30a-5p, sklonowano w wektorze pmirGLO opartym na systemie lucyferazowym. Rekombinowanymi plazmidami razem z cząsteczkami miR-30a-5p, transfekowano komórki SCC-25. Analiza względnej aktywności lucyferazy wykazała spadek aktywności dla obu miejsc potencjalnego wiązania 1 i 2. Większy spadek obserwowano dla miejsca 1 w porównaniu z 2, co może świadczyć o większej specyficzności wiązania do miejsca.

Spadek aktywności był największy w przypadku kotransfekcji komórek SCC-25 dwoma plazmidami 1 i 2, co świadczy o możliwości przyłączenia cząsteczek miR-30a-5p w obu miejscach w rejonie 3'UTR genu *DLGAP1* równocześnie. Analiza ekspresji potencjalnego genu docelowego dla miR-30a-5p *DLGAP1* po transfekcji komórek SCC-25 miR-30a-5p wykazała, że ulega zmianie. Po transfekcji komórek miR-30a-5p stwierdzono obniżenie ekspresji genu *DLGAP1* w przypadku mRNA o 12%, jego produktu białkowego – białka GKAP o 83% (ryc. 35, 36). Transfekcja komórek SCC-25 cząsteczkami miR-205a-5p (gen *DLGAP1* nie posiada miejsc wiązania tej cząsteczki) nie wpłynęła na zmianę ekspresji genu *DLGAP1* zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji.

W komórkach linii komórkowej ludzkiego nowotworu jamy ustnej SCC-25 potwierdzono na poziomie mRNA białka ekspresję na ich powierzchni receptora NMDAR2B. Transfekcja komórek SSC-25 cząsteczką miR-30a-5p wpłynęła na zmianę ekspresji genu receptora NMDAR2B zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, powodując obniżenie odpowiednio o 35% ilości mRNA, 26% białka, podczas gdy transfekcja komórek SCC-25 cząsteczkami miR-205a-5p nie wpłynęła na zmianę ekspresji genu kodującego receptor NMDAR2B zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji.

Wpływ wyciszania genu *DLGAP1* przez cząsteczki miR-30a-5p w transfekowanych komórkach SCC-25 na proliferację komórek rakowych badano przy użyciu testu MTT cytometrii przepływowej. Uzyskane wyniki wskazują na spadek ilości zdolnych do przeżycia komórek po transfekcji miR-30a-5p odpowiednio 30% po 12 godz., 61% po 24 godz. Przeprowadzona analiza cytometryczna wykazała różnice pomiędzy liczbą komórek apoptotycznych w komórkach nietransfekowanych i transfekowanych miR-30a-5p. Uzyskane wyniki wskazują na istotne zmiany w rozkładzie komórek żywych jak i wchodzących w proces apoptozy po transfekcji cząsteczkami miR-30a-5p. Zaobserwowano również zasadnicze różnice w cyklu komórkowym, prowadzące do jego hamowania. Przeprowadzone badania wskazują na udział cząsteczek miR-30a-5p, które wiążąc się z rejonem 3'UTR genu *DLGAP1*, wpłynęły na ilość receptora NMDAR2B w błonie komórek nowotworowych raka jamy ustnej SCC-25, a w konsekwencji na ich liczbę.

Poznanie funkcjonowania ścieżki sygnałowej miR-30a-5p-/DLGAP1/-NMDAR2B oraz jej roli w rozwoju nowotworów jamy ustnej, niewątpliwie przyczyni się do pogłębienia wiedzy i większego zrozumienia patogenezы raka jamy ustnej, możliwego praktycznego zastosowania w diagnostyce przeciwnowotworowej, a być może w przyszłości zaowocuje w terapii przeciwnowotworowej, przyczyniając się do powstania nowych leków w leczeniu tego rodzaju nowotworów.

ROZDZIAŁ 14

WNIOSKI

- Profil metylacji dla genów *DLGAP1*, *WIF1* w tkance zmienionej nowotworowo jest różny w porównaniu ze zmianami przednowotworowymi czy tkanką nieobjętą procesem nowotworowym pacjentów z nowotworami jamy ustnej.
- Stopień metylacji analizowanych genów *DLGAP1*, *WIF1* jest skorelowany z ich ekspresją na poziomie transkrypcji, translacji.
- Analiza miejsc polimorficznych (SNP) w genach *DLGAP1*, *WIF1* nie wykazała istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów, alleli i nie jest skorelowana z ekspresją badanych genów zarówno na poziomie mRNA i białka.
- Analiza ekspresji panelu miRNA w tkance zmienionej nowotworowo i odpowiadającej jej tkance prawidłowej pacjentów z nowotworami jamy ustnej pozwoliła na wyodrębnienie kilku miRNA, w tym miR-30a-5p, potencjalnie związanych z procesem nowotworowym jamy ustnej.
- Analiza komputerowa miR-30a-5p pozwoliła na wyodrębnienie kilku genów docelowych i miejsc potencjalnego wiązania dla cząsteczek miR-30a-5p, w tym genu analizowanego *DLGAP1*.
- Przeprowadzona analiza komputerowa wykazała możliwość wiązania się cząsteczki miR-30a-5p z dwoma sekwencjami zlokalizowanymi w rejonie 3'UTR genu *DLGAP1*.
- Transfekcja komórek nowotworowych SCC-25 cząsteczkami miR-30a-5p spowodowała obniżenie ekspresji genu *DLGAP1* i receptora NMDAR2 zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji.
- Wybrana cząsteczka miR-30a-5p ma możliwość potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genu *DLGAP1* i pośrednio genu receptora NMDAR2, wykazując w ten sposób prawdopodobnie pozytywne – antynowotworowe działanie w komórkach raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.

ROZDZIAŁ 15

STRESZCZENIE

Coraz większa liczba chorych, u których rozpoznaje się chorobę nowotworową, jest powodem do poszukiwania coraz to nowszych, skutecznych metod leczenia. Poznanie podłoża molekularnego transformacji nowotworowej, uwzględniając różne typy nowotworów, jest warunkiem prawidłowego rozpoznania i leczenia chorób nowotworowych. Nowotwory głowy i szyi (HNSCC) stanowią co najmniej 5% wszystkich nowotworów złośliwych w Polsce. Nowotwory złośliwe jamy ustnej i wargi doprowadzają do zgonów u około 3% mężczyzn i 1% kobiet. Ryzyko zgonu z powodu nowotworów jamy ustnej wzrasta z wiekiem u mężczyzn, osiągając maksimum na przełomie siódmej i ósmej dekady życia. Częstość zgonów w Polsce z powodu nowotworów wargi, jamy ustnej i gardła jest znacznie wyższa niż przeciętna dla krajów Europy. Obok czynników egzogennych coraz większą uwagę zwraca się na czynniki endogenne, w tym uwarunkowania genetyczne takiego rodzaju jak mutacje w genach supresorowych (*RB1*, *ATM*, *TP53*, *BRCA1*), onkogenach (*c-fos*, *HER2/neu*, *c-jun*), genach związanych z naprawą DNA (*XPB*, *OGG1*, *RAD51*, *XRCC1*) czy genach enzymów biorących udział w metabolizmie ksenobiotyków (*GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1*).

Celem pracy była analiza ekspresji genów zaangażowanych w proces kancerogenezy nowotworów jamy ustnej z uwzględnieniem czynników epigenetycznych, które mogą wpływać na ilość powstającego mRNA białka – produktów transkrypcji, translacji tych genów. Badania wykonano na blochkach parafinowych z utrwalonym materiałem, który pochodził od pacjentów z leukoplakią i pacjentów ze zmianami nowotworowymi jamy ustnej. W pierwszym etapie badań wybrano 16 genów, pełniących w organizmie rolę genów supresorowych, protoonkogenów, w celu analizy stopnia ich metylacji, u 20 pacjentów z leukoplakią i 120 ze zmianami nowotworowymi. Kontrolę, dla tkanki zmienionej przednowotworowo lub nowotworowo, każdorazowo stanowiła tkanka nieobjęta zmianami. Do analiz wybrano geny: *CDKN2B*, *ATM*, *TIMP3*, *APC*, *CDKN2A*, *MLH1*, *RARB*, *CHFR*, *DLGAP1*, *C2orf40*, *GPX3*, *CDKN1B*, *EPB41L3*, *TP73*, *CDH13*, *WIF1*. Genami, które najczęściej ulegały metylacji w badanej grupie były: *WIF1* (46,6%), *GPx* (41,6%), najrzadziej: *CHFR* (1,6%), *CDK1B* (1,6%). W przypadku genu *DLGAP1* zaobserwowano obniżenie metylacji w stosunku do tkanki prawidłowej (–35,8%) – hypometylację.

U pacjentów z leukoplakią procent metylacji analizowanych genów pozostawał na niskim poziomie (poniżej 10%). Dokonano porównania stopnia metylacji analizowanych genów z klinicznym zaawansowaniem choroby. Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istotnie statystyczną korelację stopnia metylacji badanych genów z klinicznym stopniem zaawansowania choroby TNM tylko w przypadku genu *DLGAP1*. Analizowane geny wykazywały zróżnicowany stopień metylacji, jeżeli chodzi o stopień złośliwości nowotworu. Wyższą częstość metylacji dla stopnia złośliwości nowotworu G1 względem G2 wykazywały geny: *RAR β* , *APC*, *CHFR*, a niższą częstość geny: *TIMP3*, *DLGAP1*, *C2orf40*, *GPX3*, *CDKN1B*, *EPB41L3*, *CDH13*, *WIF1*. Dalszą analizę przeprowadzono dla wybranych genów *DLGAP1* i *WIF1*. Przeprowadzone analizy wykazały, że ocena stopnia metylacji (hiper, hypometylacji) analizowanych genów może być potencjalnie przydatna w ocenie stopnia złośliwości nowotworu G1, G2. Kolejny etap badań stanowiła analiza ekspresji genów *DLGAP1*, *WIF1* na poziomie mRNA białka u pacjentów z leukoplakią i płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej. Zmiany w ekspresji badanych genów obserwowano zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Wzrost ekspresji genu *DLGAP1* obserwowano zarówno u chorych z leukoplakią, jak i chorych z różnym stopniem złośliwości nowotworu. Analiza ekspresji genu *WIF1* wykazała odwrotną korelację. W badanych genach *DLGAP1* i *WIF1* u pacjentów z leukoplakią i zmianami nowotworowymi przeprowadzono analizę kilku polimorfizmów pojedynczego nukleotydu. Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnej statystycznie częstości występowania określonych genotypów, alleli w analizowanych polimorfizmach SNP genu *DLGAP1*, *WIF1* w tkance prawidłowej w porównaniu z leukoplakią, czy tkanką zmienioną nowotworowo. Nie wykazano korelacji pomiędzy określonymi genotypami, allelami genu a stężeniem białka zarówno w tkance nowotworowej, leukoplakii, jak i prawidłowej.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę ekspresji miRNA w tkance zmienionej nowotworowo i prawidłowej pacjentów z nowotworami jamy ustnej. Wybrano 6 miRNA o podwyższonej lub obniżonej ekspresji, a związanych z procesem nowotworzenia: miR-29a, miR-21, miR-30a, miR-106a, miR-92, miR-30d. Ekspresję badanych miRNA korelowano ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej lub ze stopniem różnicowania guza. Uzyskane wyniki wykazują korelację zmian w ekspresji (spadkiem czy wzrostem) badanych miRNA ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej czy zróżnicowaniem guza. Analiza wyników uzyskanych zarówno dla miRNA wykazujących podwyższoną, jak i obniżoną ekspresję skorelowaną ze stopniem zaawansowania choroby, stopniem zróżnicowania guza, wykazała tendencję wzrostową w ilości przypadków dla różnych grup pacjentów. Wybrane do badań 6 rodzajów

miRNA analizowano pod kątem genów docelowych, na których mRNA potencjalnie działają. Dwa z analizowanych miRNA: miR-29a i miR-30a, wykazywały homologię do 3'UTR mRNA analizowanych wcześniej genów: *DLGAP1*, *WIF1* (miR-29a – *WIF1*, miR-30a – *DLGAP1*).

Korelacja poziomu ekspresji badanych genów: *DLGAP1*, *WIF1* z miRNA wykazała silną negatywną zależność dla ekspresji miR-30a-5p z ekspresją genu *DLGAP1*, a pozytywną miR-29a z *WIF1* u pacjentów z bardziej zaawansowaną chorobą nowotworową. Badania porównawcze ekspresji miR-30a z ekspresją genu *DLGAP1* wykazały silną negatywną korelację zarówno na poziomie mRNA, jak i białka.

W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy habilitacyjnej, na tkankach nowotworowych pobranych od pacjentów z rakiem jamy ustnej, wykazano znacznie obniżony poziom ekspresji cząsteczki miR-30a-5p w porównaniu do zdrowej tkanki nieobjętej procesem nowotworowym. Dalsze badania miały na celu określić potencjalnie terapeutyczne działanie miR-30a-5p na komórki raka jamy ustnej. Na podstawie analizy bioinformatycznej gen *DLGAP1* kodujący białko GKAP został określony jako przypuszczalny gen docelowy dla analizowanego miR-30a-5p. W rejonie 3'UTR genu *DLGAP1* znajdują się dwa potencjalne miejsca wiązania miR-30a-5p. Fragmenty 53 nukleotydowe zawierające potencjalne miejsca wiązania cząsteczki miR-30a-5p, sklonowano w wektorze pmirGLO opartym na systemie lucyferazowym. Rekombinowanymi plazmidami razem z cząsteczkami miR-30a-5p transfekowano komórki SCC-25. Analiza względnej aktywności lucyferazy wykazała spadek aktywności dla obu miejsc potencjalnego wiązania 1 i 2. Większy spadek obserwowano dla miejsca 1 w porównaniu z 2, co może świadczyć o większej specyficzności wiązania do miejsca 1. Spadek aktywności był największy w przypadku transfekcji komórek SCC-25 dwoma plazmidami 1 i 2, co świadczy o możliwości przyłączenia cząsteczek miR-30a-5p w obu miejscach w rejonie 3'UTR genu *DLGAP1* równocześnie.

Analiza ekspresji potencjalnego genu docelowego dla miR-30a-5p *DLGAP1*, po transfekcji komórek SCC-25 miR-30a-5p, wykazała, że ulega zmianie. Po transfekcji komórek miR-30a-5p stwierdzono obniżenie ekspresji genu *DLGAP1* w przypadku mRNA o 12%, jego produktu białkowego – białka GKAP o 83% (ryc. 29, 30). Transfekcja komórek SCC-25 cząsteczkami miR-205a-5p (gen *DLGAP1* nie posiada miejsc wiązania) nie wpłynęła na zmianę ekspresji genu *DLGAP1* zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji.

W komórkach linii komórkowej ludzkiego nowotworu jamy ustnej SCC-25 potwierdzono na poziomie mRNA i białka ekspresję na ich powierzchni receptora NMDAR2B. Transfekcja komórek SCC-25 cząsteczką miR-30a-5p wpłynęła na zmianę ekspresji genu receptora NMDAR2B zarówno

na poziomie mRNA, jak i białka, powodując obniżenie odpowiednio o 35% ilości mRNA, 26% białka, podczas gdy transfekcja komórek SCC-25 cząsteczkami miR-205a-5p nie wpłynęła na zmianę ekspresji genu kodującego receptor NMDAR2B zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji.

Wpływ wyciszania genu *DLGAP1* przez cząsteczki miR-30a-5p w transfekowanych komórkach SCC-25 na proliferację komórek rakowych badano przy użyciu testu MTT i cytometrii przepływowej. Uzyskane wyniki wskazują na spadek ilości zdolnych do przeżycia komórek po transfekcji miR-30a-5p odpowiednio: 30% po 12 godz., 61% po 24 godz.

Poznanie funkcjonowania ścieżki sygnałowej miR-30a-5p-/*DLGAP1*/-NMDAR2B oraz jej roli w rozwoju nowotworów jamy ustnej niewątpliwie może przyczynić się do pogłębienia wiedzy na temat patogenezy raka jamy ustnej.

Wyniki otrzymane w ramach tej pracy stwarzają szanse wyznaczenia nowego kierunku diagnostycznego dla płaskonabłonkowych nowotworów jamy ustnej.

BIBLIOGRAFIA

1. Adegboyega PA, Boromound N, Freeman D: Diagnostic utility of cell cycle and apoptosis regulatory. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005; 13: 171–177. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.pai.0000132190.39351.9b>
2. Ahmed Z, Bicknell R: Angiogenic signaling pathways. *Methods Mol Biol.* 2009; 467: 3–24. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-241-0_1
3. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T: Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005; 120(4): 483. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001>
4. Hamara K, Bielecka-Kowalska A et al.: Alterations in expression profile of iron-related genes in colorectal cancer. *Mol. Biol. Rep.* 2013; 40(10): 5573–5585. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2659-3>
5. Barallo-Gimeno A, Nieto MA: The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 2005; 132: 3151–3161. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.01907>
6. Bartkowski SB, Kurek M, Panaś M, Podziorny H, Serwatka F, Stypulkowska J, Zapała J: *Chirurgia szczękowo-twarzowa.* Collegium Medicum. Kraków 1996.
7. Bierie B, Moses HL: Tumour microenvironment: TGFβ: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(7): 506–520. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc1926>
8. Auten RL, Davis JM: Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr Res.* 2009; 66(2): 121. DOI: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181a9eafb>
9. Kowalski M, Bielecka-Kowalska A et al.: Myeloperoxidase gene (MPO) polymorphisms in patients with age-related macular degeneration (AMD). *Clin. Exp. Med. Lett.* 2010; 51(1): 15–19.
10. Bielecka-Kowalska A, Majsterek I et al.: The function of the oxidative stress enzymes in patients with the periodontal diseases. *Clin. Exp. Med. Lett.* 2008; 49(4): 229–233.
11. Chen K-M: Mechanisms of oral carcinogenesis induced by dibenzo[a,l]pyrene: an environmental pollutant and a tobacco smoke constituent. *Int J Cancer.* 2013; 133(6): 1300–1309. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.28152>

12. Friedberg EC, Walker GC: DNA Repair and mutagenesis. Am. Soc. for Microb., Washington, DC 1995.
13. Carnelio S, Khan SA, Rodrigues GS: Free radicals and antioxidant therapy in clinical practice: to be or not to be? J Coll Physicians Surg Pak. 2007; 17(3): 173–174.
14. Green FL, Page DL, Fleming ID: American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. Springer, New York 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3656-4>
15. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. Cell. 2000; 100(1): 57–100. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
16. Farah CS et al.: Oral cancer and oral potentially malignant disorders. Int J of Dent. 2014; artID 853479, p6. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/853479>
17. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH: The molecular biology of head and neck cancer. Nat Rev Cancer. 2011; 11(1): 9. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc2982>
18. Feron O: Pyruvate in to lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. Radither Oncol. 2009; 92(3): 329–333. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.025>
19. Perona R: Cell signaling: growth factors and tyrosine kinase receptors. Clin Transl Oncol. 2006; 8(2): 77–82. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12094-006-0162-1>
20. Pu X, Lippman SM, Yang H, Lee JJ, Wu X: Cyclooxygenase-2 gene polymorphisms reduce the risk of oral premalignant lesions. Cancer. 2009; 115(7): 1498–1506. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.24157>
21. Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Tohara S, Suzuki R: The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. J Immunol. 2002; 169(5): 2643–2647. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2643>
22. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA: Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. J Dent Res. 2009; 88(4): 300. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034509333371>
23. Hosseinpour S, Mashhadiabbas F, Ahsaie MG: Diagnostic biomarkers in oral verrucous carcinoma: A systematic review. Pathol Oncol Res. 2017; 23(1): 19–32. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0150-x>
24. Elliot MR, Ravichandran KS: Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. J Cell Biol. 2010; 189(7): 1059. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201004096>

25. St. John MA, Li Y, Zhou X et al.: Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130(8): 929–935. DOI: <https://doi.org/10.1001/archotol.130.8.929>
26. Kroemer G, Pouyssegur J: Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 2008; 13(6): 472–482. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.005>
27. Leivo I: Insights into a complex group of neoplastic disease: advances in histopatologic classification and molecular pathology of salivary gland cancer. *Acta Oncol.* 2006; 45(6): 662. DOI: <https://doi.org/10.1080/02841860600801316>
28. Sculy C, Bagan J: Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009; 15(6): 388–399. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01563.x>
29. Parkin MD, Bray F et al.: Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(2): 74–108. DOI: <https://doi.org/10.3322/canjclin.55.2.74>
30. Gale N, Zidar N: Benign and potentially malignant lesions of the squamous epithelium and squamous cell carcinoma. [in] Cardesa A, Slootweg PJ (eds): *Pathology of the Head Neck*. Springer, 2006; Ch.1: 1–38. DOI: https://doi.org/10.1007/3-540-30629-3_1
31. Quail G: Atypical facial pain--a diagnostic challenge. *Aust Fam Physician.* 2005; 34(8): 729–730.
32. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA: The cancer genome. *Nature.* 2009; 458(7239): 719–724. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature07943>
33. Kryst L i wsp.: *Chirurgia szczękowo-twarzowa*. WL PZWL, Warszawa 2011.
34. Li Y, St. John MA, Show X et al.: Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(24): 8442–8450. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1167>
35. Ha PK, Chang SS, Glazer CA, Califano JA, Sidransky D: Molecular techniques and genetic alternations in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2009; 45 (4–5): 335–339. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.05.015>
36. Fritz A, Percy C, Jack A: *International Clasification of Diseases for Oncology*. Ed. 3 World Health Organization, Geneva 2000.
37. Ghabanchi J, Fattahi MJ, Mardani M: Polymorphism of tumor protein p53 codon 72 showed no association with oral lichen planus in Shiraz, Iran. *J Craniofac Surg.* 2009; 20(6): 2168–2170. DOI: <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e3181bf015e>

38. Kumar V, Abbas AK, Aster JC: Robbins basic pathology. Saunders an im. of Elsevier Inc. 2013.
39. Silberstein SD, Lipton RB, Dalessio DJ: Wolff's Headache and other Head Pain, W XVII: 521–522. Oxford University Press, New York 2001.
40. Goodman M, Liu L, Ward K: Invasion characteristics of oral tongue cancer: frequency of reporting and effect on survival in a population-based study. *Cancer*. 2009; 115(17): 4010–4020. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.24459>
41. Coghlin C, Murray GI: Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J Pathol*. 2010; 222(1): 1–15. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.2727>
42. Ciccio A, Elledge SJ: The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010; 40(2): 179–204. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
43. Collado M, Serrano M: Senescence in tumours: evidence form mice and humans. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(1): 51–57. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc2772>
44. Burkhardt DL, Sage J: Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(9): 671–682. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc2399>
45. Kowalski M, Bielecka-Kowalska A et al.: Myeloperoxidase gene (MPO) polymorphisms in patients with age-related macular degeneration (AMD). *Int Rev Allergol Clin Immunol*. 2010; 16(1/2): 26–31.
46. Krajowy Rejestr Nowotworów 2010, <http://onkologia.org.pl>
47. Fovel LM, Seabury RW, Miller CD, Darko W, Probst LA, Horvath L: Safety and efficacy of direct oral anticoagulant therapy in patients with cancer. *J Pharm Pract*. 2019; 31: 897190019896500. DOI: <https://doi.org/10.1177/0897190019896500>
48. Chi AC, Day TA, Neville BW: Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65(5): 401–421. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21293>
49. Kruk-Zagajewska A, Wierzbicka M: Rak języka i dna jamy ustnej – rozpoznawanie i postępy w leczeniu. *Współcz. Onkol*. 2003; 7(4): 264–274.
50. Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K: Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2003; 32(2): 114–120. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2003.00086.x>
51. Harris CC: P 53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science*. 1993; 262(5142): 198–1981. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.8266092>

52. Artandi SE, DePitho RA: Telomers and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1): 9–18. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp268>
53. Ow TJ, Myers JN: Current management of advanced resectable oral cavity squamous cell carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2011; 4(1): 1–10. DOI: <https://doi.org/10.3342/ceo.2011.4.1.1>
54. Mydlarz WK, Hennessey PT, Califano JA: Advances and perspectives in the molecular diagnosis of head and neck cancer. *Expert Opin Med Diagn*. 2010; 4(1): 53–65. DOI: <https://doi.org/10.1517/17530050903338068>
55. Ambatipudi S, Bhosale PG, Heath E, Pandey M, Kumar G, Kane S, Patil A, Maru GB, Desai RS, Watt FM, Mahimkar MB: Downregulation of keratin 76 expression during oral carcinogenesis of human, hamster and mouse. *PLoS One*. 2013; 8(7): e70688. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070688>
56. Boldrup L, Coates PJ, Gu X, Nylander K: DeltaNp63 isoforms regulate CD44 and keratins 4, 6, 14 and 19 in squamous cell carcinoma of head and neck. *J Pathol*. 2007; 213(4): 384–391. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.2237>
57. Fillies T, Werkmeister R, Packeisen J, Brandt B, Morin P, Weingart D, Joos U, Buerger H: Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer*. 2006; 6: 10. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-10>
58. Gires O, Mack B, Rauch J, Matthias C: CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 343(1): 252–259. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.139>
59. Karantza V: Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*. 2011; 30(2): 127–138. DOI: <https://doi.org/10.1038/onc.2010.456>
60. Ohkura S, Kondoh N, Hada A, Arai M, Yamazaki Y, Sindoh M, Takahashi M, Matsumoto I, Yamamoto M: Differential expression of the keratin-4, -13, -14, -17 and transglutaminase 3 genes during the development of oral squamous cell carcinoma from leukoplakia. *Oral Oncol*. 2005; 41(6): 607–613. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.01.011>
61. Toyoshima T, Vairaktaris E, Nkenke E, Schlegel KA, Neukam FW, Ries J: Cytokeratin 17 mRNA expression has potential for diagnostic marker of oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008; 134(4): 515–521. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0308-8>
62. Khanom R, Sakamoto K, Pal SK, Shimada Y, Morita K, Omura K, Miki Y, Yamaguchi A: Expression of basal cell keratin 15 and keratin 19 in oral squamous neoplasms represents diverse pathophysiologies. *Histol Histopathol*. 2012; 27(7): 949–959.

63. Mikami T, Cheng J, Maruyama S, Kobayashi T, Funayama A, Yamazaki M, Adeola HA, Wu L, Shingaki S, Saito C, Saku T: Emergence of keratin 17 vs. loss of keratin 13: their reciprocal immunohistochemical profiles in oral carcinoma in situ. *Oral Oncol.* 2011; 47(6): 497–503. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.03.015>
64. Sakamoto K, Aragaki T, Morita K, Kawachi H, Kayamori K, Nakanishi S, Omura K, Miki Y, Okada N, Katsube K, Takizawa T, Yamaguchi A: Down-regulation of keratin 4 and keratin 13 expression in oral squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia: a clue for histopathogenesis. *Histopathology.* 2011; 58(4): 531–542. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03759.x>
65. Bragulla HH, Homberger DG: Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat.* 2009; 214(4): 516–559. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>
66. Moll R, Divo M, Langbein L: The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129: 705–733. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6>
67. Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G: p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(9): a004887. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004887>
68. Wysocka-Dubielecka KM, Majewski S, Łoza K: The role of p63 proteins in tumorigenesis and the significance of their expression in the diagnosis of skin and female genital tract neoplasms. *Przegl Dermatol.* 2015; 102(6): 550–557. DOI: <https://doi.org/10.5114/dr.2015.55706>
69. Supsavhad W, Dirksen WP, Martin CK, Rosol TJ: Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. *Vet J.* 2016; 210: 7–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.11.006>
70. Sinha A, Chandra S, Raj V, Zaidi I, Saxena S, Dwivedi R: Expression of p63 in potentially malignant and malignant oral lesions. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2015; 5(3): 165–172. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.07.001>
71. Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D, Yang A, McKeon F, Jacks T: Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell.* 2005; 7(4): 363–373. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.02.019>
72. Nasser W, Flechtenmacher C, Holzinger D, Hofele C, Bosch FX: Aberrant expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as basic biomarker for

- malignant progression of oral leukoplakias. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40(8): 629–635. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2011.01026.x
73. Ausoni S, Boscolo-Rizzo P, Singh B, Da Mosto MC, Spinato G, Tirelli G, Spinato R, Azzarello G: Targeting cellular and molecular drivers of head and neck squamous cell carcinoma: current options and emerging perspectives. *Cancer Metastasis Rev.* 2016; 35(3): 413–426. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9625-1>
74. Padhi SS, Roy S, Kar M, Saha A, Roy S, Adhya A, Baisakh M, Banerjee B: Role of CDKN2A/p16 expression in the prognostication of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2017; 73: 27–35. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2017.07.030
75. Koprowska K, Czyż M: Molekularne mechanizmy działania partenolidu – stary lek z nową twarzą. *Postępy Hig Med Dośw.* 2010; 64: 110–114.
76. Esteller M: CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002; 21(35): 5427–5440. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205600>
77. Gissi DB, Gabusi A, Servidio D, Cervellati F, Montebugnoli I: Predictive Role of p53 protein as a single marker or associated with ki67 antigen in oral leukoplakia: a retrospective longitudinal study. *Open Dent J.* 2015; 9: 41–45. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874210601509010041>
78. Courthod G, Franco P, Palermo L, Pisconti S, Numico G: The role of microRNA in head and neck cancer: current knowledge and perspectives. *Molecules.* 2014; 19(5): 5704–5716. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules19055704>
79. Saintigny P, Foy JP, Ferrari A, Cassier P, Viari A, Puisieux A: [Contribution and challenges of Big Data in oncology]. *Bull Cancer.* 2017; 104(3): 281–287. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2016.10.020>
80. Better Outcomes with Precision Medicine. *Cancer Discov.* 2016; 6: 1296–1297. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2016-134>
81. Machiels JP, Coulie PG: The promise of immunostimulatory antibodies in head and neck cancer. *Lancet Oncol.* 2016; 17(7): 856–857. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30106-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30106-1)
82. Machiels JP, Coulie PG: The promise of immunostimulatory antibodies in head and neck cancer. *Lancet Oncol.* 2016; 17(7): 856–857. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30106-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30106-1)
83. Wong K, Delaney GP, Barton MB: Evidence-based optimal number of radiotherapy fractions for cancer: A useful tool to estimate radiotherapy demand. *Radiother Oncol.* 2016; 119(1): 145–149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.12.001>

84. de Jong MC, Ten Hoeve JJ, Grenman R, Wessels LF, Kerkhoven R, Te Riele H et al.: Pretreatment microRNA expression impacting on epithelial-to-mesenchymal transition predicts intrinsic radiosensitivity in head and neck cancer cell lines and patients. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(24): 5630–5638. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0454>
85. Dumitrescu RG: Epigenetic markers of early tumor development. *Methods Mol Biol.* 2012; 863: 3–14. DOI: 10.1007/978-1-61779-612-8_1
86. Esteller M: CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002; 21(35): 5427–5440. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205600>
87. Pergol P, Nowak-Stępowaska A, Drela K, Padzik-Graczyk A: Znaczenie komórek macierzystych w inicjacji i rozwoju nowotworów. *Postępy Biochem.* 2013; 59: 45–52.
88. Skinner HD, Giri U, Yang L, Woo SH, Story MD, Pickering CR et al.: Proteomic profiling identifies PTK2/FAK as a driver of radioresistance in HPV negative head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2016; 22: 4345–4350. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2785>
89. Rooper LM, Windon MJ, Hernandez T, Miles B, Ha PK, Ryan WR, Van Zante A, Eisele DW, D'Souza G, Fakhry C, Westra WH: HPV-positive squamous cell carcinoma of the larynx, oral cavity, and hypopharynx: clinicopathologic characterization with recognition of a novel warty variant. *Am J Surg Pathol.* 2020; 44(5): 691–702. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001433
90. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebbersold DM: Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer.* 2001; 92(4): 805–813. DOI: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010815\)92:4<805::AID-CNCR1386>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010815)92:4<805::AID-CNCR1386>3.0.CO;2-9)
91. Mirghani H, Amen F, Blanchard P, Moreau F, Guigay J, Hartl DM et al.: Treatment de-escalation in HPV-positive oropharyngeal carcinoma: ongoing trials, critical issues and perspectives. *Int J Cancer.* 2015; 136(7): 1494–1503. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.28847>
92. Masterson L, Moualed D, Liu ZW, Howard JE, Dwivedi RC, Tysome JR et al.: De-escalation treatment protocols for human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of current clinical trials. *Eur J Cancer.* 2014; 50(15): 2636–2648. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.07.001>
93. Eschrich SA, Pramana J, Zhang H, Zhao H, Boulware D, Lee JH et al.: A gene expression model of intrinsic tumor radiosensitivity: prediction

- of response and prognosis after chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009; 75(2): 489–496. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.06.014>
94. Liao CT, Chang JT, Wang HM, Ng SH, Hsueh C, Lee LY et al.: Analysis of risk factors of predictive local tumor control in oral cavity cancer. *Ann Surg Oncol.* 2008; 15(3): 915–922. DOI: <https://doi.org/10.1245/s10434-007-9761-5>
 95. Loree TR, Strong EW: Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg.* 1990; 160(4): 410–414. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(05\)80555-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(05)80555-0)
 96. Chinn SB, Myers JN: Oral Cavity Carcinoma: Current Management, Controversies, and Future Directions. *J Clin Oncol.* 2015; 33(29): 3269–3276. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.2929>
 97. Smits RW, Koljenovic S, Hardillo JA, Ten Hove I, Meeuwis CA, Sewnaik A et al.: Resection margins in oral cancer surgery: Room for improvement. *Head Neck.* 2016; 38 Suppl 1: E2197–203. DOI: <https://doi.org/10.1002/hed.24075>
 98. Rosenthal EL, Warram JM, Bland KI, Zinn KR: The status of contemporary image-guided modalities in oncologic surgery. *Ann Surg.* 2015; 261(1): 46–55. DOI: <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000622>
 99. Singh J, Jayaraj R, Baxi S, Mileva M, Skinner J, Dhand NK et al.: Immunohistochemical expression levels of p53 and eIF4E markers in histologically negative surgical margins, and their association with the clinical outcome of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol.* 2016; 4(2): 166–172. DOI: <https://doi.org/10.3892/mco.2015.689>
 100. Visgauss JD, Eward WC, Brigman BE: Innovations in Intraoperative Tumor Visualization. *Orthop Clin North Am.* 2016; 47(1): 253–264.
 101. Suganya SA, Kochurani KJ, Nair MG, Louis JM, Sankaran S, Rajagopal R et al.: TM1-IR680 peptide for assessment of surgical margin and lymph node metastasis in murine orthotopic model of oral cancer. *Sci Rep.* 2016; 6: 36726. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.occl.2015.08.023>
 102. Weiss MH, Harrison LB, Isaacs RS: Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N0 neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994; 120(7): 699–702. DOI: <https://doi.org/10.1001/archotol.1994.01880310005001>
 103. Yang Z, Deng R, Sun G, Huang X, Tang E: Cervical metastases from squamous cell carcinoma of hard palate and maxillary alveolus: a retrospective study of 10 years. *Head Neck.* 2014; 36(7): 969–975. DOI: <https://doi.org/10.1002/hed.23398>

104. Roepman P, Wessels LF, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P et al.: An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 2005; 37(2): 182–186. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng1502>
105. van Hooff SR, Leusink FK, Roepman P, Baatenburg de Jong RJ, Speel EJ, van den Brekel MW et al.: Validation of a gene expression signature for assessment of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2012; 30(33): 4104–4110. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.4509>
106. Foy JP, Saintigny P, Goudot P, Schouman T, Bertolus C: The promising impact of molecular profiling on treatment strategies in oral cancers. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2017; 118(4): 242–247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2017.05.004>
107. Adamiak M, Śliwa-Dominiak J, Bąk K, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W: Bakterie komensalne a odporność układu pokarmowego, oddechowego oraz moczowo-płciowego. *Postępy Hig Med Dośw.* 2016; 70: 599–609. DOI: <https://doi.org/10.5604/17322693.1204954>
108. Duerkop BA, Hooper LV: Resident viruses and their interactions with the immune system. *Nat Immunol.* 2013; 14(7): 654–659. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.2614>
109. Nelson KE: *Metagenomics of the human body.* Springer Science + Business Media. London 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7089-3>
110. Faden AA: The potential role of microbes in oncogenesis with particular emphasis on oral cancer. *Saudi Med J.* 2016; 37(6): 607–612. DOI: <https://doi.org/10.15537/smj.2016.6.14048>
111. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O: The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 2009; 28(8): 405–411. DOI: <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0874>
112. Dworecka-Kaszak B: Mycobiome – a cross-talk between fungi and their host. XVI Conference DIGMOL 2015 „Molecular biology in diagnostics if infectious disease and biotechnology”, Warszawa 2015, 67–71.
113. Strużycka I: The oral microbiome in dental caries. *Pol J Micro.* 2014; 63: 127–135. DOI: <https://doi.org/10.33073/pjm-2014-018>
114. Khajuria N, Metgud R: Role of bacteria in oral carcinogenesis. *Indian J Dent.* 2015; 6(1): 37–43. DOI: <https://doi.org/10.4103/0975-962X.151709>
115. Beighton D, Gallagher J et al.: Isolation and identification of bifidobacteriaceae from human saliva. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(20): 6457–6460. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00895-08>

116. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M: Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* 2009; 19(4): 636–643. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.084616.108>
117. Hu J, Han S, Chen Y, Ji Z: Variations of tongue coating microbiota in patients with gastric cancer. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 173729. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/173729>
118. Chałas R, Wójcik-Chęcińska I, Woźniak MJ et al.: Płytką bakteryjną jako biofilm – zagrożenia w jamie ustnej oraz sposoby zapobiegania. *Postępy Hig Med Dosw.* 2015; 69: 1140–1148.
119. He X, Shi W: Oral microbiology: past, present and future. *Int J Oral Science.* 2009; 1(2): 47–58. DOI: <https://doi.org/10.4248/ijos.09029>
120. Zhang Z, Yang J, Feng Q, Chen B, Li M, Liang C, Li M, Li Z, Xu Q, Zhang L, Chen W: Compositional and Functional Analysis of the Microbiome in Tissue and Saliva of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Front Microbiol.* 2019; 10: 1439. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01439>
121. Dupuy AK, David MS, Li L, Heider TN, Peterson JD, Montano EA, Dongari-Bagtzoglou A, Diaz PI, Strausbaugh LD: Redefining of the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: Discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS One.* 2014; 9(3): e90899. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090899>
122. Moraes RC, Dias FL, Figueredo CM, Fischer RG: Association between Chronic Periodontitis and Oral/Oropharyngeal Cancer. *Braz. Dent. J.* 2016; 27(3): 261–266. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600754>
123. Meisel P, Holtfreter B, Biffar R, Suemnig W, Kocher T: Association of periodontitis with the risk of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 2012; 48(9): 859–863. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.02.022>
124. Tezal M, Grossi SG, Genco RJ: Is periodontitis associated with oral neoplasms? *J Periodontol.* 2005; 76(3): 406–410. DOI: <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.3.406>
125. Whitmore SE, Lamont RJ: Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog.* 2014; 10(3): e1003933. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003933>
126. Ha NH, Park DG, Woo BH, Kim DJ, Choi JI, Park BS, Kim YD, Lee JH, Park HR: *Porphyromonas gingivalis* increases the invasiveness of oral cancer cells by upregulating IL-8 and MMPs. *Cytokine.* 2016; 86: 64–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.07.013>
127. Faden AA: The potential role of microbes in oncogenesis with particular emphasis on oral cancer. *Saudi Med J.* 2016; 37(6): 607–602. DOI: <https://doi.org/10.15537/smj.2016.6.14048>
128. Khajuria N, Metgud R: Role of bacteria in oral carcinogenesis. *Indian J Dent.* 2015; 6(1): 37–43. DOI: <https://doi.org/10.4103/0975-962X.151709>

129. Tezal M, Grossi SG, Genco RJ: Is periodontitis associated with oral neoplasms? *J Periodontol.* 2005; 76(3): 406–410. DOI: <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.3.406>
130. Rusin P, Markiewicz Ł, Majsterek I: Genetic predeterminations of head and neck cancer. *Postepy Hig Med Dosw.* 2008; 62: 490–501.
131. De Carlo AA et al.: Induction of matrix metalloproteinases and a collagen-degrading phenotype in fibroblasts and epithelial cells by secreted *Porphyromonas gingivalis* proteinase. *J Periodont Res.* 1998; 33(7): 408–420. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1998.tb02337.x>
132. Lyons SR et al.: Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(6): 2362–2365. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.6.2362-2365.2000>
133. Pouliot M et al.: Lipoxin A (4) analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry.* 2000; 39(16): 4761–4768. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi992551b>
134. Zhu XQ, Lu W, Chen Y, Cheng XF, Qiu JY, Xu Y, Sun Y: Effects of *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide Tolerized Monocytes on Inflammatory Responses in Neutrophils. *PLoS One.* 2016; 11(8): e0161482. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161482>
135. Deshpande RG et al.: Invasion strategies of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: implications for cardiovascular disease. *Invasion Metastasis.* 1998; 18(2): 57–69. DOI: <https://doi.org/10.1159/000024499>
136. Huard-Delcourt A et al.: Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial cells: analysis by flow cytometry. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106(5): 938–944. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0909-8836.1998.eos106506.x>
137. Hagewald S et al.: Total IgA and *Porphyromonas gingivalis*-reactive IgA in the saliva of patients with generalised early-onset periodontitis. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108(2): 147–153. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.00743.x>
138. Eskin MA, Benakanakere MR, Rose BG, Zhang P, Zhao J, Stathopoulou P, Fujioka D, Kinane DF: Interleukin-1 β modulates proinflammatory cytokine production in human epithelial cells. *Infect Immun.* 2008; 76: 2080–2089. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.01428-07>
139. Chen TS, Kuo CH, Battsengel S, Pan LF, Day CH, Shen CY, Chung LC, Padma VV, Yao CK, Lin YM, Huang CY: Adipose-derived stem cells decrease cardiomyocyte damage induced by *porphyromonas gingivalis* endotoxin through suppressing hypertrophy, apoptosis, fibrosis, and MAPK markers. *Environ Toxicol.* 2018; 33(4): 508–513. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.22536>

140. Chen TS, Kuo CH, Battsengel S, Pan LF, Day CH, Shen CY, Chung LC, Padma VV, Yao CK, Lin YM, Huang CY: Adipose-derived stem cells decrease cardiomyocyte damage induced by porphyromonas gingivalis endotoxin through suppressing hypertrophy, apoptosis, fibrosis, and MAPK markers. *Environ Toxicol*. 2018; 33(4): 508–513. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.22536>
141. Zhu XQ, Lu W, Chen Y, Cheng XF, Qiu JY, Xu Y, Sun Y: Effects of Porphyromonas gingivalis LipopolysaccharideTolerized Monocytes on Inflammatory Responses in Neutrophils. *PLoS One*. 2016; 11(8): e0161482. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161482>
142. Moffatt CE, Lamont RJ: Porphyromonas gingivalis induction of microRNA-203 expression controls suppressor of cytokine signaling 3 in gingival epithelial cells. *Infect Immun*. 2011; 79(7): 2632–2637. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00082-11>
143. Kang W, Jia Z, Tang D, Zhang Z, Gao H, He K, Feng Q: Fusobacterium nucleatum Facilitates Apoptosis, ROS Generation, and Inflammatory Cytokine Production by Activating AKT/MAPK and NF- κ B Signaling Pathways in Human Gingival Fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019: 1681972. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/1681972>
144. Geng F, Zhang Y, Lu Z, Zhang S, Pan Y: Fusobacterium nucleatum Caused DNA Damage and Promoted Cell Proliferation by the Ku70/p53 Pathway in Oral Cancer Cells. *DNA Cell Biol*. 2020; 39(1): 144–151. DOI: <https://doi.org/10.1089/dna.2019.5064>
145. Łączmańska I, Łączmański Ł: Metoda MLPA oraz jej zastosowanie w diagnostyce chorób uwarunkowanych genetycznie. *Postępy Biologii Komórki*. 2009; 36(4): 555–563.
146. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar V, Waisfisz Q, Hess C, Schouten J, Errami A: Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of GC methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acid Res*. 2005; 33(14): e128. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gni127>
147. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402–408. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
148. Chung CT, Miller RH: A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(8): 3580. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/16.8.3580>
149. Sambrook JF, Russell DW: Molecular cloning: A Laboratory manual, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.

150. Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang GY, Cai YC, Wang LD, Yang CS: Mechanisms of inactivation of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999; 5(10): 2704–2713.
151. Xing EP, Nie Y, Wang LD, Yang GY, Yang CS: Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China. *Carcinogenesis.* 1999; 20(1): 77–84. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/20.1.77>
152. Stadler WM, Olopade O: The 9p21 region in bladder cancer cell lines: large homozygous deletion inactivate the CDKN2, CDKN2B and MTAP genes. *Urol Res.* 1996; 24(4): 239–244. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00295899>
153. Anandharaj A, Ekshyyan O, Jia Y et al.: EBV and not HPV sensitizes tobacco associated head and neck cancer cell line FaDu to radiotherapy. *Acta Otolaryngol.* 2016; 136(4): 354–362. DOI: <https://doi.org/10.3109/00016489.2015.1114182>
154. Kruk-Zagajewska A, Wierzbicka M: Rak języka i dna jamy ustnej – rozpoznawanie i postępy w leczeniu. *Współcz. Onkol.* 2003; 7(4): 264–274.
155. Ali H, Sinnott SJ, Corcoran P et al.: Oral cancer incidence and survival rates in the Republic of Ireland, 1994–2009. *BMC Cancer.* 2016; 16(1): 950. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2839-3>
156. García-Kass AI, Herrero-Sánchez A, Esparza-Gómez G: Oral tongue cancer in public hospitals in Madrid, Spain (1990–2008). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016; 21(6): e658–e664. DOI: <https://doi.org/10.4317/medoral.21196>
157. Singal R, Ginder GD: DNA methylation. *Blood.* 1999; 93: 4059–4070. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V93.12.4059>
158. Kuzmin I, Geil L: DNA methylation and chromatin modifications in cancer and development. *Int Arch Biosci.* 2001; 1047–1056.
159. El-Osta A: The rise and fall of genomic methylation in cancer. *Leukemia.* 2004; 18(2): 233–237. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403218>
160. Igaki H, Sasaki H, Kishi T, Sakamoto H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Sugimura T, Terada M: Highly frequent homozygous deletion of the p16 gene in esophageal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 203(2): 1090–1095. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2294>
161. Tanaka H, Shimada Y, Imamura M, Shibagaki I, Ishizaki K: Multiple types of aberrations in the p16 (INK4a) and the p15(INK4b) genes in 30 esophageal squamous-cell-carcinoma cell lines. *Int J Cancer.*

- 1997; 70(4): 437–442. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970207\)70:4<437::AID-IJC11>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970207)70:4<437::AID-IJC11>3.0.CO;2-C)
162. Zhang X, Feng H, Li D, Liu S, Amizuka N, Li M: Identification of differentially expressed genes induced by aberrant methylation in oral squamous cell carcinomas using integrated bioinformatic analysis. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(6): 1698. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19061698>
163. Poage GM, Houseman EA, Christensen BC, Butler RA, Avissar-Whiting M, McClean MD, Waterboer T, Pawlita M, Marsit CJ, Kelsey KT: Global hypomethylation identifies loci targeted for hypermethylation in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(11): 3579–3589. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0044>
164. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JFM: The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008; 8(3): 187–198. DOI: <https://doi.org/10.2174/156800908784293659>
165. Bleau AM, Hambarzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, Holland EC: PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell.* 2009; 4(3): 226–235. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.007>
166. Iijima Y, Ito T, Oikawa T, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kamada N, Kishi K, Asano S, Sakaki Y, Sato Y: A new ETV6/TEL partner gene, ARG (ABL-related gene or ABL2), identified in an AML-M3 cell line with a t(1;12)(q25;p13) translocation. *Blood.* 2000; 95(6): 2126–2131.
167. Lin YC, Yeckel MF, Koleske AJ: Abl2/Arg controls dendritic spine and dendrite arbor stability via distinct cytoskeletal control pathways. *J Neurosci.* 2013; 33(5): 1846–1857. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4284-12.2013>
168. Xing QT, Qu CM, Wang G: Overexpression of Abl2 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinomas and is associated with cancer cell migration and invasion. *Onco Targets Ther.* 2014; 7: 881–885. DOI: <https://doi.org/10.2147/OTT.S62348>
169. Qiang XF, Zhang ZW, Liu Q, Sun N, Pan LL, Shen J, Li T, Yun C, Li H, Shi LH: miR-20a promotes prostate cancer invasion and migration through targeting ABL2. *J Cell Biochem.* 2014; 115(7): 1269–1276. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.24778>
170. Gil-Henn H, Patsialou A, Wang Y, Warren MS, Condeelis JS, Koleske AJ: Arg/Abl2 promotes invasion and attenuates proliferation of breast cancer in vivo. *Oncogene.* 2013; 32(21): 2622–2630. DOI: <https://doi.org/10.1038/onc.2012.284>

171. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF et al.: Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2007; 39(9): 1083–1091. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng2103>
172. Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ: Defective IL7R expression in T(-) B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet.* 1998; 20(4): 394–397. DOI: <https://doi.org/10.1038/3877>
173. Zenatti PP, Ribeiro D, Li WQ, Zuurbier L, Silva MC, Paganin M, Tritapoe J, Hixon JA, Silveira AB, Cardoso BA et al.: Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2011; 43(10): 932–939. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.924>
174. Sanyal M, Morimoto M, Baradaran-Heravi A, Choi K, Kambham N, Jensen K, Dutt S, Dionis-Petersen KY, Liu LX, Felix K et al.: Lack of IL7R alpha expression in T cells is a hallmark of T-cell immunodeficiency in Schimke immuno-osseous dysplasia (SIOD). *Clin Immunol.* 2015; 161(2): 355–365. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.10.005>
175. Shia W, Chen D: The allele-specific copy number imbalance in CDK14/RAB GAP1L/SH3BP5L and the relation to the poor prognosis in breast cancer. *Breast.* 2017; 32(1): S104–S105. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(17\)30333-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(17)30333-8)
176. Li LW, Li XY, Wang WY, Gao TH, Zhou Y, Lu SX: Soluble purified recombinant C2ORF40 protein inhibits tumor cell growth in vivo by decreasing telomerase activity in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2016; 12(4): 2820–2824. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4935>
177. Li XY, Li LW, Wang WY, Yang Y, Zhou Y, Lu SX: Soluble purified recombinant C2ORF40 protein inhibits esophageal cancer cell proliferation by inducing cell cycle G1 phase block. *Oncol Lett.* 2015; 10(3): 1593–1596. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3429>
178. Li XH, Zhang Y, Zhang HW, Liu XN, Gong TQ, Li MB, Sun L, Ji G, Shi YQ, Han ZY et al.: miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res.* 2011; 9(7): 824–833. DOI: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0529>
179. Zeng R, Liu Y, Jiang ZJ, Huang JP, Wang Y, Li XF, Xiong WB, Wu XC, Zhang JR, Wang QE, Zheng YF: EPB41L3 is a potential tumor suppressor gene and prognostic indicator in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2018; 52(5): 1443–1454. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4316>

180. Zhu LY, Yang NH, Chen J, Zeng T, Yan SY, Liu YY, Yu GF, Chen QX, Du GQ, Pan W et al.: LINC00052 upregulates EPB41L3 to inhibit migration and invasion of hepatocellular carcinoma by binding miR-452-5p. *Oncotarget*. 2017; 8(38): 63724–63737. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18892>
181. Chu FF: The human glutathione peroxidase genes GPX2, GPX3, and GPX4 map to chromosomes 14, 5, and 19, respectively. *Cytogenet Cell Genet*. 1994; 66(2): 96–98. DOI: <https://doi.org/10.1159/000133675>
182. Zhao H, Li JY, Li X, Han C, Zhang Y, Zheng LL, Guo MZ: Silencing GPX3 expression promotes tumor metastasis in human thyroid cancer. *Curr Protein Pept Sci*. 2015; 16(4): 316–321. DOI: <https://doi.org/10.2174/138920371604150429154840>
183. Yang ZL, Yang LP, Zou Q, Yuan Y, Li JH, Liang LF, Zeng GX, Chen SL: Positive ALDH1 A3 and negative GPX3 expressions are biomarkers for poor prognosis of gallbladder cancer. *Dis Markers*. 2013; 35(3): 163–172. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/187043>
184. Vassallo I, Zinn P, Lai M, Rajakannu P, Hamou MF, Hegi ME: WIF1 re-expression in glioblastoma inhibits migration through attenuation of non-canonical WNT signaling by downregulating the lncRNA MALAT1. *Oncogene*. 2016; 35(1): 12–21. DOI: <https://doi.org/10.1038/onc.2015.61>
185. Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Hofstaedter F, Hartmann A et al.: WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol*. 2003; 201(2): 204–212. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.1449>
186. Tang YX, Simoneau AR, Liao WX, Yi G, Hope C, Liu F, Li SQ, Xie J, Holcombe RF, Jurnak FA et al.: WIF1, a Wnt pathway inhibitor, regulates SKP2 and c-myc expression leading to G1 arrest and growth inhibition of human invasive urinary bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8(2): 458–468. DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0885>
187. Morandi L, Gissi D, Tarsitano A, Asioli S, Monti V, Del Corso G, Marchetti C, Montebugnoli L, Foschini MP: DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015; 43(8): 1494–1500. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.07.028>
188. Li JM, Lu CL, Cheng MC, Luu SU, Hsu SH, Chen CH: Genetic analysis of the DLGAP1 gene as a candidate gene for schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2013; 205(1–2): 13–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2012.08.014>

189. Li J, Cui J, Wang X, Ma J, Niu H, Ma X, Zhang X, Liu S: An association study between DLGAP1 rs11081062 and EFNA5 rs26728 polymorphisms with obsessive-compulsive disorder in a Chinese Han population. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015; 11: 897–905. DOI: <https://doi.org/10.2147/NDT.S75009>
190. Zhang K, Fan Z, Wang Y, Faraone SV, Yang L, Chang S: Genetic analysis for cognitive flexibility in the trail-making test in attention deficit hyperactivity disorder patients from single nucleotide polymorphism, gene to pathway level. *World J Biol Psychiatry*. 2017; 20(6): 1–29. DOI: <https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1386324>
191. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD et al.: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(9): 2999–3004. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0307323101>
192. Zhu W, Liu X, He J et al.: Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: A case control study. *BMC Cancer*. 2011; 11: 393. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-393>
193. Sarver AL, Li L, Subramanian S: MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Res*. 2010; 70(23): 9570–9580. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2074>
194. Wang XC, Tian LL, Jiang XY et al.: The expression and function of miRNA-451 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*. 2011; 311(2): 203–209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.07.026>
195. Li T, Li D, Sha J et al.: MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 383(3): 280–285. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.077>
196. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM et al.: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(30): 10513–10518. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
197. Srivastava SK, Bhardwaj A, Singh S et al.: MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*. 2011; 32(12): 1832–1839. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr223>
198. Tseng CW, Lin CC, Chen CN et al.: Integrative network analysis reveals active microRNAs and their functions in gastric cancer. *BMC Systems Biology*. 2011; 5: 99. DOI: <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-99>

199. Kogo R, Mimori K, Tanaka F et al.: Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(13): 4277–4284. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2866>
200. Mascellani N, Tagliavini L, Gamberoni G et al.: Using miRNA expression data for the study of human cancer. *Minerva Biotech.* 2008; 20: 23–30.
201. Lee JW, Choi CH, Choi JJ et al.: Altered microRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(9): 2535–2542. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1231>
202. Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y et al.: Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2009; 34(4): 1069–1075. DOI: https://doi.org/10.3892/ijo_00000233
203. Tsai WC, Hsu PW, Lai TC et al.: MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2009; 49(5): 1571–1582. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.22806>
204. Yao C, Liu HN, Wu H, Chen YJ, Li Y, Fang Y, Shen XZ, Liu TT: Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs for esophageal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer.* 2018; 9(16): 2876–2884. DOI: <https://doi.org/10.7150/jca.25351>
205. Troiano G, Mastrangelo F, Caponio VCA et al.: Predictive Prognostic Value of Tissue-Based MicroRNA Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res.* 2018; 97(7): 759–766. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034518762090>
206. Bourbour S, Beheshti M, Kazemian H, Bahador A: Effects of Micro RNAs and their Targets in Periodontal Diseases. *Infect Disord Drug Targets.* 2018; 18(3): 183–191. DOI: <https://doi.org/10.2174/1871526518666180405155327>
207. Gissi DB, Morandi L, Gabusi A, Tarsitano A, Marchetti C, Cura F, Palmieri A, Montebugnoli L, Asioli S, Foschini MP, Scapoli L: A Non-invasive Test for MicroRNA Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(6): 1789. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19061789>
208. Bertram L, Lange C, Mullin K, Parkinson M, Hsiao M, Hogan MF, Tanzi RE et al.: Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am J Hum Genet.* 2008; 83(5): 623–632. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.10.008>
209. Li JM, Lu CL, Cheng MC, Luu SU, Hsu SH, Chen CH: Genetic analysis of the DLGAP1 gene as a candidate gene for schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2013; 205(1–2): 13–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2012.08.014>

210. Mathias SR, Knowles EE, Kent JJ, McKay DR, Curran JE, de Almeida MA, Glahn DC et al.: Recurrent major depression and right hippocampal volume: A bivariate linkage and association study. *Hum Brain Mapp.* 2016; 37(1): 191–202. DOI: <https://doi.org/10.1002/hbm.23025>
211. Fan Z, Qian Y, Lu Q, Wang Y, Chang S, Yang L: DLGAP1 and NMDA receptor-associated postsynaptic density protein genes influence executive function in attention deficit hyperactivity disorder. *Brain Behav.* 2018; 8(2): e00914. DOI: <https://doi.org/10.1002/brb3.914>
212. Kim E, Naisbitt S, Hsueh YP, Rao A, Rothschild A, Craig AM, Sheng M: GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol.* 1997; 136(3): 669–678. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.136.3.669>
213. Satoh K, Yanai H, Senda T, Kohu K, Nakamura T, Okumura N, Matsu-mine A, Kobayashi S, Toyoshima K, Akiyama T: DAP-1, nowe białko, które oddziałuje z domenami podobnymi do kinazy guanylanowej hDLG i PSD-95. *Genes Cells.* 1997; 2(6): 415–424. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1997.1310329.x>
214. Abbott LF, Nelson SB: Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci.* 2000; 3 (Suppl): 1178–1183. DOI: <https://doi.org/10.1038/81453>
215. Stepulak A et al.: NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(43): 15605–15610. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0507679102>
216. Stepulak A et al.: Expression of glutamate receptor subunits in human cancers. *Histochem Cell Biol.* 2009; 132(4): 435–445. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0613-1>
217. North WG, Gao G, Jensen A, Memoli VA, Du J: NMDA receptors are expressed by small-cell lung cancer and are potential targets for effective treatment. *Clin Pharmacol.* 2010; 2: 31–40. DOI: <https://doi.org/10.2147/CPAA.S6262>
218. North WG, Gao G, Memoli VA, Pang RH, Lynch L: Breast cancer expresses functional NMDA receptors. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 122(2): 307–314. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0556-1>
219. LoRusso PM: Mammalian target of rapamycin as a rational therapeutic target for breast cancer treatment. *Oncology.* 2013; 84(1): 43–56. DOI: <https://doi.org/10.1159/000343063>
220. Stepulak A, Rola R, Polberg K, Ikonomidou C: Glutamate and its receptors in cancer. *J Neural Transm.* 2014; 121(8): 933–944. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1182-6>

221. Mehrotra A, Koiri RK: N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptors: Therapeutic Target against Cancer. *Int J Immunother Cancer Res.* 2015; 1(1): 013–017. DOI: <https://doi.org/10.17352/2455-8591.000004>
222. Deutsch SI, Tang AH, Burket JA, Benson AD: NMDA receptors on the surface of cancer cells: target for chemotherapy? *Biomed Pharmacother.* 2014; 68(4): 493–496. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.03.012>
223. Li L et al.: GKAP Acts as a Genetic Modulator of NMDAR Signalling to Govern Invasive Tumor Growth. *Cancer Cell.* 2018; 33(4): 736–751. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.011>
224. Liu J, Liu Z, Zhang X, Gong T, Yao D: Examination of the expression and prognostic significance of DLGAPs in gastric cancer using the TCGA database and bioinformatic analysis. *Mol Med Rep.* 2018; 18(6): 5621–5629. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9574>
225. Young MA, May S, Damo A, Yoon YS, Hur MW, Swat W, Parry L: Epigenetic regulation of Dlg1, via Kaiso, alters mitotic spindle polarity and promotes intestinal tumorigenesis. Manuscript Published Online First on December 14, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0280>
226. Rendleman J, Shang S, Dominianni Ch, Shields JF, Scanlon P, Adaniel Ch, Desrichard A, Ma M, Shapiro R, Berman R, Pavlick A, Polsky D, Shao Y, Osman I, Kirchhoff T: Melanoma risk loci as determinants of melanoma recurrence and survival. *J Transl Med.* 2013; 11: 279. DOI: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-279>
227. Kwiatkowski BA, Burwick NR, Richard RE: DLGAP1 directs megakaryocytic growth and differentiation in an MPL dependent manner in hematopoietic cells. *Biomark Res.* 2019; 7: 13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40364-019-0165-z>
228. Zheng M, Liu X, Zhou Q, Liu G: HOTAIRM1 competed endogenously with miR-148a to regulate DLGAP1 in head and neck tumor cells. *Cancer Med.* 2018; 7(7): 3143–3156. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.1523>

