Analiza immunohistochemiczna i molekularna wybranych elementów szklaku sygnałowego kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej

lek. dent. Paulina Adamska

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. n. med. Anna Starzyńska

Zakład Chirurgii Stomatologicznej

Gdański Uniwersytet Medyczny

2020

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi,
Pani Profesor dr hab. n. med. Annie Starzyńskiej,
za opiekę merytoryczną, cenne uwagi, pomoc podczas prowadzenia badań
i redagowania niniejszej pracy, a także za wsparcie, cierpliwość i wielką życzliwość.

Serdeczne dziękuję Pani Doktor n. med. Aleksandrze Sejdzie
za nieocenioną pomoc podczas realizowania badań i redagowania niniejszej pracy.

Pracę dedykuję mężowi Łukaszowi
i Rodzicom

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI…..……..……4

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW I SYMBOLI UŻYWANYCH W PRACY……....6

1. STRESZCZENIE……...10

2. SUMMARY……12

3. WSTĘP……...14

3.1 Wprowadzenie……...14

3.2 Ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu……..……..22

3.3 PIK3CA……...……..…24

3.4 AKT…….……..…27

3.5 PTEN……..……...29

4. CELE PRACY……..…31

5. MATERIAŁ I METODY……..32

5.1 Grupa badana…….32

5.2 Mikromacierze tkankowe……..…...…….33

5.3 Badanie immunohistochemiczne……...……34

5.4 Chromogenna i wzmocniona jonami srebra hybrydyzacja in situ.....41

5.5 Analiza statystyczna……...……...47

6. WYNIKI……..49

6.1 Charakterystyka badanej grupy……...……...…….…….49

6.2 Immunohistochemiczna ocena poziomu białek PIK3CA i PTEN…….63

6.2.1 Białko PIK3CA……...63

6.2.2 Białko PTEN...……...……74

6.3 Analiza liczby kopii genu *PIK3CA* metodą chromogennej oraz wzmocnionej jonami srebra hybrydyzacji in situ……..83

6.4 Zależność poziomu białek PIK3CA, PTEN oraz liczby kopii genu *PIK3CA*…….…….…95

6.4.1 Zależność poziomu białka PIK3CA od PTEN……..……...95

6.4.2 Zależność poziomu białka PIK3CA od liczby kopii genu *PIK3CA*……96

6.4.3 Zależność utraty białka PTEN od liczby kopii genu *PIK3CA*……...98

7. DYSKUSJA…….99

7.1 Charakterystyka badanej grupy……...…..……...……99

7.2 Immunohistochemiczna ocena białek PIK3CA i PTEN…...…..……100

7.2.1 Białko PIK3CA……..…..…....…....…....…....…....…....…....……100

7.2.2 Białko PTEN…...……...…..……...……...….....…....104

7.3 Liczba kopii genu *PIK3CA*……..106

7.4 Zależność poziomu białek PIK3CA i PTEN od liczby kopii genu *PIK3CA*……..108

7.5 Chromogenna i wzmocniona srebrem hybrydyzacja in situ jako metoda oceny kopii genu *PIK3CA*……..…109

8. WNIOSKI……110

9. PIŚMIENNICTWO…….111

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW I SYMBOLI UŻYWANYCH W PRACY

aCGH	*Array comperative genomic hybridisation*	Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy
AKT	*Serine-threonine kinase*	Kinaza serynowo-treoninowa
AKT1	*Serine-threonine kinase isoform 1*	Kinaza serynowo-treoninowa izoforma 1
AKT2	*Serine-threonine kinase isoform 2*	Kinaza serynowo-treoninowa izoforma 2
AKT3	*Serine-threonine kinase isoform 3*	Kinaza serynowo-treoninowa izoforma 3
ANOVA	*Analysis of ariance*	Jednoczynnikowa analiza wariancji
AP	*Alkaline phosphatase*	Fosfataza alkaliczna
CC2	*Cell Conditioning Reaction Buffer 2*	Bufor reakcyjny 2 do kondycjonowania komórek
CEP 3	*Number of chromosome 3 centromeres*	Liczba centromerów chromosomu 3
CG	*Control group*	Grupa kontrolna
CISH	*Chromogenic in situ hybridisation*	Chromogenna hybrydyzacja in situ
DAB	*3,3'-diaminobenzidine*	3,3'-diaminobenzydyna
DIG	*Digoxigenin*	Digoksygenina
DNP	*Dinitrophenol*	Dinitrofenol
EBV	*Epstein-Barr Virus*	Wirus Epsteina-Barr
EGFR	*Epidermal growth factor receptor*	Receptor naskórkowego czynnika wzrostu
FISH	*Fluorescent in situ hybridisation*	Fluorescyjna hybrydyzacji in situ
HIER	*Heat induced epitope retrieval*	Metoda wysokotemperaturowego odsłaniania epitopów
HPV	*Human Papilloma Virus*	Wirus brodawczaka ludzkiego
HR	*Hazard ratio*	Współczynnik ryzyka
HRM	*High-resolution melting*	Topienie w wysokiej rozdzielczości
HRP	*Horseradish peroxidase*	Peroksydaza chrzanowa
IHC	*Immunohistochemistry*	Immunohistochemia

LCS	*Liquid coverslip*	Ciecz nakrywkowa
LSD	*Least significant differences*	Test najmniejszych istotnych różnic (NIR)
M	*Metastasis*	Przerzuty odległe narządowe
MALDI-TOF-MS	*Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*	Laserowa jonizacja próbki wspomagana matrycą działająca na zasadzie pomiaru czasu przelotu jonów w spektrometrze mas
mTOR	*Mammalian target of rapamycin kinase*	Kinaza ssaczy cel rapamycyny
N	*Nodules*	Przerzuty w węzłach chłonnych,
NIR	*Least significant differences (LSD)*	Test najmniejszych istotnych różnic
OS	*Overall survival*	Czas przeżycia
OSCC/RJU	*Oral squamous cell carcinoma*	Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej
p	*p value*	Poziom istotności
p110α	*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha protein*	3 kinaza fosfatydyloinozytolu-4,5-difosforanu podjednostki katalitycznej alfa
p110β	*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta protein*	3 kinaza fosfatydyloinozytolu-4,5-difosforanu podjednostki katalitycznej beta
p110δ	*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta protein*	3 kinaza fosfatydyloinozytolu-4,5-difosforanu podjednostki katalitycznej deta
p85α	*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase regulatory subunit 1 protein*	3 kinaza fosfatydyloinozytolu-4,5-difosforanu podjednostki regulatorowej 1
PBS	*Phosphate buffered saline*	Roztwór buforu fosforanowego
PIK3R3	*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase regulatory subunit 3 gene*	3 kinaza fosfatydyloinozytolu-4,5-difosforanu genu podjednostki regulatorowej 3
PIP2	*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*	Fosfatydyloinozytolo 4,5-difosforan
PIP3	*Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*	Fosfatydyloinozytolo 3,4,5-trójfosforan

PKC	*Protein kinase C*	Kinaza białkowa C
PO_4	*Phosphate group*	Grupa fosforanowa
PPA	*Protein phosphatase 2*	Białko fosfatazy 2
PTEN	*Phosphatase and tensin homolog encoded on chromosome 10*	Fosfataza i homolog tensyny kodowany na chromosomie 10
qPCR	*Quantitative (Q)-polymerase chain reaction*	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy
Q25	*Lower quartile*	Dolny kwartyl
Q75	*Upper quartile*	Górny kwartyl
r	*Correlation coefficient*	Współczynnik korelacji
RAS/MAPK	*Mitogen-activated protein kinase/RAS pathway*	Szlak kinazy aktywowanej mitogenami/RAS
RJU/OSCC	*Oral squamous cell carcinoma*	Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej
RKT	*Receptor tyrosine kinase*	Receptor kinaz tyrozynowych
RT-PCR	*Real-time polymerase chain reaction*	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
RT-PCR	*Reverse transcriptase polymerase chain reaction*	Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą
S473	*Serine 473 phosphorylation site at the AKT kinase catalytic domain*	Miejsce fosforylacji seryny w katalitycznej kinazie AKT w pozycji 473
SD	*Standard deviation*	Odchylenie standardowe
SG	*Studied group*	Grupa badana
SISH	*Silver in situ hybridisation*	Wzmocniona jonami srebra hybrydyzacja in situ
SNP	*Single nucleotide polymorphisms*	Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów
T	*Tumour*	Wielkość guza pierwotnego
T308	*Threonine 308 phosphorylation site at the AKT kinase catalytic domain*	Miejsce fosforylacji treoniny w katalitycznej kinazie AKT w pozycji 308
TMA	*Tissue microarray*	Mikromacierze tkankowe

TNM	*Classification of malignant tumours (tumour, nodules, metastasis)*	Klasyfikacja guzów złośliwych (guz, przerzuty do węzłów chłonnych, przerzuty odległe)
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*	Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego
Vps34	*Vacuolar protein-sorting defective 34*	Białko sortujące wadliwe wakuole 34
WHO	*World Health Organisation*	Światowa Organizacja Zdrowia

1. STRESZCZENIE

Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej (rak jamy ustnej, RJU) stanowi 95% zmian w tej lokalizacji. Pomimo stosowania nowoczesnych metod diagnostycznych i terapeutycznych, wyniki leczenia są niezadowalające. Identyfikacja nowych markerów molekularnych może być przydatna w planowaniu i wyborze odpowiedniego leczenia. Jednym z celów takich terapii może być ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydylo-inozytolu.

Celem pracy była ocena poziomu białek PIK3CA i PTEN oraz częstości amplifikacji genu *PIK3CA* w RJU, a także analiza zależności badanych markerów z danymi kliniczno-patologicznymi.

Badaną grupę stanowiło 92 chorych leczonych z powodu RJU w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku w latach 2007-2012. W badaniu zostały wykorzystane preparaty histopatologiczne z pierwotnych guzów jamy ustnej.

Badania immunohistochemiczne i molekularne zostały przeprowadzone na mikromacierzach tkankowych. Do analizy immunohistochemicznej białka PIK3CA użyto wskaźnika H-score (zakres 0-300), a w przypadku białka PTEN systemu binominalnego. Liczbę kopii genu *PIK3CA* zbadano przy użyciu techniki podwójnej hybrydyzacji in situ, w której zastosowano sondy znakowane chromogenem i jonami srebra.

Wartość wskaźnika H dla PIK3CA była ≥70 u 51,65% pacjentów, utratę białka PTEN odnotowano u 31,46% chorych, a amplifikację genu *PIK3CA* stwierdzono u 5 badanych. Nie wykazano zależności pomiędzy wysokim poziomem PIK3CA a danymi kliniczno-patologicznymi. W przypadku białka PTEN stwierdzono związek z wielkością pierwotnej zmiany (p=0,043) i 5-letnim przeżyciem (p=0,028). Natomiast wzrost liczby kopii genu *PIK3CA* był związany ze zmianami niskozróżnicowanymi (p=0,050). Amplifikacja genu częściej była notowana u pacjentów z rakiem zlokalizowanym w dnie jamy ustnej (p=0,040). Nie wykazano zależności pomiędzy immunohistochemiczną oceną białek PIK3CA i PTEN a amplifikacją genu *PIK3CA*. Jednoczesny brak białka PTEN oraz niski stopnień zróżnicowania histopatologicznego

(p=0,040), przerzuty odległe (p=0,033), palenie tytoniu (p=0,016) lub alkoholizm (p=0,042) wpływały na dwukrotny wzrost ryzyka skrócenia czasu przeżycia pacjentów. Natomiast obecność amplifikacji oraz lokalizacja w dnie jamy ustnej nowotworu powodowała prawie sześciokrotny wzrost ryzyka skrócenia czasu całkowitego przeżycia (p=0,037).

Niniejsza praca może przyczynić się do określenia punktów uchwytu leków w terapii molekularnej raka jamy ustnej.

2. SUMMARY

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) accounts for 95% of the malignant lesions in oral cavity. Despite development in OSCC management, the outcome is still unsatisfactory. Identification of new molecular markers may be of use in prevention, prognosis and choice of an adequate therapy. One objective of such treatment may be a signalling pathway of phosphatidyl-inositol-3-kinase.

The aim of this study was to evaluate the protein level of PIK3CA, PTEN and *PIK3CA* gene amplification in OSCC, as well as to assess their correlation with clinical-pathological data.

The study group included 92 patients treated for OSCC at the University Clinical Centre in Gdańsk between 2007-2012. Study was performed on histopathological samples from primary OSCC.

Immunohistochemical and molecular tests were carried out on tissue microarrays. The H-score (scale 0-300) was used for immunohistochemistry evaluation of PIK3CA protein, whereas for PTEN binomial system was used. *PIK3CA* gene copy number was analysed using dual in-situ hybridisation where molecular probes are marked by chromogens and silver ions.

PIK3CA IHC H-score was ≥70 in 51.65% patients, loss of PTEN protein was noticed in 31.46% cases and PIK3CA amplification was detected in 5 tumours. There was no correlation between high level of PIK3CA and clinical-pathological data. In the case of PTEN protein, there was a correlation with the size of the primary tumour (p=0.043) and a 5-year survival (p=0.028). In contrast, the increase in the number of copies of the *PIK3CA* gene was associated with the grading (p=0.050). Gene amplification was more frequently reported in patients with flour of the mouth OSCC (p=0.040). There was no correlation between the immunohistochemical assessment of PIK3CA and PTEN proteins and the *PIK3CA* gene amplification. Present study shows that the coincidence of loss of PTEN protein and the high grade tumours (p=0.040), distant metastases (p=0.033), smoking (p=0.016) and alcohol abuse (p=0.042) reduced the overall survival of patients by half. In contrast, the presence of

amplification and OSCC location in the floor of the mouth resulted in a nearly six-fold increase in the risk of shortening survival (p=0.037).

This work may contribute to determining target points in molecular therapy of oral cancer.

3. WSTĘP

3.1 Wprowadzenie

Najczęstszym nowotworem złośliwym jamy ustnej jest rak płaskonabłonkowy (RJU; ang. *oral squamous cell carcinoma,* OSCC). Stanowi 95% tych zmian, zajmując język, dno jamy ustnej, dziąsło górne i dolne, błonę śluzową policzka oraz podniebienie [125, 134]. Rocznie obserwuje się ponad 300 000 nowych zachorowań na świecie, w tym około 1800 w Polsce. Pięć procent zgonów z przyczyn nowotworowych to śmierć z powodu raka jamy ustnej. Zmiana występuje głównie u mężczyzn po 60 roku życia. W ostatnich latach notuje się gwałtowny wzrost zachorowalności na RJU u osób przed 50 roku życia. W momencie rozpoznania, u co dziesiątego chorego, występuje drugie ognisko raka lub rozsiew do okolicznych węzłów chłonnych [52, 95, 105, 131].

Do głównych czynników etiologicznych raka płaskonabłonkowego jamy ustnej należą: palenie tytoniu, nadużywanie wysokoprocentowego alkoholu, występowanie zaburzeń potencjalnie złośliwych (leukoplakii, erytroplakii, hiperkeratozy, liszaja płaskiego Wilsona, zespołu Plummera-Vinsona, brodawczaków, dysplazji, blizn, zwłóknień podśluzowych, nikotynowego zapalenia jamy ustnej, choroby Bowena), zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego (ang. *Human Papilloma Virus,* HPV) i Epsteina-Barr (ang. *Epstein-Barr Virus,* EBV) oraz infekcja grzybami z rodzaju *Candida* [3, 16, 52, 138, 148]. W młodszych grupach wiekowych zwiększa się częstość występowania RJU, szczególnie w przypadku raka języka. Jest to związane z infekcją wirusem HPV. HPV-pozytywny RJU charakteryzuje się lepszymi wynikami leczenia i zmniejszoną śmiertelnością w porównaniu z rakiem związanym z paleniem tytoniu. Częściej występuje wśród mężczyzn niż u kobiet [20, 21, 26, 38, 89, 148]. Innymi czynnikami zwiększającymi ryzyko rozwoju RJU są: zanieczyszczenia przemysłowe, narażenie zawodowe (azbest, chrom, formaldehyd, nikiel, węglowodory aromatyczne), nieprawidłowa higiena jamy ustnej, niewłaściwe dopasowanie uzupełnień protetycznych, dieta uboga w witaminy, warzywa i owoce [16, 52].

Najczęściej chorzy zgłaszają się z powodu owrzodzenia błony śluzowej jamy ustnej. Zmiany mogą ulegać nadmiernemu rogowaceniu, wytwarzaniu tarczek lub

linijnych pęknięć. Pacjenci podają dolegliwości bólowe, zaczerwienienie błony śluzowej, rozchwianie oraz przemieszczenie zębów, objaw Vicenta, krwawienie, ślinotok, przykurcz mięśni policzka, dna jamy ustnej, unieruchomienie języka, halitozę oraz brak przylegania protezy. Objawami świadczącymi o znacznym stopniu zaawansowania zmian są asymetria twarzy, zaburzenia widzenia, objawy neurologiczne (np. porażenie nerwu twarzowego), niedrożność przewodów nosowych, zaburzenia mowy, oddychania, obecność dysfagii lub odynofagii, chrypka, powiększenie regionalnych węzłów chłonnych, brak łaknienia i kacheksja. Węzły chłonne z przerzutami nowotworowymi są twarde, nieprzesuwalne względem podłoża i spoiste [52, 95, 103].

Diagnostyka obejmuje badanie kliniczne pacjenta (wywiad i badanie przedmiotowe), biopsję wycinającą lub wycięciową. Następnie wykonuje się diagnostykę obrazową w celu oceny stopnia zaawansowania zmiany. Są to badania wielorzędowej tomografii komputerowej oraz rezonansu magnetycznego części twarzowej czaszki i szyi, badanie ultrasonograficzne szyi z cytodiagnostyką węzłów chłonnych, tomografia komputerowa klatki piersiowej lub badanie radiologiczne klatki piersiowej, tomografia komputerowa lub badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej. Dodatkowymi metodami obrazowania, przydatnymi w ocenie wznowy oraz skuteczności leczenia, są scyntygrafia kości, tomografia emisyjna pojedynczych fotonów oraz pozytonowa tomografia emisyjna [108].

W celu standaryzacji i klasyfikacji stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu (ang. *staging*) członkowie komitetu *Union Internationale Contre le Cancer/American Joint Committee on Cancer (UICC/AJCC)* przygotowali system klasyfikacji nowotworów złośliwych TNM (T – *tumour* – wielkość guza pierwotnego, N – *nodules* – przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych, M – *metastasis* – przerzuty odległe narządowe). Stadium zaawansowania odnosi się do wielkości lub zasięgu zmiany pierwotnej oraz rozprzestrzenienia się komórek nowotworowych w organizmie (przerzuty do lokalnych węzłów chłonnych oraz przerzuty odległe) [102]. W niniejszej pracy użyto klasyfikacji TNM dla raka jamy ustnej z 2010 roku (siódma edycja TNM; Tabela 1 i 2) [30]. Natomiast od grudnia 2016 roku obowiązuje podział według ósmej edycji klasyfikacji TNM (Tabela 3 i 4) [5, 81]. Najnowszą klasyfikację rozszerzono

o ocenę stopnia naciekania miejscowego tkanek przez nowotwór (zmiany dotyczące cechy T) oraz obecności nacieku pozawęzłowego (zmiany dotyczące cechy N) [5, 81].

Stopień zróżnicowania histopatologicznego nowotworu (ang. *grading*) ocenia się wg *World Health Organization System* (Tabela 5), który jest wskaźnikiem szybkości wzrostu guza i rozprzestrzeniania się nowotworu. Zmiany zaliczane do wysokozróżnicowanych charakteryzują się wyglądem komórek zbliżonym do prawidłowych, rosną i rozprzestrzeniają się wolniej niż w przypadku nowotworów zaliczanych do guzów niskozróżnicowanych [4, 101].

Leczenie zależy od stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu, zróżnicowania histopatologicznego, wieku chorego oraz stopnia odżywienia. W raku jamy ustnej stosuje się leczenie chirurgiczne lub chirurgiczne z następową radioterapią na okolicę twarzowo-szyjną. W zaawansowanych przypadkach RJU stosowana jest radioterapia lub radio- i chemioterapia. Pomimo postępu w dziedzinach chirurgii, radioterapii oraz chemioterapii, nie zaobserwowano się w przeciągu ostatnich dziesięciu lat znaczącego wzrostu przeżyć 5-letnich [26, 136]. Ze względu na wysoką umieralność oraz niepewne rokowanie, zaczęto szukać innowacyjnych metod leczenia. Podjęto próby poszukiwania terapii, które umożliwiają sprofilowanie działań na specyficzne, charakterystyczne dla danych nowotworów, zaburzenia molekularne. Leczenie miałoby za zadanie zahamować szlaki sygnałowe regulujące cykl komórkowy czy angiogenezę. Zaobserwowano, że hamowanie receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) przez cetuksymab poprawia wyniki kliniczne w przypadku leczenia nawrotów zmian oraz przerzutów RJU [43, 49, 76, 82, 93, 94, 146]. Istotne jest opisanie potencjalnych markerów molekularnych oraz ich znaczenia prognostycznego i predykcyjnego. Markery mogłyby być wykorzystywane w codziennej praktyce kliniczne. Detekcja wybranych czynników powinna być prosta oraz niewymagająca znacznych nakładów finansowych [25, 29, 40, 51, 124, 164].

Tabela 1. Stopnień zaawansowania patomorfologicznego oraz klinicznego wg siódmej edycji klasyfikacji TNM (WHO 2010)

Table 1. *The clinical and pathological staging by the 7th edition of the TNM classification (WHO 2010)*

T – Guz pierwotny/*Primary tumour*	
Tx	Nie można ocenić guza pierwotnego/ *Main tumour cannot be measured*
T0	Brak dowodów świadczących o występowaniu pierwotnego nowotworu/ *Main tumour cannot be found*
Tis	Rak in situ/ *Carcinoma in situ*
T1	Guz wielkości 2 cm lub mniejszy w największym wymiarze/ *Tumour 2 cm or less in greatest dimension*
T2	Guz wielkości 2 cm, ale nie większy niż 4 cm w największym wymiarze/ *Tumour more than 2 cm but not more than 4 cm in greatest dimension*
T3	Guz wielkości ponad 4 cm w największym wymiarze/ *Tumour more than 4 cm in greatest dimension*
T4a	Guz nacieka kość korową żuchwy/zatoki szczękowej/skórę twarzy/ *Tumour invades through the cortical bone of the mandible/maxillary sinus/invades the skin of the face*
T4b	Guz nacieka przestrzeń żwacza/wyrostek skrzydłowaty/podstawę czaszki/zamyka wewnętrzną tętnicę szyjną/ *Tumour invades masticator space/pterygoid plates/skull base/encases internal carotid artery*
N – Regionalne węzły chłonne/*Regional lymph nodes*	
Nx	Regionalne węzły chłonne nie mogą być oceniane/ *Regional lymph nodes cannot be assessed*
N0	Brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych/ *No regional lymph node metastasis*
N1	Przerzuty w jednym węźle chłonnym po stronie guza, o wymiarze 3 cm lub mniejszym w największym wymiarze/ *Metastasis in a single ipsilateral lymph node, 3 cm or less in greatest dimension*
N2a	Przerzuty w jednym węźle chłonnym po stronie guza, o wymiarze większym niż 3 cm, ale mniejszym niż 6 cm w największym wymiarze/ *Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension*

N2b	Przerzuty w licznych węzłach chłonnych po stronie guza, o wymiarze nie większym niż 6 cm w największym wymiarze/ *Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension*
N2c	Przerzuty w węzłach chłonnych obustronne lub po stronie przeciwnej do guza, o wymiarze nie większym niż 6 cm w największym wymiarze/ *Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension*
N3	Przerzuty w węzłach chłonnych większe niż 6 cm w największym wymiarze/ *Metastasis in a lymph node more than 6 cm in greatest dimension*
M – Przerzuty odległe/*Distant metastasis*	
M0	Brak przerzutów odległych/ *No distant metastasis*
M1	Przerzuty odległe/ *Distant metastasis*

Tabela 2. Stopnie zaawansowania klinicznego wg WHO 2010

Table 2. *Clinical staging by WHO 2010*

Stadium/*Stage*	**T**	**N**	**M**
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
IVA	T4a	N0, N1	M0
	T1, T2, T3, T4a	N2	M0
IVB	Każde T	N3	M0
	T4b	Każde N	M0
IVC	Każde T	Każde N	M1

Tabela 3. Stopnień zaawansowania patomorfologicznego oraz klinicznego wg ósmej edycji klasyfikacji TNM (WHO 2017)

Table 3. *The clinical and pathological staging by the 8th edition of the TNM classification (WHO 2017)*

T – guz pierwotny/*Primary tumour*	
Tx	Nie można ocenić guza pierwotnego/ *Main tumour cannot be measured*
T0	Brak dowodów świadczących o występowaniu pierwotnego nowotworu/ *Main tumour cannot be found*
Tis	Rak in situ/ *Carcinoma in situ*
T1	Guz wielkości 2 cm lub mniejszy w największym wymiarze oraz **głębokość naciekania 5 mm lub mniejsza**/ *Tumour 2 cm or less in greatest dimension and **5 mm or less depth of invasion***
T2a	Guz wielkości 2 cm lub mniejszy w największym wymiarze oraz **głębokość naciekania większa niż 5 mm, ale mniejsza niż 10 mm**/ *Tumour 2 cm or less in greatest dimension and more than 5 mm but **no more than 10 mm depth of invasion***
T2b	Guz wielkości 2 cm, ale nie większy niż 4 cm w największym wymiarze oraz **głębokość naciekania nie większa niż 10 mm**/ *Tumour more than 2 cm but not more than 4 cm in greatest dimension and **depth of invasion no more than 10 mm***
T3	Guz wielkości ponad 4cm w największym wymiarze lub **głębokość naciekania większa niż 10 mm**/ *Tumour more than 4 cm in greatest dimension or **more than 10 mm depth of invasion***
T4a	Guz nacieka kość korową żuchwy/zatoki szczękowej/skórę twarzy/ *Tumour invades through the cortical bone of the mandible/maxillary sinus/invades the skin of the face*
T4b	Guz nacieka przestrzeń żwacza/wyrostek skrzydłowaty/podstawę czaszki/zamyka wewnętrzną tętnicę szyjną/ *Tumour invades masticator space/pterygoid plates/skull base/encases internal carotid artery*

N – Regionalne węzły chłonne/*Regional lymph nodes*	
Nx	Regionalne węzły chłonne nie mogą być oceniane/ *Regional lymph nodes cannot be assessed*
N0	Brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych/ *No regional lymph node metastasis*
N1	Przerzuty w jednym węźle chłonnym po stronie guza, o wymiarze 3 cm lub mniejszym w największym wymiarze; **bez nacieku pozawęzłowego**/ *Metastasis in a single ipsilateral lymph node, 3 cm or less in greatest dimension;* ***without extranodal extension***
N2a	Przerzuty w jednym węźle chłonnym po stronie guza, o wymiarze większym niż 3 cm, ale mniejszym niż 6 cm w największym wymiarze; **bez nacieku pozawęzłowego**/ *Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension;* ***without extranodal extension***
N2b	Przerzuty w licznych węzłach chłonnych po stronie guza, o wymiarze nie większym niż 6 cm w największym wymiarze; **bez nacieku pozawęzłowego**/ *Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension,* ***without extranodal extension***
N2c	Przerzuty w węzłach chłonnych obustronne lub po stronie przeciwnej do guza, o wymiarze nie większym niż 6 cm w największym wymiarze; **bez nacieku pozawęzłowego**/ *Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension,* ***without extranodal extension***
N3a	Przerzuty w węzłach chłonnych większe niż 6 cm w największym wymiarze; **bez nacieku pozawęzłowego**/ *Metastasis in a lymph node more than 6 cm in greatest dimension;* ***without extranodal extension***
N3b	Przerzuty do jednego lub licznych węzłów chłonnych **z naciekiem pozawęzłowym**/ *Metastasis in a single or multiple lymph nodes* ***with clinical extranodal extension***
M – Przerzuty odległe/Distant metastasis	
M0	Brak przerzutów odległych/ No distant metastasis
M1	Przerzuty odległe/ Distant metastasis

Tabela 4. Stopnie zaawansowania klinicznego wg WHO 2017

Table 4. *Clinical staging by WHO 2017*

Stadium-*Stage*	**T**	**N**	**M**
I	T1	N0	M0
II	T2a, T2b	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1, T2a, T2b, T3	N1	M0
IVA	T4a	N0, N1	M0
	T1, T2a, T2b, T3, T4a	N2	M0
IVB	Każde T	N3	M0
	T4b	Każde N	M0
IVC	Każde T	Każde N	M1

Tabela 5. Stopnie złośliwości histopatologicznej wg WHO

Table 5. *Histopathological grading by WHO*

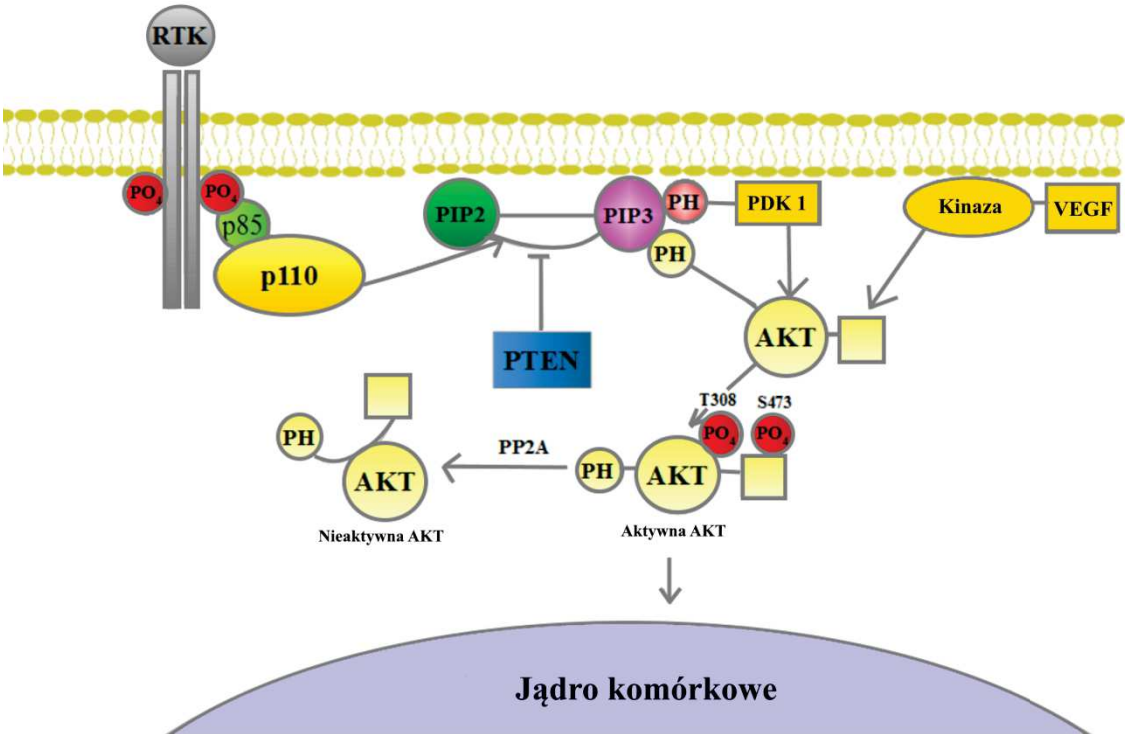
Gx	Nie można ocenić stopnia zróżnicowania/ *Grade cannot be assessed*	
G1	Rak wysokozróżnicowany/ *Well differentiated*	Niski stopień złośliwości/ *Low grade*
G2	Rak średniozróżnicowany/ *Moderately differentiated*	Pośredni stopień złośliwości/ *Intermediate grade*
G3	Rak niskozróżnicowany/ *Poorly differentiated*	Wysoki stopień złośliwości/ High grade
G4	Rak niezróżnicowany/ *Undifferentiated*	Wysoki stopień złośliwości/ *High grade*

3.2 Ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu

Wewnątrzkomórkowa ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphatidyl-inositol 3-kinase,* PI3K; Rycina 1) jest zaangażowana w procesy wzrostu, podziału, różnicowania, transportu wewnątrzkomórkowego, migracji i przeżycia komórki. Stanowi kluczowy element odpowiedzi komórki na insulinę i inne czynniki wzrostu, a także uczestniczy w procesach starzenia [9, 116, 124, 132, 163]. Zaobserwowano udział ścieżki sygnałowej PI3K w autofagii [65]. Obok kinazy białkowej C (ang. *protein kinase C*, PKC) i szlaku RAS/MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase/RAS pathway*) jest jednym z trzech podstawowych szklaków sygnałowych związanych z aktywnością receptorów kinaz tyrozynowych. Połączenie RTK (ang. *receptor tyrosine kinase*) z odpowiednim ligandem powoduje aktywację PI3K i wytworzenie jego produktu w postaci fosfatydylo-inozytolotrójfosforanu. PIP3 (ang. *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*) odgrywa rolę drugiego przekaźnika, który dzięki obecności domeny plekstryny (ang. *pleckstrin homology domain,* PH) może wiązać się z kinazami serotoninowo-treoninowymi, tyrozynowymi czy białkiem G. Fosfolipid PIP3 jest zakotwiczony w błonie komórkowej i może wiązać się z kinazami oraz białkiem G przez domenę PH, powodując ich rekrutacje w okolicy błony cytoplazmatycznej. W procesie fosforylacji dochodzi do aktywacji między innymi AKT (ang. *serine-threonine kinase=protein kinase B*) poprzez PDK1 (ang. *3-phosphoinositide-dependent kinase-1*) [9, 116, 124, 130].

Regulacja stężenia PIP3 odbywa się głównie na drodze jego defosforylacji przez białko PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog encoded on chromosome 10*). Kaskada szlaku PIK3K/AKT rozpoczyna się w momencie połączenia receptora kinazy tyrozynowej z ligandem (czynniki wzrostu, cytokiny, hormony). Dochodzi do autofosforylacji receptora, a następnie aktywacji podjednostki regulatorowej p85 PI3K, co aktywuje domenę katalityczną p110 [31]. PI3K wiąże się ze swoim substratem PIP2 (ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*), tworząc PIP3. PIP3 posiada wysokie powinowactwo do domeny PH kinazy AKT oraz indukuje fosforylację AKT poprzez PDK-1 i mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*). Powoduje to rekrutucję AKT do błony komórkowej. Fosforylacja AKT zachodzi w pozycji tyrozyny T308 i seryny S473. Aktywność enzymatyczna AKT wzrasta tysiąckrotnie. Kinaza powoduje

fosforylacje ważnych dla funkcjonowania komórki białek. Za hamowanie tego procesu odpowiada białko PTEN. W przypadku utraty PTEN dochodzi do niekontrolowanego wzrostu aktywności AKT, co umożliwia transformację onkogenną komórek organizmu. Rycina 1 przedstawia szczegółowo szlak sygnalizacji PI3K [13, 123, 129].



Rycina 1. Schemat szlaku sygnałowego ścieżki PI3K (PI3K: podjednostka katalityczna p110 i regulacyjna p85; RTK – receptor kinaz tyrozynowych; PTEN – fosfataza i homolog tensyny kodowany na chromosomie 10; PIP2 – 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu, PIP3 – 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu; PDK1 – kinaza zależna od 3-fosfoinozyty-1; PP2A – fosfataza białkowa 2; PH – domena homologiczna plekstryny; T308 – miejsce fosforylacji treoniny w domenie 308 katalitycznej kinazy AKT; S473 – miejsce fosforylacji seryny w domenie 473 kinazy regulatorowej AKT, PO_4 – grupa fosforanowa, VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń; AKT – kinaza seryno-treoninowa)

Figure 1. *Diagram of PI3K/AKT pathway (PI3K: catalytic subunit p110 and regulatory subunit p85; RTK – receptor tyrosine kinase; PTEN – phosphatase and tensin homolog encoded on chromosome 10; PIP2 – phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP3 – phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate; PDK1 – 3-phosphoinositide-dependent kinase-1; PP2A – protein phosphatase 2; PH – pleckstrin homology domain; T308 – threonine 308 phosphorylation site at the AKT kinase catalytic domain; S473 – serine 473 phosphorylation site at the AKT kinase regulatory domain;* PO_4 *– phosphate group; VEGF – vascular endothelial growth factor, AKT – serine-threonine kinase)*

Badania nad wpływem deregulacji szlaku sygnałowego PI3K na powstawanie zmian złośliwych prowadzono już w latach 70-tych XX wieku [12]. Podczas badań nad różnymi nowotworami wykryto w obrębie głównych elementów szlaku PIK3CA/AKT/PTEN mutacje oraz amplifikacje genów (zwiększenie liczby kopii genu). Wykazano, że zmiany genetyczne w obrębie szlaku powodują nieprawidłowy wzrost i proliferację komórek, indukują tworzenie się nowotworów, powstawanie przerzutów oraz mają wpływ na skuteczność leczenia [55, 106, 115, 151]. Najbardziej znane zmiany genetyczne obejmują mutacje dotyczące genu supresorowego *PTEN*, które prowadzą do utraty aktywności białka PTEN i następującej po tym aktywacji proliferacji komórkowej. Zaburzenia szlaku zostały opisane głównie w glejaku, w raku endometrium i prostaty [32, 61, 122]. Inne dobrze znane zmiany obejmują mutacje punktowe i amplifikacje genów *PIK3CA* (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha gene*) oraz *AKT*. Rola zaburzeń w procesie rozwoju RJU jest bardzo złożona. Współistnienie mutacji genu *PIK3CA* i utraty *PTEN* sugeruje, że pojedyncze zmiany nie są obojętne dla komórki, ale są zdolne do aktywowania niezależnych szlaków sygnałowych [159].

3.3 PIK3CA

Funkcją PI3K jest fosforylacja grupy hydroksylowej w pozycji 3 pierścienia inozytolowego fosfatydyloinozytolu [31, 70]. Wyróżniamy trzy klasy enzymów białkowo-lipidowych: I A, I B, II oraz III. Klasa I A jest heterodimerem składającym się z dwóch podjednostek: regulatorowej (p85) i katalitycznej (p110). Podjednostka katalityczna występuje w trzech izoformach: p110α (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha protein*), p110β (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta protein*) i p110δ (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta protein*) kodowanych odpowiednio przez geny *PIK3CA* (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha gene*), *PIK3CB* (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta gene*) i *PIK3CD* (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta gene*).

Podobnie podjednostki regulatorowe występują w trzech izoformach: p85α (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase regulatory subunit 1 protein*), p85β (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase regulatory subunit 2 protein*), p85γ (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase regulatory subunit 3 protein*) kodowanych kolejno przez geny *PIK3R1* (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase regulatory subunit 1 gene*), *PIK3R2* (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase regulatory subunit 2 gene*) oraz *PIK3R3* (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase regulatory subunit 3 gene*). Strukturę klasy I B stanowi podjednostka katalityczna p110γ oraz regulatorowa p101 i jej homologiczne formy p84 i p87PIKAP. Klasa II PI3Ks posiada tylko podjednostkę katalityczną p110, która występuje w trzech izoformach PIK3C2α, PIK3C2β i PIK3C2γ. Klasa III składa się z cząsteczki Vps34 (ang. *vacuolar protein-sorting defective 34*) (Tabela 6) [31, 123].

Podjednostka katalityczna p110α jest kodowana przez gen *PIK3CA*, który znajduje się na ramieniu długim 3 chromosomu (3q26.3). Podjednostka ma wielkość 110 kDa i jest złożona z 1068 aminokwasów. Najczęstszymi mutacjami punktowym w genie *PIK3CA*, o udowodnionym potencjale kancerogennym, są tzw. gorące miejsca (ang. *hotspots*): H1047R (egzon 20), E542K i E545K (egzon 9) [15, 88, 97, 123, 142]. Mutacje w genie *PIK3CA* występują także w obrębie egzonów 1, 4, 5, 6 i 7 [117]. Onkogenny potencjał zaburzeń genu *PIK3CA* związany jest między innymi z niewrażliwością nowotworów na insulinę, a poprzez to na ograniczenie zużycia energii w komórkach. Uważa się także, iż amplifikacje genu *PIK3CA* mogą prowadzić do transformacji nowotworowej [31].

Obecność mutacji punktowych oraz amplifikacji genu *PIK3CA* w locus *3q26.3* [15] wykazano w glejaku, raku jelita grubego, płuca, piersi, jajnika, szyjki macicy, krtani, gardła, prostaty, pierwotnym raku wątroby, chłoniaku Hodgkina, białaczce i czerniaku złośliwym [46, 68, 70, 78, 90, 110, 117, 119, 121, 123, 139, 163].

Tabela 6. Rodzina kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K)

Table 6. *Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) family*

PI3K					
Klasa I/Class I				**Klasa II/ *Class II***	**Klasa III/ *Class III***
I A			**I B**		
Podjednostka katalityczna/*Catalytic subunit*					
PIK3CA p110α	PIK3CB p110β	PIK3CD p110δ	PIK3CG p110γ	PIK3C2α PIK3C2β PIK3C2γ	PIK3C2α PIK3C2β PIK3C2γ
Podjednostka regulatorowa/*Regulatory subunit*					
PIK3R1p85α	PIK3R2 p85β	PIK3R3 p85γ	p101 p84 p87 PIKAP	Brak/ *No regulatory subunit*	Brak/ *No regulatory subunit*

Badania dotyczące zmian w obrębie genu *PIK3CA* w raku jamy ustnej są nieliczne. Mutacje genu *PIK3CA* w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi po raz pierwszy opisali w 2006 roku Qiu W i wsp., wykazując częstość mutacji rzędu 10,8% [117] w grupie 8 chorych z RJU. Najwyższy wskaźnik mutacji odnotowali Chang YS i wsp. (13,92%) [15]. W innych badaniach mutacje genu *PIK3CA* występowały w zakresie od 0% do 10,80% [11, 15, 18, 33, 58, 59, 117, 126, 127, 137, 145]. Podobne rozbieżności stwierdzono w badaniach oceniających amplifikację genu *PIK3CA*. Zmienność częstotliwości może wynikać z wielkości próby, metody zastosowanej do analizy mutacji lub innej grupy etnicznej pacjentów. Ostatnia z wymienionych przyczyn wydaje się prawdopodobna, ponieważ w badaniu nad populacją południowoindyjską nie wykryto mutacji genu *PIK3CA* [7]. W większości publikacji nie wykazano istotnego związku z danymi klinicznymi pacjentów, takimi jak wiek, palenie papierosów, płeć, lokalizacja zmiany, stopień zróżnicowania histopatologicznego a statusem genu. Tylko w pracach przeprowadzonych przez Kozakiego i wsp., na dużej grupie pacjentów, stwierdzono dodatnią zależność pomiędzy

występowaniem mutacji *PIK3CA* a stadium choroby (p=0,042) [59]. Natomiast Fenic i wsp. odkryli, że amplifikacja genu *PIK3CA* koreluje ze stopniem złośliwości histopatologicznej [33]. Największy wzrost liczby kopii genu *PIK3CA* był obserwowany we wczesnych stadiach rozwoju nowotworu [152].

Obecność mutacji genu *PIK3CA* w RJU analizowano do tej pory za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR), PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR), fluorescyjnej hybrydyzacji in situ (ang. *fluorescent in situ hybridisation*, FISH), spektrometrii masowej MALDI-TOF-MS (ang. *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*), porównawczej hybrydyzacji genowej na mikromacierzach (ang. *array-based comparative genomic hybridisation*, aCGH) i metody MLPA (ang. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) [14, 18, 59, 73, 97, 126, 140, 160].

Status białka PIK3CA badano w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej [36, 77, 154, 157], głowy i szyi [152], niedrobnokomórkowym płuca [75, 150], przełyku [2], żołądka [78], jelita grubego [48], jajnika [1] i piersi [34].

3.4 AKT

Serynowo-treoninowa kinaza białkowa AKT (ang. *serine-threonine kinase= protein kinase B*, PKB) jest zasadniczym białkiem efektorowym w szlaku PI3K oraz głównym mediatorem sygnałów przetrwania, które chronią komórki przed apoptozą, a przez to jest potencjalnie ważnym celem terapeutycznym. W warunkach prawidłowych odpowiada za procesy związane z metabolizmem glukozy, proliferacją komórki, migracją, transkrypcją oraz apoptozą [45]. Kinaza serynowo-treoninowa występuje w trzech izoformach: AKT1 (PKBα), AKT2 (PKBβ) i AKT3 (PKBγ). Pierwsze dwie kinazy można znaleźć w większości komórek organizmu, natomiast występowanie kinazy AKT3 ogranicza się do mózgu, jąder, serca, nerek, płuc i mięśni szkieletowych [41]. Uważa się, że każda izoforma spełnia odrębną funkcje, tj. AKT1 wpływa na przeżycie i wzrost komórek, AKT2 kontroluje przekazywanie sygnałów insuliny w komórkach wątroby i mięśni szkieletowych, a AKT3 wpływa na rozwój i wzrost mózgu [17, 37, 104].

Mutacja punktowa (nukleotyd 49) w genie *AKT1* powoduje zamianę w łańcuchu białkowym kwasu glutaminowego (E) na lizynę (K). Skutkuje to translokacją membranową białka AKT1 i konstytutywną aktywację AKT1 [18, 45]. Amplifikacja genu jest jednym z podstawowych mechanizmów biorących udział w aktywacji onkogenów. Obserwuje się związek pomiędzy obecnością mutacji w genach *AKT* a zaawansowaniem choroby oraz gorszą prognozą w raku jamy ustnej, skóry, prostaty, trzustki, wątroby, żołądka, endometrium, piersi, mózgu oraz w nowotworach krwi [17, 32, 37, 41, 45, 59, 60, 91, 99, 100, 104, 110, 111, 141, 158].

W genie *AKT1* zbadano pięć polimorfizmów pojedynczych nukleotydów. Polimorfizmy genotypowano za pomocą *Sequenom Mass Array* i technologii laserowej jonizacji próbki wspomaganej matrycą działająca na zasadzie pomiaru czasu przelotu jonów w spektrometrze masowym iPLEX-MALDI-TOF. Polimorfizmy rs1130214 i rs3803300 w genie *AKT1* były związane z wyższym ryzykiem rozwoju raka jamy ustnej [37]. Ze względu na wpływ mutacji *AKT1* na przeżycie pacjentów w wielu nowotworach należy uwzględnić mutację *AKT1* w dalszych badaniach nad RJU [18].

Poziom białka AKT w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej badano immunohistochemicznie, wykazując pozytywną reakcję barwną u 34,5-100% pacjentów [44, 71, 72, 84, 86, 99, 114, 120, 154, 161]. Zauważono istotne statystycznie zależności pomiędzy statusem białka AKT a płcią [86], lokalizacją zmiany [86], stopniem zróżnicowania histopatologicznego (gorsze rokowanie dla zmian słabo zróżnicowanych) [50, 72, 86, 120], stopniem zaawansowania klinicznego (gorsze rokowanie w wyższych stadiach) [50, 72 155, 161], wielkością zmiany pierwotnej [72], obecnością przerzutów węzłowych [50, 71, 72, 114, 161] oraz wznowy [71, 72, 161], paleniem papierosów [71], alkoholizmem [71], całkowitym [114] oraz 5-letnim przeżyciem [71].

3.5 PTEN

Fosfataza i homolog tensyny kodowany na chromosomie 10 (ang. *phosphatase and tensin homolog encoded on chromosome 10;* PTEN) znajduje się na ramieniu dłuższym chromosomu 10 (gen 10q23.2). Jest fosfatazą o podwójnej swoistości. Posiada aktywność lipidową i fosfataz białkowych [67]. Białko PTEN pełni rolę inhibitora ścieżki sygnałowej PI3K/AKT poprzez defosforylację PIP3, a tym samym zmniejsza stężenia 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu w komórce. Powoduje to „regulację w dół" kaskady sygnałowej AKT, aktywowanej przez czynniki wzrostu, np. EGFR. Kinaza AKT zmniejsza swoją aktywność, wiążąc się z błoną komórkową. Utrata ekspresji genu *PTEN* powoduje zwiększoną aktywność AKT i ciągłą proliferację komórek. Delecje i mutacje punktowe prowadzące do inaktywacji genu *PTEN* są najczęściej obserwowanymi aberracjami genetycznymi występującymi w różnych nowotworach – w raku prostaty, sutka, płuca, endometrium i jelita grubego oraz w glejaku [24, 31, 53, 61, 63, 122, 144, 156]. Całkowita supresja ekspresji genu *PTEN* jest letalna dla komórek embrionalnych, natomiast częściowa supresja prowadzi do wystąpienia karcynogenezy [110]. Znaczenie prognostyczne inaktywacji genu *PTEN* opisano głównie w raku macicy, piersi, prostaty, płuca czy w czerniaku [35, 61, 122, 144, 156].

Analiza genu *PTEN* w raku głowy i szyi sugeruje, że może odgrywać rolę w kancerogenezie [67]. Obecnie jest niewiele badań dotyczących genetycznych aberracji genu *PTEN* w RJU. W badaniach Cohen Y, i wsp. oraz Marvos A, i wsp. nad aberracjami nie wykryto tych zaburzeń [18, 87]. Natomiast Shin i wsp. wykazali obecność mutacji punktowych genu *PTEN* u 4,65% przypadków, z których cztery zostały zidentyfikowane jako mutacje zmiany sensu, a jedna jako mutacja typu *fameshift* [128]. W badaniach dotyczących populacji indyjskiej, Shah i wsp. udokumentowali obecność delecji intronowych *PTEN* u 3 pacjentów, ale bez istotnej korelacji z płcią, rozmiarem zmiany, stopniem zaawansowania lub złośliwości histopatologicznej [126].

Mutacje, delecje i hipermetylacje genu *PTEN* w raku jamy ustnej są rzadkim zdarzeniem. Prawdopodobnie nie jest to bezpośredni czynnik odpowiedzialny

za obniżenie stężenia białka PTEN [47, 64, 67, 96, 112, 118, 133, 154, 161]. Obecność mutacji inaktywujących w genie *PTEN*, a co za tym idzie utrata białka PTEN, wpływa na większą dynamikę wzrostu guza, duże prawdopodobieństwo wznowy miejscowej po leczeniu chirurgicznym i radioterapii oraz wiąże się z gorszym rokowaniem i z wyższą śmiertelnością u chorych na RJU [18]. Według Lee JI i wsp. czas przeżycia był krótszy u pacjentów z utratą ekspresji genu *PTEN* [67]. Natomiast utrata białka PTEN, oceniana za pomocą immunohistochemii, występuje często. Wskazuje to na pośrednią dezaktywację PTEN, na przykład poprzez modyfikacje posttranslacyjne, które mogą być mechanizmem prowadzącym do utraty tego białka [47]. Istnieją dane sugerujące, że utrata białka PTEN częściej występuje w niskozróżnicowanych zmianach [133, 154] oraz w zaawansowanych stadiach raka jamy ustnej [118, 161]. Sugeruje to, że utrata PTEN jest związana z progresją raka i rozwojem przerzutów. Ponadto zaburzenie jest częstsze w nowotworach HPV-ujemnych [154].

4. CELE PRACY

Głównym celem pracy była analiza immunohistochemiczna i molekularna wybranych elementów szlaku sygnałowego kinazy 3-fosfatydyloinozytolu.

Cele szczegółowe:

1. Ocena poziomu białek PIK3CA i PTEN oraz częstości występowania amplifikacji genu *PIK3CA* w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej.

2. Analiza wzajemnych zależności między cechami klinicznymi i patologicznymi a statusem poszczególnych białek w raku jamy ustnej.

3. Ocena zależności między cechami klinicznymi i patologicznymi a amplifikacją genu *PIK3CA* w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej.

4. Określenie znaczenia rokowniczego poziomu białek PIK3CA i PTEN.

5. Określenie znaczenia prognostycznego amplifikacji genu *PIK3CA*.

5. MATERIAŁ I METODY

5.1 Grupa badana

Badaniem retrospektywnym objęto grupę 92 chorych (mężczyźni i kobiety w wieku 36-89 lat) leczonych z powodu raka jamy ustnej w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2007-2012. W celu prowadzenia badań uzyskano pozytywną opinię Niezależnej Komisji Bioetycznej działającej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN/60/2016).

Materiał do badań pozyskano z pierwotnych zmian raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, który został pobrany w postaci wycinków bądź usuniętych zmian w całości podczas zabiegów w znieczuleniu ogólnym lub miejscowym. W badaniu zostały wykorzystane preparaty zarchiwizowane w Zakładzie Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Kierownik: prof. dr hab. n. med. Wojciech Biernat). Dane kliniczne oraz metody leczenia uzyskano na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej (historie choroby, protokoły operacyjne, zlecone badania dodatkowe, leczenie w poradniach i oddziałach Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego). Podczas prowadzonych badań została zachowana pełna anonimowość chorych.

Z badania wykluczono pacjentów, u których stwierdzono inny nowotwór złośliwy jamy ustnej lub nie była dostępna pełna dokumentacja medyczna.

Do oceny stopnia zaawansowania patomorfologicznego oraz klinicznego zastosowano siódmą edycję klasyfikacji TNM z 2010 r. (Tabela 1 i 2) [30]. Stopień zróżnicowania histopatologicznego analizowano w skali czterostopniowej (Tabela 5). Do klinicznej analizy stopnia zaawansowania nowotworu wykorzystano badanie przedmiotowe, badania tomografii komputerowej twarzoczaszki i szyi, ultrasonograficzne węzłów chłonnych szyi, radiologiczne klatki piersiowej lub badanie histopatologiczne wykonane pooperacyjne.

Szczegółowo analizowano:

1. dane demograficzne pacjentów (wiek w momencie rozpoznania, płeć);
2. czas od wystąpienia objawów do diagnozy;
3. występowanie chorób przewlekłych (nadciśnienie, cukrzyca);
4. stosowanie używek (palenie tytoniu i nadużywanie wysokoprocentowego alkoholu);
5. lokalizację nowotworu;
6. stopień zaawansowania klinicznego i zróżnicowania histopatologicznego zmiany;
7. stosowane leczenie;
8. obecność wznowy i ewentualne leczenie;
9. czas przeżycia.

5.2 Mikromacierze tkankowe

Przygotowanie preparatów polegało na ocenie makroskopowej badanego materiału, wybraniu reprezentatywnych fragmentów nowotworu, utrwaleniu w 10% zbuforowanej formalinie, a następnie przejściu rutynowej procedury, w celu zatopienia w niskotopliwej parafinie. W ten sposób uzyskano pierwotne bloki parafinowe. Następnie, pod kontrolą mikroskopu świetlnego (barwienie hematoksyliną-eozyną), wybrano reprezentatywne fragmenty zmiany. Z każdego bloczku wycięto po dwa rdzenie tkankowe średnicy 0,4 mm (*Manual Tissue Arrayer MTA 1 Beecher Instruments Inc, Sun Prairie, USA*), które zostały umieszczone we wtórnym bloku parafinowym. W ten sposób uzyskano mikromacierze tkankowe (ang. *tissue microarray*, TMA). Dzięki temu obniżono koszty badania, a pierwotny blok parafinowy może zostać wykorzystany do kolejnych analiz (mniejsze zużycie materiału tkankowego). Ponadto większa liczba próbek znajduje się w takich samych warunkach, co wpływa na wzrost precyzji przeprowadzonego badania.

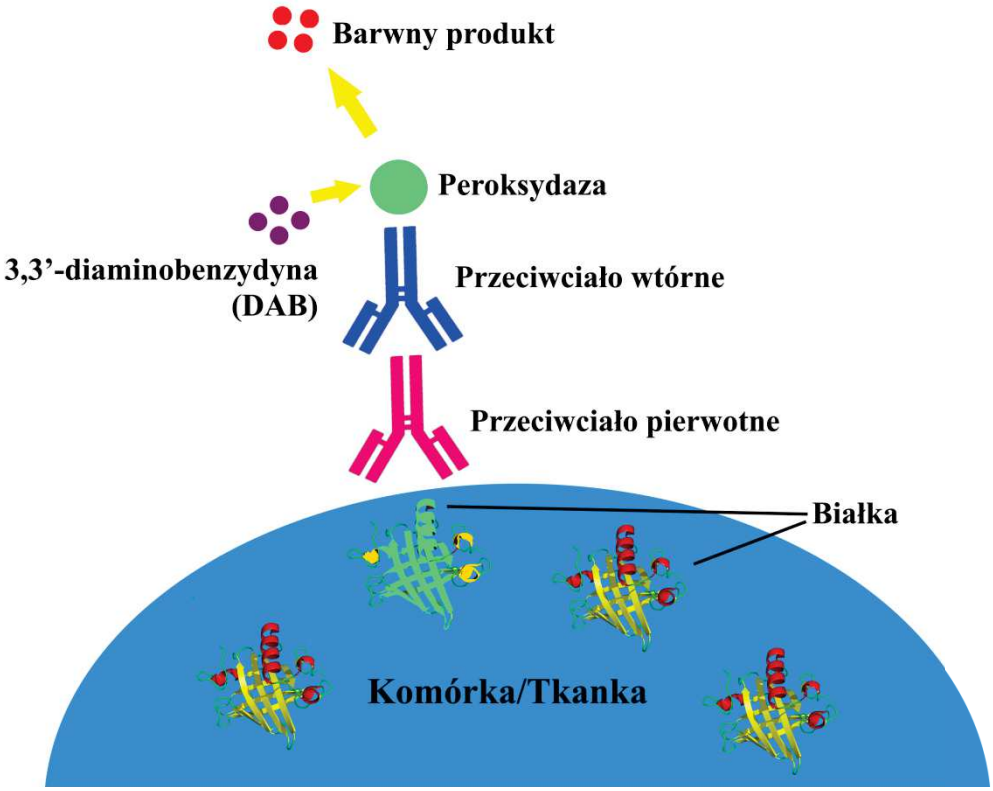
Na każdym bloczku TMA w celu prawidłowej orientacji preparatów, oprócz rdzeni ze zmianami nowotworowymi, znalazły się dwa cylindry pochodzące z wątroby. W kolejnym etapie każdy bloczek został pocięty na mikrotomie na skrawki

o średnicy 4 μm. Skrawki zostały umieszczone na szkiełkach podstawowych [56, 147]. Na tak przygotowanych szkiełkach przeprowadzono procedurę immunohistochemii oraz chromogennej hybrydyzacji in situ i wzmocnionej jonami srebra hybrydyzacji in situ.

5.3 Badanie immunohistochemiczne

Metody immunohistochemiczne pozwalają na wykrycie różnych antygenów za pomocą przeciwciał ukierunkowanych na specyficzne białko w badanym materiale. Po połączeniu odpowiedniego przeciwciała z badanym antygenem, powstaje nierozpuszczalna substancja, którą można zaobserwować w mikroskopie świetnym (Rycina 2). Przeciwciała dzieli się monoklonalne (bardziej specyficzne, ukierunkowane względem jednego epitopu) oraz poliklonalne. W zależności od przebiegu reakcji wyróżniamy immunohistochemię bezpośrednią oraz pośrednią. W metodzie bezpośredniej przeciwciało rozpoznające antygen jest sprzęgnięte z barwnikiem bądź enzymem. W technice pośredniej reakcja jest dwuetapowa. Pierwszy etap stanowi połączenie antygenu z przeciwciałem pierwotnym. Etap drugi stanowi przeciwciało wtórne swoiste dla przeciwciała pierwotnego. Metoda pośrednia jest bardziej czuła od bezpośredniej. W niniejszej pracy badanie immunohistochemiczne miało wykazać poziom białek PIK3CA i PTEN [10, 80, 109].

W celu oceny obecności białek PIK3CA i PTEN w badanych tkankach zastosowano królicze monoklonalne przeciwciała firmy Cell Signaling: PI3 Kinase p110α (C73F8) #4249 oraz PTEN (D4.3) XP® #9188. Przeciwciała pierwotne były wykorzystane w rozcieńczeniach 1:50. Kontrolę pozytywną stanowiła błona śluzowa jelita grubego.



Rycina 2. Procedura immunohistochemii

Figure 2. *Immunohistochemistry procedure*

Procedura barwienia immunohistochemicznego składała się z etapów:

1. Deparafinacji preparatów w szeregu ksylenów z płukaniem w wodzie destylowanej przez 3 minuty po każdym roztworze z szeregu ksylenów;
2. Nawodnienia za pomocą malejącego szeregu alkoholi: 100%, 96%, 80%, 70% wraz z płukaniem w wodzie destylowanej przez 3 minuty po każdym z elementów szeregu alkoholowego;
3. Odzyskiwania antygenowości poprzez odsłonięcie epitopów, które stanowią determinanty antygenowe, dzięki którym łączą się bezpośrednio z przeciwciałami. Ponowne ujawnienie epitopów zostało wykonane z zastosowaniem metody HIER (metoda wysokotemperaturowego odsłaniania epitopów), w której w urządzeniu typu *pressure cooker* przeprowadzono procedurę pod ciśnieniem 120 hPa w buforze firmy DAKO o pH 6,1 przez 1,5 godziny;
4. Chłodzenia TMA przez 20-30 minut w temperaturze pokojowej;

5. Umieszczenia TMA w komorze wilgotnej do immunohistochemii;
6. Płukania TMA przez 3 minuty roztworem buforu fosforanowego (ang. *phosphate buffered saline*, PBS);
7. Neutralizacji przez 3 minuty endogennej peroksydazy przy pomocą 3% nadtlenku wodoru (*Peroxidase Block RE7101*);
8. Płukania TMA przez 3 minuty roztworem PBS;
9. Inkubacji TMA przez 5 minut z 0,4% roztworem fosforanowym kazeiny (*Protein Block RE7102*) – wpływa to na zmniejszenie niespecyficznego wiązania przeciwciał pierwotnych;
10. Płukania TMA przez 3 minuty roztworem PBS;
11. Inkubacji TMA przez 1,5 godziny z przeciwciałami pierwotnymi (anty-PIK3CA i anty-PTEN) w temperaturze pokojowej;
12. Płukania TMA przez 3 minuty roztworem PBS;
13. Inkubacji przez 30 minut z 10% surowicą zwierzęcą (*Post Primary Block RE7111*), aby wzmocnić penetrację przeciwciał wtórnych;
14. Płukania TMA przez 3 minuty roztworem PBS;
15. Inkubacji przez 30 minut z przeciwciałami wtórnymi (*NovoLink Polimer RE7112*);
16. Płukania TMA przez 3 minuty roztworem PBS;
17. Ekspozycji przez 5 minut z 3,3'-diaminobenzydyną (DAB);
18. Płukania TMA przez 3 minuty roztworem PBS;
19. Barwienia TMA przez 5 minut hematoksyliną Mayera;
20. Dehydratacji preparatów w rosnącym szeregu alkoholowo-ksylenowym (70%, 80%, 96%, 100%);
21. Zamknięcia preparatów pod szkiełkiem nakrywkowym przy pomocy balsamu kanadyjskiego.

Kontrola ujemna została przeprowadzona przy pomocy procedury barwienia z pominięciem przeciwciał pierwotnych [10, 80]. Tak przygotowane próbki zostały ocenione w mikroskopie świetlnym pod kątem stopnia wybarwienia oraz proporcji wybarwionych komórek raka. Intensywność wybarwiania preparatów z przeciwciałem PIK3CA była oszacowana półilościowo za pomocą metody H-score. Indeks H-score obliczony był w następujący sposób:

H-score=P1×1 + P2×2 + P3×3,

gdzie: P0 – proc. komórek bez wybarwienia;

P1 – procent komórek wybarwionych z intensywnością 1;

P2 – procent komórek wybarwionych z intensywnością 2;

P3 – procent komórek wybarwionych z intensywnością 3

oraz

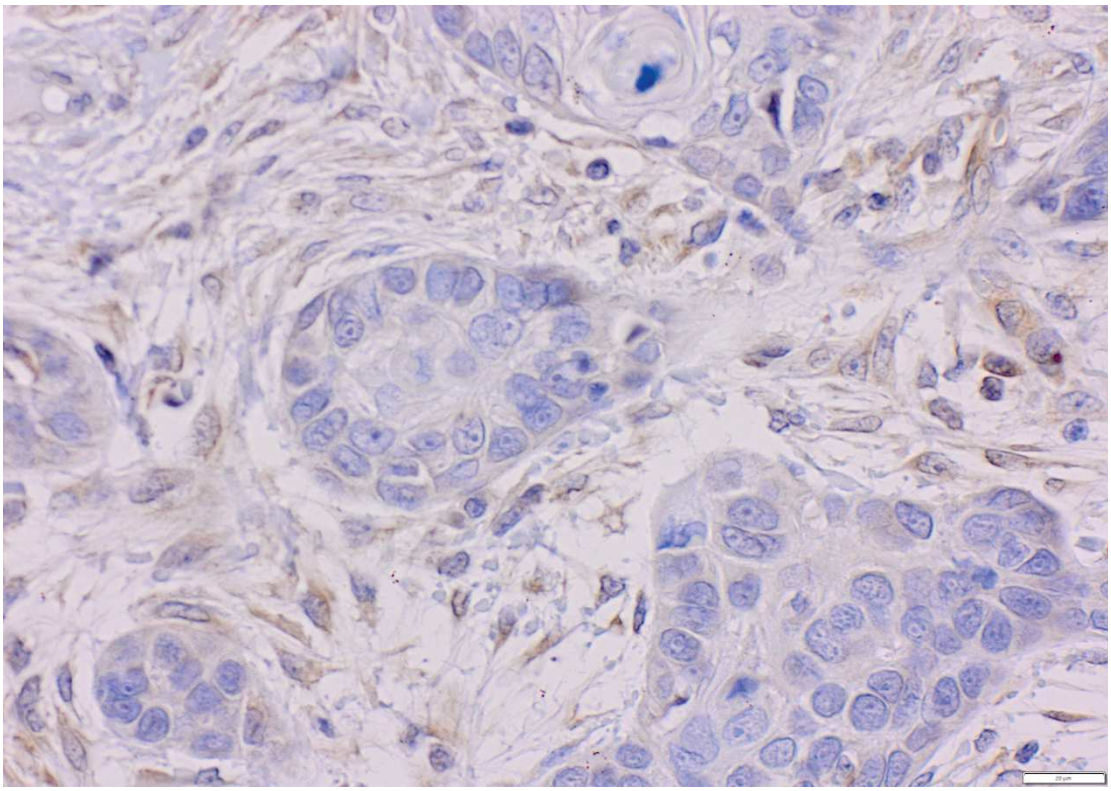
0 – brak wybarwienia;

1 – słabe wybarwienie;

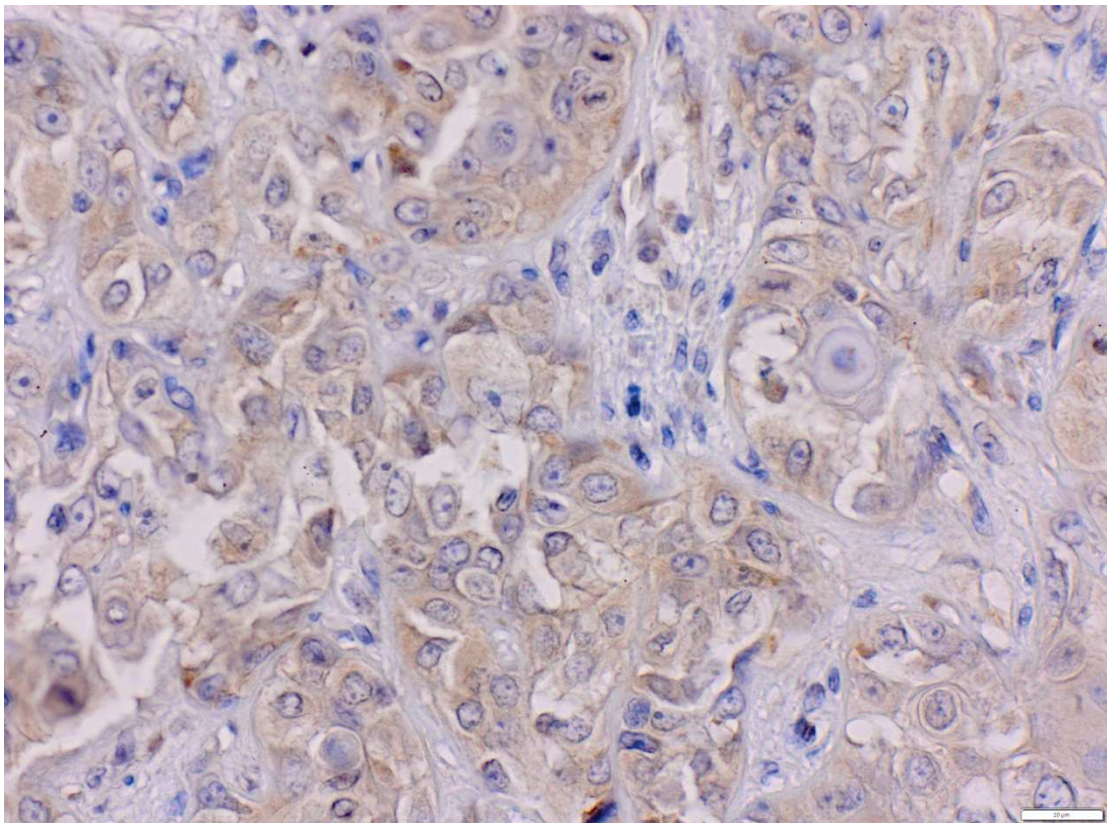
2 – umiarkowane wybarwienie;

3 – silne wybarwienie.

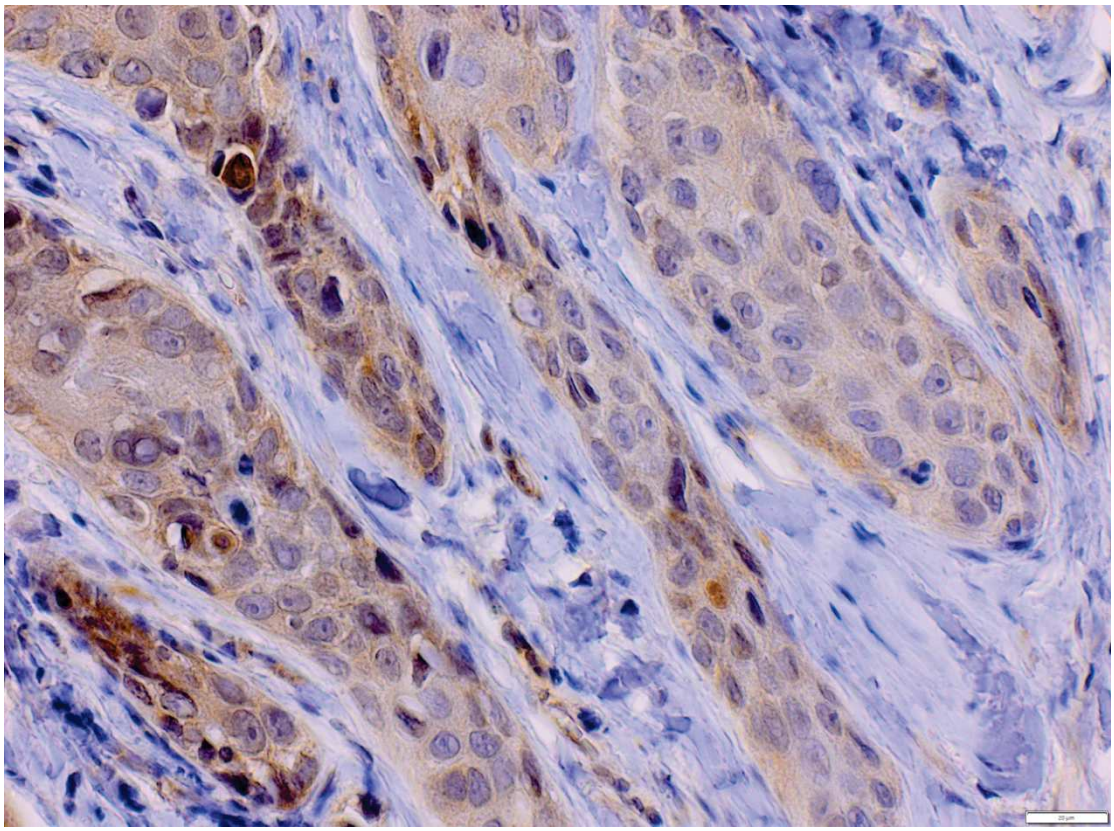
Uzyskano wyniki w zakresie od 0 do 300, gdzie 0 oznaczało brak jakichkolwiek komórek z dodatnią reakcją barwną, a wartość 300 – występowanie wszystkich komórek o silnym, dodatnim odczynie. Do oceny statystycznej wzięto pod uwagę wartość maksymalną wskaźnika H uzyskaną z dwóch rdzeni reprezentujących danego pacjenta. Wartość wskaźnika H-score oceniano jako zmienną ciągłą. W niniejszej pracy przyjęto za wynik dodatni H-score ≥10, a także podzielono pacjentów na dwie grupy – z niską i wysoką ekspresją białka PIK3CA. Punktem odcięcia była wartość 70 (mediana) (ryc. 1A, 1B, 1C). Ekspresję białka oceniono w obrębie 91 próbek z powodu utraty rdzeni TMA od jednego pacjenta [8, 42, 113, 143].



A



B

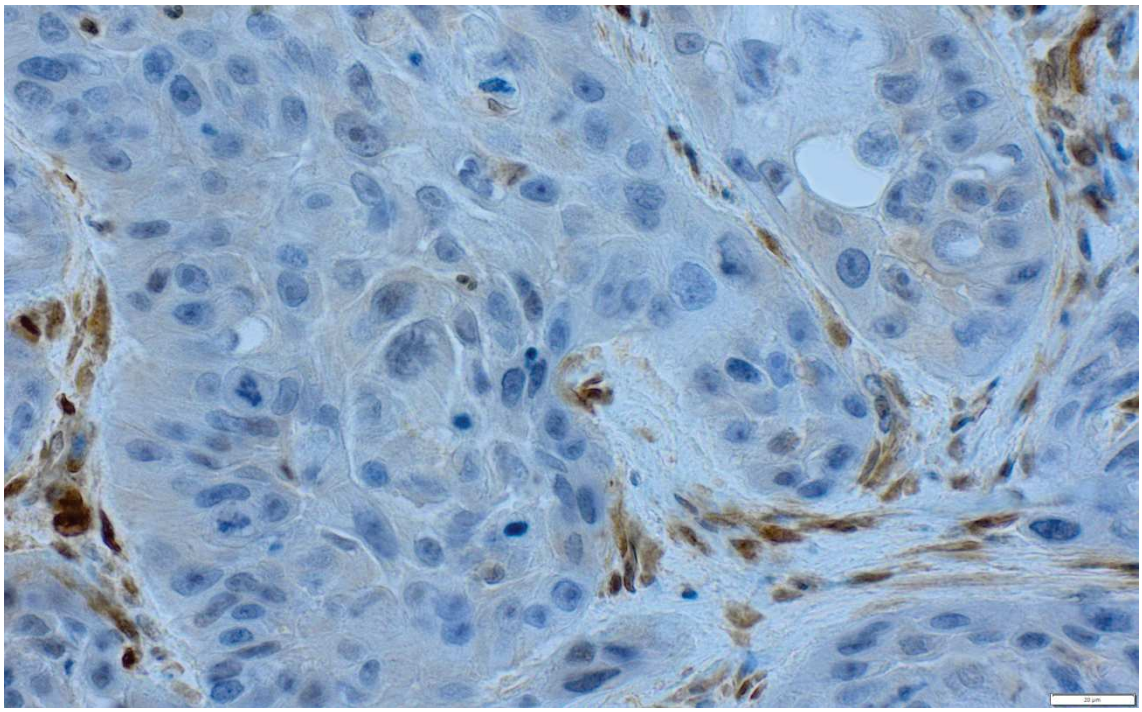


C

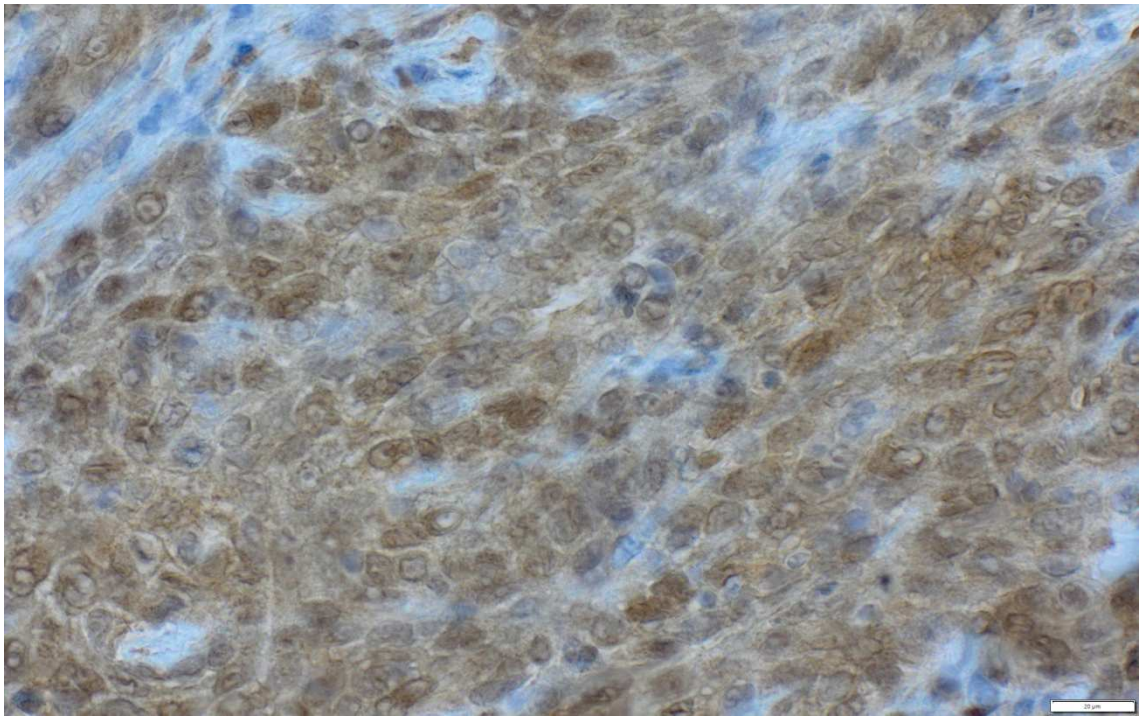
Rycina 3. Poziom białka PIK3CA w RJU (powiększenie x40) A – wskaźnik H=0, B – wskaźnik H=70, C – wskaźnik H=200

Figure 3. *The level of PIK3CA protein in OSCC (magnification x40) A – H-score=0, B – H-score=70, C – H-score=200*

Wynik barwienia immunohistochemicznego białka PTEN oznaczano w układzie zero-jedynkowym, to znaczy wartość 0 mówiła o braku białka PTEN (utrata *PTEN*), a wartość 1 świadczyła o obecności białka PTEN. Ekspresję białka oceniono w obrębie 89 próbek z powodu utraty rdzeni TMA od trzech pacjentów (Rycina 4).



A



B

Rycina 4. Poziom białka PTEN w RJU (powiększenie x40) A – brak ekspresji białka PTEN, B – ekspresja białka PTEN

Figure 4. *The level of PTEN protein in OSCC (magnification x40) A – loss of PTEN, B – positive PTEN expression*

5.4 Chromogenna i wzmocniona jonami srebra hybrydyzacja in situ

Hybrydyzacja in situ polega na łączeniu fragmentów DNA lub RNA o znanej sekwencji (tzw. sond molekularnych) z materiałem genetycznym zawartym w badanej próbie o sekwencji komplementarnej do sondy. W celu identyfikacji sondy wykorzystuje się różnego typu znaczniki. Badanie pozwala na ocenę histopatologiczną preparatów i morfologii jąder komórkowych oraz liczby kopii genów. Dzięki temu zmniejsza się ryzyko błędnej interpretacji natury jąder komórkowych. Metoda jest w pełni zautomatyzowana, dlatego wszystkie mikromacierze tkankowe znajdują się podczas przeprowadzenia reakcji w jednakowych warunkach [27, 28, 98, 153].

W metodzie chromogennej hybrydyzacji in situ (ang. *chromogenic in situ hybridisation*, CISH) wykorzystano sondy znakowane cząsteczkami antygenowymi. Sondy były wykrywane za pomocą przeciwciał skoniugowanych z enzymem, zwykle z peroksydazą chrzanową oraz fosfatazą alkaliczną (ang. *alkaline phosphatase*, AP), które katalizują reakcje substratów chromogennych. Powstałe chromogeny wytrącały się w obrębie centromerów i w ten sposób można było ocenić próbkę w mikroskopie świetlnym [27, 28, 98, 153].

We wzmocnionej jonami srebra hybrydyzacji in situ (ang. *silver in situ hybridisation*, SISH) była wykorzystywana detekcja metalograficzna. Sonda wiązała się z enzymem, który powodował neutralizację i odkładanie metalu z roztworu. Pozwoliło to na określenie liczby kopii danego genu w badanej komórce. Podobnie jak w przypadku metody CISH, wynik testu można było odczytać przy użyciu standardowego mikroskopu świetlnego [27, 28, 98, 153].

W badaniu zastosowano sondy molekularne oraz zestawy detekcyjne (*Ventana Medical Systems, Tucson, USA*):

1. CISH (Rycina 5)
   a) Sonda *Chromosome 3 DIG Probe*, znakowana digoksygeniną (DIG), umożliwia hybrydyzację z komplementarnym fragmentem centromeru na trzecim chromosomie;

b) zestaw detekcyjny *ultraView Red ISH DIG Detection Kit* wykrywający sondy znakowane digoksygeniną, składał się z:
   - *ultraView Red ISH DIG Mouse anti-DIG Antibody* zawierający mysie przeciwciała monoklonalne anty-DIG;
   - *ultraView Red ISH DIG AP* zawieracy kozie antymysie przeciwciało IgG sprzężone z fosfatazą alkaliczną;
   - *ultraView Red ISH DIG pH Enhancer* zawierający poniżej 3% chlorku magnezu;
   - *ultraView Red ISH DIG Naphthol* zawieracy naftol;
   - *ultraView Red ISH DIG Fast R.*

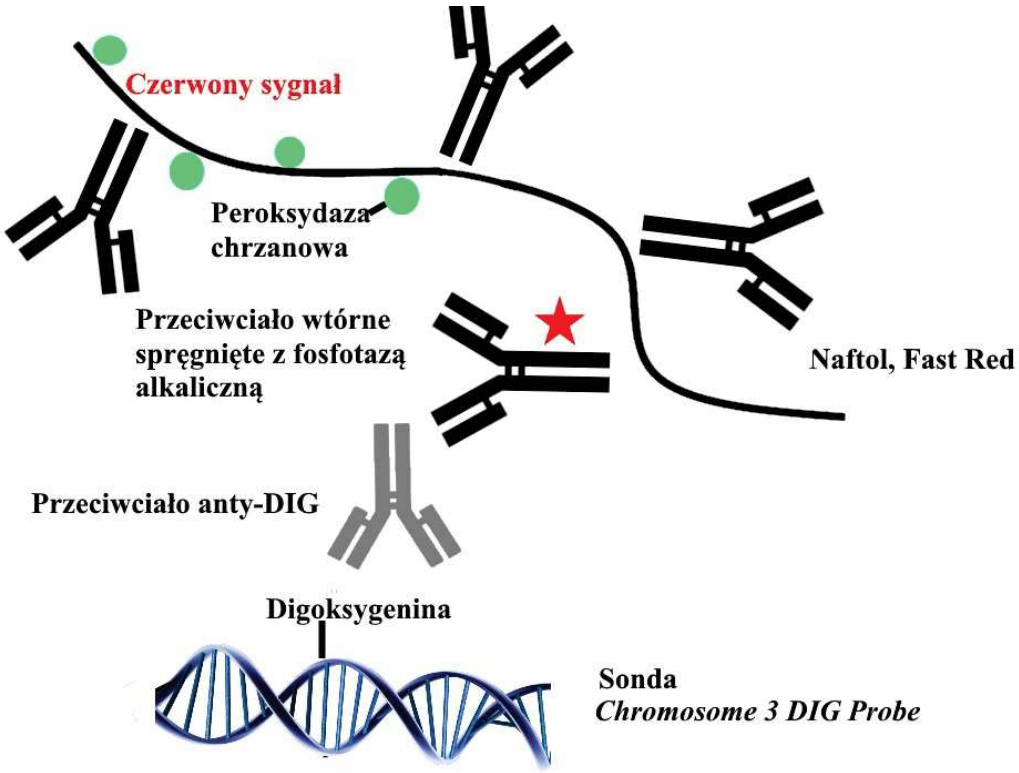
2. SISH (Rycina 6)
   a) Sonda *PIK3CA DNP Probe*, znakowana dinitrofenolem (DNP), zbudowana z łańcucha komplementarnego do fragmentu genu *PIK3CA* na trzecim chromosomie;
   b) zestaw detekcyjny *ultraView SISH DNP Detection Kit* składał się z:
      - monoklonalnych przeciwciał króliczych *ultraView Silver ISH DNP Rabbit anti-DNP Antibody* wiążących hapten DNP;
      - peroksydazy chrzanowej sprzężonej z kozimi przeciwciałami przeciw króliczym *ultraView Silver ISH DNP HRP,* zawierający peroksydazę chrzanową;
      - *ultraView Silver ISH DNP Chromogen A* (*Silver A*) zawierający poniżej 1% octanu srebra w roztworze wodnym;
      - *ultraView Silver ISH DNP Chromogen B* (*Silver B*) zawierający poniżej 1% hydrochinonu w roztworze buforu cytrynianowego;
      - *ultraView Silver ISH DNP Chromogen C* (*Silver C*) zawiera poniżej 0,2% H_2O_2 w roztworze wodnym.

Ocena amplifikacji metodą CISH/SISH jest procedurą całkowicie zautomatyzowaną, wykonywaną w maszynie BenchMark GX firmy Ventana Roche (USA). Składała się z etapów:

1. Inkubacji preparatów przez 20 minut w temperaturze 65°C;
2. Deparafinizacji przez 4 minuty w 78°C;

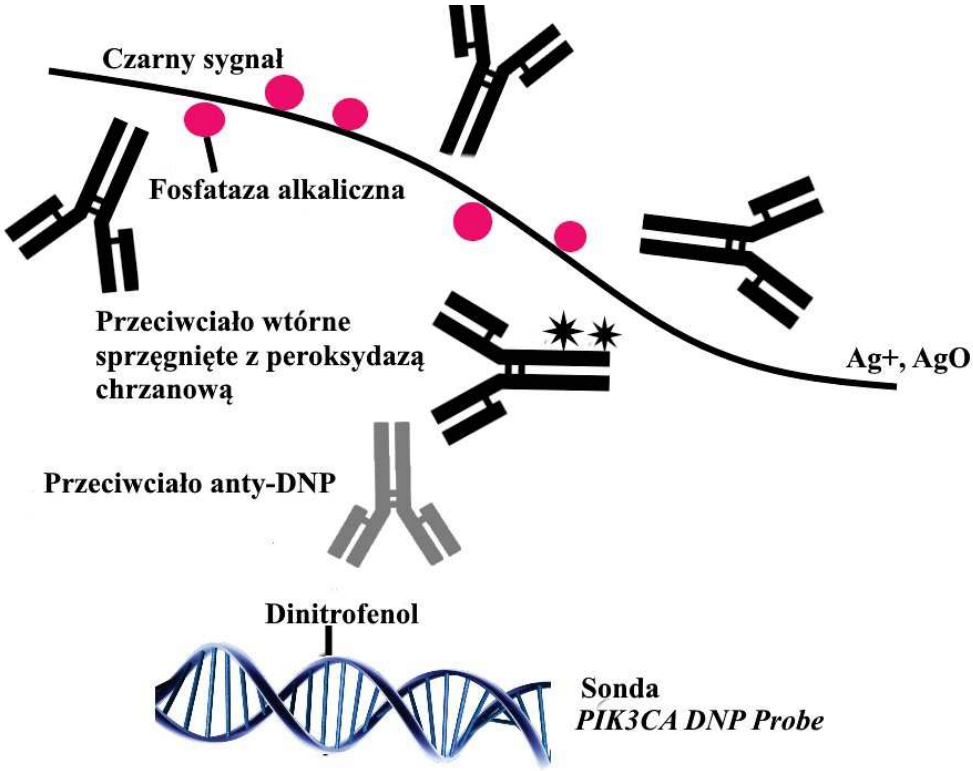
3. Pięciu cykli kondycjonowania komórek z użyciem *Cell Conditioning Reaction Buffer 2* o pH 6,0 w celu lepszego zachowania ich morfologii (8 minut, temperatura 90°C);
4. Trawienia białek poprzez inkubację z enzymem protezą-3 przez 12 minut;
5. Denaturacji DNA przez 20 minut w temperaturze 80°C;
6. Hybrydyzacji z sondami *PIK3CA DNP Probe* i *Chromosome 3 DIG Probe* przez 6 godzin w temperaturze 44°C;
7. Trzech cykli płukania po 8 minut w temperaturze 72°C;
8. Detekcji czerwonego sygnału:
    - inkubacja przez 20 minut z roztworem *RED ISH DIG Mouse anti-DIG Antibody;* przeciwciało monoklonalne anty-DIG wiąże hapten digoksygeniny wbudowany w sondę;
    - inkubacja przez 24 minuty z roztworem *RED ISH DIG AP*;
    - inkubacja przez 8 minut z roztworem *RED ISH DIG pH Enhancer;*
    - inkubacja przez 4 minuty z roztworem naftolu *RED ISH DIG Naphthol* w celu uwidocznienia przeciwciał drugorzędowych; naftol stanowi substrat dla fosfatazy alkalicznej;
    - inkubacja przez 8 minut z roztworem *RED ISH DIG Fast Red*;
9. Detekcji jonów srebra:
    - inkubacja przez 20 minut z roztworem *SIL ISH DNP Rabbit anti-DNP Antibody;*
    - inkubacja przez 16 minut z roztworem *SIL DNP HRP;* uwidocznienie związanych drugorzędowych przeciwciał odbywa się poprzez osadzanie srebra katalizowane przez peroksydazę chrzanową, a efektem tego jest powstanie ziaren srebra;
    - inkubacja przez 4 minuty z roztworem *SIL ISH DNP Chromogen A;*
    - inkubacja przez 4 minuty z roztworem *SIL ISH DNP Chromogen B*; jony srebra (Ag^+) z roztworu *Chromogen A* są redukowane hydrochinonem znajdującym się w roztworze *Chromogen B* do srebra metalicznego (AgO);
    - inkubacja przez 16 minut z roztworem *SIL ISH DNP Chromogen C*; powoduje wzmocnienie reakcji;

10. Kontrastowego wybarwienia przez 4 minuty preparatów roztworem hematoksyliny II;
11. Procedury po kontrastowym wybarwieniu przez 4 minuty preparatów roztworem *Bluing Reagent*;
12. Aplikacji roztworu LCS (ang. *liquid coverslip*);
13. Usunięcia preparatów z aparatu BenchMark GX i przykrycia preparatem *Faramount Aqueous Mounting Medium* (Dako, Glostrup, Dania) pod szkiełkiem nakrywkowym;
14. Ocena preparatów w mikroskopie optycznym.



Rycina 5. Zasada działania reakcji CISH

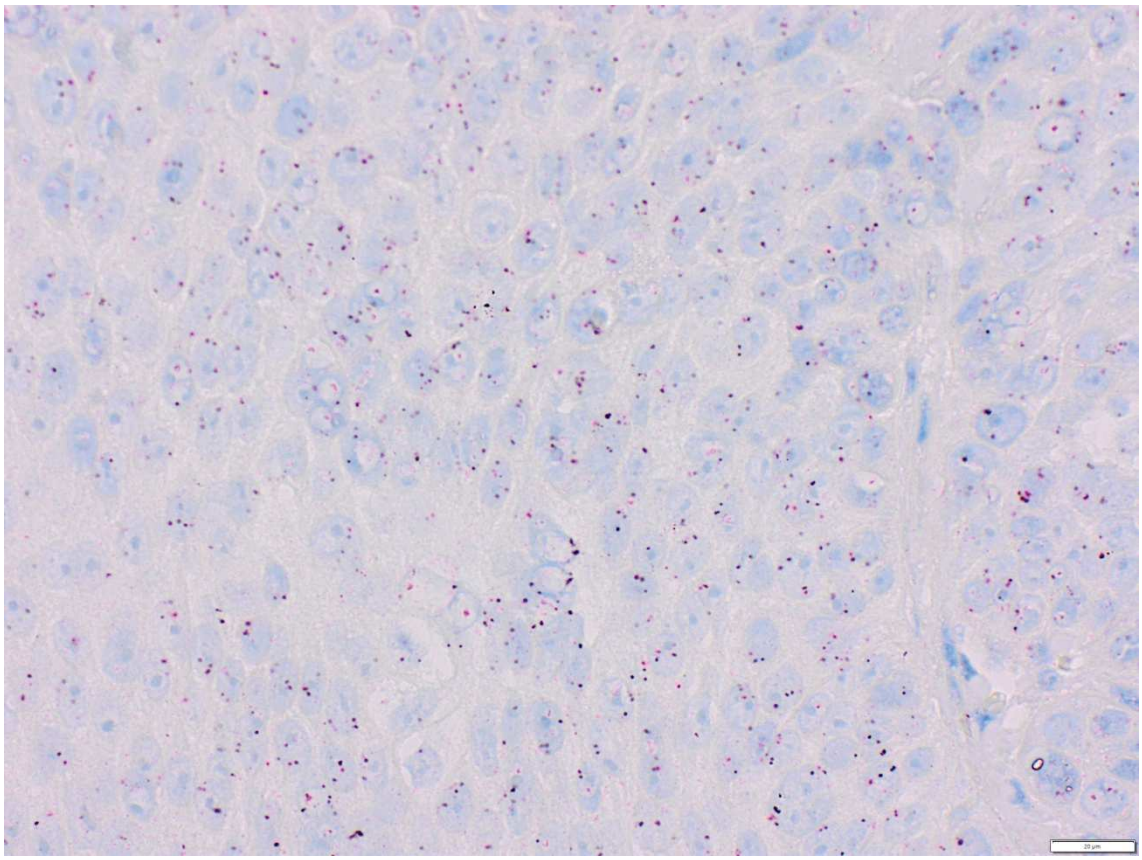
Figure 5. *Basic principles of CISH*



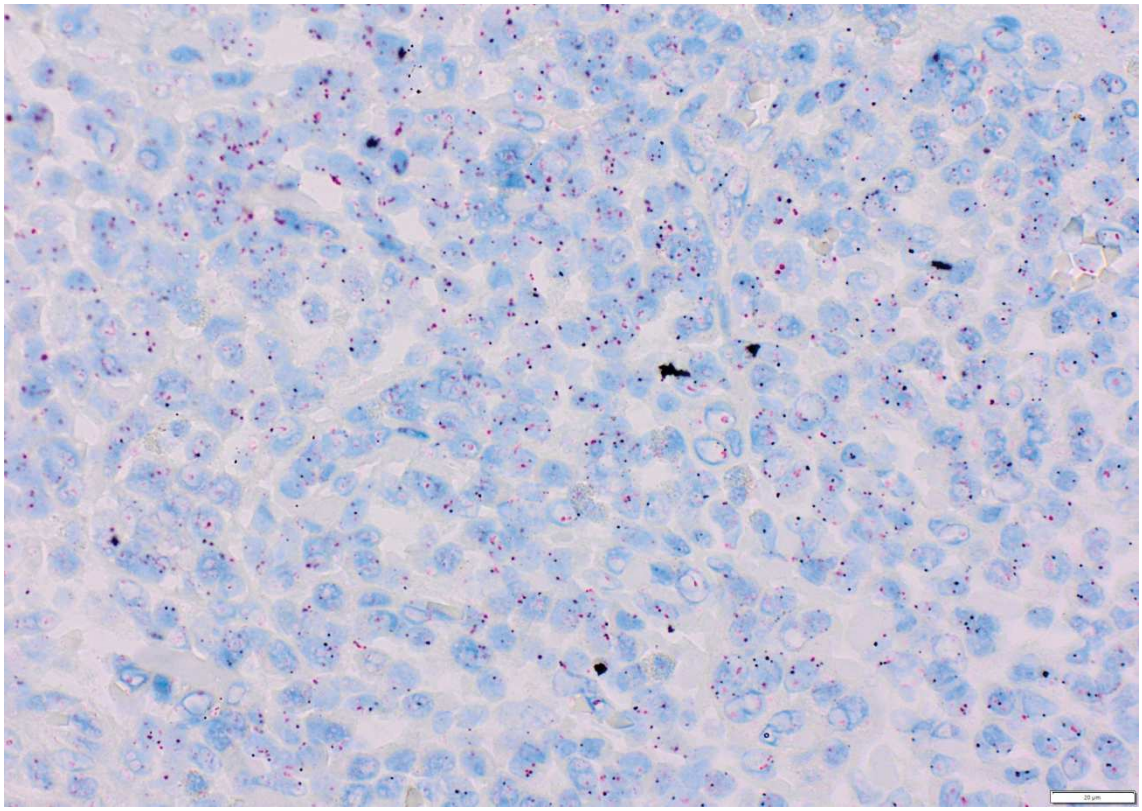
Rycina 6. Zasada działania reakcji SISH

***Figure 6**. Basic principles of SISH*

Badanie zostało wykonane na 89 próbkach z powodu utraty rdzeni TMA od trzech pacjentów. Analiza została przeprowadzona w obrębie 50 nienakładających się jąder komórkowych raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Zostały zliczone kopie genu *PIK3CA*, liczba centromerów DNA chromosomu 3 (CEP3) oraz stosunek (ang. *ratio*, R) liczby kopii genu *PIK3CA* do CEP3. Dany przypadek został uznany za posiadający amplifikację, gdy stosunek *PIK3CA/CEP3* był większy lub równy dwa lub liczba kopii genu *PIK3CA* była większa lub równa 15. Zależność pomiędzy liczbą kopii genu *PIK3CA* i wskaźnika *PIK3CA/CEP3* były analizowane jako cechy ciągłe. Ponadto pacjentów podzielono na dwie grupy – z oraz bez amplifikacji. Przykładowe zdjęcia wyników chromogennej oraz wzmocnionej jonami srebra hybrydyzacji in situ przedstawia Rycina 7 [28, 150].



A



B

Rycina 7. Przykładowe zdjęcia wyników CISH/SISH (powiększenie x40). Czarne sygnały – *PIK3CA*, czerwone sygnały – centromer chromosomu 3. A – brak amplifikacji *PIK3CA/CEP3* <2, B – obecna amplifikacja *PIK3CA/CEP3* ≥2

Figure 7. *Representative examples of CISH/SISH (x40). Black signals – PIK3CA, red signals – chromosome 3 centromere.* A – *no amplification PIK3CA/CEP3* <2, B – amplification *PIK3CA/CEP3* ≥2

Metoda CISH/SISH nie była dotychczas wykorzystywana analizie liczby kopii genu *PIK3CA* w komórkach raka płaskonabłonkowego jamy ustnej.

5.5 Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu programu STATISTICA 13.3 (StatSoft Inc. Tulsa, USA) na licencji posiadanej przez Gdański Uniwersytet Medyczny.

W analizie statystycznej wszystkie cechy jakościowe (np. płeć, brak lub obecność badanej cechy) były skategoryzowane według ogólnie przyjętych zasad. We wszystkich stosowanych testach statystycznych był przyjęty poziom istotności statystycznej $p \leq 0,05$. Normalność rozkładów była badana testem W Shapiro-Wilka.

Obliczono położenie rozkładu zmiennych, stosując średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, medianę, kwartyle (górny i dolny) oraz rozstęp.

Przeprowadzono test jednorodności wariancji dla rozkładów normalnych (test Levene'a) w celu oceny równości wariancji. Wykonano także jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA (*ang. analysis of variance*) w celu oceny prawdopodobieństwa wyodrębnienia czynników mogących mieć wpływ na różnice pomiędzy obserwowanymi średnimi grupowymi. Następnie zastosowano test post-hoc najmniejszych istotnych różnic NIR (ang. *Least Significant Differences,* LSD), aby ocenić interakcje wewnątrzgrupowe. Przeprowadzono także nieparametryczny test Kruskala-Wallis w celu porównania zmiennych ciągłych o rozkładzie normalnym z niehomogeniczną wariancją oraz zmiennych o rozkładzie innym niż normalny. W celu porównania dwóch zmiennych ilościowych wykonano test t-Studenta (dla rozkładu

normalnego zmiennej) i test U Manna-Whitneya (dla zmiennej o rozkładzie innym niż normalny).

W analizie związków między cechami wykorzystany był test niezależności Chi-kwadrat $\chi 2$ wg Pearsona i dokładny test Fishera. W analizie czynników rokowniczych były wykorzystane standardowe procedury stosowane w tego typu badaniach. Analiza przeżycia była analizowana metodą Kaplana-Meiera i porównana testem log-rank lub testem F-Coxa. Wyniki analizy jednoczynnikowej były analizowane na podstawie wyniku testu log-rank i lub F-Cox. Analiza wieloczynnikowa była przeprowadzona na podstawie modelu proporcjonalnego ryzyka wg Cox'a.

6. WYNIKI

6.1 Charakterystyka badanej grupy

W badaniu oceniano 92 chorych leczonych z powodu raka płaskonabłonkowego jamy ustnej w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2007-2012. Wśród chorych przeważali mężczyźni (67,39%). Kobiety stanowiły 32,61% pacjentów. Stosunek liczby mężczyzn do kobiet wynosił 2:1.

Wiek pacjentów w momencie rozpoznania mieścił się w przedziale 36-89 lat, średnia wieku dla obu płci wynosiła 61,52 lat, średnia wieku wśród mężczyzn – 58,71 lat, a dla kobiet – 67,33 lat. Czas pomiędzy początkiem objawów a rozpoznaniem wynosił średnio od 1 do 3 miesięcy. Mężczyźni zgłaszali się celem leczenia później niż kobiety. Pacjentów podzielono na dwie grupy wiekowe – pierwszą stanowili chorzy poniżej 60 roku życia, a drugą pacjenci powyżej 60 lat. W badanym materiale najliczniejszą grupę stanowili pacjenci w wieku ponad 60 lat – 58,69% (n=54/92), a poniżej 60 roku życia – 41,31% (n=38/92).

Palenie papierosów deklarowało 53,26% badanych (n=49/92), a spożywanie wysokoprocentowego alkoholu i alkoholizm 15,21% (n=14/92). Alkoholizm dotyczył głównie mężczyzn (p=0,011). Średnia liczba paczko lat wynosiła 20,71. Wśród chorych palących zmiany najczęściej były zlokalizowane w obrębie dna jamy ustnej oraz języka.

Pacjenci chorzy na cukrzycę stanowili 11,96% badanych (n=11/92), a na nadciśnienie 35,87% (n=33/92). Nadciśnienie dotyczyło przede wszystkim pacjentów po 60 roku życia (p=0,004). Jedynie 4,35% pacjentów (n=4/92) zgłaszało chorobę nowotworową w rodzinie.

Najczęściej zmiany zlokalizowane były w dnie jamy ustnej (26,09%; n=24/92), następnie na języku (19,67%; n=18/92), dziąśle dolnym (15,22%; n=14/92), policzku (10,87%; n=10/92), dziąśle górnym (8,70%; n=8/92) oraz podniebieniu (2,17%; n=2/92). Według stopnia zróżnicowania histopatologicznego, najczęściej notowano nowotwór w stopniu G2 (46,74%; n=43/92), a następnie G1 (41,30%; n=38/92)

i G3 (11,95%; n=11/92). Wysokozróżnicowane zmiany były zlokalizowane głównie w obrębie języka i dna jamy ustnej.

Najliczniejszą grupę stanowili chorzy z zaawansowaniem T2 (26,09%; n=24/92), następnie T4 (20,65%; n=19/92), T1 (17,39%; n=16/92) i T3 (20,65%; n=12/92). W przypadku raka dna jamy ustnej, języka oraz dziąsła dolnego przeważały zmiany T2 i T1. Natomiast zmiany T3 i T4 były zlokalizowane przede wszystkim w obrębie dna jamy ustnej oraz podniebienia. Stan węzłów chłonnych ocenianych jako N0 stwierdzono u 40,22% pacjentów (n=37/92), następnie N2 – 15,22% (n=14/92), N1 – 14,13% (n=13/92) i N3 – 6,52% (n=6/92). Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych najczęściej dawały zmiany w obrębie dna jamy ustnej i języka.

Z przeprowadzonej analizy wynika, że raka płaskonabłonkowego diagnozowano głównie w IV stadium zaawansowania klinicznego (30,43%; n=28/92), następnie w I (17,39%; n=16/92), w II (16,30%; n=15/92) i w III (14,13%; n=13/92). Zmianami w IV i III stadium były najczęściej nowotwory zlokalizowane w dnie jamy ustnej i na podniebieniu twardym.

Metodę leczenia chorych z rakiem jamy ustnej uzależniano przede wszystkim od lokalizacji, stopnia zaawansowania zmiany, zróżnicowania histopatologicznego, od wieku oraz stanu ogólnego chorego. Najczęściej stosowaną metodą leczenia była chirurgia (34,78%; n=32/92). Wykorzystywana była we wczesnych stadiach, głównie dla raka języka i dna jamy ustnej. Leczenie chirurgiczne z radioterapią lub radioterapię połączoną z późniejszym leczeniem chirurgicznym zastosowano u 22,83% pacjentów (n=21/92). Radioterapię, jako jedyną metodę leczenia, wykorzystano u 10,87% chorych (n=10/92). Natomiast radioterapia i uzupełniająca chemioterapia została wdrożona u 5,43% pacjentów (n=5/92), leczenie chirurgiczne, radioterapia i chemioterapia u 3,26% chorych (n=3/92), a leczenie chirurgiczne i chemioterapia u 1,09% pacjentów (n=1/92). Nie stosowano chemioterapii jako jedynej metody leczenia. Pacjenci po 60 roku życia byli statystycznie częściej poddawani leczeniu chirurgicznemu (p=0,029).

Wznowa miejscowa dotyczyła 11,96% chorych (n=11/92). Dane kliniczne i patologiczne przedstawiono w Tabelach 7 i 8.

Tabela 7. Dane kliniczne i patologiczne pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej **względem płci**

Table 7. *Clinical and pathological data of patients with oral squamous cell carcinoma* ***divided by gender***

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Mężczyźni/** ***Males***		**Kobiety/** ***Females***		**p wartość / p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
Wiek w momencie rozpoznania [lata]/*Age at diagnosis of cancer [years]*					
Średni wiek/*Mean age*	58,71		67,33		**<0,001**
Zakres/*Age range*	36-89		46-87		-
Lokalizacja/*Localisation*					
Język/*Tongue*	11	17,74	7	23,33	0,231
Język i dno jamy ustnej/ ***Tongue and floor of the mouth***	4	6,45	1	3,33	
Błona śluzowa policzka/*Buccal mucosa*	4	6,45	6	20,00	
Błona śluzowa policzka i dziąsło górne/ ***Buccal mucosa and upper gingiva***	1	1,61	1	3,33	
Błona śluzowa policzka i podniebienie/ ***Buccal mucosa and hard palate***	2	3,23	0	0	
Błona śluzowa policzka, dziąsło górne i podniebienie twarde/*Buccal mucosa, upper gingiva and hard palate*	1	1,61	0	0	
Dno jamy ustnej/*Floor of mouth*	17	27,42	7	23,33	
Dno jamy ustnej i dziąsło dolne/ ***Floor of mouth and lower gingival***	4	6,45	1	3,33	
Dziąsło górne/*Upper gingiva*	5	8,06	3	10,00	
Dziąsło górne i podniebienie/ ***Upper gingiva and hard palate***	1	1,61	0	0	
Dziąsło dolne/*Lower gingiva*	11	1,74	3	10,00	
Podniebienie/*Hard palate*	1	1,61	1	3,33	
Jedna lokalizacja/*One localisation*	49	79,02	26	86,67	
Dwie lokalizacje/*Two localisation*	12	19,37	4	13,33	
Trzy lokalizacje/*Tree localisation*	1	1,61	0	0	

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Mężczyźni/** ***Males***		**Kobiety/** ***Females***		**p wartość / p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
Cukrzyca/*Diabetes mellitus*					
Chorzy na cukrzycę/*Diabetics*	10	16,13	1	3,33	0,131
Zdrowi/*Patients without diabetes*	41	66,13	19	63,33	
Brak danych/*No data*	11	17,74	10	33,33	
Nadciśnienie/*Hypertension*					
Chorzy na nadciśnienie/ ***Patients with hypertension***	24	38,71	9	30,00	0,827
Zdrowi/*Patients without hypertension*	26	41,94	11	36,67	
Brak danych/*No data*	12	19,35	10	33,33	
Nikotynizm/*Smoking*					
Osoby palące/*Smoking patients*	38	61,29	11	36,67	0,080
Osoby niepalące/*No smoking patients*	10	16,13	8	26,67	
Brak danych/*No data*	14	22,58	11	36,67	
Średnia łączna liczba paczkolat/*Mean pack years*					
Paczkolata/*Pack years*	21,40		20,00		
Alkoholizm/*Alcohol abuse*					
Osoby nadużywające alkohol/*Alcoholics*	14	22,58	0	0	**0,011**
Osoby nie nadużywające alkoholu/ ***No alcololics***	34	54,84	18	60,00	
Brak danych/*No data*	14	22,58	12	40,00	
Czas od wystąpienia objawów do diagnozy/*Time from symptoms to diagnosis*					
1-3 miesiące/*1-3 months*	18	29,03	3	10,00	0,206
3-5 miesięcy/*From 3-5 months*	4	6,45	0	0	
5-7 miesięcy/*5-7 months*	7	11,29	1	3,33	
Ponad 7 miesięcy/*More than 7 months*	3	4,84	3	10,00	
Brak danych/*No data*	30	48,39	23	76,67	
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*					
G1	26	41,94	12	40,00	1,000
G2	28	45,16	15	50,00	

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Mężczyźni/** ***Males***		**Kobiety/** ***Females***		**p wartość / p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
G3	8	12,90	3	10,00	
Klasyfikacja TNM (2010)/*TNM staging system (2010)*					
T – Guz pierwotny/*Primary tumour*					
T1	1	16,13	6	20,00	0,510
T2	13	20,97	8	26,67	
T3	10	16,13	2	6,67	
T4a, T4b	15	24,19	4	13,33	
Brak danych/*No data*	14	22,58	10	33,33	
N – Regionalne węzły chłonne/*Regional lymph nodes*					
N0	21	33,87	16	53,33	0,066
N1	6	9,68	3	10,00	
N2a, N2b, N2c	11	17,74	3	10,00	
N3	10	16,13	0	0	
Brak danych/*No data*	14	22,58	8	26,67	
M – Przerzuty odległe/*Distant metastasis*					
M0	5	8,06	1	3,33	0,426
M1	0	0	0	0	
Mx	43	69,35	21	70,00	
Brak danych/*No data*	14	22,58	8	26,67	
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*					
I	10	16,13	6	20,00	0,223
II	8	12,90	7	23,33	
III	10	16,13	3	10,00	
IV	21	33,87	7	23,33	
Brak danych/*No data*	13	20,97	7	23,33	
Zastosowane leczenie/*Treatment*					
Chirurgiczne/*Surgery*	21	33,87	11	36,67	0,078
Radioterapia/*Radiotherapy*	10	16,13	0	0	
Chemioterapia/*Chemotherapy*	0	0	0	0	
Chirurgiczne i radioterapia/*Surgery*	14	22,58	7	23,33	

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Mężczyźni/** ***Males***		**Kobiety/** ***Females***		**p wartość / p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
and radiotherapy					
Chirurgiczne i chemioterapia/ ***Surgery and chemotherapy***	1	1,61	0	0	
Radioterapia i chemioterapia/ ***Radiotherapy and chemotherapy***	3	4,84	2	6,67	
Chirurgiczne, radioterapia i chemioterapia/*Surgery, radiotherapy and chemotherapy*	3	4,84	0	0	
Nie rozpoczęto leczenia/*No treatment*	1	1,61	5	16,67	
Brak danych/*No data*	9	14,52	5	16,67	
Wznowa nowotworowa/*Recurrence*					
Obecność wznowy/*Recurrence*	6	9,68	5	16,67	0,239
Brak wznowy/*No recurrence*	40	64,52	15	50,00	
Brak danych/*No data*	16	25,81	10	33,33	
Leczenie wznowy nowotworowej/*Treatment of cancer recurrence*					
Chirurgiczne/*Surgery*	3	4,84	2	6,67	0,401
Radioterapia/*Radiotherapy*	0	0	1	3,33	
Chemioterapia/*Chemotherapy*	0	0	0	0	
Chirurgia i radioterapia/ ***Surgery and radiotherapy***	2	3,23	1	3,33	
Chirurgia, radioterapia, chemioterapia/ ***Surgery, radiotherapy and chemotherapy***	0	0	0	0	
Brak wznowy/*No recurrence*	40	64,52	15	50,00	
Brak danych/*No data*	17	27,42	11	36,67	
Przeżycie 5-letnie/*5-year survival*					
Przeżycie 5-letnie/*5 year survival*	19	30,65	10	33,33	0,878
Brak przeżycia 5-letniego/ ***Patients did not survive 5 years***	41	66,13	20	66,66	
Brak danych/*No data*	2	3,23	0	0	

Tabela 8. Dane kliniczne i patologiczne pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej **względem wieku**

Table 8. *Clinical and pathological data of patients with oral squamous cell carcinoma* ***divided by age***

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**<60**		**≥60**		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
Płeć/*Gender*					
Mężczyźni/*Male*	31	81,58	31	42,59	**0,012**
Kobiety/*Female*	7	18,42	23	57,41	
Lokalizacja/*Localisation*					
Język/*Tongue*	8	21,05	10	18,52	0,815
Język i dno jamy ustnej/ ***Tongue and floor of the mouth***	1	2,63	4	7,41	
Błona śluzowa policzka/*Buccal mucosa*	4	10,53	6	11,11	
Błona śluzowa policzka i dziąsło górne/ ***Buccal mucosa and upper gingiva***	1	2,63	1	1,85	
Błona śluzowa policzka i podniebienie/ ***Buccal mucosa and hard palate***	1	2,63	1	1,85	
Błona śluzowa policzka, dziąsło górne i podniebienie twarde/*Buccal mucosa, upper gingiva and hard palate*	1	2,63	0	0	
Dno jamy ustnej/*Floor of mouth*	9	23,68	15	27,78	
Dno jamy ustnej i dziąsło dolne/ ***Floor of mouth and lower gingival***	3	7,89	2	3,70	
Dziąsło górne/*Upper gingiva*	4	10,53	4	7,41	
Dziąsło górne i podniebienie/ ***Upper gingiva and hard palate***	0	0	1	1,85	
Dziąsło dolne/*Lower gingiva*	5	13,16	9	16,67	
Podniebienie/*Hard palate*	1	2,63	1	1,85	
Jedna lokalizacja/*One localisation*	31	81,58	45	83,33	
Dwie lokalizacje/*Two localisation*	6	15,79	9	16,66	
Trzy lokalizacje/*Tree localisation*	1	2,63	0	0	
Cukrzyca/*Diabetes mellitus*					
Chorzy na cukrzycę/*Diabetics*	5	13,16	6	11,11	0,949

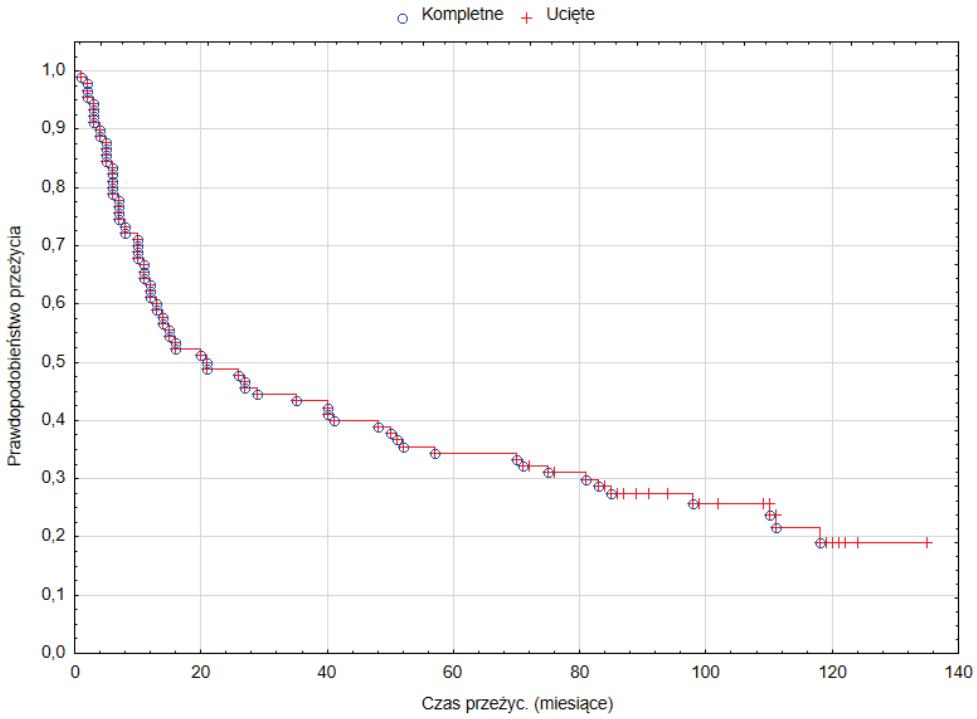
Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**<60**		**≥60**		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
Zdrowi/*Patients without diabetes*	28	73,68	32	59,26	
Brak danych/*No data*	5	13,16	16	29,63	
Nadciśnienie/*Hypertension*					
Chorzy na nadciśnienie/ ***Patients with hypertension***	9	23,68	24	44,44	**0,004**
Zdrowi/*Patients without hypertension*	23	60,53	14	25,93	
Brak danych/*No data*	6	15,79	16	29,63	
Nikotynizm/*Smoking*					
Osoby palące/*Smoking patients*	22	57,89	27	50,00	0,719
Osoby niepalące/*No smoking patients*	9	23,68	9	16,67	
Brak danych/*No data*	7	18,42	18	33,33	
Średnia łączna liczba paczkolat/*Mean pack years*					
Paczkolata/*Pack years*	18,60		22,20		
Alkoholizm/*Alcohol abuse*					
Osoby nadużywające alkohol/*Alcoholics*	9	23,68	5	9,26	0,145
Osoby nie nadużywające alkoholu/ ***No alcololics***	21	55,26	31	57,41	
Brak danych/*No data*	8	21,05	18	33,33	
Czas od wystąpienia objawów do diagnozy/*Time from symptoms to diagnosis*					
1-3 miesiące/*1-3 months*	13	34,21	8	14,81	0,234
3-5 miesięcy/*From 3-5 months*	2	5,26	2	3,70	
5-7 miesięcy/*5-7 months*	4	10,53	4	7,41	
Ponad 7 miesięcy/*More than 7 months*	2	5,26	4	7,41	
Brak danych/*No data*	17	44,74	36	66,67	
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*					
G1	16	42,11	22	40,74	0,817
G2	18	47,37	25	46,30	
G3	4	10,53	7	12,96	
Klasyfikacja TNM (2010)/*TNM staging system (2010)*					
T – Guz pierwotny/*Primary tumour*					
T1	7	18,42	9	16,67	0,716

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**<60**		**≥60**		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
T2	8	21,05	16	29,63	
T3	7	18,42	5	9,26	
T4a, T4b	9	23,68	10	18,52	
Brak danych/*No data*	7	18,42	14	25,93	
N – Regionalne węzły chłonne/*Regional lymph nodes*					
N0	16	42,11	21	38,89	0,736
N1	4	10,53	2	3,70	
N2a, N2b, N2c	5	13,16	9	16,67	
N3	5	13,16	8	14,81	
Brak danych/*No data*	8	21,05	14	25,93	
M – Przerzuty odległe/*Distant metastasis*					
M0	4	10,53	2	3,70	0,257
M1	0	0	0	0	
Mx	27	71,05	37	68,52	
Brak danych/*No data*	7	18,42	15	27,78	
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*					
I	7	18,42	9	16,67	
II	5	13,16	10	18,52	
III	7	18,42	6	11,11	
IV	12	31,58	16	29,63	
Brak danych/*No data*	7	18,42	13	24,07	
Zastosowane leczenie/*Treatment*					
Chirurgiczne/*Surgery*	11	28,95	21	38,89	**0,029**
Radioterapia/*Radiotherapy*	6	15,79	4	7,41	
Chemioterapia/*Chemotherapy*	0	0	0	0	
Chirurgiczne i radioterapia/ ***Surgery and radiotherapy***	10	26,32	11	20,37	
Chirurgiczne i chemioterapia/ ***Surgery and chemotherapy***	0	0	1	1,85	
Radioterapia i chemioterapia/ ***Radiotherapy and chemotherapy***	4	10,53	1	1,85	

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**<60**		**≥60**		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
Chirurgiczne, radioterapia i chemioterapia/ ***Surgery, radiotherapy and chemotherapy***	2	5,26	1	1,85	
Nie rozpoczęto leczenia/*No treatment*	1	2,63	5	9,26	
Brak danych/*No data*	4	10,53	10	18,52	
Wznowa nowotworowa/*Recurrence*					
Obecność wznowy/*Recurrence*	6	15,79	5	9,26	0,591
Brak wznowy/*No recurrence*	25	65,79	30	55,56	
Brak danych/*No data*	7	18,42	19	35,19	
Leczenie wznowy nowotworowej/*Treatment of cancer recurrence*					
Chirurgiczne/*Surgery*	2	5,26	3	5,56	0,793
Radioterapia/*Radiotherapy*	0	0	1	1,85	
Chemioterapia/*Chemotherapy*	0	0	0	0	
Chirurgia i radioterapia/ ***Surgery and radiotherapy***	2	5,26	1	1,85	
Chirurgia, radioterapia, chemioterapia/ ***Surgery, radiotherapy and chemotherapy***	0	0	0	0	
Brak wznowy/*No recurrence*	25	65,79	30	55,56	
Brak danych/*No data*	8	21,05	19	35,19	
Przeżycie 5-letnie/*5-year survival*					
Przeżycie 5-letnie/*5 year survival*	13	34,21	16	66,67	0,735
Brak przeżycia 5-letniego/ ***Patients did not survive 5 years***	25	65,79	36	29,63	
Brak danych/*No data*	0	0	2	3,70	

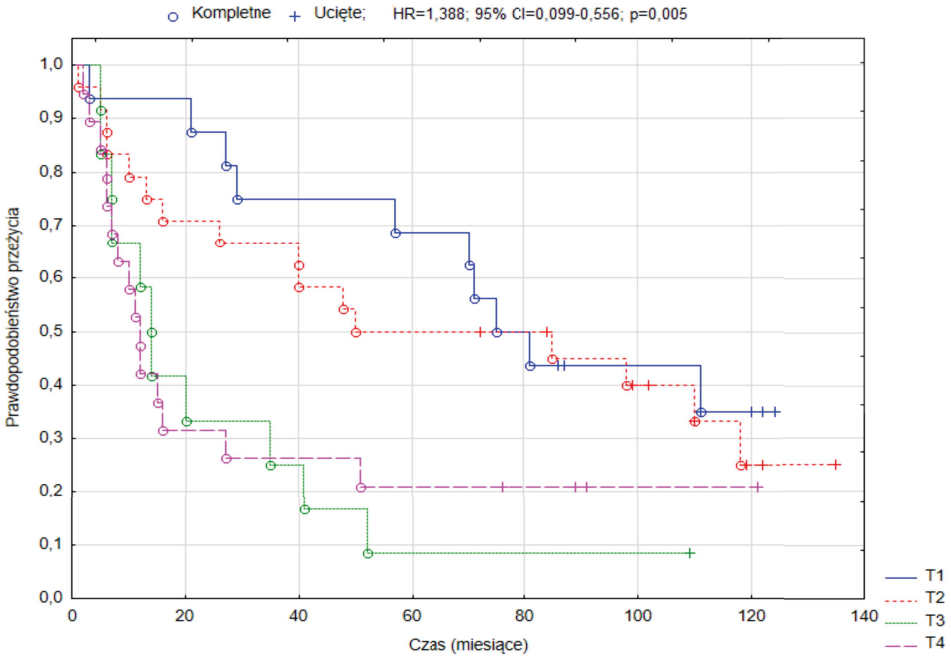
Średni okres obserwacji chorych wynosił 3 lata i 270 dni, minimalny 29 dni, a maksymalny 9 lat i 303 dni. Pięcioletnie przeżycie wynosiło 32,22%. Odnotowano duży spadek przeżycia w pierwszych 16 miesiącach leczenia nowotworu (Rycina 8).

W badaniu czasu przeżycia (ang. *overall survival*; OS) w regresji jednoczynnikowej ryzyka proporcjonalnego Cox'a wykazano zależność między czasem przeżycia chorych a cechami kliniczno-patologicznymi. Wielkość zmiany pierwotnej (T3 i T4; HR=1,388; 95% CI=0,099-0,556; p=0,005; Rycina 9), obecność przerzutów do węzłów chłonnych (HR=1,255; 95% CI=0,031-0,424; p=0,027; Rycina 10), IV stopień zaawansowania klinicznego (HR=1,387; 95% CI=0,106-0,548; p=0,004; Rycina 11) oraz brak leczenia chirurgicznego (HR=0,392; 95% CI=-1,448-(-0,395); p<0,001; Rycina 12) były niezależnymi czynnikami prognostycznymi wpływającymi na skrócenie całkowitego czas przeżycia. Zauważalny, choć nieistotny statystycznie wpływ na dalszy przebieg choroby miały następujące cechy: wiek chorych, stopień zróżnicowania histopatologicznego oraz obecność wznowy (Tabela 9).



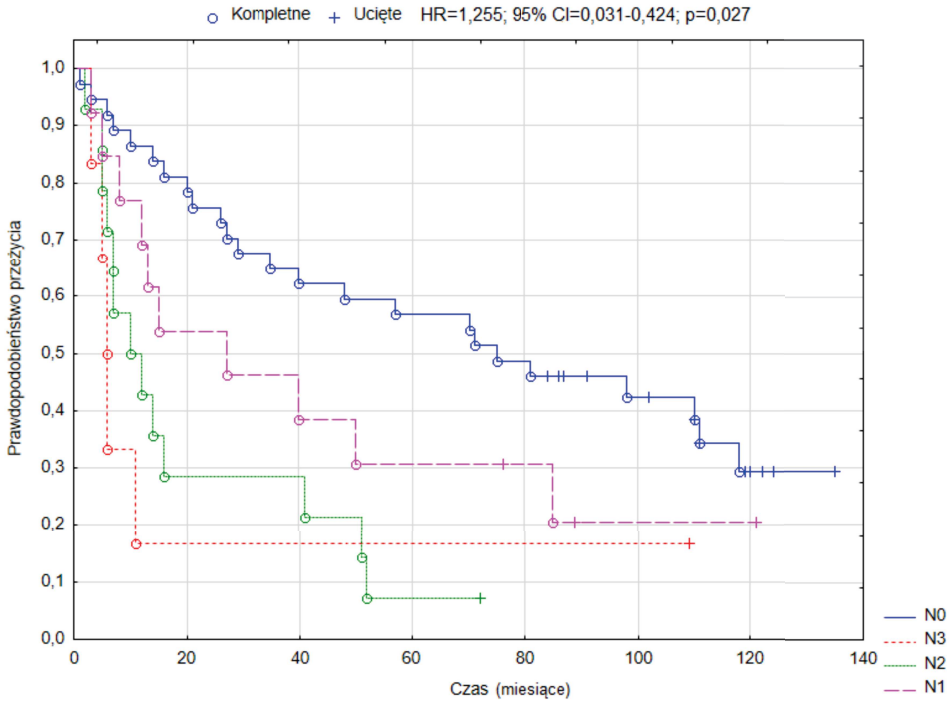
Rycina 8. Prawdopodobieństwo przeżycia (w miesiącach) dla pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej

Figure 8. *Overall survival probability curve (months) for patients with oral squamous cell carcinoma*



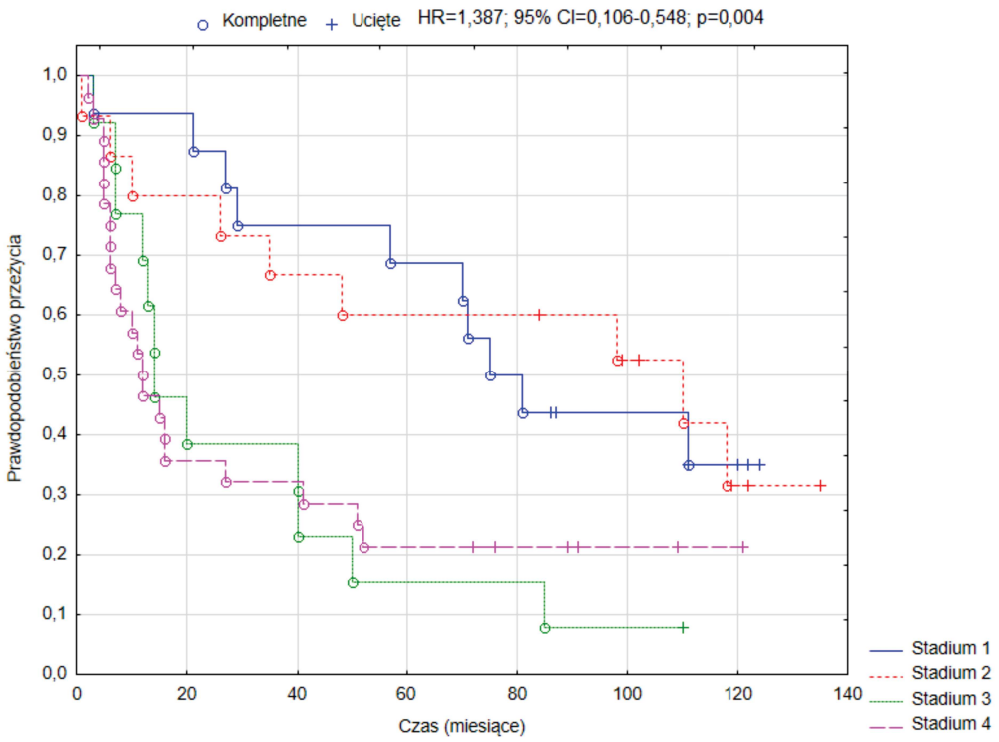
Rycina 9. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od wielkości guza pierwotnego (cecha T)

***Figure 9**. Overall survival probability curves according to the size of the primary tumour*



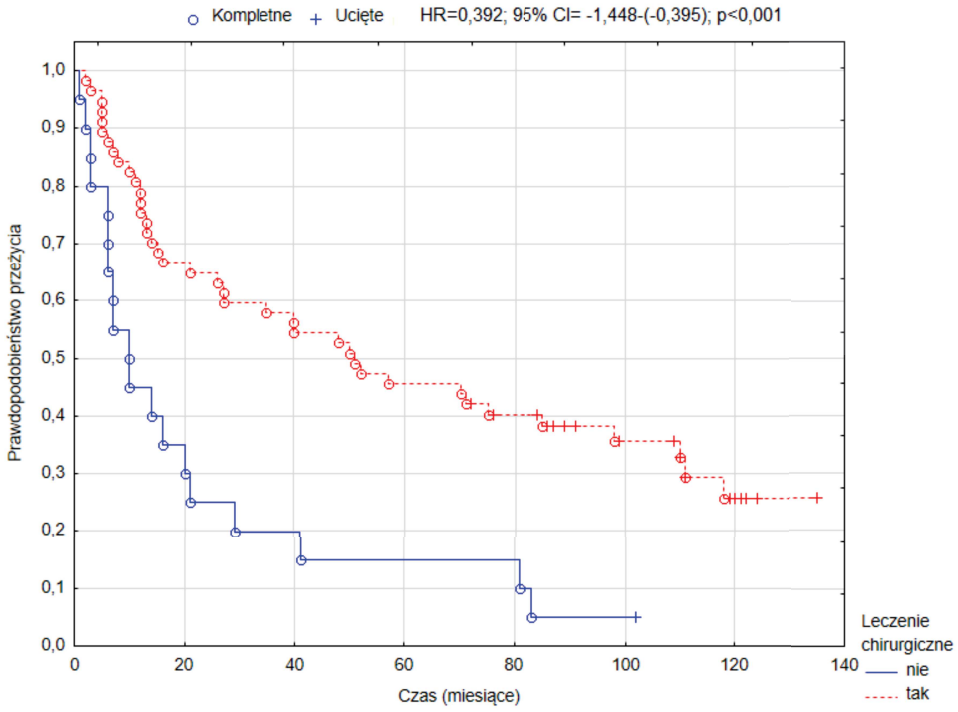
Rycina 10. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od występowania przerzutów do lokalnych węzłów chłonnych (cecha N)

***Figure 10**. Overall survival probability curves according to the lymph nodes metastasis*



Rycina 11. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego

Figure 11. *Overall survival probability curves according to patient clinical stage*



Rycina 12. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od przeprowadzenia leczenia chirurgicznego

Figure 12. *Overall survival probability curves according to surgical treatment*

Tabela 9. Zależność czasu przeżycia od cech klinicznych i patologicznych pacjentów w regresji jednoczynnikowej ryzyka proporcjonalnego Cox'a (HR – ryzyko względne)

Table 9. *Univariate Cox's regression analysis of clinical and pathological patient characteristics for overall survival (HR – hazard ratio)*

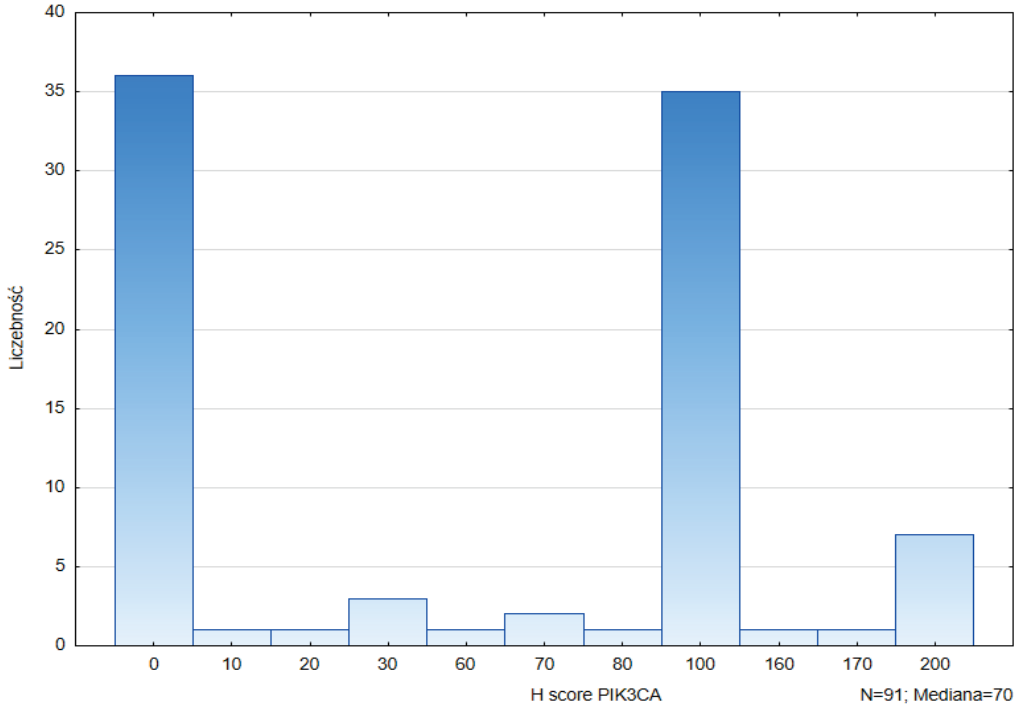
Dane kliniczne i patologiczne/ *Clinical and pathological data*	**HR**	**95% CI (beta 95% -beta 95% górna)**	**p (model Cox'a)/ *p-value (Cox model)***
Wiek [lata]/Age [years]	1,018	-0,007-0,043	0,156
Płeć/*Gender*	1,024	-0,473-0,520	0,926
Lokalizacja/*Localisation*	1,000	0	0,628
Nikotynizm/*Smoking*	1,187	-0,421-1,008	0,588
Alkoholizm/*Alcohol abuse*	0,913	-0,747-0,565	0,786
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*	1,273	-0,091-0,574	0,154
T	1,388	0,099-0,556	**0,005**
N	1,255	0,031-0,424	**0,027**
M	1,734	-0,226-1,357	0,219
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*	1,387	0,106-0,548	**0,004**
Leczenie chirurgiczne/*Surgery*	0,392	-1,448-(-0,395)	**<0,001**
Radioterapia/*Radiotherapy*	1,352	-0,217-0,821	0,251
Chemioterapia/*Chemotherapy*	0,834	-0,980-0,616	0,647
Wznowa nowotworowa/ *Recurrence*	0,627	-1,210-0,276	0,195

6.2 Immunohistochemiczna ocena poziomu białek PIK3CA i PTEN

6.2.1 Białko PIK3CA

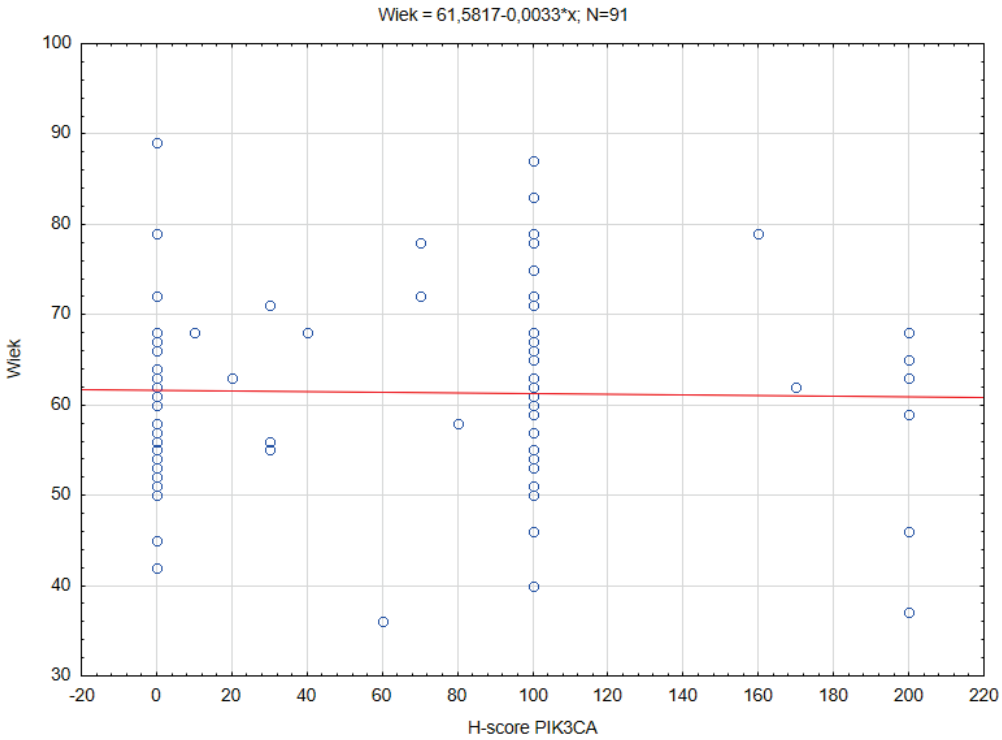
W badaniu immunohistochemicznym uzyskano wyniki barwienia białka PIK3CA dla 91 pacjentów. Nie objęto analizą 1 chorego z powodu utraty rdzeni TMA. Dodatnia reakcja barwna dotyczyła 59,34% pacjentów (n=54/91). U 7,61% chorych (n=7/91) uzyskano wynik 200, a u 40,22% pacjentów (n=37/91) wynik 0 (Rycina 13). U żadnego z chorych nie stwierdzono maksymalnej wartości wskaźnika H-score. Średnia wartość wskaźnika H-score wynosiła 62,31; odchylenie standardowe 62,88; zakres 0-200; mediana 70; dolny kwartyl 0; górny kwartyl równy 100.

Rycina 14 przedstawia wykres rozrzutu poziomu białka PIK3CA w stosunku do wieku chorych, a dane dotyczące zależności immunohistochemicznej oceny białka PIK3CA (wskaźnik H-score mierzony jako cecha ciągła) od cech klinicznych i patologicznych przedstawiono w Tabeli 10. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy cechami kliniczno-patologicznymi a poziomem białka PIK3CA na poziomie odcięcia 70 (Tabela 11).



Rycina 13. Rozkład wyników reakcji immunohistochemicznej białka PIK3CA

Figure 13. *Distribution of PIK3CA immunohistochemical expression*



Rycina 14. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność poziomu białka PIK3CA (wskaźnik H) od wieku chorych

Figure 14. *Scatter plot of PIK3CA H-score according to age of patients*

Tabela 10. Zależność immunohistochemicznej ekspresji białka PIK3CA od cech klinicznych i patologicznych (wskaźnik H-score jako cecha ciągła; r – wskaźnik korelacji)

Table 10. *PIK3CA protein expression versus clinical and pathological patient characteristics (H-score as continuous variable; r – correlation coefficient)*

Dane kliniczne i patologiczne/*Clinical and pathological data*	**p wartość/ *p-value***	**r**
Wiek [lata]/*Age [years]*	0,766	0,032
Płeć/*Gender*	0,264	-0,118
Lokalizacja/*Localisation*	0,761	-0,032
Nikotynizm/*Smoking*	0,304	-0,128
Alkoholizm/*Alcohol abuse*	0,307	-0,128
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*	0,293	0,111
T	0,466	0,089
N	0,147	0,177
M	0,052	-0,235
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*	0,747	-0,039
Leczenie/*Treatment*	0,715	0,042
Przeżycie 5-letnie/*5-year survival*	0,462	-0,079

Tabela 11. Zależność poziomu białka PIK3CA od cech klinicznych i patologicznych względem grup z wysokim i niskim poziomem PIK3CA

Table 11. *PIK3CA protein expression versus clinical and pathological patient characteristics – divided to two groups – high and low PIK3CA levels*

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Niski poziom PIK3CA/*Low level of PIK3CA – H<70***		**Wysoki poziom/** ***High level of PIK3CA – H≥70***		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**N**	**%**	
Płeć/*Gender*					
Mężczyźni/*Male*	33	75,00	29	60,42	0,136
Kobiety/*Female*	11	25,00	19	39,58	
Wiek [lata]/*Age [years]*					
<60	19	43,18	19	39,58	0,726
≥60	25	56,82	29	60,42	
Lokalizacja/*Localisation*					
Język/*Tongue*	10	22,73	8	16,67	0,924
Język i dno jamy ustnej/ ***Tongue and floor of the mouth***	2	4,55	3	6,25	
Błona śluzowa policzka/ ***Buccal muc osa***	5	11,36	5	10,42	
Błona śluzowa policzka i dziąsło górne/*Buccal mucosa and upper gingiva*	1	2,27	1	2,08	
Błona śluzowa policzka i podniebienie/ ***Buccal mucosa and hard palate***	1	2,27	1	2,08	
Błona śluzowa policzka, dziąsło górne i podniebienie twarde/*Buccal mucosa, upper gingiva and hard palate*	0	0	1	2,08	
Dno jamy ustnej/ ***Floor of mouth***	10	22,73	14	29,17	
Dno jamy ustnej i dziąsło dolne/ ***Floor of mouth and lower gingiva***	3	6,82	2	4,17	
Dziąsło górne/*Upper gingiva*	1	2,72	7	14,58	
Dziąsło górne i podniebienie/	0	0	1	2,08	

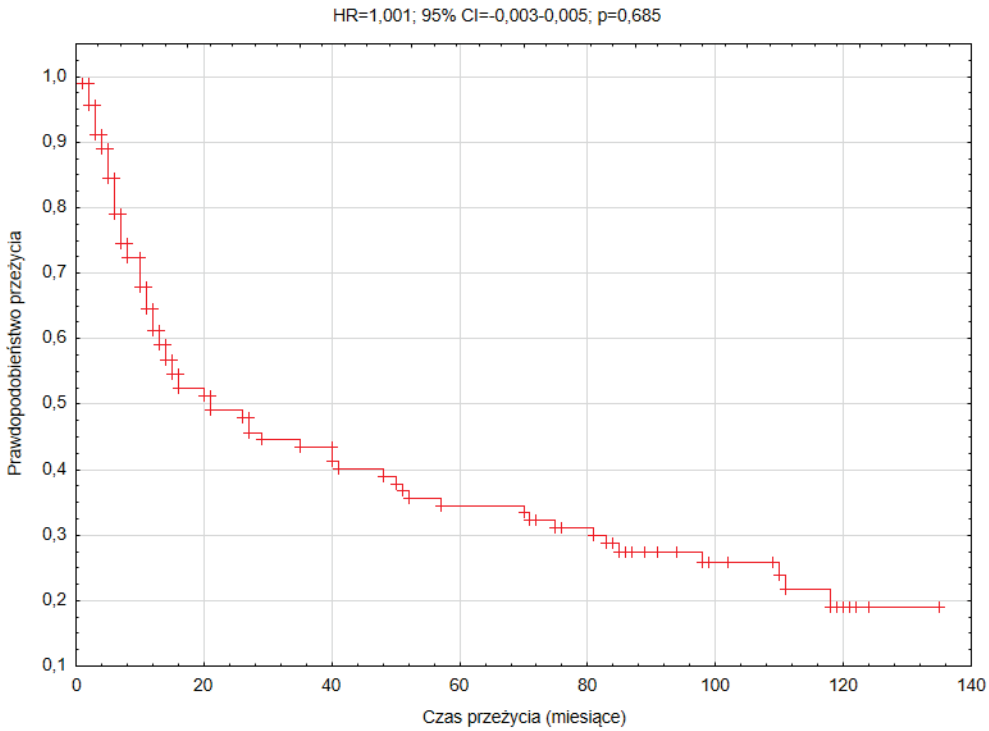
Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Niski poziom PIK3CA/*Low level of PIK3CA – H<70***		**Wysoki poziom/** ***High level of PIK3CA – H≥70***		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**N**	**%**	
Upper gingiva and hard palate					
Dziąsło dolne/*Lower gingiva*	9	20,45	5	10,42	
Podniebienie/*Hard palate*	2	4,55	1	2,08	
Jedna lokalizacja/ ***One localisation***	37	84,09	39	81,25	0,772
Dwie lokalizacje/ ***Two localisation***	7	15,91	8	16,67	
Trzy lokalizacje/ ***Tree localisation***	0	0	1	2,08	
Cukrzyca/*Diabetes mellitus*					
Chorzy na cukrzycę/*Diabetics*	7	15,91	4	8,33	0,284
Zdrowi/*Patients without diabetes*	27	61,36	33	68,75	
Brak danych/*No data*	10	22,73	11	22,92	
Nadciśnienie/*Hypertension*					
Chorzy na nadciśnienie/ ***Patients with hypertension***	17	38,64	16	33,33	0,729
Zdrowi/*Patients without hypertension*	17	38,64	20	41,67	
Brak danych/*No data*	10	22,73	12	25,00	
Nikotynizm/*Smoking*					
Osoby palące/*Smoking patients*	24	54,55	25	52,08	0,423
Osoby niepalące/ ***No smoking patients***	7	15,91	11	22,92	
Brak danych/*No data*	13	29,55	12	25,00	
Średnia łączna liczba paczkolat/*Mean pack years*					
Paczkolata/*Pack years*	22,40		18,80		
Alkoholizm/*Alcohol abuse*					
Osoby nadużywające alkohol/ ***Alcoholic patients***	8	18,18	6	12,50	0,329
Osoby nie nadużywające alkoholu/ ***No alcololic patients***	24	54,55	28	58,33	

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Niski poziom PIK3CA/*Low level of PIK3CA – H<70***		**Wysoki poziom/** ***High level of PIK3CA – H≥70***		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**N**	**%**	
Brak danych/*No data*	12	27,27	14	29,17	
Czas od wystąpienia objawów do diagnozy/*Time from symptoms to diagnosis*					
1-3 miesięce/*1-3 months*	6	13,64	15	31,25	0,332
3-5 miesięcy/*3-5 months*	2	4,55	2	4,17	
5-7 miesięcy/*5-7 months*	5	11,36	3	6,25	
Ponad 7 miesięcy/*More than 7 months*	2	4,55	4	8,33	
Brak danych/*No data*	29	65,91	24	50,00	
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*					
G1	18	40,91	20	41,67	0,561
G2	23	52,27	20	41,67	
G3	3	6,82	8	16,67	
Klasyfikacja TNM (2010)/*TNM staging system (2010)*					
T – Guz pierwotny/*Primary tumour*					
T1	9	20,45	10	20,45	0,191
T2	13	29,55	14	29,55	
T3	4	9,09	4	9,09	
T4a, T4b	8	18,18	9	18,18	
Brak danych/*No data*	10	22,73	11	22,73	
N – Regionalne węzły chłonne/*Regional lymph nodes*					
N0	18	40,91	19	39,58	0,116
N1	4	9,09	2	4,17	
N2a, N2b, N2c	9	20,45	5	10,42	
N3	1	2,27	12	25,00	
Brak danych/*No data*	12	27,27	10	20,83	
M – Przerzuty odległe/*Distant metastasis*					
M0	5	11,36	1	2,08	0,061
M1	0	0	0	0	
Mx	27	61,36	37	77,08	

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Niski poziom PIK3CA/*Low level of PIK3CA – H<70***		**Wysoki poziom/** ***High level of PIK3CA – H≥70***		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**N**	**%**	
Brak danych/*No data*	12	27,27	10	20,83	
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*					
I	9	20,45	7	14,58	0,838
II	7	15,91	8	16,67	
III	3	6,81	10	20,83	
IV	15	34,09	13	27,08	
Brak danych/*No data*	10	22,73	0	20,83	
Zastosowane leczenie/*Treatment*					
Chirurgiczne/*Surgery*	16	36,36	16	33,33	0,776
Radioterapia/*Radiotherapy*	7	15,91	3	6,25	
Chemioterapia/*Chemotherapy*	0	0	0	0	
Chirurgiczne i radioterapia/ ***Surgery and radiotherapy***	8	18,18	13	27,08	
Chirurgiczne i chemioterapia/ ***Surgery and chemotherapy***	0	0	1	2,08	
Radioterapia i chemioterapia/ ***Radiotherapy and chemotherapy***	2	4,55	3	6,25	
Chirurgiczne, radioterapia i chemioterapia/*Surgery, radiotherapy and chemotherapy*	1	2,27	2	4,17	
Nie rozpoczęto leczenia/ ***No treatment***	1	2,27	5	10,42	
Brak danych/*No data*	9	20,45	5	10,42	
Przeżycie 5-letnie/*5-year survival*					
Przeżycie 5-letnie/ ***The patients survived 5 years***	15	34,09	14	29,17	0,557
Brak przeżycia 5-letniego/ ***Patients did not survive 5 years***	27	61,36	34	70,83	
Brak danych/*No data*	2	4,55	0	0	

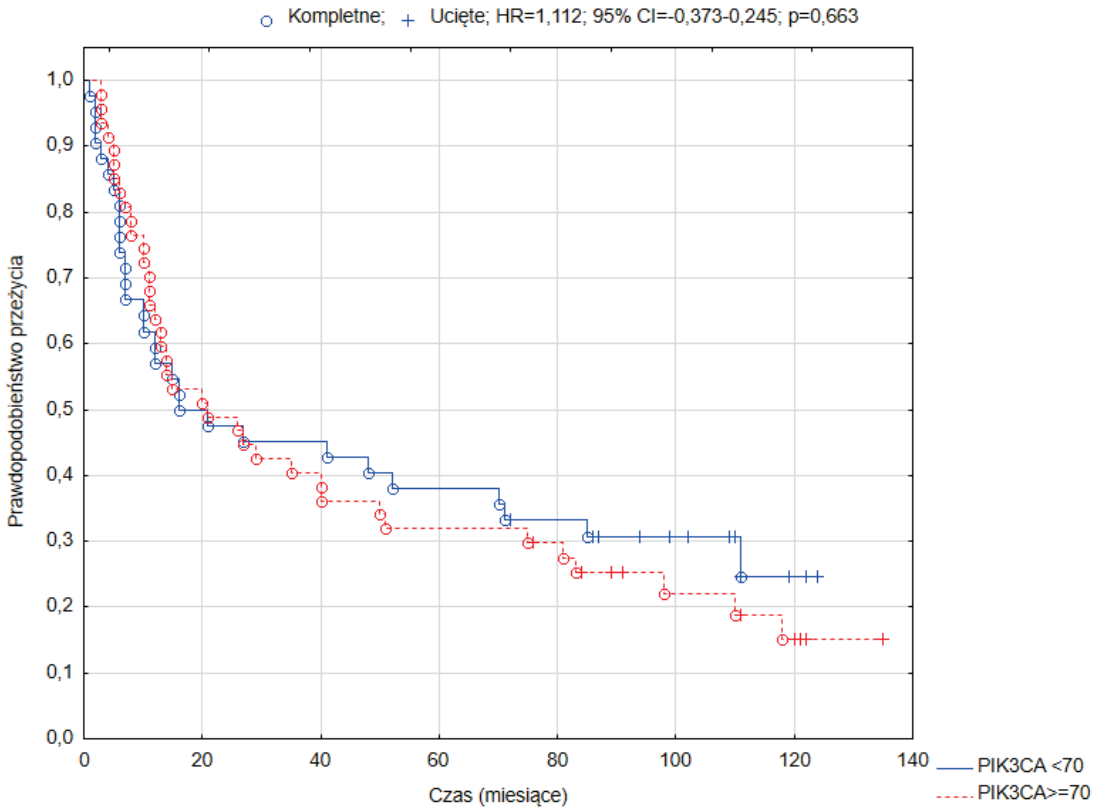
W analizie jednoczynnikowej ekspresja białka PIK3CA mierzona wskaźnikiem H, traktowanym jako cecha ciągła, nie miała związku z czasem przeżycia (HR=1,001; 95% CI=-0,003-0,005; p=0,685; Rycina 15). Również w przypadku podziału pacjentów na dwie grupy (z niską i wysoką ekspresją białka PIK3CA) nie obserwuje się wpływu białka PIK3CA na czas przeżycia chorych (HR=1,112; 95% CI=-0,373-0,245; p=0,663; Rycina 16).

W analizie wieloczynnikowej modelu proporcjonalnego ryzyka Cox'a nie wykazano wpływu na czas przeżycia chorych poziomu białka PIK3CA mierzonej jako cecha ciągła oraz z podziałem na grupę o niskiej i wysokiej ekspresji białka PIK3CA (Tabela 15).



Rycina 15. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od poziomu białka PIK3CA (białko PIK3CA oceniane jako cecha ciągła)

Figure 15. *Overall survival probability curves according to PIK3CA protein expression (PIK3CA as continuous feature)*



Rycina 16. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od poziomu białka PIK3CA – używając wartość 70 jako punkt odcięcia

Figure 16. *Overall survival probability curves according to PIK3CA – H-score using 70 as cut-off point*

Tabela 12. Wieloczynnikowy model proporcjonalnego ryzyka Cox'a czasu przeżycia w zależności od poziomu białka PIK3CA (cecha ciągła; model A) i ekspresji białka PIK3CA z punktem odcięcia większym lub równym 70 (model B)

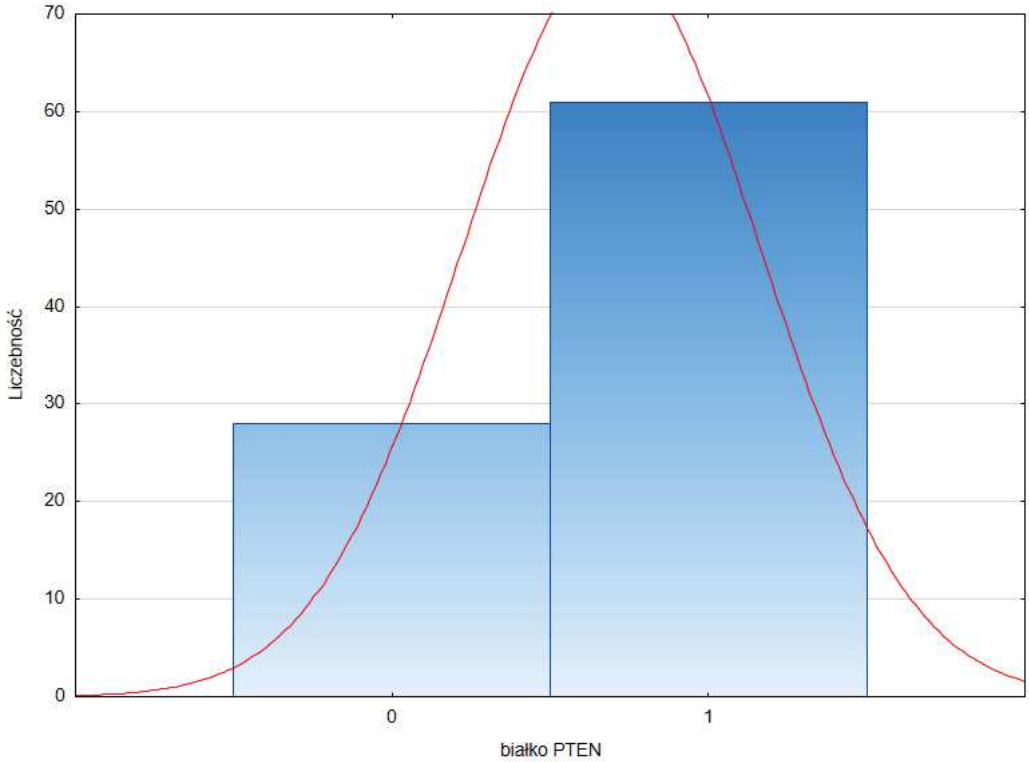
Table 12. *Multivariate Cox's regression analysis of PIK3CA protein expression (continuous feature; A) and PIK3CA H-score using 70 as cutoff point (B) for overall survival (OS) adjusting for clinical and pathological patient characteristics*

Cechy kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**HR**	**95% CI (beta 95% -beta 95% górna)**	**p (model Cox'a)/** ***p-value(Cox model)***
Model A poziom białka PIK3CA/*Model A PIK3CA protein level*			
Wiek [lata]/*Age [years]*	1,017	-0,009-0,042	0,205
Płeć/*Gender*	1,001	-0,003-0,005	0,623
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*	1,001	-0,003-0,005	0,750
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*	1,001	-0,004-0,006	0,633
Lokalizacja/*Localisation*	1,001	-0,004-0,006	0,759
Nikotynizm/*Smoking*	1,003	-0,001-0,002	0,155
Alkoholizm/*Alcohol abuse*	1,002	-0,002-0,007	0,449
T	1,001	-0,002-0,006	0,766
N	1,001	-0,003-0,006	0,557
M	1,001	-0,003-0,006	0,582
Leczenie chirurgiczne/*Surgery*	1,000	-0,004-0,004	0,905
Radioterapia/*Radiotherapy*	1,002	-0,003-0,006	0,470
Chemioterapia/*Chemotherapy*	1,002	-0,003-0,006	0,424
Model B ekspresja białka PIK3CA z punktem 70/*Model B PIK3CA H-score using 70 as cut-off point*			
Wiek [lata]/*Age [years]*	2,709	-0,172-2,165	0,077
Płeć/*Gender*	1,160	-0,347-0,645	0,556
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*	1,070	-0,428-0,564	0,788
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*	1,171	-0,408-0,723	0,584

Cechy kliniczne i patologiczne/ *Clinical and pathological data*	**HR**	**95% CI (beta 95% -beta 95% górna)**	**p (model Cox'a)/ *p-value(Cox model)***
Lokalizacja/*Localisation*	1,108	-0,474-0,679	0,727
Nikotynizm/*Smoking*	1,491	-0,182-0,981	0,175
Alkoholizm/*Alcohol abuse*	1,282	-0,346-0,843	0,410
T	1,067	-0,529-0,658	0,831
N	1,351	-0,299-0,900	0,325
M	1,145	-0,434-0,704	0,640
Leczenie chirurgiczne/*Surgery*	1,135	-0,403-0,656	0,639
Radioterapia/*Radiotherapy*	1,170	-0,397-0,771	0,577
Chemioterapia/*Chemotherapy*	1,211	-0,364-0,748	0,498

6.2.2 Białko PTEN

W badaniu immunohistochemicznym wykazano dodatnią reakcję barwną białka PTEN u 68,54% pacjentów (n=61/89), a u 31,46% chorych (n=28/89) nie stwierdzono obecności białka PTEN (Rycina 17). Nie objęto analizą 3 chorych z powodu utraty rdzeni TMA.

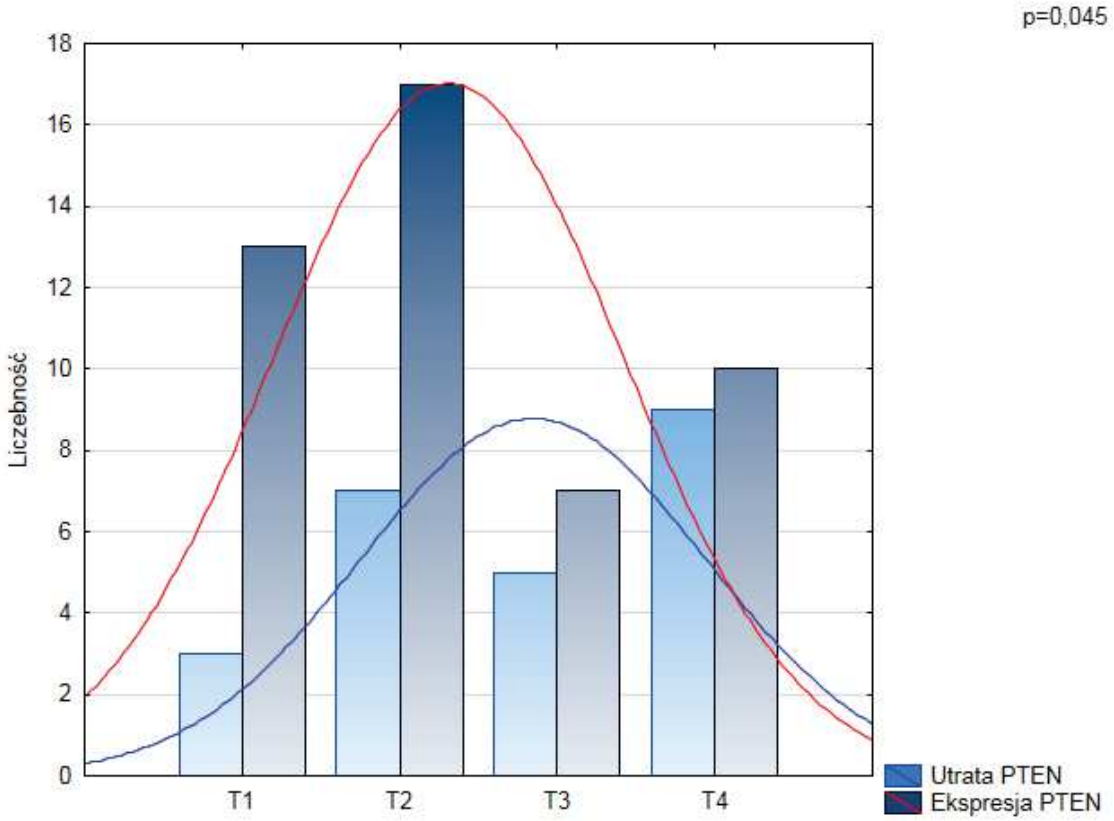


Rycina 17. Rozkład wyników reakcji immunohistochemicznej białka PTEN (0 – utrata białka PTEN; 1 – obecne białko PTEN)

Figure 17. *Distribution of PTEN immunohistochemical expression (0 – no expression; 1 – expression of PTEN protein)*

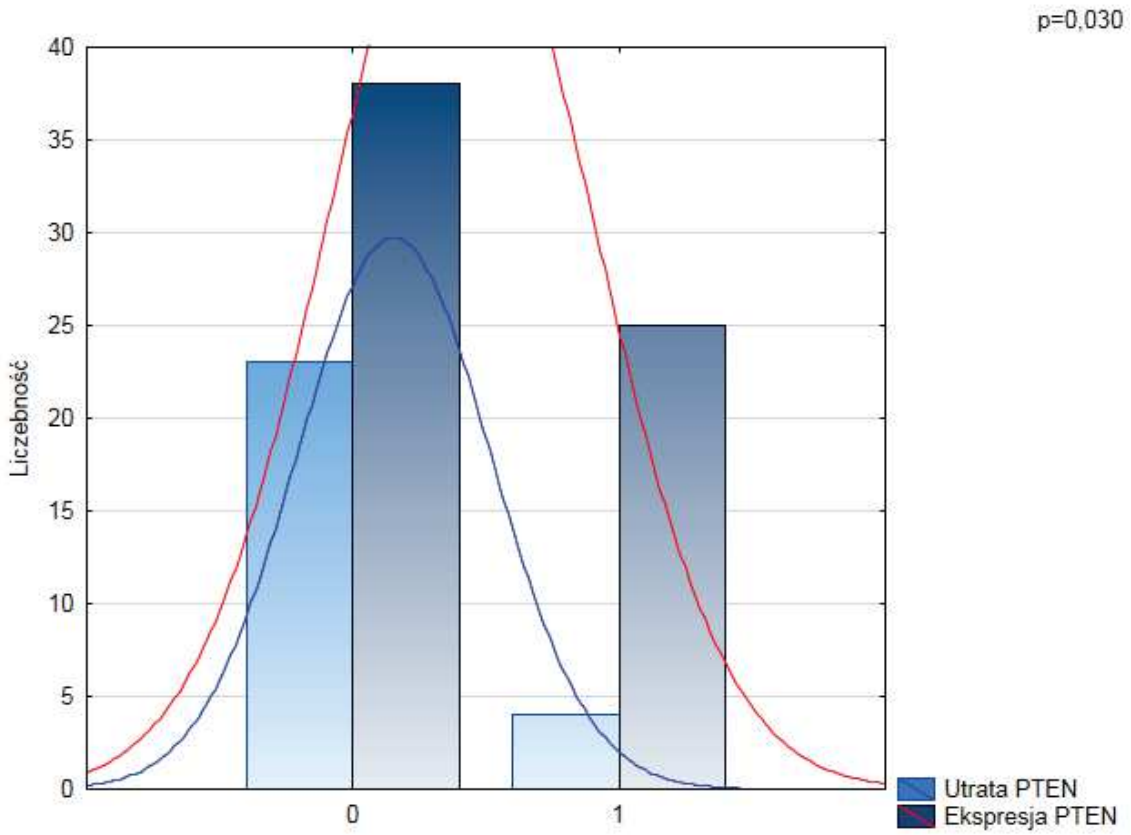
Następnie pacjentów podzielono na dwie grupy – z utratą albo bez utraty białka PTEN. Wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy chorymi w stosunku wielkości guza pierwotnego (p=0,045; Rycina 18) oraz przeżyciem 5-letnim (p=0,030; Rycina 19). Zmiany T3 i T4 statystycznie częściej dotyczyły pacjentów z utratą biała PTEN. Podobna zależność dotyczyła pięcioletniego czasu przeżycia. Ponad 82% chorych z utratą ekspresji białka nie przeżywała 5 lat. Zaobserwowano wzrost częstości utraty białka PTEN u mężczyzn, o pierwotnym guzie T4, z przerzutami do regionalnych

węzłów chłonnych, w IV stadium zaawansowania klinicznego oraz palących. W Tabeli 13 zawarto informacje dotyczące różnic pomiędzy pacjentami z dodatnią ekspresją i utratą białka PTEN.



Rycina 18. Zależność utraty białka PTEN od wielkości zmiany nowotworowej

Figure 18. *Loss of PTEN protein expression according to primary tumour size*



Rycina 19. Zależność utraty białka PTEN od 5-letniego przeżycia (0 – pacjent nie przeżył 5 lat, 1 – pacjent przeżył 5 lat)

Figure 19. *Loss of PTEN protein expression according to 5-year survival (0 – patient did not survive 5 years, 1 – patient survived 5 years)*

Tabela 13. Zależność utraty białka PTEN od cech klinicznych i patologicznych

Table 13. *Loss of PTEN protein expression versus clinical and pathological patient characteristics*

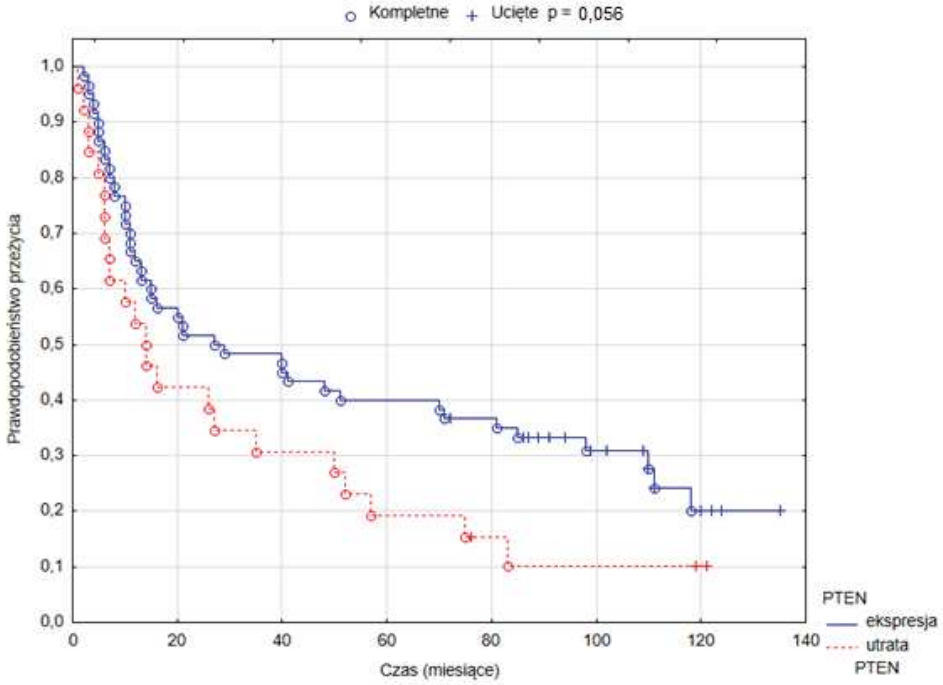
Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Utrata białka/** ***Loss of PTEN***		**Obecność białka /*Expression of PTEN***		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
Płeć/*Gender*					
Mężczyźni/*Male*	22	78,57	39	63,93	0,171
Kobiety/*Female*	6	21,43	22	36,07	
Wiek [lata]/*Age [years]*					
<60	14	50,00	23	37,70	0,279
≥60	14	50,00	38	62,30	
Lokalizacja/*Localisation*					
Język/*Tongue*	4	14,29	13	21,31	0,753
Język i dno jamy ustnej/ *Tongue and floor of the mouth*	3	10,71	2	3,28	
Błona śluzowa policzka/ *Buccal muc osa*	3	10,71	7	11,48	
Błona śluzowa policzka i dziąsło górne/ *Buccal mucosa and upper gingiva*	0	0	2	3,28	
Błona śluzowa policzka i podniebienie /*Buccal mucosa and hard palate*	1	3,57	1	1,64	
Błona śluzowa policzka, dziąsło górne i podniebienie twarde/*Buccal mucosa, upper gingiva and hard palate*	0	0	1	1,64	
Dno jamy ustnej/*Floor of mouth*	9	32,14	14	22,95	
Dno jamy ustnej i dziąsło dolne/ *Floor of mouth and lower gingiva*	2	7,14	3	4,92	
Dziąsło górne/*Upper gingiva*	2	7,14	5	8,20	
Dziąsło górne i podniebienie/ *Upper gingiva and hard palate*	1	3,57	0	0	
Dziąsło dolne/*Lower gingiva*	2	7,14	12	19,67	
Podniebienie/*Hard palate*	1	3,57	1	1,64	

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Utrata białka/** ***Loss of PTEN***		**Obecność białka /*Expression of PTEN***		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
Jedna lokalizacja/*One localisation*	21	75,00	52	85,25	0,268
Dwie lokalizacje/*Two localisation*	7	25,00	8	13,20	
Trzy lokalizacje/*Tree localisation*	0	0	1	1,64	
Cukrzyca/*Diabetes mellitus*					
Chorzy na cukrzycę/*Diabetics*	7	20,00	4	6,56	**0,030**
Zdrowi/*Patients without diabetes*	17	60,71	41	67,21	
Brak danych/*No data*	4	14,29	16	26,23	
Nadciśnienie/*Hypertension*					
Chorzy na nadciśnienie/ ***Patients with hypertension***	13	46,43	20	32,79	0,353
Zdrowi/*Patients without hypertension*	10	35,71	25	40,98	
Brak danych/*No data*	5	17,86	16	26,23	
Nikotynizm/*Smoking*					
Osoby palące/*Smoking patients*	12	42,86	36	59,02	0,055
Osoby niepalące/*No smoking patients*	9	32,14	9	14,75	
Brak danych/*No data*	7	25,00	16	22,23	
Średnia łączna liczba paczkolat/*Mean pack years*					
Paczkolat/*Pack years*	27,50		17,50		
Alkoholizm/*Alcohol abuse*					
Osoby nadużywające alkohol/ ***Alcoholics***	4	14,29	10	16,39	0,745
Osoby nie nadużywające alkoholu/ ***No alcololics***	17	60,71	34	55,74	
Brak danych/*No data*	7	25,00	17	27,87	
Czas od wystąpienia objawów do diagnozy/*Time from symptoms to diagnosis*					
1-3 miesiące/*1-3 months*	9	32,14	11	18,03	0,595
3-5 miesięcy/*3-5 months*	1	3,57	3	4,92	
5 -7 miesięcy/*5-7 months*	5	17,85	3	4,92	
Ponad 7 miesięcy/*More than 7 months*	1	3,57	5	8,20	

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Utrata białka/** ***Loss of PTEN***		**Obecność białka /*Expression of PTEN***		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
Brak danych/*No data*	12	42,86	39	63,94	
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*					
G1	12	42,86	25	40,98	0,671
G2	14	50,00	28	45,90	
G3	2	7,14	8	13,11	
Klasyfikacja TNM (2010)/*TNM staging system (2010)*					
T – Guz pierwotny/*Primary tumour*					
T1	3	10,71	13	21,31	**0,045**
T2	7	25,00	16	26,23	
T3	5	17,86	7	11,48	
T4a, T4b	9	32,14	9	14,75	
Brak danych/*No data*	4	14,29	16	26,23	
N – Regionalne węzły chłonne/*Regional lymph nodes*					
N0	10	35,71	26	42,62	0,263
N1	1	3,57	5	8,20	
N2a, N2b, N2c	9	32,14	5	8,20	
N3	4	14,29	9	14,75	
Brak danych/*No data*	4	14,29	16	26,23	
M – Przerzuty odległe/*Distant metastasis*					
M0	3	10,71	3	4,92	0,474
M1	0	0	0	0	
Mx	22	78,57	41	67,21	
Brak danych/*No data*	3	10,71	17	27,87	
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*					
I	3	10,71	13	21,31	0,250
II	6	21,43	8	13,11	
III	4	14,29	9	14,75	
IV	11	39,29	16	26,23	
Brak danych/*No data*	4	14,29	15	24,59	

Dane kliniczne i patologiczne/ *Clinical and pathological data*	**Utrata białka/ *Loss of PTEN***		**Obecność białka /*Expression of PTEN***		**p wartość /p-value**
	n	**%**	**n**	**%**	
Zastosowane leczenie/*Treatment*					
Chirurgiczne/*Surgery*	11	39,29	20	32,79	0,615
Radioterapia/*Radiotherapy*	7	25,00	3	4,92	
Chemioterapia/*Chemotherapy*	0	0	0	0	
Chirurgiczne i radioterapia/ *Surgery and radiotherapy*	6	21,43	14	22,95	
Chirurgiczne i chemioterapia/ *Surgery and chemotherapy*	0	0	1	1,64	
Radioterapia i chemioterapia/ *Radiotherapy and chemotherapy*	2	7,14	2	3,28	
Chirurgiczne, radioterapia i chemioterapia/*Surgery, radiotherapy and chemotherapy*	0	0	3	4,92	
Nie rozpoczęto leczenia/*No treatment*	0	0	6	9,84	
Brak danych/*No data*	2	7,14	12	19,67	
Przeżycie 5-letnie/*5-year survival*					
Przeżycie 5-letnie/*5 year survival*	4	14,29	23	37,70	**0,030**
Brak przeżycia 5-letniego/ *Patients did not survive 5 years*	23	82,14	37	60,66	
Brak danych/*No data*	1	3,57	1	1,64	

W analizie jednoczynnikowej brak białka PTEN nie miał związku z czasem przeżycia (HR=0,600; 95% CI=-1,019-(-0,001); p=0,056; Rycina 20). Wynik był na granicy istotności statystycznej. W analizie wieloczynnikowej modelu proporcjonalnego ryzyka Cox'a wykazano wpływ braku białka PTEN oraz czynników kliniczno-patologicznych na całkowity czas przeżycia. Niskozróżnicowany rak płaskonabłonkowy (HR=0,565; 95% CI=-1,099-(-0,041); p=0,040), przerzuty odległe (HR=0,527; 95% CI=-1,215-(-0,066); p=0,033), palenie tytoniu (HR=0,436; 95% CI= -0,148-(-0,177); p=0,016), alkoholizm (HR=0,526; 95% CI=-1,243-(-0,040); p=0,042), niezastosowanie leczenia chirurgicznego (HR=0,539; 95% CI=-1,158-(-0,078); p=0,029), radioterapii (HR=0,491; 95% CI=-1,158-(-0,078); p=0,020), chemioterapii (HR=0,523; 95% CI=-1,127-(-0,079); p=0,029) oraz brak ekspresji białka PTEN skracały niemal dwukrotnie całkowity czas przeżycia (Tabela 14).



Rycina 20. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od utraty białka PTEN

Figure 20. *Overall survival probability curves according to loss of PTEN*

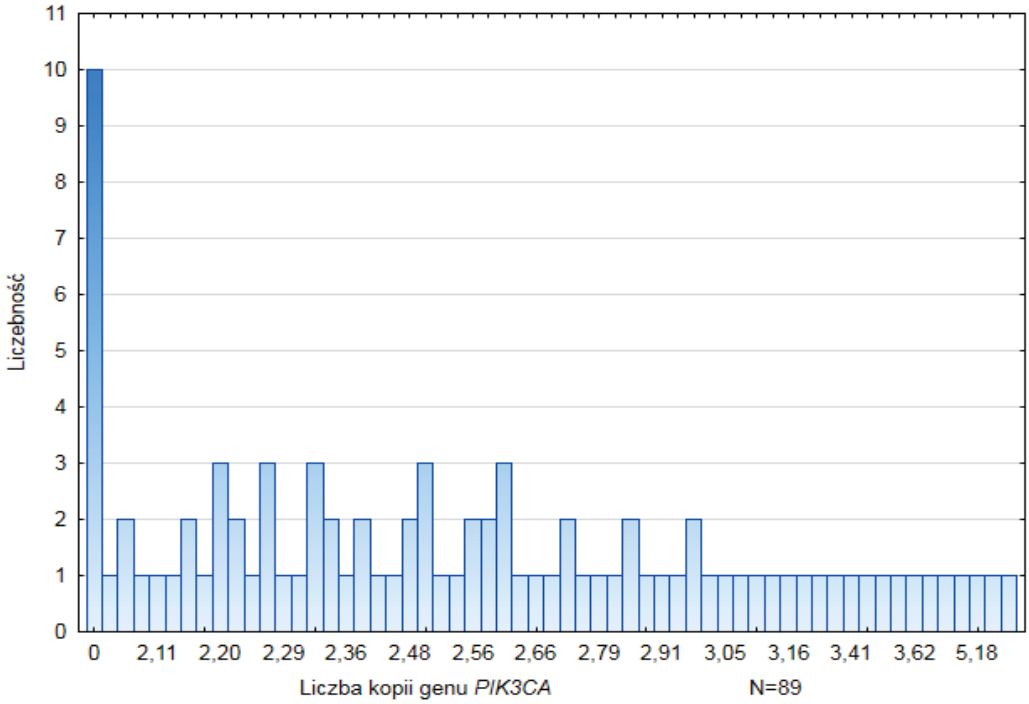
Tabela 14. Wieloczynnikowy model proporcjonalnego ryzyka Cox'a czasu przeżycia w zależności od utraty białka PTEN

Table 14. *Multivariate Cox's regression analysis of loss of PTEN protein expression for overall survival (OS) adjusting for clinical and pathological patient characteristics*

Cechy kliniczne i patologiczne/*Clinical and pathological data*	**HR**	**95% CI (beta 95%-beta 95% górna)**	**p (model Cox'a)/*p-value (Cox model)***
Wiek [lata]/*Age [years]*	1,013	-0,013-0,039	0,330
Płeć/*Gender*	0,600	-1,026-0,003	0,058
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*	**0,565**	**-1,099-(-0,041)**	**0,040**
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*	0,556	-1,174-0	0,054
Lokalizacja/*Localisation*	0,680	-1,026-0,257	0,249
Nikotynizm/*Smoking*	**0,436**	**-0,148-(-0,177)**	**0,016**
Alkoholizm/*Alcohol abuse*	**0,526**	**-1,243-(-0,040)**	**0,042**
T	0,616	-1,096-0,128	0,125
N	0,532	-1,267-0,002	0,054
M	**0,527**	**-1,215-(-0,066)**	**0,033**
Leczenie chirurgiczne/ *Surgery*	**0,539**	**-1,158-(-0,078)**	**0,029**
Radioterapia/*Radiotherapy*	**0,491**	**-1,296-(-0,128)**	**0,020**
Chemioterapia/ *Chemotherapy*	**0,523**	**-1,127-(-0,079)**	**0,029**

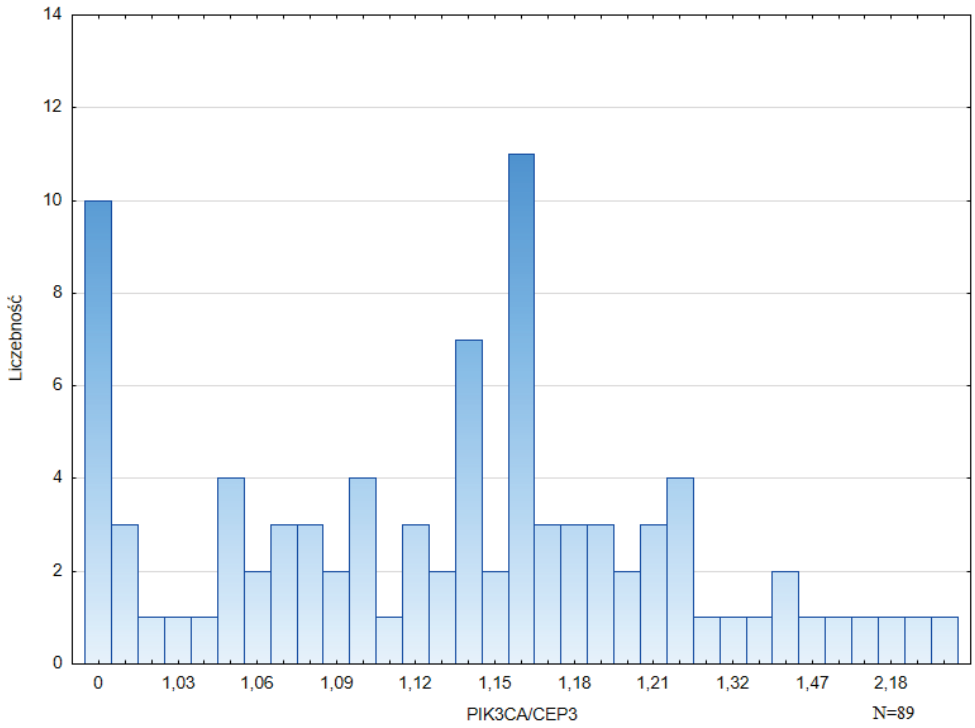
6.3 Analiza liczby kopii genu *PIK3CA* metodą chromogennej oraz wzmocnionej jonami srebra hybrydyzacji in situ

W badaniu metodą chromogennej oraz wzmocnionej jonami srebra hybrydyzacji in situ obliczono liczbę kopii genu *PIK3CA* oraz stosunek liczby kopii genu *PIK3CA* do liczby centromerów DNA chromosomu 3. Uzyskano wyniki dla 96,74% pacjentów (n=89/92). Nie objęto analizą 3 chorych z powodu utraty rdzeni TMA. Średnia wartość liczby kopii genu wynosiła 2,52; odchylenie standardowe 1,26; zakres 0,00-8,16; mediana 2,5; dolny kwartyl 2,22; a górny kwartyl równy 2,93 (Rycina 21). Minimalny stosunek *PIK3CA/CEP3* wynosił 0, a maksymalny 3,94; średnia wartość wskaźnika wynosiła 1,10; odchylenie standardowe 0,55; mediana 1,14; dolny kwartyl 1,07, a górny kwartyl równy 1,19 (Rycina 22). Amplifikację wykazano u 5,62% pacjentów (n=5/89), a nie stwierdzono u 94,38% (n=84/89) (Rycina 23).



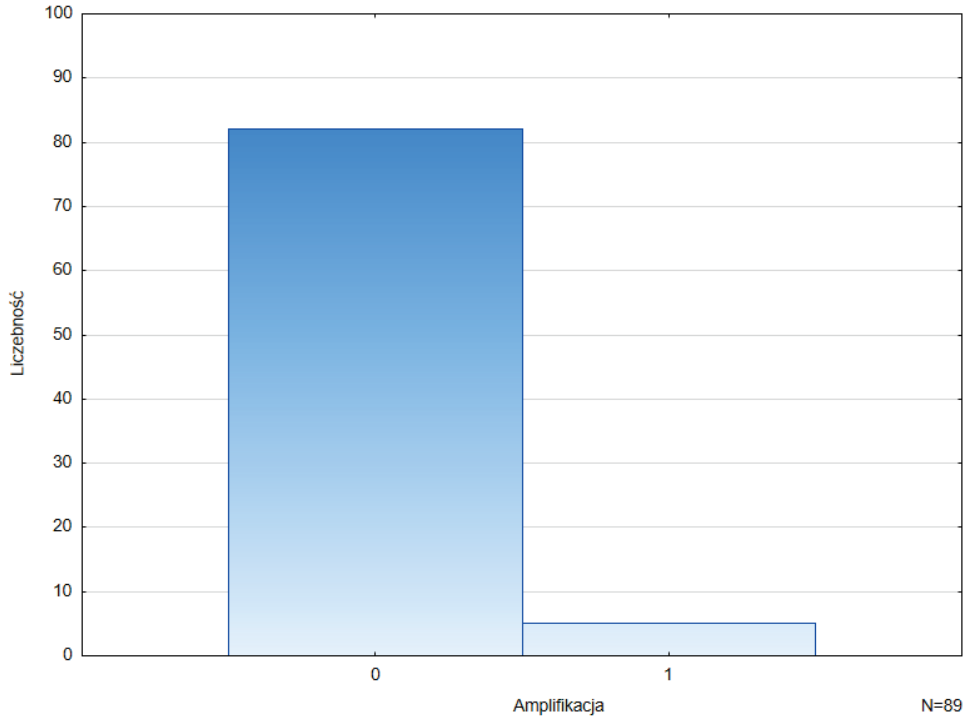
Rycina 21. Rozkład wyników liczby kopii genu *PIK3CA*

Figure 21. *Distribution of PIK3CA gene copy number*



Rycina 22. Rozkład wyników *PIK3CA/CEP3*

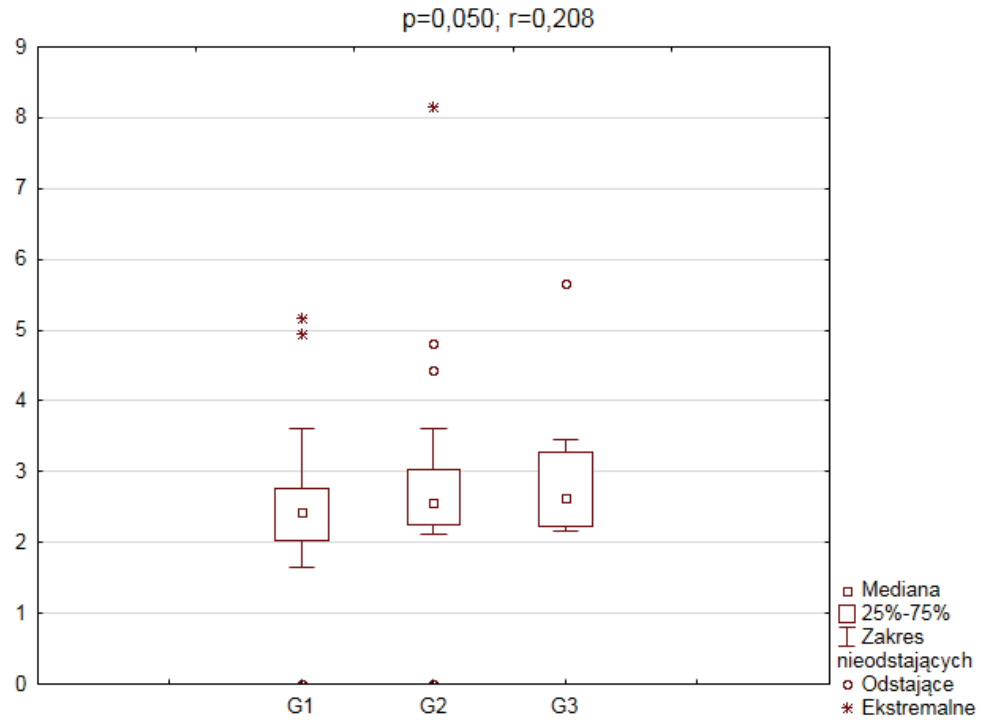
Figure 22. *Distribution of PIK3CA/CEP3*



Rycina 23. Rozkład wyników amplifikacji PIK3CA (0 – brak; 1 – obecna amplifikacja)

Figure 23. *Distribution of PIK3CA amplification (0 – no amplification; 1 – amplification)*

Wykazano istotny statystycznie związek pomiędzy liczbą kopii genu PIK3CA a stopniem zróżnicowania histopatologicznego (p=0,050; r=0,208; Rycina 24). Większa liczba kopii genu *PIK3CA* była częściej obserwowana w zmianach niskozróżnicowanych. Natomiast zauważalną, choć nieistotną statystycznie, zależność wskazano pomiędzy wskaźnikiem *PIK3CA/CEP3* a lokalizacją zmiany, wielkością guza pierwotnego, stopniem zróżnicowania histopatologicznego oraz zaawansowania klinicznego. W Tabeli 15 zawarto informacje dotyczące związku pomiędzy liczbą kopii genu *PIK3CA* oraz stosunku *PIK3CA/CEP3* od cech klinicznych i patologicznych (analiza kopii genu i wskaźnika *PIK3CA/CEP3* jako cech ciągłych). W Tabeli 16 podzielono pacjentów na dwie grupy: z obecną amplifikacją oraz bez amplifikacji genu *PIK3CA*. U pacjentów z nowotworem zlokalizowanym w dnie jamy ustnej stwierdza się statystycznie częściej amplifikację genu *PIK3CA* (p=0,040) niż w pozostałych lokalizacjach.



Rycina 24. Wykres ramka-wąsy – zależność liczby kopii genu *PIK3CA* od stopnia zróżnicowania histopatologicznego

Figure 24. *Box plot – PIK3CA gene copy number according to grading*

Tabela 15. Zależność liczby kopii genu *PIK3CA* oraz stosunku *PIK3CA/CEP3* od cech klinicznych i patologicznych (r – wskaźnik korelacji)

Table 15. *PIK3CA gene copy number and PIK3CA/CEP3 ratio versus clinical and pathological patient characteristics (r – correlation coefficient)*

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Liczba kopii genu** ***PIK3CA/PIK3CA gene copy number***		**Stosunek** ***PIK3CA/CEP3/ PIK3CA/CEP3 ratio***	
	p wartość/ ***p value***	**r**	**p wartość/** ***p value***	**r**
Wiek [lata]/*Age [years]*	0,489	-0,074	0,175	-0,145
Płeć/*Gender*	0,522	0,069	0,586	0,058
Lokalizacja/*Localisation*	0,297	0,112	0,078	0,188
Nikotynizm/*Smoking*	0,758	0,039	0,357	0,117
Alkoholizm/*Alcohol abuse*	0,769	0,038	0,275	0,140
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*	**0,050**	**0,208**	0,070	0,193
T	0,403	-0,103	0,089	-0,209
N	0,960	0,006	0,132	-0,186
M	0,542	-0,076	0,420	-0,100
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*	0,406	-0,102	0,052	-0,235
Leczenie/*Treatment*	0,196	0,151	0,151	0,167
Przeżycie 5-letnie/*5-year survival*	0,616	0,054	0,416	0,088

.

Tabela 16. Zależność amplifikacji genu *PIK3CA* od cech klinicznych i patologicznych

Table 16. *PIK3CA amplification versus clinical and pathological patient characteristics*

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Brak amplifikacji /*No amplification***		**Amplifikacja/** ***Amplification***		**p wartość /p-value**
	N	**%**	**n**	**%**	
Płeć/*Gender*					
Mężczyźni/*Male*	57	67,86	3	60,00	0,909
Kobiety/*Female*	27	31,14	2	40,00	
Wiek [lata]/*Age [years]*					
<60	36	42,86	2	40,00	0,725
≥60	48	57,14	3	60,00	
Lokalizacja/*Localisation*					
Język/*Tongue*	18	21,43	0	0	**0,040**
Język i dno jamy ustnej/ ***Tongue and floor of the mouth***	4	4,76	1	20,00	
Błona śluzowa policzka/ ***Buccal muc osa***	10	11,90	0	0	
Błona śluzowa policzka i dziąsło górne/*Buccal mucosa and upper gingiva*	2	2,38	0	0	
Błona śluzowa policzka i podniebienie/ ***Buccal mucosa and hard palate***	2	2,38	0	0	
Błona śluzowa policzka, dziąsło górne i podniebienie twarde/ ***Buccal mucosa, upper gingiva and hard palate***	1	1,19	0	0	
Dno jamy ustnej/*Floor of mouth*	22	26,19	0	0	
Dno jamy ustnej i dziąsło dolne/ ***Floor of mouth and lower gingiva***	4	4,76	0	0	
Dziąsło górne/*Upper gingiva*	8	9,52	0	0	
Dziąsło górne i podniebienie/ ***Upper gingiva and hard palate***	1	1,19	0	0	
Dziąsło dolne/*Lower gingiva*	10	11,90	4	80,00	

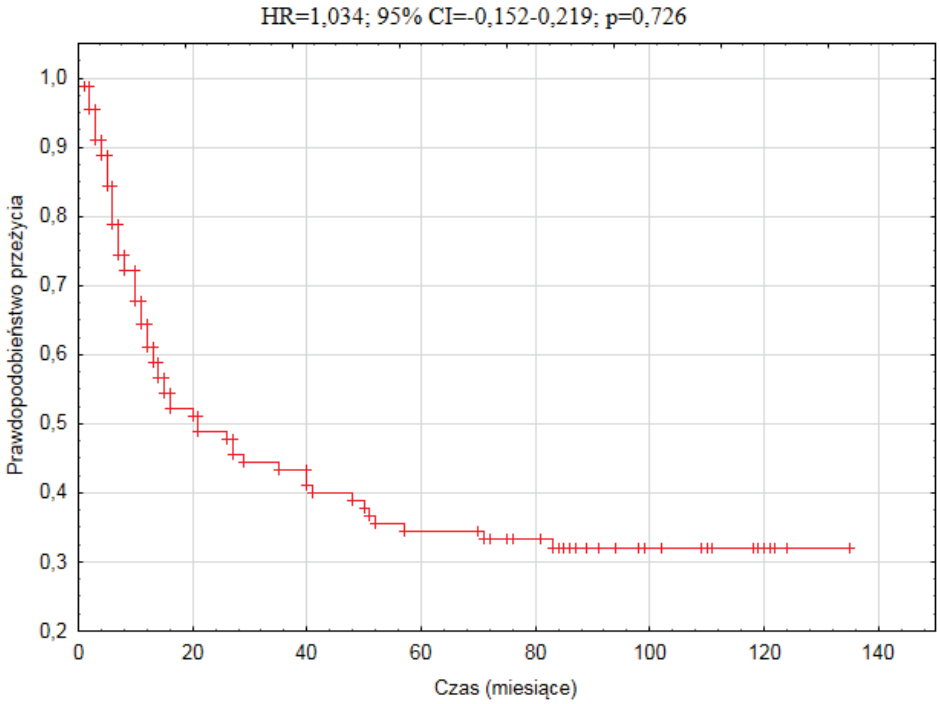
Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Brak amplifikacji /*No amplification***		**Amplifikacja/** ***Amplification***		**p wartość /p-value**
	N	**%**	**n**	**%**	
Podniebienie/*Hard palate*	2	2,38	0	0	
Jedna lokalizacja/*One localisation*	70	83,33	4	80,00	
Dwie lokalizacje/*Two localisation*	13	15,48	1	20,00	
Trzy lokalizacje/*Tree localisation*	1	1,19	0	0	
Cukrzyca/*Diabetes mellitus*					
Chorzy na cukrzycę/*Diabetics*	11	13,10	0	0	0,453
Zdrowi/*Patients without diabetes*	54	64,29	3	60,00	
Brak danych/*No data*	19	22,62	2	40,00	
Nadciśnienie/*Hypertension*					
Chorzy na nadciśnienie/ ***Patients with hypertension***	30	35,71	3	60,00	0,077
Zdrowi/*Patients without hypertension*	34	40,48	0	0	
Brak danych/*No data*	20	23,81	2	40,00	
Nikotynizm/*Smoking*					
Osoby palące/*Smoking patients*	44	52,38	3	60,00	0,957
Osoby niepalące/ ***No smoking patients***	16	19,05	1	20,00	
Brak danych/*No data*	24	28,57	1	20,00	
Średnia łączna liczba paczkolat/*Mean pack years*					
Paczkolat/*Pack years*	21,13		20,00		
Alkoholizm/*Alcohol abuse*					
Osoby nadużywające alkohol/ ***Alcoholic patients***	13	15,48	0	0	0,382
Osoby nie nadużywające alkoholu/*No alcololic patients*	47	55,95	3	60,00	
Brak danych/*No data*	24	28,57	2	40,00	
Czas od wystąpienia objawów do diagnozy/*Time from symptoms to diagnosis*					
1-3 miesięce/*From 1 to 3 months*	20	23,81	1	20,00	1,000
3-5 miesięcy/*From 3 to 5 months*	3	3,57	0	0	

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Brak amplifikacji /*No amplification***		**Amplifikacja/** ***Amplification***		**p wartość /p-value**
	N	**%**	**n**	**%**	
5-7 miesięcy/*From 5 to 7 months*	7	8,33	1	20,00	
Ponad 7 miesięcy/*More than 7 months*	6	7,14	0	0	
Brak danych/*No data*	48	57,14	3	60,00	
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*					
G1	34	40,48	1	20,00	0,351
G2	40	47,62	3	60,00	
G3	10	11,90	1	20,00	
Klasyfikacja TNM (2010)/*TNM staging system (2010)*					
T – Guz pierwotny/*Primary tumour*					
T1	15	17,86	0	0	0,510
T2	22	26,19	0	0	
T3	10	11,90	2	40,00	
T4a, T4b	19	22,62	0	0	
Brak danych/*No data*	18	21,43	3	60,00	
N – Regionalne węzły chłonne/*Regional lymph nodes*					
N0	33	39,29	1	20,00	0,921
N1	6	7,14	0	0	
N2a, N2b, N2c	13	15,48	1	20,00	
N3	13	15,48	0	0	
Brak danych/*No data*	19	22,62	3	60,00	
M – Przerzuty odległe/*Distant metastasis*					
M0	6	7,14	0	0	0,682
M1	0	0	0	0	
Mx	59	70,24	2	40,00	
Brak danych/*No data*	19	22,62	3	60,00	
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*					
I	15	17,86	0	0	0,793
II	12	14,29	1	20,00	

Dane kliniczne i patologiczne/ ***Clinical and pathological data***	**Brak amplifikacji /*No amplification***		**Amplifikacja/** ***Amplification***		**p wartość /p-value**
	N	**%**	**n**	**%**	
III	13	15,48	0	0	
IV	27	32,14	1	20,00	
Brak danych/*No data*	17	20,24	3	60,00	
Zastosowane leczenie/*Treatment*					
Chirurgia/*Surgery*	29	34,52	0	0	0,977
Radioterapia/*Radiotherapy*	10	11,90	0	0	
Chemioterapia/*Chemotherapy*	0	0	0	0	
Chirurgiczne i radioterapia/ ***Surgery and radiotherapy***	19	22,62	2	40,00	
Chirurgiczne i chemioterapia/ ***Surgery and chemotherapy***	1	1,19	0	0	
Radioterapia i chemioterapia/ ***Radiotherapy and chemotherapy***	5	5,95	0	0	
Chirurgiczne, radioterapia i chemioterapia/*Surgery, radiotherapy and chemotherapy*	3	3,57	0	0	
Nie rozpoczęto leczenia/ ***No treatment***	5	5,95	1	20,00	
Brak danych/*No data*	12	14,29	2	40,00	
Przeżycie 5-letnie/*5-year survival*					
Przeżycie 5-letnie/*5 year suvival*	27	32,14	0	0	0,127
Brak przeżycia 5-letniego/ ***Patients did not survive 5 years***	55	65,48	5	100,00	
Brak danych/*No data*	2	2,38	0	0	

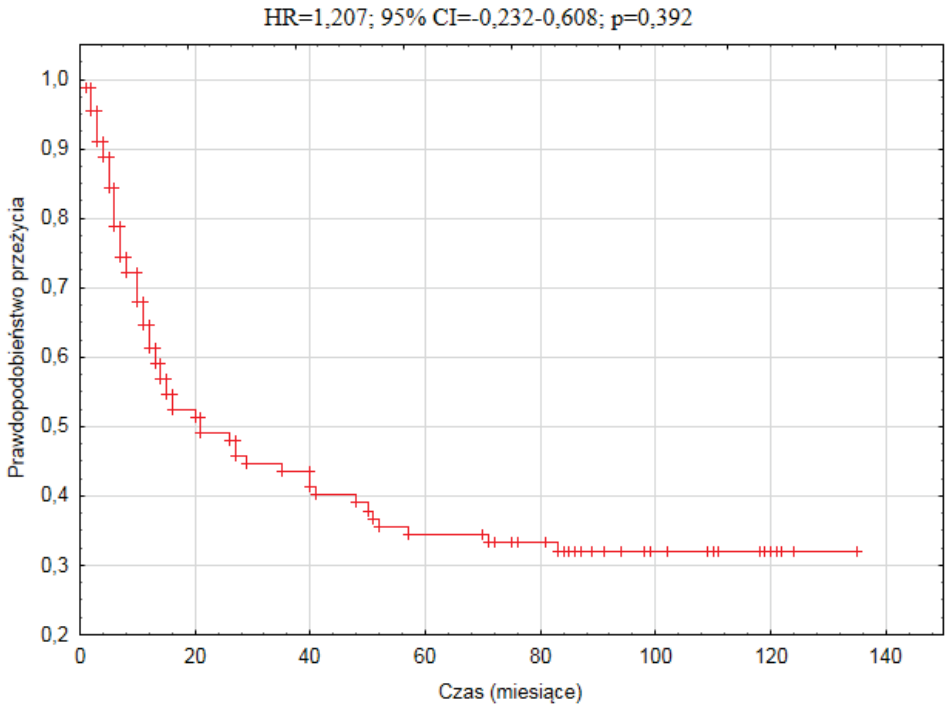
W analizie jednoczynnikowej modelu proporcjonalnego ryzyka Cox'a nie stwierdzono związku pomiędzy liczbą kopii genu *PIK3CA,* traktowanej jako cecha ciągła, a czasem przeżycia (HR=1,034; 95% CI=-0,152-0,219; p=0,726; Rycina 25). Podobne wyniki uzyskano dla analizy stosunku *PIK3CA/CEP3* (HR=1,207; 95% CI=-0,232-0,608; p=0,392; Rycina 26) i obecności amplifikacji genu *PIK3CA* (HR=1,621; 95% CI=-0,453-1,420; p=0,343; Rycina 27).

W analizie wieloczynnikowej modelu proporcjonalnego ryzyka Cox'a liczba kopii genu *PIK3CA,* stosunek *PIK3CA/CEP3* oraz czynniki kliniczno-patologiczne nie miały wpływu rokowniczego na czas przeżycia. Natomiast prawie sześciokrotny wzrost ryzyka skrócenia czasu całkowitego przeżycia zaobserwowano w przypadku zmian w dnie jamy ustnej z obecną amplifikacją genu *PIK3CA* (HR=5,783; 95% CI=0,054-3,456; p=0,037) (Tabela 17).



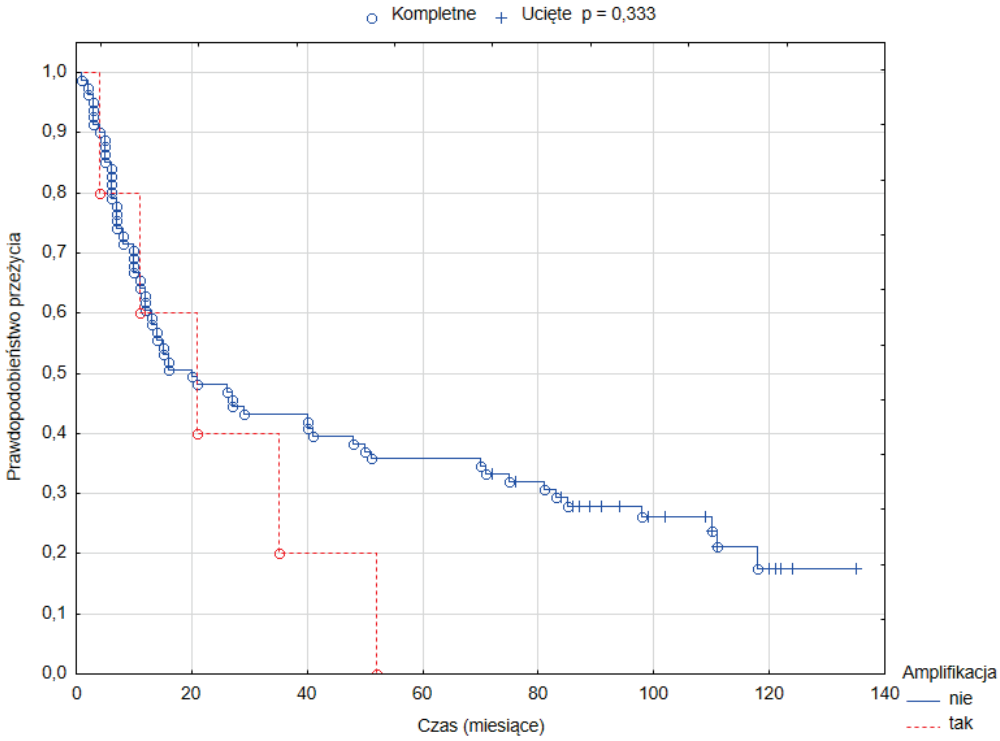
Rycina 25. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od liczby kopii genu *PIK3CA*

Figure 25. *Overall survival probability curves according to PIK3CA gene copy number*



Rycina 26. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od stosunku *PIK3CA/CEP*3

Figure 26. *Overall survival probability curves according to PIK3CA/CEP3 ratio*



Rycina 27. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od amplifikacji

Figure 27. *Overall survival probability curves according to amplification*

Tabela 17. Wieloczynnikowy model proporcjonalnego ryzyka Cox'a czasu przeżycia od liczby kopii genu *PIK3CA* (model A), stosunku *PIK3CA/CEP3* (model B) oraz amplifikacji genu *PIK3CA* (model C)

Table 17. *Multivariate Cox's regression analysis of PIK3CA gene copy number (A), PIK3CA/CEP3 ratio (B), and PIK3CA amplification (C) for overall survival adjusted for clinical and pathological patient characteristics*

Cechy kliniczne i patologiczne/ C*linical and pathological data*	**HR**	**95% CI (beta 95%-beta 95% górna)**	**p (model Cox'a) /*p-value (Cox model)***
Model A – liczba kopii genu *PIK3CA*/*Model A – PIK3CA gene copy number*			
Wiek [lata]/*Age [years]*	1,027	-0,162-0,215	0,783
Płeć/*Gender*	1,034	-0,156-0,223	0,727
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*	1,003	-0,189-0,195	0,976
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*	0,985	-0,276-0,247	0,912
Lokalizacja/*Localisation*	1,092	-0,162-0,340	0,487
Nikotynizm/*Smoking*	0,960	-0,277-0,195	0,733
Alkoholizm/*Alcohol abuse*	0,938	-0,315-0,187	0,614
T	0,976	-0,252-0,203	0,836
N	0,952	-0,310-0,211	0,711
M	1,000	-0,241-0,241	0,999
Leczenie chirurgiczne/*Surgery*	1,071	-0,104-0,242	0,445
Radioterapia/*Radiotherapy*	0,972	-0,257-0,201	0,809
Chemioterapia/*Chemotherapy*	0,946	-0,291-0,181	0,643
Model B – stosunek *PIK3CA/CEP3*/*Model B PIK3CA/CEP3 ratio*			
Wiek [lata]/*Age [years]*	1,195	-0,249-0,605	0,424
Płeć/*Gender*	1,202	-0,239-0,607	0,405
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*	1,120	-0,315-0,542	0,610
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*	1,165	-0,530-0,836	0,659
Lokalizacja/*Localisation*	1,407	-0,228-0,910	0,244

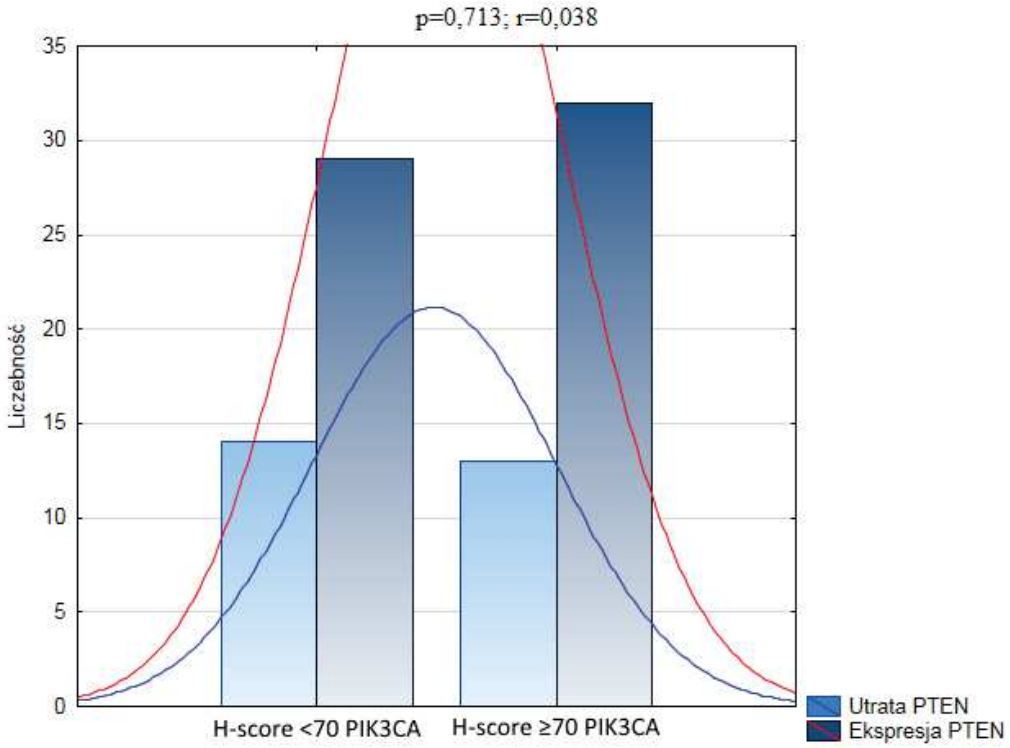
Cechy kliniczne i patologiczne/ *Clinical and pathological data*	**HR**	**95% CI (beta 95%-beta 95% górna)**	**p (model Cox'a) /*p-value (Cox model)***
Nikotynizm/*Smoking*	1,088	-0,469-0,637	0,768
Alkoholizm/*Alcohol abuse*	1,030	-0,562-0,621	0,923
T	1,032	-0,529-0,592	0,913
N	1,018	-0,668-0,704	0,958
M	1,139	-0,503-0,762	0,686
Leczenie chirurgiczne/*Surgery*	1,215	-0,179-0,568	0,324
Radioterapia/*Radiotherapy*	1,061	-0,470-0,589	0,827
Chemioterapia/*Chemotherapy*	1,025	-0,520-0,571	0,928
Model C – amplifikacja genu *PIK3CA*/*Model C – PIK3CA amplification*			
Wiek [lata]/*Age [years]*	1,570	-0,500-1,402	0,381
Płeć/*Gender*	1,660	-0,440-1,454	0,326
Stopień zróżnicowania histologicznego/*Grading*	1,563	-0,499-1,393	0,382
Stopień zaawansowania klinicznego/*Staging*	1,071	-1,397-1,534	0,928
Lokalizacja/*Localisation*	**5,783**	**0,054-3,456**	**0,037**
Nikotynizm/*Smoking*	1,595	-0,597-1,531	0,418
Alkoholizm/*Alcohol abuse*	1,429	-0,864-1,577	0,585
T	0,483	-2,314-0,859	0,337
N	0,676	-1,940-1,157	0,604
M	1,300	-1,195-1,719	0,734
Leczenie chirurgiczne/*Surgery*	1,151	-1,060-1,342	0,822
Radioterapia/*Radiotherapy*	1,331	-0,912-1,484	0,653
Chemioterapia/*Chemotherapy*	1,296	-0,948-1,467	0,685

6.4 Zależność poziomu białek PIK3CA, PTEN oraz liczby kopii genu *PIK3CA*

6.4.1 Zależność poziomu białka PIK3CA od PTEN

Dla 95,65% badanych (n=88/92) uzyskano dane dotyczące immunohistochemicznej reakcji białek PIK3CA i PTEN. U 15,91% chorych (n=14/88), u których stwierdzono utratę białka PTEN, nie wykazano obecności ekspresji białka PIK3CA w komórkach nowotworu. U 13,64% pacjentów (n=12/88) brak ekspresji PTEN występował z łącznie dodatnią reakcją barwną PIK3CA.

Nie wykazano związku między statusem białka PIK3CA a utratą białka PTEN (białko PIK3CA analizowano jako zmienną ciągłą; p=0,741; r=0,036). Po dokonaniu podziału pacjentów na grupy o wysokim i niskim poziomie wskaźnika H dla białka PIK3CA, nie wykazano zależności pomiędzy obecnością białka PIK3CA a utratą białka PTEN (p=0,713; r=0,038; Rycina 28).



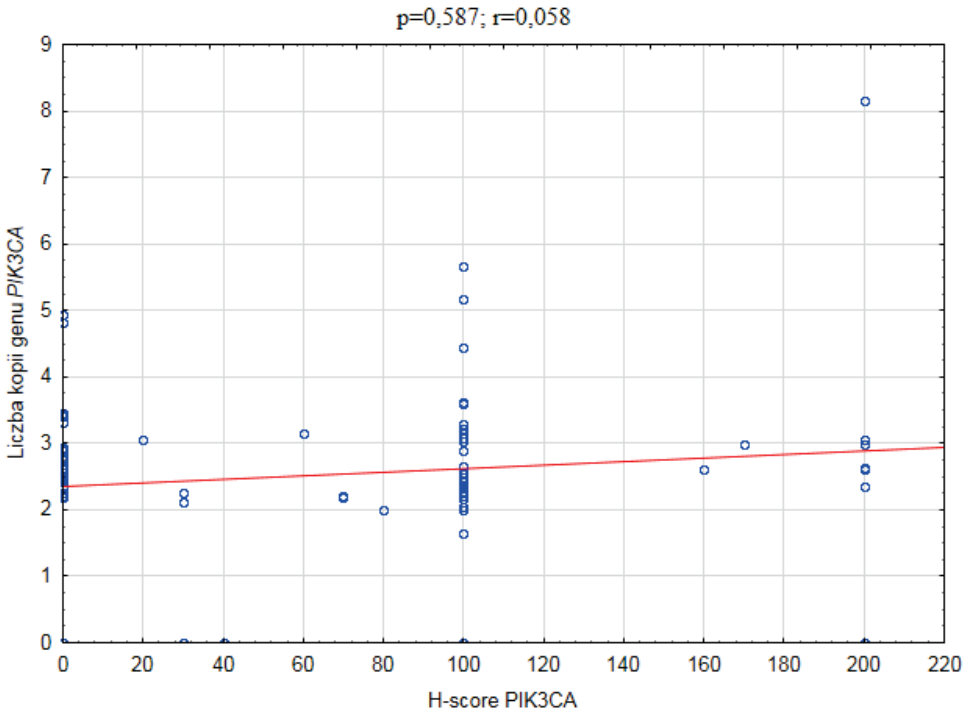
Rycina 28. Związek pomiędzy białkiem PTEN i PIK3CA z punktem odcięcia 70

Figure 28. *Relationship between PTEN and PIK3CA protein with 70 cut-off point*

6.4.2 Zależność poziomu białka PIK3CA od liczby kopii genu *PIK3CA*

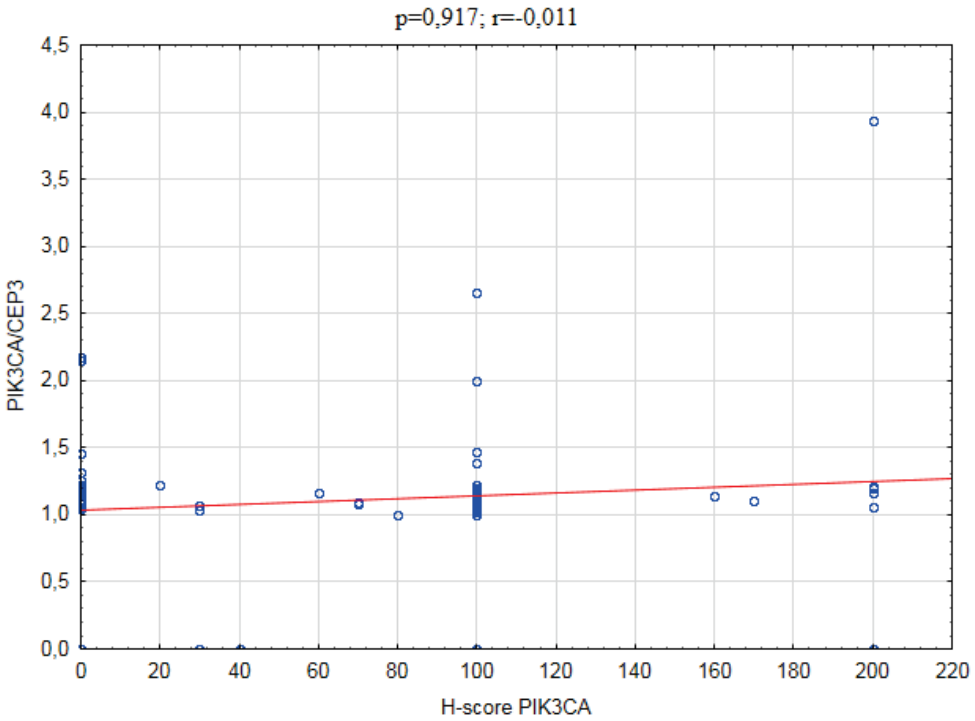
Dla 96,74% (n=89/92) pacjentów uzyskano dane dotyczące poziomu białka PIK3CA oraz liczby kopii genu *PIK3CA.* U 60% (n=3/5) chorych, u których stwierdzono obecność amplifikacji genu *PIK3CA* w komórkach nowotworu, zaobserwowano ekspresję białka PIK3CA.

Nie wykazano związku między poziomem białka PIK3CA oraz liczbą kopii genu *PIK3CA* (obie cechy analizowano jako zmienne ciągłe; p=0,587; r=0,058; Rycina 29). Nie wykazano podobnej zależności pomiędzy statusem białka PIK3CA a stosunkiem *PIK3CA/CEP3* (obie cechy analizowano jako zmienne ciągłe; p=0,917; r=-0,011; Rycina 30). Nie wykazano związku między poziomem białka PIK3CA oraz amplifikacją genu *PIK3CA* (p=0,650; r=0,048; Rycina 31).



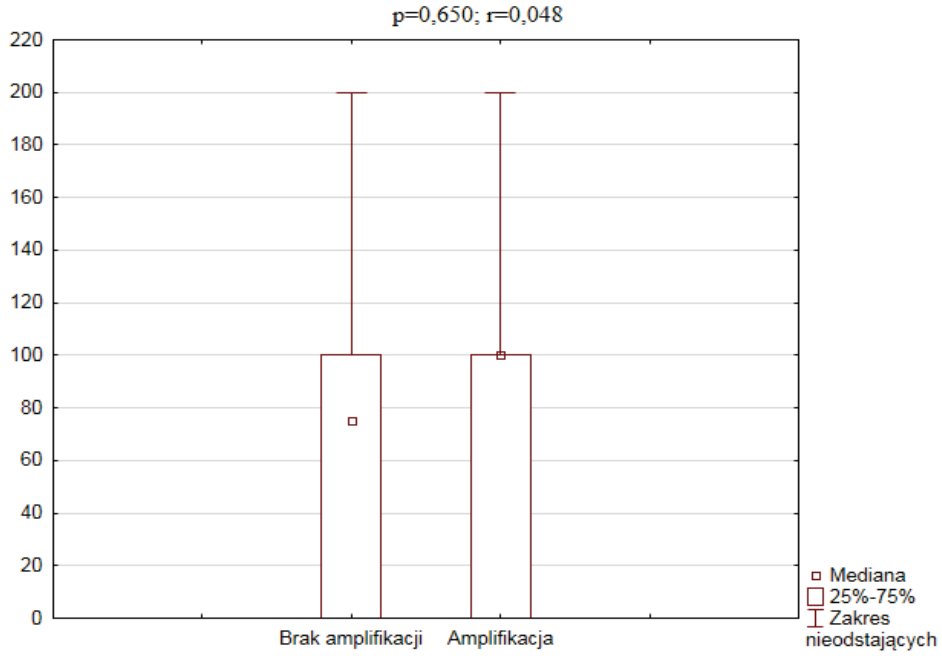
Rycina 29. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność ekspresji białka PIK3CA (wskaźnik H) od liczby kopii genu *PIK3CA*

Figure 29. *Scatter plot of PIK3CA H-score according to PIK3CA gene copy number*



Rycina 30. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność ekspresji białka PIK3CA (wskaźnik H) od stosunku *PIK3CA/CEP3*

Figure 30. *Scatter plot of PIK3CA H-score according to PIK3CA/CEP3 ratio*



Rycina 31. Wykres ramka-wąsy przedstawiający zależność ekspresji białka PIK3CA (wskaźnik H) od stosunku *PIK3CA/CEP3*

Figure 31. *Box plot of PIK3CA H-score according to PIK3CA/CEP3 ratio*

Po dokonaniu podziału wskaźnika H dla białka PIK3CA na dwie grupy, z punktem odcięcia większym lub równym 70, nie wykazano zależności pomiędzy obecnością białka PIK3CA a liczbą kopii genu *PIK3CA* (p=0,819; r=0,025) oraz stosunkiem *PIK3CA/CEP3* (p=0,864; r=-0,018). Nie wykazano związku między poziomem białka PIK3CA oraz amplifikacją genu *PIK3CA* (p=0,744; r=0,035).

6.4.3 Zależność utraty białka PTEN od liczby kopii genu *PIK3CA*

Dla 93,78% (n=86/92) pacjentów uzyskano dane dotyczące ekspresji białka PTEN oraz liczby kopii genu *PIK3CA.* U 40,00% (n=2/5) chorych, u których stwierdzono obecność amplifikacji genu *PIK3CA* w komórkach nowotworu, zaobserwowano utratę ekspresji białka PTEN.

Nie wykazano związku między utratą białka PTEN oraz liczbą kopii genu *PIK3CA* (liczba kopii genu jako zmienna ciągła; p=0,885, r=0,016). Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem białka PTEN a stosunkiem *PIK3CA/CEP3* (cecha ciągła; p=0,681, r=0,045) oraz amplifikacją genu *PIK3CA* (p=0,629; r=-0,053).

7. DYSKUSJA

W bieżących badaniach nad wieloma nowotworami poszukuje się markerów molekularnych o przewidywalnym znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym. W nowotworach płaskonabłonkowych płuca, macicy, prosty, piersi czy jelita grubego uzyskano wyniki świadczące o związku pomiędzy obecnością czynników PIK3CA i PTEN a progresją raka. Wykazano, iż są niezależnymi determinantami związanymi ze złym rokowaniem oraz zmniejszeniem 5-letniego przeżycia pacjentów [26].

Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej w momencie rozpoznania bardzo często charakteryzuje się wysokim stopniem zaawansowania klinicznego. U co dziesiątego chorego występuje drugie ognisko raka lub rozsiew do okolicznych węzłów chłonnych. Pomimo rozwoju metod rozpoznawania RJU, wyniki leczenia są niezadowalające [52, 95, 105].

Wykrycie wzrostu poziomu białek szlaku kinazy 3-fosfatydyloinozytolu może mieć znaczenie w terapii raka jamy ustnej, ponieważ ich status prawdopodobnie wpływa na oporność komórek nowotworu na leczenie terapiami celowanymi oraz tradycyjnymi metodami chemioterapii, np. 5-fluorouracylem [40].

7.1 Charakterystyka badanej grupy

Grupę badaną stanowiło 92 chorych cierpiących na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Średnia wieku wynosiła 61,52 lat, a wśród chorych przeważali mężczyźni w stosunku do kobiet. Najczęściej raka płaskonabłonkowego diagnozowano w stadium IV oraz w wysokim i średnim stopniu zróżnicowania histopatologicznego. Zmiany były zlokalizowane przede wszystkim w dnie jamy ustnej bądź na języku.

Najważniejszym czynnikiem rokowniczym w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej jest stopnień zaawansowania klinicznego nowotworu (TNM). Na wybór metody leczenia mają wpływ stopień zróżnicowania histopatologicznego, wiek chorego oraz ogólny stan pacjenta. Członkowie komitetu *Union Internationale Contre le Cancer/American Joint Committee on Cancer (UICC/AJCC)* przygotowali system

klasyfikacji nowotworów złośliwych [102]. W niniejszej pracy użyto klasyfikacji TNM dla raka jamy ustnej z 2010 roku [30].

Wykonana analiza statystyczna porównująca cechy kliniczne i patologiczne oraz ich wpływ na przebieg choroby jest zgodna z przedstawionymi w piśmiennictwie danymi. Wykazano zależność pomiędzy czasem przeżycia chorych a wielkością zmiany pierwotnej, przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych, stopniem zaawansowania klinicznego i zastosowaniem leczenia chirurgicznego.

7.2 Immunohistochemiczna ocena białek PIK3CA i PTEN

Metoda immunohistochemii pozwala na wykrycie różnych antygenów za pomocą przeciwciał ukierunkowanych na specyficzne białko w badanym materiale. Po połączeniu odpowiedniego przeciwciała z badanym antygenem, powstaje nierozpuszczalna substancja, którą można zaobserwować w mikroskopie świetnym.

7.2.1 Białko PIK3CA

W ocenie statusu białek wykorzystywane są różne skale pozwalające określić stopień oraz proporcję wybarwienia komórek. Do oceny wybarwienia immunohistochemicznego PIK3CA w raku płaskonabłonkowym stosowano różne metody. Jedna z technik kategoryzuje badane preparaty w oparciu o intensywność wybarwienia: 0 (brak barwienia), + (słabe wybarwienie), ++ (umiarkowane wybarwienie) i +++ (silne wybarwienie) [13, 36]. Kolejna z metod zakłada, że preparaty zawierające mniej niż 10% komórek wybarwionych zostały zdefiniowane jako próbki ujemne (brak ekspresji), te z 10% do <30% jako preparaty o słabo dodatnim odczynie (+), z 30% do <50% jako umiarkowanie dodatni odczyn (++) i ≥50% komórek jako silnie dodatni odczyn (+++) [77]. Zmodyfikowana metoda półilościowa (ang. *modified semi-quantitative scoring system*) określa podział ze względu na procent wybarwionych komórek nowotworowych (ang. *percentage of positive cells,* PP; zakres 0-4): wynik 0 – brak wybarwienia komórek, 1 – 1-5% wybarwionych komórek, 2 – 6-20% wybarwionych komórek, 3 – 21-50% wybarwionych komórek oraz ≥50%

wybarwionych komórek. Następnie ocenia się stopień zabarwienia komórek (ang. *staining intensity*, SI; zakres 0-3): 0 – brak wybarwienia, 1 – komórki wybarwione z intensywnością 1, 2 – komórki wybarwione z intensywnością 2 oraz 3 – komórki wybarwione z intensywnością 3. Wynik (ang. *immunoreactive score,* IRS) uzyskuje się mnożąc procent wybarwionych komórek i stopień wybarwienia. W badaniu Won HS, i wsp. za pozytywne preparaty dla białka PIK3CA określano wskaźnik IRS>6 [154]. Nie ma jednej, najlepszej techniki określającej stopnień wybarwienia preparatów. Najpopularniejszą metodą stosowaną w badaniu immunohistochemicznym zmian nowotworowych jest metoda H-score. Preparaty są oceniane pod kątem stopnia oraz proporcji wybarwionych komórek. Intensywność wybarwiania preparatów jest oszacowana półilościowo, co dokładnie opisano w rozdziale *Materiały i metody*. W raku płaskonabłonkowym jamy ustnej wskaźnik H-score stosowano w przypadku białka CD44, CD73 oraz MDC1 [23, 62, 83]. Dla białka PIK3CA w innych zmianach litych indywidualnie ustalano wartość odcięcia, np. w niedrobnokomórkowym raku płuca i w raku jelita grubego dla wartości wybarwionych komórek powyżej 10% [150, 163], w raku żołądka procent komórek wynosił ponad 20% [78] lub punkt odcięcia H-score wynoszący 10 (minimum wybarwienia) jest powszechnie przyjęty dla oceny poziomu, np. dla receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) [42, 143]. W niniejszej pracy przyjęto za wynik dodatni H-score >10 oraz podzielono badanych na dwie grupy względem punktu odcięcia równym 70 (mediana) – niski i wysoki poziom białka PIK3CA. W raku płaskonabłonkowym jamy ustnej dotąd nie wykorzystywano metody H-score do analizy białka PIK3CA. Ponadto, zamiast procedury immunohistochemii za standardowych skrawkach preparatu z bloku parafinowego, wykorzystano mikromacierze tkankowe. Dzięki temu obniżono koszty badania, większa liczba próbek znajdowała się w takich samych warunkach reakcji i była poddawana badaniu IHC, a pierwotny blok parafinowy będzie można wykorzystać do kolejnych badań (mniejsze zużycie materiału tkankowego). W badaniu TMA pobiera się rdzeń o średnicy 0,4 mm. Jest to ograniczeniem metody, ponieważ powoduje niższą reprezentatywność próbek. Nowotwory złośliwe cechują się heterogennością. Dlatego też, pomimo wyboru dwóch reprezentatywnych rdzeni tkankowych, mogą występować błędy dotyczące obecności różnych białek i genów w danej tkance [147].

W niniejszej pracy uzyskano pozytywną reakcję barwną białka PIK3CA dla 59,34% pacjentów (n=54/91; H-score ≥10). W pracy Won HS, i wsp. dodatni rezultat otrzymano dla 38,90% chorych (n=21/60), Liu CJ, i wsp. dla 80% pacjentów (n=20/25), Xiong H, i wsp. dla 92,50% chorych (n=37/40), natomiast Garg R, i wsp. dla 100% pacjentów (n=30/30) [36, 77, 154, 157]. Stosowanie różnych skal oceny wybarwienia komórek może wpływać na stopień wyników pozytywnych.

Status białka PIK3CA badano w innych zmianach litych. W raku płaskonabłonkowym głowy i szyi uzyskano wartości pozytywne dla 90% pacjentów (n=9/10) [152], w raku niedrobnokomórkowym płuca dla 43% (n=34/80) oraz 48,60% (n=69/142) [75, 150], dla 50% (n=33/66) w raku przełyku [2], dla 35% (n=7/20) w raku żołądka [78], dla 59% (n=235/398) w raku jelita grubego [48], w raku jajnika dla 73% (n=45/62) [1] oraz raku piersi 24% (n=12/50) [34].

Występowanie podwyższonego poziomu podjednostki katalitycznej kinazy 3 fosfatydyloinozytolu w różnych nowotworach może świadczyć o zwiększonej aktywności ścieżki sygnałowej PI3K/AKT/PTEN w zmianach złośliwych. Przyczyny mogą być złożone i dotyczyć nie tylko elementów szlaku (mutacje genów *PIK3CA, AKT, PTEN* oraz zmiany potranslacyjne), ale także zaburzeń dotyczących receptora kinazy tyrozynowej czy ligandów łączących się z receptorem, np. czynnikami wzrostu [2, 34, 48, 75, 78, 150, 152].

W niniejszej pracy nie zauważono istotnych statystycznie zależności pomiędzy poziomem białka PIK3CA a danymi kliniczno-patologicznymi. Natomiast zaobserwowano wzrost częstości występowania podjednostki katalitycznej kinazy 3-fosfatydyloinozytolu u mężczyzn, u pacjentów palących względem niepalących, ze zmianami wysokozróżnicowanymi (o niskim stopniu złośliwości) i średniozróżnicowanymi (o pośrednim stopniu złośliwości) oraz z pierwotnym guzem T2 i T4.

Garg R, i wsp. Wykazali, że intensywność barwienia korelowała ze stopniem zaawansowania klinicznego RJU. Wyniki barwienia preparatów pochodzących od chorych, u których występował nowotwór w późnym stadium zaawansowania (stadium III i IV) były silnie dodatnie (87,50%) dla PIK3CA [36]. W pozostałych badaniach dotyczących raka płaskonabłonkowego jamy ustnej nie znaleziono zależności

między statusem białka PIK3CA a cechami klinicznymi i patologicznymi [77, 154, 157]. Podobnie obserwacje poczyniono w raku żołądka [78], jelita grubego [48] i raku niedrobnokomórkowym płuca [150]. W raku płaskonabłonkowym rejonu głowy i szyi wykazano, że wzrost statusu białka PIK3CA ma związek z progresją zmian od dysplazji do raka inwazyjnego [152]. W pracy Lin X, i wsp. dotyczącej raka płuca zauważono związek z niskim zróżnicowaniem nowotworu [75], a w raku płaskonabłonkowym przełyku zależność z obecnością przerzutów do lokalnych węzłów chłonnych [2].

W niniejszym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy występowaniem reakcji barwnej PIK3CA z czasem przeżycia pacjentów w analizie jednoczynnikowej oraz wieloczynnikowej wg Cox'a. W badaniu Won HS, i wsp. wykazano, że obecność podjednostki katalitycznej kinazy 3-fosfatydyloinozytolu nie była niezależnym czynnikiem predykcyjnym dla przeżycia wolnego od nawrotu choroby, a przeżycie 5-letnie korelowało z całkowitym przeżyciem [154]. Dane dotyczące zależności ekspresji PIK3CA od całkowitego czasu przeżycia chorych nie były badane w pozostałych pracach dotyczących raka płaskonabłonkowego jamy ustnej [36, 77, 157]. W raku jelita grubego także nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją p110α a czasem przeżycia pacjentów [48]. Natomiast w raku jajnika wykazano zależność pomiędzy dłuższym czasem przeżycia chorych a dodatnią reakcją barwną PIK3CA [1].

7.2.2 Białko PTEN

Do oceny wybarwienia immunohistochemicznego białka PTEN w raku płaskonabłonkowym stosowano różne metody, między innymi: I) analiza poprzez rozkład i intensywność wybarwienia komórek: 0 (0% komórek wybarwionych), 1 (1-50% komórek zabarwionych) i 2 (51-100% komórek zabarwionych) oraz intensywność 0 (brak barwienia), 1 (łagodne wybarwienie), 2 (umiarkowane zabarwienie) i 3 (silne zabarwienie) [92]; II) podział trzy grupy: pozytywna (cała zmiana wybarwiona), mieszana (obecne były zarówno komórki dodatnie, jak i ujemne) i negatywna (w komórkach nowotworowych nie zaobserwowano żadnego wybarwienia) [133]; III) wybarwienie komórek nowotworowych według czterostopniowego systemu oceny: wynik 0 dla wartości <5%, wynik 1 od 5% do <25%, wynik 2 od 25% do <50%, wynik 3 dla wartości ≥50% pozytywnie wybarwionych komórek nowotworowych [69]; IV) zmodyfikowana metoda półilościowa z oceną wyniku według IRS; w badaniu Won HS, i wsp. za pozytywne preparaty dla białka PTEN określano wskaźnik IRS ≥9 [154]; V) intensywność wybarwienia oceniana jako 0 (nieobecna), 1 (słaba), 2 (umiarkowana) i 3 (silna) oraz stopień zabarwienia jako 0 (0-9%), 1 (10-24%), 2 (25-49%), 3 (50-74%) i 4 (75-100%) zgodnie z odsetkiem pozytywnie wybarwionych komórek; wynik końcowy znajdował się w zakresie 0-7; preparaty mające końcowy wynik równy 0-1 były oceniane jako brak wybarwienia, a wyniki 2-3, 4-5 i 6-7 uznano za pozytywne z siłą odpowiednio 1+, 2+ i 3+ [95]. Nie ma jednej najlepszej techniki określającej stopnień wybarwienia preparatów. W niniejszej pracy wykorzystano system zero-jedynkowy. Preparaty niewybarwione sklasyfikowano jako zmiany z utratą białka, a wybarwione – z obecnym białkiem PTEN.

W tej pracy u 31,46% chorych (n=28/89) z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej stwierdzono utratę białka PTEN. W badaniu Won HS, i wsp. otrzymano wynik utraty białka PTEN dla 1,70% pacjentów (n=1/60), Squarize CH, i wsp. dla 23% chorych (n=7/22), Lee JL, i wsp. dla 29% przypadków (n=12/41), Monteiro LS, i wsp. dla 30,60% chorych (n=22/72), Rahmani A, i wsp. dla 44,40% pacjentów (n=26/60), Angadi PV, i wsp. dla 50% przypadków (n=15/30), Xiong H, i wsp. dla 52,50% chorych (n=21/40) oraz Miyahara LAN, i wsp. dla 63,01% pacjentów (n=46/73) [6, 64, 67, 92, 96, 118, 133, 154, 157]. Natomiast Kurasawa Y, i wsp., Li J, i wsp., Pickhard A, i wsp.

oraz Jasphin SS, i wsp. podali jedynie, że odnotowali obecność białka PTEN w raku jamy ustnej [47, 64, 69, 112].

W nowotworach litych bardzo często dochodzi do utraty białka PTEN, a przez to do zaburzeń w regulacji ścieżki sygnałowej kinazy 3 fosfatydyloinozytolu. W wyniku tego nie ma jednostki regulującej proces i dochodzi do niepohamowanej pracy szlaku. Najczęstszą przyczyną są zaburzenia związane z obróbką potranslacyjną białka PTEN, a nie mutacjami w obrębie genu *PTEN* [47]. Status białka PTEN badano w wielu zmianach litych. W raku płaskonabłonkowym krtani uzyskano wartości negatywne dla 56% pacjentów (n=28/50) [85], w raku niedrobnokomórkowym płuca dla 39,13% chorych (n=36/92) [149], dla 56,74% pacjentów (n=80/141) w raku żołądka [79], dla 34,88% chorych (n=60/172) w raku jelita grubego [98] oraz dla 38,10% pacjentów (n=8/21) w raku piersi [54].

W niniejszej pracy zauważono istotne statystycznie zależności pomiędzy poziomem białka PTEN a wielkością guza pierwotnego (p=0,043) oraz 5-letnim przeżyciem (p=0,028). Zmiany T3 i T4 częściej dotyczyły pacjentów, u których doszło do utraty białka PTEN. Ponad 80% z utratą białka PTEN nie przeżywało 5 lat. Zaobserwowano wzrost częstości występowania utraty ekspresji PTEN u mężczyzn, u pacjentów ze zmianami wysokozróżnicowanymi (o niskim stopniu złośliwości) i średniozróżnicowanymi (o pośrednim stopniu złośliwości), z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych oraz w IV stadium zaawansowania klinicznego.

W badaniach nad rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej wykazano zależność pomiędzy negatywną reakcją barwną PTEN a niektórymi cechami kliniczno-patologicznymi. W pracy Lee JL, i wsp. wykazano korelację pomiędzy utratą białka PTEN a wiekiem, występowaniem odległych przerzutów oraz nawrotów choroby [67]. Natomiast wg Li J, i wsp., Rahmani A, i wsp. oraz Monteiro LS, i wsp. wiek nie wiązał się z poziomem tego białka [69, 96, 118] Badania Squarize CH, i wsp., Rahmani A, i wsp. oraz Pickhard A, i wsp. wskazały związek ze stopniem zróżnicowania histopatologicznego [112, 118, 133]. Związek ze stopniem zaawansowania klinicznego został przedstawiony w pracy Rahmani A, i wsp. Zależność między poziomem białka PTEN a rozmiarem nowotworu oraz przerzutami do lokalnych węzłów chłonnych

wykazały badania Li J, i wsp. oraz Rahmani A, i wsp. [69, 118]. Płeć nie miała związku z utratą białka PTEN [67, 69, 96, 118].

Zależność pomiędzy danymi kliniczno-patologicznymi a utratą ekspresji białka PTEN w innych nowotworach litych zauważono dla raka krtani (stopień zróżnicowania histopatologicznego, lokalizacja) [85], w raku niedrobnokomórkowym płuca (stopień zróżnicowania histopatologicznego, wielkość zmiany pierwotnej, przerzuty do węzłów chłonnych i odległe) [149] oraz w raku jelita grubego (stężenie cholesterolu LDL) [98]. Nie wykazano korelacji pomiędzy cechami kliniczno-patologicznymi a statusem białka PTEN dla raka żołądka [79],

W tym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy występowaniem negatywnej reakcji barwnej PTEN z czasem przeżycia pacjentów w analizie jednoczynnikowej wg Cox'a. Wynik był na granicy istotności statystycznej. W analizie wieloczynnikowej wykazano, że jednoczesny brak białka PTEN oraz zmiany niskozróżnicowane (p=0,040), obecność przerzutów odległych (p=0,033), palenia tytoniu (p=0,016), alkoholizmu (p=0,042), niezastosowania leczenia chirurgicznego (p=0,029), radioterapii (p=0,020) lub chemioterapii (p=0,029) skracało o połowę czas przeżycia. W badaniach Lee JI, i wsp. oraz Li J, i wsp. udowodniono, że utrata ekspresji PTEN była związana z całkowitym przeżyciem [67, 69]. W pracy Zhao J, i wsp. udowodniono, że brak białka PTEN i wysoki poziom mikroRNA wiąże się ze złą prognozą u pacjentów z rakiem języka [162]. Badania Won HS, i wsp., Monteiro LS, i wsp. oraz Pickhard A, i wsp. nie wiązały utraty białka PTEN z całkowitym przeżyciem [95, 112, 154]. Dane dotyczące zależności ekspresji PTEN od całkowitego czasu przeżycia chorych nie były badane w pozostałych pracach dotyczących raka płaskonabłonkowego jamy ustnej [6, 47, 63, 118, 133, 157]. W raku niedrobnokomórkowym płuca i żołądka wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy dłuższym czasem przeżycia chorych a negatywną reakcją barwną PTEN [79, 149].

7.3 Liczba kopii genu *PIK3CA*

Obecność wzrostu liczby kopii genu *PIK3CA* w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej badano w dostępnych publikacjach za pomocą PCR, RT-PCR, FISH, aCGH oraz

metody MLPA [14, 33, 59, 135, 137, 145]. Natomiast nie stosowano połączenia metod chromogennej hybrydyzacji in situ i wzmocnionej jonami srebra hybrydyzacji in situ. Obecność amplifikacji genu *PIK3CA* stwierdzano przy obecności minimum wartości 15 dla liczby kopii genu *PIK3CA* lub stosunku *PIK3CA/CEP3* większego lub równego 2. W badaniach na rakiem jamy ustnej inni autorzy przyjęli takie same założenia [74, 145].

W niniejszej pracy wykazano obecność amplifikacji genu *PIK3CA* u 5,62% (n=5/89) chorych. Wzrost częstości amplifikacji genu *PIK3CA* w dotychczas prowadzonych badaniach nad rakiem jamy ustnej był notowany u 16,70% pacjentów (n=18/108) w badaniu Kozaki K, i wsp. [59], u 17,30% chorych (n=38/220) w badaniu Oikawa Y, i wsp. [107], u 25% pacjentów (n=3/12) w pracy Fenic I, i wsp. [33], u 26,40% chorych (n=24/91) w pracy Stricht C, i wsp. [135], u 32,50% pacjentów (n=9/31) w artykule Suda T, i wsp. [137], u 50% chorych (n=42/82) wg Tu HF, i wsp. [145] oraz u 100% przypadków (100%; n=7/7) w publikacji Cha JD, i wsp. [14]. Zmienność częstotliwości występowania amplifikacji może wynikać z wielkości próby, metody zastosowanej do analizy kopii genu lub innej grupy etnicznej pacjentów uczestniczących w badaniach. Wzrost liczby kopii genu *PIK3CA* odnotowano także w raku piersi (72%; n=36/50) [34], niedrobnokomórkowym płuca [50], żołądka (23,30%; n=23/110) [66] oraz endometrium (12,20%; n=24/196) [57].

W niniejszej pracy wykazano zależności pomiędzy liczbą kopii genu *PIK3CA* a stopniem zróżnicowania histologicznego (p=0,050). Natomiast nie wykazano zależności w odniesieniu do cech kliniczno-patologicznych a amplifikacją genu *PIK3CA.* Pacjentów podzielono na dwie grupy, tj. z amplifikacją oraz bez amplifikacji genu *PIK3CA*. Wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami dotyczące lokalizacji zmian. U pacjentów z amplifikacją rak częściej był umiejscowiony w dnie jamy ustnej (p=0,040).

W badaniu Stricht C, i wsp. wykazano zależność pomiędzy liczbą kopii genu *PIK3CA* a stopniem zaawansowania nowotworu [135]. Także praca Oikawa Y, i wsp. wykazali korelację pomiędzy stopniem zaawansowania nowotworu (stadium III/IV vs. I/II) oraz przerzutami do lokalnych węzłów limfatycznych w stosunku do wzrostu amplifikacji *PIK3CA* [107]. Publikacja Tu HF, i wsp. wskazała na zależność liczby

kopii genu i zróżnicowania raka jamy ustnej, wystąpienia wznowy, a także nawrotu choroby u palaczy [145]. Badanie Fenic I, i wsp. wykazało zależność ze stopniem zróżnicowania nowotworu [33], a badanie Cha JD, i wsp. wskazało istotne różnice pomiędzy nabłonkiem z dysplazją a zmianą nowotworową [14].

W raku piersi i w raku endometrium wykazano zależność między amplifikacją genu a wiekiem, natomiast nie znaleziono korelacji pomiędzy rasą oraz typem histologicznym nowotworu [34, 57]. U pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca wykazano korelację pomiędzy wzrostem liczby kopii genu a paleniem tytoniu i podtypem histologicznym [50], natomiast w raku żołądka nie odnotowano zależności pomiędzy amplifikacją a danymi kliniczno-patologicznymi [66].

W niniejszym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy zwiększeniem liczby kopii genu *PIK3CA,* stosunkiem *PIK3CA/CEP3* oraz występowaniem amplifikacji genu *PIK3CA* z czasem przeżycia pacjentów w analizie jednoczynnikowej. W analizie wieloczynnikowej modelu proporcjonalnego ryzyka Cox'a liczba kopii genu *PIK3CA,* stosunek *PIK3CA/CEP3* oraz czynniki kliniczno-patologiczne nie miały wpływu rokowniczego na czas przeżycia. Natomiast obecność amplifikacji oraz lokalizacja w dnie jamy ustnej powodowała prawie sześciokrotny wzrost ryzyka skrócenia czasu całkowitego przeżycia. W badaniu Stricht C, i wsp. oraz Suda T, wsp. nie wykazano zależności pomiędzy amplifikacją genu *PIK3CA* a całkowitym przeżyciem [135, 137]. Suda T, wsp. nie wykazali zależności z przeżyciem wolnym od choroby [137]. W innych badaniach nie oceniano wzrostu częstości kopii genu i przeżycia pacjentów [59, 107].

7.4 Zależność poziomu białek PIK3CA i PTEN od liczny kopii genu *PIK3CA*

W niniejszej pracy nie wykazano zależności między poziomem białka PIK3CA (jako cecha ciągła oraz z punktem odcięcia H-score 70) a liczbą kopii genu *PIK3CA,* stosunkiem *PIK3CA/CEP3* oraz amplifikacją genu. W innych badaniach na temat raka płaskonabłonkowym jamy ustnej nie wskazano związku pomiędzy ekspresją białka a amplifikacją [33]. Zależność pomiędzy statusem podjednostki katalizującej kinazy

3 fosfatydyloinozytolu a wzrostem liczby kopii genu wykazano w raku jelita grubego i jajnika [1, 48]. W raku niedrobnokomórkowym płuca oraz przełyku nie znaleziono zależności [2, 150].

Nie wykazano związku pomiędzy utratą białka PTEN a liczbą kopii genu *PIK3CA,* stosunkiem *PIK3CA/CEP3* oraz amplifikacją genu. Do tej pory nie badano zależności pomiędzy amplifikacją genu *PIK3CA*, stosunkiem *PIK3CA/CEP3* i poziomem białka PTEN w raku płaskonabłonkowy jamy ustnej.

W badaniu nad rozlanym chłoniakiem z dużych limfocytów stwierdzono, że amplifikacja genu *PIK3CA* i utrata białka PTEN może być niezależnym czynnikiem ogólnej prognozy przeżycia [19].

7.5 Chromogenna i wzmocniona srebrem hybrydyzacja in situ jako metoda oceny kopii genu

Metody chromogennej hybrydyzacji in situ oraz wzmocnionej jonami srebra hybrydyzacji in situ są rzadko stosowanymi technikami diagnostycznymi w ocenie molekularnej obecności amplifikacji genu. W raku płaskonabłonkowym do tej pory nie stosowano tej metody. Wykorzystywane były przede wszystkim techniki FISH, PCR, RT-PCR, aCGH oraz MLPA [14, 33, 59, 135, 137, 145]. Metody CISH i SISH są alternatywą dla techniki FISH. W pierwszym i drugim przypadku są wykorzystywane sondy, których zadaniem jest wykrycie w materiale genetycznym określonej sekwencji DNA. W metodzie CISH stosuje się sondy znakowane antygenami, w SISH jonami srebra, a w FISH fluorescencyjne. Zaletami metody CISH/SISH jest pełna automatyzacja procesu, a przez to pełna standaryzacja wyników, gdyż wszystkie preparaty podczas przeprowadzenia badania znajdują się w jednakowych warunkach reakcji. Zastosowanie do oceny mikroskopu optycznego znaczenie obniża koszt w porównaniu z metodą FISH, gdzie stosuje się mikroskop fluorescencyjny. Preparaty można przechowywać w metodzie CISH/SISH przez wiele lat bez ryzyka utraty sygnałów. Jednoczesna ocena histopatologiczna tkanki oraz ocena jąder komórkowych zmniejsza ryzyko błędnej interpretacji natury jąder komórkowych [27, 28, 98, 153].

8. WNIOSKI

1. Wzrost poziomu białek PIK3CA i utrata białka PTEN są bardzo często obserwowane w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej.
2. Utrata białka PTEN występuje częściej u pacjentów z zaawansowanym rakiem jamy ustnej.
3. Wzrost liczby kopii genu *PIK3CA* jest częściej obserwowany u pacjentów z rakiem o wysokim stopniu złośliwości, a amplifikacja genu *PIK3CA* częściej dotyczy chorych z rakiem dna jamy ustnej.
4. Jednoczesna utrata białka PTEN oraz niski stopnień zróżnicowania histopatologicznego, przerzuty odległe, palenie tytoniu lub alkoholizm skraca o połowę czas przeżycia pacjentów.
5. Amplifikacja genu *PIK3CA* i lokalizacja zmiany w dnie jamy ustnej sześciokrotnie skraca czas całkowitego przeżycia chorych z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Abe A, Minaguchi T, Ochi H, Onuki M, Okada S, Matsumoto K, Satoh T, Oki A, Yoshikawa H. PIK3CA overexpression is a possible prognostic factor for favorable survival in ovarian clear cell carcinoma. Hum Pathol 2013;44(2):199-207.

2. Akagi I, Miyashita M, Makino H, Nomura T, Hagiwara N, Takahashi K, Cho K, Mishima T, Ishibashi O, Ushijima T, Takizawa T, Tajiri T. Overexpression of PIK3CA is associated with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol 2009;34(3):767-775.

3. Acharya S, Ekalaksananan T, Vatanasapt P, Loyha K, Phusingha P, Promthet S, Kongyingyoes B, Pientong C. Association of Epstein-Barr virus infection with oral squamous cell carcinoma in a case-control study. J Oral Pathol Med 2015;44(4):252-257.

4. Akhter M, Hossain S, Rahman QB, Molla MR. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. J Oral Maxillofac Pathol 2011;15(2):168-176.

5. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland, RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare, EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR. AJCC cancer staging manual, 8th ed. London 2017

6. Angadi PV, Krishnapillai R. Evaluation of PTEN immunoexpression in oral submucous fibrosis: role in pathogenesis and malignant transformation. Head Neck Pathol 2012;6(3):314-321.

7. Arunkumar G, Murugan AK, Nagarajan M, Ajay C, Rajaraman R, Munirajan AK. Absence of the frequently reported PIK3CA, CASP8, and NOTCH1 mutations in South Indian oral cancers. Oral Dis 2017;23(5):669-673.

8. Badzio A, Wynes MW, Dziadziuszko R, Merrick DT, Pardo M, Rzyman W, Kowalczyk A, Singh S, Ranger-Moore J, Manriquez G, Gaire F, Jassem J, Hirsch FR. Increased insulin-like growth factor 1 receptor protein expression

and gene copy number in small cell lung cancer. J Thorac Oncol 2010;5(12):1905-1911.

9. Brana I, Siu LL. Clinical development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer treatment. BMC Med 2012;10:161.

10. Brandtzaeg P. The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. J Immunol Meth 1998;49-67.

11. Bruckman KC, Schönleben F, Qiu W, Woo VL, Su GH. Mutational analyses of the BRAF, KRAS, and PIK3CA genes in oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010;110(5):632-637.

12. Buckley JT. Properties of human erythrocyte phosphatidylinositol kinase and inhibition by adenosine, ADP and related compounds. Biochim Biophys Acta 1977;498(1):1-9.

13. 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;8:187-198.

14. Cha JD, Kim HJ, Cha IH. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma progression detected by combining array-based comparative genomic hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011;111(5):594-607.

15. Chang YS, Hsu HT, Ko YC, Yeh KT, Chang SJ, Lin CY, Chang JG. Combined mutational analysis of RAS, BRAF, PIK3CA, and TP53 genes in Taiwanese patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2014;118(1):110-116.

16. Chen F, Cao Y, Huang J, Yan L, Lin L, Liu F, Liu F, Wu J, Qiu Y, Cai L, He B1. A novel prognostic index for oral squamous cell carcinoma patients with surgically treated. Oncotarget 2017;8(33):55525-55533.

17. Chen M, Nowak DG, Trotman LC. Molecular pathways: PI3K pathway phosphatases as biomarkers for cancer prognosis and therapy. Clin Cancer Res 2014;20(12):3057-3063.

18. Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Shalmon B, Shani T, Oren S, Amariglio N, Dratviman-Storobinsky O, Shnaiderman-Shapiro A, Yahalom R, Kaplan I, Hirshberg A. Mutational analysis of PTEN/PIK3CA/AKT pathway in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2011;47(10):946-950.

19. Cui W, Ma M, Zheng S, Ma Z, Su L, Zhang W. PIK3CA amplification and PTEN loss in diffused large B-cell lymphoma. Oncotarget 2017;8(39):66237-66247.

20. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Engl J Med 2007;356(19):1944-1956.

21. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. J Infect Dis 2009;199(1):1263-1269.

22. da Costa AA, D'Almeida Costa F, Ribeiro AR, Guimarães AP, Chinen LT, Lopes CA, de Lima VC. Low PTEN expression is associated with worse overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with chemotherapy and cetuximab. Int J Clin Oncol 2015;20(2):282-289.

23. Dave JH, Vora HH, Ghosh NR, Trivedi TI. Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1) as a prognostic marker for patients with oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2017;46(4):253-258.

24. Day FL, Jorissen RN, Lipton L, Mouradov D, Sakthianandeswaren A, Christie M, Li S, Tsui C, Tie J, Desai J, Xu ZZ, Molloy P, Whitehall V, Leggett BA, Jones IT, McLaughlin S, Ward RL, Hawkins NJ, Ruszkiewicz AR, Moore J, Busam D, Zhao Q, Strausberg RL, Gibbs P, Sieber OM. PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. Clin Cancer Res 2013;19(12):3285-3296.

25. De Felice F, Guerrero Urbano T. New drug development in head and neck squamous cell carcinoma: The PI3-K inhibitors. Oral Oncol 2017;67:119-123.

26. Dhanuthai K, Rojanawatsirivej S, Thosaporn W, Kintarak S, Subarnbhesaj A, Darling M, Kryshtalskyj E, Chiang CP, Shin HI, Choi SY, Lee SS, Aminishakib

P. Oral cancer: a multicenter study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2018;23(1):e23-e29.

27. Dziadziuszko R. Molekularne czynniki predykcyjne korzyści klinicznej leczenia inhibitorami receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) chorych na niedrobnokórkowego raka płuca. Ann Acad Med Gedan 2009;19(supl. 8):19,107.

28. Dziadziuszko R, Wynes MW, Singh S, Asuncion BR, Ranger-Moore J, Konopa K, Rzyman W, Szostakiewicz B, Jassem J, Hirsch FR. Correlation between MET gene copy number by silver in situ hybridization and protein expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol 2012;7(2):340-347.

29. Echarri MJ, Lopez-Martin A, Hitt R. Targeted therapy in locally advanced and recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (LA-R/M HNSCC). Cancers (Basel) 2016;8(3):E27.

30. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC cancer staging handbook from the AJCC cancer staging manual, 7th ed. Springer New York Dordrecht Heidelberg London 2010.

31. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. Nat Rev Genet 2006;7(8):606-619.

32. Ermoian RP, Furniss CS, Lamborn KR, Basila D, Berger MS, Gottschalk AR, Nicholas MK, Stokoe D, Haas-Kogan DA. Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. Clin Cancer Res 2002;8(5):1100-1106.

33. Fenic I, Steger K, Gruber C, Arens C, Woenckhaus J. Analysis of PIK3CA and Akt/protein kinase B in head and neck squamous cell carcinoma. Oncol Rep 2007;18(1):253-259.

34. Firoozinia M, Moghadamtousi SZ, Nikzad S, Abdul Kadir H. PIK3CA gene amplification and PI3K p110α protein expression in breast carcinoma. Int J Med Sci 2014;11(6):620-625.

35. Foster JS, Fish LM, Phipps JE, Bruker CT, Lewis JM, Bell JL, Solomon A, Kestler DP. Odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) inhibits growth and migration of human melanoma cells and elicits PTEN elevation and inactivation of PI3K/AKT signaling. BMC Cancer 2013;13:227.

36. Garg R, Kapoor V, Mittal M, Singh MK, Shukla NK, Das SN. Abnormal expression of PI3K isoforms in patients with tobacco-related oral squamous cell carcinoma. Clin Chim Acta 2013;416:100-106.

37. Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, McNeish JD, Coleman KG. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. J Clin Invest 2003;112(2):197-208.

38. Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. JAMA 2012;307(7):693-703.

39. Gonzales CB, De La Chapa JJ, Saikumar P, Singha PK, Dybdal-Hargreaves NF, Chavez J, Horning AM, Parra J, Kirma NB. Co-targeting ALK and EGFR parallel signaling in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2016;59:12-19.

40. Hafsi S, Pezzino FM, Candido S, Ligresti G, Spandidos DA, Soua Z, McCubrey JA, Travali S, Libra M. Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance (review). Int J Oncol 2012;40(3):639-644.

41. Hashimoto M, Suizu F, Tokuyama W, Noguchi H, Hirata N, Matsuda-Lennikov M, Edamura T, Masuzawa M, Gotoh N, Tanaka S, Noguchi M. Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase co-activator that exhibits oncogenic potency in vivo. Oncogenesis 2013;2:e70.

42. Hirsch FR, Dziadziuszko R, Thatcher N, Mann H, Watkins C, Parums DV, Speake G, Holloway B, Bunn PA Jr, Franklin WA. Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: comparison of antibodies and cutoff points to predict benefit from gefitinib in a phase 3 placebo-controlled study in advanced nonsmall-cell lung cancer. Cancer 2008;112(5):1114-1121.

43. Horn D, Hess J, Freier K, Hoffmann J, Freudlsperger C. Targeting EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. Expert Opin Ther Targets 2015;19(6):795-805.

44. Iamaroon A, Krisanaprakornkit S. Overexpression and activation of Akt2 protein in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2009;45(10):e175-179.

45. Ito K, Ota A, Ono T, Nakaoka T, Wahiduzzaman M, Karnan S, Konishi H, Furuhashi A, Hayashi T, Yamada Y, Hosokawa Y, Kazaoka Y. Inhibition of Nox1 induces apoptosis by attenuating the AKT signaling pathway in oral squamous cell carcinoma cell lines. Oncol Rep 2016;36(5):2991-2998.

46. Janku F, Wheler JJ, Westin SN, Moulder SL, Naing A, Tsimberidou AM, Fu S, Falchook GS, Hong DS, Garrido-Laguna I, Luthra R, Lee JJ, Lu KH, Kurzrock R. PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations. J Clin Oncol 2012;30(8):777-782.

47. Jasphin SS, Desai D, Pandit S, Gonsalves NM, Nayak PB, Iype A. Immunohistochemical expression of phosphatase and tensin homolog in histologic gradings of oral squamous cell carcinoma. Contemp Clin Dent 2016;7(4):524-528.

48. Jehan Z, Bavi P, Sultana M, Abubaker J, Bu R, Hussain A, Alsbeih G, Al-Sanea N, Abduljabbar A, Ashari LH, Alhomoud S, Al-Dayel F, Uddin S, Al-Kuraya KS. Frequent PIK3CA gene amplification and its clinical significance in colorectal cancer. J Pathol 2009;219(3):337-346.

49. Jeon YJ, Cho JH, Lee SY, Choi YH, Park H, Jung S, Shim JH, Chae JI. Esculetin Induces Apoptosis Through EGFR/PI3K/Akt Signaling Pathway and Nucleophosmin Relocalization. J Cell Biochem 2016;117(5):1210-1221.

50. Ji M, Wang W, Yan W, Chen D, Ding X, Wang A1. Dysregulation of AKT1, a miR-138 target gene, is involved in the migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2017;46(9):731-737.

51. Jimeno A, Shirai K, Choi M, Laskin J, Kochenderfer M, Spira A, Cline-Burkhardt V, Winquist E, Hausman D, Walker L, Cohen RB. A randomized,

phase II trial of cetuximab with or without PX-866, an irreversible oral phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with relapsed or metastatic head and neck squamous cell cancer. Ann Oncol 2015;26(3):556-561.

52. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. Periodontol 2000 2011;57(1):19-37.

53. Karsy M, Neil JA, Guan J, Mahan MA, Colman H, Jensen RL. A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. Neurosurg Focus 2015;38(3):E4.

54. Kechagioglou P, Papi RM, Provatopoulou X, Kalogera E, Papadimitriou E, Grigoropoulos P, Nonni A, Zografos G, Kyriakidis DA, Gounaris A. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. Anticancer Res 2014;34(3):1387-1400.

55. Keegan NM, Gleeson JP, Hennessy BT, Morris PG. PI3K inhibition to overcome endocrine resistance in breast cancer. Expert Opin Investig Drugs 2018;27(1):1-15.

56. Konomen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumors specimens. Nat Med 1998;4(7):844-847.

57. Konopka B, Janiec-Jankowska A, Kwiatkowska E, Najmoła U, Bidziński M, Olszewski W, Goluda C. PIK3CA mutations and amplification in endometrioid endometrialcarcinomas: relation to other genetic defects and clinicopathologic status of the tumors. Hum Pathol 2011;42(11):1710-1719.

58. Kostakis GC, Papadogeorgakis N, Koumaki V, Kamakari S, Koumaki D, Alexandridis C. Absence of hotspot mutations in exons 9 and 20 of the PIK3CA gene in human oral squamous cell carcinoma in the Greek population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010;109(5):e53-58.

59. Kozaki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H, Omura K, Inazawa J PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. Cancer Sci 2006;97(12):1351-1358.

60. Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, Bedolla RG, Troyer DA, Kreisberg S, Ghosh P. Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. Cancer Res 2004;64(15):5232-5236.

61. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Kornblum M, Kötschau D, Tennstedt P, Huang J, Gerhäuser C, Mader M, Kurtz S, Sirma H, Saad F, Steuber T, Graefen M, Class C, Sauter G, Simon R, Minner S, Schlomm T. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. Am J Pathol 2012;181(2):401-412.

62. Krump M, Ehrmann J. Differences in CD44s expression in HNSCC tumours of different areas within the oral cavity. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2013;157(4):280-283.

63. Kurasawa Y, Shiiba M, Nakamura M, Fushimi K, Ishigami T, Bukawa H, Yokoe H, Uzawa K, Tanzawa H. PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma. Oncol Rep 2008;19(6):1429-1434.

64. Kuramochi H, Nakamura A, Nakajima G, Kaneko Y, Araida T, Yamamoto M, Hayashi K. PTEN mRNA expression is less pronounced in left- than right-sided colon cancer: a retrospective observational study. BMC Cancer 2016;16:366.

65. Lai K, Killingsworth MC, Lee CS. Gene of the month: PIK3CA. J Clin Pathol 2015;68(4):253-257.

66. Lee H, Hwang IS, Choi IJ, Kang YN, Park KU, Lee JH. Are PIK3CA mutation and amplification associated with clinicopathological characteristics of gastric cancer? Asian Pac J Cancer Prev 2015;16(11):4493-4496.

67. Lee JI, Soria JC, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, Hong WK, Mao L. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2001;127(12):1441-1445.

68. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. Oncogene 2005;24(8):1477-1480.

69. Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, Wu D, Lin Z, Zeng C, Yao Y, Zhang P, Song E. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. Clin Cancer Res 2009;15(12):3998-4008.

70. Li X, Wu C, Chen N, Gu H, Yen A, Cao L, Wang E, Wang L. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. Oncotarget 2016;7(22):33440-33450.

71. Li Y, Wang J, Wang F, Wang H, Wang J, Zeng X, Liao G, Dan H, Chen Q. Tissue microarray analysis reveals the expression and prognostic significance of phosphorylated Akt Thr in oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2013;116(5):591-597.

72. Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee Ji, Hong SP. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. J Clin Pathol 2005;58(11):1199-1205.

73. Lin J, Lin Y, Fan L, Kuang W, Zheng L, Wu J, Shang P, Wang Q, Tan J. miR-203 inhibits cell proliferation and promotes cisplatin induced cell death in tongue squamous cancer. Biochem Biophys Res Commun 2016;473(2):382-387.

74. Lin SC, Liu CJ, Ko SY, Chang HC, Liu TY, Chang KW. Copy number amplification of 3q26-27 oncogenes in microdissected oral squamous cell carcinoma and oral brushed samples from areca chewers. J Pathol 2005;206(4):417-422.

75. Lin X, Böhle AS, Dohrmann P, Leuschner I, Schulz A, Kremer B, Fändrich F. Overexpression of phosphatidylinositol 3-kinase in human lung cancer. Langenbecks Arch Surg 2001;386(4):293-301.

76. Linares J, Rullan A, Taberna M, Vazquez S, Mesia R. Emergence of long-term surviving patients with the introduction of cetuximab in recurrent/metastatic disease of squamous cell carcinoma of head and neck. Oral Oncol 2016;55:e4.

77. Liu CJ, Lin SC, Chen YJ, Chang KM, Chang KW. Array-comparative genomic hybridization to detect genomewide changes in microdissected primary and metastatic oral squamous cell carcinomas. Mol Carcinog 2006;45(10):721-731.

78. Liu JF, Zhou XK, Chen JH, Yi G, Chen HG, Ba MC, Lin SQ, Qi YC. Up-regulation of PIK3CA promotes metastasis in gastric carcinoma. World J Gastroenterol 2010;16(39):4986-4991.

79. Liu S, Tian Y, Zhu C, Yang X, Sun Q. High miR-718 Suppresses phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression and correlates to unfavorable prognosis in gastric cancer. Med Sci Monit 2018;24:5840-5850.

80. Luongo de Matos L, Trufelli DC, de Matos MG, da Silva Pinhal MA. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. Biomarker Insights 2010;5:9-20.

81. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, Loomis AM, Shah JP. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin 2017;67(2):122-137.

82. Lyu J, Song H, Tian Z, Miao Y, Ren G, Guo W. Predictive value of pAKT/PTEN expression in oral squamous cell carcinoma treated with cetuximab-based chemotherapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2016;121(1):67-72.

83. Mandapathil M, Boduc M, Netzer C, Güldner C, Roessler M, Wallicek-Dworschak U, Jahns E, Stuck B. CD73 expression in lymph node metastases in patients with head and neck cancer. Acta Otolaryngol 2018;138(2):180-184.

84. Martins F, de Sousa SC, Dos Santos E, Woo SB, Gallottini M. PI3K-AKT-mTOR pathway proteins are differently expressed in oral carcinogenesis. J Oral Pathol Med 2016;45(10):746-752.

85. Mastronikolis NS, Tsiambas E, Papadas TA, Karameris A, Ragos V, Peschos D, Mastronikolis SN, Papadas AT, Liatsos C, Armata IE, Fotiades PP. Deregulation of PTEN expression in laryngeal squamous cell carcinoma based on tissue microarray digital analysis. Anticancer Res 2017;37(10):5521-5524.

86. Matsuo FS, Andrade MF, Loyola AM, da Silva SJ, Silva MJB, Cardoso SV, de Faria PR. Pathologic significance of AKT, mTOR, and GSK3β proteins in oral squamous cell carcinoma-affected patients. Virchows Arch 2018;472(6):983-997.

87. Mavros A, Hahn M, Wieland I, Koy S, Koufaki ON, Strelocke K, Koch R, Haroske G, Schackert HK, Eckelt U. Infrequent genetic alterations of the tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. J Oral Pathol Med 2002;31(5):270-276.

88. Mei ZB, Duan CY, Li CB, Cui L, Ogino S. Prognostic role of tumor PIK3CA mutation in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. Ann Oncol 2016;27(10):1836-1848.

89. Michailidou E, Tzimagiorgis G, Chatzopoulou F, Vahtsevanos K, Antoniadis K, Kouidou S, Markopoulos A, Antoniades D. Salivary mRNA markers having the potential to detect oral squamous cell carcinoma segregated from oral leukoplakia with dysplasia. Cancer Epidemiol 2016;43:112-118.

90. Miller TW. Initiating breast cancer by PIK3CA mutation. Breast Cancer Res 2012;14(1):301.

91. Min YH, Eom JI, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, Jeung HK, Lee ST, Lee MH, Hahn JS, Ko YW. Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. Leukemia 2003;17(5):995-997.

92. Miyahara LAN, Pontes FSC, Burbano RMR, Conte Neto N, Guimarães DM, Fonseca FP, Pontes HAR. PTEN allelic loss is an important mechanism in the late stage of development of oral leucoplakia into oral squamous cell carcinoma. Histopathology 2018;72(2):330-338.

93. Mizrachi A, Shamay Y, Shah J, Brook S, Soong J, Rajasekhar VK, Humm JL, Healey JH, Powell SN, Baselga J, Heller DA, Haimovitz-Friedman A, Scaltriti M. Tumour-specific PI3K inhibition via nanoparticle-targeted delivery in head and neck squamous cell carcinoma. Nat Commun 2017;8:14292.

94. Moon C, Chae YK, Lee J. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab. Exp Biol Med (Maywood) 2010;235(8):907-920.

95. Monteiro LS, Delgado ML, Ricardo S, Garcez F, do Amaral B, Warnakulasuriya S, Lopes C. Phosphorylated mammalian target of rapamycin is associated with an adverse outcome in oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2013;115(5):638-645.

96. Monteiro LS, Amaral JB, Vizcaíno JR, Lopes CA, Torres FO. A clinical-pathological and survival study of oral squamous cell carcinomas from a population of the North of Portugal. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2014;19(2):e120-126.

97. Murugan AK, Hong NT, Fukui Y, Munirajan AK, Tsuchida N. Oncogenic mutations of the PIK3CA gene in head and neck squamous cell carcinomas. Int J Oncol 2008;32(1):101-111.

98. Naguib A, Cooke JC, Happerfield L, Kerr L, Gay LJ, Luben RN, Ball RY, Mitrou PN, McTaggart A, Arends MJ. Alterations in PTEN and PIK3CA in colorectal cancers in the EPIC Norfolk study: associations with clinicopathological and dietary factors. BMC Cancer 2011;11:123.

99. Nakanishi K, Sakamoto M, Yamasaki S, Todo S, Hirohashi S. Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Cancer 2005;103(2):307-312.

100. Nam SY, Lee HS, Jung GA, Choi J, Cho SJ, Kim MK, Kim WH, Lee BL. Akt/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis. APMIS 2003;111(12):1105-1113.

101. National Cancer Institute Bethesda: Tumor Grade, accessed 23.11.2018; https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/prognosis/tumor-grade-fact-sheet?redirect=true

102. National Cancer Institute Bethesda: Tumor Stage, accessed 23.11.2018; https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging

103. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. CA Cancer J Clin 2002;52(4):195-215.

104. Nitulescu GM, Margina D, Juzenas P, Peng Q, Olaru OT, Saloustros E, Fenga C, Spandidos DA, Libra M, Tsatsakis AM. Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). Int J Oncol 2016;48(3):869-885.

105. Noone AM, Howlader N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review 1975-2015, accessed 23.11.2018; https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/

106. Ocana A, Vera-Badillo F, Al-Mubarak M, Templeton AJ, Corrales-Sanchez V, Diez-Gonzalez L, Cuenca-Lopez MD, Seruga B, Pandiella A, Amir E. Activation of the PI3K/mTOR/AKT pathway and survival in solid tumors: systematic review and meta-analysis. PLoS One 2014;9(4):e95219.

107. Oikawa Y, Morita KI, Kayamori K, Tanimoto K, Sakamoto K, Katoh H, Ishikawa S, Inazawa J, Harada H. Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. Cancer Sci 2017;108(2):256-266.

108. Pałasz P, Adamski Ł, Górska-Chrząstek M, Starzyńska A, Studniarek M. Contemporary diagnostic imaging of oral squamous cell carcinoma – a review of literature. Pol J Radiol 2017;82:193-202.

109. Pap Z, Ilyés IÁ, Mocan SL, Dénes L, Muică Nagy-Bota MC, Pávai Z, Szántó A. Changes in immunoexpression of p53, Ki-67, Ets-1, APAF-1 and PTEN in serrated and conventional colon adenomas. Rom J Morphol Embryol 2015;56(4):1389-1396.

110. Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, Gonzalez MV. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer 2005;114(2):242-248.

111. Pérez-Tenorio G, Stål O, Group SSBC. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. Br J Cancer 2002;86(4):540-545.

112. Pickhard A, Gröber S, Haug AK, Piontek G, Wirth M, Straßen U, Rudelius M, Reiter R. Survivin and pAkt as potential prognostic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2014;117(6):733-742.

113. Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Park K, de Marinis F, Eberhardt WE, Paz-Ares L, Störkel S, Schumacher KM, von Heydebreck A, Celik I, O'Byrne KJ. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. Lancet Oncol 2012;13(1):33-42.

114. Pontes HA, Pontes FS, de Jesus AS, Soares MC, Gonçalves FL, de Lucena Botelho T, do Carmo Ribeiro J, Dos Santos Pinto D Jr. p-Akt and its relationship with clinicopathological features and survival in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. J Oral Pathol Med 2015;44(7):532-537.

115. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. Frontiers in Oncology 2014;4:64.

116. Price KA, Cohen EE. Mechanisms of and therapeutic approaches for overcoming resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapy in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). Oral Oncol 2015;51(5):399-408.

117. Qiu W, Schönleben F, Li X, Ho DJ, Close LG, Manolidis S, Bennett BP, Su GH. PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 2006;12(5):1441-1446.

118. Rahmani A, Alzohairy M, Babiker AY, Rizvi MA, Elkarimahmad HG. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. Int J Clin Exp Pathol 2012;5(9):965-971.

119. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, Tafe LJ, Oxnard GR, Moreira AL, Travis WD, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. Clin Cancer Res 2012;18(4):1167-1176.

120. Richter P, Böhmer FD, Hindermann W, Borsi L, Hyckel P, Schleier P, Katenkamp D, Kosmehl H, Berndt A. Analysis of activated EGFR signalling pathways and their relation to laminin-5 gamma2 chain expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Histochem Cell Biol 2005;124(2):151-160.

121. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmström PO, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. Cancer Res 2005;65(7):2554-2559.

122. Sal V, Demirkiran F, Erenel H, Tokgozoglu N, Kahramanoglu I, Bese T, Turan H, Sofiyeva N, Calay Z, Arvas M, Guralp O. Expression of PTEN and β-Catenin and their relationship with clinicopathological and prognostic factors in endometrioid type endometrial cancer. Int J Gynecol Cancer 2016;26(3):512-520.

123. Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. Curr Opin Oncol 2006;18(1):77-82.

124. Samuels Y, Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. Curr Top Microbiol Immunol 2010;347:21-41.

125. Sasahira T, Kirita T, Kuniyasu H. Update of molecular pathobiology in oral cancer: a review. Int J Clin Oncol 2014;19(3):431-436.

126. Shah S, Padh H, Kalia K. Genetic alterations of the PIK3CA oncogene in human oral squamous cell carcinoma in an Indian population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2015;120(5):628-635.

127. Shah S, Jajal D, Mishra G, Kalia K. Genetic profile of PTEN gene in Indian oral squamous cell carcinoma primary tumors. J Oral Pathol Med 2017;46(2):106-111.

128. Shin KH, Kim JM, Rho KS, Park KH, Oh JE, Min BM. Inactivation of the PTEN gene by mutation, exonic deletion, and loss of transcript in human oral squamous cell carcinomas. Int J Oncol 2002;21(5):997-1001.

129. Simpson DR, Mell LK, Cohen EE. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral Oncol 2015;51(4):291-298.

130. Smolensky D, Rathore K, Bourn J, Cekanova M. Inhibition of the PI3K/AKT Pathway Sensitizes Oral Squamous Cell Carcinoma Cells to Anthracycline-Based Chemotherapy In Vitro. J Cell Biochem 2017;118(9):2615-2624.

131. Soulieres D, Faivre S, Mesia R, Remenár É4, Li SH, Karpenko A, Dechaphunkul A, Ochsenreither S, Kiss LA, Lin JC, Nagarkar R, Tamás L, Kim SB, Erfán J, Alyasova A, Kasper S, Barone C, Turri S, Chakravartty A, Chol M, Aimone P, Hirawat S, Licitra L. Buparlisib and paclitaxel in patients with platinum-pretreated recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (BERIL-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. Lancet Oncol 2017;18(3):323-335.

132. Spoerke JM, O'Brien C, Huw L, Koeppen H, Fridlyand J, Brachmann RK, Haverty PM, Pandita A, Mohan S, Sampath D, Friedman LS, Ross L, Hampton GM, Amler LC, Shames DS, Lackner MR. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway alterations are associated with histologic subtypes and are predictive of sensitivity to PI3K inhibitors in lung cancer preclinical models. Clin Cancer Res 2012;18(24):6771-6783.

133. Squarize CH, Castilho RM, Santos Pinto D. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. J Oral Pathol Med 2002;31(7):379-384.

134. Sritippho T, Chotjumlong P, Iamaroon A. Roles of human papillomaviruses and p16 in oral cancer. Asian Pac J Cancer Prev 2015;16:6193-6200.

135. Sticht C, Hofele C, Flechtenmacher C, Bosch FX, Freier K, Lichter P, Joos S. Amplification of Cyclin L1 is associated with lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Br J Cancer 2005;92(4):770-774.

136. Su SC, Lin CW, Liu YF, Fan WL, Chen MK, Yu CP, Yang WE, Su CW, Chuang CY, Li WH, Chueng WH, Yang SF. Exome sequencing of oral squamous cell carcinoma reveals molecular subgroups and novel therapeutic opportunities. Theranostics 2017;7(5):1088-1099.

137. Suda T, Hama T, Kondo S, Yuza Y, Yoshikawa M, Urashima M, Kato T, Moriyama H. Copy number amplification of the PIK3CA gene is associated with poor prognosis in non-lymph node metastatic head and neck squamous cell carcinoma. BMC Cancer 2012;12:416.

138. Taberna M, Inglehart RC, Pickard RK, Fakhry C, Agrawal A, Katz ML, Gillison ML. Significant changes in sexual behavior after a diagnosis of human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative oral cancer. Cancer 2017;123(7):1156-1165.

139. Tamas K, Walenkamp AM, de Vries EG, van Vugt MA, Beets-Tan RG, van Etten B, de Groot DJ, Hospers GA. Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. Cancer Treat Rev 2015;41(8):671-679.

140. Tan DS, Wang W, Leong HS, Sew PH, Lau DP, Chong FT, Krisna SS, Lim TKH, Iyer NG. Tongue carcinoma infrequently harbor common actionable genetic alterations. BMC Cancer 2014;14:679.

141. Terakawa N, Kanamori Y, Yoshida S. Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. Endocr Relat Cancer 2003;10(2):203-208.

142. Tran NH, Cavalcante LL, Lubner SJ, Mulkerin DL, LoConte NK, Clipson L, Matkowskyj KA, Deming DA. Precision medicine in colorectal cancer: the molecular profile alters treatment strategies. Ther Adv Med Oncol 2015;7(5):252-262.

143. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd FA. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. N Engl J Med 2005;353(2):133-144.

144. Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, Suzuki K, Higashi H, Era S, Mori M. Reduced expression of PTEN protein and its prognostic implications in invasive ductal carcinoma of the breast. Oncology 2005;68(4-6):398-404.

145. Tu HF, Chang KW, Chiang WF, Liu CJ, Yu EH, Liu ST, Lin SC. The frequent co-expression of the oncogenes PIK3CA and PAK1 in oral carcinomas. Oral Oncol 2011;47(3):211-216.

146. Vermorken JB, Herbst RS, Leon X, Amellal N, Baselga J. Overview of the efficacy of cetuximab in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck in patients who previously failed platinum-based therapies. Cancer 2008;112(12):2710-2719.

147. Vogel UF, Bueltmann BD. Simple, inexpensive, and precise paraffin tissue microarrays constructed with a conventional microcompound table and a drill grinder. Am J Clin Pathol 2006;126:342-348.

148. Wan X, Li X, Yang J, Lv W, Wang Q, Chen Y, Li Y. Genetic association between PIK3CA gene and oral squamous cell carcinoma: a case control study conducted in Chongqing, China. Int J Clin Exp Pathol 2015;8(10):13360-13366.

149. Wang J, Chen H, Liao Y, Chen N, Liu T, Zhang H, Zhang H. Expression and clinical evidence of miR-494 and PTEN in non-small cell lung cancer. Tumour Biol 2015;36(9):6965-6972.

150. Wang L, Hu H, Pan Y, Wang R, Li Y, Shen L, Yu Y, Li H, Cai D, Sun Y, Chen H. PIK3CA mutations frequently coexist with EGFR/KRAS mutations in

non-small cell lung cancer and suggest poor prognosis in EGFR/KRAS wildtype subgroup. PLoS One 2014;9(2):e88291-e88291.

151. Wang Q, Zhang X, Song X, Zhang L. Overexpression of T-cadherin inhibits the proliferation of oral squamous cell carcinoma through the PI3K/AKT/mTOR intracellular signalling pathway. Arch Oral Biol 2018;96:74-79.

152. Woenckhaus J, Steger K, Werner E, Fenic I, Gamerdinger U, Dreyer T, Stahl U. Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. J Pathol 2002;335-342.

153. Wolf FF, Bublitz GS, Frigeri HR. Correlation and comparison of immunohistochemistry for HER2/neu, using the antibody SP3 and chromogenic in situ hybridization in breast carcinomas samples J Bras Patol Med Lab 2015;51(6):407-414.

154. Won HS, Jung CK, Chun SH, Kang JH, Kim YS, Sun DI, Kim MS. Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2012;48(10):985-990.

155. Wu HT, Ko SY, Fong JH, Chang KW, Liu TY, Kao SY. Expression of phosphorylated Akt in oral carcinogenesis and its induction by nicotine and alkaline stimulation. J Oral Pathol Med 2009;38(2):206-213.

156. Xiao J, Hu CP, He BX, Chen X, Lu XX, Xie MX, Li W, He SY, You SJ, Chen Q. PTEN expression is a prognostic marker for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of the literature. Oncotarget 2016;7(36):57832-57840.

157. Xiong H, Yang Y, Yang K, Zhao D, Tang H, Ran X. Loss of the clock gene PER2 is associated with cancer development and altered expression of important tumor-related genes in oral cancer. Int J Oncol 2018;52(1):279-287.

158. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Morooka T, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Ishikawa O, Ohigashi H, Nakamori S, Monden M,

Aozasa K. Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2004;10(8):2846-2850.

159. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene 2008;27(41):5497-5510.

160. Zanaruddin SN, Yee PS, Hor SY, Kong YH, Ghani WM, Mustafa WM, Zain RB, Prime SS, Rahman ZAA, Cheong SC. Common oncogenic mutations are infrequent in oral squamous cell carcinoma of Asian origin. PLoS One 2013;8(11):e80229.

161. Zhao J, Wang S, Liu N, Tang X. Correlation between the expression of Id-1 and hyperthermia-associated molecules in oral squamous cell carcinoma. J Clin Pathol 2013;66(9):758-763.

162. Zhao J, Chi J, Gao M, Zhi J, Li Y, Zheng X. Loss of PTEN expression is associated with high microRNA 24 level and poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Surg 2017;75(7):1449.e1-49.e8.

163. Zhu YF, Yu BH, Li DL, Ke HL, Guo XZ, Xiao XY. PI3K expression and PIK3CA mutations are related to colorectal cancer metastases. World J Gastroenterol 2012;18(28):3745-3751.

164. Zhu Z, Zhou J, Xiong X, Liu D, Zheng Y, Ding X, Du Y, Gu N, Wu Y, Song X. Prognostic value of serum liver enzymes in oral and oropharynx squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med 2019;48(1):36-42.