

**Analiza immunohistochemiczna  
i molekularna czynników transkrypcyjnych -  
SNAIL1, SNAIL2, ZNF281,  
regulujących przemianę  
nabłonkowo-mezenchymalną  
w raku jamy ustnej**

lek. dent. Marek Markiewicz

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

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

Zakład Chirurgii Stomatologicznej

Gdański Uniwersytet Medyczny

2020

## **Podziękowania**

*Składam serdeczne podziękowania wszystkim,  
dzięki którym powstanie pracy było możliwe,  
w szczególności mojemu Promotorowi  
Pani Profesor dr hab. n. med. Annie Starzyńskiej,  
za opiekę merytoryczną i pomoc w realizacji pracy,  
Pani Doktor hab. n. med. Monice Sakowicz-Burkiewicz, prof. uczelni  
za życzliwość i cenne uwagi.*

*Pracę dedykuję żonie Karolinie  
i dzieciom*

## SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY .....	6
1. WSTĘP.....	8
1.1. Rak jamy ustnej – epidemiologia .....	8
1.2.1. Czynniki środowiskowe .....	10
1.2.2. Czynniki genetyczne .....	12
1.3. Klasyfikacja TNM, metody leczenia.....	13
1.4. Mechanizmy molekularne inicjujące rozwój raka jamy ustnej oraz rola EMT .....	22
1.5. Czynniki transkrypcyjne i kofaktory regulujące przemianę nabłonkowo-mezenchymalną (EMT).....	27
2. CEL PRACY .....	36
3. MATERIAŁ I METODY .....	37
3.1. Grupa badana.....	37
3.2. Badanie immunohistochemiczne mikromacierzy tkankowych (IHC-TMA) .....	40
3.3. Metoda badań molekularnych .....	43
3.4. Analiza statystyczna.....	47
4. WYNIKI.....	49
4.1. Opis grupy pod względem kliniczno-patologicznym.....	49
4.2.1. <i>SNAIL1</i> .....	55
4.2.2. <i>SNAIL2</i> .....	58
4.2.3. <i>ZNF281</i> .....	60
4.3. Ocena analizy molekularnej .....	63
4.3.1. Analiza poziomu ekspresji genu <i>SNAIL1</i> na poziomie mRNA.....	63
4.3.2. Analiza poziomu ekspresji genu <i>SNAIL2</i> na poziomie mRNA.....	64
4.3.3. Analiza poziomu ekspresji genu <i>ZNF281</i> na poziomie mRNA.....	66
4.4 Zestawienie poziomu ekspresji genów: <i>SNAIL1</i> , <i>SNAIL2</i> , <i>ZNF281</i> (IHC i mRNA) z danymi klinicznymi.....	68
4.5. Determinanty 5yDFS.....	77
4.5.1. Kliniczne .....	77
4.5.2 Ekspresja markerów .....	80
4.6. Analiza przeżycia .....	81
4.6.1. Klinicznie .....	81
4.6.1 Ekspresja markerów analizowana jako zmienna ciągła .....	89
4.6.2 Ekspresja markerów zdychotomizowana .....	90

4.6.3 Modele wieloczynnikowe.....	93
4.7. Korelacje między poziomem ekspresji markerów.....	97
4.7.1. Korelacje między poziomem ekspresji markerów na poziomie białka .....	98
4.7.2. Korelacje między poziomem ekspresji markerów na poziomie mRNA .....	101
4.8. Zależność między ekspresją markerów na poziomie mRNA i białka w raku jamy ustnej.....	102
5. DYSKUSJA.....	104
5.1. Analiza czynników epidemiologicznych, klinicznych i histopatologicznych.....	104
5.2. Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna .....	107
5.3. Czynniki transkrypcyjne.....	108
5.3.1. Analiza wyników badań ekspresji SNAIL1, SNAIL2 i ZNF281 na poziomie białka i mRNA.....	110
5.4. Nowotworowe komórki macierzyste.....	115
6. WNIOSKI.....	120
7. STRESZCZENIE .....	121
8. SUMMARY .....	124
PIŚMIENNICTWO .....	126

**WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY**

bHLH - ang. *basic helix-loop-helix*

CD - ang. *cluster of differentiation*

CSC - ang. *cancer stem cell*

DFS - ang. *disease-free survival*

DNA - ang. *deoxyribonucleic acid*

EC - ang. *embryonal carcinoma*

ESC - ang. *embryonic stem cell*

EGFR - ang. *epidermal growth factor receptor*

EMT - ang. *epithelial-mesenchymal transition*

ESC - ang. *embryonic stem cells*

FFPE - ang. *formalin-fixed, paraffin-embedded*

HIER - ang. *heat induced epitope retrieval*

HNC - ang. *head and neck cancer*

HPV - ang. *human papilloma virus*

HSV - ang. *herpes simplex virus*

ICC - ang. *intrahepatic cholangiocarcinoma*

IgG - ang. *immunoglobulin G*

IHC - immunohistochemistry

KMN - komórki macierzyste nowotworu

MET - ang. *mesenchymal epithelial transition*

MTA - ang. *manual tissue arrayer*

MMP - ang. *metalloproteinases*

mRNA - ang. *messenger RNA*

miR-34a - ang. *microRNA*

NCI - ang. *National Cancer Institute*

NF- $\kappa$ B - ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

OS - ang. *overall survival*

OSCC - ang. *oral squamous cell carcinoma*

PBS - ang. *phosphate buffered saline*

RNA - ang. *ribonucleic acid*

RT - radioterapia

RT-PCR - ang. *reverse-transcription polymerase chain reaction*

siRNA - ang. *small interfering RNA*

TGF - ang. *transforming growth factor*

TMA - ang. *tissue microarray*

TNM - ang. *tumor; nodules; metastasis*

UICC/AJCC - ang. *Union Internationale Contre le Cancer / American Joint Committee on Cancer*

USG - ultrasonografia

VEGF - ang. *vascular endothelial growth factor*

ZNF - ang. *zinc finger protein*

## 1. WSTĘP

### 1.1. Rak jamy ustnej – epidemiologia

Ze względu na częstość występowania oraz inwazyjność, rak jamy ustnej stanowi duży problem kliniczny i społeczny. Ilość nowych przypadków na całym świecie ocenia się na ok. 500 tysięcy rocznie. Stanowi to od 2% do 5% wszystkich nowotworów złośliwych na świecie [49, 50, 51].

Szczyt zachorowań na raka jamy ustnej przypada w wieku 50-60 lat, rzadziej u osób poniżej 30 roku życia oraz powyżej 80 roku życia [57, 156, 193]. Wieloośrodkowe badania epidemiologiczne ostatnich trzech dekad, prowadzone przez: NCI (ang. *National Cancer Institute*), SEER (ang. *Surveillance Epidemiology and End Results*) oraz WHO (ang. *World Health Organization*), potwierdzają wzrost zachorowalności na raka jamy ustnej. Obserwowany jest coroczny wzrost zachorowalności na raka części ustnej języka o 2,1%, nasady języka o 1,7%. Średnia zapadalność na nowotwór złośliwy języka na świecie według NCI wynosi 2,9, a dla dna jamy ustnej 0,5 na 100 tys. W momencie rozpoznania, u co dziesiątego chorego, występuje wtórne ognisko lub rozsiew do okolicznych węzłów chłonnych. Zauważalne jest wyraźne zróżnicowanie pod względem zachorowalności związane z płcią. Rak jamy ustnej trzykrotnie częściej dotyczy mężczyzn [49, 171].

Dane epidemiologiczne różnią się w zależności od wieku pacjentów oraz kraju pochodzenia [50]. W Polsce rak jamy ustnej stanowi około 0,85% wszystkich nowotworów złośliwych. Rocznie obserwuje się około 1800 przypadków zachorowań [96]. Największą liczbę zachorowań stwierdza się w krajach Azji Południowo-Wschodniej, Pakistanie, Brazylii, Indiach i Francji [25]. Najwyższą zapadalność na raka języka stwierdza się w Indiach, gdzie stanowią one aż 35-40% wszystkich nowotworów złośliwych. W USA stanowi od 2% do 4% ogółu chorób nowotworowych [140].



5-letni wskaźnik przeżycia w raku jamy ustnej waha się od 32,8% do 56%. W krajach rozwiniętych, w tym w Europie Zachodniej wynosi on około 50%, w krajach rozwijających się może być niższy [6, 62, 64, 101, 106, 156]. Pomimo, iż jama ustna jest obszarem stosunkowo łatwo dostępnym do badań przesiewowych, rak jamy ustnej w ponad 50% jest nadal diagnozowany na etapie zaawansowanego stadium choroby nowotworowej [115, 141].

90-95% wszystkich nowotworów złośliwych, rozwijających się w jamie ustnej to rak płaskonabłonkowy (ang. *oral squamous cell carcinoma*) błony śluzowej jamy ustnej i wargi, wywodzący się z nierogowaciejącego nabłonka wielowarstwowego płaskiego [57, 156, 193]. Pozostałe rodzaje raka nabłonkowego oraz gruczołowego, wywodzącego się z małych gruczołów ślinowych, a także rak brodawkowy, stanowią niewielki odsetek spośród wszystkich przypadków raka jamy ustnej [39].

Przebieg kliniczny tego nowotworu oraz rokowanie mogą różnić się w zależności od umiejscowienia.

Ognisko pierwotne raka jamy ustnej najczęściej lokalizuje się na języku oraz błonie śluzowej dna jamy ustnej, a rzadziej na błonie śluzowej policzka, trójkąta zatrzonowcowego, podniebienia twardego i wyrostka zębodołowego [208]. Zazwyczaj wykazuje średni lub wysoki stopień zróżnicowania (G1, G2) [57, 156, 193]. W przeciwieństwie do raka wargi, rak błony śluzowej jamy ustnej posiada o wiele większe ryzyko przerzutowania do okolicznych węzłów chłonnych. Jest to uwarunkowane budową anatomiczną oraz bogatym unaczynieniem chłonnym tego regionu. Najgorsze rokowanie występuje w przypadku ogniska pierwotnego zlokalizowanego na języku i w dnie jamy ustnej. W tych lokalizacjach, bardzo często już na etapie wstępnej diagnozy, stwierdza się przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych. W przypadku lokalizacji raka w dnie jamy ustnej, ognisko pierwotne może szerzyć się pod błoną śluzową, naciekając gruczoły ślinowe, mięśnie i żuchwę.

W przebiegu raka jamy ustnej, w zależności od lokalizacji i stopnia zaawansowania, występują poważne dolegliwości bólowe oraz dysfunkcje jak zaburzenia mowy, oddychania, połykania. Upośledzenie funkcji życiowych u pacjentów chorych na ten rodzaj nowotworu, spowodowane zarówno postępowaniem

choroby oraz jej leczeniem, wiąże się także z negatywnymi skutkami psychologicznymi [187].

## **1.2. Czynniki etiologiczne rozwoju raka jamy ustnej**

### **1.2.1. Czynniki środowiskowe**

W piśmiennictwie dotyczącym etiologii raka jamy ustnej dominuje nikotynizm, jako istotny czynnik predysponujący do wystąpienia choroby [9, 42, 92, 86]. Osoby palące są średnio dwudziestokrotnie bardziej narażone na wystąpienie raka jamy ustnej. Wysoki wskaźnik zachorowalności na raka jamy ustnej i gardła powiązany jest także z żuciem tytoniu i betelu. Podobne obserwacje wykryto u nałogowych palaczy opium i marihuany [73].

Poza substancjami smolistymi zawartymi w dymie tytoniowym, udowodniono także kancerogenne działanie alkoholu wysokoprocentowego. Wykazano, że alkohol w połączeniu z tytoniem zwiększa ryzyko rozwoju tego nowotworu około 100 razy. Ma to związek z synergistycznym efektem kancerogennym tych dwóch czynników [38].

Różnorodność czynników ryzyka jest przyczyną różnic w częstości występowania tego nowotworu w różnych krajach i rejonach świata. Jest to spowodowane zmiennością w przypadku narażenia na promieniowanie ultrafioletowe, różnicami kulturowymi, panującymi zwyczajami, poziomem higieny oraz warunkami socjoekonomicznymi. Analizując występowanie raka jamy ustnej w zależności od szerokości geograficznej stwierdzono, że silnym czynnikiem kancerogennym jest promieniowanie ultrafioletowe [144, 171].

Bardzo wysoka zachorowalność na raka jamy ustnej dotyczy przede wszystkim populacji o utrwalonych, złych nawykach higienicznych i dietetycznych [103, 184, 189, 190].

Do innych, istotnych czynników etiologicznych, wpływających na większe ryzyko zachorowania na raka jamy ustnej należą: awitaminozy A i C,

niedokrwistości, zmiany zanikowe błony śluzowej, narażenia zawodowe na substancje kancerogenne, uprzednia radioterapia, leczenie immunosupresyjne, infekcje wirusowe, grzybicze, kiła oraz przewlekłe urazy mechaniczne śluzówki jamy ustnej np. spowodowane źle dopasowanym uzupełnieniem protetycznym, a także oparzenia termiczne i chemiczne.

Z infekcji wirusowych, odgrywających rolę w patogenezie raka jamy ustnej, wymienić należy zakażenie Herpes simplex typu 1 (HSV1), wirusem Epsteina-Barr, a także brodawczaka ludzkiego - HPV (ang. *human papilloma virus*), szczególnie typu 16 [45, 152].

Czynnik etiologiczny w postaci zakażenia wirusem HPV w raku jamy ustnej odgrywa bardzo istotną rolę. Zwraca uwagę wzrastająca częstość występowania tego typu nowotworu nie tylko w obrębie jamy ustnej, ale też w obrębie głowy i szyi. Według niektórych danych nowotwór jamy ustnej i gardła zależny od HPV, stanowi od 17 do 56% [81, 82, 114, 145, 171]. Etiopatogeneza wirusowa w raku jamy ustnej ma związek ze zmianami zachowań seksualnych. Infekcje HPV są też odpowiedzialne za zmiany epidemiologiczne, jakie zachodzą w ostatnich latach. Zwraca uwagę wzrastająca ilość zachorowań na raka jamy ustnej i gardła, zależnych od wirusa HPV w krajach rozwiniętych. Zakażenie HPV jest też jednym z ważniejszych czynników odpowiedzialnych za wzrost zachorowań wśród kobiet [81, 82, 114, 145, 171].

Czynnikami drażniącymi błonę śluzową jamy ustnej, które również predysponują do rozwoju raka jamy ustnej, są zniszczone próchniczo zęby, choroby przyzębia i stany zapalne. Wykazano, że w przypadku używania źle dopasowanych protez zębowych ryzyko rozwoju raka jamy ustnej wzrasta trzykrotnie [184].

Charakterystyczną cechą u chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej jest zwiększone ryzyko powstania kolejnego ogniska nowotworu [96]. Wynika to z ekspozycji na wspólne czynniki kancerogenne jak np. dym tytoniowy oraz warunków anatomicznych. Patogeneza wtórnego ogniska nowotworu związana jest więc z tymi samymi czynnikami ryzyka, jakie wywołały pierwotny nowotwór oraz wpływem czynników genetycznych. Kolejne ogniska nowotworowe rozwijają się w następnych latach najczęściej w drogach oddechowych (płuco, krtań) oraz górnym

odcinku przewodu pokarmowego (gardło, przełyk). W przypadku obu układów, ich pierwszym odcinkiem jest jama ustna. Slaughter i wsp. [16, 172] w 1953 roku ogłosili teorie tzw. „pola rakowaciejącego”, która tłumaczyła zwiększoną wrażliwość błony śluzowej na czynniki rakotwórcze. Rokowanie w przypadku rozwoju drugiego nowotworu jest złe. Stwierdzono 5-letnie przeżycie zaledwie u 36,5% chorych z rakiem synchronicznym i 16,8% z metachronicznym.

### 1.2.2. Czynniki genetyczne

W raku jamy ustnej często mamy do czynienia z zaburzeniami molekularnymi. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się czynnikom genetycznym, które wpływając na zmiany morfologiczne oraz molekularne komórek, zmieniają ich właściwości, przyczyniając się do zwiększenia inwazyjności i tworzenia przerzutów w chorobie nowotworowej, a w konsekwencji pogarszają rokowanie u pacjentów [24, 27, 148].

Do najczęstszych tego rodzaju zaburzeń należy zaliczyć mutacje genów supresorowych (np. w genie *p53*), mutacje genów pełniących rolę w naprawach DNA, a także mutacje genu kodującego receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*) oraz czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) [120].

Mutacje genów kodujących białka proapoptotyczne *p53*, obserwuje się w różnych typach nowotworów, a pojawienie się niefunkcjonalnej formy tego białka lub jego brak w komórkach, jest jedną z przyczyn wystąpienia fenotypu opornego na apoptozę [56, 126]. Z kolei zwiększona ekspresja białek antyapoptotycznych, na przykład BCL2, chroni komórki, w których doszło do mutacji letalnych. Komórki te nie ulegają apoptozie, co sprzyja procesom destabilizacji genetycznej charakterystycznej dla nowotworów [56, 61, 65, 116, 126].

### 1.3. Klasyfikacja TNM, metody leczenia

Podział kliniczny oraz stopień zaawansowania klinicznego raka jamy ustnej (ang. *staging*) dokonano w oparciu o klasyfikację TNM wg *Union Internationale Contre le Cancer/American Joint Committee on Cancer (UICC/AJCC)*.

Klasyfikacja kliniczna TNM jest bardzo ważnym czynnikiem prognostycznym, pomocnym w porównywaniu wyników leczenia raka jamy ustnej. Cecha T (ang. *tumour*) odnosi się do wielkości guza pierwotnego, cecha N (ang. *nodules*) do stanu i wielkości węzłów chłonnych szyi, a cecha M (ang. *metastasis*) określa obecność przerzutów odległych. Ewaluacja prognostyczna raka jamy ustnej dokonywana jest także dzięki innym klasyfikacjom jak stopień zróżnicowania histologicznego (ang. *grading*) wg *World Health Organization System* [7, 23].

W niniejszej pracy wykorzystano podział według siódmej edycji klasyfikacji TNM. Była ona aktualna w latach 2010 - 2016 (tab. 1 i 2).

Od grudnia 2016 roku obowiązuje podział według ósmej edycji klasyfikacji TNM [3, 4, 11] (tab. 3 i 4). Najnowszą klasyfikację rozszerzono o ocenę stopnia naciekania miejscowego tkanek przez nowotwór (zmiany dotyczące cechy T) oraz obecności nacieku pozawęzłowego.

**Tab. 1.** Stopień zaawansowania patomorfologicznego oraz klinicznego raka jamy ustnej i wargi wg 7. edycji klasyfikacji TNM (2010)

*Tab. 1. Pathomorphological and clinical stage of oral and lip squamous cell carcinoma according to the 7th edition of the TNM classification (2010)*

T - guz pierwotny	
Tx	Nie można ocenić pierwotnego guza
T0	Brak dowodów świadczących o występowaniu pierwotnego nowotworu
Tis	Rak in situ
T1	Guz wielkości 2 cm lub mniejszy w największym wymiarze
T2	Guz wielkości 2 cm, ale nie większy niż 4 cm w największym wymiarze
T3	Guz wielkości ponad 4cm w największym wymiarze
T4a	Guz nacieka kość korową żuchwy/zatoki szczękowej lub skórę twarzy
T4b	Guz nacieka przestrzeń żwacza/wyrostek skrzydłowy/podstawę czaszki/zamyka wewnętrzną tętnicę szyjną
N - Regionalne węzły chłonne	
Nx	Regionalne węzły chłonne nie mogą być oceniane
N0	Brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
N1	Przerzuty w jednym węźle chłonnym po stronie guza, o wymiarze 3 cm lub mniejszym w największym wymiarze
N2a	Przerzuty w jednym węźle chłonnym po stronie guza, o wymiarze większym niż 3 cm, ale mniejszym niż 6 cm w największym wymiarze
N2b	Przerzuty w licznych węzłach chłonnych po stronie guza, o wymiarze nie większym niż 6 cm w największym wymiarze
N2c	Przerzuty w węzłach chłonnych obustronne lub po stronie przeciwnej

	do guza, o wymiarze nie większym niż 6 cm w największym wymiarze
N3	Przerzuty w węzłach chłonnych większe niż 6 cm w największym wymiarze
M - Przerzuty odległe	
M0	Brak przerzutów odległych
M1	Przerzuty odległe

**Tab. 2.** Stopnie zaawansowania klinicznego i patologicznego wg 7. edycji klasyfikacji TNM (2010)

**Tab. 2.** Clinical and pathological stages according to the 7th edition of the TNM classification (2010)

Stadium	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

**Tab. 3.** Stopień zaawansowania patomorfologicznego oraz klinicznego raka płaskonabłonkowego jamy ustnej i wargi wg 8. edycji klasyfikacji TNM (2017)

*Tab. 3. Pathomorphological and clinical stage of oral and lip squamous cell carcinoma according to the 8th edition of the TNM classification (2017)*

T - guz pierwotny	
Tx	Nie można ocenić pierwotnego guza
T0	Brak dowodów świadczących o występowaniu pierwotnego nowotworu
Tis	Rak in situ
T1	Guz wielkości 2 cm lub mniejszy w największym wymiarze oraz <b>głębokość naciekania 5 mm lub mniejsza</b>
T2a	Guz wielkości 2 cm lub mniejszy w największym wymiarze oraz <b>głębokość naciekania większa niż 5 mm, ale mniejsza niż 10 mm</b>
T2b	Guz wielkości 2 cm, ale nie większy niż 4 cm w największym wymiarze oraz <b>głębokość naciekania nie większa niż 10 mm</b>
T3	Guz wielkości ponad 4cm w największym wymiarze lub <b>głębokość naciekania większa niż 10 mm</b>
T4a	Guz nacieka kość korową żuchwy/zatoki szczękowej lub skórę twarzy
T4b	Guz nacieka przestrzeń żwacza/wyrostek skrzydłowy/podstawę czaszki/zamyka wewnętrzną tętnicę szyjną
cN - Regionalne węzły chłonne - ocena kliniczna	
cNx	Regionalne węzły chłonne nie mogą być oceniane
cN0	Brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
cN1	Przerzuty w jednym węźle chłonnym po stronie guza, o wymiarze 3 cm lub mniejszym w największym wymiarze; <b>bez nacieku pozawęzłowego</b>
cN2a	Przerzuty w jednym węźle chłonnym po stronie guza, o wymiarze



	większym niż 3 cm, ale mniejszym niż 6 cm w największym wymiarze; <b>bez nacieku pozawęzłowego</b>
cN2b	Przerzuty w licznych węzłach chłonnych po stronie guza, o wymiarze nie większym niż 6 cm w największym wymiarze, <b>bez nacieku pozawęzłowego</b>
cN2c	Przerzuty w węzłach chłonnych obustronne lub po stronie przeciwnej do guza, o wymiarze nie większym niż 6 cm w największym wymiarze; <b>bez nacieku pozawęzłowego</b>
cN3a	Przerzuty w węzłach chłonnych większe niż 6 cm w największym wymiarze; <b>bez nacieku pozawęzłowego</b>
cN3b	Przerzuty do jednego lub licznych węzłów chłonnych <b>z naciekiem pozatorebkowym</b>
* Obecność zajęcia skóry lub tkanek miękkich z głębokim uwięzieniem do leżącego pod spodem mięśnia lub sąsiednich struktur lub wystąpienie klinicznych objawów zajęcia nerwów kwalifikowane są jako cechy świadczące o klinicznym nacieku pozawęzłowym	

pN - Regionalne węzły chłonne - ocena histopatologiczna	
pNx	Regionalne węzły chłonne nie mogą być oceniane
pN0	Brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
pN1	Przerzuty w jednym węźle chłonnym po stronie guza, o wymiarze 3 cm lub mniejszym w największym wymiarze; <b>bez nacieku pozawęzłowego</b>
pN2a	Przerzuty w jednym węźle chłonnym po stronie guza, <b>o wymiarze 3cm lub mniejszym z naciekiem pozawęzłowym lub</b> większym niż 3 cm , ale mniejszym niż 6 cm w największym wymiarze, <b>ale bez nacieku pozawęzłowego</b>
pN2b	Przerzuty w licznych węzłach chłonnych po stronie guza, o wymiarze nie większym niż 6 cm w największym wymiarze; <b>bez nacieku pozawęzłowego</b>

pN2c	Przerzuty w węzłach chłonnych obustronne lub po stronie przeciwnej do guza, o wymiarze nie większym niż 6 cm w największym wymiarze; <b>bez nacieku pozawęzłowego</b>
pN3a	Przerzuty w węzłach chłonnych większe niż 6 cm w największym wymiarze; <b>bez nacieku pozawęzłowego</b>
pN3b	Przerzuty do węzła chłonnego <b>większego niż 3 cm w największym wymiarze z pozawęzłowym naciekiem lub do wielu węzłów chłonnych po stronie zmiany lub do jakiegokolwiek węzła chłonnego po stronie przeciwnej lub obustronnie z naciekiem pozawęzłowym</b>
M - Przerzuty odległe	
M0	Brak przerzutów odległych
M1	Przerzuty odległe

**Tab. 4.** Stopnie zaawansowania klinicznego i patologicznego wg 8. edycji klasyfikacji TNM (2017)

**Tab. 4.** *Clinical and pathological stages according to the 8th edition of the TNM classification (2017)*

Stadium	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

Stopień zróżnicowania histopatologicznego ( ang. *grading*) wskazuje na szybkość wzrostu i rozprzestrzenianie nowotworu, a także na przebieg choroby oraz podatność na leczenie. Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej należy najczęściej do wysoko lub średnio zróżnicowanych (stopnie G1 i G2). Charakteryzuje się powolną progresją miejscową i przerzutami najczęściej do regionalnych węzłów chłonnych. Przerzuty odległe występują względnie rzadko (10-20%). Rozwój choroby następuje na podłożu stanu przedrakowego, w wyniku metaplastji płaskonabłonkowej nabłonka wielowarstwowego płaskiego jamy ustnej. Najbardziej popularne stany przedrakowe jamy ustnej to leukoplakia, erytroplakia i liszaj płaski [187].

Rozpoznanie raka jamy ustnej zostaje postawione w oparciu o badanie histopatologiczne materiału biologicznego uzyskanego poprzez biopsję wycinkową, pobraną z ogniska pierwotnego. Powiększone, twarde węzły chłonne szyjne są postrzegane, jako potencjalnie nowotworowe. Postępowaniem standardowym jest USG szyi z ewentualną biopsją aspiracyjną cienkoigłową węzłów chłonnych. Aby potwierdzić przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych konieczne jest badanie cytologiczne.

W leczeniu raka jamy ustnej kluczowe jest podejście wielodyscyplinarne. Głównym założeniem jest usunięcie guza w granicach zdrowych tkanek, przy zachowaniu odpowiedniej funkcji fizjologicznej narządów jamy ustnej oraz osiągnięciu akceptowalnego efektu kosmetycznego. W postępowaniu terapeutycznym lub paliatywnym istnieją trzy możliwości w przypadku raka jamy ustnej: leczenie chirurgiczne, radioterapia oraz chemioterapia. Zastosowanie poszczególnych metod, w zależności od stopnia zaawansowania raka oraz jego lokalizacji, jest pojedyncze lub w różnych kombinacjach [96]. Wpływ na wybór metody leczenia ma także stan zdrowia chorego, jego wiek, a także preferencje danego ośrodka klinicznego. We wczesnych stadiach zaawansowania klinicznego (stopień I, II; T1, T2, N0, M0) dobre wyniki daje leczenie z wykorzystaniem jednej metody [28]. Leczenie chirurgiczne jak i radioterapia śródtkankowa (brachyterapia), dają porównywalne efekty leczenia. Brachyterapia stanowi alternatywę dla leczenia chirurgicznego we wczesnych etapach rozwoju raka jamy ustnej (T1, N0) oraz raka

wargi. U chorych bez przerzutów odległych (M0), którzy kwalifikują się do leczenia chirurgicznego, resekcja z marginesem zdrowych tkanek, jest postępowaniem z wyboru. W sytuacji braku uzyskania wystarczającego marginesu zdrowych tkanek po resekcji (minimum 3 mm) zastosowanie znajduje pooperacyjna radioterapia. Celem jest resekcja guza pierwotnego z marginesem przynajmniej 5 mm zdrowej tkanki w ocenie histologicznej [63, 148]. W przypadku stopnia zróżnicowania G3 poza resekcją guza pierwotnego z marginesem zdrowych tkanek, konieczne jest wycięcie węzłów chłonnych poziomów I, II, III szyi po stronie guza. Ta sama procedura bardzo często uzupełnia resekcję guza pierwotnego o stopniu zaawansowania klinicznego T2N0 [96].

W przypadku klinicznej cechy N1, poza resekcją miejscową guza pierwotnego, wykonywana jest operacja selektywnego usunięcia układu chłonnego szyi, obejmująca w przypadku raka jamy ustnej I, II i III poziom węzłów chłonnych szyi po stronie guza pierwotnego oraz uzupełniającą radioterapię [96, 170].

W raku zaawansowanym klinicznie (stopień III, IV) stosuje się leczenie skojarzone z zastosowaniem chirurgii oraz pooperacyjnej radioterapii lub chirurgii oraz pooperacyjnej chemioterapii. W tych przypadkach istnieje o wiele wyższe ryzyko powstawania przerzutów odległych [1], a odsetek niepowodzeń miejscowych w metodzie chirurgicznej, skojarzonej z radioterapią przekracza 60%. Zabiegi chirurgiczne są wspomagane pooperacyjną chemioradioterapią w przypadku zdiagnozowania złych warunków rokowniczych w badaniu patomorfologicznym np. przy wychodzeniu raka poza torebkę węzła chłonnego.

Występowanie kliniczne cechy N2-3, niezależnie od stopnia zaawansowania klinicznego guza pierwotnego wiąże się zawsze, poza resekcją miejscową guza pierwotnego, z usunięciem wszystkich poziomów węzłów chłonnych szyi (I-V) lub operacją selektywnego usunięcia układu chłonnego szyi po stronie guza pierwotnego, w zależności od stopnia zaawansowania zmian węzłowych oraz uzupełniającą radioterapią lub chemioterapią [96, 136, 192].

Uzupełniającą radioterapię stosuje się w przypadkach zaawansowanego klinicznie raka jamy ustnej (stopień III i IV) rutynowo. Radioterapia powinna zostać przeprowadzona na zasadach napromieniania radykalnego w sytuacji

wykrycia niewystarczającego marginesu resekcji w badaniu mikroskopowym oraz jednocześnie braku możliwości ponownej resekcji. Dodatkowo wskazania do uzupełniającej radioterapii obejmują: rozproszenie raka w wielu ogniskach, niskie zróżnicowanie raka (G3), wykrycie przerzutu w usuniętych węzłach chłonnych [96].

W sytuacji wysokiego miejscowego zaawansowania raka (stopień III, IV), przy jednoczesnym nieoperacyjnym charakterze guza, zasadą postępowania jest radioterapia skojarzona z równoległą chemioterapią z zastosowaniem cisplatyny [136, 192]. Rutynowo stosowana jest radioterapia konformalna w tych przypadkach polegająca na frakcjonowaniu niekonwencjonalnym dawki, co zwiększa miejscową skuteczność leczenia. Zastosowanie w tej grupie znajduje też konwencjonalna radioterapia radykalna lub paliatywna, w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu i stanu chorego. W przypadku zaawansowanych zmian klinicznych w węzłach chłonnych przed chemioradioterapią w tej grupie, można rozważyć wstępne zastosowanie 2-3 cykli indukcyjnej chemioterapii wg schematu PF (cisplatyna, fluorouracyl) lub TPF (docetaksel, cisplatyna, fluorouracyl) [96, 108].

W przypadku rozsianego raka jamy ustnej z przerzutami odległymi (M1) lub nawrotu choroby, zostaje wdrożone postępowanie indywidualizowane w zależności od sytuacji klinicznej oraz stanu chorego, ze szczególnym uwzględnieniem stopnia sprawności. W tych przypadkach zastosowanie znajduje leczenie paliatywne, oparte na radioterapii lub chemioterapii z leczeniem objawowym. Najczęściej stosowanym schematem jest zastosowanie cisplatyny oraz fluorouracylu [96, 108].

W ostatnim czasie uzyskuje się lepszą efektywność leczenia poprzez łączenie tradycyjnych metod terapii raka z terapią biologiczną. Jest to leczenie ukierunkowane molekularnie (terapia celowana), które z zasady umożliwia sprofilowanie działań na specyficzne dla nowotworów, zaburzenia molekularne [10]. Aktualnie stosuje się cetuximab. Jest to chimeryczne przeciwciało monoklonalne klasy IgG1 wiążące się do receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), który ma dużą tendencję do zwiększonej ekspresji w nowotworach głowy i szyi. Mechanizm działania tego leku polega na internalizacji receptora EGF, co z

kolei zmniejsza jego ekspresję na powierzchni komórki nowotworowej. Uniemożliwia on regenerację komórek nowotworowych, które uległy uszkodzeniu przez chemioterapię i radioterapię, poprzez nasilenie apoptozy, wyhamowanie cyklu komórkowego. Zmniejsza także ekspresję czynników regulujących angiogenezę oraz przyczynia się do wyhamowania zarówno inwazji nowotworowej jak i powstawania przerzutów nowotworowych [13,176]. Aktualnie w Polsce lek ten jest zarejestrowany do stosowania w miejscowo zaawansowanych nowotworach głowy i szyi w skojarzeniu z radioterapią u chorych, u których występują przeciwwskazania do chemioradioterapii.

Przeżycie chorych z rakiem jamy ustnej uzależnione jest od stadium zaawansowania klinicznego, pierwotnej lokalizacji i sposobu leczenia [46, 111, 121, 123]. Pomimo postępu, jaki dokonuje się w leczeniu raka jamy ustnej, rokowania pozostają niezadawalające. 5-letnie wskaźniki przeżycia wahają się od 32,8% do 56%. W krajach rozwiniętych, w tym w Europie Zachodniej wynosi on około 50%, w krajach rozwijających się może być niższy [6, 62, 64, 101, 106, 156].

#### **1.4. Mechanizmy molekularne inicjujące rozwój raka jamy ustnej oraz rola EMT**

Sygnaly, które pośredniczą w ekspresji czynników wzrostowych są rozregulowane w raku. Jest to związane z zaburzeniami molekularnych mechanizmów wpływających na ekspresję czynników wzrostowych, przenoszących sygnaly do komórek. Zaburzenia wzrostu komórek są uwarunkowane różnymi mechanizmami, włączając jakościowe lub ilościowe zmiany w receptorach czynników wzrostowych i zaburzenia w wewnątrzkomórkowych sygnałowych szlakach, w następstwie wiązania receptorowego.

Dużą rolę w proliferacji różnych nowotworów złośliwych u ludzi odgrywa nadekspresja genu dla receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) [142]. Wysoki poziom ekspresji genu dla białka EGFR, w połączeniu z wysokim

poziomem TGF $\alpha$ , uwalnianego przez eozynofile, są odpowiedzialne za progresję raka jamy ustnej.

Stwierdzono, że efekt kontroli nad progresją nowotworową ma także receptor dla TGF $\beta$ 1. Zmniejszona ekspresja genu kodującego TGF $\beta$ 1 warunkuje niekontrolowaną proliferację w badanym nowotworze. Transformujący czynnik wzrostu TGF $\beta$ 1 jest wieloczynnikowym peptydem, który kontroluje komórkową proliferację i różnicowanie. Stymuluje on wzrost fibroblastów. TGF $\beta$ 1 jest potencjalnym inhibitorem wzrostu wielu innych komórek, w tym także nabłonkowych [175]. TGF $\beta$ 1 wraz z interleukiną 6 indukują proces przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT), między innymi poprzez wpływ na wyższą ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcyjne.

**Proces przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT)** (ryc. 1) odgrywa zasadniczą rolę w progresji raka i nabywania przez komórki wielu cech, które promują jego postęp [12, 62, 78, 124, 148]. Wydaje się, iż jest to kluczowy mechanizm, w którym komórki nowotworowe zwiększają swoją zdolność migracji oraz inwazji, poprzez zmniejszenie międzykomórkowej adhezji i nabycie bardziej ruchliwego fenotypu mezenchymalnego. Komórki nabłonkowe, pozbawione m.in. E-kadheryny, tracą wzajemną przyczepność oraz adhezję do podłoża. Stają się mezenchymalnymi komórkami macierzystymi [31, 130, 164].

Proces EMT powoduje uwolnienie się komórek spod kontroli inhibicji kontaktowej, zaburzenie kontroli podziałów komórkowych, różnicowania i apoptozy. Komórki zmieniając swój fenotyp na przypominający komórki mezenchymalne, wykazują tendencje do zwiększonej ruchliwości, inwazyjności, a tym samym do tworzenia odległych przerzutów.

Jest to proces występujący także w warunkach fizjologicznych. Jego obecność jest fundamentalną cechą prawidłowego rozwoju embrionalnego i organogenezy. Ten odmienny kontekst biologiczny oraz jego bardzo zróżnicowane konsekwencje doprowadziły do wyszczególnienia trzech podtypów procesu przemiany EMT:

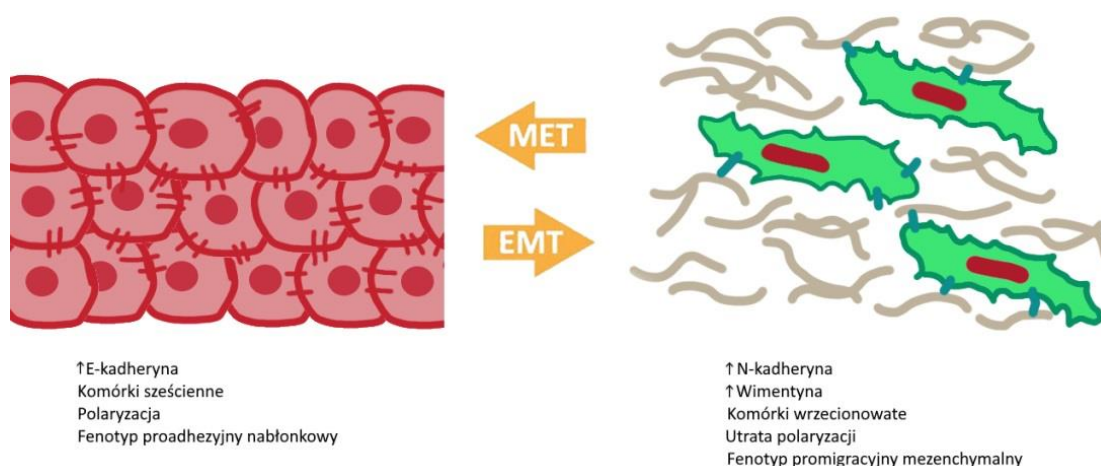
Podtyp I EMT - rozwojowy jest dobrze opisany na etapie embriogenezy. Pozwala na tworzenie warstwy mezodermy w regionach rozwijających się zarodków. Inicjuje przebieg gastrulacji prowadzący do wyodrębnienia się listków

zarodkowych (ektodermy, mezodermy oraz endodermy) z epiblastu (pierwotnej ektodermy) znajdującego się w obrębie smugi pierwotnej. Ponadto jest aktywny także w późniejszych etapach rozwojowych m. in. podczas formowania się zastawek serca, regresji przewodów Müllera u mężczyzn oraz fuzji podniebiennej.

Podtyp II EMT - zaobserwowano w procesach związanych z gojeniem oraz regeneracją tkanek, warunkuje utrzymanie homeostazy tkanek. Regulacja EMT II odbywa się za pośrednictwem cytokin prozapalnych. Brak czynników zapaleniotwórczych jest sygnałem do zatrzymania EMT oraz leży u podstaw gojenia rany. Z kolei stała aktywacja, w środowisku przewlekłego stanu zapalnego, promuje podtrzymanie EMT oraz prowadzi do procesów włóknienia tkanek i narządów oraz w konsekwencji do ich dysfunkcji.

Podtyp III EMT - w odróżnieniu od podtypu I i II, które zachodzą w prawidłowych komórkach, podtyp III jest kluczowym mechanizmem w kaskadzie związanej z progresją raka oraz nabywaniem przez jego komórki zdolności przerzutowania. Pomimo różnorodnych konsekwencji, w zależności od środowiska biologicznego oraz typu komórek, mechanizmy molekularne w każdym z podtypów EMT są bardzo podobne. Jedną z głównych cech charakterystycznych dla przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej jest utrata połączeń międzykomórkowych oraz adhezji do podłoża, co jest uwarunkowane m.in. obniżonym stężeniem E-kadheryny. W mechanizmie przemiany EMT komórka nabłonkowa ulega konwersji w kierunku fenotypu komórki mezenchymalnej, nabierając znamienych dla niej cech strukturalnych i funkcjonalnych. Sześcienne komórki o fenotypie nabłonkowym, nieruchome, ściśle do siebie przylegające i spolaryzowane, w wyniku EMT, zyskują nowe cechy. Stają się wrzecionowate oraz tracą swoją polaryzację. Przebudowie ulega cytoskielet, gdzie cytokeratynowe filamenty zostają zastąpione przez wimentynę.





**Ryc. 1.** Mechanizm procesu przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT) oraz przemiany mezenchymalno-nabłonkowej (MET)

*Fig. 1. Mechanism of epithelial-mesenchymal transformation (EMT) and mesenchymal-epithelial transformation (MET)*

Utrata połączeń międzykomórkowych jest w dużej mierze uwarunkowana zmianą ekspresji białek powierzchniowych. E-kadheryna oraz integryny, warunkujące w sąsiednich komórkach nabłonkowych wzajemne wiązania oraz wiązania z błoną podstawną, zostają zastąpione przez niestabilne integryny oraz N-kadherynę (kadherynę mezenchymalną). Następuje przełączenie w ekspresji typu kadheryn (ang. *cadherin switch*), czyli zmniejszenie się w komórkach poziomu E-kadheryny i pojawienie się N-kadheryny, białka charakterystycznego dla komórek mezenchymalnych. Koreluje to ze zmianą proadhezyjnego fenotypu komórki na mezenchymalny, promigracyjny. Transformowane, mezenchymalne komórki nabierają dużej zdolności do migracji oraz penetracji błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej. Zwiększa się ekspresja genów kodujących białka odpowiadające za fenotyp mezenchymalny, takich jak wimentyna i N-kadheryna, które mogą być uważane za markery przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej [135, 179].

W warunkach fizjologicznych, po dotarciu transformowanych komórek mezenchymalnych do tkanki docelowej, przechodzą one proces odwrotny tj. przemianę mezenchymalno-nabłonkową (MET).

Kadheryna nabłonkowa (E-kadheryna) jest jedną z ważniejszych protein, wchodzących w skład kompleksów odpowiedzialnych za adhezję komórkową. Jest białkiem przez błonowym, zdolnym do wiązania się z białkami tego samego rodzaju, co jest zależne od jonów wapnia. Spadek aktywności tego białka poprzez zablokowanie jego ekspresji w przemianie nabłonkowo- mezenchymalnej, leży u podstaw powstawania przerzutów odległych oraz złośliwego klinicznie przebiegu choroby nowotworowej. Korelacja ta została zbadana w wielu opracowaniach dotyczących raka m.in. jelita grubego, gruczołu piersiowego, płuc, pęcherza moczowego, czy prostaty [67, 70, 194].

Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna rozpoczyna się od zmniejszenia wzajemnej adhezji między komórkami nabłonkowymi oraz podścieliskiem zewnątrzkomórkowym. Kolejnym etapem jest przebudowa cytoszkieletu komórkowego. Powstają charakterystyczne wypustki blaszkowe oraz cytoplazmatyczne tj. lamellipodia oraz filopodia. Zmiany dotyczą także macierzy pozakomórkowej, która ulega proteolizie, tworząc korzystne warunki do przemieszczania się dla promigracyjnych komórek mezenchymalnych. W kontekście raka jamy ustnej, proces ten doprowadza w konsekwencji do modyfikacji i powstania nowych warunków, tworząc podścielisko nowotworu (tzw. stromatogeneza). W jego skład wchodzi głównie fibroblasty tworzące podścielisko włókniste, komórki zapalne oraz nowo powstałe naczynia krwionośne (neoangiogeneza). Komórki podścieliska oraz komórki nowotworowe pozostają ze sobą w ścisłej, wzajemnej relacji, warunkującej miejscowy, naciekający wzrost guza. Rak błony śluzowej jamy ustnej rozwija się w pierwszych stadiach w obrębie błony śluzowej. Stopniowo dochodzi następnie do rozprzestrzeniania się na głębsze struktury oraz tworzenia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych oraz przerzutów odległych. W procesie tworzenia przerzutów, który zapoczątkowuje angiogeneza, komórki nabywają nowe cechy, w tym utratę zdolności adhezji, wykształcają mechanizmy ułatwiające im przeżycie w warunkach braku adhezji, wytwarzają proteazy degradujące macierz zewnątrzkomórkową [32, 153, 169].

W preparatach histologicznych zauważalny jest, znamieny dla nowotworów o naciekającym wzroście, obraz tzw. pączkowania guza (ang. *tumor budding*).

Widoczne są grupy komórek nowotworowych, tworzone przez maksymalnie 5 komórek, które występują w podścielisku w postaci beładnie porzucanych „pączków” (ang. *buds*), które są odseparowane od gniazd nowotworowych. Obraz histologiczny charakteryzujący się wysoką intensywnością pączkowania stanowi w raku jamy ustnej ważny czynnik rokowniczy, który jest często skorelowany z przerzutami do węzłów chłonnych oraz EMT [2, 5, 11, 188].

EMT to ściśle skoordynowany i wieloetapowy proces, niezwykle istotny w trakcie rozwoju embrionalnego oraz konieczny dla utrzymania równowagi organizmu w trakcie procesów gojenia. Jest on aktualnie obiektem szerokich badań i analiz ze względu na swoją kluczową rolę w progresji i złośliwym przebiegu nowotworu. EMT wpływa na komórki zwiększając ich zdolność do migracji, zmieniając ich charakterystykę w kierunku wrzecionowatych apolarnych komórek zrębowych, opornych na chemioterapię oraz odgrywających kluczową rolę we wzroście i miejscowym nacieku nowotworu.

Pomimo licznych badań, nie wyjaśniono całkowicie mechanizmu regulacji i wpływu EMT na progresję raka jamy ustnej. Mimo, że rola EMT w kontekście procesów embriogenezy została zauważona już prawie 3 dekady temu, dopiero w ostatnim czasie zaczęto rozumieć molekularne mechanizmy tego procesu, wraz z odkryciem jego kluczowej roli w zwiększonej inwazyjności nowotworów.

### **1.5. Czynniki transkrypcyjne i kofaktory regulujące przemianę nabłonkowo-mezenchymalną (EMT)**

Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna podlega złożonej regulacji na poziomie transkrypcyjnym. Rolę regulatorów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej pełnią cytokiny i czynniki transkrypcyjne. Głównymi czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za wyhamowanie procesu ekspresji E-kadheryny, a tym samym aktywującymi przemianę EMT są EMTATFs - czynniki transkrypcyjne: rodzina palca cynkowego SNAIL (SNAIL1, SNAIL2), ZEB (ZEB1, ZEB2) oraz rodzina TWIST bHLH factors (TWIST1, TWIST2). Zwiększona ekspresja tych czynników

transkrypcyjnych oraz kofaktorów promuje progresję nowotworu i wiąże się ze złym rokowaniem klinicznym [173].

Badania wskazują na wpływ czynników transkrypcyjnych na rozwój nowotworu już w jego wczesnym etapie, poprzez wpływ na hamowanie procesów obrony przeciwnowotworowej jak apoptoza, miejscową promocję angiogenezy oraz anatagonistyczny wpływ na RB i p53 [166]. Transformacja nabłonkowo-mezenchymalna wpływa na komórki nie tylko zwiększając ich zdolność do migracji, lecz także zmienia ich charakterystykę w kierunku komórek zrębowych, opornych na chemioterapię oraz odgrywających kluczową rolę we wzroście i miejscowym nacieku nowotworu.

Wzrost poziomu czynników transkrypcyjnych w trakcie procesu EMT, poprzez hamowanie syntezy białek proapoptotycznych, między innymi hamowanie syntezy białka p53 przez SNAIL1, przyczynia się do apoptozy, wywołanej przez utratę adhezji. W wyniku tego następuje selekcja komórek zdolnych do przeżycia w warunkach braku adhezji, wykazujących się większą inwazyjnością i zdolnością do tworzenia przerzutów.

Czynniki transkrypcyjne pozostają ze sobą we wzajemnej relacji i wpływie. Mają podobny molekularny model działania w procesie aktywacji przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej. W procesie supresji genu dla E-kadheryny, SNAIL1 oraz ZEB1 inicjują spadek ekspresji *E-kadheryny*, natomiast SNAIL2 i ZEB2 utrzymują następnie jej zmniejszoną immunoreaktywność [58].

Molekularny mechanizm działania powyższych czynników transkrypcyjnych jest analogiczny. Cynkowe palce wiążą E-box regionu promotora *E-kadheryny*, *okludyny* i *klaudyny*, co w efekcie prowadzi do stłumienia ekspresji tych białek. Represja *E-kadheryny* inaktywuje połączenia adhezyjne. Zablockowanie transkrypcji genów dla okludyny i klaudyny skutkuje utratą fenotypu epitelialnego.

Rodzina czynników transkrypcyjnych **rodziny palca cynkowego SNAIL** obejmuje SNAIL1, SNAIL2 i SNAIL3, które odgrywają ewolucyjną rolę w tworzeniu mezodermy u kręgowców [131]. Należą one do rodziny czynników transkrypcyjnych palca cynkowego C2H2. Zostały po raz pierwszy zidentyfikowane podczas badań nad *Drosophila melanogaster* [131]. Są to białka składające się z 268

aminokwasów oraz pięciu regionów palca cynkowego. Geny kodujące te białka znajdują się u ludzi m. in. w łożysku, sercu, trzustce, wątrobie, nerkach, mięśniach szkieletowych. Wywierają duży wpływ na profil ekspresji genów komórek nabłonkowych. Biorą udział w regulacji EMT. Zwiększona ekspresja *SNAIL1* i *SNAIL2* obserwowana jest głównie w nowotworowych komórkach nabłonkowych. Ostatnie badania pokazują, że jest również obecna w innych typach komórek, takich jak nowotworowe fibroblasty, nowotworowe komórki mezenchymalne i makrofagi [53, 75, 159].

*SNAIL1* i *SNAIL2* poza represją genu *E-kadheryny*, wpływają dodatkowo na utratę stabilności połączeń zamykających, a także regulują ekspresję genów kodujących białka połączeń typu gap [94, 178]. Będąc swoistym inicjatorem dla EMT, przyczyniają się do zwiększonej progresji raka oraz predysponują do agresywnego przebiegu choroby oraz przerzutów [19, 28, 158].

Należy nadmienić, iż wiele innych czynników regulujących EMT, wpływa na ten proces, poprzez mechanizmy warunkujące wzrost immunoreaktywności *SNAIL1* i *SNAIL2*. Należy tu zaliczyć głównie TGF $\beta$ , Wnt, szlak regulacyjny Notch, TNF $\alpha$ , EGF, FG, Shh, SCF/c-kit, hipoksję i estrogeny.

Szlak sygnałowy Notch zwiększa ekspresję *SNAIL1* poprzez mechanizmy pośrednie i bezpośrednie [80, 124]. Poza bezpośrednią aktywacją promotora genu *SNAIL1*, szlak sygnałowy Notch stabilizuje *SNAIL1* poprzez aktywację LOX, przez HIF1 $\alpha$ . Dodatkowo sygnał zwiększenia ekspresji *SNAIL1* jest wysyłany z aktywowanego receptora kinazy tyrozynowej oraz COX2/PEG2. Proces ten jest również regulowany na poziomie translacji przez YB11 [55].

Badania wykazują dużą współzależność poszczególnych czynników transkrypcyjnych względem siebie oraz podobny wpływ na aktywację EMT. Sugerują, że zarówno *SNAIL1* jak i *SNAIL2* wpływają na regulację transformującego czynnika wzrostu TGF $\beta$ , który inicjuje EMT w komórkach nowotworowych [129].

Dodatkowo wykazana została istotna korelacja pomiędzy ekspresją genów dla wyżej wymienionych czynników transkrypcyjnych, a ekspresją genów dla metaloproteinazy 2 (MMP2) oraz metaloproteinazy 9 (MMP9). *SNAIL1* i *SNAIL2*

pełnią podobne funkcję w regulacji ekspresji genów *MMP2* oraz *MMP9* w procesie EMT [137]. SNAIL1 może zainicjować przemianę EMT przez zwiększenie ekspresji genów *MMP2* lub *MMP9*, podczas gdy SNAIL2 może odgrywać podobną rolę w utrzymaniu postępu EMT, poprzez dalszą stymulację ekspresji *MMP9*. SNAIL1 kontroluje początkową fazę przemiany EMT zarówno poprzez represję *E-kadheryny* jak i stymulację ekspresji genów kodujących MMPs, podczas gdy czynniki z grupy SNAIL2 kontrolują ekspresję *MMP9* w dalszej fazie przemiany EMT, a tym samym wpływają na utrzymanie długofalowe tego procesu.

Dobrze poznanym mechanizmem transdukcji sygnałów w EMT jest wspomniana wcześniej droga sygnalizacyjna z udziałem transformującego czynnika wzrostu beta (TGF $\beta$ ) [15, 43, 60, 118, 197]. Wpływa on na sprzeczne biologiczne procesy regulacyjne. Z jednej strony w prawidłowych komórkach nabłonkowych jest inhibitorem ich proliferacji. Z drugiej strony powszechnie znane jest zjawisko paradoksu TGF $\beta$  w komórkach nowotworowych, gdzie jest jednym z głównych promotorów kancerogenezy oraz sprzyja powstawaniu odległych ognisk przerzutowych.

Do innych dobrze poznanych cytokin, odgrywających rolę w regulacji procesu EMT, zaliczana jest interleukina 6 (IL6). TGF $\beta$  oraz IL6 indukują EMT, między innymi poprzez wzrost ekspresji czynników transkrypcyjnych. Wzrost ekspresji TGF $\beta$  i IL6 zaobserwowano w komórkach nowotworów różnego typu [162, 201].

Wiele komponent kaskady TGF $\beta$  funkcjonuje, jako supresory dla przemiany nowotworowej np. poprzez hamowanie aktywacji NF $\kappa$ B tj. plejotropowego czynnika transkrypcyjnego, odpowiedzialnego za regulację reakcji zapalnej, a w przypadku nowotworu, za promocję, wzrost, angiogenezę oraz hamowanie apoptozy [166]. W komórkach raka, TGF $\beta$  zostaje przekształcony z inhibitora w aktywator NF $\kappa$ B. Stwierdzono jego zwiększoną ekspresję w komórce raka oraz kluczową rolę w inicjacji EMT. W wielu badaniach wykazano, iż TGF $\beta$  stymuluje EMT w komórkach raka oraz zmniejsza ekspresję *E-kadheryny* i zwiększa poziom wimentyny. Zwiększa także aktywność MMPs, pozostając z nimi we wzajemnej korelacji.

SNAIL1 i SNAIL2 są krytycznymi induktorami reakcji EMT. Liczne badania ukazują korelację ich zwiększonej ekspresji w tkance nowotworowej z przerzutami do węzłów chłonnych, przerzutami odległymi i zmniejszonym czasem przeżycia [87, 95, 117, 194].

Przemiana EMT wywołana czynnikiem SNAIL1 powoduje bezpośrednią indukcję ekspresji genu dla innego czynnika transkrypcyjnego tj. **ZNF281** i tłumi jednocześnie supresorowy wpływ miR-34a/b/c. ZNF281 to proteina, która posiada 4 domeny palców cynkowych C2H2. Jej rola w kaskadzie przemiany EMT jest aktualnie obiektem wielu badań naukowych. ZNF281 jest jednym z podstawowych czynników transkrypcyjnych w embrionalnych komórkach macierzystych (ESC). Jest on kluczowym regulatorem różnicowania zarodkowych komórek macierzystych i rozwoju tkanek [52, 69, 76, 168]. Stwierdzono, że odgrywa ważną rolę w utrzymaniu i różnicowaniu komórki macierzystej osteogennej przez regulację transkrypcji genów, w tym  $\beta$ -kateniny [68, 147, 167].

ZNF281 to czynnik transkrypcyjny związany z cyklem komórkowym, który poprzez kontrolę peroksydazy glutationowej, reguluje replikację DNA, wpływa na wzrost, różnicowanie i przeżycie komórek [84, 127]. Jego rolę wykazano we wszystkich etapach rozwoju nowotworu, od kancerogenezy po tworzenie przerzutów [90, 97].

Ekspresja *ZNF281* jest indukowana przez czynnik transkrypcyjny EMT-TF SNAIL1 i hamowana przez supresorowe mikroRNA (miR-34<sup>o</sup>) guza, które pośredniczy w represji *ZNF281* przez białka p53. Ekspresja *p53* obniża poziom ZNF281 na poziomie białka i mRNA. Wobec powyższego SNAIL1, miR-34a i ZNF281 tworząc spójne **regulacyjne pętle wyprzedzające** (ang. *feed-forward regulatory loop*), które kontrolują EMT [69, 168]. Deregulacja tego układu przez epigenetyczne zmiany i mutacje osi p53 / miR-34a sprzyja progresowi nowotworu i tworzeniu przerzutów.

Badania obrazują podwyższony poziom ekspresji *ZNF281* m.in. w raku jelita grubego [85]. Jest to spowodowane bezpośrednią indukcją przez EMT oraz wiąże się z większą migracją, inwazyjnością i aktywnością  $\beta$ -kateniny.

Indukcja ekspresji *ZNF281* przez *SNAIL1* może się okazać istotnym mechanizmem w regulacyjnej kaskadzie EMT. Wykazano, że podczas obniżenia poziomu *ZNF281* przez dwie różne siRNAzy, doszło do wstrzymania indukcji reakcji EMT przez czynniki *SNAIL1* oraz nie nastąpiła utrata protein E-kadheryny z membrany zewnętrznej w komórce. Okazuje się, że *ZNF281* jest konieczne dla zapoczątkowania reakcji EMT przez czynniki *SNAIL1* i *SNAIL2* [69].

Ekspresja *ZNF281*, poprzez *Axin2*, wywołuje translokację  $\beta$ -kateniny z membrany komórkowej do jądra, co jest kolejną cechą charakterystyczną EMT. Dodatkowo *ZNF281* zwiększa ekspresję markerowych, macierzystych komórek nowotworowych CD133 oraz wpływa na sieć czynników transkrypcyjnych, regulujących multipotencjalność (*NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, and *c-MYC*) w niezróżnicowanych komórkach [203].

**Rodzina ZEB (*ZEB1* i *ZEB2/SIP1*)** to kolejna grupa czynników transkrypcyjnych regulujących przemianę EMT poprzez represję *E-kadheryny*. Obecność palców cynkowych regionu E-box *ZEB1* i *ZEB2* jest konieczna w sekwencji zapoczątkowanej przez  $TGF\beta$ , inicjującej przemianę EMT. Grupa czynników transkrypcyjnych *ZEB1* i *ZEB2* działają, jako represor, hamując ekspresję *E-kadheryny*. Ekspresja genów dla czynników *ZEB1* i *ZEB2* jest zdecydowanie zwiększona w komórkach nowotworowych CD133. Większa ekspresja tych czynników jest złym czynnikiem prognostycznym w nowotworach głowy i szyi.

Ekspresja *ZEB* jest obniżana przez grupę miR-200 microRNA. Czynniki miR-200 utrzymują status nabłonkowy komórek oraz nie dopuszczają do EMT poprzez bezpośrednią inhibicję *ZEB1* i *ZEB2*. Z drugiej strony ekspresja miR-200 jest hamowana zarówno przez *ZEB* jak i *SNAIL1* i *SNAIL2*. Tworzy to podwójny krąg, który utrzymuje komórki w nabłonkowym lub mezenchymalnym stanie [44]. Istnieją doniesienia na temat hamowania ekspresji czynników transkrypcyjnych z rodziny *ZEB* przez mediatory sygnalizacyjne Notch.

Szlak sygnałowy Notch ma istotne znaczenie dla rozwoju i utrzymania homeostazy tkanek [79, 124, 133, 200]. Odpowiada on za regulację procesów związanych z nabywaniem określonego fenotypu podczas różnicowania komórek



oraz kontrolę przeżywalności i interakcji międzykomórkowych. Ścieżka Notch dostarcza sygnału proliferacyjnego w embrionalnych komórkach macierzystych (ESC ang. *embryonic stem cells*) oraz w ich złośliwych odpowiednikach (EC ang. *embryonal carcinoma*), a także odgrywa istotną rolę w utrzymaniu nieodróżnicowanych komórek ESC i EC. Szlak sygnałowy Notch może podlegać supresji w komórkach nowotworowych w wyniku indukcji przez czynnik transkrypcyjny, należący do rodziny ZEB podczas przemiany EMT. Proces ten jest dodatkowo stymulowany przez m.in.: TGF $\beta$ , hipoksję oraz cytokiny przeciwzapalne. Zrozumienie tych procesów powinno być celem molekularnym dla terapii przeciwnowotworowych, nastawionych na selektywną eliminację komórek macierzystych nowotworu, które wykazują dużą oporność na stosowane chemioterapeutyki.

Ostatnie badania wskazują na dużą oporność i przeżycie CSCs (KMN komórek macierzystych nowotworu), które są odpowiedzialne za radiooporność oraz progres i wznowę choroby nowotworowej. CD133 to hematopoetyczna komórka macierzysta i śródbłonkowy marker progenitorowy, który jest zaangażowany w angiogenezę. Jego ekspresja jest prognostykiem w przebiegu agresywnego raka. Ważne jest zrozumienie biologii tych komórek oraz rozwój terapeutycznych strategii skierowanych przeciwko komórkom nowotworowym CD133 [36, 71, 91, 161, 205].

CD133, CD24 i CD44 to markery macierzystych komórek nowotworowych, białkowe proteiny na powierzchni komórek. Są związane z agresywnymi rodzajami raka i złą prognozą. Komórki te są bardziej odporne na chemioterapeutyki i wykazują znikomą radioczułość [29, 165]. Proces przemiany EMT, który indukowany jest przez zwiększoną ekspresję czynników transkrypcyjnych, prowadzi do zwiększonej ekspresji CD133/CD44 w macierzystych komórkach nowotworowych.

**Białko bHLH (basic helix-loop-helix) - TWIST1** to kolejny czynnik transkrypcyjny o podobnym molekularnym podłożu działania w procesie regulacji EMT. Jego najsilniejsza ekspresja zachodzi w łożysku. Uważa się, że TWIST1 odpowiada za regulację osteogenezy. Mutacja *TWIST1* warunkuje, że ów czynnik staje się onkogenem. Wykazano jego ekspresję w: raku piersi, zespole Sezarego,

chłoniakach, rakach płaskonabłonkowych nosogardzieli, przewodu pokarmowego, czerniakach, nowotworach prostaty i wątroby, kostniakomięsakach [204].

TWIST1 podwyższa poziom N-kadheryny oraz zwrótnie hamuje ekspresję *E-kadheryny*, co indukuje EMT. Jest odpowiedzialny za zwiększony poziom angiogenezy, oporność na leki i blokadę ekspresji p53. Regulacja ekspresji *TWIST1* zależy od innych czynników transkrypcyjnych oraz posttranskrypcyjnych modulacji. Represja genu *E-kadheryny* przez TWIST1 następuje poprzez przyłączenie do promotora oraz także pośrednio przez indukcję ekspresji *SNAIL1* i *SNAIL2*.

Bezpośrednia represja genu *E-kadheryny* regulowana przez TWIST1 wiąże się z zaangażowaniem innych czynników transkrypcyjnych oraz kofaktorów. Ekspresja genu dla czynnika TWIST1 jest regulowana w procesie EMT podczas rozwoju embrionalnego, stanów zapalnych oraz choroby nowotworowej przez: TGFβ, szlak regulacyjny Wnt, hipoksję, aktywację receptora kinazy tyrozynowej oraz inne cytokiny przeciwzapalne. Zwiększona ekspresja *TWIST1* w warunkach hipoksji ma znaczący wpływ na progresję nowotworu oraz angiogenezę w tkance nowotworowej. TWIST1 został wykryty w wielu komórkach raka, jako represor genu dla *E-kadheryny* oraz jeden z kluczowych czynników inicjujących EMT. Opisano także jego rolę w inhibicji procesu apoptozy [74, 88].

**Rodzina czynników transkrypcyjnych kodowanych przez kasetę homeo (homeobox) - SIX1** to grupa czynników transkrypcyjnych aktywująca proces przemiany EMT w oparciu o odmienny molekularny mechanizm działania. W przeciwieństwie do pozostałych czynników transkrypcyjnych, nie wpływa na obniżenie ekspresji *E-kadheryny*. SIX1 odgrywa istotną rolę w agresywnym przebiegu nowotworu oraz tworzeniu przerzutów. Indukuje EMT w sposób pośredni poprzez aktywację ZEB1 [96]. Wpływa na wzrost angiogenezy oraz przerzuty do węzłów chłonnych w raku piersi [83].

Białkowa homeodomena SIX1 podlega również regulacji przez TGFβ, który ją aktywuje. Z kolei negatywna regulacja jej ekspresji za pośrednictwem miR-30b została opisana jak potencjalny cel terapeutyczny w raku jelita grubego oraz prostaty [202].

Wzmożona miejscowa ekspresja genów dla badanych czynników transkrypcyjnych, regulujących przemianę nabłonkowo-mezenchymalną (EMT-ATFS): SNAIL1, SNAIL2 i ZNF281 jest uważana za ważny czynnik prognostyczny. W kontekście ich stale rosnącego, różnorodnego wpływu na przebieg choroby nowotworowej, uważa się je nie tylko za istotne diagnostycznie i prognostycznie markery, lecz także za potencjalny cel w badaniach nad wdrożeniem nowych środków terapeutycznych.

## 2. CEL PRACY

Głównym celem pracy była analiza immunohistochemiczna oraz molekularna czynników transkrypcyjnych - *SNAIL1*, *SNAIL2* i *ZNF281*.

Cele szczegółowe:

1. Ocena ekspresji genów: *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZNF281* w raku jamy ustnej.
2. Wykazanie związku pomiędzy poziomem ekspresji genów kodujących badane czynniki transkrypcyjne, a progresją raka jamy ustnej.
3. Korelacja poziomu ekspresji genów: *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZNF281* z czasem przeżycia, w celu określenia znaczenia rokowniczego.
4. Określenie znaczenia prognostycznego amplifikacji genów dla badanych czynników transkrypcyjnych.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Grupa badana

Badaniem retrospektywnym objęto grupę 82 chorych leczonych z powodu raka jamy ustnej na Oddziale Chirurgii Szcękowo-Twarzowej UCK w Gdańsku. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym [NKBBN/373-705/2019].

Badanych chorych poinformowano o założeniach i rodzaju badań. Pacjenci pisemnie wyrazili zgodę na wykorzystanie pobranego materiału pooperacyjnego do przeprowadzenia badań histologicznych oraz molekularnych. Średnia wieku chorych w momencie zabiegu operacyjnego wynosiła 64 lata. Do oceny pTNM i stopnia zaawansowania klinicznego wykorzystano 7 edycję klasyfikacji TNM Światowej Organizacji Zdrowia.

Zabiegi zostały przeprowadzone w znieczuleniu ogólnym lub miejscowym w zależności od zakresu. Polegały na pobraniu wycinka lub całkowitym usunięciu ogniska pierwotnego raka jamy ustnej wraz z marginesem zdrowych tkanek. W badaniu wykorzystano preparaty zarchiwizowane w Zakładzie Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik: prof. dr hab. Wojciech Biernat). Z badań wykluczono pacjentów z niekompletną dokumentacją medyczną. Przeprowadzono badanie 21 wycinków raka języka, 30 wycinków raka dna jamy ustnej, 3 wycinków raka podniebienia, 6 wycinków raka wyrostka zębodołowego szczęki, 8 wycinków raka wyrostka zębodołowego żuchwy, 14 wycinków raka policzka). O zakwalifikowaniu zdecydował wynik przeprowadzonego badania histopatologicznego.

Materiał tkankowy był rutynowo utrwalany w 10% zbuforowanej formalinie (4% roztwór wodny aldehydu mrówkowego pH 7,2, utrwalanie do 48 godz. (max. 72 godz.)). Następnie wycinki zatapiano w niskotopliwej parafinie, uzyskując w ten sposób pierwotne bloki parafinowe. Zabezpieczone w ten sposób tkanki,

przechowywano w temperaturze pokojowej, do momentu przygotowania mikromacierzy tkankowej (TMA).

Proces przygotowania TMA (ang. *tissue microarray*) polegał na wycięciu z pierwotnych bloków parafinowych (donorów) za pomocą igieł mikrotomu kilkumilimetrowych cylindrów, które następnie zostały przeniesione do wtórnego bloku parafinowego (akceptora). Procedura była przeprowadzana pod kontrolą mikroskopu świetlnego (barwienie hematoksyliną-eozyną). Z każdego bloczka wycięto po dwa rdzenie o średnicy 0,4 mm. Blok akceptorowy składał się z fragmentów tkanek pochodzących od różnych pacjentów. W porównaniu z oceną IHC na całych skrawkach, w technice TMA mamy do czynienia z ujednoczeniem warunków wykonywania odczynów, niskim kosztem, możliwością zbadania wielu tkanek w krótszym czasie oraz niskim zużyciem tkanki. Z drugiej strony mamy często do czynienia ze zmniejszeniem reprezentatywności próby, co może być źródłem błędów, wynikających z heterogenności guzów względem różnych antygenów i markerów molekularnych.

W badanym materiale tkankowym, utrwalonym i zatopionym w bloczki parafinowe, była oceniana ekspresja genów: *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZNF281* na poziomie białka (badanie immunohistochemiczne) oraz na poziomie mRNA (badanie molekularne). Otrzymane wyniki zostały następnie skorelowane z danymi kliniczno-patologicznymi oraz poddane analizie statystycznej.

Grupą kontrolną były wycinki zdrowej błony śluzowej pobrane u chorych (niezależnie od wieku i płci) w czasie zabiegów: dłutowania całkowicie zatrzymanego trzeciego zęba trzonowego dolnego lub górnego oraz zabiegu frenulektomii. Pacjenci z grupy kontrolnej byli zdrowi, nieobciążeni chorobami przewlekłymi, nieprzyjmujący przewlekle żadnych leków, antybiotyków, leków przeciwzapalnych. Badanie zostało przeprowadzone z zachowaniem pełnej anonimowości chorych.

Grupa kontrolna w analizie molekularnej liczyła 24 wycinki zdrowej błony śluzowej jamy ustnej.

W przypadku analizy immunohistochemicznej wykorzystano 9 wycinków zdrowej błony śluzowej jamy ustnej.

Badania histopatologiczne oraz immunohistochemiczne były przeprowadzane w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii GUMed (kierownik: prof. dr hab. Wojciech Biernat), natomiast badania molekularne wykonywano w Zakładzie Medycyny Molekularnej GUMed (kierownik: prof. dr hab. Tadeusz Paweńczyk).

### 3.2. Badanie immunohistochemiczne mikromacierzy tkankowych (IHC-TMA)

W badaniu immunohistochemicznym była oznaczana ekspresja czynników transkrypcyjnych na poziomie białka (SNAIL1, SNAIL2, ZNF281) w nabłonku raka płaskonabłonkowego błony śluzowej jamy ustnej u 82 pacjentów z kompletnym, zweryfikowanym histopatologicznie materiałem tkankowym, a także znanym przebiegiem klinicznym choroby (21 wycinków raka języka, 30 wycinków raka dna jamy ustnej, 3 wycinki raka podniebienia, 6 raka wyrostka zębodołowego szczęki, 8 wycinków raka wyrostka zębodołowego żuchwy, 14 wycinków raka policzka). Grupę kontrolną stanowiło 9 wycinków zdrowej błony śluzowej jamy ustnej.

Dla ujawnienia ekspresji genów: *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZNF281* na poziomie białka w preparatach tkankowych raka błony śluzowej jamy ustnej oraz zdrowej błony śluzowej stosowano następującą procedurę badań immunohistochemicznych.

Pobrane w czasie operacji fragmenty tkanki były utrwalane w zbuforowanej 4% formalinie i po rutynowej procedurze zatapiane w niskotopliwej parafinie. Bloki parafinowe były podstawą do utworzenia mikromacierzy tkankowych (TMA- tissue microarray). Nakłucia były wykonywane przy użyciu urządzenia Manual Tissue Arrayer MTA 1 (Beecher Instruments Inc, Sun Prairie, USA). Biopaty umieszczano w beztkankowych blokach parafinowych wtórnych - tzw. „biorcach”. Bloki parafinowe wtórne były cięte na skrawki grubości 4  $\mu\text{m}$  na mikrotomie SM 2000 Leica. Skrawki tkankowe mikromacierzy o grubości 4  $\mu\text{m}$  umieszczano na szkiełkach „Superfrost PLUS”, a następnie inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37  $^{\circ}\text{C}$ . Tak przygotowane preparaty przechowywano w lodówce w temp. 7 $^{\circ}\text{C}$  do momentu wykonania barwienia.

Utrwalenie tkanek w formalinie zmienia konformację białek oraz modyfikacje epitopów, co blokuje do nich dostęp dla swoistych przeciwciał. Konieczne jest zatem odsłonięcie epitopów, aby przywrócić białku właściwą konformację. Jedną z metod jest inkubacja tkanek w wysokiej temperaturze (ang. *HIER*, *heat induced epitope retrieval*).



**Barwienie immunohistochemiczne:**

1. Odslonięcie epitopów było wykonywane metodą HIER (metoda wysokotemperaturowego odsłaniania epitopów - PTLINK firmy Dako).
2. Chłodzenie TMA w temperaturze pokojowej przez 20-30 minut.
3. Umieszczenie TMA w tzw. komorze wilgotnej do immunohistochemii, składającej się z plastikowego stelażu z umieszczoną na dnie ligniną.
4. Wypłukiwanie w roztworze buforu fosforanowego (PBS, phosphate buffered saline) przez 3 minuty.
5. Dla zablokowania endogennej peroksydazy skrawki inkubowano w 3% roztworze nadtlenku wodoru przez 5 min.

W kolejnym etapie była stosowana inkubacja z następującymi przeciwciałami pierwotnymi:

- **pAb anti-SNAI1A Antibody NBP-119529 Novus Biological** odsłanianie bufor kwaśny (pH-6) inkubacja 60 min rozcieńczenie 1:100,
- **anti-Slug(1A6) (SNAI2) Antibody NBP2-03886 Novus Biological** odsłanianie bufor kwaśny (pH-6) inkubacja 1h rozcieńczenie 1:200,
- **ZNF281 - Sigma HPA051228** odsłanianie bufor zasadowy (pH-9) inkubacja 1h rozcieńczenie 1:200.

W procedurze ręcznego barwienia był stosowany system do wizualizacji firmy Dako EnVision Flex/HRP

1. Barwny produkt był uzyskiwany, inkubując skrawki z roztworem czterochlorku 3,3' dwuaminobenzydyny (DAB, firma DAKO) przez 5-8 minut w temperaturze pokojowej, po czym następowało przepłukiwanie pod bieżącą wodą.
2. W końcowym etapie wizualizacji, tkanki były podbarwiane hematoksyliną przez 5-8 minut.
3. Odwadniano w szeregu stężeń alkoholu (70%, 80%, 96%, 100%), a następnie prześwietlano w ksylenie przez 3 minuty oraz preparaty zamykano z balsamem kanadyjskim pod szkiełkiem nakrywkowym.

W każdym przypadku stosowano kontrolę ujemną, przeprowadzając procedurę barwienia bez przeciwciał pierwotnych. Kontrolą dodatnią dla SNAIL1 było jelito grube, dla SNAIL2 jelito grube, dla ZNF281 nerka.

### **Ocena odczynów immunohistochemicznych:**

Preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym. Dla każdego skrawka oceniano intensywność oraz proporcje wybarwienia nabłonka w całym preparacie pod różnymi powiększeniami. Dla oceny intensywności odczynu stosowano skalę trójstopniową: 1 (słaby), 2 (średni), 3 (silny). Reakcja wybarwiania była oceniana pół ilościowo za pomocą metody H-score. Wynik ten uwzględnia zarówno intensywność jak i procentowość wybarwionych komórek w każdej z intensywności. Wynik H-score został obliczony w następujący sposób:

- $H\text{-score} = P1 \times 1 + P2 \times 2 + P3 \times 3$
- P0 - % komórek bez wybarwienia,
- P1 - % komórek wybarwionych z intensywnością 1,
- P2 - % komórek wybarwionych z intensywnością 2,
- P3 - % komórek wybarwionych z intensywnością 3.

### **Intensywność wybarwienia:**

- 0 bez wybarwienia,
- 1 słabe wybarwienie,
- 2 umiarkowane wybarwienie,
- 3 silne wybarwienie.

W rezultacie otrzymywano wynik w zakresie 0 - 300. 300 oznaczało, iż 100% komórek guza było silnie wybarwionych.

### **Odczynniki:**

1. Parafina niskotemperaturowa 52-54°C, POCH, Polska.
2. Szkiełka podstawowe SuperFrost® Plus, Mar-four, Polska.
3. Szkiełka nakrywkowe, POCH, Polska.
4. PBS, POCH, Polska.
5. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, POCH, Polska.

6. Etanol 100%, POCH, Polska.
7. Etanol 96%, POCH, Polska.
8. Etanol 80% POCH, Polska.
9. Etanol 70% POCH, Polska.
10. Ksylen, POCH, Polska.
11. Balsam kanadyjski, POCH, Polska.
12. Hematoksylina, POCH, Polska.
13. Czterochlorek 3,3'-dwuaminobenzydyny (DAB), DAKO.
14. Dania EnVision Flex Target Retrieval Solution, DAKO, Dania.
15. EnVision Flex HRP, DAKO, Dania.

**Przeciwciała pierwotne:**

- pAb anti-SNAIL1A Antibody NBP-119529 Novus Biological,
- anti-Slug(1A6) (SNAIL2) Antibody NBP2-03886 Novus Biological,
- ZNF281 - Sigma HPA051228.

**Aparatura:**

1. Mikroskop Olympus CX40, Japonia.
2. Mikrotom SM 2000R Leica, Niemcy.
3. Ciepłarka wodno-elektryczna CEE-2a Elkon, Polsk
4. PTLINK Pre-Treatment Module for Tissue Specimens DAKO, Dania.

**3.3. Metoda badań molekularnych**

Badanie RT-qPCR (ang. *reverse transcription - quantitative PCR*) w czasie rzeczywistym na materiale parafinowym, utrwalonym w formalinie (FFPE).

Analiza molekularna obejmowała ocenę ilościową transkryptów dla genów: *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZNF281*. Ocena ilościowa wybranych transkryptów była przeprowadzana metodą RT-qPCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem uniwersalnych sond (Universal Probe) typu TaqMan firmy Roche z jednoczesną amplifikacją transkryptu referencyjnego-  $\beta$ -aktyny.

W technice RT-qPCR w czasie rzeczywistym porównywane są cykle progowe (Ct, ang. *threshold cycles*) pomiędzy transkryptem badanym, a referencyjnym. Dzięki analizie wartości Ct, wyznaczona zostaje określona względna ilość transkryptu genu badanego, w stosunku do transkryptu genu referencyjnego. Zmiany w stężeniu produktów reakcji PCR i uzyskiwane wartości Ct są obserwowane dzięki pomiarom fluorescencji proporcjonalnej do ilości powielanej sekwencji.

Matrycą do RT-qPCR w czasie rzeczywistym był całkowity RNA wyizolowany z fragmentów tkanek kontrolnych i nowotworowych utrwalonych w 4% zbuforowanej formalinie, zatopionych w parafinie (FFPE - ang. *formalin-fixed, parafin-embedded*).

Badanie było przeprowadzane na 82 preparatach utrwalonych w formalinie i zatopionych w bloczki parafinowe. Grupę kontrolną stanowiło 24 fragmentów zdrowej błony śluzowej. Tab. 5 przedstawia odczynniki, które wykorzystano w reakcji Rt-qPCR.

**Tab. 5.** *Odczynniki wykorzystane w reakcji RT-qPCR*

**Tab. 5.** *Reagents used in RT-qPCR*

<b>Producent</b>	<b>Odczynnik</b>
<b>Roche</b>	Sondy typu Taq Man Uniwersal Probe Library Probe Universal ProbeLibrary Reference Gene Assays: Human ACTB Gene Assay, LightCycler płytki 96 dołkowe
<b>A&amp;A Biotechnology</b>	TranScriba One step qPCR
<b>Oligo.pl</b>	Primery użyte w reakcjach PCR specyficzne dla transkryptów genów: <i>SNAIL1</i> , <i>SNAIL2</i> , <i>ZNF281</i>

### **Izolacja RNA z tkanek utrwalonych w parafinie (FFPE, ang. *formalin-fixed, paraffin-embedded*)**

Izolacja całkowitego RNA ze skrawków FFPE była przeprowadzana z użyciem komercyjnego zestawu - RNeasy FFPE Mini Kit firmy QIAGEN N.V., zgodnie z instrukcją producenta.

Materiał do izolacji stanowiły świeżo pocięte fragmenty bloczków parafinowych o grubości 5  $\mu\text{m}$ , w ilości 8-10 fragmentów. Pierwszym etapem było usunięcie z próbek parafiny przy użyciu buforu do deparafinizacji w ilości 320  $\mu\text{l}$ . Mieszaninę worteksowano 10 sekund i po krótkim wirowaniu inkubowano 3 minuty w 56 °C. Następnie próbkę schładzano do temperatury pokojowej oraz dodawano 240  $\mu\text{l}$  buforu PKD. Po przeprowadzeniu worteksowania i wirowania przez 1 minutę przy 11000 x g, w kolejnym etapie dodawano 10  $\mu\text{l}$  proteiny K i po delikatnym przepipetowaniu, inkubowano przez 15 minut w 56 °C, a następnie przez 15 minut w 80 °C. Dolną, przezroczystą fazę przenoszono następnie do nowej 2 ml próbówki oraz inkubowano w lodzie przez 3 minuty i poddano wirowaniu przez 15 minut (20000 x g). Uzyskany supernatant przenoszono do nowej próbówki tak, aby nie naruszyć pelletki oraz dodawano dezoksyrybonukleazę. Po 15 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej, dodawano 500  $\mu\text{l}$  buforu RBC, a następnie 1200  $\mu\text{l}$  98% etanolu i mieszano przez pipetowanie. Tak przygotowaną mieszaninę, наносzono na kolumnkę RNeasy Minelute spin i wirowano 15 sekund, przy obrotach powyżej 8000 x g. Następnie kolumnę przemywano dwukrotnie 500  $\mu\text{l}$  buforu RPE. Oczyszczone całkowite RNA wymywano z kolumny dodając 20  $\mu\text{l}$  wody wolnej od RNaz. Wyizolowany całkowity RNA był przechowywany w temp. - 20 °C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz.

### **Względna ocena stężenia wyizolowanego całkowitego mRNA**

Po przeprowadzeniu izolacji całkowitego RNA z tkanek FFPE, stężenie wyizolowanego RNA oznaczano fluorymetrycznie z wykorzystaniem zestawu Quant-iT zgodnie z protokołem producenta i fluorymetru Qubit firmy Invitrogen.

### Reakcja RT-qPCR w czasie rzeczywistym

Poziom mRNA dla genu danego czynnika transkrypcyjnego określano w odniesieniu do poziomu transkryptu genu referencyjnego  $\beta$ -aktyny (ACTB), podczas reakcji RT-qPCR w czasie rzeczywistym (tab. 6), z wykorzystaniem sond typu TaqMan. Reakcję RT-qPCR przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu TranScriba One step qPCR (firma A&A Biotechnology) oraz sond Universal ProbeLibrary Probe for Human (Roche) w aparacie LightCycler 480 II (Roche) i specyficznych primerów dla transkryptów badanych i referencyjnych (tab. 7).

Względny poziom ekspresji genu danego czynnika transkrypcyjnego przedstawiano jako znormalizowany stosunek poziomu ekspresji badanego transkryptu do transkryptu genu referencyjnego.

**Tab. 6.** Warunki przeprowadzanej reakcji RT-qPCR

*Tab. 6. Conditions for RT-qPCR*

	<b>Etap</b>	<b>Ilość cykli</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Czas</b>
<b>Odwrotna traskrypcja</b>	1	1	48°C	10 minut
<b>Denaturacja</b>	2	1	95°C	10 minut
<b>Amplifikacja</b>	3	45	95°C 60°C	15 sekund 45 sekund

**Tab. 7.** Sekwencja Starterów i numery sond wykorzystanych w reakcjach RT-qPCR*Tab. 7. Primer sequence and probe numbers used in RT-qPCR reactions*

<b>Transkrypt danego genu</b>	<b>ba-</b>	<b>Nazwa</b>	<b>Sekwencja</b>	<b>Gen referencyjny</b>
<b>SNAIL1</b> <b>NM_0059085.3</b>		Sonda	Uniwersal Probe Library Probe	<i>ACTB</i>
		5' starter	#11	
		3' starter	5' -tacagcgagctgcaggact-3' 3' -atctccggaggtgggatg-5'	
<b>SNAIL2</b> <b>NM_003068.4</b>		Sonda	Uniwersal Probe Library Probe	<i>ACTB</i>
		5' starter	#7	
		3' starter	5' -tggttgcttcaaggacacat-3' 3' -gcaaatgctctgttcagtg-5'	
<b>ZNF281</b> <b>NM_012482.4</b> <b>NM_001281293.1</b> <b>NM_001281294.1</b>		Sonda	Uniwersal Probe Library Probe	<i>ACTB</i>
		5' starter	#70	
		3' starter	5' -ggagaggacggcggttttt-3' 3' -tttccataccccggaggag-5'	

### 3.4. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna była przeprowadzana za pomocą środowiska statystycznego R (wersja 3.5.1) [99]. Zgodność zmiennych z rozkładem normalnym sprawdzana była testem Shapiro-Wilka. Powiązanie zmiennych ilościowych było analizowane za pomocą korelacji Pearson'a lub testu tau Kendall'a, w zależności od rozkładu. Porównanie zmiennych ilościowych pomiędzy dwiema grupami przeprowadzane było testem t studenta lub testem Mann'a-Whitney'a, w zależności od rozkładu; natomiast porównanie pomiędzy trzema i więcej grupami - za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji lub testu Kruskal'a-Wallis'a, w zależności od rozkładu. Powiązanie częstości w zmiennych kategoriowych analizowane było za pomocą testu Chi-kwadrat lub testu Fishar'a, w zależności od liczebności podgrup.

Zgodność pomiędzy ocenami w zakresie zmiennych kategoriycznych oceniana była testem kappa Cohen'a, zaś w zakresie zmiennych ilościowych za pomocą współczynnika korelacji wewnątrzklasowej. Analiza przeżycia przeprowadzana była za pomocą modeli proporcjonalnego hazardu Cox'a.

Rozkład częstości zmiennych kategoriycznych obrazowano za pomocą wykresów kołowych, zaś rozkład zmiennych ilościowych za pomocą histogramów. Porównanie zmiennych ilościowych pomiędzy grupami obrazowano za pomocą wykresów pudełko-wąsy Tukey'a. Korelacje zmiennych ilościowych były przedstawiane przy użyciu wykresów punktowych. Analiza przeżycia była obrazowana za pomocą krzywych Kaplana-Meyera.



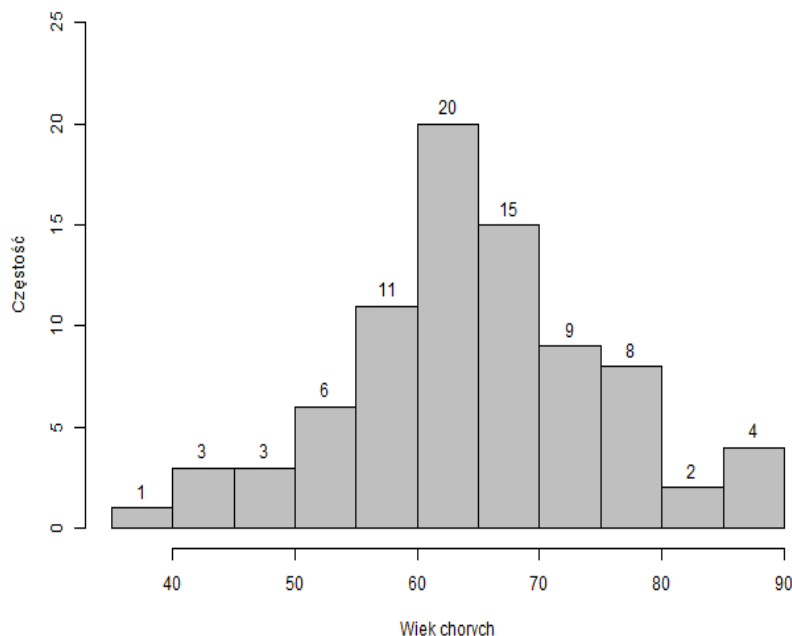
## 4. WYNIKI

### 4.1. Opis grupy pod względem kliniczno-patologicznym

Badaniem objęto grupę 82 chorych z rozpoznaniem raka jamy ustnej, leczonych i operowanych na Oddziale Chirurgii Szczękowo-Twarzowe UCK w Gdańsku. Materiałem do badań zostały wycinki błony śluzowej pobrane podczas zabiegów u chorych z rakiem jamy ustnej, leczonych w Oddziale Chirurgii Szczękowo-Twarzowej UCK w Gdańsku.

Badaną grupę stanowiło 25 kobiet (30,5%) i 57 mężczyzn (69,5%).

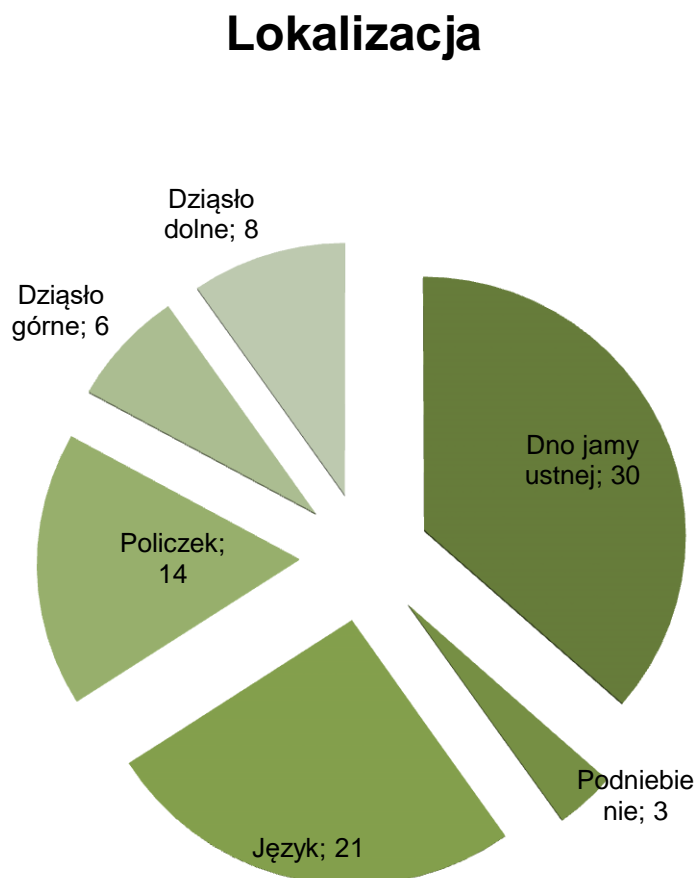
Rozkład wieku chorych w badanej grupie (ryc. 2) miał charakter normalny ( $p=0,3593$ ). Mediana wieku zachorowania wyniosła 64 lata. Najmłodsza chory miał 37 a najstarszy 90 lat. Najczęściej do zachorowania dochodziło w przedziale 60-72 lata (44 zachorowania, co stanowiło 53,7% ogółu).



**Ryc. 2.** Struktura wieku chorych

*Fig. 2.* Age structure of patients

Lokalizacja raka jamy ustnej była następująca: język - 21 przypadków, dno jamy ustnej - 30 przypadków, podniebienie - 3 przypadków, wyrostek zębodołowy szczęki - 6 przypadków, wyrostek zębodołowy żuchwy - 8 przypadków, policzek - 14 przypadków (ryc. 3).



**Ryc. 3.** Struktura lokalizacji występowania raka jamy ustnej w badanej grupie

**Fig. 3.** *The structure of the location of the occurrence of oral cancers in the studied group*

Zależność między wiekiem pacjentów a pierwotną lokalizacją guza, Zebrano w tab. 8.

**Tab. 8.** Wiek chorych z rakiem jamy ustnej z uwzględnieniem pierwotnej lokalizacji guza

*Tab. 8. Age of patients with oral carcinomas including primary tumor location*

Wiek	Dno jamy ustnej	Podniebienie	Język	Policzek	Dziąsło górne	Dziąsło dolne	Łącznie	
							n	%
≤40	0	0	0	0	1	0	1	1,2
41-50	2	0	0	2	0	2	6	7,3
51-60	9	0	5	2	0	1	17	20,7%
61-70	12	2	14	4	2	1	35	42,7%
>70	7	1	2	6	3	4	23	28,0%
<b>Razem</b>	30	3	21	14	6	8	82	100,0%

Cechy kliniczne i patologiczne analizowanej grupy chorych z uwzględnieniem podziału ze względu na płeć, pozostawały w zgodności z tab. 9.

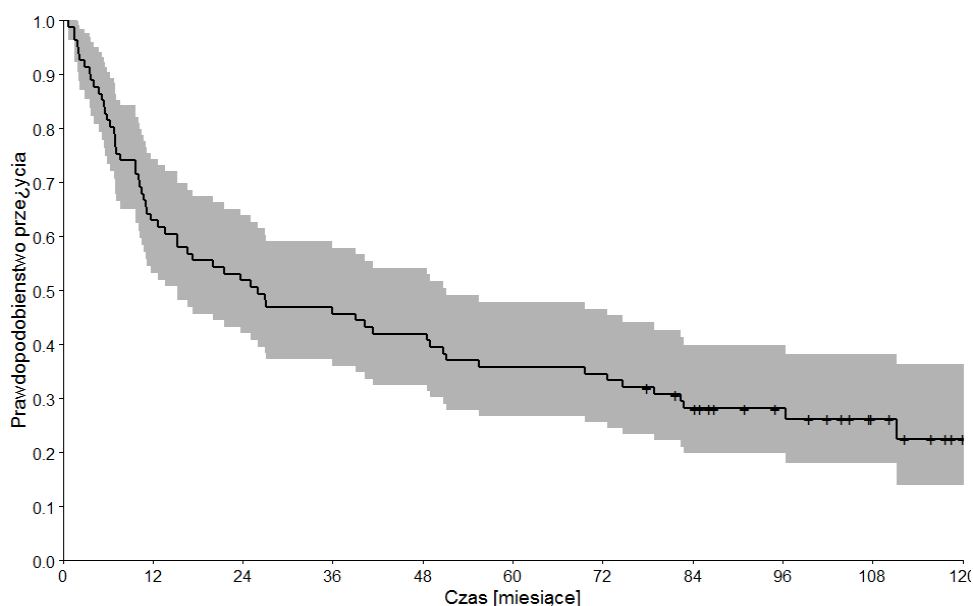
**Tab. 9.** Cechy kliniczne i patologiczne analizowanej grupy chorych z uwzględnieniem podziału ze względu na płeć

*Tab. 9. Clinical and pathological features of the analyzed group of patients*

	<b>Kobiety (n=25)</b>		<b>Mężczyźni (n=57)</b>		<b>Łącznie (n=82)</b>	
<b>WIEK [lata]</b>						
średnia	72,4		61,9		65,1	
mediana	72		62		64	
zakres	53-90		37-80		37-90	
<b>LOKALIZACJA</b>						
język / dno jamy ustnej	15	60,0%	36	63,2%	51	62,2%
podniebienie / dziąsło górne	3	12,0%	7	12,3%	10	12,2%
policzek / dziąsło dolne	7	28,0%	14	24,6%	21	25,6%
<b>STOPIEŃ ZRÓŻNICOWANIA (GRADE)</b>						
1	9	36,0%	23	40,4%	32	39,0%
2	14	56,0%	27	47,4%	41	50,0%
3	2	8,0%	7	12,3%	9	11,0%
<b>STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA (STAGE)</b>						
1	4	16,0%	10	17,5%	14	17,1%
2	6	24,0%	6	10,5%	12	14,6%
3	3	12,0%	10	17,5%	13	15,9%
4	8	32,0%	21	36,8%	29	35,4%
brak danych	4	16,0%	10	17,5%	14	17,1%
<b>KLINICZNA OCENA CECHY T (cT)</b>						
1	4	16,0%	7	12,3%	11	13,4%
2	7	28,0%	15	26,3%	22	26,8%
3	5	20,0%	8	14,0%	13	15,9%
4	3	12,0%	15	26,3%	18	22,0%
NA	6	24,0%	12	21,1%	18	22,0%
<b>PATOLOGICZNA OCENA CECHY T (pT)</b>						
1	4	16,0%	10	17,5%	14	17,1%
2	10	40,0%	9	15,8%	19	23,2%
3	2	8,0%	9	15,8%	11	13,4%
4	3	12,0%	10	17,5%	13	15,9%
NA	6	24,0%	19	33,3%	25	30,5%

<b>KLINICZNA OCENA CECHY N (cN)</b>						
<b>0</b>	10	40,0%	14	24,6%	24	29,3%
<b>1</b>	2	8,0%	9	15,8%	11	13,4%
<b>2</b>	5	20,0%	18	31,6%	23	28,0%
<b>3</b>	1	4,0%	3	5,3%	4	4,9%
<b>NA</b>	7	28,0%	13	22,8%	20	24,4%
<b>PATOLOGICZNA OCENA CECHY N (pN)</b>						
<b>0</b>	13	52,0%	20	35,1%	33	40,2%
<b>1</b>	3	12,0%	7	12,3%	10	12,2%
<b>2</b>	3	12,0%	7	12,3%	10	12,2%
<b>3</b>	0	0,0%	4	7,0%	4	4,9%
<b>NA</b>	6	24,0%	19	33,3%	25	30,5%
<b>FOLLOW-UP [miesiące]</b>						
<b>mediana</b>	25,1		27		26	
<b>zakres</b>	1,6-121,5		0,8-118,6		0,8-121,5	
<b>brak danych</b>					1 (1,2%)	
<b>5-LETNI CZAS WOLNY OD OBJAWÓW CHOROBY (5yDFS)</b>						
<b>tak</b>	9	36,0%	21	36,8%	30	36,6%
<b>nie</b>	16	64,0%	35	61,4%	51	62,2%
<b>brak danych</b>	0	0,0%	1	1,8%	1	1,2%

Dla 81 (98,8%) chorych udało się uzyskać dane dotyczące czasu przeżycia. Przeciętny okres obserwacji chorych żyjących wynosił 26 miesięcy (2,16 roku); zakres od 0,8 miesiący (0,07 lat) do 121,5 miesiący (10,13 lat). 60 (73,1%) chorych zmarło w trakcie obserwacji. Przeżycie 5 letnie w badanej grupie wynosiło 36,6% (36,0% u kobiet i 36,8% u mężczyzn), mediana czasu przeżycia 26,0 miesiący (95% CI: 15.2-51.1) (ryc. 4).



**Ryc. 4.** Prawdopodobieństwo przeżycia w badanej grupie chorych

**Fig. 4.** The probability of survival in the studied group of patients

W badanej grupie zbadano zgodność pomiędzy oceną kliniczną a patologiczną w zakresie cech TNM przy użyciu testu Kappa Cohena:

**T:** weighted kappa: 0.82 (95% CI: 0.74-0.89)

**N:** weighted kappa: 0.49 (95% CI: 0.20-0.78)

Wykazano wysoką zgodność w zakresie cechy T pomiędzy oceną kliniczną i patologiczną.

Z uwagi na stosunkowo szeroki zakres wyników IHC (ekspresja białek w tkankach była oceniana za pomocą H-score, zakres 0-300), w badanej grupie zbadano zgodność pomiędzy bioptatami IHC. W tym celu przeprowadzono analizę ICC.

**Wyniki analizy ICC** – (ang. *intraclass correlation coefficient*):

Zakres wartości współczynnika ICC to 0-1, gdzie 0 - brak zgodności, 1 - pełna zgodność.

SNAIL2: 0.67 (95% CI: 0.52-0.78)

SNAIL1: 0.68 (95% CI: 0.53-0.79)

ZNF281: 0.96 (95% CI: 0.93-0.97)

Wykazano bardzo wysoką wartość współczynnika ICC dla ZNF281, co wskazuje na wysoką homogenność ekspresji tego białka w analizowanych bioptatach.

Wykazano heterogenność ekspresji w przypadku SNAIL1 i SNAIL2 (wartości powyżej 0,75 traktowane są jako wysoka zgodność, a pomiędzy 0,6 a 0,75 jako akceptowalna zgodność).

## **4.2 Immunohistochemiczna ocena ekspresji białka**

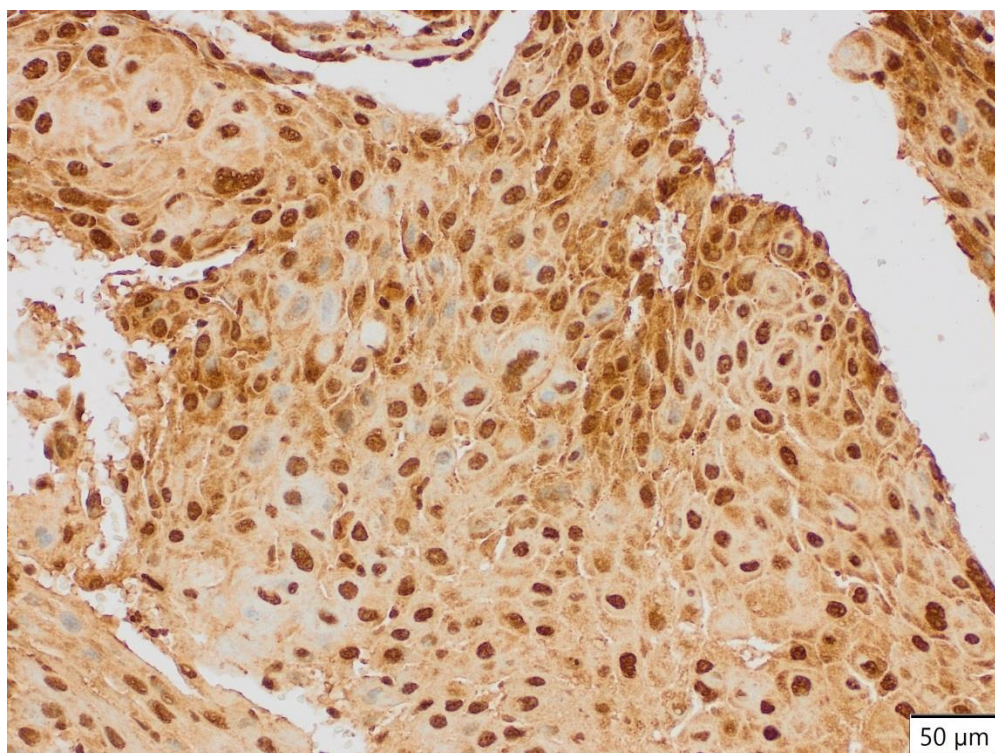
### **4.2.1. SNAIL1**

Przeprowadzone barwienia immunohistochemiczne wykazały obecność ekspresji na poziomie białka SNAIL1 u 75 chorych (91,5%). W 1 przypadku ekspresja była nieobecna (1,2%); wyniku nie uzyskano dla 6 przypadków (7,3%).

Do oceny różnic w poziomie ekspresji wykorzystano metodę jakościowo-ilościową HSCORE opisaną w rozdziale materiał i metoda.

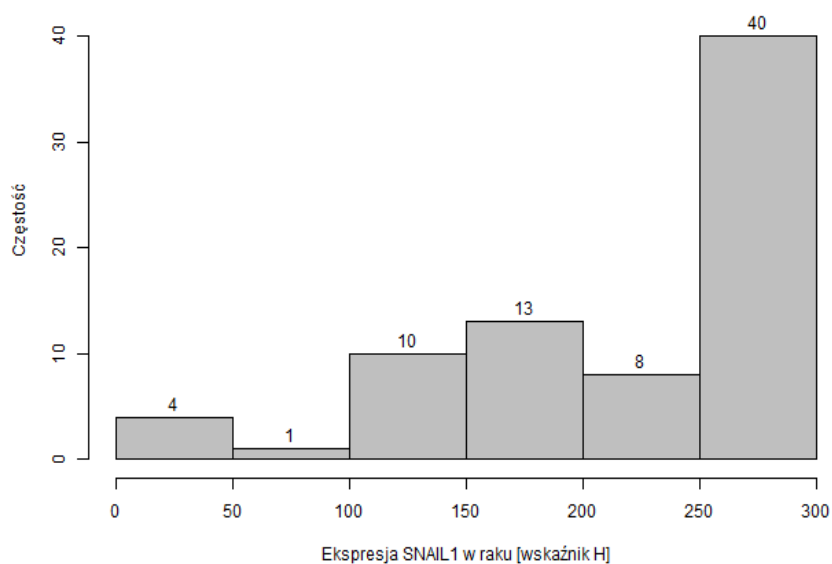
W 23 przypadkach (28,0%) odnotowano maksymalną wartość wskaźnika H równą 300 (ryc. 5). W 1 (1,2%) przypadku nie wykazano ekspresji białka SNAIL1. Średni wskaźnik H wynosił 229. W 75 (91,5%) przypadkach wartość wskaźnika H była większa niż 10 (ryc. 6).

Mediana intensywności ekspresji cytoplazmatycznej *SNAIL1* określona za pomocą HSCORE wynosiła w badanej grupie SNAIL1 270 (zakres 15-300).



**Ryc. 5.** Poziom białka SNAIL1 w raku jamy ustnej

*Fig. 5. Protein level of SNAIL1 in oral cancer*

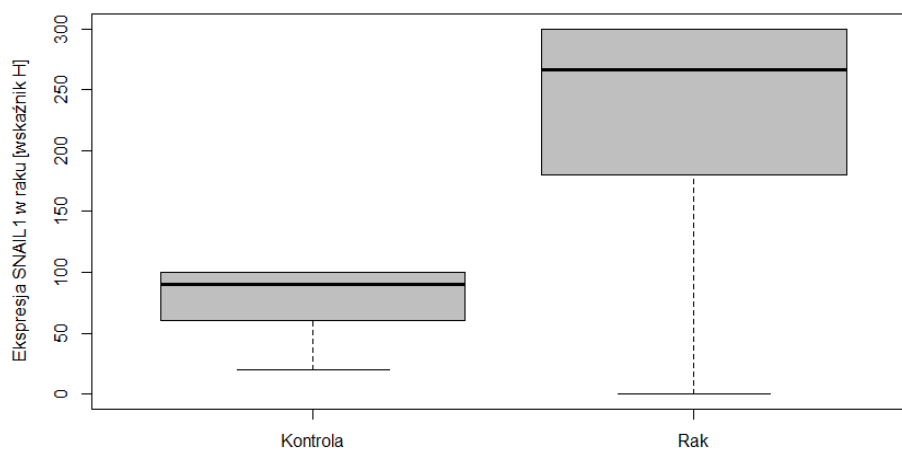


**Ryc. 6.** Histogram przedstawiający rozkład wyników analizy ekspresji białka SNAIL1 w badanej grupie raka jamy ustnej metodą barwienia immunohistochemicznego

*Fig. 6. Histogram showing the distribution of results of the analysis of SNAIL1 protein expression in the oral cancer by immunohistochemical staining*



Rozkład wartości poziomu ekspresji białka SNAIL1 w poszczególnych grupach tj. kontrola i rak został przeanalizowany testem Manna-Whitneya-Wilcoxon (ryc. 7).



**Ryc. 7.** Wykres prezentujący rozkład wartości poziomu ekspresji białka SNAIL1 w poszczególnych grupach

**Fig. 7.** A graph showing the distribution of SNAIL1 protein levels in individual groups

Na podstawie testu Manna-Whitneya-Wilcoxon wykazano, że istnieje statystycznie istotna różnica pomiędzy poziomem ekspresji *SNAIL1*, badanej metodą barwienia immunohistochemicznego, w grupie kontrolnej oraz w raku jamy ustnej ( $p < 0,001$ ).

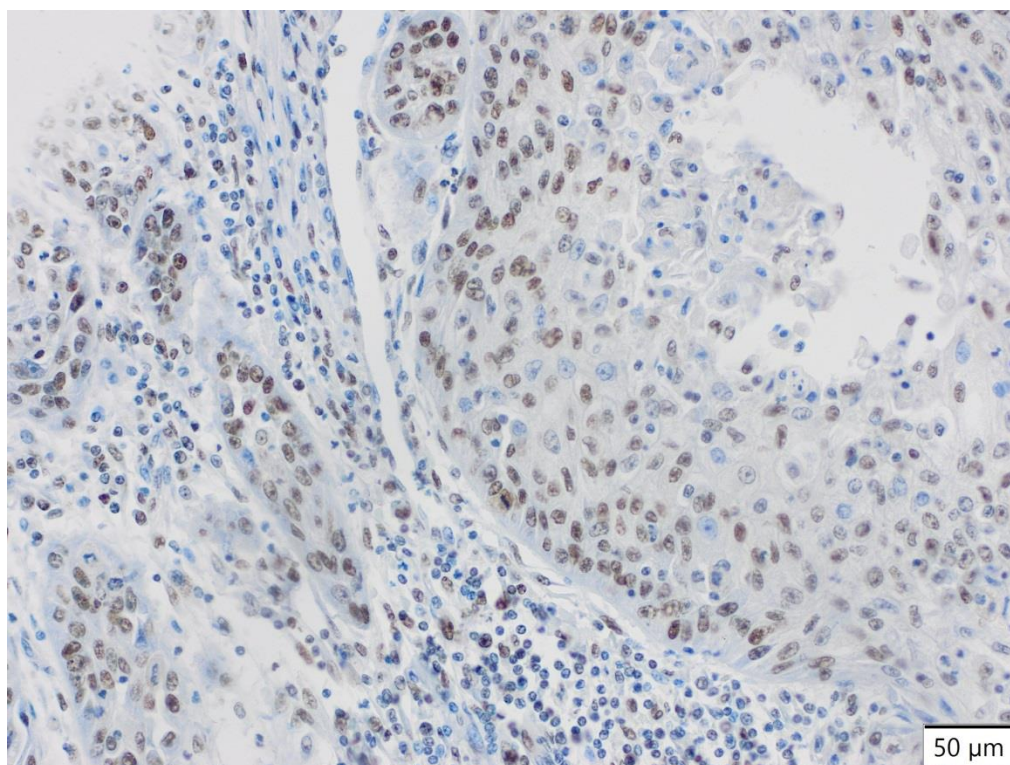
#### 4.2.2. SNAIL2

Przeprowadzone barwienia immunohistochemiczne wykazały obecność ekspresji na poziomie białka SNAIL2 u 42 chorych (51,2%). W 36 przypadkach ekspresja była nieobecna (43,9%); wyniku nie uzyskano dla 4 przypadków (4,9%).

Do oceny różnic w poziomie ekspresji wykorzystano metodę jakościowo-ilościową HSCORE opisaną w rozdziale materiał i metoda.

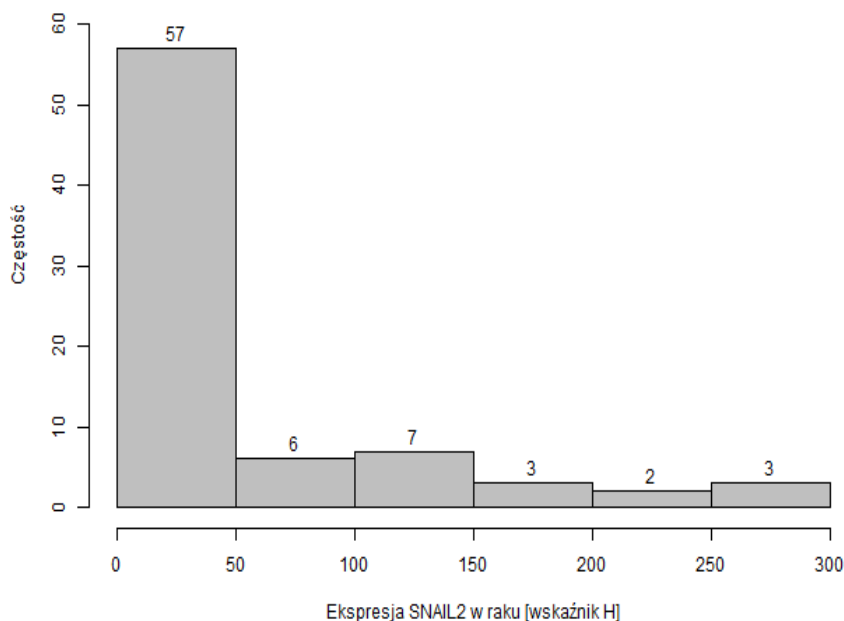
W żadnym przypadku (0%) nie odnotowano maksymalnej wartości wskaźnika H równej 300. W 36 (43,9%) przypadkach nie wykazano ekspresji białka SNAIL2. Średni wskaźnik H wynosił 45 (ryc. 8). W 42 (51,2%) przypadkach wartość wskaźnika H była większa niż 10 (ryc. 9).

Mediana intensywności ekspresji cytoplazmatycznej *SNAIL2* określona za pomocą HSCORE wynosiła w badanej grupie SNAIL2 - 55 (zakres 5-285).



**Ryc. 8.** Poziom białka SNAIL2 w raku jamy ustnej

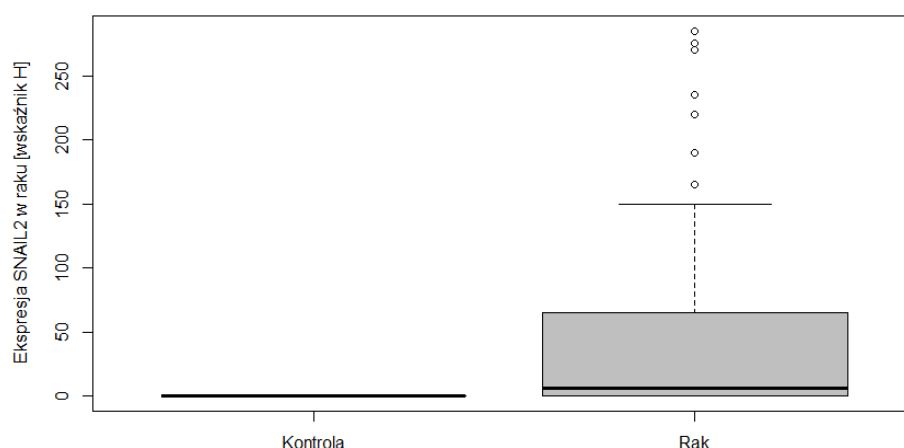
**Fig. 8.** Protein level of SNAIL2 in oral cancer



**Ryc. 9.** Histogram przedstawiający rozkład wyników analizy ekspresji białka SNAIL2 w badanej grupie raka jamy ustnej metodą barwienia immunohistochemicznego  
**Fig. 9.** Histogram showing the distribution of results of the analysis of SNAIL2 protein expression in the oral cancer by immunohistochemical staining

Rozkład wartości poziomu ekspresji białka SNAIL2 w poszczególnych grupach tj. kontrola i rak został przeanalizowany testem Manna-Whitneya-Wilcoxona (ryc. 10).

Na podstawie testu Manna-Whitneya-Wilcoxona wykazano, że istnieje statystycznie istotna różnica pomiędzy poziomem ekspresji *SNAIL2*, badanej metodą barwienia immunohistochemicznego, w grupie kontrolnej oraz w raku jamy ustnej ( $p=0,004$ ).



**Ryc. 10.** Wykres prezentujący rozkład wartości ekspresji białka SNAIL2 w poszczególnych grupach

**Fig. 10.** A graph showing the distribution of SNAIL2 protein levels in individual groups

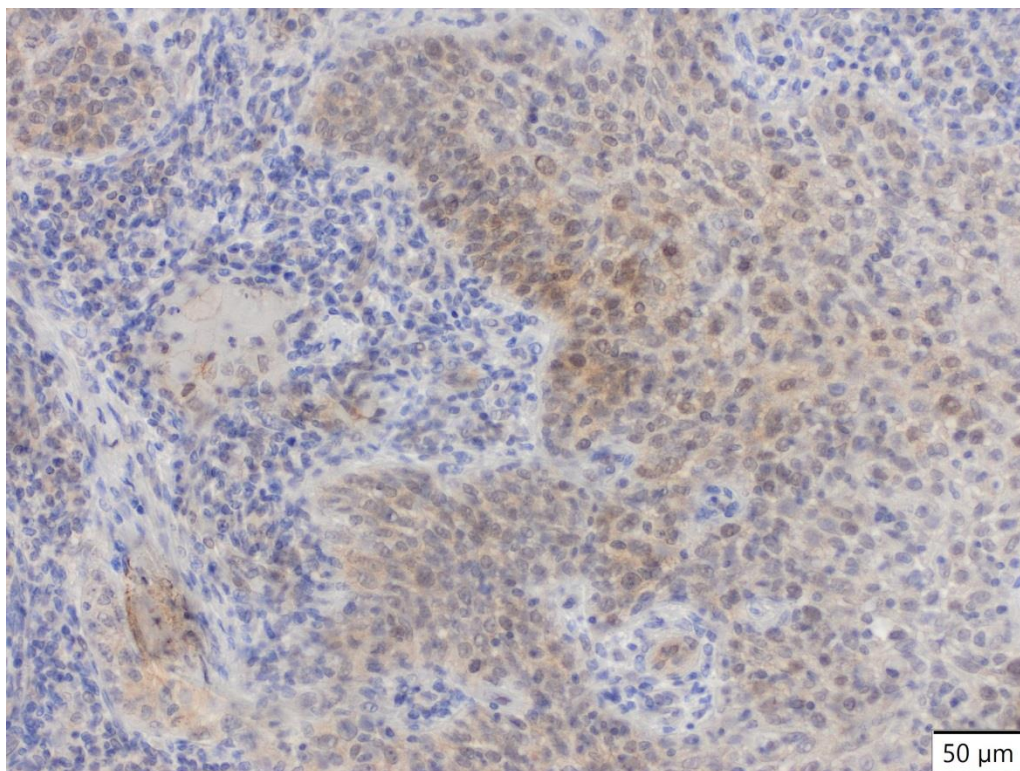
#### 4.2.3. ZNF281

Przeprowadzone barwienia immunohistochemiczne wykazały obecność ekspresji na poziomie białka ZNF281 u 61 chorych (74,4 %). W pozostałych 17 przypadkach ekspresja była nieobecna (20,7%); wyniku nie uzyskano dla 4 przypadków (4,9%).

Do oceny różnic w poziomie ekspresji wykorzystano metodę jakościowo-ilościową HSCORE opisaną w rozdziale materiał i metoda.

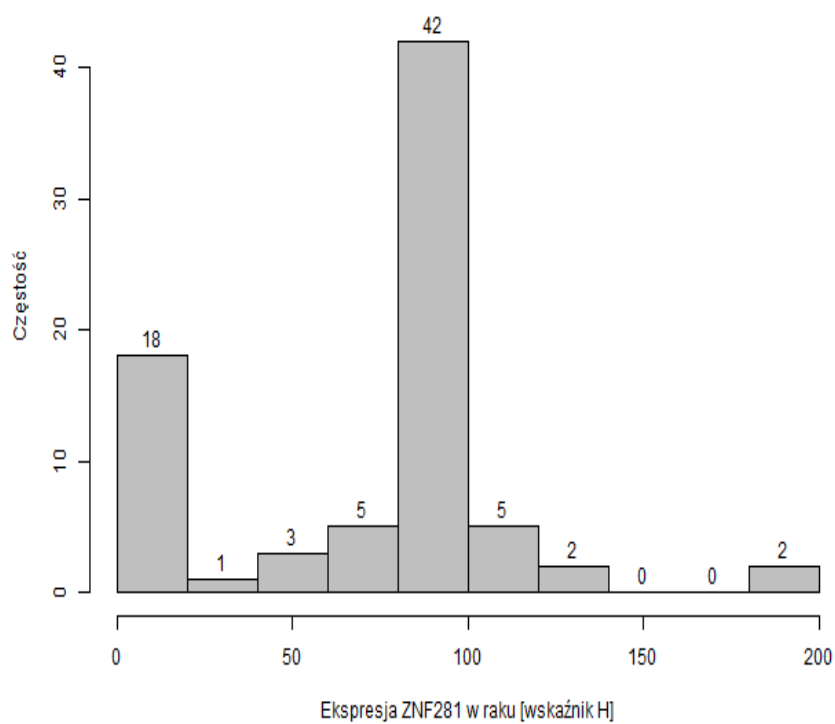
W żadnym przypadku (0%) nie odnotowano maksymalnej wartości wskaźnika H równej 300. W 17 (20,7%) przypadkach nie wykazano ekspresji białka ZNF281. Średni wskaźnik H wynosił 77 (ryc. 11). W 61 (74,4%) przypadkach wartość wskaźnika H była większa niż 10 (ryc. 12).

Mediana intensywności ekspresji cytoplazmatycznej ZNF281 określona za pomocą HSCORE wynosiła w badanej grupie ZNF281 - 100 (zakres 20-200).



**Ryc. 11.** Poziom białka ZNF281 w raku jamy ustnej

*Fig. 11. Protein level of ZNF281 in oral cancer*

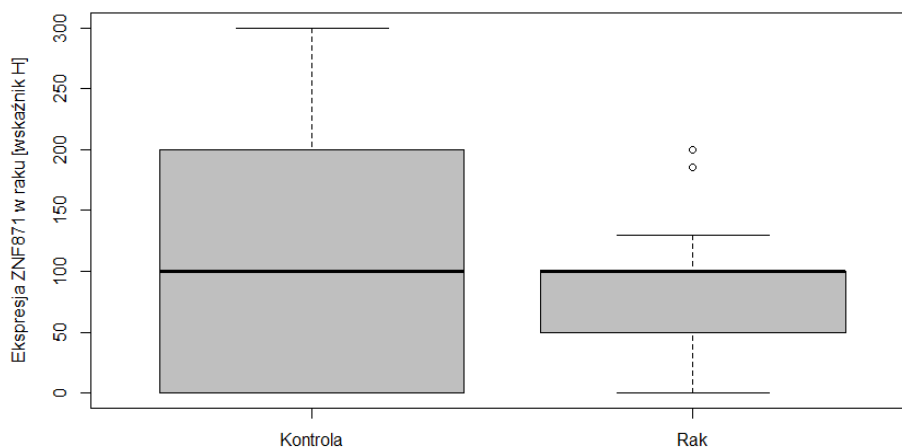


**Ryc. 12.** Histogram przedstawiający rozkład wyników analizy ekspresji białka ZNF281 w badanej grupie raka jamy ustnej metodą barwienia immunohistochemicznego

*Fig. 12. Histogram showing the distribution of results of the analysis of ZNF281 protein expression in the oral cancer by immunohistochemical staining*

Rozkład wartości poziomu ekspresji białka ZNF281 w poszczególnych grupach tj. kontrola i rak został przeanalizowany testem Manna-Whitneya-Wilcoxona (ryc. 13).

Na podstawie testu Manna-Whitneya-Wilcoxona nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy poziomem ekspresji ZNF281, badanej metodą barwienia immunohistochemicznego, w grupie kontrolnej oraz w raku jamy ustnej ( $p=0,637$ ).



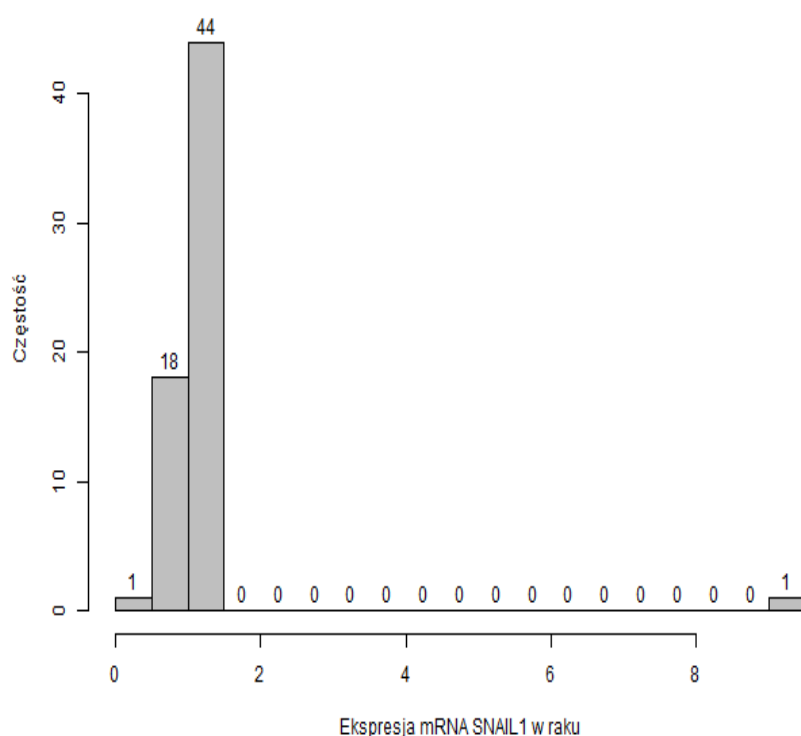
**Ryc. 13.** Wykres prezentujący rozkład wartości ekspresji białka ZNF281 w poszczególnych grupach

*Fig. 13. A graph showing the distribution of ZNF281 protein levels in individual groups*

### 4.3. Ocena analizy molekularnej

#### 4.3.1. Analiza poziomu ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie mRNA

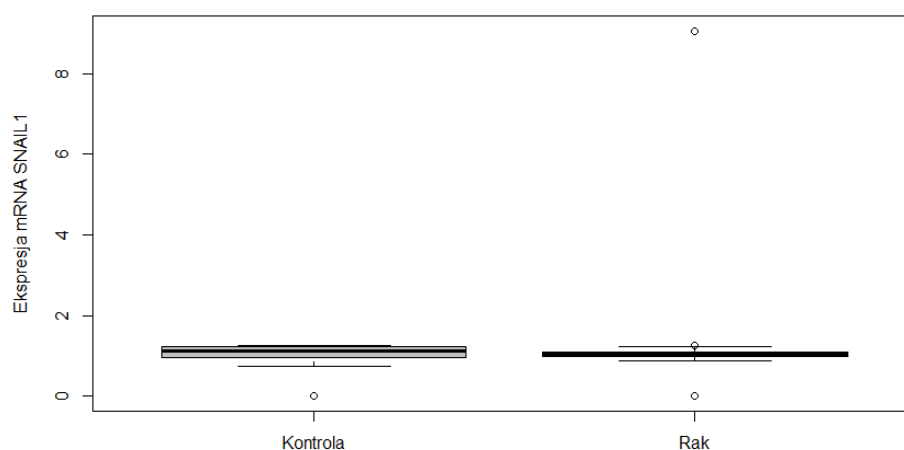
Dla 64 (78,0%) badanych przypadków uzyskano dane dotyczące poziomu ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie mRNA. Maksymalny poziom ekspresji wynosił 9,057, a minimalny 0 (ryc. 14). 18 przypadków nie objęto analizą.



**Ryc. 14.** Histogram przedstawiający względny poziom ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie mRNA

**Fig. 14.** Histogram showing the level of *SNAIL1* expression at the mRNA level

Dla wykazania istotnych statystycznie różnic w ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie mRNA w poszczególnych grupach tj. kontrola i rak, został przeprowadzony test Manna-Whitneya-Wilcoxon (ryc. 15).



**Ryc. 15.** Porównanie poziomu względnej ekspresji *SNAIL1* na poziomie mRNA pomiędzy rakiem i grupą kontrolną

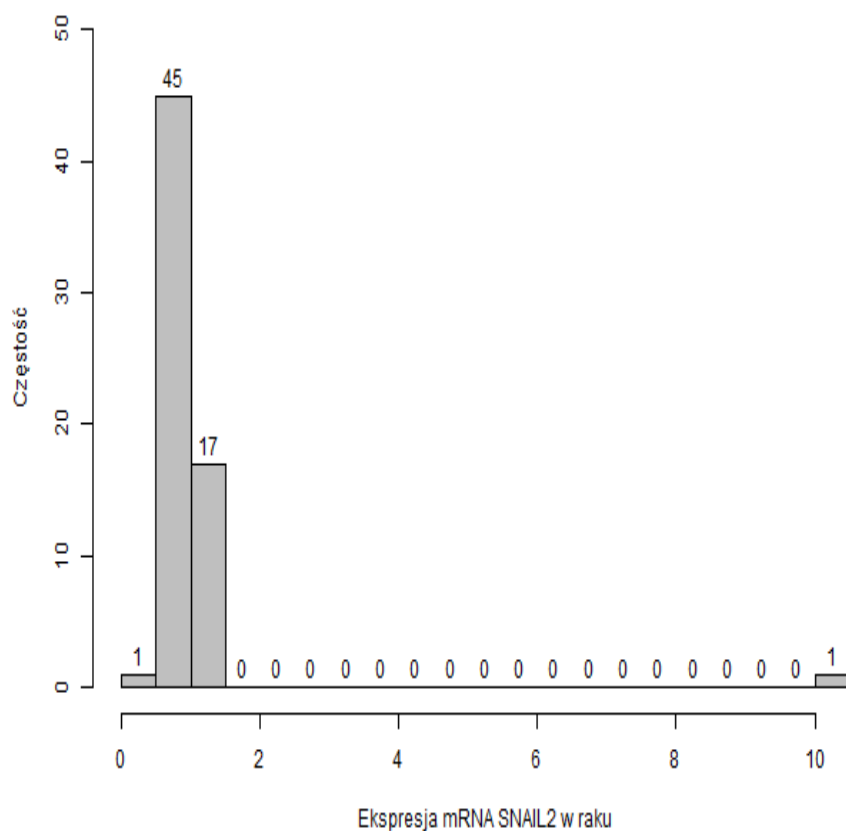
**Fig. 15.** Comparison of the level of relative *SNAIL1* expression at the mRNA level between cancer and control group

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w rozkładzie ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie mRNA w poszczególnych grupach ( $p=0,050$ ).

#### 4.3.2. Analiza poziomu ekspresji genu *SNAIL2* na poziomie mRNA

Dla 64 (78,0%) badanych przypadków uzyskano dane dotyczące poziomu ekspresji genu *SNAIL2* na poziomie mRNA. Maksymalny poziom ekspresji wynosił i 10,336, a minimalny 0 (ryc. 16). 18 przypadków nie objęto analizą.

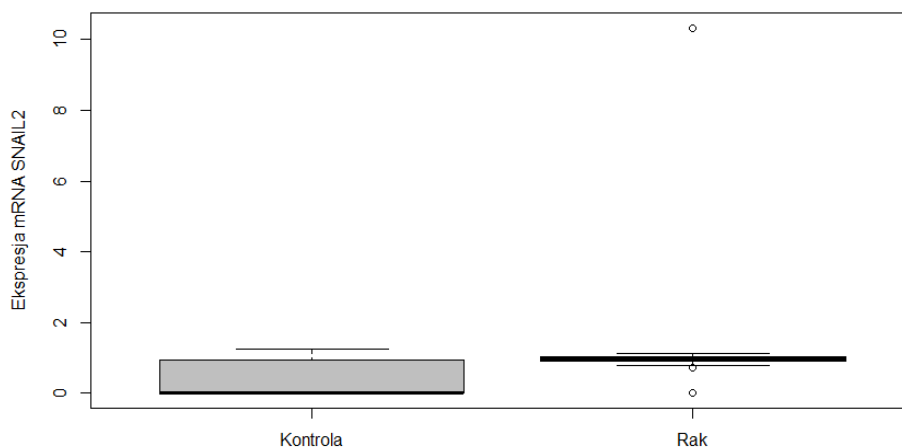




**Ryc. 16.** Histogram przedstawiający względny poziom ekspresji genu *SNAIL2* na poziomie mRNA

**Fig. 16.** Histogram showing the level of *SNAIL2* expression at the mRNA level

Dla wykazania istotnych statystycznie różnic w ekspresji genu *SNAIL2* na poziomie mRNA w poszczególnych grupach tj. kontrola i rak, został przeprowadzony test Manna-Whitneya-Wilcoxon (ryc. 17).



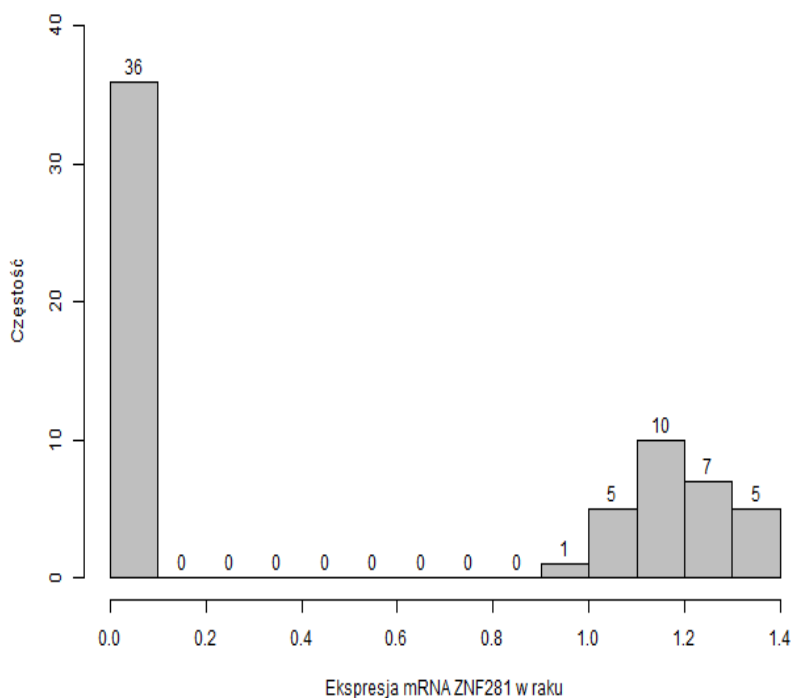
**Ryc. 17.** Porównanie poziomu względnej ekspresji *SNAIL2* na poziomie mRNA pomiędzy rakiem i grupą kontrolną

**Fig. 17.** Comparison of the level of relative expression of *SNAIL2* at the mRNA level between cancer and control group

Na podstawie testu Manna-Whitneya-Wilcoxon wykazano, że istnieje statystycznie istotna różnica pomiędzy względną ekspresją genu *SNAIL2* na poziomie mRNA w grupie kontrolnej i w raku ( $p < 0,001$ ).

#### 4.3.3. Analiza poziomu ekspresji genu *ZNF281* na poziomie mRNA

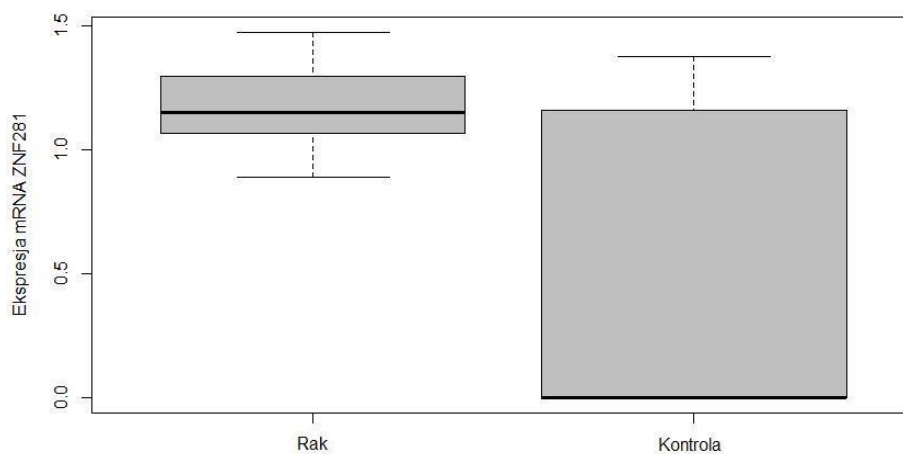
Dla 64 (78,0%) badanych przypadków uzyskano dane dotyczące poziomu ekspresji genu *ZNF281* na poziomie mRNA. Maksymalny poziom ekspresji wynosił 1,380, a minimalny 0 (ryc. 18). 18 przypadków nie objęto analizą.



**Ryc. 18.** Histogram przedstawiający względny poziom ekspresji genu *ZNF281* na poziomie mRNA

**Fig. 18.** Histogram showing the level of *ZNF281* expression at the mRNA level

Dla wykazania istotnych statystycznie różnic w ekspresji genu *ZNF281* na poziomie mRNA w poszczególnych grupach tj. kontrola i rak został przeprowadzony test Manna-Whitneya-Wilcoxona (ryc. 19).



**Ryc. 19.** Porównanie poziomu względnej ekspresji *ZNF281* na poziomie mRNA pomiędzy rakiem i grupą kontrolną

*Fig. 19. Comparison of the level of relative expression of ZNF281 at the mRNA level between cancer and control group*

Na podstawie testu Manna-Whitneya-Wilcoxona wykazano, że istnieje statystycznie istotna różnica pomiędzy względną ekspresją genu *ZNF281* na poziomie mRNA w grupie kontrolnej i raku ( $p < 0,001$ ).

#### **4.4 Zestawienie poziomu ekspresji genów: *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZNF281* (IHC i mRNA) z danymi klinicznymi**

Zbadano związek ekspresji *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZNF281* z wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi (tab. 12-14). Ze względu na brak cech rozkładu normalnego, w analizie wykorzystano testy nieparametryczne. Różnice w rozkładzie cechy pomiędzy grupami przeanalizowano testem Manna-Whitneya-Wilcoxona, dla 2 porównywanych grup oraz Kruskala-Wallis, dla 3 i więcej porównywanych grup.

**Tab. 12.** Zestawienie wyników statystycznej analizy rozkładu ekspresji genu *SNA-IL1* na poziomie białka i mRNA pomiędzy podgrupami w obrębie poszczególnych cech klinicznych

*Tab. 12. Summary results of the statistical analysis of the distribution of SNA-IL1 expression at the protein and mRNA levels between subgroups within individual clinical features*

<b>Zmienna</b>	<b>Test</b>	<b>Białko</b>	<b>mRNA</b>
<b>Płeć</b>	Test Manna-Whitneya- Wilcoxon	p=0,995	p=0,051
<b>Wiek ponad 60 lat</b>	Test Manna-Whitneya- Wilcoxon	p=0,336	p=0,394
<b>Grade</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,334	p=0,295
<b>Stage</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,747	p=0,437
<b>cT</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,642	p=0,228
<b>cN</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,89	p=0,444
<b>pT</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,582	p=0,036
<b>pN</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,886	p=0,086
<b>Cukrzyca</b>	Test Manna-Whitneya- Wilcoxon	p=0,575	p=0,932
<b>Nadciśnienie</b>	Test Manna-Whitneya- Wilcoxon	p=0,566	p=0,646
<b>Inne choroby</b>	Test Manna-Whitneya- Wilcoxon	p=0,062	p=0,689
<b>Palenie</b>	Test Manna-Whitneya- Wilcoxon	p=0,829	p=0,645
<b>Nadmierne spożywanie alkoholu</b>	Test Manna-Whitneya- Wilcoxon	p=0,717	p=0,273
<b>Historia onkologiczna</b>	Test Manna-Whitneya- Wilcoxon	p=1	p=0,424
<b>Lokalizacja</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,778	p=0,091

**Tab. 13.** Zestawienie wyników statystycznej analizy rozkładu ekspresji genu SNA-IL2 na poziomie białka i mRNA pomiędzy podgrupami w obrębie poszczególnych cech klinicznych

*Tab. 13. Summary results of the statistical analysis of the distribution of SNAIL2 expression at the protein and mRNA levels between subgroups within individual clinical features*

<b>Zmienna</b>	<b>Test</b>	<b>Białko</b>	<b>mRNA</b>
<b>Płeć</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,554	p=0,843
<b>Wiek ponad 60 lat</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,604	p=0,49
<b>Grade</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,036	p=0,472
<b>Stage</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,782	p=0,386
<b>cT</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,094	p=0,918
<b>cN</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,068	p=0,666
<b>pT</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,457	p=0,489
<b>pN</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,363	p=0,906
<b>Cukrzyca</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,316	p=0,11
<b>Nadciśnienie</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,239	p=0,384
<b>Inne choroby</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,294	p=0,128
<b>Palenie</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,393	p=0,486
<b>Alkohol</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,042	p=0,01
<b>Historia onkologiczna</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,045	p=0,291
<b>Lokalizacja</b>	Test Kruskala-Wallis	p=0,484	p=0,696

**Tab. 14.** Zestawienie wyników statystycznej analizy rozkładu ekspresji genu *ZNF281* na poziomie białka i mRNA pomiędzy podgrupami w obrębie poszczególnych cech klinicznych

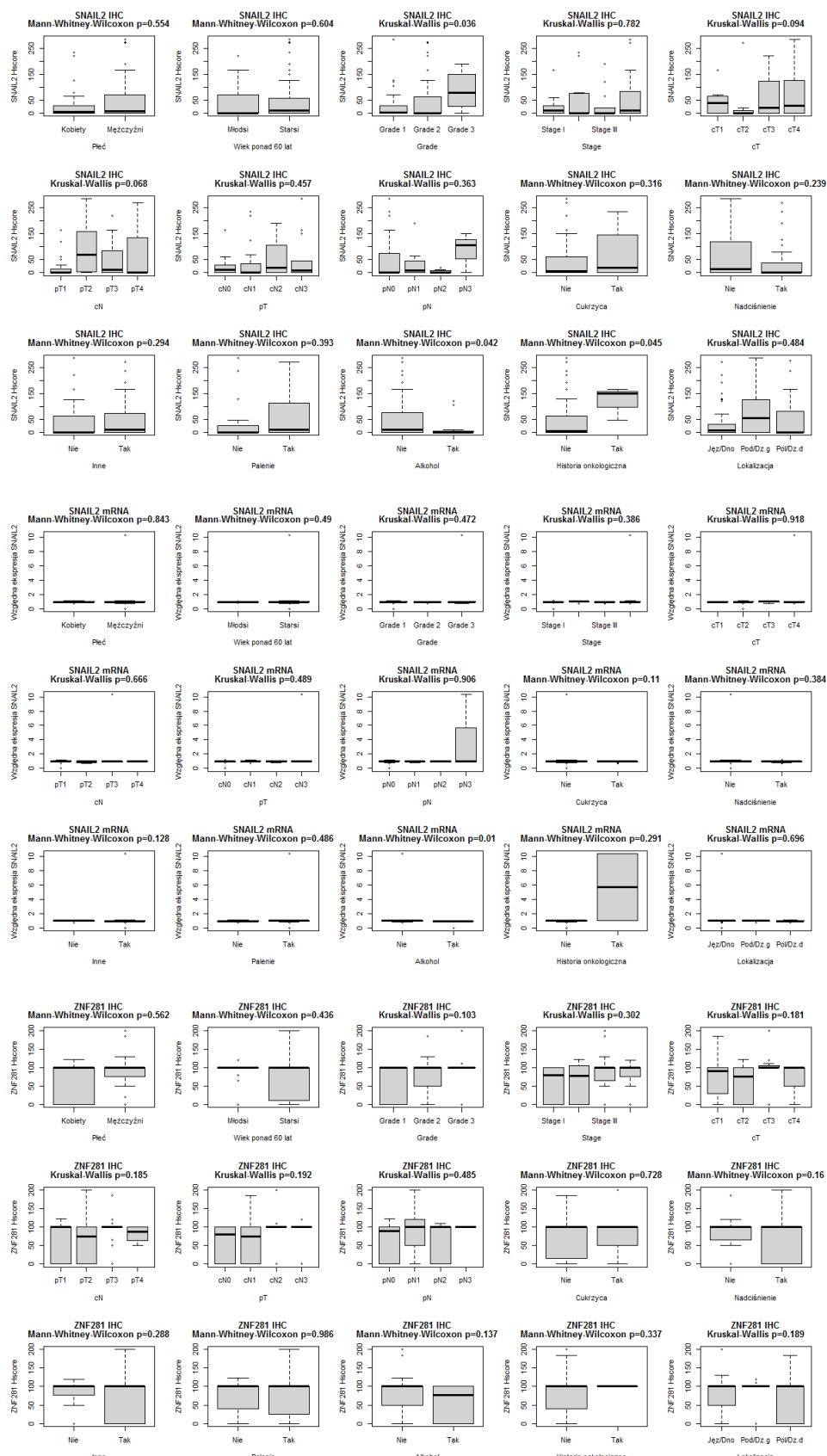
*Tab. 14. Comparison of the results of the statistical analysis of the distribution of ZNF281 expression at the protein and mRNA levels between subgroups within individual clinical features*

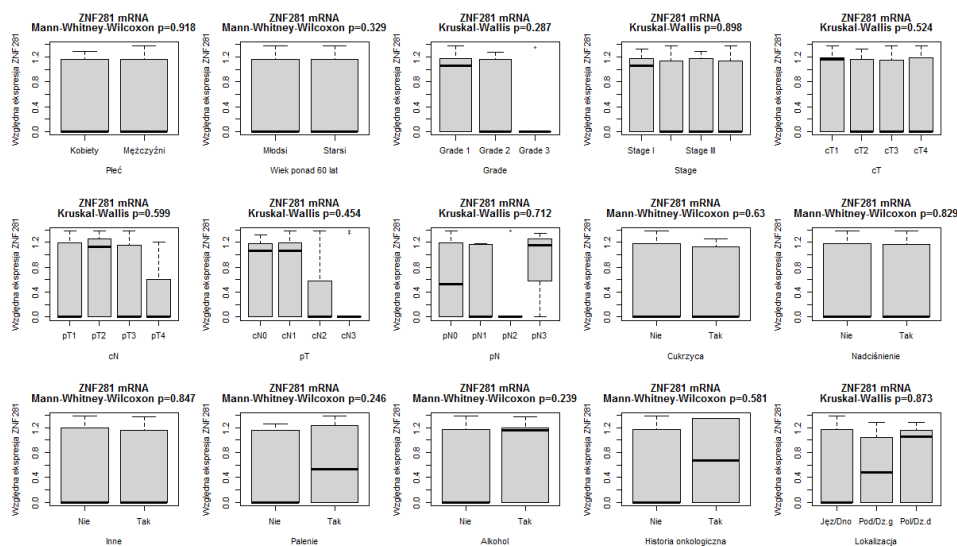
<b>Zmienna</b>	<b>Test</b>	<b>Białko</b>	<b>mRNA</b>
<b>Płeć</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,562	p=0,918
<b>Wiek ponad 60 lat</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,436	p=0,329
<b>Grade</b>	Test Kruskala-Wallisa	p=0,103	p=0,287
<b>Stage</b>	Test Kruskala-Wallisa	p=0,302	p=0,898
<b>cT</b>	Test Kruskala-Wallisa	p=0,181	p=0,524
<b>cN</b>	Test Kruskala-Wallisa	p=0,185	p=0,599
<b>pT</b>	Test Kruskala-Wallisa	p=0,192	p=0,454
<b>pN</b>	Test Kruskala-Wallisa	p=0,485	p=0,712
<b>Cukrzyca</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,728	p=0,63
<b>Nadciśnienie</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,16	p=0,829
<b>Inne choroby</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,288	p=0,847
<b>Palenie</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,986	p=0,246
<b>Alkohol</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,137	p=0,239
<b>Historia onkologiczna</b>	Test Manna-Whitneya-Wilcoxona	p=0,337	p=0,581
<b>Lokalizacja</b>	Test Kruskala-Wallisa	p=0,189	p=0,873

Rozkłady ekspresji genów: *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZNF281* na poziomie białka i mRNA pomiędzy podgrupami w obrębie poszczególnych cech klinicznych, ukazano na ryc. 20.









**Ryc. 20.** Ryciny obrazujące rozkłady ekspresji genów: *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZNF281* na poziomie białka i mRNA pomiędzy podgrupami w obrębie poszczególnych cech klinicznych

**Fig. 20.** Figures showing the distribution of *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZNF281* expression at the protein and mRNA levels between subgroups within individual clinical features

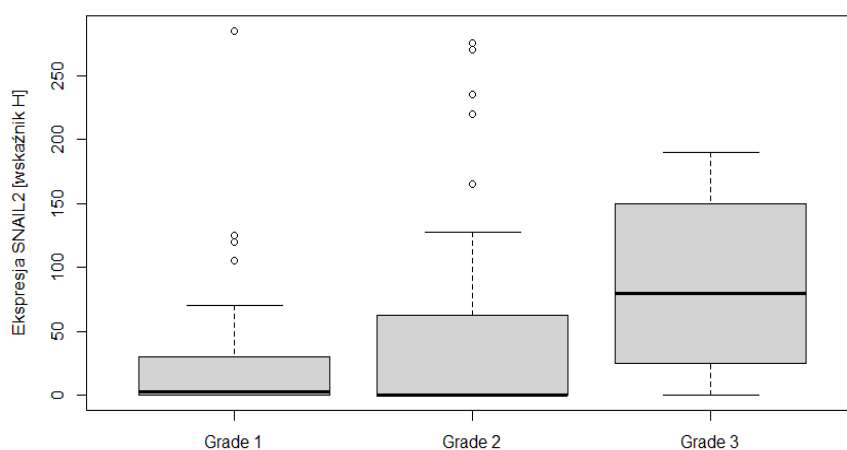
Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotne statystycznie różnice w ekspresji genu *SNAIL2* w odniesieniu do 3 analizowanych cech klinicznych:

1. Stopień zróżnicowania histologicznego (ang. *grading*) - ekspresja genu dla białka *SNAIL2* na poziomie białka wyższa w raku niskozróżnicowanym (Grade 3) w porównaniu do raka wysokozróżnicowanego (Grade 1) i raka średniozróżnicowanego (Grade 2).

2. Nadmierne spożywanie alkoholu - ekspresja *SNAIL2* na poziomie białka wyższa u pacjentów nienadużywających alkoholu.

3. Nadmierne spożywanie alkoholu - ekspresja genu *SNAIL2* na poziomie mRNA wyższa u pacjentów nienadużywających alkoholu.

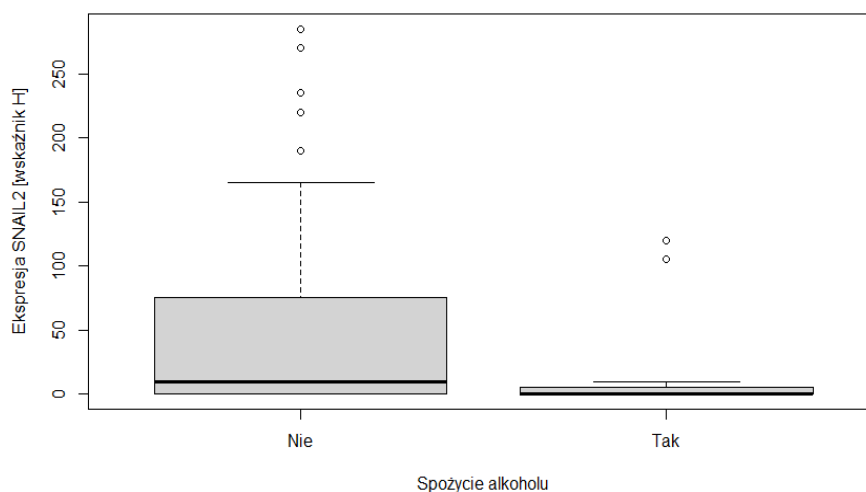
Wyniki obrazują ryciny 21-23.



**Ryc. 21.** Wykres przedstawiający zależność (A) poziomu ekspresji SNAIL2 na poziomie białka od (B) stopnia zróżnicowania raka (Grade)

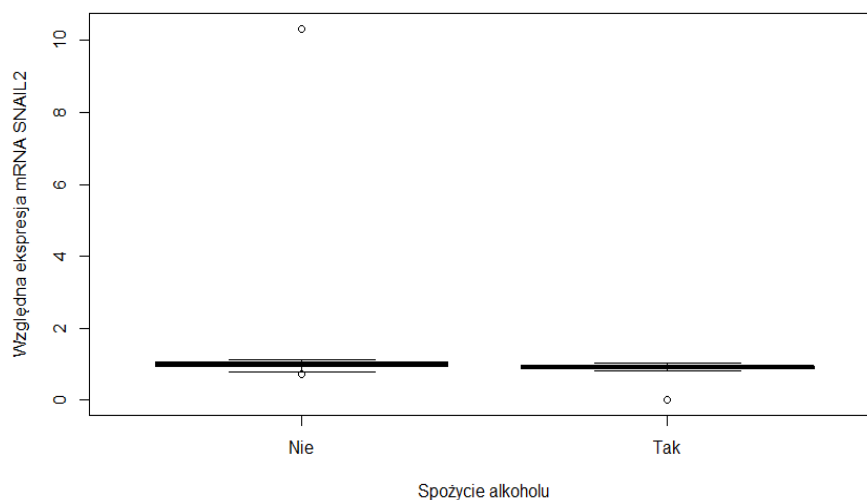
**Fig. 21.** Graph showing the relationship (A) of SNAIL2 expression level at the protein level to (B) the degree of cancer differentiation (Grade)

Wykazano, że wyższa ekspresja genu *SNAIL2* występuje w raku niskozróżnicowanym (Grade 3) ( $p=0,036$ ).



**Ryc. 22.** Wykres przedstawiający zależność (A) poziomu ekspresji SNAIL 2 na poziomie białka od (B) cechy - spożycie alkoholu (Grade)

**Fig. 22.** Graph showing relationship (A) of SNAIL 2 expression level at protein level to (B) traits - alcohol consumption (Grade)



**Ryc. 23.** Wykres przedstawiający zależność (A) poziomu ekspresji genu *SNAIL2* na poziomie mRNA od (B) cechy - spożycie alkoholu (Grade)

**Fig. 23.** Graph showing relationship (A) of SNAIL 2 expression level at mRNA level to (B) traits - alcohol consumption (Grade)

Analiza statystyczna potwierdziła wyższą ekspresję genu *SNAIL2* w grupie pacjentów nienadużywających alkoholu zarówno na poziomie białka ( $p=0,042$ ), jak i na poziomie mRNA ( $p=0,010$ ) (tab. 15). Nie wykazano zależności pomiędzy wiekiem, płcią, stopniem zaawansowania Stage, TNM, cukrzycą, nadciśnieniem, paleniem, lokalizacją oraz historią onkologiczną, a poziomem ekspresji *SNAIL1*, *SNAIL2* i *ZNF281*, ani na poziomie białka, ani na poziomie mRNA.

**Tab. 15.** Analiza rozkładu ekspresji badanych genów na poziomie białka i mRNA w grupach o różnym stopniu zróżnicowania raka (Grade)

*Tab. 15. Analysis of the expression distribution of the studied genes at the protein and mRNA level in groups with different degrees of cancer differentiation (Grade)*

<b>Test post-hoc Dunn'a z poprawką Hochberga</b>			
<b>SNAIL2.IHC</b>	p=0,3450	p=0,0059	p=0,0100

Dla doprecyzowania analizy rozkładu SNAIL2 w grupach raków o różnym stopniu zróżnicowania raka został przeprowadzony test Dunna z poprawką Hochberga. Wykazano zdecydowanie większą ekspresję *SNAIL2* na poziomie białka w raku niskozróżnicowanym (Grade 3) w porównaniu z ekspresją *SNAIL2* w grupie (Grade 1) (p=0,0059) oraz większą ekspresję *SNAIL2* na poziomie białka w raku niskozróżnicowanym (Grade 3) w porównaniu z ekspresją *SNAIL2* w w grupie (Grade 2) (p=0,0100). Nie stwierdzono różnic w ekspresji *SNAIL2* pomiędzy rakiem dobrze (Grade 1) i średnio zróżnicowanym (Grade 2).

## **4.5. Determinanty 5yDFS**

### **4.5.1. Kliniczne**

Przeprowadzono analizę statystyczną w badanej grupie, porównującą wskaźnik pięcioletniego przeżycia wolnego od choroby (DFS) w obrębie poszczególnych podgrup określających inne cechy kliniczne (tab. 16). W zależności od liczebności podgrup zastosowano test chi-kwadrat (powyżej 5 oczekiwanych obserwacji w podgrupie) bądź test Fishera (poniżej 5 oczekiwanych obserwacji w podgrupie) (tab. 17 - 19).

**Tab. 16.** Zestawienie wyników statystycznej analizy rozkładu 5-letniego wskaźnika DFS pomiędzy podgrupami w obrębie poszczególnych cech klinicznych

*Tab. 16. Summary results of the statistical analysis of the distribution of the 5-year DFS index between subgroups within individual clinical features*

Zmienna	Test	p-value
<b>Płeć</b>	Test Chi-kwadrat	p=1
<b>Wiek ponad 60 lat</b>	Test Fishera	p=0,643
<b>Grade</b>	Test Fishera	p=0,513
<b>Stage</b>	Test Fishera	<b>p=0,016</b>
<b>cT</b>	Test Fishera	<b>p=0,025</b>
<b>pT</b>	Test Fishera	p=0,572
<b>cN</b>	Test Fishera	p=0,110
<b>pN</b>	Test Fishera	p=0,167
<b>Cukrzyca</b>	Test Fishera	p=0,503
<b>Nadciśnienie</b>	Test Chi-kwadrat	p=1
<b>Inne</b>	Test Chi-kwadrat	p=0,707
<b>Leczenie operacyjne (Op)</b>	Test Chi-kwadrat	<b>p=0,036</b>
<b>RT</b>	Test Chi-kwadrat	p=0,373
<b>ChT</b>	Test Fishera	p=0,724
<b>Palenie</b>	Test Chi-kwadrat	p=0,427
<b>Alkohol</b>	Test Chi-kwadrat	p=0,976
<b>Historia onkologiczna</b>	Test Fishera	p=0,262
<b>Lokalizacja</b>	Test Fishera	p=0,523

**Tab. 17.** Rozkład 5-letniego wskaźnika DFS w zależności od zaawansowania klinicznego (Stage)

*Tab. 17. Distribution of the 5-year DFS index depending on clinical stage (Stage)*

Stopień zaawansowania klinicznego	DFS	
	0	1
1	5	9
2	5	7
3	11	2
4	21	8

**Tab. 18.** Rozkład 5-letniego wskaźnika DFS w zależności od leczenia operacyjnego (Op)

*Tab. 18. Distribution of the 5-year DFS ratio depending on surgical treatment (Op)*

Leczenie operacyjne	DFS	
	0	1
0	14	2
1	30	25

**Tab. 19.** Rozkład 5-letniego wskaźnika DFS w zależności od klinicznej oceny cechy T (cT)

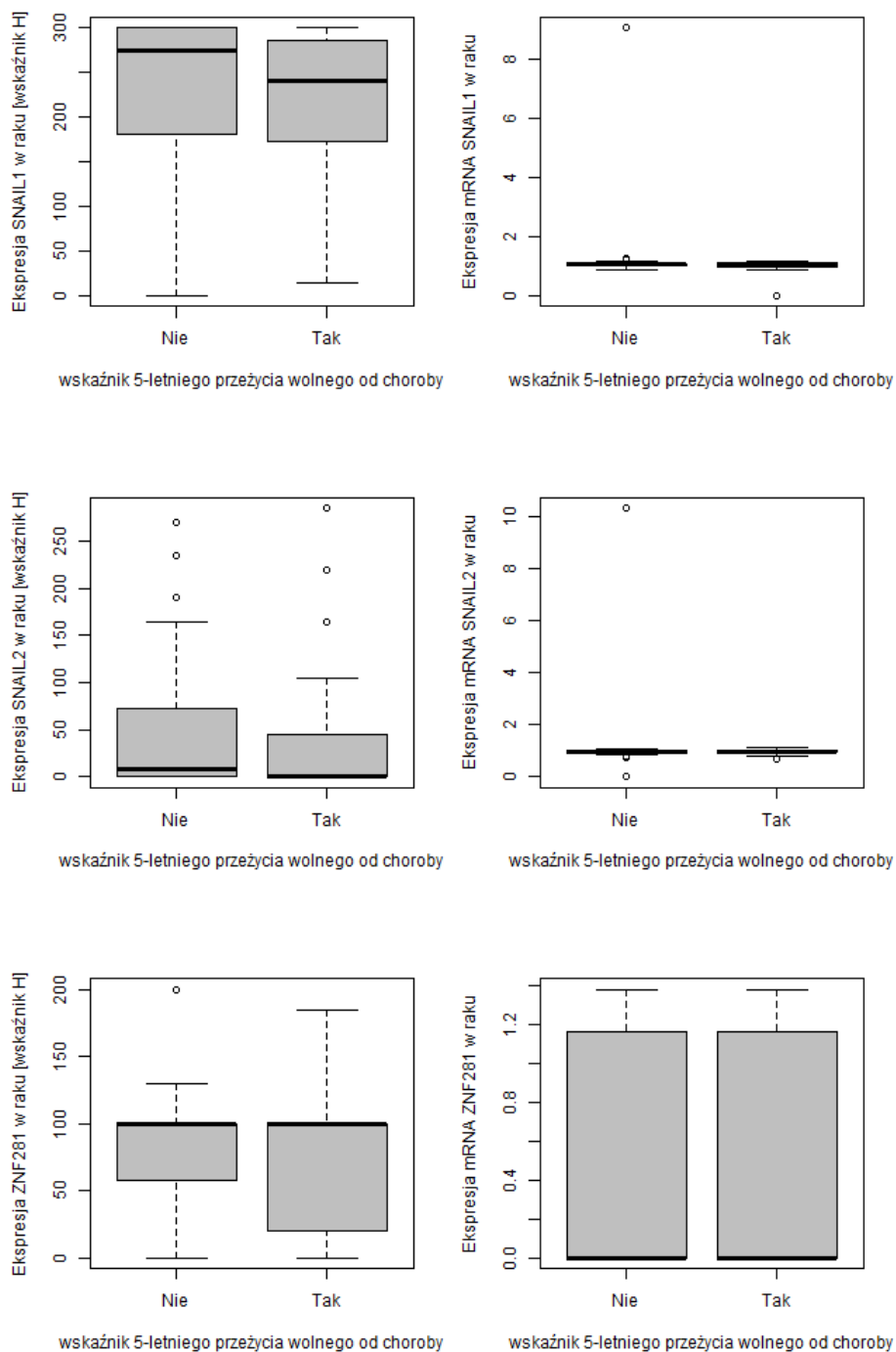
*Tab. 19. Distribution of the 5-year DFS index depending on the clinical assessment of the T-characteristic (cT)*

cT	DFS	
	0	1
1	3	8
2	12	10
3	11	2
4	13	5

Statystycznie istotne różnice w rozkładzie 5yDFS zaobserwowano w przypadku Stage ( $p=0,016$ ), klinicznego T ( $p=0,025$ ) oraz leczenia operacyjnego ( $p=0,036$ ).

## 4.5.2 Ekspresja markerów

Wykresy przedstawiające zależności (A) poziomu ekspresji genów: *SNAIL1*, *SNAIL2* oraz *ZNF281* na poziomie mRNA oraz białka od (B) wskaźnika 5 -letniego przeżycia wolnego od choroby, ukazuje ryc. 24.





**Ryc. 24.** Wykresy przedstawiające zależności (A) poziomu ekspresji genów: *SNA-IL1*, *SNAIL2* oraz *ZNF281* na poziomie mRNA oraz białka od (B) wskaźnika 5 - letniego przeżycia wolnego od choroby

**Fig. 24.** *Graphs depicting the relationship (A) of SNAIL1, SNAIL2 and ZNF281 expression levels at the mRNA and protein level from (B) a 5-year disease-free survival rate*

Przeprowadzona analiza powiązania ekspresji markerów (na poziomie mRNA i białka) z 5yDFS nie wykazała istotnych statystycznie różnic w ekspresji pomiędzy chorymi ze wznową i bez wznowy przez 5 lat.

## 4.6. Analiza przeżycia

### 4.6.1. Klinicznie

W analizowanej grupie przeżycie 5 letnie wynosiło 36,6%. Mediana czasu przeżycia wynosiła 26 miesięcy (95% CI: 15.2-51.1). W okresie obserwacji zmarło 60 pacjentów (73,1%).

**Tab. 20.** Analiza wpływu cech klinicznych na całkowite przeżycie - OS (ang. *overall survival*) z zastosowaniem modelu proporcjonalnego ryzyka Coxa

**Tab. 20.** *Analysis of the impact of clinical features on overall survival using a Cox proportional risk model*

Zmienna	Typ	Wartość	OS: HR (95% CI), p-value
<b>Płeć</b>	Kategoryczna	Mężczyźni	HR=0,976 (95% CI: 0,566-1,684); p=0,93
<b>Wiek ponad 60 lat</b>	Kategoryczna	Starsi	HR=0,759 (95% CI: 0,422-1,366); p=0,358

<b>Grade</b>	Ilościowa	Przyrost o 1	HR=1,379 (95% CI: 0,955-1,991); p=0,087
<b>Stage</b>	<b>Ilościowa</b>	<b>Przyrost o 1</b>	<b>HR=1,383 (95% CI: 1,085-1,763); p=0,009</b>
<b>cT</b>	<b>Ilościowa</b>	<b>Przyrost o 1</b>	<b>HR=1,354 (95% CI: 1,044-1,757); p=0,022</b>
<b>pT</b>	<b>Ilościowa</b>	<b>Przyrost o 1</b>	<b>HR=1,359 (95% CI: 1,017-1,815); p=0,038</b>
<b>cN</b>	Ilościowa	Przyrost o 1	HR=1,26 (95% CI: 0,959-1,655); p=0,097
<b>pN</b>	<b>Ilościowa</b>	<b>Przyrost o 1</b>	<b>HR=1,334 (95% CI: 1,001-1,779); p=0,049</b>
<b>Cukrzyca</b>	Kategoryczna	Tak	HR=1,426 (95% CI: 0,688-2,953); p=0,34
<b>Nadciśnienie</b>	Kategoryczna	Tak	HR=0,865 (95% CI: 0,487-1,536); p=0,621
<b>Inne</b>	Kategoryczna	Tak	HR=1,223 (95% CI: 0,685-2,183); p=0,496
<b>Leczenie operacyjne (Op)</b>	<b>Kategoryczna</b>	<b>Tak</b>	<b>HR=0,438 (95% CI: 0,239-0,803); p=0,008</b>
<b>RT</b>	Kategoryczna	Tak	HR=1,621 (95% CI: 0,892-2,945); p=0,113
<b>ChT</b>	Kategoryczna	Tak	HR=0,792 (95% CI: 0,336-1,868); p=0,594
<b>Palenie</b>	Kategoryczna	Tak	HR=1,393 (95% CI: 0,715-2,716); p=0,33
<b>Alkohol</b>	Kategoryczna	Tak	HR=0,768 (95% CI: 0,356-1,657); p=0,5
<b>Historia onkologiczna</b>	Kategoryczna	Tak	HR=2,05 (95% CI: 0,62-6,781); p=0,239

<b>Lokalizacja</b>	Kategoryczna	Podn/dz.g	HR=1,598 (95% CI: 0,739-3,458); p=0,233
<b>Lokalizacja</b>	Kategoryczna	Pol/dz.d	HR=0,942 (95% CI: 0,516-1,717); p=0,845

W analizie wpływu cech klinicznych na całkowite przeżycie OS (ang. *overall survival*) z zastosowaniem modelu proporcjonalnego ryzyka Coxa, płeć, wiek, Grade, lokalizacja nie posiadają znaczenia rokowniczego dla czasu przeżycia (tab. 20).

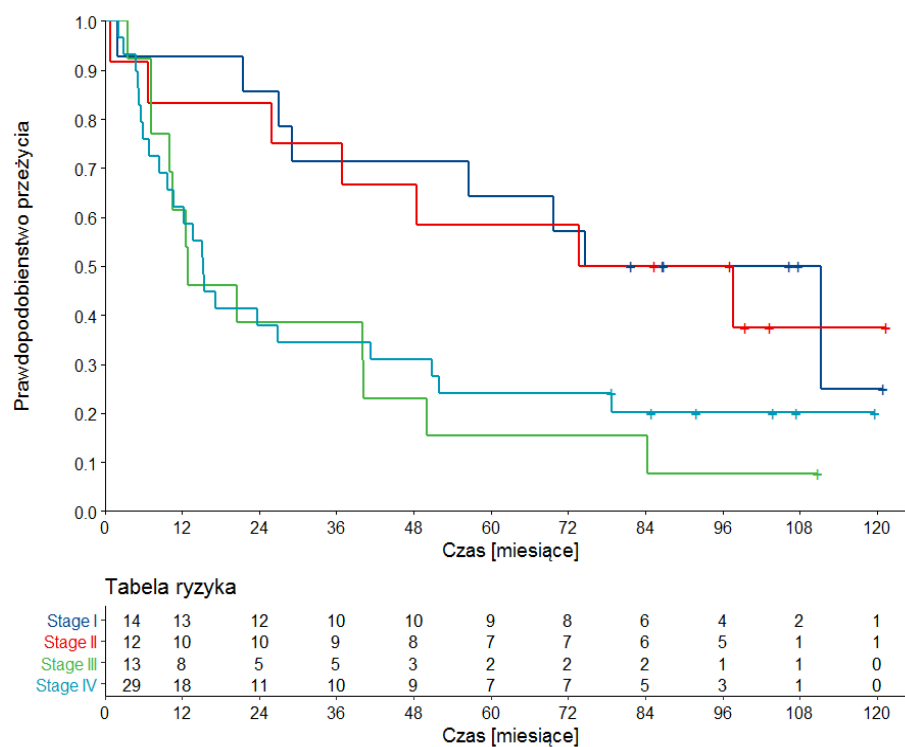
W analizowanej grupie znamiennej statystycznie wpływ na całkowite przeżycie miały:

1. Stopień zaawansowania klinicznego (ang. *staging*) (p=0,009) Wzrost o 1 wiązał się z 1,383-krotnie wyższym ryzykiem zgonu.

2. Leczenie operacyjne (p= 0,008). W każdym przypadku leczenie operacyjne wiązało się z 0,438-krotnie niższym ryzykiem zgonu w porównaniu do pacjentów niepoddanych operacji.

3. Cecha cT (p=0.022). Wzrost o 1 wiązał się z 1,354-krotnie wyższym ryzykiem zgonu.

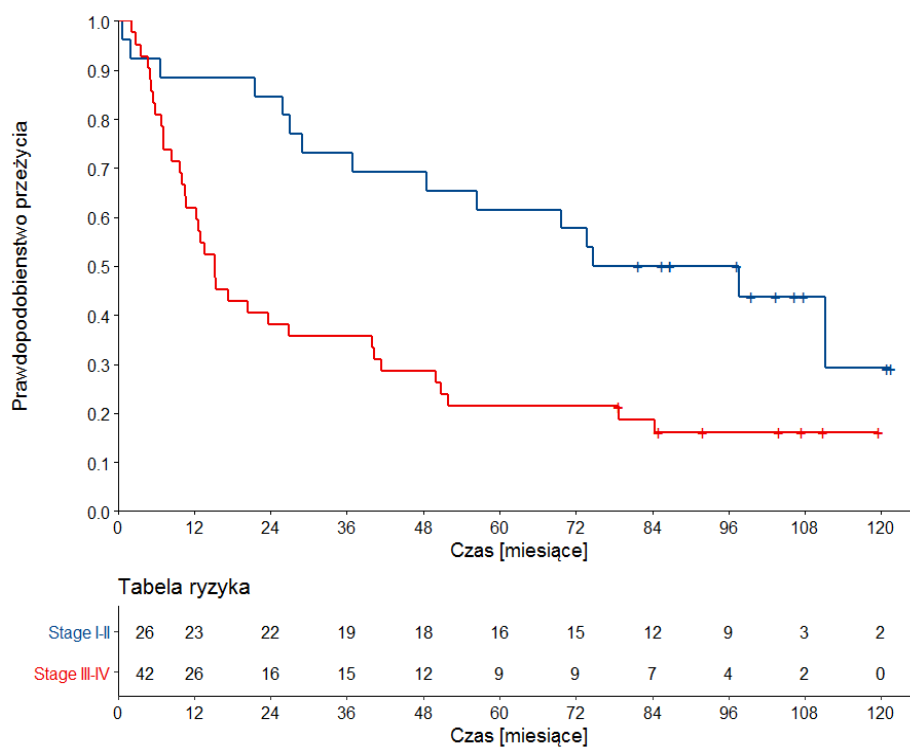
Krzywe przeżycia (Kapłana-Meiera) w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego ukazuje ryc. 25.



**Ryc. 25.** Krzywe przeżycia (Kapłana-Meiera) w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego (ang. *staging*)

**Fig. 25.** Survival curves (Kaplan-Meier) depending on clinical stage (*Stage*)

W analizie jednoczynnikowej wykazano, iż stopień zaawansowania klinicznego I i II oraz III i IV wiążą się z podobnym rokowaniem. Na potrzeby dalszych analiz wieloczynnikowych zgrupowano je razem (ryc. 26).

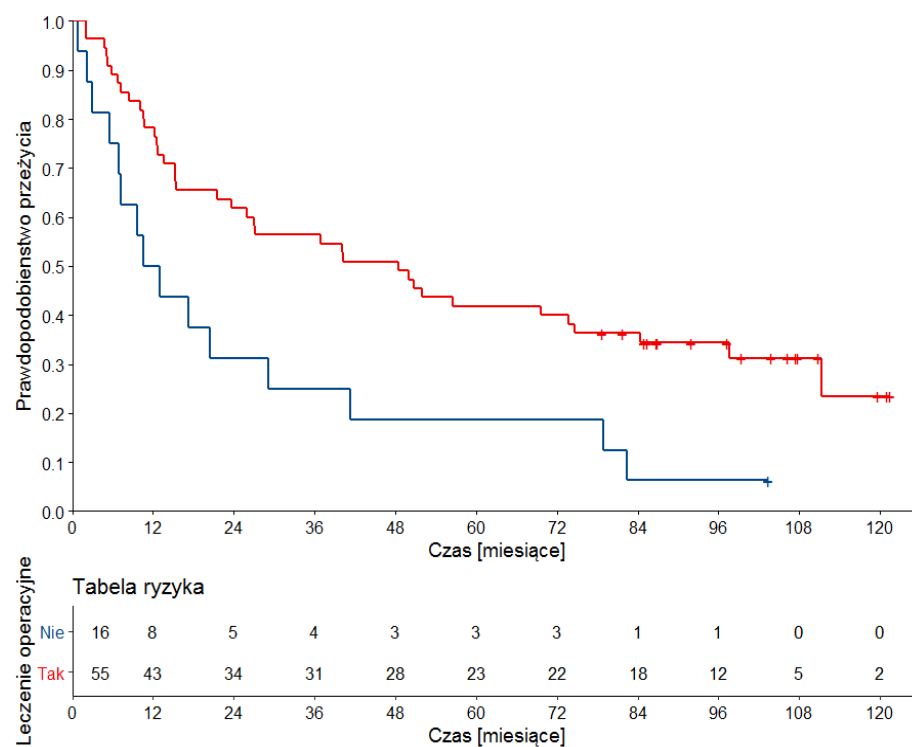


**Ryc. 26.** Krzywe przeżycia w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego (ang. *staging*) - I/II vs. III/IV

**Fig. 26.** Survival curves depending on clinical stage- I / II vs. III / IV

HR=2,535 (95% CI: 1,370-4,689); p=0,003

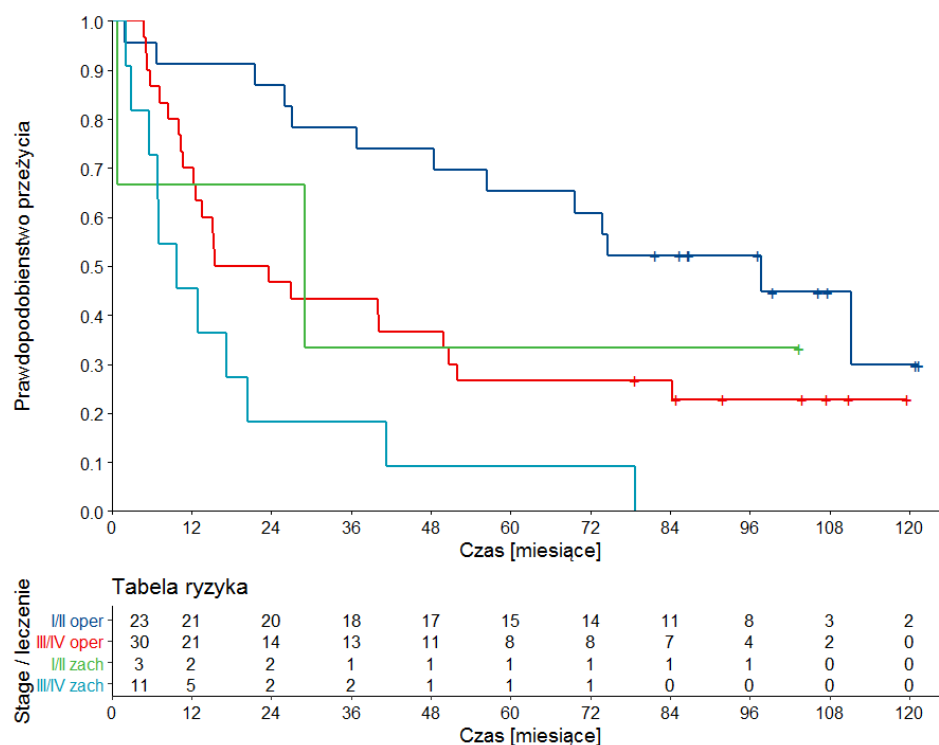
Wyższy stopień zaawansowania klinicznego (III i IV) był związany z krótszym czasem całkowitego przeżycia - OS (ryc. 27).



**Ryc. 27.** Krzywe przeżycia (OS) w zależności od zastosowania leczenia operacyjnego

**Fig. 27.** Overall Survival (OS) depending on the use of surgical treatment

Brak leczenia operacyjnego był związany z krótszym czasem całkowitego przeżycia - OS (ryc. 28).



**Ryc. 28.** Krzywe przeżycia (OS) w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego i zastosowania leczenia operacyjnego. I/II - stopień I lub II, III/IV - stopień III lub IV, oper - leczenie operacyjne, zach – radioterapia lub chemioterapia

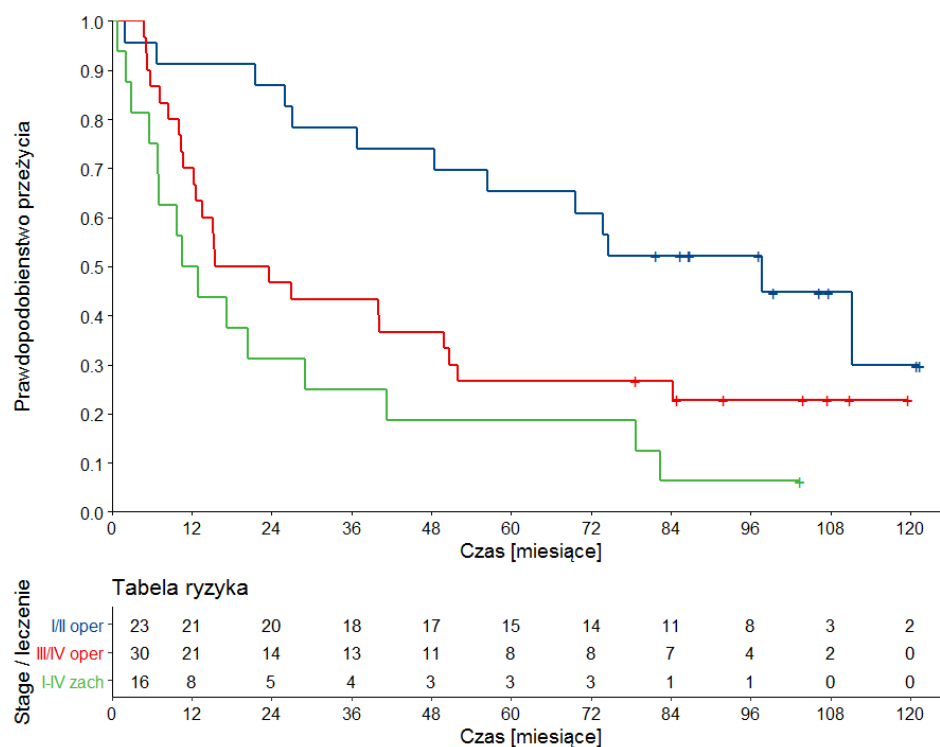
**Fig. 28.** Survival curves (OS) depending on the stage of clinical advancement and the use of surgery. I / II - stage I or II, III / IV - stage III or IV, oper - operative treatment, Zach – radiotherapy or chemotherapy

Wyższy stopień zaawansowania klinicznego (III i IV) oraz leczenie tylko radioterapią lub chemioterapią były związane z krótszym czasem całkowitego przeżycia - OS (ryc. 29).

Chorzy leczeni jedynie radioterapią lub chemioterapią mieli złe rokowanie niezależnie od stopnia zaawansowania choroby (mediana przeżycia całkowitego: 11,75 miesiąca), z kolei wśród chorych leczonych operacyjnie stopień zaawansowania klinicznego miał istotny związek z przeżyciem (mediany: 19,57 miesiąca u chorych w stopniach III i IV oraz 97,63 miesiąca u chorych w stopniach I i II). Z tego powodu, stopień zaawansowania klinicznego i sposób leczenia zostały wykorzystane, jako kliniczny punkt odniesienia do analiz wieloczynnikowych. Dla zwiększenia

przejrzystości chorych leczonych tylko radioterapią lub chemioterapią połączono w jedną grupę niezależnie od stopnia zaawansowania.

Model proporcjonalnego ryzyka Coxa uwzględniający stopień zaawansowania klinicznego oraz leczenie operacyjne (względem stage I i II) - tab. 21.



**Ryc. 29.** Krzywe przeżycia (OS) w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego i leczenia operacyjnego - stopień I i II vs. stopień III i IV vs. leczenie tylko radioterapią lub chemioterapią

**Fig. 29.** Overall Survival (OS) depending on the stage of clinical advancement and surgical treatment - stage I and II vs. stage III and IV vs radiotherapy or chemotherapy



**Tab. 21.** Model proporcjonalnego ryzyka Coxa uwzględniający stopień zaawansowania klinicznego oraz leczenie operacyjne (względem stopień I i II)

*Tab. 21. Cox proportional risk model including clinical stage and surgical treatment (relative to stage I and II)*

Zmienna	HR	95% CI	
Stopień III i IV	2,179	1,097-4,331	p=0,026
Brak leczenia operacyjnego	3,760	1,762-8,026	p<0,001

Stopień zaawansowania klinicznego I-II: HR=1

Stopień zaawansowania klinicznego III-IV: HR=2,179 (95% CI: 1,097-4,331); p=0,026

Nieoperowane: HR=3,760 (95% CI: 1,762-8,026); p<0,001

#### 4.6.1 Ekspresja markerów analizowana jako zmienna ciągła

Wyniki analizy zależności przeżycia od poziomu ekspresji badanych markerów jako bezprogowych zmiennych ciągłych zebrano w tab. 22.

**Tab. 22.** Analiza zależności przeżycia od poziomu ekspresji badanych markerów (jako bezprogowych zmiennych ciągłych)

*Tab. 22. Analysis of survival dependence on the expression level of the markers tested (as non-threshold continuous variables)*

Zmienna	Typ	Wartość	OS
<b>SNAIL1.IHC</b>	Ilościowa	Przyrost o 1	1,002 (95% CI: 0,999-1,006); p=0,231
<b>SNAIL1.mRNA</b>	<b>Ilościowa</b>	<b>Przyrost o 1</b>	<b>1,49 (95% CI: 1,142-1,946); p=0,003</b>
<b>SNAIL2.IHC</b>	Ilościowa	Przyrost o 1	1,001 (95% CI: 0,998-1,005); p=0,511
<b>SNAIL2.mRNA</b>	Ilościowa	Przyrost o 1	1,094 (95% CI: 0,876-1,366); p=0,429
<b>ZNF281.IHC</b>	Ilościowa	Przyrost o 1	1,003 (95% CI: 0,997-1,008); p=0,355
<b>ZNF281.mRNA</b>	Ilościowa	Przyrost o 1	0,877 (95% CI: 0,54-1,423); p=0,594

Zaobserwowano związek zwiększonej ekspresji *SNAIL1* na poziomie mRNA z krótszym czasem przeżycia (p=0,003). Wzrost ekspresji o 1 jednostkę wiązał się z 1,49-krotnie wyższym ryzykiem zgonu.

#### 4.6.2 Ekspresja markerów zdychotomizowana

Wyniki analizy zależności przeżycia od zdychotomizowanego poziomu ekspresji badanych markerów, zebrano w tab. 23.

**Tab. 23.** Analiza zależności przeżycia od zdychotomizowanego poziomu ekspresji badanych markerów

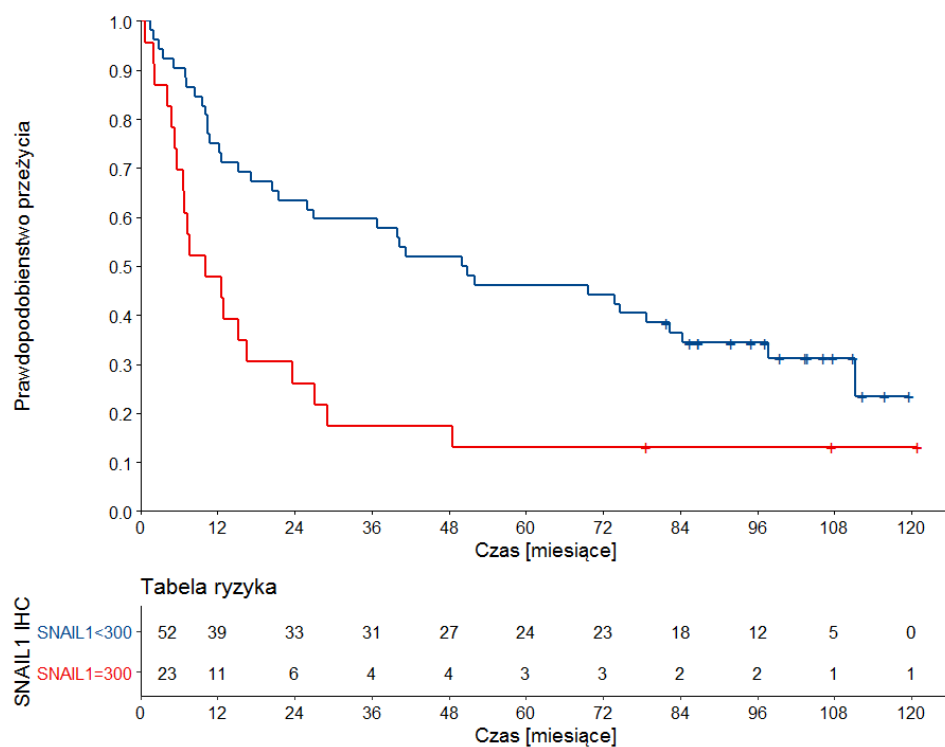
*Tab. 23. Analysis of survival dependence on the dichotomized level of expression of the markers studied*

Zmienna	Typ	Wartość	OS
<b>SNAIL1 IHC</b>	<b>Kategoryczna</b>	<b><math>\geq 300</math></b>	<b>2,333 (95% CI: 1,335-4,076); p=0,003</b>
<b>SNAIL1 mRNA</b>	<b>Kategoryczna</b>	<b><math>&gt; 1.13</math></b>	<b>3,048 (95% CI: 1,309-7,096); p=0,010</b>
<b>SNAIL2 IHC</b>	Kategoryczna	$> 0$	1,249 (95% CI: 0,736-2,119); p=0,410
<b>SNAIL2 mRNA</b>	Kategoryczna	$> 1$	0,785 (95% CI: 0,414-1,491); p=0,460
<b>ZNF281 IHC</b>	Kategoryczna	$\geq 100$	1,409 (95% CI: 0,802-2,474); p=0,233
<b>ZNF281 mRNA</b>	Kategoryczna	$> 1$	0,805 (95% CI: 0,449-1,443); p=0,466

Zbadano wartości graniczne ekspresji *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZNF281* na poziomie białka oraz mRNA o znaczeniu prognostycznym, oddzielające niski i wysoki poziom ekspresji markera. Ustalono 2 prognostycznie istotne wartości progowe:

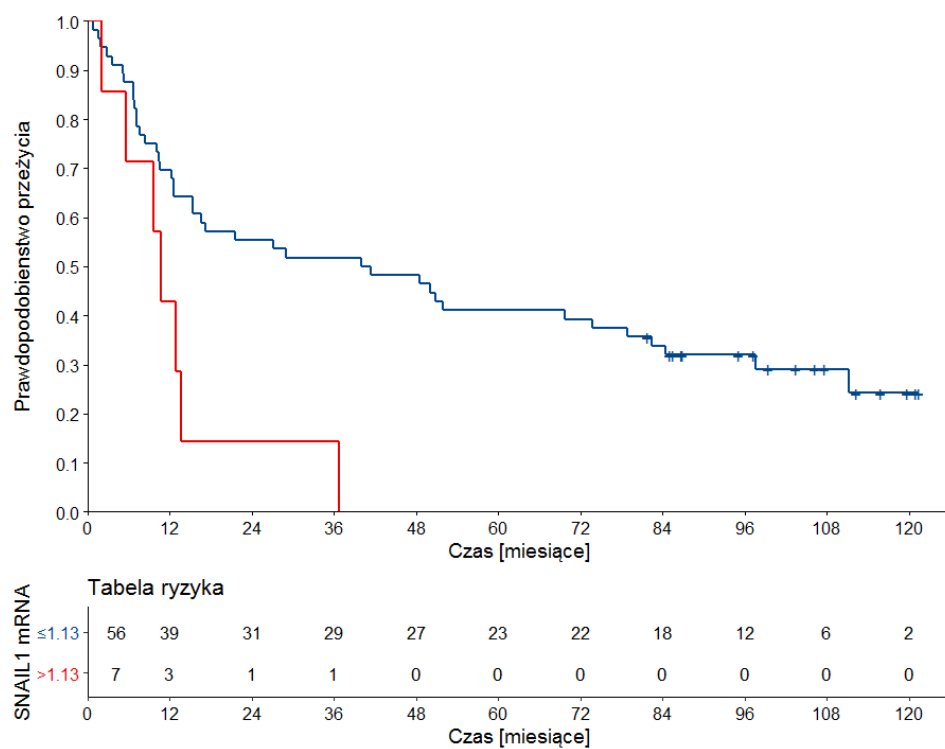
- dla ekspresji *SNAIL1* na poziomie białka - H-score 300 (p=0,003),
- dla ekspresji *SNAIL1* na poziomie mRNA - ekspresja względna na poziomie 1,13 (p=0,010).

Różnice w poziomie przeżycia ilustrują krzywe Kaplana-Meyera (ryc. 30 i 31).



**Ryc. 30.** Krzywa przeżycia Kaplana-Meyera - różnice w poziomie przeżycia w zależności od wartości ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie białka

**Fig. 30.** Kaplan-Meier survival curve - differences in survival depending on *SNAIL1* expression value at the protein level



**Ryc. 31.** Krzywa Kaplana-Meyera - różnice w poziomie przeżycia w zależności od wartości ekspresji *SNAIL1* na poziomie mRNA

*Fig. 31. Kaplan-Meyer curve - differences in survival depending on SNAIL1 expression value at mRNA level*

Wysoki poziom ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie białka (H-score = 300) oraz mRNA (względna ekspresja > 1,13) wiązał się ze skróconym czasem przeżycia (OS).

#### 4.6.3 Modele wieloczynnikowe

Wyniki zastosowania wieloczynnikowego modelu regresji ryzyka proporcjonalnego Cox'a czasu przeżycia, ukazuje tab. 24.

**Tab. 24.** Wieloczynnikowy model regresji ryzyka proporcjonalnego Cox'a czasu przeżycia

*Tab. 24. Multivariate Cox proportional risk regression model of survival*

Stopień zaawansowania klinicznego/Leczenie operacyjne + SNAIL1 IHC	Stage/operacja: HR=1,916 (95% CI: 1,303-2,817); p=0,001
	SNAIL1 IHC: HR=1,774 (95% CI: 0,93-3,387); p=0,082
Stopień zaawansowania klinicznego /Leczenie operacyjne + SNAIL1 mRNA (ciągła)	Stage/operacja: HR=1,928 (95% CI: 1,293-2,875); p=0,001
	SNAIL mRNA (ciągła): HR=1,112 (95% CI: 0,883-1,402); p=0,367
Stopień zaawansowania klinicznego /Leczenie operacyjne	Stage/operacja: HR=1,867 (95% CI: 1,251-2,785); p=0,002

+ <b>SNAIL1 mRNA (zdychotomizowana)</b>	<b>SNAIL mRNA (zdychotomizowana):</b> <b>HR=2,81 (95% CI: 1,083-7,293); p=0,034</b>
---	--

W analizie wieloczynnikowej uwzględniono:

- Stopień zaawansowania klinicznego Stage (uproszczony do I-II vs. III-IV) + Leczenie operacyjne,
- SNAIL1 IHC (=300),
- SNAIL1 mRNA (ciągła i >1.13).

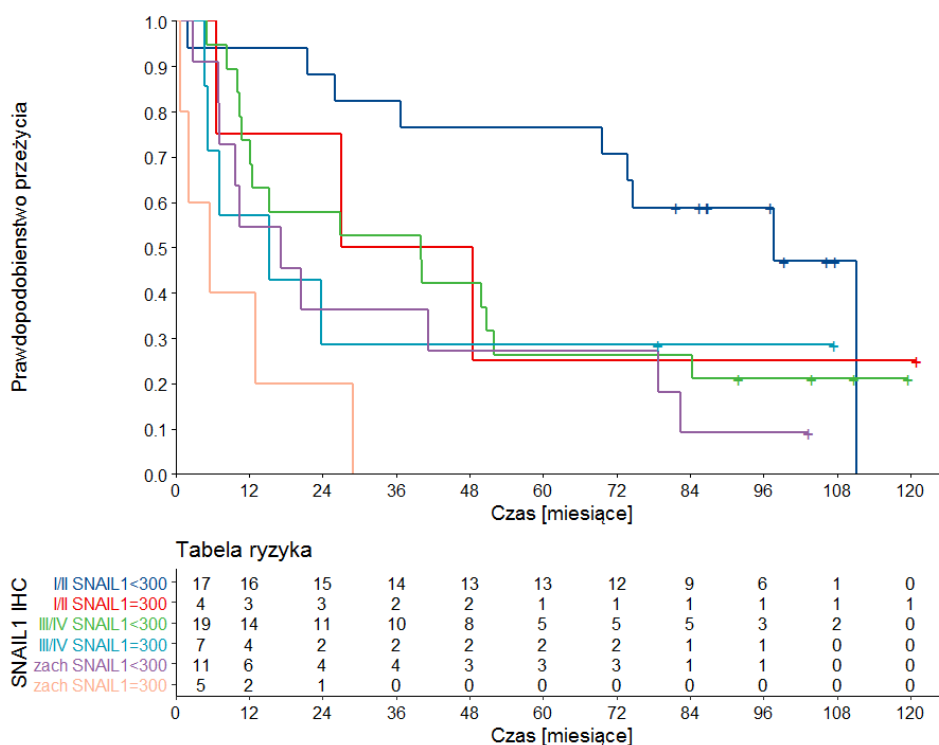
**Tab. 25.** Częstość poziomu ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie białka w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego

*Tab. 25. Frequency of SNAIL1 expression level at the protein level depending on Stage*

		<b>SNAIL1 IHC</b>	
		Niska (L)	Wysoka (H)
<b>Stopień zaawansowania klinicznego / leczenie operacyjne</b>	I-II	17	4
	III-IV	19	7
	Nieop.	11	5

Analiza wieloczynnikowa wskazuje, że wpływ poziomu ekspresji *SNAIL1* na przeżycie nie był statystycznie istotny ( $p > 0,05$ ) w odniesieniu do wpływu stopnia zaawansowania klinicznego i metody leczenia (Tab. 25).

Różnice w poziomie przeżycia w zależności od wartości ekspresji *SNAIL1* na poziomie białka w przypadkach operacyjnych przy Stage I-II i przy Stage III-IV oraz w przypadkach nieoperacyjnych, ukazuje krzywa przeżycia Kaplana-Meyera (ryc. 32).



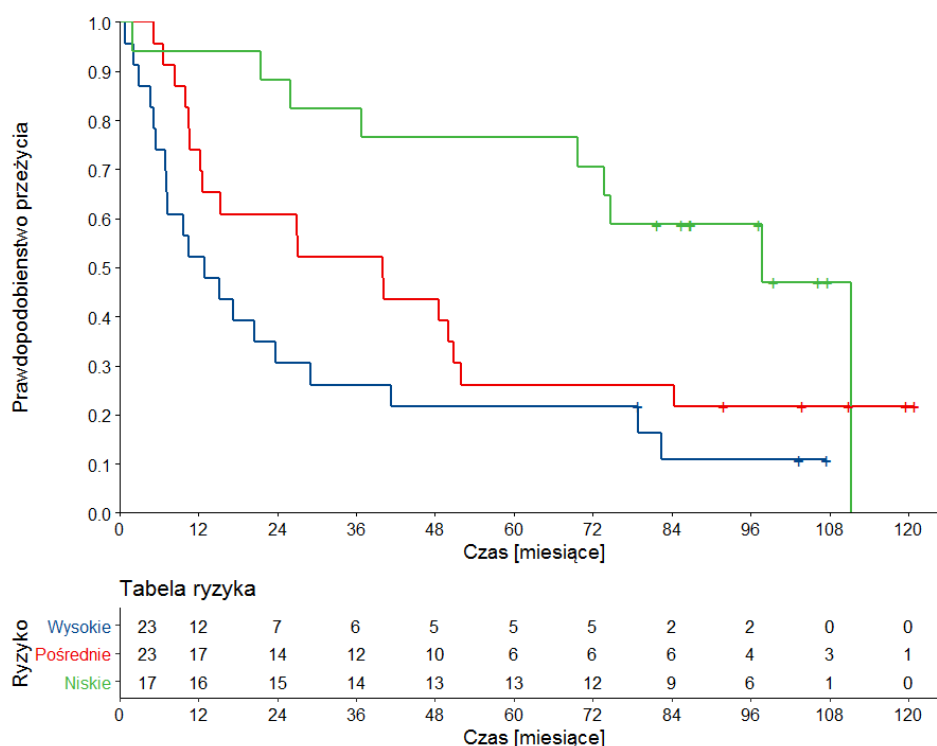
**Ryc. 32.** Krzywa przeżycia Kaplana-Meyera - różnice w poziomie przeżycia w zależności od wartości poziomu ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie białka w przypadkach operacyjnych przy stopniu I-II i przy stopniu III-IV oraz w przypadkach nieoperacyjnych

**Fig. 32.** Kaplan-Meyer survival curve - differences in survival depending on the expression value of *SNAIL1* at the protein level in operational cases at Stage I-II and Stage III-IV, and in non-operational cases

1. Ekspresja *SNAIL1* na poziomie białka w komórkach raka jamy ustnej może być dodatkowym czynnikiem prognostycznym.
2. Wykazano korelację wysokiego poziomu ekspresji genu *SNAIL1* z takimi czynnikami jak kwalifikacja do zabiegu operacyjnego oraz stopień zaawansowania klinicznego.
3. Scalono komponenty podgrup o pośrednim i wysokim ryzyku oraz wykazano, że:
  - Najlepiej rokują przypadki leczonego chirurgicznie, nisko zaawansowanego raka (stopień I-II) z niskim poziomem ekspresji *SNAIL1* (**niskie ryzyko**),

- Przypadki leczonego chirurgicznie, nisko zaawansowanego raka (stopień I-II) z wysokim poziomem ekspresji *SNAIL1* oraz leczonego chirurgicznie, zaawansowanego raka (stopień III-IV) z niskim poziomem ekspresji genu *SNAIL1* rokują podobnie i wiążą się z około 2-krotnie wyższym ryzykiem zgonu: HR=2,123 (95% CI: 0,948-4,756); p=0,067 (**pośrednie ryzyko**),
- Rokowanie chorych z rakiem leczonym jedynie radioterapią lub chemioterapią (niezależnie od stopnia zaawansowania i poziomu ekspresji genu *SNAIL1*) oraz chorych z leczonym operacyjnie, z zaawansowanym rakiem (stopień II-IV) o wysokim poziomie ekspresji *SNAIL1* jest najgorsze i wiąże się z niemal 4-krotnie wyższym ryzykiem zgonu: HR=3,645 (95% CI: 1,641-8,097); p=0,001 (**wysokie ryzyko**).

Różnice w poziomie przeżycia w podgrupach powstałych po scaleniu komponentów o pośrednim, niskim i wysokim ryzyku, uwzględniających ekspresję genu dla białka SNAIL1 (IHC), obrazuje krzywa przeżycia Kaplana-Meyera (ryc. 33).



**Ryc. 33.** Krzywa przeżycia Kaplana-Meyera - różnice w poziomie przeżycia w podgrupach powstałych po scaleniu komponentów o pośrednim, niskim i wysokim ryzyku, uwzględniających ekspresję genu dla białka SNAIL1 (IHC)



**Fig. 33.** *Kaplan-Meyer survival curve - differences in survival levels in subgroups formed after intermediate, low and high-risk components integrating SNAIL1 (IHC) expression*

W tab. 26 wskazano zależność między częstością poziomu ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie mRNA i stopnia zaawansowania Stage.

**Tab. 26.** Częstość poziomu ekspresji *SNAIL1* na poziomie mRNA w zależności od stopnia zaawansowania Stage

**Tab. 26.** *Frequency of SNAIL1 expression level at mRNA level depending on Stage stage*

		<b>SNAIL1 mRNA</b>	
		Niska (L)	Wysoka (H)
<b>Stopień zaawansowania klinicznego / leczenie operacyjne</b>	I-II	18	1
	III-IV	17	2
	Nieop.	11	3

Grupa chorych z wysoką ekspresją *SNAIL1* na poziomie mRNA była zbyt mała (5 chorych), aby możliwa była analiza podgrup.

#### **4.7. Korelacje między poziomem ekspresji markerów**

Miara zależności pomiędzy ekspresją poszczególnych czynników transkrypcyjnych na poziomie białka, wyrażona została przy pomocy współczynnika korelacji tau Kendalla. Różni autorzy przyjmują różne definicje, kiedy można mówić o silnej bądź słabej korelacji w zależności od wartości tau. Na potrzeby analizy przyjęto wartości zebrane w tab. 27.

**Tab. 27.** Siła korelacji na podstawie wartości współczynnika tau Kendalla

*Tab. 27. Correlation strength based on the value of the Kendall tau coefficient*

Siła korelacji	Zakres wartości współczynnika tau	
	Korelacja dodatnia	Korelacja ujemna
<b>Silna</b>	od 0,5 do 1,0	od -0,5 do -1,0
<b>Średnia</b>	od 0,3 do 0,5	od -0,3 do -0,5
<b>Słaba</b>	do 0,3	do -0,3

#### 4.7.1. Korelacje między poziomem ekspresji markerów na poziomie białka

Przeprowadzono analizę korelacji poziomu ekspresji w trzech wariantach w zależności od analizowanych próbek. Niezależnie od opcji analizy tj.: wszystkie próbki (raki oraz kontrole) oraz każdy bioptat osobno/uśredniony poziom, obserwujemy:

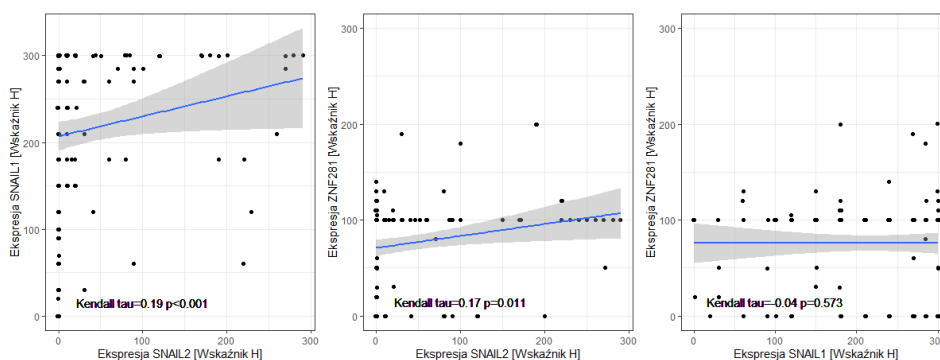
- słabą korelację pomiędzy poziomem ekspresji genów dla białek SNAIL1-SNAIL2,
- bardzo słabą korelację pomiędzy poziomem ekspresji genów dla białek SNAIL2-ZNF281,
- praktycznie brak korelacji pomiędzy poziomem ekspresji genów dla białek SNAIL1-ZNF281.

**Wszystkie próbki / każdy bioptat osobno (ryc. 34):**

**SNAIL2 - SNAIL1:** tau=0.19 p<0.001

**SNAIL2 - ZNF281:** tau=0.17 p=0.011

**SNAIL1 - ZNF281:** tau=0.04 p=0.573



**Ryc. 34.** Analiza korelacji ekspresji genów dla białek SNAIL1, SNAIL2 oraz ZNF281 w grupie raków oraz grupie kontrolnej (na poziomie pojedynczych bioptatów)

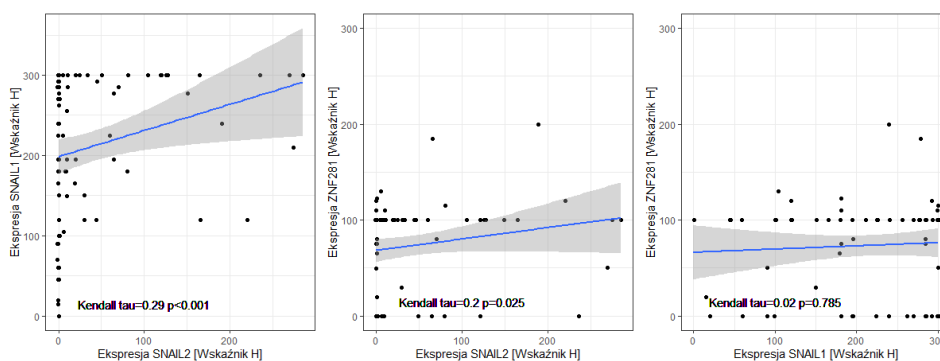
*Fig. 34. Correlation analysis of SNAIL1, SNAIL2 and ZNF281 protein expression for oral cancer group and controls (at the level of single biopsies)*

**Wszystkie próbki / uśredniony poziom (ryc. 35):**

**SNAIL2 - SNAIL1:** tau=0,29 p<0,001

**SNAIL2 - ZNF281:** tau=0,2 p=0,025

**SNAIL1 - ZNF281:** tau=0,02 p=0,785



**Ryc. 35.** Analiza korelacji ekspresji genów dla białek SNAIL1, SNAIL2 oraz ZNF281 w grupie raków oraz grupie kontrolnej (wartości uśrednione)

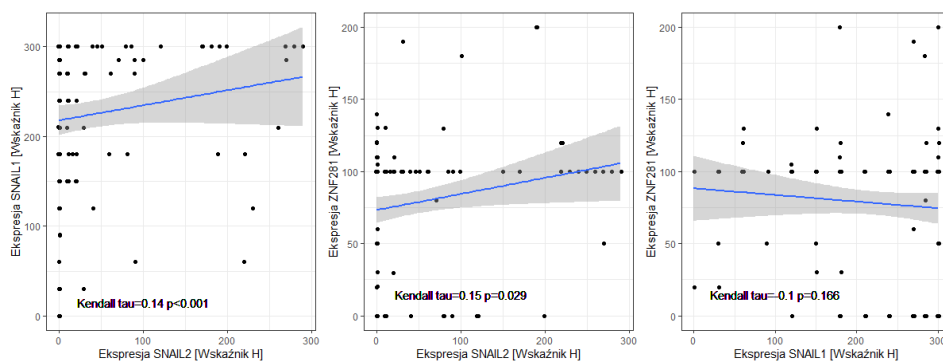
*Fig. 35. Correlation analysis of SNAIL1, SNAIL2 and ZNF281 protein expression for oral cancer group and controls (averaged values)*

**Tylko rak / każdy bioptat osobno (ryc. 36):**

**SNAIL2 - SNAIL1:** tau=0,14 p<0,001

**SNAIL2 - ZNF281:** tau=0,15 p=0,029

**SNAIL1 - ZNF281:** tau=-0,10 p=0,166



**Ryc. 36.** Analiza korelacji ekspresji genów dla białek SNAIL1, SNAIL2 oraz ZNF281 dla grupy raka (na poziomie pojedynczych biopciatów tkankowych)

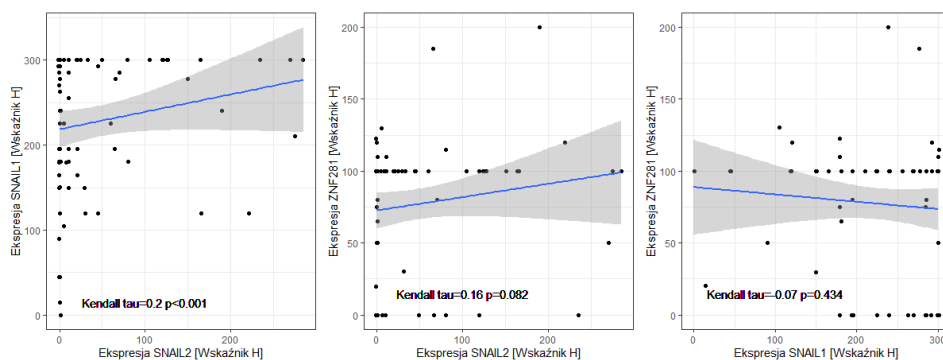
**Fig. 36.** Correlation analysis of SNAIL1, SNAIL2 and ZNF281 protein expression for oral cancer group (at the level of individual tissue biopsies)

**Tylko pierwotne / uśredniony poziom (ryc. 37):**

**SNAIL2 - SNAIL1:** tau=0,2 p<0,001

**SNAIL2 - ZNF281:** tau=0,16 p=0,082

**SNAIL1 - ZNF281:** tau=-0,07 p=0,434



**Ryc. 37.** Analiza korelacji ekspresji genów dla białek SNAIL1, SNAIL2 oraz ZNF281 dla grupy raka (wartości uśrednione)

**Fig. 37.** Correlation analysis of SNAIL1, SNAIL2 and ZNF281 protein expression for oral cancer group (averaged values)

#### 4.7.2. Korelacje między poziomem ekspresji markerów na poziomie mRNA

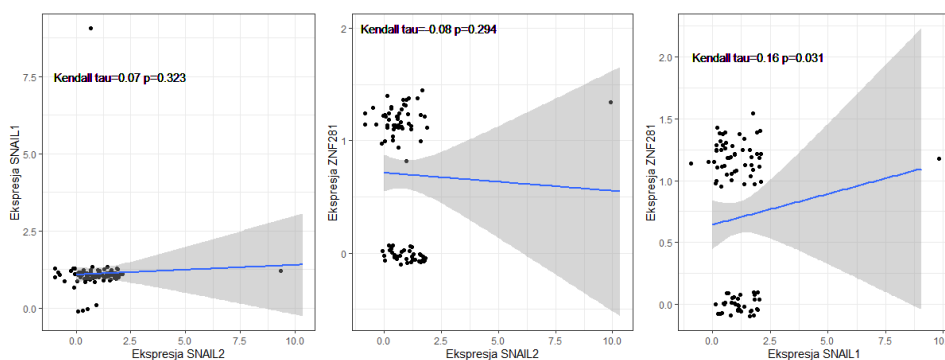
Przeprowadzono analizę korelacji poziomu ekspresji *SNAIL1*, *SNAIL2* i *ZNF281* na poziomie mRNA, lecz nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności.

**Wszystkie próbki (ryc. 38):**

**SNAIL2 - SNAIL1:** tau=0,07 p=0,323

**SNAIL2 - ZNF281:** tau=0,08 p=0,294

**SNAIL1 - ZNF281:** tau=0,16 p=0,031



**Ryc. 38.** Analiza korelacji ekspresji genów *SNAIL1*, *SNAIL2* oraz *ZNF281* na poziomie mRNA dla wszystkich próbek (grupa raków oraz kontroli)

**Fig. 38.** Correlation analysis of *SNAIL1*, *SNAIL2* and *ZNF281* expression at the mRNA level for all samples (oral cancer group and controls)

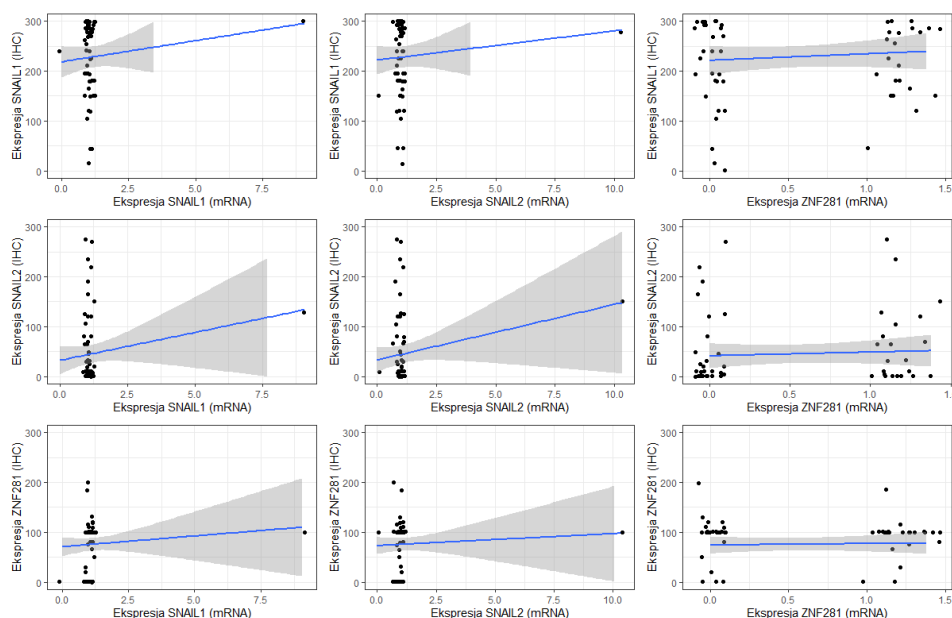
#### 4.8. Zależność między ekspresją markerów na poziomie mRNA i białka w raku jamy ustnej

Dla 60 (73,2%) przypadków uzyskano dane dotyczące poziomu ekspresji *SNAIL1* zarówno na poziomie białka jak i mRNA.

Dla 62 (75,6%) przypadków uzyskano dane dotyczące poziomu ekspresji *SNAIL2* zarówno na poziomie białka jak i mRNA.

Dla 62 (75,6%) przypadków uzyskano dane dotyczące poziomu ekspresji *ZNF281* zarówno na poziomie białka jak i mRNA.

Wyniki ukazuje ryc. 39 i tab. 28.



**Ryc. 39.** Analiza korelacji ekspresji *SNAIL1*, *SNAIL2* oraz *ZNF281* na poziomie białka oraz mRNA dla grupy raków jamy ustnej

**Fig. 39.** Correlation analysis of *SNAIL1*, *SNAIL2* and *ZNF281* expression at the protein level and mRNA for oral cancer group

**Tab. 28.** Analiza korelacji ekspresji *SNAIL1*, *SNAIL2* oraz *ZNF281* na poziomie białka oraz mRNA dla grupy raków jamy ustnej

**Tab. 28.** *Correlation analysis of SNAIL1, SNAIL2 and ZNF281 expression at the protein level and mRNA for oral cancer group*

	<b>SNAIL1.mRNA</b>	<b>SNAIL2.mRNA</b>	<b>ZNF281.mRNA</b>
<b>SNAIL1.IHC</b>	tau=-0.014 p=0.882	tau=-0.052 p=0.574	tau=0.033 p=0.744
<b>SNAIL2.IHC</b>	tau=0.037 p=0.692	tau=-0.054 p=0.565	tau=0.035 p=0.732
<b>ZNF281.IHC</b>	tau=0.031 p=0.746	tau=0.035 p=0.716	tau=-0.012 p=0.908

Przeanalizowano zależność pomiędzy ekspresją badanych czynników transkrypcyjnych na poziomie mRNA i białka. W przypadku wszystkich zestawień badających ekspresję mRNA/IHC badanych białek wyniki wskazują na brak istotnego statystycznie takiego powiązania.

## 5. DYSKUSJA

Rak jamy ustnej ze względu na częstość występowania oraz inwazyjność jest dużym problemem klinicznym i społecznym. Wśród czynników ryzyka podaje się przede wszystkim palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, narażenie na promieniowanie ultrafioletowe, zakażenia wirusowe.

### 5.1. Analiza czynników epidemiologicznych, klinicznych i histopatologicznych

Nowotwory płaskonabłonkowe regionu głowy i szyi (HNSCC, ang. *head and neck squamous cell carcinoma*) zajmują szóste miejsce pod względem częstości występowania wśród wszystkich nowotworów, z czego 48% zlokalizowane jest w obrębie jamy ustnej [49]. 90% nowotworów występujących w tej lokalizacji stanowi rak płaskonabłonkowy (OSCC, ang. *oral squamous cell carcinoma*). W odniesieniu do wszystkich nowotworów złośliwych człowieka, rak jamy ustnej stanowi 0,55-1% oraz zajmuje jedenaste miejsce pod względem częstości występowania [57, 156, 193].

W zebranych materiałach do badania włączono 82 pacjentów, z czego 69,5% stanowili mężczyźni, a 30,5% kobiety. Do zachorowań najczęściej dochodziło między 60 a 72 rokiem życia. W ponad 60% nowotwór zlokalizowany był w okolicy dna jamy ustnej i na języku.

Gontarz i wsp. [62] przebadali w okresie od 2000 do 2011 roku 60 pacjentów z rakiem języka i dna jamy ustnej, ze średnią wieku 56,5 lat, z czego aż 76,7% stanowili mężczyźni, a jedynie 23,3% kobiety. W badaniach wielośrodkowych prowadzonych przez Shilda i wsp. [171] były porównywalne wyniki. Badacze przeanalizowali częstość występowania raka jamy ustnej w zależności od położenia geograficznego, płci i wieku w roku 2012 na kilku kontynentach, obejmujących Europę, Amerykę Północną, Australię, Azję i Afrykę. W 2012 roku stwierdzili ponad 529 500 nowo rozpoznanych przypadków raka wargi, jamy ustnej i gardła,



co stanowiło 3,8% wszystkich nowotworów. Shield i wsp. [171] ocenili częstość występowania raka jamy ustnej, wargi i gardła na 3,8%. Mężczyźni stanowili 70,8%, a kobiety 29,2%. Analizując natomiast wzrastanie zachorowalności na ten typ nowotworu i zmiany demograficzne stwierdzili, że z dużym prawdopodobieństwem można przewidzieć zwiększenie się tej zachorowalności o 62% do roku 2035.

Czynnik etiologiczny w postaci zakażenia wirusem HPV w nowotworach jamy ustnej odgrywa bardzo istotną rolę. Zwraca uwagę wzrastająca częstość występowania tego typu nowotworów nie tylko w jamie ustnej, ale też w obrębie głowy i szyi. Według niektórych danych nowotwory jamy ustnej i gardła zależne od HPV, stanowią od 17 do 56% [81, 82, 114, 145, 171].

Średni okres obserwacji w badanej grupie wynosił 26 miesięcy, a 5-letnie przeżycie 36,6%. Rokowanie u chorych na raka jamy ustnej jest wysoce zależne od lokalizacji, podtypu histologicznego, stopnia zróżnicowania, stadium oraz lokalizacji guza. Na przykład rak języka ze względu na swoje bogate unaczynienie, ma dużą skłonność do inwazyjnego wzrostu i tworzenia przerzutów, rokuje gorzej. Natomiast w raku jamy ustnej związanym z infekcją HPV, rokowanie jest lepsze [48, 98].

Powszechnie uznanym prognostykiem w nowotworach głowy i szyi (OSCC) jest stopień zaawansowania nowotworu. Większość pacjentów przy rozpoznaniu ma już nowotwór w zaawansowanym stadium, a późne rozpoznanie nowotworu przyczynia się do gorszego rokowania. W badanym materiale około 35,4% pacjentów, w chwili rozpoznania miało czwarty stopień zaawansowania (Stage) nowotworu. 5-letni wskaźnik przeżycia w stadium I i II szacuje się między 65,6% a 96%, co w porównaniu ze wskaźnikiem u pacjentów z zaawansowanym stadium, który wynosi około 46%, wskazuje na korzyści wynikające z zastosowania szybkiej diagnostyki [8, 62, 110].

W analizowanej grupie stopień zaawansowania klinicznego był istotnym czynnikiem rokowniczym. Wzrost o jeden stopień zaawansowania wiązał się z 1,3 - krotnie wyższym ryzykiem zgonu. Wyższe stopnie zaawansowania klinicznego (III i IV) były związane z krótszym czasem całkowitego przeżycia. Na podstawie

przeprowadzonych badań stwierdzono też, że możliwość przeprowadzenia zabiegu operacyjnego w istotny sposób zmniejszała ryzyko zgonu. Za każdym razem leczenie operacyjne wiązało się z 0,4 - krotnie niższym ryzykiem zgonu w porównaniu do pacjentów niepoddanych operacji, a brak leczenia operacyjnego był związany z krótszym czasem całkowitego przeżycia. Powodem tego jest prawdopodobnie możliwość przeprowadzenia zabiegu operacyjnego u chorych z niższym stopniem zaawansowania raka jamy ustnej.

W ocenie zaawansowania procesu nowotworowego dużą rolę odgrywa stosowana i modyfikowana wraz z rozwojem wiedzy, klasyfikacja TNM. W analizowanej grupie chorych wykorzystano siódmą edycję tej klasyfikacji. Wielkość guza pierwotnego wpływa zarówno na wybór, jak i wynik leczenia. Oceny kliniczne stopnia zaawansowania nowotworu w klasyfikacji TNM oparte są na największym wymiarze guza dla kategorii T1 - T3 oraz zaangażowaniu określonych struktur (takich jak kość i skóra) dla T4. Duże guzy mają większe ryzyko miejscowego nawrotu i przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, co wiąże się ze złym rokowaniem [27, 63, 156].

W analizowanym materiale najwięcej pacjentów zostało sklasyfikowanych jako T2N0 i T4N2, a po badaniu histopatologicznym największą ilość pacjentów można było scharakteryzować jako T2N0. W badanej grupie wykazano wysoką zgodność w zakresie cechy T pomiędzy oceną kliniczną i patologiczną na podstawie testu Kappa Cohena. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono ponadto, że zwiększenie wielkości guza, powodujące podwyższenie o jeden stopień w klasyfikacji TNM, wiązało się z ok. 1,3 - krotnie wyższym ryzykiem zgonu. Analizując powyższe czynniki ryzyka stwierdzono, że chorzy leczeni tylko radioterapią lub chemioterapią mieli gorsze rokowanie niezależnie od stopnia zaawansowania choroby. Mediana przeżycia całkowitego wynosiła w tej grupie 11,75 miesiąca. Z kolei wśród chorych leczonych operacyjnie stopień zaawansowania klinicznego miał istotny związek z przeżyciem. Mediana przeżycia całkowitego wynosiła 19,57 miesięcy u chorych z III i IV stopniem zaawansowania oraz 97,63 miesięcy u chorych z I i II stopniem zaawansowania.

Kolejnym czynnikiem prognostycznym w raku jamy ustnej jest stopień

zróżnicowania nowotworu. Większość nowotworów jamy ustnej to zmiany wysoko zróżnicowane. Także w badanym materiale u 89% pacjentów stwierdzono I i II stopień zróżnicowania (G1, G2). Uważa się, że raki niskozróżnicowane są bardziej agresywne w stosunku do raków o średnim i wysokim stopniu zróżnicowania. Stopień zróżnicowania nie zawsze koreluje z wynikiem leczenia. Ważniejsze wydają się być pewne cechy histologiczne, które wpływają na stopień inwazyjności i skłonność do tworzenia przerzutów. Do takich cech zalicza się naciekanie okołonерwowe oraz naciekanie naczyń limfatycznych i mięśni [22, 77, 148]. Istotnym czynnikiem, mającym pozytywny wpływ na rokowanie, jest resekcja guza z odpowiednim, wynoszącym powyżej 5 mm, marginesem zdrowych tkanek [63, 148].

## 5.2. Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna

Zdolność do tworzenia przerzutów jest jednym z ważniejszych czynników rokowniczych. Badania Gontarza [62] oraz Pimenty i wsp. [148] potwierdziły, że zajęcie węzłów chłonnych należy do czynników o istotnym znaczeniu prognostycznym, wskazującym na gorsze rokowanie. Komórki zdolne do tworzenia przerzutów charakteryzują się pewnymi zmianami morfologicznymi i molekularnymi oraz promigracyjnym fenotypem mezenchymalnym. Często występują w nich zmiany genetyczne i epigenetyczne, a same komórki, w wyniku zachodzących przemian zyskują nowe właściwości, w tym większą inwazyjność i ruchliwość, co sprzyja migracji [31, 130]. Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) jest procesem w wyniku którego komórki tracą swoje właściwości nabłonkowe i przyjmują fenotyp komórek mezenchymalnych.. Jedną z charakterystycznych zmian jest tak zwany ang. *cadherin switch*, czyli zmniejszenie się w komórkach poziomu E-kadheryny i pojawienie się N-kadheryny, białka charakterystycznego dla komórek mezenchymalnych, co jest obserwowane w progresji wielu chorób nowotworowych [35]. Lascombe i wsp. [102] badali rolę N-kadheryny u pacjentów z rakiem

pęcherza moczowego. Opierali się na założeniu, że zmniejszenie ekspresji genu dla E-kadheryny, i zwiększenie poziomu N-kadheryny wiąże się z większą inwazyjnością i zdolnością do tworzenia przerzutów. W swoich badaniach wykazali brak ekspresji *N-kadheryny* w prawidłowym nabłonku pęcherza moczowego, pojawienie się jej u 14% pacjentów z guzem powierzchniowym pT1 i aż u 60% pacjentów z guzem inwazyjnym pT2 i pT3. W guzach inwazyjnych zwiększona ekspresja *N-kadheryny* była powiązana z utratą ekspresji *E-kadheryny*. Autorzy, na podstawie analizy przeżycia wolnego od progresji i wieloczynnikowej analizy ustallili, że N-kadheryna może być niezależnym markerem prognostycznym w raku pęcherza moczowego, szczególnie mniej zaawansowanego, powierzchniowego, pT1 [102].

W zależności od typu przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej, może ona zachodzić zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych [33, 41, 93].

Proces EMT wiąże się ze znacznymi zmianami w morfologii i właściwościach komórek, oddziaływaniach międzykomórkowych i w reakcjach z podścieliskiem. Wszystkie te procesy wpływają na utratę połączeń międzykomórkowych, zwiększają zdolność komórek do większej ruchliwości, migracji, przyczyniając się do zwiększenia inwazyjności. Jest to pierwszy krok w progresji nowotworu i tworzeniu przerzutów [182].

Istotnym mechanizmem zachodzącym w czasie EMT jest hamowanie apoptozy, a zmieniona wrażliwość na apoptozę jest podstawowym czynnikiem ograniczającym skuteczność działania leków cytostatycznych [132, 174].

### **5.3. Czynniki transkrypcyjne**

Czynniki transkrypcyjne należą do głównych regulatorów procesu EMT. Czynniki transkrypcyjne biorące udział w procesie EMT to białka z motywem helisa-pętla-helisa TWIST i E47, białka z motywem palca cynkowego SNAIL1 i SNAIL2, ZNF281, białka z motywem palca cynkowego i homodomeną ZEB1 i ZEB2 oraz FOXC2 [118]. Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna to proces

podlegający złożonej regulacji na poziomie transkrypcyjnym. Czynniki SNAIL1 i SNAIL2 biorą udział w podstawowym dla EMT etapie, czyli oddziaływaniu bezpośrednio na promotora genu kodującego E-kadherynę, co powoduje obniżenie poziomu tego białka w komórkach epitelialnych [14, 26].

E-kadheryna jest białkiem odgrywającym istotną rolę w utrzymywaniu polarności komórek, ich integralności oraz w zależnym od jonów wapnia tworzeniu połączeń adhezyjnych między komórkami. Odwrotna korelacja między poziomem SNAIL1 i SNAIL2, a E-kadheryny, czyli zwiększenie ekspresji powyższych czynników transkrypcyjnych i obniżony poziom E-kadheryny, została zaobserwowana w wielu nowotworach, m.in. w czerniaku złośliwym, raku wątrobowokomórkowym, raku płaskonabłonkowym jamy ustnej, raku piersi czy żołądka [18, 89, 149, 157, 199].

Zjawisko EMT i regulujące je czynniki transkrypcyjne, a szczególnie SNAIL1 i SNAIL2 są w ostatnich latach bardzo ciekawym przedmiotem badań. Działają nie tylko jako kluczowy czynnik indukujący EMT, hamują też syntezę białek proapoptotycznych, odgrywając rolę w przeżyciu komórek, regulacji odporności i biologii komórek macierzystych. Zrozumienie regulacji i ich funkcji może przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów progresji nowotworu i rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych [183, 196].

W piśmiennictwie jest wiele dowodów na związek między zwiększoną ekspresją genów *SNAIL1* i *SNAIL2*, a zdolnością komórek nowotworowych do inwazji i tworzenia przerzutów. Uważa się też, że są one potencjalnym czynnikiem rokowniczym. Oznaczanie ich ekspresji może posłużyć do prognozowania przeżywalności pacjentów i do oceny ryzyka wznowy [66, 109, 125].

Wiele danych z piśmiennictwa potwierdza rolę SNAIL1 i SNAIL2 w tworzeniu przerzutów. Wzrost ekspresji *SNAIL1* w komórkach raka jelita grubego powoduje wzrost właściwości migracyjnych i inwazyjnych komórek, w czasie procesu EMT [79]. Wzrost ekspresji *SNAIL1* potwierdzono również w przerzutach do węzłów chłonnych w przypadku raka piersi, raka płuc i jajnika [119, 134, 143]. W ostatnich latach wykazano także, iż czynniki transkrypcyjne takie jak SNAIL1 przyspieszają tworzenie przerzutów poprzez indukcję immunosupresji. Z kolei zahamowanie

ekspresji *SNAIL1* w znacznym stopniu hamuje wzrost guza i tworzenie przerzutów, głównie poprzez zwiększenie limfocytów naciekających guz i wzmocnienie ogólnoustrojowej odpowiedzi immunologicznej [99].

### **5.3.1. Analiza wyników badań ekspresji *SNAIL1*, *SNAIL2* i *ZNF281* na poziomie białka i mRNA**

W przeprowadzonej analizie zbadano poziom ekspresji na poziomie białek i mRNA takich czynników transkrypcyjnych jak *SNAIL1*, *SNAIL2* i *ZNF281* w raku jamy ustnej. Oceniono związek ekspresji czynników transkrypcyjnych z progresją guza oraz z wybranymi czynnikami klinicznymi i histopatologicznymi oraz określono korelację ekspresji czynników transkrypcyjnych z czasem przeżycia chorych.

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonych badań stwierdzono obecność ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie białka u 91,5% pacjentów z rakiem jamy ustnej, obecność ekspresji genu *SNAIL2* na poziomie białka u 51,2% pacjentów oraz obecność ekspresji genu *ZNF281* na poziomie białka u 74,4 % pacjentów.

W komórkach raka jamy ustnej poziom ekspresji genów *SNAIL1* i *SNAIL2* na poziomie białka był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną.

Analizując wyniki molekularne, dla 78% pacjentów udało się uzyskać dane dotyczące poziomu ekspresji genów *SNAIL1*, *SNAIL2* i *ZNF281* na poziomie mRNA. 18 przypadków nie objęto analizą, co było związane słabą jakością uzyskanych próbek RNA w tych przypadkach.

Na podstawie analizy wyników badań molekularnych stwierdzono, że w komórkach raka jamy ustnej poziom ekspresji *SNAIL1* i *SNAIL2* był istotnie statystycznie wyższy, niż w grupie kontrolnej.

Analiza statystyczna wyników badań ekspresji czynników transkrypcyjnych *SNAIL1* i *SNAIL2*, potwierdziła znacznie wyższy poziom ich ekspresji w komórkach raka jamy ustnej, niż w zdrowych komórkach. W przypadku *SNAIL1* zauważono wyższy poziom ekspresji na poziomie białka, w przypadku

SNAIL2 zarówno na poziomie białka, jak i mRNA.

Na wyższy poziom ekspresji genów dla czynników transkrypcyjnych rodziny palca cynkowego SNAIL1 w komórkach nowotworowych wskazują także inni autorzy. Lee i wsp. [104] wykazali wyższy poziom ekspresji w komórkach nowotworowych raka jamy ustnej w porównaniu z prawidłowym nabłonkiem, co było zbieżne z wynikami uzyskanymi w badaniach własnych. Interesujące wyniki uzyskali też Zhang i wsp. [203], którzy badali ekspresję *SNAIL1* u pacjentów ze zmianami przednowotworowymi w jamie ustnej. Zwiększony poziom ekspresji *SNAIL1* wykazali u ponad 37% pacjentów z leukoplakią. Na podstawie analizy wieloczynnikowej, uwzględniającej takie czynniki jak wiek, płeć, lokalizację i ekspresję czynników transkrypcyjnych stwierdzili, że SNAIL1 jest istotnym czynnikiem transformacji nowotworowej i może stanowić marker wyprzedzający rozwój raka jamy ustnej.

Poza potwierdzeniem obecności ekspresji genów dla czynników transkrypcyjnych w komórkach nowotworowych, w niniejszym badaniu przeanalizowano ich związek z wybranymi czynnikami etiologicznymi, klinicznymi i histopatologicznymi w raku jamy ustnej, a także wpływ ekspresji czynników transkrypcyjnych na przeżycie pacjentów.

Analiza statystyczna potwierdziła wyższą ekspresję genu *SNAIL2* w grupie pacjentów nienadużywających alkoholu, zarówno na poziomie białka ( $p=0,042$ ), jak i na poziomie mRNA ( $p=0,01$ ). Nie stwierdzono natomiast istotnej zależności pomiędzy poziomem ekspresji genów dla powyższych czynników transkrypcyjnych, zarówno na poziomie białka, jak i mRNA, a innymi analizowanymi czynnikami, takimi jak: płeć, wiek, palenie tytoniu, stopień zaawansowania, lokalizacja, istnienie wcześniejszej historii onkologicznej, czy nadciśnienie lub cukrzyca. Z kolei Zheng i wsp. [207] wykazali, że poziom ekspresji zarówno *SNAIL1*, jak i *SNAIL2* w wysokim stopniu koreluje z wielkością guza pierwotnego oraz stopniem zaawansowania guza.

Wspomniano już wcześniej o stopniu zróżnicowania nowotworu, jako ważnym czynnikiem rokowniczym, choć nie zawsze mającym przełożenie na wyniki leczenia i roli jaką poza stopniem zróżnicowania odgrywają inne cechy histologiczne guza.

Prawdopodobnie badanie ekspresji genów dla czynników transkrypcyjnych w rozszerzonym o badania immunohistochemiczne i molekularne badaniu histopatologicznym, mogłoby zwiększyć znaczenie tego badania. Wymaga to prowadzenia dalszych prac, ponieważ wyniki uzyskiwane w tym zakresie nie są jednoznaczne.

Na podstawie analizy wyników badań własnych, stwierdzono istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji genu dla białka SNAIL2 w raku niezróżnicowanym (G3) w porównaniu z rakiem średnio - (G2) i wysoko zróżnicowanym (G1). Lee i wsp. [104] stwierdzili wysoką korelację pomiędzy poziomem ekspresji *SNAIL1*, a rakiem jamy ustnej niskozróżnicowanym. Z kolei Marcus i wsp. [113] wykazali, że ekspresja *SNAIL1* nie koreluje ze stopniem zróżnicowania komórek w raku jamy ustnej.

Analizując wyniki badań własnych, zaobserwowano też związek wysokiego poziomu ekspresji *SNAIL1* na poziomie mRNA z krótszym czasem przeżycia. Wzrost ekspresji o jedną jednostkę wiązał się z 1,49 - krotnie wyższym ryzykiem zgonu. Zbadano też wartości graniczne dla czynników transkrypcyjnych i ustalono, że wysoki poziom ekspresji *SNAIL1* na poziomie białka i mRNA wiąże się ze skróceniem czasu całkowitego przeżycia. Podobne wyniki badań uzyskali Zheng i wsp. [207], którzy wykazali, że pacjenci z obecną ekspresją *SNAIL1* lub *SNAIL2* mają gorsze rokowanie, w porównaniu z pacjentami bez ekspresji powyższych czynników transkrypcyjnych oraz stwierdzili znacząco krótszy czas całkowitego przeżycia u pacjentów, u których stwierdzono wysoki poziom koekspresji genów dla białek SNAIL1 i SNAIL2, w porównaniu z pacjentami wykazującymi obecność ekspresji tylko jednego z powyższych czynników. Autorzy na podstawie analizy jednoczynnikowej wykazali, że ekspresja genów dla powyższych czynników transkrypcyjnych, podobnie jak inne czynniki ryzyka, takie jak: zaawansowanie kliniczne, stopień zróżnicowania, lokalna wznowa czy zajęcie węzłów chłonnych, w istotny sposób koreluje z czasem całkowitego przeżycia. Natomiast analiza wieloczynnikowa pozwoliła wyodrębnić obecność wysokiego poziomu koekspresji *SNAIL1* i *SNAIL2*, jako istotnego, źle rokującego czynnika prognostycznego, wpływającego na skrócenie czasu całkowitego przeżycia.



Rozbieżne wyniki dotyczące wpływu czynników transkrypcyjnych na kancerogenezę i tworzenie przerzutów, mogą wynikać z nie do końca jeszcze poznanych mechanizmów ich działania, współdziałania oraz oddziaływania na proces EMT oraz czynniki transkrypcyjne różnych cząstek supresorowych i onkogenów.

Na wyższy poziom ekspresji genów dla czynników transkrypcyjnych *SNAIL1* i *SNAIL2* w komórkach raka jamy ustnej, wskazują wyniki badań wielu autorów. Nakamura i wsp. [128] poza stwierdzeniem wysokiej ekspresji *SNAIL1* i *SNAIL2* w różnych liniach komórkowych raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, wskazali na dużą rolę interferującego RNA (siRNA) w procesie tworzenia przerzutów i progresji nowotworów. Jest to mała, dwuniciowa cząstka RNA, złożona z 20 - 25 par zasad, wykazująca supresorowe działanie w stosunku do genów o homologicznej sekwencji. Wyniki ich badań wskazują na wzajemną promocję ekspresji czynników transkrypcyjnych. Wykazano, że siRNA *SNAIL2* powoduje wzrost ekspresji *SNAIL1*, podczas gdy siRNA *SNAIL1* wydaje się zwiększać poziom ekspresji *SNAIL2* w tych komórkach. Stąd pojawienie się hipotezy, że jedynie hamujące działanie jednocześnie na *SNAIL1* i *SNAIL2*, skutecznie tłumi właściwości inwazyjne i chemiooporność na cytostatyki komórek nowotworowych.

W ostatnich latach dużą uwagę przywiązuje się do czynnika transkrypcyjnego, *ZNF281*, należącego również do białek rodziny palca cynkowego. *ZNF281* ma swój istotny udział w regulacji procesu przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej, ponieważ bezpośrednio indukuje ekspresję *SNAIL1* [69]. Ekspresja *ZNF281* koreluje też z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu, zwiększonym potencjałem do tworzenia przerzutów oraz zmniejszonym czasem przeżycia pacjentów [68, 146, 150].

Ekspresja i funkcja białka *ZNF281* była badana w przypadku wielu nowotworów, takich jak: białaczka, gruczolakorak płuca, raku okrężnicy, trzustki, prostaty, jajnika, żołądka i piersi [84, 138, 191].

Qin i wsp. [151] stwierdzili wysoki poziom ekspresji *ZNF281* w komórkach nowotworowych u pacjentów z rakiem jelita grubego, potwierdzili korelację ekspresji *ZNF281* ze stopniem zróżnicowania oraz stadium TNM, w tym

z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych. Ta obserwacja jest zgodna z ostatnimi ustaleniami Qian i wsp. [150], którzy obserwowali bardzo wysoki poziom ekspresji *ZNF281* w raku trzustki i korelację tej ekspresji ze stopniem zaawansowania nowotworu, szczególnie wielkością guza. Skłonność komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów jest jednym z ważniejszych czynników determinujących rokowanie u pacjentów z chorobami nowotworowymi. Świadczyć o tym mogą wyniki wskazujące na krótszy czas przeżycia u pacjentów ze zwiększonym poziomem ekspresji *ZNF281*, w porównaniu z pacjentami, u których nie stwierdzono ekspresji *ZNF281* [68]. Mechanizm działania czynnika transkrypcyjnego *ZNF281*, promujący inwazję i tworzenie przerzutów, prawdopodobnie związany jest, podobnie jak innych czynników transkrypcyjnych, na regulowaniu procesu przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej i zwiększaniu proliferacji, inwazji i migracji komórek nowotworowych. W badaniach Qin [151] oraz Qian i wsp. [150] poza zwiększonym poziomem ekspresji *ZNF281* w komórkach nowotworowych raka jelita grubego i trzustki wykazano, że zahamowanie ekspresji *ZNF281* przyczynia się do zmniejszenia proliferacji komórek nowotworowych oraz ich migracji i inwazji.

Badania prowadzone przez Sadleckiego i wsp. [160] wykazały wysoki poziom ekspresji genu dla białka *ZNF281* u 57% pacjentek z rakiem jajnika. Ponadto wykazano udział czynników transkrypcyjnych z tej grupy w rozwoju oporności na chemioterapię, w tym cisplatinę [180, 186]. Prawdopodobnie ten mechanizm jest współodpowiedzialny za złą odpowiedź na leczenie, progresję i wznowę w raku jajnika. Zgodnie z konwencjonalnym modelem progresji raka jajnika, komórki nowotworowe rozwijają oporność po jednym lub wielu cyklach chemioterapii, a chemiooporność jest kluczowym wyznacznikiem śmiertelności związanej z rakiem [57]. Większość pacjentek początkowo dobrze reaguje na chemioterapię, jednak później u części z nich rozwija się oporność na leki. Według Giannakeas i wsp. [58] niewielka część komórek jest oporna na chemioterapię od samego początku, a kontynuacja leczenia sprzyja selekcji opornych klonów komórek nowotworowych. Wraz z liczbą cykli chemioterapii, w masie guza rośnie udział komórek opornych na chemioterapię, które z czasem stają się dominującą populacją.

Istnieją białka, które są markerami oporności na chemioterapię. Należy do nich między innymi onkoproteina FOXM1, która zmniejsza wrażliwość komórek na leki przeciwnowotworowe, takie jak cisplatyna [34]. Być może prowadzone dalsze badania nad ekspresją *ZNF281*, mogłyby przyczynić się do wyjaśnienia jego roli w powstawaniu oporności na leki przeciwnowotworowe i wykorzystanie tego czynnika transkrypcyjnego, jako markera oporności na cytostatyki.

W badaniach prowadzonych przez Sadleckiego i wsp. [160] stwierdzono wysoki poziom jądrowej ekspresji genu *ZNF281* w większości badanych guzów jajnika, niezależnie od ich podtypu histologicznego.

Analiza wyników badań własnych potwierdza obecność wysokiego poziomu ekspresji *ZNF281* w komórkach nowotworowych. W komórkach raka jamy ustnej, badając poziom ekspresji genu *ZNF281* na poziomie białka, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic z grupą kontrolną. Na podstawie analizy wyników badań molekularnych stwierdzono jednak, że w komórkach nowotworowych jamy ustnej poziom ekspresji *ZNF281* na poziomie mRNA, zarówno w ognisku pierwotnym, jak i przerzutowym, był istotnie statystycznie wyższy, niż w grupie kontrolnej.

#### **5.4. Nowotworowe komórki macierzyste**

W ostatnich latach w rozwoju i progresji nowotworów, podkreśla się znaczącą rolę macierzystych komórek nowotworowych. Wspomniano już o roli *ZNF281* w regulacji różnicowania zarodkowych komórek macierzystych [52, 68, 76, 168]. Czynniki transkrypcyjne rodziny palca cynkowego kontrolują też ekspresję genów, kodujących białka odpowiedzialne za takie właściwości macierzystych komórek nerwowych jak samoodnawianie i zdolności multipotencjalne. Obserwuje się także ich wpływ na indukcję fenotypu macierzystych komórek nowotworowych [47, 79].

Koncepcja nowotworowych komórek macierzystych sugeruje również istnienie dwóch populacji CSC. Są to stacjonarne i inwazyjne macierzyste komórki nowotworowe. Stacjonarne CSC pozostają osadzone w tkance nabłonkowej i nie

mogą się rozprzestrzeniać. Natomiast inwazyjne CSC są zlokalizowane głównie na obrzeżu zmiany nowotworowej, na granicy chorych i zdrowych tkanek, co sprzyja ich migracji i zasiedlaniu nowych okolic [37, 91].

W wyniku prowadzonych badań stwierdzono dużo podobieństw w zakresie proliferacji i różnicowania, między komórkami macierzystymi, a nowotworowymi komórkami macierzystymi [155, 185]. Wynikają one z zaangażowania podobnych szlaków komórkowych, natomiast zasadnicze różnice dotyczą kontroli tych procesów. W procesie odnowy zdrowych tkanek, komórki ulegają następującym po sobie procesom proliferacji, różnicowania i obumierania. W przypadku komórek nowotworowych po proliferacji następuje nieprawidłowe różnicowanie, komórki mogą gromadzić się w różnych stadiach swojego rozwoju, powodując zwiększenie masy guza, do czego przyczyniają się też zaburzenia w procesie apoptozy komórek, statecznie powodując niekontrolowany wzrost [154, 155].

Nowotworowe komórki macierzyste mogą też mieć swój udział w tworzeniu oporności na cytostatyki. Większy ich udział w masie guza przyczynia się do słabej odpowiedzi na leczenie. Wynika to z tego, że większość cytostatyków działa na komórki proliferujące, natomiast nowotworowe komórki macierzyste, podobnie jak pierwotne komórki macierzyste znajdują się w fazie spoczynku, w której skuteczność leków jest mniejsza [177].

Oprócz podobieństw pomiędzy nowotworowymi, a pierwotnymi komórkami macierzystymi, poszukuje się też ich powiązań z komórkami mezenchymalnymi. Badania wykazały, że macierzyste komórki embrionalne zdolne są do różnicowania w kierunku komórek mezenchymalnych. Stało się to podstawą do założenia, że nowotworowe komórki macierzyste mogą podlegać podobnym procesom. Potwierdzać mogą to badania, w których stwierdzono obecność w komórkach inwazyjnych, markerów charakterystycznych dla komórek macierzystych oraz potwierdzono zdolność komórek podlegających EMT, do samoodnowy [20]. Podobne wyniki uzyskano badając komórki w raku sutka i prostaty. Indukcja procesu przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej, spowodowała nabycie przez te komórki fenotypu komórek mezenchymalnych oraz pojawienie się markerów charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych. Komórki macierzyste sutka,

poza charakterystyczną dla nich obecnością antygenu powierzchniowego CD44, wykazują się też spadkiem poziomu E-kadheryny, wzrostem poziomu wimentyny oraz wzrostem syntezy czynników transkrypcyjnych takich jak SNAIL1 i SNAIL2 [72].

Omawiając zjawisko przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej EMT, należy też wspomnieć o procesie odwrotnym, czyli przejściu mezenchymalno-epitelialnym MET. W wyniku tego procesu dochodzi do kolonizacji miejsca odległego i utworzenia przerzutu, a komórki ponownie zyskują fenotyp epitelialny. W komórkach przerzutowych pojawia się ponownie E-kadheryna i cytoplazmatyczna katenina, odtwarzane są połączenia międzykomórkowe. W progresji nowotworów oraz w procesie tworzenia przerzutów dużą rolę odgrywają oddziaływania komórek nowotworowych z mikrośrodowiskiem, czyli komórkami zrębu, macierzy zewnątrzkomórkowej. Zarówno w procesie EMT, jak i MET dochodzi do zmian w reorganizacji macierzy zewnątrzkomórkowej, wydzielania czynników wzrostowych i cytokin, sprzyjających dalszemu rozwojowi nowotworu [20].

W ostatnich latach wiele uwagi przywiązuje się do znaczenia mikroRNA (miRNA) w progresji nowotworów. Jest to jednoniciowa cząsteczką RNA, o długości od 18 do 25 nukleotydów, regulującą ekspresję innych genów poprzez represję translacyjną lub degradującą mRNA. Wiele badań wykazało, że niektóre miRNA mają działanie onkogenne, a inne z kolei supresyjne wobec guza. W większości są one zaangażowane w regulację procesu przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej. Do onkogennych miRNA, promujących inwazję, zaliczamy na przykład miR-1246. W komórkach nowotworowych raka jamy ustnej wykazano wysoką ekspresję onkogennych miRNA [163]. Do supresorowych miRNA zaliczany jest między innymi miR-200 i miR203, które powodują supresję guza, poprzez hamowanie EMT [21]. Działanie czynników hamujących EMT jest osłabiane przez onkogenne miRNA, natomiast działanie czynników indukujących EMT jest bardziej nasilone w wyniku niedostatecznej regulacji supresorowych miRNA [40, 198]. Wykazano też, że znaczne obniżenie miRNA w komórkach nowotworowych powoduje zmniejszenie się ekspresji E-kadheryny, przyczyniając się do pozyskania przez komórki większej ruchliwości, zmniejszenia się adhezji i

indukcji EMT [139].

Przeprowadzona w niniejszym badaniu analiza statystyczna oraz ocena poziomu ekspresji badanych czynników transkrypcyjnych na poziomie białka oraz mRNA, pozwala stwierdzić, że ekspresja genu *SNAIL1* w komórkach raka jamy ustnej może stanowić istotny czynnik ryzyka o dużym znaczeniu prognostycznym przy ocenie ryzyka zgonu u chorych na raka jamy ustnej. Na podstawie analizy wyników wyodrębniono trzy grupy ryzyka. Do grupy niskiego ryzyka zaliczono pacjentów zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego, z nowotworem o niskim stopniu zaawansowania i z niskim poziomem ekspresji *SNAIL1*. Grupę pośredniego ryzyka stanowili pacjenci zakwalifikowani do leczenia operacyjnego, z nowotworem o niskim stopniu zaawansowania i wysokim poziomem ekspresji *SNAIL1* oraz z nowotworem o wysokim stopniu zaawansowania i niskim poziomem ekspresji *SNAIL1*. U pacjentów tych stwierdzono około dwukrotnie wyższe ryzyko zgonu. Grupę wysokiego ryzyka stanowili pacjenci zakwalifikowani do leczenia operacyjnego, z nowotworem zaawansowanym i wysokim poziomem ekspresji *SNAIL1* oraz pacjenci zakwalifikowani jedynie do leczenia radioterapią lub chemioterapią, niezależnie od stopnia zaawansowania i ekspresji *SNAIL1*. W tej grupie stwierdzono niemal czterokrotnie wyższe ryzyko zgonu.

Poza badaniem ekspresji *SNAIL1*, *SNAIL2* i *ZNF281*, jako czynników ryzyka i czynników prognostycznych, należy też wspomnieć o możliwości rozwoju nowych metod terapeutycznych, opierających się na uwarunkowaniach molekularnych nowotworów.

Nabycie przez komórki zdolności do tworzenia przerzutów jest jednym z elementów progresji nowotworów. Jest to proces wieloetapowy, podczas którego w komórkach nowotworowych dochodzi do szeregu zmian genetycznych i molekularnych, w postaci mutacji, zmian w ekspresji białek. Skutkiem tego są zmiany morfologiczne komórek i zmieniające ich właściwości, w postaci nabycia większej ruchliwości, utraty adhezji i pojawienia się zdolności do przeżycia w warunkach braku adhezji.

Poznanie nowych mechanizmów towarzyszących progresji nowotworów, może się przyczynić do opracowania innowacyjnych terapii, mających na celu

zahamowanie metastazy nowotworowej. Znajomość procesów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej i mechanizmów je regulujących, w tym roli czynników transkrypcyjnych, może dać nowe podstawy do poszukiwania leków opierających się nie tylko na zniszczeniu komórek nowotworowych, ale na zahamowaniu zjawisk doprowadzających do większej inwazji i progresji nowotworu. Podejmowane są próby wykorzystania leków zmniejszających ekspresję *SNAIL1* i *SNAIL2*. Badania Zheng i wsp. [207] dotyczące ekspresji *SNAIL1*, *SNAIL2* i miRNA, dały podstawy autorom, do zaproponowania tezy, opierającej się na założeniu, że hamowanie ekspresji *SNAIL1* i *SNAIL2* oraz wprowadzenie do tkanki nowotworowej supresyjnego miRNA, może przynieść korzyści terapeutyczne poprzez przywrócenie komórkom nowotworowym prawidłowego fenotypu i odwrócenie procesu przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej. Także ZNF281, który odgrywa rolę w regulacji cyklu komórkowego oraz miRNA, mogą stanowić obiecujący cel terapeutyczny.

Poznanie roli macierzystych komórek nowotworowych, które mogą przyczyniać się do tworzenia się oporności na stosowane leki, również może być podstawą do poszukiwania nowych metod leczenia. Wyselekcjonowanie specyficznych markerów powierzchniowych i funkcjonalnych, charakterystycznych tylko dla nowotworowych komórek macierzystych, porównanie profili ekspresji genów nowotworowych i zdrowych komórek macierzystych pozwoliłoby na odróżnienie tej populacji komórek od pierwotnych komórek macierzystych. Możliwe byłoby opracowanie metod terapeutycznych, selektywnie eliminujących jedynie CSC.

## 6. WNIOSKI

1. Poziom ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjnych *SNAIL1*, *SNAIL2* i *ZNF281* w komórkach raka jamy ustnej jest istotnie wyższy niż w zdrowych komórkach. Dla genu *SNAIL1* dotyczy to wyższego poziomu ekspresji tylko na poziomie białka. Dla genu *SNAIL2* dotyczy wyższego poziomu ekspresji na poziomie zarówno białka, jak i mRNA. Dla genu *ZNF281* dotyczy wyższego poziomu ekspresji tylko na poziomie mRNA.
2. Wysoki poziom ekspresji genu kodującego białko *SNAIL2* występuje częściej u pacjentów z zaawansowanym rakiem jamy ustnej o niskim stopniu zróżnicowania (G3).
3. Wysoki poziom ekspresji genu *SNAIL1* na poziomie mRNA i białka wiąże się ze skróceniem czasu całkowitego przeżycia.
4. Poziom ekspresji genu *SNAIL1* w komórkach raka jamy ustnej może stanowić istotny czynnik ryzyka o dużym znaczeniu prognostycznym przy ocenie ryzyka zgonu u chorych na raka jamy ustnej.



## 7. STRESZCZENIE

Rak jamy ustnej stanowi istotny problem kliniczny i społeczny. Ze względu na częstość występowania zajmuje jedenaste miejsce wśród wszystkich złośliwych nowotworów. Nowotwór ten częściej występuje u mężczyzn, jego częstość występowania zwiększa się wraz z wiekiem, a takie czynniki jak palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, zakażenia wirusowe, narażenie na promieniowanie oraz pewne zmiany genetyczne, stanowią dodatkowe czynniki ryzyka.

Celem pracy była ocena ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne SNAIL1, SNAIL2 i ZNF281, które regulują przemianę nabłonkowo-mezenchymalną.

Badaną grupę stanowiło 82 pacjentów, z czego 69,5% stanowili mężczyźni, a 30,5% kobiety. Szczyt zachorowań przypadał między 60 a 72 rokiem życia, a najczęstszą lokalizacją było dno jamy ustnej i język. Średni czas przeżycia w badanej grupie wynosił 26 miesięcy, a wskaźnik 5 - letniego przeżycia wynosił 36,6%. W badanym materiale wyróżniono kilka istotnych czynników ryzyka wpływających na rokowanie. Jednym z nich był kliniczny stopień zaawansowania nowotworu. Wzrost stopnia zaawansowania wiązał się z wyższym ryzykiem zgonu i krótszym czasem całkowitego przeżycia. Również brak możliwości przeprowadzenia zabiegu operacyjnego był niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, skracającym czas całkowitego przeżycia. Kolejnym czynnikiem rokowniczym była wielkość ogniska pierwotnego. Większość analizowanych pacjentów według klasyfikacji TNM zostało sklasyfikowanych jako T2N0, a zwiększenie wielkości guza, powodujące podwyższenie o jeden stopień w klasyfikacji TNM, wiązało się z wyższym ryzykiem zgonu.

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonych badań, stwierdzono obecność ekspresji na poziomie białka dla poszczególnych czynników transkrypcyjnych: SNAIL1 u 91,5%, SNAIL2 u 51,2%, a ZNF281 u 74,4% pacjentów z rakiem jamy ustnej. Analizując wyniki badań molekularnych, stwierdzono obecność ekspresji na poziomie mRNA genów dla białek: SNAIL1, SNAIL2 i ZNF281 u 78% pacjentów.

Na podstawie analizy wyników stwierdzono wyższy poziom ekspresji genów kodujących powyższe czynniki transkrypcyjne w komórkach nowotworowych jamy ustnej w porównaniu ze zdrowymi komórkami. W przypadku *SNAIL1* wykazano istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji na poziomie białka, w przypadku *SNAIL2* wykazano wyższy poziom ekspresji zarówno na poziomie białka, jak i mRNA, natomiast w przypadku *ZNF281* wykazano wyższy poziom ekspresji na poziomie mRNA.

Przeanalizowano związek badanych czynników transkrypcyjnych z wybranymi czynnikami etiologicznymi, klinicznymi i histopatologicznymi w raku jamy ustnej, a także wpływ ekspresji genów dla tych czynników transkrypcyjnych na przeżycie pacjentów.

Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy poziomem ekspresji genów kodujących powyższe czynniki transkrypcyjne, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, a takimi czynnikami, jak: płeć, wiek, palenie tytoniu, stopień zaawansowania, lokalizacja, istnienie wcześniejszej historii onkologicznej, czy nadciśnienie lub cukrzyca. Wyższy poziom ekspresji genu dla białka *SNAIL2* był obserwowany w raku niskozróżnicowanym w porównaniu z rakiem średnio- i wysoko zróżnicowanym. Zaobserwowano też zależność wyższego poziomu ekspresji *SNAIL1* na poziomie mRNA oraz białka z krótszym czasem przeżycia pacjentów z rakiem jamy ustnej.

Na podstawie przeprowadzonej analizy czynników ryzyka w raku jamy ustnej oraz wyników badań immunohistochemicznych i molekularnych, wyodrębniono trzy grupy ryzyka. Do grupy niskiego ryzyka zaliczono pacjentów zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego, z nowotworem o niskim stopniu zaawansowania i z niskim poziomem ekspresji *SNAIL1*. Grupę pośredniego ryzyka stanowili pacjenci zakwalifikowani do leczenia operacyjnego, z nowotworem o niskim stopniu zaawansowania i wysokim poziomem ekspresji *SNAIL1* oraz z nowotworem o wysokim stopniu zaawansowania i niskim poziomem ekspresji *SNAIL1*. U pacjentów tych stwierdzono około dwukrotnie wyższe ryzyko zgonu. Grupę wysokiego ryzyka stanowili pacjenci zakwalifikowani do leczenia operacyjnego, z nowotworem zaawansowanym i wysokim poziomem ekspresji *SNAIL1* oraz pacjenci zakwalifiko-

wani jedynie do radioterapii lub chemioterapii, niezależnie od stopnia zaawansowania i poziomu ekspresji *SNAIL1*. W tej grupie stwierdzono niemal czterokrotnie wyższe ryzyko zgonu.

Obecność oraz wyższy poziom ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne *SNAIL1*, *SNAIL2* i *ZNF281* są istotnymi czynnikami rokowniczymi i prognostycznymi. Kontynuacja badań nad mechanizmem ich działania może posłużyć do rozwoju i opracowania nowych metod terapeutycznych.

## 8. SUMMARY

Oral cancer is a major clinical and social problem. It is the 11<sup>th</sup> most common malignancy in the world. That cancer is more common in men, their incidence increases with age, and factors such as smoking, alcohol consumption, viral infections, radiation exposure, and some genetic changes are additional risk factors.

The subject of the study was the assessment of gene expression for transcription factors SNAIL1, SNAIL2 and ZNF281, which regulate epithelial-mesenchymal transformation.

82 patients were included in the study, including 69.5% men and 30.5% women. The peak incidence was between 60 and 72 years old, and the most common location was the bottom of the mouth and the tongue. The average survival time in the study group was 26 months, and the 5-year survival rate was 36.6%. Several significant risk factors affecting prognosis were distinguished in the examined material. One of them was the degree of cancer advancement. An increase in severity was associated with a higher risk of death and shorter overall survival. Also, the inability to perform surgery was an adverse prognostic factor, shortening overall survival. The size of the primary outbreak was another prognostic factor. Most of the analyzed patients according to the TNM classification were classified as T2N0, and an increase in tumor size, resulting in an increase of one grade in the TNM classification, was associated with a higher risk of death.

Based on the analysis of the results of the conducted studies, the expression of the level of protein for individual transcription factors was found: SNAIL1 in 91.5%, SNAIL2 in 51.2%, and ZNF281 in 74.4% of patients with oral cancer. Analyzing the molecular results, the presence of expression at the mRNA level of genes for transcription factors: SNAIL1, SNAIL2 and ZNF281 was found in 78% of patients.

Based on the results of our own research, a higher expression of the above transcription factors was found in oral cancer cells compared to healthy cells. SNAIL1 showed higher expression at the protein level, SNAIL2 both showed higher expres-

sion at the protein and mRNA levels, while ZNF281 showed higher expression at the mRNA level.

In addition to confirming the presence of transcription factor expression in cancer cells, in my research I analyzed their relationship with selected etiological, clinical and histopathological factors in oral cancer, as well as the effect of transcription factor expression on patient survival.

No significant relationship was found between the above transcription factors, both at the protein and mRNA levels, and other analyzed factors, such as: gender, age, smoking, severity, location, previous oncological history, or hypertension or diabetes. Higher expression of the SNAIL2 protein was observed in undifferentiated cancer compared to medium and high differentiated cancer. An association of increased SNAIL1 expression at mRNA and protein level with a shorter survival time of patients with oral cancer has also been observed.

Based on the analysis of various risk factors in oral cancer, including both etiological and clinical factors, histopathological features, including results of immunohistochemical and molecular tests, among patients with oral cancer, three risk groups can be distinguished. The low-risk group includes patients qualified for surgery, patients with low-grade cancer and low *SNAIL1* expression. Patients qualified for surgery, with low-grade cancer and high *SNAIL1* expression, and with high-grade cancer and low *SNAIL1* risk constitute the intermediate risk group. These patients had about a 2-fold higher risk of death. The high-risk group consisted of patients qualified for surgery, patients with advanced cancer and high *SNAIL1* expression, and patients qualified only for radiotherapy or chemotherapy, regardless of the stage and expression of *SNAIL1*. In this group, the risk of death was almost four times higher.

Based on the research, it can be concluded that gene expression for SNAIL1, SNAIL2 and ZNF281 transcription factors could be a prognostic factor for assessing prognosis. Continued research on the mechanism of transcription factors may be used to develop and develop new therapeutic methods.

**PIŚMIENICTWO:**

1. Akhter M., Hossain S., Rahman Q. and Molla M.: 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.

2. Almangush A., Bello I.O., Keski-Säntti H., Mäkinen L.K., Kauppila J.H., Pukkila M., Hagström J., Laranne J., Tommola S., Nieminen O., Soini Y., Kosma V.M., Koivunen P., Grénman R., Leivo I., Salo T.: Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: Prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck* 2014, 36, 6, 811-818.

3. American Joint Committee on Cancer, *AJCC Cancer Staging Handbook*. 7 ed. Springer: Chicago IL, 2010.

4. Amin M.B., Edge S., Greene F., Byrd D.R., Brookland R.K., Washington M.K., Gershenwald J.E., Compton C.C., Hess K.R., Sullivan D.C., Jessup J.M., Brierley J.D., Gaspar L.E., Schilsky R.L., Balch C.M., Winchester D.P., Asare E.A., Madera M., Gress D.M., Meyer L.R. (eds.): *AJCC Cancer Staging System*, 8th Edition. Am. Jt. Committee Cancer, Springer: Chicago, 2017.

5. Angadi P. V., Patil P. V., Hallikeri K., Mallapur M. D., Hallikerimath S. and Kale A. D.: Tumor budding is an independent prognostic factor for prediction of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Surg. Pathol.* 2015, 23, 2, 102-110.

6. De Angelis R., Sant M., Coleman M.P., Francisci S., Baili P., Pierannunzio D., Trama A., Visser O., Brenner H., Ardanaz E., Bielska-Lasota M., Engholm G., Nennecke A., Siesling S., Berrino F., Capocaccia R.: Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE5—a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014, 15, 23-34.

7. Anneroth G., Batsakis J. and M. Luna: Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand. J. Dent. Res.* 1987, 95, 3, 229-49.

8. Araki L.T., Ebihara S., Ohta Y., Yoshizumi T., Ohshima W., Saikawa M., Nakatsuka T.: Surgical management of squamous cell carcinoma of the floor of the mouth. *Jpn J Clin Oncol.* 1990, 20, 387-391.

9. Asthana S., Labani S., Kailash U., Sinha D. N. and Mehrotra R.: Association of Smokeless Tobacco Use and Oral Cancer: A Systematic Global Review and Meta-Analysis. *Nicotine Tob. Res.* 2019, 21, 9, 1162-1171.

10. Astsaturov I., Cohen R. B., Harari P.M.: EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 2006, 6, 8, 691-710.

11. Attramadal C. G., Kumar S., Boysen M. E., Dhakal H. P., Nesland J. M. and Bryne M.: Tumor Budding, EMT and Cancer Stem Cells in T1-2/N0 Oral Squamous Cell Carcinomas. *Anticancer Res.* 2015, 35, 11, 6111-20.

12. Bagnato A. and Rosanò L.: Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer progression: a crucial role for the endothelin axis. *Cells. Tissues. Organs* 2007, 185, 1-3, 85-94.

13. Baselga J.: The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur. J. Cancer* 2001, 37, 4, 16-22.

14. Batlle E., Sancho E., Francí C., Domínguez D., Monfar M., Baulida J., García De Herreros A.: The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2000, 2, 84-89.

15. Böhrnsen F., Godek F., Kiesel J., Kramer F. J., Brockmeyer P. and Schliephake H.: Influence of TGF- $\beta$ 1 on tumor transition in oral cancer cell and BMSC co-cultures. *J. Cranio-Maxillo-Facial Surg.* 2017, 45, 731-740.

16. Braakhuis B. J. M., Tabor M. P., Kummer J. A, Leemans C. R., Brakenhoff R. H.: A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003, 63, 8, 1727-30.

17. Brabletz T., Jung A., Reu S., Porzner M., Hlubek F., Kunz-Schughart L.A., Knuechel R., Kirchner T.: Variable beta-catenin expression in colorectal

cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98, 10356-10361.

18. Blanco M.J., Moreno-Bueno G., Sarrío D., Locascio A., Cano A., Palacios J., Nieto M.A.: Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*. 2002, 21, 3241-3246.

19. Blehnschmidt K., Sassen S., Schmalfeldt B., Schuster T., Höfler H. and K. F. Becker: The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients. *Br. J. Cancer*. 2008, 98, 2, 489-495.

20. Brabletz T., Jung A., Spaderna S., Hlubek F., Kirchner T.: Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005, 5, 744-749.

21. Bracken C.P., Gregory P.A., Kolesnikoff N., Bert A.G., Wang, J., Shannon M.F., Goodall G.J.: A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates Epithelial-Mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2008, 68, 7846-7854.

22. Brandwein-Gensler M., Teixeira M.S., Lewis C.M., Lee B., Rolnitzky L., Hille J.J., Genden E., Urken M.L., Wang B.Y.: Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol*. 2005, 29, 167-178.

23. Bryne M., Koppang H. S., Lilleng R. and Kjaerheim A.: Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J. Pathol*. 1992, 166, 4, 375-81.

24. Byers R.M., El-Naggar A.K., Lee Y.Y., Rao B., Fornage B., Terry N.H., Sample D., Hankins P., Smith T.L., Wolf P.J.: Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue? *Head Neck*. 1998, 20, 138-144.

25. De Camargo Cancela M., Voti L., Guerra-Yi M., Chapuis F., Mazuir M. and Curado M. P.: Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck* 2010, 32, 3, 357-67.

26. Cano A., Pérez-Moreno M.A., Rodrigo I., Locascio A., Blanco M.J., del Barrio M.G., Portillo F., Nieto M.A.: The transcription factor Snail controls



epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2, 76-83.

27. Capote A., Escorial V., Muñoz-Guerra M.F., Rodríguez-Campo F.J., Gamallo C., Naval L.: Elective neck dissection in early-stage oral squamous cell carcinoma — does it influence recurrence and survival? *Head Neck.* 2007, 29, 3-11.

28. Castro Alves C., Rosivatz E., Schott C., Hollweck R., Becker I., Sarbia M., Carneiro F., Becker K.F.: Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin. *J. Pathol.* 2007, 211, 5, 507-515.

29. Chao C., Wei Y., Hummel M., Hoffmann T.K., Gross M., Kaufmann A.M., Albers A.E.: Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* 2011, 6, 1, 1-14.

30. Chaturvedi A.K., Anderson W.F., Lortet Tieulent J., Curado M.P., Ferlay J., Franceschi S., Rosenberg P.S., Bray F., Gillison M.L.: World-wide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol.* 2013, 31, 4550- 4559.

31. Chiang A.C, Massague J.: Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med.* 2008, 359, 2814-2823.

32. Chiarugi P., Giannoni E.: Anoikis: a necessary death program for anchorage--dependent cells. *Biochem Pharmacol.* 2008, 76, 1352-1364.

33. Chen J., Han Q., Pei D.: EMT and MET as paradigms for cell fate switching. *J. Mol. Cell Biol.* 2012, 4, 66-9.

34. Chiu W.T., Huang Y.F., Tsai H.Y., Chen C.C., Chang C.H., Huang S.C., Hsu K.F., Chou C.Y.: FOXM1 confers to epithelial-mesenchymal transition, stemness and chemoresistance in epithelial ovarian carcinoma cells. *Oncotarget.* 2014, 6, 4, 2349-2365.

35. Christiansen J.J., Rajasekaran A.K.: Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2006, 1, 66, 8319-8326.

36. Chu P. Y., Hu F.W., Yu C.C., Tsai L.L., Yu C.H., Wu B.C., Chen Y.W., Huang P.I., Lo W.L.: Epithelial-mesenchymal transition transcription factor ZEB1/ZEB2 co-expression predicts poor prognosis and maintains tumor-initiating properties in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2013, 49, 1, 34-41

37. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B., Eaves C.J., Jamieson C.H., Jones D.L., Visvader J., Weissman I.L., Wahl G.M.: Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006, 66, 9339-9344.

38. Conway D. I., Petticrew M., Marlborough H., Berthiller J., Hashibe M., Macpherson L.M.D.: Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int. J. cancer* 2008, 122, 12, 2811-9.

39. Cooper J.S., Porter K., Mallin K., Hoffman H.T., Weber R.S., Ang K.K., Gay E.G., Langer C.J.: National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck* 2009, 31, 6, 748-58.

40. Croce C.M.: Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* 2009, 10, 704-714.

41. De Craene B., Berx G.: Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* 2013, 13, 97-110.

42. Czerninski R., Zini A., Sgan-Cohen H.: Lip cancer: incidence, trends, histology and survival: 1970-2006. *Br J Dermatol.* 2010, 162, 1103-1109.

43. Dasgupta S., Bhattacharya-Chatterjee M., Chatterjee S. K. and O'Malley B. W. Jr.: Tumor metastasis in an orthotopic murine model of head and neck cancer: Possible role of TGF-beta 1 secreted by the tumor cells. *J. Cell. Biochem.* 2006, 97, 5, 1036-1051.

44. Dave N., Guaita-Esteruelas S., Gutarra S., Frias A., Beltran M., Peiró S., García de Herreros A.: Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 14, 12024-12032.

45. Dodd R. H., Waller J., Marlow L. A. V.: Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer: Psychosocial Impact in Patients and Knowledge of the

Link e A Systematic Review Statement of Search Strategies Used and Sources of Information. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2016, 28, 7, 421-439.

46. Doss H. H.: Induction chemotherapy + gefitinib followed by concurrent chemotherapy/radiation therapy/gefitinib for patients (pts) with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: A phase I/II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network [Abstract]. *ASCO Meeting Abstracts*. 2006, 24, 5543.

47. Fan F., Samuel S., Evans K.W., Lu J., Xia L., Zhou Y., Sceusi E., Tozzi F., Ye X.C., Mani S. A, Ellis L.M.: Overexpression of snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med*. 2012, 1, 5-16.

48. Fakhry C., Westra W.H., Li S., Cmelak A., Ridge J.A., Pinto H., Forastiere A., Gillison M.L.: Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008, 100, 261-269.

49. Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M.: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010, 127, 2893-2917.

50. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D.M., Piñeros M., Znaor A., Bray F.: Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer* 2019, 144, 8, 1941-1953.

51. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R.: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 2015, 136, 5, E359-E386

52. Fidalgo M., Shekar P.C., Ang Y.S., Fujiwara Y., Orkin S.H., Wang J.: ZNF281 functions as a transcriptional repressor for pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2011, 29, 1705-1716.

53. Franci C., Takkunen M., Dave N., Alameda F., Gomez S., Rodriguez R., Escrivà M., Montserrat-Sentís B., Baró T., Garrido M., Bonilla F., Virtanen

I., García de Herreros A.: Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene*. 2006, 25, 5134-5144.

54. Ford P. J. and Farah C. S.: Early detection and diagnosis of oral cancer: Strategies for improvement. *J. Cancer Policy* 2013, 1, e2-e7.

55. Fujii R., Imanishi Y., Shibata K., Sakai N., Sakamoto K., Shigetomi S., Habu N., Otsuka K., Sato Y., Watanabe Y., Ozawa H., Tomita T., Kameyama K., Fujii M., Ogawa K.: Restoration of E-cadherin expression by selective Cox-2 inhibition and the clinical relevance of the epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Exp. Clin. CANCER Res.* 2014, 33-40.

56. Fulda S., Meyer E., Debatin K.M.: Inhibition of TRAIL- induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 2002; 21: 2283-2294.

57. Ganly I., Patel S., Shah J.: Early stage squamous cell cancer of the oral tongue-clinicopathologic features affecting outcome. *Cancer*. 2012, 118, 101-111.

58. Giannakeas V., Sopik V., Narod S.A.: A model for ovarian cancer progression based on inherent resistance. *Gynecol Oncol.* 2016, 142, 484-489.

59. Girod S. C., Krämer C., Knüfermann R., Krueger G. R. F.: Expression in the carcinogenesis in the oral mucosa. *J. Cell. Biochem.* 1994, 56, 4, pp. 444-448.

60. Godek F., Aeckerle N., Kramer F.-J., Schliephake H., Böhrnsen F.: 26 TGF-beta induced interaction of human MSC coculture with HNSCC cell line PCI-13. *Oral Oncol.* 2015,51,5, e35-e36.

61. Gomez-Navarro J., Arafat W., Xiang J.: Gene therapy for carcinoma of the breast. Pro-apoptotic gene therapy. *Breast Cancer Res.* 2000, 2, 32-44.

62. Gontarz M., Wszyńska-Pawełec G., Zapała J.: Clinico-pathological predictive factors in squamous cell carcinoma of the tongue and the floor of the mouth. *Folia Medica Cracoviensia.* 2013, 2, 73-86.

63. González-García R., Naval-Gías L., RománRomero L., Sastre-Pérez J., Rodríguez-Campo F.J.: Local recurrences and second primary tumors from

squamous cell carcinoma of the oral cavity: a retrospective analytic study of 500 patients. *Head Neck*. 2009, 31, 1168-1180.

64. Gorsky M., Epstein J.B., Oakley C., Le N.D., Hay J., Stevenson-Moore P.: Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004, 98, 546-552.

65. Gottlieb T.M., Oren M.: p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol*. 1998, 8, 359-368.

66. Gou Y., Ding W., Xu K., Wang H., Chen Z., Tan J., Xia G., Ding Q.: Snail is an independent prognostic indicator for predicting recurrence and progression in non-muscle-invasive bladder cancer. *Int Urol Nephrol*. 2015, 47, 289-293.

67. Gou Y., Ding W., Xu K., Wang H., Chen Z., Tan J., Xia G., Ding Q.: Snail is an independent prognostic indicator for predicting recurrence and progression in non-muscle-invasive bladder cancer. *Int. Urol. Nephrol*. 2015, 47, 2, pp. 289-293.

68. Hahn S., Hermeking H.: ZNF281/ZBP-99: a new player in epithelial-mesenchymal transition, stemness, and cancer. *J Mol Med*. 2014, 92, 571-581.

69. Hahn S., Jackstadt R., Siemens H., Hunten S., Hermeking H.: SNAIL and miR-34a feed-forward regulation of ZNF281/ZBP99 promotes epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J*. 2013, 32, 3079-3095.

70. Hajra K. M., Chen D. Y.-S., Fearon E. R.: The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res*. 2002, 62, 6, 1613-8.

71. Hashikata M., Shigeishi H., Okui G., Yamamoto K.: Snail-induced CD44<sup>high</sup> cells in HNSCC with high ABC transporter capacity exhibit potent resistance to cisplatin and docetaxel. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2016, 9, 8, 7908-7918.

72. Hollier B.G., Evans K., Mani S.A.: The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2009, 14, 29-43.

73. Ho T., Wei Q., Sturgis E. M.: Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2007, 29, 7, 682-99.

74. Hong K. O., Il Lee J., Hong S. P. and Hong S. D.: Thymosin  $\beta$ 4 induces proliferation, invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma. *Amino Acids* 2016, 48, 1, 117-127.

75. Hotz B., Visekruna A., Buhr H.J., Hotz H.G.: Beyond epithelial to mesenchymal transition: A novel role for the transcription factor snail in inflammation and wound healing. *J Gastrointest Surg.* 2010, 14, 388-397.

76. Huang X., Balmer S., Yang F., Fidalgo M., Li D., Guallar D., Hadjantonakis A.K., Wang J.: Zfp281 is essential for mouse epiblast maturation through transcriptional and epigenetic control of nodal signaling. *Elife.* 2017, 6, 1-27.

77. Huang T.Y., Hsu L.P., Wen Y.H., Huang T.T., Chou Y.F., Lee C.F., Yang M.C., Chang Y.K., Chen P.R.: Predictors of locoregional recurrence in early stage oral cavity cancer with free surgical margins. *Oral Oncol.* 2010, 46, 49-55.

78. Hugo H., Ackland M.L., Blick T., Lawrence M.G., Clements J.A., Williams E.D., Thompson E.W.: Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell. Physiol.* 2007, 213, 2, 374-83.

79. Hwang W.L., Yang M.H., Tsai M.L., Lan H.Y., Su S.H., Chang S.C., Teng H.W., Yang S.H., Lan Y.T., Chiou S.H., Wang H.W.: SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology.* 2011, 141, 279-291.

80. Inamura N., Kimura T., Wang L., Yanagi H., Tsuda M., Tanino M., Nishihara H., Fukuda S., Tanaka S.: Notch1 regulates invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma by inducing EMT through c-Myc. *Auris Nasus Larynx* 2016, 44, 4, 447-457.

81. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Volume 100B. Bi-

ological Agents. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2009.

82. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Volume 100E. Personal Habits and Indoor Combustions. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2009.

83. Iwanaga R., Wang C.A., Micalizzi D.S., Harrell J.C., Jedlicka P., Sartorius C.A., Kabos P., Farabaugh S.M., Bradford A.P., Ford H.L. Expression of Six1 in luminal breast cancers predicts poor prognosis and promotes increases in tumor initiating cells by activation of extracellular signal-regulated kinase and transforming growth factor-beta signaling pathways. *Breast Cancer Res.* 2010, 14, 4.

84. Izumi H., Yasuniwa Y., Akiyama M., Yamaguchi T., Kuma A., Kitamura N., Kohno K.: Forced expression of ZNF143 restrains cancer cell growth. *Cancers.* 2011, 3, 3909-3320.

85. Jen J. and Wang Y. C.: Zinc finger proteins in cancer progression. *Journal of Biomedical Science* 2016, 23, 1, 23:53.

86. Jethwa A. R. Khariwala S. S.: Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2017, 36, 3, 411-423.

87. Jethwa P., Naqvi M., Hardy R.G., Hotchin N.A., Roberts S., Spychal R., Tselepis C.: Overexpression of Slug is associated with malignant progression of esophageal adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2008, 14, 7, 1044-1052.

88. Jiang W., Pang X.-G., Wang Q., Shen Y.-X., Chen X.-K. and Xi J.-J.: Prognostic role of Twist, Slug, and Foxc2 expression in stage I non-small-cell lung cancer after curative resection. *Clin. Lung Cancer* 2010, 13, 4, 280-287.

89. Jiao W., Miyazaki K., Kitajima Y.J.: Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br J Cancer.* 2002, 86, 98-101.

90. Jen J., Wang Y.C.: Zinc finger proteins in cancer progression. *J Biomed Sci.* 2016, 23, 1-9.

91. Jordan C.T., Guzman M.L., Noble M.: Cancer stem cells. *N Engl J Med.* 2006, 355, 1253-61.
92. Jovanovic A., Schulten E.A., Kostense P.J., Snow G.B., Waal I.: Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1993, 22, 459-462.
93. Kalluri R.: EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest.* 2009, 119, 1417-1419.
94. Kalluri R., Weinberg R. A.: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009, 119, 6, 1420-1428.
95. Katafiasz D., Smith L. M., Wahl J. K., Slug (SNAI2) expression in oral SCC cells results in altered cell-cell adhesion and increased motility. *Cell Adh. Migr.* 2011, 5, 4, 315-322.
96. Kawecki A., Nawrocki S., Golusiński W., Grzesiakowska U., Jassem J., Krajewski R., Olszewski W.: Nowotwory nabłonkowe narządów głowy i szyi; Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych. Gdańsk: Kawecki A., Nawrocki S. (red.), 2013.
97. Kim S.H., Kim E.J., Hitomi M., Oh S.Y., Jin X., Jeon H.M., Beck S., Jin X., Kim J.K., Park C.G., Chang S.Y., Yin J., Kim T., Jeon Y.J., Song J., Lim Y.C., Lathia J.D., Nakano I., Kim H.: The LIM-only transcription factor LMO2 determines tumorigenic and angiogenic traits in glioma stem cells. *Cell Death Differ.* 2015, 22, 1517-1525.
98. Klozar J., Kratochvil V., Salakova M., Smahelova J., Vesela E., Hamsikova E., Betka J., Tachezy R.: HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and oropharyngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008, 265, 75-82.
99. Kudo-Saito C., Shirako H., Takeuchi T., Kawakami Y.: Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell.* 2009, 15, 3, 195- 206.
100. Lamouille S., Xu J., Derynck R.: Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15, 3, 178-196.



101. Langdon J.D., Harvey P.W., Rapidis A.D., Patel M.F., Johnson N.W., Hopps R.: Oral cancer: the behaviour and response to treatment of 194 cases. *J Maxillofac Surg.* 1977, 5, 221-237.

102. Lascombe I., Clairotte A., Fauconnet S., Bernardini S., Wallerand H., Kantelip B., Bittard H.: N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin Cancer Res.* 2006, 12, 9, 2780-2787.

103. La Vecchia C., Tavani A., Franceschi S., Levi F., Corrao G. and Negri E.: Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997, 33, 5, 302-312.

104. Lee S.S., Tsai C.H., Yu C.C., Chan Y.C.: Elevated Snail expression mediates tumor progression in areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinoma via reactive oxygen species. *Plos one.* 2013, 8, 7, 1 - 8.

105. Li F., Tiede B., Massague J., Kang Y.: Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 2007, 17, 3-14.

106. Lindeløv B., Kirkegaard J., Hansen H.S.: Squamous cell carcinoma of the oral cavity. An unselected material from a 5-year period. *Acta Oncol.* 1990, 29, 1011-1015.

107. Liu B., Han S. M., Tang X. Y., Han L. I. and Li C. Z.: Overexpressed FOXC2 in ovarian cancer enhances the epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of ovarian cancer cells. *Oncol. Rep.*, 2014, 31, 6, 2545-2554.

108. Liu G., Franssen E., Fitch M. I. and Warner E.: Patient preferences for oral versus intravenous palliative chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 1997, 15, 1, 110-5.

109. Liu W., Liu Y., Liu H., Zhang W., An H., Xu J.: Snail predicts recurrence and survival of patients with localized clear cell renal cell carcinoma after surgical resection. *Urol Oncol.* 2015, 33, 697-700.

110. Lo W.L., Kao S.Y., Chi L.Y., Wong Y.K., Chang R.C.: Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003, 61, 751-758.

111. Lohia N., Bhatnagar S., Singh S., Prashar M., Subramaniam A., Viswanath S., Sahu P.K., Rai A.: Survival trends in oral cavity cancer patients

treated with surgery and adjuvant radiotherapy in a tertiary center of Northern India: Where do we stand compared to the developed world?. *SRM J. Res. Dent. Sci.* 2019, 10, 1, 26-31.

112. Lydiatt W.M., Patel S.G., O'Sullivan B., Brandwein M.S., Ridge J.A., Migliacci J.C., Loomis A.M., Shah J.P.: 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.

113. Marcus M., Spiegel K., Umbreit C., Richter F.P., Codina-Canet C., Berndt A., Altendorf - Hofmann A., Koscielny S., Hyckel P., Kosmehl H., Virtanen I., Berndt A.: Expression of Snail is associated with myofibroblast phenotype development in oral squamous cell carcinoma. *Histochem Cell Biol.* 2009, 131, 5, 651-660.

114. De Martel C., Ferlay J., Franceschi S., Vignat J., Bray F., Forman D., Plummer M.: Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012, 13, 607- 615.

115. McGurk M., Chan C., Jones J., O'regan E., Sherriff M.: Delay in diagnosis and its effect on outcome in head and neck cancer. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005, 43, 4, 281-284.

116. Meijerink J.P., Mensink E.J., Wang K., Sedlak T.W., Sloetjes A.W., De Witte T., Waksman G., Korsmeyer S.J.: Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood.* 1998, 91, 2991-2997.

117. Merikallio H., Turpeenniemi-Hujanen T., Pääkkö P., Mäkitaro R. Kaarteenaho R., Lehtonen S., Salo S., Salo T., Harju T., Soini Y.: Slug is associated with poor survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014, 7, 9, 5846-5854.

118. Metzler V., Romani A., Riml A., Pritz C., Riechelmann H., Dudás J.: Comparison of the effects of tumor cells, fibroblasts and TGF- $\beta$ 1 on growth, migration and epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EMT) of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2015, 51, 36.

119. Minn A.J., Gupta G.P., Siegel P.M., Bos P.D., Shu W., Giri D.D., Viale A., Olshen A.B., Gerald W.L., Massague J.: Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005, 436, 7050, 518- 524.

120. Molinolo A. A., Amornphimoltham P., Squarize C. H., Castilho R. M., Patel V., Gutkind J. S.: Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2009, 45, 4-5, 324-34.

121. Monteiro L. S., Do Amaral J. B., Vizcaíno J. R., Lopes C. A. and Torres F. O.: 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, 120-126.

122. Moore S.R., Johnson N.W., Pierce A.M., Wilson D.F.: The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis*. 1999, 5, 185-195.

123. Morris L. G. T., Patel S. G., Shah J. P. and Ganly I.: Squamous cell carcinoma of the oral tongue in the pediatric age group: A matched-pair analysis of survival. *Arch. Otolaryngol. - Head Neck Surg*. 2010, 136, 7, 697-701.

124. Moustakas A. and Heldin C.-H.: Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci*. 2007, 98, 10, 1512-20.

125. Muenst S., Däster S., Obermann E.C., Droeser R.A., Weber W.P., von Holzen U., Gao F., Viehl C., Oertli D., Soysal S.D.: Nuclear expression of Snail is an independent negative prognostic factor in human breast cancer. *Dis Markers*. 2013, 35, 337-344.

126. Mullauer L., Gruber P., Sebinger D., Buch J., Wohlfart S., Chott A.: Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res*. 2001, 488, 211-231.

127. Myslinski E., Krol A., Carbon P.: ZNF76 and ZNF143 are two human homologs of the transcriptional activator Staf *J Biol Chem*. 1998, 273, 2198-22006.

128. Nakamura R., Ishii H., Endo K., Hotta A., Fujii E., Miyazawa K., Saitoh M.: Reciprocal expression of Slug and Snail in human oral cancer cells. *PLOS ONE*, 2018, 6, 3, 1-14.

129. Nawshad A., Lagamba D. and Hay E. D.: Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Arch. Oral Biol.* 2004, 49, 9, 675-689.

130. Nguyen D.X., Massague J.: Genetic determinants of cancer metastasis. *Nature Rev Genet.* 2007, 8, 341-352.

131. Nieto M.A.: The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002, 3, 155-66.

132. Nowak R., Tarasiuk J.: Hamowanie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków przeciwnowotworowych. *Post Biochem.* 2004, 50, 330-334. 73

133. Ohashi S., Natsuzaka M., Naganuma S., Kagawa S., Kimura S., Itoh H., Kalman R.A., Nakagawa M., Darling D.S., Basu D., Gimotty P.A., Klein-Szanto A.J., Diehl J.A., Herlyn M., Nakagawa H.: A NOTCH3-mediated squamous cell differentiation program limits expansion of EMT-competent cells that express the ZEB transcription factors. *Cancer Res.* 2011, 71, 21, 6836-6847.

134. Olmeda D., Moreno-Bueno G., Flores J.M., Fabra A., Portillo F., Cano A.: SNAIL1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Cancer Res.* 2007, 67, 24, 11721-11731.

135. Onder, T.T., Gupta P.B., Mani S.A., Yang J., Lander E.S., Weinberg R.A.: Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008, 68, 3645-54.

136. O'Neill V. J., Twelves C. J.: Oral cancer treatment: Developments in chemotherapy and beyond, *British Journal of Cancer* 2002, 87, 9, 933-937.

137. Ota I., Li X. Y., Hu Y. X., Weiss S. J.: Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, 106, 48, 20318-20323.

138. Paek A.R., Lee C.H., You H.J.: A role of zinc-finger protein 143 for cancer cell migration and invasion through ZEB1 and E-cadherin in colon cancer cells. *Mol Carcinog.* 2014, 53, 1, 161-168.

139. Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E., Peter, M.E.: The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 2008, 22, 894-907.

140. Parkin M., Bray F., Ferlay J. and Pisani P.: Global cancer statistics, 2002. *A cancer J. Clin.* 2002, 55, 2, 74-108.

141. Peacock Z. S. Pogrel M.A., Schmidt B.L.: Exploring the reasons for delay in treatment of oral cancer. *J. Am. Dent. Assoc.* 2008, 139, 10, 1346-1352.

142. Pectasides E., Rampias T., Sasaki C., Perisanidis C., Kouloulis V., Burtness B., Zamboukas T., Rimm D., Fountzilas G., Psyrri A.: Markers of epithelial to mesenchymal transition in association with survival in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *PLoS One* 2014, 9, 4, 1-8.

143. Peinado H., Olmeda D., Cano A.: Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007, 7, 6, 415-428.

144. Perea-Milla L.E., Minarro-Del Moral R.M., Martinez-Garcia C., Zanetti R., Rosso S., Serrano S., Aneiros J.F., Jimenez-Puente A., Redondo M.: Lifestyles, environmental and phenotypic factors associated with lip cancer: a case-control study in southern Spain. *Br J Cancer.* 2003, 88, 1702-1707.

145. Petti S.: Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol.* 2009, 45, 340-350.

146. Pieraccioli M., Nicolai S., Antonov A., Somers J., Malewicz M., Melino G., Raschella G.: ZNF281 contributes to the DNA damage response by controlling the expression of XRCC2 and XRCC4. *Oncogene.* 2016, 35, 2592-2601.

147. Pieraccioli M., Nicolai S., Antonov A., Somers J., Malewicz M., Melino G., Raschella G.: ZNF281 contributes to the DNA damage response by con-

trolling the expression of XRCC2 and XRCC4. *Oncogene* 2016, 35, 20, 2592-2601.

148. Pimenta Amaral T.M., Da Silva Freire A.R., Carvalho A.L., Pinto C.A., Kowalski L.P.: Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Oral Oncol.* 2004, 40, 780-786.

149. Poser I., Domínguez D., Garcia De Herreros A., Varnai A., Buettner R., Bosserhoff A.K.: Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem.* 2001, 276, 24661-24666.

150. Qian Y., Li J., Xia S.: ZNF281 promotes growth and invasion of pancreatic cancer cells by activating Wnt/ beta-catenin signaling. *Dig Dis Sci.* 2017, 62, 2011-2020.

151. Qin C., J, Bua P., L., Zhanga Q., Chena J., T., Lia Q., Y., Liua J., T., Donga H., C., Renaet X. Q.: ZNF281 promotes the invasion and metastasis of colorectal cancer cells. *Cell Physiol Biochem.* 2019, 52, 1503-1516.

152. Rautava J, Syrjänen S.: Biology of Human Papillomavirus infection in head and neck carcinogenesis. *Head and Neck Pathol.* 2012, 6, 3-15.

153. Reddig P.J., Juliano R.L.: Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev.* 2005, 24, 425-439.

154. Reya T., Clevers H.: Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005, 434, 843-850.

155. Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L.: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001, 414, 105-111.

156. Rogers S.N., Brown J.S., Woolgar J.A., Lowe D., Magennis P., Shaw R.J., Sutton D, Errington D, Vaughan D.: Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral Oncol.* 2009, 45, 201-211.

157. Rosivatz E., Becker I., Specht K., Fricke E., Lubert B., Busch R., Höfler H., Becker K.F.: Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol.* 2002, 161, 1881-1891.

158. Rosivatz E., Becker I., Specht K., Fricke E., Lubber B., Busch R., Höfler H., Becker K.F.: Regular Articles: Differential Expression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Regulators Snail, SIP1, and Twist in Gastric Cancer. *Am. J. Pathol.* 2002, 161, 1881-1891.

159. Rowe R.G., Li X.Y., Hu Y., Saunders T.L., Virtanen I., Garcia de Herberos A., Becker K.F., Ingvarsen S., Engelholm L.H., Bommer G.T., Fearon E.R., Weiss S.J.: Mesenchymal cells reactivate Snail1 expression to drive three-dimensional invasion programs. *J Cell Biol.* 2009, 184, 399-408.

160. Sadłeczki P., Grabiec M., Grzanka D., Jóźwicki J., Antosik P., Walentowicz-Sadłeczka M.: Expression of zinc finger transcription factors (ZNF143 and ZNF281) in serous borderline ovarian tumors and low-grade ovarian cancers. *Journal of Ovarian Research*, 2019, 12, 23, 1-10.

161. Sahlberg S. H., Spiegelberg D., Glimelius B., Stenerlöw B. and Nestor M.: Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: Association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells. *PLoS One* 2014, 9, 4, e94621.

162. Saitoh M. Epithelial-mesenchymal transition is regulated at post-transcriptional levels by transforming growth factor- $\beta$  signaling during tumor progression. *Cancer Sci.* 2015; 106(5):481-8.

163. Sakha S., Muramatsu T., Ueda K., Inazawa J.: Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2016, 6, 38750, 1-10.

164. Sánchez-Tilló E., Liu Y., de Barrios O., Siles L., Fanlo L., Cuatrecasas M., Darling D.S., Dean D.C., Castells A., Postigo A.: EMT-activating transcription factors in cancer: Beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012, 69, 20, 3429-3456.

165. Satpute P. S., Hazarey V., Ahmed R. and Yadav L.: Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 2013, 14, 10, 5579-5587.

166. Schneider G. and Krämer O. H.: NF $\kappa$ B/p53 crosstalk—a promising new therapeutic target. *BBA - Rev. Cancer* 2011, 1815, 1, pp. 90-103.

167. Seo K. W., Lee S.K., Bhandari D.R., Park S.B.: ZNF 281 decides the early differentiation fate of human mesenchymal stem cells. *Dev. Biol.* 2011, 356, 1, 214.

168. Seo K.W., Roh K.H., Bhandari D.R., Park S.B., Lee S.K., Kang K.S.: ZNF281 knockdown induced osteogenic differentiation of human multipotent stem cells in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* 2013, 22, 29-40.

169. Schwartz M.A.: Integrins, oncogenes and anchorage independence. *J Cell Biol.* 1997, 139, 575-578.

170. Shah J. P. and Gil Z.: Current concepts in management of oral cancer - Surgery. *Oral Oncology* 2009, 45, 4-5, 394-401.

171. Shield K.D., Ferlay J., Jemal A., Sankaranarayanan R., Chaturvedi A.K., Bray F., Soerjomataram I.: The Global Incidence of Lip, Oral Cavity, and Pharyngeal Cancers by Subsite in 2012. *Ca Cancer J Clin.* 2017; 67, 51-64.

172. Slaughter D. P., Southwick H. W. and Smejkal W.: Field cancerisation in oral stratified squamous epithelium. *Cancer* 1953, 6, 963-968.

173. Smith A., Teknos T. N., Pan Q. T.: Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *ORAL Oncol.* 2013, 49, 4, 287-292.

174. Szala S.: Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych. *Nowotwory.* 2000, 50, 111-121.

175. Talar B., Czyż M.: Rola szlaków sygnałowych TGF- $\beta$  w nowotworach. *Postepy Hig Med Dosw* 2013, 67, 1008-1017.

176. Tejani M. A., Cohen R. B. and Mehra R.: The contribution of cetuximab in the treatment of recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Biologics* 2010, 4, 173-85.

177. Terpstra W., Ploemacher R.E., Prins A., van Lom K., Pouwels K., Wognum A.W., Wagemaker G., Löwenberg B., Wielenga J.J.: Fluorouracil selectively spares acute myeloid leukemia cells with long-term growth abilities in immunodeficient mice and in culture. *Blood.* 1996, 88, 1944-50.



178. Thiery J. P., Acloque H., Huang R. Y. J., Nieto M. A., Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*.2009, 139, 5,871-890.

179. Thompson E.W., Newgreen D.F., Tarin D.: Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res* 2005, 65: 5991-599.

180. Torigoe T., Izumi H., Ishiguchi H., Yoshida Y., Tanabe M., Yoshida T., Igarashi T., Niina I., Wakasugi T., Imaizumi T., Momii Y., Kuwano M., Kohno K.: Cisplatin resistance and transcription factors. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2005, 5, 15-27.

181. Todd R.: TGF-alpha and EGFR receptors mRNAs in uhmman oral cancers. *Carcinogenesis*. 1989, 10, 1553-1556.

182. Tse J.C., Kalluri R.: Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007, 101, 4, 816-829.

183. Vega S., Morales A.V., Ocana O.H., Valdes F., Fabregat I., Nieto M.A.: Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes*. 2004, 18, 1131-1143.

184. Velly A. M., Franco E.L., Schlecht N., Pintos J., Kowalski L.P., Oliveira B.V., Curado M.P.: Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*. 1998, 34, 4, 284-91.

185. Virchow R.: Cellular-Pathologie. *Arch. für Pathol. Anat. und Physiol. und für Klin. Med*. 1885, 8, 3-39.

186. Wakasugi T., Izumi H., Uchiumi T.: ZNF143 interacts with p73 and is involved in cisplatin resistance through the transcriptional regulation of DNA repair genes. *Oncogene*. 2007; 26: 5194-203.

187. Waldron C.A., Shafer W. G.: Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer*. 1975, 36, 4, 1386-92.

188. Wang C., Huang H., Huang Z., Wang A., Chen X., Huang L., Zhou X., Liu X.: Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-

mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 2011, 40, 7, 545-551.

189. Warnakulasuriya S.: Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology.* 2009, 45, 4, 5, 309-316.

190. Warnakulasuriya S.: Living with oral cancer: Epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncology.* 2010, 46, 6, 407-410.

191. Wei S., Wang L., Zhang L., Li B., Li Z., Zhang Q., Wang J., Chen L., Sun G., Li Q., Xu H., Zhang D., Xe Z.: ZNF143 enhances metastasis of gastric cancer by promoting the process of EMT through PI3K/AKT signaling pathway. *Tumour Biol.* 2016, 77, 12813-12821.

192. Wilkes J. D.: Prevention and treatment of oral mucositis following cancer chemotherapy. *Semin. Oncol.* 1998, 25, 5, 538-51.

193. Woolgar J.A., Scott J., Vaughan E.D., Brown JS., West CR., Rogers S.: Survival, metastasis and recurrence of oral cancer in relation to pathological features. *Ann R Coll Surg Engl.* 1995, 77, 325-331.

194. Wu K., Gore C., Yang L., Fazli L., Gleave M., Pong R.C., Xiao G., Zhang L., Yun E.J., Tseng S.F., Kapur P., He D., Hsieh J.T.: Slug, a unique androgen-regulated transcription factor, coordinates androgen receptor to facilitate castration resistance in prostate cancer. *Mol. Endocrinol.* 2012, 26, 9, 1496-507.

195. Wu W.S., Heinrichs S., Xu D., Garrison S.P., Zambetti G.P., Adams J.M., Look A.T.: Slug antagonizes p53 mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell.* 2005, 123, 641-653.

196. Wu Y., Zhou B.P.: New insight of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2008, 40, 7, 643-650.

197. Xu J., Lamouille S. and Derynck R.: TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009, 19, 2, 156-172.

198. Yanaihara N., Caplen N., Bowman E., Seike M., Kumamoto K., Yi M., Stephens R.M., Okamoto A., Yokota J., Tanaka T.: Unique microRNA

molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006, 9, 189-198.

199. Yokoyama K., Kamata N., Hayashi E., Hoteiya T., Ueda N., Fujimoto R., Nagayama M.: Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol*. 2001, 37, 65-71.

200. Yuan X., Wu H., Han N., Xu H., Chu Q., Yu S., Chen Y., Wu K.: Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: Biological significance and therapeutic application. *J. Hematol. Oncol*. 2014, 7, 1, 87.

201. Zarogoulidis P., Yarmus L., Darwiche K., Walter R., Huang H., Li Z., Tsakiridis K., Zarogoulidis K.: Interleukin-6 cytokine: a multifunctional glycoprotein for cancer. *Immuno. Res*. 2013, 9, 62, 16535.

202. Zeng J., Shi R., Cai C.X., Liu X.R., Song Y.B., Wei M., Ma W.L.: Increased expression of Six1 correlates with progression and prognosis of prostate cancer. *Cancer Cell Int*. 2015, 15, 63.

203. Zhang X., Kim K., Zheng Z., Kim H.S., Cha I.H., Yook J.I.: Snail and Axin2 expression predict the malignant transformation of oral leukoplakia. *Oral Oncol*. 2017, 73, 48-55.

204. Zhang P., Hu P., Shen H., Yu J., Liu Q. and Du J.: Prognostic role of Twist or Snail in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis *Eur. J. Clin. Invest*. 2014,44, 11, 1072-1094.

205. Zhang Z., Filho M. S. A.,Nör J. E.: The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol*. 2012, 48, 1, 1-9.

206. Zhao H., Xu Z., Qin H., Gao Z. and Gao L.: MiR-30b regulates migration and invasion of human colorectal cancer via SIX1. *Biochem. J*. 2014, 460, 1, 117-125.

207. Zheng M., Jiang Y., Chen W., Li K., Liu X., Gao S., Feng H., Wang S., Jiang J., Ma X., Cen X., Tang J., Chen Y., Lin Y., Tang Y., Liang X.: Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015, 6, 9, 6794-6810.

208. Zini A., Czerninski R. and Sgan-Cohen H.D.: Oral cancer over four decades: Epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *J. Oral Pathol. Med.* 2010, 39, 4, 299-305.