Kancerogeneza w obrębie błony śluzowej jamy ustnej ssaków w aspekcie badań biomedycznych

ARTUR BRYJA*, MARTA DYSZKIEWICZ-KONWIŃSKA**, JOANNA BUDNA***, WIESŁAWA KRANC*, ADRIAN CHACHUŁA***, SYLWIA CIESIÓŁKA***, EWA SUMELKA***, MATEUSZ KRAJECKI*, DOROTA BUKOWSKA****, PAWEŁ ANTOSIK****, MICHAŁ NOWICKI***, MAŁGORZATA BRUSKA*, BARTOSZ KEMPISTY*, ***

*Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej, Wydział Lekarski II, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

**Katedra i Zakład Biomateriałów i Stomatologii Doświadczalnej, Wydział Lekarski II, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Bukowska 70, 60-812 Poznań

***Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski II, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

****Instytut Weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

Otrzymano 07.06.2016

Zaakceptowano 27.10.2016

Bryja A., Dyszkiewicz-Konwińska M., Budna J., Kranc W., Chachuła A., Ciesiołka S., Sumelka E., Krajecki M., Bukowska D., Antosik P., Nowicki M., Bruska M., Kempisty B.

Carcinogenesis in mammalian oral mucosa from the perspective of biomedical research

Summary

Neoplastic diseases are a challenge to modern medicine. The understanding of histological, molecular and genetic transformation leading to cancer is essential in establishing methods for earlier diagnosis and better treatment of oral cavity cancer, not only in humans but also in animals – in particular, in dogs and cats, which develop oral cancer spontaneously. There are several methods of cancer modeling that expand research capabilities. The following overview discusses different methods of inducing carcinogenesis in animals and presents animal models used in the study of carcinogenesis. Publications reviewed in the paper discuss markers used in the diagnosis of oral cancer and describe the concept of cancer stem cells.

Keywords: carcinogenesis, HNSCC, OSCC, cancer stem cell

Opisywane w literaturze przypadki występowania spontanicznych nowotworów płaskonabłonkowych regionu głowy i szyi (HNSCC – head and neck squamous cell carcinoma) dotyczą przede wszystkim człowieka. Ma to związek z czynnikami ryzyka, którymi są palenie tytoniu i spożywanie alkoholu. Ryzyko HNSCC jest 2-4-krotnie wyższe u palaczy i 6-15-krotnie wyższe u palaczy i pijących alkohol. Odrębną grupę czynników stanowią infekcje wirusowe – w szczególności związane z wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV – human papilloma virus) (26, 38).

U człowieka HNSCC zajmuje szóste miejsce pod względem najczęściej występujących nowotworów z czego 48% zlokalizowanych jest w obrębie jamy ustnej (47). Najpowszechniejszym nowotworem umiejscowionym w jamie ustnej jest rak płaskonabłonkowy jamy ustnej (OSCC – oral squamous cell carcinoma) stanowiący 90% nowotworów występujących w jej obrębie (47). OSCC cechuje się wysoką złośliwością, a przeżywalność pacjentów ze zdiagnozowanym tym typem raka jest niższa niż 50%. Coraz częściej

OSCC rozpoznawany jest u ludzi młodych (26, 47). Przeprowadzone w Europie i Azji badania dotyczące OSCC wykazały, iż wśród populacji europejskiej diagnozowany rak płaskonabłonkowy najczęściej zlokalizowany jest w obrębie nasady języka, a w przypadku populacji azjatyckiej, w obrębie błony śluzowej policzków (51).

U zwierząt domowych OSCC występuje bardzo rzadko, bowiem zwierzęta nie są w aż takim stopniu jak człowiek narażone na typowe czynniki ryzyka. Wyjątek stanowią samorzutne nowotwory jamy ustnej diagnozowane u psów i kotów. Do częściej występujących u psów nowotworów zaliczany jest rak płaskonabłonkowy (SCC – squamous cell carcinoma) diagnozowany w 20% przypadków wszystkich rozpoznanych SCC (35). Jednym z jego podtypów jest brodawczak płaskonabłonkowy (PSCC – papillary squamous cell carcinoma), lokalizujący się także w obrębie jamy ustnej (29). U młodych psów wirus brodawczaka (CPV – canine papilloma virus) może stanowić przyczynę indukcji HNSCC (28). W przy-

padku kotów nowotwory jamy ustnej stanowią 10% wszystkich diagnozowanych u nich nowotworów, z czego 75% to OSCC (35, 45).

Modele zwierzęce w badaniach nowotworów jamy ustnej

W pracach badawczych nad nowotworami wykorzystuje się modele zwierzęce, pozwalające na analizowanie przebiegu kancerogenezy w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Najczęściej stosowanymi w tych badaniach zwierzętami są: chomik, mysz i szczur (45). Idealnym modelem zwierzęcym OSCC jest taki, który powstaje spontanicznie – tutaj do badań *in vivo* dogodnymi modelami mogą być pies i kot, u których OSCC powstają właśnie samoistnie. Dodać należy, że HNSCC z większą częstotliwością rozwija się u starszych kotów niż psów (45).

Występowanie OSCC wśród zwierząt jest dość rzadkie, dlatego nowotwory indukowane są w sposób sztuczny. Badania nad wpływem palenia tytoniu na indukcję nowotworów zapoczątkowały stosowanie związków onkogennych w praktyce laboratoryjnej (14, 36). Od tego czasu HNSCC u zwierząt laboratoryjnych wywołuje się przez traktowanie DMBA (7,12-dimetylbenzantracene – 7,12-dimetylobenzantracene) lub 4NQO (4-nitroquinoline 1-oxide – 1-tlenek 4-nitrochinaliny).

Pierwszą udaną próbę indukcji nowotworu przeprowadził Salley. Po potraktowaniu błony śluzowej chomika DMBA można było histologicznie wyróżnić cztery etapy kancerogenezy: hiperplazję, brodawczak, nowotwór *in situ* i rak płaskonabłonkowy (20, 26, 37). W późniejszym okresie technika ta została udoskonalona. Lin i wsp. poprzez zastosowanie trzy razy w tygodniu DMBA i następnie sześć razy w tygodniu arekaidyny przez okres czterech tygodni uzyskali częstotliwość indukowania nowotworów na poziomie 100% (20, 23). DMBA w komórkach ssaków ulega aktywacji przez utworzenie reaktywnego diol-epoksydu, który z kolei ulega addycji do reszt adeninowych i guaninowych w DNA (49). Drugi związek 4NQO zastosowano do indukcji OSCC u szczurów i myszy poprzez podanie go w formie związku rozpuszczonego w wodzie pitnej (49). Aby zapoczątkować zmiany nowotworowe, kancerogen 4NQO musiał być podawany zwierzętom przez okres od dwóch do trzech miesięcy (20). 4NQO w komórkach wywołuje silny stres oksydacyjny, a produkty jego metabolizmu wiążą się do DNA, głównie do reszt guaninowych. Szerszy opis metabolizmu i zastosowania 4NQO w modelach zwierzęcych został zaprezentowany przez Kanojia i Vaidya (17). Inni badacze wykazali, że nowotwory indukowane z wykorzystaniem DMBA i 4NQO korelują ze zmianą ekspresji H-ras, Bcl-2 (B cell lymphoma 2) i Bax (Bcl-2 associated X protein) (26).

Zastosowanie indukcji chemicznej u zwierząt doświadczalnych pozwala dokładniej odzwierciedlić

zmiany, jakie zachodzą w trakcie kancerogenezy w jamie ustnej u człowieka, gdyż ryzyko zachorowania koreluje z czynnikami onkogennymi, takimi jak palenie tytoniu i spożywanie alkoholu (41). Guzy indukowane u myszy SENCAR poprzez traktowanie błony śluzowej DMBA i 4NQO odzwierciedlały zmiany przednowotworowe i późniejszą przerzutowość, przypominając wielostopniowy proces kancerogenezy w obrębie jamy ustnej człowieka (41).

Do badań interakcji pomiędzy nowotworem, mikrośrodowiskiem i odpornością gospodarza stosuje się model chomika, u którego w łatwy sposób można prześledzić rozwój guza *in vivo* (45). U chomika, jako modelu HNSCC, pewne kontrowersje budzi fakt, iż zwierzę to posiada worki policzkowe, co może nie w pełni odzwierciedlać patofizjologię i spontaniczny rozwój HNSCC u człowieka (45). Chomik jako model OSCC wykorzystywany jest do badań nad wpływem czynników onkogennych, hormonów i sposobu odżywiania na kancerogenezę, a także jako źródło informacji na temat możliwości zastosowania określonych markerów molekularnych i biologicznych. Pozwala to na śledzenie zachodzących zmian genetycznych, molekularnych i immunologicznych w czasie kancerogenezy (41, 42), a także na testowanie potencjalnych związków przeciwnowotworowych (24, 39, 42).

W przypadku szczurów do chemicznej indukcji nowotworu wykorzystuje się 4NQO, gdyż zastosowanie DMBA nie przynosiło oczekiwanych rezultatów (prawdopodobnie ze względu na ochronne działanie szczurzej śliny) (41). Nowotwory indukowane u szczurów w rejonie podniebienia z użyciem 4NQO wykazywały histologicznie podobieństwo do nowotworów jamy ustnej u człowieka, cechowały się jednakże większym zróżnicowaniem i wykazywały mniejszą złośliwość (41).

Alternatywną metodą indukcji nowotworów jest przeszczep tkanki nowotworowej. W celu uniknięcia odrzucenia przeszczepu wymagane jest użycie tkanki identycznej genetycznie z tkanką biorcy (syngenicznej) lub zwierzę biorca musi cechować się obniżoną odpornością. W praktyce laboratoryjnej wykorzystywane są nacie myszy, myszy bezgranicze i myszy z ciężkim niedoborem odporności (SCID) (32, 41, 45). Wymóg użycia myszy SCID u ksenograftów prezentowany jest jako wada tych modeli (20). Inokulacja podskórna komórkowych linii nowotworowych stosowana jest przy analizie skuteczności działania leków przeciwnowotworowych i nowych związków chemicznych, które wykazywałyby niższą cytotoksyczność (45). Do zalet tego modelu należy krótki czas pomiędzy inokulacją a indukcją nowotworu (45). W przypadku przeszczepów syngenicznych, zwierzęta są gotowe do badania w ciągu 14 dni od inokulacji (41). W eksperymentach dokonuje się także przeszczepów ortotopowych, obejmujących różne lokalizacje. Najczęściej są to: podniebienie, język, dziąsła (45). Zaletą trans-

plantacji ortotopowych jest umiejscowienie guza w konkretnych regionach anatomicznych. Modele te stosowane są w badaniach nad patogenezą i leczeniem inwazyjnych form OSCC (45). Zhao i wsp. badali antyrakowe właściwości soli bambusowej. Myszom ICR (Institute of Cancer Research) do błony śluzowej policzków wszczepiono komórki nowotworowe U14. Zaobserwowano spadek objętości guzów u myszy, których błona śluzowa była traktowana solą bambusową (57).

Odrębną grupę stanowią modele z wykorzystaniem myszy transgenicznych, służących głównie do identyfikacji i określania roli w patogenezie specyficznych genów. Modele transgeniczne tworzone są przez indukowanie (knockin) lub wyciszenie (knockout) specyficznych genów onkogennych (45).

Rola nowotworowych komórek macierzystych w indukcji i progresji nowotworów

Nowotworowe komórki macierzyste (CSCs – cancer stem cells) definiuje się na podstawie ich zdolności do formowania drugorzędowych guzów, po ich wyizolowaniu z guza pierwszorzędowego i przeszczepieniu do myszy z obniżoną odpornością (16).

Pojawienie się pierwszej komórki nowotworowej tłumaczy teoria somatycznej mutacji, według której komórka somatyczna w wyniku akumulacji mutacji staje się komórką nowotworową (46), jednak wydaje się, że większe szanse na zainicjowanie procesu nowotworowego mają komórki macierzyste lub progenitorowe poprzez sekwencyjne nabycie mutacji lub zmian epigenetycznych. Komórka somatyczna musiałaby najpierw nabyć cechy komórki macierzystej (50).

Obecnie w literaturze wymienia się trzy teorie opisujące kancerogenezę. Teoria stochastyczna zakłada, że wszystkie komórki nowotworowe są homogenne pod względem potencjału rozwojowego i progresji nowotworu. Teoria ta ma raczej charakter historyczny, ponieważ w wielu doświadczeniach stwierdzono heterogenność komórek nowotworowych (46). W dwóch kolejnych koncepcjach ujęta jest rola CSCs. Pierwsza koncepcja zakłada hierarchiczny rozwój komórek. W tej koncepcji tylko niektóre komórki posiadają potencjał do formowania guza i zdolność do progresji nowotworów. Drugi model klonalnej ekspansji zakłada, że w obrębie guza istnieje komórka CSC z najkorzystniejszymi zmianami onkogennymi, która dominuje nad pozostałymi komórkami CSCs. W trakcie trwania choroby inna komórka CSC może przejąć dominację, a także uzyskać zdolność do zajęcia nowej niszy, przyczyniając się do powstania przerzutów (46).

Uważa się, że CSCs odpowiedzialne są za indukcję nowotworów, ich progresję, przerzutowość i nawrót choroby (15, 43). Pierwszą pracą wykazującą obecność komórek macierzystych w guzach litych była praca Al-Hajj i wsp. Myszom wszczepiano ludzkie komórki raka piersi i tylko niewielka liczba komórek

była w stanie zainicjować powstanie nowotworu. Zdolne do indukcji guza były komórki CSC (1, 15). Jednym z czynników mających wpływ na komórki macierzyste jest mikrośrodowisko, czyli nisza. Nisza „decyduje”, czy komórka przejdzie proces samoodnawiania, czy różnicowania. Mikrośrodowisko komórkowe zabezpiecza organizm przed niekontrolowanym rozprzestrzenianiem komórek macierzystych. CSCs prawdopodobnie nie podlegają takiej regulacji w swoim otoczeniu (53). Inną cechą różniącą komórki macierzyste i CSCs dotyczy obecności tych komórek w tkance. Komórki macierzyste obecne są w tkance w małej liczbie, w przeciwieństwie do CSCs stanowiących znaczną populację w obrębie tkanki (53).

Dehydrogenaza aldehydowa (ALDH – aldehyde dehydrogenase) zastosowana jako marker komórek macierzystych, po wszczepieniu myszom o obniżonej odporności komórek ALDH⁺ przyczyniła się do rozwoju nowotworu. Komórki ALDH⁺ wykazywały charakter komórek CSC (15, 22). Komórki ALDH^{high} mogą być pasażowane do różnych modeli zwierzęcych, wykazując morfologię i heterogenność nowotworu wyjściowego, i odegrać znaczącą rolę jako wysoce specyficzny marker CSCs w HNSCC (4). Grupa enzymów ALDH przeprowadza detoksykację wewnątrzkomórkowych aldehydów przez ich utlenienie i ułatwia utlenianie retinolu do kwasu retinowego we wcześnie różnicujących komórkach macierzystych (4).

Populacje komórek CSC w HNSCC zostały pierwotnie zidentyfikowane przez znakowanie CD44, będącego markerem komórek macierzystych w guzach nabłonkowych (4, 22). U myszy populacja komórek CD44⁺ w HNSCC jest w stanie indukować kancerogenezę i posiada wiele cech właściwych dla komórek macierzystych (4, 34). W przypadku HNSCC z zachowaną wyraźną warstwową hierarchią zróżnicowania komórkowego stwierdzono ekspresję CD44 w warstwie podstawnej, przy braku ekspresji CD44 w komórkach zróżnicowanych (34). Dla potwierdzenia, że komórki warstwy podstawnej w obrębie guza stanowią frakcję komórek niezróżnicowanych, zastosowano barwienie z wykorzystaniem przeciwciał dla cytokeratyny 5/14 (CK5/14, marker epidermalnych komórek macierzystych i progenitorowych) oraz przeciwciał dla inwolukryny (IVL, marker zróżnicowanych keratynocytów). Populacja IVL⁺CD44⁻ reprezentowała komórki guza o fenotypie zróżnicowanym, natomiast populacja IVL⁻CD44⁺ odpowiadała komórkom o fenotypie właściwym dla komórek warstwy podstawnej (34).

Wspólne zastosowanie jako markerów ALDH1 i CD44 do zidentyfikowania CSCs w HNSCC daje większą specyficzność niż stosowanie tych markerów osobno (22). Oprócz ALDH i CD44 do wyznakowania komórek CSC mogą być użyte markery epidermalnych komórek macierzystych, dla których potwierdzono wzrost ekspresji w przypuszczalnych komórkach CSC: Oct-4, Nanog, CD117, CK19 (16).

Markery będące wskaźnikami procesu kancerogenezy

W diagnostyce i leczeniu OSCC istotne znaczenie mają markery molekularne i biologiczne pozwalające wcześniej wykryć zmiany nowotworowe, zastosować terapię celowaną, pogłębić wiedzę na temat procesów zachodzących w komórkach normalnych i nowotworowych. W przypadku tkanek nabłonkowych podstawowymi markerami są keratyny, których wzór ekspresji jest charakterystyczny dla typu nabłonka i stadium różnicowania poszczególnych warstw komórek. W trakcie rozwoju nowotworu ekspresja keratyn jest utrzymywana, ale zmianie ulega wzór ich ekspresji, dlatego są one wykorzystywane jako markery zmian nowotworowych. W badaniach wykazano, że w obrębie guzów jamy ustnej zwiększonej ekspresji ulegają keratyny K8/K18, K17 i K14 (2, 6, 12, 14, 18, 30, 48, 52), natomiast obniżoną aktywność wykazują K4, K5, K13 i K19 (2, 6, 18, 19, 25, 30, 36). W jednym z badań analizowano ekspresję KRT76 w błonie śluzowej policzków chomika. Wykazano spadek ekspresji KRT76 następujący przed rozwojem nowotworu. Keratyna K76 jest charakterystyczna dla warstw obejmujących komórki różnicujące się, dlatego obniżenie ekspresji KRT76 może mieć związek z hiperproliferacją prowadzącą do powstania zmian przednowotworowych. Nie wykazano zmniejszonej aktywności KRT76 w przypadku zwiększonej proliferacji błony śluzowej indukowanej zranieniem lub stanem zapalnym (2). Wykaz białek keratynowych, z opisem struktury i funkcji został przedstawiony przez Bragulla i wsp. (7) oraz przez Molla i wsp. (27).

Istotnymi markerami są także białka z rodziny p53. Białka te chronią organizm przed uszkodzonymi lub zmutowanymi komórkami poprzez naprawę DNA lub indukcję apoptozy. Regulują metabolizm, proliferację, różnicowanie, starzenie się i śmierć komórki (54). W komórkach nowotworach człowieka frekwencja zmutowanych białek p53 przekracza 50%, natomiast frekwencja zmienionych białek p63 i p73 nie przekracza 1% (11).

Białko p53 składa się z sześciu domen: (1) domeny aktywującej transkrypcję I (TAD I – transactivation domain I), (2) domeny aktywującej transkrypcję II (TAD II – transactivation domain II), (3) domeny bogatej w prolinę (PRD – prolin-rich domain), (4) domeny wiążącej DNA (DBD – DNA binding domain), (5) domeny warunkującej oligomeryzację białka (OD – oligomerization domain) i (6) C-końcowej domeny regulującej wiązanie DNA (CTD – C-terminal regulatory domain) (54, 55). Mutacje TP53 i Ha-ras w HNSCCs zależne są od czynników wywołujących kancerogenezę. Mutacje genu TP53 są częstsze wśród populacji, w której czynnikiem ryzyka jest palenie tytoniu i spożywanie alkoholu. Rzadziej tutaj są spotykane mutacje genu Ha-ras. W populacji, w której głównym

czynnikiem ryzyka jest palenie tytoniu, frekwencja mutacji TP53 jest niższa, a częściej obserwuje się mutacje genu Ha-ras (8). W indukowanym nowotworze błony śluzowej policzka u chomika częściej występowały mutacje TP53 niż Ha-ras. Odnotowano także wzrost aktywności telomerazy (8).

Do tej rodziny należą także białka p63. Wyróżnia się 10 polimorficznych białek p63. Dwie grupy różniące się budową N-końcowego łańcucha aminokwasowego: (1) TAp63 zawiera domenę aktywującą transkrypcję TAD I, (2) ΔNp63 nie posiada domeny TAD I. Dodatkowo na podstawie różnicy na końcu karboksylowym rozróżnia się po 5 izoform białka dla każdej grupy (54). Białko TAp63 produkowane jest w niewielkich stężeniach i ulega szybkiej degradacji, hamuje cykl komórkowy i indukuje apoptozę. Myszy TAp63(–) często zapadały na nowotwory i występowały u nich liczne przerzuty (44, 54). Natomiast białka ΔNp63 hamują działanie p53 i TAp63 przez tworzenie kompleksów z tymi białkami lub wiązanie się z receptorami p53 – mogą sprzyjać proliferacji i kancerogenezie. Białka ΔNp63 uznawane są za onkogeny (54). Badania Sinha i wsp. wykazały wzrost ekspresji p63 w przypadku dysplazji i OSCC w porównaniu do błony śluzowej normalnej (40). W normalnym nabłonku p63 ulega ekspresji generalnie w warstwie podstawnej. W obszarze dysplazji zaobserwowano ekspresję p63 w warstwie podstawnej i warstwach wyższych nabłonka. Przy OSCC w kilku przypadkach zaobserwowano ekspresję p63 ograniczoną do warstw brzegowych wysp nowotworowych. W pewnych przypadkach ekspresję p63 obserwowano w komórkach obwodowych i centralnych, a w pozostałych ekspresja p63 była rozproszona w całej tkance guza (40). Rola genów p63 i p73 w supresji nowotworów jest procesem złożonym. Wiadomo, że utrata funkcjonalności p63 i p73 skutkuje kancerogenezą, jednak jest wiele doniesień prezentujących wykluczające się wyniki. Dodatkowo liczba izoform p63 i p73 komplikuje kwestię roli tych białek w procesach nowotworowych (11, 13).

Podobnie, istotną rolę w progresji nowotworów i przerzutach odgrywają metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs – matrix metalloproteinases), grupa endoproteaz zależna od cynku (31). Z MMPs powiązane są tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs – tissue inhibitors of MMPs). Wykazano wzrost ekspresji MMP-2 i MMP-9 w komórkach nowotworowych myszy, jednocześnie odnotowując spadek ekspresji TIMP-1 i TIMP-2 (58).

Jednym z najbardziej rozpowszechnionych czynników transkrypcyjnych, regulujących ekspresję genów niezbędnych do proliferacji komórek, odgrywających rolę w reakcjach zapalnych i adhezji komórek jest NF-κB. Zlokalizowany jest w cytoplazmie, w formie związanej z białkowym inhibitorem IκB (58). Fosforylacja IκB przez kinazę IκB (IKK – IκB kinase) powoduje jego dysocjację i aktywację czynnika

NF- κ B. NF- κ B podlega translokacji do jądra komórkowego i reguluje ekspresję genów (21). U myszy z przeszczepionymi komórkami nowotworowymi U14 odnotowano wzrost markerów stanów zapalnych NF- κ B oraz powolny wzrost w trakcie inokulacji cyklooksygenazy-2 (COX-2 – cyclooxygenase-2) i indukowanej syntetazy tlenu azotu (iNOS – inducible nitric oxide synthase). Poziom ekspresji I κ B- α uległ obniżeniu w porównaniu do komórek zdrowych (58). COX-2 jest enzymem katalizującym przekształcenie kwasu arachidonowego do prostanoidów (prostaglandyn, prostacyklin). Ekspresja COX-2 jest skorelowana z kancerogenezą i stanem zapalnym. Wysoki poziom COX-2 został zaobserwowany w 75% przypadków HNSCCs u człowieka. W przypadku OSCCs u kotów wysoki poziom ekspresji COX-2 odnotowano u 18% (45).

Dla indukcji i progresji nowotworów znaczenie ma niestabilność genomu, interakcja z genami niekodującymi, szczególnie mikroRNA (miRNA). miRNA regulują ekspresję wielu genów na poziomie posttranskrypcyjnej interakcji z mRNA (45, 56). Odgrywają istotną rolę w rozwoju komórek. Deregulacja ekspresji miRNA powiązana jest z procesami nowotworowymi, także z HNSCC (10). miR-21 uważany jest za onkogen. Wzrost ekspresji miR-21 koreluje ze spadkiem ekspresji PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), którego białko jest inhibitorem szlaku 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K – phosphatidylinositol 3-kinases). miR-21 poprzez hamowanie ekspresji PTEN przyczynia się do wzrostu proliferacji i hamowania apoptozy (10). W badaniach stwierdzono w przypadku HNSCC wzrost ekspresji miR-7, miR-155, miR-130b, miR-233, miR-34b oraz spadek ekspresji miR-100, miR-99a, miR-125b, miR-375 (45). Yata i wsp. w swoich badaniach wykazali różnice w ekspresji dziewięciu typów miRNA pomiędzy subpopulacjami komórek ALDH1^{high} i ALDH1^{low} w obrębie populacji HNSCC. Ponadto w komórkach ALDH1^{high} zmniejszonej ekspresji podlegały miR-424, let7a, miR-6836, miR-6873 i miR-7152, a zwiększoną aktywność wykazywała cząsteczka miR-147b (56).

W diagnostyce i terapii nowotworów istotne jest także zrozumienie działania mechanizmów apoptozy. Znajomość szlaków apoptotycznych pozwala identyfikować nowe związki działające proapoptotycznie i przeciwnowotworowo (33). W zdrowej komórce antyapoptyczne białko Bcl-2 ulega ekspresji na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Cytoplazmatyczne białko proapoptyczne Bax przyłączając się do wewnętrznej błony mitochondrialnej, wpływa na wzrost jej przepuszczalności. Podczas apoptozy uwalniany z mitochondriów do cytoplazmy cytochrom c wiąże się z Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), przyczyniając się do aktywacji prokaspazy-9. Kaspaza-9 aktywuje kaspazę-3 i kaspazę-7 napędzając proces apoptozy (5). W komórkach błony śluzowej policzków

myszy z wszczepionymi komórkami nowotworowymi U14 wykazano wzrost ekspresji Bcl-2 i spadek aktywności Bax, kaspazy-3 i kaspazy-9 (58).

Przeprowadzono także badania mające na celu zbadanie ekspresji genów w nowotworach jamy ustnej i ustalenie potencjalnych genów mających wpływ na rozwój i progresję choroby (3, 9).

Badania prowadzone nad nowotworami błony śluzowej jamy ustnej dają wgląd w procesy zachodzące w komórkach. Do badań wykorzystuje się różne modele zwierzęce. Każdy z modeli ma swoje wady i zalety, ale informacje uzyskane z poszczególnych doświadczeń pomagają zrozumieć patogenezę OSCC. Model nowotworu policzka u chomika pozwala prześledzić proces kancerogenezy i opracować skuteczne strategie leczenia. Genetycznie modyfikowane myszy pozwalają ustalić rolę określonych genów w trakcie onkogenezy. Modele podskórnych ksenograftów u nagich myszy są często wykorzystywane w badaniach przedklinicznych. Guzy umiejscowione w miejscu ortotopowym pozwalają śledzić interakcje między komórkami nowotworowymi i zdrowymi w ich naturalnym środowisku.

Piśmiennictwo

1. Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S. J., Clarke M. F.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Academy Sciences USA* 2003, 100, 3983-3988.
2. Ambatipudi S., Bhosale P. G., Heath E., Pandey M., Kumar G., Kane S., Patil A., Maru G. B., Desai R. S., Watt F. M., Mahimkar M. B.: Downregulation of keratin 76 expression during oral carcinogenesis of human, hamster and mouse. *PLoS One* 2013, 8, e70688.
3. Ambatipudi S., Gerstung M., Pandey M., Samant T., Patil A., Kane S., Desai R. S., Schäffer A. A., Beerenwinkel N., Mahimkar M. B.: Genome-wide Expression and Copy Number Analysis Identifies Driver Genes in Gingivobuccal Cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2012, 51, 161-173.
4. Bhajjee F., Pepper D. J., Pitman K. T., Bell D.: Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: A review of current knowledge and future applications. *Head Neck* 2012, 34, 894-899.
5. Blanc C., Deveraux Q. L., Krajewski S., Jänicke R. U., Porter A. G., Reed J. C., Jaggi R., Marti A.: Caspase-3 Is Essential for Pro-caspase-9 Processing and Cisplatin-induced Apoptosis of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2000, 60, 4386-4390.
6. Boldrup L., Coates P. J., Gu X., Nylander K.: DeltaNp63 isoforms regulate CD44 and keratins 4, 6, 14 and 19 in squamous cell carcinoma of head and neck. *J. Pathol.* 2007, 213, 384-391.
7. Bragulla H. H., Homberger D. G.: Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J. Anat.* 2009, 214, 516-559.
8. Chang K. W., Sarraj S., Lin S. C., Tsai P. I., Solt D.: P53 expression, p53 and Ha-ras mutation and telomerase activation during nitrosamine-mediated hamster pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000, 21, 1441-1451.
9. Chen C., Mendez E., Houck J., Fan W., Lohavanichbutr P., Doody D., Yueh B., Futran N. D., Upton M., Farwell D. G., Schwartz S. M., Zhao L. P.: Gene expression profiling identifies genes predictive of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008, 17, 2152-2162.
10. Courthod G., Franco P., Palermo L., Pisconti S., Numico G.: The role of microRNA in head and neck cancer: current knowledge and perspectives. *Molecules* 2014, 19, 5704-5716.
11. Dötsch V., Bernassola F., Coutandin D., Candi E., Melino G.: p63 and p73, the Ancestors of p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010, 2.
12. Fillies T., Werkmeister R., Packeisen J., Brandt B., Morin P., Weingart D., Joos U., Buerger H.: Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer* 2006, 6, 10.
13. Flores E. R., Sengupta S., Miller J. B., Newman J. J., Bronson R., Crowley D., Yang A., McKeon F., Jacks T.: Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: Evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* 2005, 7, 363-373.

14. Gires O., Mack B., Rauch J., Matthias C.: CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 343, 252-259.
15. Homa A., Król M.: Nowotworowe komórki macierzyste. *Życie Wet.* 2015, 90, 144-146.
16. Jones K. B., Klein O. D.: Oral epithelial stem cells in tissue maintenance and disease: the first steps in a long journey. *Int. J. Oral Sci.* 2013, 5, 121-129.
17. Kanojia D., Vaidya M. M.: 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2006, 42, 655-667.
18. Karantz V.: Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 2011, 30, 127-138.
19. Khanom R., Sakamoto K., Pal S. K., Shimada Y., Morita K., Omura K., Miki Y., Yamaguchi A.: Expression of basal cell keratin 15 and keratin 19 in oral squamous neoplasms represents diverse pathophysiology. *Histol. Histopathol.* 2012, 27, 949-959.
20. Kim S.: Animal models of cancer in the head and neck region. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2009, 2, 55-60.
21. Koprowska K., Czyż M.: Molekularne mechanizmy działania partenolidu – stary lek z nową twarzą. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2010, 64, 110-114.
22. Krishnamurthy S., Dong Z., Vodopyanov D., Imai A., Helman J. I., Prince M. E., Wicha M. S., Nor J. E.: Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010, 70, 9969-9978.
23. Lin L. M., Chen Y. K., Lai D. L., Huang Y. L.: Minimal arecaidine concentrations showing a promotion effect during DMBA-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med.* 1996, 25, 65-68.
24. Manoharan S., Balakrishnan S., Menon V. P., Alias L. M., Reena A. R.: Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenzaanthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med. J.* 2009, 50, 139-146.
25. Mikami T., Cheng J., Maruyama S., Kobayashi T., Funayama A., Yamazaki M., Adeola H. A., Wu L., Shingaki S., Saito C., Saku T.: Emergence of keratin 17 vs. loss of keratin 13: their reciprocal immunohistochemical profiles in oral carcinoma in situ. *Oral Oncol.* 2011, 47, 497-503.
26. Mognetti B., Di Carlo F., Berta G. N.: Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol.* 2006, 42, 448-460.
27. Moll R., Divo M., Langbein L.: The human keratins: biology and pathology. *Histochem. Cell Biol.* 2008, 129, 705-733.
28. Munday J. S., Tucker R. S., Kiupel M., Harvey C. J.: Multiple oral carcinomas associated with a novel papillomavirus in a dog. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27, 221-225.
29. Nemec A., Murphy B. G., Jordan R. C., Kass P. H., Verstraete F. J.: Oral papillary squamous cell carcinoma in twelve dogs. *J. Comp. Pathol.* 2014, 150, 155-161.
30. Ohkura S., Kondoh N., Hada A., Arai M., Yamazaki Y., Sindoh M., Takahashi M., Matsumoto I., Yamamoto M.: Differential expression of the keratin-4, -13, -14, -17 and transglutaminase 3 genes during the development of oral squamous cell carcinoma from leukoplakia. *Oral Oncol.* 2005, 41, 607-613.
31. Pergol P., Nowak-Stepniowska A., Drela K., Padzik-Graczyk A.: Znaczenie komórek macierzystych w inicjacji i rozwoju nowotworów. *Post. Biochemii* 2013, 59, 45-52.
32. Piotrowska H., Myszkowski K., Abraszek J., Kwiatkowska-Borowczyk E., Amarowicz R., Murias M., Wierzchowski M., Jodynis-Liebert J.: DMU-212 inhibits tumor growth in xenograft model of human ovarian cancer. *Biomed. Pharmacother.* 2014, 68, 397-400.
33. Piotrowska H., Myszkowski K., Ziolkowska A., Kulcenty K., Wierzchowski M., Kaczmarek M., Murias M., Kwiatkowska-Borowczyk E., Jodynis-Liebert J.: Resveratrol analogue 3,4,4',5-tetramethoxystilbene inhibits growth, arrests cell cycle and induces apoptosis in ovarian SKOV-3 and A-2780 cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012, 263, 53-60.
34. Prince M. E., Sivanandan R., Kaczorowski A., Wolf G. T., Kaplan M. J., Dalerba P., Weissman I. L., Clarke M. F., Le Ailles: Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Nat. Academy Sciences USA* 2007, 104, 973-978.
35. Rathore K., Alexander M., Cekanova M.: Piroxicam inhibits Masitinib-induced cyclooxygenase 2 expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Transl. Res.* 2014, 164, 158-168.
36. Sakamoto K., Aragaki T., Morita K., Kawachi H., Kayamori K., Nakanishi S., Omura K., Miki Y., Okada N., Katsube K., Takizawa T., Yamaguchi A.: Down-regulation of keratin 4 and keratin 13 expression in oral squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia: a clue for histopathogenesis. *Histopathology* 2011, 58, 531-542.
37. Salley J. J.: Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J. Dent. Res.* 1954, 33, 253-262.
38. Schierl M., Patel D., Ding W., Kochhar A., Adhami K., Zhou X. K., Dannenberg A. J., Granstein R. D.: Tobacco smoke-induced immunologic changes may contribute to oral carcinogenesis. *J. Invest. Med.* 2014, 62, 316-323.
39. Singh A. K., Manoharan S., Vasudevan K., Rajasekaran D., Manimaran A., Suresh K.: Anti-cell proliferative and anti-angiogenic potential of andrographolide during 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013, 14, 6001-6005.
40. Sinha A., Chandra S., Raj V., Zaidi I., Saxena S., Dwivedi R.: Expression of p63 in potentially malignant and malignant oral lesions. *J. Oral Biol. Craniofac. Res.* 2015, 5, 165-172.
41. Smith L. P., Thomas G. R.: Animal models for the study of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: A historical perspective with review of their utility and limitations. Part A. Chemically-induced de novo cancer, syngeneic animal models of HNSCC, animal models of transplanted xenogeneic human tumors. *Int. J. Cancer* 2006, 118, 2111-2122.
42. Sophia J., Kiran K. T. K., Kowshik J., Mishra R., Nagini S.: Nimbolide, a neem limonoid inhibits Phosphatidylinositol-3 Kinase to activate Glycogen Synthase Kinase-3beta in a hamster model of oral oncogenesis. *Sci. Rep.* 2016, 6, 22192.
43. Stankiewicz M., Malecki M.: Macierzyste komórki nowotworowe a oporność nowotworów na terapię. *Nowotwory* 2009, 59, 456-463.
44. Su X., Chakravarti D., Cho M. S., Liu L., Gi Y. J., Lin Y.-L., Leung M. L., El-Naggar A., Creighton C. J., Suraokar M. B., Wistuba I., Flores E. R.: TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature* 2010, 467, 986-990.
45. Supsavhad W., Dirksen W. P., Martin C. K., Rosol T. J.: Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. *Vet. J.* 2016, 2010, 7-16.
46. Szaryńska M., Kmiec Z.: Rola nowotworowych komórek macierzystych w patogenezie i terapii chorób nowotworowych. *Forum Med. Rodz.* 2011, 5, 47-56.
47. Tanaka T., Tanaka M.: Oral carcinogenesis and oral cancer chemoprevention: a review. *Patholog. Res. Int.* 2011, 2011, 431246.
48. Toyoshima T., Vairaktaris E., Nkenke E., Schlegel K. A., Neukam F. W., Ries J.: Cytokeratin 17 mRNA expression has potential for diagnostic marker of oral squamous cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2008, 134, 515-521.
49. Vairaktaris E., Spyridonidou S., Papakosta V., Vylliotis A., Lazaris A., Perrea D., Yapijakis C., Patsouris E.: The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol.* 2008, 44, 315-324.
50. Visvader J. E., Lindeman G. J.: Stem cells and cancer – The promise and puzzles. *Mol. Oncol.* 2010, 4, 369-372.
51. Warnakulasuriya S.: Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009, 45, 309-316.
52. Wei K. J., Zhang L., Yang X., Zhong L. P., Zhou X. J., Pan H. Y., Li J., Chen W. T., Zhang Z. Y.: Overexpression of cytokeratin 17 protein in oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oral. Dis.* 2009, 15, 111-117.
53. Wieczorek K., Niewiarowska J.: Nowotworowe komórki macierzyste. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2012, 66, 629-636.
54. Wysocka-Dubielecka K. M., Majewski S., Łoza K.: The role of p63 proteins in tumorigenesis and the significance of their expression in the diagnosis of skin and female genital tract neoplasms. *Przegl. Dermatol.* 2015, 6, 550-557.
55. Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M. D., Dötsch V., Andrews N. C., Caput D., McKeon F.: p63, a p53 Homolog at 3q27-29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Mol. Cell* 1998, 2, 305-316.
56. Yata K., Beder L. B., Tamagawa S., Hotomi M., Hirohashi Y., Grenman R., Yamanaka N.: MicroRNA expression profiles of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 2015, 47, 1249-1256.
57. Zhao X., Deng X., Park K. Y., Qiu L., Pang L.: Purple bamboo salt has anticancer activity in TCA8113 cells in vitro and preventive effects on buccal mucosa cancer in mice in vivo. *Exp. Ther. Med.* 2013, 5, 549-554.
58. Zhao X., Pang L., Qian Y., Wang Q., Li Y., Wu M., Ouyang Z., Gao Z., Qiu L.: An animal model of buccal mucosa cancer and cervical lymph node metastasis induced by U14 squamous cell carcinoma cells. *Exp. Ther. Med.* 2013, 5, 1083-1088.

Adres autora: dr hab. Bartosz Kempisty, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań, Poland; e-mail: bkempisty@ump.edu.pl