

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Piotr Ramlau

**Ocena działania przeciwnowotworowego
metylowego analogu resweratrolu 3'-hydroksy-3,4,5,4'-
-tetrametoksystylbenu (DMU-214) w modelu raka języka**

Katedra i Zakład Toksykologii
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotorzy: dr hab. Hanna Piotrowska-Kempisty, dr hab. Krzysztof Osmola

Poznań 2020

*Serdeczne podziękowania składam
Pani dr hab. n. farm. Hannie Piotrowskiej-Kempisty
oraz Panu dr. hab. n. med. Krzysztofowi Osmoli
za wyrozumiałość i pomoc w trakcie realizacji projektu.*

*Serdecznie dziękuję
Panu Profesorowi Markowi Muriasowi
za umożliwienie przeprowadzenia badań.*

Spis treści

Wykaz skrótów	5
1. Wstęp.	7
1.1. Epidemiologia nowotworów	7
1.2. Nowotwory głowy i szyi	8
1.3. Rak języka — dane epidemiologiczne i czynniki ryzyka	12
1.3.1. Objawy raka języka	13
1.3.2. Diagnostyka raka języka	14
1.3.3. Terapia raka języka	15
1.4. EGFR	22
1.4.1. Budowa EGFR	22
1.4.2. Fosforylacja EGFR	23
1.5. Apoptoza	24
1.5.1. Szlak wewnątrzkomórkowy	24
1.5.2. Szlak zewnątrzkomórkowy	26
1.6. Resweratrol	27
1.6.1. Budowa resweratrolu (3,4',5-trihydroksystylbenu)	27
1.6.2. Działanie przeciwnowotworowe resweratrolu w modelu raka języka	28
1.6.3. Metylowe analogi resweratrolu	29
2. Założenia i cel pracy	31
3. Materiał i metody	33
3.1. Odczynniki i sprzęt	33
3.1.1. Hodowla komórek	33
3.1.2. Test MTT	35
3.1.3. Test ELISA	35
3.1.4. Oznaczenie aktywności kaspaz 3/7, 8 i 9	36
3.1.5. Cytometria przepływowa	36
3.1.6. Western Blot	36
3.1.7. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja	37
3.1.8. qPCR array	38

3.2. Metody	38
3.2.1. Hodowla komórek	38
3.2.2. Ocena cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu MTT	38
3.2.3. Test ELISA	39
3.2.4. Oznaczenie aktywności kaspaz 3/7, 8 i 9	40
3.2.5. Cytometria przepływowa	40
3.2.6. Analiza poziomu ekspresji białek EGFR oraz fosforylowanej formy EGFR przy użyciu metody Western Blot	41
3.2.7. Izolacja RNA metodą Chomczyński-Sacchi i odwrotna transkrypcja	41
3.2.8. qPCR-array.	42
3.2.9. Analiza statystyczna wyników	43
4. Wyniki	44
4.1. Ocena cytotoksyczności metylowej pochodnej resweratrolu DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu w liniach komórkowych raka języka SCC-25 oraz CAL-27.	44
4.2. Poziom ekspresji białka EGFR i fosforylowanej postaci EGFRP w liniach komórkowych raka języka CAL-27 i SCC-25	46
4.3. Ocena indukcji apoptozy i nekrozy komórek raka języka CAL-27 oraz SCC-25 pod wpływem DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu.	47
4.4. Analiza aktywności kaspaz 3/7, 8 i 9 pod wpływem DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu	48
4.5. Ocena wpływu DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu na cykl komórkowy w liniach CAL-27 oraz SCC-25	50
4.6. Analiza poziomu ekspresji białka EGFR oraz jego fosforylowanej formy EGFRP pod wpływem DMU-214, gefitynibu i mieszaniny DMU-214 oraz gefitynibu w komórkach raka języka SCC-25 oraz CAL-27	51
4.7. Ocena wpływu DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu na ekspresję genów zaangażowanych w ścieżkę sygnalizacyjną EGFR	53
5. Dyskusja	57
6. Podsumowanie i wnioski	67
7. Streszczenie	69
8. Summary	71
9. Piśmiennictwo	73
10. Spis tabel i rycin	82
Opinia Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu	84
Zgoda na użycie zdjęć	85

Wykaz skrótów

AJCC	Amerykański Komitet ds. Raka (The American Joint Committee on Cancer)
ApoBD	Apolipoprotein BD
Bax	BCL2-associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma gene-2
Bid	BH3 interacting domain death agonist
CT	tomografia komputerowa (computed tomography)
DD	domena śmierci (death domain)
DED	domeny śmierci efektorowe (death effector domain)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimetylo sulfotlenek (dimethyl sulfoxide)
DMU-212	3,4,4'-tetrametoksystilben
DMU-214	3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystilben
DMU-281	4'-hydroksy-3,4,5-trimetoksystilben
DMU-291	4-hydroksy-3,5,4'-trimetoksystilben
DMU-295	4,4'-dihydroksy-3,5-dimetoksystilben
DMU-807	3-hydroksy-4,5,4-trimetoksystilben
EDTA	kwas wersenowy
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor)
EGFR	receptor naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor)
FADD	białko zawierające domenę śmierci współdziałające z FAS (fas-associated death domain)
FBS	serum płodowe z cieląt (fetal bovine serum)
GLOBOCAN	The Global Cancer Observatory
HER	receptor naskórkowego ludzkiego czynnika wzrostu (human epidermal growth factor receptor)

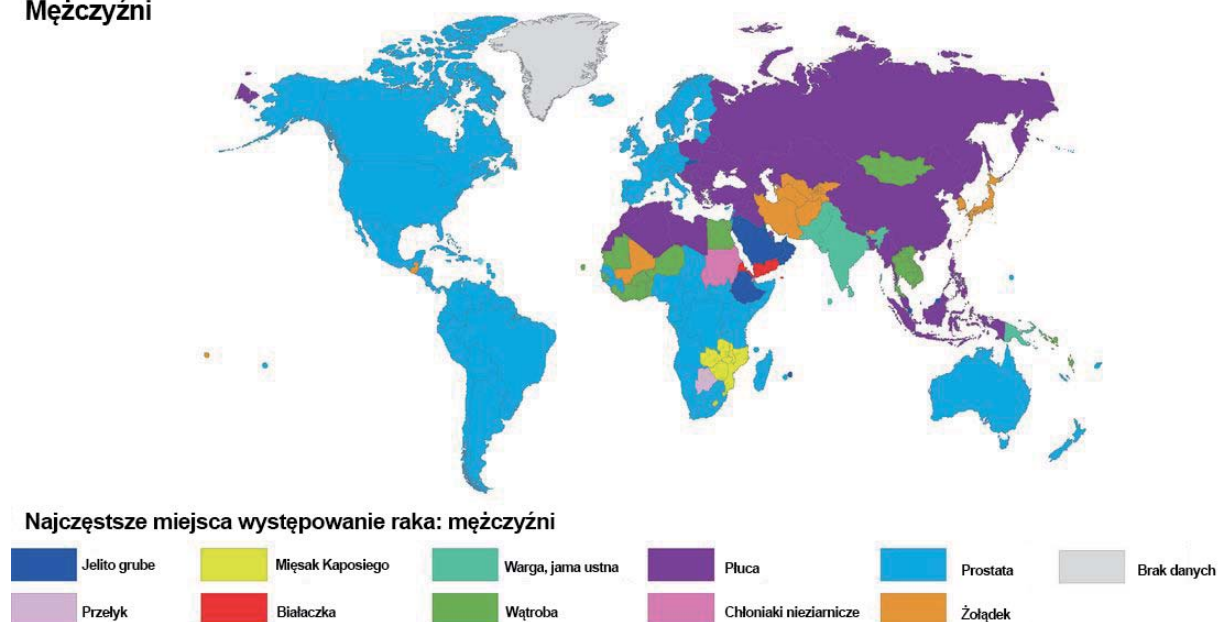
HIC	kraje wysoko rozwinięte (high-income countries)
HIF-1 α	czynnik indukowany hipoksją 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α)
HPV	ludzki wirus brodawczaka (human papilloma virus)
ICON-S	The International Collaboration on Oropharyngeal Network for Staging
LMIC	kraje słabo i średnio rozwinięte (low- and middle-income countries)
MMP	potencjał błony mitochondrialnej (mitochondrial membrane potential)
MMP9	matrix metalloproteinase 9
MRI	obrazowania za pomocą rezonansu magnetycznego (magnetic resonance imaging)
PCR	reakcja łańcuchowej polimerazy (polymerase chain reaction)
RIP	receptor-interacting protein
RTK	receptor kinazy tyrozynowej (receptor tyrosine kinases)
TBP	TATA box binding protein
TGF α	transformujący czynnik wzrostu α (transforming growth factor α)
TNF	czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor)
TNM	tumour — guz (pierwotny), node — węzeł (chłonny), metastasis — przerzut (odległy)
TPA	12-O tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRADD	białko zawierające domenę śmierci współdziałające z TNFR (TNFR-associated death domain)
UICC	Unia na rzecz Międzynarodowej Kontroli Raka (Union for International Cancer Control)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (vascular endothelial growth factor)

1. Wstęp

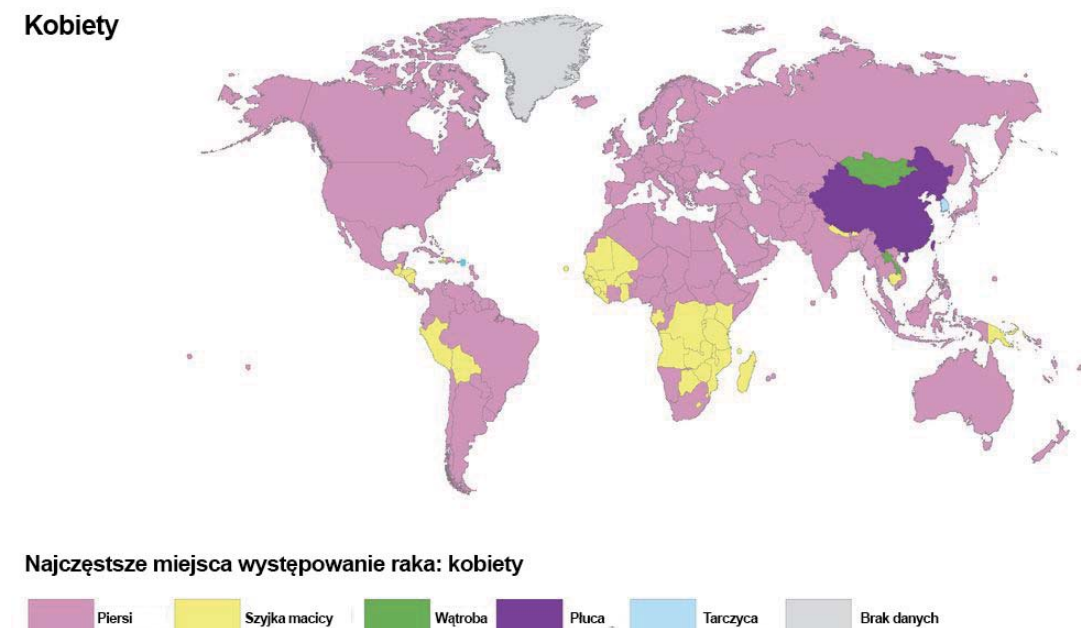
1.1. Epidemiologia nowotworów

W ostatnich dziesięcioleciach częstość występowania nowotworów rośnie niepokojąco, co jest związane ze zmieniającym się stylem życia, niezdrowymi nawykami i dłuższą średnią przeżywalnością. Rak był jedną z najpoważniejszych chorób XX wieku, a przez zwiększone obecnie narażenie na czynniki kancerogenne i rosnącą zapadalność choroby nowotworowe stały się głównym problemem medycyny XXI wieku. Jest to szczególnie zauważalne w krajach słabo i średnio rozwiniętych (ang. low- and middle-income countries, LMIC) w związku z transformacją gospodarczą wiążącą się z mechanizacją transportu i pracy, zmianami kulturowymi oraz zwiększonym dostępem do rynków międzynarodowych. W rezultacie wiele czynników ryzyka związanych ze stylem życia, tj. palenie tytoniu, brak aktywności fizycznej, nadwaga, które są już masowe w krajach wysoko rozwiniętych (ang. high-income countries, HIC), stają się coraz bardziej powszechne w LMIC [1]. Występują znaczne rozbieżności dotyczące najczęściej diagnozowanego raka w poszczególnych krajach, szczególnie wśród mężczyzn (**rycina 1**). Według GLOBOCAN w 2012 roku najczęściej diagnozowanym rakiem wśród mężczyzn w 87 krajach, zwłaszcza w Ameryce Północnej i Południowej, Europie Północnej, Zachodniej i Południowej oraz Oceanii, był rak prostaty. Rak płuca jest najczęściej diagnozowanym rakiem wśród mężczyzn w Europie Wschodniej. W Afryce dominującymi nowotworami wśród mężczyzn są nowotwory prostaty, płuca, jelita grubego, wątroby, przełyku, mięsak Kaposiego, białaczka, nowotwór żołądka i chłoniak nieziarniczy, podczas gdy w Azji obejmują one płuca, wargę i jamę ustną, wątrobę, żołądek, jelito grube oraz raka prostaty. U kobiet najczęściej występującym nowotworem w Ameryce Północnej, Europie i Oceanii jest rak piersi. Nowotwory piersi i szyjki macicy są najczęściej diagnozowanymi nowotworami w Ameryce Łacińskiej i na Karaibach, w Afryce i większości Azji. Jednak bardzo często nowotwory u kobiet w Azji obejmują także płuca (Chiny, Korea Północna), wątrobę (Laotańska Republika Ludowo-Demokratyczna, Mongolia) i tarczycę (Korea Południowa) [1].

Mężczyźni



Kobiety



Rycina 1. Częstość zachorowań na nowotwory na świecie [1]

1.2. Nowotwory głowy i szyi

Pomimo że rak głowy i szyi jest związany z bólem, stresem psychospołecznym, trwałymi okaleczeniami znacznie obniżającymi jakość życia oraz przedwczesną śmiercią, ostatnie postępy medycyny przyczyniły się do znacznej poprawy rokowania tego nowotworu.

Wprowadzenie inhibitorów immunologicznych do standardów leczenia w terapii wznowy lub przerzutów raka głowy i szyi przyniosło znaczące korzyści pacjentom dotkniętym tą chorobą. Równoległe ulepszenia standardowej terapii, tj. małoinwazyjne metody chirurgiczne oszczędzające narządy, postępy w radioterapii, wielokierunkowe podejście w leczeniu oraz ulepszona diagnostyka onkologiczna, poprawiły funkcjonowanie pacjentów, zmniejszyły zachorowalność i śmiertelność. W diagnostyce nowotworów głowy i szyi, po zebraniu dokładnej historii choroby i przeprowadzeniu badania fizykalnego u pacjenta, najczęściej wykonuje się obrazowanie radiologiczne przed pobraniem dużych próbek podczas biopsji w celu uniknięcia możliwego zniekształcenia anatomicznego lub fałszywie dodatnich wyników biopsji w tomografii pozytonowej. Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa jest wysoce czuła, specyficzna i dokładna w początkowej diagnostyce histologicznej [2]. W przypadku konieczności wykonania biopsji węzła chłonnego szyjnego i po uwzględnieniu jej wyników, wskazana jest resekcja całej grupy węzłów, aby zapobiec rozprzestrzenianiu się przerzutów i progresji guza, co wymagałoby bardziej radykalnego leczenia [2].

Około 90% nowotworów górnego odcinka układu pokarmowego i dróg oddechowych stanowią raki płaskonabłonkowe, które wywodzą się z nierogowaciejącego nabłonka wielowarstwowego płaskiego (płaskonabłonkowe raki głowy i szyi). Raki płaskonabłonkowe rozwijają się na podłożu stanów przedrakowych (zmiany morfologiczne związane ze zwiększonym ryzykiem powstania nowotworu złośliwego). Metaplasja płaskonabłonkowa może towarzyszyć zmianom regeneracyjnym i polega na zastąpieniu nabłonka charakterystycznego dla określonego miejsca wielowarstwowym nabłonkiem płaskim. Dysplazja polega na powstawaniu zaburzeń w dojrzewaniu nabłonka i w zależności od jego zajęcia można ocenić stopień jej zaawansowania (niewielki — komórki dysplastyczne zlokalizowane w 1/3 dolnej nabłonka, średni — komórki dysplastyczne zlokalizowane w 2/3 dolnych nabłonka, duży — komórki dysplastyczne zlokalizowane dodatkowo w górnej 1/3 nabłonka, ale nie w całej jego grubości). Proces tworzenia nowotworu, zwany kancerogenezą, jest procesem wieloletnim, a wczesne etapy mogą być odwracalne. Do typowych zmian przedrakowych w jamie ustnej należą leukoplakia, erytroplakia i liszaj płaski [3]. W regionie głowy i szyi występują również raki gruczołowe, które wywodzą się z nabłonka gruczołowego ślinianek. Są one najczęstszymi nowotworami złośliwymi dużych i małych gruczołów ślinowych. Sporadycznie w regionie głowy i szyi występują raki drobnokomórkowe pochodzenia neuroendokrynnego, a także raki skóry typu Merkla. Zwiększona świadomość i przyspieszona diagnoza raka związanego z ludzkim wirusem brodawczaka (ang. human papilloma virus, HPV), wraz ze zmniej-

szeniem liczby nowotworów głowy i szyi związanych z paleniem wyrobów tytoniowych, zmieniają podejście do sposobu ich leczenia. Rokowanie i wielowymiarowe możliwości terapeutyczne dla chorych na raka głowy i szyi różnią się w zależności od czynników epidemiologicznych, umiejscowienia anatomicznego i stadium nowotworu [4].

Istnieje wyraźna niejednorodność guzów powstających w obrębie głowy i szyi. Rak głowy i szyi był siódmym najczęściej występującym rakiem na świecie w 2018 r. (890 000 nowych przypadków i 450 000 zgonów) [5]. W Polsce nowotwory nabłonkowe (raki) regionu głowy i szyi stanowią około 5% wszystkich zarejestrowanych nowotworów złośliwych (ok. 4% wśród mężczyzn i ponad 1% wśród kobiet). W ostatnich latach rozpoznawano rocznie około 6000 nowych zachorowań i zarejestrowano 3800 zgonów. W minionej dekadzie odnotowano spadek zachorowalności na raka krtani i jednocześnie wzrost zachorowalności na raka ustnej części gardła [6]. Rak jamy ustnej i gardła stanowi 2% wszystkich nowotworów złośliwych, z czego około 40% to rak języka [7]. Zazwyczaj są one diagnozowane u starszych pacjentów, nadużywających alkoholu i wyrobów tytoniowych. Istnieje światowa tendencja spadkowa w występowaniu nowotworów głowy i szyi, która jest częściowo spowodowana zmniejszoną konsumpcją tytoniu wraz ze zwiększającą się świadomością społeczną [8]. Z drugiej strony, obserwuje się coraz więcej przypadków raka jamy ustnej i gardła związanego z wirusem HPV, najczęściej HPV typu 16. Problem ten występuje głównie w Stanach Zjednoczonych oraz Europie Północnej u osób w młodym wieku (od 10. do 30. roku życia), u których doszło do ekspozycji na wirusa HPV podczas seksu oralnego [9, 10]. W 2000 r. w samych tylko Stanach Zjednoczonych liczba zdiagnozowanych nowotworów głowy i szyi, które były związane z występowaniem u pacjenta wirusa HPV wzrosła z 16,3% do ponad 72,7%. Odnotowany wzrost zachorowań spowodowany był zwiększającą się świadomością na temat zależności pomiędzy HPV a nowotworami głowy i szyi, a także rozwijającymi się możliwościami diagnostycznymi potwierdzającymi obecność wirusa HPV [11]. Skuteczność profilaktycznego szczepienia przeciwko HPV nie jest naukowo potwierdzona w przypadku raka jamy ustnej i gardła, w przeciwieństwie do raka odbytu i narządów płciowych. Niemniej jednak sugeruje się, że zmniejszona częstość występowania raka jamy ustnej i gardła na skutek szczepień może być widoczna, ale dopiero po 2060 r. [9]. Rokowanie i ogólna przeżywalność jest korzystniejsza dla pacjentów z HPV-dodatnim rakiem jamy ustnej i gardła. Bardzo często jest to uwarunkowane lepszą reakcją na chemioterapię i radioterapię, a także lepszą sprawnością fizyczną i mniejszą liczbą współistniejących chorób. U pacjentów z nowotworem niezależnym od HPV nie ma często możliwości zwiększenia

aktywności fizycznej, która polepsza rokowanie chorego. Wykazano, że jest to spowodowane dolegliwościami związanymi z uzależnieniem od wyrobów tytoniowych i nadużywaniem alkoholu [10]. Łatwiejszy dostęp do radioterapii wraz z wprowadzeniem równoczesnej terapii wspomagającej oraz chemioradioterapii poprawiły przeżycie chorych na raka głowy i szyi, zwłaszcza na raka jamy ustnej i gardła związanym z HPV [10].

Amerykański Komitet ds. Raka (ang. The American Joint Committee on Cancer, AJCC) wykorzystuje system oceny zaawansowania TNM (guz, węzeł chłonny, przerzut) wraz z systemem stworzonym przez Unię na rzecz Międzynarodowej Kontroli Raka (ang. Union for International Cancer Control, UICC) w celu klasyfikacji i określenia schematu leczenia określonego przypadku płaskonabłonkowego raka głowy i szyi [12]. Stopień zaawansowania jest uwarunkowany od lokalizacji nowotworu w określonym miejscu anatomicznym. Zasadniczo wczesne stadia (I i II) obejmują mniejsze guzy bez widocznego zajęcia węzłów chłonnych. Późniejsze stadia (III i IV) charakteryzują się lokalnie zaawansowaną chorobą i objęciem otaczających struktur lub zwiększoną liczbą zajętych węzłów chłonnych. Odległe rozprzestrzenianie się przerzutów również definiuje stadium IV. Stopień zaawansowania raka jamy ustnej i gardła wymaga wykonania badań potwierdzających obecność wirusa HPV, które obejmują hybrydyzację *in situ* lub techniki wykorzystujące reakcję łańcuchowej polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR) w celu ustalenia występowania DNA HPV lub miana wirusa. Wykorzystuje się również testy immunohistochemiczne opierające się na oznaczeniu ekspresji białka p16, które jest markerem potwierdzającym występowanie HPV w organizmie chorego [13].

W 2017 r. AJCC i UICC wprowadziły oddzielny system oceny zaawansowania nowotworów dla pacjentów z HPV-dodatnim rakiem jamy ustnej i gardła, co było spowodowane innym rokowaniem chorych z tej podgrupy [12]. Stowarzyszenie The International Collaboration on Oropharyngeal Network for Staging (ICON-S) porównało kryteria prognostyczne oceny zaawansowania nowotworu (ósma edycja, obowiązująca od 2017 r.) z poprzednim system (siódma edycja, która weszła w życie w 2010 r.). W tym celu wykorzystano białko p16 jako marker choroby uwarunkowanej występowaniem HPV. Przeprowadzona analiza potwierdziła różnice w rokowaniu 1907 pacjentów z rakiem jamy ustnej i gardła, u których stwierdzono obecność HPV [14, 15]. Całkowity 5-letni wskaźnik przeżycia w przypadku raka jamy ustnej gardła z dodatnim wynikiem HPV był podobny dla stadiów I, II, III i IVA, ale istotnie niższy dla stadium IVB. Przeżycie nie różniło się istotnie między pacjentami z guzami T4a i guzami T4b oraz z N0, N1, N2, N2a i N2b. Jednak przeżycie zmniejszyło się u pacjentów z nowotworem obejmującym

mującym węzły chłonne grupy N3. W siódmej wersji klasyfikacji TNM nie brano pod uwagę występowania HPV u chorych na raka jamy ustnej i gardła. Dlatego rokowanie pogarszało się z każdym następnym stadium choroby, od stadium I do stadium IVB [14, 15]. Ten system oceny stopnia zaawansowania miał odzwierciedlać prognozy dotyczące przeważnie chorych, u których nie stwierdzono występowania HPV. Włączenie wyników ICON-S do ósmej edycji oceny zaawansowania tych nowotworów spowodowało więc względną poprawę rokowania chorych z wynikiem HPV-dodatnim.

Zachowanie struktury i funkcji narządów w obrębie głowy i szyi, zmniejszenie zachorowań i długoterminowe utrzymanie jakości życia chorych poddanych leczeniu wymaga specjalistycznej opieki obejmującej chirurgię, radioterapię i onkologię wspomaganą przez opiekę stomatologiczną, reedukację nawyków żywieniowych, współpracę z fizjoterapeutą i pomoc psychologiczną.

1.3. Rak języka — dane epidemiologiczne i czynniki ryzyka

Nowotwory jamy ustnej stanowią 14% wszystkich nowotworów głowy i szyi. Pomimo tego, że język jest narządem łatwo dostępnym podczas rutynowego badania okresowego, częstość występowania nowotworów języka w zaawansowanym stadium (III–IV etap wg klasyfikacji TNM) wynosi nadal około 30–35% [16]. Zwiększona świadomość społeczeństwa na temat wpływu wyrobów tytoniowych i alkoholu na zdrowie spowodowała spadek ich konsumpcji w ciągu ostatnich lat. Nie znalazło to jednak odzwierciedlenia w występowaniu raka języka (obejmującego 2/3 przedniej jego części). Odnotowano bowiem 60% wzrost zachorowań na raka języka u pacjentów w wieku poniżej 40. r.ż., zwłaszcza wśród młodych kobiet [17]. Powiązanie wirusa HPV z występowaniem nowotworów jamy ustnej i gardła może wyjaśniać zaobserwowaną tendencją zachorowań w młodym wieku [18]. Dostępne są dane literaturowe, które wykazały wpływ niektórych typów wirusa HPV (beta i gamma) na rozwój nowotworów głowy i szyi, w tym raka jamy ustnej. Nie potwierdzono jednak, czy wspomniane powyżej typy wirusa HPV mają większy wpływ na występowanie raka języka w grupach palących i niepalących oraz w grupach osób młodszych i starszych [19, 20]. Wykazano, że niezależnie od przynależności do grupy wiekowej i współistniejących czynników ryzyka, występowanie przewlekłego stanu zapalnego lub zaburzeń mikrobiomu jamy ustnej może zwiększać prawdopodobieństwo wystąpienia raka języka [21]. Ostatnio przeprowadzono badania kohortowe wykorzysta-

jące modele klonalnej ekspansji w celu ustalenia czynników wywołujących powstawanie nowotworów w obrębie głowy i szyi, ich wzrostu oraz przekształcenia się w zmianę złośliwą. Wykazano znaczną różnicę strukturalną, niezależną od wieku chorego, pomiędzy rakiem języka a innymi nowotworami jamy ustnej i gardła (związanymi z paleniem tytoniu, nadużywaniem alkoholu i uwarunkowanym występowaniem wirusa HPV), co sugeruje wyjątkową, jeszcze niewyjaśnioną do końca etiologię tego nowotworu [22].

Zażywanie marihuany, które jest potencjalnym czynnikiem powodującym występowanie raka jamy ustnej, w tym języka, znacznie zwiększyło się w ciągu ostatnich lat, zwłaszcza wśród młodych osób. Przeprowadzone ostatnio analizy przez Międzynarodowe Konsorcjum Epidemiologiczne Raka Głowy i Szyi sugerują jednak, że palenie marihuany może być czynnikiem zmniejszającym ryzyko występowania raka języka [23].

1.3.1. Objawy raka języka

Najczęstszym i najwcześniejszym objawem raka języka jest ból w czasie połykania, który może promieniować do ucha. Na języku i przylegających strukturach mogą pojawić się pęcherze, które pękając, zamieniają się w owrzodzenia (**ryciny 2 i 3**). W następnej kolejności pojawiają się zaburzenia w przyjmowaniu pokarmów, trudności w żuciu i połykaniu, kaszel, zachłystywanie się, ograniczenie ruchomości języka, ślinotok, szczękoscisk, chrypka, kłucie w uchu, bełkotliwa mowa, duszność, krwiotłucie, *fetor ex ore*, spadek wagi, brak łaknienia, trudności w swobodnym komunikowaniu się z otoczeniem i nie-



Rycina 2. Owrzodzenie na prawej bocznej części języka u 34-letniego pacjenta z rozpoznaniem płaskonabłonkowego raka języka [25]



Rycina 3. Duży pęcherz w dolnej lewej części języka u 29-letniej pacjentki z rozpoznaniem płaskonabłonkowego raka języka [25]

chęć do spożywania posiłków. Rak języka może też manifestować się w postaci guza w obrębie szyi. Badania ilościowe i jakościowe wykonywane przed zabiegiem operacyjnym nie wykazały istotnych zaburzeń wrażliwości smakowej [24].

1.3.2. Diagnostyka raka języka

Nowotwór płaskonabłonkowy języka jest jednym z najbardziej niebezpiecznych nowotworów głowy i szyi na świecie [26]. Jego rozwój jest często niezauważalny, ponieważ progresja procesu nowotworowego w początkowym stadium przebiega bez znaczących i uchwytnych objawów, w wyniku czego rokowanie pacjentów jest znacząco gorsze [27]. Pomimo szybkiego, od momentu wykrycia nowotworu, wdrożenia leczenia chirurgicznego, radioterapii i chemioterapii, wskaźnik 5-letniego przeżycia jest cały czas niezadowalający [28]. Jedną z przyczyn jest wysoki odsetek przerzutów (40%) do szyjnych węzłów chłonnych u pacjentów pierwotnie zdiagnozowanych [29]. Wynika to z charakterystycznej budowy anatomicznej języka, który składa się głównie z mięśni i naczyń krwionośnych. Proces nowotworowy rozwija się szybko, niezauważalnie zwiększając swój zasięg i obejmując węzły chłonne. Innym powodem niezadowalających wyników leczenia może być takie samo podejście terapeutyczne do wszystkich pacjentów z rozpoznaniem raka języka, pomimo osobniczej zmienności genetycznej. Podstawą diagnostyki w przypadku nowotworów jamy ustnej, w tym języka, jest wnikliwy wywiad, a następnie dokładne badanie przedmiotowe, w tym ocena węzłów chłonnych podbródkowych, podżuchwo-

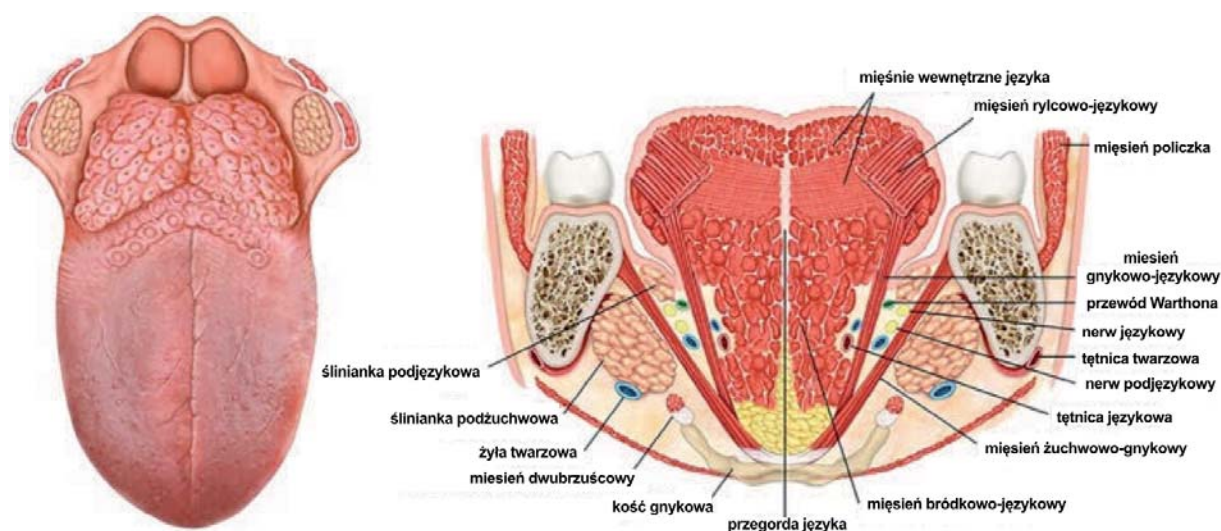
wych i szyjnych. W przypadku stwierdzonych zmian w węzłach chłonnych wskazane jest wykonanie badania USG szyi, a także niekiedy biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej. Potwierdzenie diagnozy choroby nowotworowej odbywa się za pomocą badania histopatologicznego. Gdy stwierdza się naciekanie kości szczęk, wskazane jest wykonanie badania tomografii komputerowej (ang. computed tomography, CT) i obrazowania za pomocą rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging, MRI) czy zdjęcia pantomograficznego. Podejrzenie przerzutów odległych jest wskazaniem do wykonania RTG klatki piersiowej i USG jamy brzusznej [30].

Obecnie standardem jest wykonywanie u pacjenta badań mających na celu wykrycie markerów nowotworowych. Markerem nowotworowym jest substancja wielkocząsteczkowa, najczęściej białko z komponentą węglowodanową/lipidową lub glikolipid, która bez względu na spełniane funkcje jest wytwarzana wyłącznie w komórce nowotworowej. Markerem może być białko ulegające nadekspresji w komórce nowotworowej w porównaniu z komórką prawidłową [31]. W procesie kancerogenezy dochodzi bardzo często do konstytutywnej (niezależnej od fizjologicznych mechanizmów regulacyjnych) ekspresji genów, których produkty (białka) pojawiają się tylko przejściowo — w okresie ich rozplemu i różnicowania komórek nowotworowych. W przypadku uwolnienia białek kodowanych przez te geny z komórki nowotworowej do płynów ustrojowych, stają się one markerami przydatnymi w rozpoznawaniu i monitorowaniu choroby nowotworowej [32]. W celu wykrycia i charakterystyki konkretnych, nowych markerów nowotworów głowy i szyi prowadzi się ludzkie hodowle komórkowe i tkankowe, modele zwierzęce; wykonuje się również badania diagnostyczne, tj. badania patomorfologiczne, badania genetyczne oraz analizę próbki surowicy lub śliny pacjenta [33]. Najczęściej wykorzystywane jest jednak badanie patomorfologiczne, ponieważ oceniany jest bezpośrednio pobrany od pacjenta wycinek zmiany (zazwyczaj w formie fragmentu zanurzonego w formalinie, a następnie blozków parafinowych). Umożliwia to wykonanie oceny histologicznej lub immunohistochemicznej oraz hybrydyzacji *in situ*. Jest to niestety metoda, której wynik zależy od subiektywnych umiejętności osoby wykonującej dany pomiar. Ponadto posiadanie tego samego typu i cech guza niekoniecznie oznacza takie samo rokowanie u różnych pacjentów [33, 34].

1.3.3. Terapia raka języka

Język można uznać za narząd złożony z trzech części — nasadę, trzon i koniec. Nasadę od trzonu oddziela bruzda graniczna. Trzon języka jest podzielony na dwie połowy (prawą i lewą) przez cienką blaszkę tkanki łącznej, zwaną przegrodą języka. Język po-

siada mięśnie zewnętrzne (mięsień bródkowo-językowy, gnykowo-językowy i rylcowo-językowy) i mięśnie wewnętrzne (podłużny języka górny i dolny, poprzeczny języka i pionowy języka), naczynia żyłne i tętnicze oraz włókna nerwowe ruchowe i czuciowe. W obrębie grzbietu i trzonu większość mięśni języka przyczepia się do mocnej warstwy łącznotkankowej, zwanej rozciągmem języka (**rycina 4**) [35].



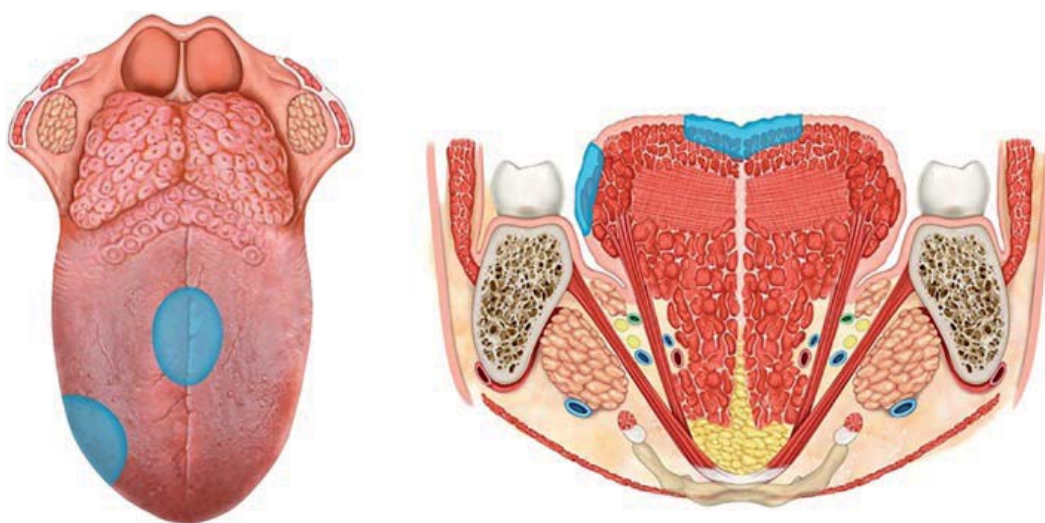
Rycina 4. Budowa anatomiczna języka i tkanek otaczających [36]

W przeciwieństwie do pozostałych nowotworów głowy i szyi, w raku języka jamy ustnej podstawową metodą leczenia jest zabieg operacyjny. Termin „glosektomia” jest używany do opisywania zabiegów chirurgicznych resekcji języka zarówno związanych z usunięciem nowotworu tego narządu, jak i niezależnych od nowotworu. W 1979 roku Péri opisał cztery rodzaje glosektomii, jednak zabiegi te nie miały powiązania z onkologią [37]. Ansarin i wsp. w 2019 zaproponowali podział glosektomii, opierając się na wyznaczeniu precyzyjnych granic planowego zabiegu oraz uwzględniając zasięg zmiany z jak największą oszczędnością tkanek języka i struktur otaczających [36]. Wyróżnia się pięć typów glosektomii.

Typ 1 glosektomii

Polega na wycięciu błony śluzowej w obrębie zdrowej tkanki z odpowiednimi marginesami bezpieczeństwa (1,0–0,5 cm w zależności od tego, czy zmiana ma wyraźnie określony zasięg). Błona śluzowa i podśluzowa są połączone z włóknami mięśni wewnętrznych języka. Głęboki margines resekcji powinien obejmować cienką warstwę

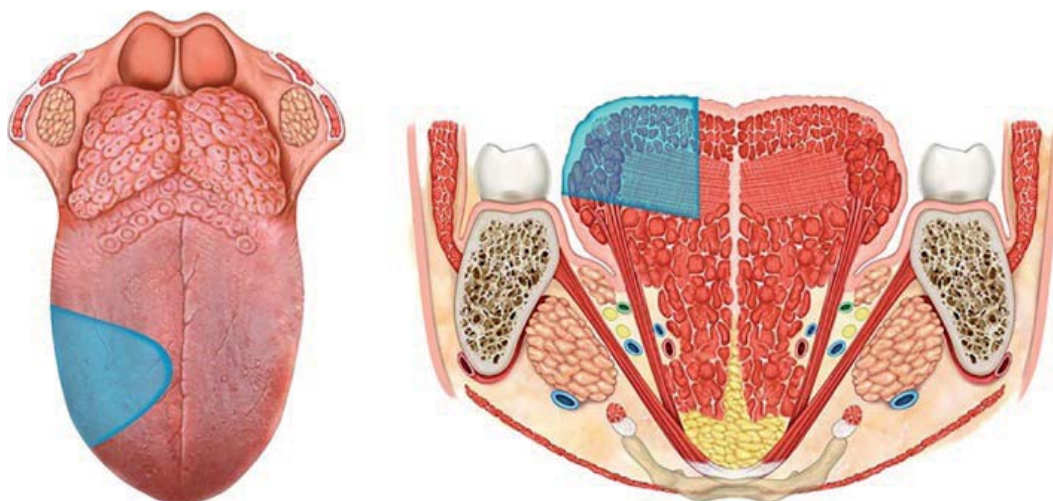
wewnętrznych mięśni, ponieważ nie można wykluczyć wnikania nowotworu w warstwę podśluzówkową. Zasadniczo ranę pozostawia się do wygojenia wtórnego. Brzegi ubytku tkanek można do siebie zbliżyć, umożliwiając gojenie pierwotne lub wykonać przeszczep tkanki w miejsce przeprowadzonego zabiegu. Wskazanie do tego zabiegu to zmiany przedrakowe oraz powierzchowne obejmujące nabłonek języka. Celem operacji jest usunięcie wszystkich zmian z odpowiednimi marginesami bezpieczeństwa (**rycina 5**) [36].



Rycina 5. Typ 1 glosektomii [36]

Typ 2 glosektomii

Obejmuje usunięcie zmiany i przylegającej śluzówki, tkanki podśluzowej oraz wewnętrznych mięśni języka do powierzchni mięśni zewnętrznych, z odpowiednim zachowaniem marginesu bezpieczeństwa (zazwyczaj 1,5 cm). Resekcja na powierzchni ma kształt „diamentu”, a w głąb tkanek ściętego stożka, którego wierzchołek dochodzi do mięśni wewnętrznych języka. Końcowe gałęzie tętnicy językowej powinny zostać podwiązane. Nerw językowy jest zazwyczaj zachowany. Zamknięcie rany pozabiegowej może być częściowe lub całkowite w celu uniknięcia krwawienia, obrzęku pooperacyjnego i powstania blizn. Wskazanie do tego zabiegu to zmiany naciekające podśluzówkowo i powierzchownie do wewnętrznych mięśni języka, nie dochodząc do zewnętrznych mięśni lub naciekające poniżej 10 mm w głąb tkanek (**rycina 6**) [36].



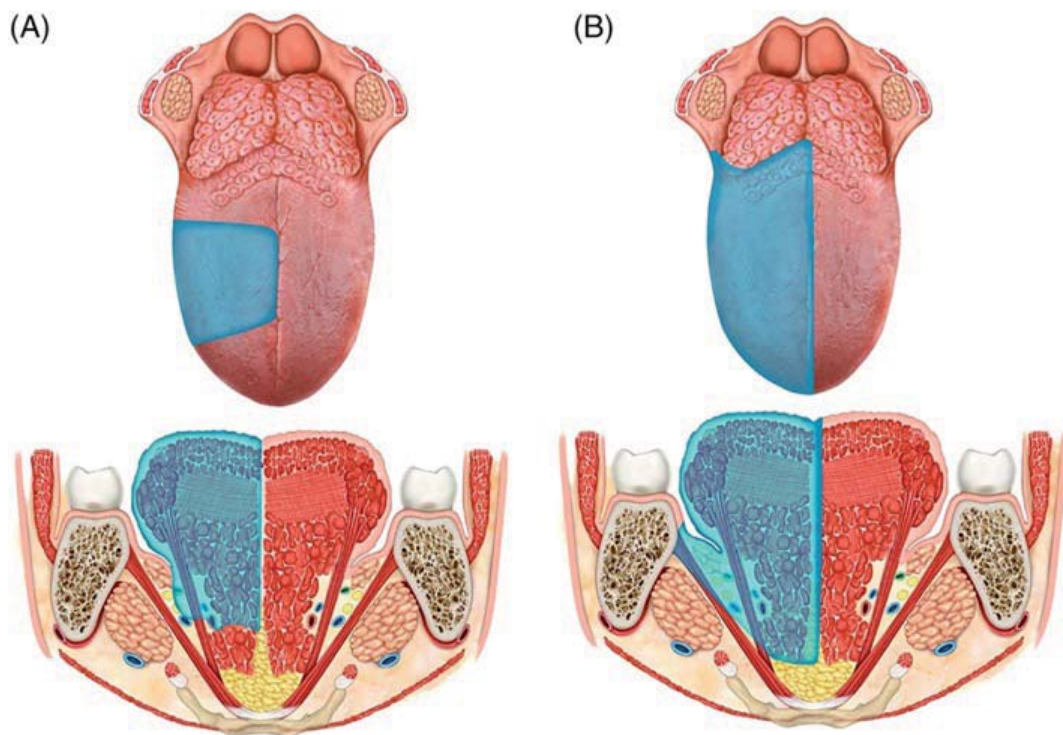
Rycina 6. Typ 2 glosektomii [36]

Typ 3 glosektomii

Wyróżnia się dwa podtypy: A oraz B.

Typ A to taki, w którym usunięciu podlega zmiana nowotworowa obejmująca błonę śluzową, podśluzówkową, mięśnie wewnętrzne i zewnętrzne języka. Śluzówka podlega resekcji aż do zdrowych tkanek z zachowaniem marginesu bezpieczeństwa (co najmniej 1,5 cm). Tętnica języka musi zostać podwiązana i równocześnie z nerwem językowym i podjęzykowym usunięta razem z resztą zmiany i zajętymi węzłami chłonnymi. Podstawa języka jest zachowana. Czubek języka może być zachowany w zależności od zasięgu zmiany. Wskazania do tego zabiegu to zmiana naciekająca mięśnie wewnętrzne i minimalnie mięśnie zewnętrzne lub naciekająca więcej niż 10 mm i ograniczona tylko do jednej strony języka (**rycina 7A**) [36].

Typ B to taki, w którym zabieg obejmuje usunięcie błony śluzowej, podśluzówkowej, mięśni wewnętrznych i zewnętrznych po tej samej stronie języka, mięśni bródkowo-językowego (łac. *genioglossus*), gnykowo-językowego (łac. *hyoglossus*) i rylcowo-językowego (łac. *styloglossus*) oraz dolną część mięśnia podniebiennego. Przegroda języka też jest uwzględniona w trakcie resekcji razem z nerwem językowym i podjęzykowym. Tętnica językowa jest podwiązana i usunięta razem z całą zmianą i zajętymi węzłami chłonnymi. Zabiegowi temu jest poddawany chory, u którego stwierdzi się masywne naciekanie nowotworu obejmujące mięśnie zewnętrzne i wewnętrzne języka, jednak ograniczone do jednej strony narządu (**rycina 7B**) [36].



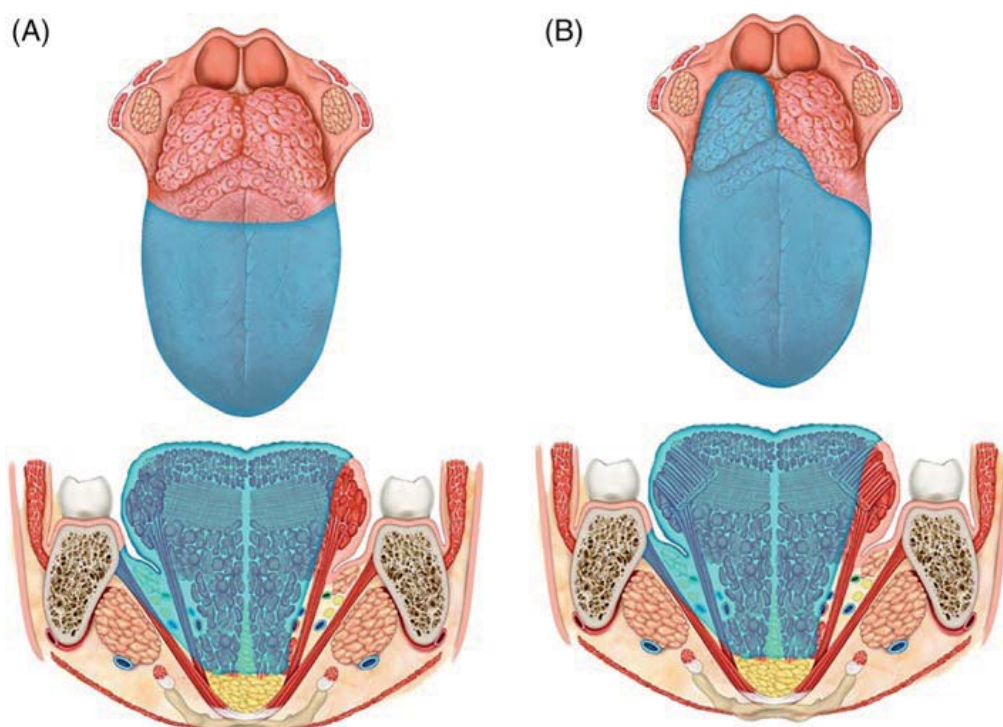
Rycina 7. Typ 3A i 3B glosektomii [36]

Typ 4 glosektomii

Podobnie jak typ poprzedni, składa się z dwóch podtypów: A oraz B.

Typ A polega na częściowej przedniej glosektomii z zachowaniem obu stron podstawy języka, tylnego mięśnia gnykowo-językowego, a także nerwów podjęzykowego i językowego po mniej zajętej przez nowotwór stronie. Wskazania do wykonania tego zabiegu to zmiany w przedniej ruchomej części języka, których zasięg obejmuje zarówno jego stronę prawą i lewą, dochodząc do mięśnia bródkowo-językowego, jednak ograniczając się do ruchomej części języka (**rycina 8A**) [36].

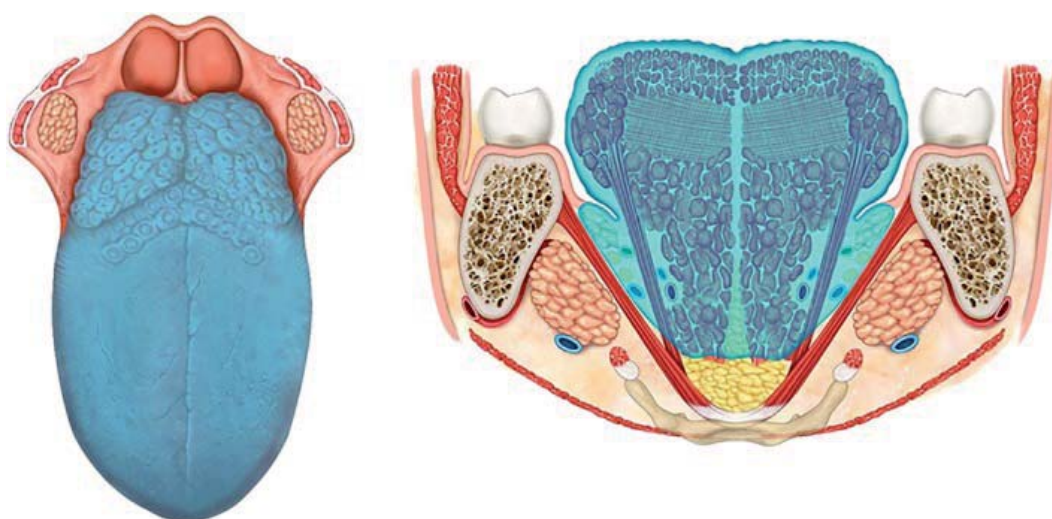
Typ B jest to zasadniczo typ A ze zwiększonym zakresem obejmującym też podstawę języka po jednej stronie. W trakcie tego zabiegu zachowane są takie struktury, jak: mięsień bródkowo-językowy, rylcowo-językowy, nerwy podjęzykowy i językowy oraz tętnica językowa (bez której nie byłoby możliwe zachowanie funkcji pozostawionej części podstawy języka). Wskazania do tego zabiegu to masywne zmiany obejmujące swoim zasięgiem część ruchomą języka oraz część podstawy języka wraz z mięśniem bródkowo-językowym (**rycina 8B**) [36].



Rycina 8. Typ 4A i 4B glosektomii [36]

Typ 5 glosektomii

Jest to najbardziej radykalny zabieg, obejmujący usunięcie całej części ruchomej i nieruchomej języka, włącznie z wszystkimi mięśniami wewnętrznymi i zewnętrznymi, tętnicą językową, nerwami językowym i podjęzykowym oraz dnem jamy ustnej. Wskazania do takiego zabiegu to zmiana, która penetruje głęboko w głąb tkanek języka, przedniej brzusznej powierzchni języka, grzbietu języka lub podstawy języka, obejmując mięsień bródkowo-językowy, gnykowo-językowy i rylcowo-językowy, powodując zaburzenie ruchomości języka (**rycina 9**) [36].



Rycina 9. Typ 5 glosektomii [36]

Tworząc koncepcję leczenia, chirurg powinien mieć na uwadze sąsiadujące z planowanym zasięgiem resekcji struktury anatomiczne, ale także wpływ, jaki może mieć przeprowadzenie zabiegu na funkcje języka, tj. mowa, połykanie czy aspekt estetyczny. Po pierwotnej resekcji guza należy wykonać jak najszybciej rekonstrukcję języka, aby uniknąć możliwych powikłań w postaci zaburzeń czynnościowych [38]. Jednak aby otrzymać najbardziej skuteczne wyniki leczenia u pacjentów z zaawansowanym procesem nowotworowym niezbędne jest wdrożenie kilku metod leczenia obok metody chirurgicznej, tj. chemioterapia i radioterapia [39].

Pod koniec XX wieku w leczeniu nowotworów głowy i szyi chemioterapia była używana tylko u chorych poddawanych leczeniu paliatywnemu w celu zahamowania progresji nowotworu. Obecnie chemioterapia ma dużo szersze zastosowanie, jednak w przypadku nowotworów głowy i szyi jest głównie używana jako leczenie wspomagające, obok radioterapii i zabiegu chirurgicznego. Istnieje wiele leków wykorzystywanych w chemioterapii, które różnią się sposobem, w jaki niszczą komórki rakowe. Wybór odpowiedniej terapii ustala się na podstawie przeprowadzonych wcześniej badań klinicznych wykazujących ich skuteczność. W niektórych przypadkach stosuje się leczenie skojarzone (polichemioterapię) polegającą na podaniu pacjentowi kilku terapeutyków jednocześnie. Może to nasilić działania niepożądane, jednak równocześnie wykazać większą skuteczność przeciwnowotworową. Najczęściej wykorzystywanym chemioterapeutykiem w przypadku raka głowy i szyi jest cisplatyna. Poza nią wykorzystywane są: karboplatyna, 5-fluorouracyl, paklitaksel, docetaksel i epirubicyna. W terapii nowotworów głowy i szyi podjęto również próbę stosowania innych leków przeciwnowotworowych, tj. gemcytabina, metotreksat, czy ifosfamid [40, 41]. Ponadto dostępne jest tzw. leczenie biologiczne. W terapii nowotworów głowy i szyi stosowany jest cetuksymab, białko łączące się z receptorem naskórkowego czynnika wzrostu EGFR, który występuje na powierzchni komórek rakowych. Obecnie cetuksymab jest łączony z innymi chemioterapeutykami, jeżeli u pacjenta dojdzie do wznowy lub stwierdzi się u niego przerzuty. Cetuksymab łączy się z radioterapią w przypadku początkowego leczenia zaawansowanego raka płaskonabłonkowego głowy i szyi [40].

Zastosowanie radioterapii ma na celu zniszczenie komórek nowotworowych przy równoczesnym oszczędzeniu zdrowych tkanek. Zarówno radioterapia jak i zabieg chirurgiczny stanowią efektywną metodę leczenia nowotworów dna jamy ustnej i języka o niskim stopniu zaawansowania, jednak w przypadku zmian zaawansowanych zaleca się terapię skojarzoną. Teleradioterapia umożliwia uzyskanie dobrych wyników terapeutycznych.

tycznych w przypadku powierzchownych zmian w obrębie języka i dna jamy ustnej, jednak nie jest zalecana w leczeniu zaawansowanych zmian głęboko naciekających tkanki, ze względu na ryzyko wystąpienia kserostomii, odczynu kostnego ze strony żuchwy, zaburzenia wrażeń smakowych i długiego czasu trwania leczenia [42].

Zachowanie zdolności do połykania i mówienia jest jednym z głównych celów w leczeniu raka języka. Chociaż stosowanie chemioterapii nie przekłada się na bezpośrednie poprawienie jakości życia pacjentów, przyczynia się do zmniejszenia rozmiarów guza przed zabiegiem operacyjnym. Wówczas zasięg resekcji języka może być dużo bardziej oszczędny, co ułatwia utrzymanie funkcji tego narządu [39].

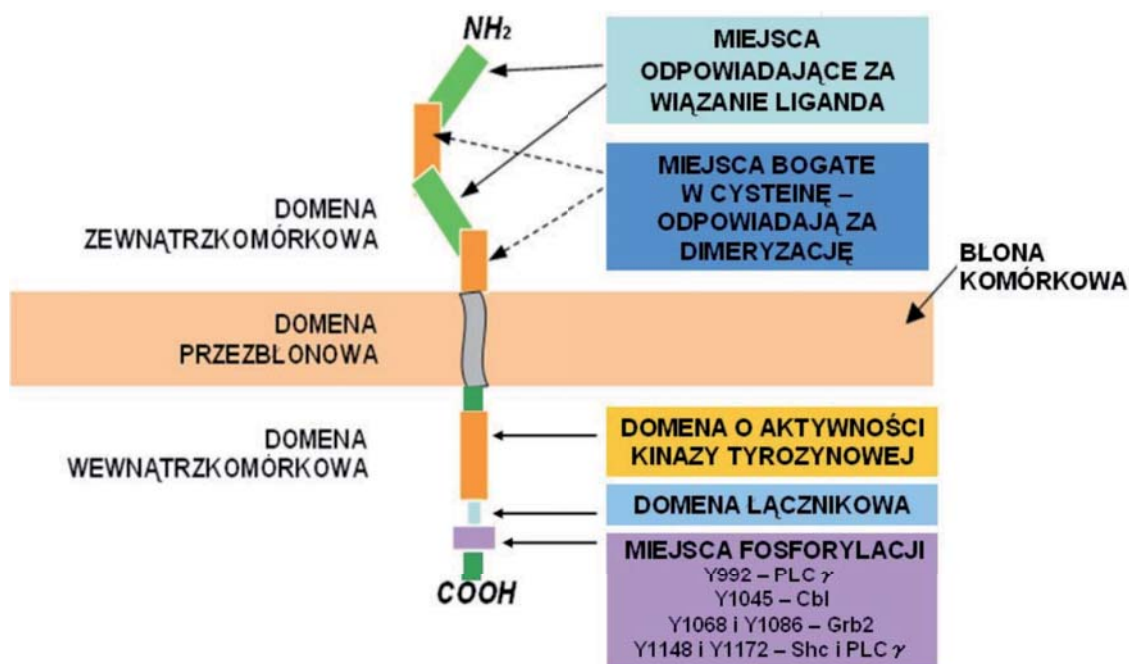
1.4. EGFR

Sygnalizacja komórkowa jest częścią złożonego systemu regulującego podstawowe funkcje komórkowe. Dzięki niej komórka może odpowiadać na zmiany w jej mikrośrodkowisku, a receptory znajdujące się na powierzchni błony komórkowej są istotną częścią szlaku sygnalizacyjnego. Należy do nich m.in. grupa receptorów zaliczana do rodziny receptorów kinazy tyrozynowej (ang. receptor tyrosine kinases, RTK). RTK biorą udział w kontroli najbardziej podstawowych procesów zachodzących w komórkach, tj. cykl komórkowy, migracja komórek, metabolizm i przeżycie. Zaliczany do RTK receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. epidermal growth factor receptor, EGFR) jest jednym z głównych białek należących do rodziny ludzkich naskórkowych receptorów wzrostu HER (ang. human epidermal growth factor receptor) w kontekście nowotworów głowy i szyi. Większość nowotworów tego regionu wykazuje jego nadekspresję [43]. Aktywacja EGFR poprzez jego fosforylację indukowaną przez kinazy tyrozynowe powoduje progresję choroby, a nadekspresja EGFR w ludzkich nowotworach wiąże się z chorobą o bardziej agresywnym przebiegu [44]. Radioterapia zwiększa ekspresję EGFR, dlatego często z radioterapią stosuje się leki blokujące sygnalizację EGFR. Powoduje to zwiększenie wrażliwości komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące przy zahamowanej nadekspresji EGFR [45].

1.4.1. Budowa EGFR

EGFR to monomeryczna glikoproteina. Podobnie do wszystkich białek należących do rodziny HER, EGFR posiada trzy domeny: zewnątrzkomórkową, hydrofobową przezbłonową i wewnątrzkomórkową cytoplazmatyczną domenę kinazy tyrozynowej [46]. Do-

mena zewnątrzkomórkowa składa się z około 621 aminokwasów i jest odpowiedzialna za wiązanie się z ligandem. Domena przezbłonowa, zbudowana z około 640 aminokwasów, odpowiada za umiejscowienie receptora w błonie komórkowej. Domena wewnątrzkomórkowa zawiera kinazę tyrozynową i jest odpowiedzialna za proces autofosforylacji (**rycina 10**) [47].



Rycina 10. Budowa receptora EGFR [48]

1.4.2. Fosforylacja EGFR

Głównymi białkami wiążącymi się z EGFR są czynnik wzrostu naskórka (ang. epidermal growth factor, EGF) oraz transformujący czynnik wzrostu α (ang. transforming growth factor α , TGF α). Połączenie się naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) z jego receptorem (EGFR) powoduje indukcję fosforylacji reszt tyrozyny w obrębie domeny wewnątrzkomórkowej (autofosforylacja). Do reszt tyrozynowych fosforylowanych w wyniku tej reakcji należą: Y703, Y920, Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148 oraz Y1173. Fosforylacja jest niezbędnym procesem do aktywacji cząsteczki EGFR, która odgrywa istotną rolę w regulacji wielu istotnych szlaków sygnałowych [49]. Zhang i wsp. wykazali, że wzmożona aktywność receptora naskórkowego czynnika wzrostu polegająca na tworzeniu dimerów ma miejsce w komórkach nowotworowych [50]. Każdy ze szlaków kontrolowanych przez EGFR związany jest z indukcją proliferacji komórek i hamowa-

niem apoptozy. Możliwość ich farmakologicznego kontrolowania i wpływania na nie jest głównym celem nowych terapii przeciwnowotworowych. Coraz częstsze staje się również stosowanie chemioterapeutyków w połączeniu z inhibitorami kinazy tyrozynowej tj. gefitynib [51].

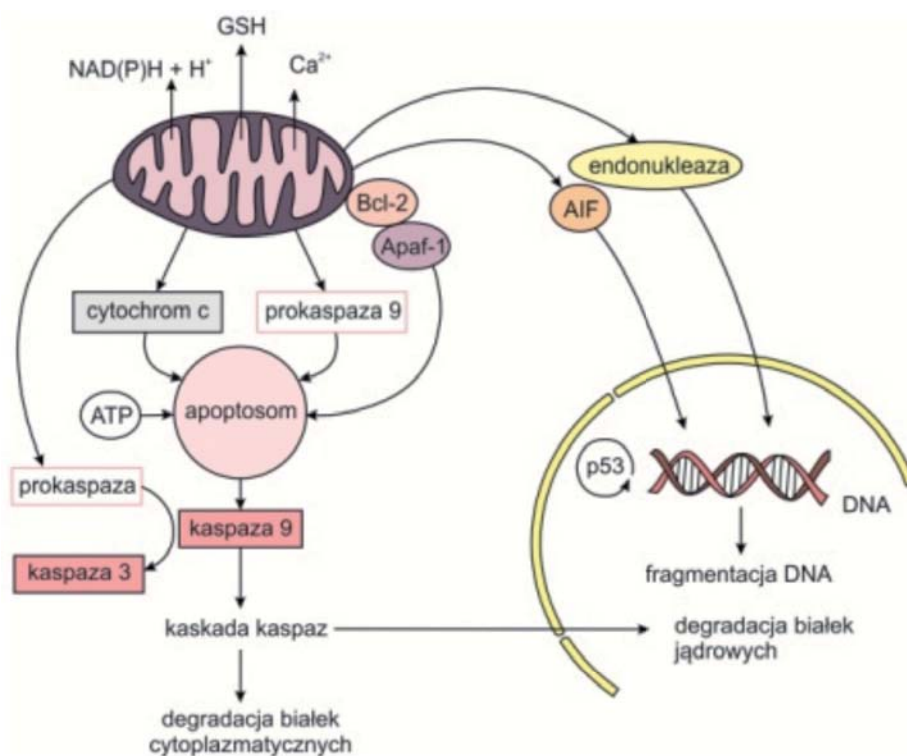
1.5. Apoptoza

Istnieje wiele form śmierci komórkowej, wśród których najlepiej poznanymi są procesy apoptozy i nekrozy. W 1965 roku John Foxton Ross Kerr z University of Queensland dokonał ich pierwszego rozróżnienia, a dopiero w 1972 r. Kerr i wsp. zaproponowali termin „apoptoza” (gr. „opadanie liści”), która jest procesem zaprogramowanej śmierci komórek [52, 53]. W odróżnieniu od nekrozy, gdzie dochodzi do uszkodzenia w wyniku działania czynnika zewnętrznego, apoptoza jest zjawiskiem naturalnym w rozwoju i życiu organizmów wielokomórkowych. Zaburzony proces apoptozy wiąże się z wieloma chorobami, w tym z chorobami neurodegeneracyjnymi, tj. choroba Alzheimera i choroba Huntingtona, uszkodzeniem niedokrwiennym, zaburzeniami autoimmunologicznymi oraz nowotworami [54]. Wyróżniamy kilka dróg aktywacji apoptozy, m.in. wewnętrzną, zewnętrzną, pseudoreceptorową i retikulum endoplazmatycznego. W przebiegu każdej z nich kaspazy pełnią kluczową funkcję [56]. Rodzinę kaspaz biorących udział w procesie apoptozy można podzielić na inicjatorowe (kaspaza 2, 8, 9, 10 i 12) oraz efektorowe (kaspaza 3, 6 i 7). Zarówno bodźce zewnętrzne, jak i wewnętrzne, połączone ze ścieżkami apoptozy zewnątrz- i wewnątrzpochodnej, mogą inicjować apoptozę. Pomimo wielu różnic w przebiegu tych dwóch szlaków, zbiegają się one, tworząc ciała apoptotyczne (ang. Apolipoprotein BD — ApoBD). Zostają one pochłonięte przez fagocyty w procesie eferocytozy, którą przyjmuje się za punkt końcowy apoptozy zamykający cykl życia komórek [57].

1.5.1. Szlak wewnątrzkomórkowy

Szlak wewnętrzny jest nazywany inaczej szlakiem mitochondrialnym, ze względu na główny udział tego organelum w aktywacji apoptozy [58]. Cały proces jest zapoczątkowany na skutek działania czynników stresowych, takich jak: stres oksydacyjny, uszkodzenie DNA, wzrost poziomu jonów wapnia, patogenów, nieprawidłowo sfałdowanych białek czy leków cytotoksycznych. Za regulację szlaku mitochondrialnego apoptozy są

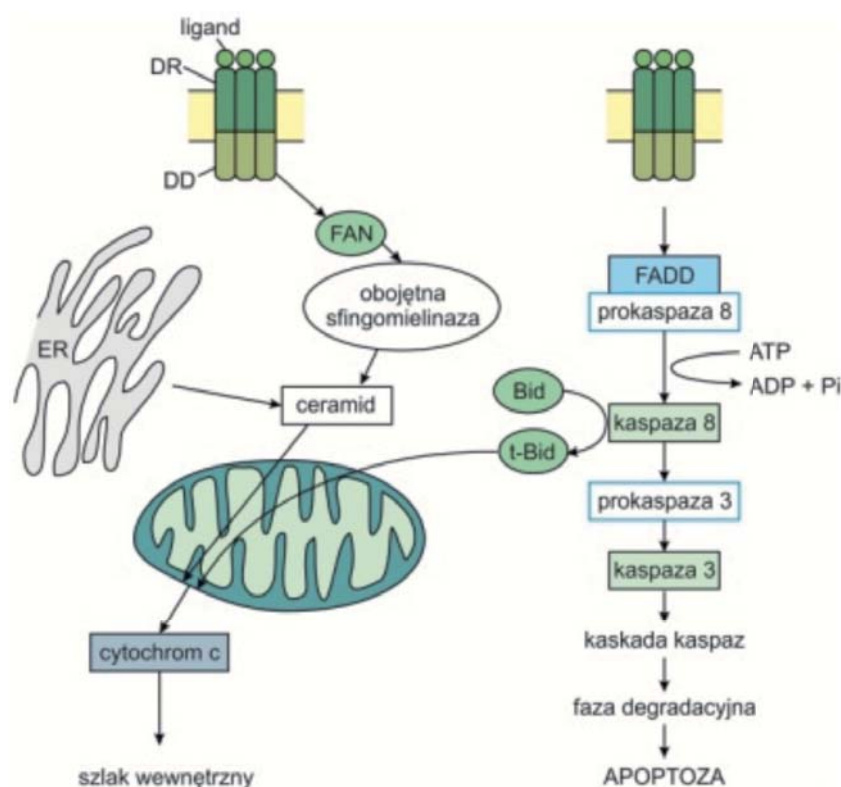
odpowiedzialne białka z rodziny Bcl-2, wśród których wyróżniamy białka proapoptyczne, m.in. Bax, Bak, Bok, Bim, Bid, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, PUMA, Blk i antyapoptyczne (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, A1, Mcl-1) [59]. W wyniku indukcji apoptozy następuje napływ białek proapoptycznych i destabilizacja błony mitochondrialnej na skutek tworzenia porów w błonie zewnętrznej mitochondrium przez oligomeryzujące białka Bax lub Bak. W fizjologicznych warunkach są one nieaktywne dzięki związaniu z białkami antyapoptycznymi Bcl-2 i Bcl-XL, które dopiero w przypadku działania czynników uszkodzających ulegają inaktywacji poprzez fosforylację. Białka Noxa oraz PUMA pełnią rolę pomocniczą poprzez hamowanie działania białek antyapoptycznych (Noxa) oraz zwiększenie ekspresji i zmian konformacyjnych białka Bax wpływającego na tworzenie porów w błonie mitochondrium (PUMA) [59]. Cytochrom C jest związany po zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej z ujemnie naładowaną kardioliną. Na skutek utleniania kardiolipina zmniejsza swoje powinowactwo do cytochromu c, umożliwiając w ten sposób uwolnienie go do cytozolu, gdzie tworzy razem z czynnikiem Apaf-1 oraz prokaspazą-9 apoptosom. Prowadzi to do aktywacji kaspazy-9. Końcowym efektem jest indukcja aktywności kaspazy-3, która w konsekwencji prowadzi do degradacji białek cytoplazmatycznych (**rycina 11**) [60].



Rycina 11. Szlak wewnątrzkomórkowy apoptozy [61]

1.5.2. Szlak zewnątrzkomórkowy

Szlak zewnątrzkomórkowy nazywany jest również, ze względu na swój przebieg, szlakiem receptorowym. Sygnałem rozpoczynającym zewnątrzkomórkową ścieżkę apoptozy jest ograniczona ilość czynników wzrostowych lub substancji odżywczych. Inicjatorem może być również lokalny wzrost stężenia hormonów i cytokin. Ponadto czynnikami uruchamiającymi szlak receptorowy apoptozy są substancje chemiczne, m.in. cytostatyki oraz czynniki fizyczne, tj. różne rodzaje promieniowania czy temperatura. Sygnał proapoptotyczny przekazywany jest za pośrednictwem receptorów z rodziny TNF (ang. tumor necrosis factor), nazywanych receptorami śmierci (ang. death receptors) [62]. Połączenie się odpowiedniego liganda (np. TNF czy FasL) z receptorem (TNFR i Fas) indukuje przekazanie sygnału poprzez domenę śmierci (ang. death domain, DD) białka FADD (ang. fas-associated death domain). Połączenie prokaspazy-8 z białkiem FADD odbywa się poprzez domeny efektorowe śmierci DED (ang. death effector domain). Następuje aktywacja kaspazy-8 i w konsekwencji kaspaz efektorowych. Aby mogło dojść do indukcji kaskady kaspaz, niezbędne jest również włączenie białka RIP (ang. receptor-interacting protein) w kompleks receptorowy przy udziale białka TRADD (ang. TNFR-associated death domain) (rycina 12) [63].



Rycina 12. Szlak zewnątrzkomórkowy apoptozy [61]

Szlak zewnątrzkomórkowy może również „przejsć” w szlak wewnętrzny poprzez aktywację białka t-BID, które powoduje uwolnienie cytochromu c z mitochondriów do cytozolu [61].

Poza szlakiem zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym istnieją również inne ścieżki apoptozy, tj. szlak pseudoreceptorowy, szlak retikulum endoplazmatycznego oraz sfingomielinowo-ceramidowy. Ten ostatni wiąże się ze wzrostem stężenia ceramidów w komórce, co jest wynikiem połączenia odpowiedniego liganda z receptorem z rodziny TNF. Ceramidy mogą aktywować także inne procesy komórkowe oraz wpływać na aktywację wewnętrznej ścieżki apoptozy poprzez zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej i uwolnienie cytochromu c. W szlaku pseudoreceptorowym sygnał proapoptyczny przekazywany jest do wnętrza komórki, wykorzystując ziarnistości pochodzące z komórek układu immunologicznego wykazujących aktywność cytotoksyczną (limfocyty T cytotoksyczne, komórki NK czy neutrofile). Szlak retikulum endoplazmatycznego to natomiast rodzaj zaprogramowanej śmierci komórki wywołowany przez zaburzenie równowagi jonowej (szczególnie jonów Ca^{2+}) oraz nagromadzenie się nieprawidłowo połączonych lub zmodyfikowanych białek w komórce [63].

Ze względu na udział wielu ścieżek sygnalizacyjnych w procesie rozwoju choroby nowotworowej, indukcja apoptozy przebiegającej na drodze kilku mechanizmów wydaje się być trafnym podejściem terapeutycznym.

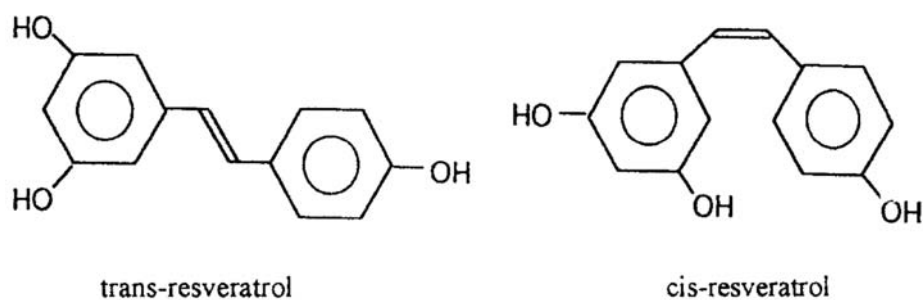
1.6. Resweratrol

Dostępnych jest wiele danych literaturowych wskazujących na wielokierunkowe działanie prozdrowotne resweratrolu.

1.6.1. Budowa resweratrolu (3,4',5-trihydroksystylbenu)

Resweratrol jest to fitoaleksyna o budowie stylbenu występująca głównie w skórce czerwonych winogron. Struktura chemiczna tego związku opiera się na dwóch pierścieniach fenolowych połączonych mostkiem etylenowym i jest podobna do syntetycznego dietylostylbestrolu estrogenowego (4,4'-dihydroksy-trans- α , β -dietylostylbenu). Dlatego resweratrol zaliczany jest do fitoestrogenów — hormonów roślinnych, które mają działanie podobne do estrogenów [64]. Związek ten charakteryzuje się działaniem pleiotropowym i poza swoimi właściwościami przeciwnowotworowymi, resweratrol wykazuje działanie

kardioprotekcyjne, neuroprotekcyjne, antyoksydacyjne, przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe [65]. Resweratrol posiada izomery cis i trans. W środowisku naturalnym występuje tylko jako izomer trans i tylko on wykazuje aktywność biologiczną (**rycina 13**). Przekształcenie w formę cis następuje pod wpływem działania takich bodźców, jak ciepło lub promieniowanie ultrafioletowe [65].



Rycina 13. Struktura chemiczna resweratrolu — izomery cis i trans [66]

1.6.2. Działanie przeciwnowotworowe resweratrolu w modelu raka języka

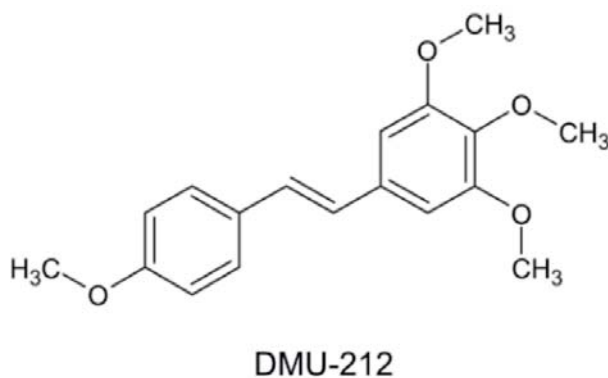
Sugeruje się, że resweratrol jest potencjalnym chemioterapeutykiem w schemacie leczenia płaskonabłonkowego raka jamy ustnej, w tym raka języka. Nadekspresja czynnika indukowanego hipoksją 1 α (ang. hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) w wielu nowotworach jest związana z bardziej agresywnym przebiegiem choroby [66]. Zhang i wsp. wykazali, że resweratrol hamuje proces angiogenezy w raku języka poprzez inhibicję HIF-1 α i czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF). Ponadto Kim i wsp. zaobserwowali, że resweratrol jest odpowiedzialny za indukcję apoptozy wewnętrznej w komórkach raka języka. Wykazano, że resweratrol obniża potencjał błony mitochondrialnej (ang. mitochondrial membrane potential, MMP), uwalniając cytochrom c z mitochondriów, indukując tym samym ekspresję białek proapoptotycznych Bax i Bak, a hamując białka Bcl-2 i Bcl-xL [67].

Lin i wsp. wykazali działanie przeciwnowotworowe resweratrolu w komórkach płaskonabłonkowego raka jamy ustnej poprzez inhibicję, indukowaną przez TPA (ang. 12-O tetradecanoylphorbol-13-acetate) żelatynazy B (ang. Matrix metalloproteinase 9, MMP9), której aktywność w okolicy pierwotnych guzów nowotworowych wiąże się z powstawaniem przerzutów i szybką progresją choroby [68]. Pomimo danych literaturowych wykazujących nie tylko działanie proapoptotyczne, ale także anty-migracyjne oraz

anty-proliferacyjne resweratrolu, jego potencjalnie szerokie zastosowanie w medycynie jest jednak ograniczone z powodu niskiej biodostępności.

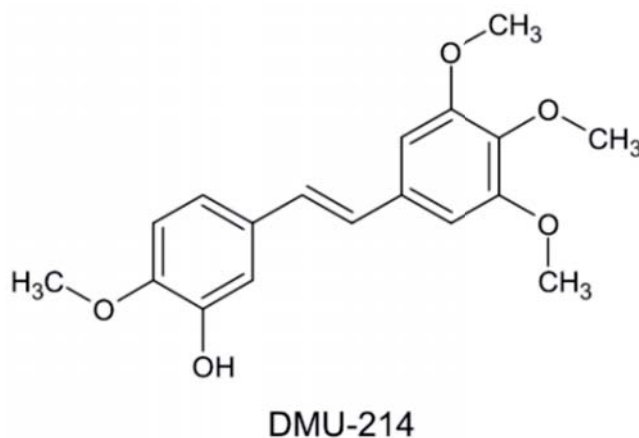
1.6.3. Metylowe analogi resweratrolu

Liczba i pozycja grup hydroksylowych, obecność wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, izomeria przestrzenna i wiązania podwójne to elementy złożonej struktury chemicznej resweratrolu, które decydują o jego aktywności biologicznej. Wykazano, że zamiana grup hydroksylowych na metylowe w cząsteczce resweratrolu zmienia szereg jego właściwości [69]. Metylowe pochodne resweratrolu charakteryzują się zwiększoną biodostępnością ze względu na większą lipofilność, dzięki czemu łatwiej są transportowane do komórek. Metylacja resweratrolu zwiększa również odporność na biotransformację i hamuje tempo metabolizmu jego analogów [70]. Ponadto obecność grup metylowych w pozycjach 3,5 oraz 3,4,5 pierścienia fenyłowego zwiększa działanie proapoptotyczne i cytotoksyczne pochodnych resweratrolu [71]. Przykładem takiego analogu jest 3,4,4',5-tetrametoksystilben (DMU-212) (**rycina 14**), w którego strukturze zastąpiono trzy grupy hydroksylowe czterema grupami metylowymi. Powszechnie wiadomo, że resweratrol podlega reakcjom II fazy biotransformacji w wątrobie, co prowadzi do koniugacji z kwasem glukuronowym i kwasem siarkowym. W przeciwieństwie do resweratrolu, DMU-212 ulega w wątrobie utlenieniu, głównie O-demetylacji i hydroksylacji w pozycjach 3, 4 lub 4'. W wyniku biotransformacji DMU-212 powstaje pięć głównych metabolitów: DMU-295 (4,4'-dihydroksy-3,5 dimetoksystilben), DMU-281 (4'-hydroksy-3,4,5-trimetoksystilben), DMU-214 (3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystilben), DMU-291 (4-hydroksy-3,5,4'-trimetoksystilben), DMU-807 (3-hydroksy-4,5,4'-trimetoksystilben) [72].



Rycina 14. Struktura chemiczna DMU-212 [73]

Spośród wszystkich metabolitów DMU-212 na szczególną uwagę zasługuje 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylben (DMU-214) (**rycina 15**). Piotrowska-Kempisty i wsp. wykazali dużo wyższą aktywność biologiczną DMU-214 w porównaniu ze związkiem macierzystym DMU-212. Sugeruje się zatem, że DMU-214 powstaje w wyniku aktywacji metabolicznej DMU-212 [74]. Ponadto po raz pierwszy wykazano, że jego biotransformacja jest katalizowana głównie przez enzym cytochromu P450 CYP1A1, a tylko w minimalnym stopniu przez izoformę CYP1B1 [75]. Jego działanie przeciwnowotworowe polega nie tylko na indukcji apoptozy, ale również na hamowaniu przerzutowania oraz proliferacji komórek nowotworowych [75].



Rycina 15. Struktura chemiczna DMU-214 [74]

2. Założenia i cel pracy

Resweratrol (3,5,4'- trihydroksystylben) jest związkiem występującym w środowisku naturalnym, który posiada szereg właściwości prozdrowotnych, m.in.: antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe, neuro- i kardioprotekcyjne oraz przeciwnowotworowe. Rosnące zainteresowanie resweratroleм można dostrzec przeglądając bazę PubMed, według której do 2010 roku na temat resweratrolu powstało 3791 artykułów, a od 2010 do 2020 roku aż 10 275. Resweratrol jest opisywany jako fitoaleksyna, która posiada zdolność hamowania procesu nowotworowego na wszystkich trzech etapach rozwoju: inicjacji, promocji oraz progresji. Pomimo jego obiecujących właściwości, zastosowanie resweratrolu jest umiarkowane ze względu na bardzo niską biodostępność. Dlatego w ostatnich latach środowiska naukowe skupiały się nad syntezą pochodnych resweratrolu, które charakteryzowałyby się lepszymi właściwościami farmakokinetycznymi. Jedną ze strategii poprawy jego biodostępności jest przyłączenie do pierścienia fenyłowego grup metylowych, zwiększając tym samym lipofilność i stabilność stylbenu. Powoduje to zmniejszenie podatności związku na drugą fazę biotransformacji ksenobiotyków, opóźniając jego eliminację z organizmu. Ponadto analiza zależności pomiędzy strukturą a bioaktywnością cząsteczki sugeruje, że obecność grup metylowych w pierścieniu fenyłowym w pozycjach -3, -5 oraz -3, -4, -5 ma zasadnicze znaczenie dla właściwości proapoptotycznych stylbenu. Teza ta znalazła swoje potwierdzenie w szeregu publikacji dotyczących właściwości przeciwnowotworowych metylowej pochodnej resweratrolu — 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212). Podczas badania właściwości tego związku zaobserwowano, że ulega on aktywacji metabolicznej do 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-214), wykazując silniejsze działanie cytotoksyczne niż związek macierzysty. Mechanizm jego działania przeciwnowotworowego polega m.in. na blokowaniu podziału komórek w fazie G2/M, indukcji apoptozy i hamowaniu migracji, w które zaangażowane są m.in. ścieżki sygnalizacyjne receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Nadekspresja tego receptora jest obserwowana w wielu nowotworach płaskonabłonkowych, m.in. głowy i szyi, do których zalicza się rak języka.

W terapiach celowanych molekularnie wykorzystywane są związki, których skuteczność opiera się na inhibicji kinaz tyrozynowych, np. EGFR, co ostatecznie prowadzi do indukcji apoptozy i hamowania proliferacji komórek nowotworowych. Jednym z takich inhibitorów jest gefitynib.

Celem rozprawy doktorskiej jest ocena skuteczności przeciwnowotworowej 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-214), metabolitu metylowego analogu resweratrolu DMU-212 w modelu raka języka. Cel pracy został zrealizowany poprzez:

1. Ocenę działania cytotoksycznego i apoptotycznego DMU-214, gefitynibu oraz kombinacji gefitynibu i DMU-214 w ludzkich liniach komórkowych raka języka SCC-25 oraz CAL-27.
2. Porównanie profilu ekspresji EGFR i jego ufosforylowanej formy EGFRP w badanych liniach komórkowych, a także analizę wpływu DMU-214, gefitynibu oraz kombinacji DMU-214 i gefitynibu na poziom ww. białek.
3. Analizę ścieżek sygnalizacyjnych EGFR pod wpływem DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu.

3. Materiał i metody

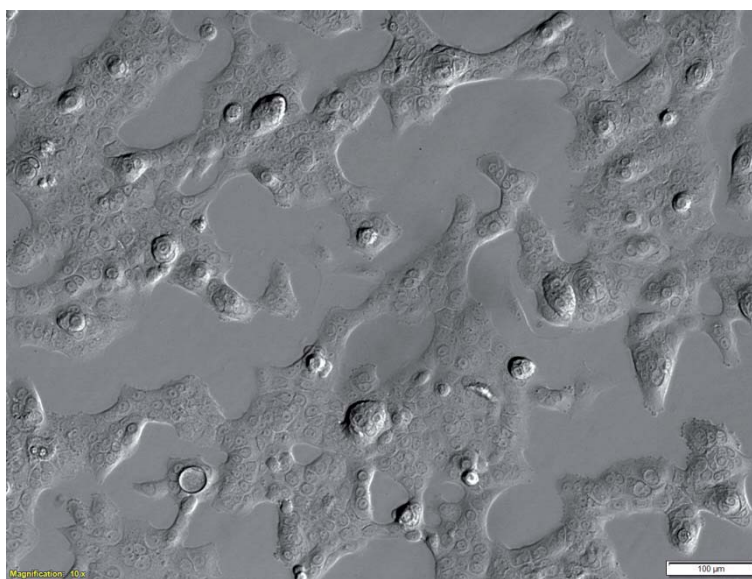
3.1. Odczynniki i sprzęt

3.1.1. Hodowla komórek

Materiał: ludzkie linie komórkowe raka języka — CAL-27 i SCC-25.

3.1.1.1. Linia komórkowa CAL-27

Morfologia: komórki epitelialne.



Rycina 16. Ludzka linia komórkowa raka języka CAL-27 (fot. Piotr Ramlau)

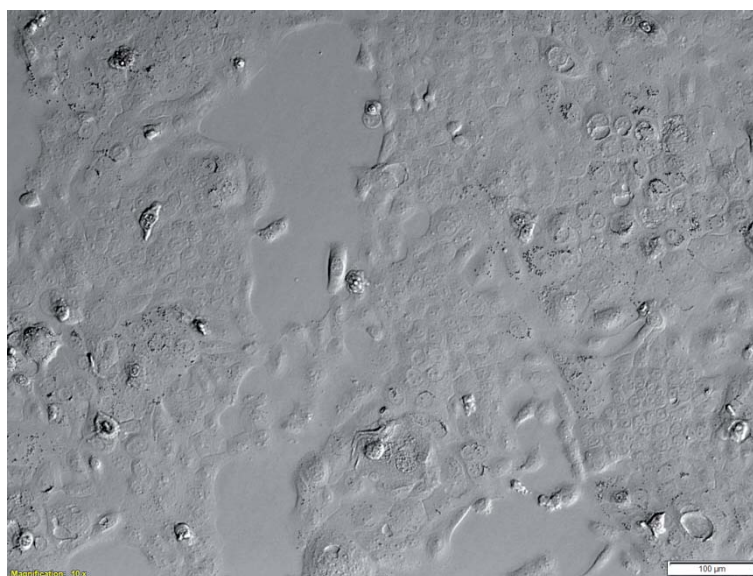
Pochodzenie: linia komórkowa została wyizolowana z raka płaskonabłonkowego języka od 56-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej.

Rodzaj hodowli komórkowej: hodowla adherentna.

Medium hodowlane: pożywka Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), do której dodano płodową surowicę bydlęcą (ang. fetal bovine serum, FBS) do końcowego stężenia 10% oraz mieszaninę streptomycyny (0,1 mg/ml), gentamycyny (100 U) i L-glutminy (2,0 mM).

3.1.1.2. Linia komórkowa SCC-25

Morfologia: komórki epitelialne.



Rycina 17. Ludzka linia komórkowa raka języka SCC-25 (fot. Piotr Ramlau)

Pochodzenie: linia komórkowa została wyizolowana z raka płaskonabłonkowego języka od 70-letniego mężczyzny.

Rodzaj hodowli komórkowej: hodowla adherentna.

Medium hodowlane: mieszanina 1:1 zmodyfikowanej pożywki DMEM oraz pożywki Ham's F12 zawierająca 1,2 g/l wodorowęglanu sodu, 2,5 mM Lglutaminy, 15 mM HEPES i 0,5 mM pirogronianu sodu, która została uzupełniona o 400 ng/ml hydrokortyzonu, 10% FBS oraz mieszaninę L-glutaminy 2,0 mM, penicyliny 100 U oraz streptomycyny 0,1 mg/ml.

Badane związki:

- 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-214),
- Gefitynib (Sigma Aldrich, Niemcy).

Odczynniki: DMEM, Ham's F12, L-glutamina, FBS, bufor fosforanowy (ang. phosphate buffered saline, PBS), roztwór trypsyny-EDTA, dimetylosulfotlenek (ang. dimethyl sulfoxide, DMSO), Trypan blue (Sigma-Aldrich, USA).

Sprzęt:

- płytki do hodowli komórkowych 6-, 24-, 96-dołkowe, butelki hodowlane o pow. 25 cm² i 75 cm², polipropylenowe probówki wirówkowe 15 ml i 50 ml, płytki Petriego (średnica 10 cm) (Corning Inc., USA),
- pipety Pasteura (Medlab, Polska),
- pipety 5 ml i 10 ml (Nest, Chiny),
- probówki do zamrażania komórek (Nalgene Comp., USA),
- pompa próżniowa Biochem-VaccuCenter BVC 21 (Vaccubrandt, Niemcy),
- wirówka Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Niemcy),
- komora laminarna Bio-Ban 48 (Dow Chem. Comp., Włochy),
- inkubator CO₂ do hodowli komórkowych z płaszczem powietrznym HERACELL 150 l (Thermo Scientific, USA),
- mikroskop świetlny TS 100, kamera Digital Sight Camera System (Nikon, Japonia).

3.1.2. Test MTT

Odczynniki: DMEM, MTT, DMSO (Sigma-Aldrich, USA).

Sprzęt: czytnik płytek Elx-800 (BioTek, USA).

3.1.3. Test ELISA**Odczynniki:**

- Cell Death Detection ELISAPLUS, kit, w skład którego wchodzi: przeciwciało anty-histon znakowane biotyną, przeciwciało anty-DNA sprzężone z HRP, kontrola pozytywna, bufor do inkubacji, bufor lizujący, bufor do substratu, substrat ABTS w tabletkach, roztwór ABTS STOP, płytki ze streptawidyną (Roche Diagnostics, Niemcy),
- PBS (Sigma-Aldrich, USA).

Sprzęt:

- wytrząsarka płytek DTS-4 (Sky Line, Łotwa),
- czytnik płytek Elx-800 (BioTek, USA).

Oprogramowanie:

- KC Junior v 1.4.1.8 — program sterujący czytnikiem BioTek Elx-800,
- MS Excel 365,
- GraphPad v. 8.0 — program użyty do sporządzenia wykresów oraz analizy statystycznej (GraphPad Prism Software, USA).

3.1.4. Oznaczenie aktywności kaspaz 3/7, 8 i 9**Odczynniki:**

- Caspase-Glo® 3/7 Assay Kit (ProMega, USA),
- Caspase-Glo® 8 Assay Kit (ProMega, USA),
- Caspase-Glo® 9 Assay Kit (ProMega, USA).
- płytki 96-dołkowe (Corning Inc., USA).

Sprzęt: czytnik płytek do luminescencji i fluorescencji (BioTek, USA).

3.1.5. Cytometria przepływowa**Odczynniki:**

- jodek propidyny, bufor PBS, rybonukleaza A (Sigma-Aldrich, USA),
- etanol (POCH, Polska).

Sprzęt: cytometr przepływowy FACS Aria (Becton Dickinson Biosciences, USA).

3.1.6. Western Blot**Odczynniki:**

- RIPA (Sigma-Aldrich, USA),
- zestaw do oznaczenia stężenia białka Quick Start Bradford Protein A (Bio-Rad, USA),
- przeciwciała:
 - › przeciwciało królicze I-rzędowe anti-EGF Receptor (T43) Antibody (Ab) (Cell Signaling, #2963),

- › przeciwciało królicze I-rzędowe anty-Phospho-EGF Receptor (Tyr1068) (D7A5) XP Rabbit mAb (Cell Signaling, #3777),
- › przeciwciało II-rzędowe przeciwnokrólicze skoniugowane z peroksydazą chrzaniową HRP (ang. horseradish peroxidase) goat anti-rabbit IgG HRP-linked Ab (Cell Signaling, #7074, przeciwciało królicze anti- β -Actin (13E5) mAb skoniugowane z HRP (Cell Signaling, #5125),
- bufor glicynowy 10 x Tris/Glycine/SDS 1L (Bio-Rad, USA),
- bufor TBS 10 x Tris Buffered Saline 1 L (Bio-Rad, USA), Tween (Sigma Aldrich, USA),
- żele gradientowe 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 50 μ l (Bio-Rad, USA),
- zestawy do transferu Trans-Blot Turbo Mini 0.2 μ m PVDF Transfer Packs (Bio-Rad, USA),
- zestaw substratów Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA).

Sprzęt:

- Mini-PROTEAN Electrophoresis System (Bio-Rad, USA),
- Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, USA),
- aparat do wizualizacji sygnału Invitrogen iBright FL1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.1.7. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja

Odczynniki:

- TriPure Isolation Reagent (Merck, Niemcy),
- chloroform, izopropanol, etanol (POCH, Polska),
- zestaw do odwrotnej transkrypcji, w skład którego wchodzi: 5 x First Strand Buffer, 0,1 M DTT, odwrotna transkryptaza SuperScript™ II Reverse Transcriptase 200 U/ μ l, inhibitor rybonukleaz Rnase OUT 40 U/ μ l (Invitrogen, USA),
- heksamery, oligo-dT, dNTP 25 mM (Roche Diagnostics, Niemcy).

Sprzęt:

- probówki typu Eppendorf 1,5 ml z wieczkiem (Biozym, Polska),
- spektrofotometr DeNovix DS-11 (DeNovix, USA),
- termoblok Mastercycler nexus gradient (Eppendorf, Niemcy).

3.1.8. qPCR array

Odczynniki: Quantum EvaGreen® PCR Kit (Syngen, Polska).

Sprzęt:

- LightCycler Instrument 96 (Roche Diagnostics, Niemcy),
- płytki EGFR SIGNALING H96 (Bio-Rad, USA).

3.2. Metody

3.2.1. Hodowla komórek

Linie komórkowe SCC-25 oraz CAL-27 hodowano w butelkach o powierzchni 25 cm² oraz 75 cm². Optymalne warunki hodowli utrzymywano dzięki wykorzystaniu inkubatora — model HERACELL 150 l (Thermo Scientific., USA). Temperatura utrzymywana była na poziomie 37 °C, wilgotność wynosiła 95%, a stężenie CO₂ 5%. W przypadku komórek SCC-25, jako pożywkę, wykorzystano mieszaninę DMEM i F 12. Do hodowli komórek CAL-27 stosowano medium DMEM.

Po uzyskaniu 80% konfluencji komórek, odtrawiano je od podłoża przy wykorzystaniu 10% roztworu trypsyny/EDTA. Komórki zliczano z użyciem komory Bürkera i mikroskopu świetlnego. Pasaże komórek przeprowadzano w warunkach jałowych, w komorze z przepływem laminarnym.

3.2.2. Ocena cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu MTT

Test MTT jest metodą powszechnie stosowaną do oceny działania cytotoksycznego ksenobiotyków i opiera się na zdolności redukcji soli tetrazolowej MTT przez mitochondrialne dehydrogenazy komórkowe do nierozpuszczalnego w wodzie fioletowego formazanu.

W celu wykonania testu MTT komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe (Corning Inc., USA) w liczbie 10 000/dołek.

Po upływie 24 h ściągano medium i dodawano roztwory badanych związków o stężeniach:

- w linii komórkowej CAL-27:
 - › DMU-214 — 1 μM, 0,5 μM, 0,25 μM, 0,125 μM, 0,0625 μM, 0,03125 μM,
 - › Gefitynib — 50 μM, 25 μM, 12,5 μM, 6,25 μM, 3,125 μM, 1,5625 μM,

- › mieszanina DMU-214 i Gefitynibu — (50 μ M Gef + 1 μ M DMU-214) (25 μ M Gef + 0,5 μ M DMU-214) (12,5 μ M Gef + 0,25 μ M DMU-214) (6,25 μ M Gef + 0,125 μ M DMU-214) (3,125 μ M Gef, + 0,0625 μ M DMU-214) (1,5625 μ M Gef + 0,03125 μ M DMU-214),
- w linii komórkowej SCC-25:
 - › DMU-214 — 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1,25 μ M, 0,625 μ M, 0,3125 μ M,
 - › Gefitynib — 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,125 μ M, 1,5625 μ M,
 - › Mieszanina DMU-214 i Gefitynibu — (50 μ M Gef + 10 μ M DMU-214) (25 μ M Gef + 5 μ M DMU-214) (12,5 μ M Gef + 2,5 μ M DMU-214) (6,25 μ M Gef + 1,25 μ M DMU-214) (3,125 μ M Gef, + 0,625 μ M DMU-214) (1,5625 μ M Gef + 0,3125 μ M DMU-214).

Po 24-, 48- i 72-godzinnej inkubacji medium z badanymi związkami ściągano, a następnie dodawano 150 μ l medium oraz 20 μ l MTT rozpuszczonego w PBS (stężenie 5 mg/ml). Po upływie 2 godz. komórki wirowano (3 min, 200 xg), ściągano dodany uprzednio roztwór MTT, po czym dodawano 200 μ l DMSO (POCH, Polska). Absorbancję mierzono z użyciem czytnika płytek Elx-800 (BioTek, USA), przy długości fali 570 nm (długość fali referencyjnej — 650 nm).

3.2.3. Test ELISA

W celu oceny zdolności DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu do indukcji apoptozy komórek SCC-25 i CAL-27 wykorzystano zestaw Cell Death Detection ELISA PLUS (Roche Diagnostics, Polska). Test opiera się na enzymatycznej reakcji immunoprecypitacji przy użyciu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko histonom i DNA. Umożliwia to oznaczenie mono- i oligonukleosomów w lizatach, które są nanoszone na płytkę ze streptawidyną. Następnie dodawana jest mieszanina przeciwciał anty-histonów oraz anty-DNA. W wyniku inkubacji przeciwciała anty-histony wiążą się z histonową komponentą nukleosomów, dzięki czemu powstaje kompleks z umieszczoną na płytce biotynylowaną streptawidyną. Przeciwciała antyDNA znakowane HRP przyłącza się natomiast do komponenty DNA nukleosomów. W końcowym etapie dokonuje się pomiaru spektrofotometrycznego umożliwiającego określenie ilości utworzonych immunokompleksów antyDNA: DNA oraz anty-histony: histony.

Komórki SCC-25 i CAL-27 wysiewano na płytki 96-dołkowe (Corning Inc., USA), w ilości 10 000 komórek/dołek. Następnego dnia ściągano medium i dodawano roztwory DMU-214 (5 μ M oraz 10 μ M), gefitynibu (15 μ M) i mieszaniny obu substancji (2, 5 μ M

gefitynibu oraz 0,5 μM DMU-214; 5 μM gefitynibu i 1 μM DMU-214). Komórki inkubowano z badanym związkiem przez 24 godz., po czym ściągano supernatant celem oznaczenia liczby komórek nekrotycznych. Komórki zawieszano natomiast w 200 μl buforu lizującego i inkubowano przez pół godziny. Płytki z lizatem wirowano (1200 rpm, 10 min, rt), po czym pobierano 20 μl supernatantu i przenoszono na płytkę znakowaną streptawidyną. Do każdego dołka dodano 80 μl przygotowanego uprzednio immunoreagentu. Płytkę wytrząsano przez 2 godz. (200 rpm, rt), po czym ściągano supernatant i przemywano ją buforem do inkubacji. Następnie dodawano roztwór ABTS i wytrząsano płytkę przez 20 min (200 rpm, rt). Przebieg reakcji został zatrzymany przez dodanie roztworu ABTS Stop Solution. Absorbancję mierzono za pomocą czytnika płytek Elx-800 (BioTek, USA), przy długości fali $\lambda = 405 \text{ nm}$ i $\lambda = 490 \text{ nm}$. Liczbę komórek apoptotycznych i nekrotycznych wyrażono przy pomocy współczynnika EF (ang. enrichment factor), obliczonego zgodnie z zaleceniami producenta.

3.2.4. Oznaczenie aktywności kaspaz 3/7, 8 i 9

Metoda oznaczenia aktywności kaspaz 3/7, 8 i 9 polega na luminescencyjnej reakcji lucyferazy, której intensywność jest wprost proporcjonalna do aktywności kaspaz -3,7, -8 i -9. Komórki CAL-27 oraz SCC-25 wysiewano na płytki 96-dołkowe z białymi ściankami (Corning Inc., USA) w ilości 10 000 komórek na dołek. Po 24 godzinach ściągano medium, a następnie dodawano roztwór DMU-214 w stężeniu 2,5 μM i 5 μM , gefitynibu o stężeniu 15 μM oraz mieszaniny obu substancji w stężeniach 0,5 μM DMU-214 i 2,5 μM gefitynibu oraz 1 μM DMU-214 i 5 μM gefitynibu. Po 24-godzinnej inkubacji komórek ze związkami badanymi dodawano 100 μM odczynnika Caspase-Glo® 3/7, Caspase-Glo® 8 oraz Caspase-Glo® 9 (Promega, USA) na dołek. Komórki delikatnie wytrząsano (400 rpm, przez 2 minuty w 21 °C), inkubowano przez 2 godz. w temperaturze pokojowej, a następnie mierzono luminescencję z wykorzystaniem czytnika płytek (BioTek, USA).

3.2.5. Cytometria przepływowa

Komórki SCC-25 i CAL-27 zostały wysiane na płytki 6-dołkowe (Corning Inc., USA) w liczbie 1 mln na dołek. Po 24 godzinach ściągano medium i dodawano roztwory badanych związków: DMU-214 (stężenie 5 μM oraz 2,5 μM), gefitynib o stężeniu 15 μM , a także mieszaniny obu substancji w stężeniach 1 μM DMU-214 i 5 μM gefitynibu oraz 0,5 μM DMU-214 i 2,5 μM gefitynibu. Po 24-godzinnej inkubacji, komórki odtrawiano,

przemywano dwukrotnie buforem PBS (Sigma-Aldrich, USA), a w następnej kolejności zawieszano w 70% etanolu (POCH, Polska), co miało na celu ich utrwalenie. Sporządzone w ten sposób próby przechowywano w temp. -20 °C do momentu dalszej analizy. Po rozmrożeniu próby wirowano przez 10 min 3000 obr./min. Powstały osad przemywany był dwukrotnie buforem PBS, po czym ponownie wirowany. Do uzyskanego osadu komórek dodano 5 µl roztworu jodku propidyny (SigmaAldrich, USA) oraz 2 µl RNAzy A (Sigma-Aldrich, USA). Po 30-minutowej inkubacji następował pomiar fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 535 nm i długości fali emisji 617 nm.

3.2.6. Analiza poziomu ekspresji białek EGFR oraz fosforylowanej formy EGFR przy użyciu metody Western Blot

W celu izolacji białka komórki SCC-25 i CAL-27 przemywano 2-krotnie buforem PBS, w następnej kolejności dodawano mieszaninę RIPA i inhibitora proteaz (Sigma-Aldrich, USA). Po upływie 30 minut lizat przenoszono do probówek 1,5 ml i przechowywano w -20 °C. Stężenie białka oznaczono spektrofotometrycznie metodą Bradforda. Białka rozdzielano zgodnie z ich masą przy zastosowaniu elektroforezy w warunkach denaturujących SDS-PAGE w żelu gradientowym 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™, a następnie identyfikowano przy pomocy swoistych przeciwciał. Do probówek 1,5 ml podawano odpowiednią objętość białka przeliczoną na 20 µg, 5 µl 4 x stężonego obciążacza Laemmli 4 x (Sigma-Aldrich, USA) i uzupełniono wodą do końcowej objętości 20 µM. W celu denaturacji białka próby poddawano inkubacji w termobloku w temperaturze 95 °C przez 5 minut, po czym krótko wirowano. Elektroforezę przeprowadzano w buforze glicynowym przy napięciu 120 V. Czas rozdziału wynosił 90 minut. Po elektroforezie przystąpiono do transferu białek za pomocą gotowego zestawu Trans-Blot Turbo Mini 0.2 µm PVDF Transfer Packs.

3.2.7. Izolacja RNA metodą Chomczyński-Sacchi i odwrotna transkrypcja

Do izolacji RNA użyto metody Chomczyńskiego i Sacchi [76]. Po 24-godzinnej inkubacji komórek SCC-25 oraz CAL-27 z DMU-214 o stężeniu 5 µM oraz 2,5 µM, gefitynibem (15 µM), a także mieszaniną obu związków w stężeniach 1 µM DMU-214 i 5 µM gefitynibu oraz 0,5 µM DMU-214 i 2,5 µM gefitynibu, poddano je lizie TriPure Isolation Reagent (Merck, Niemcy). Do otrzymanych prób dodano 200 µl chloroformu, po czym je mieszano i inkubowano 5 minut na lodzie. Następnie próby wirowano przez 15 minut, w temperaturze 4 °C, 15 000 xg. Na skutek wirowania uzyskano trzy warstwy; (1)

fazę wodną (zawierającą RNA), (2) fazę pośrednią (interfazę, zawierającą DNA) oraz (3) fazę fenolowo-chloroformową (zawierającą białka i struktury subkomórkowe). Do dalszej izolacji RNA użyto 500 μ l fazy wodnej, którą przeniesiono do nowych probówek. RNA wytrącano poprzez dodanie izopropanolu (POCH, Polska) w stosunku objętościowym 1:1. Następnie próby mieszano i umieszczano w temperaturze -80°C . Po upływie 24 godz. wytrącony RNA wirowano 15 minut, 4°C , 15 000 xg. Usunięto supernatant, a powstały osad RNA przemywano dwukrotnie schłodzonym 75% etanolem (POCH, Polska). Po usunięciu etanolu próby ponownie wirowano 15 minut, 4°C , 15 000 xg, a na końcu osuszano. RNA rozpuszczano w 20 μ l wody wolnej od RNaz. Uzyskane w ten sposób RNA wykorzystano jako matrycę do syntezy cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji (ang. Reverse Tanscription PCR, RT-PCR), do której użyto 1 μ g całkowitego RNA. Stężenie RNA określono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem aparatu DeNovix DS-11 (DeNovix, USA). Całą reakcję RT-PCR wykonano pod komorą laminarną na lodzie. Do 1 μ g RNA dodano 4 μ l 2,5 mM dNTP (Roche, Niemcy), 0,5 μ l oligo(dT) (Roche, Niemcy) oraz 0,5 μ l losowych heksamerów (Roche, Niemcy). Każdą z prób mieszano, wirowano i umieszczano na 5 minut w 65°C w termobloku Mastercycler nexus gradient (Eppendorf, Niemcy) w celu denaturacji RNA. Próby ponownie wirowano, umieszczano na lodzie i dodawano następujące składniki: 4 μ l pięciokrotnie stężonego buforu First Strand Buffer (Invitrogen, USA), 0,25 μ l inhibitora rybonukleaz Rnase OUT 40 U/ μ l (Invitrogen, USA) 2 μ l DTT 0,1 M (Invitrogen, USA) oraz 0,5 μ l odwrotnej transkryptazy SuperScriptTM II Reverse Transcriptase 200 U/ μ l (Invitrogen, USA). Próby wytrząsano, a w następnej kolejności krótko wirowano i umieszczano w termobloku. Synteza cDNA odbywała się przez 50 minut w temp. 37°C . W celu inhibicji reakcji próby inkubowano przez 15 minut w temp. 65°C . Uzyskany w ten sposób cDNA został wykorzystany jako matryca do reakcji qPCR-array (ang. quantative PCR array).

3.2.8. qPCR-array

qPCR-array to metoda ilościowego oznaczenia cDNA (ang. complementary DNA), oparta na reakcji PCR w czasie rzeczywistym RT-qPCR (ang. Real-time quantative PCR). Pozwala ona na jednoczesne kontrolowanie zmian od kilkadziesiąt do kilkuset produktów PCR w czasie trwania reakcji. W celu oznaczenia poziomu ekspresji panelu genów zaangażowanych w ścieżkę sygnalizacyjną EGFR wykorzystano metodę qPCR-array z wykorzystaniem aparatu LightCycler Instrument 96 (Roche Diagnostics, Niemcy) oraz oprogramowania LightCycler Software 1.5. Reakcja qPCR-array została przeprowadzo-

na na komercyjnie przygotowanych płytkach 96-dołkowych EGFR SIGNALING H96 (Bio-Rad, USA), stosowanych do oceny ekspresji 40 genów, których produkty białkowe są zaangażowane w ścieżkę sygnalizacyjną EGFR. Do każdego dołka płytki zawierającego zliofilizowane startery zaprojektowane w kierunku 5' → 3' oraz 3' → 5' наносono 10 µl mieszaniny reakcyjnej (1 µl cDNA, 2 µl Quantum EvaGreen® PCR Kit, 7 µl wody), o stałym składzie dla analizy ekspresji genów danej próby:

- 40 µl cDNA (1 µl na 1 reakcję),
- 80 µl Quantum EvaGreen® PCR Kit (2 µl na 1 reakcję),
- 280 µl wody (5 µl na 1 reakcję).

Reakcję przeprowadzono według protokołu zalecanego przez producenta (Bio-Rad, USA):

- preinkubacja: 95 °C, 600 s,
- oznaczenie ilościowe: 40 cykli (denaturacja: 95 °C, 15 s; przyłączanie starterów: 60 °C, 15 s; wydłużanie starterów: 72 °C, 15 s),
- chłodzenie aparatu 37 °C, 30 s.

W celu oceny ekspresji wykorzystywano względną metodę ilościową. Otrzymane wyniki analizowanych cDNA normalizowano względem trzech genów konstytutywnych: TBP (ang. TATA box binding protein), GAPDH (ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) oraz HPRT-1 (ang. hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1).

3.2.9. Analiza statystyczna wyników

W celu przeprowadzenia analizy statystycznej wyników wykorzystano program GraphPad v.8.0 oraz Microsoft Excel 365. Przedstawione wyniki doświadczeń są średnią ($\pm$ SD) pomiarów otrzymanych z trzech przeprowadzonych oddzielnie powtórzeń każdego eksperymentu. Do oszacowania wpływu DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny na poziom ekspresji badanych genów wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (one-way ANOVA). Dodatkowo wszystkie wyniki zostały przeanalizowane testem post-hoc Student-Newman-Keuls. Różnice pomiędzy próbami zostały przyjęte za istotnie statystyczne na poziomie istotności:

ns dla $p > 0,05$ (brak istotności statystycznej),

* — $p < 0,05$,

** — $p < 0,01$,

** — $p < 0,001$.

4. Wyniki

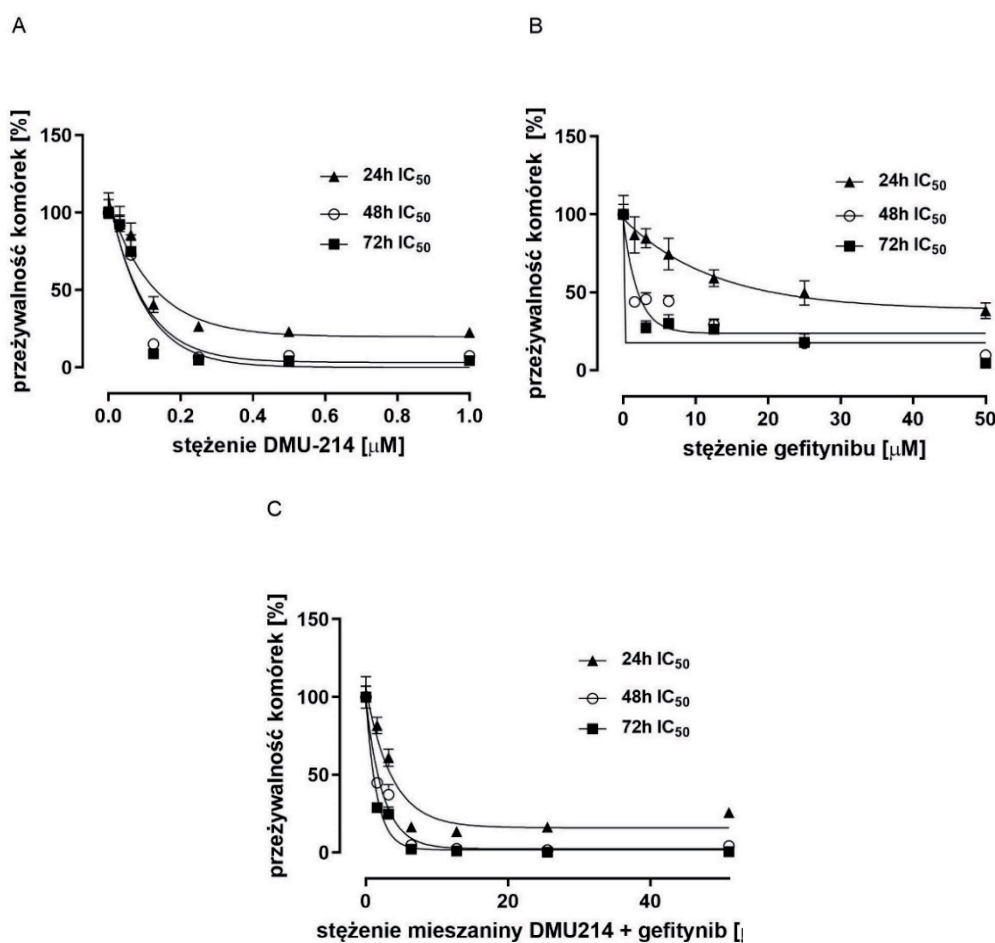
4.1. Ocena cytotoksyczności metylowej pochodnej resweratrolu DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu w liniach komórkowych raka języka SCC-25 oraz CAL-27

Wpływ metylowej pochodnej resweratrolu — DMU-214, gefitynibu i mieszaniny obu związków na żywotność linii komórkowych raka języka SCC-25 oraz CAL-27 określono za pomocą testu MTT w trzech niezależnych eksperymentach. Wyniki zostały przedstawione w formie tabeli (**tabela 1**) oraz wykresów (**ryciny 18 i 19**). Wykazano właściwości cytotoksyczne DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny w obu liniach komórkowych raka języka. Zaobserwowano, że komórki CAL-27 są bardziej wrażliwe na związki badane w porównaniu z linią komórkową SCC-25. Najwyższą aktywność cytotoksyczną zaobserwowano dla DMU-214. Wartość IC_{50} tego związku w komórkach CAL-27 po 24-godzinnej inkubacji wynosi $0,13 \pm 0,01 \mu M$, natomiast w linii komórkowej SCC-25 $5,31 \pm 1,70 \mu M$ (**tabela 1**). Działanie cytotoksyczne gefitynibu było słabsze

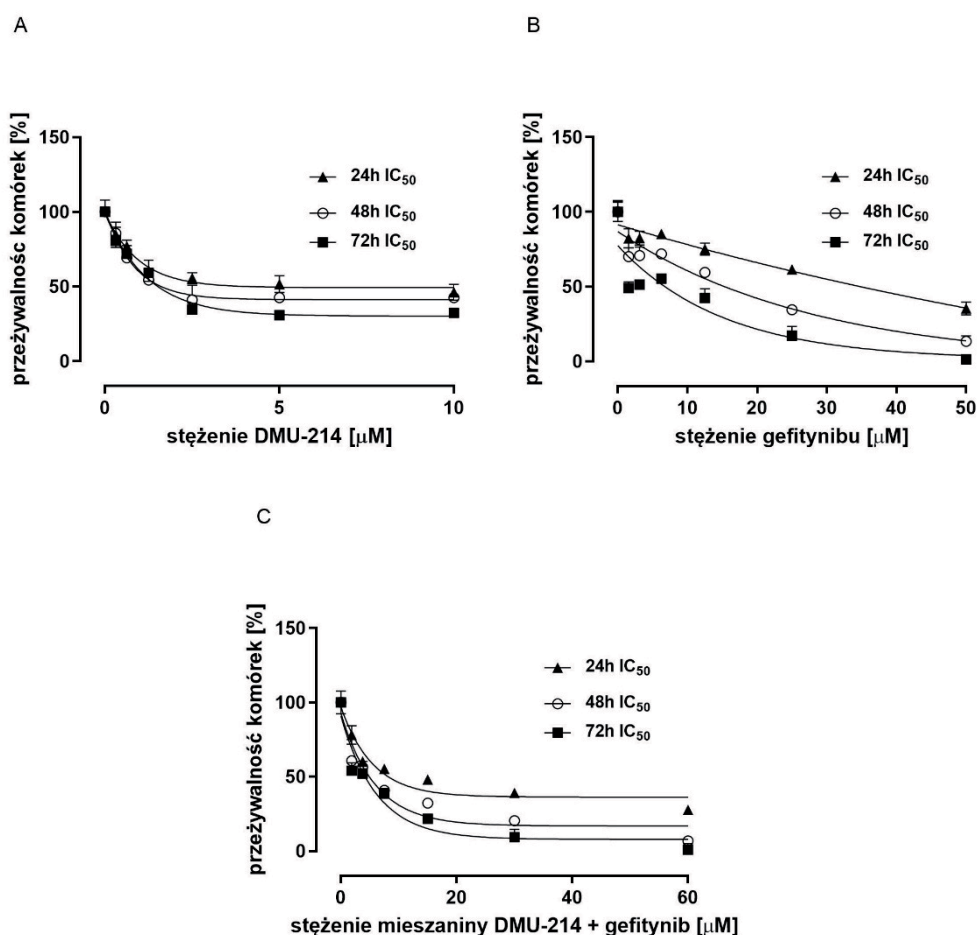
Tabela 1. Wartości IC_{50} DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny gefitynibu i DMU-214 w liniach komórkowych SCC-25 i CAL-27

Badane związki	Czas ekspozycji (h)	Wartość IC_{50} (μM)	
		SCC-25	CAL-27
DMU-214	24	$5,31 \pm 1,70$	$0,13 \pm 0,01$
	48	$1,75 \pm 0,19$	$0,08 \pm 0,01$
	72	$1,63 \pm 0,17$	$0,07 \pm 0,01$
Gefitynib	24	$36,15 \pm 1,09$	$17,14 \pm 5,00$
	48	$17,66 \pm 3,33$	$2,00 \pm 0,03$
	72	$8,64 \pm 2,67$	$1,03 \pm 0,01$
Mieszanina DMU-214 i Gefitynibu	24	$8,73 \pm 0,76$	$3,24 \pm 0,38$
	48	$5,20 \pm 0,39$	$1,44 \pm 0,36$
	72	$3,64 \pm 0,74$	$0,93 \pm 0,20$

(wartość $IC_{50} = 17,14 \pm 5,0 \mu M$ w komórkach CAL-27, a w SCC-25 to $36,15 \pm 1,09 \mu M$ po 24 h inkubacji). Wykazano również, że dodanie DMU-214 do gefitynibu znacząco zwiększyło aktywność biologiczną mieszaniny w porównaniu z gefitynibem (w linii komórkowej CAL-27 — wartość $IC_{50} = 3,24 \pm 0,38 \mu M$, w komórkach SCC-25 — $IC_{50} = 8,73 \pm 0,76 \mu M$).



Rycina 18. Przeżywalność komórek raka języka CAL-27 po 24, 48 oraz 72 godzinach inkubacji z DMU-214 (0–1 μM), gefitynibem (0–50 μM) oraz mieszaniną DMU-214 i gefitynibu (0–51 μM); średnia z trzech niezależnych eksperymentów $\pm$ SD

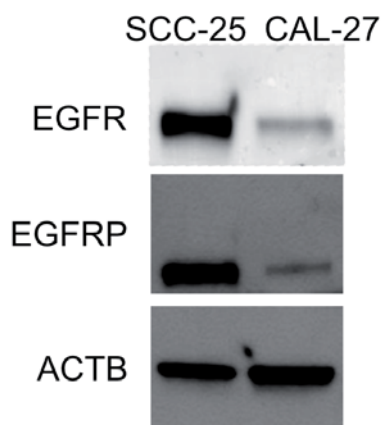


Rycina 19. Przeżywalność komórek raka języka SCC-25 po 24, 48 oraz 72 godzinach inkubacji z DMU-214 (0–10 μM), gefitynibem (0–50 μM) oraz mieszaniną DMU-214 i gefitynibu (0–60 μM); średnia z trzech niezależnych eksperymentów ± SD

4.2. Poziom ekspresji białka EGFR i fosforylowanej postaci EGFRP w liniach komórkowych raka języka CAL-27 i SCC-25

Analizę profilu ekspresji białek EGFR oraz EGFRP w linii komórkowej SCC-25 oraz CAL-27 wykonano wykorzystując technikę Western Blot (**rycina 20**). Wykazano niższy poziom ekspresji białek EGFR i jego fosforylowanej izoformy EGFRP w komórkach CAL-27, w porównaniu z SCC-25.

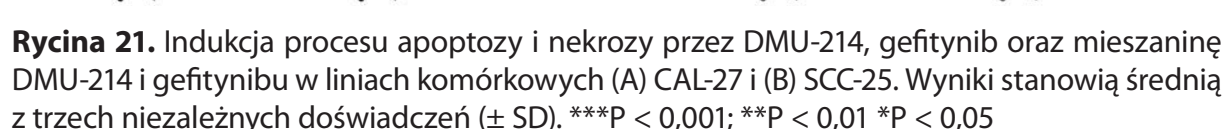
Lizaty komórkowe SCC-25 oraz CAL-27 zostały rozdzielone elektroforetycznie. Analizy profilu białek dokonano, wykorzystując technikę Western Blot, przy użyciu przeciwciał anty-EGFR i anty-EGFRP. Do oznaczenia poziomu białka referencyjnego wykorzystano przeciwciało anty β-aktyna.



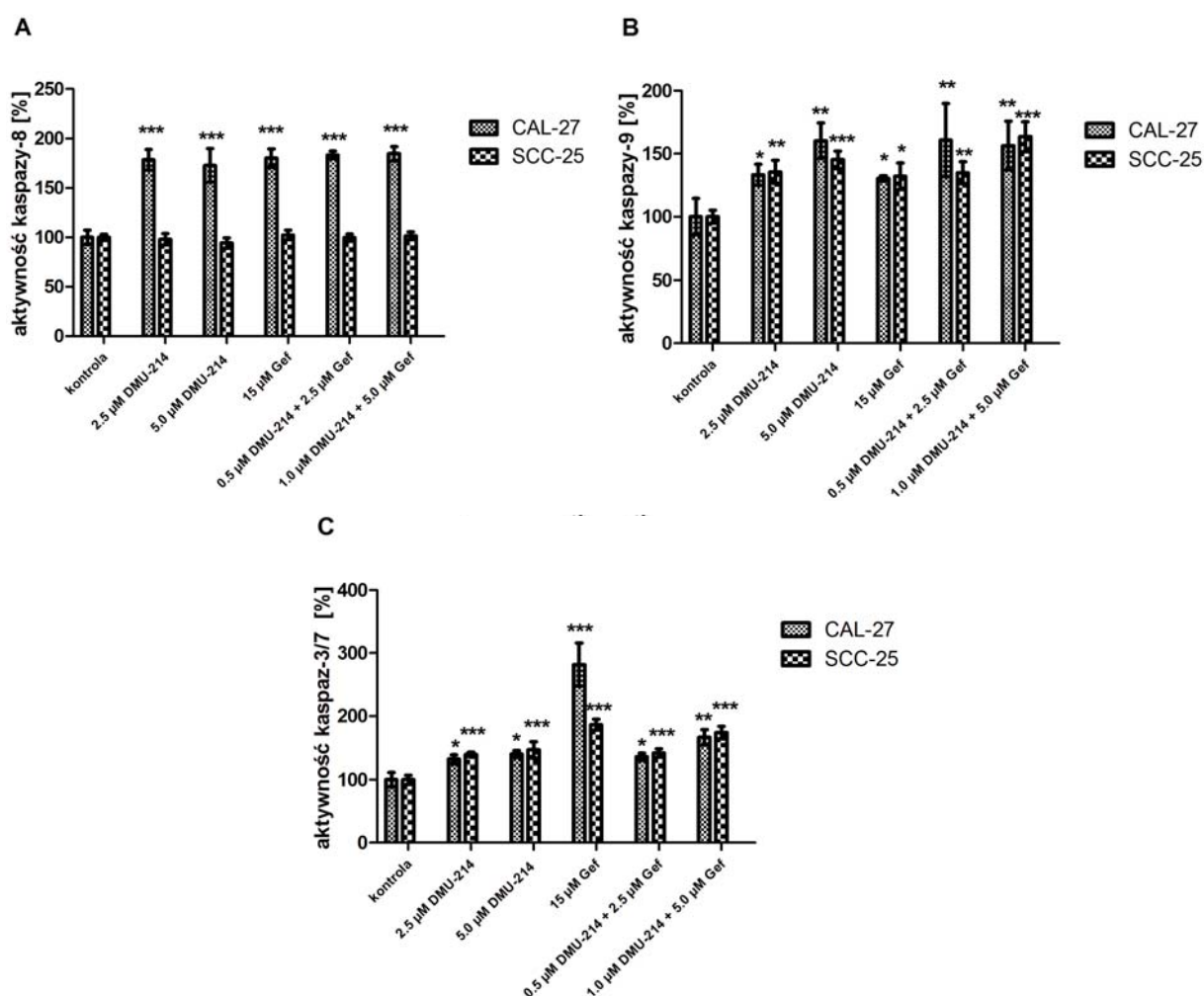
Rycina 20. Porównanie poziomu ekspresji białek EGFR i EGFRP w liniach komórkowych SCC-25 oraz CAL-27

4.3. Ocena indukcji apoptozy i nekrozy komórek raka języka CAL-27 oraz SCC-25 pod wpływem DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu

Celem wyjaśnienia mechanizmu cytotoksycznego działania DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu poprzez ocenę indukcji procesów apoptozy i nekrozy wykorzystano test ELISA, którego wyniki przedstawiono na **rycinie 21**. Działanie apoptotyczne i nekrotyczne badanych związków wyrażono jako wartości współczynnika EF (ang. enrichment factor), który przedstawia liczbę komórek podlegających procesom apoptozy i/lub nekrozy. W linii komórkowej CAL-27 najsilniejszy efekt proapoptotyczny zaobserwowano przy podaniu mieszaniny DMU-214 oraz gefitynibu w stężeniach 1 μM DMU-214 i 5 μM gefitynibu ($\text{EF} = 6,11 \pm 0,96$, $P < 0,001$) oraz 0,5 μM DMU-214 i 2,5 μM gefitynibu ($\text{EF} = 5,07 \pm 0,73$, $P < 0,001$) (**rycina 21A**). DMU-214 aplikowany osobno wykazywał słabsze właściwości proapoptotyczne zarówno w stężeniu 2,5 μM ($\text{EF} = 2,89 \pm 0,57$, $P < 0,01$), jak i 5 μM ($\text{EF} = 2,91 \pm 0,11$, $P < 0,01$). Działanie samego gefitynibu podanego w stężeniu 15 μM również było słabsze w porównaniu z mieszaniną obu związków ($\text{EF} = 2,82 \pm 0,37$, $P < 0,01$). W linii komórkowej SCC-25 najwyższą aktywność proapoptotyczną zaobserwowano po podaniu mieszaniny DMU-214 i gefitynibu w stężeniu 1 DMU-214 i 5 μM gefitynibu ($\text{EF} = 4,82 \pm 0,54$, $P < 0,001$) (**rycina 21B**). Słabsze działanie wykazała mieszanina DMU-214 i gefitynibu o stężeniu 0,5 μM DMU-214 i 2,5 μM gefitynibu ($\text{EF} = 2,87 \pm 0,29$, $P < 0,01$). Dla DMU-214 podanego osobno odnotowano potencjał proapoptotyczny odpowiednio na poziomach $\text{EF} = 2,077 \pm 0,21$ oraz $\text{EF} = 3,34 \pm 0,30$ dla stężenia 2,5 μM



spazy 8 w porównaniu z próbą kontrolną w przypadku linii komórkowej SCC-25 (**rycina 22A**). Odnotowano wzrost aktywności kaspazy 9 o ~30% w obu liniach komórkowych inkubowanych z DMU-214 o stężeniu 2,5 μM oraz gefitynibem o stężeniu 15 μM . W komórkach CAL-27 oraz SCC-25 poddanych inkubacji z mieszaniną 5 μM gefi tynibu i 1 μM DMU-214 wykazano podwyższenie aktywności kaspazy 9 o ok. 50–60%. Na podobnym poziomie zaobserwowano wzrost aktywności tej kaspazy w linii komórkowej CAL-27 inkubowanej z DMU-214 o stężeniu 5 μM oraz mieszaniną 2,5 μM gefitynibu i 0,5 μM DMU-214. W przypadku linii komórkowej SCC-25 inkubowanej z ww. kombinacjami związków odnotowano wzrost aktywności kaspazy 9 o ok. 35–40%, w porównaniu z kontrolą (**rycina 22B**). Wykazano wzrost aktywności kaspaz 3/7 o ok. 45% pod wpływem DMU-214 oraz jego mieszaniny z gefitynibem we wszystkich badanych stężeniach w obu liniach komórkowych. Aktywność kaspaz 3/7 (ok. 280%) była wyższa



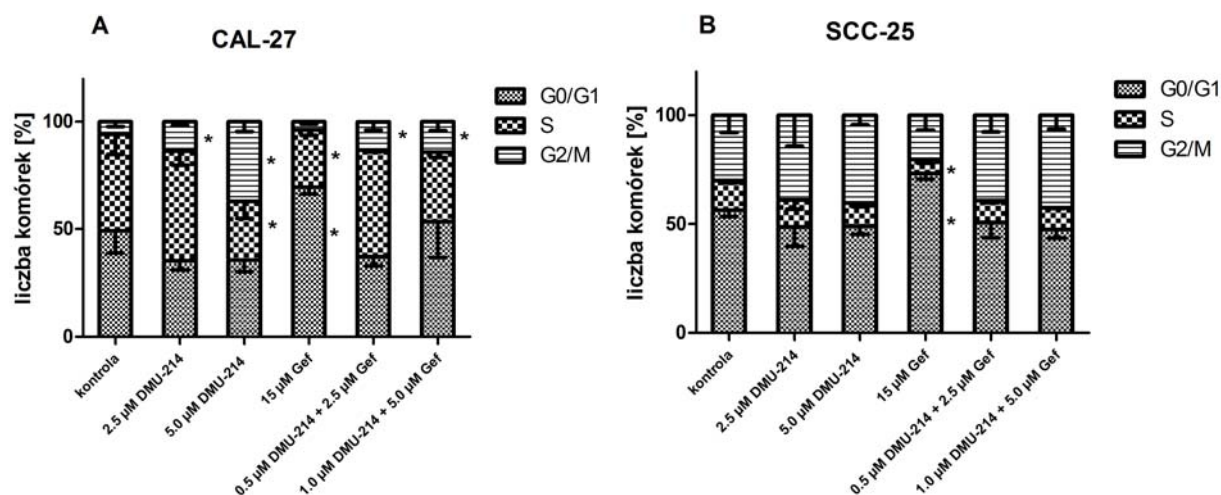
Rycina 22. Aktywność kaspazy -3/-7, -8 oraz -9 pod wpływem DMU-214, gefitynibu i mieszaniny DMU-214 oraz gefitynibu

w komórkach CAL-27 inkubowanych z gefitynibem o stężeniu 15 μM w porównaniu z ich aktywacją w linii komórkowej SCC-25 (ok. 180%) (**rycina 22C**).

Komórki SCC-25 i CAL-27 były inkubowane przez 24 godz. z DMU-214 o stężeniu 2,5 i 5 μM , gefitynibem o stężeniu 15 μM oraz mieszaniną DMU-214 i gefitynibu w dwóch stężeniach — 2,5 μM gefitynibu i 0,5 μM DMU-214 oraz 5 μM gefitynibu i 1 μM DMU-214. Wyniki stanowią średnią z trzech eksperymentów ($\pm$ SD). ***P < 0,001; **P < 0,01 *P < 0,05.

4.5. Ocena wpływu DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu na cykl komórkowy w liniach CAL-27 oraz SCC-25

W celu określenia wpływu DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny obu substancji na aktywność proliferacyjną linii komórkowych SCC-25 i CAL-27 wykonano trzy niezależne eksperymenty, podczas których wykorzystano cytometrię przepływową. Wyniki przedstawiono w postaci wykresu (**rycina 23**). W linii komórkowej CAL-27 wykazano największy wzrost liczby komórek w fazie G2/M w porównaniu z próbą kontrolną po podaniu DMU-214 o stężeniu 5 μM (**rycina 23A**). Zatrzymanie komórek w tej fazie zaobserwowano również w wyniku ekspozycji komórek CAL-27 na DMU-214 o stężeniu 2,5 μM oraz na mieszaninę DMU-214 i gefitynibu w obu badanych stężeniach. W fazie S odnotowano spadek liczby komórek CAL-27 po inkubacji z DMU-214 o stężeniu 5 μM .



Rycina 23. Ilość komórek raka języka CAL-27 oraz SCC-25 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego uzyskana po ekspozycji na związek DMU-214, gefitynib oraz na mieszaninę obu substancji. *P < 0,05

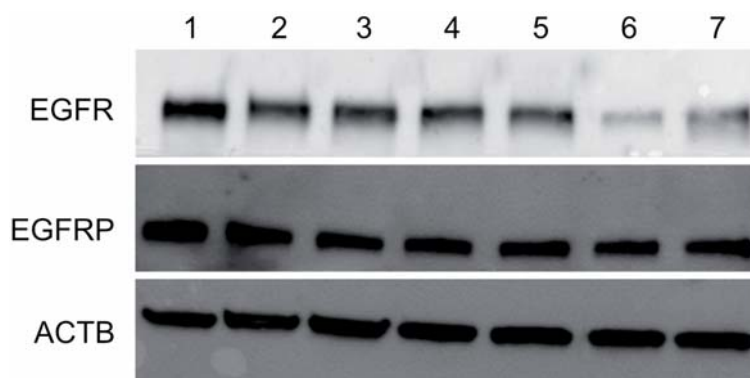
W obu badanych liniach komórkowych po podaniu gefitynibu o stężeniu 15 μM wykazano wzrost liczby komórek w fazie G0/G1 oraz jej spadek w fazie S (**rycina 23A, B**).

4.6. Analiza poziomu ekspresji białka EGFR oraz jego fosforylowanej formy EGFRP pod wpływem DMU-214, gefitynibu i mieszaniny DMU-214 oraz gefitynibu w komórkach raka języka SCC-25 oraz CAL-27

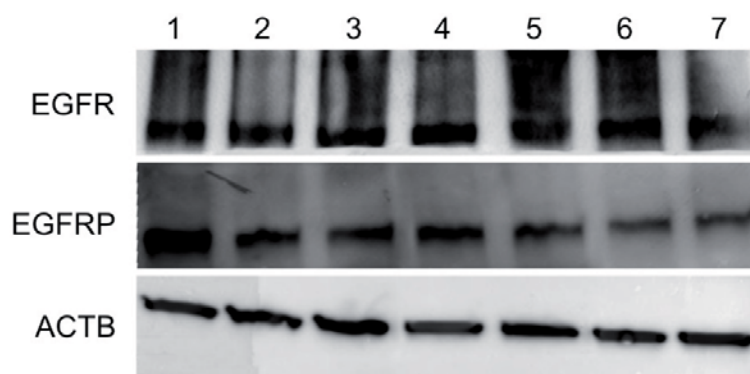
W celu oceny wpływu DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny na ekspresję białek EGFR oraz EGFRP w liniach komórkowych SCC-25 oraz CAL-27 wykorzystano technikę Western Blot (**ryciny 24 i 25**). Badania zostały przeprowadzone w trzech niezależnych eksperymentach. Komórki SCC-25 oraz CAL-27 inkubowano przez 24 godziny z DMU-214 w stężeniu 2,5 μM oraz 5 μM , gefitynibem o stężeniu 15 μM oraz 30 μM i mieszaniną obu substancji w stężeniach 0,5 μM DMU-214 i 2,5 μM gefitynibu oraz 1 μM DMU-214 i 5 μM gefitynibu.

Rozdział elektroforetyczny białek oraz analiza Western Blot z wykorzystaniem przeciwciał anti-EGFR i anti-EGFRP umożliwiły uzyskanie sygnałów, których lokalizacje odpowiadają masie cząsteczkowej EGFR (170 kDa) oraz EGFRP (170 kDa). W linii komórkowej SCC-25 zaobserwowano obniżenie poziomu białka EGFR o ~50% po podaniu obu stężeń DMU-214 (2,5 μM i 5 μM) oraz gefitynibu (15 μM i 30 μM) (**rycina 24**). Najsilniejszy efekt uzyskano po inkubacji komórek SCC-25 z mieszaniną związków w stężeniach 0,5 μM DMU-214 i 2,5 μM gefitynibu oraz 1 μM DMU-214 i 5 μM gefitynibu, w wyniku której ekspresja białka EGFR zmniejszyła się o ok. 80%, w porównaniu z próbą kontrolną. Poziom białka EGFRP w linii komórkowej SCC-25 zmniejszył się o ~20–25% po podaniu DMU-214 o niższym stężeniu (2,5 μM). Inkubacja komórek SCC-25 z 5 μM DMU-214, gefitynibem (15 μM i 30 μM) oraz mieszaniną obu substancji spowodowała obniżenie ekspresji białka EGFRP o ok. 50%, w porównaniu z próbą kontrolną (**rycina 24**). W linii komórkowej CAL-27 zaobserwowano spadek poziomu białka EGFR po podaniu DMU-214 o stężeniu 2,5 μM oraz 5 μM , o ok. 10–15%, w porównaniu z kontrolą (**rycina 25**). Nie wykazano zmian w ekspresji białka EGFR w wyniku inkubacji komórek CAL-27 z gefitynibem w obu stężeniach oraz jego mieszaniną z DMU-214 w stężeniu 2,5 μM DMU-214 i 0,5 μM gefitynibu. Po podaniu mieszaniny 5 μM gefitynibu i 1 μM DMU-214 odnotowano obniżenie poziomu białka EGFR o ~30%, w porównaniu z kon-

trolą. Poziom ekspresji EGFRP zmniejszył się nieznacznie w wyniku inkubacji komórek CAL-27 z niższym stężeniem DMU-214 (2,5 μM). Spadek poziomu białka EGFRP o ok. 50% zaobserwowano po podaniu DMU-214 w stężeniu 5 μM , gefitynibu w obu stężeniach (15 μM i 30 μM) oraz mieszaniny 2,5 μM gefitynibu i 0,5 μM DMU-214, a także 5 μM gefitynibu i 1 μM DMU-214 (**rycina 25**).



Rycina 24. Wpływ DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny na ekspresję białek EGFR oraz EGFRP w linii komórkowej SCC-25



Rycina 25. Wpływ DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny na ekspresję białek EGFR oraz EGFRP w linii komórkowej CAL-27

Lizaty komórkowe SCC-25 uzyskane po 24-godzinnej inkubacji z DMU-214, gefitynibem oraz ich mieszaniną rozdzielano elektroforetycznie oraz analizowano za pomocą techniki Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anti-EGFR oraz anti-EGFRP. Anti- β -aktyna została użyta jako kontrola: 1 — kontrola, 2 — 2,5 μM DMU-214, 3 — 5 μM DMU-214, 4 — 15 μM gefitynib, 5 — 30 μM gefitynib, 6 — 2,5 μM gefitynib + 0,5 μM DMU-214, 7 — 5 μM gefitynib + 1 μM DMU-214.

Lizaty komórkowe CAL-27 uzyskane po 24-godzinnej inkubacji z DMU-214, gefitynibem oraz ich mieszaniną rozdzielano elektroforetycznie oraz analizowano za pomocą techniki Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anti-EGFR oraz anti-EGFRP. Anty- β -aktyna została użyta jako kontrola: 1 — kontrola, 2 — 2,5 μ M DMU-214, 3 — 5 μ M DMU-214, 4 — 15 μ M gefitynib, 5 — 30 μ M gefitynib, 6 — 2,5 μ M gefitynib + 0,5 μ M DMU-214, 7 — 5 μ M gefitynib + 1 μ M DMU-214.

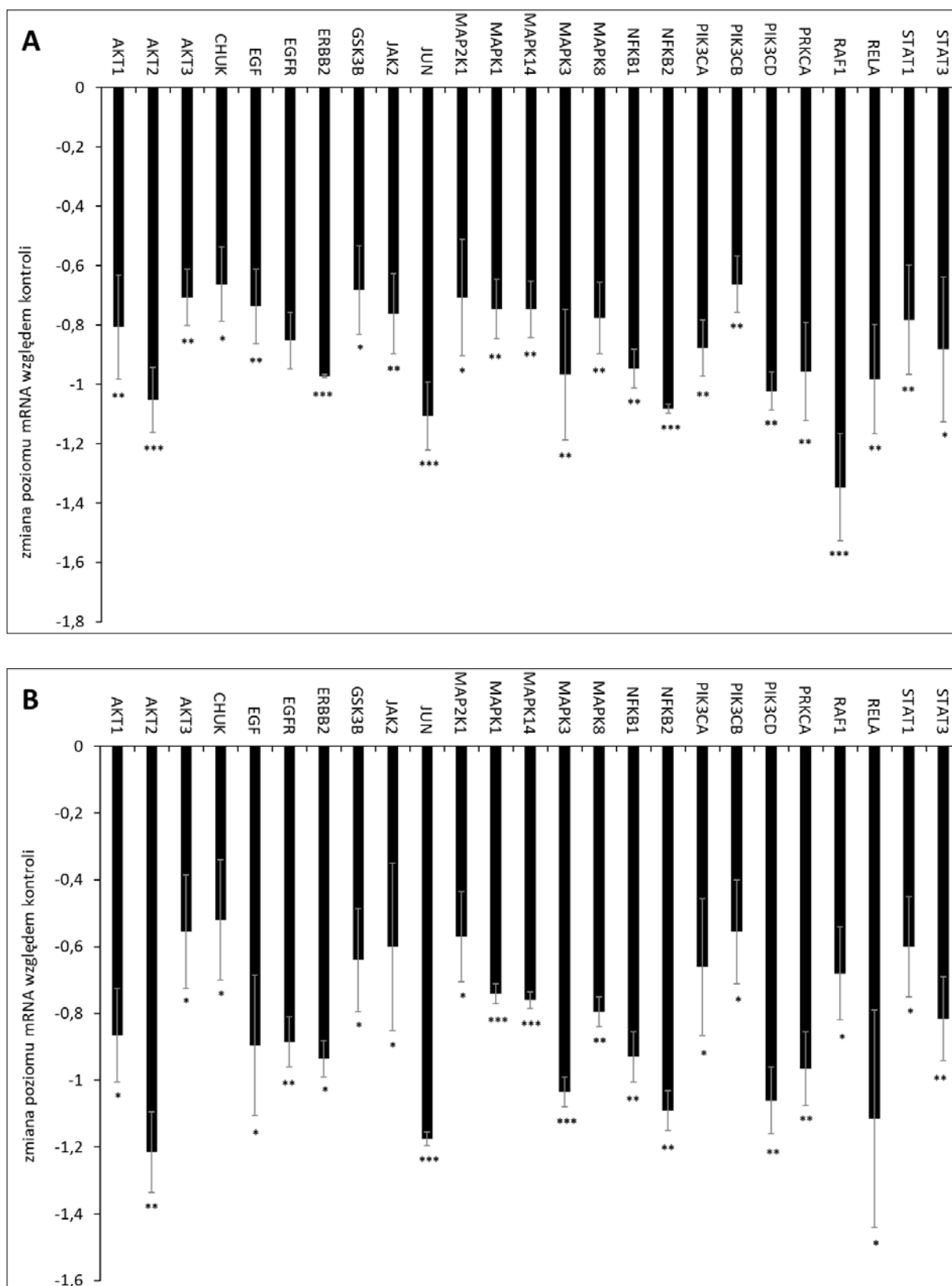
4.7. Ocena wpływu DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu na ekspresję genów zaangażowanych w ścieżkę sygnalizacyjną EGFR

Analizę poziomu ekspresji wybranych genów ścieżki sygnalizacyjnej EGFR przeprowadzono przy wykorzystaniu RT-qPCR, a wyniki przedstawiono w postaci wykresów (**ryciny 26, 27 i 28**).

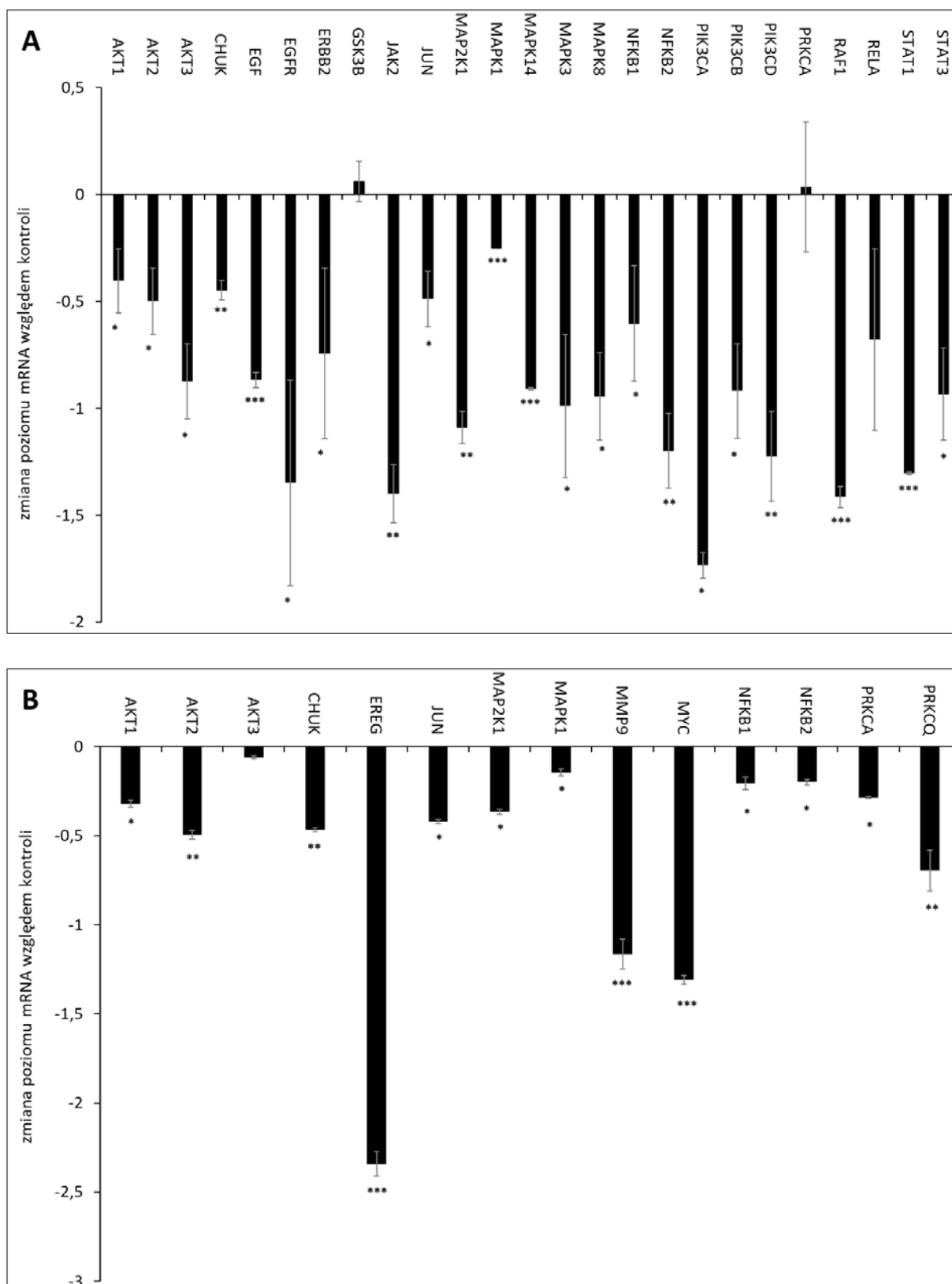
Pod wpływem DMU-214 o stężeniu 5 μ M zaobserwowano zmianę profilu ekspresji tych samych genów zaangażowanych w ścieżkę sygnalizacyjną EGFR zarówno w linii komórkowej CAL-27 (**rycina 26A**), jak i SCC-25 (**rycina 26B**). Wykazano obniżenie poziomu następujących transkryptów: AKT1, AKT2, AKT3, CHUK, EGF, EGFR, ERBB2, GSK3B, JAK2, JUN, MAP2K1, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MAPK8, NF κ B1, NF κ B2, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PRKCA, RAF1, RELA, STAT1 i STAT3.

Po podaniu gefitynibu o stężeniu 15 μ M odnotowano spadek ekspresji genów AKT1, AKT2, AKT3, CHUK, EGF, EGFR, ERBB2, GSK3B, JAK2, JUN, MAP2K1, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MAPK8, NF κ B1, NF κ B2, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PRKCA, RAF1, RELA, STAT1 i STAT3 w linii komórkowej CAL-27 (**rycina 27A**) oraz AKT1, AKT2, AKT3, CHUK, EREG, FOS, JUN, MAP2K1, MAPK1, MMP9, MYC, NF κ B1, NF κ B2, PRKCA, PRKCQ i TGFA w linii komórkowej SCC-25 (**rycina 27B**).

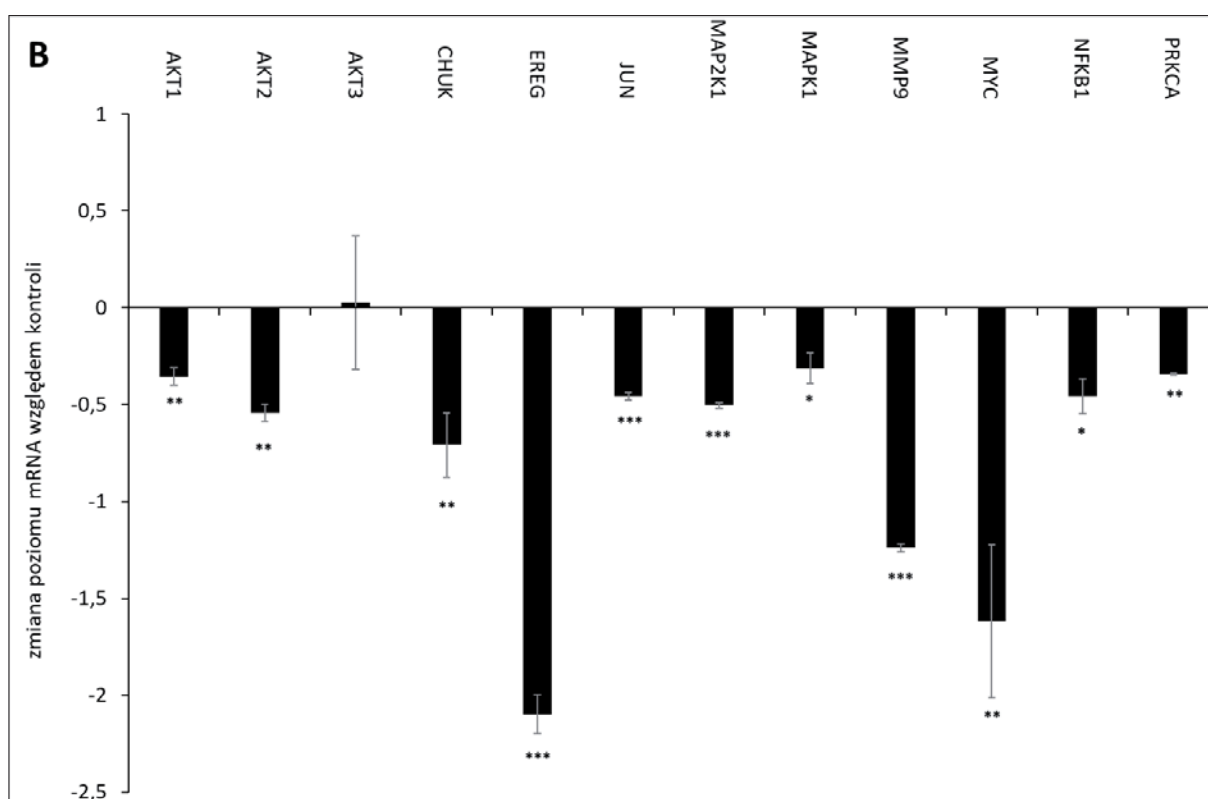
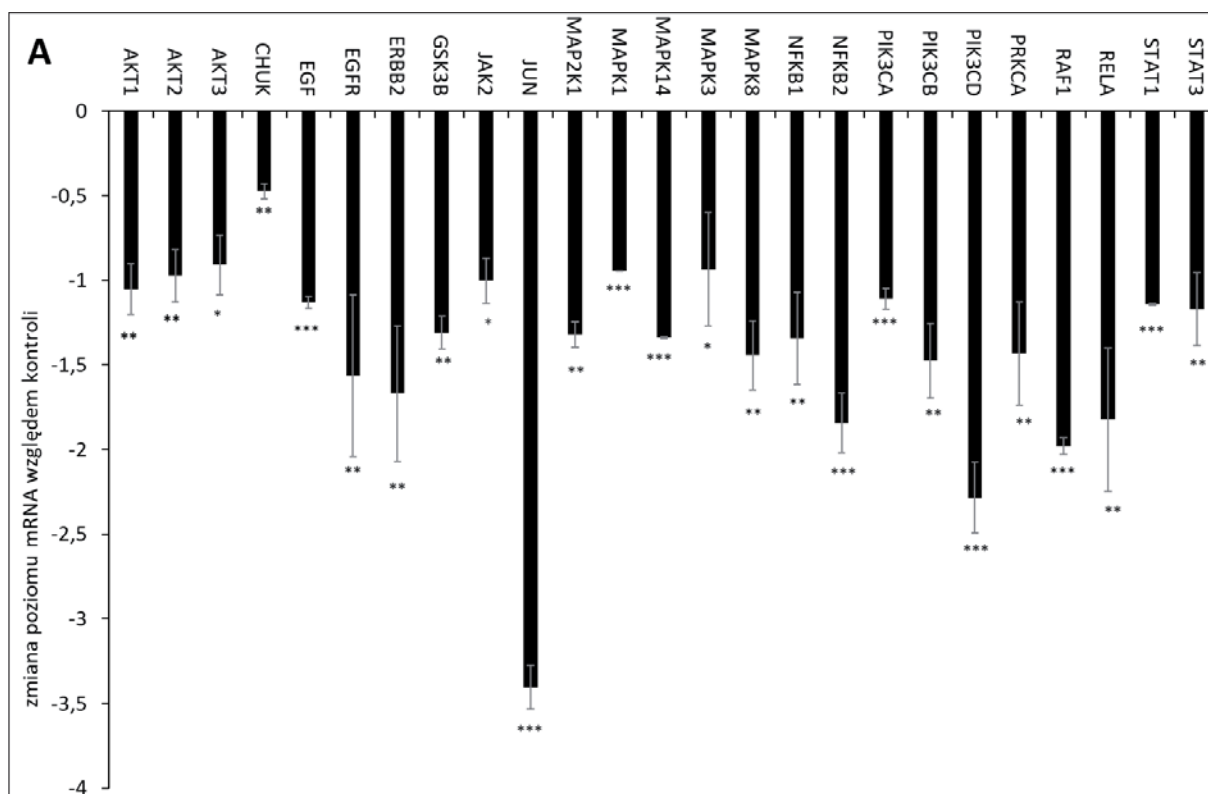
Po inkubacji komórek CAL-27 z mieszaniną obu związków (5 μ M DMU-214, 15 μ M gefitynib) wykazano zmniejszony poziom mRNA AKT1, AKT2, AKT3, CHUK, EGF, EGFR, ERBB2, GSK3B, JAK2, JUN, MAP2K1, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MAPK8, NF κ B1, NF κ B2, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PRKCA, RAF1, RELA, STAT1 oraz STAT3 (**rycina 28A**). W linii komórkowej SCC-25 zaobserwowano natomiast spadek ekspresji następujących genów AKT1, AKT2, AKT3, CHUK, EREG, FOS, JUN, MAP2K1, MAPK1, MMP9, MYC, NF κ B1, PRKCA i TGFA (**rycina 28B**).



Rycina 26. Wpływ DMU-214 o stężeniu 5 μ M na ekspresję genów ścieżki sygnalizacyjnej EGFR w linii komórkowej raka języka CAL-27 (A) oraz SCC-25 (B). Wyniki stanowią średnią z trzech eksperymentów ($\pm$ SD). *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ * $P < 0,05$



Rycina 27. Wpływ gefitynibu o stężeniu 15 μ M na ekspresję genów wchodzących w skład ścieżki sygnalizacyjnej EGFR w linii komórkowej raka języka CAL-27 (A) oraz SCC-25 (B). Wyniki stanowią średnią z trzech eksperymentów ($\pm$ SD). ***P < 0,001 **P < 0,01 *P < 0,05



Rycina 28. Wpływ mieszaniny DMU-214 (5 μ M) oraz gefitynibu (15 μ M) na ekspresję genów ścieżki sygnalizacyjnej EGFR w linii komórkowej raka języka CAL-27 (A) oraz SCC-25 (B). Wyniki stanowią średnią z trzech eksperymentów ($\pm$ SD). *** $P < 0,001$ ** $P < 0,01$ * $P < 0,05$

5. Dyskusja

Nowotwory złośliwe na całym świecie, także i w Polsce, jak i pozostałej części świata stanowią jeden z głównych problemów, z którymi musi się mierzyć współczesna medycyna. Występowanie nowotworów głowy i szyi w ostatnim czasie wykazuje tendencję spadkową, co jest spowodowane zwiększającą się świadomością społeczeństwa na temat czynników kancerogennych, szkodliwości nałogów i wpływu stylu życia na ogólny stan zdrowia. Pomimo tego liczba pacjentów, u których diagnozowane są nowotwory z tej grupy pozostaje wysoka [8]. Rak języka w 90% jest rakiem płaskonabłonkowym i stanowi 40% wszystkich nowotworów złośliwych jamy ustnej i gardła [7]. Jego występowanie bardzo często związane jest z nadużywaniem alkoholu i wyrobów tytoniowych. Rozwija się na podłożu zmian przedrakowych, do których należą: leukoplakia, erytroplakia i liszaj płaski [3]. Dostępne są liczne dane, które sugerują, że jego występowanie jest skorelowane z zakażeniem wirusem HPV [11]. Poza konsekwencjami dla chorego, które za sobą pociągają (upośledzenie narządu mowy, zaburzenie w przyjmowaniu pokarmów, silny stres psychospołeczny), rak języka wiąże się też z dużymi kosztami ekonomicznymi, ponieważ jego leczenie jest złożone i rzadko ogranicza się do jednego zabiegu [36, 37]. Ponadto wczesna diagnostyka pozostaje cały czas problematyczna. W większości przypadków rak języka diagnozowany jest w zaawansowanym stadium i u 40% chorych pierwotnie zdiagnozowanych stwierdza się przerzuty [16]. Z powodu braku skutecznej alternatywy dla radykalnych zabiegów chirurgicznych, wykorzystywanych w leczeniu tego nowotworu, konieczny jest rozwój nowych strategii terapeutycznych. Obecnie standardem w leczeniu nowotworów jest uzupełnianie zabiegów chirurgicznych o chemioterapię i radioterapię [39]. W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień na temat substancji pochodzenia naturalnego o wysokim potencjale przeciwnowotworowym. Należy do nich m.in. resweratrol (3,4',5-trihydroksystylben). Jest to fitoaleksyna występująca w środowisku naturalnym, produkowana w odpowiedzi na czynniki stresogenne. Związek ten charakteryzuje się działaniami wielokierunkowymi, poza swoimi właściwościami przeciwnowotworowymi (anty-profilacyjnym, anty-migacyjnym i pro-apop-

totycznym), wykazuje aktywność antyoksydacyjną, neuroprotekcijną, kardioprotekcijną, przeciwzapalną, przeciwbakteryjną i przeciwwirusową [65]. Resweratrol cechuje się bardzo niską biodostępnością, co było przyczyną rozpoczęcia intensywnych badań nad syntezą jego metylowych analogów o większej stabilności i lepszych parametrach farmakokinetycznych [70]. Jedną z metylowych pochodnych resweratrolu o silnym działaniu cytotoksycznym jest 3,4,5,4'-tetrametoksystylben (DMU-212). Przedmiotem badań niniejszej pracy doktorskiej jest jego metabolit 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylben (DMU-214), który wykazuje większą aktywność biologiczną niż związek macierzysty [74]. W celu analizy działania cytotoksycznego DMU-214, komórki raka języka SCC-25 oraz CAL-27 zostały poddane ekspozycji na związek badany w czasie 24, 48 oraz 72 godzin. W terapiach eksperymentalnych raka języka wykorzystywany jest m.in. gefitynib, którego działanie opiera się na hamowaniu domeny wewnątrzkomórkowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR [41]. Dostępne są dane literaturowe wskazujące na silniejsze działanie antyproliferacyjne gefitynibu w połączeniu z innymi chemioterapeutykami np. cisplatyną niż każdego z osobna [77]. Dlatego do badań w ramach rozprawy doktorskiej włączono również gefitynib i oceniono właściwości cytotoksyczne mieszaniny gefitynibu oraz DMU-214. W wyniku przeprowadzonych analiz zaobserwowano, że linia komórkowa CAL-27 jest bardziej wrażliwa, w porównaniu z SCC-25 (wartość IC_{50} dla DMU-214, gefitynibu i ich mieszaniny po 24-godzinnej inkubacji komórek CAL-27 wynosi odpowiednio $0,13 \pm 0,01 \mu M$, $17,14 \pm 5,00 \mu M$ oraz $3,24 \pm 0,38 \mu M$ vs $5,31 \pm 1,70 \mu M$, $36,15 \pm 1,09 \mu M$, $8,73 \pm 0,76 \mu M$ w linii komórkowej SCC-25). Wykazano również, że mieszanina DMU-214 i gefitynibu posiada silniejsze właściwości antyproliferacyjne niż gefitynib zarówno w linii komórkowej CAL-27, jak i SCC-25. Uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami Helal i wsp. (2015), którzy odnotowali synergistyczne działanie gefitynibu i gemcytabiny czy gefitynibu i cisplatyny [77].

W raku języka stwierdza się często nadekspresję białka EGFR u pacjentów z gorszym rokowaniem [44]. Zimmermann i wsp. wykazali związek pomiędzy nadekspresją EGFR w nowotworach głowy i szyi a dużo słabszą odpowiedzią na chemioterapię [78]. Dostępne są również dane literaturowe wskazujące, że w raku płuca podwyższony poziom fosforylacji EGFR związany jest z bardziej agresywnym przebiegiem choroby [79]. W pracy doktorskiej zaobserwowano podobną zależność, ponieważ linia komórkowa SCC-25 wykazująca większą oporność na działanie cytotoksyczne DMU-214, gefitynibu i ich mieszaniny charakteryzuje się dużo wyższym poziomem ekspresji EGFR i jego fosforylowanej postaci EGFRP, w porównaniu z komórkami CAL-27. W związku z tym

sugeruje się, że profil ekspresji białek EGFR oraz EGFRP warunkuje wrażliwość komórek raka języka CAL-27 i SCC-25 na działanie DMU-214.

Test MTT wykorzystywany jest w celu analizy cytotoksyczności badanych związków. Nie pozwala jednak ustalić mechanizmu śmierci komórkowej, czy doszło do indukcji apoptozy i/lub nekrozy komórek nowotworowych. W celu poznania mechanizmu działania cytotoksycznego badanych związków wykonano test ELISA, umożliwiający określenie liczby komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Apoptoza jest naturalnym i zaprogramowanym procesem biologicznym, który przebiega we wszystkich organizmach wielokomórkowych [80]. Powszechnie wiadomo, że apoptoza jest bardziej pożądaną odpowiedzią komórek nowotworowych na chemioterapię, ponieważ charakteryzuje się kontrolowanym przebiegiem, a jej efektem nie jest powstanie miejscowego stanu zapalnego, co ma miejsce w przypadku nekrozy [81]. Większość leków stosowanych w chemioterapii swoje działanie opiera na zatrzymaniu cyklu komórkowego, jednak każda grupa posiada inny mechanizm, który do tego doprowadza. Wiele cytostatyków powoduje uszkodzenia DNA oraz struktur odpowiedzialnych za podział komórek nowotworowych, kierując je na drogę apoptozy [80]. Jednym z najważniejszych postępów ostatnich lat w badaniach nad rakiem jest wykazanie, że śmierć komórek, głównie na skutek apoptozy, ma decydujący wpływ na regulację powstawania nowotworu, a także warunkuje jego odpowiedź na leczenie [82]. Zrozumienie zależności molekularnych, które regulują apoptozę w odpowiedzi na chemioterapię oraz zjawiska w jaki sposób komórki nowotworowe jej unikają, zapewnia nowe możliwości opracowania ukierunkowanych molekularnie terapii przeciwnowotworowych [82]. Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy badania wykazały, że DMU-214, gefitynib i ich mieszanina mają silne właściwości proapoptotyczne zarówno w linii komórkowej SCC-25, jak i CAL-27. Można na tej podstawie sugerować, że właściwości cytotoksyczne DMU-214 i gefitynibu są związane z ich zdolnością do indukcji apoptozy. Prezentowane wyniki są zgodne z obserwacjami Bruzesse i wsp. (2011), którzy wykazali, że za działanie przeciwnowotworowe gefitynibu w raku płaskonabłonkowym rejonu głowy i szyi odpowiada proces apoptozy [83]. Dostępne są również dane literaturowe na temat działania proapoptotycznego hydroksylowych i metylowych pochodnych resweratrolu, tj. 3,3',4',5-tetra-trans-hydroksystylben, 3,3',4,4',5,5'-heksa-hydroksy-trans-stylben [84] oraz 3,5,4'-trimetoksystylben [85] w modelu *in vivo* oraz *in vitro*. Szczególnie obiecującym analogiem wydaje się jednak być 3,4,4',5-tetrametoksystylben — DMU-212, który indukuje apoptozę w komórkach raka piersi [86], transformowanych nowotworowo fibroblastach [87], gruczolakoraku

płuca [88], w modelu eksperymentalnym *in vitro* ludzkich linii limfoidalnych [89], raku okrężnicy [90], raku wątroby [91] oraz w komórkach raka jajnika [73, 75–77]. W ludzkich liniach komórkowych raka jajnika A-2780 i SKOV-3, raka piersi MCF-7 oraz raka wątroby HepG2 wykazano indukcję apoptozy nie tylko w wyniku działania DMU-212, ale również jego metabolitu DMU-214 [75, 92]. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej potwierdzają wyniki uzyskane przez Androstopolus i wsp. (2011) oraz Piotrowska i wsp. (2012), ponieważ zaobserwowano, że działanie cytotoksyczne DMU-214 w modelu raka języka wiąże się z jego zdolnością do indukcji apoptozy.

Nekroza to rodzaj śmierci komórkowej, która następuje w wyniku jej uszkodzenia czynnikami zewnętrznymi. Zhang i wsp. (2014) wskazali na istotną rolę, jaką odgrywa nekroza w śmierci komórek nowotworowych. Na skutek jej przebiegu uwalniane są bowiem składniki stymulujące funkcje odpornościowe organizmu [93]. He i wsp. (2015) wykazali, że cisplatyna stosowana w połączeniu z terapią fotodynamiczną (ang. photodynamic therapy, PDT) indukuje zarówno apoptozę, jak i nekrozę w komórkach nowotworów głowy i szyi. Sugeruje się, że indukcja obu tych procesów może przyczynić się do przezwyciężenia lekooporności i poprawienia skuteczności leczenia przeciwnowotworowego [94]. W pracy doktorskiej, poza działaniem proapoptotycznym DMU-214 w obu badanych liniach komórkowych raka języka CAL-27 i SCC-25, wykazano również indukcję nekrozy w komórkach CAL-27 inkubowanych z 5 μ M DMU-214. Obserwacje te mogą częściowo tłumaczyć jego silniejszy efekt cytotoksyczny w porównaniu z niższym stężeniem (2,5 μ M).

Apoptoza może przebiegać na drodze zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej. Każda z nich w głównej mierze regulowana jest aktywacją odpowiednich kaspaz [56]. Powszechnie wiadomo, że kaspaza 8 jest markerem apoptozy przebiegającej na drodze mechanizmu receptorowego. Sekiguchi i wsp. (2019) wykazali wzrost aktywności kaspazy 8 pod wpływem gefitynibu w liniach komórkowych ludzkiego włókniakomięsa HT1080, ludzkiego gruczolakoraka płuc A549 oraz mysich fibroblastach MEF. Zaobserwowano, że wzrostowi aktywności kaspazy 8 indukowanemu przez gefitynib towarzyszył proces apoptozy zewnątrzkomórkowej [95]. Piotrowska i wsp. (2016) wykazali, że DMU-214 również powoduje wzrost aktywności kaspazy 8 oraz indukcję apoptozy receptorowej w linii komórkowej raka jajnika A-2780 oraz SKOV-3 [74]. W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej zaobserwowano wzrost aktywności kaspazy 8 pod wpływem badanych związków tylko w komórkach CAL-27. Dlatego sugeruje się, że apoptoza indukowana przez DMU-214 i gefitynib w linii komórkowej CAL-27 przebiega na

drodze mechanizmu zewnętrznego. Brak wzrostu aktywności kaspazy 8 w komórkach SCC-25 wyklucza natomiast udział tej ścieżki apoptozy w mechanizmie działania cytotoksycznego badanych związków. W pracy doktorskiej wykazano wzrost aktywności kaspazy 9 w obu liniach komórkowych raka języka pod wpływem DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny. Liczne dane literaturowe wskazują na kluczową rolę kaspazy 9 w przebiegu apoptozy wewnątrzkomórkowej [96]. Uzyskane wyniki sugerują zatem, że w linii komórkowej SCC-25 apoptoza może przebiegać poprzez ścieżkę mitochondrialną. W komórkach CAL-27, mając na uwadze wzrost aktywności również kaspazy 8, sugeruje się, że w mechanizmie działania przeciwnowotworowego DMU-214 oraz gefitynibu zaangażowana jest, oprócz ścieżki receptorowej, apoptoza przebiegająca na drodze mitochondrialnej. Aktywacja kaspaz przebiega w uporządkowany sposób na drodze proteolizy i oligomeryzacji, w wyniku której dochodzi do „kaskady kaspaz”. W pierwszej kolejności aktywowane są kaspazy inicjatorowe m.in. kaspaza 8 czy 9, których rola polega natomiast na aktywacji kaspaz wykonawczych [97]. W pracy doktorskiej zaobserwowano wzmożoną aktywność efektorowych kaspaz 3/7 w linii komórkowej SCC-25 i CAL-27 po podaniu DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny obu związków, co potwierdza przebieg fazy wykonawczej procesu apoptozy w tych komórkach.

Proces apoptozy jest ściśle związany z kontrolowaniem cyklu podziału komórek nowotworowych [98]. W związku z tym w pracy doktorskiej, w ramach badań mających na celu wyjaśnienie mechanizmu działania przeciwnowotworowego DMU-214, przeprowadzono analizę aktywności proliferacyjnej komórek SCC-25 oraz CAL-27 pod wpływem DMU-214 oraz gefitynibu. Cykl komórkowy to szereg zdarzeń mających miejsce w komórkach eukariotycznych, który prowadzi do ich podziału. W trakcie jego trwania wyróżnia się dwa okresy — interfazę oraz fazę podziału [99]. W interfazie dochodzi do wzrostu komórki i gromadzenia substancji odżywczych potrzebnych do rozpoczęcia podziału swojego materiału genetycznego DNA (kariokinezy). Faza podziału może przebiegać w formie mitozy, gdzie dochodzi do podziału komórki na dwie komórki potomne (jak ma to miejsce w przypadku komórek nowotworowych) i mejozy, w wyniku której powstają cztery komórki potomne o zredukowanej liczbie chromosomów. Mitoza jest więc procesem, dzięki któremu komórki proliferują, a indeks mitotyczny pozwala uzyskać informację umożliwiającą monitorowanie aktywności proliferacyjnej nowotworu [100]. W trakcie trwania cyklu komórkowego wyróżnia się cztery fazy: G_1 , S, G_2 , oraz M. W fazie M, trwającej najkrócej, dochodzi do podziału jądra komórki (kariokinezy) oraz cytokinezy, w trakcie której ma miejsce podział cytoplazmy i utworzenie odrębnych ko-

mórek. Jest to więc faza, podczas której następuje podział komórki [100]. Po zakończeniu fazy M każda z komórek potomnych rozpoczyna interfazę nowego cyklu komórkowego. W fazie G_1 , która jest początkiem interfazy i trwa do początku syntezy DNA, dochodzi do syntezy enzymów niezbędnych do replikacji DNA w fazie S. Faza S rozpoczyna się wraz z rozpoczęciem syntezy DNA i trwa do momentu ukończenia replikacji wszystkich chromosomów. Podczas tej fazy ilość materiału genetycznego zostaje podwojona [101]. Komórka następnie przechodzi w fazę G_2 , która trwa aż do czasu wejścia w fazę M. W trakcie jej trwania syntetyzowane są białka niezbędne do rozpoczęcia procesu mitozy, m.in. tubulina, która jest składnikiem mikrotubul, z których zbudowane jest wrzeciono podziałowe. Zahamowanie syntezy białek w tej fazie uniemożliwia komórce przeprowadzenie mitozy [102]. Niedzielące się komórki organizmów wielokomórkowych eukariotycznych mogą przejść z fazy G_1 w fazę G_0 . Może być to spowodowane przejściem komórki w stan spoczynku (jak ma to miejsce w przypadku neuronów) lub być odpowiedzią na uszkodzenie lub zniszczenie materiału genetycznego. Jest to również biochemiczna alternatywa dla zaprogramowanej śmierci uszkodzonej komórki, którą jest apoptoza [102]. Zhou i wsp. (2009) wykazali, że działanie cytostatyczne gefitynibu w modelu raka trzustki jest konsekwencją m.in. zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G_0/G_1 oraz zablokowania przejścia fazy G_2 w fazę M [103]. Wyniki otrzymane w ramach pracy doktorskiej potwierdzają zdolność gefitynibu do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G_0/G_1 w komórkach raka języka, ponieważ odnotowano jego wpływ na wzrost liczby komórek SCC-25 oraz CAL-27 w tej fazie cyklu podziału. Piotrowska i wsp. (2012, 2016) zaobserwowali, że apoptozie komórek raka jajnika indukowanej zarówno przez metylowy analog resweratrolu DMU-212, jak i jego metabolit DMU-214 towarzyszy zablokowanie cyklu komórkowego w fazie G_2/M [74, 104]. W pracy doktorskiej wykazano wzrost ilości komórek raka języka CAL-27 w fazie G_2/M po podaniu DMU-214 oraz jego mieszaniny z gefitynibem. W świetle powyższych danych sugeruje się, że za działanie proapoptotyczne DMU-214 w linii komórkowej bardziej wrażliwej na jego działanie — CAL-27 odpowiada m.in. zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G_2/M . Słabsza „odpowiedź” komórek SCC-25 może być natomiast związana z mniejszą liczbą mechanizmów indukowanych przez DMU-214, np. z brakiem zahamowania cyklu komórkowego czy brakiem udziału ścieżki receptorowej apoptozy.

Receptor naskórkowego czynnika wzrostu EGFR, którego nadekspresja w komórkach nowotworowych stanowi niekorzystny czynnik prognostyczny, charakteryzuje się aktywnością kinazy tyrozynowej [105]. Kinazy tyrozynowe, przyłączając grupę fosfo-

ranową do białka, prowadzą do zmiany jego aktywności i/lub zdolności wiązania się z innymi białkami. Aktywacja szlaku sygnalizacyjnego EGFR rozpoczyna się od jego związania z ligandem EGF, w wyniku czego dochodzi do autofosforylacji reszt tyrozynowych na cytozolowych domenach receptora [105, 106]. Dlatego w pracy doktorskiej badano wpływ DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny nie tylko na profil ekspresji EGF i EGFR, ale również na poziom fosforylowanego białka EGFRP. W wyniku przeprowadzonych analiz zaobserwowano w obu liniach komórkowych raka języka inkubowanych z DMU-214 obniżenie poziomu mRNA EGF i EGFR, któremu towarzyszył spadek ekspresji białek EGFR oraz EGFRP. Podobne obserwacje poczyniono dla gefitynibu oraz jego mieszaniny z DMU-214 w bardziej wrażliwych komórkach CAL-27. W linii komórkowej SCC-25, pomimo braku zmian na poziomie transkryptów, odnotowano obniżenie ekspresji białek EGFR i EGFRP w tych komórkach. Ponadto zaobserwowano pod wpływem gefitynibu i jego mieszaniny z DMU-214 spadek poziomu transkryptu EREG, który, pełniąc funkcję liganda EGFR, zaangażowany jest w proliferację komórek nowotworowych. Dlatego sugeruje się, że DMU-214, podobnie do stosowanego komercyjnie gefitynibu, pełni funkcję inhibitora EGFR. W wyniku autofosforylacji EGFR dochodzi do rekrutacji białek adaptorowych GRB i SOS, które aktywują natomiast białko RAS oraz kinazę serynowo-treoninową RAF [106]. W pracy doktorskiej wykazano, że DMU-214 powodował obniżenie poziomu ekspresji genu RAF-1 w obu liniach komórkowych. Ponadto w bardziej wrażliwych komórkach CAL-27 obserwowano spadek tego transkryptu również pod wpływem gefitynibu oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu. Helal i wsp. wykazali, że działanie przeciwnowotworowe gefitynibu i cisplatyny w komórkach raka języka związane jest m.in. z obniżeniem ekspresji RAF-1 oraz hamowaniem szlaku sygnalizacyjnego EGFR aktywowanego przez RAF [77]. W świetle powyższych danych sugeruje się, że właściwości antyproliferacyjne DMU-214 w modelu raka języka mogą wynikać z jego zdolności do hamowania ekspresji EGFR oraz RAF-1. Powszechnie wiadomo, że indukcja RAF stymuluje kinazę kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny (MAPKK), co następnie powoduje fosforylację kinazy MAP (MAPK) na resztach tyrozynowych i treoninowych. Ulega ona wówczas translokacji do jądra komórkowego i fosforyluje wybrane czynniki transkrypcyjne, co prowadzi do proliferacji komórek nowotworowych [106]. W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej wykazano spadek ekspresji genów zaangażowanych w ścieżkę sygnalizacyjną MAPKK w wyniku podania wszystkich badanych związków. W linii komórkowej SCC-25 zaobserwowano zmniejszenie poziomu transkryptów MAP2K1, MAPK1 i JUN pod wpływem gefitynibu oraz

jego mieszaniny z DMU-214. Ponadto odnotowano spadek ekspresji genów MAP2K1, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MAPK8 oraz JUN w linii komórkowej CAL-27 po podaniu DMU-214, gefitynibu i ich mieszaniny, a także w komórkach SCC-25 inkubowanych z DMU-214. Zhao i wsp. (2020) wskazali na kluczową rolę jednoczesnego wyciszenia ścieżki sygnalizacyjnej MAPK oraz JAK2/STAT3 w skutecznej terapii przeciwnowotworowej [107]. Kinaza janusowa 2 (ang. Janus-activated kinases, JAK2) należy do rodziny niereceptorowych kinaz tyrozynowych, której nadaktywność powoduje m.in. występowanie nowotworów mieloproliferacyjnych [108]. Dane literaturowe wskazują, że proces fosforylacji JAK2 powoduje aktywację STAT (ang. Signal Transducers and Activators of Transcription) [108]. W pracy doktorskiej zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA JAK2 w linii komórkowej CAL-27 po podaniu DMU-214, gefitynibu i ich mieszaniny oraz w bardziej opornych komórkach SCC-25, ale tylko po podaniu DMU-214. Ponadto wykazano spadek ekspresji genów STAT1 oraz STAT3 w linii komórkowej SCC-25 inkubowanej z DMU-214 i gefitynibem oraz w CAL-27 po podaniu DMU-214, gefitynibu i ich mieszaniny. Uzyskane wyniki sugerują, że za silne działanie przeciwnowotworowe DMU-214 może odpowiadać jego zdolność do hamowania ekspresji genów zaangażowanych zarówno w ścieżkę sygnalizacyjną JAK2/STAT3, jak i MAPK.

Freudlsperger i wsp. (2011) w swojej publikacji skupiającej się na potencjalnych celach molekularnych terapii nowotworów głowy i szyi wskazali, że najczęściej aktywowaną ścieżką sygnalizacyjną przyczyniającą się do progresji nowotworu jest kaskada EGFR/PI3K/AKT/mTOR [109]. W pracy doktorskiej wykazano spadek ekspresji genów ścieżki sygnalizacyjnej 3-kinazy fosfatydoinozytolu (PI3K): PIK3CA, PIK3CB oraz PIK3CD w linii komórkowej CAL-27 po podaniu DMU-214, gefitynibu i ich mieszaniny oraz w mniej wrażliwych komórkach SCC-25, ale tylko pod wpływem DMU-214. Obserwacje te sugerują, że DMU-214 może być silniejszym inhibitorem kaskady EGFR/PI3K w porównaniu z gefitynibem. Powszechnie wiadomo, że głównym przekaźnikiem sygnału w szlaku PI3K jest serynowo troninowa kinaza białkowa AKT, a jej rola związana jest z regulacją wzrostu, metabolizmu, przeżycia i proliferacją komórek. Jej zwiększona ekspresja i aktywacja została zaobserwowana w wielu nowotworach [110]. Obniżenie poziomu transkryptów AKT1 oraz AKT2 zaobserwowano zarówno w linii komórkowej SCC-25, jak i CAL-27 po podaniu gefitynibu, DMU-214 oraz mieszaniny obu związków. Poziom ekspresji AKT3 również uległ obniżeniu z wyjątkiem komórek SCC-25 inkubowanych z DMU-214. Do białek fosforylowanych przez AKT należy również m.in. białko GSK3B [110]. Zmniejszony poziom mRNA GSK3B zaobserwowano w komórkach

CAL-27 eksponowanych na gefitynib. DMU-214 spowodował spadek tego transkryptu w obu liniach komórkowych raka języka. AKT może być również aktywowana pośrednio przez receptor kinazy tyrozynowej, tj. ErbB-2 [111], którego obniżenie zaobserwowano w linii komórkowej SCC-25 po podaniu DMU-214 oraz w komórkach CAL-27 inkubowanych z gefitynibem. Powszechnie wiadomo, że AKT promuje migrację komórek i inwazję poprzez regulację m.in. czynnika transkrypcyjnego MYC [111] oraz powoduje również aktywację MMP9 [112]. Obniżenie ekspresji mRNA MYC oraz MMP9 zaobserwowano w linii komórkowej SCC-25 po podaniu tylko gefitynibu, co może sugerować inny mechanizm jego działania w tych komórkach w porównaniu z DMU-214. Rotman i wsp. (2010) w swojej publikacji zwrócili uwagę na rolę, jaką odgrywa kinaza białkowa A (PRKA) w regulacji aktywności PI3K. Poza bezpośrednią aktywacją PI3K przez PRKA, pośredniczy ona w degradacji PRKCA i PPP1CC2, co jest również istotne dla aktywacji PI3K [113]. W pracy doktorskiej wykazano spadek ekspresji genu PRKCA w linii komórkowej SCC-25 oraz CAL-27 pod wpływem DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny. Ponadto w linii komórkowej SCC-25 zaobserwowano obniżenie ekspresji genu PRKCQ pod wpływem gefitynibu.

Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (NF- κ B) jest niezbędny do przeżycia, wzrostu, replikacji i apoptozy komórek. Odgrywa również kluczową rolę w procesie kancerogeny i odporności komórek nowotworowych na chemio- oraz radioterapię [114]. W komórkach stymulowanych PDGF, AKT aktywuje kinazę IKK (ang. I- κ B kinase), degradując inhibitor NF- κ B, w wyniku czego NF- κ B może przemieścić się do jądra komórkowego i indukować transkrypcję poszczególnych genów [110]. W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej wykazano spadek poziomu transkryptu NF κ B1 w linii komórkowej SCC-25 po podaniu mieszaniny DMU-214 i gefitynibu. W komórkach SCC-25 zaobserwowano również obniżenie poziomu ekspresji mRNA obu podjednostek NF κ B: NF κ B 1 i NF κ B 2 pod wpływem, odpowiednio, gefitynibu oraz DMU-214, a w linii komórkowej CAL-27 po inkubacji z gefitynibem, DMU-214 oraz mieszaniną obu związków. CHUK (ang. conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase) to kinaza proteinowa wchodząca w skład kompleksu I κ B, który pełni kluczową rolę w regulacji transkrypcji NF- κ B [115]. Liu i wsp. (2019) wykazali, że terapia przeciwnowotworowa, której celem molekularnym jest CHUK, poprzez szlak sygnalizacyjny NF- κ B powoduje zatrzymanie proliferacji komórek niedrobnokomórkowego raka płuc [116]. W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej wykazano zmniejszenie poziomu transkryptu CHUK w liniach komórkowych SCC-25 oraz CAL-27 po

podaniu DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny obu substancji. W świetle tych danych oraz hamowania ekspresji podjednostek NF- κ B sugeruje się, że aktywność przeciwnowotworowa badanych związków może wiązać się z ich zdolnością do inhibicji ścieżki sygnalizacyjnej NF- κ B.

Uzyskane wyniki badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej pozwoliły na częściowe wyjaśnienie mechanizmu działania cytotoksycznego DMU-214, gefitynibu i mieszaniny obu związków w liniach komórkowych raka języka SCC-25 oraz CAL-27. We współczesnej chemioterapii za najbardziej pożądaną odpowiedź komórek nowotworowych uważa się apoptozę, ponieważ podlega ona dużo większej kontroli niż nekroza i przebiega bez powstania miejscowego stanu zapalnego. Lekooporność jest coraz częstszym problemem współczesnej medycy, a sposobem na jej przełamanie jest m.in. indukcja procesu apoptozy na drodze więcej niż jednego mechanizmu. W niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy wykazano, że DMU-214 aktywuje apoptozę przebiegającą na drodze mechanizmu zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowego, obniżając jednocześnie ekspresję genów należących do ścieżki sygnalizacyjnej EGFR.

6. Podsumowanie i wnioski

1. DMU-214, metabolit metylowego analogu resweratrolu DMU-212, wykazuje właściwości cytotoksyczne w ludzkich liniach komórkowych raka języka CAL-27 oraz SCC-25. Komórki CAL-27, o niższym poziomie białka receptora nabłonkowego czynnika wzrostu EGFR oraz jego fosforylowanej postaci EGFRP, są bardziej wrażliwe na działanie DMU-214 w porównaniu z SCC-25 z wyższą ekspresją tych białek. Sugeruje się, że poziom ekspresji EGFR oraz EGFRP warunkuje wrażliwość badanych linii komórkowych na DMU-214.
2. Uzyskane wyniki wskazują, że właściwości cytotoksyczne DMU-214 są związane z jego zdolnością do indukcji apoptozy. Wzrost aktywności kaspaz inicjatorowych 8 oraz 9 indukowany przez DMU-214 w komórkach CAL-27 sugeruje udział apoptozy zarówno receptorowej, jak i mitochondrialnej w mechanizmie jego działania cytotoksycznego. Brak zmian w aktywności kaspazy 8 pod wpływem związku badanego w linii komórkowej SCC-25 wyklucza przebieg apoptozy receptorowej w tych komórkach. Aktywacja kaspazy 9 pod wpływem DMU-214 sugeruje natomiast jego zdolność do indukcji ścieżki mitochondrialnej w linii komórkowej raka języka SCC-25.
3. Sugeruje się, że za działanie proapoptotyczne DMU-214 w linii komórkowej bardziej wrażliwej na jego działanie — CAL-27 odpowiada m.in. zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G_2/M . Słabsza „odpowiedź” komórek SCC-25 może być natomiast związana z mniejszą liczbą mechanizmów indukowanych przez DMU-214, m.in. z brakiem zahamowania cyklu komórkowego czy brakiem udziału ścieżki receptorowej apoptozy.
4. Uzyskane wyniki potwierdziły działanie przeciwnowotworowe gefitynibu (kontrola pozytywna dla DMU-214) jako inhibitora kinazy tyrozynowej w modelu raka języka poprzez indukcję apoptozy, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G_0/G_1 oraz inhibicję ścieżki sygnalizacyjnej EGFR.
5. Obniżenie poziomu białek EGFR oraz jego fosforylowanej postaci EGFRP, a także spadek ekspresji genów zaangażowanych w ścieżkę sygnalizacyjną EGFR pod wpły-

wem DMU-214 w liniach komórkowych raka języka CAL-27 oraz SCC-25 sugeruje, że działanie proapoptotyczne DMU-214 jest związane z hamowaniem transdukcji sygnału EGFR w tych komórkach. Niezbędne jest jednak podjęcie dalszych badań mających na celu m.in. analizę profilu ekspresji panelu genów regulowanych przez EGFR, charakterystycznych dla wewnątrz- czy zewnątrzkomórkowego mechanizmu apoptozy.

7. Streszczenie

W ostatnich dziesięcioleciach liczba zgonów spowodowana chorobami nowotworowymi znacząco się zwiększyła. Jest to spowodowane szybkim rozwojem gospodarczym krajów nisko i średnio rozwiniętych oraz stałą ekspozycją społeczeństw na czynniki ryzyka. Pomimo wdrażanych innowacyjnych terapii przeciwnowotworowych, śmiertelność spowodowana nowotworami nie zmniejsza się. Dlatego bardzo istotne jest prowadzenie badań nad nowymi związkami o potencjale antyproliferacyjnym. Resweratrol to naturalnie występująca fitoaleksyna, która wykazuje silne działanie przeciwnowotworowe. Udowodniono, że hamuje rozwój procesu kancerogenezy na wszystkich trzech etapach, inicjacji, promocji oraz progresji. Jego powszechne stosowanie uniemożliwia jednak niska biodostępność oraz krótki czas działania związku w organizmie. Skłoniło to środowiska naukowe do rozpoczęcia badań mających na celu syntezę metylowych pochodnych resweratrolu o lepszych właściwościach farmakokinetycznych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest ocena działania przeciwnowotworowego 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-214), metabolitu metylowego analogu resweratrolu DMU-212 w ludzkich liniach komórkowych raka języka SCC-25 oraz CAL-27.

W pierwszym etapie badań oceniono aktywność cytotoksyczną DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny obu związków w liniach komórkowych SCC-25 oraz CAL-27 za pomocą testu MTT. W celu określenia zdolności DMU-214, gefitynibu i ich mieszaniny, do indukcji apoptozy został wykorzystany zestaw Cell Death Detection ELISA PLUS (Roche Diagnostics, Polska). Aktywność kaspaz inicjujących -8 i -9 oraz wykonawczych -3/7 zbadano przy pomocy testu Caspase-Glo® 3,7,8 i 9 opartego na luminescencyjnej reakcji lucyferazy. Cytometria przepływowa z jodkiem propidyny umożliwiła określenie fazy cyklu komórkowego linii CAL-27 oraz SCC-25 pod wpływem związków badanych. Analizę poziomu ekspresji białek EGFR oraz fosforylowanej formy EGFR wykonano przy użyciu metody Western Blot. Do izolacji RNA została użyta metoda Chomczyńskiego-Sacchi. W celu oznaczenia poziomu ekspresji genów zaangażowanych w ścież-

kę sygnalizacyjną EGFR wykorzystano metodę qPCR-array, która oparta jest na reakcji PCR w czasie rzeczywistym RT-qPCR (ang. Real-time quantitative PCR).

W rozprawie doktorskiej wykazano właściwości cytotoksyczne DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny obu substancji w modelu raka języka. Linia komórkowa CAL-27 okazała się być bardziej wrażliwa na badane związki w porównaniu z komórkami SCC-25. Wykazano również, że dodanie DMU-214 do gefitynibu zwiększa właściwości antyproliferacyjne mieszaniny w porównaniu z samym gefitynibem. Wykorzystując technikę Western Blot, wykazano większą ekspresję białka EGFR i jego fosforylowanej formy EGFRP w linii komórkowej SCC-25. Wykazano zdolność DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny do indukcji apoptozy w linii komórkowej SCC-25 oraz CAL-27 przy pomocy testu ELISA. Działanie nekrotyczne zostało zaobserwowane tylko w linii komórkowej CAL-27 po podaniu DMU-214 o stężeniu 5 μ M. Określono zdolność DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny do aktywacji kaspaz 3/7, 8 oraz 9. W obu liniach komórkowych doszło do wzmożonej aktywności kaspaz 3/7 oraz 9 pod wpływem badanych związków. Tylko w linii komórkowej CAL-27 zaobserwowano zwiększoną aktywność kaspazy 8. Wykorzystując cytometrię przepływową, wykazano zatrzymanie podziału komórek w fazie G2/M w linii komórkowej CAL-27 po podaniu DMU-214 oraz mieszaniny DMU-214 i gefitynibu. Po podaniu gefitynibu w obu liniach komórkowych zaobserwowano wzrost liczby komórek w fazie G0/G1 oraz spadek ich liczby w fazie S. Wykorzystując technikę Western Blot, zaobserwowano w obu liniach komórkowych obniżenie poziomu ekspresji białek EGFR oraz EGFRP pod wpływem DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny. Analiza poziomu ekspresji genów wykazała obniżenie aktywności genów będących wynikiem nadekspresji EGFR pod wpływem DMU-214, gefitynibu i ich mieszaniny w obu liniach komórkowych.

Otrzymane w pracy wyniki wykazały, że właściwości cytotoksyczne DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny polegają na zdolności związków do indukcji apoptozy. Wykazano również, że DMU-214 nasila właściwości cytotoksyczne gefitynibu. Uzyskane informacje świadczą również o tym, że poziom ekspresji białka EGFR wpływa na wrażliwość komórek nowotworowych na cytostatyki stosowane w terapii raka języka.

8. Summary

The number of cancer-related deaths has increased significantly in recent decades. This is due to the rapid economic development of low- and medium-developed countries and the constant exposure of societies to risk factors. Despite the implementation of innovative cancer therapies, cancer-related deaths are not decreasing. Therefore, it is very important to conduct research on new compounds with antiproliferative potential. Resveratrol is a naturally occurring phytoalexin, which has a strong anti-cancer effect. It has been proven to inhibit the development of carcinogenesis at all three stages; initiation, promotion, and progression. Its widespread use, however, is prevented by low bioavailability and short duration of the compound in the body. This prompted the scientific community to initiate research aimed at synthesizing, among others, methyl derivatives of resveratrol with better pharmacokinetic properties.

The aim of this dissertation is to evaluate the anticancer activity of 3'-hydroxy-3,4,5,4'-tetramethoxystylbene (DMU-214), a methyl metabolite of the resveratrol analog DMU-212 in the human cell lines of oral squamous cell carcinomas SCC-25 and CAL-27.

In the first stage of the study, the cytotoxic activity of DMU-214, gefitinib, and a mixture of both compounds in SCC-25 and CAL-27 cell lines was assessed using the MTT assay. Cell Death Detection ELISA PLUS kit was used to determine the ability of DMU-214, gefitinib, and the mixture of both compounds to induce apoptosis. The activity of 8 and 9 initiator caspases and 3 and 7 executioner caspases was tested with the Caspase-Glo® 3, 7, 8, and 9 assay based on the luminescent reaction of luciferase. Flow cytometry with the use of propidium iodide allowed to determine the cell cycle phase of CAL-27 and SCC-25 line under the influence of the tested compounds. The analysis of the EGFR protein expression level and the phosphorylated form of EGFR was performed using the western blot technique. The Chomczyński-Sacchi method was used for RNA isolation. To determine the expression level of genes involved in the EGFR signaling path, the qPCR-array method was used, which is based on the RT-qPCR (real-time quantitative PCR).

The dissertation showed cytotoxic properties of DMU-214, gefitinib, and the mixture of both substances in the model of tongue cancer. CAL-27 cell line proved to be more sensitive to the tested compounds than SCC-25 cells. It has also been demonstrated that adding DMU-214 to gefitinib increases the antiproliferative properties of the mixture compared to gefitinib alone. Higher expression of EGFR protein and its phosphorylated form EGFRP was observed in the SCC-25 cell line compared to CAL-27. The ability of DMU-214, gefitinib, and their mixture to induce apoptosis in both tongue cancer cell lines was demonstrated. Necrotic effects were observed only in the CAL-27 cell line, following the administration of DMU-214 at 5 μ M. Both cell lines indicated an increased activity of caspases 3/7 and 9 under the influence of the tested compounds. An increased activity of caspase 8, which is a marker of extracellular apoptosis, was observed only in the CAL-27 cell line. Cell division in the G2/M phase in the CAL-27 cell line was shown to stop after the administration of DMU-214 and the mixture of DMU-214 and gefitinib. After the administration of gefitinib in both cell lines, an increase in the number of cells in the G0/G1 phase and a decrease in their number in the S phase was observed. A decrease in the level of EGFR and EGFRP protein expression under the influence of DMU-214, gefitinib, and their mixture was observed in both cell lines. A decrease in the expression of genes involved in the EGFR signal pathway under the influence of DMU-214, gefitinib, and their mixture was demonstrated in both tongue cancer cell lines.

The obtained data showed that cytotoxic properties of DMU-214 are related to its ability to induce intra- and extracellular apoptosis in more sensitive CAL-27 cells and mitochondrial apoptosis in the SCC-25 cell line. It is suggested that the level of EGFR and EGFRP protein expression determines the “response” of the studied cell lines to DMU-214. Lower sensitivity of SCC-25 cells may be associated with a smaller number of mechanisms induced by DMU-214, such as the lack of cell cycle inhibition or the lack of involvement of apoptosis receptor pathway. Anticancer activity of gefitinib (positive control for DMU-214) as a tyrosine kinase inhibitor in the model of tongue cancer has been confirmed. The lowering by DMU-214 of EGFR and EGFRP protein levels and the decrease in the expression of genes involved in the EGFR signal pathway in CAL-27 and SCC-25 cells suggests that the proapoptotic activity of DMU-214 is associated with the inhibition of EGFR signal transduction. However, it is necessary to undertake further studies to analyze the level of expression of genes regulated by EGFR, characteristic for apoptosis occurring as a receptor or mitochondrial mechanism.

9. Piśmiennictwo

1. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends-An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016; 25: 16–27.
2. Tandon S, Shahab R, Benton JI, Ghosh SK, Sheard J, Jones TM. Fine-needle aspiration cytology in a regional head and neck cancer center: comparison with a systematic review and meta-analysis. *Head Neck.* 2008; 30: 1246–1252.
3. Maymone MBC, Greer RO, Kesecker J, Sahitya PC, Burdine LK, Cheng A, Maymone AC, Vashi N. Premalignant and malignant oral mucosal lesions: Clinical and pathological findings. *J Am Acad Dermatol.* 2019; 81: 59–71.
4. Eskander A, Irish J, Groome PA, Freeman J, Gullane P, Gilbert R, Hall S, Urbach DR, Goldstein DP. Volume-outcome relationships for head and neck cancer surgery in a universal health care system. *Laryngoscope.* 2014; 124: 2081–2088.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68: 394–424.
6. Kawecki A, Nawrocki S. Nowotwory nabłonkowe narządów głowy i szyi. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych. Tom I. *Via Medica.* 2011; 1–32.
7. Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, D Le N, 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.
8. Mourad M, Jetmore T, Jategaonkar AA, Moubayed S, Moshier E, Urken ML. Epidemiological trends of head and neck cancer in the United States: a SEER population study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017; 75: 2562–72.
9. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Global, Regional, and National Cancer Incidence. Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2018; 4: 1553–1568.
10. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2015; 33: 3235–3242.

11. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruze S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 4294–4301.
12. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, Meyer L, Gress DM, Byrd DR, Winchester DP. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *C8A Cancer J Clin.* 2017; 67: 93–99.
13. D’Souza G, Westra W, J Wang S, van Zante A, Wentz A, Kluz N, Rettig E, Ryan WR, Ha PH, Kang H, Bishop J, Quon H, Kiess AP, Richmon JD, Eisele DW, Fakhry C. Differences in the prevalence of human papillomavirus (HPV) in head and neck squamous cell cancers by sex, race, anatomic tumor site, and HPV detection method. *JAMA Oncol.* 2017; 3: 169–177.
14. O’Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, Lee N, Riaz N, Pei X, Koyfman SA, Adelstein D, Burkey BB, Friborg J, Kristensen CA, Gothelf AB, Hoebbers F, Kremer B, Speel E, Bowles DW, Raben D, Karam SD, Yu E, Xu W. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal Cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol.* 2016; 17: 440–451.
15. Porceddu SV, Milne R, Brown E, Bernard A, Rahbari R, Cartmill B, Foote M, McGrath M, Coward J, Panizza B. Validation of the ICON-S staging for HPV-associated oropharyngeal carcinoma using a pre-defined treatment policy. *Oral Oncol.* 2017; 66: 81–86.
16. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.* 2014; 50: 387–403.
17. Patel, Sagar, Carpenter, William, Tyree, Seth, Couch, Marion, Weissler, Mark, Hackman, Trevor, Hayes, Shores, Carol, Chera, Bhishamjit. Increasing Incidence of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma in Young White Women, Age 18 to 44 Years. *JCO* 2011; 29: 1488–94.
18. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 612–619.
19. Brägelmann J, Dagogo-Jack I, El Dinali M, Stricker T, Brown CD, Zuo Z, Khattri A, Keck M, McNerney ME, Longnecker R, Bieging K, Kocherginsky M, Alexander K, Salgia R, Lingen MW, Vokes EE, White KP, Cohen EEW, Seiwert TY. Oral cavity tumors in younger patients show a poor prognosis and do not contain viral RNA. *Oral Oncol.* 2013; 49: 525–33.
20. Li R, Faden DL, Fakhry C, Langelier C, Jiao Y, Wang Y, Wilkerson MD, Pedamallu CS, Old M, Lang J, Loyo M, Ahn SM, Tan M, Gooi Z, Chan J, Richmon J, Wood LD, Hruban RH, Bishop J, Westra WH, Chung CH, Califano J, Gourin CG, Bettegowda C, Meyerson M, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, DeRisi JL, Koch WM, Agrawal N. Clinical, genomic, and metagenomic characterization of oral tongue squamous cell carcinoma in patients who do not smoke. *Head Neck.* 2015; 37: 1642–9.

21. Pickering CP, Zhang J, Neskey DM, Zhao M, Jasser SA, Wang J, Ward A, Tsai CJ, Ortega Alves MV, Zhou JH, Drummond J, El-Naggar AK, Gibbs R, Weinstein JN, Wheeler DA, Wang J, Frederick MJ, Myers JN. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young non-smokers is genomically similar to tumors in older smokers. *Clin Cancer Res.* 2014; 20: 3842–3848.
22. Brouwer AF, Eisenberg MC, Meza R. Age Effects and Temporal Trends in HPV-Related and HPV-Unrelated Oral Cancer in the United States: A Multistage Carcinogenesis Modeling Analysis. *PLoS One.* 2016; 11: e0151098.
23. Marks MA, Chaturvedi AK, Kelsey K, Straif K, Berthiller J, Schwartz SM, Smith E, Wyss A, Brennan P, Olshan AF, Wei O, Sturgis EM, Zhang ZF, Morgenstern H, Muscat J, Lazarus P, McClean M, Chen C, Vaughan TL, Wunsch-Filho V, Curado MP, Koifman S, Matos E, Menezes A, Daudt AW, Fernandez L, Posner M, Boffetta P, Chin Y, Lee A, Hashibe M, D'Souza G. Association of marijuana smoking with oropharyngeal and oral tongue cancers: pooled analysis from the INHANCE consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23: 160–171.
24. Kruk-Zagajewska A, Wierzbička M. Rak języka i dna jamy ustnej — rozpoznawanie i postępy w leczeniu. *Wsp. Onk.* 2003; 7: 264–274.
25. Silva SAR, Andrade CMA, Jorge J, Almeida OP, Vargas PA, Lopes MA. Tongue squamous cell carcinoma in young nonsmoking and nondrinking patients: 3 clinical cases of orthodontic interest. *AJO-DO.* 2014; 145: 103–107.
26. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2014; 26: 123–141.
27. Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis.* 2007; 13: 126–133.
28. Brenner H. Long-term survival rates of cancer patients achieved by the end of the 20th century: a period analysis. *Lancet.* 2002; 360: 1131–1135.
29. O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, Rhys-Evans P. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol.* 2003; 39: 386–390.
30. Jankowska M, Starzyńska A. Nowotwory złośliwe jamy ustnej — charakterystyka, diagnostyka, postępowanie, *Forum Medycyny Rodzinnej.* 2016; 10: 254–262.
31. Szymendera JJ, Gózdź SS. Rola krążących markerów nowotworowych w diagnostyce i monitorowaniu leczenia chorych na nowotwory. *Nowotwory.* 1995; 45: 369–383.
32. Steffen J. Interleukiny i ich receptory w nowotworach u ludzi: synteza, uwalnianie, występowanie w surowicy krwi. *Diagn Lab.* 1994; 30: 221–240.
33. Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past. *Nat Rev Cancer.* 2001; 1: 151–157.
34. Duffy MJ, Crown J. A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help. *Clin Chem.* 2008; 54: 1770–1779.
35. Łasiński W. Anatomia głowy dla stomatologów. ISBN 83-200-1686-X.

36. Ansarin M, Bruschini R, Navach V, Giugliano G, Calabrese L, Chiesa F, Medina J, Kowalski L, Jatin P Shah. Classification of GLOSSECTOMIES: Proposal for tongue cancer resections. *Head Neck*. 2019; 41: 821–827.
37. Péri G. Technique of glossectomy *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 1978; 79: 335–337.
38. Neligan PC, Gullan PJ, Gilbert RW. Functional reconstruction of the oral cavity. *World J Surg*. 2003; 27: 856–862.
39. Huang T, Liu H, Zhang P, Zhao Y. Effect of induction chemotherapy on the quality-of-life in patients with advanced stage tongue cancer by a prospective study. *J Int Med Res*. 2018; 46: 1461–1466.
40. <https://headandneckcancerguide.org/adults/cancer-diagnosis-treatments/chemotherapy> (data wejścia 8.4.2020).
41. Stewart JS, Cohen EE, Licitra L, Van Herpen CM, Khorprasert C, Soulieres D, Vodvarka P, Rischin D, Garin AM, Hirsch FR, Varella-Garcia M, Ghiorghiu S, Hargreaves L, Armour A, Speake G, Swaisland A, Vokes EE. Phase III study of gefitinib compared with intravenous methotrexate for recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2009: 1864–1871.
42. Hitt R, Grau JJ, López-Pousa A, Berrocal A, García-Girón C, Irigoyen A, Sastre J, Martínez-Trufero J, Brandariz Castelo JA, Verger E, Cruz-Hernández JJ; Spanish Head and Neck Cancer Cooperative Group (TTCC). A randomized phase III trial comparing induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy versus chemoradiotherapy alone as treatment of unresectable head and neck cancer. *Ann Oncol*. 2014; 25: 216–225.
43. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995; 19: 183–232.
44. Baselga J, Mendelsohn J. Status of Epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in the Biology and Treatment of Cancer. *JCO*. 2003; 21: 2787–2799.
45. Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, Christianson TJ, Spain K. The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities *IJROBP*. 1994; 29: 243–247.
46. Rajaram P, Chandra P, Ticku S, Pallavi BK, Rudresh KB, Mansabdar P. Epidermal growth factor receptor: Role in human cancer. *Indian J Dent Res*. 2017; 28: 687–694.
47. Makki N, Thiel KW, Miller FJ Jr. The epidermal growth factor receptor and its ligands in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci*. 2013; 14: 20597–20613.
48. Wojtukiewicz M, Rybałtowski M, Sierko E. Podstawy biologiczne terapii ukierunkowanej na receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR). *NOWOTWORY. JCO* . 2008; 58: 260–271.
49. Song H, Huang L, Zhang M, Wang X, Song S, Yang L. Transphosphorylation of EGFR at Y845 plays an important role in its autophosphorylation and kinase activity. *Oncol Rep*. 2014; 31: 2393–2398.
50. Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*. 2006; 125: 1137–1149.

51. Rawluk J, Waller CF. Gefitinib. *Recent Results Cancer Res.* 2018; 211: 235–246.
52. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972; 26: 239–257.
53. Guo Y, Tan J, Miao Y, Sun Z, Zhang Q. Effects of Microvesicles on Cell Apoptosis under Hypoxia. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 5972152.
54. Nicholson DW. ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nat Biotechnol.* 1996; 14: 297–301.
55. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 2019; 39: BSR20180992.
56. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 1;5:a008656.
57. Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997; 88: 323–331.
58. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol.* 2013; 87: 1157–1180.
59. Nikkhoi SK, Heydarzadeh H, Ranjbar S, Salimi F, Aghaeifard M, Alavian SM, Reshadmanesh A. The Evaluation and Comparison of Transcriptionally Targeted Noxa and Puma Killer Genes to Initiate Apoptosis Under Cancer-Specific Promoter CXCR1 in Hepatocarcinoma Gene Therapy. *Hepat Mon.* 2016; 16: e38828.
60. Elena-Real CA, Díaz-Quintana A, González-Arzola K, Velázquez-Campoy A, Orzáez M, López-Rivas A, Gil-Caballero S, Á De la Rosa M, Díaz-Moreno I. Cytochrome c speeds up caspase cascade activation by blocking 14–3–3ε-dependent Apaf-1 inhibition. *Cell Death Dis.* 2018; 9: 365.
61. <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/apoptoza> (data wejścia 27.04.2020).
62. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006; 25: 4798–4811.
63. Paduch R, Klatka M, Klatka J. Rodzaje śmierci komórki. *Pom J Life Sci.* 2015; 61: 411–418.
64. Kopeć A, Piątkowska E, Leszczyńska T. Prozdrowotne właściwości resweratrolu. *ŻNTJ* 2011; 5: 5–15.
65. Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences.* 2000; 66: 663–673.
66. Zhang Q. Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4: 1465–1474.
67. Kim SE, Shin SH, Lee JY, Kim CH, Chung IK, Kang HM, Kim IR. Resveratrol Induces Mitochondrial Apoptosis and Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Nutr Cancer.* 2017; 70: 125–135.
68. Lin FY, Hsieh YH, Yang SF, Chen CT, Tang CH, Chou MY, Chen MK. Resveratrol suppresses TPA-induced matrix metalloproteinase-9 expression through the inhibition of MAPK pathways in oral cancer cells. *JOPM.* 2018; 44: 699–706.

69. Fulda S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug Discov Today*. 2010; 15: 757–765.
70. Kang SY, Lee JK, Choi O, Young Kim C, Jang JH, Hwang BY, Hong YS. Biosynthesis of methylated resveratrol analogs through the construction of an artificial biosynthetic pathway in *E.coli*, *BMC Biotechnology*. 2014; 14: 67.
71. Li H, Wu WK, Li ZJ, Chan KM, Wong CC, Ye CG, Yu L, Sung JJ, Cho CH, Wang M. 2,3',4,4',5'-Pentamethoxy-trans-stilbene, a resveratrol derivative, inhibits colitis-associated colorectal carcinogenesis in mice. *Br J Pharmacol*. 2010; 160: 1352–1361.
72. Borys S, Khozmi R, Kranc W, Bryja A, Jeseta M, Kempisty B. Resveratrol and Its Analogues — Is It a New Strategy of Anticancer Therapy? *Advances in Cell Biology*. 2009; 5: 32–42.
73. Nowicki A, Skupin-Mrugalska P, Jozkowiak M, Wierzchowski M, Rucinski M, Ramlau P, Krajka-Kuzniak V, Jodynis-Liebert J, Piotrowska-Kempisty H. The Effect of 3'-Hydroxy-3,4,5,4'-Tetramethoxy -stilbene, the Metabolite of the Resveratrol Analogue DMU-212, on the Motility and Proliferation of Ovarian Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2020; 21: 1100.
74. Piotrowska-Kempisty H, Ruciński M, Borys S, Kucińska M, Kaczmarek M, Zawierucha P, Jodynis-Liebert J. 3'-hydroxy-3, 4, 5, 4'-tetramethoxystilbene, the metabolite of resveratrol analogue DMU-212, inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in a mice xenograft model. *Sci Rep*. 2016; 6: 1–13.
75. Piotrowska-Kempisty H, Klupczyńska A, Trzybulska D, Kulcenty K, Sulej-Suchomska AM, Kucińska M, Mikstacka R, Wierzchowski M, Murias M, Baer-Dubowska W, Kokot Z, Jodynis-Liebert J. Role of CYP1A1 in the biological activity of methylated resveratrol analogue, 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) in ovarian cancer A-2780 and non-cancerous HOSE cells. *Toxicol Lett*. 2017; 267: 59–66.
76. Chomczyński P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162: 156–159.
77. Helal H. S, Qi C, Li D, Zhao Y, Yao C. The effects of combination of gefitinib and cisplatin on tongue squamous cell carcinoma cell lines. *J Can Res Ther* 2015; 11: 37.
78. Zimmermann M, Zouhair A, Azria D, Ozsahin M. The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. *Radiat Oncol*. 2006; 1: 11.
79. Tsakiridis T, Cutz J-C, Singh G, Hirte H, Okawara G, Corbett T, Wright JR. Association of Phosphorylated Epidermal Growth Factor Receptor with Survival in Patients with Locally Advanced Non-small Cell Lung Cancer Treated with Radiotherapy. *JTO* 2008; 3: 716–722.
80. Makin G, Hickman JA. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res*. 2000; 301: 143–152.
81. Polak J, Mak P, Bzowska M. Badania nad cyklem komórkowym oraz apoptozą w wybranych modelach komórek nowotworowych traktowanych związkiem RG7388.
82. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006; 25: 4798–4811.

83. Bruzzese F, Leone A, Rocco M, Carbone C, Piro G, Caraglia M, Budillon A. HDAC inhibitor vorinostat enhances the antitumor effect of gefitinib in squamous cell carcinoma of head and neck by modulating ErbB receptor expression and reverting EMT. *JCP*. 2011; 226: 2378–2390.
84. Murias M, Handler N, Erker T, Pleban K, Ecker G, Saiko P, Jäger W. Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure–activity relationship. *Bioorg Med Chem*. 2004; 12: 5571–5578.
85. Schneider Y, Fischer B, Coelhob D, Roussia S, Gossea F, Bischoff P, Raula F. (Z)-3,5,40Tri-O-methyl-resveratrol, induces apoptosis in human lymphoblastoid cell independently of their p53 status. *Cancer Lett*. 2004; 211: 155–161.
86. Ma Z, Molavi O, Haddadi A, Lai R, Gossage RA, Lavasanifar A. Resveratrol analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (3,4,4',5-TMS) mediates anti-tumor effects via mechanism different from that of resveratrol. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008; 63: 27–35.
87. Gossau A, Chen M, Ho CT, Chen KY. A methoxy derivative of resveratrol analogue selectively induced activation of the mitochondrial apoptotic pathway in transformed fibroblasts. *British J Cancer*. 2005; 92: 513–521.
88. Yang YT, Weng ChJ, Ho ChT, Yen GCh. Resveratrol analog-3,5,40-trimethoxy- trans-stilbene inhibits invasion of human lung adenocarcinoma cells by suppressing the MAPK pathway and decreasing matrix metalloproteinase-2 expression. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53: 407–416.
89. Schneider Y, Fischer B, Coelhob D, Roussia S, Gossea F, Bischoff P, Raula F. (Z)-3,5,40Tri-O-methyl-resveratrol, induces apoptosis in human lymphoblastoid cell independently of their p53 status. *Cancer Lett*. 2004; 211: 155–161.
90. Pan MH, Gao JH, Lai ChS, Wang YJ, Chen WM, Lo ChY, Wang M, Dushenkov S, Ho ChT. Antitumor activity of 3,5,40-trimethoxystilbene in COLO205 cells and xenografts in SCID mice. *Mol Carcinog*. 2008; 47: 184–196.
91. Piotrowska H, Kujawska M, Nowicki M, Petzke E, Ignatowicz E, Krajka-Kuźniak V, Zawierucha P, Wierzbowski M, Murias M, Jodynis-Liebert J. Effect of resveratrol analogue, DMU-212, on antioxidant status and apoptosis-related genes in rat model of hepatocarcinogenesis. *Hum Exp Toxicol*. 2017; 36: 160–175.
92. Androutsopoulos VP, Ruparel KC, Papakyriakou A, Filippakis H, Tsatsakis AM, Spanidis DA. Anticancer effects of the metabolic products of the resveratrol analogue, DMU-212: structural requirements for potency. *Eur J Med*. 2011; 46: 2586–2595.
93. Zhang J, Lou X, Jin L, et al. Necrosis, and then stress induced necrosis-like cell death, but not apoptosis, should be the preferred cell death mode for chemotherapy: clearance of a few misconceptions. *Oncoscience*. 2014; 1: 407–422.
94. He C, Liu D, Lin W. Self-Assembled Core–Shell Nanoparticles for Combined Chemotherapy and Photodynamic Therapy of Resistant Head and Neck Cancers. *ACS Nano*. 2015; 9: 991–1003.

95. Sekiguchi Y, Yamada M, Noguchi T, Noomote C, Tsuchida M, Kudoh Y, Matsuzawa A. The anti-cancer drug gefitinib accelerates Fas-mediated apoptosis by enhancing caspase-8 activation in cancer cells. *JTS* . 2019; 44: 435–440.
96. Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, Li Q. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*. 2017; 8: 23996.
97. <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/apoptoza> (data wejścia 30.11.2020).
98. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001; 411: 342–348.
99. Cooper GM. Chapter 14: The Eukaryotic Cell Cycle. *The cell: a molecular approach*. 2000; Washington, D.C: ASM Press. ISBN 978–0-87893–106–4.
100. De Souza CP, Osmani SA. Mitosis, not just open or closed. *Eukaryotic Cell*. 2007; 6: 521–527.
101. Wu RS, Bonner WM. Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. 1981; *Cell* 27: 321–330.
102. Smith JA, Martin L. Do cells cycle? *PNAS* 1973; 70: 1263–1307.
103. Zhou X., Zheng M., Chen F, Zhu Y, Yong W, Lin H, Han X. Gefitinib inhibits the proliferation of pancreatic cancer cells via cell cycle arrest. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009; 292: 1122–1127.
104. Piotrowska H, Myszkowski K, Ziółkowska A, Kulcenty K, Wierzchowski M, Kaczmarek M, 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.
105. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Szambora P. Patofizjologiczne podstawy terapii ukierunkowanej na zahamowanie funkcji receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR). *Onkol Prakt Klin* 2010: 217–227.
106. Mutschler E, Geisslinger G, Heyo KK. Mutschler Farmakologia i toksykologia. Podręcznik. 2016; ISBN: 978-83-7846-037-4.
107. Zhao K, Lu Y, Chen Y, Cheng J, Zhang W. Dual Inhibition of MAPK and JAK2/STAT3 Pathways Is Critical for the Treatment of BRAF Mutant Melanoma. *Molecular Therapy*. 2020; 18: 100–108.
108. Perner F, Perner C, Ernst T, Heidel FH. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. *Cells*. 2019; 8:854.
109. Freudlsperger C, Burnett JR, Friedman JA, Kannabiran VR, Chen Z, Van Waes C. EGFR–PI3K–AKT–mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2011; 15: 63–74.
110. Krześlak A. Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów Akt kinase: a key regulator of metabolism and progression of tumors. *Postepy Hig Med Dosw*. 2010; 64: 490–503.

111. Miller DR, Ingersoll MA, Lin MF. ErbB-2 signaling in advanced prostate cancer progression and potential therapy. *Endocr Relat Cancer*. 2019; 26: R195-R209.
112. Larsson P, Syed Khaja AS, Semenas J. The functional interlink between AR and MMP9/VEGF signaling axis is mediated through PIP5K1 β /pAKT in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2020; 146: 1686–1699.
113. Rotman T, Etkovitz N, Spiegel A, Rubinstein S, Breitbart H. Protein kinase A and protein kinase C(α)/PPP1CC2 play opposing roles in the regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activation in bovine sperm. *Reproduction*. 2010; 140: 43–56.
114. Koti M, Gooding RJ, Nuin P. Identification of the IGF1/PI3K/NF κ B/ERK gene signalling networks associated with chemotherapy resistance and treatment response in high-grade serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2013; 13: 549.
115. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. STKE*. 2006; 357: re13.
116. Liu B, Wang Z, Cheng S, Du L, Yin Y, Yang Z, Zhou J. miR-379 inhibits cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition by targeting CHUK through the NF- κ B pathway in non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep*. 2019; 1418–1428.

10. Spis tabel i rycin

10.1. Tabela

Tabela 1.	Wartości IC_{50} DMU-214, gefitynibu oraz mieszaniny gefitynibu i DMU-214 w liniach komórkowych SCC-25 i CAL-27	44
-----------	---	----

10.2. Ryciny

Rycina 1.	Częstość zachorowań na nowotwory na świecie [1]	8
Rycina 2.	Owrzodzenie na prawej bocznej części języka u 34-letniego pacjenta z rozpoznaniem płaskonabłonkowego raka języka [25]	13
Rycina 3.	Duży pęcherz w dolnej lewej części języka u 29-letniej pacjentki z rozpoznaniem płaskonabłonkowego raka języka [25]	14
Rycina 4.	Budowa anatomiczna języka i tkanek otaczających [36]	16
Rycina 5.	Typ 1 glosektomii [36]	17
Rycina 6.	Typ 2 glosektomii [36]	18
Rycina 7.	Typ 3A i 3B glosektomii [36]	19
Rycina 8.	Typ 4A i 4B glosektomii [36]	20
Rycina 9.	Typ 5 glosektomii [36]	20
Rycina 10.	Budowa receptora EGFR [48]	23
Rycina 11.	Szlak wewnątrzkomórkowy apoptozy [61]	25
Rycina 12.	Szlak zewnątrzpochozny apoptozy [61]	26
Rycina 13.	Struktura chemiczna resweratrolu — izomery cis i trans [66]	28
Rycina 14.	Struktura chemiczna DMU-212 [73]	29
Rycina 15.	Struktura chemiczna DMU-214 [74]	30
Rycina 16.	Ludzka linia komórkowa raka języka CAL-27 (fot. Piotr Ramlau)	33
Rycina 17.	Ludzka linia komórkowa raka języka SCC-25 (fot. Piotr Ramlau)	34
Rycina 18.	Przeżywalność komórek raka języka CAL-27 po 24, 48 oraz 72 godzinach inkubacji z DMU-214 (0–1 μ M), gefitynibem (0–50 μ M) oraz mieszaniną	

DMU-214 i gefitynibu (0–51 μ M); średnia z trzech niezależnych eksperymentów $\pm$ SD	45
Rycina 19. Przeżywalność komórek raka języka SCC-25 po 24, 48 oraz 72 godzinach inkubacji z DMU-214 (0–10 μ M), gefitynibem (0–50 μ M) oraz mieszaniną DMU-214 i gefitynibu (0–60 μ M); średnia z trzech niezależnych eksperymentów $\pm$ SD	46
Rycina 20. Porównanie poziomu ekspresji białek EGFR i EGFRP w liniach komórkowych SCC-25 oraz CAL-27	47
Rycina 21. Indukcja procesu apoptozy i nekrozy przez DMU-214, gefitynib oraz mieszaninę DMU-214 i gefitynibu w liniach komórkowych (A) CAL-27 i (B) SCC-25. Wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych doświadczeń ($\pm$ SD). ***P < 0,001; **P < 0,01 *P < 0,05	48
Rycina 22. Aktywność kaspazy -3/-7, -8 oraz -9 pod wpływem DMU-214, gefitynibu i mieszaniny DMU-214 oraz gefitynibu	49
Rycina 23. Ilość komórek raka języka CAL-27 oraz SCC-25 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego uzyskana po ekspozycji na związek DMU-214, gefitynib oraz na mieszaninę obu substancji. *P < 0,05	50
Rycina 24. Wpływ DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny na ekspresję białek EGFR oraz EGFRP w linii komórkowej SCC-25	52
Rycina 25. Wpływ DMU-214, gefitynibu oraz ich mieszaniny na ekspresję białek EGFR oraz EGFRP w linii komórkowej CAL-27	52
Rycina 26. Wpływ DMU-214 o stężeniu 5 μ M na ekspresję genów ścieżki sygnalizacyjnej EGFR w linii komórkowej raka języka CAL-27 (A) oraz SCC-25 (B). Wyniki stanowią średnią z trzech eksperymentów ($\pm$ SD). ***P < 0,001; **P < 0,01 *P < 0,05	54
Rycina 27. Wpływ gefitynibu o stężeniu 15 μ M na ekspresję genów wchodzących w skład ścieżki sygnalizacyjnej EGFR w linii komórkowej raka języka CAL-27 (A) oraz SCC-25 (B). Wyniki stanowią średnią z trzech eksperymentów ($\pm$ SD). ***P < 0,001 **P < 0,01 *P < 0,05	55
Rycina 28. Wpływ mieszaniny DMU-214 (5 μ M) oraz gefitynibu (15 μ M) na ekspresję genów ścieżki sygnalizacyjnej EGFR w linii komórkowej raka języka CAL-27 (A) oraz SCC-25 (B). Wyniki stanowią średnią z trzech eksperymentów ($\pm$ SD). ***P < 0,001 **P < 0,01 *P < 0,05	56

Poznań, 27.08.2018 r.

Piotr Ramlau

.....
imię i nazwisko

Katedra i Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej

Katedra i Zakład Toksykologii

.....
miejsce realizowania pracy naukowej

Sz. Pan

Prof. dr hab. Paweł Chęciński

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

przy Uniwersytecie Medycznym

w Poznaniu

Szanowny Panie Profesorze,

Przygotowuję się do realizacji pracy doktorskiej, pt.: „Ocena działania przeciwnowotworowego metylowego analogu resweratrolu 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-214) w modelu raka języka”, która będzie przeprowadzana w oparciu o badania z wykorzystaniem zakupionych ludzkich linii komórkowych raka języka SCC-25 oraz SCC-4.

Proszę o potwierdzenie, że prowadzone przeze mnie badanie nie jest eksperymentem medycznym i nie wymaga opinii Komisji Bioetycznej.

**BADANIE NIE NOSI CECH
EKSPERYMENTU
MEDYCZNEGO**

2018 -09- 04

**PRZEWODNICZĄCY
KOMISJI BIOETYCZNEJ**
[Signature]
prof. dr hab. med. Paweł Chęciński

[Signature]

podpis studenta

dr hab. n. farm. Hanna Piotrowska-Kempisty

[Signature]
Katedra i Zakład Toksykologii UMP

podpis promotora

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Mar 16, 2021

This Agreement between Mr. Piotr Ramlau ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5030840405774
License date	Mar 16, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics
Licensed Content Title	Tongue squamous cell carcinoma in young nonsmoking and nondrinking patients: 3 clinical cases of orthodontic interest
Licensed Content Author	Alan Roger Santos-Silva,Marco Aurelio Carvalho Andrade,Jacks Jorge,Oslei Paes Almeida,Pablo Agustin Vargas,Marcio Ajudarte Lopes
Licensed Content Date	Jan 1, 2014
Licensed Content Volume	145
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	5
Start Page	103
End Page	107

Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Ocena działania przeciwnowotworowego metylowego analogu resweratrolu 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-214) w modelu raka języka
Institution name	Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Expected presentation date	Jun 2021
Portions	Figures 4 and 6 on page 105
Requestor Location	Mr. Piotr Ramlau Kutrzeby 12 Poznań, 61-719 Poland Attn: Mr. Piotr Ramlau
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD