

Hipermetylacja promotora
genu *CDH1* w DNA komórek
jako biomarker progresji
raka jamy ustnej

Klinika Chirurgii Szcękowo-Twarzowej Uniwersytecki Szpital Kliniczny
im. F. Chopina w Rzeszowie

Robert Brodowski

Hipermetylacja promotora genu *CDH1* w DNA komórek jako biomarker progresji raka jamy ustnej

Wydanie II poprawione i uzupełnione



WYDAWNICTWO
UNIwersytetu Rzeszowskiego
RZESZÓW 2023

Recenzowali
prof. dr hab. ADAM WŁODARKIEWCZ
dr hab. n. med. JERZY REYMOND

Redakcja i korekta tekstu
JANINA DUBIEL

Korekta tekstu w języku angielskim
JOANNA MAZUR-OKALOWE

Opracowanie techniczne, łamanie
i projekt okładki
MICHAŁ KOCZĄB

Korekta techniczna
EWA KUC

© Copyright by
Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego
Rzeszów 2023

ISBN 978-83-8277-100-8

DOI: 10.15584/978-83-8277-100-8

2030

WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU RZESZOWSKIEGO
35-959 Rzeszów, ul. prof. S. Pigonia 6, tel. 17 872 13 69, tel./faks 17 872 14 26
e-mail: wydaw@ur.edu.pl; <https://wydawnictwo.ur.edu.pl>
wydanie II, format B5, ark. wyd. 11,00 ark. druk. 8,25, zlec. red. 43/2023

Spis treści

Wykaz skrótów	7
Wstęp	9
Przegląd piśmiennictwa	13
1. Czynniki ryzyka raka jamy ustnej	13
2. Obraz kliniczny raka jamy ustnej	16
3. Budowa molekularna DNA	19
4. Podstawowe procesy epigenetyczne w onkogenezie raka jamy ustnej	21
5. Gen <i>CDH1</i> i białko E-kadheryna	26
Cel pracy	29
Materiał i wyniki badań klinicznych	30
Badania laboratoryjne	43
1. Materiał genetyczny	43
2. Preparatyka laboratoryjna próbek DNA i wyniki	44
Wyniki badań i analiza statystyczna zgromadzonych danych	50
1. Metody badań	50
2. Wyniki analizy statystyki opisowej	53
Omówienie wyników i dyskusja	71
Wnioski	81
Streszczenie	83
Summary	87
Piśmiennictwo	91
Aneks do analiz statystycznych	103
Spis rycin	126
Spis wykresów	127
Spis tabel	128

Wykaz skrótów

5mC	– 5-metylocytozyna
AJCC	– American Joint Committee of Cancer
BAC	– Biopsja Aspiracyjna Cienkoigłowa
CDH1	– gen kodujący białko E-kadherynę
CpG	– wyspa CpG; dinukleotyd zbudowany z nukleotydu cytozynowego ulokowanego 5' w stosunku do nukleotydu guaninowego
DAPK1	– Death-associated protein kinase 1
DNMT	– DNA methyltransferase; enzym metylotransferaza DNA
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy
E6, E7	– białka E6 i E7 kodowane przez wirusowe geny HPV, pełnią rolę onkogenów i są odpowiedzialne za transformację nowotworową komórek nabłonka
E2F	– rodzina czynników transkrypcyjnych, biorących udział w regulacji cyklu komórkowego
EGFR	– receptor naskórkowego czynnika wzrostu (Epidermal Growth Factor Receptor)
ESR1, ESR2	– geny kodujące receptor estrogenowy 1 i 2
GSTP1	– S-transferaza glutationowa P1
hMLH1	– ludzki gen, kodujący białko MLH1. Produkt białkowy genu bierze udział w mechanizmie naprawy DNA określanym jako naprawa niesparowanych zasad
HPV	– Human Papilloma Virus – wirus brodawczaka ludzkiego
ICD-10	– International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IL-6	– interleukina 6
MGMT	– O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MRI	– rezonans magnetyczny (magnetic resonance imaging)
MSP	– polimeraza specyficzna wobec metylacji w reakcji łańcuchowej
OSCC	– Oral Squamous Cell Carcinoma – rak kolczystokomórkowy jamy ustnej
p16 INK4a	– białko p16INK4a, inhibitor kinaz cyklozależnych

- p53** – białko p53 – czynnik transkrypcyjny o właściwościach supresora nowotworowego
- PCR** – Polymerase Chain Reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy
- PET** – Pozytronowa Emisyjna Tomografia
- hMLHF1*** – gen kodujący białko RAS
- RB** – białko retinoblastoma
- RNA** – kwas rybonukleinowy
- SAM** – S-adenozyl-L-metionina
- UICC** – Union Internationale Contre le Cancer
- USG** – ultrasonografia

Wstęp

Nowotwory złośliwe rejonu głowy i szyi są szóstymi, najczęściej występującymi na świecie nowotworami w populacji ludzi, z liczbą 650 000 rozpoznawanych każdego roku nowych zachorowań i liczbą 350 000 zgonów rocznie [5, 93]. W tej grupie nowotworów najczęściej występuje rak kółczystokomórkowy jamy ustnej (Oral Squamous Cell Carcinoma – OSCC), który rozpoznawany jest w 90% złośliwych nowotworów jamy ustnej i 38% wszystkich nowotworów głowy i szyi [93]. W 2018 roku zarejestrowano na świecie 355 000 nowych pacjentów z OSCC oraz odnotowano 177 000 zgonów z powodu OSCC. Inne typy raków występujących w jamie ustnej to: rak gruczołowo-płaskonabłonkowy, rak płaskonabłonkowy rzekomogruczołowy, rak wrzecionowatokomórkowy, rak drobnokomórkowy oraz rak limfatyczny-komórkowy [89, 146].

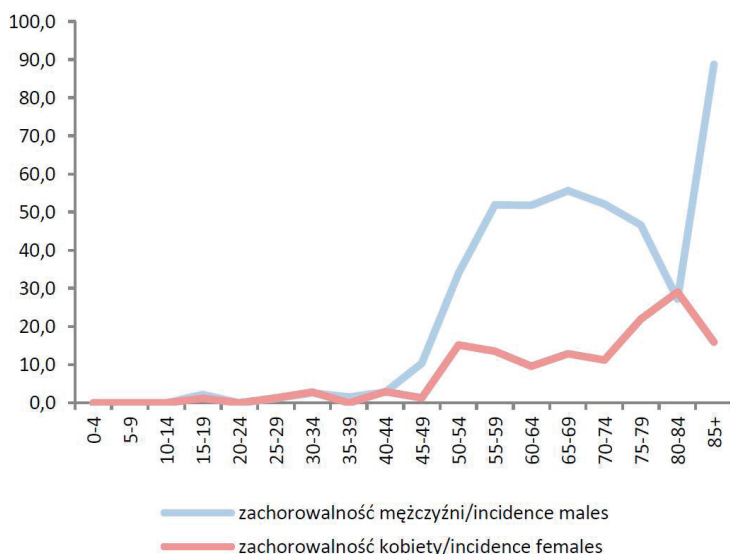
Jama ustna jest początkowym, wspólnym odcinkiem układu pokarmowego i układu oddechowego, cechującym się wielorakością pełnionych funkcji, takich jak pobieranie i żucie pokarmów, z ich wstępnym procesem trawienia, funkcją mowy oraz oddychaniem. Jama ustna cechuje się bogatym unerwieniem oraz unaczynieniem krwionośnym i chłonnym, z krzyżującymi się drogami odpływu chłonki z jej obszaru, co znajduje odzwierciedlenie w dynamice procesów nowotworowych toczących się w tej okolicy. Wyścielona jest błoną śluzową, której najbardziej zewnętrzną warstwę stanowi nabłonek wielowarstwowy płaski, w zależności od okolicy jamy ustnej rogowaciejący lub nierogowaciejący, z rozsianymi w niej licznie gruczołami ślinowymi, a każda z komórek może być źródłem rozwoju raka jamy ustnej.

Z uwagi na dużą liczbę nowych rozpoznań i postępujący wzrost zachorowań, zwłaszcza w powiązaniu z wysoką śmiertelnością i niskim odsetkiem przeżyć 5-letnich, rak jamy ustnej stanowi poważny problem medyczny, posiadający znaczący wpływ na wiele aspektów zdrowia publicznego, jak również następstwa społeczno-ekonomiczne. Rosnąca liczba nowych zachorowań i zgonów, spowodowanych rakiem jamy ustnej, wiąże się ściśle ze stałym wzrostem liczebności populacji ludzi na Ziemi oraz ze zjawiskiem starzenia się społeczeństw, zwłaszcza wysoko rozwiniętych, co jest następstwem wydłużenia czasu życia kobiet i mężczyzn.

Według danych epidemiologicznych liczba zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce w ciągu ostatnich trzech dekad wzrosła ponad dwukrotnie, osiągając ponad 140,5 tysiąca zachorowań rocznie. Rak jamy ustnej jest rozpoznawany trzykrotnie częściej u mężczyzn niż u kobiet, a ryzyko zachorowania wzrasta po 50. roku życia.

Najnowsze dane epidemiologiczne przedstawione przez Krajowy Rejestr Nowotworów dotyczą roku 2019, w którym odnotowano 2168 przypadków zachorowania na raka jamy ustnej, w tym 1726 mężczyzn i 442 kobiety oraz zarejestrowano 1428 zgony spowodowane rakiem jamy ustnej, w tym 1165 mężczyzn i 263 kobiety. Według danych Krajowego Rejestru Nowotworów, w ciągu dekady 2010–2020, w województwie podkarpackim na nowotwory złośliwe jamy ustnej zachorowało ogółem 1044 osób, w tym 819 mężczyzn i 225 kobiet. W okresie tym z powodu nowotworów jamy ustnej zmarło na Podkarpaciu ogółem 753 chorych, wśród których było 636 mężczyzn i 117 kobiet [57].

Rak kolczystokomórkowy jamy ustnej najczęściej rozpoznawany jest u chorych po 50 r.ż, z najwyższą zachorowalnością obserwowaną w 6 i 7 dekadzie życia. Stosunek zachorowań kobiet i mężczyzn wynosi około 1 : 4, natomiast wg danych epidemiologicznych dla województwa podkarpackiego stosunek ten wynosi 1:5 [57, 90].



Ryc. 1. Zachorowalność kobiet i mężczyzn na raka jamy ustnej w grupach wiekowych w województwie podkarpackim

Źródło: piśmiennictwo [57].

Pomimo znacznego postępu w działaniach prewencyjnych oraz znaczącego rozwoju narzędzi i technik terapeutycznych raka jamy ustnej, odsetek 5-letnich przeżyć chorych z OSCC pozostaje na niezmiennym poziomie od ponad 20 lat. Złe wyniki i prognozy dla chorych związane są ściśle z późnym rozpoznaniem raka i rozpoczęciem procesu terapeutycznego, często w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej, z naciekaniem przez nowotwór tkanek otaczających, przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych i rzadziej z przerzutami odległymi do innych narządów [75, 146].

Leczenie chorób nowotworowych jamy ustnej jest zadaniem trudnym i bardzo kosztownym dla społeczeństwa. W proces leczenia raka jamy ustnej zaangażowany jest zespół specjalistów z różnych dziedzin medycyny, tj. chirurg szczękowo-twarzowy, onkolog radioterapeuta, onkolog chemioterapeuta, patomorfolog, chirurg specjalizujący się w zabiegach rekonstrukcji tkankowych, jak również laryngolog, specjalista w zakresie anestezjologii i intensywnej terapii, gastroenterolog, psychoonkolog, czy wreszcie lekarz specjalizujący się w protetyce stomatologicznej. Proces kompleksowego leczenia raka jamy ustnej podzielony jest na następujące po sobie fazy. Pierwszą z nich jest faza diagnostyczna, mająca na celu rozpoznanie histologiczne nowotworu i określenie stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, na podstawie przeprowadzonych badań histopatologicznych i radiologicznych. Drugą jest faza planowania leczenia operacyjnego, z uwzględnieniem trójwymiarowych, przestrzennych potrzeb rekonstrukcyjnych w obrębie utraconych podczas zabiegu tkanek, często z wykonaniem wirtualnych modeli 3D, a także przygotowanie chorego po operacji jamy ustnej do prawidłowego odżywiania, poprzez wytworzenie np. przeżskórnej gastrostomii. Kolejnym etapem leczenia raka jamy ustnej jest zabieg operacyjny resekcji guza z marginesem tkanek zdrowych, który to margines zawsze weryfikowany jest histopatologicznym badaniem śródoperacyjnym (tzw. INTRA), a następnie operacja rekonstrukcyjna wyciętych tkanek jamy ustnej. Po wygojeniu ran chirurgicznych najczęściej chory poddawany jest uzupełniającej radioterapii, po zakończeniu której pozostaje w ścisłej obserwacji ze zmniejszającą się z czasem częstotliwością badań kontrolnych.

Następstwa leczenia raka jamy ustnej stanowią również istotny problem społeczno-ekonomiczny. Wielomiesięczna terapia wiąże się z długotrwałą absencją chorobową pacjenta, najczęściej skutkując przejściem chorego na stałą rentę. Deformacje twarzy, które często występują po leczeniu chirurgicznym i radioterapii, przyczyniają się niejednokrotnie do wyalienowania chorego ze społeczeństwa i z życia rodzinnego. Nie do pominięcia jest również fakt znacznego pogorszenia jakości życia chorych, co związane jest z dużymi trudnościami z odżywianiem, zaburzeniami mowy i suchością jamy ustnej [90, 173].

Odległe wyniki leczenia raka jamy ustnej są nadal niezadowalające i w badaniach epidemiologicznych nie ulegają poprawie od wielu lat, dlatego też tak ważne są badania ukierunkowane na poszukiwania nowych biomarkerów, które pozwoliłyby na precyzyjne monitorowanie przebiegu procesu nowotworowego i niezwłoczne podjęcie terapii, w przypadku stwierdzenia wzrostu miana markera nowotworowego u chorego, u którego nie wystąpiły jeszcze objawy kliniczne.

Jedną z dróg badawczych, mających na celu poszukiwanie biomarkerów nowotworowych, są badania z zakresu epigenetyki, której odkrycia mogą być przełomowe, zarówno w zrozumieniu i poznaniu mechanizmów onkogenezy, jak również w konstruowaniu testów pozwalających wykryć u chorego raka. W oparciu o podstawy epigenetyki, zakładające odwracalność procesów epigenetycznych, realne staje się otwarcie na nowe możliwości konstruowania leków onkologicznych, widoczne we współczesnej chemioterapii onkologicznej. Przykładem może być lek Cetuksymab, chimeryczne przeciwciało monoklonalne, blokujące zewnątrzkomórkowe domeny receptorów naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), którego nadekspresja na powierzchni komórek rakowych prowadzi do złej odpowiedzi na radioterapię i chemioterapię oraz pogarsza rokowanie [3, 14, 127, 139].

Głównymi celami terapeutycznymi, opartymi na mechanizmach epigenetycznych zmian w DNA komórki, jest blokowanie w komórkach raka metylotransferaz DNA [9, 13, 14] i deacetylazy białek histonowych (HDAC), czego skutkiem byłoby odblokowanie i następnie odwrócenie epigenetycznego wyciszenia genów supresorowych [31, 46].

Poszukiwanie zmian epigenetycznych w komórkach błony śluzowej jamy ustnej chorego, zarówno w guzie nowotworowym, jak i w tkankach potencjalnie „zdrowych”, może być w przyszłości markerem ostrzegającym o toczącej się w komórkach złośliwej transformacji, które stałyby się tzw. „molekularnym odciskiem palca”, pomagającym we wczesnej diagnostyce złośliwego procesu nowotworowego [18, 49, 53].

Wydaje się, iż pozostaje tylko kwestią czasu opracowanie epigenetycznych strategii diagnostycznych i terapeutycznych, które doprowadzą do obniżenia zachorowalności i umieralności spowodowanej rakiem jamy ustnej i innymi nowotworami złośliwymi [60, 97].

Przegląd piśmiennictwa

1. Czynniki ryzyka raka jamy ustnej

Kancerogeneza raka jamy ustnej jest złożonym, wieloetapowym procesem nabywania przez komórki cech nowotworowych, modulowanym przez czynniki wewnętrzne i czynniki środowiskowe, odzwierciedlającym ewolucję zaburzeń funkcji genów. Wiele z nich to zmiany genetyczne, wynikające z mutacji w genach supresorowych, onkogenach oraz aberracjach chromosomalnych. Nie mniej istotne są również zmiany na poziomie epigenetycznym, które są odpowiedzialne za zmianę ekspresji genów [53, 80, 92].

W etiopatogenezie raka jamy ustnej najlepiej poznanym i udokumentowanym czynnikiem ryzyka jest palenie tytoniu, odpowiedzialne za zachorowania również na nowotwory złośliwe innych narządów, takich jak płuca, żołądek czy pęcherz moczowy [59, 62]. Podczas palenia tytoniu w dymie powstają kancerogeny: N-nitrozoaminy, węglowodory aromatyczne i wolne rodniki odpowiedzialne za stres oksydacyjny. Zaburzona zostaje równowaga oksydacyjna jamy ustnej poprzez dezaktywację enzymów antyoksydacyjnych, tj. transferaza, reduktaza czy peroksydaza glutationowa i dysmutaza podtlenkowa [1].

Ryzyko zachorowania na OSCC zwiększa się wprost proporcjonalnie do liczby wypalanych codziennie papierosów i czasu trwania nałogu, co skutkuje 20-krotnym wzrostem ryzyka rozwoju raka u osób palących tytoń nałogowo [159].

Potencjał onkogenny mają również czynniki fizyczne generowane przez gorący dym tytoniowy, a powstawanie w sposób przewlekły mikrooparzeń błony śluzowej jamy ustnej doprowadza do chronicznego przekrwienia oraz zaburzeń rogowacenia i złuszczenia powierzchniowych, zewnętrznych warstw błony śluzowej, co może prowadzić do rozwoju leukoplakii, na podłożu której w 50% przypadków rozwija się proces nowotworowy [8, 62].

Drugim czynnikiem o udowodnionym potencjale kancerogennym jest wysokoprocentowy alkohol, a dokładnie metabolit powstający po reakcji z enzymem dehydrogenazą alkoholową – aldehyd octowy. Aldehyd powoduje

mutacje punktowe, zaburza mechanizmy odpowiedzialne za naprawę uszkodzonego DNA, indukuje metaplastję nabłonka wyścielającego jamę ustną oraz spowalnia cykl komórkowy i stymuluje apoptozę komórki. Aldehyd octowy ma zdolność wiązania się z DNA, co skutkuje błędami replikacyjnymi i powstawaniem mutacji. Ponadto aldehyd octowy indukuje cytochrom P 450 2E1 do aktywowania prokancerogenów w ich aktywną formę [17, 59, 92].

Ryzyko rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej jest wprost proporcjonalne do ilości wypijanego alkoholu i wzrasta 5-krotnie u osób wypijających w sposób nałogowy ponad 50 g czystego alkoholu dziennie. Zaobserwowano kumulacyjne i synergistyczne działanie równoczesnego palenia tytoniu i nałogowego picia alkoholu, co skutkuje 100-krotnym wzrostem ryzyka rozwoju raka jamy ustnej w tej grupie pacjentów [8, 90, 99, 128].

Badania epidemiologiczne prowadzone w okresie społecznej kampanii antynikotynowej w krajach rozwiniętych w ostatnich latach wykazały wzrost zachorowań na raka jamy ustnej w populacji pacjentów młodszych, w 4 i 5 dekadzie życia, którzy nigdy nie palili tytoniu [83, 113]. Stwierdzono, że ma to związek z zakażeniami wirusami HPV, HIV, HSV, EBV oraz ryzykownymi zachowaniami seksualnymi, głównie seksem oralnym. Doniesienia te potwierdzają przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych i państwach Europy badania, które wykazały trzykrotny wzrost zachorowań na raka jamy ustnej w grupie niepalących 40–50 latków [22, 63, 113].

Zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego (Human Papilloma Virus – HPV) są najczęstszymi infekcjami wirusowymi przenoszonymi drogą płciową, a ryzyko infekcji wzrasta wprost proporcjonalnie do liczby partnerów seksualnych, czasu inicjacji seksualnej i ryzykownych zachowań seksualnych. Wśród zainfekowanych HPV chorych OSCC rozwija się u statystycznie młodszych chorych, często niepalących tytoniu i nienadużywających alkoholu. W tej grupie raki jamy ustnej, powstałe w wyniku infekcji wirusowej HPV, są najczęściej niskozróżnicowane, dają wcześniej przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych, ale też cechują się wyższą promienioczułością i lepszym rokowaniem [63, 99].

Infekcja HPV zazwyczaj jest dezaktywowana przez układ immunologiczny gospodarza, nie wywołując negatywnych skutków zdrowotnych, jednak zakażenie przewlekłe, z kilkuletnią historią, powoduje rozwój procesu nowotworowego. Spośród 130 typów wirusów brodawczaka ludzkiego, za cechujące się wysokim potencjałem onkogennym uważane są typy: HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 45, HPV 56 [22].

Według danych epidemiologicznych uznaje się, że za rozwój około 50 % OSCC odpowiedzialne są wirusy HPV wysokiego ryzyka, a drogą przenoszenia infekcji jest seks oralny [63]. Od infekcji HPV do rozwoju objawowego

raka płaskonabłonkowego upływa co najmniej 10 lat. Wirusy HPV wykazują tropizm do komórek nabłonka wielowarstwowego błon śluzowych i skóry, a klinicznym obrazem zakażenia są brodawki skóry oraz brodawki błon śluzowych jamy ustnej, dróg oddechowych, narządów płciowych i odbytu [22, 175].

Wirus brodawczaka ludzkiego potrzebuje dostępu do komórek proliferujących nabłonka jamy ustnej, wykorzystuje mikroskopijne szczeliny między komórkami warstw nabłonka, by dotrzeć do warstwy podstawnej, gdzie znajdują się komórki macierzyste i progenitorowe. W zainfekowanych komórkach następuje ekspresja genów wirusowych, integracja wirusowego DNA z chromosomami gospodarza, co skutkuje zmianami w genach komórek i ostatecznych produktach tych genów. W genomie człowieka znajdują się tzw. gorące punkty, w których dochodzi do integracji z DNA wirusa [83, 99, 111].

Najważniejsze znaczenie w kancerogenezie mają produkty genów *E6* i *E7* wirusa HPV, które ukierunkowane są na białka supresorowe nowotworów w komórkach gospodarza. *E7* wiąże się z białkiem RB (retinoblastoma protein), co doprowadza do jego degradacji, przez co zapobiega sekwestracji *E2F*. Białko RB zapobiega przejściu komórki z uszkodzonym DNA przez fazę G1 i jej wejściu w fazę S, dzięki czemu uszkodzone geny nie są replikowane. Prowadzi to do ekspresji genów wrażliwych na *E2F*, w tym cyklin A i E, które odgrywają ważną rolę w progresji cyklu komórkowego. Gen *E6* tworzy kompleks z ligazą ubikwityny, który wiąże się z p53 i zapoczątkowuje jego degradację. Geny *E6* i *E7* indukują również niestabilność genomu poprzez wpływ na telomerazę, γ -tubulinę (regulator centrosomu) i białka zaangażowane w szlaki uszkodzania DNA [22, 111, 113].

Kolejnym czynnikiem ryzyka o potwierdzonym związku z rozwojem raka jamy ustnej są infekcje grzybicze, a dominującym gatunkiem grzyba wywołującego zakażenia oportunistyczne jest *Candida albicans*. Niektóre typy tego grzyba mają zdolność przemiany azotanów i azotynów w nitrozaminy, z których z kolei powstaje silny kancerogen aldehyd octowy. Pacjentów z rozpoznaną przewlekłą kandydozą jamy ustnej w dzieciństwie cechuje większe ryzyko rozwoju raka płaskonabłonkowego w młodym wieku. Ponadto oportunistyczna infekcja *Candida* spp. powoduje obniżenie pH mikrośrodowiska jamy ustnej, co może skutkować zanikiem, rozrostem i dysplazją błony śluzowej jamy ustnej. Synergistyczne działanie infekcji grzybiczej wraz z produktami spalania tytoniu i stężonym alkoholem potęgują ryzyko rozwoju raka kółczystokomórkowego jamy ustnej [92, 173].

Kolejnym czynnikiem ryzyka rozwoju choroby nowotworowej jamy ustnej są zaniedbania higieniczne, skutkujące przewlekłymi stanami zapalnymi, spowodowanymi zaburzeniem równowagi mikrobiologicznej jamy ustnej [29].

Bakterie izolowane z płytki nazębnej, *Streptococcus* spp. i *Corynebacterium* spp. mają zdolność metabolizowania alkoholu etylowego do znanego i silnie działającego kancerogenu, czyli acetaldehydu. Przewlekłe infekcje bakteryjne i stany zapalne obserwowane w chorobach przyzębia mogą przyczyniać się do inicjacji i progresji nowotworowej [29, 40].

Jednym z najważniejszych czynników rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej są uszkodzenia genomu, skutkujące tworzeniem nieprawidłowych białek, biorących udział w procesach regulacyjnych cyklu komórkowego oraz funkcji przekaźniczych cząsteczek sygnałowych, nieprawidłowy wzrost komórki i angiogenezę [2, 30, 73]. Nadekspresja onkogenów i wyciszenie genów supresorowych są podstawowymi procesami wiodącymi do zmiany fenotypu komórki prawidłowej w komórkę nowotworu. Prawidłowo działające geny supresorowe kontrolują cykl komórkowy, naprawę uszkodzonego DNA i apoptozę, czyli naturalną śmierć komórki [127]. Nieprawidłowa budowa genów supresorowych i w następstwie zaburzone ich działanie i funkcja, np. w wyniku hipermetylacji, wiodą do wyciszenia tych genów i mogą przyczynić się do rozpoczęcia procesu kancerogenezy. Nadekspresja onkogenów i ich produkty promują wzrost komórek, przedłużają ich przeżycie, co również sprzyja kancerogenezie [3, 10, 130]. Zaobserwowano również, że w nowotworach jamy ustnej, często obserwowana jest nadekspresja receptora czynnika wzrostu naskórka EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), którego fosforylacja prowadzi do aktywacji wielu szlaków związanych z proliferacją, apoptozą, inwazją i angiogenezą. Uszkodzenie funkcji receptora EGFR obserwowane jest w 80–90% nowotworów nabłonkowych, a jego nadekspresja wiąże się z gorszym rokowaniem [139].

2. Obraz kliniczny raka jamy ustnej

Istnieje wiele klasyfikacji raka jamy ustnej. Według wytycznych American Joint Committee of Cancer (AJCC) i Union Internationale Contre le Cancer (UICC) wyróżniane są: rak wargi, rak 2/3 przednich trzonu języka, rak dna jamy ustnej, rak dziąsła, rak podniebienia twardego, rak błony śluzowej policzka oraz rak trójkąta zatrzonowcowego. W międzynarodowej klasyfikacji chorób i problemów zdrowotnych ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) wyróżniono: nowotwory złośliwe warg (C00), nowotwory złośliwe języka (C02), nowotwory złośliwe dziąsła i dna jamy ustnej (C04), nowotwory podniebienia (C05) oraz nowotwory

złośliwe innych części jamy ustnej (C06), obejmujące błonę śluzową policzka, sklepienie przedsionka jamy ustnej i przestrzeń zatrzonowcową.

Klinicznie rak jamy ustnej nie jest guzem jednorodnym i cechuje się różną morfologią i wyglądem. Obraz kliniczny raka jamy ustnej pozwala wyróżnić:

- postać endofityczną, manifestującą się formą ograniczonego nacieku lub stwardnienia, z następowym pojawianiem się kraterowatego owrzodzenia, którego dno pokryte jest włóknikiem, złogami keratyny i w bardziej zaawansowanych stadiach martwiczymi tkankami nowotworu;
- postać egzofityczną, gdy nowotwór ma postać grzybiastą, o kalafiorowatej, pobrużdżonej powierzchni, która z rozwojem guza obumiera w części centralnej, tworząc owrzodzenie lub szczelinowate pęknięcia;
- postać mieszana, egzoendofityczna, która jest połączeniem obu typów rozwoju raka [90].

Budowa histologiczna raków jamy ustnej nie jest jednolita. Stopień zróżnicowania histologicznego (G) pozwala określić procentowy udział komórek wysoko dojrzałych i komórek niskozróżnicowanych w tkance guza:

GX – nie można ocenić stopnia zróżnicowania raka,

G1 – rak dobrze zróżnicowany (poniżej 25% komórek niezróżnicowanych),

G2 – rak umiarkowanie zróżnicowany (25–50% komórek niezróżnicowanych),

G3 – rak niskozróżnicowany (50–75% komórek niezróżnicowanych),

G4 – rak niezróżnicowany (ponad 75% komórek niezróżnicowanych),

co ma bezpośrednie przełożenie na dynamikę procesu nowotworowego, leczenie i rokowanie.

W 2010 roku AJCC i UICC wypracowały obowiązujący system oceny zaawansowania klinicznego cTNM i patomorfologicznego pTNM nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego. System ten określa cechę T (Tumor), opisującą liczbowo wielkość guza, cechę N (Nodus) opisującą obecność oraz zaawansowanie przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych oraz cechę M (Metastasis) opisującą występowanie przerzutów odległych w innych narządach [69, 173].

Wielkości guza (cecha T) opisuje schemat:

Tx → nie można ocenić guza pierwotnego,

To → nie stwierdza się obecności guza pierwotnego,

Tis → rakprzedinwazyjny (ca in situ),

T1 → guz do 2 cm w największym wymiarze,

- T2 → guz o wymiarach od 2 cm do 4 cm,
 T3 → guz o średnicy przekraczającej 4 cm,
 T4a → dla wargi – guz nacieka błazkę zewnętrzną trzonu żuchwy, nerw zęodołowy dolny, dno jamy ustnej, skóre brody lub nosa; dla jamy ustnej – guz nacieka kość szczęki lub żuchwy, mięśnie głębokie języka, skóre twarzy,
 T4b → guz nacieka przestrzeń żwaczową, wyrostki skrzydłowe kości klinowej, podstawę czaszki lub obejmuje tętnicę szyjną wewnętrzną.

Stopień zaawansowania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnnych (cecha N) opisuje schemat:

- Nx → nie można ocenić okolicznych węzłów chłonnnych,
 N0 → nie stwierdza się przerzutów w okolicznych węzłach chłonnnych,
 N1 → przerzut w jednym z okolicznych węzłów chłonnnych, po stronie guza < 3 cm,
 N2a → przerzut w pojedynczym węźle chłonnym po stronie guza, o średnicy > 3 cm i < 6 cm,
 N2b → liczne przerzuty w węzłach chłonnnych po stronie guza < 6 cm,
 N2c → przerzuty obustronne lub po przeciwnej stronie guza < 6 cm,
 N 3 → przerzut w węźle chłonnym o średnicy ponad 6 cm.

Ocenę występowania przerzutów w narządach odległych (cecha M) opisuje schemat:

- M0 → nie stwierdza się przerzutów odległych,
 M1 → stwierdza się przerzuty odległe.

Na podstawie oznaczonych cech TNM określa się stopień zaawansowania klinicznego raka według AJCC:

- 0° → TisN0M0
 I° → T1N0M0
 II° → T2N0M0
 III° → T3N0M0; T1N1M0; T2N1M0; T3N1M0
 IVa° → T4aN0M0; T4aN1M0; T1N2M0; T2N2M0; T3N2M0; T4aN2M0
 IVb° → każde TN3M0; T4b każde NM0
 IVc° → każde T, każde N, M1

Określenie stopnia zaawansowania klinicznego pozwala na zaplanowanie adekwatnego do stopnia zaawansowania leczenia onkologicznego [89, 90].

W procesie oceny zaawansowania klinicznego raka jamy ustnej konieczne jest badanie przedmiotowe chorego oraz wykonanie szeregu badań diagnostycznych, tj. badania ultrasonograficznego głowy i szyi (USG), badania histopatologicznego wycinka z guza lub biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej (BAC) oraz szeregu badań obrazowych – tomografii komputerowej (CT) czy rezonansu magnetycznego (MRI). Celem wykluczenia lub potwierdzenia przerzutów odległych wykonuje się także pozytronową emisyjną tomografię komputerową (PET) lub rezonans magnetyczny całego ciała [36, 171]. Wszystkie zgromadzone dane dotyczące stopnia zaawansowania raka jamy ustnej pozwalają na opracowanie strategii terapeutycznej, zawsze w zespole wielospecjalistycznym: chirurg szczękowo-twarzowy, onkolog-radioterapeuta, onkolog-chemioterapeuta, radiolog, psycholog, a często również chirurg specjalizujący się w złożonych rekonstrukcjach tkankowych [173].

Wyniki leczenia i rokowanie dotyczące chorych z rakiem jamy ustnej powiązane są ściśle z pierwotnym stopniem zaawansowania klinicznego. Wczesne stadium zaawansowania nowotworu i możliwość radykalnego leczenia chorego pozwala uzyskać 5-letnie przeżycia na poziomie przekraczającym nawet 60%. Bardziej zaawansowane klinicznie raki jamy ustnej rokują gorzej, dając 5-letnie przeżycia na poziomie 30–40%. Przypadki bardzo zaawansowane, nie pozwalające na leczenie radykalne rokują bardzo źle, z 5-letnimi przeżyciami poniżej 5% chorych [5, 89, 146].

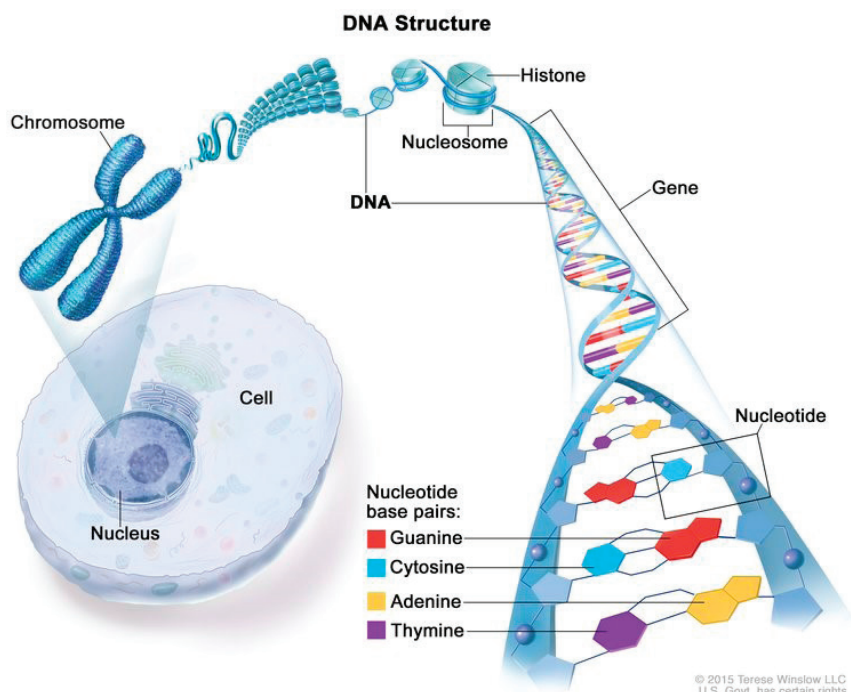
3. Budowa molekularna DNA

U podstaw rozwoju procesu nowotworowego leżą zmiany w prawidłowej strukturze DNA, które są dziedziczone w kolejnych, następujących po sobie, pokoleniach komórek.

Około 25 000 genów kodujących białka, występujących w genomie człowieka, ułożonych jest na ponad jednometrowej nici DNA utworzonej przez 3 274 571 503 par zasad azotowych, która wraz ze związanym z nią RNA i białkami tworzy chromatynę, budującą 46 chromosomów, znajdujących się w jądrze komórkowym każdej komórki człowieka.

DNA tworzy cząsteczkę w postaci podwójnej helisy zbudowanej z dwóch równolegle ułożonych łańcuchów nukleotydowych. Każdy nukleotyd zbudowany jest z cukru pięciowęglowego – deoksyrybozy, reszty fosforanowej i jed-

nej spośród zasad azotowych, dwóch purynowych: adeniny (A) i guaniny (G) oraz dwóch pirymidynowych: cytozyny (C) i tyminy (T), a ściśle określona sekwencja nukleotydów tworzy informację wykonawczą genów człowieka. Jedynie około 2% genomu człowieka to sekwencje kodujące, a pozostałe 98% to sekwencje niekodujące, tzw. introny i sekwencje międzygenowe [76, 127].



Ryc. 2. Schemat struktury chromosomu i spirali DNA

Źródło: NCI Dictionary of Cancer Terms.

Wyróżnia się dwie odrębne części funkcjonalne genu: koniec 5' genu tworzący region promotorowy, który jest zaangażowany w regulację ekspresji genu, oraz region kodujący, który ulega transkrypcji na RNA, a następnie translacji do określonego przez gen białka. Podstawowym schematem budowy chromatyny jest 1,7-krotne owinięcie nici DNA wokół histonowego oktameru tworzącego nukleosom, który zawiera 147 par zasad DNA oraz 50 par zasad DNA łącznikowego z następnym nukleosomem. Rdzeń histonowy utworzony jest przez osiem histonów, po dwie kopie histonów H2A, H2B, H3 i H4. Każdy histon zawiera domenę odpowiedzialną za reakcje histon-histon

i histon-DNA, bogatą w lizynę domenę końca $-NH_2$ oraz ogon $-COOH$, które mogą być potranslacyjnie modyfikowane poprzez acetylację, metylację, fosforylację i ubikwitynację [7, 127].

4. Podstawowe procesy epigenetyczne w onkogenezie raka jamy ustnej

Rozwój nowotworu w organizmie następuje w wyniku jednoczesnych zmian genetycznych i epigenetycznych, które zachodzą w genomie komórki [127].

Zmiany genetyczne w DNA to choroba genomu komórki, manifestująca się zmianami ekspresji genów, wiodącymi do zmian ilości, czasu powstawania i lokalizacji produktów genów supresorowych i onkogenów. Są to mutacje i zmiany w pojedynczym nukleotydzie, usunięcie lub wstawienie fragmentu DNA, zmiana liczby kopii lub translokacja [2, 30, 76]. W procesie nowotworzenia duże znaczenie mają również dodatkowe mechanizmy epigenetycznej regulacji ekspresji genów (z greckiego *epi* – ponad genomem), obejmujące dziedziczne, lecz potencjalnie odwracalne, zmiany ekspresji genów, kodowane przez modyfikacje genomu i komponenty chromatyny, jednak bez zmian w sekwencji DNA.

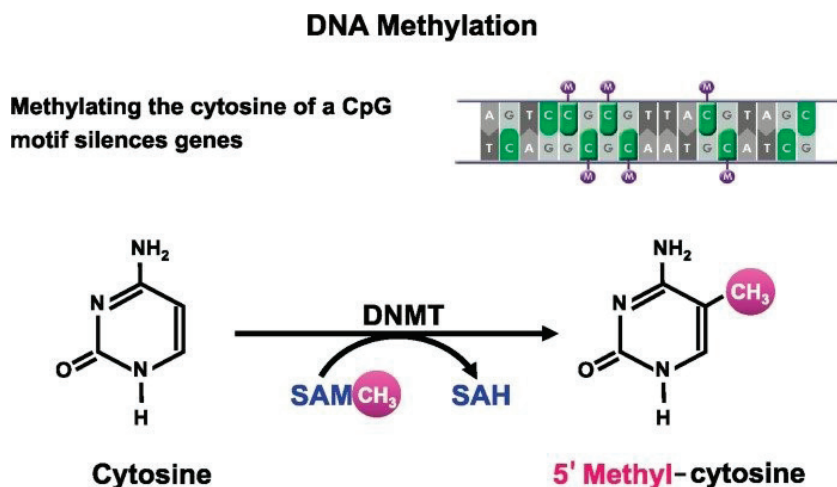
Autorem definicji epigenetyki jest Conrad H. Waddington, który w 1942 r. opisał tę dziedzinę jako gałąź biologii badającej interakcje przyczynowo-skutkowe między genami i ich produktami, znajdującymi odbicie w fenotypie powstającego organizmu [158]. Początkowo ta gałąź genetyki dotyczyła jedynie rozwoju embrionalnego, jednak badania dziedzicznych zmian w ekspresji genów, które występują niezależnie od pierwotnych zmian w sekwencji DNA, pozwoliły na rozszerzenie mechanizmów zmian epigenetycznych na funkcjonowanie całych organizmów, na wszystkich etapach rozwoju, jak również na etiopatogenezę wielu chorób, w tym nowotworów [31, 140]. Modyfikacje epigenetyczne stwarzają możliwość niejednorodności komórek, mimo identycznego zapisu sekwencji DNA i takich samych wzorców sygnalizacji komórkowej. Regulacja epigenetyczna odgrywa ważną rolę w prawidłowym rozwoju i utrzymaniu ekspresji genów specyficznych dla tkanek organizmu, a zaburzenie tych wzorców prowadzi do zmian rozpoczynających rozwój nowotworu [60, 140]. Struktura chromatyny, utworzona przez nukleosomy, podlega zmianom epigenetycznym, które przebiegają wg czterech głównych mechanizmów działania: metylacji DNA, kowalencyjnych modyfikacji histonów, przebud-

wy struktury nukleosomowej i niekodujących modyfikacji związanych z RNA, szczególnie miRNA [9, 41, 45, 46].

Mechanizmy epigenetyczne współdziałają ze sobą, przyczyniając się do powstania specyficznej populacji komórek, które tracą swoją pierwotną tożsamość oraz mechanizmy regulacyjne i w konsekwencji mogą stać się komórkami patogennymi [47, 53].

Jednym z epigenetycznych mechanizmów zmian w prawidłowym łańcuchu DNA jest proces metylacji. Epigenetyczne zmiany wzorca metylacji DNA zaobserwowano w różnych typach nowotworów i wielu badaczy uważa, iż odgrywają one zasadnicze znaczenie w kancerogenezie. Zmiany epigenetyczne obserwowano we wczesnych stadiach rozwoju nowotworu i wraz ze zmianami genetycznymi uznawane są za nieprawidłowości niezbędne do nowotworzenia tkankowego i progresji rozwoju raka [15, 156].

Różne typy nowotworów wyrażają charakterystyczne wzorce metylacji, ale mają również wspólne cechy zmian epigenetycznych, które wykorzystywane są we wczesnym wykrywaniu nowotworów, umożliwiającą śledzenie ich progresji i mają pewne znaczenie w ocenie rokowania. Na świecie obserwowany jest szybki postęp technologiczny, umożliwiający wykrywanie i monitoring zmian epigenetycznych w tkankach człowieka, co wykorzystywane jest w praktyce klinicznej, jako wczesne biomarkery zmian rakowych oraz markery progresji procesu nowotworowego [24, 51].



Ryc. 3. Schemat metylacji cytozyny do 5-metylocytozyny

Źródło: researchgate.net/publication/259209496.

Proces metylacji polega na przyłączeniu grupy metylowej do piątego węgla pierścienia cytozyny, niemniej procesowi temu ulega jedynie 3–4% wszystkich cytozyn w DNA [68, 91].

U ssaków metylacja DNA dotyczy głównie cytozyny, poprzez enzymatyczne przeniesienie grupy metylowej z S-adenozyl-L-metioniny (SAM) na węgiel w pozycji 5, tworząc 5-metylocytozynę (5mC) (Ryc. 3). Modyfikacja ta nie wpływa na parowanie zasad azotowych w DNA, a grupa metylowa znajdująca się w dużym rowku DNA może oddziaływać z białkami [13, 127].

Zmiany w metylacji DNA rozpoznawane są jako pierwszy epigenetyczny biomarker związany z rozwojem nowotworu, zmieniający prawidłowe funkcjonowanie genu i obejmują one hipermetylację, hypometylację oraz zablokowanie imprintingu [133, 140].

Hipermetylacja, czyli wzmocnienie metylacji, obserwowana jest w ściśle określonych miejscach w strukturze DNA. Do metylacji dochodzi w nukleotydach cytozynowych ulokowanych 5' w stosunku do nukleotydów guaninowych (CpG). Dinukleotyd CpG, nazywany wyspami CpG, obecny jest w regionach promotorowych 50% genów człowieka [26, 137, 149].

Metylacja DNA jest jednym z narzędzi wykorzystywanych przez rozwijającą się, prawidłową komórkę do wyłączania genów, warunkując odmienną tkankową poprzez ekspresję genów charakterystyczną dla różnych rodzajów tkanek. Ponadto metylacja wykorzystywana jest w komórce w utrzymywaniu nieczynnego chromosomu X oraz imprintingu genów jednego z dwóch rodzicielskich alleli w celu zapewnienia monoallelicznej ekspresji genu [114]. Wzór metylacji DNA w prawidłowej komórce jest stały i cechuje się specyfiką tkankową. Wzorzec ten ustalany jest u człowieka i innych ssaków podczas embriogenezy i podlega dziedziczeniu epigenetycznemu [10].

Ustanowienie i stabilność prawidłowego wzoru metylacji jest warunkiem koniecznym do utrzymania prawidłowej ekspresji genów i w rezultacie prawidłowego funkcjonowania komórek i tkanek. W zdrowych tkankach nie dochodzi do metylacji wysp CpG w regionach promotorowych genów, dlatego proces transkrypcji informacji przebiega w sposób niezaburzony. Metylowane cytozyny znajdują się najczęściej w powtarzających się sekwencjach oraz wyspach CpG promotorowych regionów represjonowanych genów, i wtedy metylacja jest sygnałem dziedzicznym i utrzymuje gen w stanie wyciszenia [26, 127].

Nośnikiem reszt metylowych jest S-adenozylometionina, która w wyniku działania enzymu metylotransferazy DNA (DNA methyltransferase, DNMT) odłącza grupę metylową, kowalencyjnie łącząc się z cytozyną. Wyodrębno-

no trzy metylotransferazy: DNMT1, DNMT3a i DNMT3b. Metylotransferaza DNMT1 bierze udział w procesie replikacji podczas przekształcania DNA hemimetylowanego do DNA metylowanego całkowicie. Mechanizm ten umożliwia dziedziczenie wzorca metylacji, co zapobiega utracie sygnału w połowie komórek potomnych. Pozostałe metylotransferazy biorą udział w metylacji nowych miejsc na nici DNA [50, 68, 116].

W komórce nowotworowej równowaga epigenetyczna zostaje zaburzona, czego dowodem jest zmieniony wzorzec metylacji. W genomie komórek nowotworowych stwierdza się ogólną hypometylację, której towarzyszy hipermetylacja genów promotorowych [149].

Hypometylacja to utrata metylacji DNA w regionach obejmujących cały genom, co skutkuje niestabilnością genomową i progresją nowotworu. W komórkach nowotworowych hypometylacji towarzyszy hipermetylacja wysp CpG genów promotorowych, które pozostają niemetylowane w prawidłowych komórkach [66]. Ten unikalny wzór metylacji poszczególnych genów jest cechą powszechnie obserwowaną w genach supresorowych większości typów nowotworów u ludzi, co skutkuje, analogicznie do mutacji punktowych i delecji, wyciszeniem transkrypcji genów supresorowych nowotworów. Ponadto metylacja DNA może bezpośrednio hamować ekspresję genów poprzez blokowanie wiązania specyficznych czynników transkrypcyjnych [37, 38].

Inaktywacja transkrypcji spowodowana przez hipermetylację promotora wpływa na geny zaangażowane w główne szlaki komórkowe, takie jak: naprawa DNA (*hMLH1* i *MGMT*), kontrola cyklu komórkowego (*p16 INK4a*, *p15 INK4b*), sygnalizacja Ras (*RASSF*), apoptoza (*DAPK1*), adhezja komórkowa (*CDH1*), detoksykacja (*GSTP1* – S-transferaza glutationowa P1), odpowiedź hormonalna (*ESR1*, *ESR2*) oraz zaburzenia szlaku p53. Zablockowanie tych genów zapewnia komórkom nowotworowym przewagę w namnażaniu i wzroście oraz zwiększa niestabilność genetyczną [68, 72, 73].

Hypometylacja DNA w komórkach nowotworowych wiąże się głównie ze wzrostem funkcji i aktywności onkogenów, ponadto w określonych promotorach może aktywować nieprawidłową ekspresję onkogenów i indukować utratę imprintingu w komórkach potomnych [37, 38, 39, 138].

Kancerogeneza jest procesem wieloetapowym, który przebiega łatwiej dzięki mechanizmom epigenetycznym, inicjującym niestabilność genetyczną w wyniku mutacji genów supresorowych i aktywacji mutacji genetycznych w onkogenach. Jedna trzecia mutacji punktowych, które mogą destabilizować strukturę i funkcję genów, zachodzi w tzw. „gorących punktach”, którymi są reszty 5-metylocytozyny, występujące przy wyspach CpG. Najczęściej

w większości tych mutacji jest to przemiana metylocytozyny w tyminę (C→T) [122, 125]. Równocześnie metylocytozyna może mieć wpływ na sparowaną z nią zasadę z drugiej nici DNA, prowadząc do przemiany guaniny w adeninę (G→A). Takie mutacje polegające na przemianie G→A znajdowane są w 44,8% przypadkach białaczek i mielodysplazji oraz 60% przypadków raka okrężnicy, natomiast mutacje C→T występują w komórkach podstawnych i rakach płaskonabłonkowych. Metylacja zwiększa ponadto szybkość hydrolizy i reaktywność sąsiednich guanin [122, 124]. Utlenianie 5-metylocytozyny natomiast przyczynia się do wysokiej częstotliwości przemiany C→T w sekwencjach wysp CpG. Takie uszkodzenia DNA mogą wpływać na wzorec metylacji komórek prawidłowych, prowadząc do zniekształceń ekspresji genów supresorowych i onkogenów, dając początek procesowi nowotworowemu [27].

Epigenetyczne zaburzenia metylacji rozwijają się stopniowo w toczącym się procesie kancerogenezy. Hypermetylacja wysp CpG pojawia się wcześniej w tym procesie, a liczba metylowanych wysp CpG sukcesywnie rośnie wraz z rozwojem nowotworu i progresją złośliwości raka [50]. Rozpoczyna się proces rozpowszechniania się metylacji nowych wysp CpG, który zajmuje coraz większe obszary genomu, co prawdopodobnie jest skutkiem starzenia się genomu oraz wynikiem działania mediatorów stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w komórce [73, 77].

Metylowane sekwencje DNA uznawane są za potencjalne biomarkery, które mogą być wykorzystane we wczesnej diagnostyce nowotworów, w ocenie stopnia zaawansowania, rokowania i ocenie odpowiedzi na wdrożoną terapię. Biomarkery epigenetyczne mogą być oznaczane w tkance nowotworowej wyciętego guza, w tkankach otaczających guz, jak również w płynach ustrojowych i osoczu. Na świecie trwają intensywne badania nad poszukiwaniem nowych epigenetycznych markerów nowotworowych [32, 78].

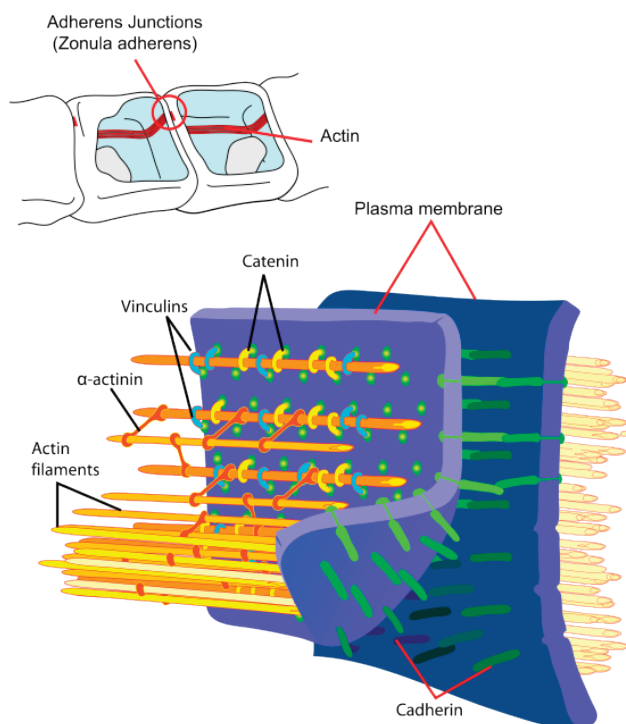
Drugim kierunkiem badań nad zmianami epigenetycznymi w DNA komórek nowotworowych jest koncepcja oparta na odwracalności procesów epigenetycznych i wykorzystanie tego zjawiska w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych i produkcji leków modyfikujących lub odwracających zmiany epigenetyczne odpowiedzialne za rozpoczęcie kancerogenezy [31, 51, 108].

Poznanie mechanizmów epigenetycznych zrewolucjonizowało badania nad nowotworami rozwijającymi się u człowieka, znacznie poszerzyło wiedzę na temat kancerogenezy i jednocześnie otworzyło możliwości opracowania biomarkerów procesu nowotworowego oraz możliwość rozwoju nowych koncepcji profilaktycznych i terapeutycznych.

5. Gen *CDH1* i białko E-kadheryna

Gen *CDH1* (kadheryna 1 typu 1) znajduje się na dłuższym ramieniu chromosomu 16, w locus 16q22.1 i koduje białko E-kadherynę (epithelial cadherine). Jest on złożony z 16 eksonów i 15 fragmentów intronowych [11, 126].

E-kadheryna jest homodimerem transmembranowym o masie cząsteczkowej 120 kD zbudowanej z 882 reszt aminokwasowych. Ta glikoproteina cechuje się dużą domeną zewnątrzkomórkową, składającą się z pięciu segmentów, przechodzącą w krótki segment przez błonowy, a następnie w domenę wewnątrzkomórkową, która zakotwiczona jest do cytoszkieletu aktynowego za pośrednictwem α i β katenin [55, 88]. C-końcowa domena cytoplazmatyczna E-kadheryny cechuje się bardzo wysoką stabilnością budowy, co związane jest z jej funkcją adhezyjną.

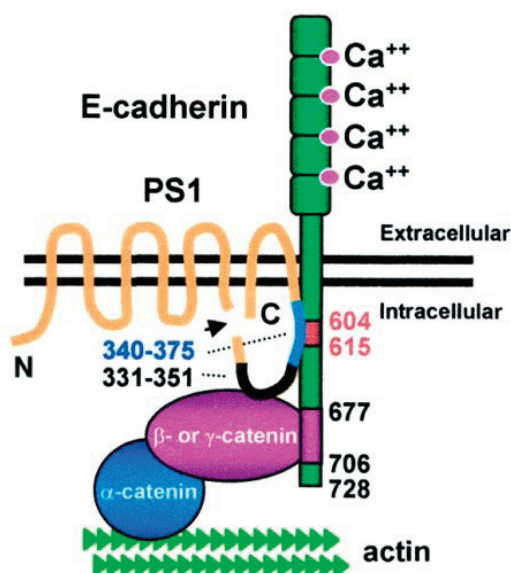


Ryc. 4. Schemat adhezji komórkowej z udziałem E-kadheryny

Źródło: commons.wikimedia.org/wiki/File:Adherens_Junctions_structural_proteins.svg.

Funkcją zewnątrzkomórkowych domen N-końcowych jest bardzo silne połączenie naprzeciwnych części E-kadheryn, a jakiegokolwiek zaburzenia w budowie tego fragmentu białka zaburza utrzymywanie przylegania sąsiadujących komórek nabłonkowych, polarność komórek, sygnalizację wewnątrzkomórkową i architekturę tkanki [19].

Niezbędnym warunkiem prawidłowej budowy przestrzennej E-kadheryny i powstania połączeń pomiędzy zewnątrzkomórkowymi domenami tego białka jest przyłączenie dwuwartościowych jonów wapnia (Ca^{2+}), co decyduje o przejściu formy biernej w formę aktywną dwóch naprzeciw położonych domen E-kadheryny [88].



Ryc. 5. Schemat budowy cząsteczki E-kadheryny z elementami zewnątrzkomórkowymi, odpowiedzialnymi za połączenia międzykomórkowe i elementami wewnątrzkomórkowymi, odpowiedzialnymi za zakotwiczenie cząsteczki białka w cytoszkielet

Źródło: researchgate.net/publication/259209496.

Badania naukowe, oceniające ekspresję E-kadheryny w różnych typach raka, wykazały kluczową rolę tego białka podczas progresji i inwazji nowotworu [56, 172]. Niski poziom aktywności lub brak E-kadheryny jest ściśle związany ze zmianami w funkcjonowaniu i ruchliwości komórek, co skutkuje większą liczbą przerzutów raka do węzłów chłonnych. Podobnie, jak w przypadku

innych nowotworów złośliwych, wykazano korelację między niską ekspresją E-kadheryny i bardziej agresywnym przebiegiem kolczystokomórkowego raka jamy ustnej. Niska ekspresja lub brak białka E-kadheryny jest skutkiem zablokowania genu supresorowego *CDH1* kodującego to białko. Do całkowitego zablokowania powstawania E-kadheryny konieczne jest wyłączenie genu na obydwu allelach, zgodnie z teorią „dwóch uderzeń” Knudsona [12, 86].

W badaniach laboratoryjnych nie odnotowano mutacji w obrębie genu *CDH1* lub też mutacje były bardzo rzadkie. Stwierdzono natomiast, iż najistotniejszym mechanizmem osłabienia ekspresji lub całkowitego zablokowania powstawania E-kadheryny jest hipermetylacja promotora genu *CDH1*. Zredukowana ekspresja E-kadheryny jest główną przyczyną dysfunkcji adhezji międzykomórkowej i zaburzenia hamowania kontaktowego komórek, co skutkuje, w zależności od nasilenia procesu, częściową lub całkowitą redukcją przylegania komórek potomnych w tkance nowotworowej, a w konsekwencji zwiększoną zdolnością do naciekania tkanek otaczających pierwotny guz, jak również wczesną zdolnością do tworzenia przerzutów [11, 19, 88]. Częstotliwość rozpoznawanej laboratoryjnie hipermetylacji genu *CDH1* waha się między 7% a 84% analizowanych próbek różnych typów raków płaskonabłonkowych [58]. Dane te sugerują, że stwierdzenie hipermetylacji genu *CDH1* u chorych na nowotwory płaskonabłonkowe może być biomarkerem epigenetycznym w przewidywaniu biologicznego zachowania się raka jamy ustnej.

Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu zaburzeń epigenetycznych w mechanizmie hipermetylacji promotora genu *CDH1* w DNA komórek nowotworowych oraz w DNA komórek prawidłowych, na przebieg kliniczny, dynamikę i rokowanie w raku jamy ustnej.

Podjęto cele szczegółowe:

- analizy związku między metylacją *CDH1* DNA z guza i DNA z tkanek marginesu chirurgicznego a lokalizacją raka jamy ustnej,
- analizy związku między metylacją *CDH1* DNA z guza i DNA z tkanek marginesu chirurgicznego a płcią chorego,
- analizy związku między metylacją *CDH1* DNA z guza i DNA z tkanek marginesu chirurgicznego a wiekiem chorego,
- analizy związku między metylacją *CDH1* DNA z guza i DNA z tkanek marginesu chirurgicznego a czasem powstania wznowy raka,
- analizy związku między metylacją *CDH1* DNA z guza i DNA z tkanek marginesu chirurgicznego a czasem i liczbą przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych,
- analizy związku między metylacją *CDH1* DNA z guza i DNA z tkanek marginesu chirurgicznego a prawdopodobieństwem przeżycia chorego,
- analizy związku między metylacją *CDH1* DNA z guza i DNA z tkanek marginesu chirurgicznego a infekcją wirusem HPV,
- udzielenie odpowiedzi na pytanie, czy metylacja *CDH1* DNA z guza i DNA z tkanek marginesu chirurgicznego w badanym materiale może być uznana za marker agresywności procesu nowotworowego;
- udzielenie odpowiedzi na pytanie, czy celowe jest kontynuowanie badań laboratoryjnych w kierunku poszukiwania biomarkera opartego na hipermetylacji genu supresorowego *CDH1* w kolczystokomórkowym raku jamy ustnej.

Materiał i wyniki badań klinicznych

Badanie miało charakter retrospektywny. Spośród chorych leczonych z powodu raka jamy ustnej w Klinice Chirurgii Szcękowo-Twarzowej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Rzeszowie wspólnie z histopatologiem i genetykiem wyselekcjonowano 79 chorych, u których możliwe było pozyskanie materiału genetycznego zarówno z tkanek guza jak i tkanek marginesu operacyjnego wolnego od komórek rakowych, a następnie z pobranego materiału przygotowano 158 preparatów do badań genetycznych. Dane dotyczące leczonych chorych zebrano po analizie dokumentacji medycznej historii chorób Kliniki Chirurgii Szcękowo-Twarzowej, Poradni Onkologicznej Podkarpackiego Centrum Onkologii oraz preparatów histologicznych pozyskanych z Zakładu Patomorfologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Rzeszowie. Wśród badanych było 58 mężczyzn i 21 kobiet. W tabeli I przedstawiono grupy wiekowe leczonych chorych.

Tabela I. Płeć i wiek chorych z rakiem jamy ustnej

Wiek chorych Płeć	< 40 r. ż.	40–50 r.ż.	51–60 r.ż.	61–70 r.ż.	> 70 r. ż.	RAZEM
Kobiety	0 (0%)	1 (1,3%)	2 (2,5%)	4 (5,1%)	14 (17,7%)	21 (26,6%)
Mężczyźni	4 (5,1%)	5 (6,3%)	6 (7,6%)	23 (27,9%)	20 (25,3%)	58 (73,4%)
RAZEM	4 (5,1%)	6 (7,6%)	8 (10,1%)	27 (34,2%)	34 (43,0%)	79 (100,0%)
$\chi^2 = 5,8882, p = 0.2076$						

Z danych tabeli I wynika, iż najliczniejszą grupę (43,0%) stanowili chorzy w wieku powyżej 70 lat. Wśród kobiet 17,7% było w wieku powyżej 70 lat, co

tworzyło najliczniejszą grupę kobiet. W grupie mężczyzn najliczniej reprezentowani byli chorzy w wieku od 61 do 70 roku życia (27,9%). W analizowanej grupie leczono 4 mężczyzn w wieku poniżej 40 roku życia. W badanej grupie chorych wiek nie był istotny statystycznie.

Zestawienie danych dotyczących lokalizacji raka i wieku operowanych chorych przedstawiono w tabeli II.

Tabela II. Umiejscowienie raka jamy ustnej w grupach wiekowych chorych

Wiek chorych Umiejscowienie	< 40 r.ż.	40–50 r.ż.	51–60 r.ż.	61–70 r.ż.	> 70 r.ż.	Razem
Język	1 (1,3%)	0 (0%)	3 (3,8%)	4 (5,1%)	8 (10,1%)	16 (20,2%)
Dno jamy ustnej	2 (2,5%)	3 (3,8%)	2 (2,5%)	8 (10,1%)	2 (2,5%)	17 (21,4%)
Policzek	1 (1,3%)	1 (1,3%)	2 (2,5%)	2 (2,5%)	1 (1,3%)	7 (8,8%)
Dziąsło	0 (0%)	2 (2,5%)	0 (0%)	12 (15,2%)	7 (8,8%)	21 (26,6%)
Warga	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	16 (20,2%)	18 (22,8%)
Razem	4 (5,1%)	6 (7,6%)	8 (10,1%)	27 (34,2%)	34 (43,0%)	79 (100,0%)

Z analizy danych zawartych w tabeli II wynika, że w badanej grupie chorych najczęściej rozpoznawano raka dziąsła (26,6%), w dalszej kolejności raka wargi (22,8%) oraz raka dna jamy ustnej (21,4%). Chorzy z rakiem błony śluzowej języka stanowili 20,2%, a najrzadziej w analizowanej grupie rozpoznawano raka błony śluzowej policzka (8,8%).

W tabeli III przedstawiono dane dotyczące stosowania używek wśród chorych badanej grupy, które to używki, tj. palenie tytoniu i nadużywanie alkoholu, uznane zostały za czynniki ryzyka zwiększające częstotliwość wystąpienia OSCC.

Ogółem nadużywanie alkoholu deklarowało 48,1% badanych, a długotrwałe palenie tytoniu 71,4% chorych. Z zebranych danych wynika, iż w badanej grupie dominowali mężczyźni nadużywający alkoholu, stanowiący 41,6% oraz palący wyroby tytoniowe, których odnotowano 53,9%. Wśród kobiet

przeważały chore nienadużywające alkoholu. Analiza statystyczna potwierdziła istotność nadużywania alkoholu w badanej grupie chorych ($p = 0.0135$).

Tabela III. Palenie tytoniu i nadużywanie alkoholu w grupie chorych z rakiem jamy ustnej

Używki Płeć	Alkohol			Tytoń		
	Tak	Nie	Razem	Tak	Nie	Razem
Kobiety	5 (6,3%)	16 (20,2%)	21 (26,6%)	14 (17,7%)	7 (8,8%)	21 (26,6%)
Mężczyźni	32 (41,6%)	26 (31,8%)	58 (73,4%)	43 (53,6%)	15 (19,0%)	58 (73,4%)
Razem	37 (48,1%)	42 (51,9%)	79 (100,0%)	57 (71,4%)	22 (28,6%)	79 (100,0%)
$\chi^2 = 6,0905, p = 0.0135$						

W tabeli IV przedstawiono zestawienie lokalizacji guza i stosowania używek.

Tabela IV. Umieszczenie raka jamy ustnej w odniesieniu do stosowanych używek

Używki Lokalizacja guza	Alkohol			Tytoń		
	Tak	Nie	Razem	Tak	Nie	Razem
Język	9 (11,4%)	7 (8,8%)	16 (20,2%)	11 (13,9%)	5 (6,3%)	16 (20,2%)
Dno jamy ustnej	9 (11,3%)	8 (10,1%)	17 (21,4%)	12 (15,2%)	5 (6,3%)	17 (21,4%)
Dziąsło	8 (10,1%)	13 (16,6%)	21 (26,7%)	16 (20,2%)	5 (6,3%)	21 (26,6%)
Policzek	3 (3,8%)	4 (5,1%)	7 (8,8%)	5 (6,3%)	2 (2,5%)	7 (8,8%)
Warg	8 (10,1%)	10 (12,6%)	18 (22,7%)	13 (16,4%)	5 (6,3%)	18 (22,7%)
Razem	37 (48,1%)	42 (51,9%)	79 (100,0%)	57 (71,4%)	22 (28,6%)	79 (100,0%)
	$\chi^2 = 1,5541, p = 0.8170$			$\chi^2 = 0,2852, p = 0.9907$		

Z danych przedstawionych w tabeli IV wynika, iż wśród chorych z rakiem dziąsła i wargi trzykrotnie więcej osób paliło wyroby tytoniowe w porównaniu z niepalącymi. Wśród chorych leczonych z powodu raka języka, raka dna jamy ustnej i policzka dwukrotnie więcej było chorych palących tytoń, nie zanotowano natomiast różnic w umiejscowieniu wskazanych nowotworów warunkowanych spożyciem alkoholu. W pozostałych lokalizacjach nie zaobserwowano dużych różnic zależnych od używek.

Na podstawie analizy historii choroby operowanych chorych oznaczono stopień zaawansowania nowotworu wg systemu TNM, a zebrane dane przedstawiono w tabeli V. Nie operowano chorych, u których na etapie planowania leczenia kompleksowego rozpoznano zaawansowanie guza w stopniu T4b lub też stwierdzono odległe przerzuty M1.

Wśród badanych najliczniejszą grupę 41,8% stanowili chorzy, u których wielkość guza zakwalifikowano do grupy T4a, w której stwierdzono średnicę pierwotnego ogniska raka powyżej 4 cm i naciekanie tkanek sąsiadujących z ogniskiem raka. Oceniając regionalne węzły chłonne (cecha N) odnotowano, iż najliczniejszą grupą 40,5% byli chorzy, u których w badaniu klinicznym stwierdzono zaawansowanie nowotworu na poziomie N2. Wyniki te nie są jednak istotne statystycznie.

W tabeli VI zestawiono dane o stopniu zaawansowania nowotworu z lokalizacją guza pierwotnego.

Z danych przedstawionych w tabeli wynika, iż najliczniejszą grupę tworzyli chorzy z rakiem dziąsła z guzem w stopniu zaawansowania klinicznego T4a, którego stwierdzono u 16,4% chorych. Drugą pod względem liczebności grupę stanowili chorzy z rakiem dna jamy ustnej o wielkości guza pierwotnego T4a, których było 11,4%, oraz pacjenci z rakiem języka o wielkości guza T2, którego odnotowano u 8,8% chorych. Analizując stopień patologii regionalnych węzłów chłonnych stwierdzono, iż najliczniejszą grupę tworzyli chorzy z rakiem wargi i bez przerzutów do węzłów chłonnych (13,9%). W dalszej kolejności byli to chorzy z rakiem języka i rakiem dna jamy ustnej oraz przerzutami N2 do węzłów chłonnych szyi (10,1%).

Na podstawie zaleceń opracowanych przez AJCC oceniono stopień zaawansowania procesu nowotworowego w analizowanej grupie chorych z rakiem jamy ustnej, a dane zebrano w tabeli VII.

W eksplorowanej grupie najczęściej leczono chorych z IVa stopniem zaawansowania procesu nowotworowego (41,7%) oraz III stopniem zaawansowania (21,4%). W dalszej kolejności byli chorzy z II stopniem zaawansowania (19,0%) oraz I stopniem zaawansowania raka jamy ustnej (8,8%). Stopień IVb odnotowano u 8,8% chorych. Najliczniejszą grupę stanowili mężczyźni,

Tabela V. Ocena zaawansowania TNM w grupie chorych

TNM	T					N				M	
	T1	T2	T3	T4a	T4b	N0	N1	N2	N3	M0	M1
Kobiety	3 (3,8%)	7 (8,8%)	2 (2,5%)	9 (11,4%)	0 (0%)	5 (6,3%)	8 (10,1%)	8 (10,1%)	0 (0%)	19 (24,1%)	2 (2,5%)
Mężczyźni	7 (8,8%)	13 (16,4%)	14 (17,7%)	24 (30,4%)	0 (0%)	15 (19,0%)	19 (20,2%)	24 (30,4%)	0 (0%)	53 (67,1%)	5 (6,3%)
Razem	10 (12,6%)	20 (25,3%)	16 (20,2%)	33 (41,8%)	0 (0%)	20 (25,3%)	27 (30,4%)	32 (40,5%)	0 (0%)	72 (91,2%)	7 (8,8%)
	$\chi^2 = 2,4199$, p = 0.4899					$\chi^2 = 0,5852$, p = 0.8998				$\chi^2 = 0,015$, p = 0.9	

wśród których zaawansowanie choroby nowotworowej oceniono na IVa stopień (30,4%) oraz stopień III (21,4%). Wśród kobiet najczęściej leczone były nowotwory w stopniu IVa zaawansowania (11,4%) oraz w stopniu II i III (po 5,1%). Nie stwierdzono istotności statystycznej analizowanych danych ($p = 0.3717$).

Tabela VI. Ocena TNM w zależności od umiejscowienia raka jamy ustnej

TNM	T					N				M	
Lokalizacja	T1	T2	T3	T4a	T4b	N0	N1	N2	N3	M0	M1
Język	3 3,8%	7 8,8%	2 2,5%	4 5,1%	0 0,0%	2 2,5%	4 5,1%	8 10,1%	0 0%	16 20,2%	0 0,0%
Dno jamy ustnej	1 1,3%	4 5,1%	3 3,8%	9 11,4%	0 0,0%	3 3,8%	5 6,3%	8 10,1%	0 0%	15 19,0%	2 2,5%
Dziąsło	0 0,0%	2 2,5%	6 7,6%	13 16,4%	0 0,0%	3 3,8%	11 13,9%	9 11,4%	0 0,0%	19 24,1%	2 2,5%
Policzek	0 0,0%	1 1,3%	3 3,8%	3 3,8%	0 0,0%	1 1,3%	1 1,3%	5 6,3%	0 0,0%	4 5,1%	3 3,8%
Warga	6 7,6%	6 7,6%	2 2,5%	4 5,1%	0 0,0%	11 13,9%	3 3,8%	2 5,1%	0 0,0%	18 22,8%	0 0,0%
RAZEM	10 12,6%	20 25,3%	16 20,2%	33 41,8%	0 0,0%	20 25,3%	24 30,4%	32 40,5%	3 3,8%	72 91,2%	7 8,8%

Tabela VII. Stopień zaawansowania procesu nowotworowego w badanej grupie

Stopień zaawansowania Płeć	0°	I°	II°	III°	IVa°	IVb°	IVc°	Razem
Kobiety	0 (0%)	2 (2,5%)	4 (5,1%)	4 (5,1%)	9 (11,4%)	2 (2,5%)	0 (0%)	21 (26,6%)
Mężczyźni	0 (0%)	5 (6,3%)	11 (13,9%)	13 (16,4%)	24 (30,4%)	5 (6,3%)	0 (0%)	58 (73,4%)
Razem	0 (0%)	7 (8,8%)	15 (19,0%)	17 (21,4%)	33 (41,7%)	7 (8,8%)	0 (0%)	79 (100,0%)

Stopień zaawansowania procesu nowotworowego i lokalizację guza zestawiono w tabeli VIII.

Tabela VIII. Stopień zaawansowania raka jamy ustnej w zależności od lokalizacji guza

Stopień zaawansowania Lokalizacja	0°	I°	II°	III°	IVa°	IVb°	IVc°	Razem
Język	0 (0%)	2 (2,5%)	5 (6,3%)	5 (6,3%)	4 (5,1%)	0 (0%)	0 (0%)	16 (20,2%)
Dno jamy ustnej	0 (0%)	1 (1,3%)	3 (3,8%)	4 (5,1%)	7 (8,8%)	2 (2,5%)	0 (0%)	17 (21,4%)
Dziąsło	0 (0%)	0 (0%)	2 (2,5%)	4 (5,1%)	13 (16,4%)	2 (2,5%)	0 (0%)	21 (26,7%)
Policzek	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,3%)	3 (3,8%)	3 (3,8%)	3 (0%)	7 (8,8%)
Warga	0 (0%)	4 (5,1%)	5 (6,3%)	3 (3,8%)	6 (7,6%)	0 (0%)	0 (0%)	18 (22,8%)
Razem	0 (0%)	7 (8,8%)	15 (19,0%)	17 (21,4%)	33 (41,7%)	7 (8,8%)	0 (0%)	79 (100,0%)

Analiza stopnia zaawansowania choroby nowotworowej i umiejscowienia guza pierwotnego wykazała, iż najliczniejszą grupę stanowili chorzy z rozpoznaniem rakiem dziąsła w IVa stopniu zaawansowania klinicznego, których było 16,4%. W dalszej kolejności odnotowano chorych z rakiem dna jamy ustnej w IVa stopniu zaawansowania (8,8%) oraz chorych z rakiem wargi ocenionym na stopień IVa zaawansowania (8,8%). W badanej grupie diagnozowano i leczono paliatywnie 7 chorych (8,8%) z rakiem policzka, dna jamy ustnej i dziąsła w stopniu zaawansowania IVb.

Na podstawie analizy dokumentacji histopatologicznej chorych operowanych z powodu raka jamy ustnej zebrano dane dotyczące stopnia zróżnicowania (dojrzałości) komórek tworzących guz. Wyniki przedstawiono w tabeli IX.

Tabela IX. Stopień zróżnicowania histologicznego raka jamy ustnej

G	G1	G2	G3	G4	Razem
Kobiety	5 (6,3%)	12 (15,2%)	4 (5,1%)	0 (0,0%)	21 (26,6%)
Mężczyźni	23 (29,1%)	29 (36,7%)	6 (7,6%)	0 (0,0%)	58 (73,4%)
Razem	28 (35,4%)	41 (52,0%)	10 (12,6%)	0 (0,0%)	79 (100,0%)
$\chi^2 = 2,1663, p = 0.3385$					

W eksplorowanej grupie chorych najczęściej rozpoznawano raka o stopniu zróżnicowania komórkowego G2 (52,0%), następnie w stopniu zróżnicowania G1 (35,4%) oraz w stopniu G3 (12,6%). Wśród chorych badaniem histopatologicznym nie rozpoznano raków niezróżnicowanych G4. W grupie kobiet badaniem histopatologicznym najczęściej rozpoznawano umiarkowane zróżnicowanie komórek guza G2 (15,2%) oraz wysokie zróżnicowanie raka G1 stwierdzone w 6,3% przypadków. W grupie mężczyzn najczęściej rozpoznawano umiarkowany stopień zróżnicowania G2 (36,7%) oraz wysoko zróżnicowane guzy w stopniu G1 (29,1%). Analizowane dane nie są istotne statystycznie ($p = 0.3385$).

W tabeli X zestawiono dane dotyczące stopnia zróżnicowania komórek guza i lokalizacji ogniska pierwotnego.

Tabela X. Stopień zróżnicowania komórek raka jamy ustnej w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego

Lokalizacja	G1	G2	G3	G4	Razem
Język	3 (3,8%)	11 (13,9%)	2 (2,5%)	0 (0,0%)	16 (20,2%)
Dno jamy ustnej	5 (6,3%)	9 (11,4%)	3 (3,8%)	0 (0,0%)	17 (21,4%)
Dziąsło	8 (10,1%)	13 (16,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	21 (26,7%)
Policzek	0 (0%)	3 (3,8%)	4 (5,1%)	0 (0,0%)	7 (8,8%)
Warga	12 (15,2%)	5 (6,3%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)	18 (22,8%)
Razem	28 (35,4%)	41 (52,0%)	10 (12,6%)	0 (0,0%)	79 (100,0%)
$\chi^2 = 8,9943, p = 0.0612$					

Z przedstawionych danych wynika, iż w badanej grupie najczęściej obserwowano stopień umiarkowanego zróżnicowania komórek raka G2 wśród guzów dziąsła (16,4%), języka (13,9%) i dna jamy ustnej (11,4%) oraz raki wysoko zróżnicowane, rozpoznawane wśród guzów wargi (15,2%). Raki nisko zróżnicowane stwierdzano najczęściej w grupie nowotworów policzka (5,1%). Analizowane dane nie były istotne statystycznie ($p = 0.0612$).

Na podstawie analizy dokumentacji medycznej operowanych chorych, którzy pozostają w obserwacji Poradni Onkologicznej Podkarpackiego Centrum Onkologii w Rzeszowie, zebrano dane dotyczące wystąpienia wznowy

miejscowej procesu nowotworowego, po pierwotnym leczeniu onkologicznym, co ilustruje tabela XI.

Tabela XI. Wznowy procesu nowotworowego w grupie chorych z rakiem jamy ustnej

Wznowa od operacji	0–6 m.	7–12 m.	13–24 m.	25–36 m.	> 36 m.	Razem
Kobiety	1 (1,3%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (2,5%)
Mężczyźni	3 (3,8%)	2 (2,5%)	2 (2,5%)	1 (1,3%)	2 (2,5%)	10 (12,6%)
Razem	4 (5,1%)	3 (3,8%)	2 (2,5%)	1 (1,3%)	2 (2,5%)	12 (15,2%)

W analizowanej grupie 79 chorych z rakiem jamy ustnej miejscową wznowę raka rozpoznano u 12 chorych, co stanowiło 15,2% leczonych pacjentów. Najczęściej, w 3,8% ogólnej liczby leczonych chorych, odnotowywano wznowę wśród mężczyzn w pierwszym półroczu od operacji. Ogółem, w pierwszym roku od zabiegu operacyjnego, rozpoznano wznowę procesu nowotworowego u 7 chorych, co stanowiło 58,33% wszystkich stwierdzonych wznów, pozostałe przypadki rozpoznawano w drugim i trzecim roku od operacji.

W tabeli XII zestawiono dane dotyczące wznowy procesu nowotworowego w zależności od lokalizacji pierwotnego ogniska raka.

Tabela XII. Wznowa miejscowa raka w zależności do lokalizacji ogniska pierwotnego

Lokalizacja	Wznowa	Bez wznowy	Razem
Język	3 (3,8%)	13 (16,4%)	16 (20,2%)
Dno jamy ustnej	3 (3,8%)	14 (17,5%)	17 (21,4%)
Dziąsło	4 (5,1%)	17 (21,5%)	21 (26,7%)
Policzek	1 (1,3%)	6 (7,6%)	7 (8,8%)
Warg	1 (1,3%)	17 (21,5%)	18 (22,8%)
Razem	12 (15,2%)	67 (84,8%)	79 (100,0%)
$\chi^2 = 1,781, p = 0.7759$			

Wznowy miejscowe obserwowano najczęściej w przypadkach raka dziąsła (5,1%), w dalszej kolejności raka języka (3,8%) oraz raka dna jamy ustnej (3,8%). W badanej grupie chorych nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności analizowanych danych ($p = 0.7759$).

W tabeli XIII zebrano informacje dotyczące przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych po pierwszej operacji ogniska pierwotnego.

Tabela XIII. Przerzuty do węzłów chłonnych po operacji raka jamy ustnej

Przerzuty do węzłów chłonnych	0–6 m.	7–12 m.	13–24 m.	24–36 m.	> 36 m.	Razem
Kobiety	5 (6,3%)	0 (0,0%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (7,6%)
Mężczyźni	9 (11,4%)	3 (3,8%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	15 (19,0%)
Razem	14 (17,7%)	3 (3,8%)	2 (2,5%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	21 (26,6%)

Przerzuty do kolejnych pięter regionalnych węzłów chłonnych po pierwotnym, chirurgicznym leczeniu raka jamy ustnej wystąpiły u 21 pacjentów (26,6%). Przerzuty w węzłach chłonnych rozpoznawano najczęściej w pierwszym półroczu po pierwotnej operacji (17,7%), odpowiednio 11,4% wśród mężczyzn i 6,3% wśród kobiet. W pierwszym roku od zabiegu onkologicznego odnotowano przerzuty do kolejnych pięter węzłów chłonnych szyi u 17 spośród 21 chorych (80,9%). W 2,5% przypadków przerzuty do węzłów chłonnych wystąpiły w drugim roku, a w 1,3% w trzecim roku od operacji.

W tabeli XIV zestawiono dane dotyczące przerzutów raka do regionalnych węzłów chłonnych w zależności od lokalizacji pierwotnego ogniska raka.

Na podstawie analizy danych ujętych w tabeli stwierdzono, iż przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych najczęściej obserwowano wśród pacjentów z rakiem dna jamy ustnej (8,8%), rakiem języka (7,6%) i rakiem dziąsła (5,1%). W badanej grupie chorych nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności analizowanych danych ($p = 0.2739$).

W tabeli XV zebrano dane dotyczące rozpoznanych przerzutów odległych wśród operowanych chorych z rakiem jamy ustnej.

W badanej grupie przerzuty odległe rozpoznano u 4 chorych (5,1%), były to przerzuty u 3 mężczyzn, które wystąpiły pomiędzy 7 i 12 miesiącem od operacji, oraz u jednej chorej, u której przerzut odległy zdiagnozowano w drugim

roku obserwacji po zabiegu operacyjnym. W dwóch przypadkach przerzuty odległe dotyczyły pacjentów z ogniskiem pierwotnym raka w dnie jamy ustnej, u jednego chorego był to rak języka i u jednego rak policzka. Przerzuty odległe rozpoznano u dwóch chorych w płucu oraz u dwóch w kręgosłupie.

Tabela XIV. Przerzuty do węzłów chłonnych w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego raka jamy ustnej

Lokalizacja	Przerzuty do węzłów chłonnych	Bez przerzutów	Razem
Język	6 (7,6%)	10 (12,6%)	16 (20,2%)
Dno jamy ustnej	7 (8,8%)	10 (12,6%)	17 (21,4%)
Dziąsło	4 (5,1%)	17 (21,4%)	21 (26,7%)
Policzek	1 (1,3%)	6 (7,6%)	7 (8,8%)
Warga	3 (3,8%)	15 (19,0%)	18 (22,8%)
Razem	21 (26,7%)	58 (73,3%)	79 (100,0%)
$\chi^2 = 1,781p = 0.2739$			

Tabela XV. Przerzuty odległe wśród chorych z rakiem jamy ustnej

Przerzuty odległe	0–6 m.	7–12 m.	13–24 m.	25–36 m.	> 36 m.	Razem
Kobiety	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,3%)
Mężczyźni	0 (0,0%)	3 (3,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (3,8%)
Razem	0 (0,0%)	3 (3,8%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)	0 (1,3%)	4 (5,1%)

W tabeli XVI zebrano dane dotyczące czasu zgonów chorych operowanych z powodu raka jamy ustnej.

Tabela XVI. Czas zgonu po operacji chorych z rakiem jamy ustnej

Zgon od operacji	0–6 m.	7–12 m.	13–24 m.	25–36 m.	> 36 m.	Razem
Kobiety	2 (2,5%)	2 (2,5%)	3 (3,8%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	9 (11,4%)
Mężczyźni	5 (6,3%)	4 (5,1%)	9 (11,4%)	1 (1,3%)	6 (7,6%)	25 (31,6%)
Razem	7 (8,8%)	6 (7,6%)	12 (15,2%)	2 (2,5%)	7 (8,8%)	34 (43,0%)
$\chi^2 = 1,2772p = 0.8652$						

W analizowanej grupie chorych w okresie obserwacji odnotowano 34 zgony, co stanowiło 43,0%. Dotyczyły 25 (31,6%) mężczyzn i 9 (11,4%) kobiet. Najwięcej zgonów w grupie kobiet obserwowano w pierwszym roku po zakończeniu leczenia onkologicznego (5,1%), wśród mężczyzn (11,4%) zmarło w pierwszym roku od operacji, podobnie w drugim (11,4%) oraz (7,6%) w okresie powyżej 3 roku od zakończenia leczenia. W badanej grupie nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności analizowanych danych ($p = 0.8652$).

W tabeli XVII zestawiono lokalizację raka jamy ustnej ze zgonami chorych.

Tabela XVII. Przeżycia i zgony chorych w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego

Przeżycia Lokalizacja	Zgon	Żyje	Razem
Język	7 (8,8%)	9 (11,4%)	16 (20,2%)
Dno jamy ustnej	8 (10,1%)	9 (11,4%)	17 (21,4%)
Dziąsło	12 (15,2%)	9 (11,4%)	21 (26,7%)
Policzek	4 (5,1%)	3 (3,8%)	7 (8,8%)
Warga	3 (3,8%)	15 (19,0%)	18 (22,8%)
Razem	34 (43,0%)	45 (57,0%)	79 (100,0%)
$\chi^2 = 7,4939, p = 0.1119$			

Z danych zebranych w tabeli XVII wynika, że najwięcej zgonów stwierdzono wśród chorych z rakiem dziąsła, których było 12 (15,2%), co stanowiło 57,1% chorych z OSCC w tej lokalizacji. W dalszej kolejności byli to pacjenci leczeni z powodu raka dna jamy ustnej (10,1%) oraz raka języka (8,8%). Najmniejszy odsetek zgonów zanotowano wśród chorych z rakiem wargi (3,8%). W badanej grupie chorych nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności analizowanych danych ($p = 0.1119$).

Badania laboratoryjne

1. Materiał genetyczny

W badaniach genetycznych poddano analizie laboratoryjnej poziom metylacji DNA regionu bogatego w CpG, w rejonie promotora genu *CDH1*, w 158 preparatach laboratoryjnych, przygotowanych z tkanek nowotworu i tkanek marginesu chirurgicznego tego samego chorego, oznaczonych przez histopatologa jako wolne od nacieku raka.

Każdą parę pozyskaną z komórek nowotworu i komórek prawidłowych pacjenta, uzyskano z tkanek 79 chorych z rakiem jamy ustnej leczonych w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie (Kierownik Kliniki dr hab. n. med. Bogumił Lewandowski, prof. UR) spośród materiału biologicznego chorych. Preparaty te zostały odrzucone w trakcie procesu preparacji próbek DNA, jako uniemożliwiające pozyskanie podwójnych próbek nieuszkodzonego, reaktywnego DNA, który mógł być poddany dalszym testom genetycznym. Preparaty laboratoryjne zostały przygotowane z blochków parafinowych materiału operacyjnego leczonych chorych, pozyskanego z Klinicznego Zakładu Patomorfologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. F. Chopina w Rzeszowie (Kierownik Zakładu dr hab. n. med. Ewa Kaznowska, prof. UR). Analizę laboratoryjną metylacji promotora genu *CDH1* przeprowadzono w Zakładzie Genetyki Medycznej Instytutu Pielęgniarstwa i Nauk o Zdrowiu Wydziału Medycznego Uniwersytetu Rzeszowskiego (Kierownik Zakładu prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik).

2. Preparatyka laboratoryjna próbek DNA i wyniki

Przygotowanie preparatów do badań biochemicznych było procesem żmudnym i wieloetapowym, absorbującym duże nakłady czasowe i finansowe.

Wyizolowanie DNA z tkanek raka i „czystych onkologicznie” tkanek marginesu operacyjnego, które po operacji zostały zatopione w bloczkach parafinowych, było procesem wymagającym uprzedniego odparafinowania zatopionych skrawków.

Procedurę odparafinowania badanych tkanek przeprowadzono w następującej sekwencji: do pociętych skrawków parafinowych o grubości 3 μm dodawano 1 ml ksyleny, próbkę worteksowano i inkubowano przez 15 minut w piecyku hybrydizacyjnym w temperaturze 56°C, następnie wirowano przez 15 minut z prędkością 12 000 obr./min, zlewano supernatant i usuwano ksylen. Czynności te powtarzano dwukrotnie. Kolejnym etapem było rozpuszczenie uzyskanego pelletu w 1 ml 98% etanolu, który był inkubowany w temperaturze pokojowej przez 5 minut, a następnie odwirowany z prędkością 12 000 obr./min przez 10 minut. Uzyskany nadsącz był poddawany suszeniu w wirówce próżniowej w temperaturze 45°C przez 20 minut.

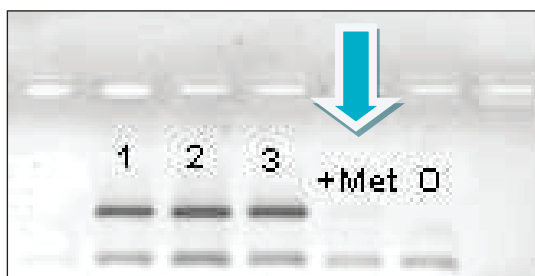
Kolejnym etapem przygotowania preparatów było poddanie odparafinowanej, suchej tkanki procesowi lizy. Pozyskaną w poprzednim etapie tkankę umieszczano w probówce Eppendorfa i dodawano 180 μl buforu ATL oraz 20 μl proteinazy K. Preparat poddawano inkubacji przez 48 godzin w temperaturze 56°C, po upływie 24 godzin ponownie dodawano 20 μl proteinazy K, po czym próbkę krótko wirowano, a następnie inkubowano przez 15 minut w temperaturze 70°C, celem dezaktywacji enzymu proteinazy K.

Następnym etapem przygotowania preparatów do analiz genetycznych była izolacja pozyskanego DNA na kolumnach. Do próbek dodawano 400 μl 99% etanolu, próbki worteksowano, wirowano, a zawartość próbki Eppendorfa przenoszono do kolumny QIAamp Spin Column, następnie wirowano przez 1 minutę z prędkością 8000 obr./min. Zawartość kolumn poddawano płukaniu buforami AW1 i AW2, poddając kolumnę wirowaniu po każdym dodaniu bufora. Usuwano przedsącz i centralnie na kolumnę nakrapiano 50 μl wody, krótko wirowano do 2000 obr./min, kolumnę odstawiano na 5 minut, a następnie uzyskane DNA wymywano z kolumny poprzez wirowanie przez 1 minutę z prędkością 8000 obr./min. Wymyty z kolumny roztwór zawierający DNA w ilości około 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dzielono na porcje i magazynowano w warunkach -80°C.

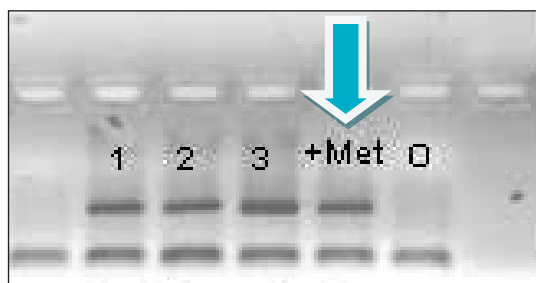
Tak pozyskane z preparatów parafinowych próbki DNA mogły zostać poddane dalszym badaniom, których celem było oznaczenie statusu metylacji regionu promotora genu *CDH1* w reakcji łańcuchowej polimerazy specyficznej wobec metylacji (Methylation – Specific PCR). Analiza ta polegała na dezaminacji próbki DNA przy użyciu dwusiarczku sodu. W reakcji tej niezmetylowane cytozyny zamieniane są na uracyl, a następnie w czasie reakcji PCR (Polymerase Chain Reaction) na tyminę, podczas gdy cytozyna metylowana pozostaje niezmieniona. W reakcji tej więc sekwencja zasad w analizowanym fragmencie DNA zostaje zmieniona, w zależności od tego, czy pierwotnie nie DNA zawierała, czy też nie zawierała metylowanej cytozyny.

Reakcję łańcuchową polimerazy specyficznej wobec metylacji (MSP) wykonuje się z użyciem starterów specyficznych zarówno dla zmetylowanego, jak i niezmetylowanego fragmentu promotora. Genomowy DNA wyizolowano z utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbek za pomocą zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen). DNA zmodyfikowano wodorosiarczkiem sodu i oczyszczono za pomocą zestawu Bisulfite Kit (Qiagen) EpiTect. Bisulfit poddany obróbce DNA powielono, stosując TaKaRa EpiTaq™ HS (Clontech) w następujący sposób: 1x bufor, 0,3 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 U polimeraza i 0,4 μM startery w całkowitej objętości 20 μl. Do amplifikacji produktów zastosowano dwa różne zestawy metylowanych i niemetylowanych starterów *CDH1*.

Amplifikację przeprowadzono w następujących warunkach: początkowa denaturacja w 95°C przez 15 minut, następnie 35 cykli z denaturacją w 95°C przez 30 sekund, hybrydyzacja w 57°C lub 55°C przez 30 sekund, i wydłużenie w 72°C przez 30 sekund, a następnie końcowe wydłużanie w 72°C przez 7 min. Zamplifikowane produkty rozdzielono w 2% żelu agarozowym (PB Genoplast Biochemicals) zabarwionym barwnikiem Green Midori (Nippon Genetics). Rozmiary metylowanych i niemetylowanych amplikonów wynosiły odpowiednio 116 par zasad i 97 par zasad.



Ryc. 6. Hemimetylacja próbek 1, 2, 3 i brak metylacji dla próbki +Met (brak prążka) oraz próbki kontrolnej 0



Ryc. 7. Hemimetylacja próbek 1, 2, 3 i całkowita metylacja próbki +Met (widoczny prążek) oraz brak prążka dla próbki kontrolnej 0

W tabeli XVIII przedstawiono sekwencję zasad w starterach, wielkość amplifikowanych fragmentów i zastosowaną temperaturę hybrydyzacji w reakcji łańcuchowej polimerazy specyficznej wobec metylacji (MSP).

Tabela XVIII. Sekwencje starterów, wielkość fragmentów i temperatura hybrydyzacji stosowane w MSP

Nazwa genu	Sekwencja starterów 5' – 3'	Rozmiar amplikonów	Temperatura wyżarzania
CDH1 zmetylowany	F: TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT R: TAACTAAAAATTCACCTACCGAC	116	57oC
CDH1 niezmetylowany	F: TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT R: CACAACCAATCAACAACACA	97	55oC

Drugim, równoległym torem przebiegał proces oznaczania w analizowanej grupie chorych infekcji wirusem HPV. Preparatyka laboratoryjna przebiegała wg następującej sekwencji:

Z tkanki dostarczonej w próbkach Eppendorfa izolowano DNA z użyciem zestawu GeneMATRIX DNA Purifikation Kit (Eurx nr kat. E3550). Zastosowano protokół B przeznaczony do izolacji DNA z fragmentów tkanek utrwalonych w parafinie. Do odparafinowanej tkanki dodawano bufor lizujący (Lyse T) i proteinazę K. Próbkę inkubowano w 56°C do całkowitego strawienia tkanki. Następnie do próbek dodano buforu Sol T i inkubowano próbki 10 min w 70°C. Po inkubacji dodano 96% etanol i wirowano próbki przez 1 min z prędkością 11 000 x g. Lizat naniesiono na minikolumnę i wirowa-

no. Następnie mini kolumnę, ze związanym DNA, przemywano dwukrotnie w buforach płuczących – Wash TX1 i Wash TX2. Ostatecznie DNA eluowano 50 µl buforu elucyjnego (Elution) podgrzanego do 70°C. Przy izolacji wykonano próbę ślepą bez tkanki, którą traktowano jak próbki badane. Tak uzyskane DNA przechowywano w –20°C.

W celu sprawdzenia jakości DNA i jego zdolności do amplifikacji wykonywano amplifikacje genu komórkowego B-globinę. Wszystkie próbki badane, z których izolowano DNA, uzyskały pozytywny wynik reakcji PCR na obecność genu B-globiny, kontrole ślepe uzyskały wynik negatywny, co świadczyło o poprawnej izolacji DNA z badanych próbek.

Wykrywanie DNA HPV z równoczesnym genotypowaniem wirusa wykonywano testem PapillomaStrip (firmy OPERON), który wykrywa i określa typy 19 genotypów HPV wysokiego i średniego ryzyka. Test opiera się na odwrotnej hybrydyzacji. Sondy położone są na paskach, które umieszcza się w rynienkach, a następnie do rynienek dodaje się produkt reakcji PCR i rozpoczyna procedurę hybrydyzacji. Test pozwala na wykrycie i genotypowanie następujących typów HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82. Mieszanka reakcyjna PCR zawierała: Mix PCR (Reag/PCR mix), startery (Reag/Primer) – komplementarne do region E6–E7 genomu HPV, polimerazę taq (Reag/Taq) oraz DNA pozyskane z próbek chorych.

Reakcje PCR przeprowadzono w warunkach 96°C, 5 min, następnie 40 cykli w temp. 94°C, 1 min, 58°C, 1 min, 72°C, 1 min, 72°C, 5 min, 8°C. Po zakończeniu reakcji PCR wykonywano hybrydyzację i reakcję barwną lub do czasu dalszych analiz przechowywano w temperaturze –20°C. Hybrydyzację i reakcję barwną wykonano wg protokołu dostarczonego przez producenta. Cała procedura przeprowadzona była w temperaturze 42°C zgodnie z protokołem. Podczas hybrydyzacji fragmenty sekwencji genów wiążą się specyficznie z odpowiadającymi im sondami genetycznymi unieruchomionymi na pasku testowym. Wykrywanie amplifikowanych fragmentów zhybrydizowanych z sondami wykorzystuje reakcję wiązania koniugatu (streptawidyny znakowanej peroksydazą) z biotyną, związaną z amplifikowanym fragmentem DNA, wbudowaną podczas reakcji PCR. Dodanie substratu dla peroksydazy (TMB) powoduje w obecności enzymu jego przekształcenie w niebieski precypitat, osadzający się w miejscu, gdzie nastąpiła hybrydyzacja. W końcowym etapie na pasku testowym występuje wzór wybarwień w formie prążków, który jest interpretowany z pomocą paska kontrolnego.

W analizowanej grupie testami laboratoryjnymi zbadano obecność infekcji tkanek nowotworowych jamy ustnej wirusem HPV, a wyniki badań zebrano w tabeli XIX.

Tabela XIX. Obecność infekcji HPV w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego

HPV Lokalizacja	HPV +	HPV –	Razem
Język	3 (3,8%)	13 (16,4%)	16 (20,2%)
Dno jamy ustnej	1 (1,3%)	16 (20,2%)	17 (21,4%)
Dziąsło	0 (0,0%)	21 (26,7%)	21 (26,7%)
Policzek	1 (1,3%)	6 (7,6%)	7 (8,8%)
Warga	3 (3,8%)	15 (19,0%)	18 (22,8%)
Razem	8 (10,1%)	71 (89,9%)	79 (100,0%)
$\chi^2 = 2,838p = 0.5852$			

W badanej grupie chorych, testami laboratoryjnymi rozpoznano infekcję komórek guza wirusem HPV u 10,1% badanych. Najczęściej dotyczyło to ognisk raka języka (3,8%) i raka wargi (3,8%). W tkankach guza języka wykryto HPV typu 31, 33 oraz 59, w raku wargi były to wirusy typu 16 i 33, w tkankach nowotworowych dna jamy ustnej rozpoznano typy 33, 45, 51 i 52, natomiast w raku policzka typy 16, 33 i 56. W eksplorowanej grupie nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności analizowanych danych ($p = 0.5852$).

W tabeli XX zestawiono dane dotyczące stopnia zróżnicowania komórek raka jamy ustnej ze stwierdzoną laboratoryjnie infekcją wirusem HPV.

Tabela XX. Infekcje HPV w zależności od stopnia zróżnicowania komórek raka jamy ustnej

HPV G	HPV +	HPV –	Razem
G1	1 (1,3%)	27 (34,1%)	28 (35,4%)
G2	5 (6,3%)	36 (45,6%)	41 (52,0%)
G3	2 (2,5%)	8 (10,1%)	10 (12,6%)
G4	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Razem	8 (10,1%)	71 (89,9%)	79 (100%)
$\chi^2 = 2,5859p = 0.2744$			

Z zebranych danych wynika, iż stwierdzona w testach genetycznych infekcja wirusem HPV najczęściej dotyczyła guzów o umiarkowanym stopniu zróżnicowania G2, których było 6,3%. Ponadto infekcję HPV stwierdzono w 2,5% guzów o niskim stopniu zróżnicowania komórkowego G3 oraz w 1,3% przypadków guzów wysoko zróżnicowanych G1. W badanej grupie chorych nie skonstatowano istotnej statystycznie zależności analizowanych danych ($p = 0.2744$).

W tabeli XXI zestawiono stopień zaawansowania raka jamy ustnej i rozpoznanej infekcji wirusem HPV.

Tabela XXI. Infekcja HPV w zależności od stopnia zaawansowania raka jamy ustnej

Stopień zaawan- sowania	0°	I°	II°	III°	IVa°	IVb°	IVc°	Razem
HPV +	0 (0%)	2 (2,5%)	2 (2,5%)	0 (0%)	4 (5,1%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (10,1%)
HPV -	0 (0%)	5 (6,3%)	13 (16,4%)	17 (21,4%)	29 (36,7%)	7 (8,8%)	0 (0%)	71 (89,9%)
Razem	0 (0%)	7 (8,8%)	15 (19,0%)	17 (21,4%)	33 (41,7%)	7 (8,8%)	0 (0%)	79 (100,0%)
$\chi^2 = 7,4939, p = 0.1119$								

Z danych zawartych w tabeli XXI wynika, że infekcja wirusem HPV najczęściej występuje w guzach o stopniu zaawansowania IVa (5,1%), które stanowiły 50% stwierdzonych infekcji HPV. W badanej grupie chorych nie zaobserwowano istotnej statystycznie zależności analizowanych danych ($p = 0.1119$).

Wyniki badań i analiza statystyczna zgromadzonych danych

1. Metody badań

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Rzeszowskiego, uchwałą Nr 14/01/2019, wyraziła zgodę na przeprowadzenie badania metylacji genu supresorowego *CDH1* w ramach projektu badawczego: „Molekularne zaburzenia w różnych typach nowotworów i chorobach o podłożu autoimmunologicznym”.

Analizowane zmienne obejmowały: dane demograficzne, obecność lub brak metylacji promotora genu *CDH1* w komórkach guza i w komórkach marginesu operacyjnego, dane dotyczące nałogowego palenia tytoniu i picia alkoholu przez chorych, umiejscowienie guza, okres obserwacji (jako czas całkowity od ostatniej wizyty w szpitalu), wystąpienie bądź niewystąpienie zgonu chorego, czas przeżycia, obecność lub brak miejscowej wznowy nowotworu, obecność lub brak przerzutów odległych i przerzutów do węzłów chłonnych, czas bez wystąpienia przerzutów odległych w okresie obserwacji, czas bez przerzutów do węzłów chłonnych w okresie obserwacji. Analizowano ponadto kliniczną i patomorfologiczną ocenę zaawansowania guza oraz stopnia zajęcia węzłów chłonnych, stopniowanie zaawansowania nowotworu w momencie operacji oraz stopień zróżnicowania nowotworu. Dodatkowo badano obecność lub brak infekcji HPV, a w przypadku stwierdzenia infekcji HPV – czy występuje jeden, czy wiele serotypów wirusa.

Uzyskane dane w postaci zmiennych opracowano z wykorzystaniem programu EXCEL 2010. Wykaz zmiennych i sposób ich kodowania przedstawia Tabela XXII.

Tabela XXII. Analizowane zmienne wraz z ich kodami liczbowymi

Kod zmiennej	Opis zmiennej	Kod zmiennej/sposób pomiaru
1	Metylacja promotora genu <i>CDH1</i> w obrębie guza	0 – brak, 1 – występuje
2	Metylacja promotora genu <i>CDH1</i> w obrębie zdrowej sąsiedniej tkanki	0 – brak, 1 – występuje
3	Wiek	W latach
4	Płeć	0 – męska, 1 – żeńska
5	Palenie tytoniu	0 – brak, 1 – występuje
6	Spożywanie alkoholu	0 – brak, 1 – występuje
7	Całkowity czas od ostatniej wizyty w szpitalu (okres obserwacji)	W miesiącach
8	Zgon pacjenta w okresie obserwacji	0 – nie wystąpił, 1 – wystąpił
9	Czas przeżycia w okresie obserwacji	W miesiącach
10	Wystąpienie miejscowej wznowy nowotworu	0 – brak, 1 – występuje
11	Czas wystąpienia miejscowej wznowy nowotworu od momentu operacji	W miesiącach
12	Wystąpienie przerzutów odległych	0 – brak, 1 – występuje
13	Czas bez wystąpienia przerzutów odległych w okresie obserwacji	W miesiącach
14	Wystąpienie przerzutów do węzłów chłonnych	0 – brak, 1 – występuje
15	Czas bez wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych w okresie obserwacji	W miesiącach
16	Ocena zaawansowania guza dokonana przez klinicystę	1 – 1, 2 – 2, 3 – 3, 4 – 4, 4a – 5
17	Ocena przerzutów do węzłów dokonana przez klinicystę	0 – 0, 1, 1, 2 – 2, 2b – 3
18	Lokalizacja guza w obrębie języka	0 – brak, 1 – występuje

Kod zmiennej	Opis zmiennej	Kod zmiennej/sposób pomiaru
19	Lokalizacja guza w obrębie dziąsła	0 – brak, 1 – występuje
20	Lokalizacja guza w obrębie wargi	0 – brak, 1 – występuje
21	Lokalizacja guza w obrębie dna jamy ustnej	0 – brak, 1 – występuje
22	Lokalizacja guza w obrębie policzka	0 – brak, 1 – występuje
24	Infekcja HPV	0 – brak, 1 – występuje
25	Szczepy HPV	0 – brak, 1 – pojedynczy, 2 – mnogie
26	Ocena zaawansowania guza dokonana przez patomorfologa	1 – 1, 2 – 2, 3 – 3, 4 – 4
27	Stopniowanie zaawansowania procesu nowotworowego w chwili operacji	0 – 0, 1, 1, 2 – 2
28	Ocena przerzutów do węzłów dokonana przez patomorfologa	0 – 0, 1, 1, 2 – 2
28	Ocena stopnia zróżnicowania guza	0 – 0, 1, 1, 2 – 2, 3 – 3

Zmienne po wstępnym opracowaniu i uporządkowaniu poddano analizie matematycznej z zastosowaniem programu Statistica 13.1. Do analizy częstości zastosowano test chi-kwadrat i test U Manna-Whitneya, a do analizy zmiennych ciągłych test U Manna-Whitneya. Zmienne ciągle charakteryzujące przebieg procesu terapeutycznego, w postaci czasu przeżycia, czasu bez wznowy miejscowej oraz czasu bez przerzutów odległych i bez przerzutów do węzłów chłonnych spełniały założenia analizy metodami zaawansowanych modeli liniowych i nieliniowych. Analizy te noszą ogólną nazwę analiz czasu przeżycia i bezawaryjności. Przeprowadzono je metodą Kaplana – Meiera. Metoda ta pozwala na uzyskanie prawdopodobieństwa przeżycia (trwania) bez wystąpienia zakładanego zjawiska (przerzut, wznowa, zgon) w okresie obserwacji. Wynik uzyskuje się jako mnożenie prawdopodobieństwa przeżyć kolejnych przedziałów czasowych, w tym przypadku miesięcy. Jako punkt końcowy przyjęto wystąpienie zjawiska (kod 1), jako punkt ucięcia – zakończenie obserwacji bez wystąpienia zjawiska (kod 0).

Po dokonaniu analizy na podstawie standardowych testów statystycznych, opartych na założeniach częstościowych (zmienna przyjmuje różne wartości w nieskończenie dużym zbiorze, a powtarzany odpowiednio często pomiar/eksperyment dostarcza wiedzy o rozkładzie prawdopodobieństwa przyjmowania danej wartości przez daną zmienną) przeprowadzono analizę bayesowską. Według twierdzenia Thomasa Bayesa określa się prawdopodobieństwo warunkowe, tj. stopień poparcia hipotezy a posteriori przez wyniki eksperymentu (pomiaru). Analiza ta wymaga poczynienia wstępnych założeń odnoszących się do prawdopodobieństwa hipotezy roboczej (a priori) w celu stworzenia modelu dla uzyskania prawdopodobieństwa zweryfikowanego danymi (a posteriori). W świetle danych eksperymentalnych (pomiarowych), prawdopodobieństwo a posteriori odpowiada prawdopodobieństwu danych przy założeniu hipotezy a priori, pomnożonemu przez dotychczasowe prawdopodobieństwo tej hipotezy i podzielonemu przez prawdopodobieństwo danych. Uzyskany wynik mieści się w przedziale 0–1, a za istotne uznaje się wartości $p > 0,5$. Ten sposób analizy statystycznej nie wymaga normalności rozkładu zmiennych w próbie, ani nie zakłada warunku ciągłości zmiennych; dobrze nadaje się do oceny wyników badań eksperymentalnych (Nowak R.: Statystyka dla fizyków. PWN, Warszawa 2002).

2. Wyniki analizy statystyki opisowej

Analizowane zmienne kwalifikowały się do przedstawienia w następujących skalach: interwałowej (wiek pacjentów w latach, czas przeżycia, czas bez wznowy, czas bez przerzutów liczone w miesiącach) oraz nominalnej (pozostałe zmienne). Warunkowało to sposób ich opracowania. Statystyki opisowe w postaci średniej arytmetycznej, mediany, odchylenia standardowego, minimum i maksimum były możliwe do przedstawienia jedynie w odniesieniu do zmiennych mierzonych w skali interwałowej w miesiącach lub latach.

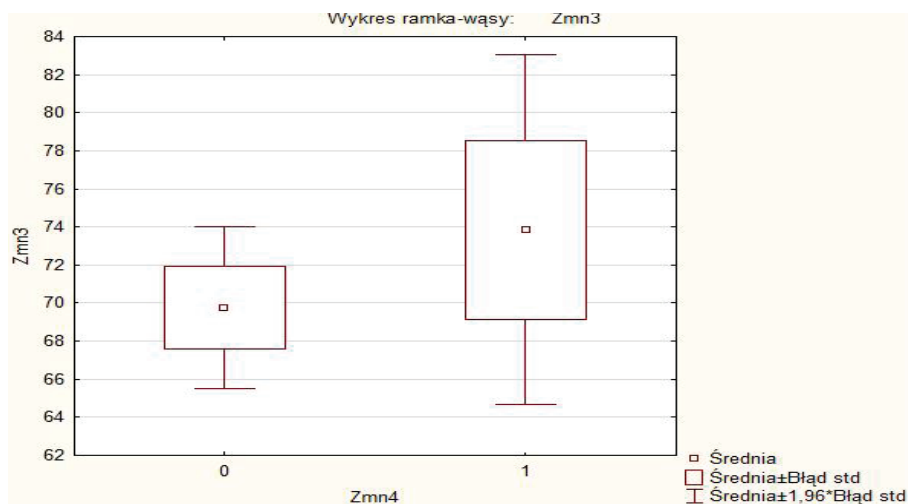
Analiza rozkładów zmiennych określanych w skali interwałowej przy wykorzystaniu testu Shapiro-Wilka i Lilieforsa wykazała, że poza wiekiem chorych nie spełniają one warunków rozkładu normalnego. Zatem o ile do analizy zmiennej w postaci wieku możliwe było zastosowanie testu t-Studenta, o tyle dla pozostałych zmiennych zastosowano zatem nieparametryczne testy dla par niezależnych U Manna-Whitney'a, par zależnych Wilcoxa oraz test chi-kwadrat.

W tabeli XXIII przedstawiono statystyki opisowe wieku pacjentów (w latach) z rozpoznaniem raka jamy ustnej z uwzględnieniem płci.

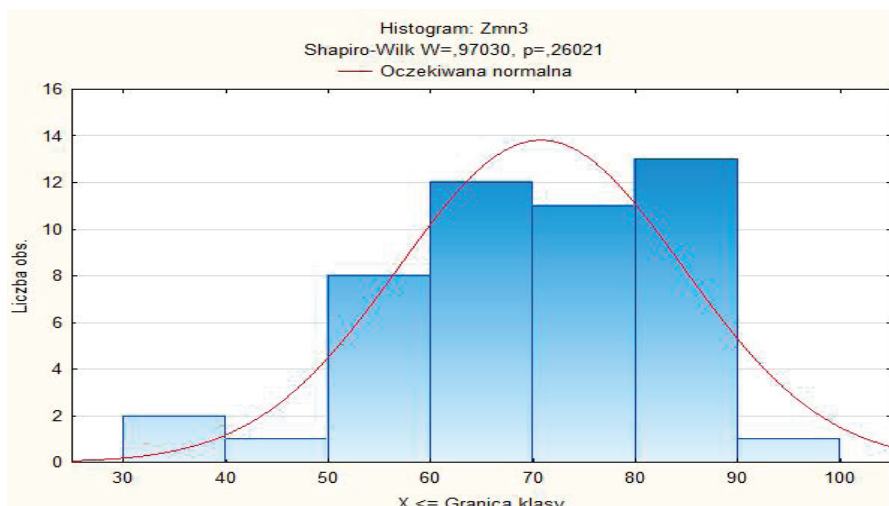
Tabela XXIII. Struktura wiekowa badanej populacji

Statystyka	Mężczyźni (N=58)	Kobiety (N=21)	Łącznie (N=79)
Średnia wieku	69,75	73,83	70,77
Odchylenie standardowe	13,068	16,24	13,86
Minimum	37	42	37,0
Maksimum	89	100	100

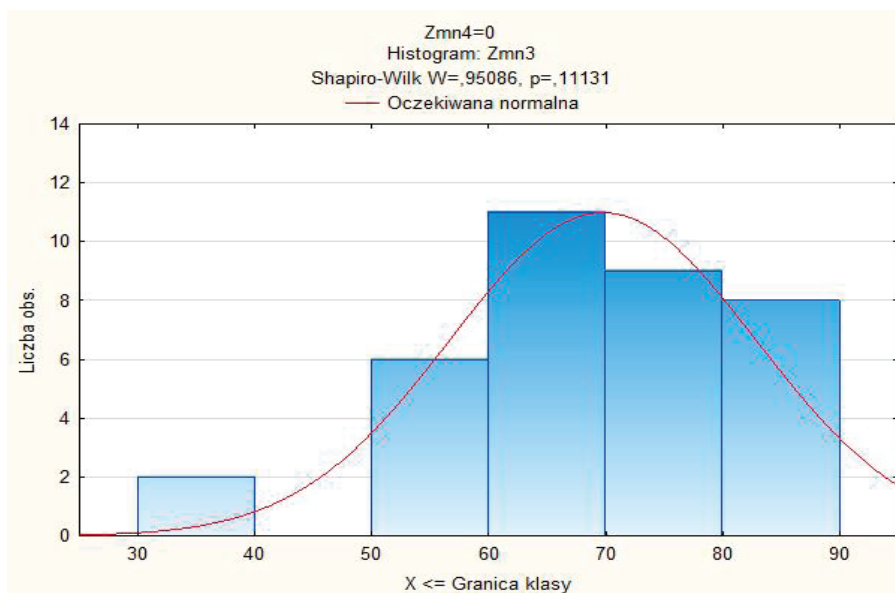
Jak wynika z danych tabeli XXIII średnia wieku kobiet była o 4 lata wyższa niż dla mężczyzn. Test t-Studenta wykazał, że różnica ta nie była znamienna statystycznie. Graficznie przedstawia to wykres 1.



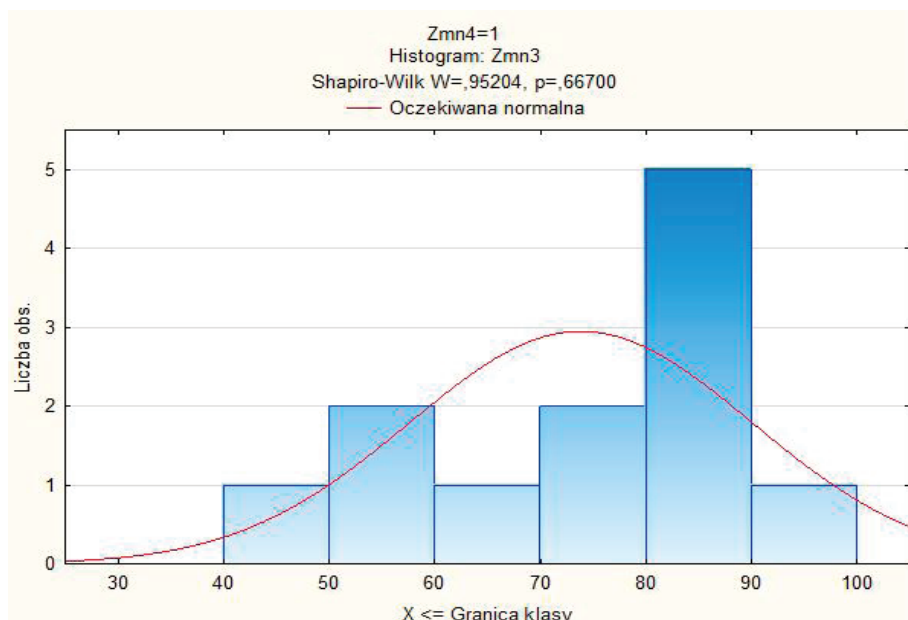
Wykres 1. Ramka-wąsy dla statystyki opisowej zmiennej 3 (wiek) względem zmiennej 4 (płeć). 0 – mężczyźni, 1 – kobiety. Z wykresu wynika, że rozrzut danych w postaci wieku był wśród kobiet znacznie bardziej rozproszony niż w grupie mężczyzn. Zatem pod względem wieku populacja mężczyzn była bardziej jednorodna



Wykres 2. Rozkład zmiennej w postaci wieku dla całości materiału wraz z wynikiem testu Shapiro-Wilk. Wartość $p = 0,26021$ wskazuje, że rozkład spełnia cechy rozkładu normalnego



Wykres 3. Rozkład zmiennej w postaci wieku dla mężczyzn wraz z wynikiem testu Shapiro-Wilk. Wartość $p = 0,11131$ wskazuje na to, że rozkład spełnia cechy rozkładu normalnego



Wykres 4. Rozkład zmiennej w postaci wieku dla kobiet wraz z wynikiem testu Shapiro-Wilk. Wartość $p = 0,667$ wskazuje, że rozkład spełnia cechy rozkładu normalnego

Występowanie metylacji promotora genu *CDH1* w guzie i zdrowej tkance sąsiadującej przedstawiono w tabeli XXIV.

Tabela XXIV. Występowanie metylacji promotora genu *CDH1* w guzie i zdrowej tkance sąsiadującej

Lokalizacja analizowanej tkanki	Liczba chorych		
	Kobiety (N=21)	Mężczyźni (N=58)	Ogółem (N=79)
Guz	14 (66,7%)	42 (72,4%)	56 (70,1%)
Zdrowa tkanka sąsiadująca z guzem	14 (66,7%)	41 (70,7%)	55 (69,6%)
$\chi^2 = 0,003p = 0.9560$			

Z danych ujętych w tabeli wynika, że spośród 58 mężczyzn z rakiem jamy ustnej hipermetylacja promotora genu *CDH1* w obrębie guza wystąpiła

u 42 chorych (72,4%), a w marginesie tkankowym u 41 chorych (70,7%). W grupie 21 kobiet zjawiska te wystąpiły odpowiednio u 14 pacjentek w tkankach guza (66,7%) i u 14 chorych w marginesie chirurgicznym (66,7%). Nie zawsze oba zjawiska obserwowano u tego samego chorego, najczęściej jednak pojawiały się one łącznie. W badanej grupie chorych nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności analizowanych danych ($p = 0.9560$).

Badani pacjenci w większości deklarowali częste picie alkoholu oraz palenie tytoniu. Obserwowana nadreprezentacja mężczyzn nadużywających alkoholu oraz mężczyzn i kobiet palących tytoń była znamienna (Aneks, tabela 2). Można zatem wysunąć tezę, że częstsze występowanie metylacji w guzie i w tkankach jest powiązane z nadużywaniem alkoholu i paleniem tytoniu. Ze statystyki chi-kwadrat wynika, że w grupie palaczy i pijących alkohol występuje istotna statystycznie nadreprezentacja hipermetylacji genu (Aneks, tabela 3). W teście korelacji rangowych Spearmana nie zaobserwowano istotnej korelacji pomiędzy wiekiem chorego a wystąpieniem lub niewystąpieniem metylacji (Aneks, tabela 4). Analiza Bayesa nie potwierdziła związku pomiędzy hipermetylacją promotora genu *CDH1* a wiekiem chorego, piciem alkoholu czy paleniem tytoniu (Aneks, tabela 20).

Następnie zbadano związek występowania hipermetylacji promotora genu *CDH1* w guzie z lokalizacją guza. Wyniki zestawiono w tabeli XXV.

Tabela XXV. Częstość występowania raka jamy ustnej w poszczególnych lokalizacjach ogółem i w podgrupach według metylacji promotora genu *CDH1* w guzie

Lokalizacja guza	Liczba obserwacji		
	Brak metylacji genu <i>CDH1</i>	Metylacja genu <i>CDH1</i>	Razem
Język	5 (6,3%)	11 (13,9%)	16 (20,2%)
Dno jamy ustnej	6 (7,6%)	11 (13,9%)	17 (21,4%)
Dziąsło	4 (5,1%)	17 (21,4%)	21 (26,7%)
Policzek	2 (2,5%)	5 (6,3%)	7 (8,8%)
Warga	6 (7,6%)	12 (15,2%)	18 (22,8%)
Razem	23 (29,1%)	56 (70,9%)	79 (100%)
$\chi^2 = 1,5374p = 0.8200$			

Analiza danych dotyczących lokalizacji guza w powiązaniu z hipermetylacją genu *CDH1* pozwala stwierdzić, iż w każdej z badanych lokalizacji co najmniej dwukrotnie częściej obserwowano hipermetylację w DNA komórek nowotworu, a w rakach dziąsła przypadków takich było 4-krotnie więcej. Wyniki badań genetycznych nie znajdują odzwierciedlenia w analizie istotności statystycznej ($p = 0.8200$), co implikuje wniosek, iż żadna lokalizacja OSCC nie predysponuje do statystycznie istotnej częstości wystąpienia zjawiska hipermetylacji. Wnioski kliniczne są jednak istotne, w szczególności z danymi przedstawionymi poniżej.

Podobne zestawienie danych dokonano, analizując hipermetylację genu *CDH1* w DNA komórek marginesu operacyjnego. Wyniki zebrano w tabeli XXVI.

Tabela XXVI. Częstość występowania raka jamy ustnej w poszczególnych lokalizacjach ogółem i w podgrupach według metylacji promotora genu *CDH1* w marginesie tkankowym

Lokalizacja guza	Liczba obserwacji		
	Brak metylacji genu <i>CDH1</i>	Metylacja genu <i>CDH1</i>	Razem
Język	5 (6,3%)	11 (13,9%)	16 (20,2%)
Dno jamy ustnej	6 (7,6%)	11 (13,9%)	17 (21,4%)
Dziąsło	5 (6,3%)	16 (20,2%)	21 (26,7%)
Policzek	2 (2,5%)	5 (6,3%)	7 (8,8%)
Warga	6 (7,6%)	12 (15,2%)	18 (22,8%)
Razem	24 (30,4%)	55 (69,6%)	79 (100%)
$\chi^2 = 0,7135p = 0.9496$			

Analogiczna interpretacja danych dotyczących lokalizacji guza w powiązaniu z hipermetylacją genu *CDH1* w DNA komórek marginesu operacyjnego pozwala stwierdzić, iż w każdej z badanych lokalizacji co najmniej dwukrotnie częściej obserwowano hipermetylację w DNA komórek zdrowych, natomiast w przypadkach raków dziąsła odnotowano 3-krotnie więcej hipermetry-

lacji genu *CDH1*. Wyniki badań genetycznych nie znajdują odzwierciedlenia w analizie istotności statystycznej ($p = 0.9496$), jednak wnioski kliniczne wydają się być interesujące, sugerując, iż stwierdzona hipermetylacja genu *CDH1* w zdrowych komórkach jest 98,2% zbieżna z wynikami hipermetylacji genu *CDH1* w komórkach raka. Taka zbieżność wyników mogłaby być podstawą do stworzenia testów epigenetycznych i biomarkerów epigenetycznych, pozwalających na wczesne wykrywanie OSCC w badaniach przesiewowych, zwłaszcza wśród pacjentów z grup wysokiego ryzyka.

Infekcje HPV wykazano w 8 przypadkach, w tym w 5 pojedynczym, w 3 przypadkach mnogimi szczepami wirusa.

Tabela XXVII przedstawia częstość występowania infekcji HPV w podgrupach według metylacji promotora genu *CDH1*.

Tabela XXVII. Obecność infekcji HPV w podgrupach według metylacji promotora genu *CDH1* w guzie

Infekcja HPV	Liczba obserwacji		
	Brak metylacji genu <i>CDH1</i>	Metylacja genu <i>CDH1</i>	Razem
HPV –	22 (27,8%)	49 (62,1%)	71 (89,9%)
HPV +	1 (1,3%)	7 (8,8%)	8 (10,1%)
Razem	23 (29,1%)	56 (70,9%)	79 (100%)
$\chi^2 = 1,1905p = 0.2752$			

Można zauważyć, że u mężczyzn występuje nadreprezentacja zakażenia HPV, a ponadto w grupie z metylacją guza występuje nadreprezentacja zakażenia HPV. Test chi-kwadrat nie znalazł zastosowania w testowaniu tych prawidłowości z powodu zbyt małej liczebności. Test U Manna-Whitneya nie wykazał istotności różnic, co do częstości występowania zakażenia wirusem HPV w podgrupach według płci oraz występowania/braku metylacji genu *CDH1* ($p = 0.2752$). Zagadnienia te mogą być przedmiotem dalszych badań w przypadku zwiększenia próby badanej w przyszłości.

Wystąpienie miejscowej wznowy nowotworu odnotowano u 12 pacjentów, w tym u 10 mężczyzn i 2 kobiet. Test chi-kwadrat (Aneks, tabela 8) potwierdził istotność nadreprezentacji mężczyzn w podgrupie ze wznową miejscową.

Analiza metodą Bayesa wykazała, że wystąpienie wznowy miejscowej istotnie wiązało się z wiekiem pacjenta (Aneks, tabela 22). Z analizy korelacji rangowych Spearmana wynika, że korelacja ta była ujemna, tj. im młodszy wiek chorego, tym częściej obserwowana wznowa miejscowa, aczkolwiek wynik testu Spearmana nie był istotny.

Tabela XXVIII. Częstość występowania wznowy miejscowej w podgrupach według hipermetylacji promotora genu *CDH1* w guzie

Statystyka	Brak metylacji genu <i>CDH1</i>	Metylacja genu <i>CDH1</i>	Razem
Brak wznowy	19 (24,0%)	48 (60,8%)	67 (84,8%)
Wznowa	4 (5,1%)	8 (10,1%)	12 (15,2%)
Razem	23 (29,1%)	56 (70,9%)	79 (100%)
$\chi^2 = 0,1221, p = 0.7268$			

Analiza danych zebranych w tabeli XXVIII pozwala stwierdzić, iż wznowa miejscowa po pierwotnej operacji raka kłczystokomórkowego jamy ustnej wystąpiła u 12 chorych (15,2%). U 8 chorych (66,7%) z hipermetylacją genu *CDH1* w DNA komórek raka oraz u 4 (33,3%) bez stwierdzonej hipermetylacji. Odnotowano więc dwukrotnie większą częstość wystąpienia wznowy miejscowej wśród pacjentów ze stwierdzoną hipermetylacją genu *CDH1* w odniesieniu do pacjentów bez stwierdzonej hipermetylacji. Badanie statystyczne nie potwierdza istotności zestawionych danych ($p = 0.7268$), jednak implikacje kliniczne skutkują czujniejszą postawą lekarza w stosunku do pacjentów onkologicznych ze stwierdzoną hipermetylacją genu *CDH1* w komórkach guza, bowiem może to skutkować większą szansą na wznowę miejscową procesu nowotworowego. Podobnego zestawienia danych dokonano w odniesieniu do hipermetylacji w marginesie operacyjnym. Dane zebrano w tabeli XXIX.

Dane zebrane w tabeli, dotyczące wznów procesu nowotworowego po operacji pierwotnej prezentują bardziej równomierny rozkład chorych w grupach ze stwierdzoną hipermetylacją genu *CDH1* w DNA komórek zdrowych marginesu operacyjnego, których było 7/12, oraz chorych bez metylacji, których odnotowano 5/12. Wyniki analizy statystycznej potwierdzają ten rozkład i brak istotności statystycznej ($p = 0.3559$).

Tabela XXIX. Częstość występowania wznowy w podgrupach według hipermetylacji promotora genu *CDH1* w marginesie tkankowym

Statystyka	Brak metylacji genu <i>CDH1</i>	Metylacja genu <i>CDH1</i>	Razem
Brak wznowy	19 (24,0%)	48 (60,8%)	67 (84,8%)
Wznowa	5 (6,3%)	7 (8,8%)	12 (15,2%)
Razem	24 (30,4%)	55 (69,6%)	79 (100%)
$\chi^2 = 0,8522, p = 0.3559$			

Czas wystąpienia wznowy miejscowej nowotworu według płci chorych przedstawiono w tabeli XXX.

Tabela XXX. Czas wystąpienia wznowy miejscowej nowotworu w miesiącach obserwacji dla materiału ogółem i w podgrupach według płci

Statystyka	Mężczyźni (N=58)	Kobiety (N=21)	Razem (N=79)
Średnia	74,19	78,5	75,27
Odchylenie standardowe	15,07	3,73	13,26
Minimum	0	0	0
Maksimum	80,0	80,0	80,0

Test U Manna –Whitneya wykazał, że różnica średniej w czasie wystąpienia wznowy miejscowej pomiędzy mężczyznami i kobietami nie była istotna statystycznie (Aneks, tabela 9). W tabeli XXXI przedstawiono dane dotyczące wznowy miejscowej raka jamy ustnej w zależności do stwierdzonej w badaniach genetycznych metylacji genu *CDH1* w komórkach nowotworu i komórkach prawidłowych z marginesu operacyjnego.

Test U Manna –Whitneya wykazał, że różnica średniej w czasie wystąpienia wznowy miejscowej pomiędzy podgrupami według metylacji genu *CDH1* nie była istotna statystycznie (Aneks, tabela 10). Podobnie brak istotnej różnicy stwierdzono w odniesieniu do zmiennej 2 (metylacja promotora genu *CDH1* w otaczającej sąsiedniej tkance – Aneks, tabela 11).

Tabela XXXI. Czas wystąpienia wznowy miejscowej nowotworu dla materiału ogółem i w podgrupach według braku/obecności metylacji genu *CDH1* w guzie i w otaczającej sąsiedniej tkance

Statystyka	Brak metylacji		Metylacja	
	W guzie (N=23)	W sąsiedztwie (N=24)	W guzie (N=56)	W sąsiedztwie (N=55)
Średnia	78,25	77,2	73,78	74,39
Odchylenie standardowe	3,49	4,46	15,93	15,72
Minimum	0	0	0	0
Maksimum	80,0	80,0	80,0	80,0

Dane dotyczące wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych w zależności od hipermetylacji genu supresorowego *CDH1* w guzie prezentuje tabela XXXII.

Tabela XXXII. Częstość występowania przerzutów do węzłów chłonnych w podgrupach według metylacji promotora genu *CDH1* w guzie

Statystyka	Brak metylacji genu <i>CDH1</i>	Metylacja genu <i>CDH1</i>	Razem
Brak przerzutów	19 (24,0%)	39 (49,4%)	58 (73,4%)
Obecne przerzuty	4 (5,1%)	17 (21,4%)	21 (26,6%)
Razem	23 (29,1%)	56 (70,9%)	79 (100%)
$\chi^2 = 1,4044$, $p = 0.02359$			

Z danych zawartych w tabeli XXXII wynika, że spośród 21 chorych, u których zaobserwowano przerzuty do węzłów chłonnych szyi po pierwotnej operacji onkologicznej, hipermetylacja genu supresorowego *CDH1* wystąpiła u 17 chorych (80,9%), natomiast w podgrupie bez metylacji do przerzutów do węzłów chłonnych doszło tylko u 4 chorych (19,1%). Wynik testu chi-kwadrat wykazał, że nadreprezentacja chorych z przerzutami do węzłów chłonnych w podgrupie, w której wykazano zjawisko hipermetylacji promotora genu

CDH1, była znamienna statystycznie (Aneks, tabela 15), tzn. w podgrupie, w której wystąpiła metylacja, ryzyko przetrzutu do węzła chłonnego jest istotnie statystycznie większe ($p = 0.02359$).

Podobnego zestawienia danych dokonano dla grupy, w której analizowano hipermetylację genu *CDH1* w DNA komórek marginesu operacyjnego, wolnego od nacieku raka. Wyniki zestawiono w tabeli XXXIII.

Tabela XXXIII. Częstość występowania przerzutów do węzłów chłonnych w podgrupach według metylacji promotora genu *CDH1* w marginesie operacyjnym

Statystyka	Brak metylacji genu <i>CDH1</i>	Metylacja genu <i>CDH1</i>	Razem
Brak przerzutów	18 (22,8%)	40 (50,6%)	58 (73,4%)
Obecne przerzuty	6 (7,6%)	15 (19,0%)	21 (26,6%)
Razem	24 (30,4%)	55 (69,6%)	79 (100%)
$\chi^2 = 0,0442, p = 0.8334$			

Analogiczna interpretacja danych dotyczących rozpoznania przerzutów do lokoregionalnych węzłów chłonnych szyi po pierwotnej operacji raka jamy ustnej, w powiązaniu z hipermetylacją genu *CDH1* w DNA komórek marginesu operacyjnego pozwala stwierdzić, iż hipermetylację w DNA komórek zdrowych odnotowano u 15 spośród 21 chorych (71,4%), u których stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych szyi, natomiast w 6 przypadkach (28,6%) hipermetylacji genu *CDH1* nie odnotowano. Wyniki badań genetycznych nie znajdują odzwierciedlenia w analizie istotności statystycznej ($p = 0.8334$), jednak wnioski kliniczne wydają się być istotne, sugerując, iż stwierdzona hipermetylacja genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej pozwala z dużym prawdopodobieństwem prognozować wystąpienie przerzutów do lokoregionalnych węzłów chłonnych szyi po pierwotnej operacji onkologicznej w jamie ustnej. Wiedza taka może być wykorzystana dwutorowo: w klinicznym planowaniu pierwotnej operacji węzłowej, sugerując zwiększenie zakresu pierwotnej operacji węzłowej oraz w okresie pooperacyjnym egzekwować krótsze okresy między wizytami kontrolnymi w tej grupie chorych, w której stwierdzono hipermetylację genu *CDH1* w DNA komórek raka, pozyskanych z wyćinka tkankowego bądź z materiału operacyjnego.

Średni czas bez przerzutów do węzłów chłonnych wyniósł 6,58 miesiąca. W podgrupie bez hipermetylacji promotora genu *CDH1* wyniósł on 9,25 miesiąca, w podgrupie z hipermetylacją genu *CDH1* – 5,25 miesiąca. Test U Manna-Whitneya nie wykazał istotności statystycznej pomiędzy tymi parametrami. Istotności statystycznej nie wykazano także względem płci ani hipermetylacji promotora genu *CDH1* w komórkach guza, ani w marginesie tkankowym. Wnioski statystyczne nie są jednak istotne dla przebiegu klinicznego choroby nowotworowej, z uwagi na fakt, że 4 miesiące różnicy w rozwoju choroby nowotworowej stanowią bardzo istotny czas na wdrożenie właściwego leczenia onkologicznego, przekładającego się na odległe wyniki i długość życia leczonych chorych z kolczystokomórkowym rakiem jamy ustnej.

Współczynnik korelacji rangowej Spearmana pomiędzy zmiennymi 12 (obecność przerzutów odległych) a 14 (obecność przerzutów do węzłów chłonnych) wyniósł 0,33 i był statystycznie istotny. Oznacza to, że wraz z pojawieniem się przerzutów do węzłów chłonnych istotnie rośnie ryzyko przerzutów odległych. Jednoczesny przerzut odległy oraz do węzłów chłonnych wystąpił u 2 chorych z hipermetylacją genu *CDH1*, tylko do węzłów chłonnych u 15, a tylko odległe u 1 chorego, na 21 chorych, u których wykazano metylację genu *CDH1*. Test chi-kwadrat nie wykazał tu istotnych różnic. Wynika z tego, że ryzyko przerzutu odległego i przerzutu do węzła chłonnego, aczkolwiek statystycznie koreluje, to nie ma związku z hipermetylacją genu. Należy jednak podkreślić, że podgrupy były bardzo nieliczne.

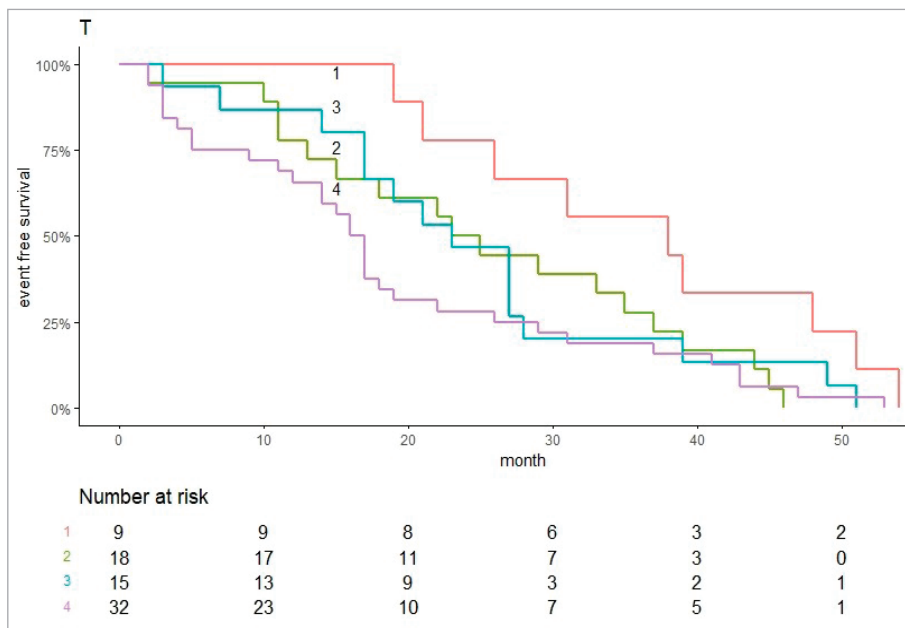
Obecność przerzutów odległych stwierdzono w 4 przypadkach. Dwa z nich wystąpiły w podgrupie, w której wystąpiła także hipermetylacja promotora genu *CDH1*, a kolejne dwa w podgrupie, w której metylacji nie wykazano. Test U Manna-Whitneya nie ujawnił, aby różnica pomiędzy podgrupami była statystycznie znamienne, tzn. względnie wyższa częstość występowania przerzutów odległych w podgrupie bez metylacji nie była istotna statystycznie (Aneks, tabela 12). Podobnie brak istotnej różnicy stwierdzono w odniesieniu do zmiennej 2 (metylacja promotora genu *CDH1* w otaczającej sąsiedniej tkance – Aneks, tabela 13). Wynik ten potwierdziła analiza metodą Bayesa (Aneks, tabela 21).

Wiek chorego istotnie korelował z wystąpieniem przerzutów odległych i była to korelacja ujemna o wartości $-0,32$ (Aneks, tabela 4). Oznacza to, że im młodszy pacjent, tym ryzyko przerzutu odległego większe. Bardzo mocnego poparcia tej hipotezie a priori dostarczyła analiza metodą Bayesa, a obliczone prawdopodobieństwo związku przerzutu z wiekiem wyniosło 0,8719460 (Aneks, tabela 21).

Kolejnym zagadnieniem podlegającym analizie statystycznej było badanie czasów przeżycia w odniesieniu do zmiennych ciągłych charakteryzujących przebieg procesu terapeutycznego w okresie obserwacji.

Średni czas obserwacji wyniósł 30,17 miesiąca, minimalny 1 miesiąc, a maksymalny 138 miesięcy. Dla mężczyzn wyniósł on odpowiednio: 30,69 miesiąca, 3 miesiące, 88 miesięcy, dla kobiet: 28,58 miesięcy, 1 miesiąc, 138 miesięcy.

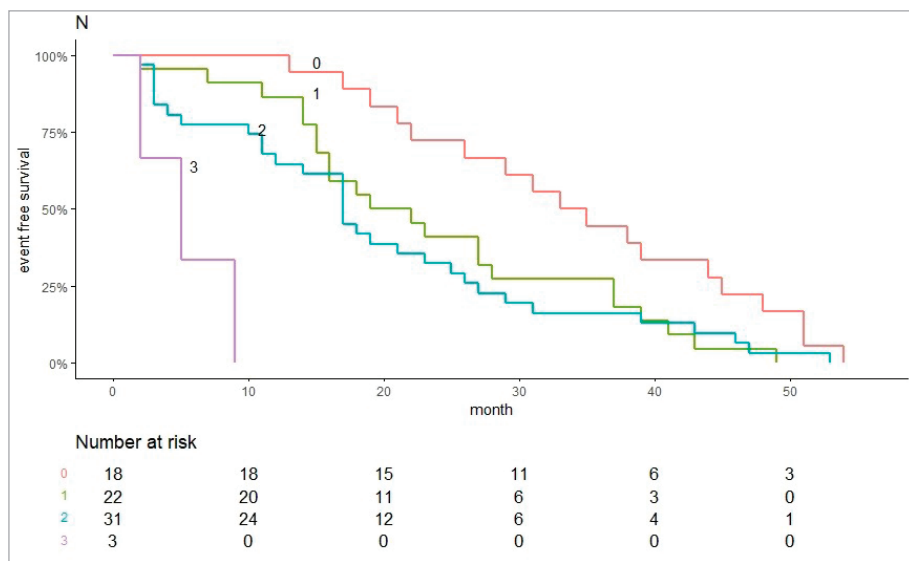
Statystyczną szansę na przeżycie chorego w odniesieniu do wielkości guza (cecha T) przedstawiono na wykresie 5.



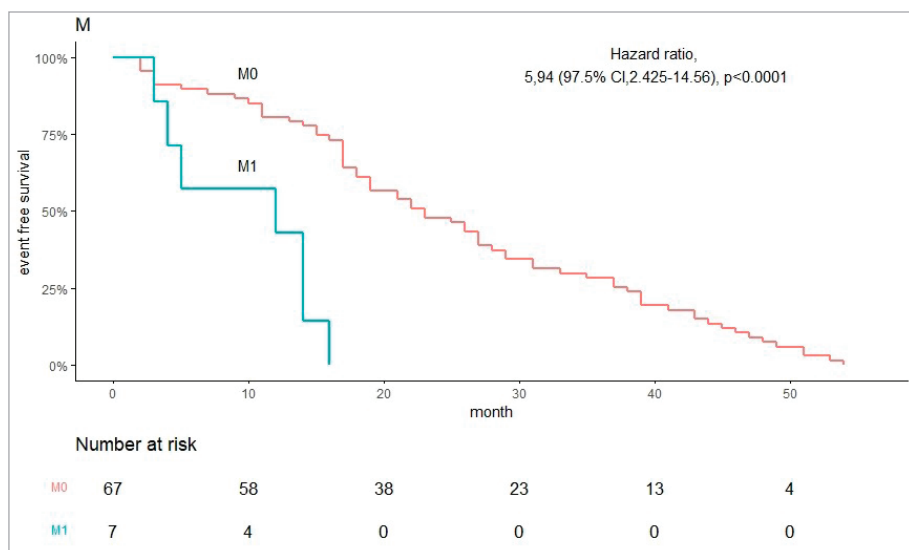
Wykres 5. Przeżycia chorych w zależności do wielkości guza (cecha T)

Przedstawione graficznie dane potwierdzają obserwacje kliniczne i zależność wprost proporcjonalną, czyli im mniejszy guz pierwotny, tym większa szansa na dłuższe przeżycie chorego. Podobnej analizy graficznej dokonano na podstawie stanu lokoregionalnych węzłów chłonnych szyi i leczonych chorych. Wyniki zebrano na wykresie 6.

Dane przedstawione graficznie na wykresie 6 potwierdzają najkrótszy czas przeżycia chorych z węzłami szyi N3 oraz największą szansę na przeżycie chorych z węzłami chłonnymi szyi N0. Graficzne szanse na przeżycie chorych z cechą M, czyli przerzutami odległymi przedstawiono na wykresie 7.



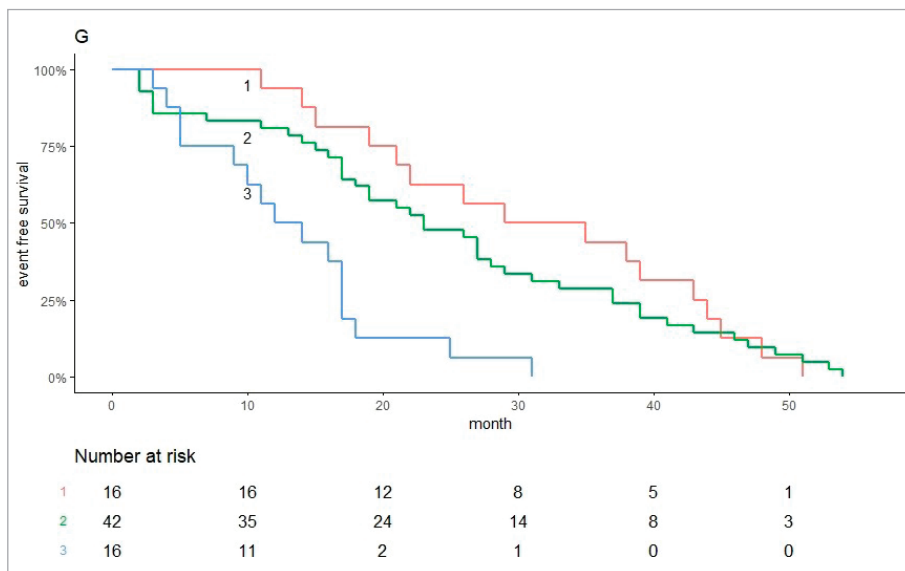
Wykres 6. Przeżycia chorych w zależności od stanu węzłów chłonnych szyi (cecha N)



Wykres 7. Przeżycia chorych w zależności od przerzutów odległych (cecha M)

Dane przedstawione graficznie na wykresie 7 potwierdzają zależność kliniczną większej statystycznej szansy na przeżycie chorego w przypadkach, gdy nie rozpoznano przerzutu odległego.

Estymatorem Kaplana-Meiera zbadano statystyczną szansę przeżycia chorych w zależności od stopnia zróżnicowania komórkowego raka jamy ustnej (cecha G), a wyniki przedstawiono na wykresie 8.



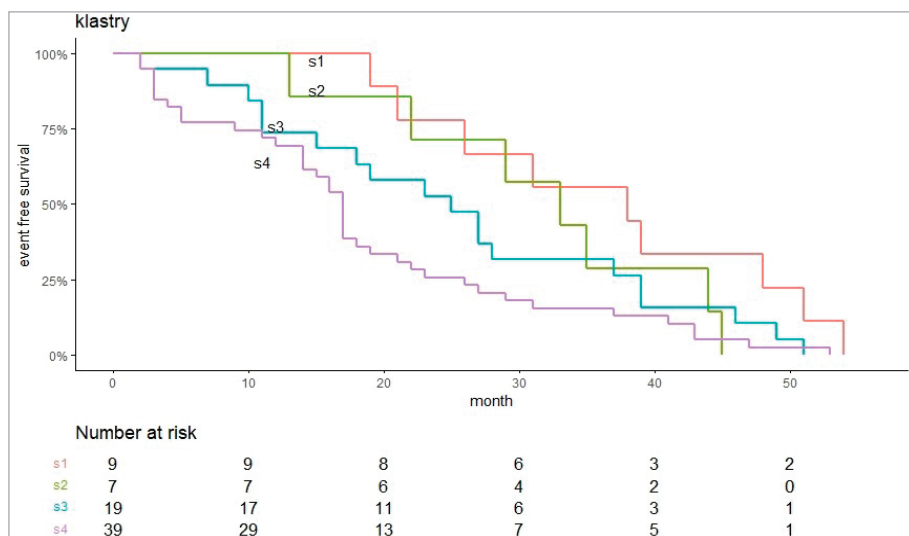
Wykres 8. Przeżycia chorych w zależności od stopnia zróżnicowania komórkowego raka jamy ustnej (cecha G)

Analiza danych zebranych w formie graficznej na wykresie 8 pozwala dostrzec zależność wyższego stopnia dojrzałości komórek OSCC z większą szansą na dłuższe przeżycie chorego. Niskozróżnicowane raki jamy ustnej skutkują krótszym przeżyciem chorych.

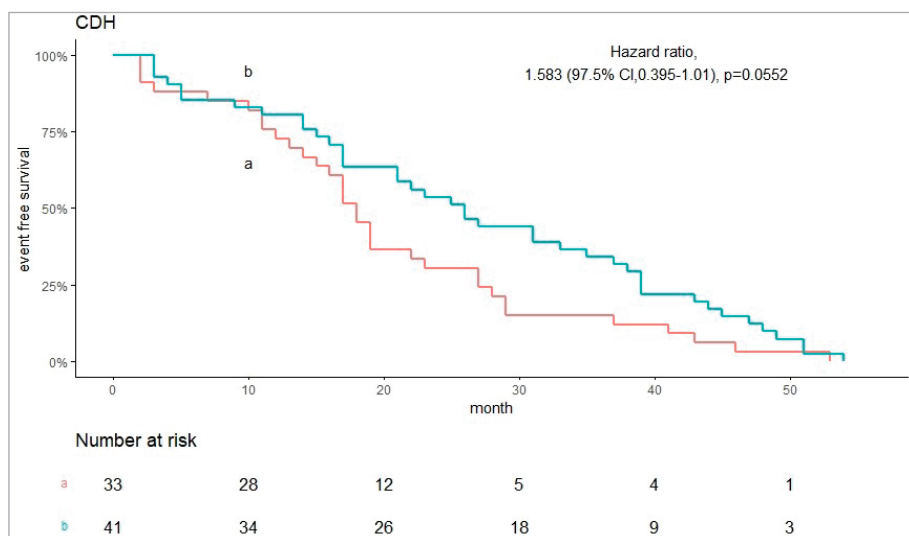
Szansę przeżycia operowanych z powodu OSCC chorych analizowano również w zestawieniu ze stopniem zaawansowania klinicznego, a zebrane wyniki przedstawiono graficznie na wykresie 9.

Analiza danych zebranych na wykresie 9 pozwala zauważyć wyższą statystyczną szansę na przeżycie chorych z I stopniem zaawansowania choroby nowotworowej, która maleje wraz z rosnącym stopniem zaawansowania raka jamy ustnej.

Zależność statystycznej szansy na przeżycie chorego z rakiem jamy ustnej i wykrytej hipermetylacji genu *CDH1* w DNA komórek raka przedstawiono graficznie na wykresie 10.



Wykres 9. Przeżycia chorych w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego raka jamy ustnej (S – staging)



Wykres 10. Przeżycia chorych w zależności od wykrytej hipermetylacji genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej

Przedstawione graficznie dane ilustrują zależność większej statystycznej szansy na przeżycie wśród chorych, u których nie stwierdzono hipermetylacji genu *CDH1*.

Zgon w okresie obserwacji odnotowano w 34 przypadkach (43,0%). W grupie tej było 25 mężczyzn (73,5%) i 9 kobiet (26,5%). Stosunek kobiet do mężczyzn wyniósł 1:3.

Wystąpienie zgonu korelowało istotnie z pojawieniem się miejscowej wznowy (dodatnio), czasem wystąpienia miejscowej wznowy nowotworu od momentu operacji (ujemnie), stwierdzeniem przerzutów odległych (dodatnio) oraz czasem bez wystąpienia przerzutów odległych (ujemnie). Wszystkie korelacje miały wartość 0,3–0,4, co jest związkiem średnio silnym (Aneks, tabela 4). Ponadto zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stopniowaniem zaawansowania guza dokonywanym przez klinicystę (zmienna 18) a wystąpieniem zgonu, tj. im bardziej zaawansowane stadium rozpoznawał lekarz, tym częściej notowano zgon. Korelacja z wiekiem była ujemna, tj. częściej zgon dotyczył ludzi młodszych.

Wyniki przedstawia tabela XXXIV.

Tabela XXXIV. Wiek chorych w podgrupach według zdarzenia w postaci wystąpienia lub niewystąpienia zgonu

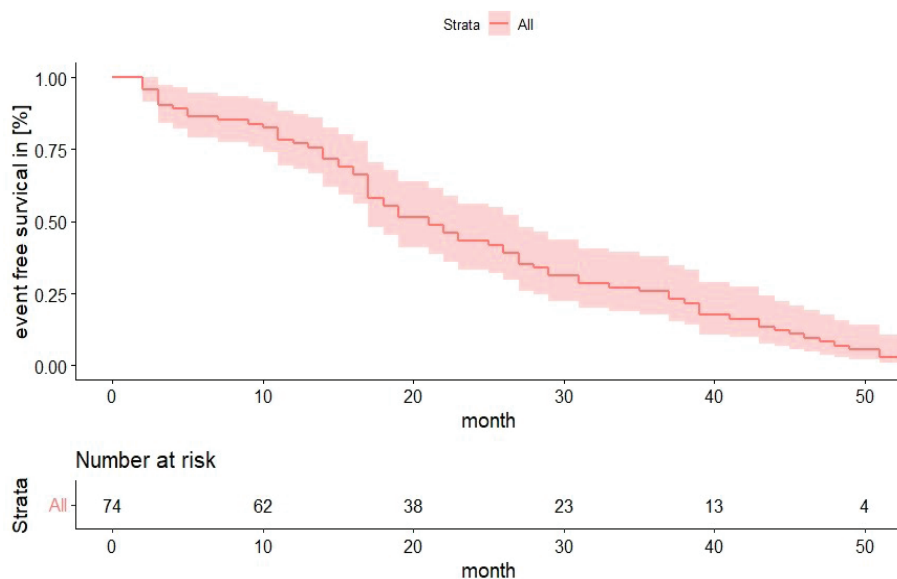
Statystyka	Niewystąpienie zgonu (N=45)	Wystąpienie zgonu(N=34)	Razem (N=79)
Średnia wieku	73,77	65,29	70,77
Odchylenie standardowe	12,15	15,41	13,86
Minimum	39,0	37,0	37,0
Maksimum	89,0	100,0	100

Średnia wieku w podgrupie pacjentów, u których wystąpił zgon w okresie obserwacji, była o ok. 8 lat niższa w porównaniu z grupą, w której odnotowano przeżycie w okresie obserwacji. W celu potwierdzenia tego spostrzeżenia wykonano test U Manna-Whitneya dla zmiennej w postaci wieku, przy zmiennej grupującej w postaci wystąpienia lub niewystąpienia zgonu. Wynik testu wykazał, że istnieje statystyczna różnica pomiędzy tymi średnimi, a zatem pacjent, u którego wystąpi zgon w okresie obserwacji jest istotnie młodszy (Aneks, tabela). Czas przeżycia chorych w okresie obserwacji (zmienna 9) przedstawiono w tabeli XXXV.

Tabela XXXV. Czas przeżycia w miesiącach dla materiału ogółem i w podgrupach według płci

Statystyka	Mężczyźni (N=58)	Kobiety (N=21)	Łącznie (N=79)
Średnia	53,53	55,42	54,0
Odchylenie standardowe	12,4	7,53	11,33
Minimum	0	42,0	0
Maksimum	60,0	60,0	60,0

Dane w formie graficznej przedstawiono na wykresie 11.



Wykres 11. Przeżycia chorych w zależności od czasu od operacji pierwotnej raka jamy ustnej

Test U Manna-Whitneya wykazał, że czas przeżycia kobiet i mężczyzn nie różnił się istotnie (Aneks, tabela 7). Czas przeżycia w okresie obserwacji korelował istotnie dodatnio z wiekiem pacjenta (Aneks, tabela 4), co potwierdza, że dłuższe przeżycia dotyczyły pacjentów starszych.

Omówienie wyników i dyskusja

Obserwowany na świecie stały wzrost populacji ludzkiej, o około 76 milionów mieszkańców Ziemi rocznie, stały rozwój wiedzy medycznej, postępy w rozwoju farmakologii oraz coraz większe możliwości terapeutyczne tworzone przez nauki inżynieryjne i teleinformatyczne, przyczyniają się w znaczący sposób do stałego wydłużania się czasu życia ludzi w Polsce i na świecie. Równoległe ze wzrostem liczby ludności w wieku senioralnym, wzrasta również liczba osób chorujących na choroby przewlekłe, w tym również na nowotwory.

Nowotwory złośliwe głowy i szyi są szóstymi najczęściej występującymi na świecie nowotworami, z liczbą ok. 650 000 nowych zachorowań i ok. 350 000 zgonów rocznie [92]. 90% zachorowań na nowotwory złośliwe głowy i szyi stanowi rak jamy ustnej, z ciągle wysoką i niesatysfakcjonującą śmiertelnością sięgającą 50% leczonych chorych w pierwszych 5 latach od rozpoznania, a wyniki leczenia, mimo postępów wiedzy medycznej, nie ulegają poprawie od pięciu dekad [14, 90]. Zabiegi chirurgiczne pozostają nadal najskuteczniejszym sposobem leczenia nowotworów złośliwych jamy ustnej, a ich skuteczność jest bardzo ściśle związana ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej. Wczesne rozpoznanie raka, w początkowym stadium jego rozwoju, bardzo istotnie poprawia odległe wyniki leczenia, znacząco ogranicza rozległość zabiegu operacyjnego i istotnie wpływa na jakość życia chorego po zakończonym leczeniu. Osiągnięcie poprawy wyników leczenia raka musi więc opierać się na poprawie diagnostyki i zapobieganiu rozwojowi nowych ognisk raka, dlatego też świat nauk medycznych wiele wysiłku poświęca na zrozumienie zależności, jak zmiany genomu ludzkiego i czynniki środowiskowe wpływają na rozwój nowotworu. O ile środowiskowe czynniki ryzyka rozwoju raka jamy ustnej zostają coraz dokładniej poznane i wyjaśnione, o tyle podstawy genetyczne procesu onkogenezy są wciąż na etapie badań laboratoryjnych i hipotez. Dotychczas uważano, iż rozwój raka jamy ustnej jest skutkiem wielogenowych zmian, które są modulowane przez indywidualne predyspozycje i wpływy czynników środowiskowych, w których żyje chory. Jednak postęp w rozwoju nowych technik genetycznych pozwolił wyłonić gałąź wiedzy – epigenetykę, która próbuje wyjaśnić wpływ czynni-

ków epigenetycznych na ekspresję genów w kolejnych pokoleniach komórek. Procesy epigenetyczne, zachodzące w DNA komórek, uważane są współcześnie za najważniejsze zjawiska w kancerogenezie nowotworów. Zmiany epigenetyczne w genach supresorowych DNA skutkują zmianą lub całkowitym zablokowaniem ekspresji genu, rozpoczynając w komórkach onkogenezę [6, 101]. Za indukcję zmian epigenetycznych w komórkach nabłonka jamy ustnej odpowiedzialne są takie procesy, jak starzenie się komórek, czynniki ryzyka wpływające w sposób przewlekły na śluzówkę jamy ustnej oraz mediatory przewlekłych stanów zapalnych, takich jak np. interleukina 6 (IL-6). Uważa się, że kumulacja, powstałych w wyżej opisanym mechanizmie zmian epigenetycznych, obecna jest już w prawidłowo wyglądających komórkach nabłonka jamy ustnej, gdy rozpoczął się proces kancerogenezy, a klinicznie nie można jeszcze rozpoznać raka [100]. Zmiany epigenetyczne rozpoznane w DNA komórek nabłonka jamy ustnej uznawane są za swoisty „genetyczny odcisk palca”, będący światłem ostrzegawczym, świadczącym o rozpoczynającym się procesie kancerogenezy, który mógłby być wykorzystany we wczesnej diagnostyce onkologicznej [140, 147]. Poznanie molekularnych mechanizmów onkogenezy jest wyzwaniem dla naukowców zgłębiających tajniki biologii nowotworów, co w przyszłości będzie skutkować możliwością wpływania technikami reakcji genetycznych na zahamowanie, czy nawet odwrócenie procesu kancerogenezy w komórkach organizmów żywych. Dzięki rozwojowi genetycznych technik laboratoryjnych, znaczącej poprawie uległa czułość i precyzja analiz biogenetycznych, co spowodowało zainteresowanie klinicystów i chirurgów, zajmujących się leczeniem nowotworów złośliwych, wykorzystaniem tych technik w poszerzaniu wiedzy klinicznej o dynamice choroby nowotworowej u pacjentów i ostatecznie przełożenie nowych informacji o nowotworze, na poprawę wyników leczenia, z nadrzędnym celem, którym jest przedłużenie życia leczonych chorych [164].

Genetyczne badania tkanek wymagają długotrwałej i skomplikowanej preparatyki, co przekłada się na długi czas wykonywanych analiz oraz na wysokie koszty, które takie badania generują. Znajduje to odzwierciedlenie w wielkościach grup chorych poddawanych badaniom genetycznym. Meta-analiza przeprowadzona w 2018 r. przez Guohong Wen i współ., oparta na publikacjach wyszukanych w bazie czasopism naukowych, wykazała jedynie 13 prac naukowych na świecie omawiających hypermetylację genu *CDH1* w rakach jamy ustnej [58], co świadczy o pionierskich pracach poszukiwania współzależności zmian epigenetycznych w DNA komórek nowotworowych i komórek prawidłowych u chorych na nowotwory złośliwe jamy ustnej.

Pierwsza część badań własnych obejmowała obserwacje kliniczne wytypowanych do badań genetycznych chorych oraz analizy korelacji parametrów takich jak: płeć, wiek, stopień zaawansowania choroby nowotworowej i umiejscowienia ogniska pierwotnego raka jamy ustnej, z wczesnymi i odległymi wynikami leczenia.

W omawianej grupie pacjentów, leczonych z powodu raka jamy ustnej, dominowali chorzy w wieku ponad 70 lat, którzy stanowili 43,0% wszystkich chorych oraz pacjenci między 61 i 70 rokiem życia, których było 34,2%. Ogółem 77,2% chorych w analizowanej grupie było w wieku powyżej 60 lat, co jest zgodne z doniesieniami innych autorów [57, 173].

W eksplorowanej grupie chorych najczęściej odnotowywano ognisko pierwotne raka dziąsła (26,7%), w dalszej kolejności raka wargi oraz raka błony śluzowej dna jamy ustnej i języka. Umiejscowienie ognisk pierwotnych raka jamy ustnej opisywane przez Lewandowskiego B. [57] i Kowalika S. [89] są porównywalne z wynikami uzyskanymi w tym opracowaniu.

Stosowanie używek uznanych za czynniki ryzyka wystąpienia raka jamy ustnej, czyli palenie tytoniu i chroniczne nadużywanie alkoholu, odnotowano we własnych badaniach u 71,4% chorych z rakiem jamy ustnej, deklarujących wieloletnie nałogowe palenie tytoniu oraz u 48,1% chorych potwierdzających nałogowe nadużywanie alkoholu. W analizowanej grupie pacjentów rak dna jamy ustnej i języka występował 2-krotnie częściej u chorych palących wyroby tytoniowe i 3-krotnie częściej u chorych z rakiem dziąsła. Podobne obserwacje poczynili Hashibe M. i współ. [59] oraz Blot W. i współ. [17] i Zapała J. [173].

Ocena stopnia zaawansowania raka jamy ustnej w badaniach własnych pozwoliła stwierdzić, iż jedynie 8,8% ogółu chorych rozpoczęło leczenie z nowotworem zaawansowanym I stopnia, 19,0% raków jamy ustnej zakwalifikowano do II stopnia zaawansowania klinicznego, kolejne 21,4% nowotworów było w III stopniu zaawansowania i aż 41,7% w IVa stopniu zaawansowania klinicznego. Dane te świadczą o niskiej świadomości onkologicznej mieszkańców Podkarpacia, a późne zgłaszanie się chorych do lekarzy skutkuje opóźnieniem rozpoczęcia leczenia, co ostatecznie znacząco pogarsza odległe wyniki leczenia. Podobne obserwacje poczynili Lewandowski B. [57], Kryst L. [90] i Kowalik S. [89]. We własnych obserwacjach najczęściej rozpoznawano raka dziąsła w IVa stopniu zaawansowania klinicznego (16,4%) oraz raka dna jamy ustnej w IVa stopniu zaawansowania, którego rozpoznano u 8,8% chorych.

W analizowanej grupie pacjentów dominował rak płaskonabłonkowy o umiarkowanym stopniu dojrzałości komórkowej G2, który rozpoznano w 52,0% badań histopatologicznych, w 35,4% guzów badaniem histopatologicznym rozpoznano raka wysokozróżnicowanego G1. We własnych bada-

niach, raka umiarkowanie zróżnicowanego najczęściej obserwowano w guzach dziąsła i błonie śluzowej języka, raka wysokozróżnicowanego G1 najczęściej rozpoznawano w guzach wargi, natomiast raka niskozróżnicowanego G3 w przypadkach guzów policzka. Wyniki te są porównywalne z danymi podawanymi przez Zapałę J. [173], Kowalika S. [89] i Pannone i współl. [121].

We własnych obserwacjach klinicznych badanej grupy pacjentów z rakiem jamy ustnej odnotowano zgon 35,7% chorych, najwięcej (18,7%) zmarło w drugim roku od operacji, 8,3% chorych zmarło w II półroczu od operacji, a 4,2% zmarło w I półroczu od operacji raka jamy ustnej.

Analiza statystyczna własnych obserwacji klinicznych wykazała korelację dodatnią między wystąpieniem wznovy miejscowej raka jamy ustnej i częstością zgonu chorego. Ryzyko zgonu statystycznie wzrasta u chorych, u których wystąpiła wznova miejscowa choroby nowotworowej. W badaniach własnych zaobserwowano korelację ujemną dotyczącą czasu wystąpienia wznovy miejscowej po pierwotnej operacji raka jamy ustnej i ryzykiem wystąpienia zgonu. Obserwacje te znalazły wyraz w statystycznych badaniach potwierdzających zależność większego ryzyka zgonu chorego od wczesnego wystąpienia wznovy miejscowej raka jamy ustnej. Analiza własnych danych w badanej grupie chorych z rakiem jamy ustnej pozwoliła znaleźć dodatnią korelację między stopniem zaawansowania choroby nowotworowej i ryzykiem wystąpienia zgonu, co znalazło również potwierdzenie w testach statystycznych przeprowadzonych w badanej grupie. Uzyskane wyniki są podobne i spójne z obserwacjami klinicznymi poczynionymi przez innych autorów [89, 173].

Interesujące wyniki odnotowano, analizując zależność ryzyka wystąpienia zgonu i wieku chorego w badanej grupie pacjentów z rakiem jamy ustnej. Zaobserwowano korelację ujemną, potwierdzającą obserwacje kliniczne, że im młodszy chory, tym większe ryzyko zgonu z powodu raka jamy ustnej. Średnia wieku zmarłych z powodu raka jamy ustnej była o 8 lat niższa od średniej dla chorych nadal żyjących. Krótszy czas przeżycia po operacji raka jamy ustnej chorych młodszych można wyjaśnić większą dynamiką procesów metabolicznych, toczących się w tkankach i komórkach młodszych, również nowotworowych. Proces starzenia się komórek, w tym komórek rakowych, polega między innymi na spowolnieniu dynamiki metabolizmu komórkowego, co wpływa na częstość podziałów komórkowych i szybkość wzrostu guza. Wnioski takie znajdują potwierdzenie w pracach Pecorino L. [127] i Majchrzak E. [104].

W analizowanej grupie chorych wznova raka jamy ustnej wystąpiła u 15,2% operowanych chorych, najczęściej (33%) wznowę rozpoznawano w I półroczu po zakończonym leczeniu, a kolejne 25% wznów odnotowano w II półroczu. Najczęściej obserwowano wznovy po operacji raka dziąsła (5,1%)

oraz po operacji raka języka (3,8%) i raka dna jamy ustnej (3,8%). W badaniach własnych zaobserwowano korelację ujemną między wiekiem chorego i wystąpieniem wznowy miejscowej. Stwierdzono, że w badanej grupie wystąpiła zależność – im młodszy chory, tym częściej wznowa miejscowa raka jamy ustnej, jednak testami statystycznymi nie potwierdzono jej istotności.

Obserwacje własne pozwoliły rozpoznać przerzuty do kolejnych pięter układu chłonnego szyi u 26,6% chorych operowanych pierwotnie z powodu raka jamy ustnej. Najczęściej przerzuty do węzłów chłonnych odnotowywano w I półroczu od pierwszej operacji, co miało miejsce u 17,7% chorych, a ognisko pierwotne raka najczęściej obserwowano w dnie jamy ustnej (8,8%) i języku (7,6%). Przerzuty odległe wystąpiły u 5,1% operowanych chorych, najliczniej w II półroczu od operacji raka dna jamy ustnej, języka i policzka. Stwierdzano przerzuty do płuca oraz do kości kręgosłupa. Podobne wyniki publikuje Kowalik S. [89]. Analizując dane dotyczące wieku chorych na raka jamy ustnej i ryzyka wystąpienia przerzutu odległego, zaobserwowano ujemną korelację przedstawioną zależnością, że im młodszy chory, tym większe ryzyko wystąpienia odległych przerzutów raka. Analogiczne wyniki obserwacji wskazują w swoich publikacjach Kumar M. i współ. [92] oraz Llowellyn C. i współ. [99].

Ponadto wykazano dodatnią korelację między wystąpieniem przerzutów odległych i stwierdzeniem przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, co jest zgodne z obserwacjami klinicznymi, iż stwierdzenie przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych zwiększa ryzyko wystąpienia przerzutów odległych. Podobne wnioski przedstawiają Kowalik S. [89] i Kryst L. [90].

Druga część badań własnych dotyczyła poszukiwań zależności między obserwacjami klinicznymi chorych leczonych z powodu raka jamy ustnej w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Rzeszowie i hypermetylacją genu supresorowego *CDH1* kodującego białko E-kadherine, odpowiedzialnego za adhezję komórek nabłonka błony śluzowej jamy ustnej. We własnych badaniach nowatorską ideą było poddawanie analizie par wyników dotyczących metylacji genu *CDH1*, pierwszego z komórek raka jamy ustnej i drugiego z prawidłowych komórek marginesu chirurgicznego po resekcji guza, oba preparaty pochodziły od tego samego chorego.

W niniejszej pracy badania genetyczne hipermetylacji genu supresorowego *CDH1* przeprowadzono w grupie 79 chorych, operowanych z powodu raka jamy ustnej w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej w Rzeszowie, u których możliwe było wykonanie par preparatów genetycznych, pochodzących z tkanek tego samego pacjenta, co dało sumę 158 preparatów. Pierwszy preparat wykonywano z DNA komórek raka jamy ustnej oraz drugi preparat

z DNA komórek „czystego” patomorfologicznie marginesu operacyjnego. Liczebności grup chorych przedstawiane przez innych badaczy na świecie, dotyczące hipermetylacji genu *CDH1* w komórkach nowotworowych zawierały się w przedziale od 15 analizowanych preparatów pozyskanych z komórek raka jamy ustnej, opisanych przez zespół Morandi i współ. w 2015 r. [112], do 141 preparatów genetycznych, wykonanych z tkanek raka jamy ustnej i prawidłowych komórek pozyskanych od chorych w badaniach Šupić i współ. [148, 150]. Średnia liczebność analizowanych preparatów wynosiła 80,3 i była niższa od przeprowadzonej w tej pracy analizy 158 preparatów. Podobnie średnia liczba analizowanych preparatów, wykonanych z tkanek raka jamy ustnej w meta-analizie Guohong W. i współ. [58], wynosiła 46,7, natomiast w niniejszej pracy było to 79 preparatów, średnia liczba kontrolnych preparatów w pracy Guohong W. wykonanych z prawidłowych tkanek wyniosła 33,2, podczas gdy w prezentowanym opracowaniu było to 79 preparatów. Dane te potwierdzają trudności i ograniczenia badawcze tej dziedziny nauki, na które napotykają naukowcy na całym świecie, dotyczące czasochłonności i kosztochłonności prowadzonych badań genetycznych.

W omawianych badaniach własnych metylację genu *CDH1*, w tkankach raka jamy ustnej, stwierdzono u 56 chorych spośród 79 operowanych, co stanowiło 70,9%. Inni autorzy opisują wyniki własne dotyczące hipermetylacji genu *CDH1*, zawierające się w przedziale od 0% metylacji genu *CDH1* w DNA komórek guza, uzyskane przez Morandi i współ. [112] do 94,1% metylacji *CDH1* w komórkach raka jamy ustnej, uzyskanych w badaniach Nagata i współ. [115]. Otrzymany w tej analizie wynik 70,9% hipermetylacji genu *CDH1* w badanej grupie pacjentów z rakiem jamy ustnej, był wyższy od średniej przedstawionej w meta-analizie Guohong W. i współ. z 2018 r., gdzie średni odsetek stwierdzonych w tkankach guza metylacji genu *CDH1* wynosił 49,1% [58]. W niniejszej pracy hipermetylację genu *CDH1* ustalono w DNA komórek raka 42 mężczyzn (72,4%) i 14 kobiet (66,7%), jednakże testami statystycznymi wg metodyki Bayesa, w badanej grupie nie potwierdzono statystycznej istotności związku płci chorego z metylacją supresorowego genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej. Podobne wyniki i wnioski o braku związku między płcią chorego a częstotliwością obserwowanej w genie *CDH1* hipermetylacji wyciągnęli ze swoich badań również inni autorzy [91, 98].

Wyniki analizy danych zawartych w niniejszym opracowaniu pozwoliły ustalić metylację genu *CDH1* w DNA prawidłowych komórek, pobranych z „czystego” onkologicznie marginesu chirurgicznego, u 55 spośród 79 chorych, co stanowiło 69,6%. W grupie tej było 41 mężczyzn (70,7%) i 14 kobiet (66,7%). Średnia wartość stwierdzonych metylacji genu *CDH1* w DNA prawi-

dłowych komórek była wyższa od wyników światowych badań, które zamykają się wartościami od 0% metylacji dla badań Asokan i współ. [6], Morandi i współ. [112] i Ge M. i współ. [55] do 54,4% dla wyników uzyskanych przez Kordi-Tamandani i współ. [88], z wynikiem przeciętnym 24,0% dla wykonanej meta-analizy. Uzyskane w przeprowadzonym badaniu wyniki mogą potwierdzać tezę o poprawie czułości nowoczesnych metod analityki genetycznej, głównie na podstawie rozwoju specyficznej reakcji łańcuchowej polimerazy. Dokonane w badanej grupie testy statystyczne wg metodyki Bayesa nie potwierdziły statystycznej istotności związku płci chorego z metylacją supresorowego genu *CDH1* w DNA komórek prawidłowych z chirurgicznego marginesu u chorych z rakiem jamy ustnej. Podobne wyniki, braku istotnego statystycznie związku między płcią chorego i częstotliwością obserwowanej w genie *CDH1* hipermetylacji w DNA komórek marginesu operacyjnego, uzyskali ze swoich badań również inni autorzy [88, 96, 112].

Kolejnym parametrem poddanym analizie w opracowaniu było zbadanie korelacji między wiekiem operowanych chorych a występowaniem hipermetylacji w genie *CDH1* DNA komórek raka jamy ustnej. W eksplorowanej grupie pacjentów, w teście korekcji rangowych Spearmana nie zaobserwowano zależności istotnej statystycznie między metylacją genu *CDH1* i wiekiem chorych. Takie same wnioski podają Marsit C. i współ. [106] oraz Mac Cabe i współ. [103]. Analogicznie nie wykazano zależności statystycznych w relacji występowania hipermetylacji genu *CDH1* w DNA komórek prawidłowych marginesu operacyjnego i wiekiem leczonych chorych. Uzyskane w niniejszym opracowaniu wyniki dotyczące korelacji między wiekiem operowanych chorych i wykazaną hipermetylacją genu supresorowego *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej i komórek niezmiennych z marginesu operacyjnego oraz dane publikowane przez innych autorów nie potwierdzają ogólnych założeń dotyczących kumulacji procesów epigenetycznych, w tym metylacji DNA genów, w starzejącej się komórce nabłonka jamy ustnej, o czym donosili w swoich publikacjach Sharma S. [140], Fernberg A. [49] czy Heyn H. [68].

Badania własne, dotyczące zależności między występowaniem hipermetylacji genu supresorowego *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej i przewlekłym stosowaniem przez chorych używek, takich jak palenie tytoniu i długotrwałe nadużywanie alkoholu, wykazały testem chi-kwadrat statystyczną istotność takiej korelacji zmiennych. Statystycznie istotną zależność metylacji DNA w genie *CDH1* dowiedziono dla grupy chorych nadużywających alkoholu przez wiele lat. Podobne wyniki występowania statystycznie istotnej zależności między hipermetylacją genu *CDH1* wśród chorych z rakiem jamy ustnej podają Marsit C. i współ. [106] oraz Asokan G. i współ. [6]. W grupie chorych

długotrwale nadużywających alkoholu wyniki w publikacjach nie są spójne. Asokan G. i współ. [6] i Robertson K. i współ. [134] uzyskali podobne wyniki do prezentowanych wyników własnych, podczas gdy Marsit i współ. [106] nie potwierdzają statystycznie istotnej zależności między nadużywaniem alkoholu i występowaniem hipermetylacji genu *CDH1*.

Hipermetylacja genu *CDH1* w komórce skutkuje wyciszeniem tego genu i zmniejszeniem lub całkowitym zablokowaniem ekspresji E-kadheryny w kolejnych pokoleniach komórek, czego następstwem klinicznym jest rozluźnienie struktury tkankowej poprzez brak lub osłabienie przylegania komórkowego, komórki nabłonkowe tracą polaryzację i stają się bardziej podatne na migrację i inwazję tkankową, promując rozwój nowotworu i skłonność do przerzutów.

Wyniki badań własnych dotyczące zależności między czasem wystąpienia wznowy i metylacją genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej nie wykazały różnic istotnych statystycznie. Hipermetylacja genu *CDH1* nie przejawiała implikacji klinicznych w postaci różnic w czasie wystąpienia wznowy procesu nowotworowego po operacji raka, dla chorych ze stwierdzoną i bez stwierdzonej metylacji genu.

W analizowanych wynikach badań własnych nie dowiedziono korelacji istotnej statystycznie między metylacją genu *CDH1* w DNA komórek guza i czasem wystąpienia wznowy, a podobne wyniki przedstawił Pannone i współ. [121]. W badanej grupie nie wykazano również zależności istotnej statystycznie między metylacją *CDH1* w tkankach marginesu operacyjnego i czasem wznowy procesu nowotworowego. Odnotowano jednak dwukrotnie większą częstość wystąpienia wznowy miejscowej wśród pacjentów ze stwierdzoną hipermetylacją genu *CDH1* w odniesieniu do chorych bez stwierdzonej hipermetylacji. Badanie statystyczne nie potwierdza istotności zestawionych danych ($p = 0.7268$), jednak implikacje kliniczne skutkują potrzebą czujniejszej postawy lekarza w stosunku do pacjentów onkologicznych ze stwierdzoną hipermetylacją genu *CDH1* w komórkach guza, bowiem może to mieć większy wpływ na wznowę miejscową procesu nowotworowego. Na podstawie przeprowadzonych badań można wysnuć wniosek, iż stwierdzenie hipermetylacji genu supresorowego *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej oraz komórek prawidłowych może w przyszłości, po udoskonaleniu metod diagnostycznych, zostać uznane za marker ryzyka wystąpienia wznowy procesu nowotworowego.

Podobnie, w badanej grupie chorych nie wykazano zależności istotnej statystycznie między metylacją genu *CDH1* w DNA komórek nowotworowych guza jamy ustnej i wystąpieniem przerzutów odległych. Analogicznie stwierdzono brak zależności istotnej statystycznie między metylacją *CDH1* w tkankach marginesu operacyjnego i wystąpieniem przerzutów odległych.

W dostępnej literaturze nie znaleziono doniesień odnoszących się do wyników wpływu metylacji genu *CDH1* w komórkach nowotworu jamy ustnej i komórkach prawidłowych tego samego chorego, jednak otrzymane dane dyskredytują hipermetylację genu *CDH1* jako biomarker ryzyka wystąpienia przerzutów odległych dla chorych z rakiem jamy ustnej.

Najbardziej interesujące wyniki, w badanej grupie chorych z rakiem jamy ustnej, otrzymano, analizując zależność między hipermetylacją genu supresorowego *CDH1* w DNA komórek raka i przerzutami do kolejnych pięter węzłów chłonnych szyi, które wystąpiły po pierwszej operacji blokowej raka jamy ustnej. Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych po pierwszej operacji wystąpiły u 21 chorych. Hipermetylacja genu supresorowego *CDH1* w DNA raka wystąpiła u 17 chorych (80,9%), natomiast w podgrupie bez metylacji do przerzutów do węzłów chłonnych doszło tylko u 4 chorych (19,1%). Wynik testu chi-kwadrat wykazał, że nadreprezentacja chorych z przerzutami do węzłów chłonnych w podgrupie, w której wystąpiło zjawisko hipermetylacji promotora genu *CDH1*, była znamienna statystycznie (Aneks, tabela 15), tzn. w podgrupie, w której wystąpiła metylacja, ryzyko przyrzutu do węzła chłonnego jest istotnie statystycznie większe ($p = 0.02359$). Nie stwierdzono statystycznej istotności w powiązaniu metylacji genu *CDH1* w tkankach z marginesu operacyjnego i wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. W dostępnej literaturze nie znaleziono publikacji, w których przedstawione byłyby zagadnienia wpływu metylacji genu *CDH1* w komórkach raka jamy ustnej na ryzyko wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych. Podobną tematyką zajmował się Graciano F. i współ. [56], analizując hipermetylację genu *CDH1* w rakach żołądka oraz Morandi L. i współ. [112], prowadzący badania genetyczne na materiale pobranym mikroszczotekami z wymazów jamy ustnej. Na podstawie analizy przedstawionych wyników badań genetycznych, dotyczących wpływu hipermetylacji genu supresorowego *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej na częstość występowania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, można sformułować wniosek, że stwierdzenie hipermetylacji genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej może stać się biomarkerem informującym o zwiększonym ryzyku wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych u chorych operowanych z powodu raka jamy ustnej. Wiedza ta mogłaby w przyszłości posłużyć do planowania szerszego zakresu operacji pierwotnej lub też do częstszego i bardziej precyzyjnego monitorowania chorych ze stwierdzoną hipermetylacją genu *CDH1* w komórkach raka z wycinka tkankowego lub preparatu operacyjnego. Wydaje się niezbędne, ale również obiecujące prowadzenie szerszych badań genetycznych w dziedzinie epigenetycznych zmian DNA nowotworów.

Średni czas od operacji do rozpoznania przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych w grupie chorych ze stwierdzoną metylacją *CDH1* w tkankach guza wynosił 5,25 miesięcy i był krótszy niż w wśród chorych, u których nie wykazano metylacji genu *CDH1*, a średni czas do rozpoznania przerzutów w węzłach wynosił 9,25 miesięcy. Nie potwierdzono istotności statystycznej tych zależności, jednak z klinicznego punktu widzenia różnica czterech miesięcy w czasie rozpoznania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych może decydować o powodzeniu leczenia i losach chorego. Problematyka ta wymaga w przyszłości szerszych badań na większych grupach chorych.

W badanej grupie nie dowiedziono istotnej statystycznie korelacji między czasem wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych dla metylacji genu *CDH1* i braku metylacji *CDH1* tak w komórkach raka jamy ustnej, jak i w komórkach prawidłowych marginesu operacyjnego.

W badaniach własnych dowiedziono, że statystycznie istotnie częściej metylacja genu *CDH1* odnotowana była w rakach wargi. W badaniach Pannone i współl. [121] przedstawił wyniki dotyczące statystycznie istotnie częstszej hipermetylacji genu *CDH1* w DNA komórek raka języka, jednak w tej samej publikacji nie znalazł zależności dotyczącej raka wargi.

W badanej grupie chorych podjęto próbę oceny zależności między hipermetylacją genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej a rozpoznaną w komórkach infekcją HPV, jednak nie wykazano istotności statystycznej takiej korelacji.

Wnioski

1. Hipermetylacja genu supresorowego *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej okazała się istotnym czynnikiem pogarszającym rokowanie tylko w odniesieniu do ryzyka wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych szyi, po pierwotnym leczeniu chirurgicznym, bez wpływu na wystąpienie przerzutów odległych. Stwierdzenie hipermetylacji genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej może być biomarkerem informującym o zwiększonym ryzyku wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych u chorych operowanych z powodu raka jamy ustnej, co może w przyszłości posłużyć do planowania szerszego zakresu operacji pierwotnej lub też do częstszych i bardziej restrykcyjnych kontroli w grupie chorych ze stwierdzoną hipermetylacją genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej.
2. Nie wykazano statystycznie istotnej zależności między hipermetylacją genu *CDH1* w DNA prawidłowych komórek z marginesu operacyjnego a częstością wystąpienia wznowy miejscowej, czasem wystąpienia wznowy miejscowej, częstością i czasem wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych oraz przerzutów odległych. Stwierdzenie hipermetylacji promotora genu *CDH1* w DNA komórek prawidłowych z tkanek marginesu operacyjnego nie może pełnić roli biomarkera w odniesieniu do ryzyka większej częstotliwości wystąpienia wznowy miejscowej, przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych ani też przerzutów odległych.
3. Średni czas wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych jest krótszy w grupie chorych, u których stwierdzono hipermetylację genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej, o około 4 miesiące.
4. Badania własne dowiodły dodatnią i statystycznie istotną korelację hipermetylacji DNA w genie *CDH1* dla grupy chorych nadużywających długotrwale alkoholu.
5. W badaniach własnych wykazano statystycznie istotną zależność hipermetylacji genu *CDH1* w DNA komórek raka wargi.

6. W badaniach własnych wykazano brak statystycznej korelacji między hipermetylacją genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej i komórek prawidłowych marginesu operacyjnego a:
 - częstością wystąpienia wznowy miejscowej choroby nowotworowej w jamie ustnej,
 - czasem wystąpienia wznowy miejscowej,
 - wystąpieniem przerzutów odległych,
 - czasem wystąpienia przerzutów odległych,
 - czasem wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.
7. Młodszy wiek chorego istotnie zwiększał ryzyko wystąpienia miejscowej wznowy nowotworu i wystąpienia przerzutów odległych.
8. Ryzyko wystąpienia przerzutów odległych oraz przerzutów do węzłów chłonnych są ze sobą istotnie związane w sposób pogarszający rokowanie.
9. Stwierdzono istotną statystycznie wyższą śmiertelność w grupie chorych z niskozróżnicowanymi rakami jamy ustnej.

Wyniki przeprowadzonych badań poszerzyły wiedzę na temat molekularnego podłoża onkogenezy raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, łącząc analizę poziomu ekspresji genu supresorowego *CDH1* z określeniem stopnia metylacji regionów promotorowych badanego genu oraz z ich wpływem na przebieg kliniczny choroby nowotworowej i wyniki leczenia. Kontynuowanie badań epigenetycznych może w przyszłości przyczynić się do opracowania panelu biomarkerów użytecznych klinicznie, wspomóc diagnostykę raka jamy ustnej oraz stać się fundamentem do opracowania nowych metod terapeutycznych opartych na mechanizmach epigenetycznych (przeciwnowotworowe leki epigenetyczne).

Streszczenie

Nowotwory złośliwe rejonu głowy i szyi są szóstymi najczęściej występującymi na świecie nowotworami w populacji ludzi, z liczbą 650 000 rozpoznawanych każdego roku nowych zachorowań i liczbą 350 000 zgonów. Wśród tej grupy nowotworów najczęściej występuje rak kolczystokomórkowy jamy ustnej (Oral Squamous Cell Carcinoma – OSCC), który rozpoznawany jest w 90% złośliwych nowotworów jamy ustnej i 38% wszystkich nowotworów głowy i szyi. Z uwagi na dużą liczbę nowych rozpoznań i stale postępujący wzrost nowych zachorowań, zwłaszcza w powiązaniu z wysoką śmiertelnością i niskim odsetkiem przeżyć 5-letnich, rak jamy ustnej stanowi poważny problem medyczny, mający znaczący wpływ na różne aspekty zdrowia publicznego, jak również niosący skutki społeczno-ekonomiczne.

Najnowsze dane epidemiologiczne przedstawione przez Krajowy Rejestr Nowotworów dotyczą roku 2019, w którym odnotowano 2168 zachorowań na raka jamy ustnej, w tym 1726 przypadków dotyczyło mężczyzn i 442 kobiet. W roku tym odnotowano 1428 zgonów spowodowanych rakiem jamy ustnej, w grupie tej było 1165 mężczyzn i 263 kobiety. Według powołanego rejestru w czasie dekady 2010–2020 w województwie podkarpackim na nowotwory złośliwe jamy ustnej zachorowało ogółem 1044 chorych, w tym 819 mężczyzn i 225 kobiet. W okresie tym z powodu nowotworów jamy ustnej zmarło ogółem 753 chorych, wśród których było 636 mężczyzn i 117 kobiet. Pomimo dużego postępu w działaniach prewencyjnych oraz znaczącego rozwoju narzędzi i technik terapeutycznych raka jamy ustnej, odsetek 5-letnich przeżyć chorych z OSCC pozostaje na niezmiennym poziomie od ponad 20 lat. Złe wyniki i prognozy dla chorych związane są ściśle z późnym rozpoznaniem raka i rozpoczęciem procesu terapeutycznego, często w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej, z naciekaniem przez nowotwór tkanek otaczających, przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych i rzadziej z przerzutami odległymi do innych narządów. Odległe wyniki leczenia raka jamy ustnej są nadal niezadowalające i w badaniach epidemiologicznych nie ulegają poprawie od wielu lat, dlatego też tak ważne są badania ukierunkowane na poszukiwania nowych biomarkerów, pozwalających na precyzyjne monito-

rowanie przebiegu procesu nowotworowego i podjęcia niezwłocznej terapii w przypadku stwierdzenia wzrostu miana markera nowotworowego u chorego, u którego nie wystąpiły jeszcze objawy kliniczne. Jedną z dróg badawczych, mających na celu opracowanie biomarkera nowotworu, są badania z zakresu epigenetyki, której odkrycia mogą być przełomowe, zarówno w zrozumieniu i poznaniu mechanizmów onkogenezy, konstruowaniu testów pozwalających wykryć u chorego markery raka, jak i w syntezie leków onkologicznych.

Rozwój nowotworu w organizmie następuje w wyniku jednoczesnych zmian genetycznych i epigenetycznych. W procesie nowotworzenia duże znaczenie mają mechanizmy epigenetycznej regulacji ekspresji genów (z greckiego *epi* – ponad genomem), obejmujące dziedziczne, lecz potencjalnie odwracalne, zmiany ekspresji genów, kodowane przez modyfikacje genomu i komponenty chromatyny, jednak bez zmian w sekwencji DNA. Jednym z epigenetycznych mechanizmów zmian w prawidłowym łańcuchu DNA jest proces metylacji. Epigenetyczne zmiany wzorca metylacji DNA zaobserwowano w wielu typach nowotworów i uważa się, iż odgrywają one zasadnicze znaczenie w kancerogenezie. Zmiany epigenetyczne obserwowano we wczesnych stadiach rozwoju nowotworu i są uznawane za nieprawidłowości niezbędne do nowotworzenia tkankowego i progresji rozwoju raka. Różne typy nowotworów wyrażają charakterystyczne wzorce metylacji, ale mają również wspólne cechy zmian epigenetycznych, które wykorzystywane są we wczesnym wykrywaniu nowotworów, umożliwiają śledzenie ich progresji i mają pewne znaczenie w ocenie rokowania. Na świecie obserwowany jest szybki postęp technologiczny umożliwiający wykrywanie i monitoring zmian epigenetycznych w tkankach człowieka, co wykorzystywane jest w praktyce klinicznej jako wczesne biomarkery zmian rakowych oraz markery progresji procesu nowotworowego. Proces metylacji polega na przyłączeniu grupy metylowej do piątego węgla pierścienia cytozyny, niemniej procesowi temu ulega jedynie 3–4% wszystkich cytozyn w DNA. Zmiany w metylacji DNA rozpoznawane są jako pierwszy epigenetyczny biomarker związany z rozwojem nowotworu, zmieniający prawidłowe funkcjonowanie genu i obejmują one hipermetylację, hypometylację oraz zablokowanie imprintingu. Epigenetyczne zaburzenia metylacji rozwijają się stopniowo w toczącym się procesie kancerogenezy. Hipermetylacja wysp CpG pojawia się wcześnie w tym procesie, a liczba metylowanych wysp CpG sukcesywnie rośnie wraz z rozwojem nowotworu i progresji złośliwości raka. Rozpoczyna się proces rozpowszechniania się metylacji nowych wysp CpG, który zajmuje coraz większe obszary genomu. Prawdopodobnie jest to skutkiem starzenia się genomu oraz wynikiem działania mediatorów stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w komórce.

Gen *CDH1* znajduje się na dłuższym ramieniu chromosomu 16, w locus 16q22.1 i koduje białko E-kadherynę. E-kadheryna jest homodimerem transmembranowym o masie cząsteczkowej 120 kD zbudowanej z 882 reszt aminokwasowych. Badania naukowe oceniające ekspresję E-kadheryny w różnych typach raka wykazały kluczową rolę tego białka podczas progresji i inwazji nowotworu. Niski poziom aktywności lub brak E-kadheryny jest ściśle związany ze zmianami w funkcjonowaniu i ruchliwość komórek, co skutkuje większą liczbą przerzutów raka do tkanek. Podobnie jak w przypadku innych nowotworów złośliwych, wykazano korelację między niską ekspresją E-kadheryny i bardziej agresywnym przebiegiem OSCC. Niska ekspresja lub brak białka E-kadheryny jest skutkiem zablokowania genu supresorowego *CDH1* kodującego to białko. Najistotniejszym mechanizmem osłabienia ekspresji lub całkowitego zablokowania powstawania E-kadheryny jest hipermetylacja promotora genu *CDH1*. Zredukowana ekspresja E-kadheryny jest główną przyczyną dysfunkcji adhezji międzykomórkowej i zaburzenia hamowania kontaktowego komórek, co skutkuje, w zależności od nasilenia procesu, częściową lub całkowitą redukcją przylegania komórek potomnych w tkance nowotworowej, a w konsekwencji zwiększoną zdolnością do naciekania tkanek otaczających pierwotny guz oraz wczesną zdolnością do tworzenia przerzutów.

Celem pracy była ocena wpływu zaburzeń epigenetycznych w mechanizmie hipermetylacji promotora genu *CDH1* w DNA komórek nowotworowych oraz w DNA komórek prawidłowych, na przebieg kliniczny, dynamikę i rokowanie raka jamy ustnej. Badanie miało charakter retrospektywny. Spośród chorych leczonych z powodu raka jamy ustnej w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Rzeszowie, Poradni Onkologicznej Podkarpackiego Centrum Onkologii oraz preparatów histologicznych pozyskanych z Zakładu Patomorfologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Rzeszowie. Wśród tych chorych było 58 mężczyzn i 21 kobiet.

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Rzeszowskiego, uchwałą Nr 14/01/2019, wyraziła zgodę na przeprowadzenie badania metylacji genu supresorowego *CDH1* w ramach projektu badawczego: „Molekularne zaburzenia w różnych typach nowotworów i chorobach o podłożu autoimmunologicznym”.

W badaniu poszukiwano wpływu hipermetylacji genu supresorowego *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej oraz DNA komórek prawidłowych z marginesu operacyjnego po wycięciu raka na przebieg kliniczny i wyniki leczenia chorych operowanych z powodu raka jamy ustnej. Głównie badania dotyczyły korelacji między hipermetylacją *CDH1* a czasem wystąpienia wznowy procesu nowotworowego, czasem wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów

chłonnych szyi, przerzutów odległych oraz przeżyciami chorych. Badania prowadzono w kontekście poszukiwania odpowiedzi na pytanie, czy hipermetylacja genu *CDH1* może być wykorzystana jako biomarker do monitorowania chorych po operacji raka jamy ustnej. Analiza otrzymanych w badaniu wyników pozwoliła wysnuć wnioski, które mogą być przydatne w procesie leczenia raka jamy ustnej.

W badaniach własnych wykazano istotną statystycznie korelację między hipermetylacją genu supresorowego *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej a częstością wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych szyi po pierwotnej operacji raka. Wiedza ta może być wykorzystana do częstszego badania chorych po operacji raka jamy ustnej, u których stwierdzono hipermetylację genu *CDH1*, aby w przypadku wykrycia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, jak najszybciej rozpocząć odpowiednie leczenie. Ponadto informacja o hipermetylacji genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej może być użyteczna w planowaniu szerszego zakresu resekcji blokowej nowotworu, zwłaszcza w odniesieniu do regionalnych węzłów chłonnych szyi, aby zmniejszyć ryzyko rozwoju przerzutów raka w kolejnych piętrach węzłów chłonnych szyi. Ponadto badania własne potwierdzają obserwacje poczynione w kwestii czasu wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych szyi, który był o 4 miesiące krótszy w grupie chorych ze stwierdzoną hipermetylacją genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej. Badania wykazały także dodatnią i statystycznie istotną korelację hipermetylacji DNA w genie *CDH1* dla grupy chorych nadużywających alkoholu.

W badaniach własnych dowiedziono brak statystycznej korelacji między hipermetylacją genu *CDH1* w DNA komórek raka jamy ustnej i komórek prawidłowych marginesu operacyjnego a częstością: wystąpienia wznowy miejscowej procesu nowotworowego w jamie ustnej, czasem wystąpienia wznowy miejscowej, wystąpieniem przerzutów odległych, czasem wystąpienia przerzutów odległych i czasem wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

Badania własne poszerzyły wiedzę na temat molekularnego podłoża onkogenezy raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, łącząc analizę poziomu ekspresji genu supresorowego *CDH1* z określeniem stopnia metylacji regionów promotorowych badanego genu oraz z ich wpływem na przebieg kliniczny choroby nowotworowej i wyniki leczenia. Kontynuowanie badań epigenetycznych może w przyszłości przyczynić się do opracowania panelu biomarkerów użytecznych klinicznie, wspomóc diagnostykę raka jamy ustnej oraz stać się fundamentem do opracowania nowych metod terapeutycznych i leków przeciw nowotworowych, opartych na mechanizmach epigenetycznych.

Summary

Malignant neoplasms of the head and neck region are the sixth most common tumors in the world wide population, with 650 000 new cases diagnosed every year and 350 000 deaths. In this group of cancers, the most common is oral squamous cell carcinoma (OSCC), which is recognized in 90% of malignant tumors in the mouth and 38% of all head and neck cancers. Due to the large number of newly diagnosed cases, especially in relation with high mortality and low 5-year survival rate, oral cancer is a serious medical problem with a significant impact on various aspects of public health as well as having a social and economic impact. The latest epidemiological data were presented by the National Cancer Registry concerning 2019 year. There were 2,168 new cases of oral cancer, including 1,726 cases in men and 442 women and 1,428 deaths caused by oral cancer, in this group there were 1,165 men and 263 women. According to this register, in the decade 2010–2020, in the Podkarpackie Province, a total of 1,044 patients suffered from malignant oral tumors, including 819 men and 225 women. During this period, a total of 753 patients died of oral cancer, in this group there were 636 men and 117 women.

Despite significant advances in preventive activities and a large development of oral cancer therapeutic tools and techniques, the percentage of 5-year survival rates of OSCC patients has remained unchanged for over 20 years. Bad results and prognosis for the patients are closely related to the late diagnosis of cancer and the initiation of the therapeutic process, often in advanced stage of malignant disease, tumor infiltration of surrounding tissues, metastases to regional lymph nodes and rarely distant metastases to other organs. Long-term results of oral cancer treatment are still unsatisfactory and epidemiological studies have not improved for many years. Due to these reasons, many researchers aimed at finding new biomarkers, allowing precise monitoring of the cancer process and starting treatment when a patient has not clinical symptoms. One of the research methods aimed at developing a tumor biomarker is epigenetics. The process of carcinogenesis occurs as a result of simultaneous genetic and epigenetic changes. The mechanisms of epigenetic regulation of gene expression (from the Greek *epi* – above the genome), in-

cluding hereditary but potentially reversible gene expression changes which are encoded by genome modifications and chromatin components and are important in the process of tumorigenesis but without changes in the DNA sequence. One of the epigenetic mechanisms of changes in the normal DNA chain is the methylation process. Epigenetic changes in the DNA methylation pattern have been observed in many types of tumors and are considered to be essential in carcinogenesis. Epigenetic changes observed in the early stages of tumor development are considered as abnormalities necessary for tissue neoplasia and progression of cancer development. Different types of tumors express characteristic methylation patterns, but they also have common features of epigenetic changes that are used in early detection of tumors, they allow tracking their progression and have some significance in assessing prognosis. In the world there is rapid technological progress in detection and monitoring of epigenetic changes in human tissues, which is used in clinical practice as early biomarkers of cancer changes and markers of cancer progression. The methylation process consists in attaching a methyl group to the fifth carbon of the cytosine ring, however only 3-4% of all cytosines in the DNA undergo this process. Changes in methylation of DNA are recognized as the first epigenetic biomarker associated with the development of cancer, changing the proper functioning of the gene and they include hypermethylation, hypomethylation and blocking imprinting. Epigenetic methylation disorders develop gradually in the ongoing process of carcinogenesis. Hypermethylation of CpG islands appears early in this process and the number of methylated CpG is successively increasing with the development of cancer and the progression of cancer malignancy. The process of the methylation of the new CpG islands begins and spreads, takes up more and more areas of the genome. This is probably due to the aging of the genome and the result of mediators of inflammation and oxidative stress in the cell.

The *CDH1* gene is located on the long arm of chromosome 16, in the 16q22.1 locus and encodes the E-cadherin protein (epithelial cadherin). E-cadherin is a 120 kD transmembrane homodimer composed of 882 amino acid residues. Scientific studies evaluating the expression of E-cadherin in various types of cancer, have demonstrated the key role of this protein during cancer progression and invasion. A low level of activity or lack of E-cadherin is closely related to cell changes and motility, resulting in more cancer metastases to the tissues. The low expression or lack of E-cadherin protein results of blocking the *CDH1* suppressor gene encoding this protein. The most important mechanism of weakening the expression or completely blocking the formation of E-cadherin is the hypermethylation of the promoter of the *CDH1*

gene. Reduced expression of E-cadherin is the main cause of dysfunction of intercellular adhesion, resulting in a partial or complete reduction of progeny cell adherence in tumor tissue and consequently an increased ability to infiltrate surrounding tissues as well as early ability to create metastases.

The aim of the study was to evaluate the effect of epigenetic disorders in the hypermethylation mechanism of the *CDH1* gene promoter in the DNA of tumor cells and in normal cells, on the clinical course, dynamics and prognosis of oral cancer. This was retrospective study. In the group of patients treated for oral cancer in the Clinic of Maxillofacial Surgery University Clinical Hospital in Rzeszów, Oncology Clinic of the Podkarpackie Center of Oncology and histological preparations obtained from the Department of Clinical Pathology of University Clinical Hospital in Rzeszów there were 58 men and 21 women. The Bioethical Commission of the University of Rzeszów, resolution No. 14/01/2019, agreed to conduct a methylation study of the *CDH1* suppressor gene as part of the research project: "Molecular disorders in various types of cancer and autoimmune diseases".

In this study I looked at the impact of hypermethylation of the *CDH1* suppressor gene in the DNA of oral cancer cells and normal cells from the surgical margin after cancer excision, on the clinical course and the treatment results of patients operated on oral cancer. The main studies concerned the correlation between *CDH1* hypermethylation and the time of onset of tumor recurrence, the time of metastases to regional lymph nodes, distant metastases and time of patients' survival.

The research was conducted in the context of searching for an answer to the question whether hypermethylation of the *CDH1* gene could be a biomarker used to patients monitoring after oral cancer surgery. Analysis of the results obtained in the study allowed to draw conclusions that this knowledge can be used in the treatment and follow-up of oral cancer. A statistically significant correlation was found between hypermethylation of the *CDH1* suppressor gene in the DNA of oral cancer cells and the incidence of metastases to the neck lymph nodes after the primary cancer surgery. This knowledge should be used for a more frequent examination of patients after oral cancer surgery, in whom hypermethylation was found and in case of the metastases to the regional lymph nodes are found, appropriate treatment can be started as soon as possible. Similar observations were made regarding the time of metastases to the neck lymph nodes, which was 4 months shorter in the group of patients with confirmed hypermethylation of the *CDH1* gene. In addition, the studies showed a positive and statistically significant correlation between DNA hypermethylation in the *CDH1* gene and the group of patients abusing alcohol, as

well as for smokers who smoked tobacco for many years. In my studies, there was no statistical correlation between hypermethylation of the *CDH1* gene in the DNA of oral cancer cells and normal cells of operative margin, and the frequency of cancer recurrence in the oral cavity, time of local recurrence, the frequency of distant metastases, time of occurrence of distant metastases and metastases to regional lymph nodes.

This research has expanded our knowledge on the molecular basis of oncogenesis of oral squamous cell carcinoma, combining the expression of the *CDH1* suppressor gene with determination of the methylation of the promoter regions of the tested gene and their effect on the clinical course of cancer and treatment results. Continuing epigenetic research may in the future contribute to the development of a clinically useful biomarker panel, support the diagnosis of oral cancer and become the foundation for the development of new therapeutic methods and oncological drugs based on epigenetic mechanisms.

Piśmiennictwo

1. Alexandrov K., Cascorbi I., Rojas M., Bouvier G., Bartsch H., *CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo-a-pyrene DNA adducts in smokers'lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation*, „Carcinogenesis” 2002; 23: 1969–1977.
2. Alexandrov L., Nik-Zainal S., Wedge D. et al., *Signatures of mutational process in human cancer*, „Nature” 2013; 500: 415–421.
3. Angadi P., Savitha J., Rao S. et al., *Oral field cancerization: current evidence and future perspectives*, „Oral Maxillofac Surg.” 2012; 16(2): 171–180.
4. Arantes L., de Carvalho A., Melendez M., et al., *Validation of methylation markers for diagnosis of oral cavity cancer*, „Eur J Cancer.” 2015; 51(5): 632–641.
5. Argiris A., Karamouzis M., Raben D., Ferris R., *Head and neck cancer*, „Lancet” 2008; 371: 1695–1709.
6. Asokan G., Jeelani S., Gnanasundaram N., *Promoter hypermethylation profile of tumour suppressor genes in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma*, „J Clin Diagn Res” 2014; 8: 9–12.
7. Bannister A.J., Kouzarides T., *Regulation of chromatin by histone modifications*, „Cell Res.” 2011; 21: 381–395.
8. Bartecchi C.E., Mackenzie T.D., Schrier R.W., *The human costs of tobacco use*, „N. Engl. J. Med.” 1994; 330: 907–912.
9. Baylin S.B., Jones P.A., *Epigenetic Determinants of Cancer*, „Cold Spring Harb. Perspect. Biol.” 2016; 8: 195–205.
10. Baylin S., Ohm J., *Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction?*, „Nature Reviews. Cancer.” 2006; 2(6): 107–116.
11. Becker K., Reich U., Schott C., Hoefler H., *Single nucleotide polymorphisms in the human E-cadherin gene*, „Hum Genet” 1995; 96(6): 739–740.
12. Ben Maamar M., Rigglesman I.S., Beck D., Skinner M.K. *Genome-Wide Mapping of DNA Methylation 5mC by Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP) – sequencing*, „Methods Mol. Biol.” 2021, 2198, 301–310.
13. Berx G., Staes K., van Hengel J., Molemans F., Bussemakers M., van Bokhoven A., van Roy F., *Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1)*, „Genomics” 1995; 26(2): 281–289.
14. Bestor T., *The DNA methyltransferases of mammals*, „Hum Mol Genet” 2000; 9: 2395–2402.

15. Bettendorf O., Piffko J., Bankfalvi A., *Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy?*, „Oral Oncol” 2004; 40: 110–119.
16. Bird A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*, „Genes Dev.” 2002; 16: 6–21.
17. Bird A., Wolffe A., *Methylation-Induced Repression – Belts, Braces, and Chromatin*, „Cell” 1999; 99(5): 451–454
18. Blot W.J., McLaughlin J.K., Winn D.M., Austin D.F., Greenberg R.S., Preston-Martin S., et al., *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*, „Cancer Res.” 1988; 48(11): 3282–3287.
19. Board R.E., Knight L., Greystoke A., Blackhall F.H., Hughes A., Dive C., Ranson M., *DNA methylation in circulating tumour DNA as a biomarker for cancer*, „Biomark. Insights” 2008; 2: 307–319.
20. Boggon T.J., Murray J., Chappuis-Flament S., Wong E., Gumbiner B.M., Shapiro L., *C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms*, „Science” 2002; 296(5571): 1308–1313.
21. Bonazzi V.F., Irwin D., Hayward N.K., *Identification of candidate tumor suppressor genes inactivated by promoter methylation in melanoma*, „Genes Chromosom. Cancer” 2009; 48: 10–21.
22. Brait M., Ford J., Papaiahgari S., et al., *Association between lifestyle factors and CpG island methylation in a cancer-free population*, „Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.” 2009; 18(11): 2984–2991.
23. Broniarczyk J., Koczorowska M., Durzyńska J., Warowicka A., Goździcka-Józefiak A., *Struktura i właściwości wirusa brodawczaka ludzkiego*, „Biotechnologia” 2010; 3(90): 126–145.
24. Bucker L., Lehmann U. *CDH1 (E-cadherin) Gene Methylation in Human Breast Cancer: Critical Appraisal of a long and Twisted Story*, „Cancers” 2022, 14, 4377.
25. Burri N., Shaw P., Bouzourene H., et al., *Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer*, „Lab Invest.” 2001; 81(2): 217–229.
26. Carvalho A., Jeronimo C., Kim M., et al., *Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma*, „Clin Cancer Res.” 2008; 14(1): 97–107.
27. Chang H., Chow V., Lam K., et al., *Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance*, „Cancer.” 2002; 94(2): 386–392.
28. Chen Z., Riggs A., *Maintenance and regulation of DNA methylation patterns in mammals*, „Biochem. Cell Biol.” 2005; 83: 438–448.
29. Chen Z., Zhang C., Kim C., Xue Y., *Quantum mechanics study and Monte Carlo simulation on the hydrolytic deamination of 5-methylcytosine glycol*, „Phys Chem Chem Phys” 2011; 13: 6471–6483.

30. Choudhury J., Ghosh S., *Promoter Hypermethylation Profiling Identifies Subtypes of Head and Neck Cancer with Distinct Viral, Environmental, Genetic and Survival Characteristics*, „PLoS One.” 2015; 10(6): 1–19.
31. Colotta F., Allavena P., Ica A., Garlanda C., and Mantovani A., *Cancer – related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*, „Carcinogenesis” 2009; 30: 1073–1081.
32. Copper M.P., Jovanovic A., Nauta J.J., et al., *Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck*, „Arch Otolaryngol Head Neck Surg.” 1995; 121(2): 157–60.
33. Dawson M.A., Kouzarides T., *Cancer epigenetics: From mechanism to therapy*, „Cell” 2012; 150: 12–27.
34. Delpu Y., Cordelier P., Cho W.C., Torrisani J., *DNA methylation and cancer diagnosis*, „Int J Mol Sci” 2013; 14: 15029–15058.
35. Demokan S., Dalay N., *Role of DNA methylation in head and neck cancer*, „Clin Epigenetics.” 2011; 2(2): 123–150.
36. Díez-Pérez R., Campo-Trapero J., Cano-Sánchez J., et al., *Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review)*, „Oncol Rep.” 2011; 25(5): 1203–1209.
37. Dorri F., Mendelowitz L., Corrada Bravo H., *methyFlow: cell-specific methylation pattern reconstruction from high-throughput bisulfite-converted DNA sequencing*, „Bioinformatics.” 2016; 32(11): 1618–1624.
38. Dubis A., Urbanik A., *Limfadenopatia szyjna – przyczyny i możliwości diagnostyczne*, „Mag. Stom.” 2013; 5: 30–38.
39. Ehrlich M., *DNA methylation in cancer: too much, but also too little*, „Oncogene” 2002; 21: 5400–5413.
40. Ehrlich M., *DNA hypomethylation in cancer cells*, „Epigenomics” 2009; 1: 239–259.
41. Ehrlich M., Gama-Sosa M., Huang L., Midgett R., Kuo K., McCune R., Gehrke C., *Amount and Distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissue of cells*, „Nucleic Acids Res.” 1982; 10: 2709–2721.
42. Elinav E., Nowarski R., Thaïss C., Hu B., Jin C., Flavell R., *Inflammation – induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms*, „Nat. Rev. Cancer” 2013; 13: 759–771.
43. Esteller M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*, „Nat Rev Genet” 2007; 8: 286–98.
44. Esteller M., *Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation*, „Human Molecular Genetics” 2007; 16: 50–59.
45. Esteller M., et al., *DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis*, „Hum Mol Genet” 2001; 8: 34–39.
46. Esteller M., Corn P., Baylin S., et al., *A gene hypermethylation profile of human cancer*, „Cancer Res.” 2001; 61(8): 3225–3229.

47. Esteller M., Pandolfi P.P., *The Epitranscriptome of Noncoding RNAs in Cancer*, „Cancer Discov.” 2017; 7: 359–368.
48. Esteller M., *Epigenetics in Cancer*, „The New England Journal of Medicine” 2008; 358(11): 1148–1159.
49. Esteller M., Hamilton S., Burger P., Baylin S., Herman J., *Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine DNA methyltransferase by promotor hypermethylation is a common event in primary human neoplasia*, „Cancer Res” 1999; 59: 793–797.
50. Esteller M., Silva J., Dominguez G., Bonilla F., Matias-Guiu X., Lerma E., Bussaglia E., Prat J., Harkes I., Repasky E., Gabrielson E., Schutte M., Baylin S., Herman J., *Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors*, „J. Natl Cancer Inst.” 2000; 92, 561–569.
51. Feinberg A.P., Tycko B., *The history of cancer epigenetics*, „Nat. Rev. Cancer” 2004, 4, 143–153.
52. Fraga M.F., Herranz M., Paz M.F., Ropero S., Erkek E., et al., *A Mouse Skin Multi-stage Carcinogenesis Model Reflects the Aberrant DNA Methylation Patterns of Human Tumors*, „Cancer Research” 2004; 64(16): 5527–5534.
53. Gal-Yam E.N., Saito Y., Egger G., Jones P.A., *Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy*, „Annu Rev Med” 2008; 59: 267–280.
54. Gao S., Eiberg H., Krogdahl A., et al., *Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas*, „J Oral Pathol Med.” 2005; 34(2): 116–119.
55. Gasche J., Goel A., *Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis*, „Future Oncol.” 2012; 8(11): 1407–1425.
56. Gasche J., Hoffmann J., Boland C., Goel A., *Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells*, „Int J Cancer” 2011; 129 (5): 1053–1063.
57. Ge M., Ling Z., Tan Z., et al., *Expression and significance of E-cadherin in adenoid cystic carcinoma of salivary glands*, „Natl Med J China” 2012; 92: 106–109.
58. Graziano F., Humar B., Guilford P., *The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice*, „Ann Oncol” 2003; 14(12): 1705–1713.
59. Grądańska-Lampart M., Radziszewska A., Patro A., Lewandowski B., *Nowotwory złośliwe w województwie podkarpackim w 2015 roku*, Rzeszów 2017: 18–23.
60. Guohong W., Huadong W., Zhaohui Z., *Associations of RASSF1A, RARb, and CDH1 promoter hypermethylation with oral cancer risk. A PRISMA – compliant meta-analysis*, „Medicine” 2018; 97(11): 1–9.
61. Hashibe M., Brennan P., Chuang S.C., Boccia S., Castellsauge X., Chen C., et al., *Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer:*

- Pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*, „Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.” 2009; 18: 541–550.
62. Hatziapostolou M., Iliopoulos D., *Epigenetic aberrations during oncogenesis*, „Cell. Mol. Life Sci.” 2011; 68: 1681–1702.
 63. Hayashi M., Wu G., Roh J., et al., *Correlation of gene methylation in surgical margin imprints with locoregional recurrence in head and neck squamous cell carcinoma*, „Cancer.” 2015; 121(12): 1957–1965.
 64. Hecht S.S., *Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer*, „Nat. Rev. Cancer” 2003; 3: 733–737.
 65. Heck J., Berthiller J., Vaccarella S., Winn D., Smith E., Shanjina O., et al., *Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium*, „Int J Epidemiol.” 2010; 39(1): 166–181.
 66. Hema K.N., Smitha T., Sheethal H.S., Mirnalini S.A., *Epigenetics in oral squamous cell carcinoma*, „J Oral Maxillofac Pathol” 2017; 21: 252–259.
 67. Herfarth K., Brent T., Danam R., Remack J., Kodner I., Wells Jr S., Goodfellow P., *Mol. „Carcinogen.”* 1999; 24: 90–98
 68. Herman J., Baylin S., *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*, „N Eng. J Med.” 2003; 349: 2042–2054.
 69. Herman J., Graff J., Myöhänen S., Nelkin B., Baylin S., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*, „Proc Natl Acad Sci U S A.” 1996; 93(18): 9821–9826.
 70. Heyn H., Esteller M., *DNA methylation profiling in the clinic: Applications and challenges*, „Nat. Rev. Genet.” 2012; 13: 679–692.
 71. Hubert Low T.H., Gao K., Elliott M., et al., *Tumor classification for early oral cancer: re-evaluate the current TNM classification*, „Head Neck.” 2015; 37: 223–228.
 72. Ishida E., Nakamura M., Ikuta M., et al., *Promotor hypermethylation of p14ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma*, „Oral Oncol.” 2005; 41(6): 614–622.
 73. Issa J. P., et al., *Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon*, „Nature Genet.” 1994; 7: 536–540.
 74. Jacinto F., Esteller M., *Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer*, „Mutagenesis” 2007; 22(4): 247–253;
 75. Jackson S., Bartek J., *The DNA – damage response in human biology and disease*, „Nature” 2009; 461: 1071–1078.
 76. Jamora C., DasGupta R., Kocieniewski P., Fuchs E., *Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development*, „Nature” 2003; 422(6929): 317–322.

77. Janiszewska M., Primi M.C., Izard T. *Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells*, „J.Biol.Chem.” 2020, 295, 2495–2505.
78. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., Thun M., *Cancer statistics, 2008*, „CA Cancer J. Clin.” 2008; 58: 71–96.
79. Jiang C., Pugh B., *Nucleosome positioning and gene regulation: Advances through genomics*, „Nat. Rev. Genet.” 2009; 10: 161–172.
80. Jin B., Robertson K.D., *DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer*, „Adv. Exp. Med. Biol.” 2013; 754: 3–29.
81. Jones P., Baylin S., *The fundamental role of epigenetic events in cancer*, „Nat. Rev. Genet.” 2002; 3: 415–428.
82. Kanwal R., Gupta S., *Epigenetic modifications in cancer*, „Clin. Genet.” 2012; 81: 303–311.
83. Kato K., Hara A., Kuno T., et al., *Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa*, „J Cancer Res Clin Oncol.” 2006; 132(11): 735–743.
84. Kaur J., Demokan S., Tripathi S., et al., *Promoter hypermethylation in Indian primary oral squamous cell carcinoma*, „Int J Cancer.” 2010; 127(10): 2367–2373.
85. Kerishnan J., Gopinath S., Kai S., et al., *Detection of Human Papillomavirus 16-Specific IgG and IgM Antibodies in Patient Sera: A Potential Indicator of Oral Squamous Cell Carcinoma Risk Factor*, „Int J Med Sci.” 2016; 13(6): 424–431.
86. Khin S., Kitazawa R., Kondo T., Idei Y., Fujimoto M., Haraguchi R., Mori K., Kitazawa S., *Epigenetic alteration by DNA promoter hypermethylation of genes related to transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling in cancer*, „Cancers (Basel)” 2011; 3: 982–993.
87. Klose R.J., Bird A.P., *Genomic DNA methylation: The mark and its mediators*, „Trends Biochem. Sci.” 2006; 31: 89–97.
88. Knudson A., *Hereditary cancer: two hits revisited*, „J Cancer Res Clin Oncol.” 1996; 122(3): 135–40.
89. Knudson A., *Chasing the cancer demon*, „Annu Rev Genet.” 2000; 34: 1–19.
90. Kordi-Tamandani D., Moazeni-Roodi A., Rigi-Ladiz M., et al., *Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer*, „Arch Oral Biol” 2010; 55: 809–814.
91. Kowalik S., Halczy-Kowalik L., *Rak jamy ustnej*, Wydawnictwo Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin 2001.
92. Kryst L., *Chirurgia szczękowo-twarzowa*, PZWL, Warszawa 2011: 417–459.
93. Kulis M., Esteller M., *DNA methylation and cancer*, „Adv. Genet.” 2010; 70: 27–56.
94. Kumar M., Nanavati R., Modi T., Dobariya C., *Oral cancer: Etiology and risk factors: A review*, „J Can Res Ther” 2016; 12: 458–463.

95. Leemans C., Braakhuis B., Brakenhoff R., *The molecular biology of head and neck cancer*, „Nat Rev Cancer.” 2011; 11(1): 9–22.
96. Li B., Wang B., Niu L.J., Jiang L., Qiu C.C., *Hypermethylation of multiple tumor-related genes associated with D.N.M.T.3b up-regulation served as a biomarker for early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma*, „Epigenetics” 2011; 6(3): 307–16.
97. Lin J.C., Jeong S., Liang G., Takai D., Fatemi M., Tsai Y.C., Egger G., Gal-Yam E.N., Jones P.A., *Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the mlh1 cpG island*, „Cancer Cell” 2007; 12: 432–444.
98. Lindsay C., Seikaly H., Biron V., *Epigenetics of oropharyngeal squamous cell carcinoma: opportunities for novel chemotherapeutic targets*, „J Otolaryngol Head Neck Surg.” 2017; 46(1): 9.
99. Lingen M.W., Pinto A., Mendes R.A., Franchini R., Czerninski R. et al., *Genetics/epigenetics of oral premalignancy: Current status and future research*, „Oral Dis.” 2011; 17 (Suppl. 1): 7–22.
100. Liu L.K., Jiang X.Y., Zhou X.X., Wang D.M., Song X.L., Jiang H.B., *Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome*, „Mod Pathol.” 2010; 23(2): 213–224.
101. Llewellyn C., Johnson N., Warnakulasuriya K., *Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review*, „Oral Oncol.” 2001; 37(5): 401–418.
102. Longo A., Rettori M., de Carvalho A., et al., *Evaluation of the methylation profile of exfoliated cell samples from patients with head and neck squamous cell carcinoma*, „Head Neck.” 2014; 36(5): 631–637.
103. Macleod K., *Tumor suppressor genes*, „Curr. Opin. Genet. Dev.” 2000; 10: 81–93.
104. McCabe M., *Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical*, „Clin Cancer Res” 2009; 15: 3927–3937.
105. McCabe M.T., Brandes J.C., Vertino P.M., *Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications*, „Clin Cancer Res” 2009; 15: 3927–3937.
106. Majchrzak E., Szybiak B., Wegner A., Pienkowski P., Pazdrowski J., et al., *Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature*, „Radiol Oncol.” 2014; 48(1): 1–10.
107. Mao L., Clark D., *Molecular margin of surgical resections – Where do we go from here?*, „Cancer.” 2015; 121: 1914–1916.
108. Marsit C., Posner M., Kelsey M., *Hypermethylation of E-Cadherin is an independent predictor of improved survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, „Cancer” 2008; 113(7): 1566–1571.
109. Martone T., Gillio-Tos A., De Marco L., et al., *Association between hypermethylated tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas*, „Clin Cancer Res.” 2007; 13(17): 5089–5094.

110. Mascolo M., Siano M., Ilardi G., Russo D., Merolla F., De Rosa G., Staibano S., *Epigenetic Disregulation in Oral Cancer*, „Int. J. Mol. Sci.” 2012; 13: 2331–2353.
111. Massie C., Mills I., Lynch A., *The importance of DNA methylation in prostate cancer development*, „J Steroid Biochem Mol Biol.” 2017; 166: 1–15.
112. Misawa K., Mochizuki D., Imai A., et al., *Prognostic value of aberrant promoter hypermethylation of tumor-related genes in early-stage head and neck cancer*, „Onco-target.” 2016; 7(18): 26087–98.
113. Moody C.A., Laimins L.A., *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*, „Nat. Rev. Cancer” 2010; 10: 550–560.
114. Morandi L., Gissi D., Tarsitano A., et al., *DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing*, „J Craniomaxillofac Surg” 2015; 43: 1494–1500.
115. Mork J., Lie A., Glatte E., et al., *Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck*, „N Engl J Med.” 2001; 344(15): 1125–1131.
116. Mukai T., Sekiguchi M., *Gene silencing in phenomena related to DNA repair*, „Oncogene” 2002; 21: 9033–9042.
117. Nagata S., Hamada T., Yamada N., et al., *Aberrant DNA methylation of tumor-related genes in oral rinse: a noninvasive method for detection of oral squamous cell carcinoma*, „Cancer.” 2012; 118(17): 4298.
118. Nakagawachi T., Soejima H., Urano T., *Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer*, „Oncogene” 2003; 22: 8835–8844.
119. Noorlag R., van Kempen P., Moelans C., et al., *Promoter hypermethylation using 24-gene array in early head and neck cancer: better outcome in oral than in oropharyngeal cancer*, „Epigenetics.” 2014; 9(9): 1220–1227.
120. Ohshima H., Bartsch H., *Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis*, „Mutat Res” 1994; 305: 253–264.
121. Okano M., Bell D., Harber D., Li E., *DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development*, „Cell” 1999; 99: 247–257.
122. Palmisano W.A., Divine K.K., Saccomanno G., Gilliland F.D., Baylin S.B., Herman J.G., Belinsky S.A., *Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum*, „Cancer Res.” 2000, 60; 21: 5954–8.
123. Pannone G., Santoro A., Feola A., Bufo P., Papagerakis P. et al., *The role of E-Cadherin down-regulation in oral cancer: CDH1 gene expression and epigenetic blockage*, „Current Cancer Drug Targets” 2014; 14 (2): 1–13.

124. Parry T.E., *Mutagenic mechanisms in leukemia and cancer: a new concept Cytosine lack could be as mutagenic as cytosine deamination*, „Leuk. Res.” 2006; 30: 1079–1083.
125. Paska A., Hudler P., *Aberrant methylation patterns in cancer: a clinical view*, „Biochem Med” 2015; 25(2): 161–176.
126. Pasz-Walczak G., Jesionek-Kupnicka D., Kubiak R., Kordek R., *Podstawowe mechanizmy kancerogenezy w jelicie grubym*, „Współcz. Onkol.” 2004; 8(6) 303–307.
127. Paz M., Fraga M., Avila S., Guo M., Pollan M., Herman J., Esteller M., *A systemic profile of DNA methylation in human cancer cell lines*, „Cancer Res.” 2003; 63: 1114–1121
128. Pecina-Slaus N., *Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells*, „Cancer Cell Int” 2003; 3(1): 1–7.
129. Pecorino L., *Biologia molekularna nowotworów w praktyce klinicznej*, Edra Urban&Partner 2018; 3: 63–65.
130. Pelucchi C., Gallus S., Garavello W., Bosetti C., La Vecchia C., *Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero digestive tract and liver*, „Health risks.” 2006, Vol. 29, No. 3: 193–198.
131. Polz-Gruszka D., Macieląg P., Foltyn S., Polz-Dacewicz M., *Oral squamous cell carcinoma (OSCC) – molecular, viral and bacterial concepts*, „J Pre-Clin Clin Res.” 2014; 8(2): 61–66.
132. Puri S., Si L., Fan C., et al., *Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma*, „Am J Otolaryngol.” 2005; 26(1): 12–17.
133. Qian X.C., Brent T.P., *Methylation hot spots in the 5'flanking region denote silencing of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene*, „Cancer Res” 1997; 57: 3672–3677.
134. Rideout W.M. III, Coetzee G.A., Olumi A.F., Jones P.A., *5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes*, „Science” 1990; 249: 1288–1290
135. Righini C., de Fraipont F., Timsit J., et al., *Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence*, „Clin Cancer Res.” 2007; 13(4): 1179–85.
136. Robertson K.D., *DNA methylation and human disease*, „Nat. Rev. Genet.” 2005; 6: 597–610.
137. Rountree M.R., Bachman K.E., Herman J.G., Baylin S.B., *DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer*, „Oncogene” 2001; 20: 3156–3165.
138. Sadikovic B., Al-Romaih K., Squire J.A., Zielenska M., *Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer*, „Curr. Genomics” 2008; 9: 394–408.

139. Salozhin S., Prokhorchuk E., Georgiev G., *Methylation of DNA-one of the major epigenetic markers*, „Biochemistry” 2005; 70: 525–532.
140. Santoro A., Pannone G., Papagerakis S., Serpico R., Guida A., Lo Muzio L., Bufo P., *Epigenetic Profiling of Oral Cancer*, „Oral Cancer” 2012; 297–313.
141. Sarkies P. *Encyclopaedia of eukaryotic DNA methylation: From patterns to mechanisms and functions*, „Biochem.Soc.Trans.” 2022, 50, 1179–1190.
142. Seshachryulu P., Ponnusamy M., Haridas D., et al., *Targeting the EGFR signalling pathway in cancer therapy*, „Expert Opin. Ther. Targets” 2012; 16: 15–31.
143. Sharma S., Kelly T.K., Jones P.A., *Epigenetics in cancer*, „Carcinogenesis” 2010; 31: 27–36.
144. Shaw R., Liloglou T., Rogers S., et al., *Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing*, „Br J Cancer.” 2006; 94(4): 561–568.
145. Shen Z., Zhou C., Li J., et al., *The association, clinicopathological significance, and diagnostic value of CDH1 promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis of 23 studies*, „Onco Targets Ther.” 2016; 9: 6763–6773.
146. Sherr C.J., *Principles of tumor suppression*, „Cell” 2004; 116: 235–246; Berger A., Knudson A., Pandolfi P., *A continuum model for tumor suppression*, „Nature” 2011; 476: 163–169.
147. Silber J., Bobola M., Ghatan S., Blank A., Kolstoe D., Berger M., *O⁶-methyl-guanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumour characteristics*, „Cancer Res” 1998; 58: 1068–1073.
148. Sinha P., Bahadur S., Thakar A., Matta A., Macha M., Ralhan R., Gupta S., *Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue*, „Head Neck.” 2009; 31 (11): 1423–1430.
149. Starzyńska A., Barańska-Rybak W., Filipowicz J. i wsp., *Prognostic factors in the cancers of the oral cavity*, „Pol. J. Environ. Stud.” 2009; 18: 299–302.
150. Su P., Huang W., Wu H., et al., *p16INK4A promoter hypermethylation is associated with invasiveness and prognosis of oral squamous cell carcinoma in an age-dependent manner*, „Oral Oncol.” 2010; 46(10): 734–739.
151. Šupić G., Jagodic M., Magić Z., *Epigenetics: a new link between nutrition and cancer*, „Nutr Cancer.” 2013; 65(6): 781–792.
152. Šupić G., Kozomara R., Branković-Magić M., et al., *Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients*, „Oral Oncol.” 2009; 45(12): 1051–1057.
153. Šupić G., Kozomara R., Jovic N., et al., *Prognostic significance of tumor-related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas*, „Oral Oncol.” 2011; 47(8): 702–708.
154. Suzuki M.M., Bird A., *DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics*, „Nat. Rev. Genet.” 2008; 9: 465–476.

155. Tabor M., Brakenhoff R., van Houten V., et al., *Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications*, „Clin Cancer Res.” 2001; 7(6): 1523–1532.
156. Tan H., Saulnier P., Auperin A., et al., *Quantitative methylation analyses of resection margins predict local recurrences and disease-specific deaths in patients with head and neck squamous cell carcinomas*, „Br J Cancer.” 2008; 99(2): 357–363.
157. Tulisiak C., Harris R., Ponomarev I., *DNA modifications in models of alcohol use disorders*, „Alcohol.” 2017; 60: 19.
158. Ushijima T., Nakajima T., Maekita T., *DNA methylation as a marker for the past and future*, „J Gastroenterol.” 2006; 41(5): 401–407.
159. Ushijima T., Okochi-Takada E., *Aberrant methylations in cancer cells: where do they come from?*, „Cancer Sci.” 2005; 96(4): 206–211.
160. Ushijima T., Watanabe N., Shimizu K., et al., *Decreased fidelity in replicating CpG methylation patterns in cancer cells*, „Cancer Res.” 2005 Jan 1; 65(1): 11–17.
161. Waddington, C.H., *The epigenotype. 1942*, „In. J. Epidemiol.” 2012; 41: 10–13.
162. Watts G., Pieper R., Costello J., Peng Y., Dalton W., Futscher B., *Methylation of discrete regions of the O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG Island is associated with heterochromatization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene*, „Mol Cell Biol” 1997; 17: 5612–5619.
163. Wei S.H., Balch C., Paik H.H., Kim Y.S., Baldwin R.L., et al., *Prognostic DNA methylation biomarkers in ovarian cancer*, „Clin Cancer Res” 2006; 12: 2788–2794.
164. Werner R., Kelly A., Issa J., *Epigenetics and Precision Oncology*, „The Cancer Journal” 2017; 23(5): 262–269.
165. Wong T., Gao W., Chan J., *Interactions between E-cadherin and microRNA deregulation in head and neck cancers: the potential interplay*, „Biomed Res Int.” 2014; 1–9.
166. Wong T., Man M., Lam A., et al., *The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR*, „Eur J Cancer.” 2003; 39(13): 1881–7.
167. Wyss A., Hashibe M., Chuang S., et al., *Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*, „Am J Epidemiol.” 2013; 178(5): 679–90.
168. van Kempen P., Noorlag R., Braunius W., et al., *Differences in methylation profiles between HPV-positive and HPV-negative oropharynx squamous cell carcinoma: a systematic review*, „Epigenetics.” 2014; 9(2): 194–203.
169. van Kempen P., van Bockel L., Braunius W., et al., *HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma is associated with TIMP3 and CADM1 promoter hypermethylation*, „Cancer Med.” 2014; 3(5): 1185–1196.
170. Valinluck V., Tsai H.H., Rogstad D.K., *Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2)*, „Nucleic Acids Res” 2004; 32: 4100–4108.

171. Vered M., Allon I., Buchner A., Dayan D., *E-cadherin in oral SCC: an analysis of the confusing literature and new insights related to its immunohistochemical expression*, „Histol Histopathol.” 2012; 27(2): 141–150.
172. Xiao C., Wang L., Zhu L., et al., *Secreted frizzled-related protein 2 is epigenetically silenced and functions as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma*, „Mol Med Rep.” 2014; 10(5): 2293–8.
173. Yoon D., Hwang H., Chang S. et al., *CT, MR, US, 18F-FDG PET/CT and their combined use for the assessment of cervical lymph node metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck*, „Eur. Radiol.” 2009; 19: 634–642.
174. Yoshiura K., Kanai Y., Ochiai A., et al., *Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas*, „Proc Natl Acad Sci USA.” 1995; 92(16): 7416–7419.
175. Zapła J., Wyszynska G., *Wybrane zagadnienia z onkologii głowy i szyi*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego. 2017: 83–107.
176. Zeilinger S., Kühnel B., Klopp N., et al., *Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation*, „PLoS One.” 2013; 8(5).
177. Zur Hausen H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*, „Nat. Rev. Cancer” 2002; 2: 342–350.

Aneks do analiz statystycznych

Tabela 1. Tabela wielodzielcza zmiennej w postaci metylacji guza i w otoczeniu w podgrupach według płci

Tabela licznosci (Arkusz Statistica) Licznosc oznacz. komorek > 10 (Nie oznaczono sum brzegowych)				
Zmn1	Zmn2	Zmn4 0	Zmn4 1	Wiersz Razem
0	0	6	4	10
0	1	4	2	6
Ogól		10	6	16
1	0	3	2	5
1	1	23	4	27
Ogól		26	6	32
Razem w kol.		58	21	79

Tabela 2. Tabela wielodzielcza zmiennej 5 (palenie tytoniu) i 6 (picie alkoholu) względem zmiennej 4 (płeć)

Tabela licznosci (Arkusz Statistica) Licznosc oznacz. komorek > 10 (Nie oznaczono sum brzegowych)			
Zmn4	Zmn5 0	Zmn5 1	Wiersz Razem
0	7	29	58
1	9	3	21
Ogól	16	32	79
Zmn4	Zmn6 0	Zmn6 1	Wiersz Razem
0	15	21	58
1	11	1	21
Ogól	26	22	79

Tabela 3. Tabela wielodzielcza zmiennej 5 (palenie tytoniu) i 6 (picie alkoholu) względem zmiennej 1 (obecność lub brak metylacji genu *CDH1* w obrębie guza) oraz zmiennej 2 (obecność lub brak metylacji genu *CDH1* w obrębie otaczającej zdrowej tkanki)

Tabela licznosci (Arkusz Statistica) Licznosc oznacz. komorek > 10 (Nie oznaczono sum brzegowych)			
Zmn1	Zmn5 0	Zmn5 1	Wiersz Razem
0	5	11	21
1	11	21	59
Ogól	16	32	58
Zmn1	Zmn6 0	Zmn6 1	Wiersz Razem
0	7	9	21
1	19	13	32
Ogól	26	22	58
Zmn2	Zmn5 0	Zmn5 1	Wiersz Razem
0	6	9	24
1	10	23	55
Ogól	16	32	79
Zmn2	Zmn6 0	Zmn6 1	Wiersz Razem
0	7	8	15
1	19	14	64
Ogól	26	22	79

Tabela 4. Wartości współczynników korelacji rangowej Spearmana dla wszystkich zmiennych

Zmienna	Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz Statistica) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < 0,05000$														
	Zmn1	Zmn2	Zmn3	Zmn4	Zmn5	Zmn6	Zmn7	Zmn8	Zmn9	Zmn10					
Zmn1	1	0,48	0,23	-0,20	-0,03	-0,15	0,14	-0,22	0,10	0,00					
Zmn2	0,48	1,00	0,18	-0,23	0,10	-0,10	0,21	-0,25	0,23	-0,13					
Zmn3	0,23	0,18	1,00	0,13	-0,32	-0,37	-0,05	-0,31	0,32	-0,23					
Zmn4	-0,20	-0,23	0,13	1,00	-0,51	-0,43	-0,17	0,08	-0,05	-0,11					
Zmn5	0,0	0,1	-0,3	-0,5	1,0	0,6	0,0	0,1	-0,1	-0,1					
Zmn6	-0,1	-0,1	-0,4	-0,4	0,6	1,0	0,1	0,0	0,0	0,0					
Zmn7	0,14	0,21	-0,05	-0,17	0,04	0,15	1,00	-0,53	0,44	-0,09					
Zmn8	-0,22	-0,25	-0,31	0,08	0,06	0,02	-0,53	1,00	-0,97	0,38					
Zmn9	0,10	0,23	0,32	-0,05	-0,06	-0,04	0,44	-0,97	1,00	-0,38					
Zmn10	0,00	-0,13	-0,23	-0,11	-0,10	-0,05	-0,09	0,38	-0,38	1,00					
Zmn11	-0,05	0,08	0,17	0,13	0,13	0,10	0,03	-0,31	0,31	-0,99					
Zmn12	-0,11	-0,12	-0,32	0,00	0,05	0,18	-0,21	0,41	-0,37	0,52					
Zmn13	0,11	0,14	0,32	-0,01	-0,04	-0,17	0,20	-0,41	0,37	-0,52					
Zmn14	0,21	-0,01	-0,12	0,05	-0,06	-0,09	-0,18	0,28	-0,31	0,53					
Zmn15	-0,25	-0,12	-0,17	0,08	0,17	0,15	-0,06	-0,15	0,17	-0,42					

Zmienna	Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz Statistica) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < 0,05000$									
	Zmn1	Zmn2	Zmn3	Zmn4	Zmn5	Zmn6	Zmn7	Zmn8	Zmn9	Zmn10
Zmn16	-0,22	-0,17	-0,43	-0,06	0,30	0,31	-0,22	0,33	-0,32	0,17
Zmn17	-0,09	-0,12	-0,34	-0,04	0,27	0,43	-0,08	0,19	-0,23	0,18
Zmn18	0,16	0,14	0,00	0,05	-0,03	0,05	0,14	-0,09	0,11	-0,05
Zmn19	-0,37	-0,20	0,10	0,45	-0,18	-0,24	-0,18	-0,01	0,07	-0,15
Zmn20	0,43	0,31	0,34	-0,24	-0,07	-0,28	-0,06	-0,16	0,10	-0,03
Zmn21	-0,10	-0,03	-0,10	-0,11	0,20	0,34	0,12	0,08	-0,09	0,22
Zmn22	-0,27	-0,28	-0,34	0,00	0,05	0,03	-0,13	0,25	-0,22	-0,17
Zmn23	-0,29	-0,31	-0,18	0,12	-0,07	0,02	-0,02	0,06	-0,07	0,12
Zmn24	0,20	0,06	-0,15	-0,13	0,20	0,15	0,19	0,02	-0,08	-0,26
Zmn25	0,18	0,04	-0,15	-0,12	0,18	0,15	0,20	0,04	-0,10	-0,26
Zmn26	-0,18	-0,31	-0,34	-0,10	0,18	0,09	-0,15	0,23	-0,22	0,42
Zmn27	-0,07	-0,20	-0,34	0,08	0,13	0,00	-0,30	0,23	-0,23	0,19
Zmn28	-0,08	-0,18	-0,35	0,05	0,16	-0,01	-0,29	0,22	-0,21	0,15
Zmn29	0,08	-0,04	-0,05	0,15	-0,10	0,04	-0,21	0,25	-0,26	0,36

Zmienna	Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz Statistica) BD usuwane parami Oznaczone są istotne z $p < 0,05000$									
	Zmn11	Zmn12	Zmn13	Zmn14	Zmn15	Zmn16	Zmn17	Zmn18	Zmn19	Zmn20
Zmn1	-0,05	-0,11	0,11	0,21	-0,25	0,05	0,12	-0,22	-0,09	0,16
Zmn2	0,08	-0,12	0,14	-0,01	-0,12	0,14	-0,09	-0,17	-0,12	0,14
Zmn3	0,17	-0,32	0,32	-0,12	-0,17	-0,01	-0,34	-0,43	-0,34	0,00
Zmn4	0,13	0,00	-0,01	0,05	0,08	0,03	-0,07	-0,06	-0,04	0,05
Zmn5	0,13	0,05	-0,04	-0,06	0,17	-0,09	0,20	0,30	0,27	-0,03
Zmn6	0,10	0,18	-0,17	-0,09	0,15	0,05	0,16	0,31	0,43	0,05
Zmn7	0,03	-0,21	0,20	-0,18	-0,06	-0,16	0,12	-0,22	-0,08	0,14
Zmn8	-0,31	0,41	-0,41	0,28	-0,15	0,14	0,17	0,33	0,19	-0,09
Zmn9	0,31	-0,37	0,37	-0,31	0,17	-0,07	-0,19	-0,32	-0,23	0,11
Zmn10	-0,99	0,52	-0,52	0,53	-0,42	0,00	0,28	0,17	0,18	-0,05
Zmn11	1,00	-0,47	0,47	-0,50	0,45	0,03	-0,28	-0,13	-0,11	0,07
Zmn12	-0,47	1,00	-1,00	0,33	-0,39	0,10	0,26	0,28	0,30	-0,03
Zmn13	0,47	-1,00	1,00	-0,33	0,41	-0,08	-0,27	-0,28	-0,29	0,04
Zmn14	-0,50	0,33	-0,33	1,00	-0,55	0,09	0,05	0,28	0,40	-0,04
Zmn15	0,45	-0,39	0,41	-0,55	1,00	-0,09	-0,02	0,08	0,22	0,33
Zmn16	-0,13	0,28	-0,28	0,28	0,08	0,07	0,16	1,00	0,52	-0,24
Zmn17	-0,11	0,30	-0,29	0,40	0,22	-0,06	0,11	0,52	1,00	0,20

Zmienna	Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz Statistica) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < 0,05000$										
	Zmn11	Zmn12	Zmn13	Zmn14	Zmn15	Zmn16	Zmn17	Zmn18	Zmn19	Zmn20	
Zmn18	0,07	-0,03	0,04	-0,04	0,33	-0,05	-0,10	-0,24	0,20	1,00	
Zmn19	0,15	-0,08	0,08	-0,24	0,13	0,04	-0,20	-0,01	-0,23	-0,17	
Zmn20	-0,02	-0,18	0,18	0,10	-0,40	0,09	-0,29	-0,16	-0,49	-0,39	
Zmn21	-0,19	0,17	-0,17	0,14	-0,03	0,11	0,37	0,35	0,45	-0,37	
Zmn22	0,17	-0,09	0,09	-0,13	0,15	-0,03	0,06	-0,06	-0,01	-0,19	
Zmn23	-0,12	0,31	-0,34	0,02	-0,15	-0,36	0,24	0,24	-0,05	-0,13	
Zmn24	0,25	-0,13	0,13	0,04	-0,03	-0,09	0,23	0,15	0,08	0,08	
Zmn25	0,25	-0,13	0,13	0,03	-0,02	-0,10	0,24	0,16	0,11	0,08	
Zmn26	-0,42	0,21	-0,22	0,27	-0,13	-0,08	0,38	0,59	0,26	-0,39	
Zmn27	-0,13	-0,01	0,02	0,57	0,31	0,05	0,07	0,35	0,60	0,23	
Zmn28	-0,10	-0,02	0,03	0,54	0,31	0,05	0,10	0,35	0,57	0,19	
Zmn29	-0,35	0,06	-0,06	0,50	-0,14	0,02	0,04	0,13	0,26	0,10	

Zmienna	Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz Statistica) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < 0,05000$										
	Zmn21	Zmn22	Zmn23	Zmn24	Zmn25	Zmn26	Zmn27	Zmn28	Zmn29	Zmn30	Zmn31
Zmn1	-0,37	0,43	-0,10	-0,27	-0,29	0,20	0,18	-0,18	-0,07	-0,08	0,08
Zmn2	-0,20	0,31	-0,03	-0,28	-0,31	0,06	0,04	-0,31	-0,20	-0,18	-0,04
Zmn3	0,10	0,34	-0,10	-0,34	-0,18	-0,15	-0,15	-0,34	-0,34	-0,35	-0,05

Zmienna	Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusze Statistica) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < 0,05000$													
	Zmn21	Zmn22	Zmn23	Zmn24	Zmn25	Zmn26	Zmn27	Zmn28	Zmn29	Zmn30	Zmn31			
Zmn4	0,45	-0,24	-0,11	0,00	0,12	-0,13	-0,12	-0,10	0,08	0,05	0,15			
Zmn5	-0,18	-0,07	0,20	0,05	-0,07	0,20	0,18	0,18	0,13	0,16	-0,10			
Zmn6	-0,24	-0,28	0,34	0,03	0,02	0,15	0,15	0,09	0,00	-0,01	0,04			
Zmn7	-0,18	-0,06	0,12	-0,13	-0,02	0,19	0,20	-0,15	-0,30	-0,29	-0,21			
Zmn8	-0,01	-0,16	0,08	0,25	0,06	0,02	0,04	0,23	0,23	0,22	0,25			
Zmn9	0,07	0,10	-0,09	-0,22	-0,07	-0,08	-0,10	-0,22	-0,23	-0,21	-0,26			
Zmn10	-0,15	-0,03	0,22	-0,17	0,12	-0,26	-0,26	0,42	0,19	0,15	0,36			
Zmn11	0,15	-0,02	-0,19	0,17	-0,12	0,25	0,25	-0,42	-0,13	-0,10	-0,35			
Zmn12	-0,08	-0,18	0,17	-0,09	0,31	-0,13	-0,13	0,21	-0,01	-0,02	0,06			
Zmn13	0,08	0,18	-0,17	0,09	-0,34	0,13	0,13	-0,22	0,02	0,03	-0,06			
Zmn14	-0,24	0,10	0,14	-0,13	0,02	0,04	0,03	0,27	0,57	0,54	0,50			
Zmn15	0,13	-0,40	-0,03	0,15	-0,15	-0,03	-0,02	-0,13	0,31	0,31	-0,14			
Zmn16	-0,01	-0,16	0,35	-0,06	0,24	0,15	0,16	0,59	0,35	0,35	0,13			
Zmn17	-0,23	-0,49	0,45	-0,01	-0,05	0,08	0,11	0,26	0,60	0,57	0,26			
Zmn18	-0,17	-0,39	-0,37	-0,19	-0,13	0,08	0,08	-0,39	0,23	0,19	0,10			
Zmn19	1,00	-0,16	-0,15	-0,08	-0,05	-0,12	-0,12	-0,16	-0,16	-0,16	-0,22			
Zmn20	-0,16	1,00	-0,35	-0,18	-0,13	0,10	0,08	-0,03	-0,27	-0,24	-0,05			
Zmn21	-0,15	-0,35	1,00	-0,17	-0,12	-0,13	-0,12	0,30	0,08	0,07	0,10			

Zmienna	Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz Statistica) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < 0,05000$										
	Zmn21	Zmn22	Zmn23	Zmn24	Zmn25	Zmn26	Zmn27	Zmn28	Zmn29	Zmn30	Zmn31
Zmn22	-0,08	-0,18	-0,17	1,00	-0,06	0,07	0,09	0,16	0,16	0,18	-0,07
Zmn23	-0,05	-0,13	-0,12	-0,06	1,00	-0,09	-0,09	0,27	-0,13	-0,13	0,04
Zmn24	-0,12	0,10	-0,13	0,07	-0,09	1,00	1,00	0,07	-0,02	0,00	0,15
Zmn25	-0,12	0,08	-0,12	0,09	-0,09	1,00	1,00	0,07	-0,02	0,01	0,16
Zmn26	-0,16	-0,03	0,30	0,16	0,27	0,07	0,07	1,00	0,23	0,25	0,08
Zmn27	-0,16	-0,27	0,08	0,16	-0,13	-0,02	-0,02	0,23	1,00	0,99	0,36
Zmn28	-0,16	-0,24	0,07	0,18	-0,13	0,00	0,01	0,25	0,99	1,00	0,31
Zmn29	-0,22	-0,05	0,10	-0,07	0,04	0,15	0,16	0,08	0,36	0,31	1,00

Tabela 5. Tabela wielodzielcza dla zmiennej 8 (zgon pacjenta) w odniesieniu do zmiennej 4 (płeć)

Tabela licznosci (Arkusz Statistica) Licznosc oznacz. komorek > 10 (Nie oznaczono sum brzegowych)			
Zmn4	Zmn8 0	Zmn8 1	Wiersz Razem
0	24	12	58
1	7	5	21
Ogół	24	55	79

Tabela 6. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 3 (wiek pacjenta) przy zmiennej grupującej 8 (wystąpienie lub niewystąpienie zgonu)

Zmienna	Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) (Arkusz Statistica) Względem zmiennej: Zmn8 Zaznaczone wyniki są istotne z $p < 0{,}05000$									
	Sum.rang Grupa 1	Sum.rang Grupa 2	U	Z	p	Z popraw.	p	N ważn. Grupa 1	N ważn. Grupa 2	2*1str. dokł. p
Zmn3	858,0000	318,0000	165,0000	2,112581	0,034637	2,114131	0,034505	31	17	0,033651

Tabela 7. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 9 (czas przeżycia w okresie obserwacji) przy zmiennej grupującej 3 (płeć pacjenta)

Zmienna	Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) (Arkusz Statistica) Względem zmiennej: Zmn4 Zaznaczone wyniki są istotne z $p < 0,05000$								
	Sum.rang Grupa 1	Sum.rang Grupa 2	U	Z	p	Z popraw.	p	N ważn. Grupa 1	N ważn. Grupa 2
Zmn9	894,0000	282,0000	204,0000	0,273810	0,784231	0,320405	0,748662	58	12

Tabela 8. Tabela wielodziedzicza dla zmiennej 10 (wystąpienie lub niewystąpienie miejscowej wznowy nowotworu) w odniesieniu do zmiennej 4 (płeć pacjenta)

Tabela licznosci (Arkusz Statistica) Licznosc oznacz. komorek > 10 (Nie oznaczono sum brzegowych)				
Zmn10	Zmn4 0	Zmn4 1	Wiersz Razem	
0	46	9	58	
1	12	12	21	
Ogół	58	21	79	

Tabela 9. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 11 (czas wystąpienia miejscowej wznowy nowotworu) przy zmiennej grupującej 3 (płeć pacjenta)

Zmienna	Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) (Arkusz Statistica) Względem zmiennej: Zmn4 Zaznaczone wyniki są istotne z $p < 0,05000$						
	Sum.rang Grupa 1	Sum.rang Grupa 2	U	Z	P	Z popraw.	P
Zmn11	854,5000	321,5000	188,5000	-0,642857	0,520317	-0,845575	0,397791
						58	21
							0,517611

Tabela 10. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 11 (czas wystąpienia miejscowej wznowy nowotworu) przy zmiennej grupującej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu *CDH1* w guzie)

Zmienna	Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) (Arkusz Statistica) Względem zmiennej: Zmn1 Zaznaczone wyniki są istotne z $p < 0,05000$						
	Sum.rang Grupa 1	Sum.rang Grupa 2	U	Z	P	Z popraw.	P
Zmn11	771,5000	404,5000	243,5000	-0,262445	0,792978	-0,345204	0,729941
						56	23
							0,786826

Tabela 11. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 11 (wystąpienie lub brak odległych przerzutów nowotworu) przy zmiennej grupującej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu *CDH1* w guzie i w otaczającej sąsiedniej tkance)

Zmienna	Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) (Arkusz Statistica) Względem zmiennej: Zmn2 Zaznaczone wyniki są istotne z $p < 0,05000$						
	Sum.rang Grupa 1	Sum.rang Grupa 2	U	Z	P	Z popraw.	P
Zmn11	828,0000	348,0000	228,0000	0,422614	0,672577	0,555880	0,578293
						53	26
							0,675933

Tabela 12. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 13 (czas bez wystąpienia odległych przerzutów nowotworu) przy zmiennej grupującej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu CDH1 w guzie)

Zmienna	Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) (Arkusz Statistica) Względem zmiennej: Zmn1 Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$						
	Sum.rang Grupa 1	Sum.rang Grupa 2	U	Z	P	Z popraw.	P
Zmn12	768,0000	408,0000	240,0000	-0,338992	0,734616	-0,707977	0,478960
						32	16
							2*Istr. dokł. p
							0,737333

Tabela 13. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 12 (wystąpienie lub brak odległych przerzutów nowotworu) przy zmiennej grupującej 2 (brak/obecność metylacji promotora genu CDH1 w otaczającej sąsiedniej tkance)

Zmienna	Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) (Arkusz Statistica) Względem zmiennej: Zmn2 Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$						
	Sum.rang Grupa 1	Sum.rang Grupa 2	U	Z	P	Z popraw.	P
Zmn12	790,5000	385,5000	229,5000	-0,389249	0,697092	-0,812939	0,416254
							33
							N ważn. Grupa 1
							N ważn. Grupa 2
							15

Tabela 14. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 13 (czas wystąpienia odległych przerzutów nowotworu) przy zmiennej grupującej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu CDH1 w guzie)

Zmienna	Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) (Arkusz Statistica) Względem zmiennej: Zmn1 Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$						
	Sum.rang Grupa 1	Sum.rang Grupa 2	U	Z	P	Z popraw.	P
Zmn13	800,0000	376,0000	240,0000	0,338992	0,734616	0,707141	0,479480
							32
							N ważn. Grupa 1
							N ważn. Grupa 2
							2*Istr. dokł. p
							0,737333

Tabela 15. Tabela wielodziedziczna dla zmiennej 14 (wystąpienie lub brak przerzutów do węzłów chłonnych) w odniesieniu do zmiennej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu *CDH1* w guzie)

Tabela licznosci (Arkusz Statistica) Licznosc oznacz. komorek > 10 (Nie oznaczono sum brzegowych)				
Zmn14	Zmn1 0	Zmn1 1	Wiersz Razem	
0	19	39	58	
1	4	17	21	
Ogól	23	56	79	

Tabela 16. Tabela wielodziedziczna dla zmiennej 12 (wystąpienie lub brak przerzutów odległych) i 14 (wystąpienie lub brak przerzutów do węzłów chłonnych) w odniesieniu do zmiennej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu *CDH1* w guzie)

Tabela licznosci (Arkusz Statistica) Licznosc oznacz. komorek > 10 (Nie oznaczono sum brzegowych)					
Zmn1	Zmn12	Zmn14 0	Zmn14 1	Wiersz Razem	
0	0	11	3	14	
0	1	0	2	2	
Ogól		11	5	16	
1	0	15	15	30	
1	1	0	2	2	
Ogól		15	17	32	
Razem w kol.		46	33	79	

Tabela 17. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 18 (ocena zaawansowania guza dokonana przez klinicystę) przy zmiennej grupującej 28 (ocena zaawansowania guza dokonana przez patomorfologa)

Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) (Arkusz Statistica) Względem zmiennej: Zmn28 Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$										
Zmienna	Sum.rang Grupa 1	Sum.rang Grupa 2	U	Z	p	Z popraw.	p	N ważn. Grupa 1	N ważn. Grupa 2	2*1str. dokł. p
Zmn18	89,00000	407,0000	23,00000	-3,57125	0,000355	-3,71645	0,000202	11	20	0,000121

Tabela 18. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 19 (ocena stopnia zajęcia węzłów chłonnych dokonana przez klinicystę) przy zmiennej grupującej 30 (ocena stopnia zajęcia węzłów chłonnych dokonana przez patomorfologa)

Zmienna	Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) (Arkusz Statistica) Względem zmiennej: Zmn30 Zaznaczone wyniki są istotne z p <,05000									
	Sum.rang Grupa 1	Sum.rang Grupa 2	U	Z	P	Z popraw.	P	N ważn. Grupa 1	N ważn. Grupa 2	2*Istr. dokł. p
Zmn19	635,0000	68,00000	5,000000	-1,98140	0,047547	-2,34068	0,019249	35	2	0,036036

Tabela 19. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 22 (lokalizacja guza w obrębie wargi) przy zmiennej grupującej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu *CDH1* w guzie)

Zmienna	Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) (Arkusz Statistica) Względem zmiennej: Zmn1 Zaznaczone wyniki są istotne z p <,05000									
	Sum.rang Grupa 1	Sum.rang Grupa 2	U	Z	P	Z popraw.	P	N ważn. Grupa 1	N ważn. Grupa 2	2*Istr. dokł. p
Zmn22	888,0000	288,0000	152,0000	2,263591	0,023600	2,940212	0,003280	32	16	0,022452

Tabela 20. Analiza prawdopodobieństwa (PIP) związku pomiędzy metylacją promotora genu *CDH1* a wiekiem, płcią, spożywaniem alkoholu, paleniem tytoniu

	PIP	Post Mean	Post SD	Cond.Pos. Sign	Idx
age	0.4165198	0.003698079	0.005429841	1.0000000	1
SEX2	0.3874318	-0.110840198	0.175485877	0.0000000	2
drinkers	0.2362535	-0.044313586	0.112861468	0.0000000	4
smokers	0.1421662	-0.005835535	0.070076273	0.2974851	3
Mean no. regressors					
Draws					
Burnins					
Time No. models visited					
„1.1824“ „16“ „0“ „0.006790161 secs“ „16“					
Modelspace 2^K	% visited%	Topmodels	Corr PMP	No. Obs.	
„16“ „100“ „100“ „NA“ „48“					
Model Prior	g-Prior	Shrinkage-Stats			
„uniform / 2“	„UTP“	„Av=0.9796“			

Tabela 21. Analiza prawdopodobieństwa (PIP) związku pomiędzy wystąpieniem przerzutów odległych a wybranymi zmiennymi

	PIP	Post Mean	Post SD	Cond.Pos. Sign	Idx
age	0.8719460	-0.0073756156	4.019531e-03	0.00000000	3
cheek	0.4050652	-0.1032591960	1.373008e+04	0.00008669	11
triangle	0.3783931	0.1251174102	1.373008e+04	1.00000000	12
bottom.of.the.mouth	0.2121896	0.0208420584	1.373008e+04	0.99544847	10
CHT.met.	0.1463150	-0.0061651115	3.730192e-02	0.14257367	2
bottom.lip	0.1445223	-0.0062323931	1.373008e+04	0.07909722	9
smokers	0.1431433	-0.0055242123	3.631749e-02	0.09592016	5
drinkers	0.1384582	0.0037051584	3.467745e-02	0.79292632	6
tongue	0.1371460	-0.0022313146	1.373008e+04	0.30100954	7
gum	0.1353102	-0.0080352265	1.373008e+04	0.02617653	8
SEX2	0.1333225	0.0036542481	3.545505e-02	0.91068652	4
OC.met.	0.1317023	0.0002603637	3.296434e-02	0.56554471	1
Mean no. regressors					
Draws					
Burnins					
Time					
No. models visited					
„2.9775“	„4096“	„0“	„0.8092721 secs“	„4096“	
Modelspace 2^K	% visited	% Topmodels	Corr PMP	No. Obs.	
„4096“	„100“	„12“	„NA“	„48“	
Model Prior	g-Prior	Shrinkage-Stats			
„uniform / 6“	„UIP“	„Av=0.9796“			

Tabela 22. Analiza prawdopodobieństwa (PIP) związku pomiędzy wystąpieniem wznowy miejscowej a wybranymi zmiennymi

	PIP	Post Mean	Post SD	Cond.Pos. Sign	Idx
age	0.6378124	-0.007255837	6.863710e-03	0.00000000	3
cheek	0.4611234	-0.213892562	2.548115e+04	0.00006313	11
bottom.of.the.mouth	0.3306897	0.079440578	2.548115e+04	0.99981701	10
smokers	0.2747334	-0.055004232	1.202147e-01	0.00000000	5
drinkers	0.2604421	-0.049333556	1.155053e-01	0.00864868	6
CHT.met.	0.2286951	-0.037936164	9.857889e-02	0.00000000	2
gum	0.2124002	-0.061051148	2.548115e+04	0.00576137	8
SEX2	0.2067694	-0.034956295	1.041540e-01	0.00608705	4
tongue	0.1535381	-0.003766198	2.548115e+04	0.27398221	7
bottom.lip	0.1500610	0.009688382	2.548115e+04	0.68933461	9
triangle	0.1490357	0.020727545	2.548115e+04	0.80344675	12
OC.met.	0.1353601	0.003192892	5.655078e-02	0.69548488	1
Mean no. regressors					
„3.2007“					
Time No. models visited					
„4096“					
„0“					
„0.6427748 secs“					
„4096“					
Models space 2^K					
% visited%					
„100“					
Topmodels					
„12“					
Corr PMP					
„NA“					
No. Obs.					
„48“					
Model Prior					
g-Prior					
Shrinkage-Stats					
„uniform / 6“					
„UIP“					
„Av=0.9796“					
Time difference of 0.6427748 secs					

Tabela 23. Liczba przeżyć w poszczególnych miesiącach obserwacji

Przyp. Liczba	Analiza Kapłana-Meiera (Arkusz Statistica)		
	Uwaga: Ucięte obserwacje oznaczono +		
	Czas	Skumul. Przeżyc.	Błąd Stand.
23	0,00000	0,979167	0,020615
4	25,00000	0,958333	0,028842
39	38,00000	0,937500	0,034939
22	42,00000	0,916667	0,039893
25	43,00000	0,895833	0,044092
32	43,00000	0,875000	0,047735
6	43,00000	0,854167	0,050942
19	44,00000	0,833333	0,053791
8	46,00000	0,812500	0,056337
29	46,00000	0,791667	0,058618
10	46,00000	0,770833	0,060665
42	48,00000	0,750000	0,062500
16	49,00000	0,729167	0,064142
15	50,00000	0,708333	0,065606
34	53,00000	0,687500	0,066902
17	58,00000	0,666667	0,068041
45	58,00000	0,645833	0,069031
2+	60,00000		
3+	60,00000		
5+	60,00000		
7+	60,00000		
9+	60,00000		
11+	60,00000		
12+	60,00000		
13+	60,00000		
14+	60,00000		
18+	60,00000		
20+	60,00000		
21+	60,00000		
24+	60,00000		
26+	60,00000		
27+	60,00000		

Przyp. Liczba	Analiza Kaplana-Meiera (Arkusz Statistica) Uwaga: Ucięte obserwacje oznaczono +		
	Czas	Skumul. Przeżyc.	Błąd Stand.
28+	60,00000		
30+	60,00000		
31+	60,00000		
33+	60,00000		
35+	60,00000		
36+	60,00000		
37+	60,00000		
38+	60,00000		
40+	60,00000		
41+	60,00000		
43+	60,00000		
44+	60,00000		
46+	60,00000		
47+	60,00000		
48+	60,00000		
1+	60,00000		

Tabela 24. Liczba pacjentów bez wznowy miejscowej w poszczególnych miesiącach obserwacji

Przyp. Liczba	Analiza Kaplana-Meiera (Arkusz Statistica) Uwaga: Ucięte obserwacje oznaczono +		
	Czas	Skumul. Przeżyc.	Błąd Stand.
30	0,00000	0,979167	0,020615
5	43,00000	0,958333	0,028842
12	54,00000	0,937500	0,034939
9	66,00000	0,916667	0,039893
4	67,00000	0,895833	0,044092
19	68,00000	0,875000	0,047735
29	68,00000	0,854167	0,050942
8	69,00000	0,833333	0,053791

Przyp. Liczba	Analiza Kaplana-Meiera (Arkusz Statistica)		
	Uwaga: Ucięte obserwacje oznaczono +		
	Czas	Skumul. Przeżyc.	Błąd Stand.
25	74,00000	0,812500	0,056337
34	74,00000	0,791667	0,058618
32	74,00000	0,770833	0,060665
42	76,00000	0,750000	0,062500
2+	80,00000		
3+	80,00000		
6+	80,00000		
7+	80,00000		
10+	80,00000		
11+	80,00000		
13+	80,00000		
14+	80,00000		
15+	80,00000		
16+	80,00000		
17+	80,00000		
18+	80,00000		
20+	80,00000		
21+	80,00000		
22+	80,00000		
23+	80,00000		
24+	80,00000		
26+	80,00000		
27+	80,00000		
28+	80,00000		
31+	80,00000		
33+	80,00000		
35+	80,00000		
36+	80,00000		
37+	80,00000		
38+	80,00000		
39+	80,00000		
40+	80,00000		

Przyp. Liczba	Analiza Kaplana-Meiera (Arkusz Statistica) Uwaga: Ucięte obserwacje oznaczono +		
	Czas	Skumul. Przeżyc.	Błąd Stand.
41+	80,00000		
43+	80,00000		
44+	80,00000		
45+	80,00000		
46+	80,00000		
47+	80,00000		
48+	80,00000		
1+	80,00000		

Tabela 25. Liczba pacjentów pozostających bez przerzutów odległych w poszczególnych miesiącach obserwacji

Przyp. Liczba	Analiza Kaplana-Meiera (Arkusz Statistica) Uwaga: Ucięte obserwacje oznaczono +		
	Czas	Skumul. Przeżyc.	Błąd Stand.
19	46,00000	0,979167	0,020615
29	48,00000	0,958333	0,028842
8	49,00000	0,937500	0,034939
42	50,00000	0,916667	0,039893
2+	60,00000		
3+	60,00000		
4+	60,00000		
5+	60,00000		
6+	60,00000		
7+	60,00000		
9+	60,00000		
10+	60,00000		
11+	60,00000		
12+	60,00000		
13+	60,00000		
14+	60,00000		

Przyp. Liczba	Analiza Kaplana-Meiera (Arkusz Statistica) Uwaga: Ucięte obserwacje oznaczono +		
	Czas	Skumul. Przeżyc.	Błąd Stand.
15+	60,00000		
16+	60,00000		
17+	60,00000		
18+	60,00000		
20+	60,00000		
21+	60,00000		
22+	60,00000		
23+	60,00000		
24+	60,00000		
25+	60,00000		
26+	60,00000		
27+	60,00000		
28+	60,00000		
30+	60,00000		
31+	60,00000		
32+	60,00000		
33+	60,00000		
34+	60,00000		
35+	60,00000		
36+	60,00000		
37+	60,00000		
38+	60,00000		
39+	60,00000		
40+	60,00000		
41+	60,00000		
43+	60,00000		
44+	60,00000		
45+	60,00000		
46+	60,00000		
47+	60,00000		
48+	60,00000		
1+	60,00000		

Tabela 26. Liczba pacjentów pozostających bez przerzutów do węzłów chłonnych w poszczególnych miesiącach obserwacji

Przyp. Liczba	Analiza Kaplana-Meiera (Arkusz Statistica)		
	Uwaga: Ucięte obserwacje oznaczono +		
	Czas	Skumul. Przeżyc.	Błąd Stand.
36	3,00000	0,979167	0,020615
5	32,00000	0,958333	0,028842
4	47,00000	0,937500	0,034939
29	48,00000	0,916667	0,039893
19	48,00000	0,895833	0,044092
48	48,00000	0,875000	0,047735
8	49,00000	0,854167	0,050942
10	53,00000	0,833333	0,053791
12	54,00000	0,812500	0,056337
41	54,00000	0,791667	0,058618
32	60,00000	0,770833	0,060665
28	60,00000	0,750000	0,062500
25	60,00000	0,729167	0,064142
9	60,00000	0,708333	0,065606
22	60,00000	0,687500	0,066902
42	60,00000	0,666667	0,068041
21	60,00000	0,645833	0,069031
38	60,00000	0,625000	0,069877
34	60,00000	0,604167	0,070585
33	60,00000	0,583333	0,071159
6	60,00000	0,562500	0,071603
3	60,00000	0,541667	0,071918
2+	60,00000		
7+	60,00000		
11+	60,00000		
13+	60,00000		

Przyp. Liczba	Analiza Kaplana-Meiera (Arkusz Statistica) Uwaga: Ucięte obserwacje oznaczono +		
	Czas	Skumul. Przeżyc.	Błąd Stand.
14+	60,00000		
15+	60,00000		
16+	60,00000		
17+	60,00000		
18+	60,00000		
20+	60,00000		
23+	60,00000		
24+	60,00000		
26+	60,00000		
27+	60,00000		
30+	60,00000		
31+	60,00000		
35+	60,00000		
37+	60,00000		
39+	60,00000		
40+	60,00000		
43+	60,00000		
44+	60,00000		
45+	60,00000		
46+	60,00000		
47+	60,00000		
1+	60,00000		

Spis rycin

Ryc. 1. Zachorowalność kobiet i mężczyzn na raka jamy ustnej w grupach wiekowych w województwie podkarpackim	10
Ryc. 2. Schemat struktury chromosomu i spirali DNA	20
Ryc. 3. Schemat metylacji cytozyny do 5-metylocytozyny	22
Ryc. 4. Schemat adhezji komórkowej z udziałem E-kadheryny	26
Ryc. 5. Schemat budowy cząsteczki E-kadheryny z elementami zewnątrzkomórkowymi, odpowiedzialnymi za połączenia międzykomórkowe i elementami wewnątrzkomórkowymi, odpowiedzialnymi za zakotwiczenie cząsteczki białka w cytoszkielet	27
Ryc. 6. Hemimetylacja próbek 1, 2, 3 i brak metylacji dla próbki +Met (brak prążka) oraz próbki kontrolnej 0	45
Ryc. 7. Hemimetylacja próbek 1, 2, 3 i całkowita metylacja próbki +Met (widoczny prążek) oraz brak prążka dla próbki kontrolnej 0	46

Spis wykresów

Wykres 1. Ramka-wąsy dla statystyki opisowej zmiennej 3 (wiek) względem zmiennej 4 (płeć). 0 – mężczyźni, 1 – kobiety. Z wykresu wynika, że rozrzut danych w postaci wieku był wśród kobiet znacznie bardziej rozproszony niż w grupie mężczyzn. Zatem pod względem wieku populacja mężczyzn była bardziej jednorodna	54
Wykres 2. Rozkład zmiennej w postaci wieku dla całości materiału wraz z wynikiem testu Shapiro-Wilk. Wartość $p = 0,26021$ wskazuje, że rozkład spełnia cechy rozkładu normalnego	55
Wykres 3. Rozkład zmiennej w postaci wieku dla mężczyzn wraz z wynikiem testu Shapiro-Wilk. Wartość $p = 0,11131$ wskazuje na to, że rozkład spełnia cechy rozkładu normalnego	55
Wykres 4. Rozkład zmiennej w postaci wieku dla kobiet wraz z wynikiem testu Shapiro-Wilk. Wartość $p = 0,667$ wskazuje, że rozkład spełnia cechy rozkładu normalnego	56
Wykres 5. Przeżycia chorych w zależności do wielkości guza (cecha T)	65
Wykres 6. Przeżycia chorych w zależności od stanu węzłów chłonnych szyi (cecha N)	66
Wykres 7. Przeżycia chorych w zależności od przerzutów odległych (cecha M)	66
Wykres 8. Przeżycia chorych w zależności od stopnia zróżnicowania komórkowego raka jamy ustnej (cecha G)	67
Wykres 9. Przeżycia chorych w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego raka jamy ustnej (S – staging)	68
Wykres 10. Przeżycia chorych w zależności od wykrytej hipermetylacji genu <i>CDH1</i> w DNA komórek raka jamy ustnej	68
Wykres 11. Przeżycia chorych w zależności od czasu od operacji pierwotnej raka jamy ustnej	70

Spis tabel

Tabela I. Płeć i wiek chorych z rakiem jamy ustnej	30
Tabela II. Umiejscowienie raka jamy ustnej w grupach wiekowych chorych	31
Tabela III. Palenie tytoniu i nadużywanie alkoholu w grupie chorych z rakiem jamy ustnej	32
Tabela IV. Umiejscowienie raka jamy ustnej w odniesieniu do stosowanych używek	32
Tabela V. Ocena zaawansowania TNM w grupie chorych	34
Tabela VI. Ocena TNM w zależności od umiejscowienia raka jamy ustnej	35
Tabela VII. Stopień zaawansowania procesu nowotworowego w badanej grupie	35
Tabela VIII. Stopień zaawansowania raka jamy ustnej w zależności od lokalizacji guza	36
Tabela IX. Stopień zróżnicowania histologicznego raka jamy ustnej	36
Tabela X. Stopień zróżnicowania komórek raka jamy ustnej w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego	37
Tabela XI. Wznowy procesu nowotworowego w grupie chorych z rakiem jamy ustnej	38
Tabela XII. Wznowa miejscowa raka w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego	38
Tabela XIII. Przerzuty do węzłów chłonnych po operacji raka jamy ustnej	39
Tabela XIV. Przerzuty do węzłów chłonnych w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego raka jamy ustnej	40
Tabela XV. Przerzuty odległe wśród chorych z rakiem jamy ustnej	40
Tabela XVI. Czas zgonu po operacji chorych z rakiem jamy ustnej	41
Tabela XVII. Przeżycia i zgony chorych w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego	41
Tabela XVIII. Sekwencje starterów, wielkość fragmentów i temperatura hybrydyzacji stosowane w MSP	46
Tabela XIX. Obecność infekcji HPV w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego	48
Tabela XX. Infekcje HPV w zależności od stopnia zróżnicowania komórek raka jamy ustnej	48
Tabela XXI. Infekcja HPV w zależności od stopnia zaawansowania raka jamy ustnej	49
Tabela XXII. Analizowane zmienne wraz z ich kodami liczbowymi	51

Tabela XXIII. Struktura wiekowa badanej populacji	54
Tabela XXIV. Występowanie metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie i zdrowej tkance sąsiadującej	56
Tabela XXV. Częstość występowania raka jamy ustnej w poszczególnych lokalizacjach ogółem i w podgrupach według metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie	57
Tabela XXVI. Częstość występowania raka jamy ustnej w poszczególnych lokalizacjach ogółem i w podgrupach według metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w marginesie tkankowym	58
Tabela XXVII. Obecność infekcji HPV w podgrupach według metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie	59
Tabela XXVIII. Częstość występowania wznowy miejscowej w podgrupach według hipermetylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie	60
Tabela XXIX. Częstość występowania wznowy w podgrupach według hipermetylacji promotora genu <i>CDH1</i> w marginesie tkankowym	61
Tabela XXX. Czas wystąpienia wznowy miejscowej nowotworu w miesiącach obserwacji dla materiału ogółem i w podgrupach według płci	61
Tabela XXXI. Czas wystąpienia wznowy miejscowej nowotworu dla materiału ogółem i w podgrupach według braku/obecności metylacji genu <i>CDH1</i> w guzie i w otaczającej sąsiedniej tkance	62
Tabela XXXII. Częstość występowania przerzutów do węzłów chłonnych w podgrupach według metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie	62
Tabela XXXIII. Częstość występowania przerzutów do węzłów chłonnych w podgrupach według metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w marginesie operacyjnym	63
Tabela XXXIV. Wiek chorych w podgrupach według zdarzenia w postaci wystąpienia lub niewystąpienia zgonu	69
Tabela XXXV. Czas przeżycia w miesiącach dla materiału ogółem i w podgrupach według płci	70

Spis tabel – aneks

Tabela 1. Tabela wielodzielcza zmiennej w postaci metylacji guza i w otoczeniu w podgrupach według płci	103
Tabela 2. Tabela wielodzielcza zmiennej 5 (palenie tytoniu) i 6 (picie alkoholu) względem zmiennej 4 (płeć)	103
Tabela 3. Tabela wielodzielcza zmiennej 5 (palenie tytoniu) i 6 (picie alkoholu) względem zmiennej 1 (obecność lub brak metylacji genu <i>CDH1</i> w obrębie guza) oraz zmiennej 2 (obecność lub brak metylacji genu <i>CDH1</i> w obrębie otaczającej zdrowej tkanki)	104

Tabela 4. Wartości współczynników korelacji rangowej Spearmana dla wszystkich zmiennych	105
Tabela 5. Tabela wielodzielcza dla zmiennej 8 (zgon pacjenta) w odniesieniu do zmiennej 4 (płeć)	110
Tabela 6. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 3 (wiek pacjenta) przy zmiennej grupującej 8 (wystąpienie lub niewystąpienie zgonu)	111
Tabela 7. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 9 (czas przeżycia w okresie obserwacji) przy zmiennej grupującej 3 (płeć pacjenta)	111
Tabela 8. Tabela wielodzielcza dla zmiennej 10 (wystąpienie lub niewystąpienie miejscowej wznowy nowotworu) w odniesieniu do zmiennej 4 (płeć pacjenta)	111
Tabela 9. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 11 (czas wystąpienia miejscowej wznowy nowotworu) przy zmiennej grupującej 3 (płeć pacjenta)	112
Tabela 10. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 11 (czas wystąpienia miejscowej wznowy nowotworu) przy zmiennej grupującej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie)	112
Tabela 11. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 11 (wystąpienie lub brak odległych przerzutów nowotworu) przy zmiennej grupującej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie i w otaczającej sąsiedniej tkance)	112
Tabela 12. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 13 (czas bez wystąpienia odległych przerzutów nowotworu) przy zmiennej grupującej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie)	113
Tabela 13. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 12 (wystąpienie lub brak odległych przerzutów nowotworu) przy zmiennej grupującej 2 (brak/obecność metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w otaczającej sąsiedniej tkance)	113
Tabela 14. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 13 (czas wystąpienia odległych przerzutów nowotworu) przy zmiennej grupującej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie)	113
Tabela 15. Tabela wielodzielcza dla zmiennej 14 (wystąpienie lub brak przerzutów do węzłów chłonnych) w odniesieniu do zmiennej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie)	114
Tabela 16. Tabela wielodzielcza dla zmiennej 12 (wystąpienie lub brak przerzutów odległych) i 14 (wystąpienie lub brak przerzutów do węzłów chłonnych) w odniesieniu do zmiennej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie)	114
Tabela 17. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 18 (ocena zaawansowania guza dokonana przez klinicystę) przy zmiennej grupującej 28 (ocena zaawansowania guza dokonana przez patomorfologa)	115
Tabela 18. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 19 (ocena stopnia zajęcia węzłów chłonnych dokonana przez klinicystę) przy zmiennej gru-	

pującej 30 (ocena stopnia zajęcia węzłów chłonnych dokonana przez pato- morfologa)	115
Tabela 19. Wynik testu U Manna Whitneya dla zmiennej 22 (lokalizacja guza w obrębie wargi) przy zmiennej grupującej 1 (brak/obecność metylacji promotora genu <i>CDH1</i> w guzie)	115
Tabela 20. Analiza prawdopodobieństwa (PIP) związku pomiędzy metylacją promotora genu <i>CDH1</i> a wiekiem, płcią, spożywaniem alkoholu, paleniem tytoniu	116
Tabela 21. Analiza prawdopodobieństwa (PIP) związku pomiędzy wystąpie- niem przerzutów odległych a wybranymi zmiennymi	117
Tabela 22. Analiza prawdopodobieństwa (PIP) związku pomiędzy wystąpie- niem wznowy miejscowej a wybranymi zmiennymi	118
Tabela 23. Liczba przeżyć w poszczególnych miesiącach obserwacji	119
Tabela 24. Liczba pacjentów bez wznowy miejscowej w poszczególnych miesi- cach obserwacji	120
Tabela 25. Liczba pacjentów pozostających bez przerzutów odległych w po- szczególnych miesiącach obserwacji	122
Tabela 26. Liczba pacjentów pozostających bez przerzutów do węzłów chłon- nych w poszczególnych miesiącach obserwacji	124

