

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Ocena wybranych szlaków sygnałowych w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej

Wprowadzenie: Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej jest najczęstszym nowotworem jamy ustnej i pomimo stosunkowo rzadkiego występowania stanowi istotny problem kliniczny. Dynamiczny wzrost guza, słaba odpowiedź na radio/chemioterapię oraz szybka wznowa miejscowa po pierwotnym leczeniu są w dalszym ciągu głównymi przyczynami niskich wskaźników przeżycia chorych. Pomimo ogromnego rozwoju onkologii w ostatnich latach, postęp w leczeniu raka jamy ustnej jest niewielki, a możliwości leczenia z wykorzystaniem nowoczesnych terapii celowanych są marginalne. Z tego powodu konieczna jest intensyfikacja badań dotyczących biologii raka płaskonabłonkowego jamy ustnej w celu poszukiwania białek, które mogłyby posłużyć jako biomarkery prognostyczne lub punkty uchwytu dla nowych terapii celowanych. Zidentyfikowanie w tkankach raków jamy ustnej subpopulacji komórek wykazujących wiele cech wspólnych z prawidłowymi komórkami macierzystymi wyznaczyło nowe kierunki badań nad biologią raków jamy ustnej. W ostatnich latach zainteresowanie badaczy skupia się wokół szlaków sygnałowych Hedgehog, WNT, NOTCH, które w fizjologicznych warunkach kontrolują liczne procesy związane z proliferacją oraz różnicowaniem komórek, natomiast ich nadmierna aktywność została zaobserwowana w różnych nowotworach. Białka wchodzące w skład szlaków sygnałowych Hedgehog, WNT, NOTCH mogą stanowić w przyszłości potencjalne punkty przyłączenia inhibitorów w terapii celowanej, czego przykładem jest już wprowadzenie inhibitorów szlaku Hedgehog do leczenia raka podstawnokomórkowego skóry. Niemniej jednak doniesienia dotyczące roli tych szlaków sygnałowych w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej są nadal nieliczne, a ich potencjalne znaczenie prognostyczne pozostaje wciąż nieustalone.

Cel: Głównym celem rozprawy doktorskiej była ocena występowania oraz określenie roli białek SHH, WNT1 i NOTCH1 w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej. Niniejsze badania wykonano w formie trzech eksperymentów badawczych, których wyniki opublikowano w trzech pracach oryginalnych składających się na cykl publikacji (sumaryczny IF: 8,279;

sumaryczna punktacja MEiN: 210,000). Ponadto dla każdego eksperymentu określono szczegółowy cel badań:

1. Immunohistochemiczna ocena występowania oraz określenie znaczenia prognostycznego białka SHH w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej w porównaniu do klasycznych parametrów kliniczno-patologicznych guza, ekspresji białka p53 oraz zakażenia wirusem HPV.
2. Określenie związku między ekspresją białka SHH, a markerami nowotworowych komórek macierzystych (CD44, CD133, SOX2) w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej w celu oceny ich wpływu na przebieg kliniczny choroby.
3. Immunohistochemiczna ocena występowania i określenie znaczenia prognostycznego białek WNT1, NOTCH1 w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej oraz analiza korelacji z wybranymi białkami proangiogennymi (PDGFR β , CXCR4).

Materiał i metody: Badania przeprowadzono na archiwalnym materiale tkankowym (błoczki parafinowe) pochodzącym od 70 chorych leczonych operacyjnie z powodu raka płaskonabłonkowego jamy ustnej w latach 2011-2015. Dla wszystkich analizowanych przypadków zgromadzono dane kliniczno-patologiczne (wiek, płeć, lokalizacja guza, stopień złośliwości histologicznej, klasyfikacja pTNM, stopień zaawansowania klinicznego AJCC) oraz okresy przeżycia całkowitego chorych. Ocenę występowania białek SHH, WNT1, NOTCH1, p53, CD44, CD133, SOX2, PDGFR β , CXCR4 oraz zakażenia wirusem HPV w tkankach raków jamy ustnej wykonano przy użyciu metody immunohistochemicznej z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych. Otrzymane wyniki ekspresji badanych białek zostały poddane szczegółowej analizie statystycznej z parametrami kliniczno-patologicznymi oraz okresami przeżycia chorych.

Wyniki: Przeprowadzone badania wykazały obecność SHH w 51/70 (72,9%) raków jamy ustnej. Zaobserwowano związek między ekspresją SHH, a wielkością guza ($p=0,026$). Analiza Kaplana-Meiera wykazała statystycznie istotny związek między stopniem złośliwości histologicznej, wielkością guza, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych oraz stopniem zaawansowania klinicznego, a krótszym całkowitym okresem przeżycia chorych (odpowiednio $p=0,047$; $p<0,001$; $p=0,003$; $p<0,001$). Ponadto zaobserwowano również, że obecność SHH w raku jamy ustnej wiązała się z krótszym przeżyciem całkowitym

pacjentów ($p=0,005$). Nie odnotowano statystycznie istotnego związku między ekspresją p53, a czasem przeżycia chorych ($p>0,05$). Dodatkowo, wykazano związek na granicy istotności statystycznej między infekcją HPV, a krótszym okresem przeżycia chorych z rakiem jamy ustnej ($p=0,055$). Wieloczynnikowa analiza regresji Coxa potwierdziła prognostyczne znaczenie klasycznych czynników rokowniczych raka jamy ustnej takich jak stopień złośliwości histologicznej ($HR=2,32$; $p=0,008$) oraz wielkość guza ($HR=4,87$; $p<0,001$). Ponadto badania ujawniły, że ekspresja SHH w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej jest negatywnym czynnikiem prognostycznym ($HR=2,93$; $p=0,004$). Powyższe wyniki zostały opublikowane w pierwszym artykule (Cierpikowski et al.: *Sonic Hedgehog is a novel prognostic biomarker in patients with oral squamous cell carcinoma*. Neoplasma 2021)

W drugiej pracy oryginalnej (Cierpikowski et al.: *SHH expression is significantly associated with cancer stem cell markers in oral squamous cell carcinoma*. Anticancer Research 2021) wykazano statystycznie istotną korelację między obecnością SHH, a ekspresją CD133 ($r=0,272$; $p=0,026$) i SOX2 ($r=0,793$; $p<0,001$) należących do markerów nowotworowych komórek macierzystych. Podobną zależność zaobserwowano między ekspresją SHH, a CD44, ale nie osiągnęła ona progu istotności statystycznej ($r=0,214$; $p=0,082$). Wykazano związek między ekspresją CD44, a stopniem zaawansowania klinicznego ($p=0,042$). Zaobserwowano również korelację między obecnością SOX2, a płcią chorego oraz przerzutami do węzłów chłonnych (odpowiednio $p=0,036$; $p=0,024$). Na podstawie analizy Kaplana-Meiera wykazano związek między ekspresją SHH ($p=0,003$) i SOX2 ($p=0,003$), a krótszym czasem przeżycia chorych. Ponadto wieloczynnikowa analiza Coxa wykazała, że ekspresja SHH ($HR=3,41$; $p=0,001$) i CD44 ($HR=2,35$; $p=0,008$) są negatywnymi czynnikami prognostycznymi w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej.

Obecność białek WNT1 i NOTCH1 była obserwowana w odpowiednio 31/60 (51,7%) i 15/60 (25,0%) przypadków. Nie obserwowano statystycznie istotnego związku między ekspresją białek WNT1 i NOTCH1, a parametrami kliniczno-patologicznymi ($p>0,05$). Wykazano korelację między obecnością WNT1, a CXCR4 ($r=0,268$; $p=0,038$) oraz między NOTCH1, a CXCR4 ($r=0,493$; $p<0,001$). Występowanie WNT1 oraz PDGFR β było związane z krótszym czasem przeżycia chorych (odpowiednio $p=0,042$; $p=0,033$). Dodatkowo, wieloczynnikowa analiza regresji Coxa wykazała, że ekspresja WNT1 ($HR=2,29$; $p=0,009$) oraz CXCR4 ($HR=2,31$; $p=0,021$) są negatywnymi czynnikami prognostycznymi w raku

płaskonabłonkowym jamy ustnej. Powyższe wyniki zostały opublikowane w trzecim artykule (Cierpikowski et al.: *Prognostic value of WNT1, NOTCH1, PDGFR β and CXCR4 in oral squamous cell carcinoma*. Anticancer Research 2023).

Wnioski: Podsumowując, w powyższych badaniach wykazano, że wysoka ekspresja białek SHH i WNT1 jest związana z gorszym rokowaniem chorych z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej, co pozwala sugerować, że SHH i WNT1 mogą stanowić w przyszłości potencjalne markery prognostyczne. Obserwowany związek między ekspresją SHH, a CD133 i SOX2 sugeruje, że szlak sygnałowy Hedgehog może wpływać na funkcjonowanie nowotworowych komórek macierzystych oraz w związku z tym może determinować agresywny przebieg kliniczny raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Ponadto dodatnie korelacje między ekspresją białek WNT1 i NOTCH1, a CXCR4 sugerują, że szlaki sygnałowe WNT i NOTCH mogą indukować wzrost aktywności czynników proangiogennych zaangażowanych w angiogenezę raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Stwierdzenie nadekspresji białek SHH i WNT1 w znacznym odsetku raków płaskonabłonkowych jamy ustnej upoważnia do rozważenia alternatywnej terapii w tej grupie pacjentów i wskazuje na możliwość potencjalnego zastosowania inhibitorów tych szlaków sygnałowych w przyszłości. Obecność białka NOTCH1 w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej nie wykazała znaczenia prognostycznego w badanej grupie chorych.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Evaluation of selected signaling pathways in oral squamous cell carcinoma

Background: Oral squamous cell carcinoma is the most common oral malignancy and despite its relatively rare occurrence it remains a significant clinical problem. Aggressive tumor growth, poor response to radio/chemotherapy and rapid local recurrence after primary treatment are still the main reasons of low survival rates of patients. Despite of intensive development of oncology in recent years, progress of oral cancer therapy is low and treatment options with usage of novel targeted therapies are marginal. Therefore, it is necessary to intensify research regarding the biology of oral squamous cell carcinoma in order to discovery of proteins that could be used as prognostic biomarkers or targets for new personalized therapies. The identification of subpopulation of cells in oral cancer tissue with many similar features as normal stem cells indicated new direction of studies about biology of oral cancer. In recent years, researchers are focused on Hedgehog, WNT, NOTCH signaling pathways, that physiologically control numerous processes related to cell proliferation and differentiation, while their aberrant activation was observed in various cancers. Proteins belonging to Hedgehog, WNT, NOTCH signaling pathway may be in future potential targets for inhibitors in personalized therapies, as in e.g. basal cell carcinoma, where are used Hedgehog pathway inhibitors. However, reports about the role of these signaling pathways on oral squamous cell carcinoma are still limited and their potential prognostic significance is still not determined.

Aim: The main aim of doctoral dissertation was to investigate the expression and define the role of SHH, WNT1 and NOTCH1 in oral squamous cell carcinoma. This study was performed in the form of three research experiments, whose results were published in three original papers, that create the publication cycle (total IF: 8.279, total MEiN: 210.000). In addition, each experiment had defined detailed aim of the study:

1. Immunohistochemical evaluation of the presence and prognostic significance of SHH in oral squamous cell carcinoma in comparison to classic clinicopathological parameters of tumor, p53 expression and HPV infection.

2. Evaluation of the association between SHH expression and cancer stem cell markers (CD44, CD133, SOX2) in oral squamous cell carcinoma in order to assess their impact on the clinical course of the disease.
3. Immunohistochemical evaluation of the presence and prognostic significance of WNT1, NOTCH1 in oral squamous cell carcinoma and analysis of their correlations with selected proangiogenic proteins (PDGFR β , CXCR4).

Material and methods: The study was conducted on archival tissue material (paraffin blocks) from 70 patients with oral squamous cell carcinoma treated surgically between 2011-2015. Clinicopathological parameters (age, gender, tumor location, tumor grade, pTNM classification, AJCC clinical stage) and overall survival were collected for all analyzed cases. The presence of SHH, WNT1, NOTCH1, p53, CD44, CD133, SOX2, PDGFR β , CXCR4 and HPV infection in oral cancer tissue was performed by immunohistochemical method with usage of monoclonal antibodies. The received results of expression of analyzed proteins were statistically correlated with clinicopathological parameters and patients survival.

Results: The study showed the presence of SHH in 51/70 (72.9%) of oral cancers. It was observed the association between SHH expression and tumor size ($p=0.026$). The Kaplan-Meier analysis revealed a statistically significant correlation between tumor grade, tumor stage, presence of lymph node metastases, clinical stage and shorter overall survival of patients ($p=0.047$; $p<0.001$; $p=0.003$; $p<0.001$; respectively). In addition, it was also observed that SHH expression in oral cancer was associated with a shorter overall survival of patients ($p=0.005$). There was no statistically significant association between p53 expression and survival time ($p>0.05$). Moreover, it was found correlation on the border of statistical significance between HPV infection and shorter survival in patients with oral cancer ($p=0.055$). Multivariate Cox regression analysis confirmed the prognostic significance of the classic prognostic factors of oral cancer, such as tumor grade (HR=2.32; $p=0.008$) and tumor stage (HR=4.87; $p<0.001$). In addition, the study revealed that SHH expression in oral squamous cell carcinoma is a negative prognostic biomarker (HR=2.93; $p=0.004$). The above results were published in the first article (Cierpikowski et al.: *Sonic Hedgehog is a novel prognostic biomarker in patients with oral squamous cell carcinoma*. Neoplasma 2021).

The second original article (Cierpikowski et al.: *SHH expression is significantly associated with cancer stem cell markers in oral squamous cell carcinoma*. Anticancer Research 2021) revealed a statistically significant correlation between expression of SHH and CD133 ($r=0.272$; $p=0.026$), SOX2 ($r=0.793$; $p<0.001$) belonging to cancer stem cells markers. A similar association was observed between SHH and CD44 expression, but it did not reach statistical significance ($r=0.214$; $p=0.082$). There was a relationship between CD44 expression and clinical stage ($p=0.042$). There was also a correlation between the presence of SOX2 and the patient's gender and lymph node metastases ($p=0.036$; $p=0.024$, respectively). Based on the Kaplan-Meier analysis, it was noted the association between SHH ($p=0.003$), SOX2 ($p=0.003$) expression and shorter survival time. In addition, multivariate Cox analysis showed that SHH expression ($HR=3.41$; $p=0.001$) and CD44 expression ($HR=2.35$; $p=0.008$) are negative prognostic factors in oral squamous cell carcinoma.

The presence of WNT1 and NOTCH1 was observed in 31/60 (51.7%) and 15/60 (25.0%) of cases. There were no statistically significant associations between WNT1, NOTCH1 expression and clinicopathological parameters ($p>0.05$). It was observed the correlation between WNT1 and CXCR4 expression ($r=0.268$; $p=0.038$) and between NOTCH1 and CXCR4 expression ($r=0.493$; $p<0.001$). The presence of WNT1 and PDGFR β was associated with shorter survival time of patients ($p=0.042$; $p=0.033$, respectively). In addition, multivariate Cox regression analysis revealed that WNT1 expression ($HR=2.29$; $p=0.009$) and CXCR4 expression ($HR=2.31$; $p=0.021$) are negative prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. The above results were published in the third article (Cierpikowski et al.: *Prognostic value of WNT1, NOTCH1, PDGFR β and CXCR4 in oral squamous cell carcinoma*. Anticancer Research 2023).

Conclusions: In summary, above studies showed that high expression of SHH and WNT1 is associated with worse prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma, what may suggest that SHH and WNT1 could be in future potential prognostic biomarkers. Observed association between SHH and CD133, SOX2 expression suggests that Hedgehog signaling pathway may influence on functioning of cancer stem cells and therefore may determine aggressive clinical course of oral squamous cell carcinoma. In addition, positive correlations between WNT1, NOTCH1 and CXCR4 expression suggest that WNT and NOTCH signaling pathways may induce increased activity of proangiogenic factors involved in the angiogenesis of oral squamous cell carcinoma. Revealed overexpression of SHH and WNT1 in significant

percentage of oral squamous cell carcinomas allows to consider an alternative therapy in this group of patients and indicates the possibility of potential use of inhibitors of these signaling pathways in the future. The presence of NOTCH1 in oral squamous cell carcinoma did not reveal prognostic significance in the studied group of patients.