

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Miloš M. Lazarević

***IN-VITRO* ISPITIVANJE  
KARAKTERISTIKA MATIČNOSTI ĆELIJA  
POREKLOM OD ORALNOG  
PLANOCELULARNOG KARCINOMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

School of Dental Medicine

Miloš M. Lazarević

***IN-VITRO* STUDY OF STEMNESS  
CHARACTERISTICS OF CELLS  
ORIGINATING FROM ORAL SQUAMOUS  
CELL CARCINOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

**Mentori:**

**dr Jelena Milašin**, redovni profesor

Institutski predmeti,

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Milan Petrović**, docent

Klinika za maksilofacijalnu hirurgiju,

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

**dr Vesna Danilović**, redovni profesor

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Zvezdana Tepavčević**, redovni profesor

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Zoran Jezdić**, docent

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Boban Aničić**, docent

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Gordana Nikčević**, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Svojim mentorima, prof. dr Jeleni Milašin na entuzijazmu, požrtvovanosti i ljudskosti koji je nesebično delila sa mnom i koja mi je pomogla da ovu doktorsku disertaciju privedem kraju. Doc. dr Milanu Petroviću na stručnoj pomoći, dragocenim sugestijama i prijateljskom odnosu. Uverili su me je da se autoritet i poštovanje stiču jedino znanjem i korektnim odnosom prema kandidatima.

Članovima komisije na utrošenom vremenu, podršci i sugestijama kojima je ova doktorska disertacija dobila svoj završni oblik. Posebno se zahvaljujem prof. dr Vesni Danilović, predsednici komisije, koja me je uvela u svet kancerskih matičnih ćelija u sklopu njenih predavanja na doktorskim studijama. Prof. dr Zvezdani Tepavčević koja me je uvela u problematiku oralne patologije i na pruženoj šansi da se dokažem u pedagoškom radu sa studentima. Dr Gordani Nikčević na preciznim i konstruktivnim sugestijama. Zaposlenim na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju, posebno doc. dr Zoranu Jezdiću, upravniku klinike, doc. dr Bobanu Aničiću, ass. dr Dragu Jelovcu i ass. dr Nikoli Mikoviću na saradnji pri prikupljanju i analiziranju uzoraka, pored kojih sam zavoleo maksilofacijalnu hirurgiju.

Kolegicama i kolegama sa Instituta, Nađi, Jelenama, Dijani, Maji i ljudini Bošku na velikoj pomoći tokom izvođenja laboratorijskih analiza.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, ocu Milanu, majci Vesni i sestri Jeleni, kao i devojci Vesni koji su bili puni razumevanja i ljubavi tokom ovih godina.

Hvala svima koji su mi svih ovih godina dok sam radio disertaciju pomogli na bilo koji način a koje nisam ovde spomenuo ili koje sam nenamerno zaboravio da pomenem.

*Jednoj Duši*

# **IN-VITRO ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA MATIČNOSTI ČELIJA POREKLOM OD ORALNOG PLANOCELULARNOG KARCINOMA**

## **SAŽETAK**

Noviji podaci ukazuju na postojanje male subpopulacije kancerskih matičnih ćelija (KMĆ) koje su odgovorne za inicijaciju, progresiju i metastaziranje tumora. Do sada, su studije bile fokusirane isključivo na karakterizaciju ovih ćelijskih populacija unutar samog tumora, dok su margine tumora bile zanemarene, iako je poznato da histološki i molekularni status margina tumora može imati značajnu ulogu u toku bolesti. U ovoj studiji, primarne kulture ćelija tumora i margina dobijenih od pacijenata sa oralnim planocelularnim karcinomom su korišćene za ispitivanje ekspresije markera povezanih sa KMĆ (CD44, CD133, Oct-4, Sox2, Nanog), markera epitelno mezenhimske tranzicije (EMT) (E-kadherin, N-kadherin, Vimentin,  $\alpha$ SMA, SLUG i SNAIL), a ispitivan je i klonalni, proliferativni i migracijski potencijal ova dva tipa ćelija.

Stoga su ciljevi ove studije bili da se izoluju ćelije oralnog planocelularnog karcinoma i njegovih margina, uspostave primarne ćelijske kulture i ispituju populacije ćelija sa karakteristikama kancerske matičnosti. Ćelijske kulture su dobijene iz 12 uzoraka tkiva (6 tumora i 6 margina). RNK je ekstrahovana i analiza ekspresije gena je urađena pomoću lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu. Korišćene su i protočna citometrija, imunocitohemija, imunohistohemija, Raman mikrospektroskopija, testovi formiranja sfera, ćelijske proliferacije, formiranja kolonija, migracije i MTT test citotoksičnosti, kako bi se u potpunosti okarakterisala ova dva tipa ćelija.

Sa manjim odstupanjima, ćelije koje potiču od tumora i ćelije poreklom od margine pokazale su prisustvo markera matičnih ćelija CD133, Nanog, Sox2, CD44 i Oct-4, imale su sposobnost da formiraju sferoide i pokazale su hemorezistenciju. Takođe, svi ispitivani EMT markeri kao dodatni dokaz kancerske matičnosti, bili su ekspimirani u tumorskim i ćelijama margine, bez statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ). Uz nekoliko izuzetaka, ekspresija EMT i KMĆ markera je bila viša u petoj pasaži u

poređenju sa prvom, što bi moglo da se tumači obogaćenjem ćelijskih kultura subpopulacijom KMĆ tokom vremena.

Tumorske i ćelije tumorskih margina su pokazale značajne sličnosti u smislu kancerske matičnosti i sklonosti ka epitelno-mezenhimskoj tranziciji, odnosno pokazivale su sličan nivo agresivnosti i klonalnosti. S obzirom na prisustvo subpopulacija ćelija sa karakteristikama KĆM u tkivu margina, trebalo bi izvršiti re-evaluaciju optimalne hirurške resekcije oralnog planocelularnog karcinoma.

**Ključne reči:** oralni planocelularni karcinom, hirurška margina, kancerske matične ćelije, embrionalni i mezenhimski markeri, epitelno-mezenhimalna tranzicija, genska ekspresija, ćelijska proliferacija i migracija.

**Naučna oblast:** Medicinske nauke

**Uža naučna oblast:** Stomatološke nauke

**UDK broj:** 616.31-006.6:602.9(043.3)

## ***IN-VITRO* STUDY OF STEMNESS CHARACTERISTICS OF CELLS ORIGINATING FROM ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

### **SUMMARY**

Recent evidence suggests that small subpopulations of cancer stem-like cells (CSC) are accountable for tumour initiation, progression and metastasis. Until now, studies were focused exclusively on the characterization of these cell populations within the tumour itself, while tumour margins were neglected, although it is known that the histological and molecular status of tumour margins may play a significant role in the course of the disease. In the present study tumor and margin cell cultures obtained from patients with oral squamous cell carcinoma were used to determine the expression patterns in the course of time, of CSC-related markers (CD44, CD133, Oct-4, Sox2, Nanog), epithelial to mesenchymal transition (EMT)-related markers (Vimentin,  $\alpha$ SMA, SLUG and SNAIL), and features, i.e. the clonal, proliferative and migratory potential of the two types of cells.

The aims of the study were to isolate cells from oral squamous cell carcinomas and their respective margins, to characterize these cells using CSC/EMT markers, to assess their self-renewal, proliferation and migration potential and determine their chemoresistance.

Cell cultures were obtained from 12 tissue specimens (6 tumors and 6 margins). Total RNA was extracted and gene expression analysis was done by real-time PCR. Flow cytometry, immunocytometry, immunohistochemistry, Raman micro-spectroscopy, sphere formation, cell proliferation, colony forming, scratch wound healing and MTT assays were conducted to fully characterize the two cell types.

With minor differences, cells originating from both tumors and tumor margins showed the presence of stem cell markers CD133, Nanog, Sox2, CD44, and Oct-4, had the capacity to form spheroids and showed chemoresistance/sensitivity. All the studied EMT markers were expressed in both tumor and margin cells, without statistically significant difference ( $p > 0.05$ ). With few exceptions, for both EMT and CSC markers, the expression was higher in the 5<sup>th</sup> passage compared to the 1<sup>st</sup>, probably as the consequence of culture enrichment with CSC in the course of time. Proliferation rates



and cell migration velocity decreased during passages, while the number of colonies increased in both types of cell cultures.

Tumor and margin cells showed remarkable similarities in terms of CSC and EMT characteristics, i.e. comparable aggressiveness and clonality. Subpopulations of margin cells appeared to have stemness properties which might raise the question of re-evaluation of optimal surgical management of oral squamous cell carcinoma.

**Key words:** oral squamous cell carcinoma, surgical margin, cancer stem cells, embryonic and mesenchymal markers, epithelial to mesenchymal transition, gene expression, cell proliferation and migration.

**Scientific field:** Medical sciences

**Narrower scientific field:** Dental sciences

**UDC:** 616.31-006.6:602.9(043.3)

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1. Oralni planocelularni karcinom (OPK) .....	2
1.1 Definicija i kliničko- patološke karakteristike.....	2
1.1.1 TNM klasifikacija.....	5
1.1.2 Histopatološke karakteristike.....	6
1.2 Epidemiologija OPK.....	9
1.3 Etiologija i faktori rizika OPK.....	12
1.3.1 Duvan.....	12
1.3.2 Alkohol.....	13
1.3.4 Nedostatak gvožđa.....	13
1.3.5 Nedostatak vitamina A.....	13
1.3.6 Infekcija <i>Candida-om albicans</i> .....	14
1.3.7 Onkogeni virusi .....	14
1.4 Terapija i prognoza OPK.....	15
1.5 Značaj tumorskih margina u lečenju pacijenata saOPK .....	16
2. Kancerske matične ćelije (KMĆ).....	18
2.1 Definicija i osobine KMĆ.....	18
2.2 Poreklo KMĆ.....	21
2.3 Markeri KMĆ.....	23
2.4 Identifikacija i karakterizacija KMĆ.....	26
2.5 Epitelno-mezenhimalna tranzicija.....	29
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	32
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	34
3.1 Pacijenti.....	35
3.2 Ćelijske kulture.....	36
3.3 Određivanje broja i morfologije ćelija tokom pasaža.....	40

3.4	Protočna citometrija.....	41
3.5	Izolacija RNK radi ispitivanja genske ekspresije.....	42
3.6	Imunocitohemija.....	44
3.7	Raman mikro-spektroskopija.....	44
3.8	Test formiranja sfera (sferoida).....	44
3.9	Test formiranja kolonija.....	46
3.10	Test proliferacije ćelija.....	47
3.11	Test ćelijske migracije.....	47
3.12	Imunohistohemija.....	48
3.13	MTT test.....	48
3.14	Statistička analiza.....	50
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>51</b>
4.1	Broj ćelija tokom pasaža i njihove morfološke osobine.....	52
4.2	Protočna citometrija.....	55
4.3	Analiza genske ekspresije: markeri kancerske matičnosti.....	58
4.4	Imunocitohemija.....	60
4.5	Raman mikro-spektroskopija.....	61
4.6	Formiranje sfera (sferoida).....	62
4.7	Test formiranja kolonija.....	63
4.8	Test proliferacije ćelija.....	64
4.9	Test ćelijske migracije.....	65
4.10	Imunohistohemija.....	66
4.11	Analiza genske ekspresije: markeri EMT.....	67
4.12	MTT test.....	69
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>71</b>
5.1	Identifikacija i karakterizacija KMĆ.....	72
5.2	Sposobnost samoobnavljanja.....	74
5.3	Rezistentnost na antineoplastične agense .....	75

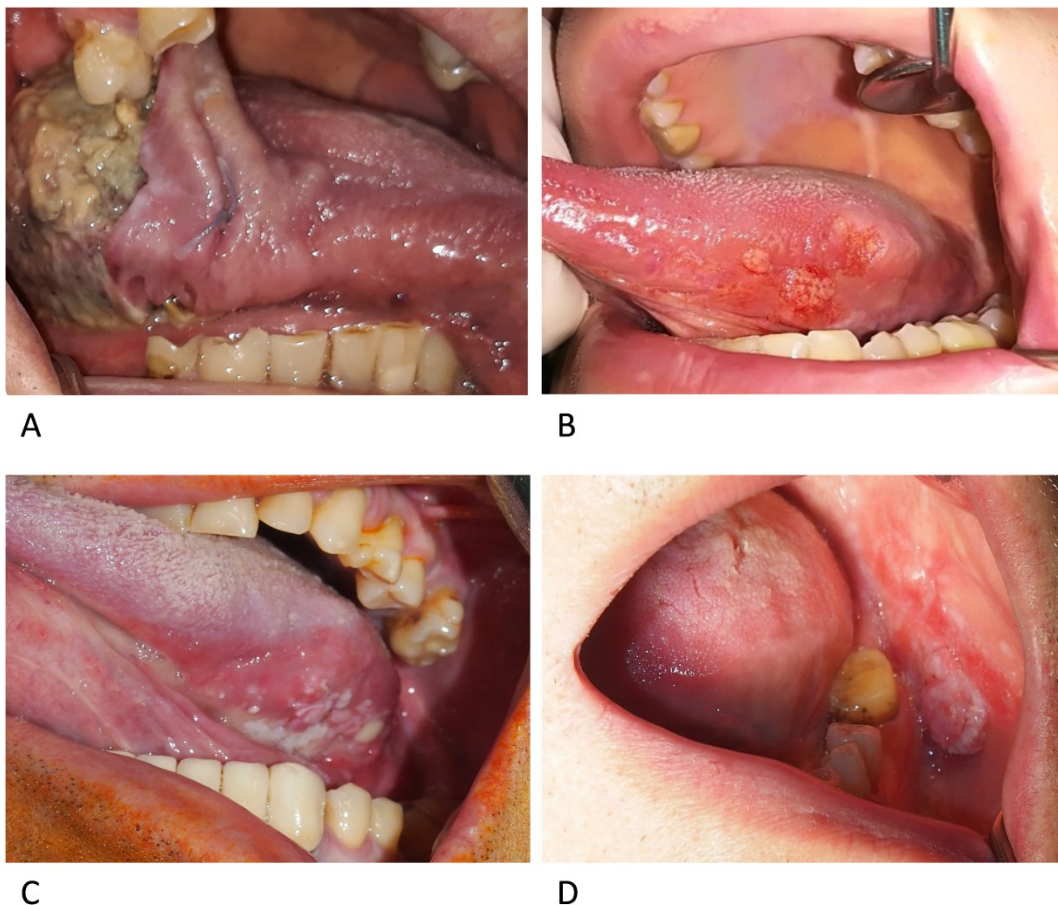
5.4 Epitelno-mezenhimalna tranzicija.....	76
5.5. Buduća istraživanja.....	77
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>80</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>82</b>
<b>8. BIOGRAFIJA.....</b>	<b>114</b>
<b>9. PRILOG.....</b>	<b>116</b>

## **1. UVOD**

# 1. Oralni planocelularni karcinom

## 1.1 Definicija i kliničko- patološke karakteristike

Oralni karcinom (OK) je maligna neoplazma koja se formira na usni ili u usnoj duplji. U 90% slučajeva radi se o oralnom planocelularnom karcinomu (OPK) koji histološki potiče od pločastoslojevitog epitela (Lingen et al., 2008). Klinički se najčešće javlja na bočnim stranama jezika, podu usne duplje, obrazima (Slika 1.1), u vidu ulcerisane mase ili proliferacije karfiolastog izgleda, različitog oblika i nejasnih granica. OPK ima različiti stepen diferentovanosti i tendenciju ka stvaranju regionalnih metastaza u limfnim čvorovima (Barnes et al., 2005) te predstavlja veliki problem globalnog javnog zdravlja.



Slika 1.1. Klinički izgled oralnog planocelularnog karcinoma jezika (A, B, C) i obraza (D)

Osobe sa OPK su najčešće stariji muškarci koji su bili svesni postojanja promene u periodu od 4 do 8 meseci pre nego što su potražili stručnu pomoć (8 do 24 meseca u nižim socioekonomskim grupama) (American Cancer Society, 2018). U ranoj fazi rasta postoji minimalan bol, što može objasniti kašnjenje u traženju lekarske pomoći. Ako zdravstveni radnik ne posumnja odmah na OPK, onda može proći još nekoliko nedelja ili meseci pre nego što se obavi biopsija.

OPK može imati različite forme:

- 1) Egzofitični (formiranje mase, pečurkasti, papilarni, verukozni) – iznad nivoa okolne mukoze;
- 2) Endofitični (invazivni, ulcerisani) – ispod nivoa okolne mukoze (Neville et al., 2008).

Vrlo često nastanku OPK predhode prekancerozne lezije (leukoplakija ili eritroplakija). Egzofitična lezija tipično ima površinu koja je nepravilna, papilarna ili verukozna, a njena boja može varirati od normalne do crvene ili bele, u zavisnosti od količine keratina i vaskularizacije (Neville et al., 2008). Površina je često ulcerisana, a tumor je tvrd (induriran) pri palpaciji. Kod endofitičnog rasta, tumor ima ulegnuće, nepravilnog oblika, ulcerisano područje sa okolnom "urolanom" granicom normalne, crvene ili bele sluznice. Urolana granica je rezultat invazije tumora nadole i bočno ispod susedne mukoze. Ovaj izgled nije jedinstven za karcinom usne duplje jer granulomatozne lezije, kao što su tuberkuloza, tercijarni sifilis, oralne lezije kod Wegenerove granulomatoze ili Crohnove bolesti i hronični traumatski ulkusi, mogu izgledati slično (Neville et al., 2008). Infiltracija kosti, kada je prisutna, može biti bolna ili potpuno bezbolna, i pojavljuje se na radiološkom snimku kao "umoljčano" rasvetljenje sa loše definisanim ili neravnim ivicama (izgled sličan osteomijelitisu). Karcinom takođe može pokazati perineuralnu invaziju (Cianfriglia et al., 1999).

Najčešća lokalizacija intraoralnog karcinoma je jezik, obično posteriorne lateralne i ventralne površine i pod usne duplje. Druge lokalizacije (u opadajućem redosledu učestalosti) su meko nepce, gingiva, bukalna sluzokoža, labijalna sluznica i tvrdo nepce.

Karcinom jezika čini više od 50% oralnih karcinoma prema studiji na američkoj populaciji (Gnepp, 2009). Prema toj studiji, dve trećine karcinoma jezika pojavljuju se kao bezbolne, mase ili ulkusi na postero - lateralnoj granici, 20% se pojavljuju na prednjoj lateralnoj ili ventralnoj površini, a samo 4% se pojavljuje na dorzumu jezika.

OPK poda usne duplje predstavlja 35% svih oralnih karcinoma u epidemiološkim istraživanjima i izgleda da se učestalost u ovom predelu usne duplje povećava među ženama (Gnepp, 2009). Kod žena se dešava u proseku deceniju ranije nego kod muškaraca, ali je i dalje ostaje bolest starijih osoba. Od svih intraoralnih karcinoma, najverovatnije je da će lezije u ustima nastati kao posledica već postojeće leukoplakije ili eritroplakije. Najčešća lokalizacija je srednja linija u blizini frenuma. Gingivni i alveolarni OPK su obično bezbolni i najčešće se javljaju iz keratinizovane mukoze u posteriornim segmentima donje vilice. Ovaj tumor ima posebnu sklonost da oponaša benigne inflamatorne i reaktivne lezije, kao što su *granuloma pyogenicum*, *perifera osificirajući fibrom* i *epulis gigantocellulare*, koji su česti na gingivi. Kada se karcinom razvije u bezuboj zoni, može se javiti kao masa koja prelazi preko proteze i podseća na inflamatornu fibrozu hiperplaziju (*epulis fissuratum*). Tumori maksilarnog alveolarnog grebena mogu se proširiti na tvrdo nepce. Karcinom gingive često infiltrira kost, što rezultuje pokretljivošću zuba.

Metastatsko širenje OPK uglavnom se odvija kroz limfatike do ipsilateralnih limfnih nodusa. Metastatsko izmenjeni limfni nodus je obično čvrst i uvećan. Ako su maligne ćelije perforirale kapsulu nodusa i prodrle u okolna tkiva, tada će biti "fiksiran", ili neće biti lako pokretan. Ekstrakapsularno širenje (proširenje metastatskih depozita izvan kapsule limfnog čvora) je histopatološki nalazpovezansa lošom prognozom, odnosno sa povećanim rizikom od lokoregionalnog recidiva, udaljene metastaze i niže stope preživljavanja (Bouquot et al., 1989). Povremeno se mogu uočiti kontralateralni ili bilateralni metastatski depoziti, a najmanje 2% pacijenata u trenutku dijagnostikovanja ima distalniju metastazu (ispod ključne kosti); u nekim studijama ovaj procenat iznosi čak 22% (Davies and Welch, 2006). Ćelije OPK imaju tendenciju da putuju do submentalnih čvorova; tumorske ćelije iz posteriornih delova usne duplje putuju do gornjeg jugularnog i digastričnog čvora. Limfna drenaža iz orofarinksa dovodi ih do jugulodigastričnog lanca limfnih čvorova ili do retrofaringealnih čvorova.



Metastaza nije rani događaj za OPK. Međutim, zbog kašnjenja u postavljanju dijagnoze, oko 21% pacijenata ima metastaze na vratu pri dijagnozi (Gnepp, 2009). Nasuprot tome, tumori koji se pojavljuju posteriorno, u orofarinksu, skloni su ranoj metastazi. Najčešća mesta udaljenih metastaza su pluća, jetra i kosti, ali bilo koji deo tela može biti pogođen.

### 1.1.1 TNM klasifikacija

Veličina tumora i stepen metastatskog širenja OPK su najbolji pokazatelji prognoze bolesti (Kowalski et al., 2000). Tabela 1.1 sumira najpopularniji protokol za određivanje stadijuma bolesti, prema tzv. TNM klasifikaciji (tumor-nodus-metastaza). TNM klasifikacije se koriste za većinu karcinoma, pri čemu se svaka klasifikacija odnosi isključivo na specifično anatomsko mesto i specifični tip tumora. Ovakv klasifikacija počiva na tri osnovne kliničke karakteristike: veličina primarnog tumora (T), status lokalnih limfnih nodusa (N), pojava udaljene metastaze (M).

Tabela 1.1. TNM klasifikacija OPK (preuzeto i modifikovano:(Deschleret al., 2017))

<b>Veličina primarnog tumora (T)</b>	
Tx	Nema dostupnih informacija o primarnom tumoru
T0	Nema dokaza o postojanju primarnog tumora
Tis	Karcinom <i>in situ</i>
T1	Prečnik tumora 2 cm i manji
T2	Prečnik tumora između 2 i 4 cm
T3	Prečnik tumora veći od 4 cm
T4a	Tumor vrši invaziju kortikalne kosti/ mišiće (m. genioglossus, m. hipoglossus, m. palatoglossus, m. stiloglossus)/ maksilarni sinus/ kožu lica. Moguća je resekcija tumora
T4b	Tumor zahvata mastikatorni prostor/ pterigoidne nastavke/ bazu lobanje i/ili unutrašnju karotidnu arteriju. Resekcija tumora nije moguća
<b>Regionalni limfni nodusi (N)</b>	
Nx	Ne mogu/nisu procenjeni
N0	Ne postoje regionalne metastaze limfnih čvorova
N1	Ipsilateralna metastaza prečnika $\leq 3$ cm
N2	Ipsilateralna metastaza prečnika $> 3$ cm $\leq 6$ cm; Multiple ipsilateralne metastaze $\leq 6$ cm; Bilateralne ili kontralateralne metastaze $\leq 6$ cm;
N2a	Ipsilateralna metastaza prečnika $> 3$ cm $\leq 6$ cm;
N2b	Multiple ipsilateralne metastaze $\leq 6$ cm;
N2c	Bilateralne ili kontralateralne metastaze $\leq 6$ cm;
N3	Metastaza u limfnom čvoru $> 6$ cm u najvećem prečniku
<b>Distalne metastaze (M)</b>	
Mx	Udaljene metastaze nisu procenjene
M0	Ne postoje udaljene metastaze
M1	Prisutne udaljene metastaze

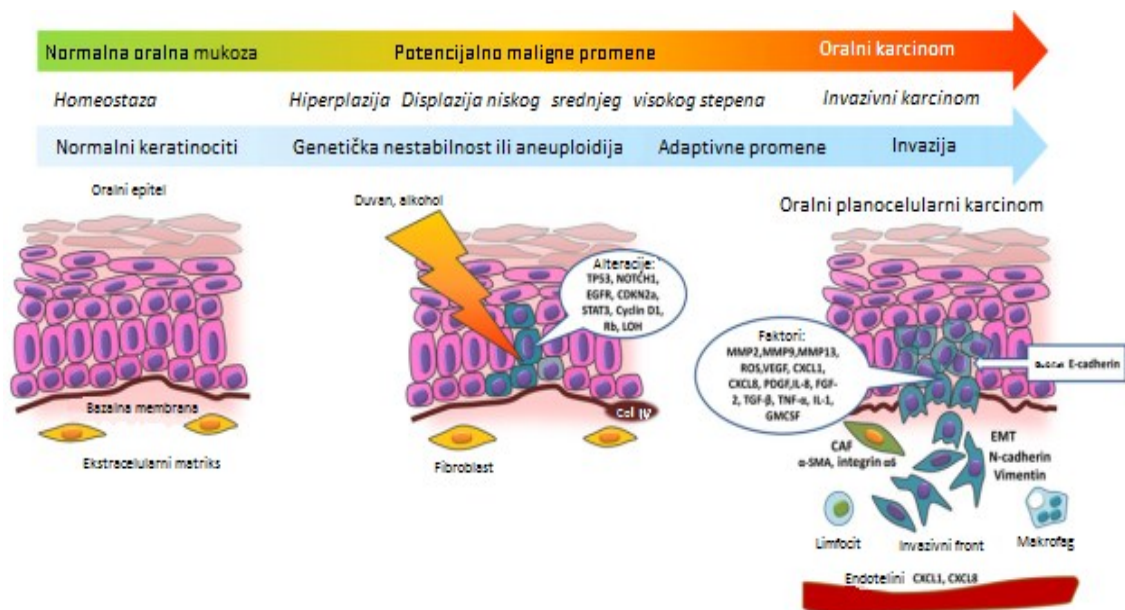
Na osnovu ove klasifikacije određuje se stadijum bolesti (*staging*).OPK se dele u četiri stadijuma (Tabela 1.2). Što je viši stadijum, prognoza je lošija. Drugim rečima, tumor stadijuma IV povezan je sa mnogo lošijom prognozom od tumora stadijuma I.

Tabela 1.2. Određivanje stadijuma OPK(preuzeto i modifikovano:(Deschler et al., 2017))

Stadijum 0	Tis	N0	M0
Stadijum I	T1	N0	M0
Stadijum II	T2	N0	M0
Stadijum III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadijum IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadijum IVb	Bilo koji T	N3	M0
	T4b	Bilo koji N	M0
Stadijum IVc	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

### 1.1.2 Histopatološke karakteristike

OPK nastaje iz displastičnog epitela i histopatološki se karakteriše invazivnim ostrvima i plažama malignih epitelnih ćelija. U najranijem trenutku invazije, tj. proboja bazalne membrane epitela, često se opisi “površinsko-invazivni” ili “mikroinvazivni”. Invazija je predstavljena nepravilnim širenjem tumorskog epitela kroz bazalnu membranu u subepitelijalno vezivno tkivo (Slika 1.2).

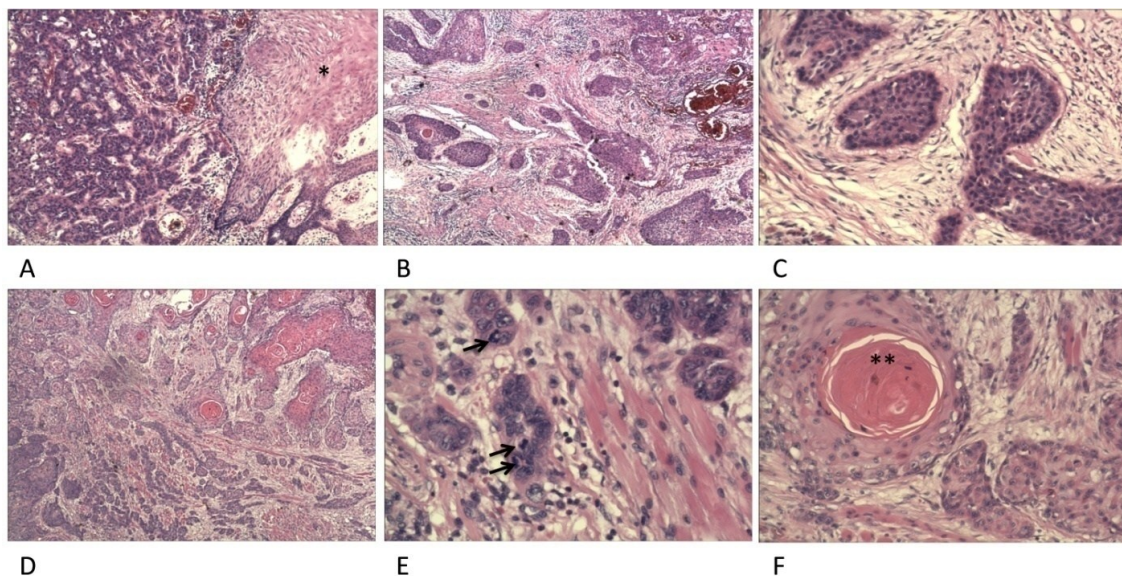


Slika 1.2. Progresivna evolucija oralnog planocelularnog karcinoma (preuzeto i modifikovano: (Rivera, 2015))

Pojedinačne tumorske ćelije, plaže ili ostrva ćelija infiltrišu kao nezavisni entiteti u dublje slojeve tkiva, bez konekcije sa površinskim epitelom. Infiltracija tumorskih ćelija može prodirati duboko u masno tkivo, mišić ili kost, uništavajući tkiva tokom progresije. Tumorske ćelije mogu invadirati krvne sudove i mogu ući u lumen vena ili limfatika. Često postoji jak inflamatorni ili imunološki odgovor na epitel, a mogu biti prisutne i fokalne oblasti nekroze i krvarenja. Karcinomske ćelije su sposobne da indukuju stvaranje novih krvnih sudova (angiogeneza) i, povremeno, gusto fibrozno vezivno tkivo (desmoplazija) (Neville et al., 2008). Bez obzira na stepen diferentovanosti tumora, tumorske ćelije generalno pokazuju bogatu eozinofilnu citoplazmu sa velikim, često tamnim (hiperhromatičnim) jedrom i poremećenim odnosom nukleus/citoplazma (Slika 1.3). Vidljivi su različiti stepeni ćelijskog i nukleusnog pleomorfizma. Normalan proizvod keratinizujućeg pločastoslojevitog epitela je keratin, a keratinske formacije, tzv. rakove perle (okrugli fokusi koncentrično slojevitih keratinizovanih ćelija sa keratinom u centru) mogu biti prisutne u tumorskom tkivu. Histopatološka procena stepena sličnosti tumora sa tkivom od koga je nastao (pločastoslojevit epitel) naziva se gradiranje (Tabela 1.2). OPK se gradiraju u tri gradusa (od gradusa I do III). Manje diferentovani tumori dobijaju viši gradus.

Histopatološki gradus tumora donekle je povezan sa njegovim biološkim ponašanjem. Drugim rečima, tumor koji dovoljno podseća na svoje tkivo porekla izgleda da raste malo sporije i da kasnije metastazira. Takav tumor se naziva tumorom niskog stepena maligniteta, I gradusom ili dobro diferentovanim planocelularnim karcinomom. Nasuprot tome, mnogocelularni tumor, praćen nuklearnim pleomorfizmom, patološkim mitozama, sa malom ili nikakvom proizvodnjom keratina može biti neprepoznatljiv u odnosu na tkivo porekla. Takav tumor često brzo raste, metastazira rano, i naziva se tumorom visokog stepena maligniteta, III gradusa, slabo diferentovan. Tumor sa histopatološkim izgledom između ove dve krajnosti označen je kao umereno diferentovan karcinom. Ukoliko tumor uopšte ne pokazuje sličnosti sa tkivom od koga potiče nazivamo ga anaplastičnim tumorom.

U određenoj meri, gradiranje OPK je subjektivan proces (Neville et al., 2008), i čini se da klinička procena mnogo bolje korelira sa prognozom nego mikroskopsko ocenjivanje. Tokom proteklih nekoliko decenija, istraživači su predložili različite multiparametarske sisteme histopatološke procene u pokušaju da pruže objektivnije kriterijume koji bi doprineli pouzdanijoj prognozi (Brandwein-Gensler et al., 2005). Varijable kao što su dubina invazije, veličina tumora, stepen keratinizacije, nuklearni pleomorfizam, limfocitni odgovor i patološke mitoze uključeni su u takve sisteme ocenjivanja. Međutim, nedostaje uniforman dogovor o upotrebi takvih metoda. Dijagnoza OPK gotovo uvek se pravi rutinskim svetlosnim mikroskopiranjem i hematoksilin i eosin (H&E) bojenjem. Posebne studije koje koriste monoklonalna antitela (npr. citokeratin) služe za diferencijalnu dijagnozu u odnosu na druge tipove tumora (npr. tumore pljuvačnih žlezda).



Slika 1.3. Patohistološki izgled OPK jezika (A, B, C) sa epitelom jezika (A\*), tumorskim plažama i trakama karcinomskih ćelija između kojih je tumorska stroma.

Patohistološki izgled OPK pod usne duplje (D, E, F) različitog stepena diferentovanosti tumora (D, F) pri čemu se mogu zapaziti specifične formacije, tzv. rakove perle (F\*\*), koje su osobina dobro diferentovanih OPK i patološke mitoze (E, strelice); Uveličanja 40×, 100×, 200×

## 1.2 Epidemiologija oralnog planocelularnog karcinoma

U svetskim studijama i izveštajima, karcinomi usne duplje i farinksa su objedinjeni i kolektivno predstavljaju šesti po učestalosti karcinom u svetu (Warnakulasuriya, 2009)., sa posebno visokom učestalošću registrovanom na indijskom potkontinentu, Australiji, Francuskoj, Brazilu i Južnoj Africi. Oko 94% svih oralnih maligniteta čine OPK. Prosečne godišnje stope incidencije i mortaliteta, značajno variraju između različitih rasa, polova i starosnih grupa. Primera radi, u SAD godišnje se dijagnostikuje oko 22000 novih slučajeva, a nešto više od 5300 osoba umire od ove bolesti svake godine (Davies and Welch, 2006).

Kao i kod mnogih maligniteta, rizik od oralnog karcinoma raste sa godinama, posebno za muškarce. Godišnja standardizovana stopa incidencije (broj novodijagnostikovanih slučajeva na 100.000 osoba svake godine) za ovu bolest je 6,4

na 100000 u centralnoj Srbiji (Tabela 1.3). U svetu, muškarci bele puti imaju veći rizik od oralnog karcinoma nakon 65 godina starosti nego bilo koja druga grupa. Žene, imaju mnogo nižu godišnju stopu incidencije od muškaraca u svim starosnim godinama (Davies and Welch, 2006). OPK je 2,7 puta češći kod muškaraca u odnosu na žene (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>). Prema poslednjim izveštajima Međunarodne agencije za istraživanje karcinoma (*International Agency for Research on Cancer*), oralni karcinomi, u koje spadaju karcinomi usana, jezika, gingive, poda usne duplje, su sve češći, sa približno 300000 novootkrivenih slučajeva godišnje i 145000 smrtnih ishoda ([http://globocan.iarc.fr/Pages/summary\\_table\\_pop\\_sel.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/summary_table_pop_sel.aspx)). U Tabeli 1.4 je prikazan morbiditet i mortalitet pacijenata sa OPK prema navodima Svetske zdravstvene organizacije (SZO). Najkritičnije stanje je u regionu jugo-istočne Azije (u oblastima Šri Lanke, Indije, Pakistana i Tajvana) i Evrope (Francuska, Mađarska, Slovačka i Slovenija) (Warnakulasuriya, 2009). Na osnovu podataka Humanog indeksa razvoja u sklopu Razvojnog programa Ujedinjenih Nacija (UNDP) morbiditet je visok i u zemljama sa boljim razvojnim indikatorima (Tabela 1.4). Međutim, GLOBOCAN podela pokazuje da je stepen mortaliteta viši u zemljama sa nižim životnim standardom (Rivera, 2015). Bez obzira na rezultate različitih studija, jasno je da OPK predstavlja globalni medicinski problem.

Tabela 1.3. Standardizovane stope incidencije, stope incidencije i broj novoobolelih slučajeva od raka usne duplje i ždrela na 100.000 stanovnika prema vodećim lokalizacijama i okruzima (muški pol) 2015. godina (preuzeto i modifikovano: Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2017.)

Lokalitet Usna duplja i ždrela (C00-C10)	Standardizovane stope incidencije*	Stope incidencije	Broj novoobolelih
Beograd	7,2	12,3	98
Kolubarski okrug	2,2	4,8	4
Mačvanski okrug	3,6	7,7	11
Raška	0,8	1,3	2
Moravički okrug	8,4	12,9	13
Zlatiborski okrug	3,8	7,3	10
Rasinski okrug	10,6	20,1	23
Šumadijski okrug	5,4	9,9	14
Pomoravski okrug	5,8	11,0	11
Braničevski okrug	6,5	9,4	8
Podunavski okrug	9,2	13,7	13
Zaječarski okrug	7	16,3	9

Borski okrug	6,9	13,8	8
Niški okrug	8,6	16,6	30
Pčinjski okrug	3,0	8,9	9
Jablanički okrug	5,2	10,6	11
Toplički okrug	9,6	15,9	7
Pirotski okrug	8	15,7	7
<b>Centralna Srbija</b>	<b>6,4</b>	<b>11,4</b>	<b>288</b>

\*fiktivne vrednosti koje se dobijaju određenim tehničkim postupkom, uvođenjem standardne populacije, obično je to populacija sveta (ASR-W); njima se prevazilaze razlike po polu i uzrastu koje postoje u različitim populacijama

Tabela 1.4. GLOBOCAN incidenca i mortalitet OPK, svi uzrasti, oba pola po populacijama (preuzeto i modifikovano:(Rivera, 2015))

Populacija	Incidenca			kumulativni rizik
	Broj	Stope incidencije	Standardizovane stope incidencije ASR-W	
SZO Afrika	13484	1,5	2,7	0,30
SZO Amerika	49200	5,2	4,1	0,48
SZO Istočni mediteranski regijon	20681	3,3	4,6	0,52
SZO Evropa	65933	7,3	4,6	0,73
SZO Jugoistočni regijon Azije	103464	5,6	6,4	0,22
SZO Zapadni Pacifički regijon	47524	2,6	2,0	0,54
GLOBOCAN razvijena područja	100823	8,1	4,7	0,54
GLOBOCAN nerazvijena područja	199550	3,4	3,7	0,42
Populacija	Mortalitet			kumulativni rizik
	Broj	Stope incidencije	Standardizovane stope incidencije ASR (W)	
SZO Afrika	8530	1,0	1,8	0,20
SZO Amerika	12803	1,3	1,0	0,12
SZO Istočni mediteranski regijon	10997	1,8	2,5	0,30
SZO Evropa	25202	2,8	1,7	0,19
SZO Jugoistočni regijon Azije	65734	3,5	4,1	0,48
SZO Zapadni Pacifički regijon	22068	1,2	0,9	0,09
GLOBOCAN razvijena područja	33313	2,7	1,4	0,16
GLOBOCAN nerazvijena područja	112040	1,9	2,1	0,24

Karcinom usne je nešto drugačiji od intraoralnog karcinoma. Ima patofiziologiju sličniju planocelularnom karcinomu kože. Izvan Republike Srbije, nađene su izuzetno velike razlike u godišnjoj stopi incidencije i mortaliteta za karcinom usne duplje. Mnoge od ovih razlika su nesumnjivo uzrokovane različitim navikama stanovništva, očekivanim trajanjem života, preventivnim obrazovanjem i kvalitetom medicinskih kartona u različitim zemljama (Neville et al., 2008).

Međutim, uprkos teškoćama u interpretaciji ovih podataka, oni su pomogli u identifikaciji potencijalnih etioloških faktora.

### **1.3 Etiologija i faktori rizika oralnog planocelularnog karcinoma**

Uzrok oralnog planocelularnog karcinoma je multifaktorijalni. OPK je prouzrokovan akumulacijom multiplih genetičkih i epigenetičkih promena u naslednom materijalu koje se javljaju kao posledica delovanja hemijskih (dugotrajna upotreba cigareta i alkohola) i fizičkih (UV zračenje) mutagenih agenasa. Nijedan pojedinačni uzročnik ili faktor nije jasno definisan ili prihvaćen, ali se generalno dele na spoljašnje i unutrašnje faktore. Vrlo je verovatno da je potrebno više od jednog faktora da bi se nastao malignitet. Glavi sredinski (spoljašnji) faktori su duvanski dim, alkohol i UV zračenje (samo za rak vermilion). Unutrašnji faktori obuhvataju sistemska ili generalizovana stanja, kao što su opšta neuhranjenost ili anemija usled deficijencije gvožđa. Čini se da nasleđe nema presudnu ulogu u patogenezi karcinoma usne duplje. Dokumentovano je da mnogim OPK prethode prekancerone lezije, posebno leukoplakija i eritroplakija. Potrebno je naglasiti da je OPK bolest koju je moguće prevenirati, jer su upotreba cigareta i alkohola glavni faktori rizika- prisutni su u 90% slučajeva (Dissanayaka et al., 2012), a imaju i izražen sinergistički efekat (Koontongkaew, 2013).

#### *1.3.1 Duvan*

Internacionalna agencija za istraživanje kancera je 2007. godine zaključila da postoje dokazi da je duvanski dim kancerogen i da izaziva karcinom usne duplje i



pankreaksa (“Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines.” 2007), a rizik za dobijanje OPK je tri puta veći kod pušača nego kod nepušača (Gandini et al., 2008). Smatra se da duvanski dim oslabljuje imunitet u usnoj duplji, što vodi pojavi različitih oboljenja usne duplje (gingivitis, parodontopatija) ali i OPK (Lee et al., 2012). Duvanski dim sadrži nekoliko elemenata koji utiču na kancerogenezu, od kojih su najznačajniji nitrozamini, benzpireni i aromatični amini (Rivera, 2015).

### *1.3.2 Alkohol*

Etanol može da utiče i lokalno i sistemski: povećava propustljivost oralne mukoze rastvarajući lipide u epitelu, što izaziva atrofiju epitela kao i smetnje u sintezi i reparaciji DNK. Pored genotoksičnog efekta, alkohol utiče i na smanjeno lučenje pljuvačke, do pada lokalnog i sistemskog imuniteta, a dovodi i do poremećaja u radu jetre, što sve rezultira povećenom osetljivošću ka infekcijama i neoplazmama (Reidy et al., 2011).

### *1.3.3 Nedostatak gvožđa*

Nedostatak gvožđa, naročito teška, hronična forma poznata kao Plummer-Vinson ili Paterson-Kelli sindrom, povezana je sa povišenim rizikom za planocelularni karcinom jednjaka, orofarinksa i usne duplje. Ljudi koji imaju nedostatak gvožđa imaju tendenciju smanjenja celularnog imuniteta, a gvožđe je neophodno za normalno funkcionisanje epitelnih ćelija gornjeg digestivnog sistema (Watts, 1961).

### *1.3.4 Nedostatak vitamina A*

Nedostatak vitamina A dovodi do prekomerne keratinizacije kože i sluzokože, a istraživači su sugerisali da taj vitamin može imati zaštitnu i preventivnu ulogu u OPK. Neki veruju da su nivoi retinola u krvi i količina unetog  $\beta$  karotena obrnuto proporcionalni riziku od OPK i leukoplakije. Dugotrajna terapija retinoičnom kiselinom i  $\beta$  karotenom takođe je povezana sa regresijom bar nekih leukoplakičnih lezija i istovremenom redukcijom stepena displazije unutar takvih lezija (Notani and Jayant, 1987).

### 1.3.5 Infekcija *Candida-om albicans*

Oralno hiperplastična kandidijaza se često navodi kao prekancerozno stanje usne duplje. Budući da se ova lezija pojavljuje kao beli plak koji se ne može ukloniti špatulom, nazvana je i kandidalna leukoplakija. Nažalost, teško je i klinički i histopatološki razlikovati pravu hiperplastičnu kandidijazu i postojeću leukoplakiju sa superponiranim kandidijazom. Eksperimentalno, neki sojevi *Candida albicans* su proizveli hiperkeratotske lezije jezika pacova bez ikakvog drugog etiološkog faktora (Krogh et al., 1987). U drugim studijama, određeni sojevi su pokazali da proizvode nitrozamine, hemikalije koje su uključene u kancerogenezu.

### 1.3.6 Onkogeni virusi

Onkogeni virusi mogu igrati važnu ulogu u raznim vrstama maligniteta. Virusni agensi sposobni su da se integrišu u nasledni materijal domaćina i na taj način remete ćelijsku kontrolu rasta i proliferacije. Ranije se smatralo da svi retrovirusi, adenovirusi, herpes simplex virusi (HSV) i humani papilomavirusi (HPV) imaju ulogu u razvoju karcinoma usne duplje (Ha and Califano, 2004). Čini se, međutim, da je HPV jedini koji je zaista impliciran, ne samo u oralnom karcinomu, već i u karcinomu farinksa, larinksa, ezofagusa, grlića materice, vulve i penisa (Ha and Califano, 2004). HPV podtipovi 16, 18, 31 i 33 su sojevi koji su najbliže povezani sa displazijom i karcinomom skvamoznih ćelija. Danas se smatra da je HPV prognostički biomarker orofaringealnih karcinoma (Kang et al., 2015). Osnovni mehanizmi kojima se veruje da HPV doprinosi oralnoj kancerogeniji podrazumevaju dva virusna proteina: E6 (koji promovise degradaciju p53 tumor supresora) (Johnson, 2004) i E7 (koji promovise degradaciju pRb, retinoblastoma tumor supresora) što dovodi do poremećaja ćelijskog ciklusa (Dalianis, 2014). HSV, posebno tip 2, predložen je takođe kao etiološki faktor oralnog karcinoma.

Veza između statusa i prognoze HPV tumora nije jasna. Neke studije ukazuju da su HPV-pozitivni tumori povezani sa poboljšanim odgovorom na tretman i produženim preživljavanjem; međutim, druge studije nisu otkrile značajnu razliku u preživljavanju između pacijenata sa HPV-pozitivnim i HPV-negativnim tumorima (Ha and Califano, 2004).

## 1.4 Terapija i prognoza oralnog planocelularnog karcinoma

Klinička slika OPK bitno utiče na oblik terapije koji će biti primenjen. Najčešće se sastoji od široke (radikalne) hirurške ekscizije, radioterapije ili kombinacije hirurške i radioterapije. Lokalizacija tumora takođe može da utiče na plan lečenja. Orofaringealni planocelularni karcinomi se obično tretiraju radioterapijom. Dodatne indikacije za radijacionu terapiju uključuju prisustvo bliskih ili pozitivnih margina resekcije, regionalne metastaze, histopatološki visok gradus tumora i perineuralnu ili angiolimfnu invaziju (Neville et al., 2008).

Kao adjuvantna terapija koriste se različiti hemoterapijski agensi. Hemoterapija se obično primenjuje istovremeno sa radijacionom. Uobičajeno upotrebljena sredstva uključuju jedinjenja koja sadrže platinu (npr., cisplatin, karboplatin), 5-fluorouracil i taksane (npr. paklitaksel, docetaksel) (Specenier and Vermorken, 2007). Pored toga, očekuje se da će ciljane (target) terapije zasnovane na nanočesticama kao nosačima citostatika postati važna strategija lečenja u budućnosti. Iako hemoterapijska sredstva mogu privremeno smanjiti veličinu tumorske mase, nijedna do sada nije značajno poboljšala stopu preživljavanja.

Za OPK manjih dimenzija obično se bira jedan način lečenja. Pacijenti sa većim lezijama ili lezijama sa klinički opipljivim limfnim nodusima obično zahtevaju kombinovanu terapiju. Pored toga, pacijentima sa ranim stadijumom (T1/T2 N0) ali duboko invazivnim (debljina tumora preko 3 mm) karcinomom jezika koji imaju povećan rizik za pojavu subkliničke metastaze limfnih nodusa, indikovano je postoperativno zračenje vrata ili elektivna disekcijavrata (Banna et al., 2010). Kod sumnje na metastaziranje lokalnog limfnog čvora, vrši se ili radikalna ili modifikovana radikalna disekcija vrata. Radikalna disekcija vrata je u suštini *en bloc* uklanjanje svih limfnih čvorova lateralnog trougla vrata, uključujući i gornji, srednji i donji jugularni čvor, supraklavikularnu grupu čvorova i promenjene delove okolne muskulature.

Prognoza za preživljavanja od OPK zavisi od stadijuma tumora. Petogodišnja stopa preživljavanja za OPK je 53% do 68% ako je tumor relativno mali (<4 cm) i metastaza se nije pojavila do trenutka postavljanja dijagnoze (stadijum I i II); 41% kada je tumor veličine 4 cm i bez metastaza ili sa metastazama u jednom regionalnom

ipsilateralnom limfnom čvoru (3 cm) (III stadijum); i samo 27% kada je tumor zahvatio susedne strukture, ima udaljene metastaze, ili pokazuje regionalne metastaze višestrukih čvorova, jednog ipsilateralnog (3 cm i 6 cm) čvora (stadijum IV) (Neville et al., 2008). Iako neki pacijenti prežive i 10 godina nakon inicijalne terapije, velika većina smrtnih slučajeva javlja se u prvih 5 godina.

Uprkos napretku u lečenju i razumevanju osnovne molekularne patogeneze OPK, stope preživljavanja tokom poslednjih nekoliko decenija nisu se značajno poboljšale i ostale su u rasponu od 50% do 59% (Rivera, 2015). Relativno nizak procenat preživljavanja se javlja usled pojave lokalnih recidiva, udaljenih metastaza kao i rezistencije na terapiju (Januszyk and Gurtner, 2013; Vogel and Marcotte, 2012). Stoga su rana dijagnoza i prevencija od suštinskog značaja za poboljšanje ishoda lečenja.

### **1.5 Značaj tumorskih margina za lečenje oralnog planocelularnog karcinoma**

Kvalitet hirurške resekcije, odnosno njena „potpunost“, je jedan od najvažnijih prognostičkih faktora u lečenju OPK (Sawairz et al., 2003), pošto je neuspeh u kompletnom uklanjanju primarnog tumora glavni uzrok smrti pacijenta. Nažalost vrlo često naizgled zdrava margina tumora krije izmenjeni histološki status. Prisustvo epitelne displazije ili tumorskih ćelija u marginama je povezano sa značajnom pojavom recidiva- u čak 66% slučajeva (Reis et al., 2011). Međutim, i kod histološki „negativnih“ hirurških margina (bez prisustva neoplastičnih ćelija vidljivih za patologa), 10-30% pacijenata sa OPK će imati lokalni recidiv (Jones et al., 1996), što može dovesti do neuspeha u lečenju i smrti pacijenta. Ovo ukazuje na činjenicu da histološki normalne margine mogu imati već brojne promene na molekularnom nivou, pre svega na nivou naslednog materijala, što povećava rizik za pojavu recidiva (Eljabo et al., 2018; Jelovac et al., 2016).

Adekvatna hirurška resekcija je presudna za lokalnu kontrolu i prognozu (Slootweg et al., 2002). Međutim, ne postoji univerzalna definicija optimalne granice resekcije. Definicija čistih margina (*clear margins*) podrazumeva rastojanje od ivica

resekcije koje se kreće u relativno širokom opsegu od 2 do 10 mm (Hinni et al., 2013; Meier et al., 2005; Priya et al., 2012).

Takođe, određene hirurške škole koriste deskriptivne termine kao što su "bez tumora", "tumorsko-negativne", "tumor nije dosegao marginu resekcije" i "linija resekcije ne pokazuje znake malignosti", koji su nedovoljno precizni. Slično je i sa definicijom bliskih i pozitivnih margina. Nedostatak univerzalne definicije margina otežava upoređivanje rezultata hirurške intervencije i ishoda bolesti kod pacijenata tretiranih u različitim centrima. Pomenute nejasnoće mogu da dovedu u pitanje i adekvatan izbor adjuvantne terapije (Smits et al., 2016).

Potrebno je istaći da se dimenzije ekscidirane promene tokom vremena tj. preparacije tkiva za patohistološku analizu menjaju. Patološka margina je skoro uvek manja od hirurške margine usled skupljanja tkiva tumora. Stepem skupljanja se mora precizno kvantifikovati, jer varira od 9,2 do čak 75% veličine tumora (Cheng et al., 2008; Funk et al., 2002; Mistry et al., 2005). Uputstvo o tretiranju patoloških margina OPK dao je *UK Royal College of Pathologists* (Helliwell and Woolgar, 2013). Oni kategorišu marginu od 5 mm kao čistu (Helliwell and Woolgar, 2013) i smatraju da te margine nisu vezane za rizik od ponovne pojave tumora. Pokazano je da su margine manje od 1 mm loš prognostički parametar (David N. Sutton et al., 2003). Margine drugih veličina pokazuju veliku varijabilnost u smislu povezanosti sa recidivom. Termin "bliske margine" pravi posebnu konfuziju u literaturi (Alicandri-Ciufelli et al., 2013; Hinni et al., 2013; Wong et al., 2012). Predložene su raznovrsne vrednosti: ispod 1,6mm (Wong et al., 2012), 2mm (Hinni et al., 2013), 5 mm (Weijers et al., 2004), 7mm (Liao et al., 2008), i 10 mm (Hicks et al., 1998). Treba napomenuti da postoje i studije koje nisu utvrdile direktnu vezu između prognoze bolesti i veličine margine (Weijers et al., 2004; Wong et al., 2012).

Šarolikost i nepodudarnost rezultatima se mogu pripisati različitom dizajnu studija koje su se bavile problematikom margina (David N. Sutton et al., 2003). Jednu od grešaka predstavlja i svrstavanje pacijenata sa karcinomom larinksa u istu grupu sa OPK (Wong et al., 2012), pod zajedničkim izrazom "kanceri glave i vrata". Sledeća greška je objedinjavanje pacijenata koji su primili adjuvantnu terapiju i onih koji nisu (Binahmed et al., 2007; Nason et al., 2009; D N Sutton et al., 2003). Radioterapija koja se sprovodi u cilju smanjenja rizika od recidiva će automatski umanjiti uticaj margine

na ishode lečenja. Treća moguća greška je nedostatak procene uticaja parametara povezanih sa tumorom, a naročito markerima agresije bolesti (veličina tumora i dubina invazije, diferencijacija, invazivni obrazac, perineuralna i limfovaskularna invazija), prilikom analize margina (Binahmed et al., 2007; Nason et al., 2009; Weijers et al., 2004)

## **2. Kancerske matične ćelije**

### **2.1 Definicija i osobine kancerskih matičnih ćelija**

Prema stohastičkoj hipotezi, tumorske ćelije su homogene, tj. svaka ćelija raka ima jednaku sklonost da inicira i propagira tumore i metastazira (Tabela 1.5). Heterogenost u tumorima se objašnjava spontanim promenama u ćelijskim fenotipovima (Albers et al., 2012) (Slika 1.2). Međutim, noviji podaci nude alternativno objašnjenje i shvatanje tumorskog tkiva, koje se naziva hipoteza matičnih ćelija karcinoma. Po toj hipotezi tumorsko tkivo sadrži ćelije na različitim hijerarhijskim nivoima i samo mala ćelijska subpopulacija u tumoru ima sposobnost da inicira pojavu karcinoma. Teorija "kancerskih matičnih ćelija" (KMĆ) podrazumeva da su KMĆ na vrhu hijerarhijske piramide (Krishnamurthy et al., 2010; Krishnamurthy and Nör, 2012).

Matične ćelije u zdravom tkivu se definišu kao nediferencirane ćelije koje imaju sposobnost da proizvode specijalizovane ćelije tog tkiva, kao i potomke nediferenciranih matičnih ćelija sa potencijalom za održavanje tkiva. Slično normalnim matičnim ćelijama, KMĆ imaju kapacitet samo-obnavljanja, kao i asimetrične deobe. Ove ključne karakteristike omogućavaju KMĆ da iniciraju i održavaju populaciju kancerskih ćelija. Pored klasičnog pojma (KMĆ), različiti termini su korišćeni u najnovijoj naučnoj literaturi za opisivanje ovih ćelija, kao što su ćelije samo-obnove i tumorske inicijacije / održavanja populacije, tumor obnavljajuće ćelije, ćelije inicijacije karcinoma i tumor-propagirajuće ćelije. U ovom radu koristićemo termin koji je najviše prihvaćen, a to je KMĆ (Liu et al., 2011).

Tabela 1.5. Osobine KMĆ (preuzeto i modifikovano:(Albers et al., 2012))

---

KMĆ inicira stvaranje tumora i dovodi do neoplastične proliferacije  
KMĆ imaju sposobnost simetrične deobe  
Posle transplantacije u odgovarajućeg domaćina, KMĆ obnavljaju heterogeni fenotip tumora pomoću asimetričnih ćelijskih deoba  
KMĆ su uglavnom sporo deljive ćelije i time relativno otporne na zračenje i hemoterapeutske tretmane  
U poređenju sa "rasutom" tumorskom populacijom, KMĆ imaju jasan "biomarkerski potpis", koji se može definisati i koji služi za izolovanje ovih ćelija

---

KMĆ se posmatraju kao rezultat onkogenog procesa i kao polazna tačka za nastanak tumora i metastaza (Dalerba et al., 2007) i prema teoriji jedna KMĆ može u potpunosti da *de novo* stvori tumor. Smatra se da se tumori sastoje od najmanje dve ćelijske subpopulacije: manja populacija KMĆ i osnovna masa tumorskih ćelija koje se razlikuju od KMĆ po tome što su izgubile sposobnost samoobnavljanja. Koncept ovog modela razvijen je kao analog za obnovu adultnih tkiva kao što je krv koja se regeneriše iz grupe hematopoetičkih matičnih ćelija (Dalerba et al., 2007). Ideja o tumorskim inicijatorskim ćelijama je istraživana kod leukemije, gde je mali broj leukemičnih ćelija generisao tumore kod miševa (Bonnet and Dick, 1997). Tumori generisani u ovim istraživanjima bili su heterogeni, sa hijerarhijskom organizacionom strukturom koja ukazuje na postojanje ćelija različitog stepena maligniteta. Prvi dokaz za postojanje KMĆ upravo dolazi od studija ćelijskih populacija akutne mijeloidne leukemije (AML) gde je ustanovljeno da ćelije koje izazivaju AML čine 0,01-1% ukupne populacije ćelija. Ta subpopulacija ćelija je bila u stanju da indukuje AML nakon transplantacije u imunodeficientne miševе, dok druge ćelijske populacije nisu imale takvu sposobnost (Bonnet and Dick, 1997; Hewitt, 1958). Još jedna potvrda validnosti ovog modela je dokaz da selektivno ubijanje KMĆ može zaustaviti rast tumora (Schatten et al., 2009).

Slično fiziološkom stanju u tkivima, i karcinomi se sastoje od heterogenih populacija ćelija koje pokazuju veoma različite morfološke i funkcionalne fenotipove (Harper et al., 2007).

Veoma je važna i zanimljiva studija u kojoj su obeležene ćelije OPK miša pokazale da mogu da generišu nemaligne keratinocite (Kauffman, 1971).

U periodu između sedamdesetih i devedesetih godina dvadesetog veka, biologija tumora je bila usmerena na koncept klonalne evolucije. Nastanak tumora se

objašnjavao akumulacijom grešaka u molekulu DNK, odnosno mutacijama onkogenih i tumor supresorskih gena u jednoj ili manjem broju ćelija, koje su potom, usled inherentne genomske nestabilnosti, sticale tokom vremena različite karakteristike. Tumori su dakle bili obeleženi velikom heterogenošću ćelija, a evolucija ćelijskih genotipova i fenotipova bila je praćena i odgovarajućom selekcijom ćelijskih populacija najpovoljnijih po dalji razvoj i širenje tumora. Devedesetih godina, tehnološki napredak omogućio je ponovno vraćanje fokusa na hipotezu postojanja ćelija koje su odgovorne za inicijaciju karcinoma. Ovakve studije su postale izvodljive pojavom tehnologija kao što je fluorescentno aktivirani sistem za sortiranje ćelija (FACS), koji je omogućio istraživačima da proučavaju specifične markere na površini ćelija i koriste ove markere za sortiranje unapred određenih subpopulacija. Na primer, FACS je pomogao u gradiranju leukemijskih ćelijskih populacija na osnovu pozitivne ekspresije površinskih markera kao što su CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> i dr. (Bonnet and Dick, 1997).

Potrebno je napomenuti da se stohastička teorija i model KMĆ međusobno ne isključuju. Tačnije, možda svaka od ove dve teorije može da pruži logičnije objašnjenje, odnosno da pokaže bolju primenjivost u različitom stadijumu progresije tumora, ili pak u specifičnom tipu tumora (Krishnamurthy and Nör, 2012).



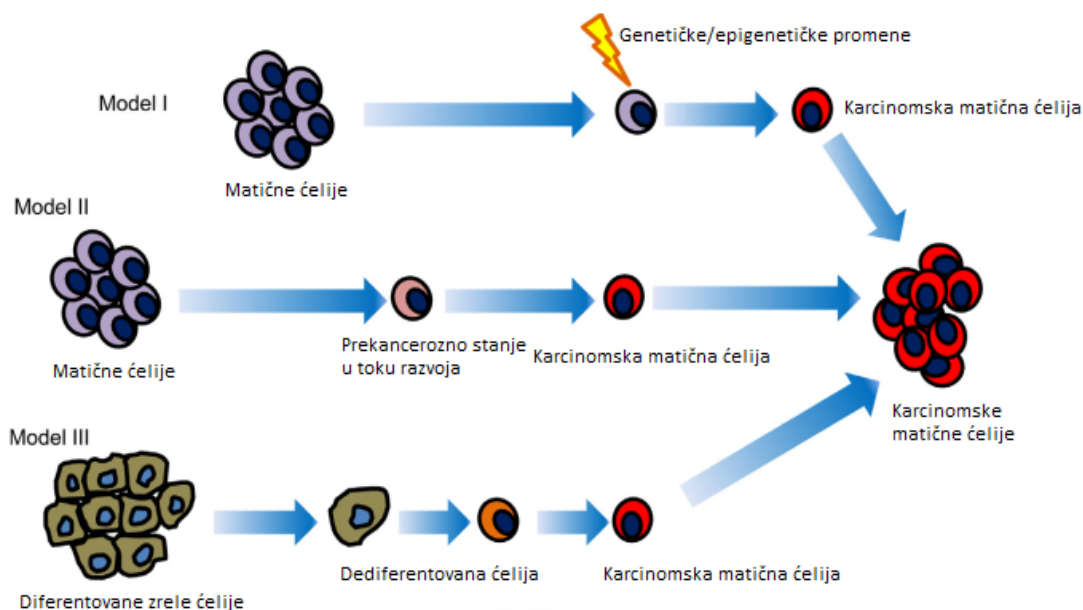
## 2.2 Poreklo kancerskih matičnih ćelija

Prema genetičkom modelu progresije, razvoj većine OPK-a traje mesecima ili godinama (Califano et al., 1996). Normalni humani oralni epitel se obnavlja u potpunosti u periodu od približno 14 do 24 dana (Squier and Kremer, 2001), tako da većina epitelnih ćelija nema dovoljno vremena da akumulira genetske promene neophodne za razvoj OPK-a (Califano et al., 1996). Samim tim, postavlja se pitanje, ukoliko KMC zaista postoje u OPK, gde se one zapravo nalaze (koje su to tačno ćelije)? Oralna mukoza se sastoji od većeg broja različitih slojeva: 1) epitel sa stratifikovanim skvamoznim ćelijama, koji nastaje deobom ćelija bazalnog sloja; 2) osnovni sloj vezivnog tkiva; i 3) submukoza.

U normalnoj sluznici, kao i u drugim tkivima koja se samoobnavljaju, kompenzacija za fiziološki gubitak zdravih ćelija zavisiće od postojanja adultnih (somatskih) matičnih ćelija (Tudor et al., 2004). Ove ćelije ostaju na suprabazalnoj poziciji i učestvuju u diferencijaciji i stratifikaciji (Stephens and Genever, 2007). Uzimajući u obzir specifičnost građe i funkcionalne karakteristike oralne mukoze, KMC mogu voditi poreklo od somatskih matičnih ćelija ili njihovih progenitora iz bazalnog sloja, koji vremenom akumuliraju određene genetske promene. Ova hipoteza je delimično poduprta eksperimentalnim istraživanjima koja su otkrila postojanje CD44<sup>+</sup> ekspresije u bazalnom sloju epitela, ali ne u diferenciranim ćelijama (Prince et al., 2007).

Pojava recidiva i razvoj novih primarnih tumora su glavni faktori koji utiču na prognozu karcinoma glave i vrata. Uprkos intenzivnoj, multimodalnoj terapiji, recidivi se javljaju kod približno 10-30% pacijenata, dok je incidenca pojave novog primarnog tumora u rasponu od 2% do 30% (Braakhuis et al., 2003; Kyrgidis et al., 2010). Ova činjenica se može objasniti postojanjem polja kancerizacije i pojavom molekularnih abnormalnosti u tumorskoj margini, a često ne samo u margini već i u delovima oralne sluznice udaljenim od tumora i naizgled zdravim. Koncept KMC pokušava da objasni lokalni neuspeh lečenja tumora, pojave recidiva i novih primarnih tumora iste lokalizacije. Glavne molekularne lezije su mutacije i epimutacije u onkogenima i tumor supresornim genima, gubitak heterozigotnosti i dr. Poznato je da ćelije sa ovim promenama dobijaju kapacitet za razvoj i širenje neoplazije. Pretpostavlja se da ove mutirane, prekancerozne ćelije zamenjuju normalne ćelije u mukozi. S obzirom na

izloženost oralnog epitela dejstvu različitih mutagena, ove ćelije su podložne daljim genetskim i epigenetskim promenama, što će rezultovati formiranjem tumora (Braakhuis et al., 2003; Feller et al., 2013).



Slika 1.4. Tri teorije o poreklu KMC (preuzeto i modifikovano:(Simple et al., 2015))

Kancerske matične ćelije, pluripotentne ćelije u tumoru koje imaju svojstva samoobnavljanja, inicijacije tumora, migracije i metastaze (Simple et al., 2015) imaju posebnu ulogu u pojavi polja kancerizacije. Poreklo ovih ćelija objašnjava se kroz tri različita modela (Slika 1.4). Prvi model predviđa da normalna matična ćelija specifična za tkivo, prolazi kroz nekoliko genetičkih i epigenetičkih promena, što dovodi do pojave KMC (Feller et al., 2013). Normalne i kancerske matične ćelije dele sposobnost samoobnavljanja, a poremećaj procesa samoobnavljanja je značajan događaj u tumorogenezi. Molekularni putevi uključeni u samoobnavljanje podrazumevaju Wnt, Notch i Hedgehog signalne puteve. Aktivacija Notch i Hedgehog puta povećava samoobnavljanje u hematopoetskim matičnim ćelijama u leukemijama (Cabanillas and Llorente, 2009) a ti putevi su aktivirani i u drugim malignitetima (Karhadkar et al.,

2004; Olsen et al., 2004). Ovaj model objašnjava i činjenicu da normalne i kancerske matične ćelije dele osobinu kao što je rezistencija na lekove, mada se u svojoj deregulisanoj proliferativnoj sposobnosti, invaziji i metastatskim svojstvima razlikuju (Bhardwaj et al., 2001; Varnum-Finney et al., 2000). Drugi model objašnjava poreklo KMĆ ili njenih prekursora iz normalnih matičnih ćelija koje su u procesu diferencijacije stekle kancerski fenotip (Bjerkvig et al., 2005; Feller et al., 2013; González-Moles et al., 2013) (Slika 1.4).

Treći model navodi da KMĆ nastaju iz tumorskih ćelija usled de-diferencijacije putem modifikacija signalnih puteva i regulatornih mehanizama (Di Fiore et al., 2014; Herreros-Villanueva et al., 2013; Kumar et al., 2012; Moon et al., 2011). Pored toga, de-diferencijacija zrelih normalnih ćelija oralnog epitela predstavlja takođe moguće poreklo KMĆ (Bjerkvig et al., 2005; Feller et al., 2013; González-Moles et al., 2013). Diferencirane ćelije moraju biti programirane da bi stekle karakteristike matičnih ćelija. Reprogramiranje ćelije je moguće samo moćnim regulatorima transkripcije (Abollo-Jiménez et al., 2010). Četiri transkripciona faktora doprinose reprogramiranju u onkogenezi, a to su c-Myc, Oct-4, Sox2 i Klf-4 (Huangfu et al., 2008; Iglesias-Linares et al., 2010). Pokazano je da inhibitori histon deacetilaze mogu zameniti c-Myc u reprogramiranju, doprinoseći supresiji ekspresije gena diferencirane ćelije. Transkripcioni faktori Oct-4, Sox2 i Klf-4 uključeni su u reprogramiranje u kasnijoj fazi.

Nezavisno od njihovog porekla, KMĆ imaju sposobnost da iniciraju i održavaju razvoj tumora i ćelijske migracije; osobine koje podržavaju stav da su KMĆ verovatno odgovorne ćelije za stvaranje polja kancerizacije (Simple et al., 2015).

### **2.3 Markeri kancerskih matičnih ćelija**

Mnogi markeri su korišćeni za identifikuju KMĆ u epitelnim tumorima (Tabela 1.6). Pokazano je da samo jedan površinski marker za identifikaciju KMĆ u OPK nije dovoljan. Među najpouzdanije markere kancerskih matičnih ćelija spadaju CD133, CD44 i ALDH1. Najpoznatiji marker korišćen za izolaciju i karakterizaciju KMĆ oralnog planocelularnog karcinoma je CD44 (Joshua et al., 2012; Prince et al., 2007).

Tabela 1.6. Markeri KMĆ (preuzeto i modifikovano:(Simple et al., 2015))

Tip markera	Marker	Povezanost sa KMĆ	Uloga u polju kancerizacije	Detektovanje u marginama
Markeri pluripotenti	Oct-4	marker KMĆ u OPK; povezuje se sa prognozom	dediferencijacija tumorskih/zrelih ćelija	+
	Sox2	reguliše osobine KMĆ pankreasa	dediferencijacija tumorskih/zrelih ćelija; inicijacija tumora	+
	Nanog	ima ulogu u stvaranju KMĆ kod GBM	dediferencijacija tumorskih/zrelih ćelija	-
Nosači lekova	ABCG2	marker matičnosti koji učestvuje u rezistenciji OPK; ABCG2 <sup>+</sup> ćelije povećavaju tumorsku inicijaciju	inicijacija tumora/rezistencija na lekove	-
Molekuli adhezije	CD44	marker KMĆ u OPK	inicijacija tumora	+
	CD133	marker KMĆ mozga, prostate i OPK	inicijacija tumora	-
EMT markeri	E-kadherin	marker EMT I KMĆ	epitelijalna migracija	+
	Snail	održava samoobnavljanje KMĆ	inicijacija tumora/migracija	+

### *CD44*

CD44 je najpoznatiji marker KMC koji je ranije bio identifikovan u različitim malignitetima kao što su karcinomi dojke, centralnog nervnog sistema, kolona, prostate i pankreasa (Mishra and Verma, 2010). CD44<sup>+</sup> subpopulacija ćelija OPK pokazuje izraženi tumorigeni potencijal, sposobnost formiranja tumorskih sferoida i otpornost prema citostaticima (Prince et al., 2007). CD44 ekspresija je u tumorima negativno korelisana sa petogodišnjim preživljavanjem pacijenata, dok su njegovi visoki nivoi zajedno sa ALDH i fosforilanim STAT3 korelisali sa OPK visokog gradusa što je u skladu sa prethodnim nalazima u karcinomu urotela (Keymoosi et al., 2014).

Uprkos tome što se CD44 marker može naći i u normalnim ćelijama, njegovo prisustvo u tumorskim ćelijama tim ćelijama daje osobine matičnosti i čini ih inicijatorima tumora. Međutim njegova uloga u OPK mora biti dodatno validirana (Chikamatsu et al., 2011).

### *CD133*

CD 133 (prominin-1) je marker KMC koji se sreće u epitelnim ćelijama i u somatskim matičnim ćelijama neuronskih tkiva, prostate, bubrega, kolorektuma, jetre, kože i pluća (Chikamatsu et al., 2011). U OPK, CD133<sup>+</sup> ćelije pokazuju povećanje klonogenog potencijala, EMT fenotip, sposobnost formiranja sferoida, samoonovljivost i druge karakteristike matičnosti (Wu and Wu, 2009).

Veći nivo CD133, povezan je sa CD44<sup>+</sup> ekspresijom u OPK kao i sa Bmi1 indukovanom proliferacijom u laringealnim karcinomima (Sun and Wang, 2011). Zapravo, pozitivna korelacija Oct-4 i Nanog sa povećanom ekspresijom CD133 pokazuje lošiju prognozu kod pacijenata sa oralnim karcinomom (Chiou et al., 2008). Međutim, dalja istraživanja su neophodna da bi se razjasnile određene nekonzistentnost kao što je slično ponašanje tumora iniciranih od strane CD133<sup>+</sup> i CD 133<sup>-</sup> populacija (Shmelkov et al., 2005). CD133 može poslužiti kao korisni KMC marker u oralnom kanceru da bi se identifikovali pacijenti koji su otporni na konvencionalnu hemoterapiju.

### *Oct-4, Sox2 i Nanog*

Transkripcioni faktori Oct-4, Nanog i Sox2 igraju ključnu ulogu u održavanju pluripotentnosti i samoobnavljanja embrionalnih matičnih ćelija interakcijom sa drugim transkripcionim faktorima (STAT3, Hes, Ks1, Zic3) i ćelijskim signalnim molekulima (TCF3, FGF2, LEFTI2).

Ekspresija Oct-4 i Nanog gena u KMĆ-obogaćenim subpopulacijama koje su izolovane iz OPK sfera, u pozitivnoj je korelaciji sa neuspehom lečenja, dok je negativno korelisana sa statusom diferentovanosti tumora (Tsai et al., 2014; Vaiphei et al., 2014). Ustanovljeno je da Oct-4 kompetentno reguliše ALDH1<sup>+</sup> ćelije OPK, dok je u kombinaciji sa TRA1-60 otkriven kao pokazatelj invazivnosti. Pored toga, pokazano je da OPK pacijenti koji pokazuju trostruko pozitivnu ekspresiju Oct-4, Nanog i CD133 imaju najgoru prognozu, što ukazuje na njihovu korisnost u predikciji lečenja (Chiou et al., 2008). Sox2 pokazuje povišenu ekspresiju posebno u skvamocelularnom karcinomu pluća i jednjaka, ali ne u adenokarcinomima plućima ili esophagusa (Bass et al., 2009).

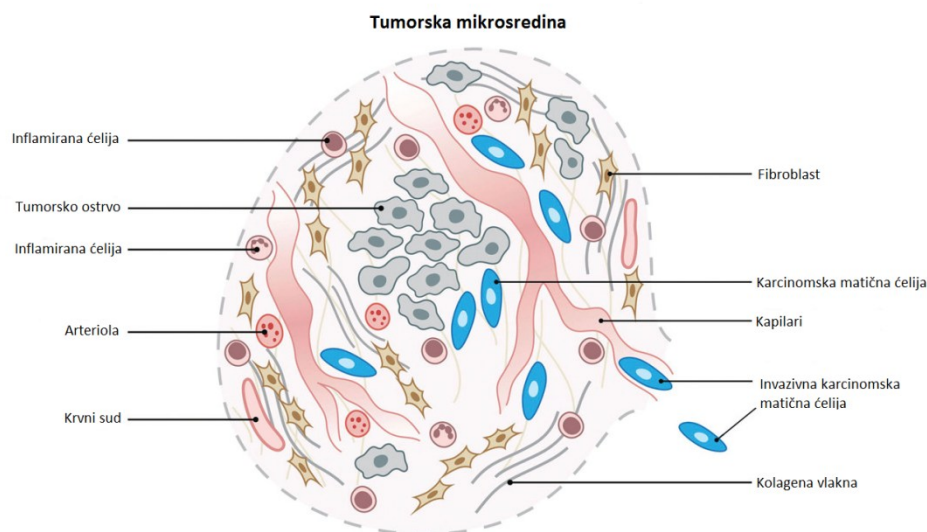
Kolektivno, ovi podaci ukazuju na to da ćelije koje pokazuju matične osobine u karcinomu ekspimiraju transkripcione faktore Oct-4, Sox2 i Nanog (Rawal et al., 2014).

## **2.4 Identifikacija i karakterizacija karcinomskih matičnih ćelija**

Identifikacija, izolacija i karakterizacija matičnih ćelija karcinoma predstavlja veliki eksperimentalni izazov. Istraživači pokušavaju da izoluju ove ćelije identifikacijom osobina koje razlikuju KMĆ od njihovih diferentovanih potomaka i od tkivnih matičnih ćelija (Tabela 1.7) (Albers et al., 2012).

Tabela 1.7. Poređenje osobina KMĆ i tkivnih matičnih ćelija (preuzeto i modifikovano: (Albers et al., 2012))

	<b>Kancerske matične ćelije</b>	<b>Tkivne matične ćelije</b>
Regulacija rasta	Neograničeno samo-obnavljanje Dovoljne za sopstveni rast	Neograničeno samo-obnavljanje Kontrolisane homeostazom
	Neosetljive na faktore rasta Nije poznato zbog čega čine mali % populacije ćelija	Osetljive na faktore rasta
Uloga	Održavaju i stvaraju heterogene tumore usled asimetrične deobe	Stvaraju i održavaju tkiva i organe usled asimetrične deobe i determinisane diferencijacije
Osobine tkiva/tumora	Stvaraju tumorsku masu koja se karakteriše: hijerarhijom, limitiranom deobom ćelija, različitim stadijumima diferentovanosti, starenjem i smrću Nemaju fiziološku funkciju Nekontrolisani lokalni rast sa invazijom	Stvaraju tkiva i organe koji se karakterišu hijerarhijom, determinisanom diferencijacijom Imaju fiziološku ulogu Kontrolisani razvoj od strane internih i eksternih signala
Lokalizacija	Stacionarne KMĆu svojim specifičnim nišama (Slika 1.5) Migratorne, metastatske KMĆ sposobne za EMT i MET	Stacionarne



Slika 1.5. Specifična niša-mikrosredina oralnog planocelularnog karcinoma (preuzeto i modificirano:(Krishnamurthy and Nör, 2012))

Sposobnost ćelija da aktivno ispumpavaju boje poput Hoechst 33342 od ATP-veznog kasetnog transportera (ABC), takođe se koristi za identifikaciju KMC. Pošto matične ćelije i matične ćelije raka mogu ostati mirne u dugim vremenskim periodima, Hoechst 33342 boja se koristi za identifikaciju putujućih matičnih ćelija karcinoma. Pokazano je da se klonogenost i tumorigeni potencijal povećavaju u OPK (Zhang et al., 2009).

Aldehid dehidrogenaza (ALDH) je intracelularni enzim koji je uključen u pretvaranje retinola u retinoičnu kiselinu (Sobreira et al., 2010). ALDH<sup>+</sup> ćelije su identifikovane u karcinomu dojke i mozga (Ginestier et al., 2007; Rasper et al., 2010). U ovim tumorima, ALDH<sup>+</sup> ćelije su okarakterisane kao visoko tumorigene ćelije koje se mogu samo-obnavljati, što su obeležja KMC. U OPK, ALDH pozitivne matične ćelije raka su uključene i u proces EMT (Chen et al., 2009). Nedavno istraživanje je pokazalo da 13 (od 15) implantacija 1000 ALDH<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> ćelija sortiranih iz primarnih OPK, i samo 2 (od 15) implantacija 10.000 ALDH<sup>-</sup>/CD44<sup>-</sup> ćelija generiše tumore (Krishnamurthy et al., 2010). Slično ovim rezultatima, Clai i saradnici su utvrdili da je čak 500 ALDH<sup>+</sup> ćelija moglo da stvori tumore, za razliku od ALDH<sup>-</sup> ćelija (Clay et al., 2010).

Jedan od najvećih izazova istraživanja matičnih ćelija raka bio je razvoj metoda za njihovu kultivaciju, ekspanziju i analizu *in vitro*. Metoda obogaćivanja



matičnih ćelija karcinoma formiranjem sfera u uslovima kulture u uslovima niske adherencije je predložena i korišćena u različitim modelima raka kao što su rak dojke, nervnog sistema i prostate (Dontu et al., 2003) i prilagođeni su za OPK (Krishnamurthy et al., 2010). U ovom slučaju, potencijalne matične ćelije raka glave i vrata se kultivišu na neadherentnoj podlozi. Matične ćelije raka rastu u suspenziji i formiraju nezavisne sfere ili kolonije. ALDH<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> ćelije sortirane od ćelijske linije karcinoma glave i vrata i kultivisane u uslovima niske adherentnosti, uspele su da stvore sfere. Ovaj test izveden je iz rada na modelima tumora dojke i mozga ( tzv. mamosfere, neurosfere) i nazvan je "orosphere assay" kako bi se naznačilo da su ove sfere nastale iz primarnih tumora iz oralne šupljine ili iz ćelijskih linija OPK. Uprkos intenzivnim istraživanjima u oblasti biologije matičnih ćelija raka poslednjih godina, razumevanje uticaja matičnih ćelija raka na patologiju OPK je i dalje na prilično niskom nivou. Jedan od razloga za to je potreba za izvođenjem studija sa primarnim uzorcima OPK, koje je teško dobiti. Još uvek postoji kontroverza o postojanju karcinoma matičnih ćelija u ćelijskim linijama, uprkos činjenici da su ih nezavisni izveštaji detaljno opisali (Harper et al., 2007; Locke et al., 2005). Pored toga, često se sprovodi ekspanzija matičnih ćelija karcinoma *in vivo*, što je dugotrajno i skupo. Međutim, postojeće *in vitro* metode nude ograničeni kapacitet za kultivaciju matičnih ćelija raka u nediferentovanom stanju. Postalo je jasno da je razvoj poboljšanih metoda za izolaciju i ekspanziju matičnih ćelija karcinoma glave i vrata važan za razvoj ove oblasti (Krishnamurthy and Nör, 2012).

## 2.5 Epitelno-mezenhimalna tranzicija

Epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) je proces koji ima važnu ulogu u embrionalnom razvoju (Tsai et al., 2014) pri čemu epitelne ćelije gube svoje epitelne karakteristike, menjaju morfologiju i stiču osobine mezenhimalnih ćelija (Tabela 1.8) (Kalluri and Weinberg, 2009). EMT dozvoljava polarizovanoj epitelnoj ćeliji da preuzme mezenhimski fenotip, koji se karakteriše povećanom pokretljivošću i invazivnošću (Kalluri and Weinberg, 2009). Iako je EMT neophodna za normalno razviće, aberantna aktivacija EMT može da izazove različite patološke pojave, uključujući fibrozu i napredovanje karcinoma (Baum et al., 2008; Turley et al., 2008).

Novije studije pokazuju da diferencirane tumorske ćelije mogu da ubrzaju nastanak KMĆ pomoću procesa epitelno-mezenhimalna tranzicije. EMT je uključena u

proces tokom kog diferencirane ćelije dobijaju svojstva matičnih, što je dokazano u karcinomu dojke, nazofarinksa i usne duplje (Morel et al., 2008; Park et al., 2004; Valk-Lingbeek et al., 2004; Xia et al., 2010). Teorija EMT doprinosi objašnjenju invazivnog i metastatskog rasta mnogih tipova maligniteta.

Monoklonalna teorija polja kancerizacije u oralnoj mukozi zahteva migraciju transformisanih ćelija pod dejstvom EMT u susednu, zdravu mukozu u cilju razvoja neoplastičnog polja. Studije na karcinomu dojke su pokazale da ćelije sa svojstvima EMT i migracije stiču karakteristike KMĆ-a. Takođe, poznato je da Oct-4 indukuje karakteristike KMĆ u oralnom epitelu kroz inicijaciju EMT (Tsai et al., 2014). Dve subpopulacije KMĆ su identifikovane u OPK: migrirajuće (CD44<sup>+</sup>/ESA<sup>-</sup>) i nemigrirajuće (CD44<sup>+</sup>/ESA<sup>+</sup>) (Biddle et al., 2011). KMĆ sa intraepitelnim migracionim sposobnostima su najverovatniji kandidati za izazivanje procesa kancerizacije polja oralne mukoze (Simple et al., 2015).

Tabela 1.8. Osobine epitelnih i mezenhimalnih ćelija (preuzeto i modifikovano:(Rawal et al., 2014))

	<b>Epitelne ćelije</b>	<b>Mezenhimalne ćelije</b>
<b>Morfološke osobine</b>	poligonalne polarizovane	izdužene nepolarizovane
<b>Biološko ponašanje</b>	nepokretne ne-invazivne	pokretljive invazivne
<b>Molekularni markeri</b>	E-kadherin dezmozoplakin citokeratin	vimentin N-kadherin SNAIL, SLUG, αSMA

Tokom progresije karcinoma, EMT pruža ćelijama karcinoma sposobnost infiltriranja u okolno tkivo i na kraju metastaziranja do udaljenih mesta (Thiery, 2002). Kod karcinoma pankreasa, istraživači su pronašli dve različite populacije KMĆ: jedna koja je zadužena za održavanje primarnog tumora i druga koja proizvodi metastaze (Hermann et al., 2007). Takođe je pokazano da ne-EMT ćelije nisu sposobne da metastaziraju bez delovanja EMT ćelija (Hermann et al., 2007; Tsuji et al., 2008).

Postavlja se pitanje da li metastatske ćelije koje se šire iz primarnog tumora potiču iz rezidualnih matičnih ćelija u tumoru ili dolaze iz somatskih tumorskih ćelija koje su podvrgnute EMT. Nakon što migrirajuće KMĆ dođu do svog odredišta, mogu se

podvrgnuti reverznoj EMT, tj. mezenhimsko-epitelnoj tranziciji (MET) (Radisky and LaBarge, 2008).

Ćelije u procesu EMT pokazuju niske ili nedetektabilne nivoe epitelnih markera E-kaderina i  $\beta$ -katenina i visoke nivoe mezenhimskih – vimentina, fibronektina i  $\alpha$ SMA (Morel et al., 2008). Kong i sar. su otkrili da ćelije raka prostate sa EMT fenotipom pokazuju karakteristike KMĆ sa povećanjem ekspresije Sox2, Nanog, Oct-4, Lin28B i/ili Notch1, kao i porastom klonogene sposobnosti i sposobnosti stvaranja sfera (prostasfere) (Kong et al., 2009).

Za OPK je nedavno pokazano da prekomerna ekspresija receptora tirozin kinaze- TrkB dovodi do promene ekspresije molekularnih medijatora EMT, uključujući promene u regulaciju E-kadherina i Twist-a (Kupferman et al., 2010).

Smatra se da je jedan od bitnih događaja u EMT upravo gubitak E-kadherina i da je taj gubitak u direktnoj korelaciji sa progresijom tumora. Još pre dvadeset godina je pokazano da gubitak E-kadherina vodi progresiji papiloma u invazivni planocelularni karcinom (Peri et al., 1998). Regulisan je nizom transkripcionih faktora a među najvažnijima su SNAIL, Twist, (Batlle et al., 2000) i ZEB1 (Sánchez-Tilló et al., 2010). Faktor transkripcije SNAIL kontroliše EMT tako što blokira ekspresiju E-kadherina (Cano et al., 2000). Povećana ekspresija Twist-a je registrovana u metastatskom karcinomu dojke i neophodna je za EMT (Li et al., 2014). Kod karcinoma glave i vrata, Twist1 indukuje Bmi-1, koji smanjuje nivo ekspresije E-kadherina. Bmi-1 ima suštinsku ulogu u regulisanju samoobnovljavanja matičnih ćelija (Valk-Lingbeek et al., 2004). Pacijenti sa oralnim karcinomom koji imaju visoke nivoe Twist1 i Bmi-1 su oni sa najlošijom prognozom (Yang et al., 2010).

Posebno je važno napomenuti da tumori koji prolaze kroz EMT stiču otpornost na hemoterapiju (Cheng et al., 2007; Li et al. 2009). Twist posreduje u EMT u ćelijama karcinoma dojke i povećava otpornost na paklitaksel (Cheng et al., 2007). Epitelne ćelijske linije karcinoma debelog creva koje ispoljavaju EMT markere pokazuju mezenhimsku morfologiju i otpornost na oksaliplatin (Virag et al., 2013). Ovi podaci potvrđuju da sticanje mezenhimskog fenotipa koreliše sa povećanom invazivnošću tumorskih ćelija, što dovodi do recidiva ili pojave metastaza i loše kliničke prognoze.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Polazna hipoteza je da:

(a) u tkivu tumora, a potencijalno i u tkivu tumorske margine, postoje ćelije odgovorne za inicijaciju i održavanje tumora, odnosno kancerske matične ćelije; (b) da ćelijske populacije u tumorima i tumorskim marginama pokazuju sličnosti u pogledu nekih bitnih bioloških karakteristika kao što su stepen diferencijacije, kapacitet proliferacije i migracije i samoobnavljanja

### **Ciljevi:**

1. Optimizacija uslova ćelijske izolacije, kultivacije i propagacije, odnosno generisanje primarnih kultura ćelija iz oralnog planocelularnog karcinoma i tkiva margine poreklom od istog pacijenta

2. Fenotipska karakterizacija ćelija tumora i margina u kulturi tokom pasaža, sledećim pristupima:

- određivanjem prisustva markera kancerske matičnosti, upotrebom protočne citometrije (CD44, CD90, CD73),

- analizom matičnosti preko ekspresije odgovarajućih ćelijskih markera (CD44, CD133, Oct-4, Sox2, Nanog) metodom *real-time* PCR-a i imunocitohemijski (CD44)

- određivanjem biohemijskog sadržaja ćelija upotrebom Raman spektroskopije

- određivanjem klonogenog, proliferativnog i migratornog potencijala izolovanih ćelija primenom istoimenih testova

3. Ispitivanje markera epitelno-mezenhimske tranzicije kancerskih ćelija primenom sledećih metoda:

- imunohistohemijski (Vimentin, αSMA, SNAIL, SLUG )

- *real-time* PCR metodom (N-kadherin, E-kadherin, Vimentin, αSMA, SNAIL, SLUG),

4. Određivanje stepena rezistentnosti / senzitivnosti ćelija u kulturi na antineoplastične agense

### **3. MATERIЈAL I METODE**

### 3.1 Pacijenti

Ovo istraživanje je podrazumevalo izolaciju ćelija iz uzoraka oralnih planocelularnih karcinoma i tkiva tumorskih margina pacijenata operisanih na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Margine tumora su uzete 5 mm od ivica tumora (Slika 3.1). Margine su potvrđene kao histološki negativne tj. bez prisustva neoplastičnih ćelija (Jelovac et al., 2016). Histopatološka analiza rađena je u saglasnosti sa smernicama Svetske zdravstvene organizacije, preparati su bojeni standardnim H&E bojenjem. Ova studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta (broj 36/31). Svi pacijenti su bili obavješteni o studiji i svi su potpisali formular za pisanu saglasnost. Ukupno je generisano 12 primarnih ćelijskih kultura poreklom od šest pacijenata. Kliničke i epidemiološke karakteristike pacijenata date su u Tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Karakteristike pacijenata

Pacijent	Pol	Godine u trenutku operacije	TNM klasifikacija *	Lokalizacija tumora	Pojava recidiva	Veličina (cm)	Upotreba alkohola	Upotreba duvana
#1	Ženski	56	T4N2M0	Pod usne duplje	Da	4 × 2	Ne	Da
#2	Muški	65	T2N0M0	Pod usne duplje	Ne	4 × 2	Da	Da
#3	Ženski	65	T2N0M0	Jezik	Ne	3 × 2	Ne	Da
#4	Muški	71	T2N0M0	Jezik	Ne	2 × 2	Da	Da
#5	Muški	55	T2N0M0	Pod usne duplje	Ne	2 × 2,5	Ne	Da
#6	Muški	45	T1N0M0	Jezik	Ne	2 × 1	Ne	Da

\*( Deschler et al., 2014 )

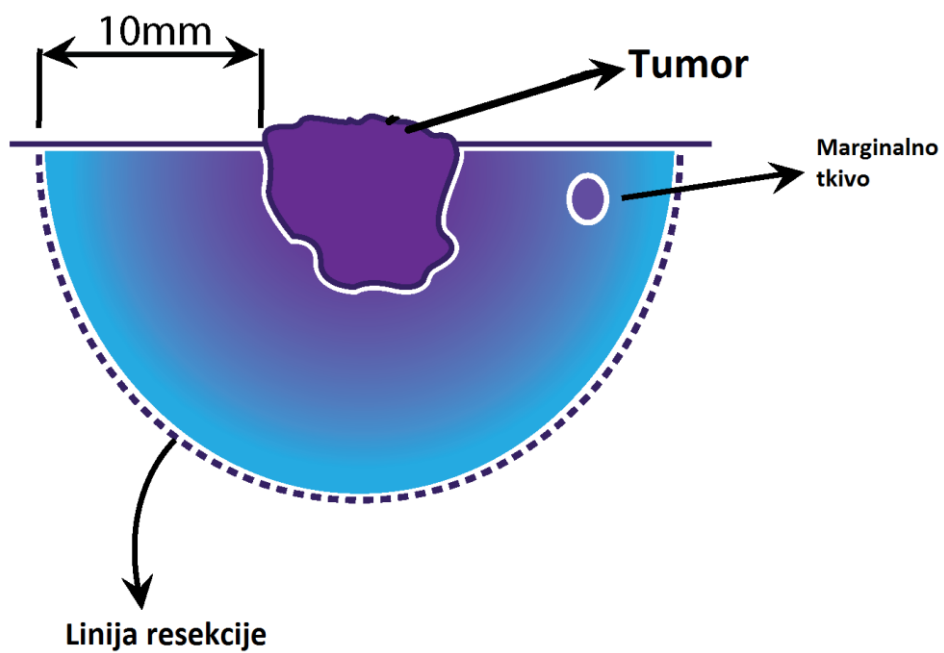
### 3.2 Čelijske kulture

Tumor i margina tkiva šest pacijenata sa dijagnozom OPK su odmah nakon operacije transportovani do Laboratorije za čelijske kulture Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Dulbekov Modifikovani "Eagle" Medijum (DMEM) sa 20% fetalnog goveđeg seruma (FBS) i 100 U/ml penicilina i 100mg/ml streptomicina (AB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) je korišćen kao medijum za transportovanje uzoraka tkiva. Uzorci tkiva su sečeni skalpelom do dimenzija od 1 mm<sup>3</sup> i zasejavani eksplant metodom (Mitra et al., 2013) sa periodičnim uklanjanjem fibroblasta (Jones, 2008) (Slika 3.2). Zatim su ćelije gajene u DMEM-u sa dodatkom 10% FBS i AB, u T75 bocama za čelijske kulture, na 37 °C u atmosferi koja sadrži 5% CO<sub>2</sub>. Medijum je menjan svakih 2-3 dana, a ćelije su pasažirane (Tabela 3.2) neposredno pre postizanja konfluentnosti od 80%. 5 x 10<sup>5</sup> ćelija je korišćeno za sledeću pasažu. U eksperimentima je kao pozitivna kontrola, korišćena čelijska linija oralnog planocelularnog karcinoma jezika SCC-25 (ATCC® CRL-1628™). Ove ćelije su gajene u 1:1 kombinaciji DMEMa i Ham-ovog F12 medijuma (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD) sa 10% FBS, AB i 400 ng/mL hidrokortizona (Sigma-Aldrich). Fibroblasti gingive zdravog pacijenta su korišćeni kao negativna kontrola. Gajeni su u istim uslovima kao tumorske i marginalne primarne kulture.

Mnoge adherentne čelijske kulture prestaju da proliferišu kada postanu konfluentne (tj. kada potpuno pokriju površinu posude za čelijsku kulturu), a neke će umreti ako su predugo u konfluentnom stanju. Suspenzija ćelija će vrlo brzo iscrpeti medijum za kultivaciju nakon što gustina ćelija postane previsoka, tako da ove kulture zahtevaju redovno pasažiranje. Drugim rečima, dok su ćelije još subkonfluentne, određeni broj ćelija se mora prebaciti u novu bocu za kulturu. Iako su pasaže neophodne da bi se održale čelijske kulture, postupak je relativno stresan za adherentne ćelije jer moraju da prođu kroz postupak tripsinizacije.

U ovoj studiji korišćene su tumorske (Tu) i marginalne (M) ćelije prve (P1) i pete (P5) pasaže.





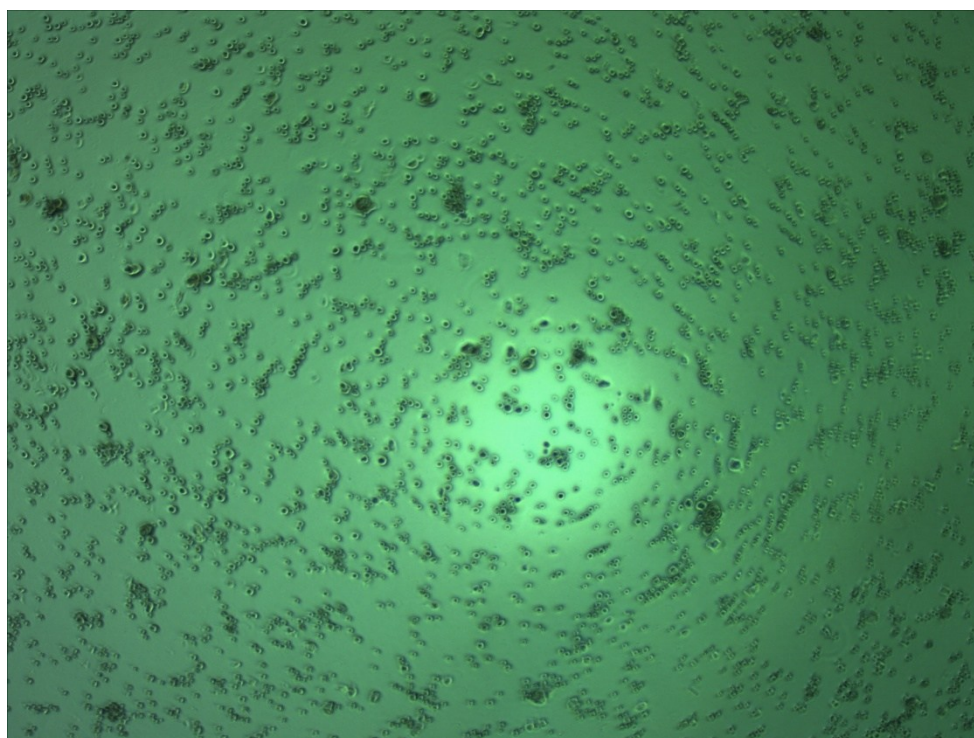
Slika 3.1. Šematski prikaz mesta uzimanja tumorskog i marginalnog tkiva za dalje analize

Tabela 3.2. Postupak pasaže ćelija

- 
1. Zagrijati TrypLE™ (tripsin i EDTA) i kompletni medijum na 37°C (za većinu ćelija TrypLE™ može biti zagrejan i na sobnoj temperaturi).
  2. Aspirirati medijum iz boce i odbaciti.
  3. Isprati ćelije sa 5 ml DPBS koji ne sadrži magnezijum i kalcijum. Aspirirati i odbaciti DPBS.
  4. Dodati odgovarajuću količinu TrypLE™ u bocu (3ml za T75 bocu) tako da pokrije sve ćelije.
  5. Inkubirati na 37°C dok se ćelije ne odlepe (obično 8-10 minuta). Posmatrati ćelije pod invertnim mikroskopom kako bi se uverili da su se sve ćelije odlepile (Slika 3.3). Po potrebi lagano udarati o ivicu flaska kako bi se ćelije odlepile, a agregati razbili.
  6. Dodati 5-10 ml prethodno zagrejanog kompletnog medijuma u bocu. Laganim nakretanjem flaska obezbediti da sve ćelije budu prekrivene medijumom.
  7. Prebaciti ćelijsku suspenziju u epruvetu od 15 ml.
  8. Centrifugirati na  $100 \times g$  u trajanju od 5-10 minuta.
  9. Odbaciti supernatant i resuspendovati pelet u 2-5 ml prethodno zagrejanog kompletnog medijuma.
  10. Odrediti gustinu i broj ćelija.
  11. Zasejati i inkubirati  $5 \times 10^5$  ćelija.
-



Slika 3.2. Proces (A) transportovanja, (B) usitnjavanja, (C) zasejavanja ćelija



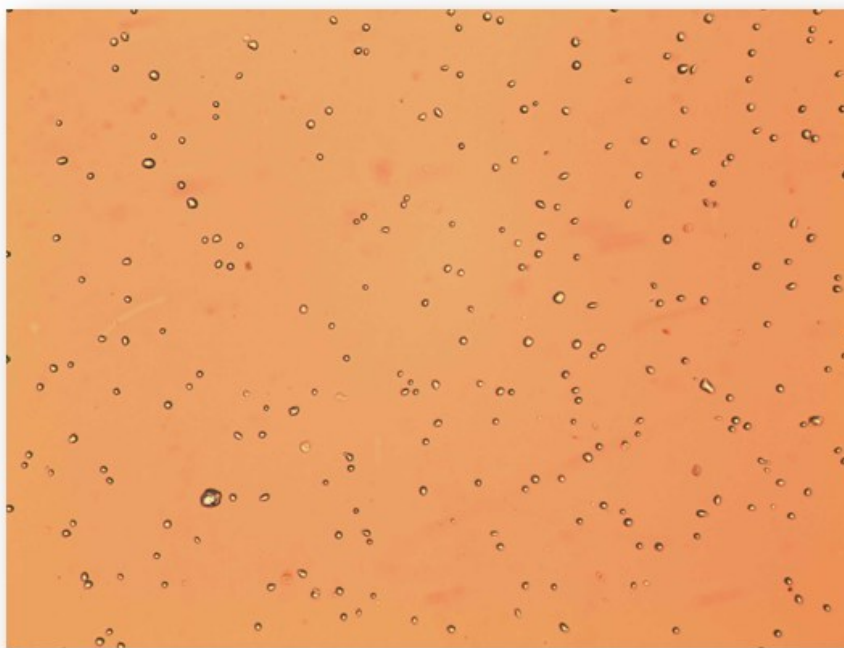
Slika 3.3. Izgled ćelija nakon dejstva TrypLE™ u trajanju od 10 minuta

### 3.3 Određivanje broja i morfologije ćelija tokom pasaža

Neposredno pre pasaže, ukupan broj ćelija, broj živih i mrtvih ćelija, vijabilnost i prosečna veličina živih i mrtvih ćelija bile su određivane pomoću Countess™ Automated Cell Counter-a (Tabela 3.3). Countess™ Automated Cell Counter koristi posebno dizajniranu mikroskopsku pločicu sa dve komore u koje se naliva suspenzija ćelija prethodno obojena supravitalnom bojom (Tripin plavo). Tripin plavo nam omogućava da napravimo razliku između živih i mrtvih ćelija jer prolazi kroz membranu mrtvih ćelija i boji ih u plavo. Žive ćelije će ostati transparentne (Slika 3.4).

Tabela 3.3. Protokol brojanja ćelija

- 
1. U posebnoj tubici pomešati 20  $\mu$ l ćelijske suspenzije i 20  $\mu$ l boje Tripin plavo;
  2. Naliti ćelijsku suspenziju u komoru mikroskopske pločice;
  3. Ubaciti mikroskopsku pločicu u Countess™ Automated Cell Counter;
  4. Očitati dobijene vrednosti.
- 



Slika 3.4. Izgled ćelija prilikom brojanja Countess™ Automated Cell Counter-om

### 3.4 Protočna citometrija

Ćelije tumora i margine ( $7 \times 10^5$  ćelija po tubi) su tri puta isprane PBS-om, obeležene sledećim monoklonskim antitelima konjugovanim sa odgovarajućim fluorescentnim bojama: CD44-APC (Exbio, Prag, Češka Republika), CD90-FITC (Life Technologies, CA, USA), CD73-PB (Sony Biotechnology, CA, SAD), CD34-FITC (Sony Biotechnology, CA, USA) i fiksirane 2% formaldehidom (Tabela 3.6). Sledećeg dana ćelije su analizirane pomoću protočnog citometra (Partec, Munster, Nemačka). Kao kontrola, korišćene su ćelije bez antitela. Analiza je urađena uz pomoć CyFlow Space (Sysmex Partec, Goerlitz, Nemačka) softvera.

Tabela 3.6. Postupak pripreme ćelija za protočnu citometriju

- 
1. Aspirirati i odstraniti medijum u kome su ćelije gajene;
  2. Odvojiti ćelije (po  $10^6$ ) u tubu zapremine 15 ml, odstraniti supernatant i resuspendovati u 2 ml 10% FBS u PBS-u;
  3. Izdvojiti  $10^6$  ćelija za kalibraciju i po  $10^6$  ćelija za svaku kombinaciju antitela;
  4. Pre upotrebe tubice sa antitelima kratko centrifugirati a zatim antitela lagano resuspendovati. Sa antitelima raditi u mraku!
  5. Dodati antitelo po preporukama proizvođača;
  6. Inkubirati 45 min na  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ;
  7. Centrifugirati na 2700 obrtaja u trajanju od 5 min. na  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ;
  8. Odliti supernatant;
  9. Dodati 1 ml hladnog PBS-a i resuspendovati;
  10. Centrifugirati na 2700 obrtaja u trajanju od 5 min. na  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ;
  11. Odliti supernatant;
  12. Dodati 1 ml hladnog PBS-a i resuspendovati;
  13. Centrifugirati na 2700 obrtaja u trajanju od 5 min. na  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ;
  14. Odliti supernatant, dodati 1 ml 2% formaldehida i inkubirati na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 min;
  15. 13. Centrifugirati na 2700 obrtaja u trajanju od 5 min. na  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ;
  16. Odliti supernatant;
  17. Resuspendovati ćelije u 0,2 ml hladnog PBS-a;
  18. Čuvati ćelije na hladnom ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) do analize.
-

### 3.5 Izolacija RNK radi ispitivanja genske ekspresije

Ukupna RNK je ekstrahovana iz ćelija ( $10^6$  ćelija po tubi) koristeći TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) (Tabela 3.4). Komplementarna DNK je pripremljena pomoću kompletnog cDNA Synthesis Kit-a (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) u skladu sa uputstvima proizvođača. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu odnosno *real time* qPCR analiza rađena je na Gene-K uređaju (Bioer, Kina), koristeći Maxima™ SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Sekvence korišćenih prajmera (5'→3') su prikazane u Tabeli 3.5. GAPDH je korišćen za normalizaciju,  $\Delta\Delta C_t$  metoda za relativnu kvantifikaciju ekspresije gena (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabela 3.4. Postupak izolacije RNK iz ćelijske kulture za ispitivanje genske ekspresije

- 
1. Aspirirati i odstraniti medijum u kome su ćelije gajene;
  2. Odvojiti ćelije ( $10^6$ ) u tubu zapremine 15ml, odstraniti supernatant;
  3. Dodati 1 ml TRIzol® Reagent-a;
  4. Lizirati ćelije resuspendovanjem;
  5. Inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi a zatim prebaciti suspenziju u tubicu zapremine 2ml;
  6. Dodati 0,2 ml hloroforma;
  7. Jako mućkati u ruci 15 sekundi;
  8. Centrifugirati uzorak na  $12000 \times g$  u trajanju od 15 minuta na  $+4^\circ C$ . Nakon centrifugiranja jasno se odvajaju tri faze, donja-crvena, fenol-hloroformska, središnja i gornja koja je bezbojna. Gornja faza čini oko 50% ukupne zapremine;
  9. Pažljivo aspirirati i prebaciti vodenu fazu u novu tubicu;
  10. Dodati 0,5 ml izopropanola;
  11. Inkubirati na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta;
  12. Centrifugirati na  $12000 \times g$  u trajanju od 10 minuta na  $+4^\circ C$ ;
  13. Aspirirati i odstraniti supernatant;
  14. Isprati pelet sa 1 ml 75% etanola;
-

- 
15. Lagano vorteksovati uzorak, a zatim centrifugirati na  $7500 \times g$  5 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$ ;
  16. Aspirirati i odstraniti supernatant;
  17. Ostaviti otvorene tubice 10 minuta na sobnoj temperaturi;
  18. Resuspendovati pelet u vodi bez RNA-za ili u 20-50  $\mu\text{l}$  0,5% SDS-a;
  19. Inkubirati u vodenom kupatilu na  $55-60^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 10-15 minuta;
  20. Nastaviti dalje sa analizom ili čuvati uzorak na  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- 

Tabela 3.5. Spisak prajmera korišćenih u studiji

<b>CD44</b>	forward AAACGAGGACCTTCATCCCAGTGA reverse ATTCCTGAGACTTGCTG GCCTCT
<b>CD133</b>	forward ACTTGGCTCAGACTGGTAAA reverse GTTCTGAGCAAATCCAGAG
<b>Oct-4</b>	forward GTGGAGAGCAACTCCGATG reverse TGCTCCAGCTTCTCCTTCTC
<b>Sox2</b>	forward GACTTCACATGTCCCAGCACTA reverse CTCTTTTGCACCCCTCCCATT
<b>Nanog</b>	forward ATTCAGGACAGCCCTGATTCTTC reverse TTTTTCGCACTCTTCTCT GC
<b>E-kadherin</b>	forward GTCAGTTCAGACTCCAGCCC reverse AAATTCACTCTGCCAGGA CG
<b>N-kadherin</b>	forward AGGGTGGACGTCATTGTAGC reverse CTGTTGGGGTCTGTCAGG AT
<b>Vimentin</b>	forward TCTACGAGGAGGAGATGCGG reverse GGTC AAGACGTGCCAGAG AC
<b><math>\alpha</math>SMA</b>	forward CAATGGCTCTGGGCTCTGTAAG reverse TGTTCTATCGGGTACTTCAG GGTC
<b>SNAIL</b>	forward ACCACTATGCCGCGCTCTT reverse GGTCGTAGGGCTGGAA
<b>SLUG</b>	forward TGTTGCAGTGAGGGCAAGAA reverse GACCCTGGTTGCTTCAAGGA
<b>GAPDH</b>	forward TCATGACCACAGTCCATGCCATCA reverse CCCT GTTGCTGTAGCCAAATTCGT

---

### **3.6 Imunocitohemija**

Prisustvo markera KMC<sup>+</sup>, CD44 ispitivan je i imunocitohemijском metodom. Ukratko, ćelije su isprane PBS-om i fiksirane 4% PFA na sobnoj temperaturi. Nakon 15min, ćelije su dva puta isprane PBS-om, a zatim je dodat 0,1% triton X 100 i 3% BSA radi blokiranja i permeabilizacije. 20 $\mu$ l primarnog antitela CD44 je korišćeno za bojenje ćelija. Ploče, obmotane parafilmom, su inkubirane 24h na 4°C. Zatim su ćelije isprane PBS-om 3 puta po 5 min, i na pločicu dodata DAPI boja kojom se boje jedra. Nakon 10 min inkubacije ćelija sa DAPI bojom u mraku, stakalca su ponovo ispirana PBS-om pet puta po pet minuta. Preparacija je završena nanošenjem mowiol-a na predmetnu pločicu. Posle sušenja mowiol-a tokom noći u frižideru, preparati su posmatrani na konfokalnom mikroskopu (Carl Zeiss, Nemačka).

### **3.7 Raman mikro-spektroskopija**

Milion tumorskih ćelija pete pasaže kao i ćelija fibroblasta gingive pete pasaže (kontrola), korišćene su za analizu Raman spektroskopijom. Nakon centrifugiranja (1700 obrtaja/min, 7 min.), ćelijski talog je prebačen na mikroskopsku pločicu sa zlatnim premazom bez fiksacije, u maloj količini vode.

Određivanje ramanskih spektara je vršeno na talasnim dužinama između 400 i 2600 cm<sup>-1</sup> na aparatu Horiba Jobin Yvon Xplora (Horiba Jobin Yvon S.A.S., Villeneuve-d'Ascq, Francuska) sa mikroskopom BX51 (Olympus, Tokio, Japan). Karakteristike merenja su bile sledeće: korišćen je diodni laser sa talasnom dužinom od 785 nm, jačinom 90mW, veličinom fokusa od 2  $\mu$ m a vreme ekspozicije je iznosilo 100s. Ramanski spektar je beležen CCD kamerom (Syncerity, Horiba Scientific, Edison, New Jersey, SAD) koja je bila podešena na 213 K. Analiza spektara (25 po uzorku) je rađena softverom LabSpec 6 (Horiba Jobin Yvon S.A.S., Villeneuve-d'Ascq, Francuska).

### **3.8 Test formiranja sfera (sferoida)**

Ćelije su zasejane u koncentraciji od 10<sup>4</sup> po bunariću u pločama za ćelijske kulture od 24 bunarića koje su prethodno tretirane 1% agaroznim gelom (Slika 3.5) sa



DMEM-om, kako bi se sprečila ćelijska adhezija za plastiku. Nakon zasejavanja, ćelije su inkubirane u DMEM-u sa dodatkom antibiotika, vitamina B27, N2 suplementa, EGF i bFGF (Phung et al., 2011) (Tabela 3.10). Nakon 7 dana inkubacije, broj i prečnik sfera po bunariću su prebrojavani pod mikroskopom (BIB-100 / T, BOECO, Nemačka). Prečnik sfera meren je softverom Scope Image 9.0.



Slika 3.5. Agarozni gel sa DMEM-om koji sprečava adheziju ćelija za plastičnu podlogu

Tabela 3.10. Protokol testa formiranja sfera

- 
1. Napraviti 1% agarozni gel po uputstvu proizvođača;
  2. Dodati 0,5 ml 1% agaroznog gela prethodno zagrejanog na 100 °C po bunariću (*48 well plate*);
  3. Ostaviti u laminarnu ploču kako bi temperatura gela opala;
  4. Dodati 10 000 ćelija u DMEM-u sa dodatkom antibiotika, vitaminom B27, N2 suplementom, EGF i bFGF po bunariću;
  5. Posmatrati i slikati (7. dana) na invertnom mikroskopu razvoj sfera.
-

### 3.9 Test formiranja kolonija

Dve stotine ćelija po bunaru u pločama širine 32 mm su zasejane i kultivisane u 1,5 ml DMEM-a, dopunjene sa 10% FBS i antibioticima tokom 7 i 14 dana. Stvorene kolonije ćelija su zatim isprane PBS-om, fiksirane u 4% formaldehida 5 minuta i obojene 0,05% *Crystal Violet* bojom tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi (Yanamoto et al., 2011). Nakon ispiranja boje, skupine sa više od 50 ćelija su mikroskopski smatrane kolonijama (Tabela 3.7). Broj kolonija je određivan softverom ImageJ (Schneider et al., 2012)

Tabela 3.7. Protokol testa formiranja kolonija

- 
1. Zasejati 200 ćelija u 1,5 ml kompletnog medijuma u Petri šolji prečnika 35 mm, menjati medijum svakog 4. dana, nakon 7/14 dana;
  2. Odliti kompletni medijum;
  3. Isprati 1 ml PBS-a;
  4. Dodati 2 ml formalina, inkubirati 5 min u laminaru;
  5. Odliti formalin i isprati 1 ml PBS-a;
  6. Dodati 1 ml 0,05% *Crystal violet* boje;
  7. Inkubirati u laminaru 30 min;
  8. Odliti boju;
  9. Isprati 2 puta 1 ml PBS-a;
  10. Slikati makroskopski i na invertnom mikroskopu.
-

### 3.10 Test proliferacije ćelija

Ćelije su zasejane na ploči sa 12 bunarića u koncentraciji od  $10^4$  po bunariću u DMEM-u dopunjena sa 10% FBS i AB (Lim et al., 2011) (Tabela 3.8). Ćelije su inkubirane (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), a broj živih ćelija je praćen nakon prvog, trećeg, petog i sedmog dana nakon zasejavanja koristeći Countess™ Automated Cell Counter.

Tabela 3.8. Protokol testa proliferacije ćelija

- 
1. Zasejati 10 000 ćelija u 1,5 ml kompletnog medijuma u pločama sa 12 bunarića, menjati medijum svakog drugog dana, nakon 1/3/5/7 dana:
  2. Izvršiti postupak pasaže ćelija;
  3. Izvršiti postupak automatskog brojanja ćelija.
- 

### 3.11 Test ćelijske migracije

U cilju ispitivanja motiliteta ćelija, primenjen je test migracije. Za ovaj test su korišćene ploče sa 24 bunarića, i zasejano je  $2 \times 10^5$  ćelija po bunariću (Wong et al., 2003). Ćelije su gajene 4-5 dana do uspostavljanja subkonfluentnosti od oko 80%. Nežno i polako, monosloj ćelija je ogreban sterilnom gumom širine 1,2 mm preko centra bunarića, pravolinijski, kako bi se proizveo prazan prostor u ćelijskom monosloju (Tabela 3.9). Nakon toga, bunarići su isprani 3 puta PBS-om i ostavljeni u inkubatoru sa DMEM (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Ćelije su snimljene odmah pa potom nakon 24, 48 i 72 h, pod mikroskopom (BIB-100 / T, BOECO, Nemačka) sa HDCE-90D kamerom (BOECO, Nemačka). Softver Scope Image 9.0 je korišćen za merenje najbližeg rastojanja između ćelija. Brzina migracije je određivana nezavisno u svim vremenskim intervalima sve dok se područje ogrebotine nije zatvorilo (72h).

Tabela 3.9. Protokol testa ćelijske migracije

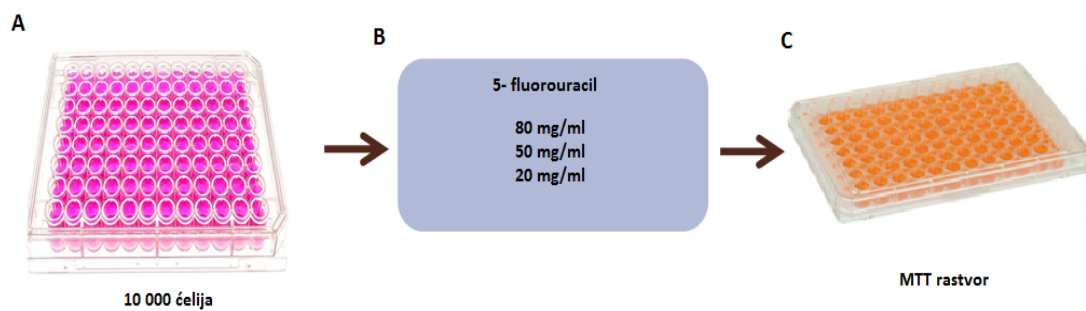
- 
1. Zasejati 20 000 ćelija u 1 ml DMEM-a u pločama sa 24 bunarića, menjati DMEM svakog drugog dana do uspostavljanja subkonfluentnosti;
  2. Gumicom pravolinijski napraviti ogrebotinu i nakon 0/24/48/72h:
  2. Slikati pod invertnim mikroskopom svaki bunarić na identičnom mestu (koje se pre toga može obeležiti markerom).
- 

### 3.12 Imunohistohemija

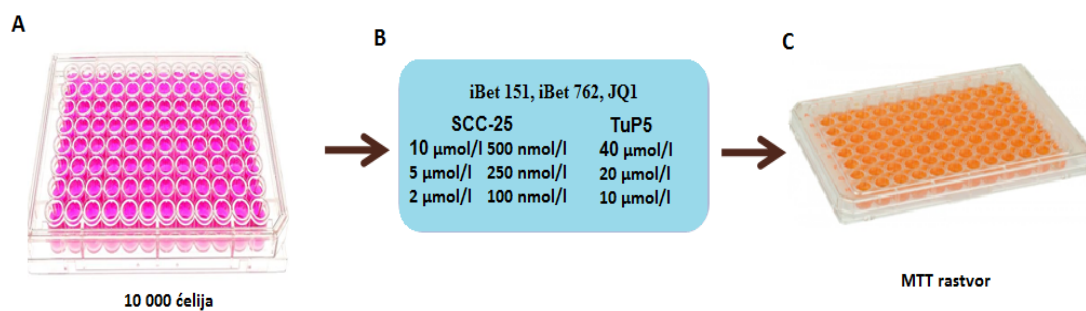
Deparafinizacija tkiva (debljine 5  $\mu\text{m}$ ) je rađena u ksilolu, u trajanju od 5 minuta i ponovljena dva puta. Nakon toga, urađena je hidratacija opadajućim koncentracijama etanola (100%, 96%, 80%,70%, 50%) takođe u trajanju od 5 min, po dva puta. Pretretiranje je urađeno korišćenjem 0,1ml citratnog pufera (pH 6) u trajanju od 20 minuta na temperaturi od 98°C. Uzorci su inkubirani 5 minuta u 3% vodonik peroksidu i isprani Tris puferom. Zatim je primenjena UV blokada (5 min.). U cilju otkrivanja markera epitelno-mezenhimalne tranzicije, uzorci su inkubirani sa poliklonalnim antitelima: Vimentin,  $\alpha\text{SMA}$ , SNAIL i SLUG (Thermo Fisher ScientificValtham, Massachusetts, SAD).

### 3.13 MTT test

MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazoliumbromid) test je korišćen za procenu uticaja antineoplastičnih agenasa na proliferaciju ćelija. Deset hiljada ćelija je zasejano na ploči sa 96 bunarića i inkubirano na 37 °C u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% CO<sub>2</sub>. Posle 24 h, ćelije su tretirane različitim koncentracijama 5-fluorouracila: 80, 50, 20mg/ml (Medac, Vedel, Nemačka) (Slika 3.6) U drugom eksperimentu, ćelije su tretirane BET inhibitorima (iBET 151, iBET 762 i JQ1) u dozama od 40  $\mu\text{mol/l}$  do 100 nmol/l (Slika 3.7). Posle 24h MTT rastvor je dodat u svaki bunarić, inkubiran 4h, a supernatant je odbačen. Precipitati su rastvoreni u 100 mL dimetil sulfoksida (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) mešanjem na 37 °C 15 min. Optička gustina je merena na 540 nm koristeći ELISA čitač (RT-2100c, Raito, Kina) (Tabela 3.11).



Slika 3.6. Šematski prikaz MTT testa citotoksičnosti (5- fluorouracil)



Slika3.7. Šematski prikaz MTT testa citotoksičnosti (Bet inhibitori)

Tabela 3.11. Protokol MTT testa

---

**I dan:** Zasejati 10 000 ćelija po bunariću (96 *well plate*) u zapremini od 0,1 ml kompletnog medijuma;

**II dan:** Izložiti ćelije tretmanu (Slike 3.6 i 3.7);

**III dan:** 1. Odliti kompletni medijum sa citostatikom;

2. Dodati 0,1 ml rastvora MTTa u kompletnom medijumu;

3. Blago mešati ploču na šejkeru (37 °C 250 rpm) 5 min, pokrivenu folijom;

4. Inkubirati 4h (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>);

5. Odliti rastvor MTT-a;

6. Dodati 0,1 ml DMSO rastvora;

7. Mešati ploču na šejkeru (37 °C 250 rpm) 15 min, pokrivenu folijom;

8. Očitati vrednosti apsorbanci na ELISA čitaču (540 nm).

---

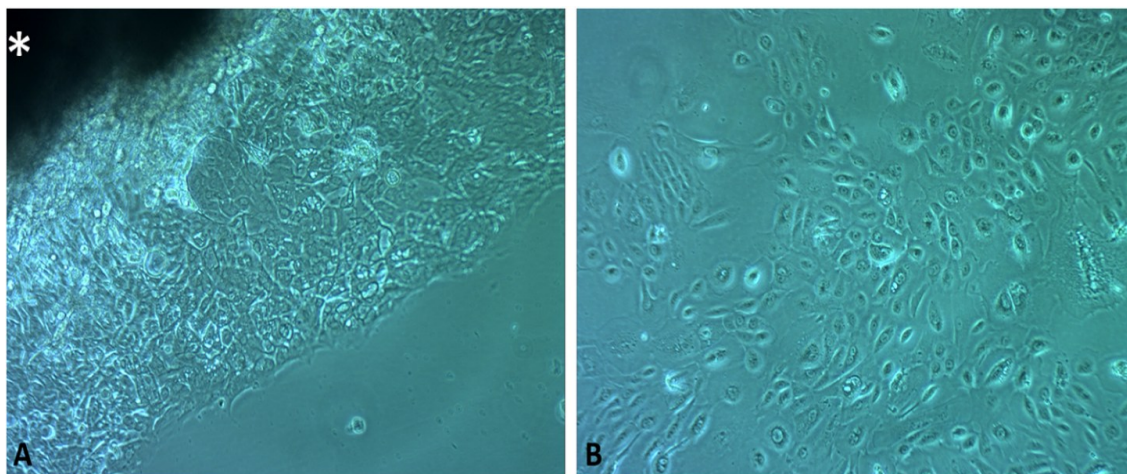
### 3.14 Statistička analiza

*Student's T tests* su korišćeni u studiji, nakon utvrđivanja normalnosti raspodele. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD. Statistička značajnost je podešena na  $p < 0,05$ . Softverski paket SPSS verzija 17 je korišćen za analizu (SPSS inc, Chicago, IL, SAD).

## **4. REZULTATI**

#### 4.1 Broj ćelija tokom pasaža i njihove morfološke osobine

U toku kultivacije ćelija (Slika 4.1 A i B), brojnost populacija je varirala u opsegu od 320 000 do 8 100 000 ćelija (Tabela 4.1).



Slika 4.1. (A) Izgled tumorskih ćelija nedelju dana nakon zasejavanja tumorskog tkiva\* (Uveličanje 40×); (B) Tumorske ćelije prve pasaže 30 dana nakon zasejavanja (Uveličanje 100×)

Tabela 4.1. Ukupan broj ćelija nakon pasaže

Uzorak	Tkivo	0. pasaža	1. pasaža	2. pasaža	3. pasaža	4. pasaža	5. pasaža
#1	Tumor	$4,1 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$	$10^6$	$5,1 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$
	Margina	$1,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$
#2	Tumor	$2,5 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$	$2 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$	$8,1 \times 10^6$
	Margina	$8 \times 10^5$	$2,7 \times 10^6$	$6,1 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
#3	Tumor	$2,4 \times 10^6$	$10^6$	$1,4 \times 10^6$	$10^6$	$5,4 \times 10^5$	$10^6$
	Margina	$3,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$10^6$
#4	Tumor	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$
	Margina	$1,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
#5	Tumor	$1,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$5,6 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$
	Margina	$2,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$2 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	$9,1 \times 10^5$
#6	Tumor	$1,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$10^6$	$4,7 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	$10^6$
	Margina	$5,7 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$	$5 \times 10^5$

Procenat živih ćelija u populaciji (ćelijska vijabilnost) je bila visoka i kretala se u opsegu od 70 do 100% (Tabela 4.2).



Tabela 4.2. Vijabilnost ćelija nakon pasaže (%)

Uzorak	Tkivo	0. pasaža	1. pasaža	2. pasaža	3. pasaža	4. pasaža	5. pasaža
#1	Tumor	77	99	94	<b>70</b>	99	98
	Margina	99	98	99	88	<b>100</b>	79
#2	Tumor	99	99	99	95	99	96
	Margina	99	<b>100</b>	99	95	<b>100</b>	99
#3	Tumor	98	96	98	98	93	99
	Margina	97	97	98	97	97	99
#4	Tumor	85	99	99	97	82	99
	Margina	92	99	97	96	97	85
#5	Tumor	96	99	99	96	93	99
	Margina	99	96	98	92	94	92
#6	Tumor	97	98	99	98	97	97
	Margina	88	98	98	90	93	85

Prečnik ćelija je varirao u osegu od 15,1  $\mu\text{m}$  do 38,9  $\mu\text{m}$  (Tabela 4.3). Veličina mrtvih ćelija je bila manja od živih. Tumorske vijabilne ćelije su bile neznatno manje u odnosu na marginalne (prosečna vrednost tokom svih pasaža 21,76  $\mu\text{m}$  vs 22,87  $\mu\text{m}$ ), dok su mrtve ćelije bile gotovo identičnih prečnika (tumorske ćelije-16,57  $\mu\text{m}$ ; marginalne ćelije- 16,52  $\mu\text{m}$ ) (Tabele 4.4-4.7).

Tabela 4.3. Prečnik ćelija nakon pasaže ( $\mu\text{m}$ )

Uzorak	Tkivo	0. pasaža	1. pasaža	2. pasaža	3. pasaža	4. pasaža	5. pasaža
#1	Tumor	20,6	20,6	<b>38,9</b>	20	17,5	20,5
	Margina	24,5	22,3	20	21	30,3	29
#2	Tumor	17,7	20,1	18	19,3	17,5	22,3
	Margina	17,4	21,5	25,8	28,6	30,3	21
#3	Tumor	18,1	19,6	19,8	19,6	20,1	20,2
	Margina	20,3	19,2	19,2	27,7	26,1	22,9
#4	Tumor	16	20,2	19,2	22	26,1	23,4
	Margina	15,4	24,9	24,1	18,1	19,2	22,2
#5	Tumor	16,9	20,9	21	27,7	29,8	29,7
	Margina	28,3	23,7	22,6	23,7	24,6	21,6
#6	Tumor	20,2	26,3	20,3	31,7	21,4	21,3
	Margina	16	25,1	19,1	27,6	25,6	<b>15,1</b>

Tabela 4.4. Prečnik tumorskih živih ćelija nakon pasaže ( $\mu\text{m}$ )

<b>Tumorske žive ćelije</b>	Minimum	Maksimum	Srednja vrednost	SD
Nulta pasaža	16,00	20,60	18,2500	1,81852
Prva pasaža	19,60	26,30	21,2833	2,49753
Druga pasaža	18,00	38,90	22,8667	7,92052
Treća pasaža	19,30	31,70	23,3833	5,14098
Četvrta pasaža	17,50	29,80	22,0667	4,94152
Peta pasaža	20,20	29,70	22,9000	3,53440

SD- standardna devijacija

Tabela 4.5. Prečnik tumorskih mrtvih ćelija nakon pasaže ( $\mu\text{m}$ )

<b>Tumorske mrtve ćelije</b>	Minimum	Maksimum	Srednja vrednost	SD
Nulta pasaža	11,30	16,40	13,2667	1,71775
Prva pasaža	11,30	18,30	15,1833	2,73307
Druga pasaža	11,00	18,60	15,4500	2,73624
Treća pasaža	12,00	26,00	16,8833	5,45323
Četvrta pasaža	13,10	34,30	21,6000	8,03169
Peta pasaža	10,90	27,50	17,1333	6,16787

SD- standardna devijacija

Tabela 4.6. Prečnik marginalnih živih ćelija nakon pasaže ( $\mu\text{m}$ )

<b>Marginalne žive ćelije</b>	Minimum	Maksimum	Srednja vrednost	SD
Nulta pasaža	15,40	28,30	20,3167	5,14875
Prva pasaža	19,20	25,10	22,7833	2,25426
Druga pasaža	19,10	25,80	21,8000	2,80071
Treća pasaža	18,10	28,60	24,4500	4,25429
Četvrta pasaža	19,20	30,30	26,0167	4,13155
Peta pasaža	15,10	29,00	21,9667	4,44102

SD- standardna devijacija

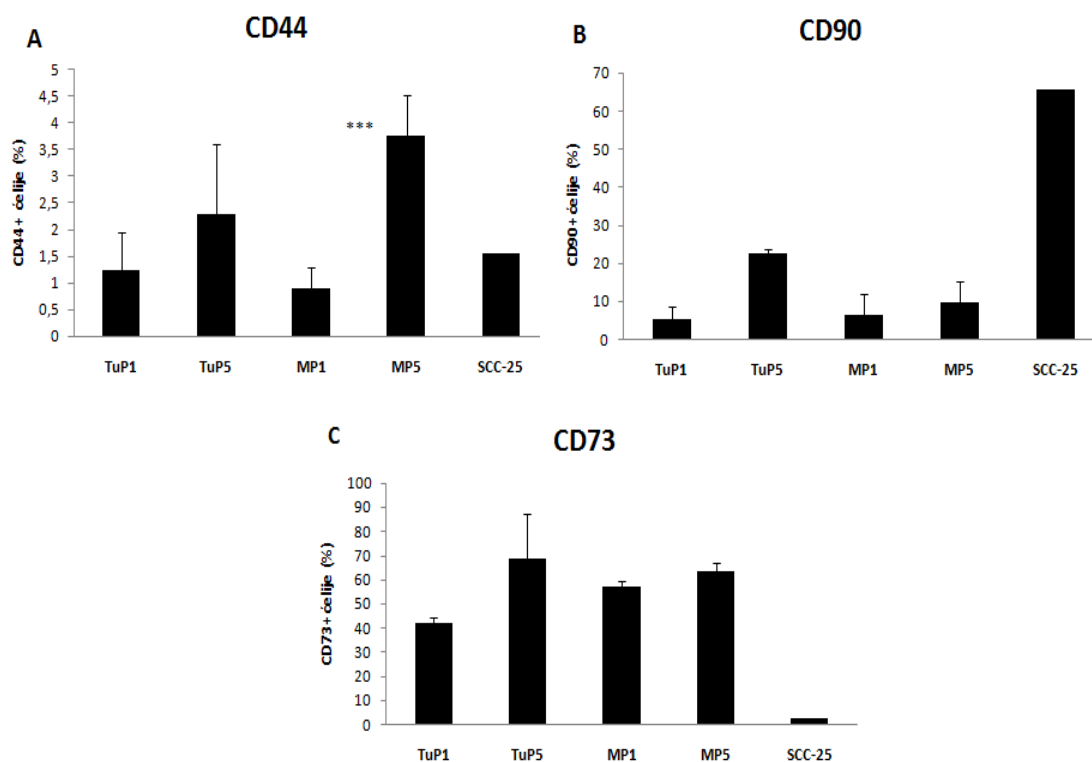
Tabela 4.7. Prečnik marginalnih mrtvih ćelija nakon pasaže ( $\mu\text{m}$ )

<b>Marginalne mrtve ćelije</b>	Minimum	Maksimum	Srednja vrednost	SD
Nulta pasaža	9,50	16,20	13,3333	2,49853
Prva pasaža	12,80	18,30	16,0833	2,02031
Druga pasaža	13,00	29,00	19,3833	5,58334
Treća pasaža	12,30	29,80	19,6500	6,98878
Četvrta pasaža	12,30	25,00	18,2833	4,10142
Peta pasaža	7,50	19,20	12,7833	4,11214

SD- standardna devijacija

## 4.2 Protočna citometrija

Protočna citometrija je pokazala jasnu ekspresiju mezenhimskih markera kancerske matičnosti (CD44, CD73 i CD90). Pored toga, utvrđen je povećani nivo ekspresije ovih markera u petoj pasaži u poređenju sa ćelijama nakon prve pasaže. Međutim, povećanje je bilo statistički značajno samo u poređenju ćelija margine ( $p < 0.001$ ) (Slika 4.2-4.4; Tabela 4.8). Kao i kod rezultata qPCR, nisu pronađene razlike između ekspresije proteina tumorskih i marginalnih ćelija. CD34 marker hematopoietičnih matičnih ćelija bio je negativan u svim uzorcima.

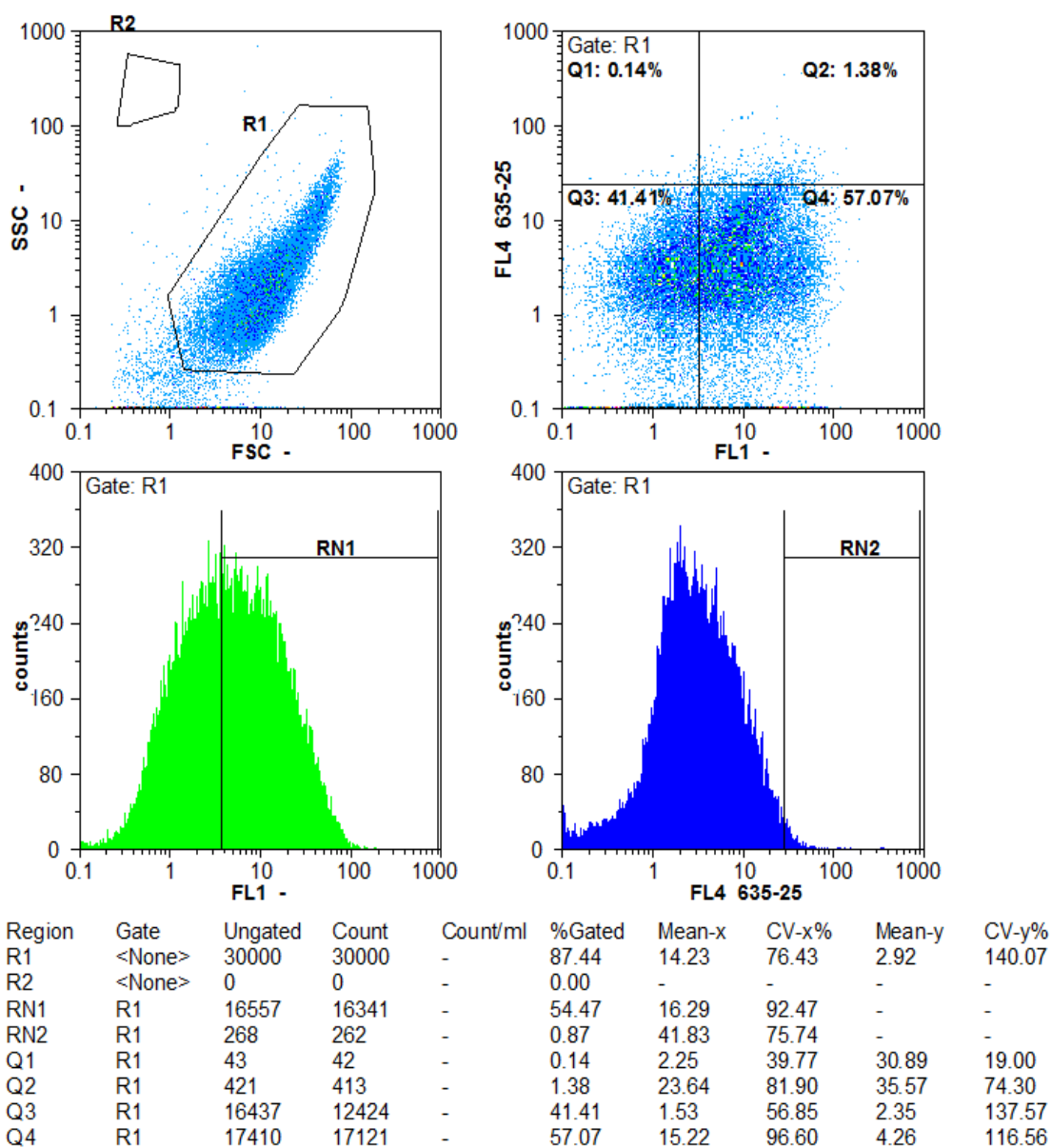


Slika 4.2. Nivoi ekspresije proteina CD44, CD73 i CD90 na površini ćelija tumora i margine OPK; SCC-25 pozitivna kontrola

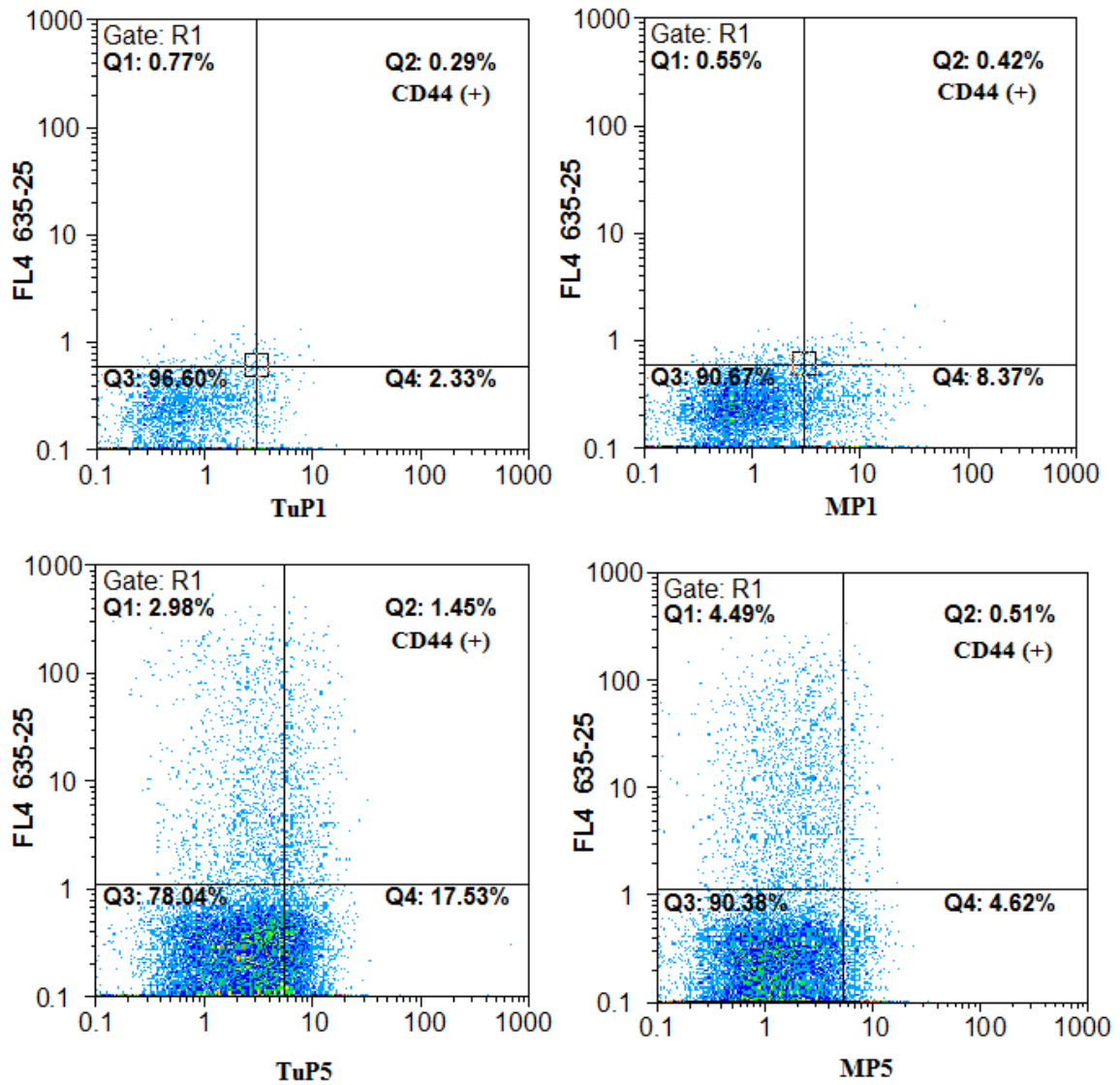
Tabela 4.8. Procenat CD44, CD90 i CD73 pozitivnih ćelija u tumorskim ćelijama prve (TuP1) i pete (TuP5) pasaže, marginalnim ćelijama prve (MP1) i pete (MP5) pasaže i u kontrolnoj ćelijskoj liniji SCC-25

Marker/ Uzorak	CD44 (%)	<i>p</i> *	CD73 (%)	<i>p</i>	CD90 (%)	<i>p</i>
<b>TuP1</b> ( <i>n</i> **= 6)	1,224 (0,713)	NS	41,840 (35,061)	NS	5,200 (2,731)	NS
<b>TuP5</b> ( <i>n</i> = 6)	2,280 (1,337)		68,565 (1,282)		22,460 (18,701)	
<b>MP1</b> ( <i>n</i> = 6)	0,903 (0,389)	<0,001	56,925 (5,696)	NS	6,175 (2,401)	NS
<b>MP5</b> ( <i>n</i> = 6)	3,750 (0,772)		63,600 (5,301)		9,750 (3,445)	
<b>SCC-25</b> ( <i>n</i> = 1)	1,550 (0,010)		2,260 (0,033)		65,450 (3,201)	

Vrednosti su izražene kao srednja vrednost (standardna devijacija); \* *p* vrednost; \*\**n* broj uzoraka; NS – ne postoji statistički značajna razlika



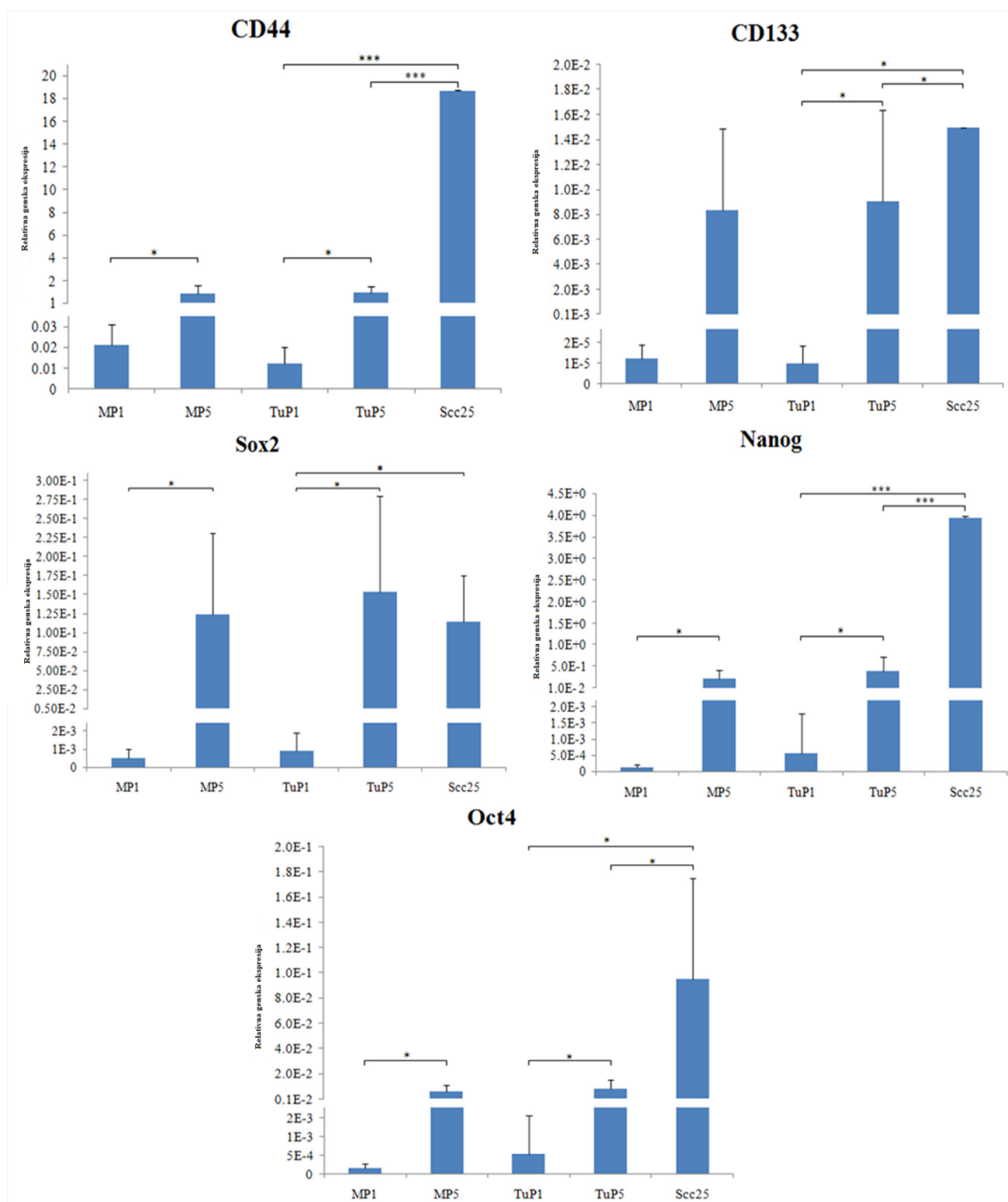
Slika 4.3. Primer određivanja nivoa ekspresije proteina CD90 i CD44 kod tumorskih ćelija pete pasaže protočnom citometrijskom analizom



Slika 4.4. Grafički prikaz rezultata protočne citometrije CD44<sup>+</sup> tumorskih (TuP1 i TuP5) i marginalnih (MP1 i MP5) ćelija

### 4.3 Analiza genske ekspresije: markeri kancerske matičnosti

Proizvedeno je dvanaest ćelijskih kultura oralnog planocelularnog karcinoma i njihovih margina u cilju analize ekspresije markera kancerskih matičnih ćelija.

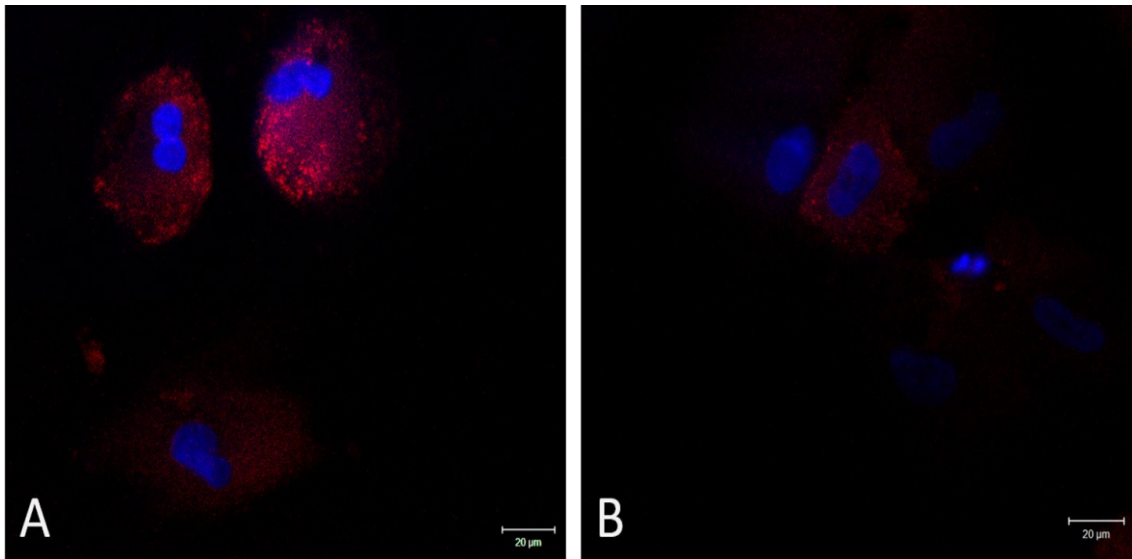


Slika 4.5. Nivo relativne genske ekspresije markera KMĆ

*Real time* qPCR analiza pokazala je ekspresiju markera KMĆ (CD44, CD133, Nanog, Sox2 i Oct-4) u tumorskim i ćelijama margina (Slika 4.5). Nivoi ekspresije svih markera KMĆ bili su veći u petoj pasaži ( $p < 0.05$ ) i u tumorskim i u ćelijama margina. CD44 je pokazao najveću ekspresiju u svim ćelijskim kulturama, dok je marker CD133 pokazao najnižu.

#### 4.4 Imunocitohemija

Imunocitohemijski, potvrđeno je prisustvo CD44 markera matičnosti kancerskih matičnih ćelija u tumorskim i marginalnim ćelijama (Slika 4.7).

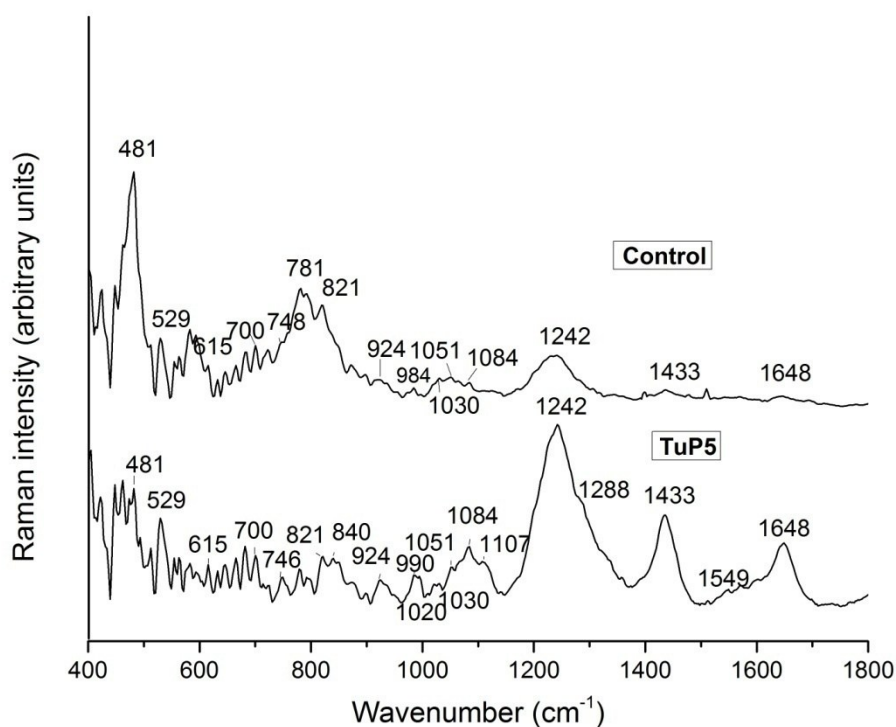


Slika 4.7. Imunocitohemijsko bojenje CD44 (crveno) i DAPI (plavo) (A) tumorskih i (B) marginalnih ćelija



#### 4.5 Raman mikro-spektroskopija

Kao dopunska metoda koja bi mogla da posluži za detaljniju fenotipsku karakterizaciju ćelija, urađena je ramanska spektroskopija koja ukazuje na fine razlike između ćelija na nivou molekula, atoma i veza između njih. Pokazano je da se tumorske ćelije značajno razlikuju u pojedinim pikovima u odnosu na kontrolu (fibroblasti pete pasaže) (Slika 4.8).

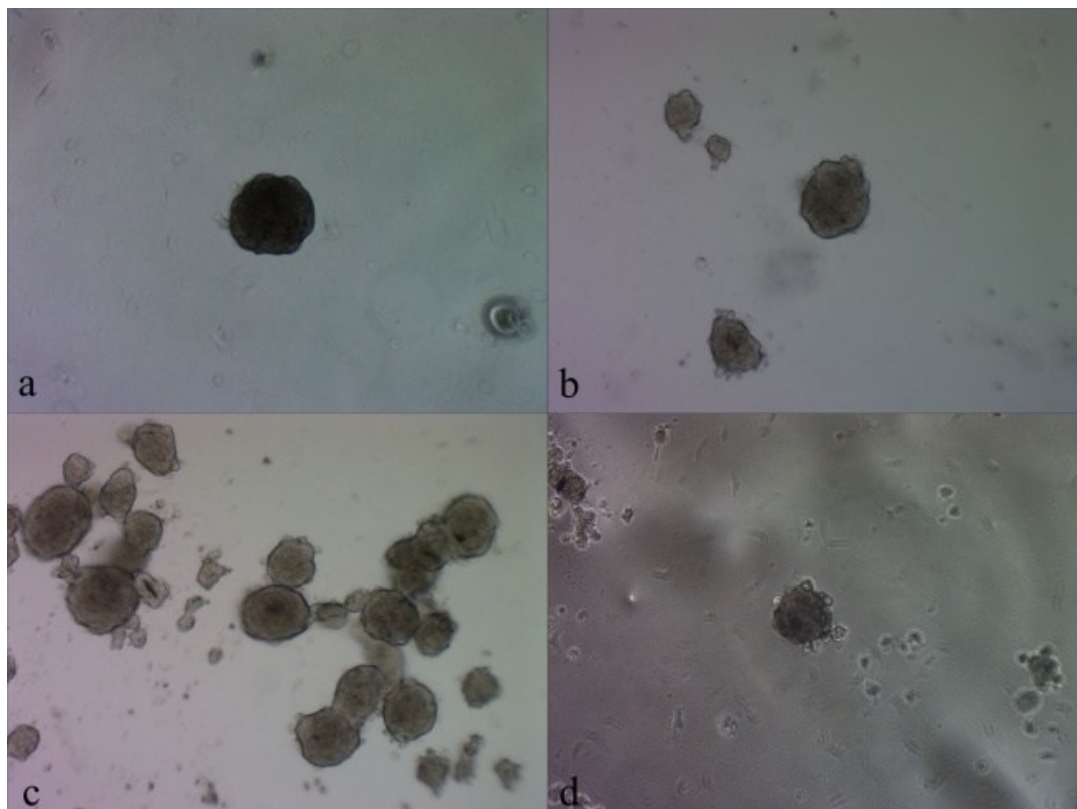


Slika 4.8. Raman spektri tumorskih ćelija pete pasaže (TuP5) i fibroblasta pete pasaže (Control)

Ova analiza je pokazala da su amidne veze (N-H) bile izraženije u tumorskim ćelijama (pik 1242) kao i količina proteina i lipida unutar ćelija (pikovi 1433 i 1648). Sa druge strane, nivo DNK/RNK (pik 781) je bio viši u kontrolnim ćelijama.

#### 4.6 Formiranje sfera (sferoida)

I ćelije tumora i ćelije margina (sa izuzetkom marginalnih ćelija prve pasaže) su pokazale sposobnost da formiraju sferoide (sfere), što predstavlja *in vitro* test njihove sposobnosti samoobnavljanja.



Slika 4.9. Sfere dobijene nakon kultivacije ćelija na neadherentnoj podlozi (a) Sfere poreklom od tumorskih ćelija prve pasaže; (b) Sfere poreklom od tumorskih ćelija pete pasaže; (c) Sfere poreklom od marginalnih ćelija pete pasaže; (d) Sfere poreklom od SCC-25 ćelijske linije; Uveličanja 40× i 100×

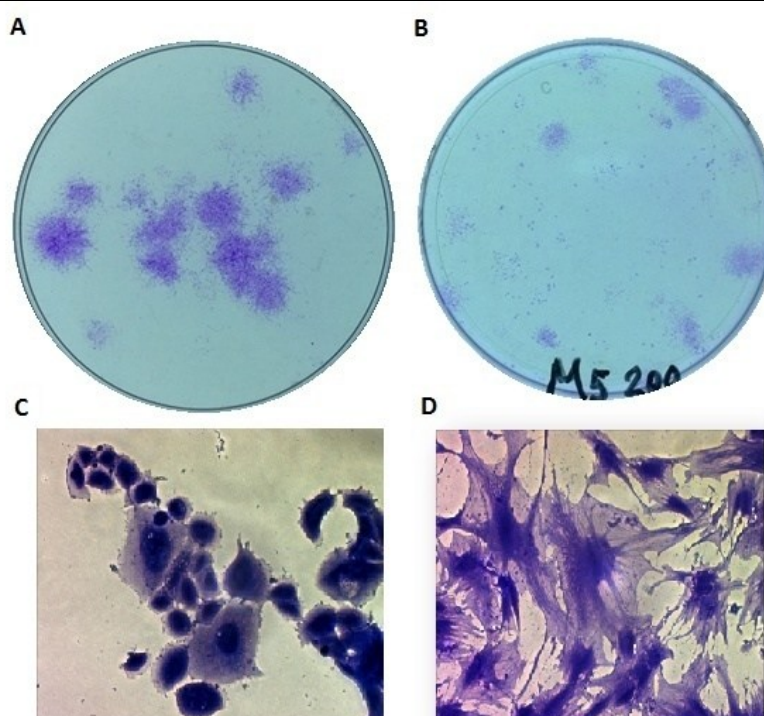
Sposobnost samoobnavljanja ćelija u petoj pasaži bila je veća u odnosu na ćelije dobijene nakon prve pasaže (Slika 4.9). Slično tome, prečnik sfera je bio veći kod ćelija pete pasaže ( $p < 0.05$ ). Prosečna veličina sfera tumorskih ćelija pete pasaže (88,5  $\mu\text{m}$ ) je bila značajno veća u odnosu na sfere tumorskih ćelija prve pasaže (36,3  $\mu\text{m}$ ). Sfere poreklom od ćelija margine su bile brojnije i veće od tumorskih (162,4  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.7 Test formiranja kolonija

Test formiranja kolonija pokazao je da i ćelije margina, kao i tumorske ćelije imaju sposobnost da formiraju kolonije.

Tabela 4.9. Test formiranja kolonija - srednje vrednosti broja kolonija

	TuP1	TuP5	MP1	MP5	SCC-25
7. dan	1,25	1,33	2,33	4,08	1,09
14. dan	15,25	6,25	17,66	9,83	3,893

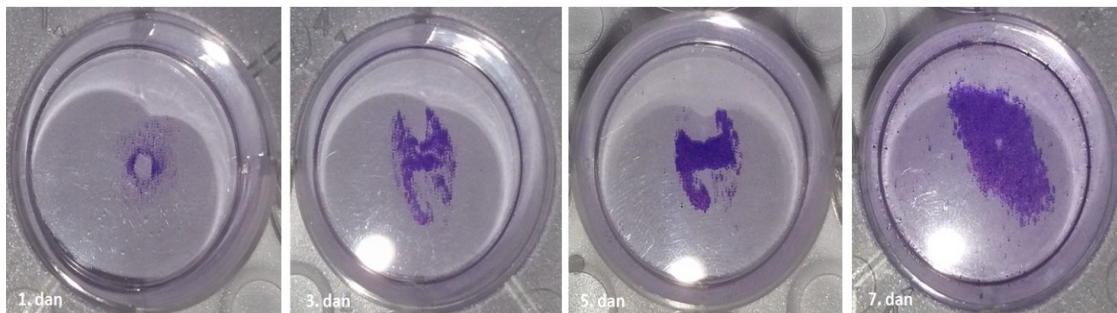


Slika 4.10. Test formiranja kolonija. Morfologija marginalnih i tumorskih ćelija pete pasaže. (A) Makroskopski i (C) mikroskopski izgled kolonija tumorskih ćelija pete pasaže; (B) Makroskopski i (D) mikroskopski izgled kolonija marginalnih ćelija pete pasaže. Bojenje- *Crystal violet*. Uveličanje 100x

Nisu pronađene statistički značajne razlike u klonogenom potencijalu između ćelija tumora i ćelija margina kao ni između pasaža (Tabela 4.9 i Slika 4.10).

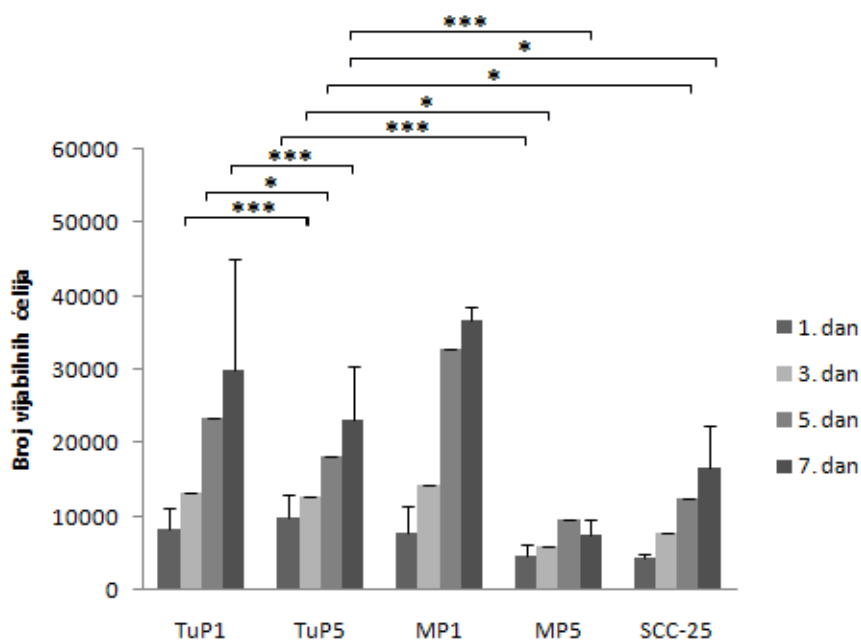
#### 4.8 Test ćelijske proliferacije

U cilju procene proliferativnog kapaciteta tumorskih i marginalnih ćelija nakon prve i pete pasaže, računat je broj vijabilnih ćelija tokom 7 dana.



Slika 4.11. Makroskopska slika testa ćelijske proliferacije u bunarićima ploče sa 48 bunarića.

Bojenje- *Crystal violet*



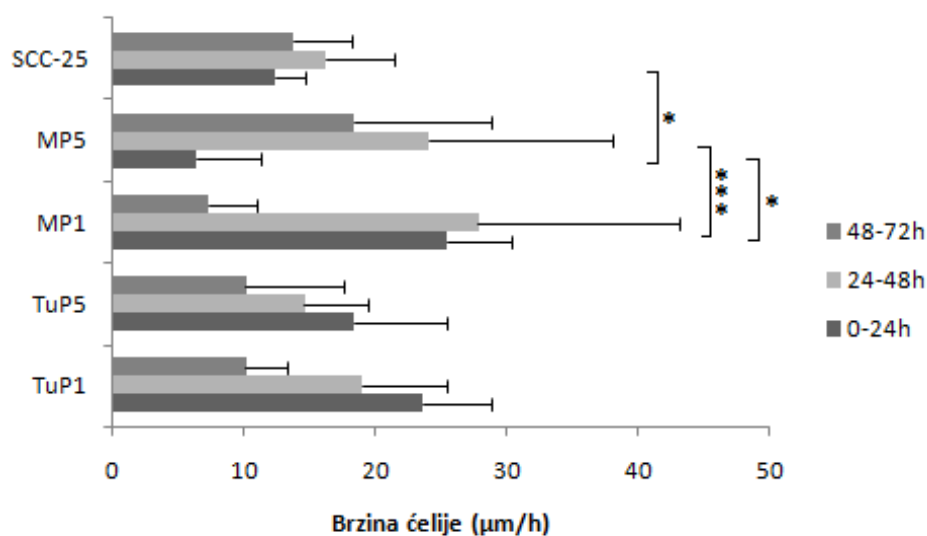
Slika 4.12. Test ćelijske proliferacije

Broj ćelija se povećao tokom vremena (Slika 4.11), sa izuzetkom ćelija margina pete pasaže koje su petog dana eksperimenta dostigle plato u proliferaciji. Kada se uporedi nivo proliferacije ćelija prve i pete pasaže, ćelije tumora i margine su pokazale

razliku - u kasnijoj pasaži ćelije su imale tendenciju ka manjem kapacitetu proliferacije (Slika 4.12).

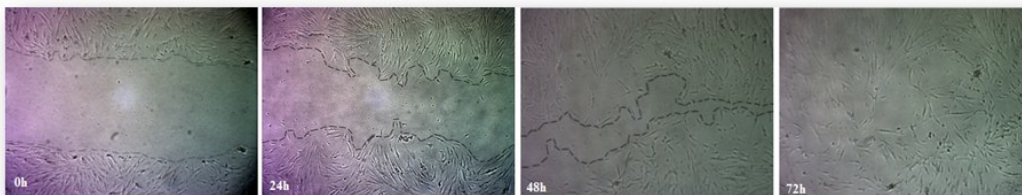
#### 4.9 Test ćelijske migracije

Utvrđeno je da su kancerske i marginalne ćelije veoma pokretljive. Prosečna brzina za prvih 24h iznosila je 18,36  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Nakon perioda od 72h, sve napravljene ogrebotine su bile gotovo zatvorene i u kulturama tumora i u kulturama margina. Brzina ćelija tumora je imala tendenciju da se smanjuje tokom vremena i tokom poslednjih 24h iznosila je 11,16  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Brzina ćelija margina bila je najveća u periodu od 24 do 48 sati (Slike 4.13 i 4.14).



Slika 4.13. Test ćelijske migracije

Sveukupno, tumorske ćelije su bile sporije (15,75  $\mu\text{m}/\text{h}$ ) nego marginalne ćelije (18,12  $\mu\text{m}/\text{h}$ ) tokom 72h, ali bez statističke značajnosti.

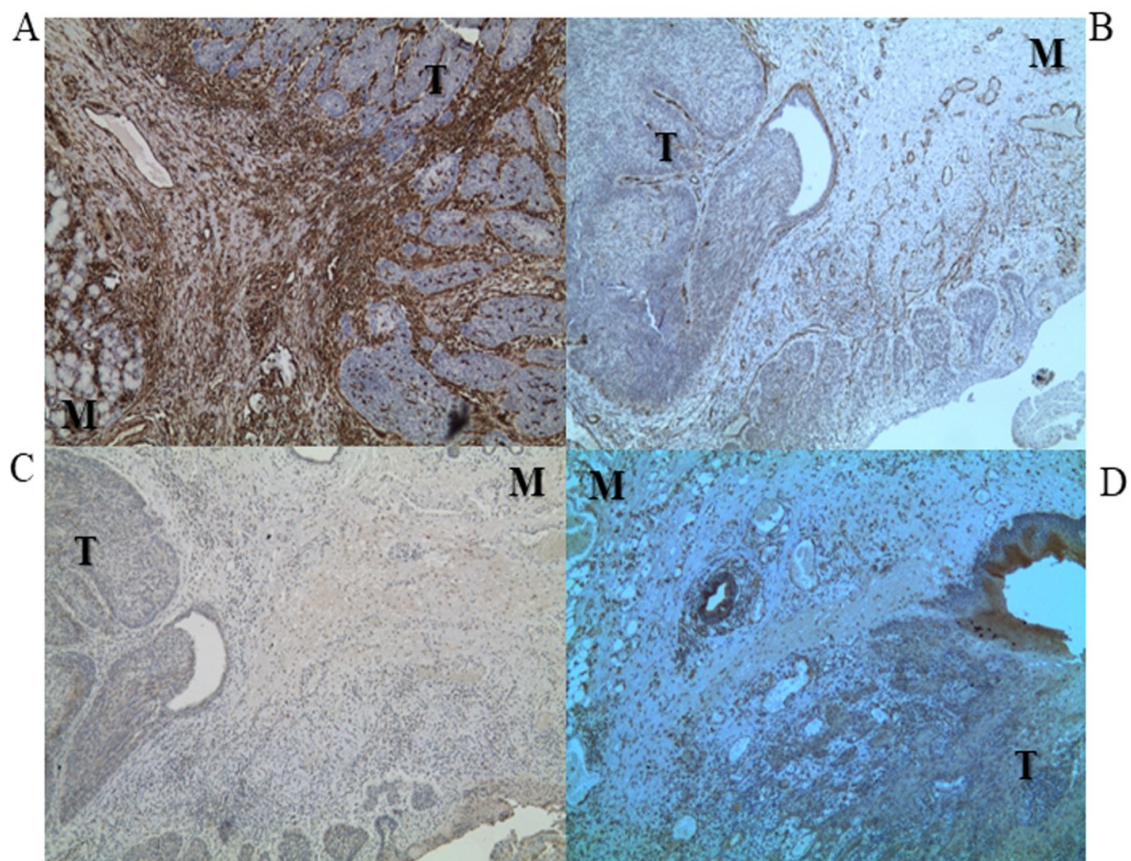


Slika 4.14. Reprezentativna slika migracije ćelija margine prve pasaže tokom perioda od 72h



#### 4.10 Imunohistohemija

Kao jedan od parametara agresivnosti tumorskih ćelija, ispitan je stepen epitelno-mezenhimske tranzicije, kako u histološkim preparatima pacijenata, tako i u ćelijskim kulturama tih istih pacijenata.

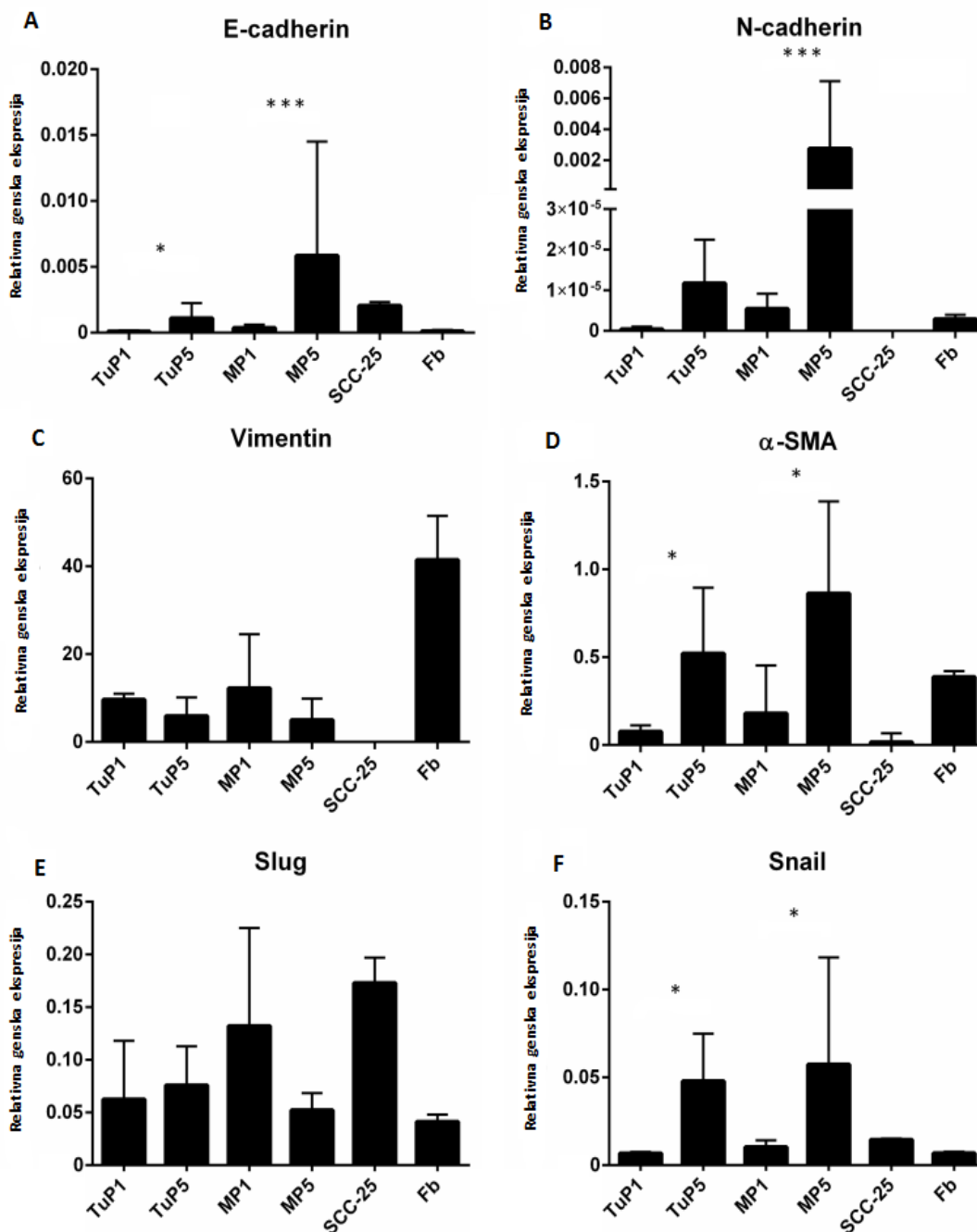


Slika 4.15. Imunohistohemijske karakteristike tumora (T) i margina (M), određene bojenjem Vimentina (A),  $\alpha$ SMA (B), SLUG (C) i SNAIL (D). Uveličanje 40 $\times$

Jasno bojenje svih markera EMT (Vimentin,  $\alpha$ SMA, SLUG i SNAIL) je primećeno u tumorskom (T) i marginalnom (M) tkivu. Reprezentativne imunohistohemijske mikrografije su prikazane na slici 4.15.

#### 4.11 Analiza genske ekspresije: markeri epitelno mezenhimske tranzicije

U cilju utvrđivanja markera EMT, pokazana je ekspresija epitelnog (E-kadherin) i mezenhimalnih markera (N-kadherin, Vimentin,  $\alpha$ SMA, SNAIL, SLUG) (Slika 4.6). Kao pozitivna kontrola, korišćena je karcinomska ćelijska linija SCC-25. Fibroblasti treće pasaže su korišćeni kao negativna kontrola.



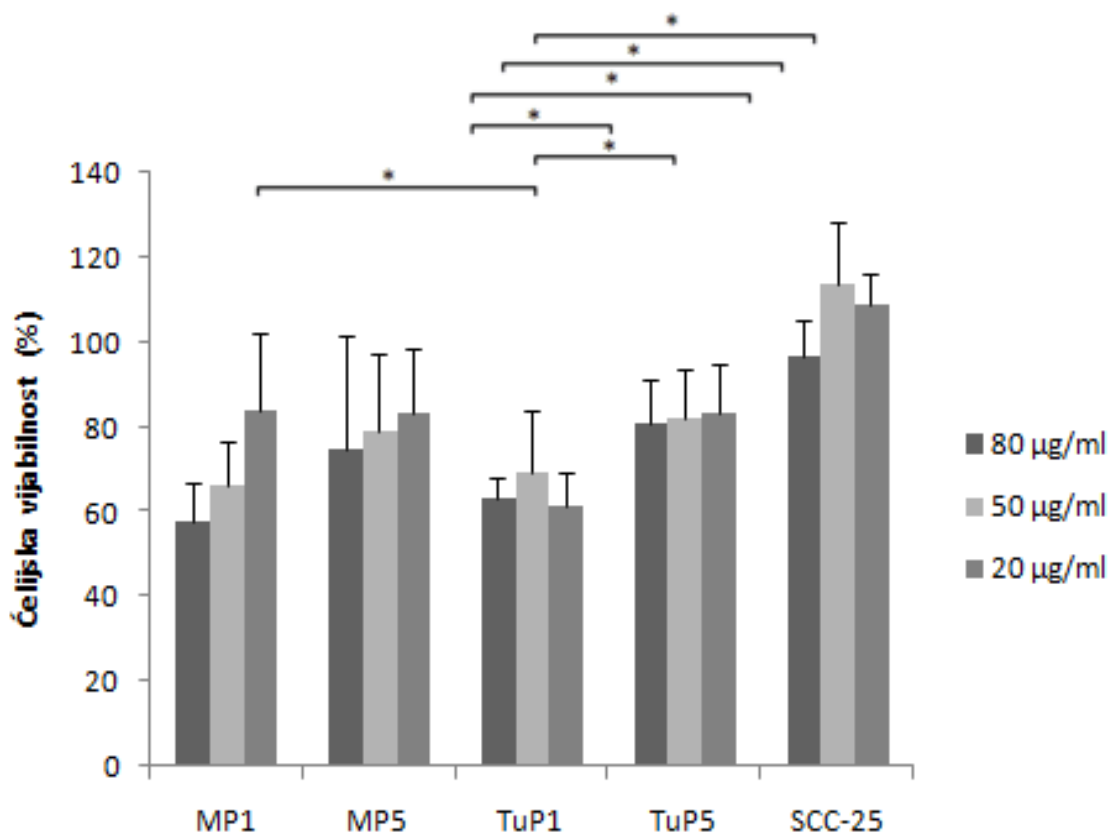
Slika 4.6. Nivo relativne genske ekspresije markera EMT

Postojale su razlike u ekspresiji markera EMT između ćelija tumora i margine, ali bez statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ). Nivo ekspresije vimentina je bio viši u tumorskim i marginalnim ćelijama na početku kultivacije (prva pasaža) nego u ćelijama pete pasaže, međutim bez statistički značajne razlike. Naprotiv, nivoi ekspresije  $\alpha$ SMA i SNAIL-a bili su veći u 5. pasaži u odnosu na prvu ( $p < 0.05$ ) i u tumorskim i u marginalnim ćelijama. Ovaj trend je takođe zabeležen u ekspresiji SLUG-a u tumorskim ćelijama. Statistički značajno povećanje nivoa ekspresije E-kadherina je postojalo između pasaža (tumorskih i marginalnih ćelija), kao i u ekspresiji N-kadherina kod ćelija marginalnog tkiva.

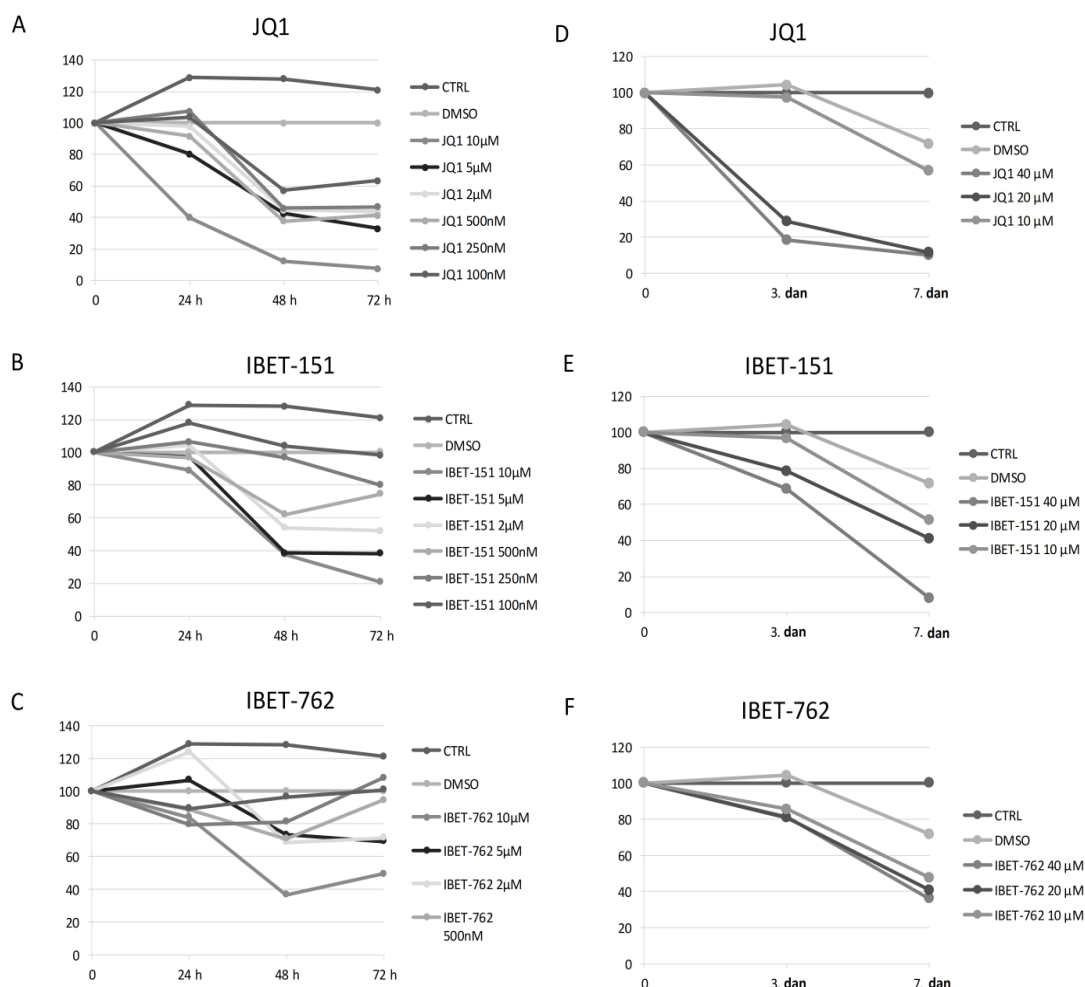


#### 4.12 MTT test

Vijabilnost ćelija nakon tretmana 5-fluorouracilom i BET inhibitorima ocenjivana je MTT testom. Ćelije tumora pete pasaže pokazale su značajno veću hemoresistenciju na 5-fluorouracil u poređenju sa tumorskim ćelijama prve pasaže (Slika 4.16). Taj trend je primećen i kod ćelija margine, međutim bez statističke značajne razlike između dva tipa ćelija. SCC-25 ćelijska linija je pokazala najveći stepen hemorezistencije.



Slika 4.16. MTT test citotoksičnosti 5-fluorouracila



Slika 4.17. MTT test citotoksičnosti BET inhibitora (A, B, C ispitivanje na ćelijama SCC-25; D, E, F ispitivanje na primarnim tumorskim kulturama pete pasaže (uzorak #4))

Primarna ćelijska kultura pete pasaže je pokazala veću rezistenciju na dejstvo BET inhibitora u odnosu na SCC-25 ćelijsku liniju. Ipak, BET inhibitori su nakon 7 dana pokazali izuzetnu citotoksičnost sa padom vijabiliteta ćelija na manje od 10% (Slika 4.17).

## **5. DISKUSIJA**

## 5.1 Identifikacija i karakterizacija karcinomskih matičnih ćelija

Identifikacija karcinomskih matičnih ćelija je otvorila uzbudljivu eru u našem razumevanju oralnog karcinoma sa značajnim implikacijama u sferi dijagnoze, prognoze, terapije i ishoda bolesti. Koncept karcinomskih matičnih ćelija, po kome je samo jedna kancerska matična ćelija dovoljna da inicira formiranje tumora koji će tokom svoje evolucije postati skupina heterogenih ćelijskih populacija, predstavlja fundamentalni pomak u shvatanju mehanizama tumorigeneze karcinoma. Identifikacija karcinomskih matičnih ćelija OPK je jedan od važnih koraka u otkrivanju prirode bolesti. Međutim, trenutno nije sa sigurnošću utvrđen jedinstven i specifičan marker koji bi precizno definisao populaciju KMĆ oralnog planocelularnog karcinoma. Stoga se smatra da je kombinacija više markera potrebna da bi se prepoznala i bolje okarakterisala ova populacija. U našoj studiji korišćena je cela paleta markera matičnosti- CD44, CD133, CD90, CD73, Oct-4, Sox2, Nanog kako bi se sa što većom sigurnošću dokazalo postojanje subpopulacija KMĆ u primarnim kulturama OPK. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su u saglasnosti sa podacima drugih studija na različitim solidnim tumorima (Phung et al., 2011; Prince et al., 2007; Wilson et al., 2013).

Specifičnost i značaj naše studije je u tome da su ovi markeri matičnosti takođe otkriveni u marginama oralnih karcinoma, odnosno u tkivu udaljenom 5mm od ivice tumora, koje je patolog proglasio zdravim tkivom. Slične analize na marginama do sada nisu opisane u naučnoj literaturi. Dobijeni rezultati sugerišu postojanje KMĆ i unutar tumorskih margina.

Ustanovljena je ekspresija svih ispitivanih markera matičnosti, bez obzira na primenjenu tehniku njihove detekcije: CD44, CD90, CD73, CD133, Sox-2, Oct-4, Nanog. CD44, važan glikoprotein na površini ćelija, povezan sa ćelijskom adhezijom i migracijom, smatra se najbitnijim markerom KMĆ oralnog planocelularnog karcinoma (Prince et al., 2007; Shakib et al., 2011). Njegovo prisustvo dokazano je protočnom citometrijom, kvantitativnim *real-time* PCR-om i imunocitohemijski. Nivo ekspresije nije bio visok, što se može objasniti činjenicom da KMĆ ne predstavljaju veliku subpopulaciju ćelija unutar OPK (Prince et al., 2007), ali je ekspresija CD44 bila viša u odnosu na druge markere matičnosti, što je u saglasnosti sa prvom studijom koja je

uopšte identifikovala ove ćelije u oralnom karcinomu. Zanimljiva je studija u kojoj je dvadeset od 30 implantacija CD44<sup>+</sup> ćelija generisalo tumore kod imunodeficientnih miševa, dok je samo jedna od 40 implantacija CD44<sup>-</sup> ćelija uspjela da generiše tumor (Baumann and Krause, 2010). Treba istaći da je u našoj studiji kod pacijenta sa terminalnim stadijumom OPK (stadijum IVa) nivo CD44 markera bio višestruko veći, u odnosu na ostale pacijente. Slične rezultate su dobili i drugi autori (Saghravarian et al., 2017), koji su ispitali vezu između nivoa ekspresije CD44 markera i stadijuma bolesti. Novija literatura otkriva ulogu CD44 i u tumorskim metastazama. Naime, opisano je da su određeni oblici CD44 povezani sa progresijom tumora i metastatskim širenjem OPK (Wang and Bourguignon, 2011).

Značajan je i podatak da je broj pasaža bitno uticao na ekspresiju svih markera, bez izuzetka. Ispitivane ćelijske kulture pokazale su značajno viši nivo ekspresije markera matičnosti u petoj pasaži u odnosu na prvu. Verovatno je tokom vremena došlo do progresivnog obogaćivanja ćelijskih kultura populacijom kancerskih matičnih ćelija, iako se ne može u potpunosti isključiti ni alternativno objašnjenje, a to je da je broj KMĆ ostao nepromenjen, a da je porasla ekspresija. Nivo ekspresije markera matičnosti u tumorskoj ćelijskoj liniji SCC-25 (čije su ćelije u desetoj pasaži), bio je viši nego u primarnim kulturama koje smo mi generisali.

Identifikacija markera KMĆ pouzdanim testovima kao što je protočna citometrija koristeći monoklonska antitela, može otvoriti nove mogućnosti za ranu detekciju tumorskih ćelija, što automatski obezbeđuje i pravovremenu primenu adekvatne terapije (Liu et al., 2011). Naša studija je pokazala prisustvo subpopulacije KMĆ unutar primarnih kultura OPK i margina protočnom citometrijom – ovi rezultati su pokazali veliku podudarnost sa rezultatima qPCR-a. Protočna citometrija je dokazala postojanje većeg broja CD44 pozitivnih ćelija u kulturama pete pasaže. CD73 i CD90 pozitivne ćelije su takođe bile prisutne, što je u skladu sa dosadašnjim studijama ovog agresivnog tumora (Han et al., 2014). U ovoj studiji nije pokušano sortiranje ćelija na osnovu odgovarajućih površinskih markera, tako da se zapravo ne zna da li se radi o različitim subpopulacijama ćelija koje eksprimiraju različite markere matičnosti, ili se pak radi o istim ćelijama koje eksprimiraju različite markere.

Transmembranski glikoprotein CD133 takođe je ispitivan kao jedan od važnijih markera za matične ćelije karcinoma (Wu and Wu, 2009) i detektovan je u obe vrste kultura (tumor+margina), kao i prethodni markeri, doduše u nešto nižim koncentracijama. U nekim ćelijskim linijama OPK (Hep-2), utvrđeno je da su CD133<sup>+</sup> ćelije imale povećanu klonalnost u poređenju sa CD133<sup>-</sup> ćelijama (Zhou et al., 2007). Slično prethodnoj studiji, Zhang i saradnici su takođe utvrdili da CD133<sup>+</sup> ćelije imaju povećanu klonogenost, invazivnost i tumorigenost u odnosu na CD133<sup>-</sup> ćelije, udruženo sa otpornošću na paklitaksel (Zhang et al., 2010). Utvrđeno je da su ćelije oralne mukoze sa povišenom ekspresijom CD133 pokazale povećanu migratornu sposobnost i tumorigenost u poređenju sa kontrolama (Chiou et al., 2008).

Markeri kancerske matičnosti Sox-2, Oct-4 i Nanog bili su eksprimirani u obe vrste kultura (tumori i margine), opet ukazujući na njihovu značajnu sličnost. Neke grupe su pokazale da ovi markeri mogu da posluže kao prediktori ponašanja tumora odnosno da imaju uticaj na prognozu kod pacijenata sa oralnim kancerom (Chiou et al., 2008), ali u ovoj studiji zbog malog uzorka to nije moglo da bude utvrđeno.

## 5.2 Sposobnost samoobnavljanja

Sposobnost formiranja sferoida, kao test tumorskog samoobnavljanja i kapaciteta rasta nezavisno od podloge, smatra se adekvatnom *in vitro* zamenom za *in vivo* eksperimente (SF et al., 2012). Kancerske matične ćelije koje se kultivišu u uslovima bez seruma zadržavaju nediferencirano stanje. Dodavanje faktora rasta ih usmerava prema proliferaciji i formiranju ćelijskih agregata koji se nazivaju tumorski sferoidi ili sfere (Allegra et al., 2006). Okamoto i saradnici su izolovali KMĆ iz ćelijskih linija karcinoma usne duplje koje su bile sposobne da formiraju sferoide i koje su pokazivale visok nivo ekspresije CD44 (Okamoto et al., 2009). Chiou i saradnici su proučavali dve tumorske ćelijske linije i primarne kulture OPK i pokazali su da izolovane KMĆ imaju visoku sposobnost formiranja sfera koja je bila podudarna sa visokim nivoom ekspresije CD133 (Chiou et al., 2008).

Uspešnost stvaranja sfera u našoj studiji je iznosila 100% u tumorskim kulturama (u 12 od 12 kultura) i 50% u kulturama margina (6 od 12 kultura ćelija margina). Brzina stvaranja sfera je bila prilično varijabilna, iako nije bila potrebna

dugotrajna kultivacija. Poređenja radi, većina primarnih tumora mozga stvara neurosfere u roku od 4 nedelje, dok je u našoj studiji bilo potrebno samo 7-14 dana za nastanak sfera. Ove razlike mogu biti posledica brojnih tehničkih specifičnosti, kao što je produženo vreme zasejavanja od momenta uklanjanja tumora, drugačije metode kultivacije ili prisustvo bakterijske/gljivične infekcije. (Bhaijee et al., 2012).

Ovaj test se i ranije koristio za identifikaciju KMĆ unutar tumora (Osman et al., 2015), međutim nikada za tumorske margine. U našoj studiji, ćelije primarnih kultura margine i tumora imale su sposobnost stvaranja sfera, potvrđujući postojanje KMĆ u ćelijama margine u petoj pasaži. Međutim, zanimljivo je da ćelije margine prve pasaže nisu imale ovu sposobnost, što predstavlja značajnu razliku u odnosu na tumorske ćelije prve pasaže. Pojava sfera u petoj pasaži upućuje na obogaćivanje kulture subpopulacijom karcinomskih matičnih ćelija. S druge strane, u studiji na 43 primarna tumora glave i vrata, pokazano je da je samo 6% (3 od 43 uzorka) primarnih tumora imalo sposobnost formiranja sferoida (Lim et al., 2011).

### **5.3 Rezistentnost na antineoplastične agense**

Uprkos sve većem broju istraživanja koja ispituju mehanizme koji su odgovorni za neuspeh u lečenju i rezistenciji OPK na standardne terapijske modalitete, ništa se bitno nije popravilo na tom planu i ishod lečenja ostaje u velikoj meri nepromenjen (odnosno nepovoljan). Terapije koje ciljaju KMĆ moraju da prevaziđu njihovu hemorezistentnost, radiorezistenciju i imunološke mehanizme invazije (Albers et al., 2012). Pokazano je da su KMĆ različitih maligniteta vrlo otporne na toksične, antineoplastične agense. KMĆ poseduju jedinstvene mehanizme koji se odupiru ćelijskoj smrti, uključujući modifikovane anti-apoptotske mehanizme i smanjenu mitotsku aktivnost (Clarke et al., 2006). U oralnom planocelularnom karcinomu je pokazano da je veći procenat CD44<sup>+</sup> ćelija u primarnom tumoru pacijenta povezan sa većim stopama neuspeha lečenja, dok su ćelije kancera koje ekspimiraju KMĆ markere CD44, CD24, Oct-4 povezane sa lošijom prognozom nakon radioterapije (Joshua et al., 2012). CD44<sup>+</sup> ćelije takođe pokazuju veću otpornost na pro-apoptotske stimuluse (TNF- $\alpha$  i anti-Fas antitelo) i veću otpornost na hemoterapeutske agense u odnosu na ostalu populaciju ćelija (Chikamatsu et al., 2012). U našoj studiji, postoji povezanost između porasta populacije KMĆ u petoj pasaži i veće hemorezistentnosti ćelijskih

kultura. 5- fluorouracil nije podjednako efikasno delovao na ćelije prve i pete pasaže. Naime i tumorske i marginalne ćelije pete pasaže bile su generalno rezistentnije na ovaj agens.

Bromodomain protein 4 (BRD4) je član bromodomena i porodice ekstraterminalnih (BET) proteina. Njegova abnormalna ekspresija je opisana u nekoliko humanih malignih tumora (He et al., 2017; Mio et al., 2018, 2016). Ovi podaci ukazuju na mogućnost korišćenja inhibitora BRD4 kao novog pristupa u lečenju oralnog karcinoma. Pošto su BET proteini, posebno BRD4, deregulisani u nekoliko agresivnih maligniteta i pošto se smatraju bitnim pokretačima tumorskog rasta, razvijen je veliki broj BET inhibitora (Filippakopoulos et al., 2010; Nicodeme et al., 2010). Među njima, JQ1, iBET-151, i iBET-762 su najdetaljnije ispitivani (Filippakopoulos et al., 2010). U ovoj studiji ispitana je citotoksičnost ovih agenasa primenom MTT testa i dobijeni su obećavajući rezultati, odnosno značajno smanjenje vijabilnosti tumorskih ćelija. Primećeno je da je njihov efekat povezan sa brzinom proliferacije ćelija. Primarne tumorske ćelije, zbog generalno sporije proliferacije u odnosu na imortalizovanu ćelijsku liniju SCC-25, pokazale su nešto veći stepen rezistencije.

Ponovna pojava tumora (recidivi) i letalni ishod uglavnom su posledica invazivnosti tumorskih ćelija i njihove sposobnosti da metastaziraju, a razumevanje ćelijskih mehanizama invazije i metastaza je od ključnog značaja za razvoj novih terapijskih modaliteta. Teorija KMC nudi jedinstven mehanizam metastaziranja (sposobnost formiranja tumora na primarnom, ali i na udaljenim mestima). Davies i saradnici su pokazali da CD44<sup>+</sup> ćelije oralnog karcinoma imaju veću sposobnost migracije, invazije i metastatski potencijal u poređenju sa CD44<sup>-</sup> ćelijama (Davis et al., 2010).

#### **5.4 Epitelno-mezenhimalna tranzicija**

EMT dovodi do gubitka epitelnog i sticanja mezenhimskog fenotipa. Ovaj fenomen karakteriše mnoge humane karcinome i, kako EMT napreduje, tumorske ćelije postaju pokretljivije i povećavaju svoju agresivnost (Kalluri and Weinberg, 2009; Lim and Thiery, 2012). Jedna od osnovnih pojava tokom EMT je smanjenje ekspresije epitelnog kadherina (e-kadherina), glikoproteina bitnog za međućelijsku adheziju, a



SLUG i SNAIL, glavni transkripcijski represori E-kadherina, smatraju se ključnim medijatorima EMT (Moreno-Bueno et al., 2008; Thiery, 2002). Povećana ekspresija Vimentina, mezenhinskog proteina, također je tipičan događaj u toku EMT. Vimentin povećava pokretljivost ćelija i narušava integritet epitela (Misra et al., 2012). Pošto se EMT javlja samo u nekim ćelijama raka, pretežno na periferiji tumora, dok druge kancerske ćelije zadržavaju svoje epitelne karakteristike, prolaznu prirodu EMT i heterogenost stepena dediferencijacije čini *in vivo* studije ovog fenomena izuzetno interesantnim ali i složenim (Krisanaprakornkit and Iamaroon, 2012). EMT proces do sada nije bio dovoljno ispitan na marginama hirurške resekcije, u blizini invazivnog fronta tumora iako je poznato da su i histološki i molekularni status margina važne determinante ponašanja tumora (Eljabo et al., 2018; Jelovac et al., 2016; Markiewicz et al., 2014).

Prepostavili smo, kao i neki drugi autori (Brabletz et al., 2001; Nassar et al., 2010), da se EMT pretežno javlja na margini tumora. Zbog toga smo koristili, pored primarnih tumorskih, i kulture margina kako bismo procenili njihove karakteristike povezane sa EMT. Svi EMT markeri (E- kadherin, N-kadherin, Vimentin,  $\alpha$ SMA, SNAIL, SLUG) su eksprimirani u oba tipa ćelija na različitim nivoima. Istraživani markeri nisu pokazali statistički značajnu razliku u ekspresiji između tumorskih i ćelija margina. U našoj studiji, visoki nivoi vimentina detektovani su u obe vrste ćelijskih kultura, a u skladu sa tom karakteristikom ovog EMT markera i migratorni potencijal obe vrste ćelija je bio veoma sličan. Naime, povećana ekspresija vimentina se obično povezuje sa OPK i predstavlja indikator prisustva ćelijskih populacija sa visokim migracionim kapacitetom (Misra et al., 2012; Qin et al., 2018, 2016), što je u skladu sa našim rezultatima. Jedan od glavnih faktora koji su uticali na ekspresiju EMT markera je pasažiranje ćelija. Nivoi ekspresije tokom pasaža su pokazali statistički značajne razlike ( $\alpha$ SMA i SNAIL u oba tipa ćelija). Ovaj fenomen je ranije opisan kod karcinomskih ćelija jajnika, koje su tokom pasaža sve više sintetisale kolagen tipa I i II dok su postepeno gubile ekspresiju citokeratina (Marck and Bracke, 2000). Ova činjenica se može objasniti na nekoliko načina. Naime, kao u slučaju ekspresije prethodno opisanih markera (CD44, CD133, Oct, nanog i dr) porast EMT markera, koji su istovremeno i markeri matičnosti, može se objasniti povećanjem populacije KMC u kulturi tokom pasaža, odnosno obogaćenjem kulture ćelija subpopulacijom

karcinomskih matičnih ćelija, što se u određenoj meri reflektuje na klonalnost tumora i povećanje agresivnosti tokom progresije tumora. S druge strane, ne može se sasvim isključiti mogućnost da se ne uvećava broj ovih ćelija, nego da samo raste ekspresija svih analiziranih markera. Konačno, ćelije u kulturi mogu biti podvrgnute transdiferencijaciji tokom pasaže, odnosno da se od populacije pretežno epitelnih ćelija progresivno dobijaju ćelije sa mezenhimalnim fenotipom. U kliničkim studijama, utvrđena je povezanost markera epitelno-mezenhimske tranzicije sa pojavom recidiva i metastaza (Turley et al., 2008). U našoj studiji, pokazano je da su nivoi ekspresije markera EMT u određenoj vezi sa markerima matičnosti (CD44, CD133, Oct-4, Sox2, Nanog).

### **5.5 Buduća istraživanja**

Veliki broj istraživanja KMĆ doveo je i do značajnih pomaka u ovoj naučnoj oblasti a pre svega je rezultovao nagoveštajem efikasnijih metoda njihove eliminacije. Ustanovljeno je, između ostalog, da procenat KMĆ u tumoru pacijenta može imati prognostički značaj za rizik od recidiva i pojavu metastaza. Takođe, karakteristike određene populacije KMĆ (ekspresija njihovih markera matičnosti, proliferativni kapacitet ili otpornost na lekove) mogu uticati na odluku vezanu za izbor tretmana.

*Target terapija* (ciljana eliminacija KMĆ) i dalje ima različite prepreke koje nisu u potpunosti savladane, od hemo- i radio-rezistentnosti, do mehanizama imunološkog »izbegavanja« koje poseduju KMĆ. Jedan od imunoterapijskih pristupa je upotreba monoklonskih antitela. Različite strategije su do sada klinički upotrebljene: antitela usmerena protiv površinskih antigena tumorskih ćelija i aktivacije imunoloških ćelija koje uzrokuju smrt tumorskih ćelija, zatim primena antitela koja su konjugovana sa citotoksinima ili emiterima zračenja u stanju da prouzrokuju oštećenje ćelija direktno po vezivanju, kao i antitela koja blokiraju ili inhibiraju bitne ćelijske puteve tumorskih ćelija. Ove strategije su rezultirale različitim nivoima poboljšanja prognoze i preživljavanja, ali ne i u izlečenju. Ovaj varijabilni uspeh se može objasniti vrlo heterogenom ekspresijom tumorskih antigena. U toku je niz istraživanja upotrebe antitela usmerenih na KMĆ kod solidnih karcinoma (Park et al., 2009; Schatton et al., 2008). U OPK do sada nije bilo opisano antitelo koje selektivno cilja KMĆ, ali se kandidati ispituju (Albers et al., 2012).

Tradicionalna hemoterapija ili radioterapija generalno podrazumeva ubijanje tumorskih ćelija (Pepa et al., 2015). Međutim, umesto toga, matične ćelije raka bi mogle potencijalno da se indukuju i diferenciraju u normalne pomoću tzv. *diferencijalne terapije*, koja ima za cilj reaktiviranje programa endogene diferencijacije u ćelijama karcinoma da bi se nastavio proces sazrevanja i eliminisao fenotip tumora (Yan and Liu, 2016). Generalno, agensi za diferencijaciju pokazuju manju toksičnost od konvencionalnih antineoplastičnih agenasa. Prototip diferencijalne terapija je *all-trans-retinoična kiselina* (ATRA), koja dovodi do potpune remisije kod pacijenata sa akutnom promijelocitnom leukemijom (Warrell et al., 1991). Studije se sada fokusiraju i na razjašnjavanje mehanizama delovanja diferencijalne terapije kod solidnih tumora, pre svih u karcinomu nazofaringsa (Yan et al., 2014). Međutim, ostaju mnogi izazovi za ovaj vid terapije. Prvo, molekularni mehanizmi odgovorni za blokiranje diferencijacije mogu se razlikovati između različitih tipova tumora i od pacijenta do pacijenta, čak i za tumore sa ekvivalentnom histološkom klasom. Drugo, ćelije raka se uglavnom ne mogu u potpunosti vratiti u normalne ćelije sa relevantnom funkcionalnošću. Treće, iako su mnogi reagensi pokazali sposobnost da indukuju diferencijaciju u pretkliničkim modelima, jako je malo reagenasa koji bi se mogli primeniti u kliničkim uslovima. Još jedan agens predstavlja novi pravac u lečenju OPK. *Sulfasalazin* je specifičan inhibitor transporta cistina koji inhibira rast, invaziju i metastaziranje nekoliko vrsta karcinoma (Kneser et al., 2006; Lo et al., 2008). Nedavno je pokazano da terapija sulfasalazinom selektivno pokreće apoptozu CD44<sup>+</sup> ćelija OPK, bez uticaja na CD44<sup>-</sup> ćelije što ukazuje na njegovu selektivnost ka KMC (Yoshikawa et al., 2013). Konačno, postoje dokazi da epigenetska regulacija igra ključnu ulogu u ćelijskoj diferencijaciji tokom embrionalnog razvića, kao i u samoobnavljanju kancerskih matičnih ćelija (Li, 2002; Meshorer and Misteli, 2006), pa se pretpostavlja da bi kontrola molekularnih mehanizama uključenih u epigenetske modifikacije mogla pružiti nove mogućnosti tretmana solidnih tumora u sklopu diferencijalne terapije, što i naša istraživanja sa primenom BET inhibitora potvrđuju (Yan and Liu, 2016).

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Uspostavljen je protokol izolacije i kultivacije ćelija poreklom od oralnog planocelularnog karcinoma i tkiva tumorske margine;
2. U ćelijskim kulturama poreklom od tumora i od margine utvrđeno je prisustvo kancerskih matičnih ćelija, sudeći po ekspresiji specifičnih markera (CD133, Nanog, Sox2, CD44 i Oct-4). Rezultati *real-time* PCR analize genske ekspresije, potvrđeni su dodatno i protočnom citometrijom u kojoj su ispitani markeri matičnosti CD44, CD73 i CD90;
3. Tokom pasaža broj kancerskih matičnih ćelija je rastao, odnosno uvećavala se ekspresija specifičnih markera u obe vrste kultura.
4. U obe vrste ćelijskih kultura utvrđena je ekspresija markera epitelno-mezenhimske tranzicije (E-kadherin, N-kadherin, Vimentin,  $\alpha$ SMA, SNAIL, SLUG), kao pokazatelj tumorske agresivnosti i jedan od parametara matičnosti;
5. I tumorske ćelije i ćelije margina su pokazale sposobnost formiranja kolonija, proliferacije i migracije, koje su se menjale tokom pasaža;
6. Ćelije u obe vrste kultura su imale sposobnost samo-obnavljanja što je pokazano testom formiranja sferoida, a ta sposobnost bila je izraženija u petoj pasaži u odnosu na prvu pasažu; ovo predstavlja još jednu potvrdu prisustva KMĆ u kulturama, kao i obogaćivanja kultura kancerskim matičnim ćelijama tokom vremena;
7. Oba tipa ćelijskih kultura su pokazala rezistenciju na antineoplastične agense, a hemoresistencija je bila izraženija u kulturama pete pasaže u odnosu na kulture prve pasaže;

Iz svega navedenog proističe zaključak o velikoj sličnosti tumora i tumorskih margina u pogledu njihovih ćelijskih i molekularnih karakteristika *in vitro*. Ključna informacija koja proističe iz ove studije je da su kancerske matične ćelije prisutne i u hirurškim marginama, što ukazuje na potrebu da se revidiraju stavovi vezani za širinu hirurške resekcije oralnog planocelularnog karcinoma.

## **7. LITERATURA**

## A

Abollo-Jiménez, F., Jiménez, R., Cobaleda, C., 2010. Physiological cellular reprogramming and cancer. *Semin. Cancer Biol.* doi:10.1016/j.semcancer.2010.02.002

Albers, A.E., Chen, C., Koeberle, B., Qian, X., Klussmann, J.P., Wollenberg, B., Kaufmann, A.M., 2012. Stem cells in squamous head and neck cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 81, 224–240. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.03.004

Alicandri-Ciuffelli, M., Bonali, M., Piccinini, A., Marra, L., Ghidini, A., Cunsolo, E.M., Maiorana, A., Presutti, L., Conte, P.F., 2013. Surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma: What is “close”? *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology.* doi:10.1007/s00405-012-2317-8

Allegra, E., Garozzo, A., Lombardo, N., De Clemente, M., Carey, T.E., 2006. Mutations and polymorphisms in mitochondrial DNA in head and neck cancer cell lines. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.*

Alt-Holland, A., Shamis, Y., Riley, K.N., DesRochers, T.M., Fusenig, N.E., Herman, I.M., Garlick, J.A., 2008. E-kadherin suppression directs cytoskeletal rearrangement and intraepithelial tumor cell migration in 3D human skin equivalents. *J. Invest. Dermatol.* doi:10.1038/jid.2008.102

Austin, T.W., Solar, G.P., Ziegler, F.C., Liem, L., Matthews, W., 1997. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood.*

## B

Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P., Sidransky, D., 2005. Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours, IARC Press.

Bass, A.J., Watanabe, H., Mermel, C.H., Yu, S., Perner, S., Verhaak, R.G., Kim, S.Y., Wardwell, L., Tamayo, P., Gat-Viks, I., Ramos, A.H., Woo, M.S., Weir, B.A., Getz, G., Beroukhi, R., O'Kelly, M., Dutt, A., Rozenblatt-Rosen, O., Dziunycz, P., Komisarof, J., Chirieac, L.R., Lafargue, C.J., Scheble, V., Wilbertz, T., Ma, C., Rao, S., Nakagawa, H., Stairs, D.B., Lin, L., Giordano, T.J., Wagner, P., Minna, J.D., Gazdar, A.F., Zhu, C.Q., Brose, M.S., Ceconello, I., Ribeiro, U., Marie, S.K., Dahl, O., Shivdasani, R.A., Tsao, M.S., Rubin, M.A., Wong, K.K., Regev, A., Hahn, W.C., Beer, D.G., Rustgi, A.K., Meyerson, M., 2009. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.* doi:10.1038/ng.465

Banna, G.L., Collovà, E., Gebbia, V., Lipari, H., Giuffrida, P., Cavallaro, S., Condorelli, R., Buscarino, C., Tralongo, P., Ferrà, F., 2010. Anticancer oral therapy: Emerging related issues. *Cancer Treat. Rev.* doi:10.1016/j.ctrv.2010.04.005

Battle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., De Herreros, A.G., 2000. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* doi:10.1038/35000034

Baum, B., Settleman, J., Quinlan, M.P., 2008. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2008.02.001

Baumann, M., Krause, M., 2010. CD44: A cancer stem cell-related biomarker with predictive potential for radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2244



Bhaijee, F., Pepper, D.J., Pitman, K.T., Bell, D., 2012. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: A review of current knowledge and future applications. *Head Neck*. doi:10.1002/hed.21801

Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D.P., Williams, K.P., Chadwick, K., Ling, L.E., Karanu, F.N., Bhatia, M., 2001. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat. Immunol.* doi:10.1038/84282

Biddle, A., Liang, X., Gammon, L., Fazil, B., Harper, L.J., Emich, H., Costea, D.E., Mackenzie, I.C., 2011. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1059

Binahmed, A., Nason, R.W., Abdoh, A.A., 2007. The clinical significance of the positive surgical margin in oral cancer. *Oral Oncol.* doi:10.1016/j.oraloncology.2006.10.001

Bjerkvig, R., Tysnes, B.B., Aboody, K.S., Najbauer, J., Terzis, A.J.A., 2005. Erratum: The origin of the cancer stem cell: Current controversies and new insights (*Nature Reviews Cancer* (2005) 5 (899-904)). *Nat. Rev. Cancer.* doi:10.1038/nrc1777

Bonnet, D., Dick, J.E., 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* doi:10.1038/nm0797-730

Braakhuis, B.J.M., Tabor, M.P., Kummer, J.A., Leemans, C.R., Brakenhoff, R.H., 2003. A genetic explanation of slaughter's concept of field cancerization: Evidence and clinical implications. *Cancer Res.*

Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., Kirchner, T., 2001. Variable  $\beta$ -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/pnas.171610498

Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., Helin, K., 2006. Genome-wide mapping of polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev.* doi:10.1101/gad.381706

Brandwein-Gensler, M., Teixeira, M.S., Lewis, C.M., Lee, B., Rolnitzky, L., Hille, J.J., Genden, E., Urken, M.L., Wang, B.Y., 2005. Oral squamous cell carcinoma: Histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am. J. Surg. Pathol.* doi:10.1097/01.pas.0000149687.90710.21

## C

Cabanillas, R., Llorente, J.L., 2009. The Stem Cell Network model: Clinical implications in cancer. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology.* doi:10.1007/s00405-008-0809-3

Califano, J., Van Der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., Sidransky, D., 1996. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. *Cancer Res.*

Calvo, A., Catena, R., Noble, M.S., Carbott, D., Gil-Bazo, I., Gonzalez-Moreno, O., Huh, J.I., Sharp, R., Qiu, T.H., Anver, M.R., Merlino, G., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Green, J.E., 2008. Identification of VEGF-regulated genes associated with increased lung metastatic potential: Functional involvement of tenascin-C in tumor growth and lung metastasis. *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2008.155

Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., Del Barrio, M.G., Portillo, F., Nieto, M.A., 2000. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* doi:10.1038/35000025

Chen, Y.C., Chen, Y.W., Hsu, H.S., Tseng, L.M., Huang, P.I., Lu, K.H., Chen, D.T., Tai, L.K., Yung, M.C., Chang, S.C., Ku, H.H., Chiou, S.H., Lo, W.L., 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.048

Cheng, A., Cox, D., Schmidt, B.L., 2008. Oral Squamous Cell Carcinoma Margin Discrepancy After Resection and Pathologic Processing. *J. Oral Maxillofac. Surg.* doi:10.1016/j.joms.2007.08.040

Cheng, G.Z., Chan, J., Wang, Q., Zhang, W., Sun, C.D., Wang, L.H., 2007. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1479

Cianfriglia, F., Di Gregorio, D.A., Manieri, A., 1999. Multiple primary tumours in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* doi:10.1016/S1368-8375(98)00105-5

Chikamatsu, K., Ishii, H., Takahashi, G., Okamoto, A., Moriyama, M., Sakakura, K., Masuyama, K., 2012. Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44+ head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head Neck*. doi:10.1002/hed.21732

Chikamatsu, K., Takahashi, G., Sakakura, K., Ferrone, S., Masuyama, K., 2011. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. doi:10.1002/hed.21420

Chiou, S.H., Yu, C.C., Huang, C.Y., Lin, S.C., Liu, C.J., Tsai, T.H., Chou, S.H., Chien, C.S., Ku, H.H., Lo, J.F., 2008. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4404

Chiou, S.H., Yu, C.C., Huang, C.Y., Lin, S.C., Liu, C.J., Tsai, T.H., Chou, S.H., Chien, C.S., Ku, H.H., Lo, J.F., 2008. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4404

Choudhari, S.K., Chaudhary, M., Gadbail, A.R., Sharma, A., Tekade, S., 2014. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. *Oral Oncol.* doi:10.1016/j.oraloncology.2013.09.011

Chong, C.R., Jänne, P.A., 2013. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat. Med.* doi:10.1038/nm.3388

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., Wahl, G.M., 2006. Cancer stem cells - Perspectives on

current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells, in: *Cancer Research*. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3126

Clay, M.R., Tabor, M., Owen, J.H., Carey, T.E., Bradford, C.R., Wolf, G.T., Wicha, M.S., Prince, M.E., 2010. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*. doi:10.1002/hed.21315

## **D**

Dalerba, P., Cho, R.W., Clarke, M.F., 2007. Cancer stem cells: Models and concepts, in: *Annual Review of Medicine*, Annual Review of Medicine. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 267–284. doi:10.1146/annurev.med.58.062105.204854

Dalianis, T., 2014. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (review). *Int. J. Oncol.* doi:10.3892/ijo.2014.2355

Davies, L., Welch, H.G., 2006. Epidemiology of head and neck cancer in the United States. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* doi:10.1016/j.otohns.2006.01.029

Deschler, DG., Moore, MG., Smith, RV., eds. *Quick Reference Guide to TNM Staging of Head and Neck Cancer and Neck Dissection Classification*, 4th ed. Alexandria, VA: American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery Foundation, 2014.

Di Fiore, R., Marcatti, M., Drago-Ferrante, R., D’Anneo, A., Giuliano, M., Carlisi, D., De Blasio, A., Querques, F., Pastore, L., Tesoriere, G., Vento, R., 2014. Mutant p53 gain of function can be at the root of dedifferentiation of human osteosarcoma MG63 cells into 3AB-OS cancer stem cells. *Bone*. doi:10.1016/j.bone.2013.12.021

Dick, J.E., 2008. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. doi:10.1182/blood-2008-08-077941

Dickenson, A.J., Currie, W.J.R., Avery, B.S., 1995. Screening for syphilis in patients with carcinoma of the tongue. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* doi:10.1016/0266-4356(95)90046-2

Dissanayaka, W.L., Pitiyage, G., Kumarasiri, P.V.R., Liyanage, R.L.P.R., Dias, K.D., Tilakaratne, W.M., 2012. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* doi:10.1016/j.oooo.2011.11.001

Dittmer, A., Hohlfeld, K., Lützkendorf, J., Müller, L.P., Dittmer, J., 2009. Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* doi:10.1007/s00018-009-0089-0

Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., Wicha, M.S., 2003. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* doi:10.1101/gad.1061803

## **E**

Eljabo, N., Nikolic, N., Carkic, J., Jelovac, D., Lazarevic, M., Tanic, N., Milasin, J., 2018. Genetic and epigenetic alterations in the tumour, tumour margins, and normal buccal mucosa of patients with oral cancer. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* doi:10.1016/j.ijom.2018.01.020

## **F**

F.L. Greene, D.L. Page, I.D. Fleming, A.G. Fritz, C.M. Balch, D.G. Haller, M.M. (Eds.), 2002. AJCC cancer staging manual (6th ed.). Springer, New York.

Feller, L.L., Khammissa, R.R.A.G., Kramer, B.B., Lemmer, J.J., 2013. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: Pathobiology. *Cancer Cell Int.* doi:10.1186/1475-2867-13-31

Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W.B., Fedorov, O., Morse, E.M., Keates, T., Hickman, T.T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M.R., Wang, Y., Christie, A.L., West, N., Cameron, M.J., Schwartz, B., Heightman, T.D., La Thangue, N., French, C.A., Wiest, O., Kung, A.L., Knapp, S., Bradner, J.E., 2010. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468, 1067–1073. doi:10.1038/nature09504

Funk, G.F., Sigman, J.D., Robinson, R.A., Johnson, R.E., Hoffman, H.T., 2002. Quantification of surgical margin shrinkage in the oral cavity. *Head Neck.* doi:10.1002/(sici)1097-0347(199707)19:4<281::aid-hed6>3.3.co;2-4

Furth, J., Kahn, M.C., 1937. The transmission of leukemia of mice with a single cell. *Am. J. Cancer.* doi:10.1158/ajc.1937.276

## **G**

Gandini, S., Botteri, E., Iodice, S., Boniol, M., Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P., Boyle, P., 2008. Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *Int. J. Cancer.* doi:10.1002/ijc.23033

Gao, L., Yan, L., Lin, B., Gao, J., Liang, X., Wang, Y., Liu, J., Zhang, S., Masao, I., 2011. Enhancive effects of Lewis y antigen on CD44-mediated adhesion and spreading

of human ovarian cancer cell line RMG-I. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* doi:10.1186/1756-9966-30-15

Gnepp, D.R., 2009. *Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck*, *Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck*. doi:10.1016/B978-1-4160-2589-4.X0001-0

Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M.S., Dontu, G., 2007. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell*. doi:10.1016/j.stem.2007.08.014

González-Moles, M.A., Scully, C., Ruiz-Ávila, I., Plaza-Campillo, J.J., 2013. The cancer stem cell hypothesis applied to oral carcinoma. *Oral Oncol.* doi:10.1016/j.oraloncology.2013.04.002

## **H**

Ha, P.K., Califano, J.A., 2004. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* doi:10.1177/154411130401500402

Han, J., Fujisawa, T., Husain, S.R., Puri, R.K., 2014. Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 14, 173. doi:10.1186/1471-2407-14-173

Harper, L.J., Piper, K., Common, J., Fortune, F., Mackenzie, I.C., 2007. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00617.x



He, T., Li, X., Lu, D., Tian, L., Xu, B., n.d. MiR-137 silencing of BRD4 suppresses oral squamous cell carcinoma cells proliferation, migration and invasion 8.

Heiden, K.B., Williamson, A.J., Doscas, M.E., Ye, J., Wang, Y., Liu, D., Xing, M., Prinz, R.A., Xu, X., 2014. The sonic hedgehog signaling pathway maintains the cancer stem cell self-renewal of anaplastic thyroid cancer by inducing snail expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* doi:10.1210/jc.2014-1844

Helliwell, T., Woolgar, J., 2013. Dataset for histopathology reporting of mucosal malignancies of the oral cavity. *R. Coll. Pathol.*

Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., Heeschen, C., 2007. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell.* doi:10.1016/j.stem.2007.06.002

Herreros-Villanueva, M., Zhang, J.S., Koenig, A., Abel, E. V., Smyrk, T.C., Bamlet, W.R., De Narvajias, A.A.M., Gomez, T.S., Simeone, D.M., Bujanda, L., Billadeau, D.D., 2013. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis.* doi:10.1038/oncsis.2013.23

Hewitt, H.B., 1958. Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic Leukaemia of CBA mice. *Br. J. Cancer.* doi:10.1038/bjc.1958.47

Hicks, W.L., North, J.H., Loree, T.R., Maamoun, S., Mullins, A., Orner, J.B., Bakamjian, V.Y., Shedd, D.P., 1998. Surgery as a single modality therapy for squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Am. J. Otolaryngol. - Head Neck Med. Surg.* doi:10.1016/S0196-0709(98)90061-8

Hinni, M.L., Ferlito, A., Brandwein-Gensler, M.S., Takes, R.P., Silver, C.E., Westra, W.H., Seethala, R.R., Rodrigo, J.P., Corry, J., Bradford, C.R., Hunt, J.L., Strojan, P., Devaney, K.O., Gnepp, D.R., Hartl, D.M., Kowalski, L.P., Rinaldo, A., Barnes, L., 2013. Surgical margins in head and neck cancer: A contemporary review. *Head Neck*. doi:10.1002/hed.23110

Hjortdal, O., Naess, A., Berner, A., 1995. Squamous cell carcinomas of the lower lip. *J. Cranio-Maxillofacial Surg*. doi:10.1016/S1010-5182(05)80252-5

Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., Melton, D.A., 2008. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol*. doi:10.1038/nbt1418

## **I**

Iglesias-Linares, A., Yañez-Vico, R.M., González-Moles, M.A., 2010. Potential role of HDAC inhibitors in cancer therapy: Insights into oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.01.009

## **J**

Januszyk, M., Gurtner, G.C., 2013. High-Throughput Single-Cell Analysis for Wound Healing Applications. *Adv. Wound Care*. doi:10.1089/wound.2012.0395

Jelovac, D.B., Tepavcevic, Z., Nikolic, N., Ilic, B., Eljabo, N., Popovic, B., Carkic, J., Konstantinovic, V., Vukadinovic, M., Milicic, B., Milasin, J., 2016. The amplification of c-erb-B2 in cancer-free surgical margins is a predictor of poor outcome in oral

squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 45, 700–705.  
doi:10.1016/j.ijom.2015.11.014

Johnson, J.T., 2004. Oral & maxillofacial pathology. *Am. J. Otolaryngol.*  
doi:10.1016/0196-0709(95)90086-1

Jones, A.S., Bin Hanafi, Z., Nadapalan, V., Roland, N.J., Kinsella, A., Helliwell, T.R.,  
1996. Do positive resection margins after ablative surgery for head and neck cancer  
adversely affect prognosis? A study of 352 patients with recurrent carcinoma following  
radiotherapy treated by salvage surgery. *Br. J. Cancer.* doi:10.1038/bjc.1996.327

Jones, J.C.R., 2008. Reduction of Contamination of Epithelial Cultures by Fibroblasts.  
*Cold Spring Harb. Protoc.* 2008, pdb.prot4478. doi:10.1101/pdb.prot4478

Joshua, B., Kaplan, M.J., Doweck, I., Pai, R., Weissman, I.L., Prince, M.E., Ailles,  
L.E., 2012. Frequency of cells expressing CD44, a Head and Neck cancer stem cell  
marker: Correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck.* doi:10.1002/hed.21699

## **K**

Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J.*  
*Clin. Invest.* doi:10.1172/JCI39104

Kang, H., Kiess, A., Chung, C.H., 2015. Emerging biomarkers in head and neck cancer  
in the era of genomics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* doi:10.1038/nrclinonc.2014.192

Karhadkar, S.S., Bova, G.S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs,  
J.T., Berman, D.M., Beachy, P.A., 2004. Hedgehog signalling in prostate regeneration,  
neoplasia and metastasis. *Nature.* doi:10.1038/nature02962

Kauffman, S., 1971. Differentiation of malignant to benign cells. *J. Theor. Biol.*  
doi:10.1016/0022-5193(71)90020-8

Keymoosi, H., Asgari, M., Gheytauchi, E., Madjd, Z., Shariftabrizi, A., 2014. ALDH1  
in Combination with CD44 as Putative Cancer Stem Cell Markers are Correlated with  
Poor Prognosis in Urothelial Carcinoma of the Urinary Bladder. *Asian Pacific J. Cancer  
Prev.* doi:10.7314/apjcp.2014.15.5.2013

Kneser, U., Schaefer, D.J., Polykandriotis, E., Horch, R.E., 2006. Tissue engineering of  
bone: The reconstructive surgeon's point of view. *J. Cell. Mol. Med.*  
doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00287.x

Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Banerjee, S., Ahmad, A., Kim, H.R.C., Sarkar, F.H., 2009.  
miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and  
invasion of prostate cancer cells. *Stem Cells.* doi:10.1002/stem.101

Koontongkaew, S., 2013. The tumor microenvironment contribution to development,  
growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J. Cancer.*  
doi:10.7150/jca.5112

Kowalski, L.P., Bagietto, R., Lara, J.R.L., Santos, R.L., Silva, J.F., Magrin, J., 2000.  
Prognostic significance of the distribution of neck node metastasis from oral carcinoma.  
*Head Neck.* doi:10.1002/(SICI)1097-0347(200005)22:3<207::AID-HED1>3.0.CO;2-9

Krogh, P., Hald, B., Holmstrup, P., 1987. Possible mycological etiology of oral mucosal  
cancer: Catalytic potential of infecting candida albicans and other yeasts in production  
of N-nitrosobenzylmethylamine. *Carcinogenesis.* doi:10.1093/carcin/8.10.1543

Krisanaprakornkit, S., Iamaroon, A., 2012. Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma. *ISRN Oncol.* doi:10.5402/2012/681469

Krishnamurthy, S., Dong, Z., Vodopyanov, D., Imai, A., Helman, J.I., Prince, M.E., Wicha, M.S., Nör, J.E., 2010. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1712

Krishnamurthy, S., Nör, J.E., 2012. (28) Head and neck cancer stem cells. *J. Dent. Res.* doi:10.1177/0022034511423393

Kumar, S.M., Liu, S., Lu, H., Zhang, H., Zhang, P.J., Gimotty, P.A., Guerra, M., Guo, W., Xu, X., 2012. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene.* doi:10.1038/onc.2011.656

Kupferman, M.E., Jiffar, T., El-Naggar, A., Yilmaz, T., Zhou, G., Xie, T., Feng, L., Wang, J., Holsinger, F.C., Yu, D., Myers, J.N., 2010. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* doi:10.1038/onc.2009.486

Kyrgidis, A., Vahtsevanos, K., Tzellos, T.G., Xirou, P., Kitikidou, K., Antoniadis, K., Zouboulis, C.C., Triaridis, S., 2010. Clinical, histological and demographic predictors for recurrence and second primary tumours of head and neck basal cell carcinoma. A 1062 patient-cohort study from a tertiary cancer referral hospital. *Eur. J. Dermatology.* doi:10.1684/ejd.2010.0903

## **L**

Lee, J., Taneja, V., Vassallo, R., 2012. Cigarette smoking and inflammation: Cellular and molecular mechanisms. *J. Dent. Res.* doi:10.1177/0022034511421200

Lee, Y.C.A., Marron, M., Benhamou, S., Bouchardy, C., Ahrens, W., Pohlmann, H., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Agudo, A., Castellsague, X., Bencko, V., Holcatova, I., Kjaerheim, K., Merletti, F., Richiardi, L., Macfarlane, G.J., Macfarlane, T. V., Talamini, R., Barzan, L., Canova, C., Simonato, L., Conway, D.I., McKinney, P.A., Lowry, R.J., Sneddon, L., Znaor, A., Healy, C.M., McCartan, B.E., Brennan, P., Hashibe, M., 2009. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0910

Leemans, C.R., Tiwari, R., Nauta, J.J.P., Waal, I. Van Der, Snow, G.B., 1994. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer.* doi:10.1002/1097-0142(19940101)73:1<187::AID-CNCR2820730132>3.0.CO;2-J

Li, A., Xia, X., Yeh, J., Kua, H., Liu, H., Mishina, Y., Hao, A., Li, B., 2014. PDGF-AA promotes osteogenic differentiation and migration of mesenchymal stem cell by down-regulating PDGFR $\alpha$  and derepressing BMP-Smad1/5/8 signaling. *PLoS One.* doi:10.1371/journal.pone.0113785

Li, E., 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* doi:10.1038/nrg887

Liao, C.T., Chang, J.T.C., Wang, H.M., Ng, S.H., Hsueh, C., Lee, L.Y., Lin, C.H., Chen, I.H., Huang, S.F., Cheng, A.J., Yen, T.C., 2008. Analysis of risk factors of

predictive local tumor control in oral cavity cancer. *Ann. Surg. Oncol.*  
doi:10.1245/s10434-007-9761-5

Lim, J., Thiery, J.P., 2012. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development.* doi:10.1242/dev.071209

Lim, Y.C., Oh, S.-Y., Cha, Y.Y., Kim, S.-H., Jin, X., Kim, H., 2011. Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 47, 83–91. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.11.011

Lingen, M.W., Kalmar, J.R., Karrison, T., Speight, P.M., 2008. Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncol.*  
doi:10.1016/j.oraloncology.2007.06.011

Liu, L., Wei, X., Ling, J., Wu, L., Xiao, Y., 2011. Expression pattern of Oct-4, sox2, and c-Myc in the primary culture of human dental pulp derived cells. *J. Endod.*  
doi:10.1016/j.joen.2010.12.012

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25, 402–408.  
doi:10.1006/meth.2001.1262

Lo, J.F., Yu, C.C., Chiou, S.H., Huang, C.Y., Jan, C.I., Lin, S.C., Liu, C.J., Hu, W.Y., Yu, Y.H., 2011. The epithelial-mesenchymal transition mediator S100A4 maintains cancer-initiating cells in head and neck cancers. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2350

Lo, M., Wang, Y.Z., Gout, P.W., 2008. The xc- cystine/glutamate antiporter: A potential target for therapy of cancer and other diseases. *J. Cell. Physiol.* doi:10.1002/jcp.21366

Locke, M., Heywood, M., Fawell, S., Mackenzie, I.C., 2005. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0931

## **M**

Marck, V.L. Van, Bracke, M.E., 2000. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Human Cancer., in: Madame Curie Bioscience Database [Internet].

Markiewicz, A., Wełnicka-Jaśkiewicz, M., Seroczyńska, B., Skokowski, J., Majewska, H., Szade, J., Żaczek, A.J., 2014. Epithelial-mesenchymal transition markers in lymph node metastases and primary breast tumors - Relation to dissemination and proliferation. *Am. J. Transl. Res.*

Marron, M., Boffetta, P., Zhang, Z.F., Zaridze, D., Wunsch-Filho, V., Winn, D.M., Wei, Q., Talamini, R., Szeszenia-Dabrowska, N., Sturgis, E.M., Smith, E., Schwartz, S.M., Rudnai, P., Purdue, M.P., Olshan, A.F., Eluf-Neto, J., Muscat, J., Morgenstern, H., Menezes, A., McClean, M., Matos, E., Mates, I.N., Lissowska, J., Levi, F., Lazarus, P., La Vecchia, C., Koifman, S., Kelsey, K., Herrero, R., Hayes, R.B., Franceschi, S., Fernandez, L., Fabianova, E., Daudt, A.W., Dal Maso, L., Curado, M.P., Cadoni, G., Chen, C., Castellsague, X., Boccia, S., Benhamou, S., Ferro, G., Berthiller, J., Brennan, P., Møller, H., Hashibe, M., 2009. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int. J. Epidemiol.* doi:10.1093/ije/dyp291



Meier, J.D., Oliver, D.A., Varvares, M.A., 2005. Surgical margin determination in head and neck oncology: Current clinical practice. The results of an International American Head and Neck Society member survey. *Head Neck*. doi:10.1002/hed.20269

Meshorer, E., Misteli, T., 2006. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* doi:10.1038/nrm1938

Mio, C., Conzatti, K., Baldan, F., Allegri, L., Sponziello, M., Rosignolo, F., Russo, D., Filetti, S., Damante, G., 2018. BET bromodomain inhibitor JQ1 modulates microRNA expression in thyroid cancer cells. *Oncol. Rep.* 39, 582–588. doi:10.3892/or.2017.6152

Mio, C., Lavarone, E., Conzatti, K., Baldan, F., Toffoletto, B., Puppini, C., Filetti, S., Durante, C., Russo, D., Orlicchio, A., Di Cristofano, A., Di Loreto, C., Damante, G., 2016. MCM5 as a target of BET inhibitors in thyroid cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* 23, 335–347. doi:10.1530/ERC-15-0322

Mishra, A., Verma, M., 2010. Cancer biomarkers: Are we ready for the prime time? *Cancers (Basel)*. doi:10.3390/cancers2010190

Misra, A., Pandey, C., Sze, S.K., Thanabalu, T., 2012. Hypoxia Activated EGFR Signaling Induces Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT). *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0049766

Mistry, R.C., Qureshi, S.S., Kumaran, C., 2005. Post-resection mucosal margin shrinkage in oral cancer: Quantification and significance. *J. Surg. Oncol.* doi:10.1002/jso.20285

Mitra, A., Mishra, L., Li, S., 2013. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. Trends Biotechnol. doi:10.1016/j.tibtech.2013.03.006

Moon, J.H., Kwon, S., Jun, E.K., Kim, A., Whang, K.Y., Kim, H., Oh, S., Yoon, B.S., You, S., 2011. Nanog-induced dedifferentiation of p53-deficient mouse astrocytes into brain cancer stem-like cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.070

Morel, A.P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., Puisieux, A., 2008. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. PLoS One. doi:10.1371/journal.pone.0002888

Moreno-Bueno, G., Portillo, F., Cano, A., 2008. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. Oncogene. doi:10.1038/onc.2008.346

## N

Nason, R.W., Binahmed, A., Pathak, K.A., Abdoh, A.A., Sándor, G.K.B., 2009. What is the adequate margin of surgical resection in oral cancer? Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology. doi:10.1016/j.tripleo.2008.11.013

Nassar, A., Radhakrishnan, A., Cabrero, I.A., Cotsonis, G.A., Cohen, C., 2010. Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: A tissue microarray-based study. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. doi:10.1097/PAI.0b013e3181dddb20

Neville, B., Damm, D., Allen, C., 2008. Oral and Maxillofacial Pathology. Saunders

Notani, P.N., Jayant, K., 1987. Role of Diet in Upper Aerodigestive Tract Cancers. *Nutr. Cancer*. doi:10.1080/01635588709513945

Nicodeme, E., Jeffrey, K.L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C.-W., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., White, J., Kirilovsky, J., Rice, C.M., Lora, J.M., Prinjha, R.K., Lee, K., Tarakhovsky, A., 2010. Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 468, 1119–1123. doi:10.1038/nature09589

## **O**

Okamoto, A., Chikamatsu, K., Sakakura, K., Hatsushika, K., Takahashi, G., Masuyama, K., 2009. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.10.003

Olsen, C.L., Hsu, P.P., Glienke, J., Rubanyi, G.M., Brooks, A.R., 2004. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. *BMC Cancer*. doi:10.1186/1471-2407-4-43

Osman, T.A., Parajuli, H., Sapkota, D., Ahmed, I.A.H., Johannessen, A.C., Costea, D.E., 2015. The low-affinity nerve growth factor receptor p75NTR identifies a transient stem cell-like state in oral squamous cell carcinoma cells. *J. Oral Pathol. Med.* 44, 410–419. doi:10.1111/jop.12251

## **P**

Park, C.Y., Tseng, D., Weissman, I.L., 2009. Cancer stem cell-directed therapies: Recent data from the laboratory and clinic. *Mol. Ther.* doi:10.1038/mt.2008.254

Park, I.K., Morrison, S.J., Clarke, M.F., 2004. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J. Clin. Invest.* doi:10.1172/JCI200420800

Pepa, C. Della, Tonini, G., Pisano, C., Di Napoli, M., Cecere, S.C., Tambaro, R., Facchini, G., Pignata, S., 2015. Ovarian cancer standard of care: Are there real alternatives? *Chin. J. Cancer.* doi:10.5732/cjc.014.10274

Peri, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., Christofori, G., 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* doi:10.1038/32433

Phung, Y.T., Barbone, D., Broaddus, V.C., Ho, M., 2011. Rapid generation of in vitro multicellular spheroids for the study of monoclonal antibody therapy. *J. Cancer* 2, 507–514. doi:10.7150/jca.2.507

Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., Ailles, L.E., 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 973–978. doi:10.1073/pnas.0610117104

Priya, S., Pai, P., D'Cruz, A., 2012. Cut margins and disease control in oral cancers. *J. Cancer Res. Ther.* doi:10.4103/0973-1482.95178

## Q

Qin, X., Yan, M., Li, R., Ye, D., Zhang, J., Xu, Q., Feng, Y., Sun, Q., Jiang, C., Chen, W., 2018. Identification and characterization of a highly metastatic epithelial cancer cell line from rat tongue cancer. *Arch. Oral Biol.* doi:10.1016/j.archoralbio.2018.07.010

Qin, X., Yan, M., Zhang, J., Xu, Q., Lv, Z., Chen, W., 2016. Establishment of a highly metastatic buccal squamous cell carcinoma cell line from a Sprague-Dawley Rat. *Arch. Oral Biol.* doi:10.1016/j.archoralbio.2015.11.003

## **R**

Radisky, D.C., LaBarge, M.A., 2008. Epithelial-Mesenchymal Transition and the Stem Cell Phenotype. *Cell Stem Cell.* doi:10.1016/j.stem.2008.05.007

Rasper, M., Schäfer, A., Piontek, G., Teufel, J., Brockhoff, G., Ringel, F., Heindl, S., Zimmer, C., Schlegel, J., 2010. Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro. Oncol.* doi:10.1093/neuonc/noq070

Rawal, R.M., Shah, K.A., Kothari, K.C., Shah, M.J., Patel, S.S., 2014. Cancer Stem Cells and Stemness Markers in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* doi:10.7314/apjcp.2014.15.20.8549

Reidy, J., McHugh, E., Stassen, L.F.A., 2011. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon.* doi:10.1016/j.surge.2011.01.010

Reis, P.P., Waldron, L., Perez-Ordóñez, B., Pintilie, M., Galloni, N.N., Xuan, Y., Cervigne, N.K., Warner, G.C., Makitie, A.A., Simpson, C., Goldstein, D., Brown, D., Gilbert, R., Gullane, P., Irish, J., Jurisica, I., Kamel-Reid, S., 2011. A gene signature in histologically normal surgical margins is predictive of oral carcinoma recurrence. *BMC Cancer.* doi:10.1186/1471-2407-11-437

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L., 2001. Weissman - 414105a0.pdf. *Nature.* doi:10.1038/35102167

Rivera, C., 2015. Essentials of oral cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*

Rothenberg, S.M., Ellisen, L.W., 2012. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Invest.* doi:10.1172/JCI59889

## S

Saghraivanian, N., Anvari, K., Ghazi, N., Memar, B., Shahsavari, M., Aghaee, M.A., 2017. Expression of p63 and CD44 in oral squamous cell carcinoma and correlation with clinicopathological parameters. *Arch. Oral Biol.* 82. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.06.011

Sánchez-Tilló, E., Lázaro, A., Torrent, R., Cuatrecasas, M., Vaquero, E.C., Castells, A., Engel, P., Postigo, A., 2010. ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene.* doi:10.1038/onc.2010.102

Sawairz, F.A., Irwin, C.R., Gordon, D.J., Leonard, A.G., Stephenson, M., Napier, S.S., 2003. Invasive front grading: Reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* doi:10.1034/j.1600-0714.2003.00060.x

Sciubba, J.J., 2001. Oral cancer: The importance of early diagnosis and treatment. *Am. J. Clin. Dermatol.* doi:10.2165/00128071-200102040-00005

Schatton, T., Frank, N.Y., Frank, M.H., 2009. Identification and targeting of cancer stem cells. *BioEssays.* doi:10.1002/bies.200900058

Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., Fuhlbrigge, R.C., Kupper, T.S.,

Sayegh, M.H., Frank, M.H., 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*. doi:10.1038/nature06489

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089

SF, C., YC, C., Nieh, S., CL, L., CY, Y., YS, L., Chen, S.-F., Chang, Y.-C., Nieh, S., Liu, C.-L., Yang, C.-Y., Lin, Y.-S., 2012. Nonadhesive culture system as a model of rapid sphere formation with cancer stem cell properties. *PLoS One* 7, e31864–e31864. doi:10.1371/journal.pone.0031864

Shakib, K., Schratzenholz, A., Soskic, V., 2011. Stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 49, 503–6. doi:10.1016/j.bjoms.2010.07.016

Shmelkov, S. V., St.Clair, R., Lyden, D., Rafii, S., 2005. AC133/CD133/Prominin-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* doi:10.1016/j.biocel.2004.08.010

Simple, M., Suresh, A., Das, D., Kuriakose, M.A., 2015. Cancer stem cells and field cancerization of Oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* doi:10.1016/j.oraloncology.2015.04.006

Slootweg, P.J., Hordijk, G.J., Schade, Y., Van Es, R.J.J., Koole, R., 2002. Treatment failure and margin status in head and neck cancer. A critical view on the potential value of molecular pathology. *Oral Oncol.* doi:10.1016/S1368-8375(01)00092-6

Smits, R.W.H., Koljenovic, S., Hardillo, J.A., Ten Hove, I., Meeuwis, C.A., Sewnaik, A., Dronkers, E.A.C., Bakker Schut, T.C., Langeveld, T.P.M., Molenaar, J., Hegt, V.N.,

Puppels, G.J., Baatenburg De Jong, R.J., 2016. Resection margins in oral cancer surgery: Room for improvement. *Head Neck*. doi:10.1002/hed.24075

Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines., 2007. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.

Sobreira, T.J.P., Davidson, B., Laudet, V., Pereira, A.C., Simoes-Costa, M., Schubert, M., Lowe, C.J., Aronowicz, J., Schechtman, D., Xavier-Neto, J., de Oliveira, P.S.L., Pani, A., Bronner, M., Sweeney, S., Marletaz, F., Brunet, F., 2010. Structural shifts of aldehyde dehydrogenase enzymes were instrumental for the early evolution of retinoid-dependent axial patterning in metazoans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/pnas.1011223108

Society, A.C., 2018. Cancer Facts and Figures 2018 [WWW Document]. *Am. Cancer Soc.*

Specenier, P.M., Vermorken, J.B., 2007. Neoadjuvant chemotherapy in head and neck cancer: Should it be revisited? *Cancer Lett.* doi:10.1016/j.canlet.2007.06.015

Squier, C.A., Kremer, M.J., 2001. Biology of oral mucosa and esophagus. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* doi:10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003443

Stephens, P., Genever, P., 2007. Non-epithelial oral mucosal progenitor cell populations. *Oral Dis.* doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01314.x

Sun, S., Wang, Z., 2011. Head neck squamous cell carcinoma c-Met<sup>+</sup> cells display cancer stem cell properties and are responsible for cisplatin-resistance and metastasis. *Int. J. Cancer.* doi:10.1002/ijc.25927



Sutton, D.N., Brown, J.S., Rogers, S.N., Vaughan, E.D., Woolgar, J.A., 2003. The prognostic implications of the surgical margin in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* doi:10.1054/ijom.2002.0313

## T

Thiery, J.P., 2002. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* doi:10.1038/nrc822

Trujillo, K.A., Heaphy, C.M., Mai, M., Vargas, K.M., Jones, A.C., Vo, P., Butler, K.S., Joste, N.E., Bisoffi, M., Griffith, J.K., 2011. Markers of fibrosis and epithelial to mesenchymal transition demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors. *Int. J. Cancer.* doi:10.1002/ijc.25788

Tsai, L.L., Hu, F.W., Lee, S.S., Yu, C.H., Yu, C.C., Chang, Y.C., 2014. Oct4 mediates tumor initiating properties in oral squamous cell carcinomas through the regulation of epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0087207

Tseng, C.N., Huang, C.F., Cho, C.L., Chang, H.W., Huang, C.W., Chiu, C.C., Chang, Y.F., 2013. Brefeldin A effectively inhibits cancer stem cell-like properties and MMP-9 activity in human colorectal cancer cells. *Molecules.* doi:10.3390/molecules180910242

Tsuji, T., Ibaragi, S., Shima, K., Hu, M.G., Katsurano, M., Sasaki, A., Hu, G.F., 2008. Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12 CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1444

Tudor, D., Locke, M., Owen-Jones, E., Mackenzie, I.C., 2004. Intrinsic patterns of behavior of epithelial stem cells, in: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. doi:10.1111/j.1087-0024.2004.09310.x

Turley, E.A., Veiseh, M., Radisky, D.C., Bissell, M.J., 2008. Mechanisms of disease: Epithelial-mesenchymal transition - Does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat. Clin. Pract. Oncol.* doi:10.1038/ncponc1089

## V

Vaiphei, K., Sinha, S.K., Kochhar, R., 2014. Comparative Analysis of Oct4 in Different Histological Subtypes of Esophageal Squamous Cell Carcinomas in Different Clinical Conditions. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 15, 3519–3524. doi:10.7314/apjcp.2014.15.8.3519

Valk-Lingbeek, M.E., Bruggeman, S.W.M., Van Lohuizen, M., 2004. Stem cells and cancer: The polycomb connection. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2004.08.005

Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W.S., Bernstein, I.D., 2000. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat. Med.* doi:10.1038/81390

Virag, P., Fischer-Fodor, E., Perde-Schrepler, M., Brie, I., Tatomir, C., Balacescu, L., Berindan-Neagoe, I., Victor, B., Balacescu, O., 2013. Oxaliplatin induces different cellular and molecular chemoresistance patterns in colorectal cancer cell lines of identical origins. *BMC Genomics*. doi:10.1186/1471-2164-14-480

Vogel, C., Marcotte, E.M., 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* doi:10.1038/nrg3185

## W

Wang, S.J., Bourguignon, L.Y.W., 2011. Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance. *Am. J. Pathol.* doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.077

Watts, J.M.K., 1961. The importance of the Plummer-Vinson syndrome in the aetiology of carcinoma of the upper gastro-intestinal tract. *Postgrad. Med. J.* doi:10.1136/pgmj.37.431.523

Warnakulasuriya, S., 2009. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* doi:10.1016/j.oraloncology.2008.06.002

Warrell, R.P.J., Frankel, S.R., Miller, W.H.J., Scheinberg, D.A., Itri, L.M., Hittelman, W.N., Vyas, R., Andreeff, M., Tafuri, A., Jakubowski, A., Gabrilove, J., Gordon, M.S., Dmitrovsky, E., 1991. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *N. Engl. J. Med.* doi:10.1056/NEJM199105163242002

Weijers, M., Snow, G.B., Bezemer, D.P., van der Wal, J.E., van der Waal, I., 2004. The status of the deep surgical margins in tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma and risk of local recurrence; an analysis of 68 patients. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* doi:10.1054/ijom.2002.0469

Wicha, M.S., Liu, S., Dontu, G., 2006. Cancer stem cells: An old idea - A paradigm shift. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3153

Wilson, G.D., Marples, B., Galoforo, S., Geddes, T.J., Thibodeau, B.J., Grenman, R., Akervall, J., 2013. Isolation and genomic characterization of stem cells in head and

neck cancer. *Head Neck-Journal Sci. Spec. Head Neck* 35, 1573–1582.  
doi:10.1002/hed.23184

Wong, K., Rubenthiran, U., Jothy, S., 2003. Motility of colon cancer cells: Modulation by CD44 isoform expression. *Exp. Mol. Pathol.* 75, 124–130. doi:10.1016/S0014-4800(03)00053-4

Wong, L.S., McMahon, J., Devine, J., McLellan, D., Thompson, E., Farrow, A., Moos, K., Ayoub, A., 2012. Influence of close resection margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal carcinoma. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* doi:10.1016/j.bjoms.2011.05.008

Wu, Y., Wu, P.Y., 2009. CD133 as a Marker for Cancer Stem Cells: Progresses and Concerns. *Stem Cells Dev.* doi:10.1089/scd.2008.0338

## X

Xia, H., Cheung, W.K.C., Sze, J., Lu, G., Jiang, S., Yao, H., Bian, X.W., Poon, W.S., Kung, H.F., Lin, M.C., 2010. miR-200a regulates epithelial-mesenchymal to stem-like transition via ZEB2 and  $\beta$ -catenin signaling. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M110.133744

## Y

Yan, M., Liu, Q., 2016. Differentiation therapy: A promising strategy for cancer treatment. *Chin. J. Cancer.* doi:10.1186/s40880-015-0059-x

Yan, M., Zhang, Y., He, B., Xiang, J., Wang, Z.F., Zheng, F.M., Xu, J., Chen, M.Y., Zhu, Y.L., Wen, H.J., Wan, X.B., Yue, C.F., Yang, N., Zhang, W., Zhang, J.L., Wang,

J., Wang, Y., Li, L.H., Zeng, Y.X., Lam, E.W.F., Hung, M.C., Liu, Q., 2014. IKKa restoration via EZH2 suppression induces nasopharyngeal carcinoma differentiation. *Nat. Commun.* doi:10.1038/ncomms4661

Yanamoto, S., Kawasaki, G., Yamada, S., Yoshitomi, I., Kawano, T., Yonezawa, H., Rokutanda, S., Naruse, T., Umeda, M., 2011. Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral Oncol.* 47, 855–860. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.06.501

Yang, M.H., Hsu, D.S.S., Wang, H.W., Wang, H.J., Lan, H.Y., Yang, W.H., Huang, C.H., Kao, S.Y., Tzeng, C.H., Tai, S.K., Chang, S.Y., Lee, O.K.S., Wu, K.J., 2010. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* doi:10.1038/ncb2099

Yoshikawa, M., Tsuchihashi, K., Ishimoto, T., Yae, T., Motohara, T., Sugihara, E., Onishi, N., Masuko, T., Yoshizawa, K., Kawashiri, S., Mukai, M., Asoda, S., Kawana, H., Nakagawa, T., Saya, H., Nagano, O., 2013. XCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3609-T

## **Z**

Zhang, P., Zhang, Y., Mao, L., Zhang, Z., Chen, W., 2009. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes. *Cancer Lett.* doi:10.1016/j.canlet.2008.12.015

Zhang, Q., Shi, S., Yen, Y., Brown, J., Ta, J.Q., Le, A.D., 2010. A subpopulation of CD133+ cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett.* doi:10.1016/j.canlet.2009.08.010

Zhou, L., Wei, X., Cheng, L., Tian, J., Jiang, J.J., 2007. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope.* doi:10.1097/01.mlg.0000251586.15299.35

## **8. BIOGRAFIJA**

Miloš M. Lazarević rođen je 31.08.1988. godine u Leskovcu, Republika Srbija. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2007. godine i diplomirao u januaru 2013. sa prosečnom ocenom 9,69. Lekarski staž obavio je na Stomatološkom fakultetu u Beogradu, a državni ispit je položio u martu 2014. godine. Doktorske studije je upisao u oktobru 2013. godine i položio sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00. Od februara 2017. godine angažovan je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije, pod nazivom “Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije”, evidencioni broj 175075. Od školske 2017/2018. godine angažovan je u obavljanju praktične nastave na predmetu Opšta i oralna patologija, u okviru integrisanih akademskih studija Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Do sada je objavio 8 radova na SCI listi.



## **9. PRILOG**

*Prilog 1.*

STOMATOLOŠKI FAKULTET  
UNIVERZITET U BEOGRADU

## INFORMATOR ZA ISPITANIKE

**Naslov istraživanja:**

### **„*IN-VITRO* ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA MATIČNOSTI ĆELIJA POREKLOM ODORALNOG PLANOCELULARNOG KARCINOMA“**

**Plan i svrha istraživanja**

Studija se bavi istraživanjem karcinomskih ćelija koje se izoluju iz tumora usne šupljine. Tumorske ćelije su oduvek bile interesantne u medicini i stomatologiji u cilju istraživanja njihovih osobina, dok su ćelije na periferiji tumora još uvek nedovoljno ispitivane.

Cilj ovog istraživanja biće ispitivanje osobina i razlika između ćelija unutar samog tumora i ćelija koje se nalaze na njegovoj periferiji.

Istraživanje će biti sprovedeno na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, u okviru izrade doktorske disertacije.

Za učešće u studiji ne postoji novčana naknada.

Ne postoji sukob interesa od strane istraživača uključenih u studiju.

Nakon potpisivanja **Saglasnosti**, uzimanja istorije bolesti i standardne hiruške procedure, mali deo izvađenog tumora i njegove periferije će biti transportovan u odgovarajućem medijumu u laboratoriju Stomatološkog fakulteta radi daljeg istraživanja.

**Rizici po pacijenta**

U literaturi ne postoje podaci o postojanju rizika u vezi sa ovakvim procedurama.

### **Značaj istraživanja**

Moguća korist ove studije odnosi se na razumevanje ponašanja tumorskih ćelija i njenu eventualnu primenu u daljim istraživanjima terapije karcinoma.

### **Tajnost podataka**

Dokumentacija o pacijentu je poverljiva. Uvid u medicinsku dokumentaciju, osim ordinirajućeg lekara, imaće samo članovi istraživačkog tima, a za objavljivanje će biti korišćeni isključivo anonimni studijski podaci.

### **Pacijent će blagovremeno biti obavešten ako nove informacije postanu dostupne**

Pacijent će na vreme biti obavešten ako dođe do bilo kakvih promena u istraživanju ili ako nove informacije u nauci i praksi postanu dostupne. Sve informacije će moći da dobije od članova istraživačkog tima.

### **Dobrovoljno učestvovanje i uslovi povlačenja iz studije**

Učestvovanje u studiji je potpuno dobrovoljno. Povlačenje iz studije je moguće u svakom trenutku iz bilo kog razloga, i neće imati uticaja na način i ishod terapije pacijenta.

### **Približan broj učesnika u studiji**

Približan broj učesnika u studiji će biti: 5 pacijenata.

### **Koga pitati**

Ukoliko u bilo kom trenutku poželite više informacija o ovom istraživanju, molimo Vas da se obratite dr Milošu Lazareviću, sa Stomatološkog fakulteta u Beogradu (064/4901268).

Prilog 2.

Naslov studije:

**„IN-VITRO ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA MATIČNOSTI  
ĆELIJA POREKLOM ODORALNOG PLANOCELULARNOG  
KARCINOMA“**

**SAGLASNOST**

Nakon što sam pročitao/la *Informator za pacijente* gde je opisan postupak i izvođenje istraživanja, informisan/a sam o prirodi i ciljevima ove studije kao i o potencijalnim rizicima i koristima. Imao/la sam priliku da postavim pitanja u vezi sa studijom i dobio/la zadovoljavajuće odgovore.

Razumem da je moje učešće

---

(Ime i prezime)

potpuno dobrovoljno i da sam slobodan/na da povučem svoj pristanak u bilo kom trenutku bez davanja bilo kakvih razloga, što neće uticati na način i ishod terapije.

Svaka informacija u vezi sa mnom biće poverljiva, a samo će anonimni studijski podaci biti korišćeni za objavljivanje.

Slažem se da informacije u vezi samnom mogu biti poslate u druge zemlje, unutar i izvan Evropske unije.

Dobrovoljno dajem pristanak za učešće ikorišćenju ćelija koje se izoluju iz tumora i perifernog tkiva tumora uistraživanju navedenom u okviru *Informatora za pacijente*.

Ime i prezime ispitanika \_\_\_\_\_

(štampanim slovima)

Potpis ispitanika \_\_\_\_\_

Prilog 3.

## Изјава о ауторству

Потписани **Miloš Lazarević**

број индекса **4001/2013**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

***In-vitro* испитивање карактеристика матичности ћелија пореклом од оралног планоцелуларног карцинома**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Prilog 4.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Miloš Lazarević**

Број индекса **4001/2013**

Студијски програм **Bazične stomatološke nauke**

Наслов рада ***In-vitro* ispitivanje karakteristika matičnosti ćelija poreklom od oralnog planocelularnog karcinoma**

Ментори **prof. dr Jelena Milašin, doc. dr Milan Petrović**

Потписани/а \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

***In-vitro* испитивање карактеристика матичности ћелија пореклом од оралног планоцелуларног карцинома**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.