

OSC-19 hücre hattı kullanımı ile ksenograft oral yassı hücreli karsinoma fare modelinin geliştirilmesi

Development of xenograft oral squamous cell carcinoma mouse model

Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur Tuncer
İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0001-8233-1839

Dr. Betül Sümeyra Akça
İstanbul Aydın Üniversitesi, Diş hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0001-5292-692X

Yeliz Ekici
İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0002-6750-6378

Dr. Öğr. Üyesi Elçin Bedeloğlu
İstanbul Aydın Üniversitesi, Diş hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0002-0128-8435

Doç. Dr. Umut Can Küçüksezer
İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0002-5358-5570

Geliş tarihi: 25 Nisan 2018

Kabul tarihi: 13 Mayıs 2018

doi: 10.5505/yeditepe.2019.36854

Yazışma adresi:

Doç. Dr. Umut Can Küçüksezer
İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji A.D.,
İ.Ü. Aziz Sançar Detae, Vakıf Gureba Cad. 34093
Çapa-fatih, İstanbul
Telefon: 05326514871
e-posta: uksezer@istanbul.edu.tr

ÖZET

Amaç: Yassı hücreli karsinom (YHK), en sık gözlenen oral kavite yerleşimli kanser olup, oral kavitede en fazla dilde tümöre neden olduğu bilinmektedir. Hastalık gelişiminde etken olan pek çok risk faktörü arasında genetik değişimler de bulunmaktadır. Oral kavite kanserlerinin çoğu geç evrede tanımlanabilmekte ve bu durum hasta sağ kalım oranlarını azaltmaktadır. Bu nedenle, yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesinde öncü olabilecek deneysel modellere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışma, hastalık tedavisine destek sağlayacak ksenograft oral YHK fare modelinin geliştirilmesini amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Yassı hücreli karsinom hücre hattı OSC-19, Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) hücre bankasından alınarak kullanılmış, ilk aşamada hücre kültür ortamı, ilgili hücreler için optimize edilmiştir. Işık mikroskopu altında büyümesi takip edilen hücrelerin, medyum değişimleri ekimden sonra 2. günde gerçekleştirilirken, pasajlama işlemleri ise ekimi takiben 5. günde gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı tripan dışlama yöntemi ile, otomatik hücre sayım cihazı kullanımıyla incelenmiş, yüksek canlılık ve yeterli sayıdaki OSC-19 hücreleri, nude farelerin diline enjekte edilerek ksenograft ortotopik hayvan modeli oluşturulmuş ve tümör gelişimi gözlenmiştir.

Bulgular: OSC-19 hücre serisi, 1 aylık süre içerisinde, 8 pasajlamanın sonunda sağlıklı görünüme kavuşmuş, invazif büyüme özelliği kazanarak 5 günde 1 konflüent hale gelebilmeye başlamıştır. Bu aşamadaki hücrelerde canlılık oranı (>%93) olarak saptanmıştır. Ortotopik modelin oluşturulabilmesi için kullanılan (n=2) nude farelerde, dile uygulanacak OSC-19 ideal hücre sayısı (1x10⁶) olarak saptanmıştır. Bu doz 25µL hacimdeki kültür medyumunu ile dile enjekte edildiğinde, farelerde 8. günde tümör oluşturmuş; dildeki tümörün solunum ve beslenmeyi engelleyecek büyüklüğe eriştiği gün ise enjeksiyon sonrası 24. gün olarak tespit edilmiştir.

Sonuçlar: Bu bulgular ışığında, gerçekleştirdiğimiz çalışmanın ana amacı insan dil kanser hücre hattı OSC-19 kullanılarak ksenograft oral YHK fare modelinin geliştirilmesi ve bu süreçte karşılaştığımız zorlukların paylaşılarak ileriki çalışmalarda daha hızlı hedefe ulaşılmasına destek sağlamak olmuştur. Oluşturduğumuz bu oral kanser fare modelinin ileriki çalışmalarda güncel ya da yeni tedavi yaklaşımlarının denenebileceği faydalı bir model olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: OSC-19, oral kanser, ksenograft fare modeli, oral yassı hücreli karsinom

SUMMARY

Aim: Squamous cell carcinoma is most frequent among oral cancers, which causes tumor progression in tongue. Most of the oral cancers could be diagnosed at a relatively late term. New diagnostic and therapeutic approaches are required for better treatment of patients. This study aimed to develop xenograft oral squamous cell carcinoma mice model, which

could potentially support better diagnosis and treatment of patients.

Materials and Method: Squamous cell carcinoma cell line OSC-19 was purchased from Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB). Culture conditions were optimized accordingly, and growth and proliferation of cells were investigated under light microscopy. Cell culture medium was refreshed every two days and passages were done 5 days following cell-seeding. Cell counts and viability determination was converted with an automatic cell counter utilizing trypan blue exclusion method. Xenograft and orthotropic mouse model was established by injecting OSC-19 cells to the tongues of nude mice, and tumor progression was monitored.

Results: OSC-19 cell line was monitored to have invasive proliferation following 8 passages in a month, and became confluent in 5 days following a passage. Cells were determined to have (>93%) viability before transplantation to mice. For establishment of orthotrophic mouse model (n=2) nude mice were utilized, where (1x10⁶) OSC-19 cells were determined as ideal number to be injected within 25µL of cell culture medium. Tumor development was observed on day 8 post injection, and tumor growth sufficient to block nutrition and respiration was achieved on day 24.

Conclusions: In light of these findings, xenograft oral squamous cell carcinoma mouse model has been established. This manuscript defines the key points of these experiments and difficulties faced, all of which are expected to be helpful for future studies. This experimental model is expected to be beneficial in prospective studies that aim to investigate current or novel therapeutic approaches.

Keywords: OSC-19, oral cancer, xenograft mouse model, oral squamous cell carcinoma

GİRİŞ

Yassı hücreli karsinom (YHK) oral kavitede lokalize kanserler içinde %90'nın üzerinde bir görülme oranıyla en sık görülen kanser türünü oluşturmaktadır.^{1,2} Dil, ağız tabanı, sert ve yumuşak damak, bukkal mukoza, retromolar alan, vestibüler alan ve dişetleri tümörün ağız içindeki yerleşim alanlarıdır. Bu alanlardan dil, YHK'nın oral bölgede en sık görüldüğü bölgeyi oluşturmaktadır.³ Dil YHK'nın gelişiminde önceleri en önemli risk faktörleri arasında ileri yaş, alkol, sigara ve betel cevizi (betel nut) tüketimi ile erkek cinsiyet gösterilmiş olsa da, son yıllarda yapılan çalışmalarla alkol ve/veya sigara tüketmeyen daha genç ve kadın hastalarda da tümörün görülme oranlarında artış gözlemlendiği ortaya konmuştur.⁴ Bu durumda hastalığın etyopatogenezinde, insan papilloma virüs (HPV) ve Epstein Barr virüs (EBV) gibi viral etiyolojik faktörlerin varlığının dışında, genetik değişimlerin de etkili olabileceği belirtilmiştir.^{5,6} Oral kanserlerin tanısında, prekanseröz bir lezyon

ya da oral YHK, erken aşamalarda elle ve gözle muayene ile tespit edilebilmektedir, ancak hastalığın teşhisinde altın standart insizyonel biyopsidir.⁷ Bunlara ek olarak erken dönemde vital doku boyama, fırça biyopsisi, floresan görüntüleme gibi ilave yöntemler de hastalık teşhisinde kullanılmaktadır.⁸ Oral kavite her ne kadar kolay görülebilen bir alan olsa da, çoğu kanser geç evrede teşhis edilmektedir.⁹ Hastalığın klinik olarak hangi evrede olduğunu belirlemek için en sık kullanılan sistem Amerikan Kanser Ortak Komitesinin (American Joint Committee on Cancer (AJCC)) ilk olarak 1977 yılında belirlediği ve 2016 yılında⁸. baskısını yayınladığı "Tümör boyutu, etkilenmiş Lenf Nodülleri, Metastazı (TNM)" evreleme sistemidir.¹⁰ Her kanser türünde olduğu gibi oral kavite kanserlerinde de, erken teşhis sayesinde, sağ kalım oranları artmaktadır. Bu bağlamda, hastalığın güncel tedavisinde Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (National Comprehensive Cancer Network (NCCN)), Avrupa Medikal Onkoloji Topluluğu (European Society for Medical Oncology (ESMO)) gibi kuruluşların belirlediği tedavi yaklaşımları rehber alınmaktadır.¹¹ Bu kılavuzlar ışığında, erken evrelerde oral kavite kanserlerinin tedavisi cerrahi rezeksiyon ya da radyoterapi ile sağlanırken, ileri evrede tespit edilen bu kanserler genellikle cerrahi, radyoterapi ve/veya kemoterapiden oluşan kombine yöntemler ile tedavi edilmektedir.^{12,13,14} Bununla birlikte, güncel tedaviler kapsamında, kemoterapötik ajanlara gelişen direnç aşmak ve yine bu ajanlara bağlı yan etkileri azaltmak için kombine ilaç tedavisi ve adjuvan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi de bulunmaktadır.¹⁵ Gerek güncel tedavilerin geliştirilmesine, gerekse de kullanımda olan ve yeni geliştirilen ilaçların denenmesine yönelik hastalık modellerinin oluşturulması çok değerlidir.

Bu nedenle çalışmamızın amacı, hastalık tedavisine destek sağlayacak ksenograft oral YHK fare modelinin geliştirilmesi olmuştur. Bu doğrultuda model, ortotopik fare modeli temel alınarak, insan kaynaklı dil kanser hücre hattı olan OSC-19'un, immün yetmezlikli (atimik) çıplak (nude) farelerde oral tümörlerin primer olarak en sık görüldüğü alan olan dile enjekte edilmesiyle oluşturulmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre kültürü optimizasyonu

OSC-19 hücre hattı Japonya'da bulunan "Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB)"tan temin edilmiştir. Hücreler oldukça invaziv büyüyebilme özelliğinden ve rejyonel lenf nodlarına spontan metastaz yapabilme kabiliyetinin yüksek olmasından dolayı ortotopik fare modelinin oluşturulmasında tercih edilmiştir.^{16,17} Üretici firmanın tavsiyeleri dikkate alınarak, hücreler öncelikle 37°C su banyosunda 5 dakika bekletilerek çözüldürülmüş ve büyüme medyumuna eklenmiştir. Hücrenin optimal büyüme ve proliferasyon olma yeteneğini sağlayan büyüme medyumuna, %10 fetal bovin serum (Gibco, katalog

no: 10270098) içeren L-Glutamin'li DMEM/F12 (Biosera, katalog no: LM-D1222/500) ile 100 ünite/mL penisilin ve 100ug/mL streptomisin içeren pen-strep (Gibco, katalog no: 15140) ihtiva etmektedir. Hücreler ilk çözdürüldüğünde 1 kez büyüme medyumunda yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 120g'de 8 dakika santrifüj edilmiş ve hücre sayımına tabi tutulmuştur. Işık mikroskopu altında büyümesi takip edilen hücrelerin, medyum değişimleri ekimden sonra 2. günde gerçekleştirilirken, pasajlama işlemleri ise ekimi takiben 5. günde gerçekleştirilmiştir. Hücre pasajlamalarında tripsinizasyon öncesi büyüme medyumundan arındırılmak için hücreler 2 kez kalsiyum ve magnezyumdan yoksun PBS (Gibco, katalog no: 70011) ile yıkanmış ve flask yüzeyinden kopmaları güç olduğundan %0,25'lik tripsin (Biosera, katalog no: LM-T1720/100) ile toplanmışlardır. Hücreler öncelikle T-25 ve çoğaldıkça T-75 flasklara (Thermo Scientific, katalog no: 156472) sırasıyla yaklaşık 80.000 hücre 5 mL medyum volümünde ve yaklaşık 250.000 hücre 12 mL volümünde ekilmişlerdir. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde büyütülmüşlerdir. Hücrelerin pasajlamaları sırasında tüm santrifüj aşamaları oda sıcaklığında 1000 rpm'de 3 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, tüm hücre sayım işlemleri Vi-Cell Counter cihazı (Beckman Coulter, Inc. Vi-CELL XR) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hayvan bakımı ve barınma koşulları

Gerçekleştirilen çalışmada hayvanlar üzerine uygulanacak tüm deneysel yaklaşımlarda "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (www.nap.edu/catalog/5140.html)" prensipleri doğrultusunda hayvan hakları ve refahı korunmuş ve Boğaziçi Üniversitesi Kurumsal Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 22.02.2018 tarihli toplantısında, 12.01.2018 tarih ve kodlu proje olarak etik onay alınmıştır. Yine benzer çalışmalarda literatür bulguları göz önünde bulundurularak, çalışmaların 4-6 haftalık erkek nude farelerde gerçekleştirilmesi öngörülmüştür.¹⁸ Bunun için farelerin rutin steril bakımları Boğaziçi Üniversitesi Deneysel Hayvan Üretim ve Bakım Merkezi'nden (VIVARIUM) hizmet alınarak sağlanmıştır. Kısaca, fareler HEPA filtreli odalarda ve bireysel havalandırılmalı (individually ventilated cage (IVC)) kafeslerde barındırılmıştır. Altlık olarak kokusuz, steril talaş kullanılmıştır. Yem olarak, farelerin fizyolojik gereksinimlerine yönelik steril yem ile ad libitum tarzda beslenme yapılmıştır. Oda koşulları %40-70 nem, havalandırma ve sıcaklık değerleri özel bir otomasyon sistemi ile her gün kontrol edilmiştir. Kafes, altlık ve ekipmanları otoklav ile sterilize edildikten sonra kullanılmıştır.

Ortotopik fare modeli oluşturulması

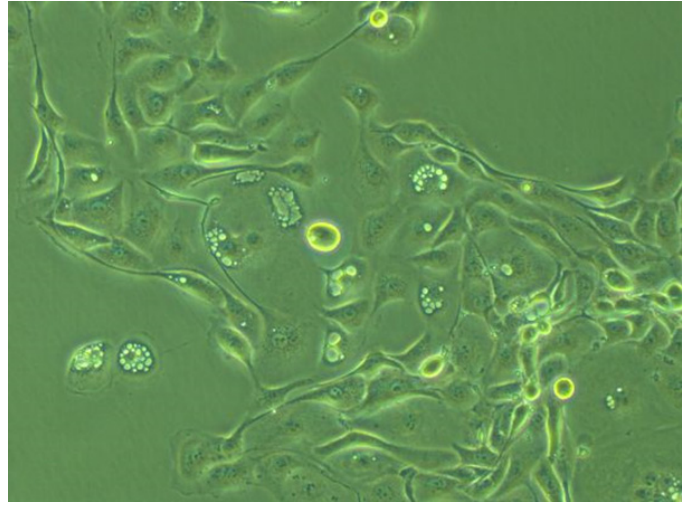
Literatür bulguları OSC-19 hücre hattının nude farelerin diline enjekte edilmesi suretiyle oluşturulan ksenograft ortotopik model için 20.000 ile 2.000.000 arasında değişen hücre sayılarının kullanıldığını bildirmektedir.^{18,19} Bu sayılar değerlendirildiğinde çalışmamızda ortotopik

fare modelinin oluşturulması için 2 nude farenin dillerine 200.000 veya 1.000.000 OSC-19 hücresi, 25uL'lik serumdan yoksun büyüme medyumunda içinde enjekte edilmiştir. İşlem %1-3 izofluran ile inhalasyon anestezisi altında 0.5 ml insülin iğnesi (BD medikal) kullanılarak hücrelerin dile submukozal olarak implantasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

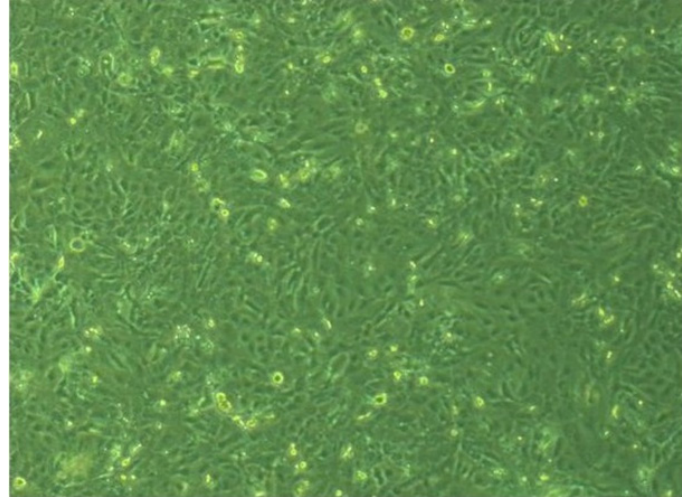
BULGULAR

Hücrelerin optimizasyonu ve çoğaltılması

OSC-19 hücreleri 1 ay sonunda yaklaşık 8 pasajlama sonrasında sağlıklı görünüme kavuşarak ve invaziv büyüme özelliğini sağlayarak 5 günde 1 konflüent hale gelmişlerdir (Şekil 1a ve b).



Şekil 1a. Sağlıklı OSC-19 hücrelerinin görünümü: OSC-19 hücre morfolojisi ışık mikroskopunun 40X merceği altındaki görüntüleri gösterilmektedir;



Şekil 1b. Sağlıklı OSC-19 hücrelerinin görünümü: Yaklaşık %100 konflüent halde sağlıklı OSC-19 hücreleri ışık mikroskopunun 5X merceği altındaki görüntüleri gösterilmektedir.

Hücrelerin pasajlanmaları aşamasındaki çoğalmaları Vi-cell counter (Beckman Coulter) cihazındaki canlı hücre sayımı ile tespit edilmiştir. Buna göre, hücrelerdeki canlılık ortalama %93'lere vardığında fare modellemesine geçilmiştir (Şekil 1).

Nude farelerde ksenograft oral YHK fare modelinin oluşturulması

Nude fareler uygun steril koşullarda en az 4 haftalık olana kadar yetiştirilmiştir. Ortotopik modelin oluşturulması

farelerin diline uygulanacak olan OSC-19 hücre sayıları 2 farede denenmiş ve yalnızca 1.000.000 hücrenin enjekte edildiği farenin dilinde tümör gelişimi 8. günde gözlemlenmiştir (**Şekil 2**).



Şekil 2a. Ortotopik fare modelinde tümörün görünümü: OSC-19 hücrelerinin dile enjeksiyonu aşaması gösterilmektedir;



Şekil 2b. Ortotopik fare modelinde tümörün görünümü: 1.000.000 OSC-19 hücrenin dile oluşturduğu tümör gösterilmektedir.

Bu günden sonra tümör geliştiren fare takibe alınmıştır. Bu farede, dildeki tümörün solunum ve beslenmeyi engelleyecek büyüklüğe eriştiği gün enjeksiyonun 24. günü olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle 24. günde fare kurban edilmiştir.

TARTIŞMA

Tekrarlayan ve/veya metastatik oral kavite kanserleri düşük prognozlu ve yüksek maliniteli kanserler grubundadır. Erken tanı kapsamında hastaların düzenli diş hekimi ziyaretlerinde bulunmaları en önemli şarttır. Hastalığın tedavisi ile tanı dönemine bağlı olarak cerrahi girişim, radyoterapi ve/veya kemoterapi yaklaşımlarını içermektedir. Ancak yine de sağ kalım oranları oldukça düşük olan oral kavite kanserlerinin tedavisinin geliştirilmesinde hücre sel ve hayvan modelleri üzerindeki yaklaşımlar oldukça önemlidir. Bu bağlamda gerçekleştirdiğimiz çalışmada ksenograft oral yassı hücreli karsinoma fare modeli, OSC-19 hücre hattının yardımı ve ortotopik fare modeli temel

alınarak gerçekleştirilmiştir.

Japonya'dan temin edilen OSC-19 hücrelerinin yolculuğu esnasında soğuk zinciri bozularak elimize ulaştığını düşünmekteyiz, çünkü bu hücreler yaklaşık 1 ay süren meşakkatli bir süreç doğrultusunda ancak sağlıklı yapılarına kavuşmuşlardır (**Şekil 1**). Bu süreçte, tedarikçi firma ve OSC-19 hücre hattını kullanmış uluslar arası araştırmacılarla gerçekleştirdiğimiz kişisel iletişimler bu hücrelerin çok kısa zamanda sayılarını arttırdıkları ve ortotopik model için uygun olduklarını belirtmiştir. Oysa ki uygulamada 2 ay içinde 1.000.000 OSC-19 hücre sayısını elde etmiş bulunmaktayız. Bu süreçte deneyimiz, kullanılan medyumda FBS kadar l-glutaminin de OSC-19 hücrelerinde proliferatif aktiviteyi arttırdığını göstermiştir. Bir diğer önemli unsurun da hücre kültürü için muamme edilmiş (treated) ile muamme edilmemiş (non-treated) flask kullanımındaki ayırmadır. Öyle ki; OSC-19 hücrelerinin treated flasklarda daha etkin proliferatif etki gösterdiğini tecrübe etmiş bulunmaktayız. Bu kapsamda, bu tip flasklarda hidrofobik polistren yüzeylerin kimyasal muamelelerle negatif yüklerini artırarak hidrofilik olmaları sağlanmıştır. Bu da yapışan hücrelerin daha kolay şekilde yüzeye tutunmalarını sağlayarak büyümelerine destek vermektedir.²⁰ Buna ek olarak, OSC-19 hücreleri kültür ortamında tripsinizasyona kuvvetli direnç göstererek, yüksek invaziv kapasitesini doğrulamıştır. Bu nedenle hücreleri flasklardan kaldırıp toplamak amacıyla %0,25'lik tripsin kullanılmış ve tedarikçi firma hücrelerin 5 dakikalık tripsin inkübasyonunun yeterli olması gerektiğini bildirirken, biz 10 dakikalık bir süre sonunda hücrelerin yaklaşık %90'ını kaldırmışızdır. Bu 10 dakikalık sürenin 5-6 dakikasında hücreler 370C'lik inkübatörde beklemiş, geri kalan sürede ise hafif sarsılmak suretiyle yüzeyden kopmaları ışık mikroskopu altında takip edilmiştir. OSC-19 hücrelerinin kültüründe tripsinizasyon bu nedenlerden dolayı en can alıcı aşamayı oluşturmaktadır ve bu hücrelerin manipülasyonuna ilişkin incelikler literatürde bulunmamaktadır. Hücre kültürü optimizasyonlarını takiben in vivo modellemeye geçiş de gerçekleştirilen çalışmanın ikinci zor basamağını oluşturmaktadır, çünkü literatürde aynı hücre hattı ve fare türü kullanımı için farklı sayılarda hücre kullanımıyla modellenmenin gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Bu doğrultuda en az sayıda hayvan kullanımı ile dilde tümör geliştirmeye yetecek miktarda hücre sayısının tespit edilmesi, çalışmamızdaki en önemli kriterlerden birini oluşturmaktaydı. Bu bağlamda, başlangıç olarak 200.000 ve 1.000.000 OSC-19 hücre denenerek, literatürde verilen 2 ayrı uç hücre sayıları temsil edilmiştir. Sürpriz bir şekilde yalnızca 1.000.000 OSC-19 hücre verilen farenin dilinde tümör gözlemlenmiş ve bu fare takibe alınmıştır. Çalışmamızın 24. gününde farenin dilindeki tümörün hayvan refahını engelleyecek boyuta erişmesinin tespitinin de gelecek çalışmaların süre kısıtlamasını belirlemesi açısından

değerli olduğunu düşünmekteyiz.

SONUÇ

Bu bulgular ışığında, gerçekleştirdiğimiz çalışmanın ana amacı insan dil kanser hücre hattı OSC-19 kullanılarak ksenograft oral YHK fare modelinin geliştirilmesi ve bu süreçte karşılaştığımız zorlukların paylaşarak ileriki çalışmalarda daha hızlı hedefe ulaşılmasına destek sağlamak olmuştur. Oluşturduğumuz bu oral kanser fare modelinin ileriki çalışmalarda güncel ya da yeni tedavi yaklaşımlarının denenebileceği faydalı bir model olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Attar E, Dey S, Hablas A, Seifeldin IA, Ramadan M, et al. Head and neck cancer in a developing country: a population-based perspective across 8 years. *Oral Oncol.* 2010;46(8):591-596.
2. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol.* 2010;46(6):414-417.
3. Zhang J, Gao F, Yang AK, Chen WK, Chen SW, et al. Epidemiologic characteristics of oral cancer: single-center analysis of 4097 patients from the Sun Yat-sen University Cancer Center. *Chinese Journal of Cancer* 2016; 35, 24.
4. Ng JH, Iyer NG, Tan MH, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: a global study. *Journal of The Sciences and Specialties of The Head and Neck* 2017; 39: 297-304.
5. Park GC, Roh JL, Cho KJ, Kim JS, Jin MH, et al. F-FDG PET/CT vs human Papillomavirus, p16 and Epstein-Barr virüs detection in cervical metastatic lymph nodes for identifying primary tumors. *International Journal of Cancer* 2017, 140(615),1405-1412.
6. Yom SS. HPV and oropharyngeal cancer: etiology and prognostic importance. *Seminars in cutaneous medicine and surgery* 2015; 34(4): 178-181.
7. Macey R, Walsh T, Brocklehurst P, Kerr AR, Liu JL, et al. Adjunctive tests cannot replace scalpel biopsy for oral cancer diagnosis. *Evidence-Based Dentistry* 2015; 16: 46-47.
8. Lingen MW, Kalmar JR, Karrison T, Speight PM. 2008. Critical Evaluation of Diagnostic Aids for the Detection of Oral Cancer. *Oral Oncol.* 2008; 44(1):10-22.
9. Vernham GA, Crowther JA. Head and neck carcinoma-stage at presentation. *Clinical otolaryngology and allied sciences* 1994; 19: 120-124.
10. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, et al. *AJCC Cancer Staging Manual* 2017. 8th ed. Newyork: Springer.
11. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical practice guidelines in oncology: Head and neck cancers.
12. Nakakaji R, Umemura M, Mitsudo K, Kim JH, Hoshino

Y, et al. Treatment of oral cancer using magnetized paclitaxel. *Oncotarget* 2018; 9(21): 15591-15605

13. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, et al. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med.* 2006;354:567-578.

14. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J, MACH-NC Collaborative Group Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol.* 2009;92:4-14

15. Chang HP, Lu CC, Chiang JH, Tsai FJ, Juan YN, et al. Pterostilbene Modulates the Suppression of Multidrug Resistance Protein 1 and Triggers Autophagic and Apoptotic Mechanism in Cisplatin-Resistant Human Oral Cancer CAR cells Via AKT Signaling. *Int. J. Oncol.* 2018; 52(5): 1504-1514.

16. Yokoi T, Homma H, Odajima T. Establishment and characterization of OSC-19 cell line in serum and protein free culture. *Tumor Res.* 1988; 24: 1-17.

17. Hira-Miyazawa M, Nakamura H, Hirai M, Kobayashi Y, Kitahara H, et al. Regulation of programmed-death ligand in the human head and neck squamous cell carcinoma microenvironment is mediated through matrix metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage. *Int J Oncol.* 2018; 52(2): 379-388.

18. Chung TK, Warram J, Day KE, Hartman Y, Rosenthal EL. Time-dependent pretreatment with bevacuzimab increases tumor specific uptake of cetuximab in preclinical oral cavity cancer studies. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(5): 790-798

19. Shirako Y, Taya Y, Sato K, Chiba T, Imai K, et al. Heterogeneous tumor stromal microenvironments of oral squamous cell carcinoma cells in tongue and nodal metastatic lesions in a xenograft mouse model. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2015; 44(9): 656-668.

20. Thermo Scientific™ Nunc™ EasYFlask™ Cell Culture Flasks.

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/156367>.