

**Ocena ekspresji białka adhezyjnego CD44v6
w nowotworach pierwotnych, ksenograftach
oraz tkankach zdrowych poddanych działaniu
promieniowania jonizującego**

Rozprawa doktorska
lek. Magdalena E. Korożan

Klinika Onkologii i Radioterapii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Praca zrealizowana w ramach grantu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego nr W-135
w latach 2005-2008

Promotor
Prof. dr hab. Jacek Jassem

Gdańsk, 2010

Spis treści

Spis treści.....	2
Alfabetyczny wykaz używanych skrótów	5
STRESZCZENIE.....	6
ABSTRACT.....	10
WSTĘP	13
1.1 Znaczenie oraz występowanie białek CD44.....	13
1.2 Izoformy CD44 (CD44v)	14
1.3 Udział białek wariantów CD44 w fizjologicznych i patofizjologicznych procesach zachodzących u ludzi.....	15
1.4 Adhezja komórkowa i procesy przekazywania sygnału.....	17
1.5 Prezentacja czynników wzrostu z udziałem CD44.....	17
1.6 Rozsiew nowotworu	17
1.7 Ekspresja białka CD44v6 w prawidłowych tkankach	18
1.8 Ekspresja CD44v6 w dysplastycznym nabłonku jamy ustnej	19
1.9 Ekspresja białka CD44v6 w rakach płaskonabłonkowych	20
1.10 Ekspresja białka CD44v6 w rakach gruczołowych	20
1.11 Ekspresja białka CD44v6 w nowotworach nienabłonkowych	21
1.12 Przeciwciała monoklonalne anty – CD44v6 w badaniach klinicznych.....	21
1.13 Przeciwciała monoklonalne anty – CD44v6 w diagnostyce obrazowej.....	22
1.14 Cele pracy	22
MATERIAŁY I METODY	24
2.1 Ludzkie raki przeszczepiane na myszy nu/nu, ksenografty	24
2.1.1 Myszy.....	24
2.1.2 Guzy przeszczepiane myszom (ksenografty).....	25
2.1.2.1 Procedura przeszczepiania ksenograftów	27
2.1.2.2 Procedura napromieniania zwierząt wiązką zewnętrzną	27
2.1.2.3 Procedura pobierania ksenograftów.....	28
2.1.3 Tkanka nabłonkowa jamy ustnej oraz nowotwory wywodzące się z linii komórkowej MKG	29
2.2 Ludzkie tkanki prawidłowe i nowotworowe	29

2.2.1 Napromieniana i nienapromieniana błona śluzowa jamy ustnej	29
2.2.2 Wycinki z błony śluzowej i raka odbytnicy	30
2.3 Wykrywanie CD44v6 w skrawkach parafinowych guzów i tkanek	
prawidłowych	31
2.3.1 Protokół przygotowywania i aplikacji odczynników	32
2.4 Analiza ekspresji CD44v6 i ocena jej nasilenia	33
2.4.1 Analiza ekspresji CD44v6	33
2.4.2 Ocena nasilenia ekspresji CD44v6.....	35
2.5 Histologiczne zróżnicowanie badanych guzów nowotworowych.....	35
2.6 Ekspresja CD44v6 w komórkach ludzkich nabłoneków jamy ustnej	36
2.6.1 Kategorie ocenianych mikroskopowo uszkodzeń popromiennych	
w błonie śluzowej jamy ustnej	36
2.7 Metody statystyczne	37
WYNIKI	38
3.1 Ksenografty ludzkich raków.....	38
3.1.1 Ekspresja CD44v6 w prawidłowej nienapromienianej błonie	
śluzowej policzka	38
3.1.2 Występowanie CD44v6 na komórkach pierwotnych raków wywodzących	
się z błony śluzowej jamy ustnej oraz ich ksenograftów	38
3.1.3 Ekspresja CD44v6 w ksenograftach ludzkich raków płaskonabłonkowych	
głowy i szyi	44
3.1.3.1 Śmierć komórek guza po napromienianiu	44
3.1.3.2 Ekspresja CD44v6 na powierzchni badanych ksenograftów	45
3.1.3.3 Obecność CD44v6 na powierzchni komórek nienapromienianych	
ksenograftów ludzkich raków	47
3.1.3.4 Ekspresja CD44v6 na powierzchni komórek napromienianych	
ksenograftów ludzkich raków regionu głowy i szyi	50
3.1.3.5 Heterogenność ekspresji CD44v6 w komórkach poszczególnych	
grup ksenograftów	51
3.2 Tkanki ludzkie	56
3.2.1 Wpływ napromieniania na ekspresję CD44v6 w komórkach błony	
śluzowej jamy ustnej	56

3.2.2 Ekspresja białka CD44v6 na powierzchni komórek napromienianej i nienapromienianej prawidłowej błony śluzowej odbytnicy	62
3.2.3 Ekspresja CD44v6 na powierzchni komórek napromienianych i nienapromienianych raków odbytnicy	63
3.2.4 Ekspresja CD44v6 na powierzchni komórek przerzutów raka odbytnicy do regionalnych węzłów chłonnych.....	70
DYSKUSJA	72
4.1 Metody oceny ekspresji CD44v6	72
4.2 Pierwotne raki oraz ksenografty ludzkich raków okolicy głowy i szyi.....	73
4.2.1 Ekspresja CD44v6 w zależności od cech demograficznych i klinicznych guza	73
4.2.2 Ksenografty jako model ludzkich raków	73
4.3 Porównanie ekspresji CD44v6 na komórkach prawidłowej błony śluzowej jamy ustnej oraz pierwotnych raków i ksenograftów wywodzących się z tej okolicy...	74
4.4 Napromieniana i nienapromieniana prawidłowa błona śluzowa jamy ustnej	75
4.5 Zmiany ekspresji CD44v6 w napromienianych i nienapromienianych ksenograftach raków regionu głowy i szyi	77
4.6 Ekspresja CD44v6 w napromienianych i nienapromienianych rakach odbytnicy oraz prawidłowej błonie śluzowej odbytnicy	80
4.7 Podsumowanie.....	82
4.8 Wnioski	83
Piśmiennictwo.....	85

Alfabetyczny wykaz używanych skrótów

1. **AMG:** Akademia Medyczna w Gdańsku, Gdański Uniwersytet Medyczny (GUMed)
2. **ATCC** (ang. *American Type Culture Collection*)
3. **BED** (ang. *biological-effective dose*), dawka promieniowania ekwiwalentna do dawki frakcjonowanej po 2 Gy.
4. **CD44v6:** antygen różnicowania komórkowego, nr 44 wariant 6, określenie CD jest standardem używanym w celu jednolitego nazewnictwa i identyfikacji białek błonowych.
5. **CHT:** chemioterapia
6. **DFS:** (ang. *disease free survival*), czas wolny od choroby
7. **5-FU:** 5-fluorouracyl
8. **ECM:** (ang. *extracellular matrix*), macierz zewnątrzkomórkowa
9. **FD** (ang. *fractionated dose*), dawka frakcyjna
10. **Gy:** grej, jednostka dawki pochłoniętej, $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$.
11. **HA:** (ang. *hyaluronic acid*), kwas hialuronowy
12. **HNSCC:** (ang. *head and neck squamous cell carcinoma*), rak regionu głowy i szyi
13. **IgG:** immunoglobulina klasy G
14. **IHC:** immunohistochemia
15. **LV:** leukoworyna
16. **MŚ:** mikroskop świetlny
17. **MTX:** metotreksat
18. **OS:** (ang. *overall survival*), całkowity czas przeżycia
19. **RT:** (ang. *radiotherapy, radiation therapy*) radioterapia
20. **SCC:** (ang. *squamous cell carcinoma*), rak płaskonabłonkowy
21. **SEM:** (ang. *standard error of measurement*), standardowy błąd pomiaru
22. **SSD** (ang. *source-to-skin distance*), odległość źródła promieniowania od skóry
23. **TD:** (ang. *total dose*), dawka całkowita
24. **TBI:** (ang. *total body irradiation*), napromienianie całego ciała
25. **TOT:** (ang. *turnover time*), czas obrotu komórkowego
26. **VDT** (ang. *volume doubling time*), czas podwojenia objętości guza

STRESZCZENIE

Wstęp. Glikoproteiny CD44s to jedna z dużych grup molekuł adhezyjnych. CD44v6 stanowi jeden z ich wariantów, powstały na drodze alternatywnego składania genów. W tkankach ludzkich najsilniejszą ekspresję CD44v6 wykazują nabłonki wielowarstwowe płaskie. Prawidłowe komórki krypt jelitowych nie wykazują obecności CD44v6. Białko to jest obecne w 61-100% raków głowy i szyi oraz od 6-100% raków jelita grubego. Ze względu na prawdopodobny udział CD44v6 w transformacji nowotworowej oraz tworzeniu przerzutów, białko to jest potencjalnie obiecującym celem terapii ukierunkowanych molekularnie wykorzystujących przeciwciała monoklonalne anty-CD44v6. Dotychczas nieznane są ewentualne korzyści wynikające z łączenia tej metody leczenia z radioterapią (RT). Nieznana jest także kinetyka zmian nasilenia ekspresji CD44v6 przed i po frakcjonowanej RT.

Cel pracy. Celem pracy było określenie wpływu RT na nasilenie ekspresji CD44v6 w tkankach zdrowych oraz wycinkach nowotworów. Szczegółowe cele pracy obejmowały:

1. Określenie nasilenia ekspresji CD44v6 w prawidłowej błonie śluzowej jamy ustnej oraz w rakach płaskonabłonkowych rejonu głowy i szyi i ich ksenograftach.
2. Określenie wpływu RT na nasilenie ekspresji CD44v6 w błonie śluzowej jamy ustnej, w komórkach ludzkich ksenograftów raków głowy i szyi i raka odbytnicy.
3. Określenie wpływu RT na nasilenie ekspresji CD44v6 w raku odbytnicy oraz w sąsiadującej z guzem, niezmienionej błonie śluzowej.
4. Ocena ekspresji CD44v6 w raku odbytnicy w odniesieniu do klinicznych cech chorego: wieku, płci, typu histologicznego oraz stopnia złośliwości histologicznej i stopnia klinicznego zaawansowania.
5. Porównanie ekspresji CD44v6 w pierwotnym ognisku raka odbytnicy oraz w przerzutach do regionalnych węzłów chłonnych.

Metody. Obecność białka oraz jego rozmieszczenie w badanych tkankach oceniano na skrawkach parafinowych za pomocą metody immunohistochemicznej (IHC) z wykorzystaniem ludzkich przeciwciał monoklonalnych anty-CD44var(v6), klon VFF18 oraz mysiego biotynylowanego przeciwciała wtórnego. Wszystkie próbki poddano analizie mikroskopowej z wykonaniem dokumentacji zdjęciowej. Nasilenie ekspresji CD44v6 szacowano przy użyciu skali 0-3. Badania na liniach komórkowych

przeprowadzono z zastosowaniem 7-14 tygodniowych myszy, u których przed wszczepieniem linii komórkowej zastosowano immunosupresję poprzez napromienianie całego ciała (TBI) pojedynczą dawką 4 Gy. Ksenografty napromieniano dawką całkowitą w zakresie 12-54 Gy w sposób frakcjonowany, 2-3 Gy na frakcję, 5-7 razy w tygodniu w zależności od protokołu (200 kV, promieniowanie X). Łącznie zbadano 85 ksenograftów, w tym 36 pierwotnie nienapromienianych ksenograftów raków regionu głowy i szyi, 6 ksenograftów otrzymanych przez zaszczerpienie raka będącego wznową po RT, 40 ksenograftów raków regionu głowy i szyi po zastosowaniu różnych całkowitych dawek RT oraz 3 nienapromieniane ksenografty raka jelita grubego. Wpływ RT na ekspresję CD44v6 w prawidłowej błonie śluzowej jamy ustnej przeprowadzono u 22 chorych na zaawansowanego raka okolicy głowy i szyi. Chorzy otrzymywali RT w zależności od indywidualnych wskazań w dawkach całkowitych na guz (TD) pomiędzy 54 Gy a 60 Gy. Biopsje błony śluzowej policzka pobierano przed rozpoczęciem RT oraz bezpośrednio po jej zakończeniu.

Badania dotyczące raka odbytnicy przeprowadzono na dwóch grupach chorych. Pierwszą z nich stanowiło 45 chorych poddanych przedoperacyjnej RT. Stosowano promieniowanie X (6, 15 i 18 MV) w dawkach od 25 do 50,4 Gy. Zabieg operacyjny w grupie chorych poddanych krótkotrwałej RT tj. 25 Gy w 5 frakcjach (bez chemioterapii) odbywał się średnio po 6 dniach od zakończenia RT. Chorzy poddani konwencjonalnemu napromienianiu (45-50,4 Gy w 25-28 frakcjach) operowani byli średnio po 51 dniach od zakończenia RT. Przedmiotem oceny były pobrane w trakcie zabiegu wycinki błony śluzowej prawidłowej odbytnicy, wycinki guza oraz zajęte przerzutami węzły chłonne. Do oceny ekspresji w tkankach nienapromienianych wykorzystywane zostały także wycinki prawidłowej odbytnicy, guza oraz zajętych przerzutami węzłów chłonnych, pochodzące od 27 chorych, u których wykonano pierwotnie zabieg operacyjny metodą Dixon'a lub Miles'a. Uzyskane dane opracowano przy użyciu statystyki opisowej oraz programów statystycznych Sigma Plot, ANOVA oraz Statistica 8.0.

Wyniki. Ekspresja CD44v6 w komórkach nienapromienianych pierwotnych raków regionu głowy i szyi oraz ich ksenograftów była znamienne niższa w porównaniu z ekspresją tego białka w komórkach błony śluzowej jamy ustnej pochodzącej od tych samych chorych. W ksenograftach raków płaskonabłonkowych regionu głowy i szyi

nasileniem ekspresji CD44v6 było związane z cechą G a; im lepiej zróżnicowany histologicznie guz, tym wyższe było nasilenie ekspresji. Ponadto wykazano, że niemal w każdym przeszczepialnym guzie istnieje pula komórek niewykazująca ekspresji CD44v6 lub wykazująca bardzo słabą ekspresję, często zlokalizowana w okolicy torebki i naczyń krwionośnych ksenograftu. Nasilenie ekspresji CD44v6 w ksenograftach wywodzących się z linii FaDu (G3) i GL (G2) po zastosowaniu RT było znamienne wyższe w porównaniu do guzów nienapromienianych. Zależności tej nie obserwowano w grupie dobrze zróżnicowanych ksenograftów UT14 (G1). Ekspresji CD44v6 nie wykazano na powierzchni komórek gruczolakoraka linii HT29. Błona śluzowa jamy ustnej wykazywała zróżnicowane nasilenie ekspresji CD44v6 w zależności od warstwy nabłonka; najsilniejsze w warstwach środkowych. W prawidłowej błonie śluzowej jamy ustnej RT powodowała znaczne obniżenie nasilenia ekspresji CD44v6 w komórkach warstwy kolczystej i ziarnistej. Nie wykazano obecności CD44v6 w komórkach prawidłowej błony śluzowej odbytnicy, zarówno poddanej, jak i nie poddanej RT. RT zwiększała nasilenie ekspresji CD44v6 w komórkach raków odbytnicy w porównaniu z rakami nienapromienianymi. Nie było znacznej różnicy w ekspresji pomiędzy rakami napromienianymi dawką 25 Gy oraz poddanymi konwencjonalnej RT. Ekspresja CD44v6 w komórkach przerzutów do węzłów chłonnych była nieznacznie niższa niż w guzach pierwotnych. Nie było znacznych różnic w nasileniu ekspresji w węzłach chłonnych przed i po RT. Nasilenie ekspresji CD44v6 nie zależało od stopnia zaawansowania klinicznego, stopnia złośliwości G, płci, wieku oraz obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

Wnioski

1. W rakach płaskonabłonkowych rejonu głowy i szyi oraz w ich ksenograftach ekspresja CD44v6 jest słabsza niż w prawidłowych nabłonkach, z których wywodzą się te nowotwory. Nasilenie ekspresji CD44v6 jest związane ze zróżnicowaniem guza. Brak lub mniejsza ekspresja występuje głównie w komórkach warstwy podstawnej prawidłowego nabłonka oraz w potencjalnie klonogennych komórkach nowotworowych.
2. Frakcjonowana RT zmniejsza ekspresję CD44v6 w prawidłowym nabłonku jamy ustnej, najprawdopodobniej w wyniku przyspieszenia repopulacji i odnowy

komórkowej, a przez to zaburzenia procesów dojrzewania. W komórkach nowotworowych ekspresja CD44v6 zwiększa się pod wpływem RT, co może być wynikiem jej letalnego efektu w odniesieniu do klonogennych komórek, lub innych nieznanych mechanizmów.

3. Większość raków odbytnicy wykazuje ekspresję CD44v6, a jej nasilenie zwiększa się pod wpływem RT. Prawidłowa błona śluzowa odbytnicy, zarówno napromieniana, jak i nienapromieniana, nie zawiera tego białka.
4. Nasilenie ekspresji CD44v6 nie jest związane z wiekiem, płcią oraz stopniem zaawansowania klinicznego raka odbytnicy.
5. Ekspresja CD44v6 jest słabsza w przerzutach raka odbytnicy do regionalnych węzłów chłonnych w porównaniu do komórek guza pierwotnego, niezależnie do zastosowania RT.

RT jest dotychczas jedynym znanym zewnętrznym modulatorem nasilenia ekspresji CD44v6. Zmniejszenie ekspresji CD44v6 pod wpływem RT w prawidłowej błonie śluzowej jamy ustnej oraz jej nasilenie w guzach nowotworowych poddanych RT może mieć istotne znaczenie przy podejmowaniu prób kojarzenia RT z przeciwciałami anty-CD44v6. Uzyskane wyniki wymagają dalszych badań na większej grupie chorych.

ABSTRACT

Expression of adhesion protein CD44v6 in primary tumours, xenografts and healthy tissues exposed to ionizing radiation

Background. Glycoproteins CD44s are a large group of adhesion molecules. CD44v6 is one of the variants produced by the submission of alternative genes. Among the human tissues the strongest expression of CD44v6 occurs in squamous cell epithelium. Normal rectal crypts do not show the presence of CD44v6. This variant is present in 61-100% of head and neck cancers and 6-100% of colon cancers. Due to the possible role of CD44v6 in carcinogenesis and the development of cancer metastases, this protein is a potentially promising target of molecular therapies using monoclonal anti-CD44v6 antibodies. Currently, the possible benefits of combining this method with radiation therapy (RT) are unknown. Unknown is also an impact of RT on CD44v6 expression.

Study aim. The aim of this study was to determine the effect of ionizing radiation on CD44v6 expression level in healthy and cancerous tissue specimens.

1. To determinate differences in the expression of CD44v6 following RT of human xenografts of the head and neck cancer, and colon adenocarcinoma cell line.
2. To compare the expression of CD44v6 in normal cells of the epithelium in the oral mucosa before and after fractionated RT.
3. To evaluate the impact of RT on the expression of CD44v6 on cancer cells and in the adjacent unchanged rectal mucosa before and after fractionated RT.
4. To assess the CD44v6 expression in relation to patients age, sex, histological tumor type and degree, and initial clinical stage.
5. To comprise the CD44v6 expression in the primary tumor and in metastases to the regional lymph nodes.

Methods. The presence of CD44v6 and its distribution in the examined tissues were assessed on paraffin samples by Immunohistochemistry (IHC) using human monoclonal anti-CD44var (v6) antibodies, clone VFF18, and a mouse biotinylated secondary antibody. All samples were analyzed and photographed under the light microscope. CD44v6 expression was scored 0-3. Studied cell lines were transplanted into 7-14 week old mice. To obtain mouse immunosuppression total body irradiation with a single dose of 4 Gy was performed. Xenografts were irradiated with the dose of 12 to 54 Gy, administered in 2-3 Gy fractions, 5-7 times a week. A total of 85 xenografts were

examined including 36 originally untreated xenografts of the HNSCC, 6 tumours obtained by grafting the unirradiated primary SCC, 40 irradiated xenografts of the HNSCC and 3 xenografts of colorectal cancer. Effect of RT on CD44v6 expression in normal oral mucosa was examined in 22 patients with locally advanced HNSCC. Patients received primary or postoperative RT according to the individual protocol with the total tumor dose of 54 Gy to 60 Gy. Biopsies from buccal mucosa were performed before and immediately after the end of irradiation.

Clinical studies included two groups of patients with rectal cancer. The first population consisted of 45 patients with rectal cancer undergoing preoperative RT (6, 15 and 18 MV) at doses ranging from 25 to 50.4 Gy. In patients undergoing short-term RT, i.e. 25 Gy in 5 fractions (without chemotherapy) surgery was performed after an average of 6 days following RT. Patients undergoing conventional RT (45-50.4 Gy in 25-28 fractions) were operated on after an average of 51 days following RT. Analysis included tissue samples from the normal rectal mucosa, primary tumor and regional lymph nodes collected at surgery. CD44v6 expression was also assessed in unirradiated normal rectal mucosa, primary tumor and metastatic lymph nodes derived from 27 patients treated with primary surgery by Dixon's and Miles's. Statistical analysis used descriptive statistics and statistical programs Sigma Plot, ANOVA, and Statistica 8.0.

Results. Expression of CD44v6 was significantly lower on the cells of unirradiated primary HNSCC and their xenografts than on untreated cells of the oral mucosa originating from the same patients. Grading and level of CD44v6 expression were comparable in xenografts and their tumors of origin. Better differentiated tumours showed higher level of CD44v6 expression. In every xenograft there was a pool of cells showing no or weak CD44v6 expression, typically located close to the xenograft capsule and blood vessels. Expression of CD44v6 increased significantly after the RT in FaDu (G3) and GL (G2) but not in the well-differentiated xenografts (UT14). CD44v6 expression was absent on adenocarcinoma cell line HT29. CD44v6 expression differed in particular cell layers of the oral cavity mucosa, with the strongest expression in granulomatous and spinous cell layers. In normal oral mucosa RT resulted in significant reduction of CD44v6 expression in both middle layers. CD44v6 was absent in normal rectal crypts, both irradiated and unirradiated. RT increased the level of CD44v6 expression on the surface of rectal cancer cells. CD44v6 expression in rectal tumors

irradiated with the dose of 25 Gy and 45-50.4 Gy did not differ significantly. CD44v6 expression in the cells of metastases to the lymph nodes was slightly lower than in primary tumors. There was no increase in the CD44v6 expression in the lymph nodes following RT. The level of CD44v6 expression in rectal cancer was not related to clinical stage, histological grade, sex, age and the presence of metastases to regional lymph nodes.

Conclusions.

1. CD44v6 expression in HNSCC and their xenografts is lower than in their tissues of origin. The level of CD44v6 expression is associated tumor grade differentiation. Absence or low level of CD44v6 expression occurs in cancer cells that are potentially clonogenic and in the germinal cell layer of normal epithelium.
2. Fractionated RT decreased the level of CD44v6 expression in normal oral epithelial cells and cancers of it origin. Likely due to shortening of cell turnover time and an increased repopulation resulting in abnormal cell maturation. CD44v6 expression in cancer cells increased after RT may be due to killing of clonogenic cells or switching of or on other cellular mechanisms.
3. Irradiated and unirradiated normal rectal mucosa shows no expression of CD44v6 as opposed to rectal cancers which typically demonstrate the presence of CD44v6.
4. In rectal cancer RT increases the level of CD44v6 perhaps due to switching on different adhesion mechanisms characterized other types of epithelia including multilayer squamous one.
5. Expression of CD44v6 is weaker in metastases of rectal cancer to lymph nodes compared to the primary lesion. RT does not affect this expression in nodal metastases.
6. CD44v6 expression in rectal cancer is not related to patient age, sex, grading and initial clinical stage.

RT seems to be the only known external modulator of CD44v6 expression. The down-regulation in CD44v6 expression in normal oral mucosa and its up-regulation in cancer after RT may be of importance for combining RT with anti-CD44v6 antibodies. Currently these results warrant confirmation in a larger group of patients.

WSTĘP

Nowotwory stanowią drugą po chorobach układu sercowo-naczyniowego przyczyną zgonów w Polsce i mimo postępu w technikach leczenia, wyniki są nadal niezadowalające. Jedną z najbardziej obiecujących metod leczenia są terapie ukierunkowane molekularnie, w tym z zastosowaniem swoistych przeciwciał. Obecnie w praktyce klinicznej monoklonalne przeciwciała stosuje się między innymi w terapii rozlanego raka piersi (trastuzumab), nowotworów głowy i szyi (cetuksymab) i uogólnionego raka jelita grubego (bewacyzumab, pertuzumab, cetuksymab). Prowadzone są intensywne poszukiwania białek mogących stanowić nowe punkty uchwytu dla terapii ukierunkowanych molekularnie. Jednym z nich jest glikoproteina CD44v6 należąca do rodziny białek CD44. Dotychczasowa wiedza nie pozwala na jednoznaczną ocenę ewentualnych korzyści wynikających z zastosowania przeciwciał anti-CD44v6 w leczeniu nowotworów. Jak dotąd nie udało się także określić czynników wpływających na nasilenie ekspresji CD44v6 w tym wpływu radioterapii (RT).

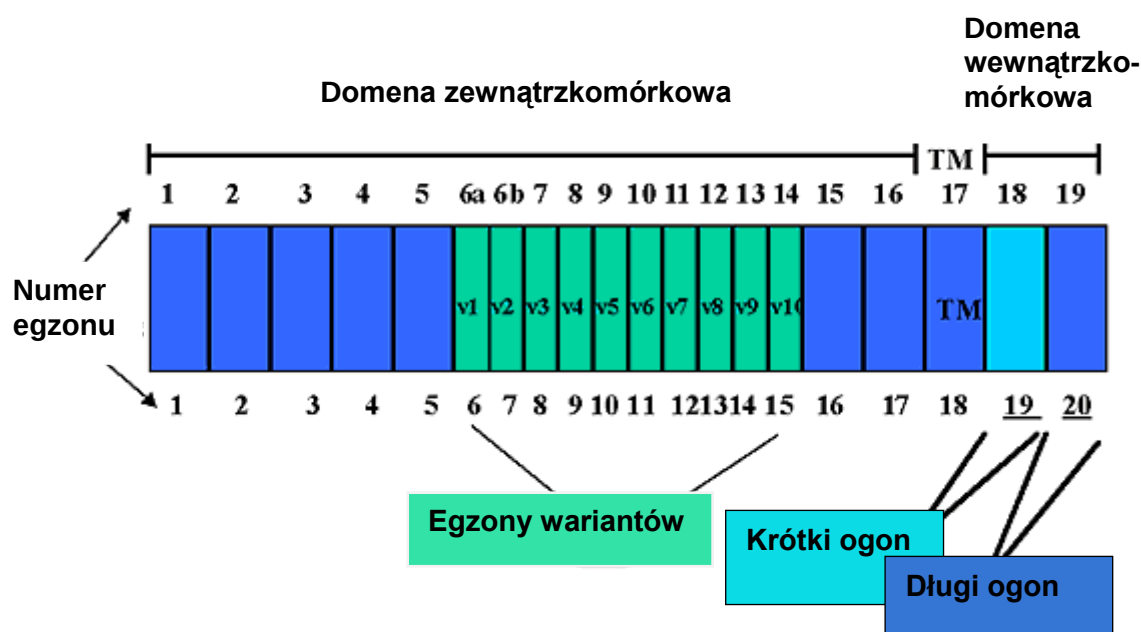
1.1 Znaczenie oraz występowanie białek CD44

Białka CD44 to glikoproteiny stanowiące jedną z pięciu grup białek adhezyjnych, reprezentujące typ I białek błonowych. CD44 po raz pierwszy opisano w roku 1980 jako antygen powierzchniowy limfocytów T i granulocytów [1, 25, 103]. Białko CD44 występuje najczęściej w formie standardowej (CD44s). Ekspresję glikoprotein z rodziny CD44 stwierdzono między innymi na powierzchni komórek nabłonkowych, limfocytów, fibroblastów, komórek glejowych, komórek Kupfera oraz komórek mezangium nerek. Jedynie kilka typów komórek nie wykazuje ekspresji białek CD44. Należą do nich hepatocyty, płytki krwi, niektóre linie komórek limfocytarnych, kardiomiocyty, komórki nabłonka cewek nerkowych, niektóre komórki jądra oraz skóry właściwej [11, 90, 102]. Rodzina białek CD44 tworzy receptory powierzchniowe dla ligandów występujących głównie w substancji zewnątrzkomórkowej (ECM), takich jak glikany, hialuroniany i kolagen [1, 86, 99]. Receptory CD44 kodowane są przez pojedynczy gen zlokalizowany w ramieniu krótkim ludzkiego chromosomu 11 (11p13-p14.1), zawierający 19 egzonów [119, 120]. Różnorodność strukturalna białek CD44 jest wynikiem alternatywnego składania pojedynczego genu i dotyczy co najmniej 10 z

19 egzonów kodowanych w ludzkim genie CD44. Dzięki temu procesowi powstają warianty CD44 (CD44v) różniące się budową domeny zewnątrzkomórkowej [119, 120]. Do heterogenności tej grupy cząsteczek przyczyniają się także procesy potranslacyjnej obróbki białek np. oligosacharydowa glikozylacja łańcuchów aminokwasowych [86], przyłączanie reszt siarczanu chondroityny, siarczanu keratyny oraz fosforylacja białek w zewnątrzkomórkowej części receptora [99]. Glikoproteiny CD44 posiadające w miejscu łączenia się z ligandem cząsteczkę siarczanu heparanu nabywają zdolności do przyłączenia czynników wzrostowych i promowania wzrostu komórki na drodze transdukcji sygnału zależnej od kompleksu receptor - czynnik wzrostu [8, 67, 140]. Łańcuch białkowy domeny wewnątrzkomórkowej oddziałuje z wieloma białkami cytoszkieletu, takimi jak ankyryna, merlina, c-src i ERM (ezryna, radyksyna, moezyna). [12, 94, 108]. W ostatnich latach przedmiotem badań stała się rola białek CD44 w przekazywaniu sygnału i wydaje się, że ta ich funkcja jest nie mniejsza niż ich udział w adhezji komórkowej [57, 108].

1.2 Izoformy CD44 (CD44v)

Różnorodność wariantów CD44v zależy w dużej mierze od alternatywnego składania genów, podczas którego od 6 do 15 egzonów jest różnie wycinanych z nici mRNA. Powoduje to powstanie izoform nazywanych wariantami 1.-10. (v1-v10) [98]. W wariantowych postaciach CD44 egzony 6.-14. oraz 18. są składane alternatywnie. Proces ten dotyczy głównie zewnątrzkomórkowej części receptora i powoduje zmiany długości białkowego łańcucha obecnego na powierzchni komórki. Numer danego wariantu wskazuje, który z egzonów pozostał w cząsteczce mRNA (pozostałe egzony zostają wycięte). W cząsteczce białka może brakować dowolnej kombinacji spośród 10 egzonów (v1-v10), przy czym istnieją warianty, w których pozostał więcej niż 1 egzon [94]. Białko CD44v6 jest izoformą zawierającą fragment łańcucha aminokwasowego kodowany przez egzon 10. (v6), natomiast pozostałe egzony zostają usunięte (Ryc. 1). Obiektem alternatywnego składania mRNA może być także domena wewnątrzkomórkowa, czego wynikiem jest powstanie dwóch izoform o długim (ang. *long-tailed*) lub krótkim (ang. *short-tailed*) ogonie. W pierwszym przypadku egzon 18. pozostał w cząsteczce mRNA, w drugim - został z niej wycięty (Ryc. 1) [98, 142, 143].



Ryc. 1 Alternatywne składanie egzonów kodujących białka z rodziny CD44

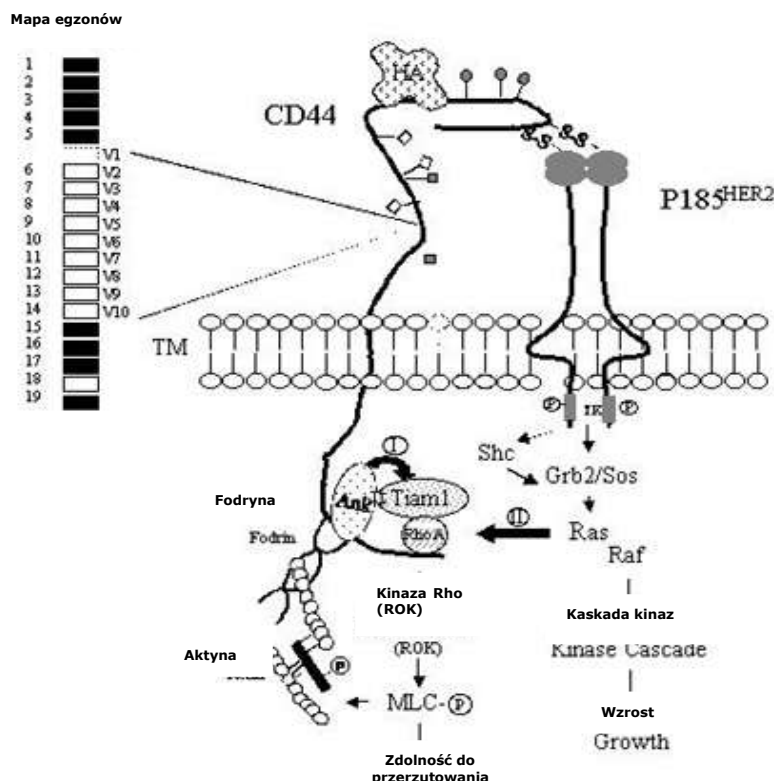
Rycina przedstawia schemat genu kodującego białko CD44. Górna linia przedstawia numery egzonów w genie CD44 występujących u człowieka w liczbie 19, a dolna 20 egzonów u myszy. Egzony występujące w najczęstszej izoformie CD44s przedstawione są w kolorze niebieskim. Kolorem zielonym oznaczono egzony, które w wyniku składania genów pozostają w cząsteczce CD44, tworząc odpowiednie warianty CD44v. Alternatywne składanie genów w domenie wewnątrzkomórkowej polega na wycięciu lub pozostawieniu w cząsteczce genu egzonu 18., dając odpowiednio część wewnątrzkomórkową z krótkim lub długim łańcuchem aminokwasów.

Źródło: W. i Ch. Knutson. "The hyaluronan receptor CD44"

1.3 Udział białek wariantów CD44 w fizjologicznych i patofizjologicznych procesach zachodzących u ludzi

Białka z rodziny CD44 biorą udział w wielu procesach fizjologicznych i patofizjologicznych, między innymi w embriogenezie, hematopoezie, napływie limfocytów do obwodowych narządów limfatycznych, zapaleniach, w agregacji i migracji komórkowej, retencji substancji okołokomórkowej, powstawaniu i progresji nowotworów oraz tworzeniu przez nie przerzutów [12, 13, 84, 154]. Stwierdzono między innymi, że oceniana metodą immunohistochemiczną (IHC) zdolność do syntezy CD44 i CD44v wiąże się z możliwością tworzenia kolonii w hodowlach wielu linii komórek nowotworowych oraz ze zdolnością do tworzenia przerzutów. Istnieją także doniesienia o tym, że rozpuszczalna forma CD44 może zapobiegać tworzeniu się guzów nowotworowych [143]. Przedmiotem poszukiwań jest rokownicza rola białka CD44v6 oraz jego wartość predykcyjna dla terapii celowanej z użyciem przeciwciał anty-

CD44v6. Ryc. 2 przedstawia jedną z możliwych dróg oddziaływań CD44v na procesy wzrostu i naciekania nowotworów oraz powstawanie przerzutów [8, 109].



Ryc. 2 Przyłączenie HA do CD44 pobudza aktywację kinazy tyrozyny zależnej od kompleksu p185HER2, co bezpośrednio wiąże ze sobą dwa niezależne szlaki przekazywania sygnału tj. Sos-Ras, pobudzający procesy wzrostu komórek nowotworowych, oraz Tiam1-RhoA zaangażowany w procesy naciekania sąsiadujących tkanek oraz powstawanie przerzutów.

Źródło: L. Y. W. Bourguignon "CD44- Mediated Oncogenic Signaling and Cytoskeleton Activation During Mammary Tumor Progression" *J Mam G Biol Neoplasm*, (2001), 6, 287-297

Wydaje się także, że główne czynniki angiogenezy – VEGF i bFGF oraz enzymy degradacji macierzy MMP biorą, w połączeniu z CD44v, udział w procesie ontogenezy i procesach determinujących wiele cech biologicznych komórek guza np. jego zdolność do naciekania i migracji w zależności od białek cytoszkieletu. Kompleksy CD44v – elementy cytoszkieletu, odgrywają ważną rolę w procesach przekazywania zewnętrznych sygnałów pomiędzy komórkami oraz pomiędzy komórką a ECM, jak również kontroli wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału odpowiedzialnych m.in. za nowotworzenie i tworzenie przerzutów. W niektórych badaniach wykazano, że w prawidłowych komórkach izoformy CD44 odgrywają rolę

jedynie na określonych etapach dojrzewania, natomiast wydaje się, że w komórkach nowotworowych szlaki te ponownie się uaktywniają [57].

1.4 Adhezja komórkowa i procesy przekazywania sygnału

Białka z rodziny CD44 przyłączają za pomocą domeny zewnątrzkomórkowej kwas hialuronowy, który jest jednym z podstawowych elementów ECM wielu tkanek oraz błony podstawnej nabłonków. Współdziała on między innymi z proteoglikanami ECM, dzięki czemu odgrywa istotną rolę w procesach adhezji komórkowej, oddziaływaniach macierz-komórka, degradacji hialuronianów, migracji komórkowej oraz procesach dojrzewania i różnicowania się komórek [86, 87]. Siła i zakres połączeń kompleksu CD44v-ECM uzależniona jest od liczby miejsc wiązania HA z receptorem oraz gęstości receptorowej i rodzaju izoform CD44 występujących na powierzchni komórki [8, 12, 13, 152]. Molekularne podstawy przekazywania sygnału w komórkach nowotworowych z udziałem receptorów CD44 są jednak nadal słabo poznane.

1.5 Prezentacja czynników wzrostu z udziałem CD44

Obecne w środowisku guza nowotworowego rozpuszczalne cząsteczki czynników wzrostu wpływają na regulację szeregu jego cech, takich jak proliferacja, naciekanie i tworzenie przerzutów [51]. W roku 1998 po raz pierwszy przedstawiono model oddziaływania pomiędzy czynnikiem wzrostu a białkami CD44 [109]. Zaobserwowano, że cząsteczka HA może wiązać inne czynniki wzrostu, np. EGF i tworzyć w połączeniu z białkami CD44 kompleks czynnik wzrostu-HA-CD44. Z tego powodu receptory CD44 obecne na powierzchni komórek nowotworowych mogą nie tylko pośredniczyć w przekazywaniu sygnału do wnętrza komórki, ale także prezentować czynnik wzrostu innym receptorom występującym na tej samej komórce, na sąsiednich komórkach i na komórkach podścieliska. Ten rodzaj prezentowania antygeny był wcześniej opisywany dla keratynocytów naskórka [8].

1.6 Rozsiew nowotworu

Ekspresja białek CD44, w tym CD44v6, może nadawać komórkom guza zdolność do tworzenia przerzutów [49, 115, 121, 155]. Wykazano, że izoformy CD44v6, a także v4-7 i v6-7 mogą nadawać komórkom potencjał do tworzenia przerzutów. Zjawisko to stwierdzono w modelu szczurzym, na komórkach nieprzerzutującej linii nowotworu, która po pobudzeniu receptorów CD44v6 nabywała takich zdolności [49].

Wstrzyknięcie przeciwciał przeciwko różnym wariantom CD44 prowadziło zarówno *in vitro* (komórki szczurzego raka trzustki) jak i *in vivo* (w modelu szczurzym) do opóźnienia wystąpienia przerzutów lub do całkowitego zablokowania rozsiewu nowotworu [121]. Zauważono, że zmniejszenie ekspresji CD44v6 w nabłonkach płaskich może być przejawem transformacji nowotworowej. Stwierdzono także, że cząsteczki CD44s występujące na powierzchni komórek zdolnych do tworzenia przerzutów występują w zmienionej postaci – część wystająca ponad powierzchnię błony komórkowej jest większa i silnie glikozylowana [152, 154]. Wartość rokownicza CD44v6 w odniesieniu do tworzenia przerzutów jest jednak kontrowersyjna.

1.7 Ekspresja białka CD44v6 w prawidłowych tkankach

W przeciwieństwie do formy standardowej, warianty CD44 w tym wariant 6. występuje w prawidłowych tkankach tylko w niektórych fazach rozwoju. W życiu płodowym CD44v6 bierze udział w adhezji komórkowej i oddziaływaniach pomiędzy komórkami nabłonkowymi a mezenchymalnymi [152]. Oddziaływania nabłonek - podścielisko mezenchymalne poprzez receptory CD44v6 pobudzają wzrost i różnicowanie się nabłonek. Najprawdopodobniej CD44v6 odgrywa istotną rolę w odróżnicowywaniu się poszczególnych tkanek nabłonkowych oraz dojrzewaniu i wzroście danego typu nabłonka, co ma miejsce już we wczesnych stadiach rozwoju zarodka. W życiu pozapłodowym białko CD44v6 obecne jest tylko na komórkach niektórych typów nabłonek, takich jak naskórek, nabłonek jamy ustnej, gardła, przełyku, szyjki macicy, gruczołu krokowego, a także pneumocytach typu II nabłonka płuc i na komórkach nabłonka oskrzeli [54, 61]. W prawidłowym gruczole piersiowym komórki nabłonka wyściełającego przewody mleczne nie wykazują ekspresji CD44v6, podczas gdy epitopy CD44v6 są silnie eksponowane na powierzchni komórek mioepitelialnych [36]. Ekspresji CD44v6 nie wykazują także prawidłowe krypty jelitowe [57]. W przeciwieństwie do nabłonek płaskich wydaje się, że w nowotworach pochodzenia gruczołowego dochodzi do nadekspresji CD44v6, gdyż w większości przypadków receptor ten jest nieobecny na tkankach prawidłowych będących punktem wyjścia dla nowotworu. W prawidłowym nabłonku płaskim ekspresja CD44v6 jest ograniczona do wczesnych stadiów rozwoju tkanki nabłonkowej [113]. Prawidłowe ludzkie keratynocyty skóry posiadają na swej powierzchni izoformy od v3 do v10 [61]. Nasilenie ekspresji CD44v6 jest zależne od dojrzałości komórek, co najlepiej widać na

przykładzie naskórka oraz nabłonków płaskich, i jest odmienne w poszczególnych warstwach nabłonka. W przypadku nabłonków płaskich nierogowaciejących jamy ustnej dorosłych osób, najsilniejsza ekspresja CD44v6 występuje w warstwie podstawnej i kilku rzędach komórek przypodstawnych warstwy kolczystokomórkowej. W nabłonkach rogowaciejących CD44v6 występuje w komórkach wszystkich warstw z wyjątkiem warstwy rogowej, z najsilniejszą ekspresją w warstwach młodszych i najslabszą w komórkach warstwy jasnej [4, 113]. Ekspresja CD44v6 w keratynocytach znajdujących się w obrębie procesu zapalnego nie różni się w porównaniu do tkanek zdrowych. Na komórkach spoczynkowych szpiku kostnego w tym w komórkach pnia, występuje słaba ekspresja CD44v6 lub jej brak [54, 100]. Dzięki zmniejszonej ekspresji CD44v6 lub jej braku w komórkach rozrodczych układu krwiotwórczego, skóry prawdziwej i krypt jelitowych oraz ich ograniczonemu występowaniu do kilku warstw komórek w obrębie nabłonków płaskich, wzrasta znaczenie CD44v6 jako potencjalnego celu dla terapii z udziałem anti-CD44v6.

1.8 Ekspresja CD44v6 w dysplastycznym nabłonku jamy ustnej

W dysplazji średniego stopnia (leukoplakia na brzusznej stronie języka) ekspresja CD44v6 ograniczona jest ściśle do dolnych partii nabłonka [4, 113]. W przypadku atrofii, przejawiającej się klinicznie jako erytroplakia języka i ocenianej również jako dysplazja średniego stopnia, komórki CD44v6-dodatnie występowały w różnych warstwach. W hyperplastycznym nabłonku dna jamy ustnej z nasiloną dysplazją, ekspresję CD44v6 obserwowano we wszystkich warstwach nabłonka z wyjątkiem warstwy rogowej [4, 113]. Płaskonabłonkowe raki jamy ustnej wykazują znacznie niższą ekspresję CD44v6 niż zmiany dysplastyczne. Chorzy w podeszłym wieku wykazują słabszą ekspresję CD44v6 w tkankach prawidłowych i dysplastycznych w porównaniu z młodszymi chorymi [4, 113]. W innych badaniach nad ekspresją białka CD44v6 w tkankach dysplastycznych jamy ustnej stwierdzono niezmienną [82] lub obniżoną [4] ekspresję w porównaniu z tkankami prawidłowymi pochodzącymi z tego samego rejonu jamy ustnej. Nasilenie ekspresji CD44v6 nie jest związane z histologicznym typem dysplazji czy innymi czynnikami kliniczno-patologicznymi [4, 113]. Wydaje się, że CD44v6 nie pozwala określić ryzyka przemiany zmian przednowotworowych jamy ustnej w raki [113]. W rakach, zwłaszcza dobrze zróżnicowanych, nasilenie ekspresji CD44v6 jest podobne jak w tkankach

prawidłowych lub dysplastycznych, ale w większości raków płaskonabłonkowych jest ona słabsza niż w wyjściowych tkankach [34, 37, 81, 116, 127].

1.9 Ekspresja białka CD44v6 w rakach płaskonabłonkowych

Ekspresję CD44v6 stwierdzono w tkankach pochodzących z raków płaskonabłonkowych niezależnie od ich punktu wyjścia. W przerzutach raków płaskonabłonkowych do węzłów chłonnych obserwowano mniejsze, równe lub większe nasilenie ekspresji CD44v6 w porównaniu do guzów pierwotnych [55, 56, 81, 139]. Najsilniejszą ekspresję CD44v6 stwierdzono w guzach wywodzących się z nabłonków okolicy głowy i szyi [34, 37, 55, 56, 72, 81, 127, 142], przełyku [46, 55], skóry [55, 125, 122] i oskrzeli [16, 38, 43, 55, 60, 91, 92, 101, 139], gdzie występowała ona w ponad 70% komórek guza. W rakach skóry odsetek komórek wykazujących ekspresję CD44v6 wynosił 100% [55, 125]. Na powierzchni komórek raków płaskonabłonkowych głowy i szyi obserwuje się częstą i dość jednorodną ekspresję CD44v6, przy czym zmniejsza się ona wraz z postępem nowotworzenia [4, 81]. Udział CD44v6 w rozwoju i progresji tych nowotworów pozostaje jednak niejasny. W innych nowotworach nabłonkowych ekspresja CD44v6 występuje rzadziej i jest mniej jednorodna. W rakach szyjki macicy udział komórek wykazujących ekspresję waha się w szerokich granicach od 32% do 100% (średnio poniżej 70%) [2, 3, 15, 23, 26, 69, 66, 70, 71, 129], a w raku sromu 33% [136].

1.10 Ekspresja białka CD44v6 w rakach gruczołowych

Ekspresję CD44v6 stwierdzono we wszystkich typach raków pochodzenia gruczołowego, przy względnie dużych różnicach pomiędzy nimi. Komórki pierwotnego raka piersi wykazują ekspresję wariantu 6. w 65-88% komórek [36, 68, 93, 94, 126], a komórki przerzutów tego nowotworu do węzłów chłonnych - w 91-100%. Rokownicze znaczenie ekspresji CD44v6 w raku piersi jest niejasne. W niektórych doniesieniach cecha ta wiązała się z gorszym rokowaniem [93, 126], w innych nie stwierdzono tej zależności [68], a w jednym badaniu stwierdzono wręcz wydłużenie przeżycia w przypadku ekspresji CD44v6 [50]. Wydaje się, że ekspresja białek CD44 wiąże się natomiast ze zróżnicowaniem komórek guza [40, 73, 118, 135].

W rakach gruczołowych płuca mniej niż 50% przypadków wykazywało ekspresję CD44v6 [16, 38, 139], choć w jednym badaniu stwierdzono ją w około 95% guzów

[91]. Nasilenie ekspresji CD44v6 w rakach gruczołowych i płaskonabłonkowych płuca jest podobne [16, 38, 55, 91, 101, 112, 139].

W rakach gruczołowych jelita grubego i odbytnicy [17, 23, 35, 76, 96, 97, 148, 149], trzustki [44, 45, 117] oraz żołądka [55, 95, 150] ekspresję CD44v6 wykazuje od 6% do 100% nowotworów. W rakach tych zaobserwowano także znamienne mniejszą ekspresję w ogniskach przerzutowych w porównaniu ze zmianami pierwotnymi [35, 51, 55, 97]. W kilku badaniach obserwowano także występowanie dużej heterogenności rozkładu CD44v6 na powierzchni komórek w obrębie jednego guza [71, 76, 88].

1.11 Ekspresja białka CD44v6 w nowotworach nienabłonkowych

Obecności CD44v6 nie stwierdzono na powierzchni komórek czerniaka złośliwego [90, 125], glejaka wielopostaciowego [78, 111, 134] i nerwiaka zarodkowego [48], natomiast w guzach wywodzących się z komórek Schwann'a (*schwannoma*) była ona słaba [123]. Ekspresję CD44v6 stwierdzono w 10-73% badanych próbek białaczki szpikowej [6, 65, 85], w 0-30% chłoniaków skóry [88, 145], w około 28% chłoniaków Hodgkin'a i w 28-57% pozostałych chłoniaków [114].

1.12 Przeciwciała monoklonalne anty – CD44v6 w badaniach klinicznych

W badaniach I i II fazy stosowano pochodzące od gryzoni przeciwciała monoklonalne (U36, VFF18), przeciwciała chimeryczne (chU36) oraz IgG pochodzenia ludzkiego (BIWA4) [18, 19, 20, 21, 22, 131]. We wszystkich badaniach z udziałem mysich IgG obserwowano wystąpienie reakcji typu ludzkie przeciwciało przeciw IgG mysimu (*human anti-mouse antibody*, HAMA [32]) Stworzenie chimerycznego przeciwciała (ludzko-mysiego) U36 (chU36) pozwoliło w znacznej mierze wyeliminować reakcję immunologiczną typu HAMA i HAMA (*human anti-human antibody*) skierowaną przeciw obcogatunkowemu przeciwciału [18, 20, 21, 33] W żadnym z powyższych badań pod wpływem przeciwciał anty CD44v6 nie uzyskano wydłużenia DFS, OS, regresji zmian lub znamiennej stabilizacji choroby. Jedno z badań II fazy dotyczyło humanizowanego przeciwciała biwatuzumabu (BIWA4) połączonego z izotopem renu, ¹⁸⁶Re [10]. Stabilizacja choroby trwała od 6 do 21 tygodni i obserwowana była tylko w grupie chorych leczonych maksymalnymi dawkami [10]. Badanie I fazy z udziałem biwatuzumabu (BIWI 1) połączonego ze związkiem chelatującym - mertanzyną, zostało

przerwane z uwagi na nasilone powikłania skórne, przy niewielkich korzyściach klinicznych [136].

1.13 Przeciwciała monoklonalne anty – CD44v6 w diagnostyce obrazowej

W badaniu Börjesson'a i wsp. [11] stosowano przeciwciało chimeryczne U36 znakowane cyrkonem 89 (^{89}Zr) jako radioznacznik w badaniach PET u chorych na miejscowo zaawansowane raki głowy i szyi. Czułość w odniesieniu do guza pierwotnego wynosiła 100%, a w odniesieniu do węzłów chłonnych 72%. Prawdliwość opisu PET potwierdzono operacyjnie u 112 na 121 badanych. Jest to wynik porównywalny z zastosowaniem badania przy użyciu fuzji tomografii komputerowej oraz rezonansu magnetycznego.

1.14 Cele pracy

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu napromieniania na nasilenie ekspresji CD44v6 w guzach pierwotnych, ksenograftach, tkankach prawidłowych, wykazujących konstytutywną ekspresję tego białka oraz w tkankach nie wykazujących ekspresji CD44v6 przed zastosowaniem RT, ale mogących wykazywać taką ekspresję podczas różnych faz dojrzewania.

W niniejszej pracy zastosowano metody IHC wykrywania białka CD44v6, które umożliwiają w prosty, szybki i względnie tani sposób ocenić ekspresję receptorów białkowych. Do badań wykorzystano ksenografty raków głowy i szyi oraz gruczolakoraka jelita grubego, a także tkanki ludzkie takie jak błona śluzowa jamy ustnej pobrana przed i po zastosowaniu RT oraz wycinki błony śluzowej odbytnicy i raka odbytnicy uzyskane chirurgicznie przed i po zastosowaniu RT.

Szczegółowe cele pracy obejmowały:

1. Określenie wpływu RT na nasilenie ekspresji CD44v6 w komórkach ludzkich ksenograftów raków głowy i szyi oraz gruczolakoraka jelita grubego.
2. Określenie wpływu RT na nasilenie ekspresji CD44v6 w komórkach błony śluzowej prawidłowego nabłonka jamy ustnej.
3. Określenie wpływu RT na nasilenie ekspresji CD44v6 w komórkach nowotworu złośliwego oraz w sąsiadującej z guzem, niezmienionej błonie śluzowej odbytnicy.

4. Ocenę ekspresji CD44v6 w rakach odbytnicy w odniesieniu do klinicznych cech chorego: wieku, płci, typu histologicznego oraz stopnia złośliwości histologicznej i stopnia zaawansowania klinicznego w chwili rozpoznania.
5. Porównanie ekspresji CD44v6 w ognisku pierwotnym oraz w przerzutach do regionalnych węzłów chłonnych.

MATERIAŁY I METODY

2.1 Ludzkie raki przeszczepiane na myszy nu/nu, ksenografty

2.1.1 Myszy

Do doświadczeń użyto męskie i żeńskie osobniki „nagich myszy” NMRI (nu/nu) w wieku 7-14 tygodni. Myszy hodowane były w sterylnych pomieszczeniach laboratoryjnych Centrum Doświadczalnego Wydziału Medycznego Politechniki w Dreźnie (zdj. 2-1). Sposób hodowli zwierząt oraz przeprowadzania doświadczeń był zgodny z niemieckim protokołem bioetycznym. Zachowany był 12-godzinny cykl dnia i nocy z użyciem sztucznego światła włączanego o godzinie 7.00 i gaszonego o 19.00. Zwierzęta odżywiane były komercyjnymi karmami dla zwierząt laboratoryjnych i otrzymywały wodę *ad libitum*. Temperatura w pomieszczeniu wynosiła 26°C. Poziom wilgotności powietrza wahał się w granicach od 50 do 60%. Ponadto zwierzęta objęte były stałą opieką weterynaryjną. Dla wywołania immunosupresji myszy, 2 dni przed przeszczepieniem guza nowotworowego poddawano je napromienianiu całego ciała (TBI) dawką 4 Gy (moc dawki 1 Gy/min.) przy użyciu aparatu ortowoltowego emitującego promieniowanie X o energii 200 kV (0,5 mm Cu) [5].



Zdj. 2-1. Myszy nu/nu z guzami przeszczepionymi w okolicy biodra, wykorzystywane w badaniach. Laboratorium Radiobiologii Centrum Doświadczalnego Wydziału Medycznego Politechniki w Dreźnie, Niemcy, zdjęcie własne.

2.1.2 Guzy przeszczepiane myszom (ksenografty)

1. **MKG-hSCC** grupa ludzkich raków płaskonabłonkowych o złośliwości G2 i G3 okolicy głowy i szyi otrzymanych jako ustabilizowane linie komórkowe w Laboratorium Radiobiologii i Radioterapii Doświadczalnej Wydziału Medycznego Politechniki w Dreźnie, Niemcy:
 - 1.1 MKG2 - wywodzący się z pierwotnego raka języka, rośnie jako G2
 - 1.2 MKG3 - wywodzi się z raka jamy ustnej, histologicznie G2
 - 1.3 MKG4 - wywodzący się z raka jamy ustnej, histologicznie G2/G3
 - 1.4 MKG5 - wywodzący się z raka jamy ustnej, histologicznie G3
 - 1.5 MKG6 - wywodzący się z raka jamy ustnej, histologicznie G2
 - 1.6 MKG7 - wywodzący się z raka jamy ustnej, histologicznie G2
 - 1.7 MKG9 - wywodzący się z raka dna jamy ustnej, histologicznie G2
 - 1.8 MKG12 - wywodzący się z raka migdałka, histologicznie G3
2. **FaDu-hSCC** otrzymany w roku 1968 z ludzkiego raka gardła dolnego pochodzącego od hinduskiego pacjenta. Obecnie ta linia komórkowa utrzymywana jest w ciągłym pasażu w *American Type Culture Collection (ATCC)* (Rockville, MD, USA). Używany do badań od lat 80. ubiegłego stulecia. Linia komórkowa FaDu rośnie na myszach nu/nu jako niskozróżnicowany rak bez zdolności keratynizacji. W zakresie objętości guza od 100-400 mm³ średni czas podwojenia objętości dla tego rodzaju guza określony został na około 4 dni [5]. W badaniach doświadczalnych wykazano, że nowotwór ten przeszczepiony na myszy nie powoduje lub powoduje nieznaczną odpowiedź immunologiczną [107].
3. **GL-hSCC** jest linią komórkową otrzymaną w roku 1991 w Hamburgu, Niemcy z miejscowo zaawansowanego ludzkiego raka płaskonabłonkowego krtani [5]. Histologicznie ksenografty GL-hSCC rosną jako guzy średnierzóżnicowane (G2), posiadające zdolność tworzenia keratyny. W zakresie objętości guza od 100-400 mm³ średni czas podwojenia objętości dla tego rodzaju guza określony został na około 8.6 dnia [58, 59]. GL-hSCC nie powoduje lub powoduje nieznaczną odpowiedź immunologiczną u myszy nu/nu [58, 59].
4. **UT-SCC-14** jest guzem pochodzenia ludzkiego otrzymanym w Klinice Otorynolaryngologii – Chirurgii Głowy i Szyi Uniwersytetu w Turku, Finlandia z raka wolnej części języka [47, 83]. Na myszkach nu/nu rośnie jako

wysokozróżnicowany nowotwór (G1) ze zdolnością do keratynizacji. Średni czas wzrostu objętości od 100 do 400 mm³ wynosi 5,6 dnia. Nie powoduje lub powoduje nieznaczną odpowiedź immunologiczną u myszy nu/nu [59].

5. **UT-SCC-5** jest guzem pochodzenia ludzkiego otrzymanym w Klinice Otorinolaryngologii – Chirurgii Głowy i Szyi Uniwersytetu w Turku, Finlandia z raka wolnej części języka. Materiał do utworzenia tej linii komórkowej pobrany został z przetrwałego guza 2-3 tygodnie po zakończeniu radykalnej RT. Następnie guz poddany był pasażowaniu na myszkach nu/nu przez około 3 lata do uzyskania trwałej linii komórkowej. Na myszkach guz rośnie jako niskozróżnicowany, nierogowaciejący najczęściej G3, rzadziej G2.
6. **UT-SCC-15** jest guzem pochodzenia ludzkiego wywodzącym się z miejscowej wznowy raka wolnej części języka po przebytej wcześniej radykalnej RT. Otrzymany w Klinice Otorinolaryngologii – Chirurgii Głowy i Szyi Uniwersytetu w Turku, Finlandia. Na myszkach nu/nu rośnie jako dobrze zróżnicowany nowotwór (G1) ze zdolnością do keratynizacji.
7. **UT-SCC-33** jest rakiem płaskonabłonkowym pochodzenia ludzkiego, wywodzącym się z guza dziąsła. Otrzymany w Klinice Otorinolaryngologii – Chirurgii Głowy i Szyi Uniwersytetu w Turku, Finlandia. Na myszkach nu/nu rośnie jako dobrze lub średnierzóżnicowany nowotwór (G1 lub G2) ze zdolnością do keratynizacji.
8. **SKX-SCC** jest klonem komórkowym ustalonym w wyniku serii przeprowadzonych pasażów z komórek pochodzących z ludzkiego raka dna jamy ustnej o średnim stopniu złośliwości histologicznej. [27].
9. **HT29** jest gruczolakorakiem uzyskanym do badań od Dr. Bergmann z Forschungszentrum, Rossendorf, Niemcy. Wykorzystana linia komórkowa pochodziła z ATCC(ang. *American Type Culture Collection*). Komórki raka jelita grubego będące źródłem HT29 zostały wyizolowane w roku 1964 przez J. Fogh. Linia HT29 została otrzymana przez wielokrotne pasażowanie pobranych komórek w roku 1975 przez J. Fogh and G. Trempe. Ksenografty rosnące na myszkach nu/nu histologicznie są guzami G2.

W tabeli 2-1 przedstawiono punkty wyjścia, stopień złośliwości oraz liczbę poszczególnych ksenograftów. Łącznie poddano ocenie 155 skrawków pochodzących z 85 ksenograftów, w tym 36 pierwotnie nienapromienianych ksenograftów raków

plaskonablonkowych, 6 ksenograftów otrzymanych przez zaszczepienie guza będącego wznową po RT, 40 ksenograftów raków plaskonablonkowych po zastosowaniu różnych dawek RT oraz 3 nienapromienianych ksenograftów raka jelita grubego.

Ksenograft	Lokalizacja guza pierwotnego	Stopień zróżnicowania guza pierwotnego	Stopień zróżnicowania ksenograftu	Guzy bez RT, n	Guzy po RT, n	Łączna liczba zbadanych graftów
FaDu	Gardło dolne	G3	G3	5	10	15
GL	Krtąń	G1	G1 i G2	6	16	22
UT5	Język, wznowa po RT	G2	G1	5	0	5
UT14	Język	G1	G2 i G3	5	14	19
UT15	Język, wznowa po RT	G1	G1	1	0	1
UT33	Język	G1	G1	4	0	4
SKX	Dno jamy ustnej	G2	G2	3	0	3
MKG	Różne okolice H&N	G2 i G3	G2 i G3	13	0	13
HT29	Jelito grube	G2	G3	3	0	3

Tabela 2-1. Wykaz badanych ksenograftów

2.1.2.1 Procedura przeszczepiania ksenograftów

W celu otrzymania przeszczepialnego guza (ksenograftu), małe fragmenty ludzkich guzów wszczepiane były podskórnie w okolicy prawego biodra nagich myszy NMRI nu/nu. W odniesieniu do ksenograftów raków plaskonablonkowych MKG, małe fragmenty guzów wszczepiane były podskórnie na plecach myszek nu/nu. Kolejne pasaży wszczepiane były w okolicę prawego biodra. Po osiągnięciu odpowiednich rozmiarów guzy były pasażowane 4-5 krotnie na kolejnych zwierzętach. Guzy były przeszczepiane w sterylnych warunkach, przy użyciu standardowego znieczulenia ketaminą w dawce 120 mg/ kg m. c. oraz ksylokainą w dawce 16 mg/ kg m.c. podanych pozajelitowo.

2.1.2.2 Procedura napromieniania zwierząt wiązką zewnętrzną

Napromienianie ksenograftów odbywało się w warunkach sterylnych w pokoju laboratoryjnym przy zastosowaniu wiązki o energii 200 kV (0,5 mm Cu). Odległość SSD wynosiła 42 cm, a moc dawki 1.1-1,2 Gy/min. Zwierzęta były napromieniane bez znieczulenia i w czasie RT oddychały powietrzem atmosferycznym. Stosowano ich stabilizację w specjalnych plastikowych tubach na płytkach Lucite'a. Dodatkowo w

polu napromieniania fiksowana była noga, na której znajdował się ksenograft. W przypadku guzów FaDu, GL i UT-SCC-14 napromienianie rozpoczynało się zgodnie z zaplanowanym protokołem w dniu, w którym guz osiągnął średnicę 6 mm. Guzy kontrolne nie były napromieniane. Zwierzęta napromieniane były 6–18 frakcjami podawanymi jeden raz dziennie. Ksenografty FaDu napromieniane były dawką frakcyjną 3 Gy, 7 dni w tygodniu natomiast UT14 oraz GL - dawką frakcyjną 2 Gy również 7 dni w tygodniu. Całkowita dawka RT podana zwierzętom z ksenograftem FaDu mieściła się w granicach od 0 do 54 Gy a dla innych ksenograftów raków płaskonabłonkowych od 0 do 36 Gy. Poszczególne zwierzęta były wykluczane z analizy, jeżeli występowały znaczne nieścisłości dozymetryczne, co w praktyce oznaczało przesunięcie kończyny z guzem w stosunku do zaplanowanego pola napromieniania o więcej niż 10%. Ksenografty raków jelita grubego nie były napromieniane. Ksenografty raków regionu głowy i szyi były napromieniane według protokołów zamieszczonych w tabeli 2-2.

Ksenograft	Grupa kontrolna	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4	Schemat RT
	Bez RT	TD 1	TD 2	TD 3	FD/ dni RT/tydz.
FaDu	0 Gy (n=5)	36 Gy (n=4)	45 Gy (n=3)	54 Gy (n=3)	3 Gy /7 dni /tydz.
GL	0 Gy (n=6)	12 Gy (n=6)	24 Gy (n=5)	36 Gy (n=6)	2 Gy /7 dni /tydz.
UT14	0 Gy (n=5)	12 Gy (n=5)	24 Gy (n=4)	36 Gy (n=5)	2 Gy /7dni /tydz.

Tabela 2-2. Protokół napromieniania badanych ksenograftów

2.1.2.3 Procedura pobierania ksenograftów

Guzy FaDu, GL oraz UT14 pobierane były w całości wraz z torebką 24 godziny po podaniu ostatniej frakcji RT, a ich średnica wynosiła 5–6 mm. Guzy kontrolne, nienapromieniane, usuwane były po osiągnięciu średnicy 10-12 mm. Po pobraniu guzy podlegały obróbce przygotowującej je do badań z użyciem metod immunohistochemicznych (IHC). Usunięte ksenografty umieszczane były na całą noc w 4% roztworze formaliny, a następnie zatapiane w ciekłej parafinie. Błoczki parafinowe krojone były nożem mikrometrycznym na skrawki o grubości 3 μ m (Reicher-Jung Cutting Machine, Rotationsmikrotom 2065), które były nanoszone na szkiełka pokryte poli-L-lizyną. Następnie preparaty były suszone przez około 10-12 godzin w temperaturze 37°C.

2.1.3 Tkanka nabłonkowa jamy ustnej oraz nowotwory wywodzące się z linii komórkowej MKG

Wycinki 8 prawidłowych tkanek nabłonkowych pochodzące od 8 chorych na raka jamy ustnej otrzymano z banku tkanek mieszczącego się w Laboratorium Radiobiologii i Radioterapii Doświadczalnej Kliniki Radioterapii Wydziału Lekarskiego im. Carl'a Gustav'a Carus'a Politechniki w Dreźnie, Niemcy. Próbkę te zostały pobrane w trakcie zabiegów operacyjnych. Od chorych tych pobrano wycinki raków, z których otrzymano linie MKG przez pasażowanie ich jako ksenografty na nagich myszkach. We wszystkich pierwotnych rakach uzyskano histologicznie potwierdzenia rozpoznania i określono stopień ich złośliwości. Wśród guzów były 2 raki języka, 4 raki ścian jamy ustnej, 2 raki dna jamy ustnej oraz 1 rak migdałka. Trzy spośród 8 guzów ocenione zostały jako niskozróżnicowane (G3), pozostałe jako średnierzóżnicowane (G2).

2.2 Ludzkie tkanki prawidłowe i nowotworowe

2.2.1 Napromieniana i nienapromieniana błona śluzowa jamy ustnej

Badane próbki pochodziły od chorych na potwierdzone histopatologicznie, zlokalizowane raki regionu głowy i szyi (rak jamy ustnej lub części ustnej gardła) w stopniu zaawansowania klinicznego od T1N0 do T4N3. Pacjenci otrzymywali RT jako podstawowe leczenie lub w uzupełnieniu zabiegu operacyjnego. Z badania wykluczono chorych, którzy z jakiegokolwiek powodu otrzymali wcześniej RT, mieli zmiany w obrazie morfologicznym krwi lub w badaniach biochemicznych, potwierdzone przerzuty odległe lub zły stan ogólny (WHO PS 3 i 4 lub < 60 w skali Karnofsky'go). W zależności od indywidualnych wskazań, chorzy otrzymali RT w dawkach całkowitych na guz w granicach 54-60 Gy. Szczegółowe informacje dotyczące napromieniania poszczególnych chorych nie są znane. Wycinki o wymiarach 5x5x5 mm pobierane były z przedniej części błony śluzowej wewnętrznej powierzchni policzka lub, jeśli ta okolica nie była napromieniana, z okolicy znajdującej się w polu leczenia. U wszystkich chorych wycinki pobierano przed rozpoczęciem RT oraz bezpośrednio po jej zakończeniu. Tkanki utrwalano w sposób standardowy w 4% roztworze formaliny oraz zatapiano w parafinie. Ta część badań przeprowadzona była w Klinice Radioterapii (Government Medical College Indore M.P., India) oraz w Aksigen Hospital Care w Bombaju, Indie. Następnie próbki te zostały przewiezione do Laboratorium

Radiobiologii Politechniki w Dreźnie przez Prof. Dörr'a, gdzie dzięki jego uprzejmości zostały udostępnione autorce.

2.2.2 Wycinki z błony śluzowej i raka odbytnicy

Całość badań wykonano wyłącznie na materiale ludzkim obejmującym grupę 72 chorych na raka odbytnicy, w tym 45 chorych leczonych poddanych RT poprzedzającej resekcję. Stosowano promieniowanie fotonowe X o energii 6, 15 i 18 Gy w dawkach od 25 do 50,4 Gy. Część chorych otrzymała 2 cykle chemioterapii z udziałem 5-fluorouracylu i kwasu foliowego w dawkach odpowiednio 350 mg/m² i 20 mg/m² podanych jednocześnie z frakcjami RT od 1. do 5. i od 20. do 25 dnia. Tabela 2-3 przedstawia zastosowany schemat RT oraz liczbę cykli CHT. Niektórzy chorzy z powodu złej tolerancji nie otrzymali pełnych 2 cykli chemioterapii. Biologiczną dawkę efektywną (BED) podaną na guz obliczono dla $\alpha/\beta = 5$ Gy, korzystając z modelu liniowo – kwadratowego (tabela 2-3) [14, 132].

$$BED = nd \times \frac{\alpha/\beta + d}{\alpha/\beta + 2}$$

n - liczba frakcji

d - dawka frakcyjna promieniowania

nd=całkowita dawka fizyczna

α/β - określa promieniowrażliwość komórek, miara pojemności naprawczej komórek

Dawka całkowita RT	Dawka frakcyjna RT	Liczba frakcji	BED $\alpha/\beta=5$ Gy	Liczba chorych	Liczba dni CHT	Liczba dni od zakończenia RT do zabiegu operacyjnego
25 Gy	5 Gy	5	35,7	22	0	1–10 (śr. 6,3)
45-48,6 Gy	1,8 Gy	25-27	-	12	3-10	18–88 (śr. 54,7)
45-48,6 Gy	1,8 Gy	25-27	43,7- 47,2	4	0	
50,4 Gy	1,8 Gy	28	49	1	0	
50,4 Gy	1,8 Gy	28	-	6	2-10	30–68 (śr. 47,0)

Tabela 2-3. Schematy leczenia stosowane u chorych na raka odbytnicy otrzymujących przedoperacyjną radioterapię lub radiochemioterapię

Zabieg operacyjny w grupie chorych otrzymujących krótkotrwałą RT (25 Gy w 5 frakcjach bez chemioterapii) odbywał się średnio w 6,3 dniu od jej zakończenia. Chorzy otrzymujący konwencjonalnie frakcjonowaną RT (≥ 45 Gy w 25-28 frakcjach) operowani byli średnio po 50,8 dniach od jej zakończenia. Uzyskano od nich wycinki prawidłowej błony śluzowej odbytnicy (usunięte podczas zabiegów operacyjnych

sąsiadujące z guzem fragmenty tkanek niezmiennych nowotworowo oraz linia cięcia), a od chorych z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych – także wycinki z węzłów chłonnych. Zbadano także wycinki guza od 21 chorych pobrane przed rozpoczęciem przedoperacyjnej RT. Ekspresję CD44v6 w tkankach nienapromienianych oceniano w wycinkach prawidłowej błony śluzowej odbytnicy (dystalna linia cięcia chirurgicznego), rakach odbytnicy oraz zajętych węzłach chłonnych pochodzących od chorych poddanych pierwotnemu zabiegowi operacyjnemu. Łącznie zbadano wycinki nowotworowe pochodzące od 27 chorych operowanych metodą Dixon’a lub Miles’a w latach 1999-2006. Dane o chorych uzyskano z historii chorób Kliniki Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed.). W tabeli 2-4 przedstawiono łączne zestawienie zbadanych tkanek.

Lp.	Rodzaj badanej tkanki	Liczba chorych
1	Prawidłowa nienapromieniana błona śluzowa odbytnicy	27
2	Prawidłowa błona śluzowa odbytnicy po RT	44
3	Nienapromieniany rak odbytnicy	Zabieg operacyjny
		Biopsje
		Łącznie
4	Rak odbytnicy po RT	45
5	Nienapromieniany węzeł chłonny	14
6	Węzeł chłonny po RT	18

Tabela 2-4 Wykaz zbadanych tkanek pochodzących od chorych na pierwotnego raka odbytnicy

2.3 Wykrywanie CD44v6 w skrawkach parafinowych guzów i tkanek prawidłowych

Wszystkie tkanki utrwalane były w 4% formalinie, zatapiane w parafinie i skrawane nożem mikrometrycznym na skrawki o grubości 2-3 μm . Tkanki pochodzące od chorych na raki regionu głowy i szyi oraz ksenografty wywodzące się z raków tego regionu były wybarwiane i analizowane w Laboratorium Radiobiologii i Radioterapii Doświadczalnej Politechniki w Dreźnie, Niemcy. Tkanki prawidłowe i nowotworowe pobrane od chorych na raka odbytnicy pochodziły z Zakładów Patomorfologii z Gdańska i Elbląga. Wszystkie wycinki krojone były w Laboratorium Immunohistochemicznym Katedry i Zakładu Patomorfologii GUMed (kierownik prof. dr hab. n. med. Wojciech Biernat) Badania IHC oraz ich analiza wykonane zostały w Zakładzie Histologii Katedry Histologii i Immunologii GUMed (kierownik prof. dr hab. n. med. Jolanta Myśliwska. Parafinowe skrawki zarówno tkanek prawidłowych, jak i

nowotworowych, „odparafinowywano” przy użyciu ksylenu (trzykrotnie po 10 minut), a następnie uwadniano w roztworach etanolu o malejących stężeniach (100%→100%→96%→80%→70%→40%) po 3 minuty w każdym. Następnie skrawki płukano trzykrotnie w roztworze PBS (0,1 mol/l *phosphate buffer solution*, pH=7,4), przygotowywanym bezpośrednio przed użyciem (NaCl + Na₂HPO + K₂HPO + woda destylowana) lub wykorzystywano gotowy, komercyjnie dostępny proszek do przygotowywania PBS, rozpuszczany w wodzie destylowanej. Zgodnie ze standardowymi protokołami wykorzystywanymi w badaniach z użyciem IHC, zastosowano metodę wzmocnienia antygenowego przy użyciu mikrofali w buforze cytrynianowym (mikrofala firmy Whirlpool, Szwecja, Model Vip20, 800W, bufor, 0,1 mol/l cytrynian sodu i kwas cytrynowy, pH=6, gotowanie przez 10 min.). Ten rodzaj wzmocnienia antygenowego stosowany był w odniesieniu do prawidłowych i nowotworowych ludzkich tkanek. Ksenografty nie były poddawane gotowaniu w kuchence mikrofalowej. Następnie tkanki chłodzone były w lodzie przez około 30-45 min. Po każdym następnym kroku skrawki płukane były w PBS 3 x 5 min. Inkubacja z odczynnikami odbywała się w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej 20-25°C. Obecność CD44v6 na powierzchni komórek wykrywano przy użyciu zestawu Animal Research Kit (DAKO ARK, Hamburg, Niemcy) oraz peroksydazy (DAKO K3954, K3955) dla pierwotnych przeciwciał pochodzenia mysiego. W badaniach wykorzystano pierwotne mysie przeciwciało monoklonalne anti-human CD44 var (v6), klon VFF18, podklasa IgG1. Wybrane przeciwciało charakteryzuje się najwyższym powinowactwem do antygenu CD44v6 spośród dostępnych obecnie przeciwciał anti-CD44v6 [55]. Wyjściowe stężenie przeciwciała wynosiło 1000 µg / 1 ml, natomiast stężenie robocze 1:1000. Wszystkie odczynniki przechowywane były w warunkach zalecanych przez producenta tj. w temperaturze 4°C.

2.3.1 Protokół przygotowywania i aplikacji odczynników

1. Blokowanie peroksydazy przy użyciu 0,03% H₂O₂ – blokowanie aktywności endogennej peroksydazy tkankowej - 5 min.
2. Inkubacja z biotynylowanym pierwotnym przeciwciałem (także dodatnia i ujemna kontrola) - 20 min.

Krok 1: Wymieszanie skoncentrowanego przeciwciała pierwotnego ze zmodyfikowaną biotynyłowaną immunoglobuliną przeciwko immunoglobulinie mysiej w buforze Tris-HCl zawierającym białko nośnikowe i 15 mM azotek sodu (NaN_3). Rozpuszczalnik zawierał 1% albumin osocza wołowego.

Krok 2: Dodanie odczynnika blokującego (mysie osocze rozpuszczone w buforze Tris-HCl) i inkubacja w temperaturze pokojowej.

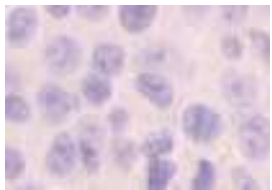
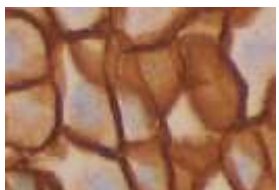
3. Inkubacja z kompleksem streptawidyna-peroksydaza w temperaturze 37°C.
4. Wykrywanie i lokalizacja związanego kompleksu przeciwciał przy użyciu roztworu kompleksu DAB + chromogen (diaminobenzydyna-chromogen). Na każdy 1 ml buforu stosowano 1 kroplę roztworu DAB + chromogen.
5. Barwienie preparatów hematoksyliną celem uwidocznienia jąder komórkowych.
6. Odwadnianie skrawków w roztworach alkoholu o wzrastających stężeniach (40%→→→100%) po 3 minuty w każdym i ich oczyszczanie w ksylenie 2x10 min.
7. Zamykanie preparatów przy użyciu medium Entellan (Merck, Karlsruhe, Niemcy) i ich pokrywanie szkiełkami nakrywkowymi.
8. Jako kontrolę ujemną używano preparaty, w których zamiast przeciwciała pierwotnego stosowano PBS. Wynik był ujemny, gdy nie wykrywano ekspresji białka CD44v6.

2.4 Analiza ekspresji CD44v6 i ocena jej nasilenia

2.4.1 Analiza ekspresji CD44v6

Ekspresję błonową CD44v6 w komórkach tkanek zdrowych i tkanek nowotworowych analizowano przy użyciu opisanej metody IHC. Oceniono związek pomiędzy ekspresją białka CD44v6 a histopatologiczną złośliwością guza (według skali G1-G3). Tkaniki były analizowane przez autorkę pracy przy użyciu mikroskopu świetlnego (MŚ) przy całkowitym powiększeniu 100–400x (Carl Zeiss MC80, Jena, Niemcy). Dla każdego ze skrawków analiza była przeprowadzona przy użyciu powiększenia 100x, 200x i 400x. Uzyskane wyniki zostały zobrazowane zdjęciami z MŚ. Ekspresja glikoproteiny CD44v6 analizowana była także pod kątem heterogenności w obrębie komórek pochodzących z jednego guza (całkowita i niecałkowita ekspresja). Ekspresja CD44v6 dla każdego badanego skrawka określana była jakościowo wzrokową metodą

porównawczą przy użyciu czterostopniowej skali (od 0 do 3) według poniższego schematu:

0	brak ekspresji błonowej CD44v6		
1	słaba ekspresja		
2	średnia ekspresja		
3	silna ekspresja		

Wynik interpretowano jako dodatni tylko w przypadku ewidentnej ekspresji błonowej. Z uwagi na heterogenność w obrębie guza w poszczególnych ksenograftach pochodzących od myszy, w każdym skrawku określano dokładnie procent komórek wykazujących ekspresję CD44v6 i oceniano jej nasilenie w skali od 0 do 3. Następnie na przekroju przez największy wymiar ksenograftów określano średnią arytmetyczną ekspresji. Ponieważ tkanki nowotworowe pochodzące bezpośrednio od ludzi stanowiły jedynie wycinki guzów, nie określano heterogenności ekspresji w obrębie guza, a jedynie jej obecność lub brak oraz średnie nasilenie ekspresji w badanym wycinku. W ludzkich tkankach prawidłowych analizowano nasilenie ekspresji CD44v6 w poszczególnych warstwach nabłonka płaskiego oraz całościowo w nabłonku odbytnicy.

2.4.2 Ocena nasilenia ekspresji CD44v6

Średnia ekspresja CD44v6 oceniana była na podstawie analizy całego przekroju badanego guza lub tkanki prawidłowej według następujących zasad:

- Silna ekspresja (3 pkt.) - jeżeli suma poszczególnych pól żywych komórek w obrębie guza ocenionych na 2 lub 3 punkty była większa niż 80%, w tym więcej niż 50% komórek żywych było ocenionych na 3 punkty (na 2 punkty mniej niż 30%).
- Średnia ekspresja (2 pkt.) - jeżeli suma komórek żywych określona jako 2 lub 3 znajdowała się w zakresie 60-80%, a komórki oceniane na 2 stanowiły powyżej 50%.
- Słaba ekspresja (1 pkt) - jeżeli suma odsetka komórek określonych jako 2 lub 3 była mniejsza niż 20% lub 80% żywych komórek wykazywało ekspresję na poziomie 1 punktu.
- Ogniskowa ekspresja – jeżeli CD44v6 stwierdzano w mniej niż 10% żywych komórek (jeden przypadek guza FaDu).
- Brak ekspresji (0 pkt.) - jeżeli guz nie wykazywał ekspresji CD44v6

W obrębie całego przekroju ksenograftu oceniany był udział komórek martwiczych oraz udział obszarów z perlami rogowymi. Komórki z obszarów rogowacenia w obrębie guza traktowane były jako martwicze, nawet w przypadkach dobrze wyodrębnionych, prawidłowych jąder komórkowych. Wynikało to z ich pomijalnego znaczenia w szerzeniu się guza, śmierci komórek po zastosowaniu RT oraz rokowaniu. Oprócz analizy jakościowej błonowej ekspresji CD44v6 i rozmieszczenia komórek wykazujących ekspresję CD44v6 w obrębie guza, badano także ich rozmieszczenie w odniesieniu do torebki guza oraz naczyń krwionośnych.

2.5 Histologiczne różnicowanie badanych guzów nowotworowych

Histopatologiczne cechy badanych pierwotnych raków regionu głowy i szyi określono w Zakładzie Patomorfologii Politechniki w Dreźnie. Stopień różnicowania ksenograftów ustalany był przez autorkę we współpracy z patomorfologami z Politechniki Drezdeńskiej. W odniesieniu do tkanek odbytnicy stopień różnicowania histologicznego ustalany był przez dr Małgorzatę Gross z Zakładu Patomorfologii GUMed.

Ocena stopnia złośliwości histologicznej dokonywana była na podstawie standardowej trójstopniowej skali G:

- G1 - dobrze zróżnicowany guz, niski stopień złośliwości, komórki wysoko dojrzałe, zróżnicowane, o małym stopniu proliferacji, duża zdolność do odtwarzania prawidłowych struktur
- G2 - średnio zróżnicowany guz
- G3 - źle zróżnicowany guz, wysoki stopień złośliwości, często komórki niezróżnicowane lub anaplastyczne, szybko rosnące, naciekające sąsiednie struktury, obecność ognisk martwicy, nadmierna proliferacja naczyń krwionośnych, liczne figury podziału, niska zdolność odtwarzania prawidłowych struktur tkankowych lub jej brak.

2.6 Ekspresja CD44v6 w komórkach ludzkich nabłonków jamy ustnej

Ekspresję CD44v6 oceniano w komórkach tkanek nabłonkowych pochodzących od 28 chorych na raka rejonu głowy i szyi. Poszczególne pary wycinków pobierane były od tego samego chorego przed rozpoczęciem RT oraz wkrótce po jej zakończeniu. Tkanki pobierane były z przedniej części wewnętrznej błony policzka. Do końcowej analizy włączono tkanki pochodzące od 22 chorych. Tkanki od pozostałych 6 chorych odrzucono z powodów technicznych, takich jak artefakty lub zniszczenie tkanek, uniemożliwiających ich obróbkę lub analizę mikroskopową. Dodatkowo 8 biopsji pobrano od chorych, którzy nie byli napromieniani; ich raki okolicy głowy i szyi stanowiły punkty wyjścia dla ksenograftów MKG.

2.6.1 Kategorie ocenianych mikroskopowo uszkodzeń popromiennych w błonie śluzowej jamy ustnej

Wyróżniono następujące kategorie popromiennych uszkodzeń błony śluzowej jamy ustnej:

- 1 Aplazja: w badanej części skrawka brak żywych komórek, dopuszczalna obecność komórek płaskich, bezjądrowych.
- 2 Hipoplazja: zmniejszona liczba żywych komórek; wyróżniono 3 stopnie hipoplazji od słabo wyrażonej do silnie wyrażonej.
- 3 Hiperplazja: nawarstwienie większej liczby komórek niż normalnie w obrębie jednej warstwy.

- 4 Parakeratoza: nieprawidłowe różnicowanie komórek, skrócenie czasu obrotu komórkowego do około 4-5 dni, ze zmniejszeniem liczby komórek warstwy ziarnistej. Obecność przetrwałych jąder w komórkach warstwy rogowej.

2.7 Metody statystyczne

Do analizy ekspresji oraz rozmieszczenia CD44v6 zastosowano statystykę opisową. Wyniki opracowano za pomocą programu SPSS for Windows (Statistical Package for the Social Sciences), wydanie 11.5.1. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SEM oraz jako średnia $\pm$ SD. Dokonano opisowej analizy fragmentów guza o dodatniej i ujemnej ekspresji CD44v6. Opisano i przeanalizowano zależność pomiędzy natężeniem ekspresji CD44v6 a położeniem komórek względem naczyń krwionośnych i powierzchni ksenograftów. Poszczególne grupy porównano przy użyciu komputerowych programów statystycznych: Sigma Plot (test t-Student'a), Statistica 8.0 (test t) oraz ANOVA. Minimalny poziom istotności statystycznej przyjęto dla $p < 0,05$. Wartości p w zakresie 0,05–0,1 były interpretowane jako trend.

WYNIKI

3.1 Ksenografty ludzkich raków

3.1.1 Ekspresja CD44v6 w prawidłowej nienapromienianej błonie śluzowej policzka

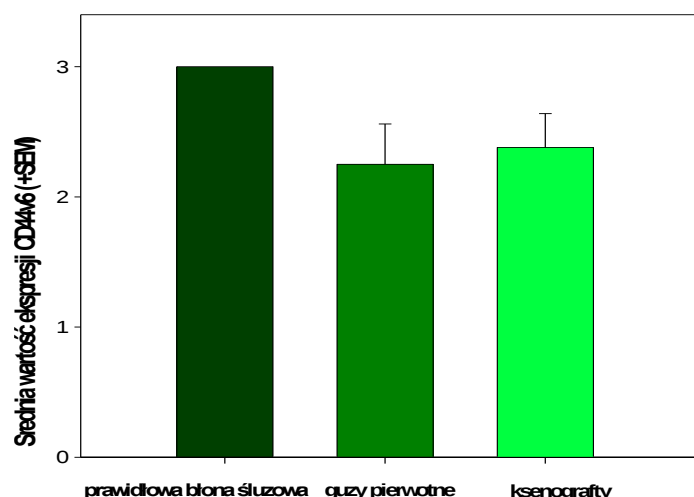
W żadnym przypadku nie wykazano ekspresji CD44v6, ani w jądrze komórkowym ani w cytoplazmie badanych komórek. W nabłonku płaskim rogowaciejącym ekspresja CD44v6 ograniczona była do komórek warstwy podstawnej i przypodstawnej (tzw. warstwa rozrodcza) i słabła w kierunku górnych warstw. Najslabsza była w warstwie komórek ziarnistych i nie występowała ona w ogóle w warstwie komórek jasnych i rogowych. Obraz taki występował w 6 spośród 8 badanych przypadków (zdz. 3-1). W pozostałych 2 przypadkach ekspresję obserwowano we wszystkich warstwach nabłonka, także w warstwie komórek jasnych i w warstwie rogowej. W 7 na 8 przypadków najsilniejsza ekspresja (oceniona na 3 punkty), występowała w warstwie kolczystokomórkowej. W 4 przypadkach komórki warstwy podstawnej wykazywały różny stopień ekspresji CD44v6 (punktacja od 0 do 2 punktów). W 2 z 8 badanych tkanek najsilniejsza ekspresja CD44v6 widoczna była w komórkach warstwy podstawnej. W żadnym z badanych fragmentów tkanek prawidłowych nie stwierdzono obecności CD44v6 w komórkach podścieliska.

3.1.2 Występowanie CD44v6 na komórkach pierwotnych raków wywodzących się z błony śluzowej jamy ustnej oraz ich ksenograftów

W 4 spośród 8 przypadków stwierdzono znamienne niższą ekspresję CD44v6 w wycinkach z nowotworów pierwotnych i przeszczepionych w porównaniu do pochodzącej od tych samych chorych prawidłowej tkanki nabłonkowej. Ekspresja CD44v6 i jej rozkład na komórkach prawidłowych była inna niż nowotworach i ksenograftach. Była ona słabsza w guzach mniej zróżnicowanych (G2 i G3; tabela 3-1).

Lp.	Lokalizacja guza pierwotnego	Stopień zróżnicowania pierwotnego guza	Stopień zróżnicowania ksenograftu	Ekspresja CD44v6		
				Prawidłowy nabłonek	Guz pierwotny	Ksenograft
1	Rak dna jamy ustnej	G2	G2	3	3	3
2	Rak języka	G2	G2	3	3	3
3	Rak błony śluzowej jamy ustnej	G2	G1	3	3	3
4	Rak błony śluzowej jamy ustnej	G3	G3	3	1	1
5	Rak błony śluzowej jamy ustnej	G2	G2 i G3	3	2	2
6	Rak błony śluzowej jamy ustnej	G2	G1	3	3	3
7	Rak języka	G3	G2	3	1	2
8	Rak migdałka	G3	G3	3	2	2

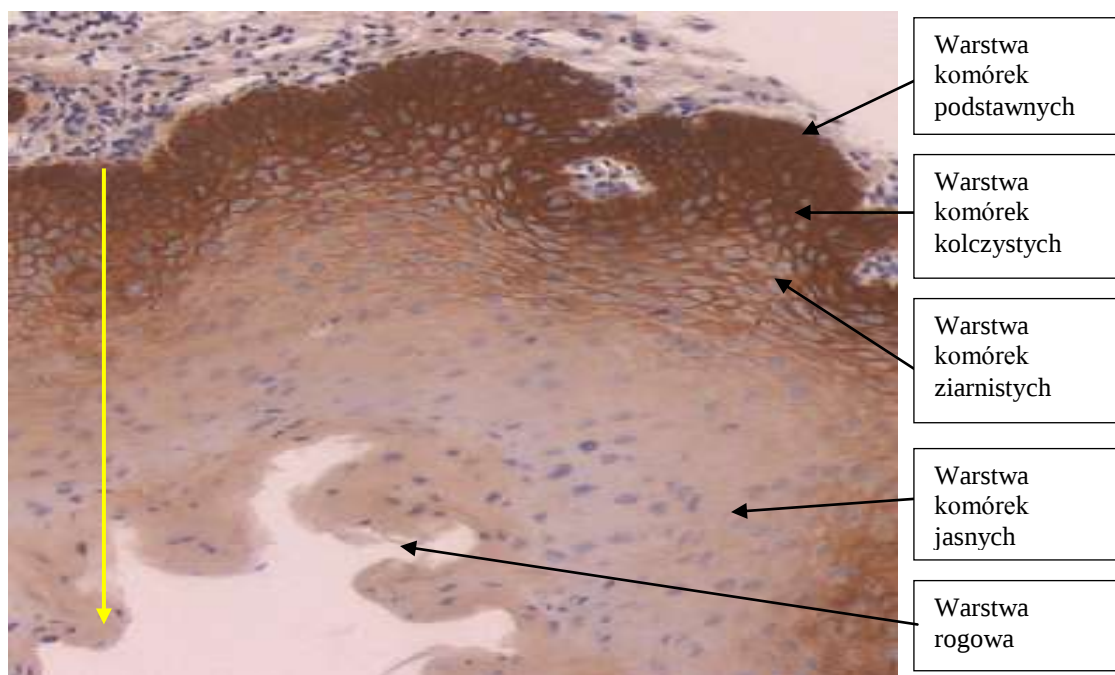
Tabela 3-1. Średnia ekspresja CD44v6 w skali od 0-3 dla różnych tkanek (prawidłowa błona śluzowa jamy ustnej, guz pierwotny, ksenograft) pochodzących od tego samego chorego. W jednym przypadku stopień złośliwości histologicznej był określony dla dwóch niezależnych ksenograftów.



Wykres 3-1. Średnia wartość ekspresji CD44v6: prawidłowa błona śluzowa (kolumna 1) = $3,0 \pm 0,0$; guz pierwotny (kolumna 2) = $2,25 \pm 0,31$; ksenograft (kolumna 3) = $2,37 \pm 0,26$. Zarówno guzy pierwotne, jak i ksenografty wykazują znamienne niższą ekspresję CD44v6 w porównaniu z tkanką prawidłową pochodzącą z jamy ustnej, p odpowiednio 0,031 i 0, test t. Nie stwierdzono znamiennych zmian w ekspresji wariantu 6 w ksenograftach w porównaniu z guzami pierwotnymi, $p=0,76$, test t - Studenta.

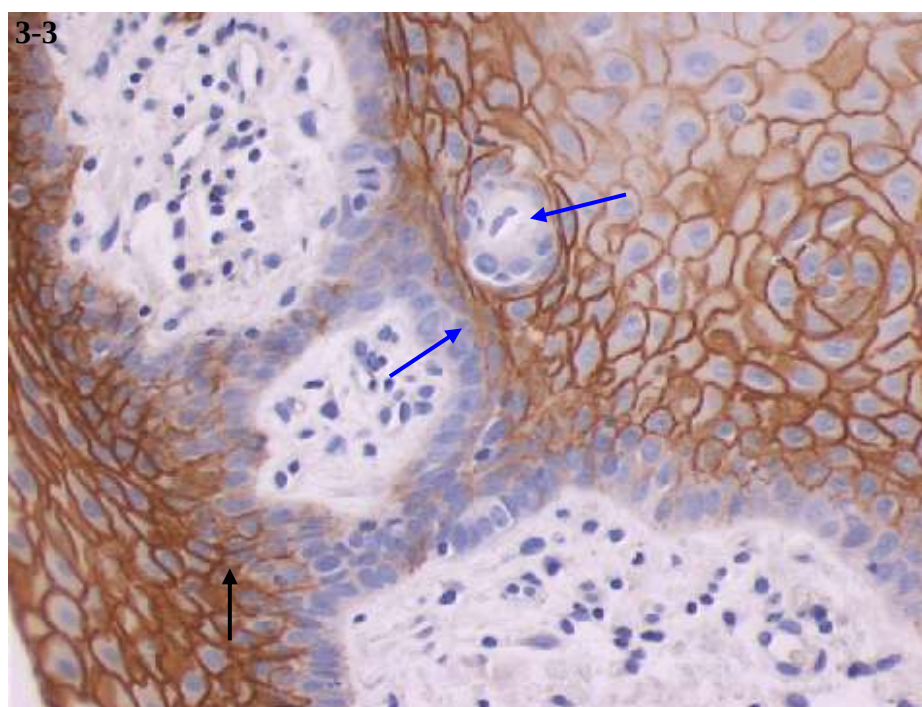
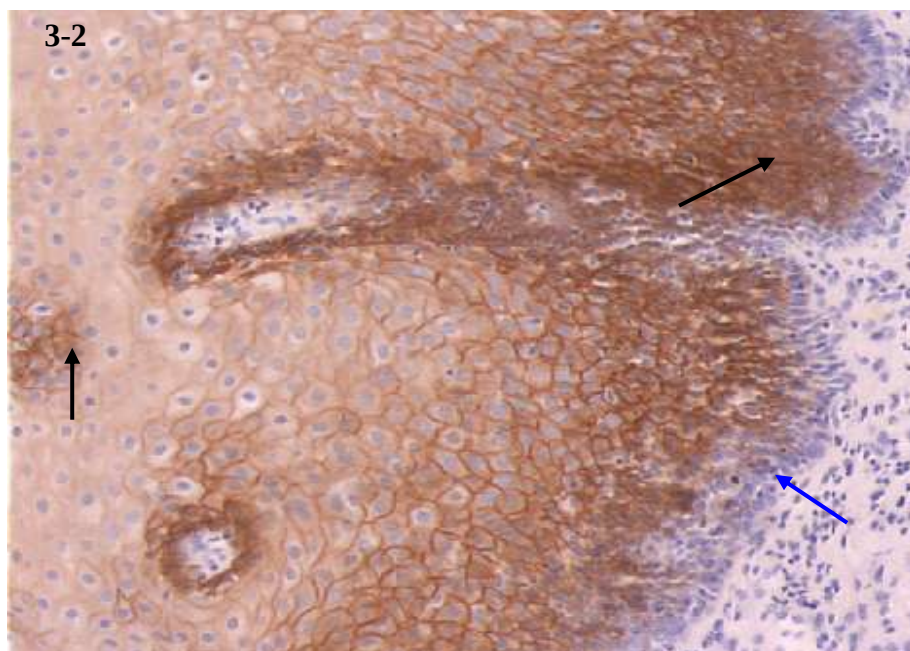
Siedem spośród 8 badanych grup guzów pierwotnych i wywodzących się z nich ksenograftów wykazywało bardzo podobne cechy fenotypowe w zakresie ekspresji CD44v6. Cztery spośród 8 badanych grup tkanek nowotworowych wykazywało podobne nasilenie ekspresji CD44v6 jak prawidłowa błona śluzowa. Błona śluzowa jamy ustnej wykazywała jednak istotnie większą średnią ekspresję CD44v6 w porównaniu z tkankami nowotworowymi (wykres 3-1). Ekspresja CD44v6 na komórkach

prawidłowego nabłonka miała homogenny, kompletny rozkład (zdj. 3-1) podczas, gdy rozkład ten na komórkach nowotworowych był niejednorodny.



Zdj. 3-1 Ekspresja CD44v6 w prawidłowym nabłonku wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym jamy ustnej (przednia, wewnętrzna powierzchnia policzka) pobranym od chorego na pierwotnego raka jamy ustnej. Wszystkie warstwy nabłonka z wyjątkiem warstwy komórek jasnych i warstwy zrogowaciełej (komórki CD44v6-ujemne), wykazują silną ekspresję CD44v6, z tendencją do jej zmniejszania się wraz ze stopniem dojrzewania komórek. Całkowite powiększenie 100x.

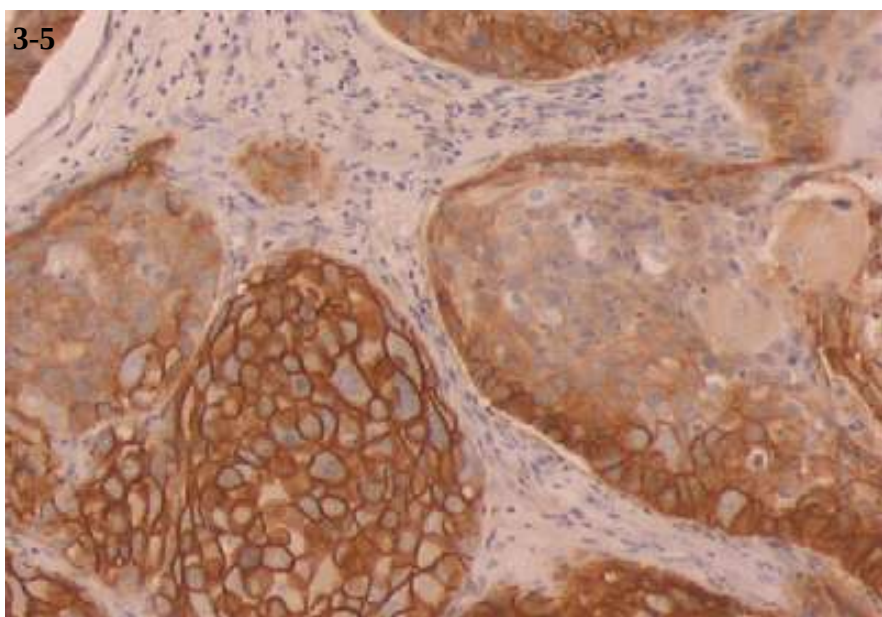
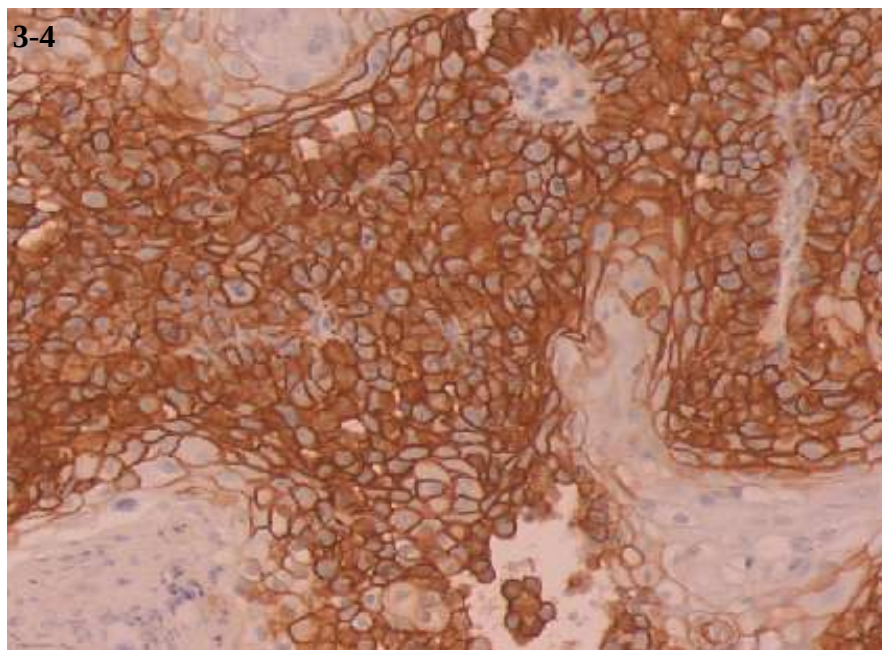
Wykazano, że w porównaniu do tkanki prawidłowej, na komórkach nowotworowych ekspresja badanego antygenu była częściej niekompletna (zdj. 3-2, 3-3).



Zdj. 3-2 i 3-3 Ekspresja CD44v6 w nienapromienianych guzach pierwotnych wywodzących się z jamy ustnej, G2. Widoczna wyraźna heterogenność ekspresji CD44v6 - od komórek nie wykazujących obecności CD44v6, określonej jako 0 (niebieska strzałka), do silnej ekspresji, określonej jako 3 (czarna strzałka). Niebieska strzałka pokazuje komórki guza bez ekspresji CD44v6, sąsiadujące z prawidłową tkanką i naciekające ją, ze zwiększonym udziałem komórek dzielących się. W obrębie guza widoczne jest częściowe zachowanie cech prawidłowej tkanki nabłonkowej. Całkowite powiększenie: Zdj. 3-2 100x, zdj. 3-3 200x.

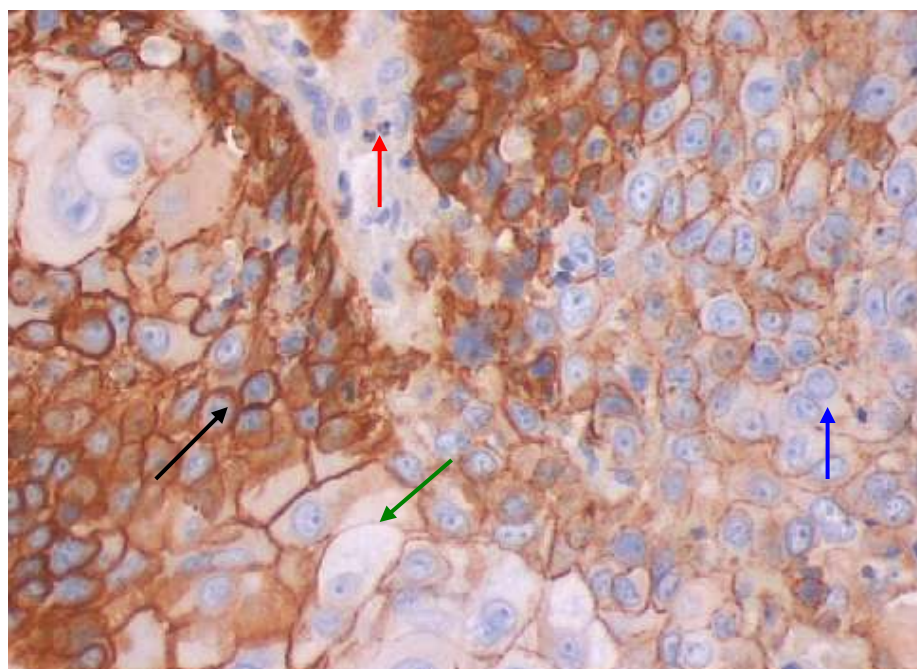
W obrębie każdego z guzów obserwowano pewien odsetek żywych komórek, które wykazywały ekspresję CD44v6 w skali od 0-3. W badanych guzach obecna była także

stanowiąca mniej niż 10% żywych komórek frakcja nie wykazująca ekspresji. Ponad 90% komórek wykazywało różny stopień ekspresji CD44v6 (tabela 3-2). Stopień heterogenności w dużej mierze zależał od stopnia zróżnicowania guza. W obrębie guzów pierwotnych o wysokiej dojrzałości heterogenność rozkładu CD44v6 była mniejsza i bardziej zbliżona do rozkładu w prawidłowym nabłonku. W obrębie ksenograftów, z uwagi na zaburzoną architekturę tkankową, podobieństwo to było mniej wyrażone (zdj. 3-4, 3-5).



Zdj. 3-4, 3-5 Ekspresja CD44v6 na powierzchni komórek ksenograftów ludzkich raków jamy ustnej, przedstawionych na zdj. 3-3–3-5. Na zdjęciu 3-6 ksenograftu raka jamy ustnej, histologicznie G1, ekspresja jest silna, homogenna (oceniona jako 3). W guzie przedstawionym na zdjęciu 3-7, wywodzącym się z raka języka, graft histologicznie G2, zaznaczona jest wyraźna heterogenność ekspresji CD44v6. Całkowite powiększenie: 100x.

Udział komórek raka wykazujących porównywalne nasilenie ekspresji CD44v6, określone w skali od 0-3 był w obu grupach nowotworów podobny (tabela 3-2, zdj. 3-5, 3-6).



Zdj. 3-6 Obecność CD44v6 na powierzchni komórek pierwotnego, nienapromienianego raka języka, histologicznie G2. Widoczna jest znaczna heterogenność ekspresji białka CD44v6. Czarna strzałka wskazuje intensywną ekspresję, zielona słabą. Zielona strzałka wskazuje także niekompletną ekspresję błonową CD44v6. Niebieska strzałka wskazuje komórki nie wykazujące ekspresji CD44v6. Czerwoną strzałką pokazano tkankę łączną nie wykazującą ekspresji CD44v6. Całkowite powiększenie: 200x.

Ekspresja CD44v6	Guz pierwotny (n=8) [%]	Ksenograft (n=9) [%]
0	8±3	5±3
1	18±6	10±5
2	18±3	25±10
3	56±8	59±14

Tabela 3-2 Heterogenność guzów w zakresie ekspresji CD44v6. Procentowy udział żywych komórek wykazujących ekspresję CD44v6 w obrębie guzów pierwotnych i przeszczepialnych. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM. Brak różnic pomiędzy badanymi grupami w zakresie ekspresji CD44v6 ($p > 0.05$, test t - Studenta).

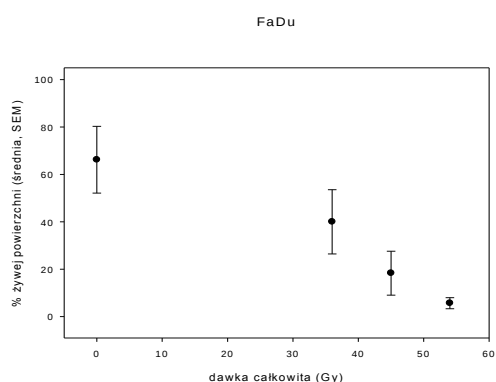
W rakach pierwotnych, gdzie częściowo zachowany jest charakter tkanki, komórki młodsze wykazują słabszą ekspresję CD44v6 w porównaniu z odpowiadającymi im komórkami prawidłowego nabłonka. W 5 spośród 8 badanych pierwotnych raków głowy i szyi komórki bezpośrednio sąsiadujące i naciekające tkankę prawidłową nie wykazywały ekspresji CD44v6 lub była ona słaba (0-1; zdj. 3-2, 3-3). Zależność tę obserwowano jedynie w okolicach, gdzie spodziewana jest obecność komórek zdolnych do naciekania prawidłowych tkanek, niezależnie od tego czy należą one do puli

komórek pnia. Figury podziału obserwowano w większości w komórkach nie wykazujących ekspresji badanego białka, sąsiadujących z tkankami prawidłowymi. Jednakże występowały one także w komórkach CD44v6-dodatnich i wykazywały różne nasilenie ekspresji. Podziały obserwowano najczęściej w komórkach CD44v6-ujemnych lub słabo dodatnich (0 lub 1).

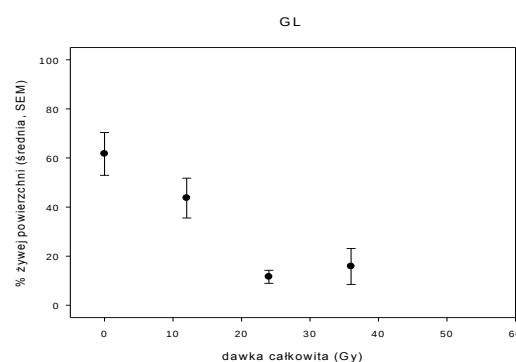
3.1.3 Ekspresja CD44v6 w ksenograftach ludzkich raków płaskonabłonkowych głowy i szyi

3.1.3.1 Śmierć komórek guza po napromienianiu

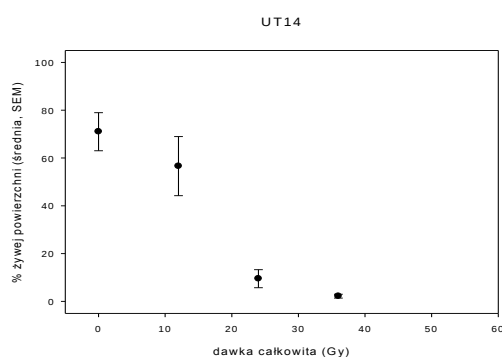
Obliczenia przeprowadzono oceniając wzrokowo udział powierzchni guza zajmowanej przez żywe komórki po zastosowaniu wzrastających dawek RT. We wszystkich badanych guzach stwierdzono malejący udział żywych komórek wraz ze wzrostem dawki (ryc. 3-1 do 3-3).



Ryc. 3-1



Ryc. 3-2

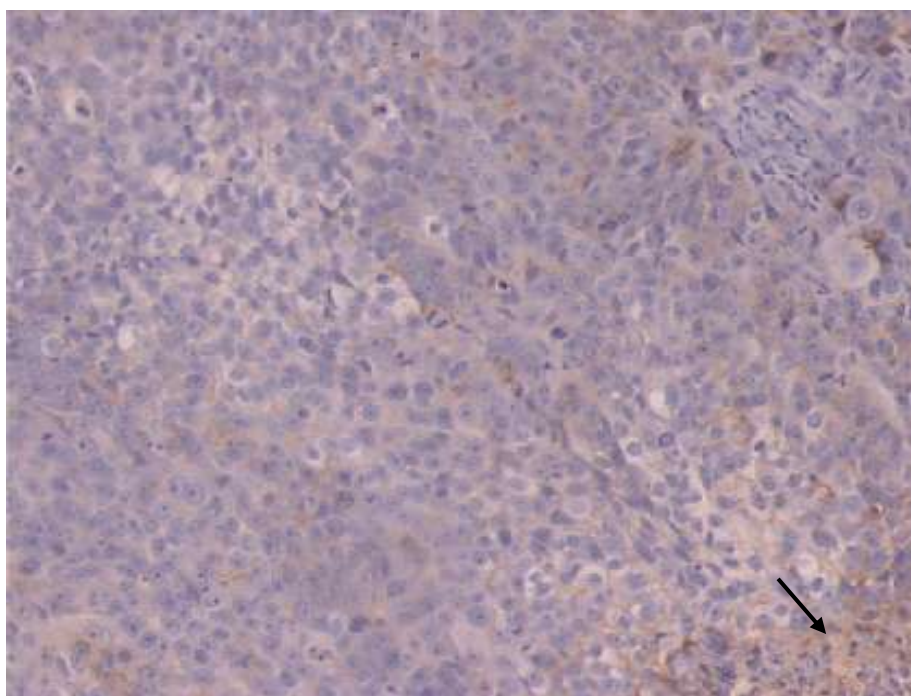


Ryc. 3-3

Ryc. 3-1, 3-2, 3-3 Procentowy udział powierzchni guza zajmowanej przez żywe komórki w zależności od podanej całkowitej dawki RT w guzach FaDu, GL i UT14. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SEM.

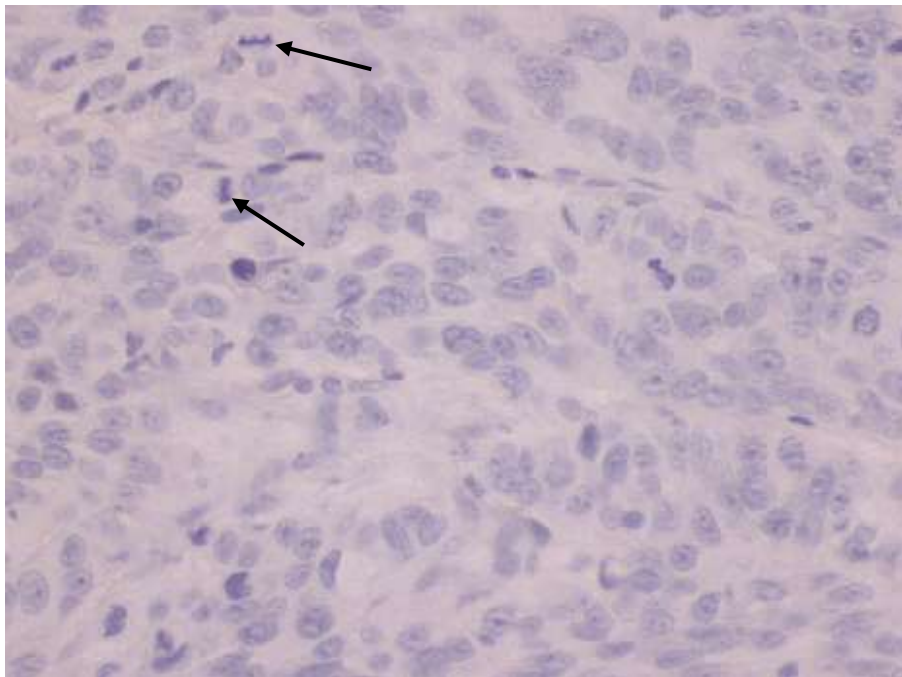
3.1.3.2 Ekspresja CD44v6 na powierzchni badanych ksenograftów

Łącznie przeanalizowano ekspresję CD44v6 w 155 skrawkach pochodzących z 81 ksenograftów raków płaskonabłonkowych okolicy głowy i szyi i 3 ksenograftów raka gruczołowego jelita grubego. Wszystkie ksenografty raków płaskonabłonkowych wykazywały błonową ekspresję CD44v6. W obrębie poszczególnych ksenograftów guzy wykazywały różne nasilenie ekspresji CD44v6 od słabego do bardzo silnego. Reakcja IHC w żywych komórkach wykazywała wysoką heterogenność zarówno w obrębie jednego guza, jak i w poszczególnych grupach. Tylko 1 spośród 15 badanych guzów FaDu, nienapromieniany, wykazywał ogniskową ekspresję CD44v6, przy czym udział komórek wykazujących ekspresję CD44v6 stanowił mniej niż 10% żywych komórek (zdj.3-7).



Zdj. 3-7 Ogniskowa ekspresja CD44v6 w obrębie nienapromienianego ksenograftu FaDu, G3. Komórki wykazujące ekspresję badanego białka stanowią mniej niż 10% powierzchni żywych komórek. Strzałka wskazuje część martwiczą guza, nieswoiście zabarwioną przez chromogen. Powiększenie: 100x

Żaden z badanych ksenograftów HT29 (3/3) otrzymanych z raka jelita grubego nie wykazywał ekspresji CD44v6, (tabela 3-3; zdj. 3-8).



Zdj. 3-8 HT29, nienapromieniany ksenograft raka gruczołowego wywodzącego się z jelita grubego, G3. Guz w całości nie wykazuje ekspresji CD44v6. Czarnymi strzałkami zaznaczono przykładowe komórki będące w fazie podziału. Widoczne liczne figury podziału (wysoki wskaźnik mitotyczny). Powiększenie: 200x

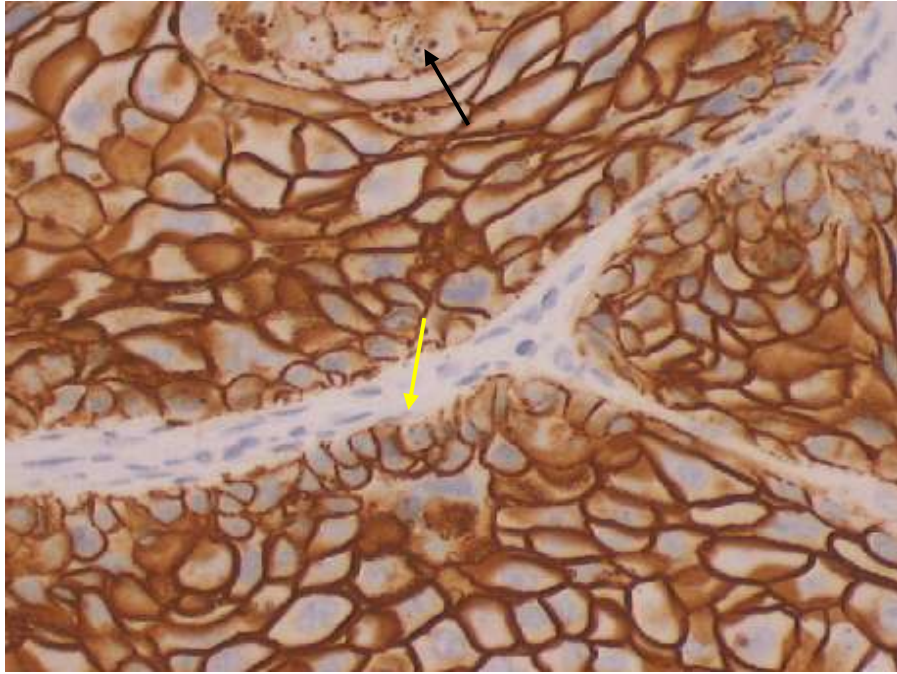
3.1.3.3 Obecność CD44v6 na powierzchni komórek nienapromienianych ksenograftów ludzkich raków

Guz	n	Stopień zróżnicowania G	Nasilenie ekspresji CD44v6 (0-3) Śr ± SD	Komórki CD44v6 (+) jako % komórek żywych Śr ± SD	Wskaźnik nasilenia ekspresji ±SD	Udział % w całkowitej powierzchni guza		
						Komórki żywe Śr ± SD	Martwica Śr ± SD	Keratynizacja Śr ± SD
FaDu	5	G3	1,4 ± 1,14	55 ± 43	77,0±22,1	66,2 ± 31,5	33,8 ± 31,5	0,0 ± 0,0
GL	6	G1/G2	1,83 ± 0,98	79 ± 26	144,6±13,5	61,67 ± 21,37	27,5 ± 21,39	11,0 ± 5,0
UT14	5	G1	3,0 ± 0,0	99,8 ± 0,0	299,4± 0,0	71,0 ± 17,82	13,4 ± 15,66	16,0 ± 9,0
UT5 *	5	G2/G3	2,6 ± 0,55	98,0 ± 1,0	254,8±0,78	55,0 ± 21,51	44,6 ± 21,05	0,4 ± 1,0
UT33	4	G1	3,0 ± 0,0	99,0 ± 0,0	297,0± 0,0	55,0 ± 63,64	45,0 ± 63,64	1,5 ± 0,7
UT15 *	1	G1	3,0 ± 0,0	97,0 ± 0,0	291,0± 0,0	80,0 ± 0,0	18,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
SKX	3	G2	2,5 ± 0,71	99,0 ± 1,0	247,0±0,86	40,5 ± 41,72	59,5 ± 41,7	0,0 ± 0,0
HT29	3	G3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0± 0,0	75,0 ± 20,0	25,0 ± 20,0	-

* Graft otrzymany z guza będącego wznową po RT, usunięty 2-3 tyg. po zakończeniu radykalnej RT

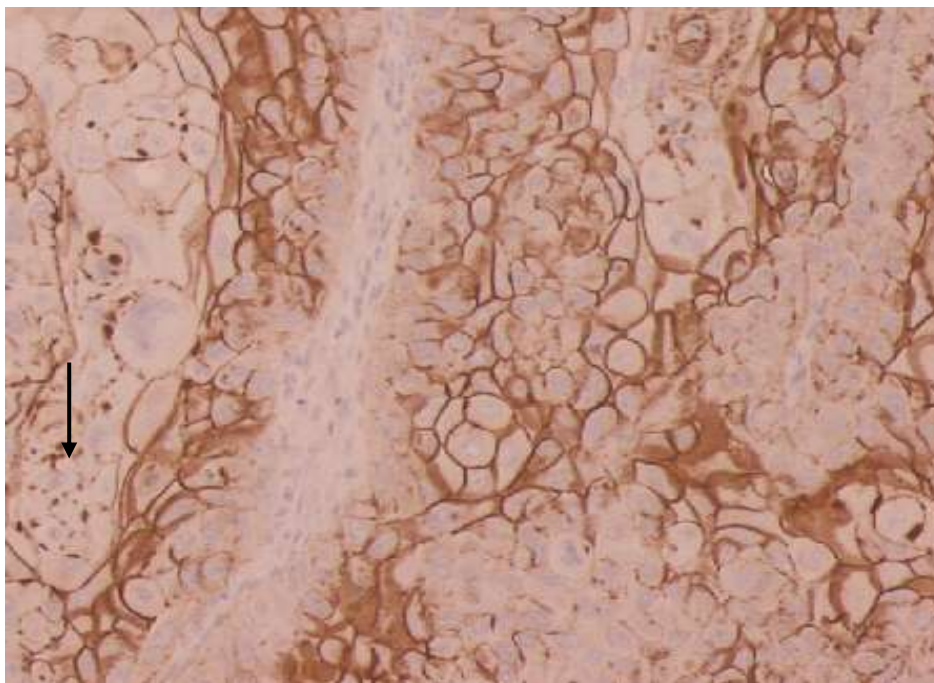
Tabela 3-3. Ekspresja CD44v6 na powierzchni komórek nienapromieniowywanych ksenograftów. W tabeli przedstawiono średnią wartość ekspresji CD44v6, procentowy udział komórek CD44v6-dodatnich w odniesieniu do wszystkich komórek żywych w obrębie przekroju guza oraz procentowy udział żywych pól, martwicy oraz obszarów keratynizacji w obrębie guza.

Dla ksenograftów raków regionu głowy i szyi średnia wartość ekspresji zależała w dużej mierze od stopnia zróżnicowania histologicznego. Najbardziej dojrzałe histologicznie ksenografty (UT14 i UT33) wykazywały najbardziej homogeną, silną ekspresję CD44v6 w porównaniu z pozostałymi guzami (tabela 3-3). Silną ekspresję CD44v6 wykazywało 99,8% żywych komórek ksenograftów UT14 i 99% w UT33 (zdj. 3-9).

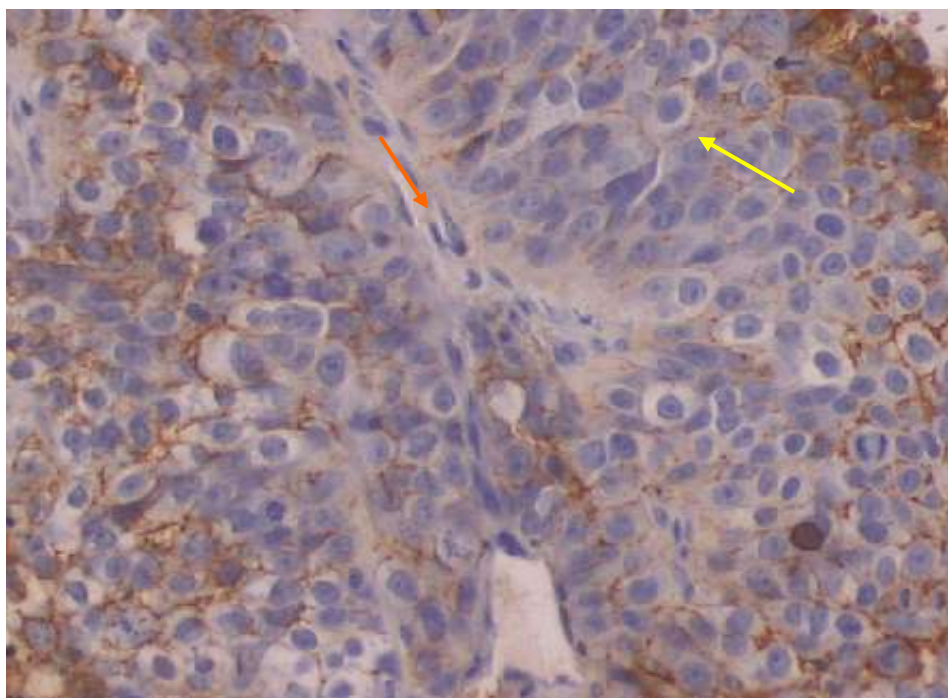


Zdj. 3-9 Równomierna, silna ekspresja CD44v6 w nienapromienianym UT14, G1. Komórki bezpośrednio przylegające do tkanki łącznej na powierzchni od strony naczyń krwionośnych wykazują wyraźnie słabszą, niekompletną ekspresję CD44v6 (żółta strzałka). Czarną strzałką zaznaczono obszar keratynizacji. Mysia tkanka łączna nie wykazuje ekspresji CD44v6. Powiększenie: 200x.

Ksenografty GL, mniej dojrzałe histologicznie, wykazywały większą heterogenność i mniejsze nasilenie ekspresji CD44v6. Stopień złośliwości histologicznej w 3 spośród 6 guzów GL określono jako G2 i głównie te 3 guzy wykazywały średnie nasilenie ekspresji CD44v6 (zdj. 3-10). Średnio wyrażoną ekspresję CD44v6 obserwowano także w średnio zróżnicowanych guzach SKX. Najsłabsza ekspresja występowała w komórkach niskozróżnicowanych ksenograftów FaDu (G3) wywodzących się z raka gardła dolnego (zdj. 3-7 i 3-11). UT5 i UT15. Przeszczepy wznów po RT, wykazywały średnią ekspresję CD44v6, zależną w dużej mierze od stopnia zróżnicowania nowotworu (tabela 3-3). Nasilenie ekspresji CD44v6 w zależności od stopnia G dla nienapromienianych ksenograftów FaDu (G3), GL (G2) i UT14 (G1) przedstawiono na rycinach 3-4, 3-5 i 3-6.



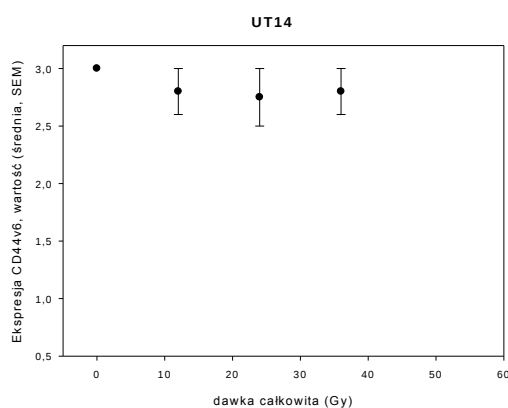
Zdj. 3-10 Heterogenność ekspresji CD44v6 w obrębie nienapromienianego ksenograftu GL-SCC, G2. Ekspresja CD44v6 jest słabsza w pobliżu naczyń krwionośnych. Komórki położone dalej od naczyń wykazują silną ekspresję. Czarną strzałką zaznaczono obszar keratynizacji w obrębie guza, zaliczany do części martwej guza. Powiększenie: 100x.



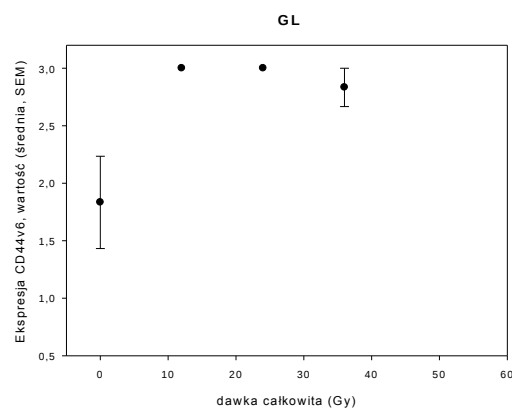
Zdj. 3-11 Heterogenność ekspresji CD44v6 w obrębie nienapromienianego guza FaDu, G3. Komórki wykazują ekspresję ocenioną na 0, 1 lub 2. Silniejszą ekspresję wykazują komórki oddalone od naczyń krwionośnego, zaznaczonego pomarańczową strzałką. Komórki nie wykazujące obecności CD44v6 oraz wykazujące jego niską ekspresję znajdują się w bliskim sąsiedztwie naczyń krwionośnego. Żółtą strzałką zaznaczono komórki wykazujące słabą, niekompletną ekspresję CD44v6. Powiększenie: 200x.

3.1.3.4 Ekspresja CD44v6 na powierzchni komórek napromienianych ksenograftów ludzkich raków regionu głowy i szyi

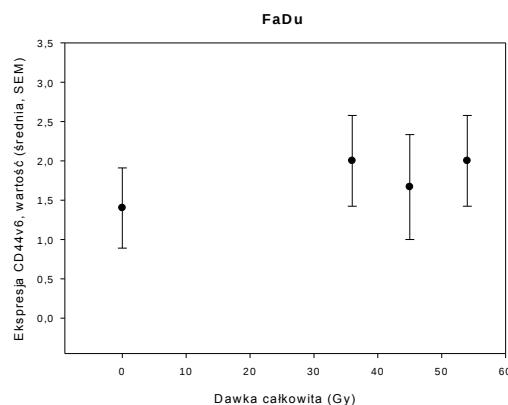
Komórki napromienianych ksenograftów ludzkich raków płaskonabłonkowych o średnim (GL) i niskim (FaDu) stopniu zróżnicowania histologicznego wykazywały znamienne wzrost ekspresji CD44v6 w porównaniu z guzami nienapromienianymi. Zależności tej nie obserwowano w ksenograftach wysokozróżnicowanych (UT14). Ryciny 3-4, 3-5 i 3-6 przedstawiają średnie nasilenie ekspresji CD44v6 dla poszczególnych grup nowotworów w zależności od całkowitej dawki RT.



Ryc. 3-4



Ryc. 3-5



Ryc. 3-6

Ryc. 3-4, 3-5, 3-6. Zmiany nasilenia ekspresji CD44v6 w ksenograftach UT14, GL i FaDu po RT. Wyniki przedstawiono jako średnią ekspresję CD44v6 (0-3) $\pm$ SEM w zależności od podanej dawki całkowitej.

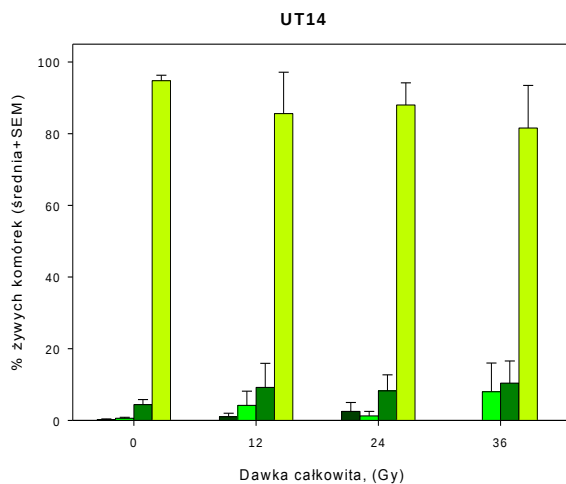
UT14 - brak znamienności pomiędzy badanymi grupami ($p = 1,00$, test t).

GL - we wszystkich napromienianych grupach ekspresja CD44v6 była znamienne wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Wartości p wynosiły odpowiednio: 0,009, 0,013, 0,03. W grupach poddanych RT ekspresja CD44v6 nie była związana z dawką RT ($p=1,00$, test t).

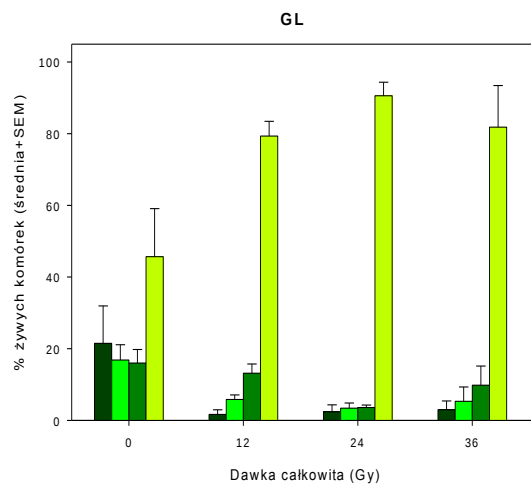
FaDu - w grupie napromienianej dawką 36 Gy obserwowano znamienne wzrost nasilenia ekspresji CD44v6 w porównaniu z nienapromienianymi ksenograftami FaDu ($p=0,023$). Zwiększanie dawki powyżej 36 Gy nie powodowało dalszego, istotnego wzrostu nasilenia ekspresji CD44v6 ($p=1,00$). Zaobserwowano jedynie trend do nasilenia ekspresji CD44v6 po zastosowaniu dawki 54 Gy w porównaniu z dawką 45 Gy; $p=0,096$.

3.1.3.5 Heterogenność ekspresji CD44v6 w komórkach poszczególnych grup ksenograftów

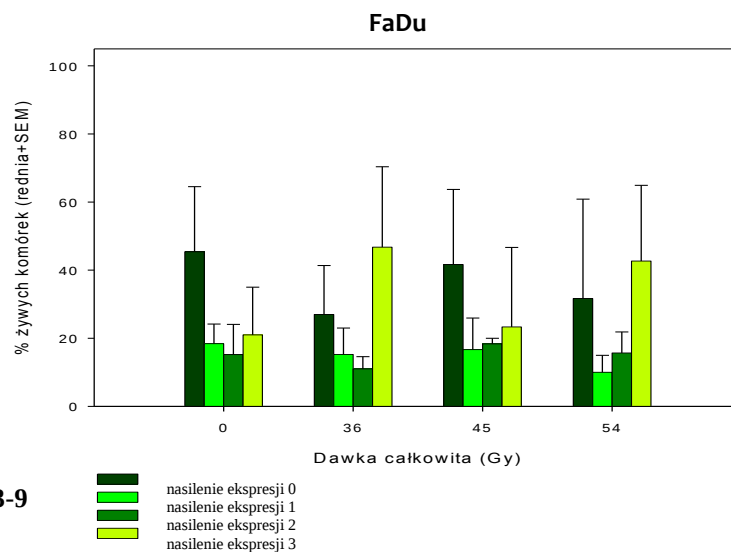
W obrębie poszczególnych ksenograftów obserwowano grupy komórek o różnym nasileniu ekspresji CD44v6 - od jej braku do silnego odczynu (ocenianego jako 3). Obserwowano duże zróżnicowanie (6-100%) pod względem udziału komórek CD44v6-dodatnich w obrębie badanych guzów FaDu. Sześć spośród 80 zbadanych ksenograftów wykazywało ekspresję CD44v6 w mniej niż 50% żywych komórek. Trzynaście spośród 80 ksenograftów wykazywało słabą ekspresję CD44v6. Słabą ekspresję CD44v6 lub jej brak obserwowano głównie blisko powierzchni guza, wokół naczyń krwionośnych i w sąsiedztwie tkanki łącznej. Komórki nie wykazujące ekspresji CD44v6 występowały zwykle w grupach od kilku do kilkunastu, tworząc guzkową strukturę, rzadziej było to skupisko pojedynczych komórek rozproszonych w tkance łącznej (zdj. 3-13 do 3-17). Ryc. 3-7, 3-8, 3-9 przedstawiają heterogenność ekspresji CD44v6 w poszczególnych grupach ksenograftów i jej zmiany w zależności od zastosowanej dawki RT. Udział komórek nie wykazujących ekspresji CD44v6 był ściśle związany ze stopniem złośliwości histologicznej guza. Komórki CD44v6-ujemne obecne były we wszystkich guzach o wysokim stopniu złośliwości (G3) i występowały rzadziej w guzach G2. Najmniejszy odsetek komórek CD44v6-ujemnych obserwowano w guzach dobrze zróżnicowanych (G1) np. UT14 (zdj.3-9, 3-10, 3-11). Zarówno w guzach nienapromienianych, jak i napromienianych heterogenność ekspresji CD44v6 była największa w pobliżu naczyń i tkanki łącznej guza. W guzach napromienianych, z powodu zniszczenia ich struktury histologicznej oraz struktury naczyń krwionośnych, zależność ta była mniej widoczna. W przypadku dawek RT powyżej 24 Gy zależność ta nie występowała w żadnym z badanych ksenograftów. Jednakże niezależnie od dawki RT, niemal w każdym przypadku obecne były ogniska komórek nie wykazujących ekspresji CD44v6. RT powodowała znamienne obniżenie udziału komórek CD44v6-ujemnych w porównaniu do guzów nienapromienianych. Niezależnie od dawki RT w prawie wszystkich guzach występował mniej więcej stały udział komórek nie wykazujących ekspresji CD44v6 (zdj. 3-13 do 3-17).



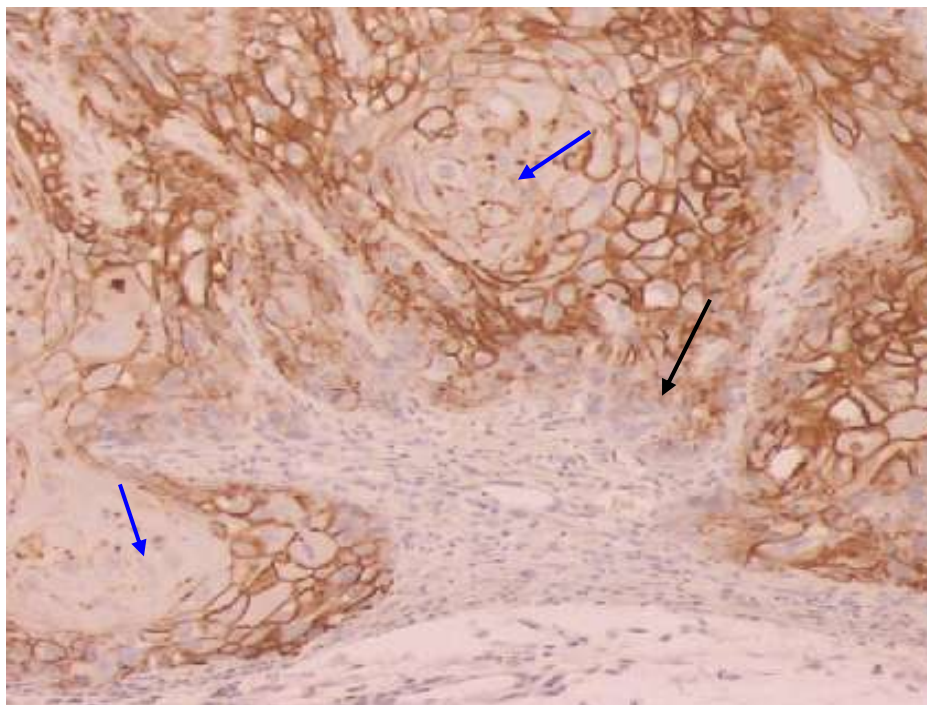
Ryc. 3-7



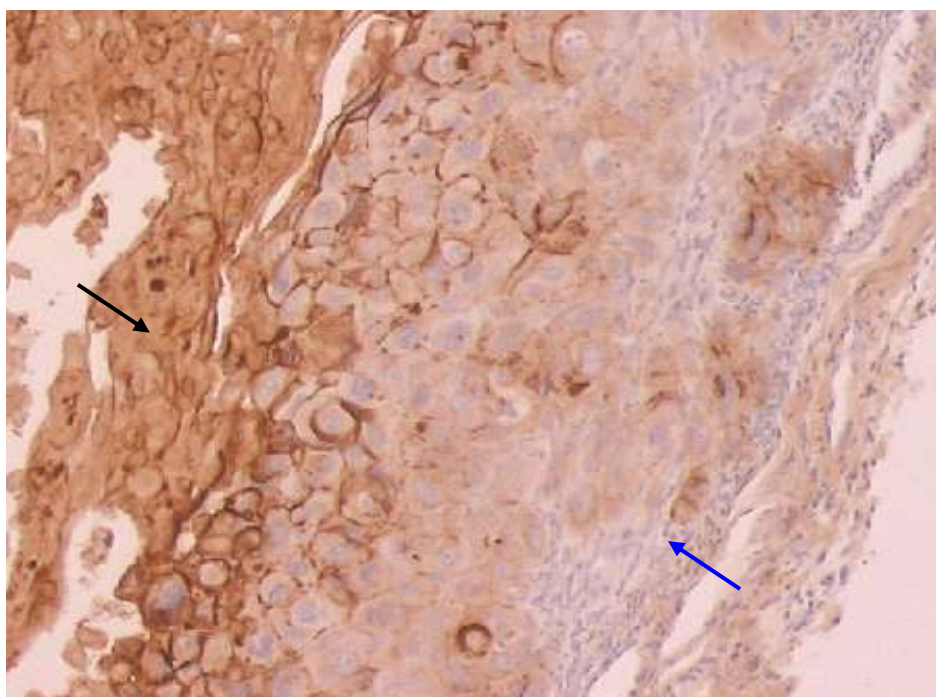
Ryc. 3-8



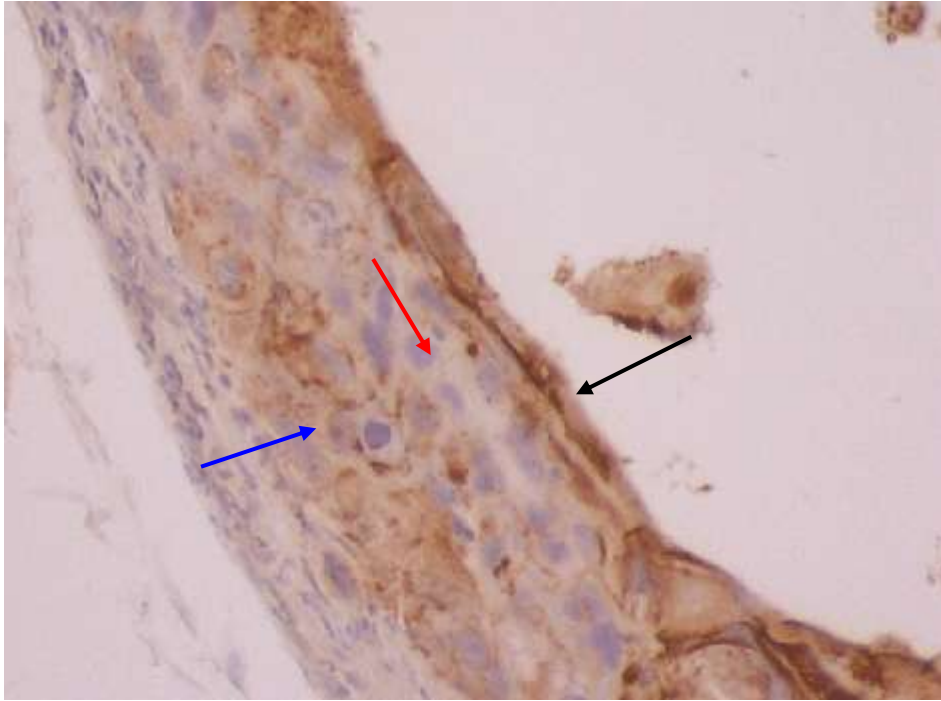
Ryc. 3-7, 3-8, 3-9. Heterogenność ekspresji CD44v6 w obrębie poszczególnych grup ksenograftów w zależności od dawki RT. Poszczególne słupki przedstawiają procentowy udział komórek o poszczególnych stopniach nasilenia ekspresji CD44v6 w zależności od dawek RT. Kolorami zaznaczono nasilenie ekspresji według przyjętej skali od 0 do 3 (patrz legenda).



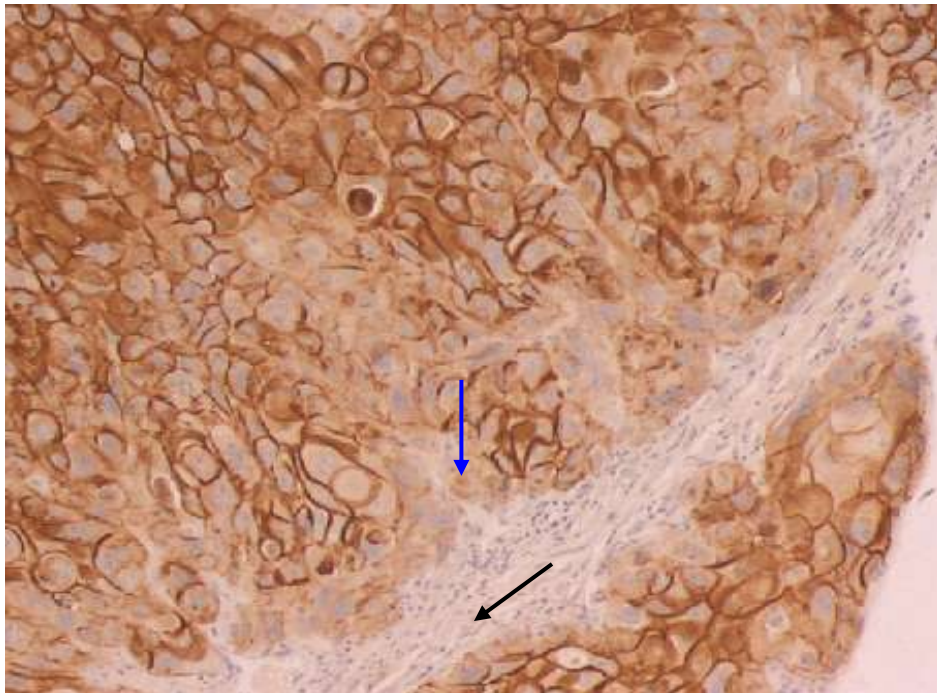
Zdj. 3-13 Heterogenność ekspresji białka CD44v6 w obrębie napromienianego ksenograftu UT14, 6x2 Gy (TD=12 Gy). Komórki niewykazujące obecności CD44v6 występują w bliskim sąsiedztwie tkanki łącznej, w pobliżu torebki guza (czarna strzałka). Niebieskimi strzałkami zaznaczono obszary keratynizacji, zaliczane do martwej części guza. Mysisia tkanka łączna nie wykazuje obecności CD44v6. Powiększenie: 100x



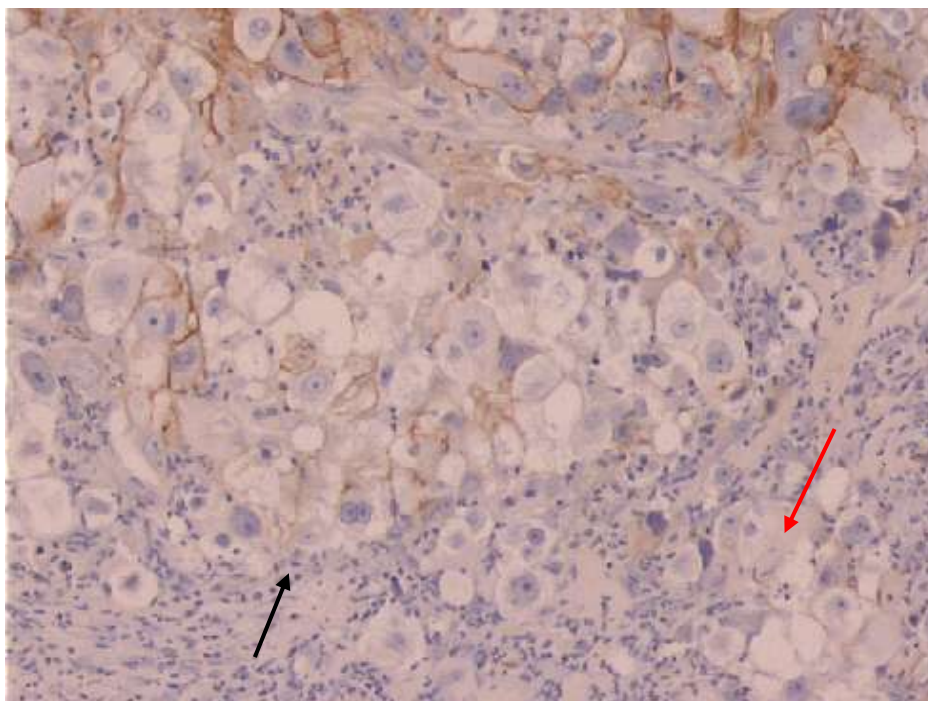
Zdj. 3-14 Heterogenność ekspresji CD44v6 na powierzchni komórek napromienianego graftu GL, 12x2 Gy (TD=24 Gy). Niebieską strzałką zaznaczono powierzchnię guza. Czarną strzałką zaznaczono martwicę po zastosowaniu RT. Po między nimi widoczny „kołnierz” z żywych komórek. Nie widać naczyń krwionośnych. Ekspresja CD44v6 wzrasta wraz z oddalaniem się od powierzchni guza. Powiększenie: 100x



Zdj. 3-15 Heterogenność w obrębie napromienianego GL, 18x2 Gy (TD=36 Gy). Granica żywych komórek po zastosowanej RT ograniczona jest do kilku warstw komórek znajdujących się bezpośrednio przy powierzchni guza (niebieska strzałka). W części centralnej widoczne „hallo” po wypłukanych tkankach martwiczych. Czarna strzałka wskazuje przylegającą do komórek pozostałość tkanek martwiczych. Czerwoną strzałką zaznaczono komórki niewykazujące ekspresji CD44v6. Tkanki martwicze wybarwiają się nieswoiście chromogenem. Powiększenie: 200x



Zdj. 3-16 Ekspresja CD44v6 w guzie FaDu napromienianym dawką 12x3 Gy (TD=36 Gy). Heterogenność ekspresji CD44v6 występuje głównie w sąsiedztwie tkanki łącznej (czarna strzałka) oraz drobnych naczyń krwionośnych odchodzących prostopadle od większego naczynia (niebieska strzałka). Wraz z oddalaniem się od naczyń krwionośnych komórki wykazują coraz silniejszą ekspresję CD44v6, określoną jako 3. Powiększenie: 100x



Zdj. 3-17 Ekspresja białka CD44v6 na komórkach FaDu, G3 napromienianego dawką 15x3 Gy (TD=45 Gy). Komórki nie wykazujące ekspresji CD44v6, “rozsypane” są w różnej wielkości skupiskach w obrębie bogatej tkanki łącznej będącej torebką guza nacieczoną przez te komórki. Czarną strzałką zaznaczono powierzchnię guza. Widoczne jej przekraczanie (czerwona strzałka). Powiększenie: 100x

Tylko w 2 przypadkach guzy FaDu wykazywały ekspresję CD44v6 we wszystkich żywych komórkach. Jeden z tych guzów był napromieniany dawką 45 Gy a drugi 54 Gy. W niskozróżnicowanych guzach FaDu (G3) ekspresja była bardziej heterogenna, a komórki wykazywały niekompletny odczyn. W guzach FaDu (G3) nie wykazano znamienych różnic ekspresji białka CD44v6 w żadnej z badanych grup ($p > 0,1$). W przypadku nienapromienianych guzów GL (G2), w 2 z 6 ksenograftów stwierdzono ekspresję w 100% komórek. W napromienianych guzach ekspresję CD44v6 we wszystkich komórkach stwierdzono w 3 spośród 6 guzów GL napromienianych dawką 12 Gy, 3 spośród 5 napromienianych dawką 24 Gy i w 2 spośród 6 napromienianych dawką 36 Gy. We wszystkich grupach guzów GL (G2) RT znamiennie zwiększała udział komórek wykazujących silną ekspresję CD44v6 ($p < 10^{-3}$). W grupie nie poddanej RT, udział komórek wykazujących ekspresję CD44v6 ocenioną jako 0, 1 lub 2 był podobny ($p > 0,1$). Dawka 12 Gy znamiennie zwiększała udział żywych komórek wykazujących średnią ekspresję CD44v6 (ocenioną jako 2) w porównaniu z komórkami nie wykazującymi ekspresji ($p < 0,05$). RT powodowała znamienne obniżenie udziału komórek CD44v6-ujemnych w porównaniu do grupy nie leczonej ($p < 10^{-3}$). Napromienianie dawką 12 i 24 Gy powodowało znamienny wzrost odsetka komórek

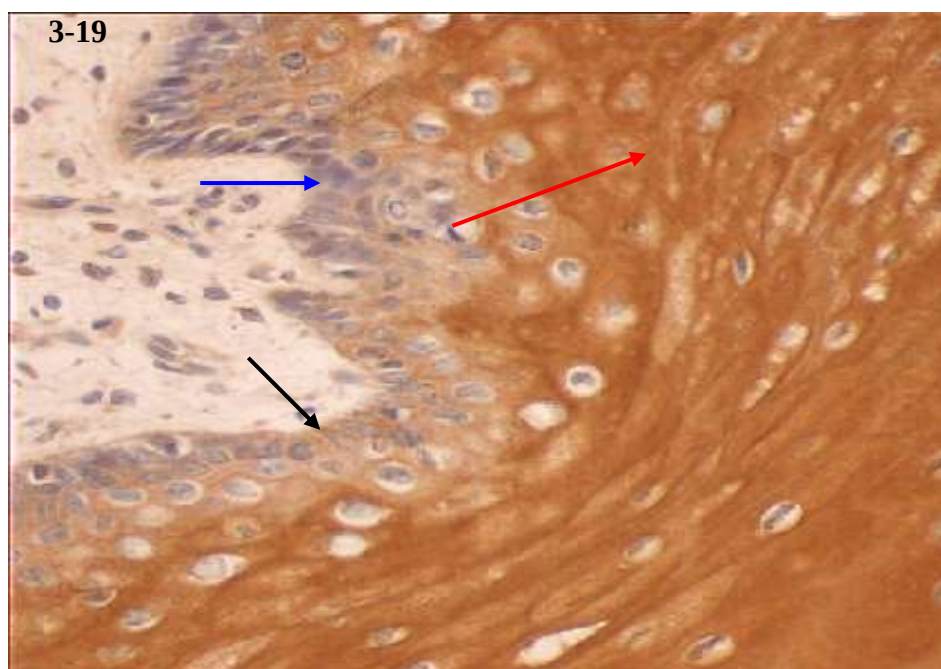
wykazujących silną ekspresję CD44v6 (3) w porównaniu do grupy nienapromienianej ($p=0,029$) a dla dawki 36 Gy obserwowano trend do wzrostu odsetka komórek wykazujących silną ekspresję CD44v6 ($p=0,086$). W przypadku guzów UT14, G1, silną ekspresję we wszystkich komórkach stwierdzono w większości badanych ksenograftów. W większości przypadków dobrze zróżnicowanych guzów UT14 (G1) ekspresja była silna, homogenna i całkowita. Jedynie w 3 przypadkach guzów UT14 stwierdzano od 90 do 99% komórek CD44v6-dodatnich. Wśród nich jeden guz był nienapromieniany, jeden otrzymał dawkę 12 Gy i jeden 24 Gy. W grupach UT14 (G1) otrzymujących różne dawki RT (TD = 0 Gy, 12 Gy, 24 Gy lub 36 Gy), udział komórek wykazujących silną ekspresję, był znamienne wyższy niż komórek wykazujących średnią, słabą, lub brak ekspresji ($p < 10^{-3}$). Nie stwierdzono znamiennych różnic w nasileniu ekspresji CD44v6 w zależności od dawki RT ($p>0,1$).

3.2 Tkanki ludzkie

3.2.1 Wpływ napromieniania na ekspresję CD44v6 w komórkach błony śluzowej jamy ustnej

W prawidłowym nienapromienianym nabłonku wielowarstwowym płaskim błonową ekspresję CD44v6 stwierdzano w komórkach warstwy podstawnej, kolczystej oraz ziarnistej. W 9 spośród 22 przypadków komórki warstwy podstawnej (*stratum basale*) nie stwierdzano ekspresji CD44v6 a w pozostałych 13 przypadkach była ona nasilona w różnym stopniu. Jeżeli komórki warstwy podstawnej wykazywały ekspresję CD44v6, była ona słaba lub niekompletna od strony przylegania do błony podstawnej i zwiększała się w kierunku przeciwnego, dystalnego bieguna komórki (zdj. 3-18 do 3-20). W prawidłowej, nienapromienianej błonie śluzowej jamy ustnej, najsilniejszą ekspresję CD44v6 obserwowano w dwóch środkowych warstwach nabłonka - w kolczystokomórkowej i komórek ziarnistych. Ekspresja w tych warstwach była silna i jednorodna na całej powierzchni komórek. Ekspresja CD44v6 malała wraz ze wzrostem dojrzałości komórek nabłonkowych w kierunku powierzchni nabłonka. Coraz mniej receptorów CD44v6 obserwowano w komórkach warstwy jasnej, aż do całkowitej lub prawie całkowitej utraty CD44v6 na powierzchni komórek warstwy rogowej. W położonych najbliżej powierzchni nabłonka i bliskich złuszczeniu komórkach warstwy jasnej, brak ekspresji CD44v6 odnotowano w 17 spośród 22 wycinkach. Tabela 3-4

przedstawia ekspresję CD44v6 w poszczególnych warstwach nienapromienianego ludzkiego nabłonka wielowarstwowego płaskiego pochodzącego z jamy ustnej.



Zdj. 3-18, 3-19 Ekspresja CD44v6 w nienapromienianym, prawidłowym nabłonku pochodzącym z przedniej wewnętrznej powierzchni policzka chorego na zaawansowanego raka rejonu głowy i szyi. Czarne strzałki wskazują komórki podstawne, wykazujące zmniejszoną ekspresję CD44v6. Niebieską strzałką zaznaczono CD44v6-ujemne komórki warstwy podstawnej. Komórki warstwy koleczystej i ziarnistej wykazują najsilniejszą ekspresję CD44v6 (czerwone strzałki). Powiększenie odpowiednio na zdjęciu 3-18 100x, na zdjęciu 3-19: 200x

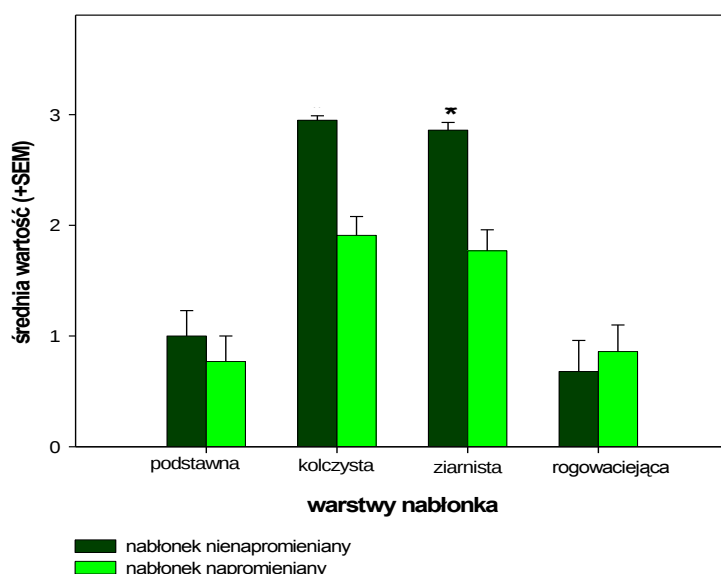
W nabłonku jamy ustnej napromienianym dawką w zakresie 54-60 Gy, stwierdzono znamienne mniejsze nasilenie ekspresji CD44v6 na powierzchni warstwy kolczystokomórkowej oraz ziarnistej (tabela 3-5) w porównaniu do tych samych warstw w nabłonku nienapromienianym (tabela 3-4). Ryc. 3-10 przedstawia nasilenie ekspresji CD44v6 w poszczególnych warstwach nabłonka przed i po RT.

Nienapromieniany nabłonek jamy ustnej (n=22)						
Warstwa	Nasilenie ekspresji CD44v6				Średnie nasilenie ekspresji	SEM
	0	1	2	3		
Podstawnokomórkowa	9	8	1	4	1,00	0,23
Kolczystokomórkowa	0	0	1	21	2,95	0,04
Komórek ziarnistych	0	0	3	19	2,86	0,07
Komórek jasnych	17	0	0	5	0,68	0,27

Tabela 3-4. Ekspresja CD44v6 w poszczególnych warstwach nienapromienianego prawidłowego ludzkiego nabłonka jamy ustnej 22 chorych na zaawansowanego raka głowy i szyi

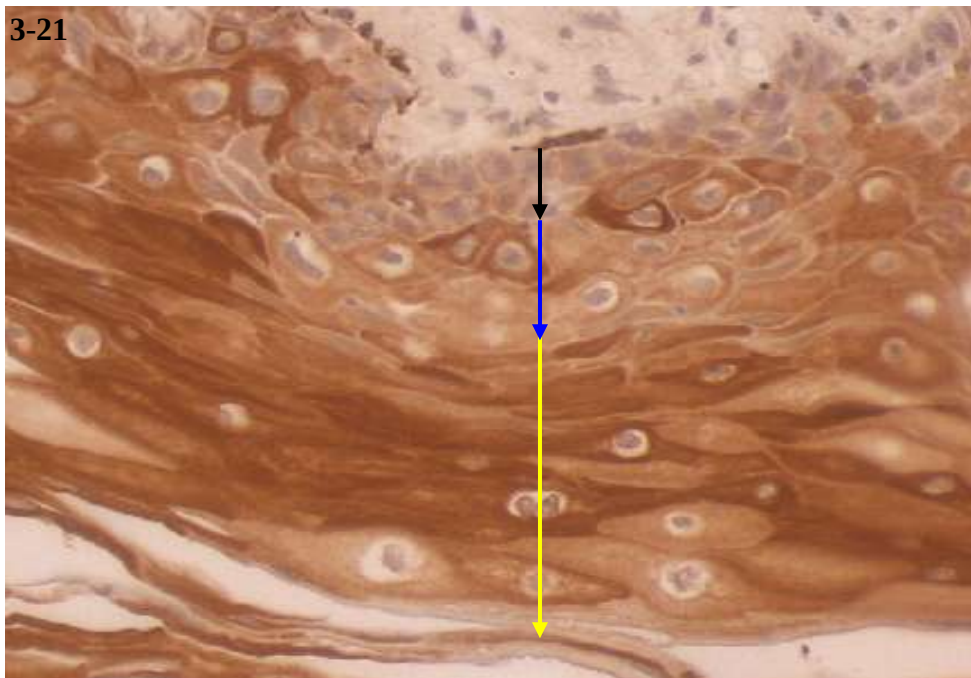
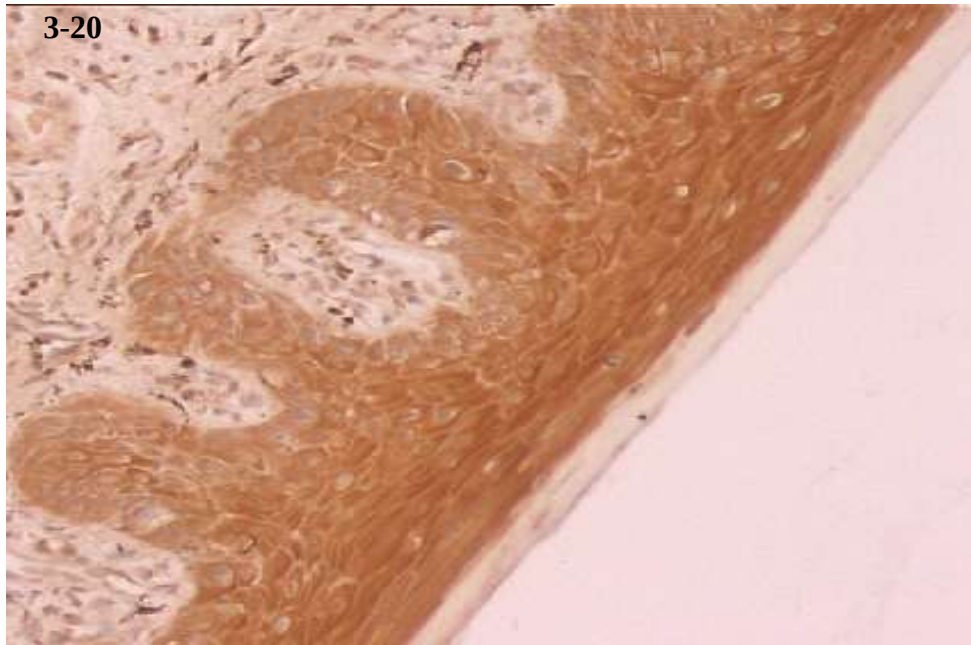
Napromieniany nabłonek jamy ustnej (n=22)						
Warstwa	Nasilenie ekspresji CD44v6				Średnie nasilenie ekspresji	SEM
	0	1	2	3		
Podstawnokomórkowa	12	6	1	3	0,77	0,23
Kolczystokomórkowa	0	8	8	6	1,91	0,17
Komórek ziarnistych	0	11	5	6	1,77	0,19
Komórek jasnych	12	4	3	3	0,86	0,18

Tabela 3-5. Ekspresja CD44v6 w poszczególnych warstwach napromienianego prawidłowego ludzkiego nabłonka jamy ustnej 22 chorych na zaawansowanego raka okolicy głowy i szyi

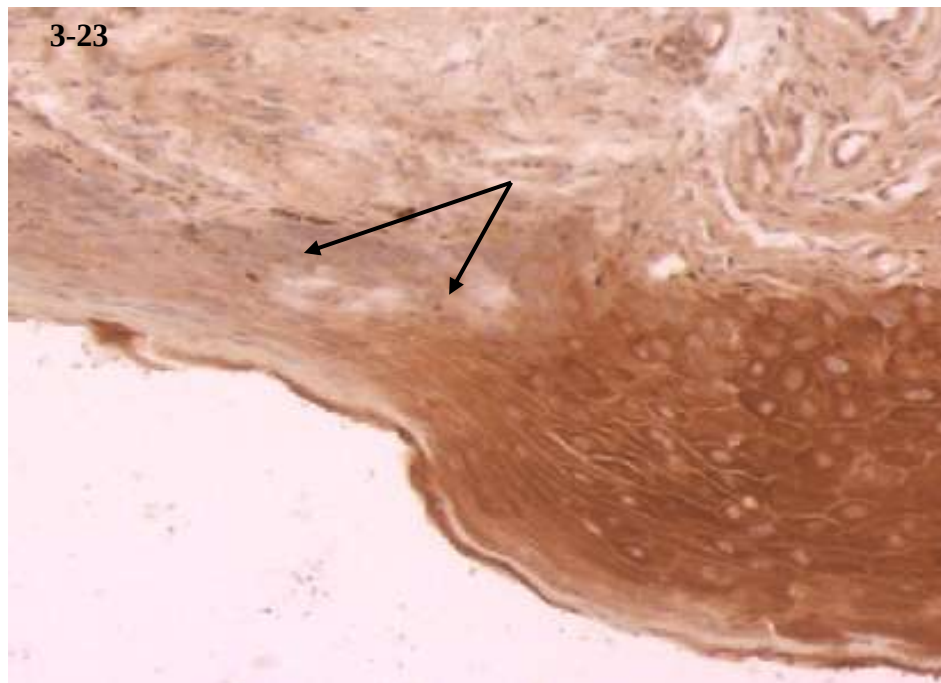


Ryc. 3-10. Zmiany w nasileniu ekspresji CD44v6 w poszczególnych warstwach nabłonka jamy ustnej po RT u chorych na raka głowy i szyi. Na schemacie przedstawiono średnie nasilenie ekspresji w warstwach nienapromienianego nabłonka (ciemnozielone słupki) i nabłonka napromienianego (jasnozielone słupki). W warstwie kolczystej i ziarnistej stwierdzono znamienne obniżenie ekspresji CD44v6 po zastosowaniu RT, (p odpowiednio $6,6 \times 10^{-7}$ i $2,38 \times 10^{-6}$). W pozostałych warstwach, podstawnej i rogowej nie stwierdzono istotnych zmian w nasileniu ekspresji CD44v6 (p odpowiednio 0,49 i 0,62).

W napromienianej błonie śluzowej jamy ustnej komórki warstw podstawnej i jasnej wykazywały wyraźnie słabszą ekspresję CD44v6 lub jej brak w porównaniu do dwóch środkowych warstw (tabela 3-4 i 3-5, schemat 3-10). W obu badanych grupach tkanek nie było istotnych zmian w nasileniu ekspresji CD44v6 pomiędzy warstwą podstawną a warstwą komórek jasnych ($p>0,05$). W warstwie komórek jasnych po RT obserwowano większą liczbę przetrwałych jąder komórkowych w porównaniu do grupy nieleczonej i wykazywała ekspresję CD44v6. W komórkach pleomorficznych po RT obserwowano zmniejszoną ekspresję CD44v6, podczas gdy komórki o zachowanej, prawidłowej strukturze dla danej warstwy wykazywały silną ekspresję CD44v6 (zdj. 3-20, 3-21). Komórki warstwy podstawnej poddane RT miały kształt cylindryczny, podczas gdy komórki te w nabłonku nienapromienianym były sześciennie lub niemal okrągłe. We wszystkich tkankach napromienianych dawkami radykalnymi pomiędzy 54 a 60 Gy ($n=22$) stwierdzano różne zmiany charakterystyczne dla odczynów popromiennych, takie jak średniego i dużego stopnia hipoplazja ($n=22$), ogniskowa aplazja (7 z 22) oraz hiperkeratynizacja (2 z 22). W 6 spośród 22 przypadków hipoplazja komórkowa współwystępowała z ogniskami aplazji. W 1 przypadku w całym badanym skrawku stwierdzono rozlaną aplazję i brak komórek progenitorowych, z obecnością jedynie komórek płaskich. Nabłonek hipoplastyczny był około 2-2,5x cieńszy oraz miał o około 50% mniejszą ogólną liczbę komórek w porównaniu z nabłonkiem nienapromienianym. Ścieńczenie dotyczyło wszystkich warstw nabłonka, w szczególności warstwy kolczystej i ziarnistej (zdj. 3-20, 3-21). W przypadkach, w których występowały ogniska aplazji, obserwowano zjawisko naprawy uszkodzeń po RT w postaci wynabłonkowania uszkodzonych fragmentów przez nadpełzanie komórek z otaczających fragmentów nabłonka do ognisk aplazji i zastępowania w tym miejscu zabitych komórek rozrodczych. W żadnym przypadku nie stwierdzono ekspresji CD44v6 w komórkach nadpełzających w rejony anaplastyczne (zdj. 3-22, 3-23). W przypadku hiperkeratynizacji nabłonek stawał się około 2-2,5x grubszy w zakresie warstwy jasnej, z licznymi spłaszczonymi nawarstwionymi komórkami bezjądrowymi w warstwie rogowej i normalnymi lub nieco tylko ścieńczałymi warstwami kolczystą i ziarnistą.



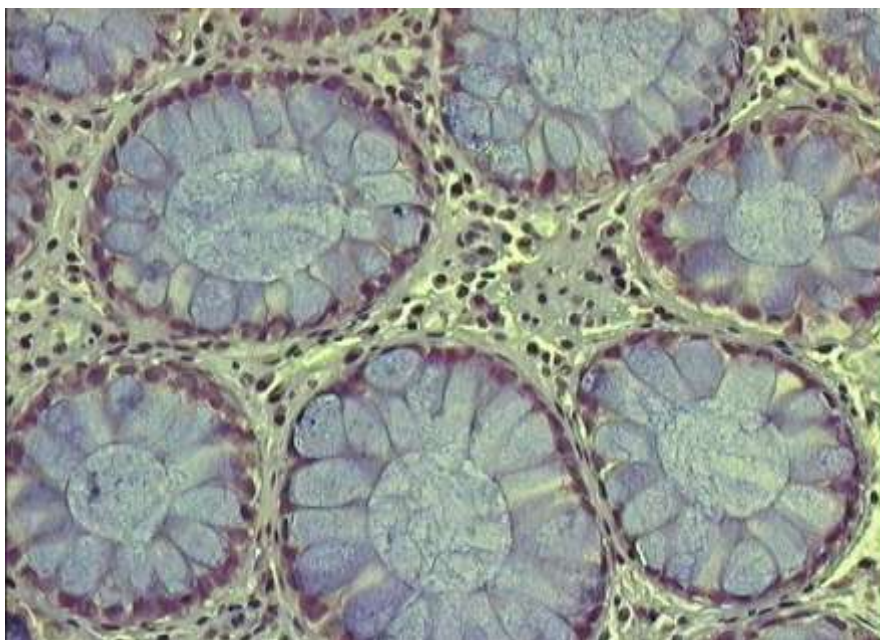
Zdj. 3-20, 3-21 Obraz mikroskopowy wycinka prawidłowej błony śluzowej przedniej wewnętrznej powierzchni policzka u chorego na raka rejonu głowy i szyi poddanego RT dawką całkowitą 54-60 Gy. Na obu zdjęciach widoczna jest dużego stopnia hipoplazja komórkowa z nasiloną odnową komórkową w warstwie rozrodczej (tj. w warstwie podstawnej oraz przypodstawnej). Komórki warstwy rozrodczej (czarna strzałka) wykazują obniżoną ekspresję CD44v6 w porównaniu do komórek innych warstw nabłonka. Widoczne jest duże zaburzenie architektoniki tkanki, szczególnie w zakresie warstw środkowych, znaczne ścieńczenie tych warstw (niebieska strzałka) oraz różne nasilenie ekspresji CD44v6 w zależności od dojrzałości komórek w obrębie warstwy. Zatarte są granice pomiędzy warstwą kolczystą i ziarnistą. Żółtą strzałką zaznaczono warstwę komórek jasnych, zawierających liczne przetrwałe jądra komórkowe. Silnie brązowe zabarwienie komórek warstwy rogowej wynika głównie z nieswoistego zabarwienia chromogenem resztek komórkowych. Zdjęcia przedstawiają ten sam skrawek tkankowy przy powiększeniu 100x (zdjęcie 3-20) oraz (200x zdjęcie 3-21).



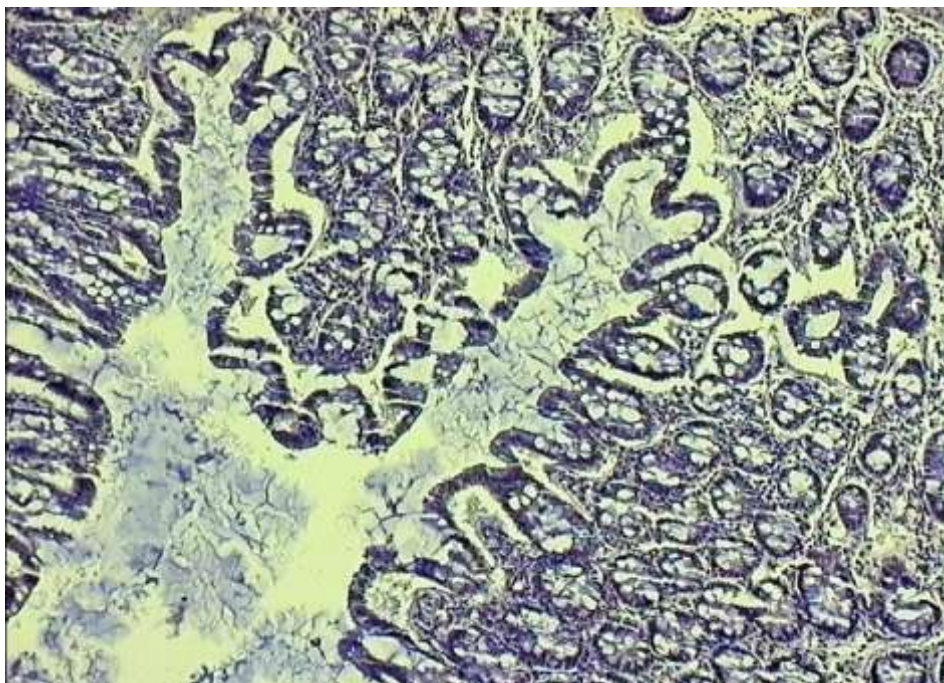
Zdj. 3-22, 3-23 Ogniskowa aplazja w obrębie napromienianej błony śluzowej jamy ustnej po zakończonej RT dawką 54-60 Gy (czerwona strzałka). Zapalenie błony śluzowej indukowane promieniowaniem jonizującym. Widoczne wynabłonkowanie komórkami CD44v6-ujemnymi napływającymi z otoczenia. Jest to jeden ze sposobów naprawy tkanki po zadziałaniu czynnika uszkadzającego. Na zdjęciu 3-23 w dnie ogniska anaplazji widoczne są liczne szybko dzielące się komórki rozrodcze, nie wykazujące ekspresji CD44v6 (czerwona strzałka). Powiększenie 100x

3.2.2 Ekspresja białka CD44v6 na powierzchni komórek napromienianej i nienapromienianej prawidłowej błony śluzowej odbytnicy

Prawidłowa błona śluzowa odbytnicy, zarówno napromieniana, jak i nienapromieniana, nie wykazywała ekspresji CD44v6 (Zdj.3-24 i 3-25). Zbadano 27 tkanek nie poddanych RT oraz 44 tkanki napromieniane, w tym 21 par tkanek pochodzących od tych samych chorych. Zdjęcia 3-24 i 3-25 przedstawiają obraz odpowiednio błony śluzowej nienapromienianej oraz napromienianej całkowitą dawką 25 Gy.



Zdj. 3-24. Prawidłowa nienapromieniana błona śluzowa odbytnicy pochodząca od chorego na pierwotnego raka odbytnicy. Nie wykazano ekspresji CD44v6 w komórkach krypt prawidłowej błony śluzowej odbytnicy. Powiększenie 400x



Zdj. 3-25. Prawidłowa błona śluzowa odbytnicy pochodząca od chorego na pierwotnego raka odbytnicy, poddana RT dawką 5x5 Gy (TD=25 Gy). Nie wykazano ekspresji CD44v6 w komórkach krypt prawidłowej błony śluzowej odbytnicy poddanych działaniu RT. Powiększenie 100x

3.2.3 Ekspresja CD44v6 na powierzchni komórek napromienianych i nienapromienianych raków odbytnicy

Nie wykazano znamienych różnic w nasileniu ekspresji pomiędzy grupami otrzymującymi różne całkowite dawki indukcyjnej wyłącznej radioterapii (tabela 3-7) lub radioterapii w skojarzeniu z chemioterapią (tabela 3-8). Dawka całkowita zastosowanej RT nie wpływała także na ekspresję CD44v6 w komórkach przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (tabela 3-9).

Protokół RT	Dawka biologiczna RT [Gy] (BED) $\alpha/\beta = 5$ Gy dla kontroli miejscowej	n	% chorych n=45	Średnie nasilenie ekspresji CD44v6 $\pm$ SD
krótkotrwała RT, 25 Gy/5 frakcjach, FD=5 Gy	35,7	22	49	1,86 $\pm$ 0,99
konwencjonalna RT, 45-50,4 Gy/ 25-28 frakcjach, FD=1,8 Gy	43,7 – 49,0	23	51	1,96 $\pm$ 0,82

Tabela 3-7. Ekspresja CD44v6 w tkankach po krótkotrwałej i konwencjonalnej RT. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą otrzymującą RT krótkotrwałą (TD=25 Gy w 5 frakcjach) i konwencjonalną (45-50,4 Gy w 25-28 frakcjach), p=0,73, test-t

Lp.	Protokół leczenia	Liczba chorych	%, n=45	Średnie nasilenie ekspresji CD44v6 ± SD
1	25 Gy/5 fr., FD=5 Gy bez CHT	22	49	1,86 ± 0,99
2	RT, 45-50,4 Gy/ 25-28 fr., FD=1,8 Gy z CHT	18	40	2,0 ± 0,77
3	RT, 45-50,4 Gy/ 25-28 fr., FD=1,8 Gy bez CHT	5	11	1,80 ± 1,10

Tabela 3-8. Ekspresja CD44v6 w napromienianych tkankach w zależności od całkowitej dawki RT oraz jednoczesnego stosowania chemioterapii. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami otrzymującymi dawkę 25 Gy w 5 frakcjach, oraz dawkę w granicach 45-50,4 Gy w 25-28 frakcjach z lub bez CHT (dla 1 i 2 p= 0,32, dla 1 i 3 p=0,45 i 2 i 3 p=0,32, test-t)

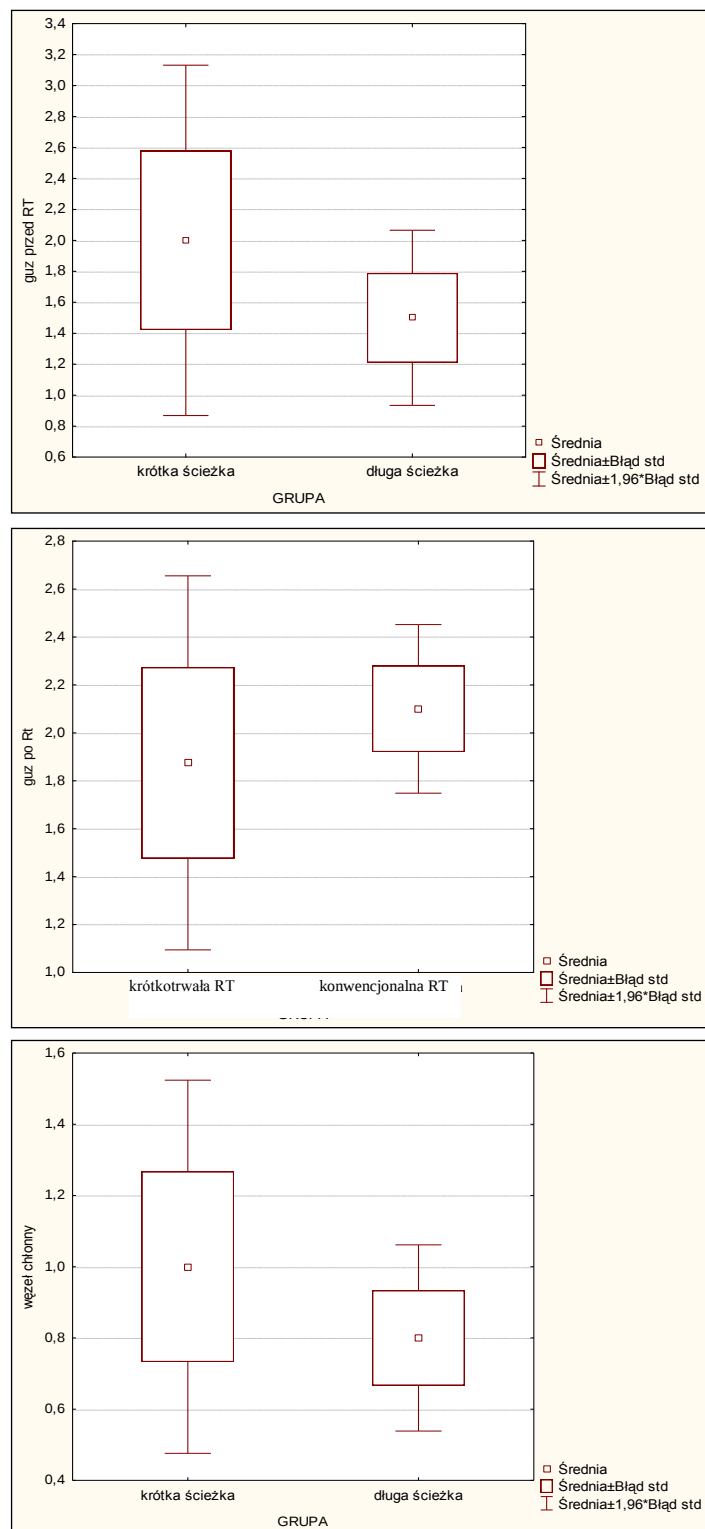
Protokół RT	Liczba chorych	%, n=45	Średnie nasilenie ekspresji CD44v6 ± SD
krótkotrwała RT, 25 Gy/5 frakcjach, FD=5 Gy	8	18	1,00 ± 0,76
konwencjonalna RT, 45-50,4 Gy/ 25-28 frakcjach, FD=1,8 Gy	10	22	0,80 ± 0,42

Tabela 3-9. Ekspresja CD44v6 w komórkach nowotworowych pochodzących z przerzutów do węzłów chłonnych w zależności od dawki RT. Nie stwierdzono znamiennych różnic w nasileniu ekspresji białka CD44v6 w komórkach przerzutów węzłowych w zależności od całkowitej dawki RT (p=0,49, test-t)

Schemat zastosowanej radioterapii nie wpływał także na ekspresję CD44v6 w obrębie przerzutów do węzłów chłonnych (tabela 3-10). Obraz graficzny uzyskanych wyników przedstawiono na ryc. 3-11, 3-12 i 3-13.

Rodzaj tkanki	Liczba zbadanych chorych		Średnie nasilenie ekspresji CD44v6 ± SD	
	Krótkotrwała RT	Konwencjonalna RT	Krótkotrwała RT	Konwencjonalna RT
Guz przed RT	11	10	1,45 ± 0,82	1,30 ± 0,48
Guz po RT	22	23	1,86 ± 0,99	1,96 ± 0,82
Węzeł chłonny po RT	8	10	1,00 ± 0,76	0,80 ± 0,42

Tabela 3-10. Średnie nasilenie ekspresji CD44v6 w różnych tkankach w zależności od zastosowanego schematu radioterapii. W żadnej z badanych grup tkanek nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowanego schematu radioterapii na ekspresję CD44v6. Dla wszystkich badanych grup p> 0,05, test-t



Ryc. 3-11, 3-12, 3-13. Średnia ekspresja CD44v6 w różnych tkankach w zależności od zastosowanego schematu RT. W żadnej z badanych grup tkanek nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowanej dawki RT na ekspresję CD44v6. Na schematach podano wartości p dla testu t - Studenta.

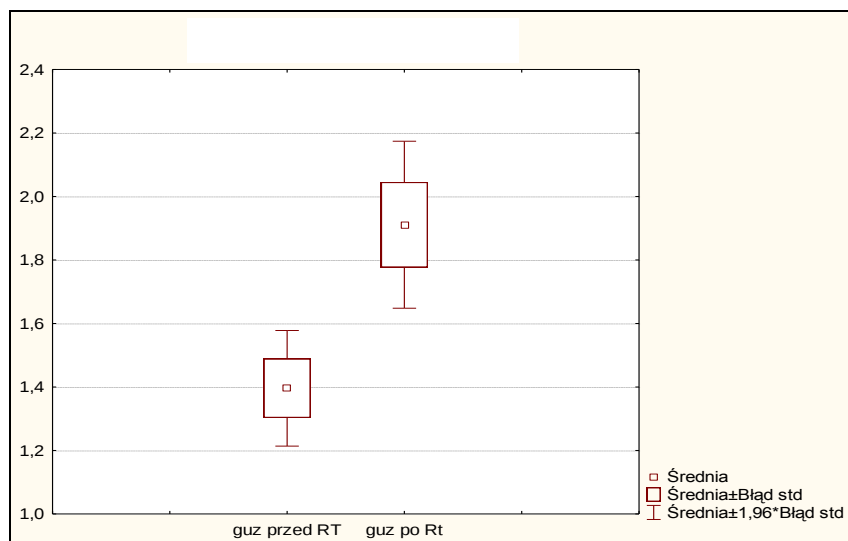
Łącznie zbadano skrawki pochodzące od 45 chorych napromienianych dawką całkowitą w granicach 25-50,4 Gy w tym 21 kobiet (47%) oraz 24 mężczyzn (53%). Średnie nasilenie ekspresji CD44v6 $\pm$ SD wynosiło u kobiet $1,40 \pm 0,89$ a u mężczyzn $1,97 \pm 0,86$ ($p=0,053$). Średnie nasilenie ekspresji CD44v6 $\pm$ SD w grupie ≥ 65 r.ż. wynosiło $2,08 \pm 0,78$, a w grupie < 65 r.ż. $1,71 \pm 1,01$ ($p=0,086$). U 18 chorych (41%) napromienianych przedoperacyjnie stwierdzono wyjściowo przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych. Średnie względne nasilenie ekspresji CD44v6 $\pm$ SD w guzie pierwotnym w tej grupie wynosi $2,00 \pm 0,84$. W grupie chorych N- poddanej RT ($n=26$, 59%) średnie względne nasilenie ekspresji CD44v6 wynosiło $1,88 \pm 0,95$ ($p=0,34$). W grupie poddanej RT ekspresja CD44v6 w guzach pierwotnych nie była związana z obecnością przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, $p = 0,34$, test t – Studenta. Obserwowano natomiast trend w kierunku większej ekspresji CD44v6 w nienapromienianych rakach ($n=27$) z cechą N+ ($n=16$, 59% badanej populacji) w porównaniu z chorymi N- ($n=11$, $p=0,08$). Średnie nasilenie ekspresji CD44v6 $\pm$ SD wynosiło w grupie nienapromienianej z wyjściowym zajęciem węzłów chłonnych $1,56 \pm 0,63$, a u chorych bez przerzutów węzłowych $1,18 \pm 0,60$. W żadnej z badanych grup nie wykazano znamiennych różnic w ekspresji CD44v6 w zależności stopnia zaawansowania klinicznego oraz stopnia złośliwości histologicznej (tabela 3-11).

Stopień zaawansowania klinicznego, skala Dukes'a	n chorych z grupy 45, % grupy badanej	Średnie nasilenie ekspresji CD44v6 $\pm$ SD	Stopień złośliwości histologicznej G (n chorych z grupy 45, % grupy badanej)	Średnie nasilenie ekspresji CD44v6 $\pm$ SD
B1	n=12, 27	$1,92 \pm 0,79$	G1(n=5, 11)	$1,40 \pm 0,89$
B2	n=14, 31	$1,86 \pm 1,10$	G2 (n=32, 71)	$1,97 \pm 0,86$
C1	n=4, 9	$1,87 \pm 0,92$	G3 (n=5, 11)	$1,60 \pm 1,14$
C2	n=15, 33	$2,25 \pm 0,50$	Nie oceniono G (n=3, 7)	$2,67 \pm 0,58$

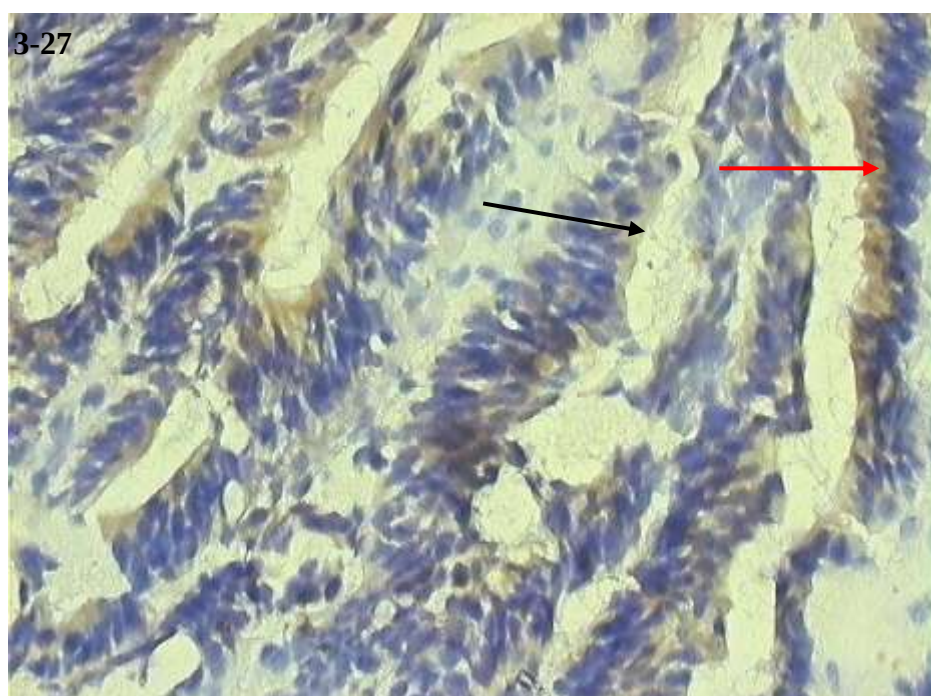
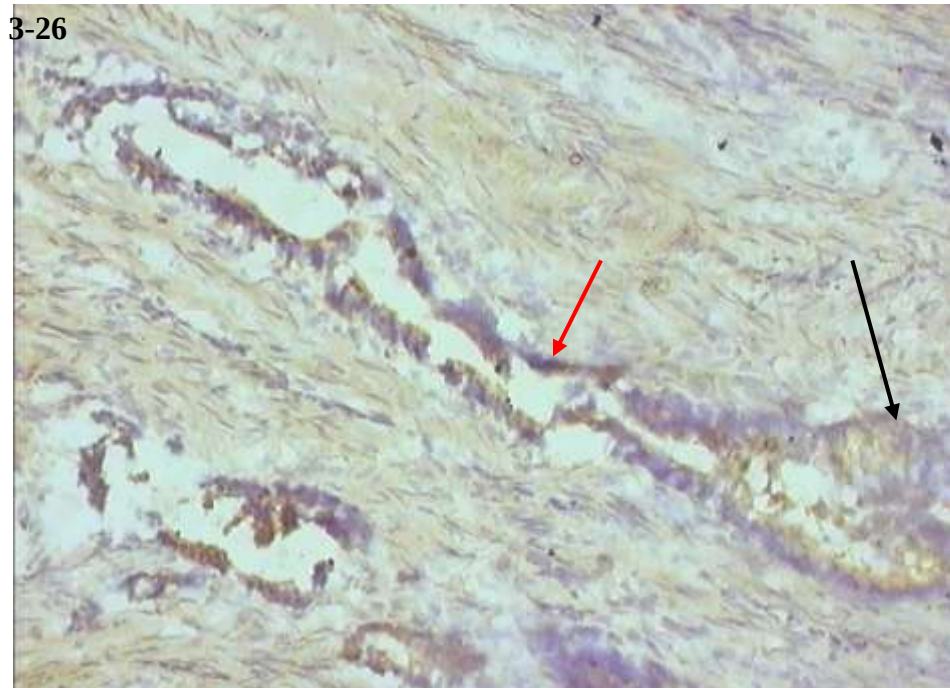
Tabela 3-11. Ekspresja CD44v6 w tkankach napromienianych dawką całkowitą od 25 do 50,4 Gy w zależności od zaawansowania klinicznego ocenianego w skali Dukes'a oraz stopnia złośliwości histologicznej G. W badanej grupie nie było chorych w stopniach zaawansowania A i D, zatem stopni tych nie ujęto w tabeli. Brak znamienności statystycznych dla wszystkich grup, test t – Studenta.

Łącznie zbadano 48 raków odbytnicy poddanych pierwotnej resekcji lub biopsji wycinającej oraz 45 raków poddanych resekcji po zastosowaniu przedoperacyjnej RT lub uzupełniającej radiochemioterapii. Ekspresję CD44v6 w obu grupach stwierdzono odpowiednio w 94% i 89% badanych wycinków. Średnie nasilenie ekspresji przed i po RT wynosiło $1,40 \pm 0,64$ i $1,91 \pm 0,90$ ($p=0,002$); (ryc. 3-14). Na zdjęciach 3-26 i 3-27 przedstawiono ekspresję CD44v6 na nienapromienianych komórkach raka odbytnicy.

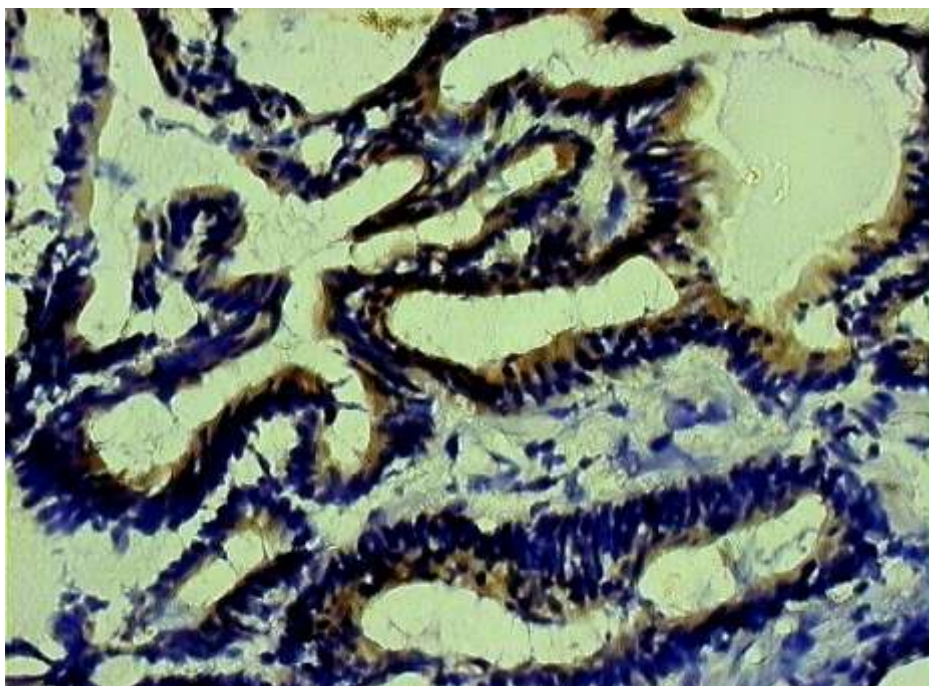
Zdjęcia 3-28 i 3-29 przedstawiają ekspresję po zastosowaniu napromieniania guza pierwotnego dawką całkowitą odpowiednio 25 Gy i 45 Gy.



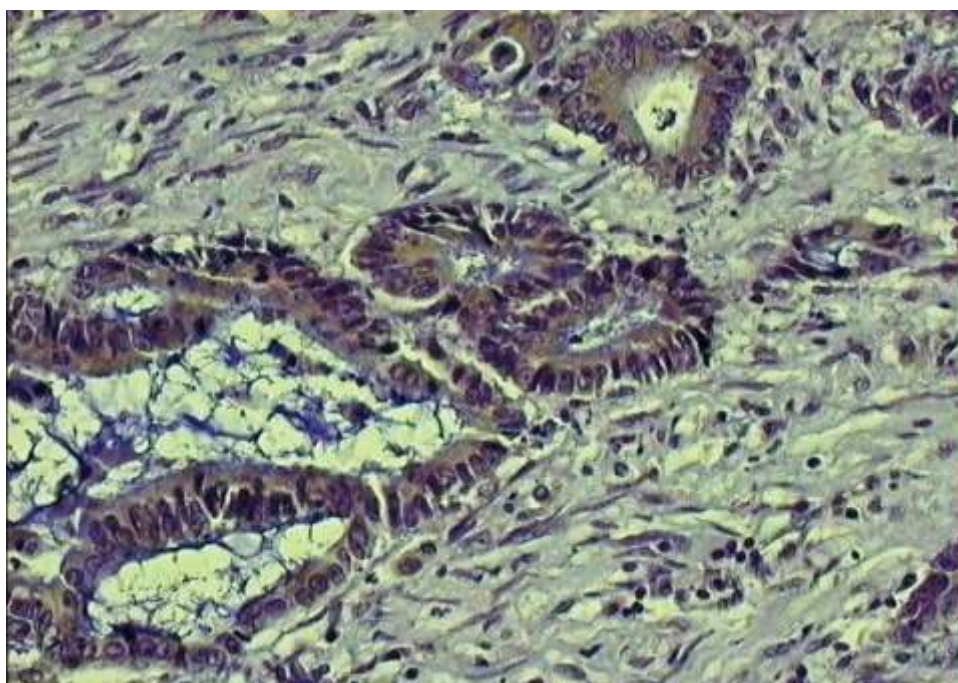
Ryc. 3-14. Średnie nasilenie ekspresji CD44v6 na komórkach napromienianych i nienapromienianych guzów odbytnicy. Wycinki raków nienapromienianych pochodzą od chorych pierwotnie leczonych operacyjnie (n=48), a raków napromienianych od chorych poddanych przedoperacyjnej RT (n=45). Stwierdzono znamienne wyższą ekspresję CD44v6 na powierzchni komórek napromienianych w porównaniu z grupą nienapromienianą, $p=0,002$, test t – Studenta.



Zdj. 3-26 i 3-27. Pierwotny nienapromieniany rak gruczołowy odbytnicy. Średnie nasilenie ekspresji CD44v6. Poszczególne komórki wykazują różne nasilenie ekspresji CD44v6. Czerwoną strzałką zaznaczono komórki o silnej ekspresji, czarną komórki wykazujące słabą ekspresję CD44v6. Powiększenie odpowiednio 100 i 200x



Zdj. 3-28. Pierwotny rak gruczołowy odbytnicy po RT 5x5 Gy. Silna ekspresja CD44v6 na powierzchni komórek. Powiększenie 100x

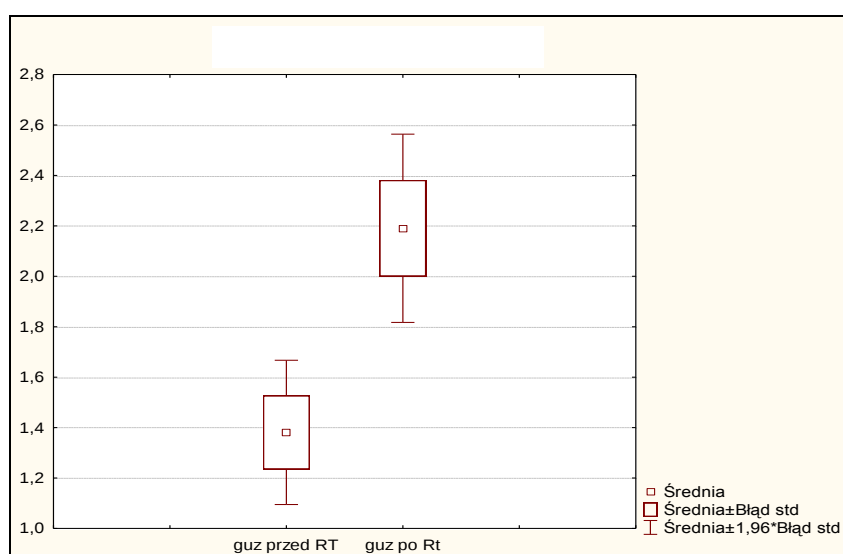


Zdj. 3-29. Pierwotny rak gruczołowy odbytnicy po RT z CHT 25x1,8 Gy. W obrębie przetrwałych komórek raka stwierdza się średnią ekspresję CD44v6. Powiększenie 200x

Na podstawie porównania ekspresji CD44v6 w 21 parach tkanek pochodzących od tych samych chorych, stwierdzono zwiększenie ekspresji CD44v6 po zastosowaniu RT ($p=1 \times 10^{-6}$); (tabela 3-12 i rycina 3-15).

Ekspresja CD44v6	Guz odbytnicy przed RT	Guz odbytnicy po RT
0	1	2
1	12	0
2	7	11
3	1	8
Średnia $\pm$ SD	$1,38 \pm 0,67$	$2,19 \pm 0,87$

Tabela 3-12. Ekspresja CD44v6 w komórkach raka odbytnicy przed i po RT, TD=25-50,4 Gy. Poszczególne pary tkanek nienapromienianych (wycinki diagnostyczne) oraz guzów operowanych po zakończeniu RT pochodzą od tych samych chorych, $n=21$. Wykazano istotny wzrost nasilenia ekspresji pod wpływem RT, $p=1 \times 10^{-6}$, test t.



Ryc. 3-15. Ekspresja CD44v6 na powierzchni komórek raka odbytnicy przed i po RT, TD = 25-50,4 Gy. Poszczególne pary tkanek nienapromienianych (wycinki diagnostyczne) oraz guzów operowanych po zakończeniu RT, pochodzą od tych samych chorych, $n=21$. Stwierdzono znaczne nasilenie ekspresji po RT, $p=1 \times 10^{-6}$, t - test.

3.2.4 Ekspresja CD44v6 na powierzchni komórek przerzutów raka odbytnicy do regionalnych węzłów chłonnych

Łącznie zbadano 18 zawierających przerzuty węzłów chłonnych pochodzących od chorych poddanych przedoperacyjnej radioterapii oraz 14 od chorych poddanych pierwotnej resekcji odbytnicy. Średnia ekspresja w węzłach nienapromienianych ($n=14$) wynosiła $1,00 \pm 0,55$, a w węzłach napromienianych ($n=18$) - $0,89 \pm 0,58$, ($p=0,29$, test t-Studenta). Ponadto porównano ekspresję CD44v6 w komórkach napromienianych i

nienapromienianych guzów pierwotnych i przerzutów do węzłów chłonnych pochodzących od tych samych chorych. Stwierdzono znamienne słabszą ekspresję CD44v6 w węzłach chłonnych w porównaniu z ekspresją w guzie pierwotnym. Zależność ta występowała zarówno w przerzutach napromienianych, jak i nienapromienianych (tabele 3-13 i 3-14).

Ekspresja CD44v6	Guz odbytnicy nienapromieniany n=14	Przerzut węzłowy nienapromieniany n=14
0	1	2
1	4	11
2	9	2
3	0	0
Średnia ± SD	1,57 ± 0,65	1,00 ± 0,55

Tabela 3-13. Ekspresja CD44v6 komórkach raka odbytnicy i przerzutach do regionalnych węzłów chłonnych u chorych, którzy nie otrzymywali wcześniej RT. Poszczególne pary tkanek pochodzą od chorych pierwotnie operowanych z powodu miejscowo-regionalnie zaawansowanego raka odbytnicy. Wykazano istotnie mniejszą ekspresję CD44v6 w komórkach przerzutów węzłowych w porównaniu do komórek guza pierwotnego ($p=5,6 \times 10^{-4}$, test t – Studenta).

Ekspresja CD44v6	Guz odbytnicy napromieniany n=18	Przerzut węzłowy napromieniany n=18
0	1	4
1	3	12
2	9	2
3	5	0
Średnia ± SD	2,00 ± 0,84	0,89 ± 0,58

Tabela 3-14. Ekspresja CD44v6 w komórkach pierwotnego ogniska raka odbytnicy i przerzutach do regionalnych węzłów chłonnych po RT całkowitą dawką 25-50,4 Gy. Poszczególne pary tkanek pochodzą od chorych poddanych przedoperacyjnej RT z powodu miejscowo-regionalnie zaawansowanego raka odbytnicy. Wykazano istotne zmniejszenie ekspresji CD44v6 na komórkach napromienianych przerzutów węzłowych ($p=4,7 \times 10^{-6}$, test t – Studenta).

DYSKUSJA

4.1 Metody oceny ekspresji CD44v6

Dostępne przeciwciała monoklonalne przeciw wariantom CD44 umożliwiają ich wykrywanie za pomocą metod IHC zarówno w skrawkach parafinowych, jak i mrożonych. Obecnie dostępnych jest kilka rodzajów przeciwciał monoklonalnych anti-CD44v6. Są to m.in. 2F10, VFF4, VFF7, VFF18 (BIWA 1), U36, V6B3, HB-256 oraz var 3.1 [39, 55, 75, 116, 141]. W ciągu około 30 lat od odkrycia CD44v6 pojawiło się wiele doniesień na temat ekspresji tego białka na ludzkich komórkach zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych. Otrzymywano różniące się od siebie wyniki, często zależne od zastosowanego przeciwciała lub sposobu otrzymania, przygotowania i obróbki materiału tkankowego. W różnych badaniach dotyczących tego samego typu nowotworu np. raka odbytnicy, udział guzów wykazujących ekspresję CD44v6 zawarty był w granicach od 6 do 100% [35, 51, 55, 97]. Podobna sytuacja dotyczy raka szyjki macicy, gdzie ekspresję w zależności od metody wykrywania stwierdzano w 32% do 100% guzów [55]. Jednym z możliwych wyjaśnień jest różne powinowactwo antygenowe przeciwciał monoklonalnych stosowanych w poszczególnych badaniach. Przeciwciało VFF7 wydaje się mieć mniejsze powinowactwo do CD44v6 w porównaniu z klonami VFF4, VFF18 czy 2F10 [55] i jego użycie może zaniżać wyniki. Wyższą ekspresję stwierdzono w świeżo mrożonych skrawkach [26], zwłaszcza przy zastosowaniu przeciwciał o wysokim powinowactwie do CD44v6 np. VFF18, 2F10 oraz jednoczesnym wzmacnianiu antygenowym przy użyciu mikrofali.

W większości prac w odniesieniu zarówno do tkanek prawidłowych, ksenograftów, jak i pierwotnych guzów nowotworowych stosowano metodę wzmacniania antygenowego za pomocą mikrofali. Napromienianie mikrofalami prawidłowej błony śluzowej jamy ustnej powoduje wzrost antygenowości komórek warstwy podstawnej [112]. W niniejszej pracy w odniesieniu do tkanek ludzkich również stosowano wzmacnienie antygenowe. W przypadku ksenograftów metoda ta powodowała znaczne uszkodzenia tkanek, uniemożliwiające przeprowadzenie wiarygodnej analizy, dlatego jej nie stosowano. W większości prac za wynik dodatni uważano stwierdzenie CD44v6 w co najmniej 10% komórek. W poszczególnych pracach rozpiętość ta sięga jednak od 5% do 50% [34, 56, 68, 118]. W niektórych doniesieniach wyniki oceniano z uwzględnieniem intensywności barwienia, najczęściej w skali 1+ do 3+, a także

uwzględniano lub nie uwzględniono komórek, które wykazywały słabą ekspresję CD44v6. Z powodu tych rozbieżności proponuje się wykorzystanie nowoczesnych technik molekularnych (m.in. PCR) do wykrywania zwiększonej ekspresji CD44v6 w wycinkach z ognisk przerzutowych. Sugerowano także, że analiza stężenia rozpuszczalnego antygenu CD44v6 w płynach ustrojowych może być przydatna we wczesnym wykrywaniu nawrotu nowotworu [26, 36, 40, 71]. Z uwagi na retrospektywny charakter przeprowadzonych badań, niemożliwe było wykorzystanie świeżych skrawków ani analiza stężenia CD44v6 w surowicy krwi. Wykorzystane zostały skrawki parafinowe w połączeniu z przeciwciałem monoklonalnym o wysokim powinowactwie do CD44v6 (klon VFF 18), a ekspresję CD44v6 oceniano przy użyciu najczęściej stosowanej skali od 0 do 3. Uzyskane wyniki trudno jest odnieść do innych doniesień, gdyż tylko nieliczne z nich wykorzystywały identyczne metody wykrywania i analizy.

4.2 Pierwotne raki oraz ksenografty ludzkich raków okolicy głowy i szyi

4.2.1 Ekspresja CD44v6 w zależności od cech demograficznych i klinicznych guza

Wydaje się, że nasilenie ekspresji CD44v6 nie jest związane z wiekiem chorych [82]. Zależność taką wykazano tylko w jednym doniesieniu dotyczącym wpływu wieku na poziom ekspresji CD44v6 i na transformację nowotworową komórek nabłonkowych [112]. W niniejszym materiale w odniesieniu do raka odbytnicy stwierdzono nieznamiennie wyższą ekspresję CD44v6 u chorych po 65. roku życia. W badanej populacji nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji CD44v6 w zależności od płci. Z uwagi na brak szczegółowych danych klinicznych chorych nie można było ocenić wpływu wieku na ekspresję CD44v6 w badanych nabłonkach jamy ustnej i rakach regionu głowy i szyi. W niektórych doniesieniach wykazano słabą lub brak ekspresji CD44v6 w pierwotnych rakach płaskonabłonkowych okolicy głowy i szyi [80], rakach *endometrium* [42] oraz w rakach z komórek przejściowych [62] jeżeli towarzyszyły im przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych. Cecha ta w odniesieniu do chorych na raka głowy i szyi w niniejszej pracy nie była znana.

4.2.2 Ksenografty jako model ludzkich raków

W niniejszym badaniu wykorzystano ludzkie guzy przeszczepione na myszy nu/nu. Ksenografty takie są dobrym modelem, bowiem z dużą wiernością zachowują cechy pierwotnych ludzkich nowotworów [63]. Dotyczy to także ekspresji CD44v6. W

badaniach porównujących 8 raków pierwotnych i ksenograftów MKG wywodzących się z tych raków nie stwierdzono różnic w nasileniu ekspresji CD44v6 oraz heterogenności komórek w obrębie nowotworów. W 2 przypadkach mimo pasażowania otrzymane ksenografty były lepiej zróżnicowane histologicznie w porównaniu z guzami, z których się wywodziły. Mogło to być spowodowane heterogennością guza pierwotnego pod względem zróżnicowania komórek. O stopniu G guza decyduje najniżej zróżnicowana frakcja komórek. Do otrzymania ksenograftu wykorzystuje się tylko niewielki fragment guza pierwotnego, który mógł zawierać komórki lepiej zróżnicowane. Ostatecznie ksenograft zachowuje cechy histologiczne frakcji przeszczepionej, a nie całego guza pierwotnego. Ksenografty badano na myszach pozbawionych własnej odporności co prawie całkowicie eliminuje ewentualny wpływ układu immunologicznego na rozwój przeszczepionego raka [107, 59]. Cechy tej nie obserwuje się w pierwotnych nowotworach, rozwijających się w organizmie posiadającym określoną odporność. W mysim modelu ludzkie pozostają jedynie tkanki nowotworowe, a jako obce gatunkowo, zostają zawsze otorbione myszą tkanką łączną. Złośliwe nowotwory człowieka z reguły nie posiadają torebki łącznotkankowej. Naczynia i tkanka łączna wewnątrz guza także są mysie, co może być korzystne w badaniach, w których ludzka tkanka łączna mogłaby wykazywać antygenowość w stosunku do badanego białka. Podobnie jak mysia, ludzka tkanka łączna nie wykazuje ekspresji CD44v6. Mysie pochodzenie naczyń ksenograftu może mieć wpływ na adhezję komórkową i obserwowane zmniejszenie ekspresji CD44v6 w bezpośrednim sąsiedztwie naczyń i torebki guza. Z drugiej strony komórki prawie całkowicie pozbawione CD44v6 znajdowały się w miejscach, gdzie doszło do nacieczenia torebki i gdzie potencjalnie znajdowały się komórki mające zdolność do naciekania i podziałów.

4.3 Porównanie ekspresji CD44v6 na komórkach prawidłowej błony śluzowej jamy ustnej oraz pierwotnych raków i ksenograftów wywodzących się z tej okolicy

W niniejszej pracy porównano ekspresję CD44v6 w komórkach błony śluzowej jamy ustnej, pierwotnych rakach jamy ustnej oraz otrzymanych z nich ksenograftach. Wszystkie grupy tkankowe pochodziły od tych samych chorych. Przeprowadzone badania wykazały obecność silnej ekspresji badanego białka na powierzchni komórek prawidłowego nabłonka jamy ustnej i obniżoną w guzach pierwotnych i ksenograftach. Nasilenie ekspresji CD44v6 w komórkach raków i ksenograftów było podobne.

Potwierdza to tezę, że ksenografty są dobrym modelem do badań nad ludzkimi guzami. Stopień obniżenia nasilenia ekspresji w rakach pierwotnych i ksenograftach w porównaniu do ekspresji w prawidłowej błonie śluzowej był związany ze stopniem złośliwości. Zmniejszenie ekspresji CD44v6 w rakach okolicy głowy i szyi oraz na liniach komórkowych wywodzących się z tych raków wykazano w większości opublikowanych badań [113, 127].

4.4 Napromieniana i nienapromieniana prawidłowa błona śluzowa jamy ustnej

Udowodniono, że CD44v6, obok innych molekuł adhezyjnych warunkuje w dorosłym życiu tworzenie prawidłowej architektury nabłonka [113], a w płodowym życiu bierze udział w rozwoju tkanki nabłonkowej poprzez oddziaływanie pomiędzy tą tkanką i tkanką mezenchymalną [153]. Prawdopodobnie CD44v6 odgrywa istotną rolę w procesach wzrostu i dojrzewania. Prawidłowa ekspresja CD44v6 wzmacnia więzy pomiędzy komórkami oraz pomiędzy komórkami a macierzą międzykomórkową [30, 153]. W większości dostępnych doniesień wykazano obecność CD44v6 w komórkach warstwy podstawnej, kolczystej oraz proksymalnej części warstwy ziarnistej nabłonków płaskich rogowaciejących. W niektórych pracach silną ekspresję CD44v6 stwierdzano w komórkach wszystkich warstw nabłonka z wyjątkiem warstw górnych (rogowych). W niektórych doniesieniach twierdzono zmniejszoną ekspresję CD44v6 lub jej całkowity brak w warstwie podstawnej oraz w komórkach warstwy jasnej [80]. W badaniach Kunishi'ego [80] stosowano podobne jak w niniejszej pracy metody przygotowywania tkanek i ich wybarwiania, z wyjątkiem pierwotnego przeciwciała (stosowano klon 2F10 o podobnym, wysokim powinowactwie do badanego antygenu). Wyniki uzyskane przez tych autorów były podobne.

Zabijanie komórek pnia podczas kolejnych frakcji RT powoduje postępującą utratę liczby komórek, które w warunkach fizjologicznych uzupełniają utratę komórek powierzchownych. Udowodnionym morfologicznym skutkiem wczesnych zmian popromiennych odpowiedzialnych za rozwój zapalenia błon śluzowych jest zmniejszenie liczby komórek w warstwach nabłonka, prowadzące do powstania hipoplazji oraz ognisk aplazji komórkowej. Jako odpowiedź na działanie czynnika uszkadzającego obserwowano także hiperplazję w napromienianym nabłonku, zaburzenie architektoniki tkanki nabłonkowej i zmianę kształtu komórek [156]. Zmiany takie wykazano również w niniejszych badaniach. U podstaw tych zjawisk leży

zmniejszenie całkowitej liczby komórek rozrodczych w warstwach podstawnej i przypodstawnej. Przyjmuje się, że komórki pnia mają nieograniczoną lub prawie nieograniczoną możliwość podziałów, co pozwala na odtwarzanie nabłonka i naprawę uszkodzeń. Zdolność komórek rozrodczych do podziałów i naprawy uszkodzeń DNA warunkuje tolerancję tkanek na działanie RT. W czasie konwencjonalnej RT wprowadza się co 5 frakcji dwudniowe przerwy, podczas których dochodzi do regeneracji uszkodzonych tkanek prawidłowych. Obserwowane po RT zmiany liczby komórek pozostają w ścisłym związku z czasem obrotu komórkowego (TOT, ang. *turnover time*), czyli czasem od powstania do złuszczenia komórki nabłonka. Prawidłowy TOT dla nabłonka jamy ustnej wynosi u myszy 5-6 dni, a u człowieka 7 dni [29, 130]. Czas utajenia efektu RT dla człowieka wynosi mniej niż 2 tygodnie [29]. RT powoduje skrócenie TOT nabłonka języka myszy z fizjologicznego 5,2 do około 3,2 dnia [31, 30]. Czas podziału komórkowego dla komórek pnia nabłonka myszy po RT skraca się z około 3,5 dnia do mniej niż 1 dnia [30]. W niniejszej pracy liczba komórek nabłonka po zastosowaniu terapeutycznej dawki 54-60 Gy zmniejszała się o około 50%. Stwierdzono zburzenie prawidłowej struktury histologicznej oraz 2-2,5-krotne zmniejszenie łącznej liczby komórek we wszystkich warstwach napromienianego nabłonka. W prawidłowej błonie śluzowej jamy ustnej RT powodowała znamienne obniżenie ekspresji CD44v6. Spadek ekspresji CD44v6 pod wpływem RT może częściowo tłumaczyć morfologiczne zmiany popromienne na poziomie komórkowym i tkankowym. Zmniejszenie ekspresji CD44v6 może powodować obserwowane w niniejszych badaniach zaburzenie dojrzewania i przemieszczania się komórek w warstwach nabłonka, a także skracać TOT i przyspieszać złuszczenie komórek. Przyczyną obserwowanego zmniejszenia ekspresji CD44v6 może być zwiększenie udziału mniej dojrzałych komórek w porównaniu do nieleczonego nabłonka. Innym możliwym wytłumaczeniem jest przyspieszenie repopulacji (ang. *accelerated repopulation*) obserwowane w napromienianych nabłonkach po około 3-4 tygodniach od rozpoczęcia RT [30]. W 1990 roku Kummermehr i Dörr po raz pierwszy zaproponowali model opisujący reorganizację odnowy uszkodzonego promieniowaniem nabłonka [28]. Model ten obejmuje przyspieszenie podziałów komórek rozrodczych oraz zmianę sposobu odtwarzania puli komórek pnia z asymetrycznego (jedna komórka potomna pozostaje w warstwie podstawnej, druga dojrzewa i wędruje do kolejnych warstw) na symetryczny (obie komórki rozrodcze wędrują do wyższej warstwy

komórek). Zmiany te pozwalają na podtrzymanie funkcji nabłonka oraz zastąpienie komórek uszkodzonych przez promieniowanie komórkami zdolnymi do prawidłowych podziałów. Jeśli komórki rozrodcze rzeczywiście wykazują niższą ekspresję CD44v6 w porównaniu do komórek warstw środkowych nabłonka (kolczystej i ziarnistej), to model przyspieszenia odnowy komórkowej tłumaczyłby całkowite obniżenie ekspresji CD44v6 obserwowane w badaniach IHC w warstwach środkowych nabłonka, do których przemieszczają się komórki rozrodcze i komórki mniej dojrzałe. Hipotezę tę dodatkowo wspiera obserwowana w niniejszych badaniach migracja komórek CD44v6-ujemnych, zdolnych do podziałów, „nadpełniających” do ognisk aplazji w celu wynabłonkowania uszkodzenia tkanki. Na tym etapie badań nie można jednak wykluczyć zmian w metabolizmie komórkowym po zastosowaniu RT i modyfikowaniu ilości antygeny gromadzącego się na powierzchni w wyniku zadziałania mechanizmów wewnątrzkomórkowych, powodujących rzeczywiste obniżenie ekspresji CD44v6 na dojrzałych komórkach warstwy kolczystej i ziarnistej.

4.5 Zmiany ekspresji CD44v6 w napromienianych i nienapromienianych ksenograftach raków regionu głowy i szyi

W większości dostępnych doniesień wykazano silną ekspresję CD44v6 na komórkach prawidłowego nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego oraz jej zmniejszanie się w procesie transformacji nowotworowej tej tkanki [81, 127]. Mniejszą ekspresję CD44v6 obserwowano także w dysplazjach nałonkowych średniego i dużego stopnia [4, 127], a postęp procesu transformacji związany był z dalszym jej obniżaniem [4, 80]. W jednym z doniesień autorzy wykazali podobny poziom ekspresji CD44v6 w tkankach dysplastycznych i tkankach prawidłowych [82]. Obniżenie nasilenia CD44v6 może być związane z obserwowanym w trakcie transformacji nowotworowej zmniejszeniem adhezji i rozluźnieniem więzi pomiędzy komórkami, co prowadzi do zaburzenia architektoniki tkanki i pozwala na przekraczanie błony podstawnej przez komórki nowotworu [73, 125, 122, 149]. Doniesienia na temat ekspresji CD44v6 w tkankach dysplastycznych i rakach płaskonabłonkowych są jednak sprzeczne i trudno jednoznacznie określić rolę tego białka w procesie powstawania i progresji nowotworu [4, 81, 116, 127].

Zbadano szereg zewnętrznych i wewnętrznych czynników, które mogłyby wpływać na nasilenie ekspresji CD44v6. Na podstawie badań *in vitro* na liniach komórkowych że ekspresja CD44v6 nie jest modulowana przez czynniki wewnątrzpochodne takie jak:

czynniki wzrostu, fibronektyna, laminina, siarczan heparanu, chondroitynę i kolagen typu II oraz czynniki zewnętrzne: MTX, tunikamycynę czy retinol [127]. Odsetek komórek CD44v6-dodatnich w rakach głowy i szyi waha się w poszczególnych doniesieniach w granicach od 61 do 100%, w większości pomiędzy 95 i 100%. Dla raków skóry jest on najwyższy i bliski 100%. W niniejszych badaniach wykazano słabszą ekspresję CD44v6 w guzach nowotworowych w porównaniu z prawidłowym nabłonkiem, aczkolwiek w obu przypadkach była ona obecna. Obserwowano znaczną heterogenność ekspresji glikoproteiny CD44v6 w obrębie poszczególnych raków pierwotnych oraz w przeszczepianych guzach. Była ona jednak wyraźna tylko w guzach o średnim i wysokim stopniu złośliwości (G2 i G3) i dotyczyła ksenograftów linii FaDu i GL. Tylko jeden rak FaDu wykazywał ogniskową ekspresję CD44v6; dodatnie komórki stanowiły 6% komórek żywych. W pozostałych guzach udział komórek wykazujących ekspresję CD44v6 wynosił od 55 do 99%. W niniejszych badaniach w obrębie każdego z ksenograftów istniały pule komórek niewykazujących ekspresji CD44v6 lub wykazujących słabą, niekompletną ekspresję błonową. Komórki te były zlokalizowane z reguły w pobliżu naczyń krwionośnych lub podtorebkowo, a ich udział był związany z cechą G. Obserwowano także większy odsetek figur podziału w komórkach niewykazujących ekspresji CD44v6 lub wykazujących słaby odczyn. Jeżeli komórki rozrodcze prawidłowego nabłonka wykazują słabą ekspresję CD44v6 lub brak, to można wnioskować, że te same cechy w ksenograftach związane są z ich potencjałem rozrodczym. Hipotezę tę wydaje się potwierdzać obserwacja, że raki gorzej zróżnicowane i z wyższym indeksem mitotycznym, wykazywały na ogół niższą ekspresję CD44v6 i miały wyższy odsetek komórek CD44v6-ujemnych i słabo dodatnich. Ta frakcja komórek, zlokalizowana blisko naczyń i powierzchni guza, miała zapewniony dopływ substancji odżywczych oraz tlenu, niezbędnych do przeprowadzania podziałów komórkowych i przeżycia. Jeżeli nasilenie ekspresji CD44v6 rzeczywiście wpływa na zdolność do tworzenia przerzutów, to lokalizacja w pobliżu naczyń i torebki, ułatwiająca przekraczanie tkanki łącznej, może sugerować ich potencjalną zdolność do szerzenia się. W obrębie komórek CD44v6-ujemnych pierwotnych raków regionu głowy i szyi, w bezpośrednim sąsiedztwie naciekaných prawidłowych tkanek znajdowano figury podziałowe. W obrębie ognisk raka komórki z widocznymi figurami podziału wykazywały jednakże różne nasilenie ekspresji CD44v6, przy czym dominowały komórki wykazujące brak ekspresji lub jej niskie nasilenie. W

obrębie nowotworu występują także komórki prawidłowe i komórki nowotworowe wtórnie nabywające zdolność różnicowania do komórek dojrzałych, pozostające często w fazie G₀ cyklu komórkowego. Ta frakcja komórek może pod wpływem różnych bodźców ponownie zacząć się dzielić i, jako komórki lepiej zróżnicowane, mogą wykazywać silną ekspresję antygen CD44v6.

Postulowany jest wpływ różnych wariantów CD44, w tym wariantu 6., na zdolność nowotworów do tworzenia przerzutów [49, 115, 121, 155]. Izoformy v4-7 oraz v6-7 zmieniały przeszczepiane na myszy, nie tworzące przerzutów linie komórkowe w guzy tworzące odległe przerzuty [49]. Większość autorów sugeruje jednak mniejszą ekspresję CD44v6 w pierwotnych nowotworach, guzach przerzutowych i tkankach dysplastycznych w porównaniu z normalnym nabłonkiem skóry [116], błony śluzowej krtani [128] oraz błony śluzowej jamy ustnej [4]. Na modelu zwierzęcym zauważono, że zablokowanie CD44v6 oraz innych wariantów CD44 przeciwciałami monoklonalnymi powodowało zablokowanie tworzenia przerzutów lub znaczne obniżenie ich liczby [121]. Niektórzy autorzy sugerują, że obecność CD44v6 na komórkach raków jelita grubego i odbytnicy oraz komórkach chłoniaków nieziarniczych jest związane z bardziej agresywnym przebiegiem choroby [148]. W niektórych ludzkich nowotworach zmiany w nasileniu ekspresji CD44v6 mogą być związane z gorszym rokowaniem i częstszym występowaniem odległych przerzutów, jednakże nie zostało to ostatecznie udowodnione.

Proces tworzenia przerzutów nowotworowych jest złożony i nie do końca poznany. Wydaje się jednak prawdopodobne, że komórki zdolne do tworzenia przerzutów muszą mieć zaburzoną adhezję w stosunku do innych komórek guza oraz macierzy zewnątrzkomórkowej. Zmniejszenie liczby cząstek adhezyjnych na powierzchni takiej komórki może być jednym z etapów nabywania przez nią zdolności do migracji i tworzenia przerzutów [89]. Prawdopodobnie zmniejszenie adhezji ułatwia proces oddzielania się i złuszczenia górnych warstw komórek nabłonka. Obecny stan wiedzy nie pozwala jednak jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy zmniejszenie ekspresji CD44v6 powoduje nabywanie przez komórki zdolności do wędrowania i tworzenia przerzutów. Sugerowano, że zahamowanie CD44v6 swoistym pierwotnym przeciwciałem zaburza w dużym stopniu oddziaływanie międzykomórkowe oraz oddziaływanie z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej [86]. Najprawdopodobniej jest to bardziej złożony proces, w którym mniejsze nasilenie ekspresji CD44v6 jest

tylko jednym z zachodzących zjawisk, niekoniecznie najważniejszym. Najprawdopodobniej nie ma jednej cząsteczki odpowiedzialnej za nabywanie przez komórkę zdolności do zainicjowania tworzenia przerzutu, a raczej są to złożone procesy i dotyczą wielu grup cząsteczek adhezyjnych. Być może sekwencja receptorów adhezji obecnych lub nieobecnych na komórce, decyduje przynajmniej w części o nabyciu zdolności migracji i o miejscu rozwoju przerzutu. Hipoteza ta mogłaby tłumaczyć zaobserwowaną w niniejszej pracy obecność w guzach frakcji komórek ubogich w antygen CD44v6, a rozpatrywanych potencjalnie jako komórki klonogenne i/lub zdolne do tworzenia przerzutów. Wymaga to jednak zbadania obecności innych cząstek adhezji na badanych komórkach oraz kinetyki ich zmian w komórkach klonogennych, przy potwierdzeniu ich klonogenego charakteru. Badania te powinny też być poszerzone o profil zmian ekspresji cząsteczek adhezyjnych analizowany w badaniach molekularnych. Obecnie nie można traktować obniżenia ekspresji CD44v6 jako markera procesu tworzenia przerzutów ani jednoznacznie potwierdzić, że obniżenie ekspresji CD44v6 w nabłonku prawidłowym jest przejawem toczącej się kancerogenezy [82].

RT znamienne zwiększa nasilenie ekspresji CD44v6 na komórkach raków gorzej zróżnicowanych i nie wpływała na jej nasilenie w nowotworach wysoko zróżnicowanych (np. w raku UT14), które wyjściowo cechowała silna, homogenna ekspresja CD44v6. RT, obok zabijania dzielących się komórek i pozornego zwiększenia ekspresji CD44v6, być może wywołuje także różne procesy, które nie zostały jeszcze do końca poznane np. z powodu odczynów zapalnych, swoistych cytokin lub z zjawiska *bystander effect*. Włączenie lub wyłączenie pod wpływem RT nieznanymi dotychczas mechanizmów może zwiększać ekspresję CD44v6 w napromienianych guzach. Badania wpływu RT na nasilenie ekspresji CD44v6 ma charakter pionierski i nie znajduje odniesienia w dostępnym piśmiennictwie.

4.6 Ekspresja CD44v6 w napromienianych i nienapromienianych rakach odbytnicy oraz prawidłowej błonie śluzowej odbytnicy

W niniejszych badaniach nienapromieniana prawidłowa błona śluzowa odbytnicy nie wykazywała ekspresji CD44v6, co potwierdza wcześniejsze doniesienia [41, 66]. Błona śluzowa odbytnicy pokryta jest jednowarstwowym nabłonkiem cylindrycznym zaliczanym do nabłonków gruczołowych. Pomiędzy dojrzałymi komórkami nabłonka występują komórki kubkowe (kom. gruczołowe) oraz komórki pnia.

Najprawdopodobniej ich oddziaływania międzykomórkowe oparte są na innych mechanizmach adhezji niż w nabłonku wielowarstwowym płaskim i odbywają się bez udziału CD44v6. W niektórych doniesieniach sugerowano, że przy użyciu przeciwciała VFF7 można stwierdzić słabą ekspresję wewnątrzcytoplazmatyczną białka CD44v6 zlokalizowaną w okolicy jądra komórkowego [23]. Nie ma doniesień na temat wpływu RT na nasilenie ekspresji CD44v6 w prawidłowej błonie śluzowej odbytnicy. Wykazano ogniskową ekspresję CD44v6 w błonie śluzowej objętej nieswoistym procesem zapalnym, takim jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego lub choroba Leśniowskiego-Crohna [41]. W błonie śluzowej poddanej zarówno krótkotrwałej jak i konwencjonalnej RT, nie stwierdzono ekspresji CD44v6. Może to mieć związek z tym, że proces zapalny po RT w badanych tkankach był reakcją na bezpośrednie zadziaływanie bodźca uszkodzającego, tj. promieniowania jonizującego, a nieswoiste zapalenia jelit są procesami przewlekłymi, trwającymi lata. Zmiana zdolności komórki do ekspresji białka CD44v6 może świadczyć o procesie złośliwienia i być jego wskaźnikiem. Potwierdzono zwiększone ryzyko rozwoju raka jelita grubego u chorych na nieswoiste zapalenie jelit i obecność ogniskowej ekspresji CD44v6 może być związana z toczącym się procesem transformacji nowotworowej. Tezę tę potwierdza obecność ognisk ekspresji CD44v6 w kryptach o zwiększonym indeksie proliferacji [41]. Badania IHC oraz badania molekularne z zastosowaniem metody RT-PCR wykazały znamienne zwiększenie ekspresji CD44v6 w ulegającej transformacji nowotworowej błonie śluzowej odbytnicy [151]. W innym badaniu stwierdzono występowanie CD44v6 na powierzchni komórek łagodnych polipów jelita grubego i odbytnicy (27% badanych polipów wykazywało tę cechę), na gruczolakach (ekspresja w 7-25% badanych tkanek) oraz na komórkach wczesnych raków wywodzących się z gruczolaków (54% przypadków). Potwierdza to wzrost zdolności do ekspresji CD44v6 wraz z postępem procesu nowotworzenia [41].

Mimo postępu, wyniki leczenia chorych na raka odbytnicy pozostają niezadowalające. Oczekuje się, że dołączenie terapii ukierunkowanych molekularnie do stosowanych obecnie skojarzonych metod leczenia może istotnie poprawić miejscową kontrolę nowotworu oraz zmniejszyć ryzyko rozwoju odległych przerzutów. Jak dotąd w leczeniu raka odbytnicy nie stosuje się skojarzenia immunoterapii z RT. Użycie w niniejszej pracy modelu raka odbytnicy było celowe, ponieważ jest to jeden z niewielu nowotworów wykazujących ekspresję CD44v6, w którym stosuje się przedoperacyjną

RT. Poza tym, w jednym bloku tkankowym oprócz pierwotnego guza znajduje się także prawidłowa błona śluzowa oraz zajęte przerzutami węzły chłonne. Wykazany w niniejszej pracy wzrost ekspresji CD44v6 w rakach odbytnicy w porównaniu do prawidłowej błony śluzowej oraz zmian łagodnych potwierdza wcześniejsze doniesienia [147, 151]. Nasilenie ekspresji CD44v6 nie zależy od stopnia zaawansowania klinicznego, stopnia złośliwości histologicznej i obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych oraz do wątroby [66, 105, 151]. Nie ma doniesień na temat ekspresji CD44v6 w odniesieniu do płci. W niniejszym badaniu nie wykazano różnic w ekspresji CD44v6 u mężczyzn i u kobiet. W niektórych doniesieniach słabszą ekspresję lub jej brak stwierdzano w guzach o większych wymiarach oraz w guzach naciekających całą ścianę jelita [66]. W niniejszym badaniu nie przeprowadzono takiej analizy. Inni autorzy wykazali zmniejszoną ekspresję CD44v6 w zaawansowanych rakach odbytnicy [149]. W większości dostępnych doniesień wykazano także zmniejszoną ekspresję CD44v6 lub jej brak w guzach przerzutowych, zarówno w węzłach chłonnych, jak i w przerzutach do wątroby [7, 23]. Zmniejszenie nasilenia ekspresji w przerzutach do węzłów chłonnych potwierdziły także niniejsze badania. Może to potwierdzać hipotezę, że zdolność komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów zależy między innymi od nasilenia ekspresji CD44v6. W badaniach Peng'a i wsp. [105, 106] stwierdzono znamienny związek pomiędzy nasileniem ekspresji CD44v6 a całkowitym czasem przeżycia i czasem do progresji. Z uwagi na zbyt krótki czas obserwacji, trudności logistyczne i brak możliwości prowadzenia długotrwałej obserwacji, w niniejszej pracy nie oceniano rokowniczej wartości ekspresji CD44v6.

4.7 Podsumowanie

Poznanie szeregu białek antygenowych, w tym CD44v6, ich rozmieszczenia oraz kinetyki zmian pod wpływem różnych bodźców, pozwala lepiej zrozumieć biologię nowotworów oraz stwarza potencjalne możliwości wdrożenia celowanych terapii. Zmniejszenie ekspresji CD44v6 może być jednym z ciągu zdarzeń towarzyszących procesowi powstawania i progresji raka i może być związane ze stopniem jego dojrzałości. Zmniejszenie ekspresji CD44v6 obserwowane po napromienieniu prawidłowej błony śluzowej jamy ustnej może wynikać z nasilenia repopulacji oraz przyspieszeniu odnowy komórkowej, a przez to zaburzenia procesów dojrzewania komórek w porównaniu z nabłonkiem nienapromienianym. Zmiany w nasileniu ekspresji CD44v6 mogą być skutkiem zabijania mniej dojrzałych komórek, mających

zdolność do dzielenia się lub być spowodowane zmianami w mechanizmach komórkowych regulujących nasilenie ekspresji danego receptora na skutek zadziałania bodźca uszkodzającego, jakim jest promieniowanie jonizujące. Wpływ frakcjonowanej RT na ekspresję białka CD44v6 w guzach nowotworowych oraz w prawidłowym nabłonku wydaje się odmienny. Wzrost nasilenia ekspresji CD44v6 w guzach nowotworowych poddanych RT może stanowić przesłankę dla prób kojarzenia RT z terapią anti-CD44v6. Jak dotąd promieniowanie jonizujące jest jedynym znanym zewnętrznym modulatorem nasilenia ekspresji CD44v6. Uzyskane wyniki wymagają jednak dalszych badań, obejmujących większe grupy chorych. W prowadzonych obecnie badaniach klinicznych znajduje się kilka przeciwciał monoklonalnych anti-CD44v6. Najlepsze wyniki i zarazem najkorzystniejszy profil terapeutyczny uzyskano po zastosowaniu ludzkich przeciwciał anti-CD44v6 (biwatuzumab). W badaniach znajdują się także koniugaty biwatuzumabu oraz leków cytotoksycznych [104]. Jak dotąd nie ma prac na temat skuteczności jednoczesnej RT oraz podawania przeciwciał monoklonalnych anti-CD44v6. Nawet jeżeli obecne wyniki nie znajdą odniesienia klinicznego, będą one stanowiły przyczynek w poszukiwaniu zmian ekspresji receptorów na powierzchni komórek poddanych działaniu RT.

4.8 Wnioski:

1. W rakach płaskonabłonkowych rejonu głowy i szyi oraz w ich ksenograftach ekspresja CD44v6 jest słabsza niż w prawidłowych nabłonkach, z których wywodzą się te nowotwory. Nasilenie ekspresji CD44v6 jest związane ze zróżnicowaniem guza. Brak lub mniejsza ekspresja występuje głównie w komórkach warstwy przypodstawnej prawidłowego nabłonka oraz w potencjalnie klonogennych komórkach nowotworowych.
2. Frakcjonowana RT zmniejsza ekspresję CD44v6 w prawidłowym nabłonku jamy ustnej, najprawdopodobniej w wyniku przyśpieszenia repopulacji i odnowy komórkowej, a przez to zaburzenia procesów dojrzewania. W komórkach nowotworowych ekspresja CD44v6 zwiększa się pod wpływem RT, co może być wynikiem jej letalnego efektu w odniesieniu do klonogennych komórek, lub innych nieznanymi mechanizmów.
3. Większość raków odbytnicy wykazuje ekspresję CD44v6, a jej nasilenie zwiększa się pod wpływem RT. Prawidłowa błona śluzowa odbytnicy, zarówno napromieniana, jak i nienapromieniana, nie zawiera tego białka.

4. Nasilenie ekspresji CD44v6 nie jest związane z wiekiem, płcią oraz stopniem zaawansowania klinicznego raka odbytnicy.
5. Ekspresja CD44v6 jest słabsza w przerzutach raka odbytnicy do regionalnych węzłów chłonnych w porównaniu do komórek guza pierwotnego, niezależnie do zastosowania RT.

Piśmiennictwo

1. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill C.B., Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* (1990), **62**, 1303-1313
2. Ayhan, A., Baykal, C., Al., A., Ayhan, A. Altered CD44 variant 6 expression in FIGO stage IB cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* (2001), **83**, 569-574
3. Ayhan, A., Tok, E.C., Bildirici, I., Ayhan, A. Overexpression of CD44 variant 6 in human endometrial cancer and its prognostic significance. *Gynecol Oncol.* (2001), **80**, 355-358
4. Bahar, R., Kunishi, M., Kayada, Y., Yoshiga, K. CD44 variant 6 (CD44v6) expression as a progression marker in benign, premalignant and malignant oral epithelial tissues. *Int J Oral Maxillofac Surg.* (1997), **26**, 443-446
5. Baumann, M., Petersen, C., Schulz, P., Baisch H. Impact of overall treatment time on local control of slow growing human GL squamous cell carcinoma in nude mice treated by fractionated irradiation. *Radiother and Oncol.* (1999), **50**, 107-111.
6. Bendall, L.J., Bradstock, K.F., Gottlieb, D.J. Expression of CD44 variant exons in acute myeloid leukaemia is more common and more complex than that observed in normal blood, bone marrow or CD34⁺ cells. *Leukemia* (2000), **14**, 1239-1246
7. Bendardaf, R., Algars, A., Elzagheid, A., Korkeila, R., Ristamaki, R., Lamlum, H., Collan, Y., Syrjanen, K., Pyrhonen, S. Comparison of CD44 expression in primary tumours and metastases of colorectal cancer. *Oncol. Rep.* (2006), **16**, 741-746
8. Bennett, K.L., Jackson, D.G., Simon, J.C., Tanczos, E., Peach R, Modrell, B., Stamenkovic, I., Plowman, G., Aruffo, A. CD44 isoforms containing exon v3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol.* (1995), **128**, 687-698
9. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy cetuxymab plus for locoregionally advanced squamous cell carcinoma of head and neck. *N Engl J Med.* (2006), **354**, 567-578
10. Börjesson, P., Postema, E., Roos, J., Colnot, R., Marres, H., van Schie, M., Stehle, G., de Bree, R., Snow, G., Oyen, W., van Dongen, M. Phase I therapy study with ¹⁸⁶Re-labelled humanized monoclonal antibody BIWA4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* (2003), **9**, 3961s-3972s
11. Börjesson, P.K., Jauw, Y.W., Boellaard, R., de Bree, R., Comans, E.F., Roos, J.C., Castelijns, J.A., Vosjan, M.J., Kummer, J.A., Leemans, C.R., Lammertsma, A.A., van Dongen, G.A. Performance of immune – positron emission tomography with zirconium-89-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in the detection of lymph node metastases in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res.* (2006), **12**, 2133-2140
12. Bourguignon L.Y.W. CD44-mediated oncogenic signalling, and cytoskeleton activation during mammary tumour progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2001), **6**, 287-297
13. Bourguignon, L.Y.W., Zhu, D., Zhu, H. CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signalling and tumour progression. *Front Biosci.* (1998), **1**, 637-649

14. Bujko, K., Kolodziejczyk, M. The 5 x 5 Gy with delayed surgery in non-resectable rectal cancer: A new treatment option. *Radiothe Oncol.* (2008), **87**, 311-313
15. Callagy, G., O'Grady, A., Butler, D., Leader, M., Path, F.R.C., Kay, E., Path M.R.C. Expression of CD44 in uterine cervical squamous neoplasia: a predictor of microinvasion? *Gynecol Oncol.* (2000), **76**, 73-79
16. Carbognani, P., Spaggiari, L., Romani, A., Solli, P., Corradi, A., Cantoni, A.M., Petronini, P.G., Borghetti, A.F., Rusca, M., Bobbio, P. Expression of human CD44v6 in non-small-cell lung cancer. *Eur Surg Res.* (1998), **30**, 403- 408
17. Clarke, G., Ryan, E., O'Keane, J.C., Crowe, J., Mathuna, P.M. Mortality association of enhanced CD44v6 expression is not mediated through lymphatic spread in stage II colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* (2000), **15**, 1028-1031
18. Colnot, D.R., Quak, J.J., Roos, J.C., van Lingen A., Wilhelm, A.J., van Kamp, G.J., Huijgens, P.C., Snow, G.B., van Dongen, G.A. Phase I therapy study of 186 Re- labelled chimeric monoclonal antibody U36 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Nucl Med.* (2000), **41**, 1999-2010
19. Colnot, D.R., Quak, J.J., Roos, J.C., de Bree, R., Wilhelm, A.J., Snow, G.B., van Dongen, G.A. Radioimmunotherapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma: initial experience. *Head Neck* (2001), **23**, 559-565
20. Colnot, D.R., Wilhelm, A.J., Roos, J.C., de Bree, R., Quak, J.J., Snow, G.B., van Dongen, G.A. Evaluation of limited blood sampling in a preceding 99m Tc labelled diagnostic study to predict the pharmacokinetics and myelotoxicity of 186 Re-cMAb U36 radioimmunotherapy. *J Nucl Med.* (2001), **42**, 1364-1367
21. Colnot, D.R., Ossenkoppele, G.J., Roos, J.C., Quak, J.J., de Bree, R., Borjesson, P.K., Huijgens, P.C., Snow, G.B., van Dongen, G.A. Reinfusion of unprocessed, granulocyte colony-stimulating factor-stimulated whole blood allows dose escalation of 186 Re-labelled chimeric monoclonal antibody U36 radioimmunotherapy in a phase I escalation study. *Clin Cancer Res.* (2002), **8**, 3401-3406
22. Colnot, D.R., Roos, J.C., de Bree, R., Wilhelm, A.J., Kummer, J., Hanft, G., Heider, K.H., Stehle, G., Snow, G.B., van Dongen, G.A. Safety, biodistribution, pharmacokinetics, and immunogenicity of 99m Tc-labelled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother.* (2003), **52**, 576-582
23. Coppola, D., Hyacinthe, M., Cantor, A.B., Karl, R., Marcet, J., Cooper, D.L., Nicosia, S.V., Cooper, H.S. CD44v6 expression in human colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* (1998), **29**, 627-635
24. Cunningham D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, Ch., Chau, I., Van Cutsem, E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan- refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* (2004), **351**, 337-345
25. Dalchau, R., Kirkley, J., Fabre, J.W. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur J Immunol.* (1980), **10**, 737-744
26. Dall, P., Heider, K.H., Hekele, A., Minckwitz, G., Kaufmann, M., Ponta, H., Herrlich, P. Surface protein expression and messenger RNA splicing analysis of

- CD44 in uterine cervical cancer and normal cervical epithelium. *Cancer Res.* (1994), **54**, 3337-3341
27. Dörfler, A., Baumann, M. Erste strahlenbiologische Untersuchungen an einer neuen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie SKX. *Experimentelle Strahlentherapie und klinische Strahlenbiologie.* (1997), **6**, 61-64
 28. Dörr, W., Kummermehr, J. Accelerated repopulation of mouse tongue epithelium during fractionated irradiation or following single dose. *Rad Oncol.* (1990), **17**, 249-259
 29. Dörr, W. Modulation of repopulation processes in oral mucosa: experimental results. *Int J Radiat Biol.* (2003), **79**, 531-537
 30. Dörr, W., Emmendorfer, H., Weber-Frisch, M. Tissue kinetics in mouse tongue mucosa during daily fractionated radiotherapy. *Cell Prolif.* (1996), **29**, 495-504
 31. Dörr, W., Kummermehr, J. Proliferation kinetics of mouse tongue epithelium under normal conditions and following single dose irradiation. *Virchows Arch.* (1991), **60B**, 287
 32. de Bree, R., Roos, J.C., Quak, J.J., den Hollander, W., Snow, G.B., Van Dongen, G.A. Radioimmunoscinigraphy and biodistribution of technetium-99m-labelled monoclonal antibody U36 in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* (1995), **1**, 591-598
 33. de Bree, R., Roos, J.C., Plaizier, M.A., Quak, J.J., van Kamp, G.J., den Hollander, W., Snow, G.B., van Dongen, G.A. Selection of monoclonal antibody E48 IgG or U36 IgG for adjuvant radioimmunotherapy in head and neck cancer patients. *Br J Cancer* (1997), **75**, 1049-1060
 34. Fabricius, E.M., Langford, A., Kramer, M.H., van Kieken, J.H., Kluin-Nelemans, H.C., Hermans, J., Heisterkamp, S., Noordijk, E.M., Kluin, P.M., Pals, S.T. CD44v6 expression in head and neck carcinomas. *Cancer J.* (1997), **10**, 325- 579
 35. Finke, L.H., Terpe, H-J., Zoerb, C., Haensch, W., Schlag, P.M. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* (1995), **345**, 583
 36. Foekens, J.A., Dall, P., Klijn, J.G.M., Skroch-Angel, P., Claassen, C.J., Look, M.P., Ponta, H., van Putten, W.L., Herrlich, P., Henzen-Logmans, S.C. Prognostic value of CD44 variant expression on primary breast cancer. *Int J Cancer* (1999), **84**, 209-215
 37. Foneca, I., Pereira, T., Rosa-Santos, J., Soares, J. Expression of CD44 isoforms in squamous cell carcinoma of the border of the tongue: a correlation with histological grade, pattern of stromal invasion, and cell differentiation. *J Surg Oncol.* (2001), **76**, 115-120
 38. Fosano, M., Sabatini, M., Wiczorek, R., Sidhu, G., Goswami, S., Jagirdar, J. CD44 and its v6 spliced variant in lung tumours. *Cancer* (1997), **80**, 34-41
 39. Fox, S.B., Fawcett, J., Jackson, D.G., Collins, I., Gatter, K.C., Harris, A.L., Gearing, A., Simmons, D.L. Normal human tissues, in addition to some tumours, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res.* (1994), **54**, 4539-4546
 40. Friedrichs, K., Franke, F., Lisboa, B.W., Kugler, G., Gille, I., Terpe, H.J., Holzel, F., Maass, H., Gunthert, U. CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer. *Cancer Res.* (1995), **55**, 5424-5433
 41. Fromont Hankard, G., Cezard, J.P., Aigrain, Y., Navarro, J., Peuchmaur, M. CD44 variant expression in inflammatory colonic mucosa is not disease specific

- but associated with increased crypt cell proliferation. *Histopathol.* (1998), **32**, 317-321
42. Fujita, N., Yaegashi, N., Ide, Y., Sato, S., Nakamura, M., Ishiwata, I., Yajima, A. Expression of CD44 in normal human versus tumor endometrial tissues: possible implication of reduced expression of CD44 in lymph-vascular space involvement of cancer cells. *Cancer Res.* (1994), **54**, 3922-3928
 43. Fukuse, T., Hirata, T., Naika, H., Hitomi, S., Wada, H. Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant isoforms in the primary and metastatic sites of non-small cell lung carcinoma with intrapulmonary metastases. *Cancer* (1999), **86**, 1174 –1181
 44. Gansauge, F., Gansauge, S., Zybowski, A., Charnweber, C., Link, K.H., Nusler, A.K., Beger, H.G. Differential expression of CD44 splice variants in human pancreatic adenocarcinoma and in normal pancreas. *Cancer Res.* (1995), **55**, 5499-5503
 45. Gotoda, T., Matsumura, Y., Kondo, H., Saitoh, D., Shimada, Y., Kosuge, T., Kanai, Y., Kakizoe, T. Expression of CD44 variants and its association with survival in pancreatic cancer. *Jpn J Cancer Res.* (1998), **89**, 1033-1040
 46. Gotoda, T., Matsumura, Y., Kondo, H., Ono, H., Kanamoto, A., Watanabe, H., Tachimori, Y., Nakanishi, Y., Kakizoe, T. Expression of CD44 variants and prognostic in oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut.* (2000), **46**, 14-19
 47. Grenman, R., Pekkola-Heino, K., Joensuu, H., Aitasalo, K., Klemi, P., Lakkala, T. UT-MUC-1, a new mucoepidermoid carcinoma cell line and its radiation sensitivity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* (1992), **118**, 542-547
 48. Gross, N., Beck, D., Beretta, C., Jackson, D., Perruisseau, G. CD44 expression and modulation on human neuroblastoma tumours and cell lines. *Eur J Cancer* (1995), **31A**, 471-475
 49. Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Rober, S., Zoller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., Herrlich, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* (1991), **65**, 13-24
 50. Guriec, N., Gairard, B., Marcellin, L., Wilk, A., Calderoli, H., Renaud, R., Bergerat, J.P., Oberling, F. CD44 isoforms with exon v6 and metastasis of primary NoMo breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* (1997), **44**, 261-268.
 51. Hamada, J., Sawamura, Y., van Meir, E.G. CD44 expression and growth factors. *Front Biosci.* (1998), **1**, 657-664
 52. Hefler, L., Tempfer, C., Haeusler, G., Kucera, E., Mayerhofer, K., Zeillinger, R., Reinthaller, A., Kainz, C. Cytosol concentrations of CD44 isoforms in breast cancer tissues. *Int. J. Cancer* (1998), **79**, 541-545.
 53. Heider, K-H., Kuthan, H., Stehle, G., Munzert, G. CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* (2004), **53**, 579-567
 54. Heider, K-H., Mulder, J.W., Ostermann, E., Susani, S., Patzelt, E., Pals, S.T., Adolf, G.R. Splice variants of the cell surface glycoprotein CD44 associated with metastatic cells are expressed in normal tissues of humans and Cynomolgus monkeys. *Eur J Cancer* (1995), **31A**, 2385-2391
 55. Heider, K-H., Sproll, M., Susani, S., Patzelt, E., Beaumier, P., Ostermann, E., Ahorn, H., Adolf, G.R. Characterization of a high-affinity monoclonal antibody specific for CD44v6 as a candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother.* (1996), **43**, 245-253

56. Herold-Mende, C., Seiter, S., Born, A.I., Patzelt, E., Schupp, M., Zoeller, J., Bosch, F.X., Zoller, M. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Pathol.* (1996), **179**, 66-73
57. Herrlich, P., Morrison, H., Sleeman, J., Orian-Rousseau, V., Konig, H., Weg-Remers, S., Ponta, H. CD44 acts both as a growth and invasiveness-promoting molecule and as a tumour-suppressing co-factor. *Ann N Y Acad Sci.* (2000), **910**, 106-120
58. Hessel, F., Krause, M., Helm A., Petersen, C., Grenman, R.,Thames H.D., Baumann, M. Submitted to *International Journal of Radiation Biology*, 05.05.2004.
59. Hessel, F., Krause, M., Petersen, C., Horcsoki, M., Klinger, T., Zips, D., Thames, H.D., Baumann, M. Repopulation of moderately well- differentiated and keratinizing GL human squamous cell carcinomas growing in nude mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2004), **58**, 510-518
60. Hirata, T., Fukuse, T., Naiki, H., Hitomi, S., Wada, H. Expression of CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor. *Cancer Res.* (1998), **58**, 1108-1110
61. Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M., Tolg, C., Ponta, H., Herrlich, P., Gunthert, U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumour cell lines. *Cancer Res.* (1991), **51**, 5292- 5297
62. Hong, R.L., Pu, Y.S, Hsieh, T.S., Chu, J.S., Lee, W.J. Expression of E-cadherin and v6-containing isoforms of CD44 and their prognostic values in human transitional cell carcinoma. *J Urol.* (1995), **153**, 2025-2028
63. Huang, P., Taghian, A., Hsu, D.W., Perez, L.A., Allam, A., Duffy, M., DaCosta, A., Suit, H.D. Spontaneous metastasis, proliferation characteristics and radiation sensitivity of fractionated irradiation recurrent and unirradiated human xenografts. *Radiat Oncol.* (1996), **41**, 73-81
64. Hurwitz i wsp. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer *N England J Med.* (2004), **350**, 2235-
65. Inagaki, H., Banno, S., Wakita, A., Ueda, R., Eimoto, T. Prognostic significance of CD44v6 in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* (1999), **12**, 546-552
66. Ishida, T. Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma. *Surg Today* (2000), **30**, 28-32
67. Jackson, D.G, Bell, J.I., Dickinson, R., Tans, J., Shields, J., Whittle, N. Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon. *J Cell Biol.* (1995), **128**, 673- 685
68. Jansen, R.H.L., Joosten-Achjanie, S.R., Arends, J.W., Volovics, A., Hupperets, P.S., Schouten, H.C., Hillen, H.F. CD44v6 is not a prognostic factor in primary breast cancer. *Ann Oncol.* (1998), **9**, 109-111
69. Kainz, C., Kohlberger, P., Tempfer, C., Sliutz, G., Gitsch, G., Reinthaller, A., Breitenecker, G. Prognostic value of CD44 splice variants in human stage III cervical cancer. *Eur J Cancer* (1995), **31A**, 1706-1709
70. Kainz, C., Kohlberger, P., Sliutz, G., Tempfer, C., Heinzl, H., Reinthaller, A., Breitenecker, G., Koelbl, H. Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage IB and IIB. *Gynecol Oncol.* (1995), **57**, 383-387
71. Kainz, C., Tempfer, C., Kohlberger, P., Janisch, S., Koelbl, H., Gitsch, G., Breitenecker, G. Immunohistochemical detection of adhesion molecule CD44 splice variants in lymph node metastasis of cervical cancer. *Int J Cancer* (1996), **69**, 170-173

72. Kanke, M., Fujii, M., Kameyama, K., Kanzaki, J., Tokumaru, Y., Imanishi, Y., Tomita, T., Matsumura, Y. Clinicopathological significance of expression of CD44 variants in head and neck squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* (2000), **91**, 410-415
73. Kaufmann, M., Heider, K.H., Sinn, H.P., von Minckwitz, G., Ponta, H., Herrlich, P. CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet* (1995), **345**, 615-619.
74. Khalodoyanidi, S., Achtnich, M., Hehlmann, R., Zoller, M. Expression of CD44 variant isoforms in peripheral blood leucocytes in malignant lymphoma and leukaemia: inverse correlation between expression and tumour progression. *Leukemia Res.* (1996), **20**, 839-851
75. Koopman, G., Heider, K.H., Adolf, G.R., van der Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S.T. Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J Exp Med.* (1993), **177**, 897-904
76. Koretz, K., Moeller, P., Lehnert, T., Hinz, U., Otto, H.F., Herfarth, C. Effect of CD44v6 on survival in colorectal carcinoma. *Lancet* (1995), **345**, 327-328
77. Kozłowska, K., Ciechorek, M., Zarzečna, M., Wojcik, S. Expression of CD44 on two lines of transplantable melanoma cells-relationship with cytokine secretion and tumour progression. *Folia Histochem Cytobiol.* (2004), **42**, 29-34
78. Krause, M., Hessel, F., Wohlfarth, J., Zips, D., Hoinkis, C., Foest, H., Petersen, C., Short, S.C., Joiner, M.C., Baumann, M. Ultrafractionation in A7 human malignant glioma in nude mice. *Int J Radiat Biol.* (2003), **79**, 1-7
79. Krzakowski, M. red. Onkologia kliniczna tom II, Wyd. Med. Borgis, Warszawa 2006
80. Kunishi, M., Kayada, Y., Tsumura, M., Yoshiga, K., Takada, K. Expression of CD44 variant 6 and its metastatic potential in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Gan To Kagaku Ryoho.* (1996), **23**, 1045-1048
81. Kunishi, M., Kayada, Y., Yoshiga, K. Down-regulated expression of CD44 variant 6 in oral squamous cell carcinomas and its relationship to regional lymph node metastasis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* (1997), **26**, 280-283
82. Kuo, M.Y.P., Cheng, S.J., Chen, H.M., Kok, S.H., Hahn, L.J., Chiang, C.P. Expression of CD44s, CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in betel-quid-chewing-associated oral premalignant cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med.* (1998), **27**, 428-433
83. Lansford, C.D., Grenman, R., Bier, H., Somers, K.D., Kim, S.-Y., Whiteside, T.L., Clayman, G.L., Welkoborsky, H.-J., Carey, T.E. Head and neck cancers. In human cell culture. Cancer cell lines part 2. *Kluwer Academic Press, Dordrecht (Holland)* (1999), **2**, 185-255
84. Laurent, T.C., Laurent, U.B., Fraser, J.R. The structure and function of hyaluronan: an overview. *Immunol Cell Biol.* (1996), **74**, A1-A7
85. Legras, S., Gunthert, U., Stauder, R., Curt, F., Oliferenko, S., Kluin-Nelemans, H.C., Marie, J.P., Proctor, S., Jasmin, C., Smadja-Joffe, F. A strong expression of CD44-v6 corelates with shorter survival of patients with acute myeloid leukaemia. *Blood* (1998), **91**, 3401
86. Lesley, J., Hyman, R., Kincade, P.W. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol.* (1993), **54**, 271-335
87. Lesley, J., Hascall, V.C., Tammi, M., Hyman, R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem.* (2000), **275**, 26967- 26975

88. Liang, X., Smoller, B.r., Golitz, L.E. Expression of CD44 and CD44v6 in primary cutaneous CD30 positive T-cell lymphoproliferative disorders. *J Cutan Pathol.* (2002), **29**, 459-464
89. Liotta, L.A., Steeg, P.S., Stetler-Stevenson, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* (1991), **64**, 327-336
90. Manten-Horst, E., Danen. E.H., Smit, L., Snoek, M., Le Poole, I.C., van Muijen, G.N., Pals, S.T., Ruiter, D.J. Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumour progression and metastatic potential. *Int J Cancer* (1995), **64**, 182-188
91. Mizera-Nyczak, E., Dyszkiewicz, W., Heider, K.H. Isoform expression of CD44 adhesion molecules, Bcl-2, p53 and Ki-67 proteins in lung cancer. *Tumour Biol.* (2001), **22**, 45-53
92. Miyoshi, T., Kondo, K., Hino, N., Uyama, T., Monden, Y. The expression of the CD44 variant exon 6 is associated with lymph node metastases in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* (1997), **3**, 1289-1297
93. Morris, S.F., O'Hanlon, D.M., Laughlin, R., McHale, T., Connolly, G.W., Given, H.F. The prognostic significance of CD44s and CD44v6 expression in stage two breast carcinoma: an immunohistochemical study. *EJSC* (2001), **27**, 527-531
94. Morrison, H., Sherman, L.S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C.A., Gutman, D.H., Ponta, H., Herrlich, P. The NF2 tumour suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev.* (2001), **15**, 968-980
95. Mueller, J.D., Schneiders, A., Heider, K.H., Meier, S., Hommel, G., Gabbert, H.E. Expression and prognostic value of the CD44 splicing variants v5 and v6 in gastric cancer. *J Pathol.* (1997), **183**, 222-227
96. Mueller, J.D., Heider, K.H., Oberhuber, G., Mueller, E., Bethke, B., Stolte, M., Hofler, H. Comparison of CD44 expression in early colorectal carcinomas of the de novo and ex adenoma types. *Virchows Arch.* (1998), **433**, 407-414
97. Nanashima, A., Yamaguchi, H., Sawai, T., Yasutake, T., Tsuji, T., Jibiki, M., Yamaguchi, E., Nakagoe, T., Ayabe, H. Expression of adhesion molecules in hepatic metastases of colorectal carcinomas: relationship to primary tumours and prognosis after hepatic resection. *J Gastroenterol Hepatol.* (1999), **14**, 1004-1009
98. Naot, D., Sinov, R.V., Ish-Sahlom, D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res.* (1997), **71**, 241-319
99. Neame, S.J., Isacke, C.M. Phosphorylation of CD44 in vivo requires both Ser323 and Ser325, but does not regulate membrane localisation or cytoskeletal interaction in epithelial cells. *EMBO J* (1992), **11**, 4733-4738
100. Neu, S., Geiselhadr, A., Sproll, M., Hahn, D., Kuci, S., Niethemmer, D., Handgretinger, R. Expression of CD44 isorofms by highly enriched CD34-positive cells in cord blood, bone marrow, and leukaphereses. *Bone Marrow Transplant.* (1997), **20**, 593-598
101. Nguen, V.N., Mirejovska, T., Melinova, L., Mandys, V. CD44 and its v6 spliced variant in lung carcinomas: relationship to NCAM, CEA, EMA and UP1 and prognostic significance. *Neoplasma* (2000), **47**, 400-408
102. Noordzij, M.A., Steenbrugge, G.J., Verkaik, N.S., Schroder, F.H., Van der Kwast, T.H. Decreased expression of CD44 in metastatic prostate cancer. *Int J Cancer* (1999), **84**, 478-483

103. Ohene-Abuakwa, Y., Pignatelli, M. Adhesion molecules in cancer biology. *Adv Exp Med Biol.* (2000), **465**, 115-126
104. Payne, G. Progress in immunoconjugate cancer therapeutics. *Cancer Cell* (2003), **3**, 207-212
105. Peng, J.J., Cai, S.J., Cai, G.X., Lian, P., Guan, Z.O., Wang, M.H., Xu, Y. Predicting prognosis of rectal cancer patients with total mesorectal excision using molecular markers. *World J Gastroenterol.* (2007), **13**, 3009-3015
106. Peng, J.J., Lu, J.J., Zhu, J., Xu, Y., Lu, H., Lian, P., Cai, G., Cai, S. Prediction of treatment outcome by CD44v6 after total mesorectal excision in locally advanced rectal cancer. *Cancer J.* (2008), **14**, 54-61
107. Petersen, C., Zips, D., Krause, M., Schone, K., Eicheler, W., Hoinkis, C., Thames, D., Baumann, M. Repopulation of FaDu human squamous cell carcinoma during fractionated radiotherapy correlates with reoxygenation. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys.* (2001), **51**, 483-493
108. Ponta, H., Scherman, L., Herrlich P.A. CD44: from adhesion molecules signalling regulators. *Nature Rev Mol Cel Biol.* (2003), **4**, 33-45
109. Ponta, H., Wainwright, D., Herrlich, P. The CD44 protein family. *Int J Biochem Cell Biol.* (1998), **30**, 299-305
110. Putz E. et al. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res.* (1999), **59**, 241-248.
111. Ranuncolo, S.M., Ladedá, V., Specterman, S., Varela, M., Lastiri, J., Morandi, A., Matos, E., Bal be Kier-Joffe, E., Puricelli, L., Pallotta, M.G. CD44 expression in human gliomas. *J Surg Oncol.* (2002), **79**, 30-36
112. Rautava, J., Pirinen, R., Hirvikoski, P., Bohm, J., Kellokoski, J., Rautava, J., Pirinen, R., Hirvikoski, P., Bohm, J., Kellokoski, J., Moisio, K., Moisio, K., Viren, M., Johansson, R., Hollmen, S., Kosma, V.M. Reduced expression of CD44v3 variant isoform is associated with unfavourable outcome in non-small cell lung carcinoma. *Hum Pathol.* (2000), **31**, 1088-1095
113. Rautava, J., Soukka, T., Inki, P., Leimola-Viranan, R., Saloniemi, I., Happonen, R-P., Heikinheimo, K. CD44v6 in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Oral Oncol.* (2003), **39**, 373-379
114. Ristamaki, R., Joensuu, H., Soderstrom, K.O., Jalkanen, S. CD44v6 expression in non-Hodgkin's lymphoma: an association with low histological grade and poor prognosis. *J Pathol.* (1995), **176**, 259-267
115. Rudy, W., Hofmann, M., Schwartz-Albiez, R., Zoller, M., Heider, K.H., Ponta, H., Herrlich, P. the two major CD44 proteins expressed on a metastatic tumour cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res.* (1993), **53**, 1262-1268
116. Salmi, K., Gron-Virta, K., Sointu, P., Grenman, R., Kalimo, H., Jalkanen, S. Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in mam: downregulation during malignant transformation of tumours of squamocellular origin. *J Cell Biol.* (1993), **122**, 431
117. Satoh, K., Shinosegawa, T., Koizumi, M., Toyota, T. Expression of CD44 in ductal cell carcinomas and in intraductal neoplasm of the pancreas. *Anticancer Res.* (1997), **17**, 215-219
118. Schumacher, U., Horny, H.P., Horst, H.A., Patzelt, E., Herrlich, P., Kaiserling, E. A CD44 variant exon 6 epitope as a prognostic indicator in breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* (1996), **22**, 259-261

119. Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., Bell, J.I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad. Sci USA* (1992), **89**, 12160-12164
120. Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G. The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *J Biol Chem.* (1993), **268**, 12235-12238
121. Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S., Zoller, M. Prevention of tumour metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med.* (1993), **177**, 443-455
122. Seiter, S., Tilgen, W., Herrmann, K., Schadendorf, D., Patzelt, E., Moeller, P., Zoller, M. Expression of CD44 splice variants in human skin and epidermal tumours. *Virchows Arch.* (1996), **428**, 141-149
123. Sherman, L., Skroch-Angel, P., Moll, J., Schadendorf, D., Patzelt, E., Moeller, P., Zoller, M. Schwann cell tumors express characteristic patterns of CD44 splice variants. *J Neurooncol.* (1995), **26**, 171-184
124. Short, S.C., Mitchell, S.A., Boulton, P., Woodcock, M., Joiner, M.C. The response of human glioma cell lines to low-dose radiation exposure. *Int J Radiat Biol.* (1999), **75**, 1341-1348
125. Simon, J.C., Heider, K.H., Dietrich, A., Wutting, C., Schoepf, E., Adolf, G.R., Ponta, H., Herrlich, P. Expression of CD44 isoforms in human skin cancer. *Eur J Cancer* (1996), **32A**, 1394-1400
126. Sinn, H.P., Heider K.H., Skroch-Angel, P., von Minkwitz, G., Kaufmann, M., Herrlich, P., Ponta, H. Human mammary carcinomas express homologues of rat metastasis-associated variants of CD44. *Brest Cancer Res Treat.* (1997), **36**, 307-313
127. Soukka, T., Salmi, M., Joesuu, h., Hakkinen, L., Sointu, P., Koulu, L., Kalimo, K., Klemi, P., Grenman, R., Jalkinen, S. Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells. *Cancer Res.* (1997), **57**, 2281-2289
128. Spafford, M.F., Koeppe, J., Pan, Z., Archer, P.G., Meyers, A.D., Franklin, W.A. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* (1996), **122**, 627-632.
129. Speiser, P., Kridelka, F., Tampfer, C., Edwards, L., Leodolter, S., Kainz, C., Hacker, N.F. CD44v6 expression is an independent prognostic factor in non-negative FIGO stage cervical carcinoma. *Int J Gynecol. Cancer* (1999), **9**, 160-165
130. Steel, G.G. Basic Clinical Radiobiology. 3th edition. 2002
131. Stroomer, J.W., Roos, J.C., Sproll, M., Quak, J.J., Heider, K.H., Wilhelm, B.J., Castelijns, J.A., Meyer, R., Kawakkelstein, M.O., Snow, G.B., Adolf, G.R. van Dongen, G.A. Safety and biodistribution of 99m Technetium- labelled anti-CD44v6 monoclonal antibody BIWA 1 in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res.* (2000), **6**, 3046-3055
132. Suwinski, R., Wzietek, I., Tarnowski, R., Namysl-Kaletka, A., Kryj, M., Chmielarz, A., Wydmanski, J. Moderately low alpha/beta ratio for rectal cancer may best explain the outcome of three fractionation schedules of preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2007), **69**, 793-799

133. Swedish Rectal Cancer Trial: Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med.* (1997), **336**, 980
134. Taghian, A., DuBois, W., Budach, W., Baumann, M., Freeman, J., Suit, H. In vivo radiation sensitivity of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (1995), **32**, 99-104
135. Tempfer, C., Loesch, A., Heinzl, H., Haeusler, G., Hanzal, E., Koelbl, H., Breitenecker, G., Kainz, C. Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 isoforms CD44v5, CD44v6 and CD44v7- 8 in human breast cancer. *Eur J Cancer* (1996), **32**, 2023-2025
136. Tempfer, C., Sliutz, G., Haeusler, G., Speiser, P., Reinthaller, A., Breitenecker, G., Vavra, N., Kainz, C. CD44v3 and v6 variant isoform expression correlates with poor prognosis in early-stage vulvar cancer. *Br J Cancer* (1998), **78**, 1091-1094
137. Tijink, B.M, Buter, J., de Bree, R., Giaccone, G., Lang, M.S., Staab, A., Leemans, C.R. A phase I dose escalation study with anti – CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus. *Clin Cancer Res.* (2006), **12**, 6064 - 6072
138. Tokue, Y., Matsumura, Y., Katsumata, N., Watanabe, T., Tarin, D., Kakizoe, T. CD44 variant isoform expression and breast cancer prognosis. *Jpn J Cancer Res.* (1998), **89**, 283-290
139. Tran, T.A., Kallakury, B.V.S., Sheehan, C.E., Ross, J.S. Expression of CD44 standard form and variant isoforms in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol.* (1997), **28**, 809-814
140. van der Voort, R., Taher, T.E., Wielenga, V.J., Spaargaren, M., Prevo, R., Smit, L., David, G., Hatrmann, G., Gherardi, E., Pals, S.T. Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *J Biol Chem.* (1999), **274**, 6499-6506
141. van Hal, N.L., van Dongen, G.A., Rood-Knippels, E.M., van der Valk, P., Snow, G.B., Brakenhoff, R.H. Monoclonal antibody U36, a suitable candidate for clinical immunotherapy of squamous cell carcinoma, recognises a CD44 isoform. *Int J Cancer* (1996), **68**, 520-527
142. van Hal, N.L., van Dongen, G.A., Stigter-van Walsum, M., Snow, G.B., Brakenhoff, R.H. Characterisation of CD44v6 isoforms in head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* (1999), **82**, 837-845
143. van Weering, D.H., Baas, P.D., Bos, J.L. A PCR-based method for the analysis of human CD44 splice products. *PCR Methods Appl.* (1993), **8**, 100-106
144. Verel, I., Heider, K.H., Siegmund, M., Ostermann, E., Patzelt, E., Sproll, M., Snow, G.B., Adolf, G.R., van Dongen, G.A. Tumour targeting properties of monoclonal antibodies with different affinity for target antigen CD44v6 in nude mice bearing head and neck cancer xenografts. *Int J Cancer* (2002), **99**, 396-402
145. Wagner, S. N., Wagner, C., Reinhold, U., Funk, R., Zoller, M., Goos, M. Predomonant expression of CD44 splice variant v10 in malignant and reactive human lymphocytes. *J Invest Dermatol.* (1998), **111**, 464-471
146. Washington K, Gottfried MR, Telen MJ. Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinomas. *Hum Pathol.* (1994), **25**, 1043–1049
147. Wang, X., Chen, W., li, H., Wang, Q. Heat shock protein 72 associated with CD44v6 in human colonic adenocarcinomas. *Cell Biol Int.* (2008), **32**, 860-864

148. Wielenga, V.J., Heider, K.H., Offerhaus, G.J.A., et al. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumour progression. *Cancer Res.* (1993), **53**, 4754-4756
149. Wielenga, V.J., van der Voort, R., Mulder, J.W., Kruijt, P.M., Weidama, W.F., Oosting, J., Seldenrij, C.A., van Krimpen, C., Offerhaus, G.J.A., Pals, S.T. CD44 splice variants as prognostic markers in colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol.* (1998), **33**, 82-87
150. Xin, Y., Grace, A., Gallagher, MM., Curran, B.T., Leader, M.B., Kay, E.W. CD44v6 in gastric carcinoma: a marker of tumour progression. *Appl Immunohistochem Mol morphol.* (2001), **9**, 138-142
151. Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., Kudo, T., Hirohashi, S., Ochiai, A., Tohnai, I., Ueda, M., Kimata, K. CD44 variant exon 6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Oncol Res.* (2003), **10**, 1919-1924
152. Yu Q. et al. Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function. *J. Exp Med.* (1997), **186**, 1985-1996
153. Yu, Q., Toole, B.P. Common pattern of CD44 isoforms is expressed in morphogenetically active epithelia. *Dev Dyn.* (1997), **208**, 1-10
154. Zhang, S., Chang, M.C., Zylka, D, Turley, S., Harrison, R., Turley, E.A. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *JBC* (1998), **273**, 11342-11348
155. Zoller, M. CD44: physiological expression of distinct isoforms as evidence for organ-specific metastasis formation. *J Mol Med.* (1995), **73**, 425-438
156. Hussain, G. A., Dalia A. E. Assessment of oral cytological changes associated with exposure to chemotherapy and/or radiotherapy. *Cyt J* (2009), **6**, 8