

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Magdalena Dutsch-Wicherek

Ocena ekspresji białka RCAS1 u chorych na raka
płaskonabłonkowego gardła i krtani

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Jacek Składzień

Praca została wykonana w Katedrze i Klinice Otolaryngologii CMUJ.
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Jacek Składzień

SPIS TREŚCI

Rozdział 1. Wstęp	3- 31
• Cel pracy	32
Rozdział 2. Materiały i metody	33-42
Rozdział 3. Wyniki	43-56
Rozdział 4. Dyskusja	57-64
Rozdział 5. Wnioski	65
Rozdział 6. Streszczenia	66-73
Rozdział 7. Indeks skrótów	74
Rozdział 8. Piśmiennictwo	75-81

1.0. Wstęp

1.1. Epidemiologia i morfologia raka gardła i krtani

Proliferacja nowotworowa istnieje prawdopodobnie od czasu pojawienia się na ziemi organizmów wielokomórkowych. Pierwsze opisy nowotworów można znaleźć już w staroegipskich papyrusach, a także na glinianych tablicach zapisanych pismem klinowym pochodzących z Babilonu. *Hipokrates* podzielił guzy na łagodne i złośliwe, wprowadzenie nazwy *karkinos* (oznaczającą kraba albo raka) dla tych ostatnich przypisuje się Pawłowi z Eginy. *Virchow* z kolei wyodrębnił z grupy guzów (tumor) nowotwory (neoplasma) [1].

Rak głowy i szyi jest szóstym co do częstości nowotworem złośliwym na świecie, stanowi rocznie około 600 000 nowo wykrytych zachorowań u mężczyzn, 270 000 nowych zachorowań wśród kobiet [2]. W niektórych krajach rozwijających się jest to najczęściej występujący nowotwór rozpoznawany wśród mężczyzn, a wśród kobiet trzeci co do częstości. Okres 5-letniego przeżycia z tą chorobą nie zmienił się od lat 1980-tych mimo stosowania efektywnych metod chirurgicznych i rekonstrukcyjnych oraz nowoczesnych technik radioterapii i chemioterapii, i wynosi około 52% [3,4]. Wśród czynników ryzyka wymienia się palenie tytoniu, konsumpcję mocnego alkoholu, żucie betelu. Wskazuje się również na znaczenie infekcji wirusem brodawczakowatości HPV (human papillomavirus), ryzyko związane jest z typami 16, 18, 31,33 i 45 [5,39]. Częstym problemem związanym z pacjentem z rakiem głowy i szyi jest nawrót choroby albo w miejscu resekcji (marginesy chirurgiczne mogą być histopatologicznie zdrowe, jednak mogą posiadać potencjał zaburzeń genetycznych), jak też powstanie nowego guza nowotworowego w innej lokalizacji w obrębie górnych dróg oddechowych, lub powstanie drugiego guza pierwotnego. Ryzyko miejscowego nawrotu procesu nowotworowego, mimo że marginesy resekcji chirurgicznej były histopatologicznie wolne od nacieku nowotworowego jest oceniane na około 10-30% [6,7]. Uważa się, że za nawrót choroby może być odpowiedzialne pozostawienie pojedynczych tzw. komórek ukrytych (ang. occult cells) które mogą utworzyć populację

prawdziwych komórek raka (MRC-minimal residual cancer), są one niedostępne dla standardowej diagnostyki histopatologicznej, a mogą być zlokalizowane w obrębie marginesów operacyjnych, w pozostawionych węzłach chłonnych, krwi żyłnej, naczyniach żylnych, a także w szpiku kostnym [8,9]. Komórki te mogą stanowić początek populacji komórek nowotworowych po leczeniu operacyjnym, lub mogą zostać zlikwidowane przez układ immunologiczny, nie stanowiąc rzeczywistych komórek MRC [10].

Proces nowotworowy jest zjawiskiem złożonym. Ostatnie wyniki badań w dziedzinie biologii molekularnej pozwoliły na wyodrębnienie z całej ogromnej nauki o nowotworach mechanizmów odpowiedzialnych za ucieczkę guza nowotworowego spod nadzoru immunologicznego ustroju, których kluczem jest odpowiednia regulacja zjawiska apoptozy poprzez ekspresję na powierzchni komórek nowotworowych rozmaitych czynników.

1.1. Epidemiologia i morfologia raka gardła i krtani

Narządowy nowotwór złośliwy jest schorzeniem wieku starszego. Od wielu lat obserwuje się stopniowy wzrost zachorowalności na nowotwory, jest to niewątpliwie związane ze starzeniem się populacji. Liczba zachorowań na nowotwory jamy ustnej i gardła od lat 1970-tych wzrosła ze 105 000 do 143 000 w 1985 roku u kobiet, natomiast u mężczyzn obserwowano wzrost z 232 900 do 270 000 w 1985 roku [17].

Częstość nowotworów głowy i szyi szacuje się na około 10% wszystkich nowotworów złośliwych. Histologicznie najczęstszym nowotworem złośliwym tego obszaru jest rak płaskonabłonkowy stanowiący około 90%. W chwili rozpoznania u około 40% pacjentów stwierdza się przerzuty w obrębie okolicznych węzłów chłonnych, u około 50% chorych nowotwór rozpoznaje się w stadium zaawansowanym. Rokowanie zależy w dużym stopniu od miejscowego stanu zaawansowania, jednak najważniejszym czynnikiem rokowniczym jest stan okolicznych węzłów chłonnych. U 20% pacjentów z guzami tej okolicy dochodzi do rozwoju równoczesnego (synchronicznego) lub następowego (metachronicznego) innych nowotworów złośliwych [18].

Stopień zaawansowania guza nowotworowego ocenia się według systemu klasyfikacji TNM, jego piąta modyfikacja została ogłoszona w 1997 roku. Jest on używany zarówno przez Międzynarodową Unię do Walki z Rakiem (UICC), jak i przez Amerykański Komitet Klasyfikacji Nowotworów (AICC) i oba systemy są obecnie identyczne [17].

1.1.1 Rak krtani

Rak krtani stanowi około 25% nowotworów złośliwych głowy i szyi. Występuje najczęściej między 45 a 75 rokiem życia. Jeszcze w latach 1950-tych wykrywano go 15 razy częściej u mężczyzn aniżeli u kobiet, obecnie szacuje się, że występuje on u mężczyzn około 4,5 raza częściej niż u kobiet [19]. Najczęstszą lokalizacją guza jest głośnia (około 80%), drugą co do częstości lokalizacją jest nadgłośnia (około 15%), najrzadziej guz lokalizuje się podgłośniowo (około 5%). Rokowanie zależy od wielu czynników, między innymi stanu zaawansowania miejscowego oraz obecności przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych. Ocenia się, że częstość przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych wykazuje tendencję rosnącą w następujących lokalizacjach: głośnia-0%, okolica podgłośniowa-20%, okolica nadgłośniowa-33%, lokalizacja typu „transglottic”-52% [19,20]. Odsetek 5-letnich przeżyć u pacjentów z guzem o lokalizacji głośniowej o zaawansowaniu T1 wynosi 85%, T2-50 do 80%. Unieruchomienie fałdu głosowego jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Leczenie jest chirurgiczne lub radioterapią. W raku nadgłośni, który najczęściej lokalizuje się w obrębie nagłośni, a rzadziej zajmuje fałdy przedsionkowe i fałdy nalewkowo-nagłośniowe, rokowanie jest gorsze niż w raku głośni. Najważniejszym czynnikiem rokowniczym jest tu obecność przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych. Leczenie jest chirurgiczne lub chirurgiczne skojarzone z radioterapią. Odsetek 5-letnich przeżyć wynosi około 80% w stadium zaawansowania T1 i T2, natomiast w T3 i T4 wynosi 50-60%. Lokalizacja podgłośniowa jest najrzadsza, stosuje się leczenie chirurgiczne lub chirurgiczne skojarzone z radioterapią, odsetek 5-letnich przeżyć wynosi poniżej 40%. Lokalizacja przezgłośniowa (tzw. typu transglottic) oznacza guz wywodzący się z centrum przedsionka, skąd rozprzestrzenia się on do okolicy przezgłośniowej. Charakteryzuje się zajęciem głośni oraz fałdów przedsionkowych i kieszonki.

Szerzenie podśluzówkowe jest charakterystyczne dla inwazji miejscowej. Wykazano, że guzy te mają zdolność do naciekania zarówno okolicy nadgłośniowej jak i głośni. Częstość utajonych jak i jawnych przerzutów w węzłach chłonnych jest w tej lokalizacji wysoka. Odsetek 5-letnich przeżyć wynosi poniżej 50% [21].

1.1.2. Rak gardła

Okolo 40% nowotworów głowy i szyi rozwija się w obrębie jamy ustnej, 25% w obrębie krtani, 15% w obrębie gardła, 7% w obrębie ślinianek, a 13% stanowią pozostałe nowotwory tej okolicy [18]. Umiejscowienie nowotworu w obrębie gardła dolnego obejmuje trzy lokalizacje: najczęstszą jest zachyłek gruszkowaty, następnie tylna ściana gardła i najrzadziej okolica zapierściennej (ta ostatnia występuje najczęściej u kobiet). Lokalizacja ta charakteryzuje się wysokim odsetkiem przerzutów, często obustronnych (u 50% pacjentów badanych po raz pierwszy stwierdza się guz T3N1-2). Uważa się, że dla raka okolicy zapierściennej stanem przedrakowym jest choroba Plummera-Vinsona. Leczenie chirurgiczne jest możliwe jedynie u ograniczonej liczby chorych. We wczesnych stadiach zaawansowania leczenie chirurgiczne skojarzone z radioterapią daje okolo 50% 5-letnich przeżyć. W rakach T3 z przerzutami do węzłów chłonnych odsetek ten jest znacznie niższy (15-45%). Rak zlokalizowany w obrębie językowej powierzchni nagłośni z naciekiem dołka językowo-nagłośniowego jest uważany za biologicznie bardziej agresywny, a punktem wyjścia jest często górna część gardła dolnego. Guzy obejmujące nagłośnie, zajmujące również fałd nalewkowo-nagłośniowy i zachyłek gruszkowaty częściej dają przerzuty do węzłów chłonnych. Również guzy zachyłka gruszkowatego, nasady języka oraz tylnej ściany gardła znacznie częściej dają przerzuty do szyjnych węzłów chłonnych. Ocenia się, że przerzutuje okolo 55% guzów nasady języka, 90% guzów zachyłka gruszkowatego [19].

1.2. Biologiczna rola RCAS1

RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells) został po raz pierwszy opisany przez Sonodę w 1996 roku w linii komórkowej SiSo gruczolakoraka szyjki macicy, w którym zidentyfikowano białko za pomocą przeciwciała monoklonalnego (MoAb22-1-1). Antygeny związane z guzem (tumor-associated antigens), do których zaliczono RCAS1 są strukturami, które pozwalają układowi immunologicznemu na rozpoznanie i wyeliminowanie komórek nowotworowych.

1.2.1. Zahamowanie wzrostu komórek i indukcja apoptozy przez RCAS1

Białko RCAS1 jest rozpoznawane przez przeciwciało monoklonalne mysie (MoAb22-1) skierowane przeciwko linii komórkowej ludzkiego gruczolakoraka macicy (SiSo). W badaniach immunohistochemicznych wykazano, że antygen rozpoznawany przez to przeciwciało występuje na powierzchni komórek raka jajnika oraz raka macicy, a szczególnie silnie ulega ekspresji w obrębie komórek inwazyjnego raka. Białko RCAS1 jest białkiem błonowym II typu składającym się z N-końca błonowego (8-27 aminokwasów) oraz C-końca o strukturze coiled-coil zdolnej do tworzenia oligomerów. Ekspresja genu dla RCAS1 (analiza RNA) ma miejsce w jajnikach, jądrach, prostaty, grasicy, mięśniach, sercu. Immunohistochemicznie nie wykryto białka RCAS1 w prawidłowej tkance jajnika, ani w żadnym z wymienionych narządów. Zarówno transkryptu jak i białka nie wykryto też w jelicie cienkim, grubym, węzłach chłonnych czy limfocytach wyizolowanych z surowicy. Aby określić funkcję tego białka zsyntetyzowano rekombinowane białko (rRCAS1). Białko to po dodaniu do różnych ludzkich i mysich linii komórkowych (K562-human chronic myelogenous leukemia, CCRF-CEM-human T lymphoblast, Ramos-Burkitt lymphoma i innych) było przyłączane do tych linii komórkowych. Dodanie do hodowli przeciwciała MoAb22-1 hamowało przyłączenie RCAS1 do tych linii komórkowych, sugerując obecność specyficznego receptora dla RCAS1 na powierzchni tych komórek. W zjawisku interakcji, przyłączania RCAS1 do

receptora bierze udział region C-końca (ze strukturą coiled-coil), odcięcie tego regionu hamowało przyłączenie RCAS1 do komórek badanych linii komórkowych. **Żadna z linii komórkowych nie wykazywała jednoczesnej ekspresji białka RCAS1 oraz receptora dla tego białka.** Komórki prawidłowe np. szeregu hemopoetycznego czy też limfocyty wykazywały ekspresję receptora dla RCAS1. Komórki linii komórkowej SiSo wykazywały zdolność do wydzielania białka RCAS1 do przestrzeni pozakomórkowej kultury. Była to rozpuszczalna forma białka której dodanie do kultur linii komórkowej K562 silnie hamowało proliferację komórek, wywoływała apoptozę w kulturach komórek posiadających receptor dla RCAS1 (K562, Ramos), natomiast nie wywoływała takiego efektu w komórkach nie posiadających receptora dla RCAS1 (U937-human histiocytic leukemia cell line). Zdolność do hamowania proliferacji komórek i indukowania ich apoptozy znosiło dodanie przeciwciała skierowanego przeciwko RCAS1 (MoAb22-1). RCAS1 indukuje apoptozę komórek przez aktywację szeregu kaspaz. Przyłączenie RCAS1 do komórek posiadających odpowiedni receptor wywołuje zahamowanie proliferacji tych komórek i indukuje ich apoptotyczną śmierć również poprzez aktywację IL-1 β converting enzyme (ICE-like) proteases. Receptor dla RCAS1 obecny na powierzchni limfocytów (PBL-peripheral blood lymphocytes) i jego ekspresja na limfocytach T CD3+ i CD3- oraz komórek CD16+ NK była znacznie podwyższona po aktywacji tych komórek IL-2. Zarówno rekombinowane jak i rozpuszczalne RCAS1 indukowało w tych komórkach fragmentację DNA. Również proliferacja tych komórek była hamowana po dodaniu RCAS1. Natomiast niestymulowane, nieaktywne limfocyty były niewrażliwe na działanie RCAS1, dodanie do nieaktywnych PBL RCAS1 nie wpływało na przeżycie tych komórek. Komórki NK są bardzo ważne w rozpoznaniu komórek nowotworowych i ich eliminacji. Ludzkie NK i limfocyty T nie wykazują ekspresji RCAS1, natomiast aktywowane wykazują wysoką ekspresję receptora dla RCAS1. RCAS1 hamuje ich proliferację i powoduje apoptozę. Zjawisko to wskazuje na udział RCAS1 w indukcji śmierci limfocytów [12].

1.2.2 RCAS1 jako regulator apoptozy komórek szeregu erytroblastycznego

Komórki progenitorowe szeregu erytropoetycznego pobrane z krwi obwodowej wykazywały ekspresję receptora dla RCAS1 (RCAS1-R). Stopień wiązania z RCAS1 zmniejszał się wraz z dojrzewaniem komórek. Dodanie rozpuszczalnej formy RCAS1 do kultur komórek spowodowało apoptozę tych komórek, dodatkowo dodanie przeciwciała skierowanego przeciwko Fas nie spowodowało zatrzymania apoptozy. Świadczy to o tym, że RCAS1 jest czynnikiem wywołującym apoptozę niezależnym od Fas. Zbadanie komórek szpiku kostnego ujawniło, że RCAS1-R był obecny na komórkach niedojrzałych, natomiast był nieobecny na komórkach dojrzałych. Histochemicznie wykazano również obecność ekspresji RCAS1 w obrębie cytoplazmy makrofagów w tkance hemopoetycznej. RCAS1, które jest produkowane przez makrofagi w tkance szpiku kostnego może odgrywać zasadniczą rolę w regulacji dojrzewania tych komórek, poprzez kontrolę ich apoptozy niezależną od Fas. RCAS1 wywołuje apoptozę aktywowanych limfocytów T, które wykazują ekspresję receptora dla RCAS1. Homeostaza tkanki hemopoetycznej jest możliwa poprzez utrzymanie równowagi pomiędzy śmiercią komórek i ich proliferacją. Jest ona z jednej strony regulowana przez szereg czynników wzrostu takich jak erytropoetyna, IL-3, IGF-1 (insuline like growth factor-1), SCF (stem cell factor), które redukują apoptozę, jak też regulują różnicowanie i proliferację komórek. Z drugiej strony równowaga ta jest regulowana przez czynniki o działaniu apoptotycznym. Fas (CD95/APO-1) należy do rodziny TNF, jego stymulacja prowadzi do apoptozy komórek docelowych. Fas i Fas-L ulegają ekspresji na powierzchni komórek szeregu erytropoetycznego, odgrywając rolę w utrzymaniu homeostazy. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) wywołuje apoptozę komórek progenitorowych szeregu erytropoetycznego, poprzez domenę śmierci związaną z Fas (FADD-Fas-associated death domain). TRAIL może być również zaangażowany w regulację apoptozy komórek szeregu hemopoetycznego.

RCAS1 obecny na powierzchni różnych komórek nowotworowych, zwłaszcza o złym rokowaniu, może być zaangażowany w ucieczkę komórek guza spod nadzoru immunologicznego gospodarza działając poprzez receptor obecny na powierzchni

komórek układu immunologicznego (limfocyty T). Ekspresja RCAS1-R jest obecna na linii komórek białaczkowych (K562), z potencjalną zdolnością do różnicowania w kierunku komórek szeregu erytroblastycznego, jak również CCRF-CEM (acute lymphoblastic leukemia cell line). Prawidłowe komórki szeregu erytropoetycznego wykazują ekspresję RCAS1-R, dodanie RCAS1 do hodowli indukowało apoptozę tych komórek. Dla wywołania apoptozy komórek szeregu hemopoetycznego nie wystarczy jak się wydaje działanie jednego z czynników proapoptotycznych, potrzebne jest skojarzone działanie szeregu czynników wzrostu i czynników wywołujących apoptozę, takich jak Fas, RCAS1, TRAIL [22].

Zaproponowano następujące drogi apoptozy:

1. Aktywacja Fas- formowanie DISC (death inducing signaling complex)- aktywuje kaspazę 8- aktywacja kaspazy 3- utrata potencjału błonowego mitochondrium-apoptoza
2. Aktywacja RCAS1- aktywacja kaspazy 8- może indukować apoptozę poprzez FADD INF- γ - aktywacja kaspazy 3 i 8- apoptoza

1.2.3 Analiza genu dla RCAS1 – EBAG 9

Ludzki EBAG9 był początkowo zidentyfikowany jako gen odpowiadający na estrogeny (estrogen responsive gene), ostatnio ujawniono, że jest on identyczny z RCAS1, który jest antygenem związanym z powierzchnią guza nowotworowego i bierze udział w „ucieczce” guza spod nadzoru immunologicznego ustroju gospodarza. Chromosomalną lokalizację genu określono w obrębie 8q23. Jednocześnie jest wiele doniesień, że w złośliwych nowotworach takich jak rak przełyku, czy nerki ma miejsce zwiększona liczba kopii tego regionu. Gen dla RCAS1 (EBAG9) cDNA zawiera region 5' nieprzetłumaczony 242 nukleotydów, region kodujący 639 nukleotydów (koduje 213 aminokwasów) oraz region 3' nieprzetłumaczony 179 nukleotydów. W obrębie regionu 5' znajduje się element pomiędzy sekwencjami 86-36 odpowiadający na aktywację receptora estrogenowego (ERE- estrogen responsive element), a jego transkrypcja może być pobudzona poprzez terapię estrogenową. E_{α} (receptor estrogenowy- α) przyłącza się do ERE, co sugeruje że gen ten należy do genów odpowiadających na

stymulację estrogenami, co może mieć znaczenie zwłaszcza w guzach posiadających receptory estrogenowe [23].

Zbadano mysie EBAG9 i porównano do ludzkiego. Jest to gen konserwatywny, homologia pomiędzy mysim a ludzkim genem wynosi aż 98%. Dla porównania homologia na poziomie aminokwasów pomiędzy białkami błonowymi II typu, np. FasL wynosi 76%, a dla TNF- α jest około 75%, co wskazuje na uniwersalną, ważną biologicznie rolę białka RCAS1, stojącą ponad gatunkiem. Domeny o strukturze „coiled coil” mają budowę identyczną, a funkcja tych domen jest kluczowa, prawdopodobnie są one odpowiedzialne za dimeryzację i przyłączanie odpowiedniego receptora. Obecność mRNA dla EBAG9 wykazano w następujących tkankach: serce, wątroba, jądra. W innych narządach takich, jak mózg, płuca, nerki, mięśnie szkieletowe, ekspresja mRNA EBAG9 była oznaczalna, ale o niskiej intensywności. Na poziomie białka RCAS1 (prążek 32 kD) wykazano w takich narządach jak: mózg, śledziona, płuca, wątroba, nerki, jądra, w tkankach embrionalnych. Bardzo niski poziom białka znaleziono w sercu, macicy, jajniku, podczas gdy jego poziom w mięśniach szkieletowych był prawie nieoznaczalny. Tak więc, RCAS1 jest obecne w różnych tkankach, nie tylko w tkankach zmienionych patologicznie, np. w procesie nowotworowych ale także w tkankach zdrowych, jak też w tkankach embrionalnych. Jego funkcją jest zahamowanie wzrostu i indukcja apoptozy. Uważa się, że białko to kontroluje morfogenezę, czy organogenezę. Natomiast jego ekspresja, jak wykazano jest zależna od estrogenów, po terapii estrogenami poziom białka RCAS1 był trzy razy wyższy niż bez podania estrogenów [24].

Masa białka RCAS1 została określona przez Tsuchiję w 2001 roku na 32 kD, a potem potwierdzona przez Engelsberga w 2003. Engelsberg potwierdził masę białka RCAS1, którą oznaczył na 32kD przy użyciu innego niż dotychczas przeciwciała, poliklonalnego króliczego, uzyskanego dzięki utworzeniu rekombinowanego RCAS1 [24, 25]. Było to możliwe dzięki opisaniu struktury genu EBAG9 dla RCAS1 w 2000 roku przez Ikedę [23].

1.2.4 Ekspresja RCAS1 w raku piersi

Zaburzenia genetyczne identyfikowane w raku piersi zawierają amplifikację fragmentów DNA (niektóre z nich zawierają znane protoonkogeny), czy też utratę fragmentów chromosomów, w specyficznych dla komórek nowotworowych *loci*. Utrata heterozygotyczności powoduje inaktywację genów supresorowych (tumor suppressor genes), została udokumentowana w wielu liniach komórkowych raka piersi, w obrębie chromosomów 1p, 3p, 7p, 11p, 16q, 17q, 18q, oraz 22q. Utratę alleli obserwowano w obrębie krótkiego ramienia chromosomu 8 w pierwotnym raku piersi. Z kolei udokumentowano **zwielokrotnienie kopii regionu 8q24.1** znacznie częściej w inwazyjnym raku piersi, aniżeli w mniej agresywnych typach raka. Połowa guzów wykazywała zwielokrotnienie całego długiego ramienia, podczas gdy inne miały bardziej ograniczony zasięg. W tych guzach *c-myc* mogło być karcynogenem, którego zwielokrotnienie odgrywało zasadniczą rolę w nabyciu agresywnego fenotypu raka piersi [26].

W 2001 roku opisano zwiększoną liczbę kopii genu EBAG9 (genu dla RCAS1) zlokalizowanego w locus 8q23, związaną z wczesnym stadium raka piersi. Amplifikację 8q, zwłaszcza związaną z genem CMYC i otaczającym regionem 8q24.1 opisywano już wcześniej. Wyniki przeprowadzonego badania sugerują, że na ramieniu długim chromosomu 8 znajdują się co najmniej dwa niezależne regiony będące celem w raku piersi. Co więcej wykazany **wzrost liczby kopii genu EBAG9** może odgrywać rolę w powstawaniu i progresji raka piersi, zwłaszcza jego wczesnej postaci [27].

Immunoreaktywność EBAG9 została zidentyfikowana w obrębie całej powierzchni i w cytoplazmie inwazyjnych komórek przewodów gruczołu piersiowego, podczas gdy w prawidłowej tkance zidentyfikowano EBAG9 jedynie w obrębie powierzchni komórek gruczołowych skierowanych do światła gruczołów. **Immunoreaktywność EBAG9 była odwrotnie proporcjonalnie związana z obecnością nacieków komórek jednojądrowych oraz naciekiem przez limfocyty T CD3+**. Wyniki tych badań wskazują na to, że EBAG9 jest produkowane w odpowiedzi na pobudzenie receptora estrogenowego, hamuje ono naciekanie tkanki przez limfocyty T i stanowi dowód na interakcje pomiędzy układem hormonalnym a immunologicznym [28].

Wykryto obecność białka RCAS1 w przewodowym raku sutka w 66% komórek o wysokim stopniu zróżnicowania (G1), w 75% komórek o pośrednim stopniu zróżnicowania (G2) oraz w 89% komórek o niskim stopniu zróżnicowania (G3). Nie wykryto obecności białka RCAS1 w komórkach prawidłowych tego gruczołu. **Ekspresja RCAS1 korelowała więc ze stopniem zróżnicowania komórek nowotworu**, nie korelowała natomiast z ekspresją ER, wysnuto więc wniosek, że synteza białka RCAS1 może być regulowana również przez czynniki inne niż estrogeny. W obrębie tkanki raka przewodowego sutka zidentyfikowano duży stopień nacieczenia przez zarówno limfocyty CD4⁺ jak CD8⁺ o prawidłowej cytotoksyczności, nie powodowały one jednak odrzucenia komórek raka przez organizm gospodarza. Prawdopodobnie komórki raka sutka mogą uniknąć odpowiedzi immunologicznej ustroju poprzez ekspresję RCAS1 na swojej powierzchni, jak również poprzez zdolność do sekrecji wydzielniczej formy tego białka, co zostało potwierdzone *in vitro*. Ten mechanizm byłby dodatkowym do znanych już i opisanych takich jak FasL czy IL10 [29].

1.2.5 Ekspresja RCAS1 w raku narządu rodnego

Ekspresja RCAS1 została po raz pierwszy opisana w raku szyjki macicy, raku endometrium oraz raku jajnika, oznaczenie wykonano za pomocą mysich przeciwciał klasy IgM Mo 22-1-1 otrzymanych z hodowli tkankowej linii komórek gruczolakoraka szyjki macicy SiSo, masa molekularna białka została określona na 78 kD, co było związane jak wyjaśniono później z możliwością tworzenia przez RCAS1 struktur oligomerycznych. Nie wykryto obecności białka w obrębie prawidłowej tkanki szyjki macicy oraz jajnika. Natomiast białko było obecne w gruczolakoraku szyjki macicy (87,5%), gruczolakoraku endometrium (66%) oraz gruczolakoraku jajnika (58,8%). Przeciwciało reagowało również z komórkami raka płaskonabłonkowego szyjki macicy (87,7%). Ekspresja **RCAS1 była związana z progresją nowotworu**, ponieważ nie stwierdzono obecności tego białka w dysplazji komórek szyjki macicy, natomiast było ono obecne w raku mikroinwazyjnym i inwazyjnym. Obecność białka wykryto również w wydzielinie z pochwy u pacjentek z rakiem szyjki macicy, natomiast nie było ono obecne u osób zdrowych [11].

RCAS1 jest białkiem o dużej reprezentacji w rakach inwazyjnych. Jego ekspresja jest związana ze złym rokowaniem w gruczolakoraku szyjki macicy, jest rozszkana szeroko w cytoplazmie oraz błonach komórkowych gruczolakoraka. Ponadto białko zidentyfikowano w obrębie światła przewodów gruczołów nacieczonych nowotworowo, co wskazuje na zdolność wydzielania białka przez te komórki. Białko zostało również zidentyfikowane w obrębie komórek zdrowego endometrium (26%) oraz w przypadku hyperplazji endometrium (32%). Ekspresja białka była niska, podobna we wszystkich próbkach tkankowych oraz niezależna od fazy cyklu miesięczkowego. Ekspresja RCAS1 była w sposób znamieny związana ze stopniem zróżnicowania nowotworu, została zidentyfikowana w 63% komórek nowotworowych o wysokim stopniu zróżnicowania (G1), w 65% o pośrednim stopniu zróżnicowania (G2) i w 90% komórek o niskim stopniu zróżnicowania (G3). **Ekspresja tego białka jest więc związana z transformacją złośliwą oraz niskim zróżnicowaniem nowotworu.** Natomiast nie znaleziono korelacji pomiędzy ekspresją RCAS1 a czynnikami wskazującymi na inwazję nowotworu przestrzeni chłonno-naczyniowej, jak też węzłów chłonnych [30].

W badaniu nad ekspresją RCAS1 pacjentek leczonych operacyjnie z powodu raka endometrium wykazano **znamieny statystycznie związek pomiędzy ekspresją białka a chirurgicznym stadium zaawansowania**. Wykazano również, porównując ekspresję FasL oraz RCAS1 w badanych tkankach, że to właśnie **RCAS1, a nie FasL jest odpowiedzialne za apoptozę limfocytów naciekających guz** i ułatwienie rozprzestrzeniania się nowotworu do tkanek sąsiednich. Ekspresja FasL oraz TNF α była w badanych próbkach tkanek bardzo słaba [13].

1.2.6 Ekspresja RCAS1 w raku płuc

Wykazano obecność ekspresji białka RCAS1 w raku płuc, była ona znamienne statystycznie wyższa w przypadkach o wysokim zaawansowaniu wielkości guza (T) oraz stadium choroby. Ponadto białko było znacznie silniej reprezentowane w **komórkach raka o niskim stopniu zróżnicowania**, w porównaniu do przypadków guza średnio i wysoko zróżnicowanego. Rak płaskonabłonkowy posiadał inny sposób ekspresji białka,

które było reprezentowane tutaj tylko w obrębie błony komórkowej, w porównaniu do gruczolakoraka, w którym ekspresja była rozszkana w cytoplazmie komórek nowotworowych. Co więcej wykazano, że **guzy o wysokiej ekspresji RCAS1 posiadały również znamienne wyższy stopień apoptozy limfocytów naciekających guz (TIL)**. Tak więc, RCAS1 może indukować apoptozę TIL, umożliwiając w ten sposób „ucieczkę” nowotworu spod nadzoru immunologicznego. RCAS1 jest zatem ważnym, niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w raku płuc [14].

W kolejnej analizie RCAS1 było obecne w 47% badanych próbkach raka płaskonabłonkowego płuc. Pacjenci grupy RCAS1 pozytywnej (wysoka ekspresja białka) mieli krótszy czas przeżycia aniżeli pacjenci grupy RCAS1 negatywnej (brak ekspresji białka), stąd można wnioskować, że obecność RCAS1 jest **niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w chorobie nowotworowej**. Poza tym obecność RCAS1 **korelowała ze stopniem złośliwości i zaawansowaniem guza** [31].

1.2.7 Obecność RCAS1 w nowotworach przewodu pokarmowego

Ekspresja RCAS1 w raku przełyku

W grupie badanych 95 pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym przełyku białko RCAS1 było obecne w 33,7% próbek tkankowych. **Ekspresja białka znamienne korelowała z wiekiem pacjentów, stadium zaawansowania choroby oraz była niezależnym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym**. Korelacja z wielkością guza wskazuje na to, że RCAS1 może być białkiem związanym z progresją w raku przełyku. Jest to zgodne z obserwacją ekspresji tego białka w raku płuc. Podobnie jak w raku płuc czy macicy i jajnika przeżycie u pacjentów z wysoką ekspresją RCAS1 było znacząco krótsze aniżeli u pacjentów o guzach RCAS1 ujemnych [16].

Ekspresja RCAS1 w raku pęcherzyka żółciowego

W badaniu nad ekspresją RCAS1 w raku pęcherzyka żółciowego przeanalizowano 110 próbek tkankowych, z których aż 70% wykazywało wysoką ekspresję białka. Ekspresja RCAS1 rosła wraz ze wzrostem stadium zaawansowania nowotworu. **Wykazano również znamienne statystycznie związki pomiędzy wysoką**

ekspresją RCAS1 a głębokością nacieku nowotworowego, obecnością przerzutów w węzłach chłonnych oraz zajęciem naczyń żylnych i perineurium. Wysoka ekspresja RCAS1 była niezależnym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Nie zidentyfikowano ekspresji białka w gruczolaku pęcherzyka żółciowego uważanego za stan przednowotworowy. W związku z tym RCAS1 wydaje się być późnym czynnikiem będącym znacznikiem progresji nowotworowej, natomiast nie będącym czynnikiem odpowiedzialnym za powstawanie (z gruczolaka) raka pęcherzyka żółciowego [32].

Ekspresja RCAS1 w raku wątroby

W badaniu nad ekspresją białka RCAS1 w raku wątroby wykazano, że 26,5% komórek raka posiadało ekspresję białka, która była związana z rosnącą inwazyjnością nowotworu (naciekiem przewodów żółciowych, naczyń żylnych, przerzutów wewnątrzwątrobowych) [33].

Ekspresja RCAS1 w raku trzustki

Analiza ekspresji białka RCAS1 w gruczolakoraku trzustki została przeprowadzona w grupie 80 pacjentów. Ekspresja białka była obecna w 96% guzów nowotworowych, nie wykryto jej natomiast w prawidłowych komórkach przewodów trzustki. **Czas przeżycia u chorych o wysokiej ekspresji RCAS1 w guzie był statystycznie zmiennie krótszy aniżeli chorych o niskiej ekspresji RCAS1 w guzie. Białko RCAS1 było niezależnym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym** [15].

Ekspresja RCAS1 w raku pozawątrobowych dróg żółciowych

Rak pozawątrobowych dróg żółciowych jest stosunkowo rzadkim schorzeniem. Chociaż zwykle guz jest niewielki, a jego progresja następuje powoli, chorzy zgłaszają się późno, z racji niespecyficznych i późno występujących objawów. Wykazano, że ekspresja RCAS1 w tym raku jest częsta (86,7%), w porównaniu z innymi badanymi dotychczas tkankami nowotworowymi, co więcej ekspresja RCAS1 jest obecna od wczesnego stadium karcynogenezy (ekspresja w stadium I wynosiła 83,3%). Prawidłowe komórki nabłonka dróg żółciowych nie wykazują ekspresji tego białka. Nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją RCAS1 a czynnikami klinicznymi i patologicznymi. **Natomiast wysoka ekspresja białka była**

podobnie jak w przypadku innych przebadanych tkanek nowotworowych niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [34].

Ekspresja RCAS1 w raku żołądka, przewlekłym stanie zapalnym błony śluzowej żołądka oraz zdrowej błonie śluzowej żołądka.

Ekspresję RCAS1 badano u pacjentów z T3, stwierdzono jej obecność w 54,3% badanych przypadków, natomiast wysoką ekspresję zidentyfikowano u 25,6% chorych. **Ekspresja białka statystycznie korelowała z typem histologicznym guza oraz obecnością przerzutów do węzłów chłonnych.**

Częstość apoptozy limfocytów TIL była bardziej zaznaczona w u pacjentów o wysokiej ekspresji RCAS1, aniżeli u tych o niższej ekspresji białka. Chociaż nie udowodniono zaznaczonej różnicy w przeżyciu u pacjentów o silnie zaznaczonym czy słabo zaznaczonym nacieku guza przez limfocyty naciekające guz, częsta apoptoza tych limfocytów wskazywała na znacznie gorsze rokowanie. Odsetek 5-letnich przeżyć u pacjentów z guzem o niskiej ekspresji RCAS1 wyniósł 77,9%, natomiast u pacjentów z guzem o wysokiej ekspresji RCAS1 wyniósł 48,4%. Szeroka analiza wykazała, że RCAS1 jest niezależnym, niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [35].

1.2.8 Ekspresja RCAS1 w gruczolakach przysadki

Ekspresję RCAS1 zidentyfikowano w 48% gruczolaków przysadki. Ekspresja białka nie korelowała z typem, rozmiarem guza, czy inwazyjnością. W złośliwym glejaku zidentyfikowano zarówno RCAS1 jak i MIB-1. Nie zidentyfikowano RCAS1 ani MIB-1¹ (MIB-1 labeling index) w tkance zdrowej przysadki mózgowej. Wykazano korelację statystyczną pomiędzy ekspresją RCAS1 oraz indeksem MIB-1. Ekspresja RCAS1 oraz MIB-1 przepowiada potencjał wzrostu gruczolaków przysadki [36].

1.2.9 Ekspresja RCAS1 w trofoblaście i łożyskach

Łożysko oddziela nie tylko krew matki i płodu, ale również dwa układy immunologiczne. Uważa się, że trofoblast odgrywa kluczową rolę w unikaniu

¹ MIB –(z j. angielskiego: monoclonal antibody recognizes the proliferation- related antigen Ki-67) przeciwciało monoklonalne rozpoznające antygen związany z proliferacją Ki-67

rozpoznania przez układ immunologiczny matki. Potencjalnymi układami biorącymi udział w tym procesie, polegającym na wytworzeniu tolerancji immunologicznej matki dla płodu i odpowiadającymi za utrzymanie ciąży jest ekspresja FasL i innych białek regulacyjnych, w tym upośledzenie ekspresji białek MHC klasy I i II, z wyjątkiem HLA-C i HLA-G. Udowodniono wysoką ekspresję białka RCAS1 w trofoblastach w przypadku ciąż prawidłowych, natomiast wyraźnie obniżoną ekspresję RCAS1 w trofoblastach spontanicznie odrzuconych ciąż [37].

1.3 Biologia molekularna raka gardła i krtani

Częstym problemem związanym z pacjentem z guzem głowy i szyi jest nawrót choroby albo w miejscu resekcji (marginesy chirurgiczne mogą być histopatologicznie zdrowe, jednak mogą posiadać potencjał zaburzeń genetycznych), jak też powstanie nowego guza nowotworowego w innym miejscu, prawdopodobieństwo rozwoju drugiego pierwotnego nowotworu w terenie głowy i szyi, tchawicy, oskrzeli i przełyku jest większe od zagrożenia nawrotem pierwotnie leczonego raka [6]. Ryzyko miejscowego nawrotu procesu nowotworowego, mimo że marginesy resekcji chirurgicznej były histopatologicznie wolne od nacieku nowotworowego jest oceniane na 10-30% [6,7]. Dlatego też diagnostyka molekularna w wykrywaniu guza i monitorowaniu remisji jest przedmiotem szerokich badań. Biologia molekularna guza leżąca u podstaw odrębności komórki nowotworowej przejawia się w zmianach ekspresji białek związanych z apoptozą oraz z dojrzewaniem i wzrostem komórki. Funkcja w biologii sprowadza się w zasadzie do specyficznego oddziaływania i wiąże się praktycznie zawsze z aktywnością białka [40].

W biologii molekularnej złośliwego guza nowotworowego biorą udział następujące czynniki: aktywacja onkogenów, inaktywacja czynników hamujących wzrost guza, unieśmiertelnienie (immortalization), aktywacja mechanizmów inwazji i przerzutowania [41]. Oprócz tego trudno nie wspomnieć o mechanizmach ucieczki guza nowotworowego spod kontroli immunologicznej ustroju, jak też wpływie nowotworu na stan układu immunologicznego gospodarza.

1.3.1 Apoptoza w raku gardła i krtani

Apoptoza jest mechanizmem kontrolowanego usuwania komórek, który należy rozumieć jako mechanizm komplementarny choć przeciwny do mitozy, uczestniczący w regulacji populacji komórek.

Słowo apoptoza pochodzi z języka greckiego znaczy dokładnie tyle co odpadanie (apo- od, pt-p(a)d jak w pasc/ padac). Używane jest w odniesieniu do opadania płatków kwiatów i liści z drzew. W mikroskopie elektronowym wykazano dwa podstawowe etapy zmian strukturalnych podczas apoptozy komórki. Pierwszy to

formowanie ciałek apoptotycznych w wyniku kondensacji i następnie fragmentacji komórki, a w drugim ich fagocytozy przez inne komórki (np. histiocyty). Formowane ciała apoptotyczne zawierają zaznaczoną kondensację jądra i cytoplazmy, fragmentację jądra i oddzielenie guzowatości znajdujących się na powierzchni komórek, dla wytworzenia wielu otoczonych błoną, ściśniętych lecz dobrze zachowanych fragmentów komórkowych o bardzo różnorodnym rozmiarze. Nie zanotowano morfologicznych znaczników inicjacji procesu. Uformowane ciała apoptotyczne charakteryzują się ściśle upakowanymi organellami, które mogą być skondensowane, ale są chemicznie i strukturalnie nietknięte. Zawartość ciałek apoptotycznych zależy od składników komórki, niektóre z nich mogą zawierać całą zawartość skondensowanej chromatyny jądrowej, podczas gdy inne zawierają jedynie elementy cytoplazmy. Ciała apoptotyczne często występują w przestrzeni międzykomórkowej tworząc zgrupowania: gniazda. Tylko większe z nich są widoczne w mikroskopie świetlnym. Mniejsze ciała apoptotyczne mają tendencję do rozpraszania się i w narządach takich jak wątroba lub kora nadnerczy często można je obserwować pomiędzy komórkami parenchymy a komórkami wyścielającymi zatoki. Ciała pochodzące z nabłonka gruczołów i błony śluzowej oraz cewek nerkowych są często wydzielane do światła, inne dostają się do naczyń krwionośnych. Należy podkreślić, że wolne ciała apoptotyczne nigdy nie wykazują objawów degeneracji i jest prawdopodobne, że w tym stanie są w dalszym ciągu odpowiedzialne za aktywność metaboliczną. Kondensacja materiału komórkowego jest przede wszystkim konsekwencją pozbycia się wody. Stopień kondensacji umożliwia tworzenie ciałek apoptotycznych bez dodatkowej syntezy błony komórkowej. W badanych tkankach znaleziono większość apoptotycznych ciałek w obrębie cytoplazmy komórek prawidłowych. Sugeruje to, że są one szybko fagocytowane przez inne komórki prawdopodobnie dzięki właściwościom powierzchni błon komórkowych. **W trakcie rozwoju płodowego oraz stanach patologicznych ciała apoptotyczne są obserwowane w komórkach tkanki łącznej i nabłonkowej. Natomiast w stanach fizjologicznych tylko w tkance łącznej. Co więcej, w chorobie nowotworowej ciała apoptotyczne są znacznie częściej fagocytowane przez zmienione nowotworowo komórki nabłonkowe w porównaniu do histiocyty.**

Rozmiar populacji komórkowej, nowotworowej czy fizjologicznej zależy od równowagi pomiędzy ich produkcją a utratą. Apoptoza jest związana z regulacją populacji komórek w tkankach prawidłowych, wzrasta w nowotworach złośliwych, może brać udział w regresji guza i uczestniczy w ontogenezie [42].

Apoptoza to zaprogramowana genetycznie śmierć komórki. Transformacja nowotworowa komórki jest związana nierozłącznie z zaburzeniami apoptozy, będącej wynikiem zmian ilościowych i jakościowych w ekspresji białek decydujących o:

- Hamowaniu apoptozy i powstawaniu nieśmiertelności komórki
- Unikaniu apoptozy powodowanej przez jednojądrowe komórki cytotoksyczne
- Apoptozie komórek układu immunologicznego, wywołanej przez komórkę nowotworową

Białka cytoplazmatyczne odpowiedzialne za hamowanie apoptozy komórek nowotworowych w raku głowy i szyi:

NFκB- (ang. nuclear factor κB-czynnik transkrypcyjny κB) aktywacja tego białka jest związana z HIAP (human inhibitor of apoptosis proteins), który odcina inhibitor IκB w cytoplazmie komórki. W konsekwencji dochodzi do aktywacji receptorów błonowych TNFR-1(p55), CD40, DR3, DR4 i DR5, które zawierają cytoplazmatyczną domenę śmierci TRADD (TNF receptor associated death domain). Potwierdzono wzrost aktywności telomerazy towarzyszący wzrostowi ekspresji NFκB, wykazano jego udział w promocji progresji raka płaskonabłonkowego, uczestniczy ono w indukcji oporności na leki przeciwnowotworowe [43,44]. Rak płaskonabłonkowy jest, jak wiadomo źródłem licznych cytokin związanych ze wzrostem potencjału wzrostowego, przerzutów nowotworowych oraz szerzeniem raka płaskonabłonkowego, należą tutaj IL-1, IL-6, IL-8 oraz GM-CSF. Aktywacja genów cytokin może mieć udział w progresji guza nowotworowego. Ekspresja genów prozapalnych cytokin może być regulowana również przez TNF-α poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Po aktywacji to białko hamujące jest fosforylowane i degradowane uwalniając NF-κB aktywujący geny docelowe, włączając geny kodujące wymienione cytokiny, **promuje ono transformację i**

przeżycie komórek nowotworowych. Bierze ono w ten sposób udział w „nabywaniu” przez komórki fenotypu złośliwego [43].

FLIP-FLICE (*FLIP*: FADD [Fas associated death domain] –like IL-1 β -converting enzyme) stanowią nową grupę białek przeciwapoptotycznych, które hamują związanie kaspazy 8 i 10 z molekułą łącznikową FADD. FLIP jest czynnikiem progresji guza, blokującym sygnał poprzez hamowanie kaspazy 8, 3 i 9, chroniąc nowotwór przed odrzuceniem przez limfocyty T [45]. Potwierdzono jego udział w powstawaniu przerzutów raka płaskonabłonkowego. Prawidłowe hepatocyty mogą ochronić się przed apoptozą poprzez ekspresję FLIP, zdolność przerzutujących komórek nowotworu do ekspresji FLIP oraz innych molekuł może mieć zasadnicze znaczenie w ich przeżyciu [46].

Białka z rodziny Bcl-2 są ważnymi czynnikami regulującymi apoptozę w różnych układach komórkowych. Bcl-2 zostało po raz pierwszy uzyskane z komórek chłoniaka B komórkowego, białko hamowało apoptozę proliferujących komórek chłoniaka. **Poza Bcl-2 działanie hamujące apoptozę wykazuje Bcl-x_L oraz A1.** Inne białka z rodziny Bcl, takie jak Bax, Bcl-x_S pobudzają apoptozę komórek. Rola tego białka jest kluczowa w ochronie prawidłowych komórek przed nieprawidłową apoptozą. Zwłaszcza w tkance limfatycznej, na przykład proliferujące limfocyty w centrach rozrodczych nie posiadają ekspresji Bcl-2, co koreluje z wysoką częstością apoptozy podczas gdy limfocyty dojrzałe charakteryzują się ekspresją Bcl-2. Białko to jest obecne w wielu tkankach prawidłowych, jak nabłonek oskrzeli, czy głowy i szyi. Tutaj ekspresja jest zlokalizowana w regionach błony podstawnej, w obrębie komórek które uważane są za nabłonkowe komórki stem. Bcl-2 zidentyfikowano w wielu złośliwych procesach nowotworowych (rak płuc, prostaty, piersi), gdzie jego ekspresja korelowała z rokowaniem. Ekspresja Bcl-2 była znamienna statystycznie we wczesnym raku głowy i szyi, wskazując na to, że może być przydatnym markerem wczesnego stadium choroby [47]. W zaawansowanym raku krtani nie znaleziono korelacji pomiędzy ekspresją Bcl-2 a czynnikami klinicznymi, patologicznymi, czy rokowaniem [48]. Natomiast Gallo wykazał korelację pomiędzy zwiększoną ekspresją Bcl-2 a skróceniem okresu przeżycia w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi, leczonym wyłącznie napromienianiem [49].

Unikanie apoptozy jest związane z ucieczką przed rozpoznaniem komórki nowotworowej przez układ immunologiczny w szczególności CTLs, które dla swojego działania wymagają restrykcji MHC. Transformacji nowotworowej towarzyszy:

- HLA (human leucocyte antigens), które są kodowane na krótkim ramieniu chromosomu 6. Aberracje w zakresie ramienia krótkiego chromosomu 6, prowadzą do zmniejszenia ekspresji lub utraty HLA-I na powierzchni tych komórek. Sytuację taką spotyka się często w komórkach guzów nowotworowych oraz komórkach zainfekowanych wirusem. Promuje to inwazję nowotworową poprzez zaburzenie w prezentacji antygeny limfocytom cytotoksycznym [50];
- HLA-G hamuje lizę wywoływaną przez limfocyty NK. Jego główną funkcją, jak się uważa jest ochrona trofoblastu przed atakiem ze strony limfocytów NK. Ekspresja HLA-G, która w interakcji między innymi z (CD94/NKG2A, KIRs family receptor) jest odpowiedzialna za hamowanie NK w efekcie powoduje oporność guza nowotworowego na atak ze strony tych komórek [51];
- Białka LMP 2 oraz TAP1 i 2 odpowiedzialne za transport proteasomów zawierających HLA-I i ich wbudowanie w błonę komórkową. Aż 90% linii komórek nowotworowych charakteryzuje się całkowitym brakiem ekspresji TAP. W immunoterapii nowotworów wykorzystuje się stymulację ekspresji TAP [50].

Komórka nowotworowa posiada zdolność do oszukiwania układu immunologicznego organizmu gospodarza poprzez ekspresję na swojej powierzchni białek, fizjologicznie wykorzystywanych w organizmie do eliminacji komórek nieprawidłowych w drodze apoptozy oraz wydzielanie białek do macierzy międzykomórkowej, modyfikujących mikrośrodowisko guza.

Białka błonowe II typu należące do rodziny TNF, mogą występować w formie rozpuszczalnej: FasL, DR3, oraz inne białka błonowe II typu na przykład RCAS1, CAP.

- **Fas** (Apo1/CD95) jest receptorem błonowym należącym do TNFR (tumor necrosis factor receptor family), **FasL** (CD40) jest ligandem dla Fas, białkiem błonowym II typu, należącym do rodziny TNF. Interakcja pomiędzy Fas i FasL prowadzi do aktywacji domeny śmierci FADD i w efekcie do aktywacji kaspazy 8, która poprzez aktywację kaspazy 3 prowadzi do fragmentacji DNA i destabilizacji potencjału błony mitochondrium, śmierci komórki efektorowej (w tym przypadku CTLs i NK). Aktywowane limfocyty cytotoksyczne posiadają na swojej powierzchni zarówno ekspresję Fas jak FasL, który poprzez interakcje z Fas obecnym na powierzchni guza, doprowadza do uruchomienia apoptozy limfocytów. Co ciekawe, niektóre komórki nowotworowe posiadają na swojej powierzchni ekspresję zarówno Fas jak i FasL, przy czym ekspresja Fas prowadzi do apoptozy limfocytów, natomiast komórki guza posiadające ekspresję Fas nie są eliminowane przez FasL obecny na powierzchni komórek układu immunologicznego. Udział ekspresji FasL w hamowaniu aktywności komórek układu immunologicznego opisano szczegółowo w rozdziale 2.3 [52].

Ekspresja Fas i FasL była przedmiotem analizy w raku krtani. Ekspresja Fas była obecna w 47,6%, a FasL w 64,3% badanych raków krtani, natomiast ich obecność w zdrowej tkance krtani wyniosła odpowiednio 90% i 20%. Ekspresja Fas nie korelowała ze stopniem zróżnicowania komórek nowotworowych ani stadium zaawansowania, natomiast korelowała znacząco z przerzutowaniem. **Ekspresja FasL pozytywnie korelowała ze stopniem zróżnicowania guza, stanem zaawansowania klinicznego oraz tworzeniem przerzutów.** Wynika stąd że ekspresja Fas i FasL jest ściśle związana z powstawaniem i progresją choroby nowotworowej w raku krtani i że może ona wskazywać na rokowanie w tej chorobie. Ekspresję Fas/FasL oraz częstość spontanicznej apoptozy zbadano również w raku ustnej części gardła. Nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją Fas i FasL a cechami klinicznymi i patologicznymi, jak również ekspresja Fas nie wpływała na stopień spontanicznej apoptozy w komórkach guza nowotworowego. Ekspresja FasL była związana z ekspresją IL-10 oraz G-CSF. IL-10 jest znanym czynnikiem hamującym syntezę i wydzielanie IFN-

gamma, głównej cytokiny wydzielanej przez limfocyty Th1, która zwiększa aktywność komórek NK przeciwko komórkom nowotworowym, jak również wrażliwość komórek nowotworowych na działanie NK. G-CSF jest cytokiną regulującą proliferację, różnicowanie oraz chemotaksję granulocytów, jest też jednym z czynników hamujących apoptozę mediowaną przez Fas, w przeprowadzonym badaniu ekspresja G-CSF mogła chronić komórki guza nowotworowego przed apoptozą ze strony limfocytów cytotoksycznych [52]. W raku nosogardła ekspresja IL-10 znacząco korelowała z przeżyciem. Pacjenci z guzem nosogardła o wysokiej ekspresji w guzie IL-10 mają znacznie gorsze rokowanie [53]. Reasumując funkcja Fas/FasL jest regulowana poprzez działanie wielu czynników, między innymi cytokin wydzielanych przez guz.

- **DcR3** (decoy receptor for FasL) (TNFRF6) należy do rodziny TNFR (TNF receptor family). Został odkryty i zidentyfikowany w 1998 roku jako nowy, rozpuszczalny czynnik który przyłącza FasL i hamuje indukowaną przez FasL apoptozę. Amplifikację genu oraz obecność mRNA zidentyfikowano w połowie analizowanych guzów płuc i jelita grubego. Komórki guza mogą uniknąć ataku zależnego od FasL ze strony komórek układu immunologicznego poprzez ekspresję DcR3 [54](R. Pitti, 1998). Ekspresję mRNA dla DcR3 zidentyfikowano w wielu zdrowych tkankach, takich jak żołądek, jelito grube, śledziona, węzły chłonne. DcR3 uczestniczy w modulacji odpowiedzi immunologicznej głównie poprzez hamowanie dojrzewania i proliferacji limfocytów T. Ekspresja DcR3 w chłoniakach związana jest z powstaniem guza, DcR3 hamuje limfocyty cytotoksyczne specyficzne dla guza, immunoterapia skierowana przeciwko DcR3 mogłaby być potencjalnie przydatna w leczeniu chłoniaków posiadających ekspresję DcR3 [55]. DcR3 chroni komórki raka płaskonabłonkowego przed śmiercią indukowaną przez CTLs za pośrednictwem FasL. Jego ekspresja została zidentyfikowana w złośliwych glejakach [56].
- **RCAS1 / EBAG9** (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells), położony na 8q23, jest niedawno odkrytym białkiem błonowym II typu, obecnym na powierzchni różnych komórek raka, działa jako ligand dla

receptora obecnego na różnych komórkach układu immunologicznego: limfocytach T, B, komórkach NK, indukując w tych komórkach zarówno *in vivo*, jak *in vitro* apoptozę poprzez aktywację kaspazy 3. W badaniach przeprowadzonych w Klinice Otolaryngologii CM UJ wykazano obecność RCAS1 w różnych nowotworach głowy i szyi [57].

Immortalizacja to zdolność komórek do nieograniczonego wzrostu, cecha ta powstaje w wyniku mutacji genów kontrolujących liczbę podziałów komórkowych, komórki zatem zaczynają dzielić się w sposób nieograniczony, stają się „nieśmiertelne”. Jest to cecha charakterystyczna dla komórek nowotworowych, podczas gdy w tkankach prawidłowych spotykana jest w komórkach germinalnych i pnia [58].

Telomeraza jest enzymem odpowiedzialnym za syntezę DNA (telomerów). Aktywność telomerazy jest niezbędna do immortalizacji [59]. Większość raków krtani charakteryzuje się aktywnością telomerazy oraz ekspresją **hTERT** (human telomerase reverse transcriptase), podjednostki katalitycznej telomerazy, której ekspresja jest wykładnikiem aktywności telomerazy *in vivo* i *in vitro* [60]. Aktywność telomerazy wykryto również w tkankach przylegających w bezpośrednim sąsiedztwie do tkanek raka, im bliżej guza tym aktywność była wyższa. Ekstrakt z raka krtani bez aktywności telomerazy skutecznie hamował aktywność produkujących telomerazę komórek, sugerując obecność hamujących telomerazę substancji. Obecność komórek pnia (stem) w regenerującym się nabłonku może tłumaczyć ekspresję hTERT w nienowotworowych tkankach krtani osób starszych, podczas gdy reaktywacja telomerazy jest odpowiedzialna za ekspresję hTERT w rakach [61].

1.4 Limfocyty naciekające guz (TIL- tumor infiltrating lymphocytes) oraz limfocyty krążące (PBMC- periferal blood mononuclear cells) u osób z rakiem głowy i szyi

Rak głowy i szyi jest jednym z najbardziej immunosupresyjnych guzów. Status funkcjonalny i rola limfocytów naciekających guz (TIL) była przedmiotem zainteresowania już w latach 70 tych XX wieku, przede wszystkim wykazano zmniejszoną ilość limfocytów naciekających guz, która korelowała ze stopniem jego złośliwości i złym rokowaniem [62,63]. Następne badania wykazały, że limfocyty naciekające guz wykazują zaburzenia funkcji, zatem zmniejszonej liczbie tych limfocytów w chorobie nowotworowej towarzyszy upośledzenie ich aktywności [64]. Jednocześnie w badaniach prowadzonych *in vitro* ujawniono, że TIL inkubowane z cytokinami nabierają silnej i specyficznej aktywności przeciwnowotworowej, którą wykorzystano w immunoterapii czerniaka [65,66]. Następnie zaobserwowano, że TIL przechodzą apoptozę która może być związana z ekspresją białek Fas/FasL, jak również z innymi białkami związanymi z molekułami śmierci [67,68]. Dowiedziono, że guzy nowotworowe o wysokiej ekspresji FasL były często nacieczone przez TIL Fas(+), które wykazywały cechy apoptozy [69].

W 1999 roku Gastman i wsp. zbadali ekspresję FasL przez komórki raka płaskonabłonkowego głowy i szyi. Wykazano wysoką ekspresję aktywnej biologicznie formy tego białka, stwierdzono że jest ona zróżnicowana w obrębie samego guza, obserwuje się tutaj regiony FasL-pozytywne (o wysokiej ekspresji FasL) oraz regiony FasL-negatywne (o braku ekspresji FasL), pozostaje to w zgodności ze spostrzeżeniami dotyczącymi sposobu ekspresji tego białka w obrębie raka przełyku [68,70]. Stwierdzono ponadto, że liczba TIL była znacznie wyższa w regionach guza o wysokiej ekspresji FasL, przeciwnie do regionów guza o niskiej ekspresji FasL, gdzie liczba TIL była znacznie niższa. Prawdopodobnie ekspresja FasL na powierzchni guza może być niejako pobudzana przez limfocyty naciekające guz. Co więcej zasugerowano hipotezę według której, apoptoza limfocytów walczących z komórkami guza może być odpowiedzialna za uszkodzenie funkcjonalne TIL. Zasugerowano też inną hipotezę, według której guz aktywuje

komórki układu immunologicznego, pobudza ekspresję FasL na powierzchni tych komórek ułatwiając w ten sposób apoptozę limfocytów, które zabijają się nawzajem [71]. Komórki raka płaskonabłonkowego mają więc bezpośrednią zdolność do wywoływania śmierci aktywnych limfocytów. Poza tym stwierdzono, że ekspresja FasL na powierzchni komórek guza była znacznie wyższa aniżeli ekspresja FasL na powierzchni aktywnych limfocytów. Inkubacja komórek guza z przeciwciałami skierowanymi przeciwko FasL powodowała częściowe zahamowanie apoptozy limfocytów. Uważa się, że oprócz FasL inne mechanizmy mogą brać udział w wywoływaniu apoptozy limfocytów T, na przykład w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi wykazano wysoką ekspresję TRAIL, który może wywoływać apoptozę limfocytów poprzez TRAILR.² Jednocześnie komórki raka płaskonabłonkowego są odporne na śmierć indukowaną przez FasL, jest to więc forma obrony guza przez zniszczeniem przez układ immunologiczny oraz przez inne mechanizmy protekcyjne jak np. ekspresja Bcl-2 [68].

Ujawniono również, że apoptoza limfocytów nie jest wyłącznie ograniczona do mikrośrodowiska guza, lecz cechuje także komórki układu immunologicznego krążące w krwi obwodowej pacjentów z guzem nowotworowym [72].

Saito i wsp. w 1999 roku zbadali zjawisko apoptozy krążących we krwi limfocytów u chorych z rakiem zlokalizowanym w obrębie głowy i szyi. Wykazano znacznie wyższą częstość występowania zjawiska apoptozy limfocytów uzyskanych od chorych z rakiem głowy i szyi, aniżeli od osób zdrowej grupy kontrolnej. Limfocyty te właściwie były „przeprogramowane na śmierć”, czego nie obserwowano u osób zdrowej grupy kontrolnej. Co więcej, pacjenci nie posiadali w czasie pobierania krwi żadnych objawów choroby, byli po leczeniu chirurgicznym lub chemio i radioterapii. Jednocześnie przebadano grupę pacjentów z przerzutami melanoma, u których wykazano podobne zjawisko w obrębie limfocytów krążących, natomiast w zdrowej grupie kontrolnej nie wykazano tego typu zmian. Spontaniczna apoptoza limfocytów wydaje się być zjawiskiem niezależnym od

² TRAIL-ang. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand jest podobnie jak inne molekuly śmierci takie jak TNF- α czy FasL, obecne na powierzchni limfocytów cytotoksycznych czy NK są odpowiedzialne za eliminację komórek zakażonych wirusem oraz komórek nowotworowych. Zmniejszenie wrażliwości guza nowotworowego na apoptozę indukowaną przez te receptory może ułatwiać wzrost komórek guza i powstawanie przerzutów nowotworowych. Dowiedziono, że TRAIL może działać jako czynnik hamujący wzrost guza in vivo, również białko to hamowało w warunkach eksperymentalnych powstawanie przerzutów nowotworowych.

rodzaju nowotworu, charakterystycznym dla choroby nowotworowej, bez klinicznie uchwytnych objawów choroby. **Apoptoza dotyczyła wszystkich podtypów limfocytów: T, NK, B oraz monocytów**, limfocyty stanowiły większość komórek dotkniętych apoptozą. Początkowo skupiono się na limfocytach CD3⁺, ponieważ akumulowały się w okolicy guza, były aktywne oraz wrażliwe na śmierć indukowaną przez guz (TICD) jak i śmierć indukowaną przez aktywację (AICD). Rozróżnienie pomiędzy tymi dwoma drogami indukcji apoptozy jest nie do końca jasne, gdyż obecność guza lub utajonych przerzutów nowotworowych aktywuje nie tylko apoptozę TIL, ale również innych limfocytów (krążących) i predysponuje komórki do śmierci indukowanej przez aktywację (AICD). Z drugiej strony guz może wywołać bezpośrednio apoptozę aktywowanych limfocytów poprzez interakcje Fas-FasL, TRAILR-TRAIL. Jest to obecnie przedmiotem szerokich badań. U pacjentów z rakiem głowy i szyi wykazano również znacznie podwyższoną ilość limfocytów charakteryzujących się **obniżoną ekspresją łańcucha ζ receptora TcR** lub jej brakiem. Uważa się, że istnieje związek pomiędzy obniżoną ekspresją łańcucha ζ a apoptozą limfocytów, białko ζ zawiera aminokwasy wrażliwe na kaspazy, co prawdopodobnie jest związane z apoptozą tych komórek indukowaną przez aktywację lub przez guz. Spontaniczna apoptoza limfocytów pacjentów z rakiem głowy i szyi, będących po leczeniu operacyjnym lub napromienianiu i chemioterapii wskazuje na **przedłużone efekty wpływu guza nowotworowego na układ immunologiczny**. U pacjentów badanych przed przeprowadzeniem leczenia ten wpływ jest jeszcze silniej wyrażony [72].

Mikrośrodowisko guza wpływa hamująco na funkcję komórek układu immunologicznego, czego cechą charakterystyczną jest upośledzenie TcR³

³ Receptor limfocytów T (TcR) jest heterodimerem składającym się z dwóch łańcuchów α i β połączonych mostkiem dwusiarczkowym (określanych jako TcR2). Alternatywny typ receptora występuje na małej subpopulacji limfocytów T i składa się z łańcuchów γ i δ (TcR1). Wszystkie łańcuchy mają regiony stałe w odcinku C-końcowym oraz zmienne w odcinku N-końcowym. Receptor limfocytów T rozpoznaje epitopy antygeny nie bezpośrednio, lecz jedynie na komórkach prezentujących antygen (APC) w kontekście determinant głównego układu zgodności tkankowej (MHC). Jego ekspresja jak i aktywacja komórki będąca efektem rozpoznania antygeny zależą od dodatkowej obecności trzech transmembranowych, niepolimorficznych cząsteczek, należących do nadrodziny immunoglobulin, (γ, δ, ε) połączonych niekowalencyjnie z TcR, określonych ogólną nazwą CD3. Ponadto w skład kompleksu wchodzi łańcuch ζ, nie należący do nadrodziny immunoglobulin, lub jego pokrewna forma η. Kompleks TcR-CD3 stanowi funkcjonalną całość, w obrębie której istnieje podział ról: TcR rozpoznaje antygen, CD3 przenosi sygnał o tym do wnętrza komórki.

(obniżona ekspresja łańcucha ζ) i chociaż mechanizmy prowadzące do tych zaburzeń są różne, ich efektem jest zawsze progresja guza. Wykazano, że zmniejszona ekspresja łańcucha ζ u pacjentów z rakiem gardła wiąże się ze znacznie częściej występującą spontaniczną apoptozą TIL oraz limfocytów krążących. Niska ekspresja łańcucha ζ przez TIL korelowała z wysokim poziomem ekspresji przez guz FasL. Niska ekspresja łańcucha ζ na limfocytach krążących była również związana ze zmniejszoną zdolnością tych komórek do proliferacji. Apoptoza korelowała z redukcją ekspresji łańcucha ζ . **Obniżona ekspresja łańcucha ζ związanego z TcR, zaburzona funkcja układu immunologicznego oraz apoptoza komórek naciekających guz oraz limfocytów krążących występowały równocześnie u pacjentów z rakiem gardła.** Wymienione zaburzenia korelowały z wysoką ekspresją FasL w guzie, lecz nie obserwowano korelacji ze stadium choroby. Sugeruje to, że **guz nowotworowy może wywierać ogólnoustrojowy wpływ hamujący na komórki układu immunologicznego**, prawdopodobnie przy udziale drogi mediowanej przez Fas/FasL [73].

Te spostrzeżenia potwierdzono również w kolejnej serii badań dotyczącej właściwości limfocytów krwi krążących oraz naciekających guz u pacjentów z rakiem głowy i szyi. Dodatkowo, limfocyty CD3⁺ Fas pozytywne preferencyjnie przechodziły apoptozę i posiadały niską ekspresję łańcucha ζ , podobnie limfocyty CD8⁺ były wyraźnie bardziej wrażliwe na apoptozę niż CD4⁺. **Utrata limfocytów CD8⁺ u pacjentów z rakiem głowy i szyi może być czynnikiem krytycznym przesądającym o osłabionej obronie przeciwnowotworowej.** U pacjentów z rakiem głowy i szyi poziom rozpuszczalnej formy Fas w surowicy mierzonej testem ELISA był znacznie wyższy a niżeli u osób zdrowych, bądź bez uchwytnych objawów choroby nowotworowej [74].

Wyizolowane limfocyty wykazują zaburzenia funkcji objawiające się nie tylko zaburzeniem w proliferacji, ale również obniżoną cytotoksycznością skierowaną przeciwko guzowi nowotworowemu, jak też innym profilem cytokinowym. Guz nowotworowy może wpływać na aktywność komórek układu immunologicznego znajdujących się w pobliżu guza pierwotnego lub jego przerzutu. TIL wyizolowane z guza nowotworowego wykazują zaburzenia funkcji objawiające się nie tylko

zaburzeniem w proliferacji w odpowiedzi na mitogeny czy antygeny związane z guzem, ale także obniżoną cytotoksycznością skierowaną przeciwko guzowi nowotworowemu, innym profilem cytokinowym obniżeniem produkcji IL-2 i INF- α .

Limfocyty naciekające guz nowotworowy ulegają apoptozie poprzez aktywację kaspazy i fragmentację DNA. Dowiedziono, że komórki jednojądrowe efektorowe układu immunologicznego uzyskane z krwi obwodowej pacjentów z rakiem głowy i szyi wykazują upośledzenie funkcji, co wskazuje na znacznie wykraczający poza lokalny, zasięg działania immunosupresyjnego nowotworu. W przeprowadzonym badaniu nad apoptozą wśród obwodowych komórek jednojądrowych wykazano, że komórki te wyizolowane od chorych z rakiem głowy i szyi znacznie częściej ulegały apoptozie aniżeli kontrolne, co więcej największą subpopulacją komórek ulegających apoptozie były limfocyty T, wręcz stopień spontanicznej apoptozy wśród limfocytów T był tak duży jak wśród komórek u których indukowano apoptozę. Wskazywać to może na to, że limfocyty T u chorych na raka głowy i szyi, Fas+ i TNFR1+, są niejako przeprogramowane na uruchomienie apoptotycznej śmierci. Podniesiony poziom spontanicznej apoptozy u pacjentów z rakiem głowy i szyi, w stosunku do kontroli, wskazuje na to, że większa frakcja komórek jednojądrowych przechodziła apoptozę *in vivo* aniżeli u pacjentów grupy kontrolnej. Spontaniczną apoptozę obserwowano w krążących komórkach jednojądrowych otrzymanych od pacjentów z rakiem głowy i szyi, natomiast nie obserwowano tego zjawiska u osób zdrowych.

Cel pracy

RCAS1, białko będące przedmiotem zainteresowania w niniejszej pracy jest nowo odkrytym czynnikiem o wysokiej ekspresji na powierzchni komórek nowotworowych, odpowiedzialnym za wywoływanie apoptozy komórek układu immunologicznego naciekających guz i w ten sposób prawdopodobnie umożliwia ono ekspansję choroby nowotworowej [11,12]. Dokładne funkcje tego białka nie zostały jeszcze poznane. Jest to niezależny marker nowotworowy, w badanych dotychczas nowotworach był odpowiedzialny za niekorzystną prognozę w chorobie nowotworowej [13-16]. Jego oznaczenie w usuwanym chirurgicznie nowotworze, jak również histopatologicznie zdrowym marginesie guza może nieść za sobą informację co do aktywności procesu, a zatem sugerować bardziej lub mniej agresywną terapię dodatkową. Monitorowanie biologii guza może umożliwić bardziej efektywne niż dotychczas diagnozowanie i leczenie, będące szansą dla pacjenta. Nie wiemy do końca dlaczego guz nowotworowy usunięty w granicach zdrowych histopatologicznie tkanek i leczony według przyjętej procedury nawraca i prowadzi do śmierci. Być może badania nad biologią molekularną nowotworu zdołają te wątpliwości chociaż w małej części wyjaśnić.

1. Zbadanie obecności ekspresji białka RCAS1 w raku gardła i krtani. Białko to nie było dotychczas przedmiotem badań w raku głowy i szyi, dlatego też poniżej przedstawiono jego charakterystykę na podstawie dostępnej literatury.
2. Porównanie ekspresji RCAS1 w tkance nowotworowej i nienowotworowej, w tym zdrowej błonie śluzowej górnych dróg oddechowych oraz histopatologicznie zdrowym marginesie guza.
3. Analiza ekspresji RCAS1 w kontekście wybranych cech klinicznych i patologicznych guza (określonych poprzez TNM, stopień zróżnicowania guza).

2.0 Materiały metody

2.1. Charakterystyka materiału klinicznego

Łącznie przeanalizowano 120 próbek tkankowych, z których 51 tkanek raka oraz 34 tkanek zdrowego histopatologicznie marginesu nowotworowego pochodziło od chorych z rakiem płaskonabłonkowym gardła i krtani, 8 próbek tkankowych przewlekłych stanów zapalnych górnych dróg oddechowych pobrano od chorych z polipami nosa i 27 próbek tkankowych zdrowej błony śluzowej górnych dróg oddechowych pobrano od pacjentów operowanych z powodu skrzywienia przegrody nosa.

Każdy badany wyraził zgodę na pobranie próbki tkankowej do badania molekularnego. Dodatkowo uzyskano zgodę Komisji Etycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego na przeprowadzenie programu badawczego (Nr: KBET/379/13/2003).

2.1.1. Charakterystyka grupy pacjentów z chorobą nowotworową

Chorych do badań dobierano losowo. Kryterium włączenia do grupy było wylosowanie nazwiska chorego przez osobę nie związaną z badaniami przeprowadzanymi w niniejszej pracy. Rozważaniem objęto pacjentów z rakiem gardła, które ograniczono do jamy ustnej, ustnej części gardła oraz krtaniowej części gardła oraz z rakiem krtani. Wszyscy chorzy objęci programem badawczym zostali zakwalifikowani do radykalnego leczenia operacyjnego, choroba miała zasięg lokalny (głowa i szyja), na podstawie wykonanej diagnostyki przed leczeniem operacyjnym wykluczono obecność przerzutów nowotworowych. W badanej grupie przeważali mężczyźni, stanowiąc 84,4%, kobiety stanowiły 15,6% badanych. Najmłodsza z badanych kobiet miała 45 lat, a najstarsza 72. Najmłodszy mężczyzna miał 42 lata, a najstarszy 77 lat. Średnia wieku w grupie chorych z rakiem gardła i krtani wyniosła 57,2, będąc dla kobiet o ponad dwa lata niższa (55,1 lat) niż dla mężczyzn (57,6). W badanej grupie nowotwór najczęściej był obserwowany kolejno: w piątej dekadzie życia (47,2%), następnie w szóstej dekadzie życia (23,5%), w czwartej dekadzie życia (17,6%) i najrzadziej w siódmej dekadzie życia

(11,7%). U 45% badanych guz nowotworowy był ograniczony do krtani, u 41% występował w jamie ustnej i gardle, natomiast u 14% obejmował rozległe oba narządy. W badanej grupie paliło 86,4% mężczyzn, 59,3% kobiet. Użycie ponad paczki papierosów dziennie (zwykle około 80 papierosów na dobę) deklarowało 32,5% kobiet i 34,7% mężczyzn, 1 paczkę papierosów paliło 44,8% mężczyzn, podczas gdy mniej niż 1 paczkę paliło 6,7% badanych. Najczęściej wywiad w kierunku palenia tytoniu był wieloletni. Do spożycia dużych ilości alkoholu wysokoprocentowego przyznało się 7,8% badanych mężczyzn, żadna z kobiet, 23,5% mężczyzn deklarowało spożycie alkoholu częściej niż okazjonalnie.

W tabeli 2.1.1. przedstawiono charakterystykę 51 pacjentów z chorobą nowotworową, potwierdzonym rakiem płaskonabłonkowym gardła lub krtani, z uwzględnieniem lokalizacji procesu chorobowego.

Wszyscy chorzy po leczeniu operacyjnym byli konsultowani onkologicznie, 86% zakwalifikowano do uzupełniającego leczenia napromienianiem. Jednocześnie chorzy znajdowali się w stałej kontroli laryngologicznej Ambulatorium Kliniki. Grupę badanych obserwowano przez okres 18 miesięcy od operacji.

Tabela 2.1.1.1. Charakterystyka grupy chorych z rakiem płaskonabłonkowym gardła i krtani. Tkanka nowotworowa oznaczona jest kodem A

GRUPA CHORYCH Z RAKIEM PŁASKONABŁONKOWYM GARDŁA I KRTANI					
LP	KOD	WIEK	PŁEĆ	TKANKA	LOKALIZACJA GUZA
1	F21	57	M	A	Krtań (lok. głośniowa)
2	F23	72	K	A	Krtań (lok. nadgłośniowo-głośniowa typu transglottic)
3	F26	47	M	A	Gardło-korzeń języka i fałd podniebiennie-gardłowy
4	F30	55	M	A	Migdałek prawy z naciekiem na boczną ścianę gardła i korzeń języka
5	F31	60	M	A	Lewy zachyłek gruszkowaty z naciekiem na granicę bocznej i tylnej ściany gardła, naciek na chrząstkę tarczową
6	F34	45	M	A	Krtań (guz typu transglottic)
7	F36	51	M	A	Krtań (lewa kieszonka, fałd przedsińkowy i głosowy lewy, naciek na szypułkę nagłośni)
8	F38	56	M	A	Krtań (trzy piętra krtani)
9	F40	45	M	A	Korzeń języka i migdałek podniebienny prawy
10	F42	62	M	A	Krtań (guz o lok. nadgłośniowej)
11	F44	45	K	A	Wznowa okolicy tracheostomu oraz podgłośniowej
12	F46	62	M	A	Krtań (lokalizacja głośniowo-podgłośniowa) naciek chrząstki tarczowatej
13	F49	60	M	A	Migdałek podniebienny lewy z naciekiem na wyrostek zębodołowy żuchwy oraz dno jamy ustnej

14	F50	51	M	A	Guz krtaniowej i gardłowej ściany prawego zachyłka gruszkowatego oraz lewego fałdu głosowego
15	F52	54	K	A	Korzeń języka
16	F54	55	K	A	Krtań (piętro nadgłośniowe)
17	F28	47	K	A	Migdałek podniebienny lewy
18	F 98	51	M	A	Krtań (prawa połowa trzy piętra oraz zachyłek gruszkowaty)
19	F 96	68	M	A	Krtań (guz piętra nadgłośniowego)
20	F 105	65	M	A	Trzon języka i dno jamy ustnej z guzem średnicy do 3,5 cm
21	F 124	48	K	A	Podniebienie miękkie, trójkąt zatrzonowcowy, wyrostki zębodołowe zuchwy, dno jamy ustnej, część języka po lewej
22	F 103	49	M	A	Migdałek podniebienny prawy
23	F 55	70	M	A	Gardło-korzeń języka
24	F 121	62	M	A	Dno jamy ustnej po stronie prawej obejmuje trzon i brzeg języka.
25	F 129	58	M	A	Krtań (lokalizacja nadgłośniowa)
26	F 127	42	M	A	Korzeń języka po stronie prawej z naciekiem przechodzącym na migdałek podniebienny i boczną ścianę gardła.
27	F 125	57	M	A	Korzeń języka
28	F 130	51	M	A	Migdałek podniebienny lewy oraz przylegający fragment korzenia języka
29	F 126	51	M	A	Przerzutowy guz szyi po stronie lewej do próbki nr F130
30	F 128	74	M	A	Krtań (lokalizacja nadgłośniowo-głośniowa)
31	F 95	67	M	A	Krtań
32	F104	56	M	A	Guz migdałka podniebiennego lewego i przylegającej części korzenia języka
33	F2	54	M	A	Krtań (guz zlokalizowany podgłośniowo rosnący podśluzówkowo)
34	F4	77	M	A	Krtań (z zachyłkiem gruszkowatym)
35	F14	57	M	A	Krtań- guz 2/3 przednich prawego fałdu głosowego, ruchomość zachowana
36	F15	53	M	A	Krtań (z zachyłkiem gruszkowatym)
37	F16	54	M	A	Migdałek podniebienny prawy
38	F17	52	M	A	Krtań (guz prawej połowy typu transglottic, obejm. fałd przedsionkowy, kieszonkę, fałd głosowy, przechodzi na szypułę nagłośni)
39	M16	68	M	A	Krtań (guz typu transglottic lok. głośniowo-podgłośniowa, nacieczona kieszonka krtaniowa oraz podstawa nagłośni)
40	M9	66	M	A	Migdałek
41	M37	48	M	A	Krtań (guz typu transglottic)
42	A5	70	M	A	Krtań (guz nadgłośniowego piętra krtani-krtaniowej pow. nagłośni)
43	A13	51	M	A	Migdałek
44	A4	56	M	A	Trzon języka oraz dno jamy ustnej
45	M44	62	K	A	Krtań (trzy piętra)+zachyłek gruszkowaty
46	M41	58	K	A	Krtań (trzy piętra)
47	M33	69	M	A	Korzeń języka
48	M1	73	M	A	Krtań (nagłośnia z naciekiem chrząstki, zachyłek gruszkowaty)
49	M15	54	M	A	Migdałek
50	M18	51	M	A	Migdałek
51	F79	52	M	A	Guz lewego fałdu głosowego

2.1.2 Charakterystyka grupy kontrolnej

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano trzy podgrupy badanych: osoby zdrowe, przyjęte do Kliniki i operowane z powodu skrzywienia przegrody nosa, od których pobrano zdrową błonę śluzową górnych dróg oddechowych, osoby operowane z powodu polipów nosa, od których pobrano do badania tkankę polipów oraz osoby operowane z powodu choroby nowotworowej (rak gardła i krtani), należące do grupy chorych z chorobą nowotworową, od których dodatkowo pobierano zdrowy histopatologicznie margines guza nowotworowego. Badani byli dobierani losowo i zakwalifikowani do następujących podgrup:

- Grupa badanych z chorobą nowotworową, od których pobierano tkanki zdrowe histopatologicznie z marginesu guza (liczebność grupy-34 osoby, tkanka została oznaczona kodem B). W grupie tej 20% badanych stanowiły kobiety, 80% stanowili mężczyźni. Średnia wieku badanych wyniosła 56,9 lat, będąc dla kobiet o około dwa lata niższą (55,2) niż dla mężczyzn (57,3).
- Grupa badanych z polipami nosa, od których pobierano tkankę polipów, jako zdrową, nienowotworową tkankę będącą w przewlekłym stanie zapalnym, a nie stanowiącą stanu przedrakowego liczebność grupy-8 osób, tkankę oznaczono kodem C). 43% badanych stanowili mężczyźni, 57% stanowiły kobiety. Średni wiek badanych wyniósł 41,4, w tym dla kobiet był on niższy (34,2) niż dla mężczyzn (51).
- Grupa badanych, operowanych z powodu skrzywienia przegrody nosa, od których pobrano zdrową błonę śluzową górnych dróg oddechowych (liczebność grupy- 27 osób, tkanka została oznaczona kodem D). W grupie tej mężczyźni stanowili 60% badanych, natomiast kobiety stanowiły 40%. Średnia wieku wyniosła 39,2 lat, będąc dla kobiet o cztery lata niższą (36,8) niż dla mężczyzn (40,8).

Tabela 2.1.2.1. Charakterystyka grupy kontrolnej. Tkanka oznaczona kodem B - histopatologicznie zdrowy margines raka, C - przewlekły stan zapalny górnych dróg oddechowych, D- zdrowa błona śluzowa górnych dróg oddechowych.

GRUPA KONTROLNA										
LP	KOD	WIEK	PŁEĆ	TKANKA		LP	KOD	WIEK	PŁEĆ	TKANKA
52	F22	72	K	B		87	M28	45	K	C
53	F24	47	M	B		88	M7	34	K	C
54	F25	57	M	B		89	M3	33	M	C
55	F27	47	K	B		90	M22	54	M	C
56	F29	55	M	B		91	M38	128	K	C
57	F32	60	M	B		92	M4	130	K	C
58	F33	45	M	B		93	M34	166	M	C
59	F35	51	M	B		94	M200	57	K	D
60	F37	56	M	B		95	M201	14	K	D
61	F39	45	M	B		96	M202	37	M	D
62	F41	62	M	B		97	M203	21	M	D
63	F43	45	K	B		98	M204	29	K	D
64	F45	62	M	B		99	M205	50	M	D
65	F47	49	M	B		100	M206	49	K	D
66	F48	60	M	B		101	M207	45	M	D
67	F51	51	M	B		102	M208	33	M	D
68	F53	55	K	B		103	M209	51	M	D
69	F 99	51	M	B		104	M210	25	M	D
70	F 100	68	M	B		105	M211	57	M	D
71	F 102	65	M	B		106	M212	52	M	D
72	F 118	48	K	B		107	M213	29	K	D
73	F 119	62	M	B		108	M214	16	K	D
74	F 120	58	M	B		109	M215	33	M	D
75	F 123	42	M	B		110	M216	44	M	D
76	F 131	74	M	B		111	M217	56	K	D
77	F132	51	M	B		112	M218	60	M	D
78	F95	56	M	B		113	M219	51	M	D
79	M31	68	M	B		114	M220	57	K	D
80	M24	66	M	B		115	M221	18	M	D
81	M13	48	M	B		116	M222	26	K	D
82	M25	62	K	B		117	M223	16	K	D
83	M11	58	K	B		118	M224	33	M	D
84	M52	69	M	B		119	M225	44	M	D
85	M50	73	M	B		120	M226	56	K	D
86	M51	54	M	B						

2.2. Analiza biochemiczna

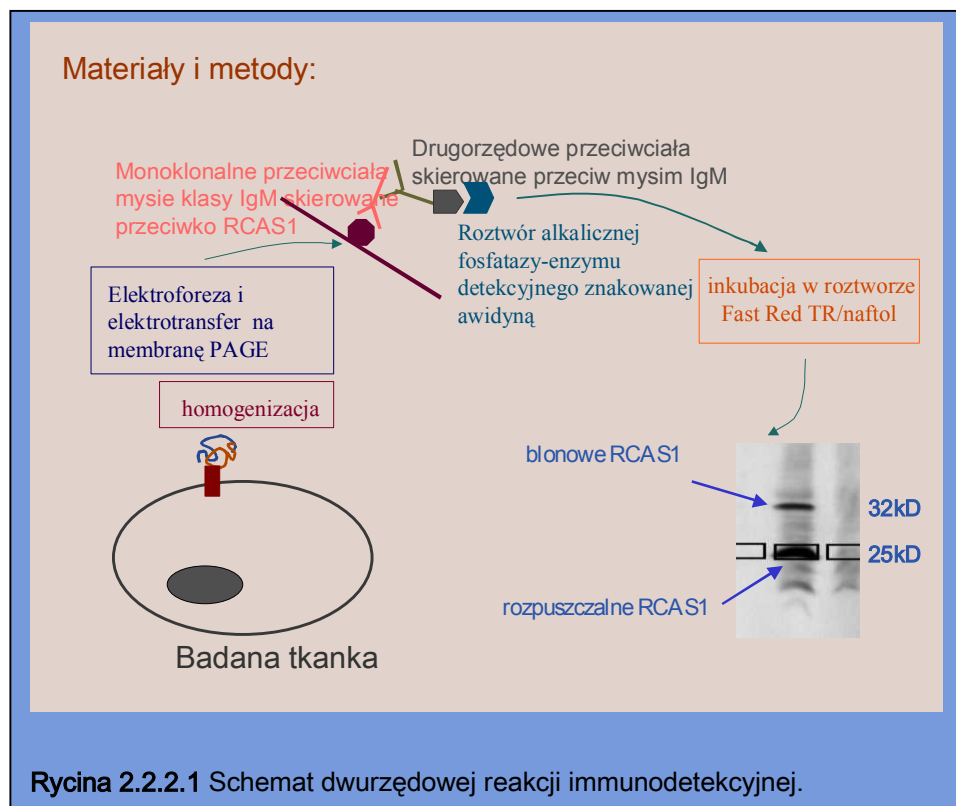
2.2.1 Przygotowanie materiału badawczego

Próbki tkanek zostały pobrane z materiału uzyskanego w wyniku wykonania typowego zabiegu operacyjnego radykalnego onkologicznie. Materiał ten był bezpośrednio po usunięciu, na sucho, w lodzie przekazywany do Katedry Patomorfologii, gdzie patolog wycinał dla potrzeb dalszych badań molekularnych fragment odpowiedniej tkanki o wymiarach 5x5mm, oznaczał kodem i natychmiast zamrażał w temperaturze minus 90°C. Pozostała część materiału była utrwalana w roztworze formaldehydu dla potrzeb dalszej oceny histopatologicznej materiału pooperacyjnego. W kolejnej fazie eksperymentu zamrożone próbki rozmrażano do temperatury około 0°C (w lodzie), dokonano homogenizacji z zastosowaniem szklanego homogenizatora tkankowego (szkło-szkło typu *Potter-Elvehjem*). Homogenizacja została wykonana ze starannością w zakresie utrzymania stałej temperatury, nie doprowadzono do rozgrzewania homogenizatora. W trakcie homogenizacji dodano koktajl inhibitorów proteinaz (*Complete-Roche, Niemcy*). Następnie w stosunku 1:1 po odpipetowaniu, zmieszano otrzymany materiał z buforem (125 mM tris-HCl pH 6.8 zawierającym 4% siarczan dodecyłu sodu - SDS i 20% glicerol). Tak przygotowany materiał zamrożono do temperatury minus 20 stopni Celsjusza. Każda badana tkanka była zakodowana celem obiektywizacji warunków oceny. Niezależnie od oznaczenia zgromadzono informacje, dotyczące szczegółowo charakteru i przebiegu choroby. Dopiero po zakończeniu eksperymentu badawczego rozkodowano dane. Kodowania dokonała trzecia osoba nie uczestnicząca w badaniach.

2.2.2 Dwurzędowa reakcja immunodetekcyjna – eksperyment przeprowadzono w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biotechnologii UJ

Materiał tkankowy rozmrożono i gotowano na wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut celem solubilizacji nierozpuszczalnych białek. Po zwirowaniu w supernatantach oznaczono poziom białka całkowitego z wykorzystaniem metody kwasu bincyncholowego (BCA). Próbkę zawierającą po 50 µg białka całkowitego została nałożona następnie na żele poliakrylamidowe SDS-PAGE typu tris-tricyna [75]. Po przeprowadzeniu rozdzielania elektroforetycznego został dokonany elektrotransfer mokrego białka z żelu na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF). Elektrotransfer prowadzony był w buforze 10 mM kwas 3-(cykloheksylamino)-propanosulfonowy (CAPS) pH 11.0 z dodatkiem 10 % objętościowych metanolu. Niespecyficzne miejsca wiążące membrany zostały zablokowane następnie poprzez całkowite łagodne mieszanie w temperaturze 4°C w 5% roztworze albuminy wołowej w buforze TST (0.01 M tris-HCl pH 7,4, 0.9% NaCl, 0.05 % Tween-20). Po blokowaniu membranę traktowano przez 1.5 godziny w temperaturze pokojowej roztworem mysich przeciwciał monoklonalnych anti-RCAS1 (*Medical and Biological Laboratories, Japonia*) stosując rozcieńczenie przeciwciał 1 : 5 000 w stosunku objętościowym do buforu TST. Po zlaniu przeciwciał zastosowano cztery pięciominutowe cykle płukania w buforze TST bez dodatków, a następnie membrana była traktowana przez 1.5 godziny w temperaturze pokojowej roztworem drugorzędowych przeciwciał anti-mysia-IgM, specyficznych w stosunku do łańcucha μ (*SIGMA, USA*). Drugorzędowe przeciwciała stosowano w rozcieńczeniu 1 : 5 000 w stosunku objętościowym do buforu TST. Następnie ponownie czterokrotnie płukano buforem TST bez dodatków, po czym traktowano roztworem enzymu detekcyjnego alkalicznej fosfatazy znakowanej awidyną (*SIGMA, USA*). Enzym został użyty w rozcieńczeniu 1 : 5 000 w stosunku objętościowym do buforu TST. Po ostatnich czterech cyklach płukania w buforze TST membrana została umieszczona w roztworze substratu Fast Red TR/naftol AS/MX wykonanego z gotowego zestawu tabletek (*SIGMA, USA*). Po około pięciu minutach inkubacji otrzymano ceglano-czerwone prążki w

miejscach obecności antygenu RCAS1, substrat został wylany i membranę wypłukano przez pięć minut w wodzie po czym została wysuszona.



Przeprowadzona dwurzędowa reakcja immunodetekcyjną została opracowana w zespole: dr n. med. Paweł Mak, lek. med. Magdalena Dutsch-Wicherek oraz lek. med. Łukasz Wicherek.

2.2.3 Analiza ilościowa prążka o masie cząsteczkowej 32kD

Dla przeprowadzenia analizy ilościowej membrany skanowano (w aparacie *Fluor-S MultiImager-BioRad, USA*). Otrzymane skany przeanalizowano za pomocą oprogramowania *QuantityOne (BioRad, USA)*. Ilość antygenu RCAS1 jest proporcjonalna do intensywności barwy jego prążków i wyrażona została w bezwymiarowych jednostkach względnych, liczonych w stosunku do intensywności prążka RCAS1 zawsze tej samej próbki kalibracyjnej (w zależności od serii oznaczeń kolejnej próbki standardowej: próbka oznaczona numerem: 5, A38, F28, F38). Na każdym blocie znajduje się jedna ścieżka zawierająca standardy mas cząsteczkowych, jedna ścieżka zawierająca próbkę kalibracyjną ilości RCAS1,

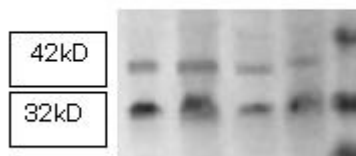
identyczną we wszystkich oznaczeniach i następnie 12 ścieżek zawierających oznaczane próbki. Na podstawie ścieżki ze standardami mas cząsteczkowych zidentyfikowano prążki antygeny RCAS1 o masie 32 kDa na ścieżce kalibracyjnej oraz ścieżkach badanych [24,25,76]. Następnie określono intensywność tych prążków w pikselach. Uzyskane liczby pikseli każdego z prążków podzielone zostały przez intensywność pikselową prążka RCAS1 próbki kalibracyjnej znajdującej się na pierwszej ścieżce. Otrzymany wynik jest przedstawiony w postaci bezwymiarowych jednostek intensywności liczonych względem prążka kalibracyjnego. Prążek RCAS1 ścieżki kalibracyjnej zawsze posiadał w ten sposób intensywność równą 1.00, zaś pozostałe prążki próbek badanych odnoszone są do tej jego intensywności. Ponieważ na każdą ścieżkę nałożono zawsze po 50 µg białka całkowitego oznaczanych próbek, to analizowane w niniejszej pracy ilości antygeny RCAS1 zawsze będzie odnosić się do zawartości względnej prążka 32 kD antygeny RCAS1 w 50 µg próbki [76].

2.2.4 Kontrolna analiza względnej zawartości *beta*-Aktyny, prążek o masie cząsteczkowej 42 kD

Przedstawiona powyżej dwurzędowa reakcja immunodetekcyjna wykorzystująca monoklonalne przeciwciała przeciw RCAS1 pozwala oznaczyć ilość badanego białka względem próbki kontrolnej w ilości 50µg białka całkowitego zawartego w próbce. Jako kontrolę dla RCAS1 wybrano białko cytoszkieletu, β -Aktynę, która oprócz kontroli jakościowej stanowi w przeprowadzonym eksperymencie wykładnik zawartości komórek w badanym preparacie tkankowym.

Po wykonaniu elektrotransferu na membrany PVDF, wcześniej opisaną reakcję immunodetekcyjną uzupełniono o drugą reakcję przeprowadzoną jednocześnie, pozwalającą oznaczyć względną ilość β -Aktyny (w stosunku do próbki kontrolnej w 50µg białka całkowitego). W pierwszym etapie dwurzędowej reakcji uzupełniającej zastosowano monoklonalne przeciwciała przeciw β -Aktynie (*Sigma Aldrich*). Natomiast drugi etap zrealizowano na bazie przeciwciał monoklonalnych przeciw mysjemu fragmentowi Fc sprzężonych z peroksydazą chrzanową.

Zastosowanie innego enzymu redukcyjnego pozwala na użycie innego barwnika niż w pierwszej reakcji (dla RCAS1). W efekcie otrzymano dwa różnokolorowe prążki. Czerwonawy prążek dla RCAS1 i brązowo fioletowawy prążek dla β -Aktyny. Przykład różnokolorowych prążków przedstawia rycina 2.2.4.1



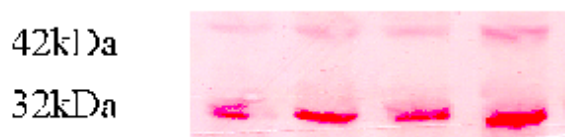
Rycina 2.2.4.1 Efekt dwurzędowej reakcji immunodetekcyjnej. Prążek o masie 42 kD odpowiada β -Aktynie. Natomiast prążek o masie 32 kD odpowiada RCAS1.

Dodatkowym argumentem przemawiającym za wyborem β -Aktyny do roli białka kontrolnego jest jej masa cząsteczkowa. Masa 42 kD pozwala w sposób jednoznaczny zobrazować dwa różne prążki (32kD i 42kD). Lokalizacja w podobnym zakresie mas cząsteczkowych pozwala w jednym rodzaju żelu dokonać elektroforezy, nie powoduje to ryzyka powstania błędu wynikającego z różnych żeli do przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego białek o znacznie odbiegających masach cząsteczkowych.

Przeprowadzenie jednocześnie dwóch reakcji immunodetekcyjnych (dla RCAS1 i β -Aktyny) w obrębie jednego blotu pozwala obiektywnie analizować i porównać statystyczny rozkład ilości jednego białka względem drugiego.

3.0 Wyniki

Białko RCAS1 w przeprowadzonej analizie metodą Western blot zidentyfikowano jako prążek o masie 32 kD, natomiast białko kontrolne β -Aktynę jako prążek o masie 42kD.



Rycina 3.0.1. Przedstawia blot będący wynikiem dwurzędowej reakcji immunodetekcyjnej. Prążek o masie 32kD odpowiada badanemu białku RCAS1, natomiast prążek o masie 42kD odpowiada białku kontrolnemu *beta*-Aktynie.

W przeprowadzonym eksperymencie stwierdzono obecność białka RCAS1 we wszystkich badanych tkankach raka płaskonabłonkowego gardła i krtani. Otrzymane wartości średniej względnej ilości RCAS1 w badanych próbkach przedstawiono w Tabeli 3.0.1.

Tabela 3.0.1. Średnia względna ilość białka RCAS1 w badanych tkankach raka płaskonabłonkowego w konfrontacji z klinicznymi i patologicznymi cechami guza nowotworowego oraz przebiegiem choroby. G- stopień zróżnicowania komórek nowotworowych, T- wielkość guza, N- obecność przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych, R- wznowa procesu nowotworowego w okresie 18 miesięcznej obserwacji, Z-zgon chorego.

Lp	Kod próbki	Względna ilość RCAS1	G	N	T	Przebieg choroby	Rodzaj zabiegu operacyjnego
1	F21	1,746211	G 2	N 2	T2	R	Laryngectomia tot. Lymphangectomia bil.
2	F23	0,593588	G 2	N 0	T3	R	Laryngectomia tot. Lymphangectomia bil.
3	F26	0,560752	G 3	N 2	T2	R, Z	Pharyngectomia partialis. Modifide radical neck dissection sin. Operatio modo Crile dex.
4	F30	2,45	G 3	N 2	T3	-	Extirpatio tu mesopharyngis. Lymphangectomia dex.
5	F31	0,54	G 2	N 2	T4	-	Laryngectomia totalis. Pharyngectomia partialis. Lymphangectomia bilateralis.
6	F34	0,147153	G 2	N 0	T3	R	Laryngectomia tot. Lymphangectomia bil.
7	F36	0,822569	G 2	N 1	T3	-	Laryngectomia tot. Lymphangectomia bil.
8	F38	0,994	G 3	N2	T3	-	Laryngectomia totalis. Lymphangectomia bilatealis.
9	F40	0,162854	G 2	N 2	T2	R	Extirpatio tu radice lingue et tonsillae palatinae dex. Lymphangectomia bilateralis.
10	F42	0,57	G 2	N 0	T2	-	Reoperatio. Laryngectomia totalis. Operatio explorativa colli bilateralis. Stan po operacji częściowej z powodu ca 2 lata wcześniej.
11	F44	0,52	G 2	N 2	T3	R	Laryngopharyngectomia Stan po operacji usunięcia lewej połowy gardła oraz krtani 6 miesięcy wcześniej.
12	F46	0,54	G 2	N 0	T4	-	Laryngectomia totalis.
13	F49	0,393541	G 3	limfang.	T3	R	Extirpatio tu tonsillae, lingue, resectio partialis mandibulae. Pectoralis flap. Stan po resekcji raka języka I op. węzłowej 8 lat wcześniej.
14	F50	1,376046	G 2	N 2	T2	R	Laryngectomia totalis. Pharyngectomia partialis. Operatio Crile dex. Lymphangectomia sin.
15	F52	2,250913	G 3	N 2	T 1	R	Extirpatio tu radice lingue. Lymphangectomia dex.
16	F54	1,330195	G 2	N 0	T 2	-	Laryngectomia partialis. Lymphangectomia bilateralis.
17	F28	1,000349	G 2	N2	T1	-	Extirpatio tu tonsillae sin cum lymphangectomia sin.
18	F 98	0,706068	G 2	N 2	T 3	R	Laryngectomia totalis. Lymphangectomia bilateralis.
19	F 96	1,258917	G 3	N 2	T 2	-	Laryngectomia horizontalis. Lymphangectomia selectiva bilateralis.
20	F 105	1,878974	G 3	N 0	T 2	R, Z	Extirpatio tu fundi oris et corporis lingue. Lymphangectomia sin.
21	F 124	1,830052	G 2	N 0	T 3	R	Extirpatio tu oropharyngis et mandibulae. Lymphangectomia sin.
22	F 103	1,310659	G 2	N 2	T 2	-	Extirpatio tu mesopharyngis dex. Operatio modo Crile dex. Operatio plastica pharyngis pectoralis flap.

23	F 55	1,331308	G 3	N 2	T 2	-	Pharyngectomy partialis. Lymphangectomy bilateralis.
24	F 121	1,239064	G 3	N 2	T 2	-	Extirpation of the tongue and floor of the mouth. Lymphangectomy bilat.
25	F 129	1,21368	G 3	N 0	T 2	-	Laryngectomy totalis cum lymphangectomiam bilateralis.
26	F 127	1,533371	G 3	N 2	T 3	-	Excision of the mesopharynx and tongue. Lymphangectomy of the neck dex. Reconstruction pharynx pectoralis flap
27	F 125	1,929473	G 3	N 2	T 3	-	Extirp. of the mesoph. flap
28	F 130	0,770328	G 3	N 2	T 3	R, Z	Extirpation of the mesopharynx. Reconstruction pectoralis flap.
29	F 126	1,17285	G 3	N 2	T 3	-	Extirp. of the meta colli.
30	F 128	0,835663	G 2	N 0	T 2	R	Laryngectomy frontolateralis enlargata. Lymphangectomy selective bilateralis.
31	F 95	0,800192	G 2	N 0	T 2	-	Laryngectomy totalis
32	F104	1,505212	G 2	N 1	T 3	-	Extirpation of the root of the tongue and tonsils. Lymphangectomy bilateralis. Pectoralis flap.
33	F2	1,084507	G 2	N 0	T 1	-	Laryngectomy totalis cum resectione lobi sinistri gl. thyroideae.
34	F4	0,86	G 3	N 0	T 3	-	Laryngectomy totalis
35	F14	0,57	G 1	N 0	T 1	-	Chordectomy dex (zakładkowa)
36	F15	0,745408	G 2	N 2	T 1	-	Laryngectomy totalis
37	F16	1,510862	G 2/3	N 2	T 3	-	Extirpation of the tonsils dex. Operatio Crile dex. Reconstruction pectoralis flap.
38	F17	0,682559	G 2	N 0	T 3	-	Laryngectomy subtotalis cum lymphangectomia bilat.
39	M16	1,19647	G 2	N 0	T 3	R	Laryngectomy totalis. Lymphangectomy bilat. Stan po chemioterapii 1 rok wcześniej.
40	M9	0,96194	G 2	N 2	T 1	-	Extirp. of the mesopharynx
41	M37	1,21631	G 2	N 0	T 3	-	Laryngectomy totalis
42	A5	1,31723	G 3	N 2	T 4	R	Laryngectomy tot. Lymphangectomy sin. St post laryngectomiam partialem (1999) et radioth. 2002)
43	A13	1,8717	G 3	N 2	T 2	R, Z	Extirp. of the mesopharynx
44	A4	1,24658	G 2	N 0	T 3	-	Extirpation of the floor of the mouth, body of the tongue and mandibulae. Stan po operacji i napromienianiu 2 lata wcześniej.
45	M44	2,07541	G 2	N 0	T 2	R	Laryngectomy totalis
46	M41	0,48116	G 2	N 0	T 2	-	Laryngectomy partialis
47	M33	1,13271	G 2	N 2	T 2	-	Extirpation of the mesopharynx
48	M1	0,58657	G 2	N 0	T 4	-	Laryngectomy totalis. Pharyngectomy partialis. Stan po napromienianiu z powodu ca laryngis 20 lat wcześniej.
49	M15	1,04208	G 2	N 0	T 2	-	Extirpation of the mesopharynx
50	M18	0,56764	G 2	N 0	T 2	-	Extirpation of the mesopharynx
51	F79	2,7586	G 3	N 0	T 1	R	Chordectomy enlargata sin. Lymphangectomy selective sin.

W przeprowadzonej analizie dalszych losów pacjentów na podstawie obserwacji 18 miesięcznej stwierdzono wznowę miejscową procesu nowotworowego u 37,2% (19 pacjentów) badanych, natomiast u 7,8% (4 pacjentów) doszło do rozsiewu procesu nowotworowego i śmierci.

Względną ilość RCAS1 oznaczono w sumie w 120 próbkach tkankowych, w tym w 51 próbkach raka płaskonabłonkowego gardła i krtani, 34 próbkach tkankowych histopatologicznie zdrowych marginesów raka, 8 próbkach tkankowych pochodzących z przewlekłego stanu zapalnego górnych dróg oddechowych oraz 27 próbkach tkankowych zdrowej błony śluzowej górnych dróg oddechowych. Natomiast wartość względną białka kontrolnego beta Aktyny oznaczono w 93 próbkach tkankowych, w tym w 40 próbkach raka płaskonabłonkowego gardła i krtani, 29 próbkach tkankowych histopatologicznie zdrowych marginesów raka oraz 24 próbkach tkankowych zdrowej błony śluzowej górnych dróg oddechowych.

Obecność białka RCAS1 wykazano we wszystkich tkankach nowotworowych poddanych analizie. Białko to zidentyfikowano również w tkankach zdrowego histopatologicznie marginesu tych nowotworów i błonie śluzowej górnych dróg oddechowych będącej w przewlekłym stanie zapalnym. RCAS1 nie było natomiast obecne w tkankach zdrowej błony śluzowej górnych dróg oddechowych uzyskanych od pacjentów operowanych z powodu choroby nienowotworowej. Nie wykazano różnic w zakresie ekspresji białka kontrolnego β -Aktyny w badanych tkankach. Wyniki średniej względnej ilości RCAS1 oraz białka kontrolnego β -Aktyny w badanych tkankach nowotworowych oraz grupie kontrolnej przedstawiono w Tabeli 3.0.2.

Tabela 3.0.2. Względna ilość RCAS1 oraz β -Aktyny w badanych tkankach nowotworowych oraz tkankach grupy kontrolnej. Tkanka nowotworowa: A - rak płaskonabłonkowy gardła i krtani. Grupa kontrolna: B - zdrowy histopatologicznie margines nowotworu, C-przewlekły stan zapalny górnych dróg oddechowych (polipy nosa), D-zdrowa błona śluzowa górnych dróg oddechowych.

Tkanka nowotworowa					Grupa kontrolna					Grupa kontrolna				
Lp	No	RCAS1	<i>beta</i> Aktyna	Kod	Lp	No	RCAS1	<i>beta</i> Aktyna	K	Lp	No	RCAS1	<i>beta</i> Aktyna	Kod
1	F21	1,746211	1,015831	A	52	F22	1,128224	1,573801	B	94	M200	0	1,01306	D
2	F23	0,593588	0,969619	A	53	F24	1,158834	0,89281	B	95	M201	0	0,96104	D
3	F26	0,560752	1,81117	A	54	F25	1,30749	1,77842	B	96	M202	0	0,91509	D
4	F30	2,45	1,602875	A	55	F27	0,139192	1,73696	B	97	M203	0	1,12553	D
5	F31	0,54	1,353645	A	56	F29	0,731768	0,796115	B	98	M204	0	0,79601	D
6	F34	0,147153	0,417904	A	57	F32	0,429055	1,218489	B	99	M205	0	1,00244	D
7	F36	0,822569	2,336041	A	58	F33	0,209085	0,593786	B	100	M206	0	1,3065	D
8	F38	0,994	1,42	A	59	F35	0,53	1,239918	B	101	M207	0	1,23172	D
9	F40	0,162854	0,462496	A	60	F37	0,362974	1,030821	B	102	M208	0	1,01242	D
19	F42	0,57	1,014676	A	61	F39	0,271016	0,769669	B	103	M209	0	1,04715	D
11	F44	0,52	0,861808	A	62	F41	0,304381	0,864421	B	104	M210	0	1,27057	D
12	F46	0,54	1,052628	A	63	F43	0,594434	1,688154	B	105	M211	0	1,38804	D
13	F49	0,393541	0,799659	A	64	F45	0	0,197833	B	106	M212	0	0,84421	D
14	F50	1,376046	0,641078	A	65	F47	0,65451	0,901852	B	107	M213	0	1,25661	D
15	F52	2,250913	1,464779	A	66	F48	0,9	0,86139	B	108	M214	0	1,12902	D
16	F54	1,330195	0,725	A	67	F51	1,246328	1,115171	B	109	M215	0	0,97625	D
17	F28	1,000349	1,000009	A	68	F53	0,462247	1,248359	B	110	M216	0	1,37093	D
18	F 98	0,706068	1,831405	A	69	F 99	1,364866	1,892969	B	111	M217	0	1,28206	D
19	F 96	1,258917	2,069806	A	70	F 100	0,87	1,47636	B	112	M218	0	0,92346	D
20	F 105	1,878974	2,241706	A	71	F 102	1,782117	2,156	B	113	M219	0	1,17699	D
21	F 124	1,830052	2,69011	A	72	F 118	1,490272	2,050799	B	114	M220	0	1,06371	D
22	F 103	1,310659	2,552782	A	73	F 119	0,898761	1,40225	B	115	M221	0	0,87308	D
23	F 55	1,331308	2,216078	A	74	F 120	0,880613	1,205936	B	116	M222	0	1,08567	D
24	F 121	1,239064	1,230909	A	75	F 123	0,984	0,950229	B	117	M223	0	1,15939	D
25	F 129	1,21368	1,220835	A	76	F 131	1,231004	1,324095	B	118	M224	0	1,03574	D
26	F 127	1,533371	1,260686	A	77	F132	1,9321	1,09343	B	119	M225	0	1,05647	D
27	F 125	1,929473	1,563963	A	78	F95	0,8792	1,32413	B	120	M226	0	1,12407	D
28	F 130	0,770328	1,158362	A	79	M31	0,50222	-	B					
29	F 126	1,17285	1,038423	A	80	M24	0,36558	-	B					
30	F 128	0,835663	1,125488	A	81	M13	0,33819	-	B					
31	F 95	0,800192	1,323943	A	82	M25	0,4589	-	B					
32	F104	1,505212	0,585204	A	83	M11	0,28596	-	B					
33	F2	1,084507	0,314451	A	84	M52	0,40788	-	B					
34	F4	0,86	0,375175	A	85	M50	0,18493	-	B					
35	F14	0,57	0,129943	A	86	M51	0,00942	-	B					
36	F15	0,745408	0,608432	A	87	M28	0,8964	-	C					
37	F16	1,510862	1,098239	A	88	M7	0,9584	-	C					
38	F17	0,682559	0,456967	A	89	M3	0,698	-	C					
39	F79	2,7586	1,1876	A	90	M22	0,5334	-	C					
40	M16	1,19647	-	A	91	M38	0,5372	-	C					
41	M9	0,96194	-	A	92	M4	0,9386	-	C					
42	M37	1,21631	-	A	93	M34	0,3305	-	C					
43	A5	1,31723	-	A										
44	A13	1,8717	-	A										
45	A4	1,24658	-	A										
46	M44	2,07541	-	A										
47	M41	0,48116	-	A										
48	M33	1,13271	-	A										
49	M1	0,58657	-	A										
50	M15	1,04208	-	A										
51	M18	0,56764	-	A										

3.1 Ocena ekspresji RCAS1 i *beta*-Aktyny w tkance nowotworowej i nienowotworowej

Porównano poziom ekspresji białka RCAS1 w tkankach nowotworowych oraz w tkance nienowotworowej. Zaobserwowano znamienne statystycznie wyższe

wartości ekspresji białka w próbkach tkankowych raka, aniżeli w próbkach tkankowych nienowotworowych (zdrowym histopatologicznie marginesie guza i przewlekłym stanie zapalnym górnych dróg oddechowych). Nie wykazano różnic w ekspresji białka kontrolnego β -Aktyny w porównanych tkankach. Wyniki ilustruje Tabela 3.1.1. oraz rycina 3.1.1.

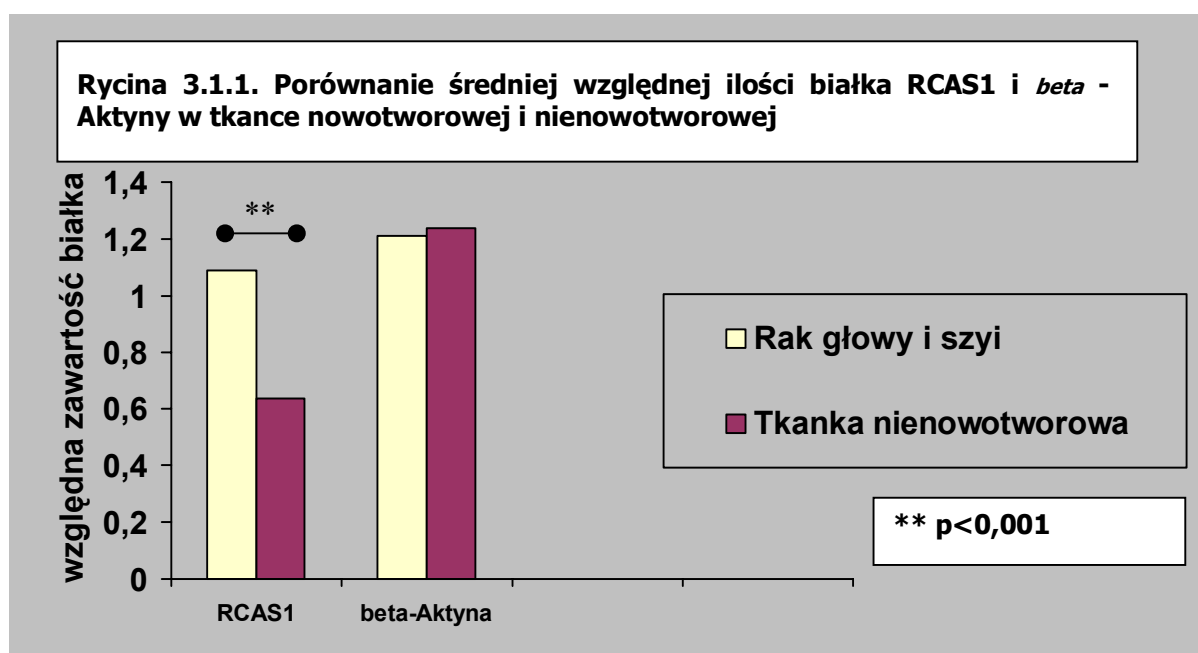


Tabela 3.1.1. Porównanie średniej względnej ilości białka RCAS1 w tkance nowotworowej (A) i nienowotworowej (B, C).

Rodzaj tkanki	Tkanka nowotworowa (n=51)	Tkanka nienowotworowa (n=42)	Wartość p
Średnia względna wartość RCAS1 ⁴ (odchylenie standardowe)	1,089 (±0,535)	0,6367 (±0,44)	0,000032
Średnia względna wartość β-Aktyny ⁵ (odchylenie standardowe)	1,21163 (±0,648)	1,2386 (±0,47)	0,6

Przeanalizowano poziom ekspresji białka RCAS1 w tkankach nowotworowych w odniesieniu do TNM, określonych zgodnie z zasadami klasyfikacji przyjętymi

⁴ Wartości względne RCAS1 charakteryzują się rozkładem normalnym, do obliczeń zastosowano test t-Studenta

⁵ Wartości względne beta-Aktyny cechuje brak rozkładu normalnego, do obliczeń zastosowano test Manna-Whitneya.

przez UICC⁶ w 1990 roku. Porównanie ekspresji RCAS1 z wielkością guza nie wykazało różnic znamiennej statystycznie.

Nie wykazano również różnic w zakresie ekspresji białka kontrolnego β -Aktyny w analizowanych tkankach. Wyniki ilustruje Tabela 3.1.2.

Tabela 3.1.2. Porównanie względnej ilości RCAS1 w zależności od wielkości guza, zgodnie z zasadami klasyfikacji TNM.

Rozmiar guza	T1	T2	T3	T4
liczebność	7	20	20	4
Średnia wartość RCAS1 w guzie (odchylenie standardowe)	1,1021 ($\pm 0,5933$)	1,1828 ($\pm 0,6224$)	1,0826 ($\pm 0,5784$)	0,9519 ($\pm 0,5166$)

Porównanie ekspresji RCAS1 w tkankach guza, w których obecne były przerzuty w okolicznych węzłach chłonnych zaklasyfikowane jako N2, do tkanek guza, któremu towarzyszyły pojedyncze (N1) przerzuty w węzłach chłonnych lub przerzuty nie były obecne (N0) wykazało wyższą wartość w tkankach nowotworów, którym towarzyszyły przerzuty w węzłach chłonnych N2. Różnica nie była znamienna statystycznie. Wyniki ilustruje Tabela 3.1.3.

Tabela 3.1.3. Porównanie względnej ilości RCAS1 w tkance guza z obecnością przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych zgodnie z zasadami klasyfikacji TNM.

Stan węzłów chłonnych	N0, N1 (n=27)	N2 (n=24)	Wartość p
Średnia względna wartość RCAS1 (odchylenie standardowe)	0,984 ($\pm 0,5883$)	1,287 ($\pm 0,5504$)	0,06

Porównanie ekspresji RCAS1 w tkankach pobranych od pacjentów posiadających przerzuty w okolicznych węzłach chłonnych, kiedy naciek nowotworu przekraczał torebkę węzła do ilości RCAS1 w tkankach pobranych od pacjentów, u których przerzuty były obecne w okolicznych węzłach chłonnych, lecz naciek nowotworu nie przekraczał torebki węzła wykazało **statystycznie znamienne wyższą ilość białka u pacjentów, u których naciek nowotworu przekraczał torebkę węzła**. Wyniki ilustruje Tabela 3.1.4.

⁶ UICC- International Union Against Cancer

Tabela 3.1.4. Porównanie względnej ilości RCAS1 w tkance guza otrzymanej od osób, u których były obecne przerzuty w okolicznych węzłach chłonnych i naciek nowotworu przekraczał torebkę węzła, z ilością RCAS1 u pacjentów, u których były obecne przerzuty nowotworowe w okolicznych węzłach chłonnych, lecz naciek nowotworu nie przekraczał torebki węzła.

Rodzaj nacieku	Naciek przekracza torebkę węzłów (n=16)	Naciek nie przekracza torebki węzłów (n=10)	Wartość p
Średnia względna wartość RCAS1 ⁷ (odchylenie standardowe)	1,4631 (±0,5285)	0,8681 (±0,4362)	0,0011
Średnia względna wartość β-Aktyny ⁸ (odchylenie standardowe)	1,2019 (±0,4103)	1,2147 (±0,3962)	0,8

Porównanie średniej względnej ilości RCAS1 w badanych próbkach tkanek nowotworów złośliwych do stopnia zróżnicowania guza wykazało znamienne statystycznie wyższą ekspresję białka w nowotworach o niskim stopniu zróżnicowania. Wyniki ilustruje Tabela 3.1.5.

Tabela 3.1.5. Porównanie względnej ilości RCAS1 do stopnia zróżnicowania nowotworu wykazało różnice znamienne statystycznie.

Stopień zróżnicowania nowotworu	G1 (n=1)	G2 (n=31)	G3 (n=19)	Wartość p
Średnia względna ilość RCAS1 (odchylenie standardowe)	-	1,005 (±0,4852)	1,3541 (±0,6801)	0,038

Analiza średniej względnej ilości RCAS1 w raku ograniczonym do gardła, raku ograniczonym tylko do krtani oraz raku obejmującym gardło i krtani ujawniła najwyższą średnią ilość białka RCAS1 w raku gardła, następnie w raku krtani, a najniższą w raku obejmującym oba narządy (różnica nie była znamienne statystycznie).

Tabela 3.1.6. Porównanie względnej ilości RCAS1 w tkance guza obejmującej krtani, gardło, oraz oba narządy nie wykazało różnic znamienych statystycznie.

Narząd	Rak krtani (n=23)	Rak gardła (n=21)	Rak obejmujący oba narządy (n=7)
Średnia względna ilość RCAS1 (odchylenie standardowe)	1,0267 (±0,5798)	1,2928 (±0,6119)	0,8809 (±0,3741)

⁷ Wartości względne RCAS1 charakteryzują się rozkładem normalnym, do obliczeń zastosowano test t-Studenta

⁸ Wartości względne beta-Aktyny cechuje brak rozkładu normalnego, do obliczeń zastosowano test Manna Whitneya.

3.2 Porównanie ekspresji RCAS1 i *beta*-Aktyny w guzie i zdrowym histologicznie marginesie.

Porównano poziom ekspresji białka RCAS1 w tkankach nowotworowych oraz w ich zdrowym histopatologicznie marginesie. Zaobserwowano znamienne statystycznie wyższe wartości ekspresji białka w próbkach tkankowych raka, aniżeli w próbkach tkankowych marginesu. Nie wykazano różnic w zakresie ekspresji białka kontrolnego β -Aktyny w porównanych tkankach. Wyniki ilustruje Tabela 3.2.1 oraz rycina 3.2.1.

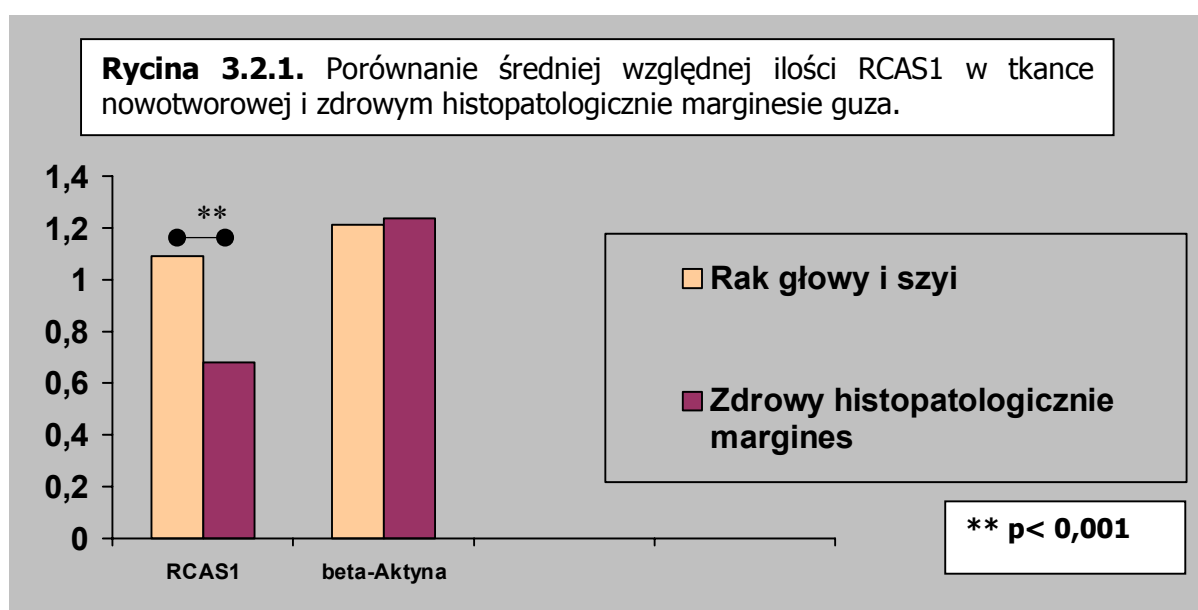


Tabela 3.2.1. Porównanie średniej względnej ilości RCAS1 w tkance nowotworowej i zdrowym histopatologicznie marginesie guza.

Rodzaj tkanki	Tkanka nowotworowa (n=51)	Zdrowy histologicznie margines nowotworu (n=34)	Wartość p
Średnia względna wartość RCAS1 ⁹ (odchylenie standardowe)	1,089 (±0,535)	0,6817 (±0,461)	0,00057
Średnia względna wartość β-Aktyny ^{10,11} (odchylenie standardowe)	1,2116 (±0,648)	1,2386 (±0,47)	0,6

⁹ Wartości względne RCAS1 charakteryzują się rozkładem normalnym, do obliczeń zastosowano test t-Studenta

¹⁰ Wartości względne beta-Aktyny cechuje brak rozkładu normalnego, do obliczeń zastosowano test Manna Whitneya.

¹¹ W grupie tkanka nowotworowa względną ilość białka kontrolnego oznaczono dla 39 próbek tkankowych. Natomiast w grupie zdrowy histopatologicznie margines nowotworu oznaczenia białka kontrolnego wykonano dla 27 próbek tkankowych.

Przeanalizowano również 27 próbek tkankowych raka gardła i krtani, w których pobrano do analizy fragmenty tkanek bezpośredniego marginesu guza nowotworowego, będącego pod względem histopatologicznym tkanką zdrową. Porównanie średniej względnej ilości RCAS1 w tkankach raka płaskonabłonkowego do tkanek zdrowego histologicznie marginesu guza wykazało, jak wcześniej pokazano statystycznie znamienne wyższą ilość białka w tkankach raka (Tabela 3.2.2).

Tabela 3.2.2. Charakterystyka pacjentów dla których określono zawartość RCAS1 w guzie oraz w marginesie zdrowym histopatologicznie. Obok numeru kodu próbki zamieszczono informację w nawiasie kwadratowym dotyczącą przebiegu choroby, (r- nawrót choroby nowotworowej w okresie 18-miesięcznej obserwacji od zabiegu operacyjnego, z- zmarły z powodu choroby nowotworowej w okresie 18-miesięcznej obserwacji od zabiegu operacyjnego).

Lp	No-Ca	No-Margines	Stopień dojrzałości	N	T	Lokalizacja	RCAS1	RCAS1 margines	Współczynnik
1	F21 [r]	F25	G2	N 2	T 2	krtień	1,746211	1,30749	0,74
2	F23 [r]	F22	G2	N 0	T 3	krtień	0,593588	1,128224	1,9
3	F26 [rz]	F24	G3	N 2	T 2	krtień i gardło	0,560752	1,158834	2,06
4	F30	F29	G3	N 2	T 3	migdałek podniebienny	2,45	0,731768	0,29
5	F31	F32	G2	N 1	T 4	gardło dolne	0,54	0,429055	0,79
6	F34 [r]	F33	G2	N 0	T 3	krtień	0,147153	0,209085	1,42
7	F36	F35	G2	N 1	T 3	krtień	0,822569	0,53	0,64
8	F38	F37	G3	N 2	T 3	krtień	0,994	0,362974	0,36
9	F40 [r]	F39	G2	N 2	T 2	korzeń języka i migdałek podniebienny	0,162854	0,271016	1,66
10	F42	F41	G2	N 0	T 2	krtień	0,57	0,304381	0,53
11	F44 [rz]	F43	G3	N 2	T 3	gardło dolne	0,52	0,594434	1,14
12	F46	F45	G2	N 0	T 4	krtień	0,54	0	0
13	F49 [r]	F48	G3	Limf	T 3	korzeń języka	0,393541	0,9	2,28
14	F50 [r]	F51	G2	N 2	T 2	krtień	1,376046	1,246328	0,90
15	F103	F47	G2	N 0	T 2	migdałek podniebienny	1,310659	0,65451	0,49
16	F54	F53	G2	N 0	T 2	krtień	1,330195	0,462247	0,34
17	F28	F27	G2	N 2	T 1	migdałek podniebienny	1,000349	0,139192	0,13
18	F98 [r]	F99	G3	N 0	T 3	gardło i krtień	0,706068	1,364866	1,93
19	F96	F100	G2	N 2	T 2	krtień	1,258917	0,87	0,69
20	F105[rz]	F102	G3	N 0	T 2	korzeń języka dno jamy ustnej	1,878974	1,782117	0,94
21	F124 [r]	F118	G2	N 0	T 3	dno jamy ustnej	1,830052	1,490272	0,81
22	F121	F119	G3	N 2	T 2	dno jamy ustnej	1,239064	0,898761	0,72
23	F129	F120	G3	N 0	T 2	krtień	1,21368	0,880613	0,72
24	F127	F123	G2	N 2	T 3	korzeń języka, migdałek i boczna ściana gardła	1,533371	0,984	0,64
25	F128 [r]	F131	G2	N 0	T 2	krtień	0,835663	1,231004	1,47
26	F104	F95	G2	N 2	T 3	migdałek podniebienny i korzeń języka	1,505212	0,800192	0,53
27	F130[rz]	F132	G3	N 2	T 3	migdałek podniebienny i korzeń języka	0,7703	1,9321	2,5

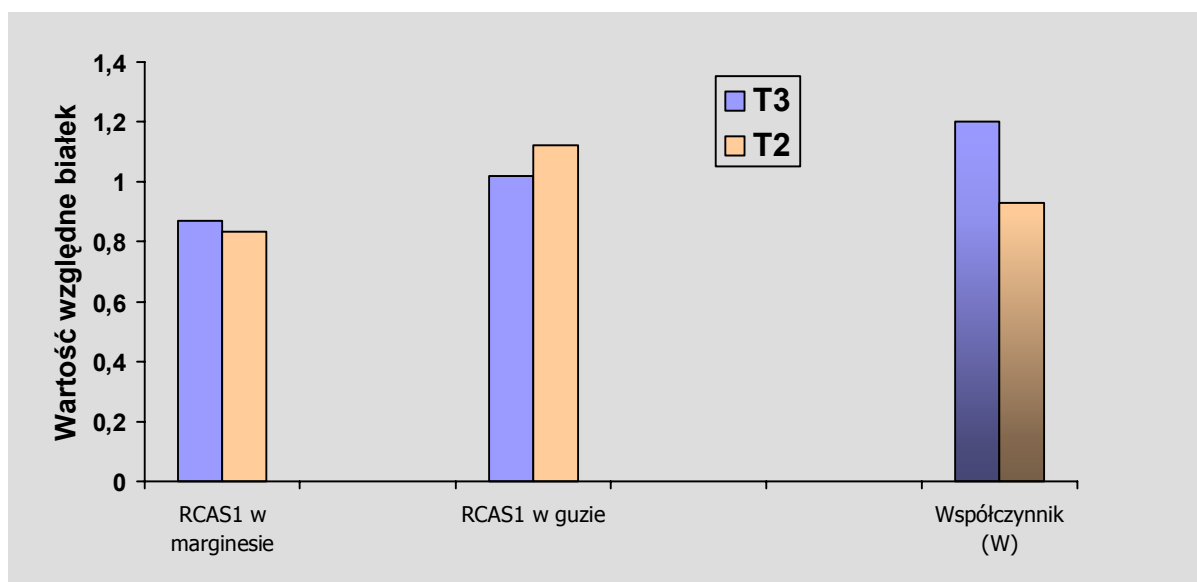
Zauważono jednak, że w pojedynczych przypadkach średnia względna ilość RCAS1 w zdrowym marginesie jest wyższa od ilości w tkance raka. Postanowiono porównać w tej sytuacji obie wartości i przeanalizować ich wielkość w odniesieniu do danych klinicznych określonych według klasyfikacji TNM, stopnia zróżnicowania komórek nowotworowych, lokalizacji guza, nawrotu choroby oraz rokowania. Względne wartości RCAS1 w tkankach raka, marginesu oraz wynik ich porównania, który otrzymano dzieląc wartość średniej względnej ilości RCAS1 w marginesie guza przez wartość średniej względnej ilości RCAS1 w tkankach raka przedstawiono w Tabeli 3.2.3. Wartość uzyskaną z tego porównania określono jako współczynnik środowiska guza (WSG). W tabeli przedstawiono również informację o dalszym przebiegu choroby u pacjentów w 18 miesięcznym okresie obserwacji od rozpoznania i leczenia chirurgicznego w Klinice. Zaznaczono wznowę procesu nowotworowego (literą r) oraz zgon (literą z).

Wykazano znamienne statystycznie wyższą wartość współczynnika (W) w guzach o największych wymiarach (T3) określonych według kryteriów klasyfikacji TNM. (Tabela 3.2.4, Rycina 3.2.2).

Tabela 3.2.3. Porównanie współczynników określających stosunek względnych wartości RCAS1 w marginesie guza (zdrowym histopatologicznie) do względnych wartości RCAS1 w guzie w aspekcie wielkości nacieku nowotworowego według klasyfikacji TNM.

Stopień dojrzałości guza	T1 (n=1)	T2 (n=12)	T3 (n=12)	T4 (n=2)
Średnia wartość RCAS1 w guzie (odchylenie standardowe)	1,0003 (±0,1391)	1,1235 (±0,5016)	1,0221 (±0,6733)	0,5401 (±0,3033)
Średnia wartość RCAS1 w marginesie (odchylenie standardowe)	0,1391	0,9222 (±0,4511)	0,9189 (±0,4971)	0,4290 (±0,4971)
Średnia wartość współczynnika (RCAS1 w guzie do RCAS1 w marginesie)	0,13	0,93 (±0,52)	1,2 (±0,78)	0,79 (±0,55)

Rycina 3.2.2. Rozkład wartości względnych RCAS1 w: guzie nowotworowym, marginesie guza oraz współczynnika (W) wynikającego z porównania wartości RCAS1 w marginesie do RCAS1 w guzie w aspekcie jego wielkości określonej w klasyfikacji TNM.



Nie wykazano różnic w wartości współczynnika w odniesieniu do obecności przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych.

Tabela 3.2.4. Porównanie wartości współczynników określających stosunek względnych wartości RCAS1 w marginesie guza (zdrowym histologicznie) do względnych wartości RCAS1 w guzie w aspekcie przejścia nacieku nowotworowego poza torebkę węzła chłonnego.

	Naciek przekracza torebkę węzłów (n=7)	Naciek nie przekracza torebki węzłów (n=3)	Wartość p
Średnia wartość współczynnika - W (odchylenie standardowe)	1,18 (±0,86)	1,77 (±0,68)	0,33

Zaobserwowano wyższą wartość współczynnika w nowotworach o niskim stopniu zróżnicowania. W przypadku G2 wynosił średnio 0,8, natomiast w G3 odpowiednio 1,18. Różnica nie była znamienna statystycznie. W zakresie względnej

zawartości badanego białka zaobserwowano różnicę w jego ekspresji w zależności od stopnia zróżnicowania komórek nowotworowych.

Tabela 3.2.5. Porównanie względnej wartości RCAS1 w marginesach nowotworu (histopatologicznie zdrowych) do względnej wartości RCAS1 w guzach o różnym stopniu zróżnicowania.

Stopień zróżnicowania komórek nowotworowych	Średnia względna wartość RCAS1 ±SD		
	G2 (n=17)	G3 (n=9)	p
Rak płaskonabłonkowy gardła i krtani	0,9821 (±0,522)	1,2311 (±0,6937)	0,04
Zdrowy histopatologicznie margines guza	0,6822 (±0,4699)	0,9846 (±0,3808)	0,03

Analiza wartości wyznaczonego współczynnika w aspekcie lokalizacji nowotworu wykazała jego najwyższą wartość w raku płaskonabłonkowym obejmującym dwa narządy: krtani oraz gardło, w przypadkach w których konieczne było wykonanie całkowitego odjęcia krtani oraz częściowego usunięcia gardła, u wszystkich pacjentów wykonano operację rekonstrukcyjną gardła.

Tabela 3.2.6. Porównanie współczynników w zależności od lokalizacji guza.

Narząd	Rak gardła (n=9)	Rak krtani (n=10)	Rak gardła i krtani (n=8)
Średnia wartość współczynnika	0,7	0,93	1,46
(odchylenie standardowe)	(±0,43)	(±0,49)	(±0,72)
p		0,29	
p			0,1
p		0,023	

Wysoki wskaźnik ilości RCAS1 w tkance marginesu nowotworowego był w badanym materiale związany z gorszym rokowaniem co do przeżycia. U 13 chorych stwierdzono wznowę procesu nowotworowego, z których cztery osoby zmarły w okresie roku od przeprowadzonej operacji. W Tabeli 3.2.8 zaznaczono pacjentów, u

których wystąpił zgon (z) do roku czasu od przeprowadzonej operacji oraz nawrót choroby (r) również do roku czasu od pierwszej operacji. Zabieg operacyjny u tych chorych został przeprowadzony w ocenie histopatologicznej w marginesach zdrowych tkanek. Porównanie średnich względnych wartości prezentuje Tabela 3.2.8.

Tabela 3.2.7. Przedstawienie wartości współczynników (W), średniej względnej ilości RCAS1 w raku gardła i krtani, oraz w zdrowym histopatologicznie marginesie guza w kontekście wznowy procesu nowotworowego w okresie jednorocznej obserwacji.

	Bez wznowy (n=14)	Wznowa (n=13)	Wartość P
Średnia względna ilość RCAS1 w raku płaskonabłonkowym gardła i krtani \pm SD	1,0923 (\pm 0,5405)	1,1074 (\pm 0,6864)	NS
Średnia względna ilość RCAS1 w zdrowym histopatologicznie marginesie guza \pm SD	0,5604 (\pm 0,3182)	1,2675 (\pm 0,4589)	0,0002
Współczynnik środowiska guza (W) \pm SD	0,54 (\pm 0,33)	1,42 (\pm 0,63)	0,0001

SD- odchylenie standardowe, NS- brak znamienności statystycznej

4. Dyskusja

W przeprowadzonej analizie techniką Western blot zidentyfikowano masę molekularną badanego białka RCAS1 jako 32 kD. Zastosowano dwurzędową reakcję immunodetekcyjną, którą oryginalnie opracowano w zespole: dr n. biol. Paweł Mak, lek. med. Magdalena Dutsch-Wicherek oraz lek. med. Łukasz Wicherek. Została ona przedstawiona i przyjęta podczas Jubileuszowej Konferencji Wydziału Biotechnologii UJ z okazji 50-lecia pracy naukowej *prof. dr hab. Aleksandra Koja* (XXX Winter School of Faculty of Biotechnology – *Commemorating the 50th anniversary of Alex Koj's scientific research: "Cytokines, proteinases and proteinase inhibitors in regulation of cellular metabolism"*; Zakopane, Poland 28th February - 4th March, 2003) [Ł. Wicherek, M. Dutsch-Wicherek, P. Mak, "The role of RCAS1 in tumor escape and immunological tolerance during pregnancy"] oraz opublikowana na łamach *Acta Biochemica Polonica* [76]. Celem uzyskania obiektywnej kontroli w przeprowadzonym eksperymencie i uniknięcia błędu wynikającego z różnej zawartości komórek w badanych próbkach tkankowych nowotworów oraz grupy kontrolnej, która mogłaby zafałszować wyniki i prowadzić do błędnych wniosków, przy użyciu dwurzędowej reakcji immunodetekcyjnej przeanalizowano rozkład β -Aktyny. Białko to stanowi podstawowy składnik cytoszkieletu, występuje powszechnie w organizmie człowieka, jest białkiem budulcowym, którego funkcja w organizmie jest zupełnie inna niż białka RCAS1. Spełnia więc ono kryteria obiektywnej kontroli jakościowej. Ponadto będąc składnikiem cytoszkieletu, β -Aktyna jest również obiektywnym wykładnikiem zawartości komórek w badanej próbce tkankowej.

Rak głowy i szyi jest szóstym co do częstości nowotworem złośliwym na świecie, rokowanie jest uzależnione od stanu miejscowego zaawansowania, okolicznych węzłów chłonnych, stopnia zróżnicowania komórek nowotworu. Częstym problemem związanym z leczeniem pacjentów z guzem głowy i szyi jest nawrót choroby, mimo tego że marginesy chirurgicznej resekcji są histopatologicznie zdrowe. Dlatego też diagnostyka molekularna w wykrywaniu guza i monitorowaniu jego remisji jest obecnie przedmiotem szerokich badań. Biologia molekularna guza

leżąca u podstaw odrębności komórki nowotworowej przejawia się w ocenie zmian ekspresji białek związanych z apoptozą oraz z dojrzewaniem i wzrostem komórki. W powstawaniu nowotworu złośliwego bierze udział wiele czynników, takich jak aktywacja onkogenów, inaktywacja czynników hamujących wzrost guza, unieśmiertelnienie (immortalization), aktywacja mechanizmów inwazji i przerzutowania. Oprócz tego niezwykle istotną rolę przypisuje się zjawiskom związanym z procesem tzw. „ucieczki” guza nowotworowego spod kontroli immunologicznej ustroju, jak też ogólnoustrojowemu wpływowi nowotworu na stan układu immunologicznego gospodarza. Transformacja nowotworowa komórki jest związana z zaburzeniami apoptozy, będąc wynikiem zmian ilościowych i jakościowych w ekspresji białek decydujących o: hamowaniu apoptozy, prowadzącym do immortalizacji, unikaniu apoptozy powodowanej przez jednojądrowe komórki cytotoksyczne, czy o apoptozie komórek układu immunologicznego, wywołanej przez komórkę nowotworową. Niniejsza praca jest poświęcona białku zdolnemu do wywoływania apoptozy komórek układu immunologicznego, RCAS1, które prawdopodobnie może mieć również wpływ ogólny na stan układu immunologicznego, co jest obecnie przedmiotem badań.

Białko RCAS1 nie było dotąd przedmiotem badań w raku gardła i krtani. Ekspresja RCAS1 w prezentowanej analizie była obecna we wszystkich tkankach raka płaskonabłonkowego gardła i krtani, natomiast była nieobecna w zdrowej tkance nabłonkowej grupy kontrolnej pacjentów, którzy byli leczeni z powodu choroby nienowotworowej. Zidentyfikowano ją także w histopatologicznie zdrowych marginesach operacyjnych badanych nowotworów. Pozostaje to w zgodności z dotychczasowymi doniesieniami o ekspresji RCAS1 w raku szyjki macicy, endometrium i jajnika, trzustki, dróg żółciowych, wątroby, gdzie białko zidentyfikowano w tkankach nowotworowych, natomiast nie było obecne w tkance prawidłowej [11,15,34]. Wysłunięto więc wniosek, że RCAS1 jest charakterystyczne dla złośliwego procesu nowotworowego. W prezentowanym eksperymencie ekspresja białka nie wiązała się z wielkością nacieku nowotworowego, podobnie jak w raku pozawątrobowych dróg żółciowych, chociaż takiego rodzaju korelację znaleziono na przykład w raku płuc i przełyku [14,16,34]. Średnia wartość RCAS1 dla guzów od T1 do T3 jest podobna, natomiast zwraca uwagę niemal o połowę

nizsza wartość RCAS1 w T4. Jednocześnie wartość RCAS1 w marginesie guza jest niewiele niższa niż w samej tkance nowotworu, co może wskazywać na wysoki potencjał inwazji guza. W przebadanych próbkach tkankowych raka gardła i krtani zaobserwowano natomiast wyższe wartości RCAS1 w tych tkankach raka, gdzie występowały przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych (N2). Wyższa ekspresja białka w przypadku choroby nowotworowej, w której oprócz obecności przerzutów w węzłach chłonnych dochodzi do inwazji nowotworu poza torebkę węzła świadczy o przekroczeniu w chorobie nowotworowej kolejnej bariery i tendencji do poza miejscowego szerzenia się procesu. Podobne spostrzeżenie poczyniono w raku pęcherzyka żółciowego, w którym ekspresja RCAS1 rosła wraz z głębokością nacieku nowotworowego, obecnością przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych, zajęciem naczyń żylnych oraz naciekiem perineurium, czyli niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi stanowiącymi o ekspansji guza [32]. Z kolei w raku żołądka wysoka ekspresja białka była spotykana znacznie częściej w guzach N2 aniżeli N0/N1 [35]. Można zatem wnioskować, że wysoka ekspresja białka RCAS1 wiąże się z progresją guza, tym bardziej, że w prezentowanej analizie szczególnie wysokie wartości białka były związane z przekroczeniem przez naciek nowotworowy torebki węzła chłonnego, co jest jednoznaczne z pokonaniem kolejnej bariery w szerzeniu się procesu nowotworowego. Przerzuty do węzłów chłonnych jak i przejście nacieku nowotworowego poza torebkę węzła są znanymi niezależnymi niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi. **Zatem wysoka ekspresja RCAS1 może być dobrym znacznikiem aktywności procesu nowotworowego, współlistnieje z niekorzystnym rokowaniem u pacjentów.**

Zaobserwowano, że wysokie wartości RCAS1 w badanych tkankach raka gardła i krtani, podobnie jak w raku płuc, szyjki macicy, czy raku piersi, są związane z niskim stopniem zróżnicowania komórek nowotworu [14,29,30]. Niski stopień zróżnicowania komórek nowotworowych jest również ważnym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym, obligującym do bardziej agresywnej terapii. Uważa się, że komórki o wysokiej ekspresji białka RCAS1 mają niejako przewagę nad innymi, prowadząc do wytworzenia szczególnie złośliwej linii komórkowej zdolnej do przetrwania i tworzenia przerzutów [32]. **Zatem można wnioskować, że RCAS1 jest niekorzystnym prognostycznie markerem nowotworowym i**

świadczy o wysokiej złośliwości guza. Jego wysoka ekspresja jest związana z obecnością innych uznanych niekorzystnych czynników rokowniczych.

Kolejnym istotnym spostrzeżeniem w prezentowanym eksperymencie jest obecność ekspresji białka RCAS1 w obrębie tkanek zdrowego marginesu operacyjnego. Margines operacyjny nie był dotychczas przedmiotem badań nad ekspresją RCAS1. Margines guza nowotworowego jest interesującą tkanką z punktu widzenia molekularnego. Jego ocena przy użyciu standardowych metod analizy w badaniu histopatologicznym wykazuje, że jest to tkanka zdrowa, bez cech nowotworu. Rozważania na temat możliwych przyczyn nawrotów i rozsiewu choroby nowotworowej przyczyniły się do określenia marginesu nowotworowego jako tkanki potencjalnie odpowiedzialnej za taki stan rzeczy. Pomimo stosowania nowoczesnych metod diagnostycznych, terapeutycznych okres 5-letnich przeżyć w raku głowy i szyi od lat 1980-tych nie uległ szczególnej poprawie i wynosi około 52% [3]. Uważa się że ukryte komórki nowotworowe, tzw. z ang. minimal residual cancer (MRC) niemożliwe do wykrycia standardowymi metodami diagnostycznymi mogą pozostawać w organizmie, w marginesach operacyjnych, węzłach chłonnych, rozsiane, można je nawet wykryć wśród komórek szpiku kostnego. Ponadto tkanka, w obrębie której dochodzi do powstania drugiego pierwotnego nowotworu lub nawrotu choroby może posiadać aberracje genetyczne, będące punktem wyjścia dla karcinogenezy [9]. W 1995 roku Brennan i wsp. wykazali (za pomocą FASAY) obecność zmutowanego białka p53 w obrębie nie tylko tkanki raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, ale również w jej zdrowym histopatologicznie marginesie u 52% przebadanych pacjentów. W 38% tych przypadków doszło do rozwinięcia wznowy miejscowej, podczas gdy żaden z pacjentów, u których analiza molekularna wykazała zdrowy margines nie miał wznowy miejscowej [78]. Partridge i wsp. badając raka jamy ustnej potwierdzili, że błona śluzowa histopatologicznie zdrowa może posiadać potencjał zaburzeń, w tym wypadku zmutowane białko p53, wyprzedzający zmiany histologiczne. Procent ukrytych komórek MRC w marginesach chirurgicznych wahał się od 0,05-10%, u 30% pacjentów u których badaniem molekularnym potwierdzono pozytywne marginesy operacyjne wykryto wznowę procesu nowotworowego. Identyfikacja rozsianych

komórek nowotworowych w szpiku kostnym oraz krwi żyłnej u pacjentów, u których w dalszym przebiegu choroby wystąpiły przerzuty nowotworowe do narządów odległych potraktowano jako dowód, że te pojedyncze komórki nowotworowe były rzeczywistymi mikroprzerzutami [9]. **W prezentowanym eksperymencie ekspresja białka RCAS1 w marginesach nowotworów była znamienne niższa aniżeli w tkance raka, jednakże w pojedynczych przypadkach zauważono, że jest ona wyższa w próbkach marginesu aniżeli próbkach raka.** Najwyższe wartości wyznaczonego współczynnika obserwowano w guzach o największym rozmiarze (T3) oraz miejscowym zasięgu, jak również w rakach o niskim stopniu zróżnicowania. **Można wnioskować zatem, że wysoka ekspresja RCAS1 w marginesie guza wiązała się z niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi i wyraźnie wyższym stopniem miejscowej inwazji.** Analiza dalszych losów pacjentów ujawniła, że u 48% przeanalizowanych chorych o wysokiej wartości współczynnika w ciągu roku obserwowano wznowę miejscową choroby nowotworowej, pomimo przeprowadzenia operacji w histopatologicznie zdrowych granicach zmiany i zastosowania terapii uzupełniającej. Średnia względna ilość RCAS1 w tkance raka u tych chorych nie wykazywała różnic, natomiast obserwowana wartość RCAS1 w tkance marginesu oraz wartość współczynnika była znamienne statystycznie wyższa u chorych, u których wystąpiła wznowa. Podobnie więc, jak w cytowanej powyżej pracy obecność wysokiej ekspresji markera nowotworowego w zdrowym histologicznie marginesie chirurgicznym miała znaczenie diagnostyczne i kliniczne. Potwierdza to rolę RCAS1 jako niekorzystnego czynnika co do przeżycia, z drugiej strony zwraca uwagę na margines nowotworu jako potencjalne źródło ukrytych komórek nowotworowych. Warto wspomnieć, że wysoka ekspresja białka RCAS1 nawet przez pojedyncze komórki nowotworowe daje tym komórkom przewagę w przeżyciu i umożliwia głębokie naciekanie tkanki, penetrację drogą naczyń limfatycznych, żylnych, perineurium, a następnie odrodzenie populacji komórek nowotworowych [32]. Brown i wsp. zaobserwowali, że MRC wykryte po operacyjnym usunięciu raka piersi u części pacjentów były niszczone przez komórki układu immunologicznego w okresie trzech miesięcy od operacji, natomiast u pozostałych pacjentów komórki te przeżywały stanowiąc prawdziwe mikroprzerzuty

[10]. Rak głowy i szyi jest uważany za jeden z najbardziej immunosupresyjnych nowotworów. Zarówno Hoffman jak i Gastman donosili o upośledzeniu funkcji układu immunologicznego w tym raku, które utrzymywało się w dalszym ciągu po usunięciu nowotworu [68,74]. Komórki układu immunologicznego przechodziły spontaniczną apoptozę za pośrednictwem Fas/FasL. Wpływ rozpuszczalnej formy białka RCAS1 na funkcję układu immunologicznego nie jest dokładnie poznany, jest obecnie przedmiotem badań, wiadomo jednak że białko to może wywierać hamujące działanie na te komórki biorąc tym samym udział w długotrwałym efekcie supresji układu immunologicznego. W przeprowadzonych badaniach nad RCAS1 Nakashima po raz pierwszy zidentyfikował rozpuszczalną formę RCAS1, która może być wydzielana przez komórki, jak też odcinana z ich powierzchni [12]. Zachowuje ona działanie hamujące aktywne komórki CTLs oraz NK, jak też powoduje ich apoptozę. Rozpuszczalną formę RCAS1 zidentyfikowaliśmy w surowicy chorych z rakiem głowy i szyi [76]. Opisano przydatność kliniczną monitorowania rozpuszczalnej formy RCAS1 w surowicy chorych z rakiem dróg żółciowych jako testu diagnostycznego oraz po interwencji operacyjnej [78].

W aspekcie występowania pojedynczych komórek nowotworowych, mogących być źródłem przerzutu, a które dzięki ekspresji takiego białka jak RCAS1 mogą stanowić realne niebezpieczeństwo po uprzednim zabiegu operacyjnym należy wspomnieć o lokalizacji ekspresji tego białka w komórkach raka głowy i szyi. W analizie immunohistochemicznej ekspresji RCAS1 w raku gardła i krtani wykazano obecność ziarnistego typu świecenia rozsianego w cytoplazmie, rzadko w obrębie błony komórkowej komórek raka [79]. Istotne jest również, że nie wykazano różnic w rodzaju wewnątrzkomórkowej dystrybucji ekspresji RCAS1 pomiędzy tkanką raka a zdrowym histopatologicznie marginesem guza. W dotychczasowych doniesieniach na temat immunohistochemicznej ekspresji RCAS1 wykazano różnice w dystrybucji wewnątrzkomórkowej białka pomiędzy tkanką raka, a tkanką nienowotworową (rozsiany typ świecenia w raku, skupiska w chorobie autoimmunologicznej oraz tkance zdrowej). Nasza obserwacja pozostaje więc w zgodności z innymi doniesieniami, podobny typ świecenia RCAS1 w tkance raka jak i w marginesie może wynikać według wcześniejszych spostrzeżeń, z pewnych cech molekularnych poprzedzających wystąpienie histologicznych cech nowotworu. Funkcja tego białka

związana jest z hamowaniem aktywnych komórek układu immunologicznego (CTLs, NK), indukowaniem apoptozy tych komórek, a więc z ucieczką nieprawidłowych komórek przed nadzorem komórek immunokompetentnych, tak więc ekspresja białka mogłaby poprzedzać wystąpienie zmian nowotworowych, skoro ułatwia ich maskowanie.

Podsumowując powyższe rozważania dotyczące ekspresji białka RCAS1 w raku gardła i krtani oraz jego zdrowym histopatologicznie marginesie, zaprezentowane wyniki badań są pierwszymi takimi doniesieniami, co więcej ekspresja RCAS1 w zdrowym histopatologicznie marginesie guza nie była dotąd przedmiotem analizy w żadnym z nowotworów. Na podstawie zaprezentowanych wyników badań przychylam się do kontrowersyjnej nowej teorii dotyczącej powstawania i rozsiewu choroby nowotworowej, określonej mianem genometastazy.

Obecność DNA i RNA w surowicy pacjentów chorych na chorobę nowotworową identyfikowano już w latach 1970-tych [80]. Do 1989 roku nie było jednak wiadomo, czy jest to DNA i RNA nowotworowe [81]. W 1994 roku Sorensen donosił o znalezieniu w surowicy DNA o mutacjach genu K-ras u chorych z rakiem trzustki, a Vasioukhin o mutacji N-ras w zespole mielodysplastycznym [82,83]. Na tej podstawie powstała nowa dziedzina badań nad markerem choroby nowotworowej. W 1999 Holmgren wykazał, że DNA może być odzyskiwane i używane ponownie przez komórki somatyczne z ciałek apoptotycznych [84]. W 2002 roku Garcia-Olmo opublikowali doniesienie o możliwości przenoszenia DNA z jednej komórki do drugiej, poprzez fagocytozę ciałek apoptotycznych, dowodząc, że obecność wolnego DNA nowotworowego w surowicy może mieć znaczenie w tworzeniu przerzutów nowotworów [85,86]. Zatem Garcia-Olmo zasugerowali, że do tworzenia przerzutów nowotworowych może dochodzić drogą transfekcji¹² wrażliwych komórek zlokalizowanych w dalekich narządach docelowych z dominującymi onkogenami pochodzącymi z guzów pierwotnych i krążącymi w surowicy krwi. Zaproponowali termin GENOMETASTAZY dla opisanego zjawiska.

¹² Klonowanie DNA polega na wprowadzeniu fragmentu DNA połączonego z wektorem do komórki, w której ulegnie on powieleniu. Wprowadzenie DNA do komórek bakterii odbywa się metodą transformacji. Ten sam proces w odniesieniu do komórek eukariotycznych określa się terminem TRANSFEKCJA (gdyż transformacja jest terminem odnoszącym się do transformacji nowotworowej).

Już JFKerr w 1970 roku zaobserwował możliwość fagocytozy ciałek apoptotycznych w warunkach fizjologicznych głównie przez histiocyty, natomiast ciała apoptotyczne powstałe w wyniku fragmentacji komórki nowotworowej były fagocytowane zarówno przez histiocyty jak przez komórki zdrowego nabłonka [42]. Przejście (horizontal transfer) DNA może występować między komórkami raka a innymi komórkami somatycznymi i może przypuszczalnie być zjawiskiem genomastazy (przerzutu nowotworowego na poziomie genomu) [85,86]. W przedstawionym kontekście tkanką o szczególnym znaczeniu jest zdrowy margines nowotworu, tkanka nabłonkowa która może „nabywać” fenotyp nowotworowy, a jego pierwsze symptomy, takie jak ekspresja zmutowanego białka p53, czy być może obecność ekspresji RCAS1, mogłyby wyprzedzać histologiczne cechy transformacji nowotworowej, pozostając niewidocznymi w standardowej diagnostyce. Zrozumiałe staje się też w tym kontekście częstsze występowanie wznowy procesu nowotworowego u pacjentów o wysokiej ekspresji białka RCAS1 w marginesie guza. **Wysoka ekspresja RCAS1 w zdrowym histopatologicznie marginesie guza nowotworowego może być związana z wyższym ryzykiem wznowy miejscowej procesu nowotworowego i rozsiewu choroby. Analiza molekularna zdrowego histopatologicznie marginesu operacyjnego staje się koniecznością i może mieć za sobą możliwość rzeczywistej poprawy przeżycia pacjentów z rakiem głowy i szyi.**

5.0. Wnioski

1. Białko RCAS1 jest obecne w raku gardła i krtani.
2. RCAS1 jest niekorzystnym prognostycznie markerem nowotworowym. Jego wysoka ekspresja jest związana z obecnością innych uznanych niekorzystnych czynników rokowniczych
3. Wysoka ekspresja RCAS1 w zdrowym histopatologicznie marginesie guza nowotworowego jest związana z wyższym ryzykiem wznowy miejscowej procesu nowotworowego i rozsiewu choroby. Standardowa diagnostyka poszerzona o analizę molekularną tkanki pod względem występowania RCAS1 mogłaby wnieść przydatne informacje, pozwalające na zastosowanie bardziej agresywnej terapii i w rezultacie uzyskanie lepszych wyników leczenia.

6.0 Streszczenie

Wprowadzenie

Rak głowy i szyi jest szóstym co do częstości występowania nowotworów na świecie. Okres 5-letniego przeżycia nie uległ poprawie od lat 1980-tych mimo stosowania efektywnych metod chirurgicznych i rekonstrukcyjnych oraz nowoczesnych technik radioterapii i chemioterapii, i wynosi około 52%. Częstym problemem związanym z pacjentem z rakiem głowy i szyi jest nawrót choroby albo w miejscu resekcji, albo w innej lokalizacji w obrębie górnych dróg oddechowych, lub powstanie drugiego guza pierwotnego. Ryzyko wznowy jest wysokie, ocenia się je na około 10-30%. Proces nowotworowy jest zjawiskiem złożonym. Ostatnie zdobycze biologii molekularnej pozwoliły na wyodrębnienie z całej ogromnej nauki o nowotworach mechanizmów odpowiedzialnych za ucieczkę guza nowotworowego spod nadzoru immunologicznego ustroju, których kluczem jest odpowiednia regulacja zjawiska apoptozy poprzez ekspresję na powierzchni komórek nowotworowych rozmaitych czynników.

RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells) jest białkiem błonowym II typu obecnym na powierzchni wielu nowotworów złośliwych, zdolnym do wywołania zarówno *in vitro* jak i *in vivo* zahamowania wzrostu oraz apoptozy aktywnych limfocytów cytotoksycznych oraz komórek NK. Zatem białko to odpowiada za „ucieczkę guza nowotworowego” spod nadzoru komórek układu immunologicznego organizmu gospodarza, umożliwia szerzenie się procesu nowotworowego. Jednocześnie uważa się, że może wywierać ono wpływ zarówno miejscowy, jak i ogólnoustrojowy na funkcję układu immunologicznego, jest to obecnie przedmiotem badań. Wysoka ekspresja białka w różnych nowotworach złośliwych, m.in. w raku płuc, żołądka, dróg żółciowych była związana z wysokim stopniem apoptozy limfocytów naciekających guz (TIL), co z kolei w sposób znaczący wiązało się z gorszym przeżyciem pacjentów. Celem niniejszej pracy było zbadanie obecności ekspresji białka RCAS1 w raku gardła i krtani, w których białko to nie było dotychczas przedmiotem badań, jak również porównanie jego ekspresji w tkance nowotworowej i nienowotworowej oraz analiza ekspresji RCAS1 w kontekście cech klinicznych i patologicznych guza (określonych poprzez TNM,

stopień zróżnicowania guza oraz obserwację dalszych losów pacjentów) dla ewentualnej oceny wartości prognostycznej tego białka w raku gardła i krtani.

Materiały i Metody

Materiał tkankowy został pobrany za wiedzą i zgodą pacjentów, po uprzednim otrzymaniu zgody Komisji Etycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego (nr: KBET/379/13/2003) na przeprowadzenie programu badawczego. Przy użyciu metody Western blot przeprowadzono analizę białka RCAS1 oraz białka kontrolnego β -Aktyny, będącego białkiem cytoszkieletu. Przeanalizowano łącznie: 51 tkanek raka płaskonabłonkowego gardła i krtani, 34 próbki tkankowe zdrowych histopatologicznie marginesów nowotworowych, 27 tkanek zdrowej błony śluzowej górnych dróg oddechowych pobranych od pacjentów operowanych w Klinice z powodu choroby nienowotworowej oraz 8 tkanek znajdujących się w przewlekłym stanie zapalnym (polipów nosa). Pacjenci byli obserwowani w Klinice Otolaryngologii przez okres 18 miesięcy od wykonanego leczenia operacyjnego. Weryfikacja histopatologiczna materiału tkankowego została przeprowadzona w Katedrze Patologii CM UJ. Natychmiast po pobraniu materiał tkankowy był mrożony do temperatury -90°C , następnie był homogenizowany z koktailem inhibitorów proteinaz, przeprowadzono dwurzędową reakcję immunodetekcyjną.

Wyniki

W przeprowadzonym eksperymencie metodą Western blot zidentyfikowano badane białko RCAS1 jako prążek o masie 32 kD oraz białko kontrolne β -Aktynę jako prążek o masie 42kD. Obecność białka RCAS1 wykazano we wszystkich tkankach nowotworowych poddanych analizie. Białko to zidentyfikowano również w tkankach zdrowego histopatologicznie marginesu tych nowotworów i błonie śluzowej górnych dróg oddechowych będącej w przewlekłym stanie zapalnym. RCAS1 nie było natomiast obecne w tkankach zdrowej błony śluzowej górnych dróg oddechowych uzyskanych od pacjentów operowanych z powodu choroby nienowotworowej. Nie wykazano różnic w zakresie ekspresji białka kontrolnego β -Aktyny w badanych tkankach.

- Zaobserwowano znamienne statystycznie wyższe wartości ekspresji białka w próbkach tkankowych raka, aniżeli w próbkach tkankowych marginesu oraz znamienne statystycznie wyższe wartości ekspresji białka w próbkach tkankowych raka, aniżeli w próbkach tkankowych przewlekłego stanu zapalnego górnych dróg oddechowych.
- Porównanie ekspresji RCAS1 w tkankach guza, w których obecne były przerzuty w okolicznych węzłach chłonnych zaklasyfikowane jako N2, do tkanek guza, któremu towarzyszyły pojedyncze (N1) przerzuty w węzłach chłonnych lub przerzuty nie były obecne (N0) wykazało wyższą wartość w tkankach nowotworów, którym towarzyszyły przerzuty w węzłach chłonnych N2.
- Wykazano statystycznie znamienne wyższą ilość białka RCAS1 w tkance nowotworowej pobranej od pacjentów z obecnymi przerzutami w okolicznych węzłach chłonnych, u których naciek nowotworu przekraczał torebkę węzła niż u pacjentów, u których przerzuty były obecne w okolicznych węzłach chłonnych, lecz naciek nowotworu nie przekraczał torebki węzła.
- Porównanie średniej względnej ilości RCAS1 w badanych próbkach tkanek nowotworów złośliwych do stopnia zróżnicowania guza wykazało znamienne statystycznie wyższą ekspresję białka w nowotworach o niskim stopniu zróżnicowania.
- Analiza średniej względnej ilości RCAS1 w raku ograniczonym do gardła, raku ograniczonym tylko do krtani oraz raku obejmującym gardło i krtani ujawniła najwyższą średnią ilość białka RCAS1 w raku gardła, następnie w raku krtani.

Przeanalizowano 27 próbek tkankowych raka gardła i krtani, w których pobrano do analizy fragmenty tkanek bezpośredniego marginesu guza nowotworowego, będącego pod względem histopatologicznym tkanką zdrową. Porównanie średniej względnej ilości RCAS1 w tkankach raka płaskonabłonkowego do tkanek zdrowego histologicznie marginesu guza wykazało statystycznie znamienne wyższą ilość białka w tkankach raka. Zauważono jednak, że w pojedynczych przypadkach

średnia względna ilość RCAS1 w zdrowym marginesie jest wyższa od ilości w tkance raka. Porównano obie wartości, uzyskując wartość współczynnika środowiska guza (W) i przeanalizowano ich wielkość w odniesieniu do TNM, stopnia zróżnicowania komórek nowotworowych, lokalizacji guza, nawrotu choroby oraz rokowania.

- Znamienne statystycznie wyższą wartość współczynnika (W) zaobserwowano w guzie o największych wymiarach (T3) określonych według kryteriów klasyfikacji TNM.
- Wartość współczynnika była wyższa dla nowotworów o niskim stopniu zróżnicowania.
- Analiza wartości wyznaczonego współczynnika w aspekcie lokalizacji nowotworu wykazała jego najwyższą wartość w raku płaskonabłonkowym obejmującym dwa narządy: krtań oraz gardło, gdzie guz przekraczał bariery anatomiczne.
- Wysoki wskaźnik ilości RCAS1 w tkance marginesu nowotworowego był w badanym materiale związany z gorszym rokowaniem co do przeżycia. Czterech pacjentów nie przeżyło roku od wykonania zabiegu operacyjnego (nowotwór był usunięty w histopatologicznie zdrowych granicach).
- U 13 chorych z wysokimi wartościami wskaźnika stwierdzono wznowę procesu nowotworowego w okresie roku od przeprowadzonej operacji.

Wnioski

RCAS1 jest niekorzystnym prognostycznie markerem nowotworowym. Jego ekspresja jest związana z obecnością innych uznanych niekorzystnych czynników rokowniczych. Wysoka ekspresja RCAS1 w zdrowym histopatologicznie marginesie guza nowotworowego jest związana z wyższym ryzykiem wznowy miejscowej choroby i rozsiewu choroby. Standardowa diagnostyka poszerzona o analizę molekularną tkanki o ekspresję RCAS1 mogłaby wnieść przydatne informacje, pozwalające na zastosowanie bardziej agresywnej terapii i w rezultacie uzyskanie lepszych wyników leczenia.

6.0 Abstract

Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma constitutes the sixth most common cancer in the world. Male to female incidence rates are greater than 2:1. The five year survival rate for patients with this disease has not improved appreciably since the early 1980s and remains at approximately 52%. A common problem occurring in cases of head and neck cancer is the recurrence of the disease either in the location of primary surgical resection (although the surgical resection margins were histopathologically free of cancer cells) or in a new place in upper respiratory tract. The risk of a local recurrence of the disease is still high, estimated at about 10-30%. Molecular biology achievements enabled to determine mechanisms responsible for tumor escape from host immunological surveillance, which are controlled by the regulation of apoptosis through the expression of various factors on cells surface.

Tumor associated antigen RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells) having gene at 8q23, is a type II membrane protein, expressed in various human cancer cells. It has been reported to be expressed with high frequency in breast, lung, larynx and pharynx, gallbladder, ovarian, uterine, bile duct cancer cells, in Reed Sternberg cells and erythroid progenitor cells. The RCAS1 protein acts as a ligand for a putative receptor present in various human cells including normal peripheral lymphocytes such as T, B, and NK (natural killer) cells. RCAS1 inhibits growth of receptor expressing cells *in vitro* and *in vivo* and induces apoptotic cell death through activation of caspase 3 and caspase 8 and collapse of mitochondrial transmembrane potential. Thus, it facilitates escape from host immune surveillance by inducing apoptosis of activated CD3+ and NK cells and enables the disease to spread. High RCAS1 expression in many examined cancer was connected with high TIL apoptosis rate, and was related to poor prognosis in these cases. The aim of his work was to determine RCAS1 expression in pharyngeal and laryngeal cancers and non-cancerous tissue samples (histological clear surgical margin, chronic inflammation), analyze the expression with respect to

the clinicopathological features of the tumor (TNM, grading) in order to evaluate its possible prognostic value in cancer.

Materials and Methods

All patients with pharyngeal and laryngeal cancer in this study had undergone surgery between January 2002 and December 2003 at the Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery of Jagiellonian University in Krakow. In all cases patient's agreement was received. The approval for the research program was obtained from the Ethical Committee of the Jagiellonian University in Krakow: KBET/379/13/2002. The patients were randomly selected and observed within 18 months after the surgical treatment. A total of 120 tissue samples was obtained during surgery. RCAS1 was estimated in 51 tissue samples derived from laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma, 34 clear surgical margins, 8 nasal polyps, and 27 healthy mucous membrane specimens. Surgically removed material was evaluated to determine histological type and metastases of the lymph nodes using histological methods in Pathology Department of Jagiellonian University. In 27 cases of laryngeal and pharyngeal cancer two samples were collected, one derived from the cancer tissue and one from its clear surgical margin. The clear surgical margin was defined as the 1cm² area of tumor adjacent tissue macroscopically and histological free of neoplastic texture. Directly after the surgical procedure the pathologist examined and collected tissue samples in -90°C. Using Western blot method RCAS1 protein and β -Actin control protein were analyzed. For the identification RCAS1 anti-RCAS1 mouse Mo-22-1-1 monoclonal antibody was used.

Results

RCAS1 was determined as a 32kDa band while β -Actin control protein was identified as a 42 kDa band. The presence of RCAS1 protein was identified in all cancerous tissue samples examined. The protein was also revealed in histological clear surgical margin and chronic inflammation of mucous membrane of upper respiratory tract (nasal polyps). RCAS1 expression was not observed in healthy mucous membrane of upper respiratory tract derived from patients with not

neoplastic disease. No difference was found in the expression of β -Actin control protein between these tissue samples.

- RCAS1 relative amount was observed to be statistically significantly higher in pharyngeal and laryngeal cancer than in chronic inflammation of upper respiratory tract (nasal polyps).
- Higher average relative amount of RCAS1 protein was observed in tissue samples derived from patients with the presence of lymph node metastases in comparison to samples derived from patients without the presence of lymph node metastasis.
- Among the group of patients with the presence of lymph node metastases the level of RCAS1 expression was statistically significantly higher in patients with those, in which the neoplastic infiltration spread extracapsularly in comparison to the patients without extracapsular transition.
- The analysis of RCAS1 average relative amount with respect to the tumor grading revealed statistically significantly higher value in cancers of high grade (G3) in comparison to G2 and G1.
- The RCAS1 expression level was found to be higher in cancers infiltrating pharynx than in laryngeal cancers.

In 27 cases of pharyngeal and laryngeal cancers two samples were collected, one derived from the cancer tissue and one from its clear surgical margin. The RCAS1 average relative amount in cancer samples was statistically significantly higher than in clear surgical margin specimens. It was noticed, however that in single cases the RCAS1 average relative amount was higher in clear surgical margin samples than in cancer samples. Thus, two RCAS1 values were compared, clear surgical margin average relative amount to the cancer average relative amount, obtaining tumor environmental indicator (TEI) value. It was analyzed with respect to the tumor size, local lymph node metastases presence (according to the TNM classification), tumor grading, tumor localization, cancer recurrence and prognosis.

- Statistically significantly higher TEI value was observed in cases of the largest tumor size (T3).

- TEI value was compared with the tumor grading and was found to be higher in the cases of high grade squamous cell carcinoma than in the cases of moderately differentiated cancer cells.
- The analysis of TEI value and tumor localization revealed the highest TEI values in cases with tumors affecting both pharynx and larynx, where the tumor range transgressed anatomical barriers.
- High TEI value was related to poor prognosis. High TEI value was identified in four cases involving patients who, in spite of histopathologically cancer free surgical margins, died of cancer within a year following radical surgical treatment.
- In 13 cases of patients with high TEI values the recurrence of the disease was confirmed within a year following surgical treatment.

Conclusions

RCAS1 protein expression is an unfavorable prognostic marker in pharyngeal and laryngeal cancer. Its expression is associated with other well known negative prognostic factors. High RCAS1 expression in clear surgical margin of pharyngeal and laryngeal cancer is connected with higher risk of local cancer recurrence and dissemination of the tumor. We have indicated that comparison of RCAS1 in clear surgical margin and tumor cells might thus have both diagnostic and treatment consequences. RCAS1 expression could be used to predict the possibility of cancer recurrence. Molecular diagnosis of clear surgical margin might thus have a decisive significance for subsequent therapy and survival.

7.0 Indeks skrótów

RCAS1- receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells
RCAS1-R- RCAS1 receptor
rRCAS1- rekombinowane białko RCAS1
sRCAS1-soluble RCAS1-rozpuszczalna forma RCAS1
TAA- tumor-associated antigens- antygeny związane z guzem
IL-1 β converting enzyme (ICE-like) proteases
PBL- peripheral blood lymphocytes- limfocyty krwi obwodowej
SCF- stem cell factor- czynnik komórki macierzystej stem
IGF-I- Insuline-like Growth Factor I- insulino-podobny czynnik wzrostu
Fas (CD95/APO-1)
TRAIL- TNF-related apoptosis-inducing ligand- ligand indukujący apoptozę związany z TNF
FADD- Fas-associated death domain- domena śmierci związana z Fas
TRADD- TNF receptor associated death domain- domena śmierci związana z TNF
DISC- death inducing signaling complex- kompleks indukujący sygnał śmierci
ERE- estrogen responsive element- element odpowiadający na estrogeny
Er α - receptor estrogenowy- α
Er β - receptor estrogenowy- β
TIL-tumor infiltrating lymphocytes- limfocyty naciekające guz
NK-natural killer cells- naturalni zabójcy
CTLs-cytotoxic lymphocytes- limfocyty cytotoksyczne
DNK- doczesnowe NK- decidual NK
HPV- Human Papillomavirus- ludzki wirus brodawczakowości
NF κ B- nuclear factor κ B- czynnik jądrowy κ B
HIAP- human inhibitor of apoptosis proteins- ludzki inhibitor białek apoptotycznych
TNFR- tumor necrosis factor receptor family- rodzina receptorów TNF
DcR3- decoy receptor for Fas-L
HTERT- human telomerase reverse transcriptase- ludzka telomeraza odwrotna transkryptaza
LOH- loss of heterozygosity- utrata heterozygotyczności
TGFR- transforming growth factor receptor- receptor dla transformującego czynnika wzrostu
TGF- transforming growth factor- transformujący czynnik wzrostu
EGF- epidermal growth factor- naskórkowy czynnik wzrostu
PDGF- platelet derived growth factors- czynnik wzrostowy pochodzący z płytek krwi u ludzi

8.0. Piśmiennictwo

1. Małofiejew M. Nowotwory. W: Historia medycyny. Brzeziński T (red.). PZWL, Warszawa 1988:348.
2. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;80:827-841.
3. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. Cancer statistics, 1994. *CA Cancer J Clin* 1994;44:7-26.
4. Schantz SP, Harrison LB, Hong WK. Tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses, nasopharynx, oral cavity and oropharynx. W: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Devita VT Jr, Helman S, Rosenberg SA (red.). JB Lippincott, Philadelphia 1993:574-630.
5. Mineta H, Ogino T, Amano HM, Ohkawa Y, Araki K, Takebayashi S, Miura K. Human papillomavirus (HPV) type 16, and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1998;18:4765-4768.
6. Sherman CD. Guzy głowy i szyi. W: *Podręcznik onkologii klinicznej*. Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosch FX (red.). PWN, Warszawa 1994:218-237.
7. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJP, Van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer at the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 1994;73:187-190.
8. Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999;86:2668-2673.
9. Partridge M, Li SR, Pateromichelakis S, Francis R, Philips E, Huang X, Tesfa-Selase F, Langdon JD. Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. *Clin Cancer Res* 2000;6:2718-2725.
10. Brown DC, Purushotham AD, Birnie GD, George WD. Detection of intraoperative tumor cell dissemination in patients with breast cancer by use of reversed transcription and polymerase chain reaction. *Surgery* 1995;117:96-101.
11. Sonoda K, Nakashima M, Kaku T, Kamura T, Nakano H, Watanabe T. A novel tumor-associated antigen expressed in human uterine and ovarian carcinomas. *Cancer* 1996;77:1501-1509.
12. Nakashima M, Sonoda K, Watanabe T. Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat Med* 1999;5:938-942.
13. Sonoda K, Miyamoto S, Hirakawa T, Kaku T, Nakashima M, Watanabe T, Akazawa K, Fujita T, Nakano H. Association between RCAS1 expression and clinical outcome in uterine endometrial cancer. *Br J Cancer* 2003;89:546-551.

14. Iwasaki T, Nakashima M, Watanabe T, Yamamoto S, Inoue Y, Yamanaka H, Matsumura A, Iuchi K, Mori T, Okada M. Expression and prognostic significance in lung cancer of human tumor-associated antigen RCAS1. *Int J Cancer* 2000;89:488-493.
15. Hiraoka K, Hida Y, Miyamoto M, Oshikiri T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Shinohara T, Itoh T, Shichinohe T, Kondo S, Kasahara N, Katoh H. High expression of tumor associated antigen RCAS1 in pancreatic ductal adenocarcinoma is an unfavorable prognostic factor. *Int J Cancer* 2002;99:418-423.
16. Nakakubo Y, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Oshikiri T, Kato K, Suzuoki M, Hiraoka K, Ito T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. Prognostic significance of RCAS1 expression in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Cancer Lett* 2002;177:101-105
17. O'Sullivan B, Irish J, Siu L. Nowotwory głowy i szyi. W: Podręcznik onkologii klinicznej. Pawłęga J (red.). Wydawnictwo Przegląd Lekarski, Kraków 2001:345-370.
18. Sherman CD. Guzy głowy i szyi. W: Podręcznik onkologii klinicznej. Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosch FX (red.). PWN, Warszawa 1994:219.
19. Sidransky D. Cancer of the head and neck. W: *Cancer: principles and practice of oncology*. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (red.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997:100-250.
20. Ogura JH, Mallen R, Spector GJ. Tumors of the larynx and pharynx. W: *Diseases of the nose, throat and ear*. Ballenger JJ (red.). Lea and Febiger, Philadelphia 1977:26-86.
21. Lu W, Ren Z, Pan Z. Histopathological study of local invasiveness of transglottic cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1998;20:299-301.
22. Matsushima T, Nakashima M, Oshima K, Abe Y, Nishimura J, Nawata H, Watanabe T, Muta K. Receptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells, a novel regulator of apoptosis of erythroid progenitor cells. *Blood* 2001;98:313-321.
23. Ikeda K, Sato M, Tsutsumi O, Tsuchija F, Tsuneizumi M, Emi M, Imoto I, Inazawa J, Muramatsu M, Inoue S. Promoter analysis and chromosomal mapping of human EBAG9 gene. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;273:654-660.
24. Tsuchija F, Ikeda K, Tsutsumi O, Hiroi H, Momoeda M, Taketani Y, Muramatsu M, Inoue S. Molecular cloning and characterization of mouse EBAG9, homolog of human cancer associated surface antigen: expression and regulation by estrogen. *Biochem Biophys Res Comm* 2001;284:2-10.
25. Engelsberg A, Hermosilla R, Karsten U, Schulein R, Dorken B, Rehm A. The Golgi protein RCAS1 controls cell surface expression tumor-associated O-linked glykan antigens. *J Biol Chem* 2003;278:22998-30007.
26. Yokota T, Yoshimoto M, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M. Frequent multiplication of chromosomal region 8q24.1 associated with aggressive histologic types of breast cancers. *Cancer Lett* 1999;139:7-13.

27. Tsuneizumi M, Emi M, Nagai H, Harada H, Sakamoto G, Kasumi F, Inoue S, Kazui T, Nakamura Y. Overrepresentation of the EBAG9 gene at 8q13 associated with early stage breast cancers. *Clin Cancer Res* 2001;7:3526-3532.
28. Suzuki T, Inoue S, Kawabata W, Akahira J, Morija T, Tsuchija F, Ogawa S, Muramatsu M, Sasano H. EBAG9/RCAS1 in human breast carcinoma a possible factor in endocrine-immune interactions. *Br J Cancer* 2001;85:1731-1737.
29. Rousseau J, Tetu B, Caron D, Malenfant D, Cattaruzzi P, Audette M, Doillon C, Tremblay J, Guerette B. RCAS1 is associated with ductal breast cancer progression. *Biochem Biophys Res Comm* 2002;293:1544-1549.
30. Sonoda K, Kaku T, Hirakawa T, Kobayashi H, Amada S, Sakai K, Nakashima M, Watanabe T, Nakano H. The clinical significance of tumor-associated antigen RCAS1 expression in the normal, hyperplastic and malignant uterine endometrium. *Gynecol Oncol* 2000;79:424-429.
31. Izumi M, Nakanishi Y, Yoshino I, Nakashima M, Watanabe T, Hara N. Expression of tumor associated antigen RCAS1 correlates significantly with poor prognosis in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2001;92:446-451.
32. Oshikiri T, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Katoh K, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Shinohara T, Itoh T, Kondo S, Katoh H. RCAS1 as a tumor progression marker: an independent negative prognostic factor in gallbladder cancer. *Br J Cancer* 2001;85:1922-1927.
33. Noguchi K, Enjoji M, Nakamuta M, Nakashima M, Nishi H, Choi I, Taguchi K, Kotoh K, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneishi M, Nawata H, Watanabe T. Expression of tumor associated antigen RCAS1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2001;168:197-202.
34. Suzuoki M, Hida Y, Miyamoto M, Oshikiri T, Hiraoka K, Nakakubo Y, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. RCAS1 expression as a prognostic factor after curative surgery for extrahepatic bile duct carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2002;9:388-393.
35. Fukuda K, Tsujitani S, Maeta Y, Yamagouchi K, Ikeguchi M, Kaibara N. The expression of RCAS1 and tumor infiltrating lymphocytes in patients with T3 gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 2002;5:220-227.
36. Umeoka K, Naoko S, Oyama K, Tahara S, Kurotani R, Ikuyama S, Nakashima M, Watanabe T, Osamura R Y, Teramoto A. Immunohistochemical analysis of RCAS1 in human pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2001;14:1232-1236.
37. Oshima K, Nakashima M, Sonoda K, Kikuchi M, Watanabe T. Expression of RCAS1 and FasL in human trophoblasts and uterine glands during pregnancy: the possible role in immune privilege. *Clin Exp Immunol* 2001;123:481-486.
38. Brown JJ, Xu H, Nishitani J, Mohammed H, Osborne R, Teklehaimanot S, Gill G, Liu X. Potential biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2003;113:393-400.
39. Galloway DA. Papillomavirus capsids: a new approach to identify serological markers of HPV infection. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:474-475.

40. Konieczny L, Roterman I. Strategia działania organizmu żywego. Zamiast Korepetycji, Kraków 2000:5-104.
41. Nadal A, Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2003;442:1-7.
42. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
43. Dong G, Chen Z, Kato T, Waes CV. The host environment promotes the constitutive activation of nuclear factor- κ B and proinflammatory cytokine expression during metastatic tumor progression of murine squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:3495-3504.
44. Arlt A, Schafer H. NF kappaB-dependent chemoresistance in solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002;40:336-347.
45. Djerbi M, Screpanti V, Catrina AI, Bogen B, Biberfeld P, Grandien A. The inhibitor of death receptor signaling FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med* 1999;190:1025-1031.
46. Seki N, Hayakawa Y, Brooks A, Wine J, Wiltrout RH, Yagita H, Tanner JE, Smyth M, Sayers TJ. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis is an important endogenous mechanism for resistance to liver metastases in murine renal cancer. *Cancer Res* 2003;63:207-213.
47. Friedman M, Grey P, Venkatesan TK, Bloch I, Chawla P, Caldarelli DD, Coon JS. Prognostic significance of bcl-2 expression in localized squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:445-450.
48. Friedman M, Lim JW, Manders E, Schaffner AD, Kirshenbaum GL, Tanyeri HM, Caldarelli DD, Coon JS. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001;23:280-285.
49. Gallo O, Boddi V, Calzolari A, Simonetti L, Troati M, Bianchi S. *bcl-2* protein expression correlates with recurrence and survival in early stage head and neck cancer treated by radiotherapy. *Clin Cancer Res* 1996;2:261-2
50. Giorda E, Sibilio L, Martayan A, Moretti S, Ventura I, Mottolese M, Ferrara GB, Cappelacci S, Eibenschutz L, Catricala C, Grammatico P, Giacomini P. The antigen processing machinery of class I human leucocyte antigens: linked patterns of gene expression in neoplastic cells. *Cancer Res* 2003;63:4119-4127.
51. Bainbridge D, Ellis S, Boulteiller P, Sargent I. HLA-G remains a mystery. *Trends Immunol* 2001;22:548-552.
52. Fujieda S, Sunaga H, Tsuzuki H, Fan G-K, Ito T, Sugimoto C, Saito H. Expression of Fas (CD95) ligand is correlated with IL-10 and granulocyte colony-stimulating factor expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2000;161:73-81.
53. Fujieda S, Lee K, Sunaga H, Fan G-K, Imanaka M, Takenaka H, Saito H. Staining for IL-10 predicts clinical outcome in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1999;85:1439-1445.

54. Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel EC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gumey AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 1998;396:699-703.
55. Oshima K, Haraoka S, Sugihara M, Suzumiya J, Kawasaki H, Kanda M, Kikuchi M. Amplification and expression of a decoy receptor for Fas ligand (DcR3) in virus (EBV or HTLV-I) associated lymphomas. *Cancer Lett* 2000;160:89-97.
56. Roth W, Isenmann S, Nakamura M, Platten M, Wick W, Kleihues P, Bahr M, Ohgaki H, Ashkenazi A, Weller M. Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. *Cancer Res* 2001;61:2759-2765.
57. Dutsch-Wicherek M, Wicherek Ł, Mak P, Składzień J. Ocena ekspresji RCAS1 w różnych stanach chorobowych narządów głowy i szyi. *Otarynolaryngologia* 2004;1:25-28.
58. Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R. Telomeres, telomerase and cancer:an up-date. *Virchows Arch* 2000;437:1-16.
59. Ohshima K, Sugihara M, Haraoka S, Suzumiya J, Kanda M, Kawasaki C, Shimazaki K, Kikuchi M. Possible immortalization of Hodgkin and Reed-Sternberg cells: telomerase expression, lengthening of telomere and inhibition of apoptosis by NF- κ B expression. *Leuk Lymphoma* 2001;41:367-376.
60. Luzar B, Poljak M, Marin IJ, Fischinger J, Gale N. Quantitative measurement of telomerase catalytic subunit (hTERT) mRNA in laryngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001;21:4011-4015.
61. Hohaus S, Cavallo S, Ballacosa Genuardi M, Galli J, Cadoni G, Almadori G, Lauriola L, Litwin S, Maurizi M, Neri G. Telomerase activity in human laryngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 1996;2:1895-1900.
62. Ioachim HL. Correlations between tumor antigenicity, malignant potential, and local host immune response. *Contemp Top Immunobiol.* 1980;10:213-38.
63. Keller SE, Ioachim HL, Pearse T, Siletti DM. Decreased T-lymphocytes in patients with mammary cancer. *Am J Clin Pathol* 1976;65:445-449.
64. Miescher S, Whiteside TL, Moretta L, Von Flidner V. Clonal and frequency analyses of tumor infiltrating T lymphocytes from human solid tumors. *J Immunol* 1987;138:4004-4011.
65. Yannelli JR, Hyatt C, McConnell S, Hines K, Jacknin L, Parker L, Sanders M, Rosenberg SA. Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience. *Int J Cancer* 1996;65:413-421.
66. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1159-1166.

67. Reichert TE, Rabinowich H, Johnson JT, Whiteside TL. Human immune cells in the tumor microenvironment: mechanisms responsible for signaling and functional defects. *J Immunother* 1998;21:295-306.
68. Gastman BR, Atarashi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowitch H, Whiteside TL. Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinoma of the head and neck and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res* 1999;59:5356-5364.
69. Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Brady C, Roche D, Collins JK, Shanahan F. Fas ligand counterattack in vivo apoptotic depletion of tumor infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol* 1998;160:5669-5675.
70. Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Brady C, Roche D, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by esophageal carcinoma. *J Immunol* 1998;160:5669-5675.
71. Chappell DB, Restifo NP. T cell tumor cell: a fatal interaction? *Cancer Immunol Immunother* 1998;279:6-10.
72. Saito T, Kuss I, Dworacki G, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. Spontaneous ex vivo apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1263-1273.
73. Reichert TE, Strauss L, Wagner E, Gooding W, Whiteside T. Signaling abnormalities, apoptosis and reduced proliferation of circulating and tumor infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:3137-3145.
74. Hoffman TK, Dworacki G, Tsukihira T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, Whiteside T. Spontaneous apoptosis of circulation T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 2002;8:2553-2562.
75. Schagger H, Aquila H, Von Jagow G. Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem* 1988;173:201-205.
76. Wicherek Ł, Dutsch-Wicherek M, Mak P, Klimek M, Składzien J, Dubin A. Comparative analysis of RCAS1 level in neoplasms and placenta. *Acta Biochim Pol* 2003;50:1187-1194.
77. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, Goodman SN, Sidransky D. Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 1995;332:429-435.
78. Watanabe H, Enjoji M, Nakashima M, Noguchi K, Kinukawa N, Sugimoto R, Kotoh K, Nakamura M, Nawata H, Watanabe T. Clinical significance of serum RCAS1 levels detected by monoclonal antibody 22-1-1 in patients with cholangiocellular carcinoma. *J Hepatol* 2003;39:559-563.
79. Dutsch-Wicherek M, Wicherek Ł, Popiela TJ, Tomaszewska R, Wierzchowski W, Modrzejewski M, Składzien J. Prawdopodobne mechanizmy molekularne biorące udział w nawrocie raka krtani. *Otorynolaryngologia* 2005. In press.

80. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646-650.
81. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989;46:318-322.
82. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:67-71.
83. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994;86:774-779.
84. Holmgren L, Szeles A, Rajnavolgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk KI. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 1999;93:3956-3963
85. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC, Ontanon J, Martinez E. Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis". *Blood* 2000;95:724-725.
86. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genometastasis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:265-275.