

## بررسی تجلی چهار ایزوفرم CD44 (V<sub>7</sub>, V<sub>6</sub>, V<sub>3</sub>, CD44S) در سرطان مری

الهه فلفلی<sup>۱</sup>، الهه الهی\*<sup>۱</sup>، فرشته سلیمانی<sup>۲</sup>، عیسی جهانزاد<sup>۳</sup>، محمد محمودی<sup>۴</sup>، صالح محقق حضرتی<sup>۴</sup>  
<sup>۱</sup>گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران  
<sup>۲</sup>گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران  
<sup>۳</sup>انستیتو کانسر، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه تهران  
<sup>۴</sup>دانشکده بهداشت، دانشگاه تهران  
(دریافت: ۸۱/۶/۳۱؛ پذیرش: ۸۳/۳/۲)

### چکیده

CD44 یک پروتئین چسبندگی است که تجلی آن در سلولهای سالم و سرطانی انواع بافتها متفاوت است. شیوع سرطان مری از نوع اسکوموس سل کارسینوما در ایران در مقایسه با اغلب کشورهای دیگر، بسیار بالا است. در اینجا تجلی CD44 استاندارد (CD44S) و اشکال پروتئین حاوی توالی‌های مربوط به آگزونهای متغیر V<sub>3</sub>، V<sub>6</sub> و V<sub>7</sub> در بافت سرطانی و به ظاهر سالم مری ۴۲ (یا بیشتر) ایرانی مبتلا به سرطان مری به روش ایمنوهیستوشیمی مطالعه شد. بیماران از لحاظ مرحله‌ی تمایز و میزان تهاجم دسته‌بندی شدند. نتایج با روشهای آماری ارزیابی شدند. تفاوت‌های معنی‌دار در تجلی بین نمونه‌های سالم و سرطانی عبارتند از تجلی V<sub>6</sub> و V<sub>7</sub> در درصد بیشتری از نمونه‌های سالم و افزایش شدت تجلی CD44S در نمونه‌های سرطانی. مکان سلولی تجلی CD44S و هر سه آگزون متغیر نیز به وضوح در نمونه‌های سالم در مقایسه با نمونه‌های سرطانی فرق داشت. تفاوت‌هایی در گروه‌های مختلف نمونه‌های سرطانی نیز تشخیص داده شد، یکی افزایش درصد و شدت تجلی CD44S با کاهش درجه تمایز و دیگر کاهش درصد تجلی V<sub>7</sub> با افزایش وضعیت تهاجمی. وجود این تفاوتها پیشنهاد می‌دهد تجلی CD44 یا بر ایجاد و توسعه سرطان مؤثر است یا تحت تأثیر این فرایند واقع است.

**واژه‌های کلیدی:** CD44، اسکوموس سل کارسینومای مری، ایمنوهیستوشیمی، آگزونهای متغیر، تمایز، تهاجم.

## مقدمه

شمال ایران بر روی کمر بند سرطان مری که از غرب ایران تا شمال چین امتداد دارد، قرار می‌گیرد. علاوه بر این سرطان مری یکی از انواع سرطانهای پرشیوع در ایران است (Azin *et al.*, 1998). این سرطان در تمام سنین بعد از کودکی بروز می‌کند و به نظر می‌رسد میان ایرانیان در زنها بیش از مردها شایع است. معمولاً سرطان مری را در مرحله پیشرفته بیماری تشخیص می‌دهند. هرچند شیوع ادنوکارسینوما مری رو به افزایش است، اما اسکواموس سل کارسینوما در دنیا و در ایران شایعترین شکل بیماری است (Lam, 2000). مطالعات همه‌گیرشناسی نقش عوامل محیطی همچون الکل، تنباکو، صدمات وابسته به دما و تشعشعات رادیو اکتیو و حتی ویروسها را در ایجاد سرطان مری موثر دانسته‌اند (Azin *et al.*, 1998, Lam, 2000, Baumforth *et al.*, 1999). در ایجاد بیماری مطالعه شده‌اند که مهمترین اینها سایکلین  $D_1$ ،  $P_{53}$  و ژن تیلوسیس هستند (Mandard *et al.*, 2000, Risk *et al.*, 1999). تجلی ژن  $CD_{44}$  نیز در انواع سرطانها از جمله سرطان مری بررسی شده است.  $CD_{44}$  یک گلیکو پروتئین تراغشایی و نیز یک ملکول چسبندگی است که در انواع سلولها از جمله سلولهای اپیتلیال تجلی می‌یابد (Fox *et al.*, 1994; Mackay *et al.*, 1994). انواع اشکال  $CD_{44}$  باطیف اندازه بین ۸۵ و ۲۰۰ هزار دالتن وجود دارد که همه اینها توسط یک ژن با ۲۰ ژون بر روی کروموزوم شماره ۱۱ انسان رمز می‌شود (Screatan *et al.*, 1992, Brown *et al.*, 1991). اشکال مختلف در اثر دگرپیرایش حداقل نه اگزان متغیر ( $V_2-V_{10}$ ) و تغییرات پس از ترجمه بوجود می‌آیند (Screatan *et al.*, 1992). اگزانهای متغیر اگر تجلی یابند، دامنه‌های خارج سلولی پروتیین را تشکیل می‌دهند. شکل  $CD_{44}$  که هیچ یک از اگزانهای متغیر در آن ظاهر می‌شود،  $CD_{44}$  استاندارد ( $CD_{44S}$ ) نام دارد.  $CD_{44}$  به انواع لیگاندها از جمله هیالورونات، فیبرونکتین و کولاژن متصل می‌شود (Miyake *et al.*, 1990). پیشنهاد شده‌است که  $CD_{44}$  در بسیاری از فرایندها که همراه با حرکت سلولی هستند نقش ایفا می‌کند، از جمله لانه‌گزینی لمفوسیتها، عملکردهای دیگر دستگاه ایمنی و متاستاز (Gallatin *et al.*, 1989; Haynes *et al.*, 1991; Matsumura *et al.*, 1995; Miyake *et al.*, 1990). اشکال مختلف  $CD_{44}$  گرایش یکسانی برای همه لیگاندها ندارند. برای مثال  $CD_{44S}$  در قیاس با  $CD_{44E}$  (که اگزانهای متغیر  $V_8$ ،  $V_9$  و  $V_{10}$  را دارد)، گرایش بیشتری برای هیالورونات دارد (Gallatin *et al.*, 1989). مطالعات مختلف تغییر تجلی  $CD_{44}$  را در سرطانهای مختلف مثل سروگردن (Herold *et al.*, 1996)، مغز (Kuppner *et al.*, 1992)، تیروئید (Ross *et al.*, 1996)، ریه (Sleeman *et al.*, 1996)، کلیه (Ferpe *et al.*, 1996)، دستگاه تناسلی زنان و مردان

(Naor et al., 1997)، (Dall et al., 1995)، سینه (Gao et al., 1997; Naor et al., 1997)، لافوما (Naor et al., 1997) راست روده (Finke et al., 1996)، معده (Yamaguchi et al., 1995)، لوزالمعده (Naor et al., 1997) و مری (Lagorce-Pages et al., 1998) گزارش کرده‌اند. اما الگو تجلی CD44 در مراحل مختلف پیشرفت سرطان مری دقیقاً مشخص نیست (Lagorce-Pages et al., 1998). جهت درک بهتر این الگو بر آن شدیم تجلی CD44 را در بافت مری افراد مبتلا به این سرطان مطالعه کنیم.

## مواد و روشها

برای بررسی تجلی پروتیین CD44 در بافت مری افراد مبتلا به سرطان مری، ۵۳ بیمار که بین سالها ۱۳۷۲ و ۱۳۷۶ به بیمارستان امام خمینی مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. تعداد مردها ۲۶، تعداد زنها ۲۷ و میانگین سن هر دو گروه ۵۰ سال بوده است. بیمارانی که میزان تمایز در بافت سرطانی آنها ضعیف متوسط و خوب بود، انتخاب شدند. علاوه بر میزان تمایز (differentiation)، شاخص تهاجمی (invasive) بودن یا نبودن تومورها و نیز وجود یا عدم وجود متاستاز نیز در نظر گرفته شد. اطلاعات درباره وضعیت متاستازی نمونه‌ها از پرونده بیمارستانی بیماران کسب شد. بلوک‌های پارافین بافت به ظاهر سالم مری و بافت سرطانی مری این افراد از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان امام خمینی تهیه شدند. بلوک بافت پوست فرد سالم نیز تهیه شد تا از آن به عنوان شاهد مثبت در بررسی تجلی CD44S استفاده شود. تجلی پروتیین به روش ایمنوهیستوشیمی وابسته به آنزیم هورس رادیش پراکسیداز انجام گرفت (Janice B). برشهای پنج میکرونی از بلوکها تهیه شدند. روش رنگ‌آمیزی حالت تغییر یافته‌ای از روشهای منتشر شده بود. به اختصار، برشها در زایلین پارافین زدایی و با درجات نزولی الکل آبدهی شدند، سپس در محلول شستشو تریس (۰/۰۵ مولار تریس، pH=۷/۶، ۰/۱۵ مولار NaCl، ۰/۰۰۲ درصد تریتون X-۱۰۰) به مدت ۵ دقیقه قبل از ادامه کار قرار گرفتند. سپس برشها در محلول ۳ درصد H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و ۰/۳ درصد متانل به مدت ۲۰ دقیقه گذاشته شد تا فعالیت پراکسیداز درون سلولی برشها خنثی شود و بعد مجدداً در محلول شستشو تریس گذاشته شدند. بازیافت آنتی ژنها با قرار دادن برشها در محلول ۰/۰۱ مولار سیترات سدیم و انکوبه کردن در دستگاه میکروویو (Daewoo) انجام گرفت. قدرت دستگاه میکروویو ۷۰۰ وات و زمان انکوبه کردن ۲۵ دقیقه (۱۰ دقیقه باضافه ۳ تا ۵ دقیقه) بوده است. پس از هر مرحله حرارت، یک دقیقه صبر کرده و مقدار بافر کنترل می‌شد تا نمونه‌ها خشک نشوند. در مرحله رنگ‌آمیزی، برای کاهش رنگ غیراختصاصی، برشها ابتدا با

سرم ۵:۱ رقیق شده خرگوش به مدت ۲۰ دقیقه پوشانیده شدند و سپس بدون شستشو، آنتی‌بادیهای منوکلونال ضد CD44S (DAKO; Carpinteria, CA, USA)، CD44V<sub>3</sub> (Cal-biochem; Nottingham, UK)، CD44V<sub>6</sub> (Cal-biochem)، یا CD44V<sub>7</sub> (Cal-biochem) رقیق شده به بافتها اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت اتاق درون اتاقک مرطوب قرار داده شدند. پس از شستشو با محلول شستشوی تریس، بافتها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول آنتی بادی ثانویه بیوتین دار (DAKO)، به رقت ۱ به ۲۰۰ انکوبه شدند. پس از شستشو، کمپلکس استرپتاویدین بیوتین پراکسیداز به رقت ۱ به ۲۰۰ اضافه و برشها به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس کروموژن DAB و سوبسترا پراکسیداز (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۳٪) به مدت ۲ دقیقه روی برشها قرار داده شد. در آخر، نمونه‌ها با همتوکسیلین رنگ آمیزی، با درجات صعودی الکل آبگیری، در زایلین فرو برده و با لامل پوشانیده شدند. در تمام آزمایشها همراه با نمونه‌های مورد آزمایش یک برش از بافت کنترل پوست و یک برش از بافت کنترل تومور (شماره ۸۵۳) رنگ‌آمیزی و ارزیابی می‌شد. این کنترل‌ها ما را از تغییرات شدت رنگ‌آمیزی در روزهای مختلف آگاه می‌ساخت. کنترل بافت توموری برای سیستم نمره دادن بر اساس شدت رنگ لازم بود. کنترل منفی همواره رنگ‌آمیزی بافتها بدون آنتی‌بادی مربوط به CD44 بوده است. نتایج آزمایش به صورت کمی و نیمه کمی ثبت شد. ارزیابی نیمه کمی بر حسب شدت رنگ گیری انجام گرفت به نحوی که نمونه‌ها نمره صفر تا پنج می‌گرفتند (Beesley 1993). نمونه‌هایی که CD44 در آنها تشخیص داده نشد نمره صفر، نمونه‌هایی که فقط رنگ ضعیف داشتند نمره ۱، نمونه‌هایی که رنگ متوسط در کمتر از ۲/۳ سلولها داشتند نمره ۲، نمونه‌هایی که رنگ متوسط در بیشتر از ۲/۳ سلولها داشته‌اند نمره ۳، نمونه‌هایی که رنگ قوی در همه سلولها داشتند نمره ۴ و نمونه‌هایی که رنگ خیلی قوی در تقریباً همه سلولها داشته‌اند نمره ۵ را دریافت کردند. در ارزیابی کمی، تعداد نمونه‌های مثبت و منفی مقایسه شدند به نحوی که نمونه‌هایی با نمره ۱ تا ۵ مثبت و نمونه‌هایی با نمره صفر، منفی گروه‌بندی شدند.

روشهای آماری مربع کای، مربع کای trend، مربع کای McNemar، همبستگی Spearman و آزمون Wilcoxon برای ارزیابی نتایج به کار گرفته شدند.

## نتایج

تجلی CD44S در بافت سالم و سرطانی ۵۳ بیمار و تجلی اگزان‌های متغیر V<sub>3</sub>، V<sub>6</sub> و V<sub>7</sub> در دو نوع بافت ۴۲ نفر از همان بیماران بررسی شد. در ارائه نتایج، پروتیین‌هایی که با پادتن

CD44S تشخیص داده می‌شوند، همه CD44S خوانده می‌شدند. در هر چهار نوع بررسی، تمام طرح‌های ممکن تجلی مشاهده شدند: تجلی در بافت سالم و سرطانی، تجلی فقط در بافت سرطانی، تجلی فقط در بافت سالم و عدم تجلی در هر دو نوع بافت.

تفاوت معنی‌داری بین درصد برشهای سرطانی (۵۶٪) و سالم (۵۳٪) که CD44S را تجلی کردند، وجود نداشت (جدول ۱). همچنین تفاوت معنی‌داری بین درصد نمونه‌های سرطانی (۱۲٪) و سالم (۲۲٪) که V<sub>3</sub> را تجلی کردند مشاهده نشد. اما تفاوت معنی‌داری بین درصد نمونه‌های سرطانی و سالم که V<sub>6</sub> (۱۰٪ و ۲۴٪ به ترتیب؛  $p < 0.05$ ) و V<sub>7</sub> (۸٪ و ۲۵٪ به ترتیب؛  $p < 0.05$ ) را تجلی کردند وجود داشت، به نحوی که درصد بیشتری از نمونه‌های سالم این دو آگزون را تجلی می‌کردند (جدول ۱). در نمونه‌های تومور و سالم که تجلی آگزون‌های متغییر تشخیص داده شد، شدت تجلی همواره ضعیف بود. اما برای CD44S، شدت تجلی در برشهای سرطانی در مقایسه با سالم بیشتر بوده است (آزمون Wilcoxon،  $p < 0.05$ ). از ۲۹ نمونه سرطانی که CD44S را تجلی می‌کردند، نمره شدت تجلی در ۴۰ درصد یا بیشتر بوده است در حالی که نمره شدت تجلی تنها ۱۳٪ از نمونه‌های سالم CD44S مثبت ۳ بود و نمره هیچکدام از نمونه‌های سالم بیشتر از ۳ نبود (جدول ۱).

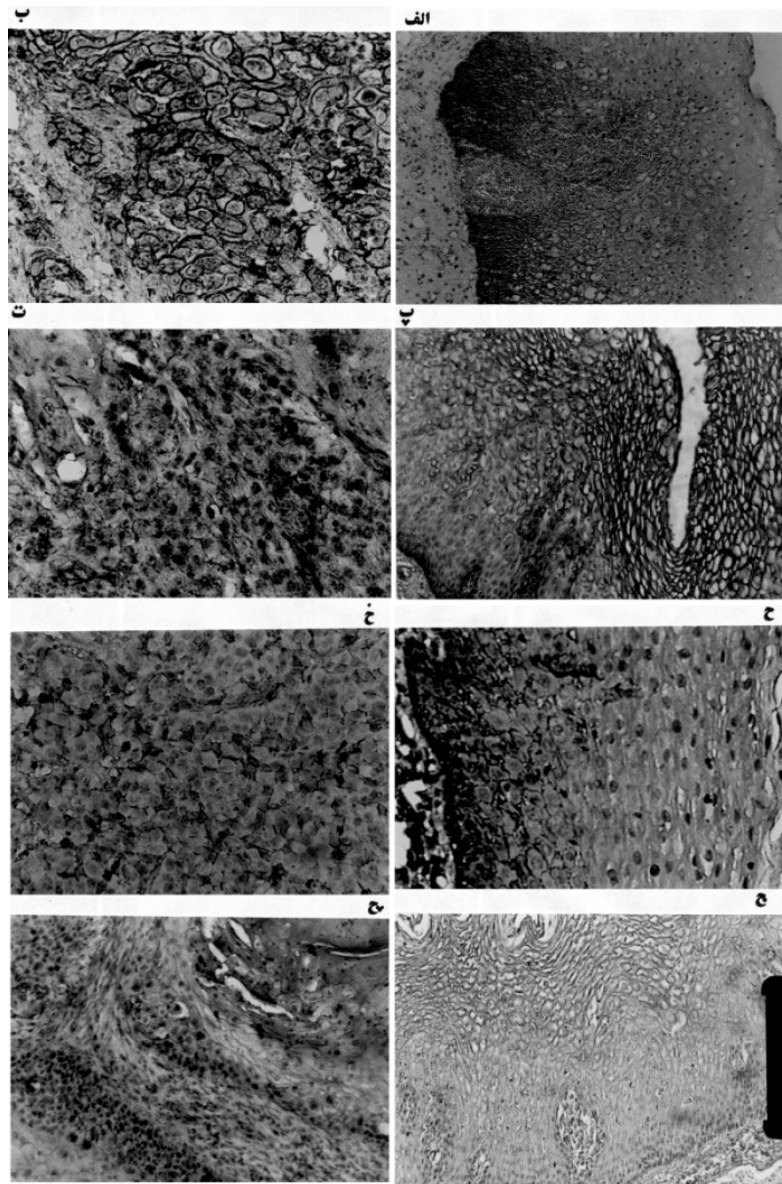
جدول ۱- تجلی CD44S، V<sub>3</sub>، V<sub>6</sub>، V<sub>7</sub> در بافت سرطانی و سالم

بافت سالم	بافت سرطانی	
۵۳٪	۵۶٪	CD <sub>44</sub> S
۲۲٪	۱۲٪	V <sub>3</sub>
۲۴٪	۱۰٪	V <sub>6</sub>
۲۵٪	۸٪	V <sub>7</sub>
۱۳٪	۴۰٪	شدت تجلی CD <sub>44</sub> S > ۳

برای توضیح، به متن مراجعه کنید.

احتمالاً بارزترین تفاوت بین نمونه‌های سالم و سرطانی، طرح فضایی تجلی پروتیین بوده است. در برشهای بافت سالم، بیشترین تجلی CD44S و V<sub>7</sub> همواره در سلولهای مجاور غشا پایه بوده است و میزان تجلی به سمت لایه سلولهای اسکواموس بافت اپی‌تلیال، کم می‌شد (شکل ۱- الف). بیشترین تجلی V<sub>3</sub> و V<sub>6</sub> در سلولهای سطحی بافت پوششی نمونه‌های سالم بوده است و میزان تجلی به سمت لایه بازال کم می‌شد (شکل ۱- پ و ۱- ج). اما در برشهای سرطانی، تجلی پراکنده و در سرتاسر برش به یک میزان مشاهده می‌شد (شکل ۱-)

ب، ۱-ت، ۱-چ و ۱-خ).



شکل ۱ - تشخیص تجلی انواع اشکال  $CD_{44}$  در بافت مری به روش ایمنوهیستوشیمی  
الف)  $CD_{44S}$ ، بافت سالم، ب)  $CD_{44S}$ ، بافت سرطانی، پ)  $V_3$ ، بافت سالم،  
ت)  $V_3$ ، بافت سرطانی، ج)  $V_6$ ، بافت سالم، چ)  $V_6$ ، بافت سرطانی،

ح) V<sub>7</sub>، بافت سالم، خ) V<sub>7</sub>، بافت سرطانی

ارتباط بین تجلی اشکال مختلف CD<sub>44</sub> و متغیرهای سن، جنس، میزان تمایز و میزان تهاجم بررسی شد. رابطه معنی‌داری بین تجلی CD<sub>44</sub>S و سن، جنس یا میزان تهاجم وجود نداشت (آزمون مربع‌کای McNemar). رابطه معنی‌داری بین تجلی CD<sub>44</sub>S و میزان تمایز وجود داشت به نحوی که درصد نمونه‌های توموری که CD<sub>44</sub>S در آنها تجلی می‌شد با کاهش تمایز افزایش می‌یافت (مربع‌کای trend:  $p < 0/05$ ) و شدت تجلی نیز زیاد می‌شد (Spearman Correlation:  $r = 0/4$ ) تنها رابطه معنی‌داری که بین تجلی آگزونهای متغییر و عوامل فوق تشخیص داده شد، رابطه بین تجلی V<sub>7</sub> و روند تهاجم بود به نحوی که با پیشرفت تومور از وضعیت غیر تهاجمی به تهاجمی و سپس متاستازی، درصد نمونه‌های توموری که V<sub>7</sub> در آنها تجلی می‌شد کاهش می‌یافت (کای trend:  $p < 0/005$ ). هیچ رابطه‌ای بین تجلی یا عدم تجلی CD<sub>44</sub>S و آگزونهای متغییر تشخیص داده نشد.

## بحث

تجلی یا عدم تجلی CD<sub>44</sub>S و هیچ یک از آگزونهای متغییر V<sub>3</sub>، V<sub>6</sub> و V<sub>7</sub> در تمام نمونه‌های سالم یا در تمام نمونه‌های سرطانی یا زیرگروه‌های نمونه‌های سرطانی، یکسان نبوده است. یعنی این طور نبوده که در همه نمونه‌های یک گروه تجلی می‌شدند یا نمی‌شدند و این می‌رساند که عواملی علاوه بر عواملی که در اینجا در نظر گرفته شدند، در تنظیم تجلی CD<sub>44</sub> دخالت دارند. با این حال تفاوتی در طرح تجلی CD<sub>44</sub>S یا آگزونهای متغییر بین بافت سالم و سرطانی تشخیص داده شدند که پیشنهاد می‌دهد تجلی CD<sub>44</sub> در ایجاد یا پیشرفت اسکوموس سل کارسینوما مری دخالت دارد یا اینکه تحت تاثیر سرطانی شدن قرار می‌گیرد. تفاوتی مشاهده شده عبارتند از تجلی V<sub>6</sub> و V<sub>7</sub> در درصد بیشتری از نمونه‌های سالم در مقایسه با نمونه‌های سرطانی و افزایش شدت تجلی CD<sub>44</sub>S در نمونه‌های سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم. علاوه بر این مکان تجلی CD<sub>44</sub>S و هر سه آگزون متغییر V<sub>3</sub>، V<sub>6</sub> و V<sub>7</sub> در نمونه‌های سالم در مقایسه با نمونه‌های سرطانی فرق داشت. نتایج ذکر شده با نتایج دو مطالعه دیگر بر تجلی CD<sub>44</sub> در اسکوموس سل کارسینومری از برخی لحاظ یکسان و از لحاظ دیگر تفاوت دارد (Roye et al., 1993; Castella et al., 1996). در یکی از اینها CD<sub>44</sub>S و V<sub>3</sub> در تمام نمونه‌های سرطانی تشخیص داده شد (Castella et al., 1996) و در دیگری بیشترین تجلی V<sub>3</sub> و V<sub>6</sub> در نمونه‌های سالم در لایه بازال بوده است (Roye et al., 1993). تفاوت در دو نوع آنتی‌بادی که استفاده شد ممکن است منشا اختلاف بوده باشد. تجلی V<sub>7</sub> در هیچ یک از

بررسی‌های قبلی مطالعه نشده بود.

علاوه بر تفاوتها بین نمونه‌های سرطانی و سالم، در دو مورد تفاوت معنی داری بین زیر گروه‌های مختلف نمونه‌های سرطانی تشخیص داده شد. درصد تجلی و شدت تجلی CD44S با کاهش درجه تمایز افزایش یافت و درصد تجلی V<sub>7</sub> با افزایش وضعیت تهاجمی کمتر شد. این مشاهدات پیشنهاد می‌دهند که تجلی CD44S و V<sub>7</sub> به نحوی با تغییرات وضعیت سرطان دخالت دارند.

آخرین نکته قابل توجه عدم تطابق بین تجلی CD44S و آگزونها‌های متغییر V<sub>3</sub>، V<sub>6</sub> و V<sub>7</sub> است. آنتی‌بادی که برای تشخیص CD44S به کار گرفته شد، اولین پادتن ضد CD44 تجارتي بود و سازنده آن از ماهیت اپی توپی که شناسایی می‌کرد آگاهی نداشت (مذاکره با نماینده DAKO). از آنجا که در بسیاری از نمونه‌ها که برای V<sub>3</sub>، V<sub>6</sub> یا V<sub>7</sub> مثبت بودند، تجلی CD44S تشخیص داده نشد، احتمالاً پادتن ضد CD44S اپیتوپی را تشخیص می‌داد که اقلأ در برخی از پروتیین‌های CD44 حاوی بخش متغیر، یا وجود ندارد یا در دسترس برای اندرکنش با پادتن قرار نمی‌گیرد.

### تشکر و قدردانی

از سرکار خانم یزدانی برای در اختیار گذاشتن میکروسکوپ و از همکاران بخش پاتولوژی بیمارستان امام خمینی برای در اختیار گذاشتن نمونه‌ها سپاسگذار هستیم.

### References

- Azin F., Raie R.M., Mahmoudi M.M. (1998) *Correlation between levels of certain carcinogenic and noncarcinogenic trace elements and esophageal cancer in northern Iran*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **39**, 179-184.
- Baumforth K.R.N., Young L.S., Favell K.J., Constardinou Co. and Murray P.G. (1999) *Demystification of the Epstein- Barr Virus and its association with cancers*. *Mol. Pathol.*, **52**, 307-322.
- Beesley J., (1993) *Immuno-cytochemistry: A Practical Approach* Oxford University Press, UK.
- Brown T.A., Bouchard T., St John T., Wayner E., Carter W.G. (1991) *Human keratinocytes expresses a new CD44 core protein (CD44E) as a heparin sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons*. *J. Cell Biol.*, **113**, 207-21.
- Castella E., Ariza A., Fernandez-Vasalo A., Roca X., Ojanguren I. (1996) *Expression of CD44 H and CD44 V<sub>3</sub> in normal oesophagus, Barrett mucosa and oesophageal carcinoma*. *J. Clin. Pathol.* **49**, 489-492.
- Dall P., Heider K., Sinn H. Angel P., Adolf G., Kaufmann M., Herrlich P., Panta



- H. (1995) *Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44 V-expression, A new prognostic factor in human breast cancer*, Int. J. Cancer. **60**, 471-477.
- Ferpe H., Storkel S., Zimmer U., Anguez V., Fischer G., Pantel K., Gunthert U. (1996) *Expression of CD44 isoforms in retal cell tumors*. Am. J. Pathol. **148**, 453-463.
- Finke L., Zorb C., Haensch W., Schlag P., Terpe H. (1996) *Expression of CD44 isoforms: a new histopathologic parameter in colorectal carcinama*. Zentralbl Chir, **121**, 460-465.
- Fox S.B., Fawcett J., Jackson D.G., Collins I., Gatter K.C., Harris A.L., Gearing A., Simmons D.L. (1994) *Normal human tissues, in addition to some tumors, expresses multiple different CD44 isoforms*. Cancer Res., **54**, 4539-46.
- Gallatin W.M., Tayner E.A., Hofman P.A., St John T, Butcher EC, Carter WG. (1989) *Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor*. Proc. Natl Acad Sci, USA 86: 4654.
- Gao A., Lou W., Dong J., Isaacs J. (1997) *CD<sub>44</sub> is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13*. Cancer Res. **57**, 846-849.
- Haynes B.F., Liao H.X., Patton K.L. (1991) *The Transmembrane hyaluronate receptor (CD<sub>44</sub>): multiple functions, multiple forms*. Cancer Cells **3**, 347-50.
- Herold C., Seiter S., Born A., Patzelt E., Schupp M., Zoller J., Bosch F., Zoller M. (1996) *Expression of CD<sub>44</sub> splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinoma of the head and neck*. J. Pathol. **179**, 66-73.
- Janice B. The Dako, Handbook of Immunoenzymatic Staining Methods DAKO, Carpinteria, CA, USA.
- Kuppner M., Varmeir E., Gauthier T., Hamou M., De Tribolet, N. (1992) *Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumors*. Int. J. Cancer. **50**, 572- 577.
- Lam A.K.Y. (2000) *Molecular biology of esophageal cell carcinoma*. Crit. Rev. in Oncol. Hematol., **33**,71-90,.
- Lagorce-Pages C., Faraf F., Dubois S., Belghiti J., Flejou J.F. (1998) *Expression of CD<sub>44</sub> in premalignant and malignant Barrett's oesophagus*. Histopath. **32**, 7-14.
- Mackay C.R., Terpe H.J., Stauder R, Marston W.L., Stark J.H., Gunthert U. (1994) *Expression and modulation of CD<sub>44</sub> variant isoforms in humans*. J cell Biol. 124: 71-82.
- Mandard A.M., Hainaut P., Hollstein M. (2000) *Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus*. Mutat. Res., **462**, 335-342.
- Matsumura Y., Sugiyama M, Matsumura S, Hayle A, Robinson P, Smith JC, Tarin D. (1995) *Unusual retention of introns in CD<sub>44</sub> gene transcripts in bladder cancer provides new diagnostic and clinical oncological opportunities*. J. Pathol **177**, 11-20.
- Miyake K., Underhill C.B., Lesely J., Kincode P.W. (1990) *Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD<sub>44</sub> participates in hyaluronate*

- recognition*. J. Exp. Med, **172**, 69-75.
- Naor D., Sionov R., Ish-Shalom D. (1997) *CD<sub>44</sub> structure, function and association with the malignant process*. Advances in cancer Research. **71**, 243-307.
- Risk J.M., Mills H.S., Garde J., Dunn J.R., Evans K.E., Hollstein M., Field J.K. (1999) *The Tylosis esophageal cancer (TOC) locus: more than just a familial cancer gene*. Dis. Esophagus, **12**, 173-176.
- Ross J., Del Rosario A., Sanderson B., Bui H. (1996) *Selective expression of CD<sub>44</sub> cell adhesion molecule in Thyroid papillary carcinoma fine-needle aspirates*. Diagn. Cytopathol. **14**, 287-291.
- Roye G.D. Myers R.B., Brown D., Poczatek R., Beenken S.W., Grizzle W.E. (1993) *CD<sub>44</sub> expression in dysplastic epithelium and squamous cell carcinoma of the esophagus*. Int. J. Cancer. **69**, 254-258.
- Screatan G.R., Bell M.V., Jakson D.G., Cornelis F.B., Gerth U., Bell J.J. (1992) *Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD<sub>44</sub> reveals at least 12 alternatively spliced exons*. Proc. Nat. Acad. Sci., USA **89**, 12160-64.
- Sleeman J., Rudy W., Hofman M., Moll J., Herrlich P., Ponta H. (1996) *Regulated clustering of variant CD<sub>44</sub> proteins increases their hyaluronate binding capacity*. J. of Cell Biology, **135**, 1139-1150.
- Yamaguchi A., Saito M., Goli T., Iida A., Takeuchi K. (1995) *Expression of CD<sub>44</sub> variant exons 8-10 in gastric cancer*. Jpn. J. Cancer Res, **86**, 1166-1171.