

## Hialuronian w chorobach nowotworowych – patofizjologia i perspektywy farmakoterapii

Michał S. Karbownik, Jerzy Z. Nowak

*Hialuronian jest wielkocząsteczkowym polisacharydem o strukturze liniowej, złożonym z powtarzających się naprzemiennie reszt kwasu D-glukuronowego i N-acetylo D-glukozaminy. Hialuronian należy do rodziny glikoaminoglikanów (GAG), jednak wykazuje pewne różnice w stosunku do pozostałych członków GAG. Jest głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej i odpowiada za utrzymanie prawidłowego nawodnienia i napięcia tkanki. Dzięki swym właściwościom reologicznym, hialuronian zmniejsza tarcie pomiędzy wzajemnie trącymi o siebie powierzchniami chrząstek stawowych czy w pochewkach ścięgniętych. Poza funkcjami strukturalnymi, bierze on udział w procesach rozwoju embrionalnego, gojenia ran, zapalenia i nowotworzenia.*

*Hialuronian wykazuje krótki czas półtrwania, zwłaszcza w tkankach zmienionych patologicznie. Jego metabolizm jest kontrolowany w procesach syntezy i degradacji, zachodzących przy udziale odpowiednich enzymów (HAS i HYAL). Hialuronian i/lub różnorodne produkty jego rozkładu mogą aktywować wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnałów za pośrednictwem hialadheryn – białek wiążących hialuronian (HABP) – głównie CD44 i RHAMM.*

*Wykazano zwiększony poziom hialuronianu w wielu złośliwych tkankach nowotworowych. Poprzez wpływ na hialadheryny, hialuronian może pobudzać sygnalizację wewnątrzkomórkową, mającą wpływ na progresję, migrację, inwazję, przerzutowanie komórek nowotworowych oraz na proces angiogenezy. Hialadheryny wydają się być zatem obiecującą tarczą dla potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Poniższa praca przeglądowa omawia sposoby antagonizowania receptorów CD44 i RHAMM przy udziale oligomerów hialuronianu, rozpuszczalnych białek wiążących, przeciwciał, siRNA i szczepionek przeciwnowotworowych. Artykuł przedstawia ponadto koncepcję terapii celowanej z użyciem hialuronianowych nanocząstek, rozpoznających komórki nowotworowe.*

### Hyaluronan in cancer – pathophysiology and pharmacotherapy perspectives

*Hyaluronan (HA) is a linear high-molecular-weight polysaccharide composed of repeating units of D-glucuronic acid residues and N-acetyl-D-glucosamine. Hyaluronan belongs to the family of glycosaminoglycans (GAGs), but it differs from the other members of GAGs. It is a principal element of extracellular matrix, contributing to maintenance of appropriate tissue hydration and tension. Hyaluronan is crucial to decrease the friction between sliding surfaces in joints and tendon sheaths because it demonstrates remarkable rheological properties. Hyaluronan is not only a structural component, but interacts with cells during embryonic development, healing processes, inflammation, and cancer.*

*Hyaluronan is a “dynamic” molecule. Its high turnover rate is most evident in pathologic tissues. It undergoes extensive metabolism controlled mainly by synthesizing (HASs) and degrading (HYALs) enzymes. Hyaluronan and/or its various degradation products are capable of activating intracellular signaling pathways through hyaladherins – hyaluronan binding proteins (HABPs), including CD44 and RHAMM.*

*It was proved that hyaluronan accumulation correlates with the malignant phenotype of many neoplastic tissues. Hyaluronan, by influencing hyaladherins, seems to enhance intracellular metabolic pathways leading to tumor cells progression, migration, invasion, metastases and angiogenesis. Consequently, selective targeting of hyaluronan receptors is a promising way for the development of new anticancer drugs. This review provides the data and concepts of mechanisms which lead to the antagonism of CD44 and RHAMM receptors (hyaluronan oligomers, soluble binding proteins, antibodies,*

*siRNA and vaccinations*). It also presents a suggestion for targeted cancer therapy using nanocarriers of hyaluronan derivatives. Finally, the article evaluates the future of anticancer drugs interacting with hyaluronan, products of its degradation and hyaluronan cell-surface receptors.

**Słowa kluczowe:** Kwas hialuronowy, hialuronian, nowotworzenie, CD44, RHAMM, leki przeciwnowotworowe, nanocząstki

**Key words:** Hyaluronic acid, hyaluronan, cancerogenesis, CD44, RHAMM, anticancer drugs, nanocarriers

## I. Hialuronian

### Historia

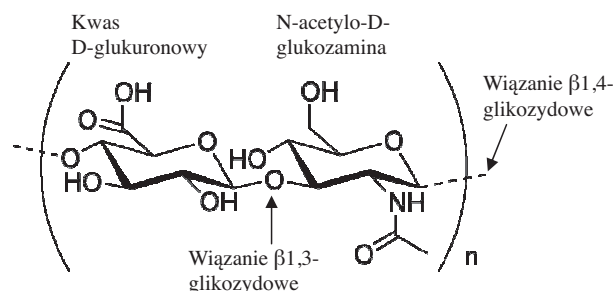
Historia hialuronianu rozpoczęła się w 1841 r. odkryciem substancji wypełniającej przestrzenie międzykomórkowe, nazwanej *ground substance*. Początki nowożytnej ery hialuronianu datuje się na 1934 rok. Wtedy to Karl Meyer i John Palmer wyizolowali ze szklistki oka wołu polisacharyd zawierający kwas uronowy. Badacze zaproponowali dla niego nazwę kwas hialuronowy – *hyaluronic acid* – łącząc nazwę tkanki, z której pochodził związek (*hyaloid* – szklistka), z nazwą jednego ze składników sacharydowych (*uronic acid* – kwas uronowy). Pełna struktura chemiczna związku została ustalona dopiero w 1954 r. przez Meyera i Weissmana. W 1986 r. zaproponowano nazwę zgodną z naturą chemiczną cząsteczki tj. *hyaluronan* – hialuronian.

### Charakterystyka ogólna hialuronianu

Hialuronian jest biopolimerem o strukturze liniowej. W skład jego cząsteczki wchodzi powtarzające się naprzemiennie reszty sacharydowe kwasu D-glukuronowego (GlcA) oraz N-acetylo-D-glukozyminy (GlcNAc), połączone wiązaniami  $\beta$ 1,3- i  $\beta$ 1,4-glikozydowymi (Ryc. 1).

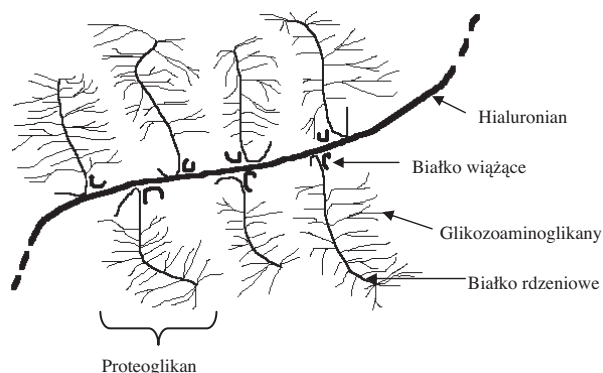
Grupa karboksylowa kwasu D-glukuronowego w środowisku fizjologicznym jest zdysocjowana, dlatego hialuronian występuje w postaci polianionu w połączeniu z  $\text{Na}^+$ , który jest przeważającym kationem zewnątrzkomórkowym (hialuronian sodu). Nazwa „kwas hialuronowy” jest mniej poprawna chemicznie, ponieważ sugeruje niezdisocjowany charakter cząsteczki. Mimo to hialuronian często jest określany skrótem HA – *hyaluronic acid*.

Hialuronian należy do rodziny glikoaminoglikanów (GAG). Wykazuje jednak istotne różnice w porównaniu z pozostałymi przedstawicielami tej grupy związków.



Ryc. 1. Wzór strukturalny jednostki disacharydowej kwasu hialuronowego – HA ( $n$  – liczba merów w cząsteczce)

Posiada znacznie większą cząsteczkę (do 25 000 jednostek disacharydowych), co przekłada się na jego większą masę cząsteczkową (do 10 MDa). Masa ta wykazuje dużą rozpiętość, bowiem cząsteczka hialuronianu nie ma ściśle określonej długości. Wszystkie glikoaminoglikany – oprócz hialuronianu – łączą się kowalencyjnym wiązaniem z rdzeniem białkowym, tworząc złożone struktury zwane proteoglikanami. Hialuronian stanowi z kolei szkielet, do którego przyłączają się w sposób niekowalencyjny, poprzez białka wiążące, inne glikoaminoglikany lub proteoglikany, tworząc olbrzymie agregaty (Ryc. 2) [1, 2].



Ryc. 2. Agregaty hialuronianu w macierzy zewnątrzkomórkowej

Agregaty hialuronianu są, obok włókien kolagenowych tkanki łącznej oraz białek niekolagenowych, głównymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – *extracellular matrix*). U człowieka, poza tkanką łączną, największa ilość hialuronianu znajduje się w pępowinie, mazi stawowej, ciele szklistym oka, krążkach międzykręgowych kręgosłupa, a także w skórze i we włosach [3]. Wysokie stężenia hialuronianu występują ponadto w grzebieniu koguta i otoczkach ścian komórkowych wielu patogennych szczepów bakterii z rodzaju *Streptococcus* i *Pasteurella*. Należy zaznaczyć, że hialuronian posiada identyczną strukturę u wszystkich organizmów żywych, co pozwala na uzyskiwanie go do celów medycznych i kosmetycznych z różnych źródeł. Obecnie hialuronian pozyskuje się głównie z dwóch źródeł, mianowicie z grzebieni kogutów oraz genetycznie modyfikowanych hodowli bakteryjnych.

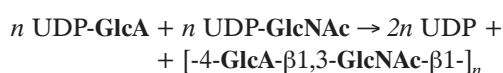
Hialuronian wykazuje szczególne właściwości fizykochemiczne. Dzięki ujemnemu ładunkowi tworzy liczne koordynacyjne wiązania z cząsteczkami wody. Jeden gram hialuronianu może związać aż do 6 litrów wody – **higroskopijność** [4]. Roztwory wodne hialuronianu wyka-

zują ponadto dużą **lepkość** (opór wewnętrzny przeciwko płynięciu, który jest proporcjonalny do stężenia), **elastyczność** (odwracalna zmiana kształtu pod wpływem siły zewnętrznej, zależna od stężenia i długości łańcuchów) oraz **sprężystość** (właściwość odzyskiwania pierwotnego kształtu i wymiarów po usunięciu sił zewnętrznych). Wymienione właściwości reologiczne tłumaczą, dlaczego hialuronian spełnia funkcje naturalnego „smaru” na wzajemnie trących o siebie powierzchniach chrząstek stawowych czy w pochewkach ścięgniastych [3, 5]. Ponadto, cechy te zadecydowały o wykorzystaniu hialuronianu w celach medycznych, np. w okulistyce czy w chirurgii estetycznej [2, 6].

Ostatnie dwie dekady badań nad hialuronianem rzuciły nowe światło na jego funkcję biologiczną. Do niedawna sądzono, że hialuronian pełni jedynie funkcje strukturalno-budulcowe. Przełomem stało się poznanie molekularnych mechanizmów biosyntezy i degradacji związku oraz przekazywania sygnałowego. Odsłoniło to istotną rolę hialuronianu jako modulatora immunologicznego, czynnika zaangażowanego w procesy wzrostu i rozwoju, regulatora stanu zapalnego, mechanizmu gojenia ran, a także progresji nowotworowej.

### Biosynteza hialuronianu

Biosynteza hialuronianu w organizmie żywym nie zachodzi w aparatach Golgiego (jak w przypadku pozostałych glikozoaminoglikanów), ale na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej [7]. Proces syntezy przebiega przy udziale błonowych glikozylotransferaz – syntaz hialuronianowych (HASs – *hyaluronan synthases*). Syntazy te są enzymami bifunkcyjnymi, katalizują dwie reakcje chemiczne jednocześnie. Reakcja przebiega w procesie transglikozylacji nukleotydowych prekursorów kwasu D-glukuronowego i N-acetylo-D-glukozaminy według schematu:



UDP – urydyno-5'-difosforan

$n$  – liczba cząsteczek/merów

W miarę wydłużania łańcucha hialuronianu, jest on wydzielany na zewnątrz komórki przez poropodobne struktury błony komórkowej. W opisanym procesie powstają olbrzymie cząsteczki o masie powyżej 1000 kDa [8, 9].

U człowieka występują trzy różne syntazy hialuronianowe: HAS-1, HAS-2 i HAS-3. Geny kodujące izoenzymy zlokalizowane są na różnych chromosomach i ich ekspresja jest tkankowo zależna [9, 10]. Izoenzymy te różnią się aktywnością oraz zdolnością do syntezy łańcuchów o różnej wielkości cząsteczki [11, 12] (Tab. I).

Interesujących informacji dotyczących syntaz hialuronianowych dostarczyło badanie na myszach z wyłączonymi genami (*gene knock-out*). Okazało się, że wyłączenie genu *has1* lub *has3* nie wywierało wpływu na żywotność, funkcje rozrodcze oraz nie zmieniało fenotypu zwierząt. Natomiast wyłączenie *has2* skutkowało efektem letalnym. Gen *has2* okazał się niezbędny do życia, w tym m.in. do prawidłowego rozwoju serca [13].

Odnotowano również wpływ wielu związków endogennych na ekspresję syntaz hialuronianowych. Czynniki wzrostowe: PDGF-BB, EGF, bFGF i prawdopodobnie TGF- $\beta$ , ponadto cytokiny prozapalne: IL-1, TNF- $\alpha$ , limfotoksyna- $\alpha$  oraz interferony stymulują ekspresję i wzrost aktywności enzymów HAS. Znamienny jest również stymulujący wpływ niektórych substancji indukujących wzrost nowotworowy (np. estry forbolowe) na aktywność syntaz hialuronianowych. Zwiększoną aktywność tych enzymów zaobserwowano również w tkance uszkodzonej oraz w przebiegu chorób o podłożu autoimmunologicznym [5, 14-16]. Powyższe dane wskazują, że proces biosyntezy hialuronianu nie jest jednostajny, ale zróżnicowany i zależy od różnorodnych czynników fizjologicznych i patologicznych. Dane te sugerują również, że izoenzymy HAS mogą stać się tarczami dla nowych substancji leczniczych.

### Degradacja hialuronianu

Degradacja hialuronianu zachodzi na drodze dwóch różnych procesów: rozkładu enzymatycznego i nieenzymatycznego [2]. W degradacji enzymatycznej biorą udział specyficzne enzymy – hialuronoglikozoaminidazy, inaczej zwane hialuronidazami (HYALs – *hyaluronidases*). Proces degradacji nieenzymatycznej zachodzi według mechanizmu wolnorodnikowego; jest zatem niespecyficzny – ma miejsce w stanach stresu oksydacyjnego i prowadzi do fragmentacji cząsteczki hialuronianu.

Hialuronidazy katalizują reakcję hydrolizy wiązania  $\beta$ 1,4-glikozydowego cząsteczki hialuronianu (Ryc. 1). W ludzkim genomie zidentyfikowano 6 genów kodujących sekwencje hialuronidazy, które są zlokalizowane na dwóch chromosomach (Tab. II) [17].

HYAL-1 jest główną hialuronidazą osoczną, występuje ponadto w wielu tkankach. Izoenzym ten

Tab. I. Geny i białka enzymatyczne syntaz hialuronianowych

Gen	Białko enzymatyczne	Lokalizacja chromosomowa	Ilość aminokwasów	Masa syntetyzowanej cząsteczki [kDa]
<i>has1</i>	HAS-1	19q13.3	578	100 – 1000
<i>has2</i>	HAS-2	8q24.12	552	>1000
<i>has3</i>	HAS-3	16q22.1	553	≤100

Tab. II. Geny i białka enzymatyczne hialuronidaz

Gen	Białko enzymatyczne	Lokalizacja chromosomowe
<i>hyal1</i>	HYAL-1	3p21.3
<i>hyal2</i>	HYAL-2	
<i>hyal3</i>	HYAL-3	
<i>hyal4</i>	HYAL-4	7q31.3
<i>ph20 / spam1</i>	PH-20	
<i>phyal1</i> (pseudogen)	–	

degraduje hialuronian o dużej masie cząsteczkowej (HMWH – *high molecular weight hyaluronan*) do małych produktów, zwykle czterosacharydowych [18, 19].

HYAL-2 jest izoenzymem tkankowym, zakotwiczo- nym do błony komórkowej. Wykazuje słabszą aktywność niż HYAL-1, hydrolizuje hialuronian wielkocząsteczkowy do mniejszych fragmentów, około 20 kDa, czyli 50 jednostek disacharydowych (LMWH – *low molecular weight hyaluronan*) [20, 21].

HYAL-3 oraz HYAL-4 występują w wielu tkankach, jednak ich udział w procesie degradacji hialuronianu jest niedostatecznie wyjaśniony. Wiadomo, że HYAL-4 jest izoenzymem mniej specyficznym; poza degradowaniem hialuronianu wykazuje powinowactwo do innych gliko- zoaminoglikanów.

PH-20 jest izoenzymem występującym w jądrach; jest enzymem plemnikowym, znanym również pod nazwami *spreading factor* oraz SPAM-1 – od ang. *sperm adhesion molecule 1*. Jest on odpowiedzialny za rozkład hialuronianu otaczającego komórkę jajową – umożliwia penetrację plemnika do jej wnętrza i zapłodnienie [22]. Dalsze badania udowodniły występowanie PH-20 w innych tkankach oraz w nowotworach złośliwych [23].

Rozpad hialuronianu w tkankach zachodzi w dwu- etapowym procesie. Agregaty długołańcuchowego hialuronianu (HMWH) w macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) ulegają związaniu ze specyficznym receptorem na powierzchni komórek – receptorem CD44. Hialuro- nidaza HYAL-2 degraduje wówczas biopolimer do krót- kołańcuchowego hialuronianu (LMWH), który następ- nie jest rozcinany przez HYAL-1 lub PH-20 do krótkich oligomerów:



Należy dodać, że wiele organizmów żywych produ- kuje hialuronidazy. Niektóre szczepy bakterii chorobo- twórczych (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyoge- nes*, *Clostridium perfringens*) wykorzystują te enzymy w celu rozbijania barier stawianych przez macierz zewną- trzkomórkową i zwiększenia swojej mobilności w tkan- kach zaatakowanego organizmu [2]. Również owady, pijawki, pewne skorupiaki oraz żmije wytwarzają hialu- ronidazy [24].

Jak wyżej wspomniano, proces degradacji hialuro- nianu zachodzić może również na drodze nieenzyma- tycznej, w wyniku fragmentacji przez reaktywne formy tlenu i azotu (ROS – *reactive oxygen species*, RNS – *reactive nitrogen species*). Stopień udziału wolnorodnikowego mechanizmu rozkładu hialuronianu w całościowym procesie degradacji nie został dotychczas określony, jednak- że rola nieenzymatycznej fragmentacji została udowod- niona. W przebiegu procesu zapalnego, w trakcie które- go dochodzi do generacji wolnych rodników, hialuronian ulega rozcinaniu do krótszych fragmentów, które z kolei wykazują różnorodną aktywność biologiczną [2].

Procesy biosyntezy i degradacji hialuronianu w warunkach fizjologicznych pozostają w stanie rów- nowagi dynamicznej. Spośród około 15 g hialuronia- nu w organizmie człowieka, 5 g ulega stałej wymianie w ciągu jednego dnia. Hialuronian obecny w krążeniu podlega szybkiemu obrotowi ( $t_{1/2} = 2-5$  min.). W mazi stawowej nie stwierdza się obecności syntaz hialuro- nianowych ani hialuronidaz. Hialuronian dociera tam z zewnątrz i jest eliminowany na drodze katabolizmu chemicznego ( $t_{1/2} \approx 12$  godz.). W chrząstce stawowej hial- uronian utrzymywany jest przez około 1-3 tygodnie, a w szklistce oka – do 70 dni [2].

### Aktywność biologiczna hialuronianu

Hialuronian został dobrze poznany jako struktu- ralny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Jak wcześniej wyjaśniano, jest on kluczowy w utrzyma- niu struktury ECM oraz komunikacji między komórkami. Dzięki odpowiednim parametrom reologicznym, pełni on rolę substancji poślizgowej i nawilżającej między elemen- tami wzajemnie o siebie trącymi. Stosunkowo niedawno wykazano, że wielkocząsteczkowy hialuronian (HMWH) oraz produkty jego rozpadu (LMWH oraz oligosacha- rydy) biorą również udział w zaskakująco dużej liczbie procesów biologicznych (Tab. III) [25], związanych z ich interakcjami z białkami wiążącymi hialuronian (HABPs – *hyaluronan-binding proteins*), zwanymi również hiala- dherynami.

Hialuronian wpływa na proliferację, różnicowanie i migrację komórek, angiogenezę, reakcje zapalne, czyn- ność komórek układu odpornościowego, procesy nowo- tworzenia. Jest coraz więcej doniesień na temat jego roli w patomechanizmie wielu chorób [2, 11, 14, 26-28].

Wśród białek wiążących hialuronian wyróżnia się białka związane z błonami komórkowymi (CD44, RHAMM, receptory Toll-podobne: TLR-4 i TLR-2, LYVE-1, HARE) oraz białka występujące w macierzy zewnątrzkomórkowej (białko wiążące LP, agrekan, bre- wikan, wersykan) [2].

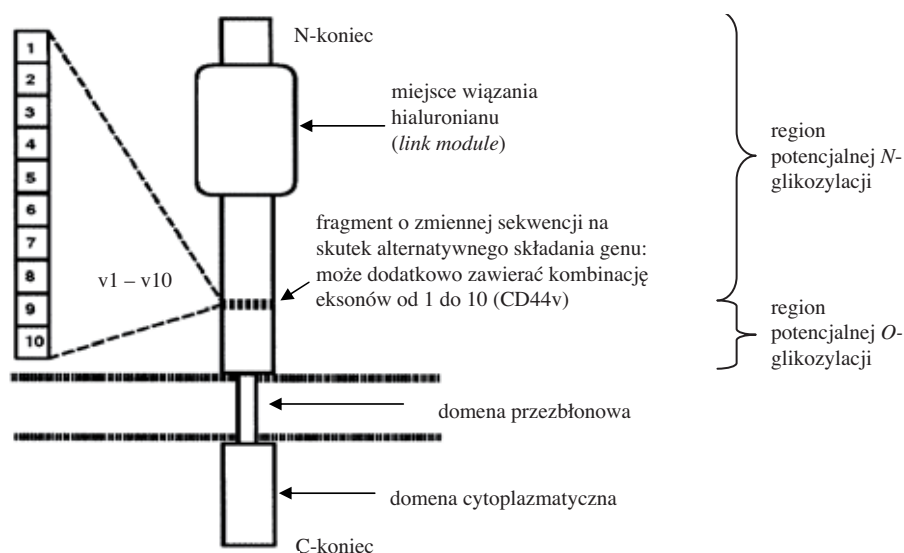
### Receptor CD44

Białko CD44 (*Cluster of Differentiation 44*) (Ryc. 3) stanowi główny receptor dla hialuronianu. Jest on jedno- łańcuchową glikoproteiną transbłonową (37 kDa) o cha- rakterze kwasowym, determinowanym głównie obecno-



Tab. III. Aktywność biologiczna hialuronianu i produktów jego degradacji

Liczba jednostek disacharydowych	Aktywność biologiczna
5000-25000 (HMWH)	Zahamowanie angiogenezy, fagocytozy, zwrotne hamowanie biosyntezy HA
~ 500	Indukcja cytokin prozapalnych, stymulacja urokinazy i PAI-1 ( <i>plasminogen activator inhibitor type 1</i> )
5-20	Dezaktywacja CD44, aktywacja migracji komórek nowotworowych
4-16	Stymulacja angiogenezy i neowaskularyzacji nowotworowej
~ 8	Supresja proliferacji komórek mięśni gładkich
6	Różnicowanie komórek śródbłonna naczyniowego, zwiększenie ekspresji PTEN ( <i>phosphatase and tensin homolog</i> ) w komórce nowotworowej → inicjacja apoptozy
5	Podmiana HA na powierzchni oocytów, podmiana proteoglikanów na powierzchni komórek
3	Zwrotne hamowanie wydłużania łańcucha HA, indukcja NO i metaloproteinaz w chondrocytach, indukcja HAS-2 w chondrocytach
2-3	Indukcja syntezy cytokin w komórkach dendrytycznych, transkrypcja genów kodujących MPs
2	Zwiększenie ekspresji HSP-72 ( <i>heat shock protein 72</i> ), HSF-1 ( <i>heat shock factor 1</i> ) oraz Fas, supresja apoptozy i siarczanowania proteoglikanów, indukcja chemotaksji



Ryc. 3. Schemat receptora CD44

ścią kwasu sialowego. CD44 wykazuje dużą zmienność strukturalną. Teoretycznie możliwe jest występowanie ponad 800 izoform (choć nie wszystkie ulegają ekspresji). Do chwili obecnej zidentyfikowano dziesiątki różnych CD44. Różnorodność ta jest po pierwsze skutkiem zachodzenia procesu alternatywnego składania (*alternative splicing*). Wariant nie zawierający eksonów regulowanych w tym procesie zwany jest standardowym CD44 (CD44s) – jest on najczęstszą formą receptora. Pozostałe warianty określa się mianem CD44v. Po drugie, różnice w budowie receptora mogą wynikać z zachodzących odwracalnie modyfikacji potranslacyjnych (*N*-, *O*-glikozylacji i przyłączania glikozoaminoglikanów) [29]. Z powyższych przyczyn rzeczywista masa CD44 zazwyczaj waha się w przedziałach 80-95 kDa, choć występują także cząsteczki o masie do 250 kDa [30, 31].

Różnorodność budowy CD44 sprawia, że nie wszystkie komórki posiadające ten receptor wiążą hialuronian.

choć pozostaje on głównym ligandem większości CD44. Zidentyfikowano ponadto kilka innych cząsteczek wiążących się z CD44, takich jak kolagen, fibrynogen, fibronektyna, laminina, siarczan chondroityny i inne [30, 32, 33].

Powinowactwo hialuronianu do CD44 zależy również w dużej mierze od stanu aktywacji receptora, który może wzrastać na skutek glikozylacji, oddziaływania niektórych czynników (TGF- $\beta$ 1, estrów forboleu) oraz usuwania reszt kwasu sialowego [34].

Cząsteczka CD44 jest obecna na powierzchni większości komórek i spełnia wiele funkcji. Hialuronian na skutek oddziaływania z CD44 bierze udział w przywieraniu komórek do ECM, adhezji leukocytów do śródbłonna naczyniowego, stymuluje procesy agregacji, proliferacji, migracji, a także angiogenezy [14, 35, 36].

## Receptor RHAMM

Białko RHAMM (*receptor for hyaluronan-mediated motility*) posiada kilka izoform (u człowieka 52-84 kDa), występuje on zarówno na powierzchni, jak i wewnątrz komórki. W zdrowych tkankach gen *RHAMM* ulega ekspresji w niewielkim stopniu. Ekspresja nasila się w procesie gojenia ran, który jest jedyną znaną do tej pory fizjologiczną funkcją receptora. Aktywacja receptora pod wpływem hialuronianu przyczynia się do wzmożenia ruchliwości komórek [37, 38], niezbędnej w procesie gojenia ran. Mimo, że hialuronian występuje na zewnątrz komórki, sugeruje się również możliwość jego interakcji z wewnątrzkomórkowymi receptorami RHAMM i jej udział w procesach podziałów komórkowych [39].

## Inne receptory dla hialuronianu

Receptory Toll-podobne (TLR – *Toll-like receptors*) są głównymi receptorami odporności wrodzonej [40]. Poprzez wpływ na receptory TLR, niskocząsteczkowy hialuronian (LMWH) odgrywa ważną rolę w regulacji stanu zapalnego – działa prozapalnie [14]. Wielkocząsteczkowa postać (HMWH) spełnia zadanie wygaszania odpowiedzi immunologicznej – działa przeciwzapalnie [26].

Receptory LYVE-1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*) występują w ścianach naczyń limfatycznych. Biorą udział w transporcie hialuronianu do limfy. Mogą również uczestniczyć w limfangiogenezie i przerzutowaniu nowotworów do węzłów chłonnych [41]. Rola receptorów HARE (*hyaluronan receptor for endocytosis*) pozostaje wciąż do ustalenia. Przypuszcza się, że pośredniczą one w eliminacji hialuronianu z organizmu [42].

## II. Hialuronian w chorobach nowotworowych

### Rozwój nowotworu

Inwazja nowotworowa i przerzutowanie są skomplikowanym procesem składającym się z wielu następujących po sobie etapów. Początkowo nowotwór pojawia się i rozrasta w obrębie tkanki macierzystej, a jego komórki nie są w stanie przekroczyć wewnątrznarządowych barier (rak nieinwazyjny). Dopiero po pewnym czasie komórki nowotworowe stają się zdolne do naciekania sąsiednich warstw tkanki macierzystej i pobliskich tkanek, a później do przerzutowania.

Rozprzestrzenianie się transformowanych nowotworowo komórek dokonuje się w kilku etapach. Przede wszystkim komórki muszą stracić zdolność do adhezji (komórki przerzutujące). Wtedy mogą penetrować na coraz większy obszar, pokonując bariery, żeby ostatecznie móc dostać się do światła naczyń limfatycznych i krwionośnych. W ten sposób komórki nowotworowe „podróżują” dopóty, dopóki nie zostaną wychwycone w wyniku procesów adhezyjnych przez komórki śródbłonka naczyniowego. Wówczas przenikają w wyniku migracji przez-

śródbłonkowej (ekstrawazacja), aby utworzyć nowe kolonie komórek nowotworowych (przerzuty oddalone) [43].

Wśród wielu różnorodnych cząsteczek adhezyjnych, cytokin i innych związków chemicznych, zaangażowanych w proces inwazji nowotworowej i przerzutowania, znalazły się: hialuronian, jego receptory oraz wiele cząsteczek związanych z metabolizmem tego polisacharydu. W poniższych rozdziałach przedstawiono aktualną wiedzę na temat roli tych czynników w rozwoju nowotworu oraz perspektywy farmakoterapii, ingerującej w opisane ścieżki metabolizmu i przekazywania sygnału.

### Udział hialuronianu w rozwoju nowotworu

Rola hialuronianu w procesie nowotworzenia została dość dobrze poznana i opisana [26, 44-46]. Mimo to, wciąż – jak się wydaje – jest niedoceniana przez wielu badaczy nowotworów. Najprawdopodobniej wynika to z faktu, że dopiero ostatnie lata przynoszą wyjaśnienie wielu nurtujących zagadek, dotyczących roli hialuronianu w nowotworzeniu. Tymczasem hialuronian nie tylko odgrywa istotną rolę w patogenezie nowotworów, ale również może stać się w przyszłości tarczą dla leków przeciwnowotworowych. Pierwsze próby zostały już pomyślnie przeprowadzone.

W 1939 r. Elvin Kabat po raz pierwszy zaobserwował, że hialuronian jest produkowany przez komórki nowotworowe mięsaka Rousa u kurcząt. Po infekcji wirusem mięsaka dochodzi do pięciokrotnego wzrostu aktywności syntaz hialuronianowych w komórkach transformowanych i gromadzenia się biopolimeru. Wykazano, że stężenie hialuronianu w tkankach nowotworów złośliwych jest wyższe niż w tkankach zmian łagodnych i tkankach prawidłowych, zarówno zwierząt, jak i człowieka [9, 47-50]. Poziom hialuronianu badano metodą histochemiczną z wykorzystaniem biotyloowanych białek wiążących [47] lub metodą chromatografii jonowymiennej [48]. Hialuronian jest także wydzielany do osocza osób chorych na nowotwór [50-53]. Zachodzi pozytywna korelacja pomiędzy nasilonym wytwarzaniem hialuronianu i jego wydzielaniem do krwi, a zwiększoną inwazyjnością i skłonnością do przerzutowania nowotworu [53-57]. Poziom hialuronianu może być pomocnym biomarkerem niektórych nowotworów [58, 59].

### Interakcje hialuronianu z receptorami

#### CD44

Wyjaśnienia powyższych obserwacji należy upatrywać w interakcji hialuronianu ze specyficznymi receptorami (hialadherynami), głównie CD44 [35, 60]. Nadekspresję tych receptorów obserwowano na powierzchni wielu komórek nowotworowych [55, 57, 61-64].

W procesie onkogenezy zwiększa się gęstość receptorowa i aktywność CD44. Udowodniono, że zarówno stan zapalny, jak i proces nowotworzenia, przyczyniają się do częściowej proteolizy białka CD44 na dwie cząsteczki. Zewnątrzkomórkowa, rozpuszczalna forma CD44

(sCD44 – *soluble CD44*) pełni rolę kompetycyjnego antagonisty w stosunku do interakcji hialuronianu z przezbłonową formą receptora CD44 i może wykazywać działanie przeciwnowotworowe [65]. Natomiast domena wewnątrzkomórkowa wędruje do jądra komórkowego i stanowi jeden z czynników przyczyniających się do pobudzenia transkrypcji genu *CD44* i nasilenia ekspresji receptora na powierzchni komórek nowotworowych [66, 67].

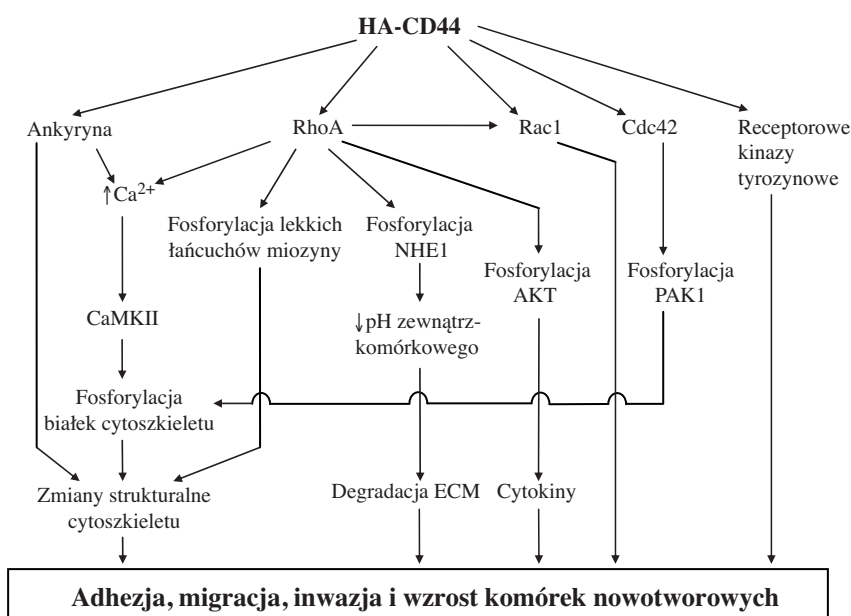
Komórki nowotworowe wytwarzają stosunkowo duże ilości mleczanu w wyniku metabolizmu beztlenowego, zachodzącego nawet przy wystarczającej obecności tlenu (efekt Warburga). Mleczan nasila ekspresję *CD44* oraz pobudza produkcję hialuronianu przez fibroblasty [68].

Różne warianty alternatywnego składania *CD44* – *CD44v* – w przeciwieństwie do formy „standardowej” (*CD44s*) – są stosunkowo mało stabilne i ulegają degradacji pod wpływem hialuronidaz. Przypuszcza się, że *CD44v* wymagają stałej obecności swojego liganda – hialuronianu – dla utrzymania wysokiej ekspresji receptorów. Hialuronian może być zatem czynnikiem wzmagającym ekspresję swojego własnego receptora [69].

Jak już wspomiano, hialuronian może wykazywać różnice w powinowactwie do *CD44*, które zależą od stanu aktywacji receptora [33]. Aktywacja *CD44* zachodzi m.in. pod wpływem różnych mediatorów zapalnych, obecnych także w procesie nowotworzenia [70].

Pobudzenie receptorów *CD44* przez hialuronian uruchamia liczne szlaki biochemiczne, nasilające rozwój nowotworu [71] (Ryc. 4). Wiele z tych ścieżek wpływa na modyfikację cytoszkieletu (głównie za pośrednictwem białek wiążących GTP), przyczyniając się do wzrostu, przeżywalności, migracji i inwazji komórek nowotworowych. Szlaki te zostały poznane i scharakteryzowane na podstawie badań wybranych linii komórkowych. Ze względu na dużą złożoność tych szlaków zostaną one tylko skrótowo opisane.

1. Interakcja HA-CD44, za pośrednictwem białka błonowego – ankiryny, pobudza zmiany strukturalne cytoszkieletu komórkowego, niezbędne dla procesów adhezji komórek nowotworu prostaty [72] i jajnika [73]. Również za pośrednictwem ankiryny dochodzi do otwarcia kanałów wapniowych i wzrostu stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  wewnątrzkomórkowego. W następstwie ma miejsce fosforylacja białek cytoszkieletu (filaminy), przy udziale zależnej od wapnia i kalmoduliny kinazy białkowej II (CaMKII). Proces ten prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu i migracji komórek płaskonabłonkowego raka głowy i szyi [74]. Co więcej, okazało się, że aktywowana kinaza CaMKII łącznie z  $\text{TNF-}\alpha$  indukuje zwrotne (*up-regulacja*) *CD44* na powierzchni monocytów [75]. CaMKII fosforyluje również receptor *CD44* w pozycji Ser (325), co może dodatkowo przyczynić się do migracji komórek [76].
2. Podwyższenie poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia i dalsze tego skutki mogą wynikać ponadto z aktywacji białka RhoA w wyniku pobudzenia *CD44* poprzez hialuronian. RhoA należy do nadrodziny małych białek G (Ras). Białko RhoA ma funkcję GTP-azy, a jego rolą jest udział w przekaznictwie sygnałów wewnątrzkomórkowych [77]. Przy udziale tego białka dochodzi do wielu kluczowych dla rozwoju nowotworów zmian molekularnych. RhoA partycypuje w fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny, przyłączenia ich do filamentów aktynowych i organizacji mikrotubul, umożliwiając w następstwie migrację komórek nowotworowych [78]. Interakcja HA-CD44, również poprzez białko RhoA, prowadzi do fosforylacji wymiennika  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  typu 1 (NHE1) i obniżenia zewnątrzkomórkowego pH. W kwasowym środowisku dochodzi do aktywacji wielu enzymów degradujących macierz zewnątrzkomórkową (m.in. HYAL-2). Modyfikacja



Ryc. 4. Schemat molekularnego mechanizmu wpływu interakcji HA-CD44 na rozwój nowotworu

ECM umożliwia inwazję nowotworową w raku piersi [79]. Pobudzone przez RhoA przekąźnictwo sygnałów prowadzi także do fosforylacji wielu kluczowych w onkogenezie białek komórkowych (m.in. Gab-1, kinazy PI3) [80]. W następstwie ma miejsce aktywacja białka AKT, produkcja cytokin oraz wzrost komórek nowotworu piersi [63].

3. Wiązanie hialuronianu do receptora CD44 powoduje aktywację przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego poprzez białko Rac1. Białko to, podobnie jak RhoA, należy do nadrodziny małych białek G (Ras). Aktywacja przekąźnictwa poprzez Rac1 pobudza migrację komórkową w raku jajnika [61]. Nie tylko interakcja HA-CD44 nasila szlaki przekąźnictwa z udziałem Rac1. Mogą one być dodatkowo stymulowane poprzez przekąźnictwo RhoA (z udziałem białek Tiam-1 oraz ankyryny), co przyczynia się do przerzutowania komórek raka piersi [81, 82].
4. Cdc42 jest kolejnym białkiem nadrodziny Ras (rodzina Rho) [83], biorącym udział w rozwoju nowotworu. Złożone ścieżki przekąźnictwa sygnałów, będące następstwem interakcji HA-CD44, prowadzą do fosforylacji enzymu PAK1, istotnego w aktywacji cytoszkieletu i przyczyniają się do progresji nowotworu jajnika [84]. Aktywowane przez hialuronian receptory CD44 uczestniczą także w formowaniu kompleksu IQGAP1-Cdc42, który przyczynia się do zmian strukturalnych cytoszkieletu i migracji komórek nowotworowych [85].
5. Pobudzenie receptora CD44 przez hialuronian nasila procesy sygnalizacji komórkowej, której centralnym elementem są receptorowe kinazy tyrozynowe (*receptor tyrosine kinase* – RTK) rodziny ErbB oraz c-Met [1, 57, 86]. Stwierdzono, że doświadczalnie podwyższona produkcja hialuronianu nasila fosforylację i tym samym aktywność ErbB2 w komórkach raka piersi, które normalnie wykazują niską aktywność tej kinazy [87]. Nadmierna aktywacja szlaków sygnalizacyjnych RTK stymuluje proces nowotworzenia [88, 89]. Dla podkreślenia tego faktu należy zaznaczyć, że do tej pory zarejestrowano już wiele substancji leczniczych, hamujących przekąźnictwo sygnałów drogą receptorowych kinaz tyrozynowych [90, 91], wiele innych pozostaje w fazie badań klinicznych.

Rola interakcji hialuronianu z receptorem CD44 wydaje się być jeszcze bardziej skomplikowana niż przedstawiano to do tej pory. Mało tego, jej wpływ na rozwój nowotworu nie jest tak jednoznaczny, jak wynikałoby to z dotychczasowych rozważań.

Należy pamiętać, że CD44 nie jest białkiem jednolitym pod względem budowy. Występuje w wielu izoformach, co wynika z procesów alternatywnego składowania i modyfikacji potranslacyjnych. Wykazano, że tylko w niektórych przypadkach forma „standardowa” receptora CD44 (CD44s) odpowiada za aktywację powyższych szlaków metabolicznych [92, 93]. Z większości badań wynikało, że to różne warianty alternatywnego składowania

CD44 (CD44v) odpowiadają za złośliwy fenotyp nowotworu [29, 61, 64, 94-96].

Paradoksalnie, niektórzy autorzy donoszą, że ekspresja CD44 wykazuje odwrotną korelację z ryzykiem rozwoju nowotworów. W raku neuroendokrynnym szyjki macicy stwierdzono, że wysoki poziom receptora CD44 wpływa na hamowanie przerzutowania [97]. Podobnie w raku piersi, interakcja HA-CD44 chroniła przed przerzutowaniem [98]. W nowotworach prostaty także uzyskiwano podobne wyniki [99], choć późniejsze badania wskazują, że CD44 raczej sprzyja przerzutowaniu [100, 101].

Wszystko wskazuje na to, że rolę interakcji HA-CD44 oraz to, który wariant alternatywnego składowania receptora uczestniczy w rozwoju nowotworu, należałoby badać oddzielnie dla każdego przypadku. Tym bardziej, że niejednorodność ekspresji *CD44* można zaobserwować nawet w nowotworach wywodzących się z tej samej tkanki (np. nowotwory gruczołu krokowego) [102].

## RHAMM

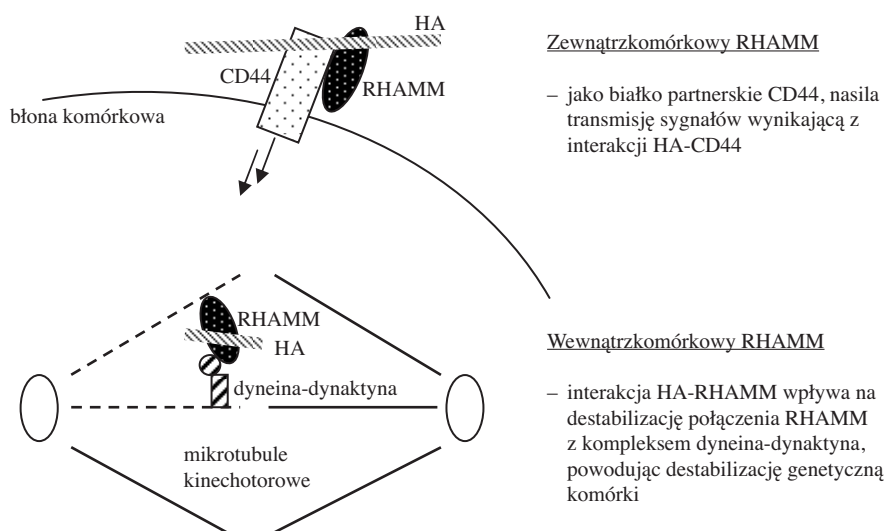
Kolejnym receptorem hialuronianu biorącym udział w procesach nowotworzenia jest RHAMM. Receptor ten występuje w formie wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej. Podstawową lokalizacją białka RHAMM jest wnętrze komórki. Białko to może być jednak wydzielane poza komórkę pod wpływem różnorodnych czynników w procesie egzoocytozy lub przy udziale flipaz. Forma zewnątrzkomórkowa nie jest integralnym białkiem błony komórkowej i wykazuje funkcje zupełnie odmienne od RHAMM wewnątrzkomórkowego [103].

RHAMM bierze udział w mechanizmie gojenia ran, w czasie którego dochodzi do nadekspresji jego genu. Jednak poza fizjologicznymi procesami z jego udziałem, wysoki poziom RHAMM obserwuje się również w stanach patologicznych. Wykazano jego podwyższoną ekspresję w wielu komórkach nowotworowych [1, 104]. Wysoki poziom RHAMM jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym nowotworu piersi [105], jest on funkcjonalnie powiązany z genem *BRCA1* [106].

Wewnątrzkomórkowy RHAMM jest związany z wrzecionem podziałowym i pełni istotną rolę w procesach mitozy. Jest obecny na powierzchni mikrotubul kinetochorowych, centrosomów i w jądrze komórkowym [107], odpowiadając za stabilność i odpowiednią organizację cytoszkieletu [108]. RHAMM aktywnie uczestniczy w procesie przemieszczania się chromosomów, wiążąc się między mikrotubulami za pośrednictwem białek motorycznych dyneiny i dynaktyny. Wewnątrzkomórkowy hialuronian – produkowany przez specyficzny wariant syntazy hialuronianowej HAS-1 [16] – pobudza receptory RHAMM, co prowadzi do zakłócenia interakcji RHAMM z białkami motorycznymi i niestabilności genetycznej komórek szpiczaka mnogiego [103, 109] oraz raka piersi (z udziałem *BRCA1*) [106] (Ryc. 5).

Zewnątrzkomórkowy RHAMM wydaje się pełnić szczególną rolę w nowotworzeniu, dlatego że jego występowanie wyjaśnia – przynajmniej w niektórych aspek-





Ryc. 5. Rola zewnątrzkomórkowego i wewnątrzkomórkowego receptora RHAMM w procesie nowotworzenia

tach – brak roli interakcji HA-CD44 w rozwoju nowotworów. Pozytywny wpływ CD44 na rozwój nowotworu może zależeć nie tylko od ekspresji odpowiedniego wariantu alternatywnego składowania i modyfikacji potranslacyjnych, ale również od występowania tzw. białek partnerskich (*partner proteins*), towarzyszących CD44. Niektóre spośród znanych białek partnerskich CD44 to: syntaza hialuronianowa (HAS-1) i metaloproteinazy macierzy (MMP9, MMP14) [1, 84, 96]. Pojawiają się one w podwyższonym stężeniu w wysoce inwazyjnych nowotworowych liniach komórkowych CD44<sup>+</sup> [110, 111]. Podobnie białko RHAMM może pełnić funkcję białka partnerskiego dla CD44. Tworzy ono kompleksy z CD44, przedłużając obecność tego ostatniego na powierzchni komórek inwazyjnego raka piersi, co wzmacnia przekazanie sygnałów, wynikające z interakcji HA-CD44 [37, 112] (Ryc. 5).

Stwierdzono również, że nie sama obfitość białka RHAMM ma udział w regulacji aktywności CD44, ale jego przemieszczanie się na zewnątrz komórki [110, 111]. Dlatego właśnie linie komórek nowotworowych, wykazujące ekspresję CD44 i jednocześnie nie posiadające zewnątrzkomórkowego RHAMM, mogą nie wykazywać pozytywnej korelacji między interakcją HA-CD44, a zwiększoną inwazyjnością i przerzutowaniem.

### Hialuronian i oporność na leczenie przeciwnowotworowe

Oporność lekowa komórek nowotworowych może rodzić się w wyniku różnorodnych mechanizmów, ograniczających siłę działania substancji leczniczych. Wyróżniamy dwa główne powody rozwoju oporności: zmiany we wrażliwości komórki na lek (będące skutkiem m.in. zaburzeń genetycznych) oraz zmiany w dostępności leku w miejscu jego działania (na skutek obniżonej biodostępności, upośledzonego przenikania do komórki nowotworowej, zwiększonego wyrzutu na zewnątrz komórki, nasilonej biotransformacji leku, itp.) [113].

Komórki nowotworowe mogą być niewrażliwe na pojedynczy lek lub wiele substancji leczniczych, które wykazują oporność krzyżową między sobą. Szczególnym takim przypadkiem jest oporność wielolekowa (MDR – *multidrug resistance*), która charakteryzuje się niewrażliwością na wiele odmiennych pod względem budowy i mechanizmu działania leków. Prowadzi ona do niepowodzeń terapii skojarzonej wieloma chemioterapeutykami. Jednym z najlepiej poznanych mechanizmów oporności wielolekowej jest nasilony wyrzut leków z komórki. Jest on warunkowany aktywnością ATP-zależnego transportera rodziny ABC (*ATP-Binding Cassette Transporters*), np. glikoproteiny-P (gp-P) lub MRP [113].

Hipoteza podkreślająca rolę hialuronianu w rozwoju oporności lekowej została wysunięta po doniesieniu, że enzym rozkładający hialuronian – hialuronidaza – może zwiększać bioaktywność równolegle podawanych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych [114-118]. Skład zewnątrzkomórkowej macierzy guza jest zmieniony w wyniku m.in. nadprodukcji hialuronianu przez komórki nowotworowe [49]. Dlatego powszechnie tłumaczono powyższe zjawisko zwiększaniem dostępności leku do wnętrza guza w wyniku rozkładu i rozluźnienia macierzy zewnątrzkomórkowej przez hialuronidazy [119].

Niektóre doniesienia naukowe sugerowały, że mechaniczne ograniczanie dostępu leków do komórek nowotworowych nie jest jedynym wytłumaczeniem powstawania oporności lekowej przy udziale hialuronianu. Okazało się, że w wyniku interakcji HA-CD44 dochodzi do uruchamiania przekazania sygnałów warunkujących oporność lekową w wielu nowotworach, np. białaczkach [120], nowotworach głowy i szyi [121, 122], płuc [123]. Wykazano również, że interakcja HA-CD44 prowadzi do nadekspresji pomp usuwających substancje lecznicze z komórki: glikoproteiny-P [124], MRP2 [123, 124] oraz BCRP [125].

Ostatnie badania wykazały, że wpływ hialuronianu na ekspresję tych transporterów wynika raczej z ich stabilizacji w błonie komórkowej niż nasilonej biosyntezy

[126]. Zarówno glikoproteina-P jak i receptor CD44 są zakotwiczone w cytoszkielecie komórkowym. Położone są w obrębie jednej tratwy lipidowej (*lipid raft*). Ich bliskie sąsiedztwo molekularne (<10 nm) sugeruje, że CD44 jest połączone z gp-P nie tylko strukturalnie, ale i funkcjonalnie [126,127].

Powyższe przypuszczenia są potwierdzane przez następujące fakty. Po pierwsze, występuje pozytywna korelacja między jednoczesną nadekspresją gp-P i CD44 w wieloopornych liniach komórkowych nowotworów piersi, jajnika i jamy ustnej. Po drugie, zaobserwowano współwytrącanie się gp-P i CD44 pod wpływem zarówno przeciwciał anty-gp-P, jak i anty-CD44. Po trzecie, wykazano, że leki przeciwnowotworowe, będące substratem dla glikoproteiny-P (winblastyna), hamują inwazję komórek nowotworowych *in vitro*, co można tłumaczyć destabilizacją funkcjonalnego powiązania gp-P/CD44 [128].

Najważniejszym jednak doniesieniem, potwierdzającym strukturalne i funkcjonalne powiązanie transporterów i CD44, które może mieć swoje odzwierciedlenie w farmakoterapii, jest szybka internalizacja pomp gp-P oraz BCRP pod wpływem oligomerów hialuronianu (oHA), które działają antagonistycznie w stosunku do wielocząsteczkowego hialuronianu (HMWH) [129, 130].

### Perspektywy farmakoterapii

Hialuronian odgrywa istotną rolę w procesach przeżywalności, inwazji, migracji i przerzutowania komórek nowotworowych. Bierze również udział w rozwoju oporności wielolekowej. Swoje działanie hialuronian odgrywa za pośrednictwem specyficznych receptorów, głównie CD44 oraz RHAMM. Zablokowanie ścieżek przekazywania sygnałów na wczesnym etapie procesów biochemicznych – poprzez antagonistyczny wpływ w stosunku do receptorów dla hialuronianu – jest jednym z wiodących nurtów projektowania potencjalnych leków przeciwnowotworowych [131].

Jednym ze sposobów antagonizowania interakcji hialuronianu z receptorami CD44 jest użycie oligosacharydów (oligomerów) hialuronianu (oHA). Są one krótkimi fragmentami polimeru hialuronianu, zawierającymi od 3 do 9 jednostek disacharydowych (masa cząsteczkowa około 2,5 kDa) [132, 133]. Oligomery hialuronianu tej wielkości wykazują powinowactwo do CD44, jednak w przeciwieństwie do hialuronianu wiążą się z receptorem monowalentnie, co nie skutkuje aktywacją przekazywania sygnału [134]. Funkcjonują zatem jako antagoniści endogennego hialuronianu, konkurując z nim kompetycyjnie o miejsce wiązania z receptorem. Udowodniono w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* na zwierzętach, że oHA hamują przekazywanie sygnałów w onkogenezie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych oraz hamują wzrost wielu nowotworów [125, 130, 132, 133, 135]. Należy podkreślić, że podobny efekt obserwowano przy użyciu przeciwciał anty-CD44 (rozpoznających niezmienny epitop wszystkich wariantów CD44). Natomiast nie wykazano takiego efektu przy użyciu oligomerów chi-

tny, siarczanu chondroityny ani hialuronianu wielocząsteczkowego (HMWH – 2000 kDa) i niskocząsteczkowego (LMWH – 80 kDa) [132]. Ponadto oHA o określonej wielkości cząsteczki (6 jednostek disacharydowych) uczestniczą w aktywacji produktu genu supresorowego *PTEN*, który jest odpowiedzialny za indukcję apoptozy [132] oraz – jak już wspomniano – silnie hamują ekspresję gp-P i innych transporterów rodziny ABC [129, 130]. Badania wykazały, że równoczesne podawanie oHA z lekami przeciwnowotworowymi, takimi jak: doksorubicyna, karmustyna, paklitaksel, winkrystyna, cisplatyna, metotreksat i 5-fluorouracyl wyraźnie zwiększa ich skuteczność wobec wieloopornych linii komórkowych [136]. Przyszłość terapii z użyciem oHA jest tym bardziej obiecująca, że stosowanie oHA nie powodowało żadnych znaczących działań niepożądanych *in vivo* w modelu zwierzęcym [125, 130, 132, 135].

Mimo tak wyraźnych danych, rola oligomerów oHA w rozwoju nowotworu wydaje się być jeszcze nie do końca zbadana. Z części doniesień naukowych wynika, że oHA pobudzają procesy angiogenezy, sprzyjając nowotworzeniu [137-139]. Być może rzeczywista aktywność oHA zależy od wielkości ich cząsteczki. Problem wymaga dalszych badań dla ustalenia faktycznej roli oHA i bezpieczeństwa długotrwałej terapii oligomerami hialuronianu.

Inną strategią hamowania interakcji hialuronianu z jego receptorami jest zastosowanie rozpuszczalnych form białek wiążących hialuronian (*soluble hyaluronan-binding proteins*), takich jak rozpuszczalna zewnątrzkomórkowa forma CD44 (sCD44), czy rozpuszczalna forma RHAMM. Białka te, wiążąc endogenny hialuronian, zmniejszają jego ilość zdolną do interakcji z receptorami błonowymi. Powodują przez to osłabienie przekazywania sygnałów i w konsekwencji hamują wzrost, inwazję oraz przerzutowanie wielu linii nowotworowych, a także przyczyniają się do procesu apoptozy [65, 140-142]. Podobne efekty uzyskano stosując kompleks wiążący hialuronian w postaci wyciągu z chrząstki wołowej (Metastatin) [143].

Jeszcze innym podejściem do zahamowania przekazywania sygnału, będącego skutkiem interakcji HA-CD44, jest wyciszenie ekspresji genu *CD44*. Proces ten odbywa się przy udziale odpowiedniego siRNA (*small interfering RNA*), które pośrednio uczestniczy w degradacji komplementarnego mRNA (produktu transkrypcji *CD44*), uniemożliwiając powstanie kodowanego przez nie białka, czyli receptora CD44. Wykazano, że linie komórek nowotworowych transfekowane siRNA wykazują zdecydowanie niższy stopień fosforylacji kinaz tyrozynowych ErbB2, kluczowych w onkogenezie [87, 144].

Należy pamiętać, że receptor CD44 (i jego mRNA) występuje w wielu wariantach alternatywnego składu. Nowotwory wywodzące się z jednej linii komórkowej wykazują ekspresję jednego spośród wariantów CD44, który jest mniej rozpowszechniony od innych form CD44, w tym formy „standardowej” CD44s. Zaprojektowanie leku, który selektywnie wchodziłby w interakcję z danym wariantem CD44, wydaje się być bardziej zasadne z uwagi na mniejsze ryzyko działań niepożąda-

nych. Terapia personalizowana wymaga jednak najpierw zidentyfikowania konkretnego wariantu CD44, który ulega ekspresji w danym nowotworze [102].

Przykładem może być próba leczenia raka płaskonabłonkowego głowy i szyi. Niedawno zakończyły się badania kliniczne I fazy przeciwciała anty-CD44v6, znakowanego radioaktywnym izotopem lub substancją toksyczną. Wyniki są obiecujące, choć występowały poważne działania niepożądane. Bezpieczniejszą alternatywą wydaje się być zastosowanie krótkiego peptydu wiążącego się z izoformą CD44v6, który hamuje angiogenezę i przerzutowanie [145].

Sukcesem zakończyły się badania przedkliniczne antagonistów CD44 w terapii glejaka wielopostaciowego – guza mózgu o najwyższym stopniu złośliwości, opornego na chemo- i radioterapię. Rozpuszczalne białka fuzyjne regionu Fc ludzkiego przeciwciała z domeną zewnątrzkomórkową określonych wariantów CD44 (hsCD44v3-v10-Fc, hsCD44v8-v10-Fc) oraz specyficzne dla CD44 shRNA (wyciszające ekspresję genów) podawane dożylnie okazywały się skuteczne w leczeniu tego nowotworu, przedłużając czas przeżycia zwierząt doświadczalnych i podnosząc wrażliwość na chemioterapię przeciwnowotworową [146].

Duże nadzieje wiąże się z terapeutycznymi szczepionkami przeciwnowotworowymi, zawierającymi cDNA konkretnego wariantu CD44. Szczepienie – zwłaszcza za pomocą cDNA – wykazuje przewagę nad bierną immunizacją, gdyż ekspozycja antygeny pozwala na długotrwałe pobudzanie układu odpornościowego. Wyniki badań wskazują, że szczepienie z użyciem cDNA specyficznego wariantu receptora CD44 (CD44v), w zwierzęcym modelu nowotworu piersi, hamuje zdolność do wzrostu i przerzutowania nowotworu do płuc. Tak zadowalających rezultatów nie uzyskiwano w wyniku szczepienia cDNA formy standardowej CD44 (CD44s) [147].

Szczepienie za pomocą antygeny RHAMM-R3 (wysokie immunogenne epitopy dla receptora RHAMM) również przynosi pomyślne wyniki. Zakończyła się druga seria badań klinicznych I fazy z użyciem tej szczepionki. U 44% pacjentów leczonych z powodu ostrych białaczek szpikowych, zespołów mielodysplastycznych oraz szpiczaka mnogiego, obserwowano pozytywną odpowiedź immunologiczną. Z tego względu RHAMM jest obiecującą strukturą celowanej immunoterapii nowotworów [148].

## Rola obrotu hialuronianu w rozwoju nowotworu

### Syntazy hialuronianowe (HASs)

Jak już powiedziano, poziom hialuronianu pozytywnie koreluje z inwazyjnością i skłonnością do przerzutowania nowotworu. Hialuronian jest wytwarzany przez komórki nowotworowe i otaczające je komórki zrębu dzięki aktywności syntaz hialuronianowych (HAS). Aktywność tych enzymów jest podwyższona w wielu nowotworach, w tym: jajnika, trzonu macicy i jelita grubego [26, 149]. Badania wykazały podwyższenie ekspresji *has1* i

*has2* w złośliwych komórkach transformowanych onkogenami *v-src* lub *v-fos*. Podobnie, nasilenie ekspresji *has2* obserwowano w komórkach transformowanych *v-Ha-ras*, a eksperymentalne zahamowanie aktywności tej syntazy prowadziło do zahamowania wzrostu nowotworu [9, 26]. HAS-3 – syntaza wytwarzająca hialuronian o mniejszych cząsteczkach – prawdopodobnie również pełni rolę w niektórych procesach nowotworzenia. Wykazano, że jej eksperymentalna indukcja pobudza wzrost i angiogenezę w komórkach raka prostaty *in vitro* [150].

Syntazy hialuronianowe wydają się być obiecującym celem terapii przeciwnowotworowej. Wyciszenie ekspresji *has3* za pomocą odpowiedniego siRNA hamuje wzrost raka jelita grubego w modelu zwierzęcym [151]. Prowadzone są również badania nad doustnym inhibitorem biosyntezy hialuronianu – 4-metyloumbelliferonem – o złożonym i nie wyjaśnionym do końca mechanizmie działania (jest możliwe, że wpływa on m.in. na aktywność HAS-2). Hamuje on proliferację i inwazję niektórych nowotworów, w tym kilku linii komórkowych raka prostaty [152].

### Hialuronidazy (HYALs)

Wyraźny wpływ syntaz hialuronianowych na rozwój nowotworu, sugeruje odwrotny wpływ hialuronidaz – jako inhibitorów nowotworzenia. Jest kilka doniesień potwierdzających tę hipotezę. Jednym z nich jest delekcja locus chromosomowego 3p21.3 (w którym są umiejscowione geny *hyal*), obserwowana w niektórych rakach [26, 153]. Ponadto stwierdzono, że nadekspresja *hyal1* hamuje rozwój raka jelita grubego u szczurów [154] oraz, że podanie dożylnie wysokich dawek hialuronidazy jądrowej PH-20 zwierzętom z ksenograficznym przeszczepem komórek ludzkiego raka piersi powoduje szybkie zmniejszenie objętości guza [155]. Niedawno zbadano także, że nie aktywność syntaz hialuronianowych, ale obniżona ekspresja *hyal1* odpowiada za gromadzenie się hialuronianu w surowiczych nowotworach jajnika [156].

Pomimo tych doniesień, jest wiele przeciwnych wyników badań, wskazujących na pozytywną korelację między aktywnością hialuronidaz a procesem nowotworzenia, złośliwością komórek nowotworowych i angiogenezą [157-160]. Hialuronidaza HYAL-1 może funkcjonować jako biomarker progresji raka prostaty [159]. Jednocześnie zauważono, że wysoki poziom hialuronianu w tkance glejaka sprzyja onkogenezie tylko przy równoczesnej ekspresji hialuronidaz [161] oraz, że szybszy wzrost ksenograficznych przeszczepów nowotworowo zmienionej tkanki prostaty zachodzi przy równoczesnej ekspresji syntazy hialuronianowej HAS-2 i hialuronidazy HYAL-1 [162]. Podobnej obserwacji dokonano dla nowotworu pęcherza moczowego u człowieka [163]. Rola hialuronidaz w procesie nowotworzenia nie jest zatem pewna, ale wydaje się, że mogą one funkcjonować zarówno jako promotory, jak i supresory nowotworzenia.

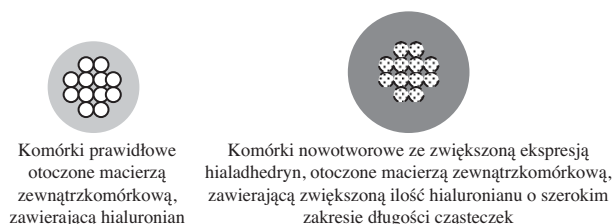
Część badań wskazuje, że hialuronidazy mogą sprzyjać nowotworzeniu, dlatego sugeruje się, że nie sam wielkość cząsteczkowy hialuronian (HMWH), ale być może

krótsze produkty jego rozpadu (LMWH i oHA) biorą udział w nowotworzeniu, wchodząc w interakcję z hialadherynami (głównie CD44 i RHAMM). Hialuronidazy mogą być jedynie czynnikami niezbędnymi do uzyskania częściowej degradacji hialuronianu do krótkołańcuchowych związków.

Wielokrotnie zbadano, że niskocząsteczkowy hialuronian (LMWH) o masie 10-100 kDa oraz oligomery składające się z 3 do 25 jednostek disacharydowych rzeczywiście mogą działać proangiogenicznie, podczas gdy wysokocząsteczkowy biopolimer – HMWH (> 1000 kDa) – przeciwnie, hamować angiogenezę [25, 138, 139, 164-167]. Wykazano, że wielocząsteczkowy hialuronian może stymulować angiogenezę dopiero w kompleksie z wersykanem – proteoglikanem macierzy zewnątrzkomórkowej [165]. Proangiogenne oHA izolowano z moczu pacjentów cierpiących na raka pęcherza moczowego [168], śliny osób chorych na raka płaskonabłonkowego głowy i szyi [169] oraz tkanki nowotworu prostaty [170].

Hialuronian obecny w macierzy zewnątrzkomórkowej nowotworów wydaje się być zatem bardzo złożoną mieszaniną cząsteczek biopolimeru i ich fragmentów, których rola wymaga dalszych badań dla ustalenia ich wpływu na proces nowotworzenia.

Można wysunąć wniosek, że nie sama obecność hialuronianu, ale obrót związku (*turnover*), a przez to występowanie cząsteczek polimeru o szerokim zakresie długości, może być kluczowe dla rozwoju nowotworu (Ryc. 6) [65, 160, 161-163].



Komórki prawidłowe otoczone macierzą zewnątrzkomórkową, zawierającą hialuronian

Komórki nowotworowe ze zwiększoną ekspresją hialadheryn, otoczone macierzą zewnątrzkomórkową, zawierającą zwiększoną ilość hialuronianu o szerokim zakresie długości cząsteczek

Ryc. 6. Hialuronian w ECM komórek prawidłowych i nowotworowych

Sugeruje się ponadto, że nie tylko sam hialuronian i jego produkty rozpadu, ale również inne składniki uwięzione w macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) stymulują angiogenezę. Na ECM, która jest bogata w hialuronian, należy spojrzeć jako rezerwuar różnych czynników wzrostu zaangażowanych w rozrost naczyń krwionośnych. Degradacja hialuronianu i rozluźnienie ECM może sprzyjać uwalnianiu tych czynników i stymulować angiogenezę [9].

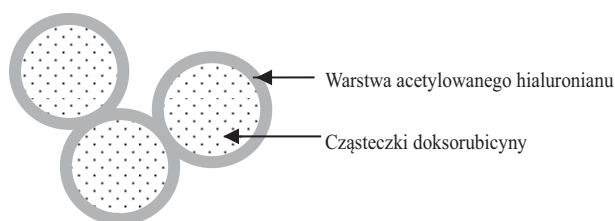
Przyjmując, że hialuronidazy mogą przyczyniać się do progresji nowotworowej, możliwe byłoby zastosowanie inhibitorów tych enzymów jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Florotaniny wyizolowane z alg *Eisenia bicyclis* i *Ecklonia kurome* [171] oraz polisacharyd z brunatnicy *Undaria pinnatifida* [172] hamują aktywność hialuronidazy jądrowej PH-20. Połączenie wyizolowanego polisacharydu z nanocząstkami selenowymi (Nano-Se) kieruje komórki czerniaka *in vitro* na ścieżkę

apoptozy [173]. Zastosowanie inhibitorów hialuronidaz może w przyszłości być pomocne w leczeniu nowotworów, a wspomniane rośliny mogą stać się cennymi produktami żywnościowymi. Zastosowanie ich jednak wymaga dalszych badań.

### Hialuronian – nośnik leków przeciwnowotworowych

Nadekspresja hialadheryn (głównie CD44 i RHAMM) ma miejsce na powierzchni wielu komórek nowotworowych. Hialuronian – mający powinowactwo do tych receptorów – może być zatem użyty jako nośnik leków przeciwnowotworowych w terapii celowanej. Wydaje się, że takie podejście zwiększy skuteczność i ograniczy toksyczność chemioterapeutyków [174]. Skonstruowano wiele chemicznie modyfikowanych cząsteczek hialuronianu, które okazywały się być dobrymi nośnikami dla leków przeciwnowotworowych [131]. Kilka z nich zostanie omówionych jako przykłady.

W celu przeprowadzenia badania, przygotowano acetylowe pochodne niskocząsteczkowego hialuronianu (LMWH) – Ac-HA. Acetylowanie zwiększa hydrofobowość, umożliwiając samoorganizację substancji i poprawia właściwości farmakokinetyczne. Tak zmodyfikowany hialuronian łatwo tworzy z dokсорubicyną kompleksowe połączenie – mikrokapsułki (Ryc. 7). Wykazano *in vitro* wysokie powinowactwo takich mikrokapsułek do linii komórek nowotworowych HeLa i znaczną cytotoxyczność w stosunku do nich. Jednocześnie nie obserwowano cytotoxyczności w stosunku do komórek nie wykazujących ekspresji hialadheryn. Mikrokapsułki acetylowanego hialuronianu wydają się być obiecującym sposobem zwiększania skuteczności i bezpieczeństwa tradycyjnie stosowanych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych [175].



Ryc. 7. Mikrokapsułki acetylowanego hialuronianu zawierające cząsteczki dokсорubicyny

Inhibitory deacetylaz histonów (HDI – *histone deacetylase inhibitors*) powodują zahamowanie wzrostu, indukują różnicowanie i/lub apoptozę wielu komórek nowotworowych przez zmianę ekspresji niektórych genów. Z tego względu mogą stać się przydatne jako cytostatyki nowej generacji. Najwcześniej poznanym HDI był kwas masłowy. Kwas ten może być kowalencyjnie łączony z grupami hydroksylowymi hialuronianu, tworząc wielocząsteczkowy prolek o charakterze estru (HA-But). Hialuronian rozpoznaje komórki wykazujące ekspresję CD44 i „dostarcza” kwas masłowy w pobliżu miejsca działania. W badaniach *in vitro* stwierdzono



10-krotnie wyższą zdolność do hamowania proliferacji ludzkich komórek nowotworowych przez wspomniany ester kwasu masłowego, w porównaniu z wolnym kwasem masłowym. W badaniu przedklinicznym na zwierzęcym modelu niedrobnokomórkowego raka płuc wykazano zahamowanie przerzutowania pod wpływem HA-But [176].

W badaniu *in vitro* porównywano także właściwości farmakokinetyczne doksorubicyny internalizowanej w nośniku opartym na poliwinylalkoholu (PVA) z doksorubicyną umieszczoną w nośniku dodatkowo opłaszczonym cząsteczkami hialuronianu o różnym stopniu utlenienia (HAox). Utlenianie hialuronianu przeprowadza się w celu ułatwienia formulacji postaci leku i zwiększenia powinowactwa do receptorów powierzchniowych komórek nowotworowych. Wykazano, że hialuronian (HAox) użyty jako nośnik zwiększa stopień penetracji cytostatyku do wnętrza komórek nowotworowych HT-29 [177].

### Zakończenie

Hialuronian, któremu przypisywano dawniej jedynie rolę strukturalną, wydaje się być również czynnikiem biorącym udział w procesie nowotworzenia. Wykazano jego udział w procesach adhezji, migracji, inwazji i przerzutowania komórek nowotworowych oraz w procesie angiogenezy. Hialuronian funkcjonuje za pośrednictwem hialadhedryn – receptorów uruchamiających szlaki przekazywania komórkowego.

Hialuronian jest związkiem bardzo niejednorodnym, stanowi złożoną mieszaninę cząsteczek o różnej długości łańcucha. Rola poszczególnych cząsteczek hialuronianu w procesie nowotworzenia jest niewystarczająco jasna. Liczne badania opisują sumaryczny wpływ tej mieszaniny na proces nowotworzenia. Określanie wpływu izolowanych cząsteczek hialuronianu na nowotwór wydaje się być jednak mało zasadne z punktu widzenia praktyki klinicznej, w której istotny jest obserwowany *in vivo* efekt.

Na podstawie dostępnych publikacji naukowych hialuronian i procesy jego metabolizmu można uznać za tarcze działania potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Przeprowadzone badania pozwalają z optymizmem spojrzeć w kierunku przyszłości farmakoterapii opartej o hialuronian. Doświadczenie w terapii nowotworów przestrzega jednak przed wielkim entuzjazmem. Powszechnie wiadomo, że leki blokujące pojedyncze ścieżki przekazywania sygnałów szybko stają się nieskuteczne. Komórki nowotworowe być może łatwo uzyskują oporność na działanie projektowanych leków. Niemniej jednak jest prawdopodobne, że w kombinacji z chemioterapeutykami i/lub radioterapią okażą się one pomocne w leczeniu nowotworów i ratowaniu życia chorych.

**Mgr farm. Michał S. Karbownik**  
Zakład Farmakologii UM w Łodzi  
ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź  
e-mail: michal.karbownik@umed.lodz.pl

### Piśmiennictwo

- Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 528-39.
- Nowak JZ. Hialuronian: aspekty biochemiczne i funkcjonalne. *Mag Lek Okul* 2010; 4: 37-49.
- Laurent TC, Fraser JR: Hyaluronan. *FASEB J* 1992; 6: 2397-404.
- Scott JE, Cummings C, Brass A i wsp. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem J* 1991; 274: 699-705.
- Laurent TC. Hyaluronan research in Uppsala. *Ups J Med Sci* 2007; 112: 123-42.
- Jóźwiak-Bębenista M, Nowak JZ. Hialuronian: charakterystyka i praktyczne zastosowanie w medycynie. *Farm Pol* 2010; 66: 882-93.
- Prehm P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem J* 1984; 220: 597-600.
- De Angelis PL. Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56: 670-82.
- Itano N, Kimata K. Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 268-74.
- Spicer AP, Seldin MF, Olsen AS i wsp. Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes. *Genomics* 1997; 41: 493-7.
- Itano N, Sawai T, Yoshida M i wsp. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 1999; 274: 25085-92.
- Spicer AP, Tien JY. Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004; 72: 89-108.
- Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T i wsp. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest* 2000; 106: 349-60.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 435-61.
- Wilkinson TS, Potter-Perigo S, Tsoi C i wsp. Pro- and anti-inflammatory factors cooperate to control hyaluronan synthesis in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 92-9.
- Adamia S, Maxwell CA, Pilarski LM. Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005; 5: 3-14.
- Stern R, Jedrzejewski MJ. The hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev* 2006; 106: 818-39.
- Csoka AB, Scherer SW, Stern R. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics* 1999; 60: 356-61.
- Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* 2001; 20: 499-508.
- Lepperdinger G, Mullegger J, Kreil G. Hyal2-less active, but more versatile? *Matrix Biol* 2001; 20: 509-14.
- Lepperdinger G, Strobl B, Kreil G. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem* 1998; 273: 22466-70.
- Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. The dual functions of GPIanchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol* 2001; 20: 515-25.
- Beech DJ, Madan AK, Deng N. Expression of PH-20 in normal and neoplastic breast tissue. *J Surg Res* 2002; 103: 203-7.
- Stern R, Kogan G, Jedrzejewski MJ i wsp. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol Adv* 2007; 25: 537-57.
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 2006; 85: 699-715.
- Krasiński R, Tchórzewski H. Hialuronian jako czynnik regulujący proces zapalenia. *Postępy Hig Med Dośw* 2007; 61: 683-9.
- Stern R. Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathol Biol (Paris)* 2005; 53: 372-82.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev* 2011; 91: 221-64.
- Screaton GR, Bell MV, Jackson DG i wsp. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12160-4.
- Naor D, Nedvetzki S, Golan I i wsp. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002; 39: 527-79.
- Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 33-45.
- Bajorath J. Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins* 2000; 39: 103-11.

33. Eshkar-Sebban L, Ronen D, Levartovsky D i wsp. The involvement of CD44 and its novel ligand galectin-8 in apoptotic regulation of autoimmune inflammation. *J Immunol* 2007; 179: 1225-35.
34. Lesley J, English N, Perschl A i wsp. Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J Exp Med* 1995; 182: 431-7.
35. Johnson P, Ruffell B. CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8: 208-20.
36. Heldin P, Karousou E, Bernert B i wsp. Importance of hyaluronan-CD44 interactions in inflammation and tumorigenesis. *Connect Tissue Res* 2008; 49: 215-8.
37. Zaman A, Cui Z, Foley JP i wsp. Expression and role of the hyaluronan receptor RHAMM in inflammation after bleomycin injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33: 447-54. Tolg C, Hamilton SR, Nakrieko KA i wsp. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 motogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol* 2006; 175: 1017-28.
38. Tolg C, Hamilton SR, Nakrieko KA i wsp. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 motogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol* 2006; 175: 1017-28.
39. Tolg C, Hamilton SR, Morningsar L i wsp. RHAMM promotes interphase microtubule instability and mitotic spindle integrity through MEK1/ERK1/2 activity. *J Biol Chem* 2010; 285: 26461-74.
40. Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 1149-54.
41. Jackson DG. The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 1-7.
42. Harris EN, Weigel JA, Weigel PH. The human hyaluronan receptor for endocytosis (HARE/Stabilin-2) is a systemic clearance receptor for heparin. *J Biol Chem* 2008; 283: 17341-50.
43. Yeatman TJ, Nicolson GL. Molecular basis of tumor progression: mechanisms of organ-specific tumor metastasis. *Semin Surg Oncol* 1993; 9: 256-63.
44. Toole BP. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology* 2002; 12: 37R-42R.
45. Toole BP, Hascall VC. Hyaluronan and tumor growth. *Am J Pathol* 2002; 161: 745-7.
46. Stern R. Hyaluronan in cancer biology. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 237.
47. Paiva P, Van Damme MP, Tellbach M i wsp. Expression patterns of hyaluronan, hyaluronan synthases and hyaluronidases indicate a role for hyaluronan in the progression of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 98: 193-202.
48. Theocharis AD, Vynios DH, Papageorgakopoulou N i wsp. Altered content composition and structure of glycosaminoglycans and proteoglycans in gastric carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 376-90.
49. Itano N, Zhuo L, Kimata K. Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. *Cancer Sci* 2008; 99: 1720-5.
50. Alaniz L, Garcia M, Rizzo M i wsp. Altered hyaluronan biosynthesis and cancer progression: an immunological perspective. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9: 1538-46.
51. Manley G, Warren C. Serum hyaluronic acid in patients with disseminated neoplasm. *J Clin Pathol* 1987; 40: 626-30.
52. Wilkinson CR, Bower LM, Warren C. The relationship between hyaluronidase activity and hyaluronic acid concentration in sera from normal controls and from patients with disseminated neoplasm. *Clin Chim Acta* 1996; 256: 165-73.
53. Xing RD, Chang SM, Li JH i wsp. Serum hyaluronan levels in oral cancer patients. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 327-30.
54. Toole BP, Zoltan-Jones A, Misra S i wsp. Hyaluronan: a critical component of epithelial-mesenchymal and epithelial-carcinoma transitions. *Cells Tissues Organs* 2005; 179: 66-72.
55. Götte M, Yip GW. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res* 2006; 66: 10233-7.
56. Park JB, Kwak HJ, Lee SH. Role of hyaluronan in glioma invasion. *Cell Adh Migr* 2008; 2: 202-7.
57. Misra S, Hascall VC, Berger FG i wsp. Hyaluronan, CD44, and cyclooxygenase-2 in colon cancer. *Connect Tissue Res* 2008; 49: 219-24.
58. Perrotta R, Bevelacqua Y, Malaguamera G i wsp. Serum markers of cutaneous melanoma. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010; 2: 1115-22.
59. Grigoriu BD, Grigoriu C, Chahine B i wsp. Clinical utility of diagnostic markers for malignant pleural mesothelioma. *Monaldi Arch Chest Dis* 2009; 71: 31-8.
60. Dickinson LE, Gerecht S. Micropatterned surfaces to study hyaluronic acid interactions with cancer cells. *J Vis Exp* 2010; 46: doi: 10.3791/2413.
61. Bourguignon LYW, Zhu H, Zhou B i wsp. Hyaluronan (HA) promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185HER2 and induces Rac1 & Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth. *J Biol Chem* 2001; 276: 48679-92.
62. Auvinen P, Tammi R, Tammi M i wsp. Expression of CD44s, CD44v3 and CD44v6 in benign and malignant breast lesions: correlation and colocalization with hyaluronan. *Histopathology* 2005; 47: 420-8.
63. Bourguignon LYW, Singleton P, Zhu H i wsp. Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and Rho-kinase promotes Grb2-associated binding-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression. *J Biol Chem* 2003; 278: 29420-34.
64. Da Cunha CB, Oliveira C, Wen X i wsp. De novo expression of CD44 variants in sporadic and hereditary gastric cancer. *Lab Invest* 2010 Sep 20, w druku.
65. Yu Q, Toole BP, Stamenkovic I. Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function. *J Exp Med* 1997; 186: 1985-96.
66. Cichy J, Pure E. The liberation of CD44. *J Cell Biol* 2003; 161: 839-43.
67. Nagano O, Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* 2004; 95: 930-5.
68. Stern R, Shuster S, Neudecker BA i wsp. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res* 2002; 276: 24-31.
69. Stern R, Shuster S, Wiley TS i wsp. Hyaluronidase can modulate expression of CD44. *Exp Cell Res* 2001; 266: 167-76.
70. Yaqub S, Aandahl EM. Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis. *Crit Rev Oncol* 2009; 15: 43-63.
71. Bourguignon LYW. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 251-9.
72. Zhu D, Bourguignon LYW. The ankyrin-binding domain of CD44s is involved in regulating hyaluronic acid-mediated functions and prostate tumor cell transformation. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998; 39: 209-22.
73. Zhu D, Bourguignon LYW. Interaction between CD44 and the repeat domain of ankyrin promotes hyaluronic acid-mediated ovarian tumor cell migration. *J Cell Physiol* 2000; 183: 182-95.
74. Bourguignon LYW, Gilad E, Brightman A i wsp. Hyaluronan-CD44 interaction with leukemia-associated RhoGEF and epidermal growth factor receptor promotes Rho/Ras co-activation, phospholipase C epsilon-Ca2+ signaling, and cytoskeleton modification in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 14026-40.
75. Mishra JP, Mishra S, Gee K i wsp. Differential involvement of calmodulin-dependent protein kinase II-activated AP-1 and c-Jun N-terminal kinase-activated EGR-1 signaling pathways in tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced CD44 expression in human monocytic cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 26825-37.
76. Lewis CA, Townsend PA, Isacke CM. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase mediates the phosphorylation of CD44 required for cell migration on hyaluronan. *Biochem J* 2001; 357: 843-50.
77. Corbett KD, Alber T. The many faces of Ras: Recognition of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 710-16.
78. Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 2001; 114: 2713-22.
79. Bourguignon LYW, Singleton PA, Diedrich F i wsp. CD44 interaction with Na+-H+ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 2004; 279: 26991-7007.
80. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K i wsp. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 615-75.
81. Bourguignon LYW, Zhu H, Shao L i wsp. CD44 interaction with Tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid (HA)-mediated breast tumor cell migration. *J Biol Chem* 2000; 275: 1829-38.
82. Bourguignon LYW, Zhu H, Shao L i wsp. Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. *J Cell Biol* 2000; 150: 177-91.
83. Nowak JM, Grzanka A, Żuryń A i wsp. Rodzina białek Rho i ich rola w cytoszkieletcie komórki. *Postępy Hig Med Dośw* 2008; 62: 110-17.
84. Bourguignon LYW, Gilad E, Peyrollier K. Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent ovarian tumor cell growth and migration. *J Biol Chem* 2007; 282: 19426-41.
85. Mataraza JM, Briggs MW, Li Z i wsp. IQGAP1 promotes cell motility and invasion. *J Biol Chem* 2003; 278: 41237-45.
86. Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP i wsp. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* 2002; 16: 3074-86.
87. Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 8875-83.
88. Casalini P, Iorio MV, Galmozzi E i wsp. Role of HER receptors family in development and differentiation. *J Cell Physiol* 2004; 200: 343-50.

89. Ghatak S, Hascall VC, Markwald RR i wsp. Stromal hyaluronan interaction with epithelial CD44 variants promotes prostate cancer invasiveness by augmenting expression and function of hepatocyte growth factor and androgen receptor. *J Biol Chem* 2010; 285: 19821-32.
90. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005; 353: 172-87.
91. Kumar S, Masood N, Shaikh AJ. Old disease, new targets--part-I, solid malignancies. *J Pak Med Assoc* 2009; 59: 398-405.
92. Bartolazzi A, Peach R, Aruffo A i wsp. Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J Exp Med* 1994; 180: 53-66.
93. Sy MS, Guo YJ, Stamenkovic I. Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth *in vivo*. *J Exp Med* 1991; 174: 859-66.
94. Carvalho R, Milne AN, Polak M i wsp. A novel region of amplification at 11p12-13 in gastric cancer, revealed by representational difference analysis, is associated with overexpression of CD44v6, especially in early-onset gastric carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 967-75.
95. Hong SC, Song JY, Lee JK i wsp. Significance of CD44v6 expression in gynecologic malignancies. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32: 379-86.
96. Wang SJ, Wreemann VB, Bourguignon LY. Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Head Neck* 2007; 29: 550-8.
97. Kuo KT, Liang CW, Hsiao CH i wsp. Downregulation of BRG-1 repressed expression of CD44s in cervical neuroendocrine carcinoma and adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 1570-7.
98. Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV i wsp. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res* 2005; 65: 6755-63.
99. Gao AC, Lou W, Dong JT i wsp. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res* 1997; 57: 846-9.
100. Desai B, Rogers MJ, Chellaiah MA. Mechanisms of osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. *Mol Cancer* 2007; 6: 18.
101. Patrawala L, Calhoun-Davis T, Schneider-Broussard R i wsp. Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: the CD44+alpha2beta1+ cell population is enriched in tumor-initiating cells. *Cancer Res* 2007; 67: 6796-805.
102. Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA i wsp. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 260-7.
103. Maxwell CA, McCarthy J, Turley E. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? *J Cell Sci* 2008; 121: 925-32.
104. Schmitt M, Schmitt A, Rojewski MT i wsp. RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses. *Blood* 2008; 111: 1357-65.
105. Wang C, Thor AD, Moore DH 2<sup>nd</sup> i wsp. The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 567-76.
106. Pujana MA, Han JD, Starita LM i wsp. Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction. *Nat Genet* 2007; 39: 1338-49.
107. Assmann V, Jenkinson D, Marshall JF i wsp. The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J Cell Sci* 1999; 112: 3943-54.
108. Groen AC, Cameron LA, Coughlin M i wsp. XRHAMM functions in ran-dependent microtubule nucleation and pole formation during anastral spindle assembly. *Curr Biol* 2004; 14: 1801-11.
109. Maxwell CA, Rasmussen E, Zhan F i wsp. RHAMM expression and isoform balance predict aggressive disease and poor survival in multiple myeloma. *Blood* 2004; 104: 1151-8.
110. Liu R, Wang X, Chen GY i wsp. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med* 2007; 356: 217-26.
111. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P i wsp. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 2007; 11: 259-73.
112. Hamilton SR, Fard SF, Paiwand FF i wsp. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 16667-80.
113. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 48-58.
114. Baumgartner G, Gomar-Hoss C, Sakr L i wsp. The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors-- experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy. *Cancer Lett* 1998; 131: 85-99.
115. Green SK, Francia G, Isidoro C i wsp. Antidhesive antibodies targeting Ecadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy *in vitro*. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 149-59.
116. Spruss T, Bernhardt G, Schonenberger H i wsp. Hyaluronidase significantly enhances the efficacy of regional vinblastine chemotherapy of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121: 193-202.
117. Smith KJ, Skelton HG, Turiansky G i wsp. Hyaluronidase enhances the therapeutic effect of vinblastine in intralesional treatment of Kaposi's sarcoma. Military Medical Consortium for the Advancement of Retroviral Research (MMCARR). *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 239-42.
118. Klocker J, Sabitzer H, RaunikW i wsp. Hyaluronidase as additive to induction chemotherapy in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Lett* 1998; 131: 113-5.
119. Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 36: 193-207.
120. Cordo Russo RI, Garcia MG, Alaniz L i wsp. Hyaluronan oligosaccharides sensitize lymphoma resistant cell lines to vincristine by modulating P-glycoprotein activity and PI3K/Akt pathway. *Int J Cancer* 2008; 122: 1012-8.
121. Wang SJ, Bourguignon LYW. Hyaluronan-CD44 promotes phospholipase C mediated Ca<sup>2+</sup> signaling and cisplatin resistance in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132: 19-24.
122. Wang SJ, Bourguignon LYW. Hyaluronan and the interaction between CD44 and epidermal growth factor receptor in oncogenic signaling and chemotherapy resistance in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132: 771-8.
123. Ohashi R, Takahashi F, Cui R i wsp. Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer Lett* 2007; 252: 225-34.
124. Misra S, Ghatak S, Toole BP. Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2. *J Biol Chem* 2005; 280: 20310-5.
125. Gilg AG, Tye SL, Tolliver LB i wsp. Targeting hyaluronan interactions in malignant gliomas and their drug-resistant multipotent progenitors. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1804-13.
126. Toole BP, Slomiany MG. Hyaluronan: a constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 244-50.
127. Baco S, Nagy H, Goda K i wsp. Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter: P-glycoprotein. *Cytometry A* 2004; 6: 105-16.
128. Miletto-González KE, Chen S, Muthukumaran N i wsp. The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 6660-7.
129. Slomiany MG, Dai L, Tolliver LB i wsp. Inhibition of functional hyaluronan-CD44 interactions in CD133-positive primary human ovarian carcinoma cells by small hyaluronan oligosaccharides. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7593-601.
130. Slomiany MG, Dai L, Bomar PA i wsp. Abrogating drug resistance in malignant peripheral nerve sheath tumors by disrupting hyaluronan-CD44 interactions with small hyaluronan oligosaccharides. *Cancer Res* 2009; 69: 4992-8.
131. Platt VM, Szoka FC Jr. Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Mol Pharm* 2008; 5: 474-86.
132. Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 38013-20.
133. Toole BP, Ghatak S, Misra S. Hyaluronan oligosaccharides as a potential anticancer therapeutic. *Curr Pharm Biotechnol* 2008; 9: 249-52.
134. Lesley J, Hascall VC, Tammi M i wsp. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem* 2000; 275: 26967-75.
135. Zeng C, Toole BP, Kinney SD i wsp. Inhibition of tumor growth *in vivo* by hyaluronan oligomers. *Int J Cancer* 1998; 77: 396-401.
136. Misra S, Ghatak S, Zoltan-Jones A i wsp. Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. *J Biol Chem* 2003; 278: 25285-8.
137. West DC, Hampson IN, Arnold F i wsp. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 1985; 228: 1324-6.
138. Matou-Nasri S, Gaffney J, Kumar S i wsp. Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and gamma-adducin. *Int J Oncol* 2009; 35: 761-73.
139. Cui X, Xu H, Zhou S i wsp. Evaluation of angiogenic activities of hyaluronan oligosaccharides of defined minimum size. *Life Sci* 2009; 85: 573-7.



140. Peterson RM, Yu Q, Stamenkovic I i wsp. Perturbation of hyaluronan interactions by soluble CD44 inhibits growth of murine mammary carcinoma cells in ascites. *Am J Pathol* 2000; 156: 2159-67.
141. Ahrens T, Sleeman JP, Schempp CM i wsp. Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid. *Oncogene* 2001; 20: 3399-408.
142. Mohapatra S, Yang X, Wright JA i wsp. Soluble hyaluronan receptor RHAMM induces mitotic arrest by suppressing Cdc2 and cyclin B1 expression. *J Exp Med* 1996; 183: 1663-8.
143. Liu N, Lapcevic RK, Underhill CB i wsp. Metastatin: a hyaluronan-binding complex from cartilage that inhibits tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61: 1022-8.
144. Lee H, Mok H, Lee S i wsp. Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels. *J Control Release* 2007; 119: 245-252.
145. Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer* 2010; 46: 1271-7.
146. Xu Y, Stamenkovic I, Yu Q. CD44 attenuates activation of the hippo signaling pathway and is a prime therapeutic target for glioblastoma. *Cancer Res* 2010; 70: 2455-64.
147. Wallach-Dayana SB, Rubinstein AM, Hand C i wsp. DNA vaccination with CD44 variant isoform reduces mammary tumor local growth and lung metastasis. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1615-23.
148. Greiner J, Schmitt A, Giannopoulos K i wsp. High-dose RHAMM-R3 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and multiple myeloma. *Haematologica* 2010; 95: 1191-7.
149. Yabushita H, Kishida T, Fusano K i wsp. Role of hyaluronan and hyaluronan synthase in endometrial cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 1101-5.
150. Liu N, Gao F, Han Z i wsp. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 5207-14.
151. Lai E, Singh R, Teng B i wsp. Inhibition of hyaluronan synthase-3 decreases subcutaneous colon cancer growth in mice. *Dis Colon Rectum* 2010; 53: 475-82.
152. Lokeshwar VB, Lopez LE, Munoz D i wsp. Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2010; 70: 2613-23.
153. Frost GI, Mohapatra G, Wong TM i wsp. HYAL1/UCP-1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p21.3, is inactivated in head and neck squamous cell carcinomas by aberrant splicing of pre-mRNA. *Oncogene* 2000; 19: 870-7.
154. Jacobson A, Rahmanian M, Rubin K i wsp. Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affect the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors. *Int J Cancer* 2002; 102: 212-9.
155. Shuster S, Frost GI, Csoka AB i wsp. Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. *Int J Cancer* 2002; 102: 192-7.
156. Nykopp TK, Rilla K, Sironen R i wsp. Expression of hyaluronan synthases (HAS1-3) and hyaluronidases (HYAL1-2) in serous ovarian carcinomas: inverse correlation between HYAL1 and hyaluronan content. *BMC Cancer* 2009; 9: 143.
157. Bouga H, Tsouros I, Bounias D i wsp. Involvement of hyaluronidases in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 499.
158. Wang XY, Tan JX, Vasse M i wsp. Comparison of hyaluronidase expression, invasiveness and tubule formation promotion in ER (-) and ER (+) breast cancer cell lines in vitro. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 1300-4.
159. Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Lokeshwar BL. HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res* 2005; 65: 224-50.
160. Delpech B, Laquerriere A, Maingonnat C i wsp. Hyaluronidase is more elevated in human brain metastases than in primary brain tumours. *Anticancer Res* 2002; 22: 2423-7.
161. Enegd B, King JA, Stylli S i wsp. Overexpression of hyaluronan synthase-2 reduces the tumorigenic potential of glioma cells lacking hyaluronidase activity. *Neurosurgery* 2002; 50: 1311-8.
162. Simpson MA. Concurrent expression of hyaluronan biosynthetic and processing enzymes promotes growth and vascularization of prostate tumors in mice. *Am J Pathol* 2006; 169: 247-57.
163. Lokeshwar VB, Schroeder GL, Selzer MG i wsp. Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening comparison of hyaluronic acid-hyaluronidase and BTA-Stat tests. *Cancer* 2002; 95: 61-72.
164. Gao F, Cao M, Yang C i wsp. Preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides for angiogenesis study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 78: 385-92.
165. Koyama H, Hibi T, Isogai Z i wsp. Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M. *Am J Pathol* 2007; 170: 1086-99.
166. Tzuman YC, Sapoznik S, Granot D i wsp. Peritoneal adhesion and angiogenesis in ovarian carcinoma are inversely regulated by hyaluronan: the role of gonadotropins. *Neoplasia* 2010; 12: 51-60.
167. Wang YZ, Cao ML, Liu YW i wsp. CD44 mediates oligosaccharides of hyaluronan-induced proliferation, tube formation and signal transduction in endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011; 236: 84-90.
168. Lokeshwar VB, Obek C, Soloway MS i wsp. Tumor-associated hyaluronidase: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 773-7 [errata w: *Cancer Res* 1998; 58: 3191].
169. Franzmann EJ, Schroeder GL, Goodwin WJ i wsp. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *Int J Cancer* 2003; 106: 438-45.
170. Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL i wsp. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem* 2001; 276: 11922-32.
171. Shibata T, Fujimoto K, Nagayama K i wsp. Inhibitory activity of brown algal phlorotannins against hyaluronidase. *Int J Food Sci Tech* 2002; 37: 703-9.
172. Katsube T, Yamasaki Y, Iwamoto M i wsp. Hyaluronidase inhibiting polysaccharide isolated and purified from hot water extract of Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Food Sci Technol Res* 2003; 9: 25-9.
173. Chen T, Wong YS, Zheng W i wsp. Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008; 67: 26-31.
174. Gaffney J, Matou-Nasri S, Grau-Olivares M i wsp. Therapeutic applications of hyaluronan. *Mol Biosyst* 2010; 6: 437-43.
175. Park W, Kim KS, Bae BC i wsp. Cancer cell specific targeting of nanogels from acetylated hyaluronic acid with low molecular weight. *Eur J Pharm Sci* 2010; 40: 367-75.
176. Speranza A, Pellizzaro C, Coradini D. Hyaluronic acid butyric esters in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2005; 16: 373-9.
177. Cerroni B, Chiessi E, Margheritelli S i wsp. Polymer shelled microparticles for a targeted doxorubicin delivery in cancer therapy. *Biomacromolecules* 2011; 12: 593-601.

Otrzymano: 8 listopada 2010 r.  
Przyjęto do druku: 27 stycznia 2011 r.