

Ocena ekspresji antygenów CD3+CD69+ i CD3+HLA/DR+ na limfocytach T krwi obwodowej u chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani

Estimation of CD3+CD69+ and CD3+HLA/DR+ antigens expression in whole blood T lymphocytes in patients with squamous cell laryngeal carcinoma

KATARZYNA STARSKA^{1/}, EWA GŁOWACKA^{2/}, OLGA STASIKOWSKA^{3/}, IWONA LEWY-TRENDA^{3/},
PAWEŁ PAPIEŻ^{4/}, JAN WOŚ^{4/}, PRZEMYSŁAW LEWKOWICZ^{2/}

^{1/} I Katedra i Klinika Otolaryngologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

^{2/} Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

^{3/} Katedra Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

^{4/} Poradnia Laryngologiczna w Krakowie

Wprowadzenie. Podczas aktywacji komórek uczestniczących w komórkowej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko antygenom guza nowotworowego, na ich powierzchni pojawiają się markery pobudzenia wczesnego.

Cel pracy. Analiza funkcji autologicznych komórek krwi obwodowej na podstawie oceny ekspresji markerów pobudzenia na limfocytach T u chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani.

Materiał i metody. Analizą objęto grupę 55 chorych ze zwerfikowanym rakiem płaskonabłonkowym krtani. W ocenie uwzględnione zostały kryteria klasyfikacji pTNM, stopień zróżnicowania histologicznego oraz głębokość inwazji nowotworowej. Ekspresję markerów pobudzenia na komórkach krwi pełnej chorych, oceniano z zastosowaniem techniki immunofluorescencyjnego znakowania krwi pełnej.

Wyniki. Zwiększona ekspresja antygenów wczesnej CD8/CD69 oraz późnej CD4/HLA/DR aktywacji na limfocytach T krwi obwodowej u chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani była wskaźnikiem większego zaawansowania zmian nowotworowych ocenionych na podstawie cechy pT.

Wnioski. Przeprowadzone badania wskazują na znaczenie oceny aktywności limfocytów T jako biomarkerów zaawansowania zmian i progresji procesu nowotworowego u pacjentów z rakiem krtani.

Słowa kluczowe: rak krtani, antygen aktywacji CD3+CD69+, CD3+HLA/DR+, limfocyty T

Introduction. During activation of cells involved in the cellular immune response against tumor antigens, the stimulation markers appear on the surface of the cells.

Aim. The aim of this study was to analyze the function of autologous peripheral blood cells on the expression excitation of markers of T lymphocytes in the patients with squamous cell laryngeal carcinoma.

Material and methods. The analysis included a group of 55 patients with verified squamous cell carcinoma of the larynx. The pTNM classification criteria, tumour histological grade and tumour invasion have been included in the assay performed. The expression of the stimulation markers in the blood cells of patients was assessed using the techniques of immunofluorescence labeling in whole blood.

Results. Increased expression of the early CD8/CD69 and the late CD4/HLA/DR activation antigens on T lymphocytes in peripheral blood of patients with carcinoma of the larynx was an indicator of more advanced tumors evaluated on the basis of pT characteristics.

Conclusions. The study indicates the importance of the estimation of T lymphocytes activity as a biomarker of advanced changes and progression of tumour in patients with laryngeal carcinoma.

Key words: laryngeal carcinoma, antigen of activation CD3+CD69+, CD3+HLA/DR+, T lymphocytes

WSTĘP

W Polsce rak krtani jest istotnym problemem onkologicznym, stanowiąc w statystykach onkologicznych 3,3% wszystkich zarejestrowanych zachorowań na nowotwory wśród mężczyzn (standaryzowany współczynnik zachorowalności 8,3/100 000) i 0,5% (0,5/100 000) wśród kobiet [1]. Pod względem zachorowalności, rak krtani w Polsce znajduje się na ósmym miejscu wśród nowotworów złośliwych u mężczyzn [1].

Jedną z najistotniejszych kwestii współczesnej onkologii nowotworów głowy i szyi, w szczególności raka płaskonabłonkowego krtani, jednego z najczęstszych guzów tego regionu, jest znalezienie obiektywnych biomarkerów agresywności nowotworu, które umożliwiłyby wskazanie fenotypu związanego z większą inwazyjnością guza. Zdefiniowanie biologicznych wskaźników, jednoznacznych w ocenie i interpretacji, pozwoliłoby w praktyce na wyodrębnienie grup chorych z nowotworami charakteryzującymi się nasiloną progresją zmian, a tym samym pozwoliłoby na wybór właściwego i optymalnego leczenia, jak też prognozowania w konkretnych przypadkach raków głowy i szyi.

W ostatnich latach wiele ośrodków naukowych prowadzi wielokierunkowe badania doświadczalne i kliniczne nad mechanizmami regulacyjnymi determinującymi aktywność komórek układu odpornościowego w odpowiedzi immunologicznej, skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym różnego pochodzenia, w celu poznania i zrozumienia zjawisk immunologicznych, które mogłyby mieć istotny wpływ na rozwój i progresję procesu nowotworowego. Badania nad oddziaływaniem komórek nowotworowych na autologiczne komórki biorące udział w procesach odpornościowych oraz ocena wpływu wzajemnych interakcji międzykomórkowych na stopień inwazyjności guza nowotworowego i przebieg kliniczny choroby nowotworowej, stają się obecnie wiodącymi w immunopatologii klinicznej i wyznaczają kierunek poszukiwań dla wskazania immunologicznych markerów agresywności nowotworu, które pozwoliłyby na wykorzystanie ich w praktyce onkologicznej [2-8].

Szczegółowa wiedza na temat mechanizmów regulacyjnych, kształtujących ostateczny efekt odpowiedzi układu odpornościowego na antygeny guza nowotworowego m.in. poziomu aktywności limfocytów T CD4+ i CD8+ może mieć istotne znaczenie w określeniu inwazyjności zmian nowotworowych, a tym samym w ocenie przebiegu klinicznego choroby a także w wyborze optymalnego sposobu leczenia i rokowaniu u chorych z nowotworami regionu głowy i szyi, w tym z rakiem płaskonabłonkowym krtani.

Ze względu na to, że stan wiedzy dotyczący współzależności parametrów komórkowej odpowiedzi immunologicznej tj. ekspresji markerów pobudzenia wczesnego i późnego na subpopulacjach limfocytów T CD4+ i CD8+ oraz związków z cechami kliniczno-morfologicznymi w raku płaskonabłonkowym krtani jest niewystarczający, niezbędną stała się ocena wybranych wskaźników komórkowej odpowiedzi immunologicznej.

Celem pracy była analiza funkcji autologicznych komórek krwi obwodowej, współuczestniczących w procesach odpornościowych, na podstawie ekspresji wybranych markerów pobudzenia na subpopulacjach limfocytów T tj. CD3+CD69+ i CD3+HLA/DR+ oraz znalezienie związków między cechami kliniczno-morfologicznymi (pT, G, głębokością inwazji) a ekspresją wybranych markerów pobudzenia w raku płaskonabłonkowym krtani.

MATERIAŁ I METODY

Grupa badana

W pracy analizowano 55 chorych ze zweryfikowanym rakiem płaskonabłonkowym krtani, leczonych chirurgicznie. Grupę badaną stanowiło 53 (96,4%) mężczyzn i 2 (3,6%) kobiety, w wieku 47–83 lat (średnia wieku 58,3 lat). W badanej grupie chorych na podstawie kryteriów klasyfikacji pTNM stwierdzono, że guzy pT2 stanowiły 25,4% (14/55), pT3 – 38,2% (21/55) a pT4 – 36,4% (20/55). U 33 (60%) pacjentów zastosowano całkowite usunięcie krtani a u 22 (40%) chorych częściowe usunięcie krtani. U 22 (40%) chorych z potwierdzonymi badaniami śródoperacyjnym, powiększonymi węzłami chłonnymi, wykonano ponadto operację usunięcia węzłów chłonnych regionu szyi (pN1-3), w tym u 20 (36,4%) selektywną operację węzłów chłonnych i u 2 (3,6%) chorych radykalną operację węzłową w modyfikacji Crile’a-Jawdyńskiego. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki UM w Łodzi (numer RNN/15/03/KN).

Ocena patomorfologiczna

W przeprowadzonej analizie patomorfologicznej stopień zaawansowania miejscowego zmian nowotworowych określono zgodnie z kryteriami klasyfikacji TNM dla raków regionu głowy i szyi (UICC 2003). W ocenie głębokości inwazji nowotworowej została uwzględniona skala zaawansowania zmian morfologicznych we froncie nacieku nowotworowego tj. w jego najbardziej inwazyjnej i najmniej zróżnicowanej części, zgodnie z kryteriami klasyfikacji Tumor front grading (TFG) [9], Preparaty H&E oceniano w mikroskopie świetlnym Olympus AX60, w 5 polach widzenia (w pow. 200x), kierując się

miejscami o najgłębszym naciekaniu do otaczających tkanek. W badanej grupie raków krtani w ocenie głębokości inwazji stwierdzono następujące stopnie zaawansowania zmian: carcinoma in situ w 6 przypadkach (10,9%), mikroinwazję podśluzówkową w 12 (21,8%), guzkowy naciek podśluzówkowy w 18 (32,7%) oraz głęboką inwazję ściany z zajęciem chrząstki krtani w 19 przypadkach (34,5%).

Metodyka oznaczenia ekspresji antygenów aktywacji wczesnej i późnej na limfocytach T CD4+ i CD8+

Ekspresję markerów pobudzenia na subpopulacjach limfocytów T oceniano na komórkach świeżej krwi pełnej inkubowanej 24h w 24-celkowych płaskodennych płytkach (Nunc Corp., Roskilde, Danmark) w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂ (Cellstar Incubator) w podłożu hodowlanym RPMI 1640 (Biomed, Lublin, Poland). Do badań używano przeciwciała monoklonalne: anty-CD4 (FITC), anty-CD4 (PE), anty-CD8 (FITC), anty-CD8 (PE), anty-CD69 (APC), anty-HLA/DR (APC) (Becton-Dickinson). Ocenę ekspresji receptorów aktywacji na subpopulacjach limfocytów CD4+ i CD8+ wykonano, stosując standardowe techniki immunofluorescencyjnego znakowania krwi pełnej. Analizę cytofluorymetryczną przeprowadzono z zastosowaniem cytometru przepływowego FACSCalibur z argonowym laserem 488 nm (Becton-Dickinson). W analizie wyników stosowano program BD CellQuest™ z wykorzystaniem opcji Dot-Plot. Wyniki wyrażano jako odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ wykazujących obecność badanego receptora.

Analiza statystyczna

Ocenę statystyczną zebranych danych przeprowadzono z wykorzystaniem programu STATISTICA 5.0 (StatSoft, Inc. USA). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (test ANOVA rang Kruskala-Wallis) wraz z testem jednorodności wariancji (test Levene'a) oraz testami porównań wielokrotnych (post-hoc test Bonferroni-Dunneta) dla porównywania średnich wartości cech w badanych grupach. Dla wszystkich stosowanych testów przyjęto poziom istotności $p \leq 0,05$.

WYNIKI

Analiza rozkładu procentowego subpopulacji limfocytów T wykazała, że w badanej grupie chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani średnie wartości ekspresji antygenów CD4+ i CD8+, wyrażone jako odsetek analizowanych komórek, wykazujących obecność badanego receptora wynosiły (śr.±SEM): 34,6±7,16 dla CD3/CD4 i 30,2±5,82 dla

CD3/CD8. Współczynnik CD4+/CD8+ w grupie badanej wyniósł 1,2 (34,6:30,2). Wartości średniej ekspresji wybranych markerów pobudzenia na limfocytach T CD4+ i CD8+ w grupie badanej przedstawia tabela I.

Analiza ekspresji antygenów aktywacji na limfocytach T CD4+ i CD8+ w zależności od cech klasyfikacji pTNM i cechy G

Oceniono związek ekspresji antygenów aktywacji wczesnej (CD3/CD69) na limfocytach T CD4+ i CD8+ w badanej grupie chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani z wynikami oceny patomorfologicznej rozległości miejscowej procesu nowotworowego (pT). Analiza danych wykazała istotne statystycznie różnice wartości średniej ekspresji antygenów CD4/CD69 ($p=0,04$) oraz CD8/CD69 ($p=0,01$), w zależności od rozległości miejscowej guza nowotworowego pT, w układach badawczych. Guzy w wysokim stadium zaawansowania miejscowego (pT3 i pT4) charakteryzowały się znamienne statystycznie wyższymi wartościami średniej ekspresji badanych antygenów aktywacji wczesnej.

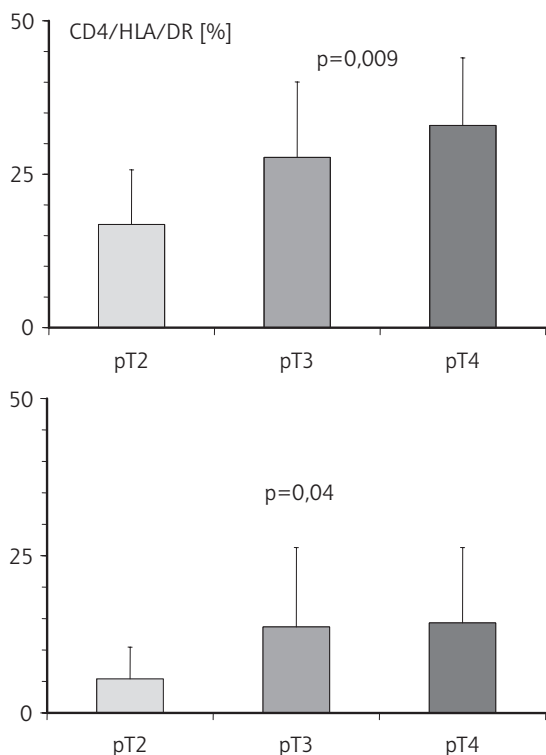
Oceniono także związek ekspresji antygenów aktywacji późnej (CD3/HLA/DR) na limfocytach T CD4+ i CD8+ w badanej grupie chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani z cechą pT, określoną w badaniu morfologicznym. Analiza statystyczna danych wykazała istotne statystycznie różnice wartości średniej ekspresji antygenów CD4/HLA/DR ($p = 0,009$) w zależności od rozległości miejscowej guza nowotworowego pT. Guzy w najwyższym stadium zaawansowania miejscowego pT4 charakteryzowały się znamienne statystycznie wyższymi wartościami średniej ekspresji badanych antygenów aktywacji późnej. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wartościach ekspresji antygenów CD3/CD69 i CD3/HLA/DR dla cechy pN oraz G. Wartości średniej ekspresji antygenów aktywacji wczesnej i późnej na limfocytach T CD4+ i CD8+ w zależności od cechy pT oraz wyniki analizy statystycznej przedstawia tabela II i rycina 1.

Tabela I. Ekspresja markerów pobudzenia na limfocytach T

Antygen aktywacji	% limfocytów T śr.±SEM
Wczesne markery pobudzenia	
CD4/CD69	11,1±1,91
CD8/CD69	15,1±2,25
Późne markery pobudzenia	
CD4/HLA/DR	25,4±2,17
CD8/HLA/DR	38,4±2,05

Tabela II. Ekspresja antygenów aktywacji na limfocytach T w zależności od cechy pT

Cecha pT	Antygeny aktywacji wczesnej		Antygeny aktywacji późnej	
	CD4/CD69	CD8/CD69	CD4/HLA/DR	CD8/HLA/DR
	śr.±SEM	śr.±SEM	śr.±SEM	śr.±SEM
pT2	5,4±1,52	6,4±0,97	16,8±2,68	32,1±2,74
pT3	13,6±3,37	21,5±4,19	27,7±3,28	42,9±3,08
pT4	14,3±4,24	15,6±3,32	32,9±3,88	39,3±4,48



Ryc. 1. Ekspresja antygenów aktywacji wczesnej CD4/CD69 oraz aktywacji późnej CD4/HLA/DR w zależności od miejscowej rozległości procesu nowotworowego

Analiza ekspresji antygenów aktywacji na limfocytach T CD4+ i CD8+ w zależności od głębokości inwazji nowotworowej

Oceniono zależności statystyczne ekspresji antygenów aktywacji wczesnej (CD3/CD69) na limfocytach T CD4+ i CD8+ w badanej grupie chorych z rakiem krtani od głębokości nacieku nowotworowego, według kryteriów klasyfikacji TFG. Analiza danych wykazała istotne statystycznie różnice wartości średniej ekspresji antygenów CD8/CD69 ($p = 0,006$) w zależności od stopnia głębokości naciekania otaczających tkanek. Guzy o najmniejszej liczbie punktów w klasyfikacji TFG (*carcinoma in situ*) charakteryzowały się znamienne statystycznie niższymi wartościami średniej ekspresji badanych antygenów aktywacji wczesnej. Oceniono związek ekspresji antygenów aktywacji późnej (CD3/HLA/

DR) na limfocytach T CD4+ i CD8+ w badanej grupie chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani ze stopniem głębokości nacieku nowotworowego. Analiza statystyczna danych wykazała istotne statystycznie różnice wartości średniej ekspresji antygeny CD4/HLA/DR ($p=0,04$), w zależności od głębokości inwazji. Guzy naciekające ścianę krtani w najmniejszym stopniu, charakteryzowały się znamienne statystycznie niższymi wartościami średniej ekspresji antygeny CD4/HLA/DR. Wartości średniej ekspresji antygenów aktywacji wczesnej i późnej na limfocytach T w zależności od głębokości inwazji przedstawia tabela III i ryc. 2.

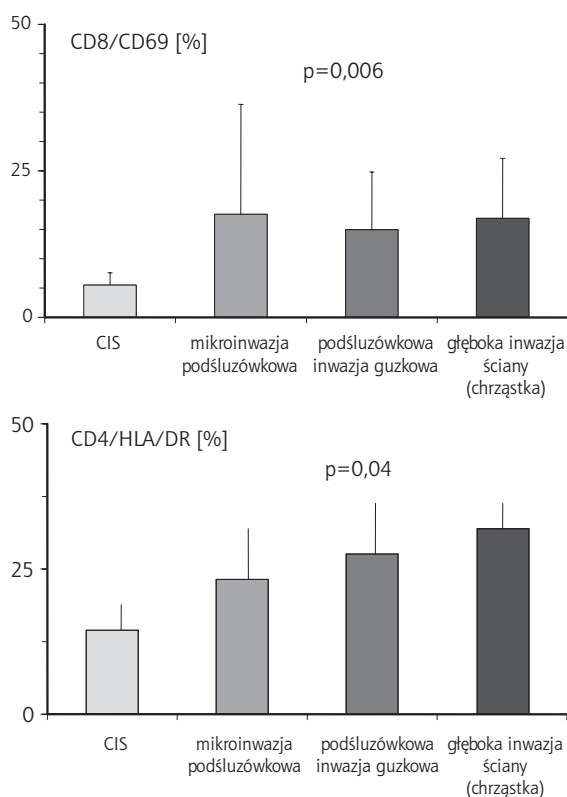
DYSKUSJA

Podczas aktywacji limfocytów T na ich powierzchni pojawiają się markery pobudzenia (CD – *cluster of differentiation*), które w zależności od czasu trwania aktywacji od zadziałania bodźca stymulującego można podzielić na antygeny pobudzenia wczesnego (CD69 i CD71) oraz antygeny aktywacji późnej (CD25, CD26, HLA/DR) [10,11]. Antygen CD69 (AIM, MLR3, activator induced molecule), który występuje głównie na pobudzonych limfocytach T, ale również na limfocytach B i makrofagach, ma właściwości pektynowe i bierze udział w przekazywaniu sygnału aktywującego, prowadząc do syntezy różnych cytokin m.in. IL-2 i IFN- γ oraz receptora dla IL-2 (IL-2R) [10,12]. CD69 jest najwcześniejszym markerem ulegającym ekspresji na pobudzonych komórkach immunokompetentnych [11]. Ekspresja antygeny CD69 na limfocytach krwi obwodowej jest niska, ale stymulacja receptora TCR/CD3 powoduje po 2-4 godzinach indukcję tego markera na limfocytach T, B i komórkach NK [10,12]. Cząsteczka HLA/DR ulega ekspresji na limfocytach B, makrofagach oraz w czasie późniejszych etapów aktywacji na limfocytach T i komórkach NK. Wzmożona ekspresja HLA/DR występuje po około 24 godzinach od stymulacji [10].

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że raki płaskonabłonkowe krtani w wysokim stadium zaawansowania miejscowego zmian nowotworowych, charakteryzowały się znamienne wyższą ekspresją badanych antygenów aktywacji wczesnej CD4/CD69 i CD8/CD69. Spośród analizowanych markerów antygeny pobudzenia późnego HLA/DR na limfocytach T CD4+ wykazywały także wyższą ekspresję w zaawansowanych rakach krtani. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na immunologiczne pobudzenie limfocytów T krwi krążącej, zarówno CD4+ jak i CD8+, we wczesnej fazie odpowiedzi na obecność antygenów guza, w przypadkach raków krtani w wysokim stadium zaawansowania

Tabela III. Ekspresja antygenów aktywacji w zależności od głębokości inwazji

Głębokość zmian	Antygeny aktywacji wczesnej		Antygeny aktywacji późnej	
	CD4/CD69 śr.±SEM	CD8/CD69 śr.±SEM	CD4/ HLA/DR śr.±SEM	CD8/ HLA/DR śr.±SEM
carcinoma <i>in situ</i>	4,9±2,51	5,5±1,05	16,0±3,09	32,4±3,21
mikroinwazja podśluzówkowa	10,9±3,13	17,5±5,93	22,1±4,08	37,7±4,22
guzkowy naciek podśluzówkowy	13,6±4,57	14,9±2,96	28,1±4,33	42,1±3,82
głęboka inwazja ściany	10,7±2,59	16,8±3,61	30,2±3,11	37,1±3,71



Ryc. 2. Ekspresja antygenów aktywacji wczesnej CD8/CD69 oraz aktywacji późnej CD4/HLA/DR w zależności od głębokości inwazji nowotworowej

zmian nowotworowych. Obserwowany jednak, brak zależności ekspresji markerów pobudzenia późnego na limfocytach T, w szczególności na subpopulacji CD8+ w inwazyjnych przypadkach raka krtani, charakteryzujących się agresywnym wzrostem, wskazuje na postępujące upośledzenie i spadek efektywności przeciwnowotworowych mechanizmów immunologicznych, postępujących wraz z wydłużaniem czasu oddziaływania komórek nowotworowych na komórki układu odpornościowego.

Zjawisko supresyjnego wpływu komórek guza na funkcje komórek biorących udział w procesach immunologicznych, może prowadzić do zjawiska anergii i tolerancji immunologicznej na obce antygeny ze strony układu odpornościowego, w przebiegu choroby nowotworowej. Nie bez znaczenia jest także rola limfocytów regulatorowych, subpopulacji limfocytów CD4+, które poprzez działanie immunosupresyjne na komórki efektorowe, również przyczyniają się do hamowania przeciwnowotworowych mechanizmów immunologicznych i postępującej progresji zmian nowotworowych [13-19].

Do występowania zaburzeń funkcji limfocytów T, zarówno CD4+ i CD8+ i braku pobudzenia komórek uczestniczących w reakcjach odpornościowych w przebiegu odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego na antygeny guza, przyczyniają się także zmiany w poziomie wydzielanych cytokin. W pracach dotyczących tematu wielu badaczy podkreśla brak aktywacji mechanizmów immunologicznych zależnych od IL-6 i IFN- γ , co powoduje zmniejszenie skuteczności komórkowej odpowiedzi immunologicznej na antygeny nowotworowe. Obniżenie stężenia IL-6 na obwodzie, może być przyczyną m.in. spadku aktywności limfocytów T rozpoznających antygen, upośledzenia różnicowania pobudzonych przez antygen limfocytów T, w kierunku limfocytów cytotoksycznych Tc, zmniejszenia aktywacji limfocytów Tc i komórek NK do bezpośredniego hamowania proliferacji komórek nowotworowych oraz działania cytolytycznego [20,21]. Brak efektu działania IFN- γ , który wzmacnia ekspresję cząsteczek MHC na komórkach APC i nasila prezentację antygenów limfocytom T, zwiększa cytotoksyczność limfocytów Tc oraz indukuje ekspresję cytokin m.in. IL-1 α , IL-6, TNF, a więc stymuluje aktywność limfocytów T CD4+ i CD8+, potwierdza immunosupresyjne działanie komórek guza nowotworowego na limfocyty T oraz wskazuje na defekt odpowiedzi immunologicznej spowodowany nieprawidłowym funkcjonowaniem tych komórek [20,21]. Zjawisko supresji odpowiedzi immunologicznej w zaawansowanym raku krtani nasila także wysoki poziom wydzielanej IL-10, która również hamuje ekspresję cząsteczek MHC klasy II na makrofagach i zmniejsza prezentację antygenów nowotworowych, hamuje powstawanie limfocytów Th1 oraz wytwarzanie cytokin przez limfocyty Th1 (IFN- γ).

Przedstawione obserwacje są zatem dowodem nieefektywności mechanizmów immunologicznych, zależnych od pobudzonych limfocytów T oraz jednocześnie wskazują na skuteczność działania mechanizmów ucieczki, wykorzystywanych przez

komórki guza, w obronie przed przeciwnowotworową odpowiedzią immunologiczną typu komórkowego [20,21]. W dostępnym piśmiennictwie trudno znaleźć publikacje, w których w sposób szczegółowy analizowano związek ekspresji antygenów aktywacji na limfocytach T w raku płaskonabłonkowym krtani w kontekście oceny wpływu aktywności komórek immunokompetentnych na parametry kliniczno-morfologiczne guza nowotworowego. Ponadto, prace dotyczące omawianego tematu w rakach regionu głowy i szyi, odnosiły się najczęściej do oceny ekspresji markerów pobudzenia na komórkach naciekających guz (TIL), rzadziej komórek krwi krążącej, co nie pozwala na bezpośrednie porównywanie wyników [13,15,22-24].

Do dyskusji wybrano jedynie publikacje dotyczące raków regionu głowy i szyi, w których autorzy przyjęli możliwie podobny do zastosowanego panel markerów aktywacji na limfocytach T oraz zbliżoną metodykę badawczą [13,15,22-24]. Należy podkreślić, że wyniki badań różnych autorów wskazują na duże rozbieżności w ocenie aktywności komórek biorących udział w procesach immunologicznych w różnych typach raków głowy i szyi i prowadzą do formułowania odmiennych wniosków, dotyczących również związku ekspresji markerów pobudzenia na komórkach układu odpornościowego ze wskaźnikami kliniczno-morfologicznymi [13,15,22-24]. Kuss i wsp. [23] potwierdzili występowanie nasilonej supresji limfocytów T CD8+ krwi obwodowej w najwyższym stadium zaawansowania klinicznego zmian (IV S), wskazując na związek nieprawidłowej aktywności komórek efektorowych w inwazyjnych guzach nowotworowych u chorych z rakami regionu głowy i szyi. Ci sami autorzy, przeprowadzając badania w innej grupie chorych z HNSCC potwierdzili obniżoną liczbę limfocytów T CD4+ i CD8+ we krwi krążącej, nie wykazując jednak zależności aktywności komórek układu odpornościowego z parametrami klasyfikacji TNM [24].

Badoual i wsp. [13] analizując związek aktywności określonych subpopulacji limfocytów T naciekających guz (TIL), potwierdzili brak występowania zależności ekspresji fenotypu CD4+ z rozległością miejscową guza pT, stopniem zaawansowania zmian węzłowych pN oraz pierwotną lokalizacją inwazji nowotworowej. Podobne wyniki przedstawili Boucek i wsp. [15], którzy wykazali zależność występowania wysokiego odsetka limfocytów o fenotypie CD8+ we krwi obwodowej i jednocześnie obniżonego współczynnika CD4+/CD8+, ze wzrastającą inwazyjnością zmian, określonych na podstawie cechy pT, w analizowanej grupie chorych z nowotworami regionu głowy i szyi. Wolf i wsp.

[25] nie potwierdzili jednak występowania związku współczynnika CD4+/CD8+ z zaawansowaniem zmian nowotworowych, wynikami leczenia, występowaniem wznów nowotworowych oraz czasem przeżycia chorych z rakami krtani.

Aarstad i wsp. [22] w badaniach ekspresji antygenów pobudzenia wczesnego tj. CD69+ i CD71+ oraz późnego CD25+ i HLA/DR+ na limfocytach T krwi obwodowej w odniesieniu do parametrów klasyfikacji TNM, zaobserwowali znamienne zależności między badanymi wskaźnikami. Autorzy wykazali, że wysoka ekspresja cząsteczki CD71+ na limfocytach CD3+ oraz wysoki współczynnik CD69+:CD71+ i CD25+:HLA/DR+ wiąże się znamienne ze wzrastającą inwazyjnością zmian nowotworowych, określonych na podstawie wykładników klasyfikacji pTNM w rakach regionu głowy i szyi. Liczni badacze wskazują również na znaczenie ekspresji różnych markerów pobudzenia w progresji procesu nowotworowego oraz tym samym na rolę antygenów aktywacji, jako wskaźników prognostycznych. Analiza znaczenia ekspresji antygenów aktywacji na limfocytach T jako wskaźników rokowniczych nie była przedmiotem badań w niniejszym opracowaniu, z powodu przedstawionej wcześniej charakterystyki klinicznej badanej grupy, niemniej jednak wyniki badań innych autorów pośrednio wskazują na rolę stopnia aktywności komórek układu odpornościowego w przebiegu choroby nowotworowej i znaczenie w determinowaniu zaawansowania zmian.

Badoual i wsp. [13] wykazali istotną zależność występowania wysokiego odsetka limfocytów TIL o fenotypie CD4+CD69+ z mniejszym ryzykiem wystąpienia wznów miejscowych i wydłużeniem czasu przeżycia chorych z rakami regionu głowy i szyi. Co interesujące, wzrost odsetka limfocytów o fenotypie CD4+Foxp3+ w utkaniu guza również wiązał się ze zmniejszoną częstością wznów nowotworowych. Patomechanizm prowadzący do obserwowanych zmian, cytowani autorzy tłumaczyli wpływem limfocytów regulatorowych na subpopulacje limfocytów T CD4+CD25+Foxp3- i CD8+. Limfocyty Treg, działając supresyjnie na limfocyty T CD4+ oraz limfocyty cytotoksyczne CD8+, prowadziły do hamowania odpowiedzi zapalnej, sprzyjającej wzrostowi guza, a tym samym przyczyniały się do zmniejszenia inwazyjności nowotworu i powstawania wznów miejscowych. Badacze ci zanotowali także pozytywną korelację odsetka limfocytów T CD4+CD69+ z liczbą limfocytów T o fenotypie CD4+CD25+, w utkaniu nowotworowym, nie wykazując jednak takich zależności dla limfocytów T CD4+CD69+ i komórek wykazujących ekspre-

się antygenów CD4+Foxp3+. Omawiani autorzy zaobserwowali również, że zmniejszony odsetek limfocytów TIL CD4+ wiązał się z brakiem wznów procesu nowotworowego, pozostawał jednak bez wpływu na czas przeżycia chorych. Odmienne wyniki przedstawił Kuss i wsp. [23,24] wykazując silną zależność zmniejszonej ekspresji antygeny CD4+ na limfocytach krwi obwodowej ze zwiększoną częstością wznów miejscowych w przypadkach raków głowy i szyi.

Loose i wsp. [17] potwierdzili pozytywną korelację liczby limfocytów T naciekających guz, wykazujących ekspresję antygeny CD25+ z wydłużeniem czasu przeżycia w badanej grupie chorych. Aarstad i wsp. [22] wykazali istotny związek ekspresji antygeny aktywacji wczesnej CD71+ na limfocytach krwi krążącej z czasem przeżycia chorych w badanej grupie chorych z rakami regionu głowy i szyi, wskazując na rolę wysokiej ekspresji CD71+ jako negatywnego wskaźnika prognostycznego. Badacze wykazali także znamienne zależności ekspresji antygenów aktywacji wczesnej i późnej z czasem przeżycia chorych z HNSCC. Wysoka wartość współczynników CD69+:CD71+ i CD25+:HLA/DR+ wiązała się ze złym rokowaniem w badanej grupie chorych. Rozbieżności w wynikach badań dotyczących oceny roli ekspresji antygenów pobudzenia na limfocytach T jako wskaźników zaawansowania kliniczno-morfologicznego zmian nowotworowych oraz znaczenia

prognostycznego badanych parametrów aktywności komórek biorących udział w procesach odpornościowych, wskazuje na konieczność przeprowadzenia dalszych badań dla uzyskania jednoznacznych i wiążących wniosków dotyczących patomechanizmów progresji guza nowotworowego w rakach regionu głowy i szyi, w tym w rakach krtani.

WNIOSKI

1. Zwiększona ekspresja antygenów aktywacji wczesnej CD4/CD69, CD8/CD69 oraz aktywacji późnej CD4/HLA/DR na limfocytach T krwi obwodowej u chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani jest wskaźnikiem większego zaawansowania zmian nowotworowych ocenionych na podstawie cechy pT.
2. Guzy nowotworowe o najmniejszym zaawansowaniu zmian określonych według kryteriów klasyfikacji TFG (carcinoma in situ) charakteryzowały się najmniejszą ekspresją antygenów aktywacji wczesnej (CD8/CD69) oraz najmniejszą ekspresją markerów pobudzenia późnego (CD4/HLA/DR) na subpopulacjach limfocytów T w badanej grupie chorych.

Badania wykonano w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N403 043 32/2326.

Piśmiennictwo

1. Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce. Warszawa 2008. (<http://www.onkologia.org.pl/doc/biuletyn2006>).
2. Brocks CP, Pries R, Frenzel H, Ernst M, Schlenke P, Wollenberg B. Functional alteration of myeloid dendritic cells through head and neck cancer. *Anticancer Res.* 2007; 27(2): 817-824.
3. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B i wsp. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2003; 63(19): 6478-6487.
4. Nitsch SM, Pries R, Wollenberg B. Head and neck cancer triggers increased IL-6 production of CD34+ stem cells from human cord blood. *In Vivo.* 2007; 21(3): 493-498.
5. Pries R, Thiel A, Brocks C, Woldenberg B. Secretion of tumor-promoting and immune suppressive cytokines by cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo* 2006; 20(1): 45-48.
6. Pries R, Wollenberg B. Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17(3): 141-146.
7. Pro B, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol Histopathol.* 2004; 19(4): 1345-1351.
8. Yamamoto T, Kimura T, Ueta E, Tatemoto Y, Osaki T. Characteristic cytokine generation patterns in cancer cells and infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinomas and the influence of chemoradiation combined with immunotherapy on these patterns. *Oncology.* 2003; 64(4): 407-415.
9. Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP, Mann WJ. Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995; 104(7): 503-510.
10. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods.* 2004; 293(1-2): 127-142.
11. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S i wsp. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry.* 1997; 27(1): 71-76.
12. Kozar K, Zagożdżon R. Aktywacja limfocytów. w: Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W i wsp. (red.). *Immunologia*, Wyd. PWN 2008.

13. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, El Houda Aguezny N i wsp. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(2): 465-472.
14. Bergmann C, Strauss L, Wang Y, Szczepanski MJ, Lang S, Johnson JT, Whiteside TL. T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of suppression and expansion in advanced disease. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(12): 3706-3715.
15. Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M, Kuchar M, Betka J, Boucek V i wsp. Regulatory T cells and their prognostic value for patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 426-33.
16. Chikamatsu K, Sakakura K, Yamamoto T, Furuya N, Whiteside TL, Masuyama K. CD4+ T helper responses in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2008; 44(9): 870-877.
17. Loose D, Signore A, Bonanno E, Vermeersch H, Dierckx R, Deron P, Van de Wiele. Prognostic value of CD25 expression on lymphocytes and tumor cells in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Biother Radiopharm.* 2008; 23(1): 25-33.
18. Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer.* 2005; 92(5): 913-920.
19. Strauss L, Bergmann C, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(21): 6301-611.
20. Gołąb J, Jakóbsiak M, Zagożdżon R, Obłąkowski P. Cytokiny. (w) *Immunologia.* Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W i wsp. (red.). Wyd. PWN 2008.
21. Jakóbsiak M, Lasek W. *Immunologia nowotworów.* (w) *Immunologia.* Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W i wsp. (red.). Immunologia, Wyd. PWN 2008.
22. Aarstad HJ, Heimdal JH, Klementsén B, Olofsson J, Ulvestad E. Presence of activated T lymphocytes in peripheral blood of head and neck squamous cell carcinoma patients predicts impaired prognosis. *Acta Otolaryngol.* 2006; 126(12): 1326-1333.
23. Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(11): 3755-3762.
24. Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to disease. *Adv Otorhinolaryngol* 2005; 62: 161-172.
25. Wolf GT, Bradford CR, Urba S, Smith A, Eisbruch A, Chepeha DB i wsp. Immune reactivity does not predict chemotherapy response, organ preservation, or survival in advanced laryngeal cancer. *Laryngoscope.* 2002; 112(8): 1351-1356.