

Kliniczno-morfologiczne znaczenie ekspresji genu i białka CCR3 w raku płaskonabłonkowym krtani

The clinicopathological significance of the expression of CCR3 gene and protein in laryngeal squamous cell carcinoma

KATARZYNA STARSKA^{1/}, IWONA LEWY-TRENDA^{2/}, PAWEŁ PAPIEŹ^{3/}, JAN WOŚ^{3/}, EWA FORMA^{4/},
MAGDALENA BRYŚ^{4/}

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

^{2/} Katedra Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

^{3/} Oddział Laryngologii Szpitala Specjalistycznego im. Żeromskiego w Krakowie

^{4/} Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi

Wprowadzenie. CCR3 (CD193) jest C-C receptorem typu 3 dla chemokin obecnym na limfocytach Th, eozynofilach i bazofilach oraz komórkach nabłonka dróg oddechowych. Nieznana jest jednak rola CCR3 w raku krtani w aspekcie znaczenia klinicznego.

Cel pracy. Celem pracy była ocena ekspresji receptora dla chemokin CCR3 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, zarówno na poziomie genu jak i białka oraz znalezienie związków z cechami kliniczno-morfologicznymi (pT, głębokością inwazji i typem inwazji) w raku płaskonabłonkowym krtani.

Materiał i metody. Analizą objęto grupę 71 chorych z rakiem krtani. W patomorfologicznej ocenie zastosowano kryteria klasyfikacji pTNM oraz zmian we froncie guza TFG. Ekspresję CCR3 na izolowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej PBMC oceniano metodą ilościowej analizy produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym (real-time RT-PCR) oraz Western blot.

Wyniki. Zwiększona ekspresja receptora CCR3 na limfocytach T u chorych z rakiem krtani była związana z większą rozległością miejscową zmian nowotworowych (pT3-4). Guzy o większym zaawansowaniu zmian TFG (TFG3-4) charakteryzowały się większą ekspresją białka CCR3 w PBMC w badanej grupie chorych. W rakach krtani głębiej naciekających otaczające tkanki podścieliska guza wykazano większą ekspresję CCR3 (naciek chrząstki).

Wnioski. Przeprowadzone badania wskazują na znaczenie oceny ekspresji receptora CCR3 jako wskaźnika zaawansowania i progresji procesu nowotworowego w raku krtani.

Słowa kluczowe: rak krtani, receptor dla chemokin CCR3, jednojądrzaste komórki krwi

Introduction. CCR3 (CD193), C-C chemokine receptor type 3 is a receptor that is highly expressed in eosinophils and basophils, and is also detected in Th cells, as well as in airway epithelial cells. Nevertheless, little is known about the function of chemokine receptors in the development and progression of laryngeal cell carcinoma.

Aim. The aim of this study was to analyze the expression of CCR3 in peripheral blood mononuclear cells, on the gene and protein level, and to find links with clinical and morphological characteristics (pT, depth and type of invasion) in the carcinoma of the larynx.

Material and methods. The analysis included a group of 71 patients with confirmed laryngeal carcinoma. pTNM and TFG classification criteria were applied for the pathological assessment. The expression of markers in the blood cells of patients was assessed using the RT-PCR and Western blot techniques.

Results. Increased expression of CCR3 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was an indicator of advanced tumours evaluated on the basis of the characteristics of pT (pT3-4). Tumours at the highest stages of progression identified by TFG criteria (TFG3-4) were associated with higher expression of CCR3 in PBMC of the studied group of patients. In laryngeal carcinomas characterized by deep invasion with cartilage infiltration, the CCR3 expression was shown to be higher, as well.

Conclusions. The study proves the importance of the CCR3 expression in T lymphocytes as an indicator of advanced changes and progression in patients with laryngeal carcinoma.

Key words: laryngeal carcinoma, chemokine receptor CCR3, peripheral blood mononuclear cells

WSTĘP

Rak krtani nadal pozostaje istotnym problemem onkologicznym. W statystykach rak krtani stanowi 3,3% wszystkich zarejestrowanych zachorowań na nowotwory wśród mężczyzn (standaryzowany współczynnik zachorowalności 8,3/100000) [1]. Pomimo szeroko zakrojonych badań z zakresu patologii i biologii molekularnej nadal nie wskazano jednoznacznych parametrów, na podstawie których można określić stopień inwazyjności zmian oraz przewidzieć przebieg choroby nowotworowej u pacjentów z rakiem krtani.

Receptor dla chemokin CCR3 (CD193) jest białkiem kodowanym przez gen CCR3 zlokalizowanym w regionie chromosomowym 3p21. C-C receptor typu 3 należy do rodziny 1 receptorów beta-chemokin, podobnym do receptorów sprzężonych z białkami G, i jak one będącym integralnym białkiem błonowym z osadzonym w niej motywem siedmiu alfa helis [2]. Receptor ten wiąże różne chemokiny m.in. eotaksyny (CCL11), eotaksyny-2 (CCL24), eotaksyny-3 (CCL26), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), i RANTES (CCL5), obecnym na limfocytach Th1 i Th2, eozynofilach i bazofilach oraz komórkach nabłonka dróg oddechowych [2,3].

W ostatnich latach prowadzi się liczne badania doświadczalne i kliniczne nad mechanizmami regulacyjnymi cyklu komórkowego, procesu proliferacji, apoptozy z udziałem chemokin i receptorów dla chemokin oraz kontroli za ich pośrednictwem procesu inicjacji i progresji procesu nowotworowego [3-18]. W piśmiennictwie podkreśla się znaczenie ekspresji receptora dla chemokin CCR3 w proliferacji komórek nowotworowych oraz roli w powstawaniu przerzutów w wielu nowotworach m.in. w rakach regionu głowy i szyi, w tym jamy ustnej, raku nerki, tarczycy i prostaty [3-8]. Wyniki badań nad oddziaływaniem komórek biorących udział w procesach odpornościowych oraz ocena wpływu na stopień inwazyjności guza nowotworowego i przebieg kliniczny choroby nowotworowej, wydają się być obiecującymi pod względem wykorzystania w praktyce onkologicznej [3-18].

Celem pracy była ocena ekspresji receptora dla chemokin CCR3 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC), zarówno na poziomie genu jak i białka oraz znalezienie związków między cechami kliniczno-morfologicznymi (pT, sumą punktów wg klasyfikacji TFG, głębokością inwazji i typem inwazji) a ekspresją analizowanego markera chemotaksji w raku płaskonabłonkowym krtani.

MATERIAŁ I METODY

Grupa badana

W pracy analizowano 71 chorych ze zweryfikowanym rakiem płaskonabłonkowym krtani, leczonych chirurgicznie. Grupę badaną stanowiło 69 (97,2%) mężczyzn i 2 (2,8%) kobiety, w wieku 45-78 lat (średnia wieku 62,9 lat). W badanej grupie chorych na podstawie kryteriów klasyfikacji pTNM stwierdzono, że guzy pT1 stanowiły 7,1% (10/71) a pT2 – 25,3% (18/71), pT3 – 29,6% (21/71) a pT4 – 45,1% (32/71). U 48 (67,6%) pacjentów zastosowano całkowite usunięcie krtani a u 23 (32,4%) chorych częściowe usunięcie krtani. U 37 (52,1%) chorych z potwierdzonymi badaniami śródoperacyjnym, powiększonymi węzłami chłonnymi, wykonano ponadto operację usunięcia węzłów chłonnych regionu szyi (pN1-3). Przy kwalifikacji pacjentów do przeprowadzanych badań zastosowano następujące kryteria włączenia do grupy badanej potwierdzony w badaniu patomorfologicznym rak płaskonabłonkowy krtani, zastosowanie leczenia chirurgicznego jako pierwszej metody postępowania leczniczego, bez stosowanej w przeszłości innej metody leczenia (immunosupresyjnego, radio- lub chemioterapii), brak obecności przerzutów odległych.

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 naciekanium do otaczających tkanek. Charakterystykę kliniczną grupy badanej przedstawiono w tabeli I.

Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

Celem izolacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells* – PBMCs), pobierano krew pełną w trakcie rutynowych badań kontrolnych w ilości 10 ml jednorazowo na heparynę litową (10U/mL). Limfocyty krwi obwodowej były izolowane przez wirowanie na gradiencie gęstości Ficoll-Paque™ PLUS (1,077g/mL, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Supernatant całkowicie usuwano

Tabela I. Kliniczna charakterystyka badanej grupy

Cecha		Liczebność grupy N (%)
Płeć	Mężczyźni	69 (97,2%)
	Kobiety	2 (2,8%)
Leczenie chirurgiczne	Częściowe usunięcie krtani	23 (32,4%)
	Całkowite usunięcie krtani	48 (67,6%)
Operacja usunięcia węzłów chłonnych		37 (52,1%)
Selektywna operacja węzłowa (SND)		34 (47,8%)
Radykalna operacja węzłowa (RND)		3 (4,2%)
pT	pT2	18 (25,3%)
	pT3	21 (29,6%)
	pT4	32 (45,1%)
pN	pN0	34 (47,9%)
	pN1-3	37 (52,1%)
	pN1	3 (4,2%)
	pN2	24 (86%)
	pN3	7 (9,8%)

a następnie dodawano RNAlater RNA Stabilization Reagent (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Komórki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu izolacji RNA. Materiał kontrolny w ocenie ekspresji badanych kwasów nukleinowych oraz białek w PBMC stanowiły jednojądrzaste komórki krwi obwodowej od 55 zdrowych ochotników. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki UM w Łodzi (RNN/13/11/KE).

Ocena ekspresji poziomu mRNA dla CCR3 w PBMCs metodą ilościowej analizy produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym (real-time RT-PCR)

Całkowite RNA izolowano przy użyciu odczynnika TRI Reagent (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Czystość otrzymanych preparatów RNA określano metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm i 280 nm. Przyjętym kryterium czystości DNA była wartość A_{260}/A_{280} mieszcząca się w granicach 1,8-2,0. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano przy użyciu zestawu PCR Kit ver. 3.0 (Takara Bio Inc. Japonia) zgodnie z zaleceniami producenta. cDNA przechowywano w temp. -20°C . Otrzymany RNA stanowił matrycę w reakcji real-time PCR dla oznaczenia liczby kopii mRNA dla genu CCR3. Użyta mieszanina reakcyjna zawierała: 0,5 μl cDNA, 5 μl TaqMan® Universal PCR MasterMix, 0,5 μl 20x TaqMan® Gene Expression Assays i 4 μl H_2O . Reakcję real-time PCR prowadzono w urządzeniu Mastercycler®ep realplex

(Eppendorf). Początkowa ilość matrycy wyznaczana była na podstawie parametru Ct (teoretyczny numer cyklu, przy którym wartość fluorescencji jest wyższa niż przyjęta arbitralnie wartość graniczna). Pomiar wartości Ct wykonano w dwóch powtórzeniach, jako gen referencyjnego wykorzystano GAPDH. Do badań zastosowano następujące sondy TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA): CCR3 - Hs00266213_s1 (75 bp), GAPDH - Hs00266705_g1.

Ocena poziomu ekspresji białka CCR3 w PBMCs z zastosowaniem analizy immunologicznej białek techniką Western blot

Rozdzielone w żelu poliakrylamidowym białka elektrotransferowano na immobilon P (Millipore) w układzie: 20% (v/v) metanol – 0,192 M Gly – 0,025 M Tris, pH 8,3 przy natężeniu prądu 400 mA w temperaturze 4°C podczas 80 min. Unieruchomione na membranie białka identyfikowano za pomocą kompleksu streptawidyna/biotyna/peroksydaza chrzastki (StreptABC/HRP; Dako) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Stosowano następujące przeciwciała (Santa Cruz Biotechnology): CCR3 – sc-7897 (H-52). Analizę densytometryczną białek immunoidentyfikowanych techniką Western blot przeprowadzono za pomocą wideodensytometru firmy Biotec-Fischer (Niemcy) z kamerą SSC-M370CE (Sony) oraz programu komputerowego GelPro Analyzer® version 3.0 for Windows™ (Media Cybernetics, USA).

Analiza statystyczna

Analizy statystycznej wyników dokonano przy użyciu programu komputerowego STATISTICA wersja 9.0 (StatSoft, Polska). Do oceny rozkładów wykorzystano test Kolmogorova-Smirnova i po stwierdzeniu rozkładów odmiennych od normalnych do dalszych obliczeń stosowano testy nieparametryczne U Manna-Whitneya i Kruskala-Wallis. Wyliczono także współczynnik skośności i ponieważ przybierał on wartości niższe niż 1,5 stosowano do obliczeń średnia arytmetyczna oraz odchylenie standardowe (SD). Za statystycznie istotną przyjęto wartość $p \leq 0,05$.

WYNIKI

Ocena morfologiczna wykazała, że najliczniejszą grupę wśród raków płaskonabłonkowych krtani stanowiły guzy charakteryzujące się głęboką inwazją ściany z zajęciem chrząstki narządu – 28 (39,4%) przypadków. Nowotwory o największej inwazyjności zmian tj. naciekające podścielisko małymi grupami komórek (<15 komórek wpp) stanowiły

także 28 (39,4%) wśród ocenionych raków krtani. Dokładny rozkład wyników oceny badanych parametrów morfologicznych wg klasyfikacji TFG tumor front grading w badanej grupie raków krtani przedstawiono w tabeli II.

Tabela II. Morfologiczna charakterystyka badanej grupy

Cecha	Liczebność grupy N (%)
Zróżnicowanie histopatologiczne G	
G1	10 (8,5%)
G2	54 (81,7%)
G3	7 (9,8%)
Głębokość inwazji	
grupa 1-2:	
mikroinwazja (CIS)	0
guzkowy naciek podśluzówkowy	24 (67,6%)
grupa 3-4:	
naciek tkanki mięśniowej	19 (33,8%)
naciek chrząstki krtani	28 (39,4%)
Typ inwazji	
grupa 1-2:	
dobrze odgraniczone marginesy	9 (12,7%)
naciek litymi sznurami i wstęgami	21 (29,6%)
grupa 3-4:	
naciek małymi grupami (<15 kom.)	28 (39,4%)
naciekanie pojedynczymi komórkami	13 (18,3%)
TFG	
grupa 1-2:	
6-9 punktów	1 (1,4%)
10-13 punktów	25 (35,2%)
grupa 3-4:	
14-17 punktów	25 (35,2%)
18-21 punktów	20 (28,2%)
>22 punktów	0

Ocena ekspresji mRNA oraz poziomu ekspresji białek dla CCR3 w PBMCs

W przeprowadzonej analizie molekularnej oceniono ekspresję mRNA oraz białka dla cząsteczki CCR3 w izolowanych komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u chorych ze zweryfikowanym rakiem krtani oraz u zdrowych ochotników, jako grupy kontrolnej. Pozytywną ekspresję mRNA dla CCR3 w PBMCs w badanych grupach wykazano u 76,1% (54/71) chorych z rakiem krtani oraz u 40% (22/55) zdrowych ochotników. Poziom średnich wartości ekspresji mRNA dla CCR3 w PBMCs w badanej grupie chorych i w grupie kontrolnej wynosiły odpowiednio: 329,16±271,88 vs 51,92±53,54. Stwierdzono znamienne różnice w poziomie ekspresji mRNA CCR3 w analizowanych grupach ($p<0,001$). Ocena analizowanych cząsteczek na poziomie białka wykazała pozytywną ekspresję dla CCR3 w PBMCs u 30,9% (22/71) chorych z rakiem

krtani oraz u 36,36% (20/55) zdrowych ochotników. Średnie wartości poziomu białka CCR3 w izolowanych PBMCs w grupie chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani i w grupie kontrolnej wynosiły odpowiednio: 37,98±66,14 vs 15,34±16,61. Wykazano występowanie znamienych różnic w poziomie ekspresji badanego białka w analizowanych grupach ($p<0,02$). Dla potrzeb statystycznych podzielono analizowane raki płaskonabłonkowe krtani na dwie grupy porównawcze (grupa 1-2 vs grupa 3-4) stosując podział dla każdego ocenianego parametru kliniczno-morfologicznego. Analiza ekspresji mRNA dla CCR3 w odniesieniu do stopnia zaawansowania zmian nowotworowych wg klasyfikacji TFG wykazała, że średnie wartości kwasu rybonukleinowego mRNA w grupie 1-2 (6-13 punktów TFG) oraz w grupie 3-4 (14-21 punktów TFG) wynosiły odpowiednio: 456,92±30,82 i 359,55±277,21. Zanotowano występowanie znamienych różnic w poziomie ekspresji badanego białka w analizowanych grupach ($p=0,04$).

Analiza ekspresji mRNA i białka dla CCR3 w zależności od cech kliniczno-morfologicznych

Statystyczna analiza wyników RT-PCR oraz oceny cech kliniczno-morfologicznych badanych raków krtani nie wykazała różnic w ekspresji mRNA dla CCR3 w izolowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej dla cechy pT w grupach pT1-2 vs. pT3-4 ($p=0,39$). Średnia wartość poziomu mRNA CCR3 dla badanych raków krtani wynosiła: 369,84±273,56 dla guzów pT2 oraz 301,07±270,4 dla guzów pT3-4. Analiza statystyczna nie potwierdziła także znamienych różnic w poziomie kwasów rybonukleinowych mRNA CCR3 w grupach guzów charakteryzujących się głęboką inwazją ściany narządu (naciekaniem chrząstki krtani i tkanki mięśniowej) a guzkowym naciekiem podśluzówkowym (grupa 1-2 vs grupa 3-4, $p=0,83$). Średnia wartość poziomu mRNA CCR3 dla badanych raków krtani wynosiła: 352,98±277,53 dla guzów grupy 1-2 oraz 301,07±270,4 dla guzów grupy 3-4. Podobne zależności dotyczyły nowotworów o różnym typie naciekania podścieliska tj. raków krtani z dobrze odgraniczonymi marginesami i naciekającymi litymi sznurami/wstęgami w porównaniu z guzami charakteryzującymi się naciekaniem małymi grupami komórek (<15 kom.) i pojedynczymi komórkami nowotworowymi (grupa 1-2 vs grupa 3-4, $p=0,96$). Średni poziom ekspresji mRNA CCR3 dla badanych raków krtani wynosił odpowiednio: 452,62±237,26 dla guzów grupy 1-2 oraz 428,0±281,86 dla guzów grupy 3-4. Analiza ekspresji mRNA dla CCR3 w odniesieniu do stopnia zaawansowania zmian nowotworowych wg klasyfikacji TFG nie wykazała

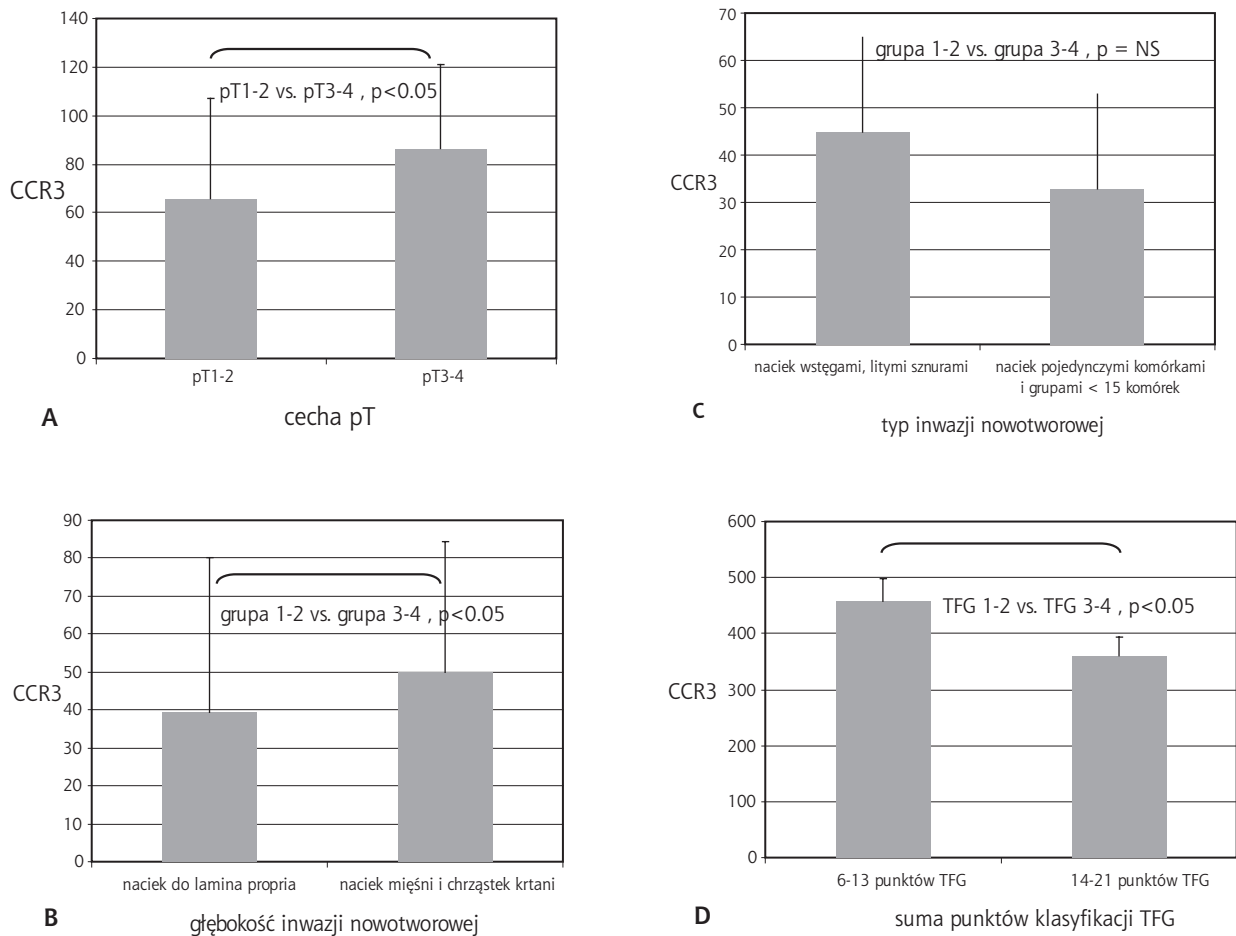
różnic w izolowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej w grupie raków 1-2 (6-13 punktów TFG) oraz w grupie 3-4 (14-21 punktów TFG) ($p=0,18$).

W statystycznej ocenie poziomu białka metodą Western blot CCR3 w badanym materiale potwierdzono występowanie znamienych różnic dla każdego z badanych parametrów kliniczno-morfologicznych. Raki krtani o wyższym stopniu zaawansowania zmian miejscowych wykazywały wyższą ekspresję białka CCR3 w izolowanych PBM-Cs (pT2 vs pT3-4; $p<0,05$). Średnia wartość poziomu białka CCR3 dla badanych raków krtani wynosiła: $65,93\pm 41,11$ dla guzów pT2 oraz $86,29\pm 34,47$ dla guzów pT3-4. Ocena ekspresji CCR3 w zależności od głębokości naciekania podścieliska guza, zgodnie z przyjętymi kryteriami klasyfikacji TFG, wykazała także znamienne zależności. Wyższa ekspresja białka CCR3 w izolowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej charakteryzowała nowotwory z wyższym stopniem inwazyjności ściany narządu (naciekanie chrząstki krtani i tkanki mięśniowej vs. guzkowy naciekanie podśluzówkowy, $p=0,02$). Średnie wartości poziomu białka CCR3 dla analizowanej cechy wynosiła: $29,22\pm 24,04$ dla grupy 1-2 oraz $50,06\pm 44,83$ dla guzów grupy 3-4. Przeprowadzona analiza badanych parametrów morfologiczno-molekularnych nie potwierdziła jednak znamienych statystycznie różnic w ekspresji CCR3 w izolowanych PBMCs między guzami charakteryzującymi się najmniejszym stopniem rozproszenia nacieku nowotworowego w podścielisku (naciekanie dobrze odgraniczonymi marginesami oraz litymi sznurami/wstęgami) w porównaniu z guzami charakteryzującymi się naciekaniami małymi grupami komórek (<15 kom.) i pojedynczymi komórkami nowotworowymi (grupa 1-2 vs grupa 3-4, $p=0,64$). Średnie wartości poziomu białka CCR3 dla badanej cechy wynosiła: $44,85\pm 72,87$ dla grupy 1-2 oraz $32,95\pm 62,0$ dla guzów grupy 3-4. Ocena wyników analizy Western blot w badanej grupie chorych z rakiem krtani wykazała znamienne statystycznie różnice ekspresji CCR3 w zależności od inwazyjności zmian nowotworowych ocenionych wg kryteriów skali TFG. Dla raków krtani charakteryzujących się wyższym stopniem agresywności guza (raki krtani z liczbą 6-13 punktów TFG) potwierdzono wyższą ekspresję białka CCR3 w izolowanych PBMCs w porównaniu z rakami o większej inwazyjności zmian (14-21 punktów TFG) (grupa 1-2 vs grupa 3-4, $p<0,05$). Średnia wartość poziomu CCR3 dla badanych raków krtani wynosiła: $61,65\pm 30,82$ dla guzów z liczbą 6-13 punktów oraz $84,91\pm 38,19$ dla guzów z sumą 14-21 punktów TFG. Średnie wartości ekspresji białka CCR3 w badanej grupie raków

krtani z uwzględnieniem badanych parametrów kliniczno-morfologicznych: stopnia miejscowego zaawansowania zmian pT, głębokości inwazji, typu inwazji oraz punktacji TFG przedstawiono na ryc. 1.

DYSKUSJA

Liczne badania z dziedziny biologii molekularnej i immunologii wskazują na rolę chemokin i receptorów dla chemokin w zjawisku kancerogenezy, proliferacji komórek nowotworowych i powstawaniu przerzutów do węzłów chłonnych w wielu nowotworach różnego pochodzenia [3-18]. Jednym z receptorów dla chemokin, który może mieć znaczenie w progresji procesu nowotworowego opisywanym w rakach regionu głowy i szyi [3,6,8], nerki [4], tarczycy [5] i chłoniakach [7] jest CCR3 (CD193), który jest C-C receptorem typu 3. Ligandami dla CCR3 są m.in. eotaksyny (CCL11), eotaksyny-2 (CCL24), eotaksyny-3 (CCL26), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), i RANTES (CCL5) [2,3]. Należy podkreślić, że ocena ekspresji cząsteczki CCR3 w kontekście znaczenia klinicznego oraz oceny morfologicznej zmian nowotworowych w raku krtani nie była dotychczas publikowana w dostępnym piśmiennictwie. Wyniki przedstawionych w pracy badań wskazują na znaczenie zwiększonej ekspresji CCR3 na jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej jako wskaźnika większego zaawansowania zmian nowotworowych ocenionych na podstawie parametrów klasyfikacji TFG oraz cechy pT i głębokości inwazji. Wyniki przedstawione w prezentowanej pracy pozostają zgodne z wynikami badań innych autorów a dotyczących nowotworów o innym umiejscowieniu w piśmiennictwie dotyczącym tematu [4-8]. Mechanizm działania i regulacja zjawiska proliferacji oraz progresji nowotworu, w tym powstawanie przerzutów węzłowych z udziałem receptora CCR3 nie jest jednak do końca poznany. Jöhrer i wsp [4] wskazują na rolę pobudzenia receptora CCR3 za pośrednictwem ligandu eotaksyny-1/CCL11 i promowanie progresji guza poprzez nasilenie mobilizacji komórek zapalnych w podścielisku nowotworu. Autorzy wykazali występowanie wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{++} , internalizację receptorów oraz nasiloną proliferację linii komórkowej w raku nerki po pobudzeniu receptora CCR3 w doświadczeniach in vitro. Również González i wsp. [5] wykazali pozytywną ekspresję białka CCR3 sięgającą 100% w utkaniu nowotworowym oraz 3,5-krotny wzrost dodatniego wybarwienia komórek guza w ocenie immunohistochemicznej CCR3 w raku brodawkowatym tarczycy w porównaniu z komórkami nie-



Ryc. 1. Wyniki statystycznej oceny różnic średnich wartości ekspresji białka CCR3 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej w zależności od stopnia miejscowego zawansowania zmian pT (A), głębokości inwazji (B), typu inwazji (C), punktacji TFG (D)

zmienionego nowotworowo gruczołu. Jung i wsp. [6] przedstawili koncepcję nasilonnej inwazyjności zmian nowotworowych w raku jamy ustnej i rolę w tym zjawisku cząsteczki CCL7, która za pośrednictwem aktywacji receptorów CCR1 i CCR3 promuje migrację komórek nowotworowych. Inny mechanizm przedstawili Kleinhaus i wsp. [7]. Badacze wskazali na kluczową rolę cząsteczki CCR3 oraz jej ligandu eotaksyny-1/CCL11 w nasileniu proliferacji i retencji komórek T CD30⁺ w chłoniakach skórnych z komórek T oraz korelację ekspresji receptora CCR3 z obecnością cytokin o profilu Th2 w nacieku zapalnym podścieliska guza. Inni autorzy potwierdzają również w swoich badaniach na znaczenie receptora CCR3 jako parametru wskazującego na skuteczność radioterapii. Wolff i wsp. [8] przedstawili dane dotyczące doświadczeń na liniach komórkowych raków regionu głowy i szyi. Badacze wykazali, że zmniejszona ekspresja mRNA CCR3 może być wskaźnikiem zmniejszenia agresywności zmian po zastosowanym leczeniu. W licznych doniesieniach dotyczących omawianych zagadnień podkreśla się znaczenie również innych chemokin i receptorów

dla chemokin w patogenezie i progresji zmian nowotworowych w guzach różnego pochodzenia, które pośredniczą lub stanowią jedno z ogniw szlaków pobudzenia CCR3 [10-18]. Almofti i wsp. [10] potwierdzili znamienne dodatnie korelacje między zwiększoną ekspresją CXCR4 a występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych oraz typem inwazji nowotworowej, częstością wznów miejscowych guza i gorszą prognozą w raku jamy ustnej. Ferreira i wsp. [11] także wykazali, że zwiększona ekspresja chemokiny CCL2 u pacjentów z rakiem jamy ustnej związana jest z większym indeksem proliferacyjnym utkania guza oraz zwiększonym występowaniem przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Badacze zanotowali, że wzrost odsetka pozytywnie wybarwionych w badaniu immunohistochemicznym komórek guza korelował z czasem przeżycia chorych. Kominsky i wsp. [12] w badaniach nad znaczeniem chemokin w powstawaniu przerzutów do kości w zaawansowanym raku nerki wykazali, że poziom ekspresji białka receptorowego MIP-1 delta, CCR1 oraz CCR3 wiąże się z nasiloną aktywnością komórek nowotworowych oraz zwiększoną induk-

cją osteolizy. Oliveira-Neto i wsp. [13] potwierdzili znaczenie ekspresji CXCL12/CXCR4 w tkance guza jako jednoznacznego wskaźnika węzłowego stopnia zaawansowania zmian i obecności przerzutów do węzłów chłonnych w raku jamy ustnej. Inny aspekt znaczenia ekspresji chemokin i receptorów dla chemokin w chorobie nowotworowej wykazali Owen i wsp. [14]. Badacze wskazali na możliwe zależności między stopniem ekspresji prozapalnych chemokin CCL2, CCL5 i CXCL2, jak też receptorów dla chemokin CCR1, CCR2, CCR3 i CXCR2 w komórkach TIL w badanej grupie raków piersi a odpowiedzią na chemioterapię w przeprowadzonych badaniach doświadczalnych. Silva i wsp. [15] także wykazali znamienne zależności między poziomem ekspresji mRNA dla CCL3/CCR1 w komórkach utkania nowotworowego a zdolnościami migracyjnymi komórek guza, nasileniem inwazyjności zmian nowotworowych oraz obecnością przerzutów do węzłów chłonnych w raku jamy ustnej. Autorzy wskazali na wyższą ekspresję mRNA badanych chemokin u chorych z dłuższym wskaźnikiem czasu przeżycia. W piśmiennictwie dotyczącym tematu wielu badaczy wskazuje na znaczenie chemokin m.in. antyangiogennej cząsteczki CXCR3 jako czynników istotnych w patogenezie raka nerki [15]. Suyama i wsp. [16] wykazali, że wydzielane chemokiny I-TAC i Mig przez komórki śródbłonna naczyń odżywiających masę guza mogą oddziaływać z białkiem CXCR3 wydzielanym przez guz i w ten sposób odgrywać istotną rolę w patogenezie procesu nowotworowego. Uchida i wsp. [17] wskazali na inny patomechanizm odgrywający istotną rolę w zjawisku przerzutowania komórek nowotworowych do węzłów chłonnych. Badacze podkreślili rolę aktywacji szlaku ERK1/2 i Akt/PKB za pośrednictwem pobudzenia cząsteczek SDF-1/CXCR4 w raku jamy ustnej. Wagner i wsp. [18] także potwierdzili występowanie związków

między ekspresją CXCR4 i CCR7 oraz ich ligandów (CXCL12 i CCL21) z rozległością węzłową zmian nowotworowych w raku brodawkowym tarczycy [18]. Badacze zanotowali że podwyższona ekspresja analizowanych chemokin charakteryzuje guzy o większym stopniu zaawansowania zmian nowotworowych oraz z potwierdzonymi przerzutami do węzłów chłonnych.

Obiecujące wyniki badań dotyczących oceny roli ekspresji receptorów dla cytokin jako wskaźników zaawansowania kliniczno-morfologicznego zmian nowotworowych oraz znaczenia prognostycznego badanych parametrów aktywności komórek biorących udział w procesach odpornościowych, uzasadnia konieczność kontynuacji badań dla uzyskania jednoznacznych wniosków dotyczących patomechanizmów progresji guza nowotworowego w raku krtani.

WNIOSKI

1. Zwiększona ekspresja receptora CCR3 na jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej u chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani była wskaźnikiem większego zaawansowania zmian nowotworowych ocenionych na podstawie cechy pT oraz głębokości inwazji.
2. Raki krtani charakteryzujące się zmianami nowotworowymi przekraczającymi granice narządu oraz naciekające chrząstki krtani cechowała wyższa ekspresja CCR3 oceniana na poziomie białka.
3. Guzy nowotworowe o największym zaawansowaniu zmian określonych według kryteriów klasyfikacji TFG (>14 punktów) charakteryzowały się największą ekspresją receptora CCR3 na limfocytach T w badanej grupie chorych.

Piśmiennictwo

1. Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce. Warszawa 2008. (<http://www.onkologia.org.pl/doc/biuletyn2006>).
2. Entrez Gene: CCR3 chemokine (C-C motif) receptor 3. (<http://www.pubmedhome/entrezgene>).
3. Beck LA, Tancowny B, Brummet ME, Asaki SY, Curry SL, Penno MB i wsp. Functional analysis of the chemokine receptor CCR3 on airway epithelial cells. *J Immunol* 2006; 177(5): 3344-54.
4. Jöhrer K, Zelle-Rieser C, Perathoner A, Moser P, Hager M, Ramoner R i wsp. Up-regulation of functional chemokine receptor CCR3 in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11(7): 2459-65.
5. González HE, Leiva A, Tobar H, Böhmwald K, Tapia G, Torres J i wsp. Altered chemokine receptor expression in papillary thyroid cancer. *Thyroid* 2009; 19(9): 957-65.
6. Jung DW, Che ZM, Kim J, Kim K, Kim KY, Williams D, Kim J. Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *Int J Cancer* 2010; 127(2): 332-44.
7. Kleinhans M, Tun-Kyi A, Gilliet M, Dummer R, Burg G, Nestle FO. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in CD30+ cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101(4): 1487-93.
8. Wolff HA, Rolke D, Rave-Fränk M, Schirmer M, Eicheler W, Doerfler A i wsp. Analysis of chemokine and chemokine receptor expression in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell lines. *Radiat Environ Biophys* 2011; 50(1): 145-54.
9. Starska K, Kulig A, Łukomski M. Tumor front grading in prediction of survival and lymph node metastases in patients with laryngeal carcinoma. *Adv Med Sci* 2006; 51: 200-204.

10. Almofti A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H, Sato M. The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2004; 25(1): 65-71.
11. Ferreira FO, Ribeiro FL, Batista AC, Leles CR, de Cássia Gonçalves Alencar R, Silva TA. Association of CCL2 with lymph node metastasis and macrophage infiltration in oral cavity and lip squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 2008; 29(2): 114-21.
12. Kominsky SL, Abdelmagid SM, Doucet M, Brady K, Weber KL. Macrophage inflammatory protein-1 delta: a novel osteoclast stimulating factor secreted by renal cell carcinoma bone metastasis. *Cancer Res* 2008; 68(5): 1261-6.
13. Oliveira-Neto HH, Silva ET, Leles CR, Mendonça EF, Alencar Rde C, Silva TA, Batista AC. Involvement of CXCL12 and CXCR4 in lymph node metastases and development of oral squamous cell carcinomas. *Tumour Biol* 2008; 29(4): 262-71.
14. Owen JL, Criscitiello MF, Libreros S, Garcia-Areas R, Guthrie K, Torroella-Kouri M, Iragavarapu-Charyulu V. Expression of the inflammatory chemokines CCL2, CCL5 and CXCL2 and the receptors CCR1-3 and CXCR2 in T lymphocytes from mammary tumor-bearing mice. *Cell Immunol* 2011; 270(2): 172-82.
15. Silva TA, Ribeiro FL, Oliveira-Neto HH, Watanabe S, Alencar Rde C, Fukada SY i wsp. Dual role of CCL3/CCR1 in oral squamous cell carcinoma: implications in tumor metastasis and local host defense. *Oncol Rep* 2007;18(5): 1107-13.
16. Suyama T, Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, Kimura S, Ichikawa T i wsp. Up-regulation of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokines IFN-inducible T-cell alpha chemoattractant and monokine induced by IFN-gamma and of their receptor CXC receptor 3 in human renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 103(2): 258-67.
17. Uchida D, Begum NM, Almofti A, Nakashiro K, Kawamata H, Tateishi Y i wsp. Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 2003; 290(2): 289-302.
18. Wagner PL, Moo TA, Arora N, Liu YF, Zarnegar R, Scognamiglio T, Fahey TJ 3rd. The chemokine receptors CXCR4 and CCR7 are associated with tumor size and pathologic indicators of tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(10): 2833-41.