

Interleukina-2 u chorych na raka krtani leczonych radioterapią

Interleukin-2 in laryngeal cancer patients treated by radiotherapy

GRZEGORZ NAMYSŁOWSKI, JAN PILCH, PIOTR URBANIEC, WOJCIECH ŚCIERSKI, IZABELA SOWIŃSKA-KRZYŻANOWSKA

Katedra i Oddział Kliniczny Laryngologii Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze

Wprowadzenie. Interleukiny zaliczamy do rodziny cytokin. Nazwa ta określa peptydy hormonopodobne, niskocząsteczkowe białka lub glikoproteiny o działaniu miejscowym i ogólnoustrojowym, wpływające na funkcje komórek i warunkujące wzajemne ich oddziaływanie.

Cel. Ocena zmian stężenia IL-2 w surowicy krwi chorych na raka krtani przed leczeniem i po radioterapii.

Materiał i metody. Badaniem objęto grupę 21 chorych mężczyzn z rakiem krtani zakwalifikowanych do radioterapii. U wszystkich chorych określono stężenie IL-2 w surowicy krwi przed leczeniem oraz 1 i 30 dni po radioterapii. Wyniki porównano z grupą 20 zdrowych ochotników.

Wyniki. Stężenie IL-2 było istotnie niższe u chorych z rakiem w porównaniu z grupą kontrolną. Średnie stężenie IL-2 u chorych na raka krtani przed leczeniem wynosiło 26,5 pg/ml, 1 dzień po radioterapii spadło do 23,5 pg/ml i wzrosło do 29,3 pg/ml 30 dni po zakończeniu leczenia. Zmiany te nie były istotne statystycznie. Badanie wykonane u chorych na raka 30 dni po leczeniu wykazało niższe stężenie. IL-2 u chorych wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby ($p < 0,05$).

Wnioski. U chorych z rakiem krtani występują istotnie niższe wartości stężeń IL-2 w porównaniu z grupą zdrowych ochotników. Zmiany stężenia IL-2 związane z radioterapią nie są charakterystyczne ani znaczące.

Słowa kluczowe: interleukina-2, rak krtani, radioterapia

Introduction. Interleukins belong to the family of cytokines. Cytokines are low-molecular proteins or glycoproteins characterised by local and systemic activity influencing cell functions and interactions.

Aim. Evaluate variations in serum level of IL-2 in the laryngeal cancer patients before treatment and after radiotherapy.

Material and methods. A group of 21 male patients with laryngeal cancer was considered for the purpose of this study. All of them were treated by radiotherapy. In all cases, serum concentration of IL-2 was evaluated before the treatment, on the first and 30th day after the therapy. The results were compared with the group of 20 healthy volunteers.

Results. IL-2 concentration was significantly lower in cancer patients than in the controls. The mean value of IL-2 concentration in laryngeal cancer patients treated by radiotherapy was 26.5 pg/ml before treatment, 23.5 pg/ml in the 1 day and 29.3 pg/ml 30 days after the therapy. The differences were not statistically significant. Determinations made in the laryngeal cancer patients 30 days after the radiotherapy showed that IL-2 decreased with the progress of the disease ($p < 0.05$).

Conclusions. Serum concentration of IL-2 in the laryngeal cancer patients is significantly lower than in the healthy control group. The changes of IL-2 serum concentration in the course of radiotherapy are not significant or characteristic.

Key words: Interleukin-2, laryngeal cancer, radiotherapy

Nadesłano: 23.06.2005

Oddano do druku: 01.06.2006

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Wojciech Ścierański

Katedra i Oddział Kliniczny Laryngologii Śląskiej Akademii Medycznej

w Zabrze, ul. Skłodowskiej-Curie 10, 41-800 Zabrze

tel/fax: (32) 271 74 20, wojscier@mp.pl

Wstęp

Komórki nowotworowe mogą wytwarzać i wydzielac do krwiobiegu substancje określane jako znaczniki nowotworowe lub markery. Znacznik nowotworowy jest definiowany jako biochemiczny wskaźnik obecności nowotworu i może być wykryty w surowicy krwi lub w innych płynach i tkankach ustrojowych dzięki zastosowaniu metod o dużej czułości (w tym przeciwciał monoklonalnych) [1, 2]. Marker może być również syntetyzowany przez komórki prawidłowe w odpowiedzi na inwazję komórek nowotworowych. Dynamiczny rozwój immunologii, opracowanie techniki otrzymywania przeciwciał monoklonalnych oraz czułych testów immunoenzymatycznych i radioimmunologicznych, umożliwiły wykrywanie markerów nowotworowych w płynach

biologicznych [3, 4]. Dzięki określaniu stężenia markerów stało się możliwe rozpoznawanie i monitorowanie procesu leczenia wielu nowotworów.

W odniesieniu do różnych nowotworów, w tym raka krtani, ustalono wiele czynników prognostycznych. Dostarczyły one ważnych informacji o biologii i przebiegu raka krtani. Należą do nich: stopień proliferacji i zawartość DNA w komórkach raka, ekspresja genów regulujących cykl komórkowy, angiogeneza i apoptoza komórki [5-7]. Wzrost nowotworu jest wypadkową wielu czynników takich jak: wzrost populacji komórek guza, długość cyklu komórkowego, unaczynienie guza – angiogenezy oraz obumierania komórek nowotworu na drodze apoptozy [8]. Od wielu lat przedmiotem badań jest ocena aktywności proliferacyjnej komórek raka, ze względu na jej związek z tempem wzrostu guza, a określenie wielkości frakcji wzrostowej guza jest obecnie uznawanym wskaźnikiem w prognozowaniu czasu przeżycia w wielu nowotworach (chłoniaki, rak sutka, czerniak) [9, 10]. W przebiegu wielu procesów nowotworowych często dochodzi do niezależnej od fizjologicznych mechanizmów regulacyjnych ekspresji genów, których produkty w komórkach normalnych pojawiają się przejściowo w okresie ich proliferacji i różnicowania. Jeżeli produkty takich genów pochodzące z komórek nowotworowych są uwalniane do płynów ustrojowych, to mogą być markerami użytecznymi w rozpoznawaniu, prognozowaniu i leczeniu chorób nowotworowych [11]. W ciągu ostatnich kilkunastu lat poznano produkty wielu genów, które są w warunkach fizjologicznych czynnikami wzrostu, regulacji działania i/lub różnicowania się komórek. Do takich czynników należą cytokiny, które są rozpuszczalnymi mediatorami w układzie odpornościowym. Większość cytokin, wykryto podczas badań nad mechanizmami odpowiedzi komórek układu odpornościowego na antygeny. W kolejnych badaniach wykazano, że w przebiegu wielu nowotworów dochodzi do zmiany ekspresji genów kontrolujących zarówno syntezę cytokin jak i ich receptorów występujących na powierzchni komórek [4, 12]. Wykazano, że niektóre cytokiny mogą stymulować lub hamować wzrost nowotworów. Uwalnianie cytokin, a także ich rozpuszczalnych receptorów przez rosnące nowotwory złośliwe do krwi i płynów ustrojowych stworzyło interesujące perspektywy wykorzystania ich jako markerów procesu neoplazmatycznego [11, 13]. W dostępnej literaturze istnieją doniesienia na temat wartości prognostycznych wybranych interleukin w surowicy krwi w niektórych nowotworach regionu głowy i szyi [14-16].

Interleukiny zaliczamy do rodziny cytokin. Nazwa ta określa peptydy hormonopodobne, niskocząsteczkowe białka lub glikoproteiny o działaniu miejscowym i ogólnoustrojowym, wpływające na funkcje komórek i warunkujące wzajemne ich oddziaływanie. Zidentyfikowano ponad sto kilkadziesiąt cytokin, a liczba ich stale powiększa się [15, 17, 18]. Dzielą się one na kilka

grup. Są wśród nich: interleukiny (IL), interferony (IFN), czynniki stymulujące kolonie (CSF), czynniki wzrostowe i chemokiny (cytokiny o działaniu chemotaktycznym) [17]. Cytokiny wytwarzane są przez limfocyty T i B, monocyty, makrofagi, fibroblasty, komórki śródbłonna, mastocyty i płytki krwi w odpowiedzi na stymulację przez specyficzne lub niespecyficzne czynniki aktywujące. Odgrywają one znaczącą rolę w modulowaniu procesów odporności komórkowej i humoralnej. Szczegółnie miejsce w produkcji cytokin zajmują limfocyty T o funkcji pomocniczej, które stanowią 60% całej populacji limfocytów. Istnieją dwie różniące się pod względem czynnościowym subpopulacje: limfocyty Th1 i limfocyty Th2. Obie te populacje komórek mają zdolność wytwarzania różnych cytokin. Limfocyty Th1 syntetyzują i wydzielają IL-2 oraz IFN- γ , i w ten sposób wspomagają odpowiedź typu komórkowego. Natomiast limfocyty Th2 wytwarzają interleukiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i regulują głównie odpowiedź typu humoralnego, wpływając na wzrost i różnicowanie limfocytów B [11].

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie parametrami, które uzupełniając obecnie stosowane kryteria kliniczne i histopatologiczne, pozwalają, na dokładniejszą ocenę biologii guza, umożliwiając jednoczesne podjęcie optymalnego leczenia, z równoczesnym szczegółowym monitorowaniem przebiegu choroby na poziomie komórkowym [19].

Poszukując markerów u chorych na raka krtani leczonych różnymi metodami zaprogramowano cykl badań mających na celu seryjne oznaczanie stężenia interleukiny-2 w surowicy krwi u chorych poddanych radioterapii. W dostępnej literaturze brak jest jednoznacznych i wyczerpujących danych na temat zachowania się stężenia tej cytokiny w surowicy krwi u chorych na raka krtani w różnych fazach choroby i przy zastosowaniu różnych metod leczenia.

Celem pracy było zbadanie stężenia IL-2 w surowicy krwi chorych na raka krtani i jego zmiany w przebiegu leczenia napromienianiem. Oceniono również związek IL-2 ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej krtani.

MATERIAŁ I METODY

Badani

Badaną grupę stanowiło 21 mężczyzn w wieku od 42 do 73 lat (średnia 54,0 lat, SD=5,6) leczonych napromienianiem w Instytucie Onkologii w Gliwicach w latach 2001–2002. Wszyscy chorzy byli palaczami tytoniu (średnio 20 papierosów dziennie) przez około 20 lat i pili wysokoprocentowy alkohol. Stopień zaawansowania klinicznego chorych według klasyfikacji TNM

był następujący: stopień II – 8 chorych (38,1%), III – 5 chorych (23,8%) i stopień IV – 8 chorych (38,1%).

Wszyscy chorzy w tej grupie byli napromieniani według ustalonych schematów i dawek, które zależne były od stopnia zaawansowania klinicznego choroby. Dziewięciu chorych napromieniano w schemacie CAIR (7 dni w tygodniu 1,8Gy/fx) w dawce całkowitej do 72 Gy na guz w ciągu 40 dni. Stopień zaawansowania klinicznego w tej grupie był następujący: II – 5 chorych (55,6%), III – 2 chorych (22,2%) i IV 2 chorych (22,2%). Siedmiu chorych napromieniano w schemacie konwencjonalnym (5 dni w tygodniu 1,8 Gy/fx) w dawce całkowitej do 70 Gy na guz w ciągu 49 dni. Zaawansowanie kliniczne w tej grupie przedstawiało się następująco: stopień II – 2 chorych (28,6%), III – 1 chory (14,3%) i IV – 4 chorych (57,1%). Pięciu chorych napromieniano w schemacie *Concomitant boost* (5 dni w tygodniu 1,8 Gy/fx, przez 2 dni podając 2 frakcje dzienne) w dawce całkowitej do 72 Gy na guz w ciągu 40 dni. Chorzy w tej grupie byli w następujących stadiach zaawansowania: stopień II – 1 chory (20%), stopień III – 2 chorych (40%) i IV – 2 chorych (40%).

Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych mężczyzn (ochotników) w przedziale wiekowym od 41 do 60 lat (średnia 51,2 lat, SD=4,5), którzy zgłosili się do badania profilaktycznego w Przychodni Akademickiej w Gliwicach.

Metody

Do badania pobierano 3-krotnie krew pełną w ilości 5 ml z żyły łokciowej. Po odwirowaniu (szybkość 1000xg przez 15 minut) uzyskano około 3 ml surowicy, którą rozdzielano po 1,5 ml do probówek Eppendorfa i zamrażano w temperaturze minus 70°C do czasu wykonania badań. Pierwszy raz krew pobierano przed rozpoczęciem planowanego leczenia, drugi bezpośrednio po zakończeniu napromieniania, a trzeci raz w 30 dniu po radioterapii.

Stężenie IL-2 oznaczano w surowicy badanych osób metodą immunoenzymatyczną ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) za pomocą testu IL-2 ELISA firmy Bender MedSystems Diagnostics GmbH, Austria, Wiedeń. Test przeprowadzano zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Badanie wykonano w dwóch powtórzeniach na polistyrenowej płytce z 96 zbiorniczkami. Wszystkie zbiorniczki płytki były opłaszczane mysimi monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkiej IL-2. Właściwe badanie zostało poprzedzone wykonaniem krzywej wzorcowej. Do jej wykonania wykorzystano IL-2 Standard oraz Sample Diluent. Krzywa obejmowała zakres stężeń od 0 do 200 pg/ml. Przed rozpoczęciem badania odczynnik i surowice ludzkie doprowadzano do temperatury pokojowej.

WYNIKI

W tabeli I i II przedstawiono wyniki średnich stężeń IL-2 w grupie badanej i kontrolnej przed leczeniem (pomiar 1), bezpośrednio po leczeniu (pomiar 2) i w 30 dni po radioterapii (pomiar 3).

Tabela I. Stężenie IL-2 w grupie badanej (N) i kontrolnej (K) przed leczeniem (pomiar 1)

Grupa	N	Średnia	-95% CI	+95% CI	Min	Max	SD	p
K	20	38,605	37,183	40,027	30,8	44,3	3,039	<0,001
N	21	26,562	23,887	29,237	16,2	36,6	5,877	

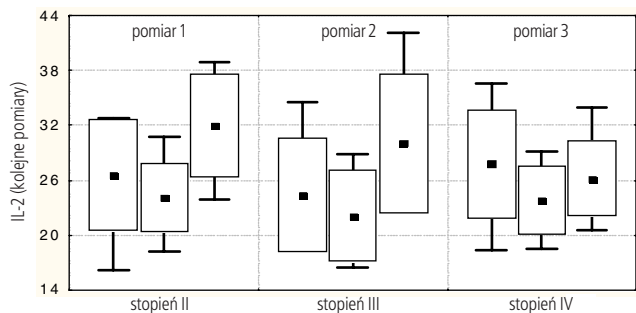
Tabela II. Stężenie IL-2 w grupie badanej (N₁) bezpośrednio po leczeniu (pomiar 2) oraz w 30 dni po zakończeniu radioterapii (N₃₀) – pomiar 3

Grupa	N	Średnia	-95% CI	+95% CI	Min	Max	SD	p
N ₁	21	23,510	21,737	25,282	16,4	30,8	3,893	0,117
N ₃₀	21	29,324	26,637	32,010	20,5	42,1	5,902	

W badanej grupie chorych leczonych napromienianiem stężenie IL-2 przed leczeniem było znacznie niższe niż w grupie kontrolnej ($p < 0,000001$). Średnie stężenie IL-2 w grupie kontrolnej wynosiło 38,6 pg/ml a w grupie badanej 26,56 pg/ml. W grupie chorych napromienianych stężenie IL-2 bezpośrednio po leczeniu obniżyło się nieznacznie statystycznie ($p = 0,054$) w porównaniu z poziomem stężenia przed leczeniem i jego średnia wartość wynosiła 23,5 pg/ml. Trzydzieści dni po leczeniu stężenie IL-2 w surowicy chorych poddanych radioterapii nieznacznie wzrosło w porównaniu z wartościami przed leczeniem ($p = 0,117$) do wartości 29,32 pg/ml.

W grupie chorych napromienianych zauważono różne zachowanie się stężenia IL-2. Bezpośrednio po leczeniu u 52,3% chorych wystąpił początkowo spadek, następnie znaczący wzrost stężenia badanej cytokiny. U 23% chorych wzrost, następnie spadek wartości, u 9,5% postępujący wzrost, natomiast u 19% chorych spadek, następnie nieznaczny wzrost stężenia IL-2, której wartość pozostała mniejsza w porównaniu z okresem przed leczeniem.

W grupie chorych napromienianych stężenia IL-2 przed leczeniem i bezpośrednio po jego zakończeniu nie różniły się znacznie statystycznie w odniesieniu do poszczególnych stopni zaawansowania klinicznego. 30 dni po zakończeniu radioterapii stwierdzono niższe stężenie IL-2 wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby ($p < 0,05$) (ryc. 1).



Ryc. 1. Stężenie IL-2 w poszczególnych etapach leczenia u chorych napromieniowanych w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego choroby

DYSKUSJA

Pomimo znaczących sukcesów w diagnostyce i terapii nowotworów głowy i szyi skuteczność wykrywania i leczenia raka krtani jest wciąż niezadowalająca i nadal stanowi istotny problem we współczesnej onkologii laryngologicznej. Od wielu lat prowadzone są prace badawcze w nowotworach głowy i szyi próbujące wyjaśnić udział IL-2 w etiopatogenezie i leczeniu tych nowotworów.

Tisch i wsp. [20] badali wpływ miejscowego napromieniania (średnio 60 Gy) na układ odpornościowy chorych leczonych z powodu raka jamy ustnej, gardła i krtani. Oceniali oni stan układu odpornościowego przed, bezpośrednio po zakończeniu terapii oraz w okresie 4 do 6 tygodni po leczeniu. Liczba limfocytów T (szczególnie T CD4+ i T CD8+) oraz stężenie IL-2 wraz z jej rozpuszczalnym receptorem w surowicy krwi znacząco obniżyły po leczeniu napromienianiem.

Wustrow i wsp. [21] oceniali stężenia IL-2 uwalnianej przez limfocyty u chorych z nowotworami części ustnej gardła, krtani i obecnością przerzutów do węzłów chłonnych oraz porównywali uzyskane wyniki ze stężeniem IL-2 w surowicy zdrowych osób. Wykazano, że u chorych z rakiem części ustnej gardła oraz przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych występowały znacznie niższe stężenia IL-2 w porównaniu z grupą kontrolną. W grupie chorych z rakiem krtani autorzy stwierdzili jedynie niewielkie obniżenie stężenia badanej cytokiny w porównaniu do grupy kontrolnej.

Gonzalez i wsp. [22] u chorych na raka krtani oceniali ilość obwodowych limfocytów T w surowicy krwi oraz syntezę IL-2. Praca miała na celu określenie korelacji między stopniem zaawansowania klinicznego choroby a liczbą limfocytów T oraz uwalnianej przez nie IL-2. Liczba limfocytów T była niska i podobna do liczby w grupie kontrolnej, a stężenie IL-2 nie wykazywało zmian w porównaniu z grupą kontrolną.

Heimdal i wsp. [23] w grupie 81 chorych na raka płaskonabłonkowego głowy i szyi oceniali reaktywność limfocytów T oraz stężenie IL-2 w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego choroby, oddzielnie dla cechy T guza i cechy węzłowej N. Stwierdzili, że im wyższy stopień zaawansowania klinicznego choroby, tym niższe było stężenie IL-2 oraz mniejsza proliferacja limfocytów T. Stężenie badanej cytokiny i limfocytów korelowało z cechą T i N guza.

Wanebo i wsp. [24] stwierdzili spadek ekspresji receptora IL-2 na limfocytach oraz upośledzenie aktywności komórek NK w wysoko zaawansowanych nowotworach głowy i szyi. Li i wsp. [25] obserwowali spadek stężenia IL-2 w nowotworach głowy i szyi i znamieny jej wzrost po zastosowaniu terapii genowej.

Obserwacje własne wykazały istotnie niższe stężenie IL-2 przed leczeniem w grupie chorych napromieniowanych w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobne wyniki uzyskał Lai i wsp. [26]. Wustrow i wsp. [21] również zaobserwował niskie stężenie IL-2 u chorych na raka krtani. Było ono jednak wyższe niż w grupie chorych na nowotwory jamy ustnej i gardła. Natomiast Huang i wsp. [14] oraz Reichert i wsp. [16] odnotowali wysokie stężenie IL-2 w surowicy krwi przed leczeniem. Reichert uważa, że wzrost stężenia IL-2 jest wynikiem uwalniania jej przez same komórki nowotworowe, a występowanie wysokiego stężenia szczególnie w trakcie podziałów komórek raka może być markerem wzrostu nowotworów głowy i szyi. Obserwacje Huanga [14] dowodzą, że wzrost stężenia IL-2 jest spowodowany odpowiedzią układu odpornościowego na obecność antygenów nowotworowych w surowicy krwi.

Bezpośrednio po przeprowadzonej radioterapii u naszych chorych wystąpił wyraźny spadek stężenia IL-2 w 15 przypadkach (71,5%) natomiast u 6 (28,5%) stwierdzono nieznaczny wzrost w porównaniu z wartościami otrzymanymi przed leczeniem. W materiale własnym stwierdzono, że u chorych napromieniowanych nastąpił wzrost stężenia IL-2 w 30 dni po zakończeniu leczenia. U 3 chorych (14%) przewyższył stężenie IL-2 w porównaniu z grupą zdrowych ochotników.

W badaniach własnych analizowano jak kształtuje się stężenie IL-2 w surowicy chorych z II, III, oraz IV stopniem zaawansowania klinicznego choroby. Niezależnie od stopnia zaawansowania choroby stężenie badanej cytokiny u wszystkich chorych było niższe w porównaniu z grupą kontrolną. W grupie chorych napromieniowanych stężenia IL-2 przed leczeniem i bezpośrednio po jego zakończeniu nie różniły się statystycznie w odniesieniu do poszczególnych stopni zaawansowania klinicznego. 30 dni po zakończeniu radioterapii stwierdzono obniżanie stężeń wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby ($p < 0,05$) (ryc. 1).

WNIOSKI

1. U chorych z rakiem krtani stwierdzono istotnie niższe wartości stężeń IL-2 w porównaniu z grupą zdrowych ochotników.
2. Zmiany stężenia IL-2 spowodowane radioterapią nie są charakterystyczne i znaczące.

Piśmiennictwo

1. Hsu TC, Johnston DA, Cherry LM. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans. Possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int J Cancer* 1989; 43(20): 403-408.
2. Ligęziński A, Jurkiewicz D. Postępy w rozpoznawaniu i leczeniu chorób górnych dróg oddechowych o podłożu immunologicznym. Wydawnictwo medyczne Urban & Partner Wrocław 1989.
3. Adamiak G, Ligęziński A, Jurkiewicz D i wsp. Ocena surowiczych stężeń antygenu żołądkowo-jelitowego oraz immunoglobulin G, A, M u chorych z nowotworami złośliwymi głowy. *Otolaryngol Pol* 1998; 6: 655-660.
4. Kulpa J. Krążące markery nowotworowe w diagnostyce chorób nowotworowych. *Terapia* 1996; 7: 17-20.
5. Gryczyński M, Pietruszewska W. Angiogeneza jako nowy czynnik rokowniczy u chorych na raka krtani. *Otolaryngol Pol* 2002; 1(1): 13-20.
6. Pabiszczak M, Banaszewski J, Szmeja Z i wsp. Porównanie zachowania się poziomu adduktów kancerogen: DNA w rakach jamy ustnej, gardła i krtani. *Otolaryngol Pol* 2001; 5: 551-554.
7. Szala S, Radzikowski C. Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. *Nowotwory* 1997; 47: 1-19.
8. Bocca E, Calearo C, De Vincentis I. Occult metastases in cancer of the larynx and their relationship to clinical and histological aspects of the primary tumor. *Laryngoscope* 1984; 94(8): 1086-1090.
9. Gryczyński M, Kobos J, Murlewska A i wsp. Przeżywalność chorych na raka krtani a wybrane czynniki rokownicze. *Otolaryngol Pol* 2003; 3: 329-340.
10. Kram A, Kabacińska A, Domagała W. Proliferacyjny antygen jądrowy (PCNA) w rakach płaskonabłonkowych części głośniowej krtani. *Otolaryngol Pol* 1994; Supl 16.
11. Steffen J. Interleukiny i ich receptory w nowotworach u ludzi: synteza, uwalnianie, występowanie w surowicy krwi. *Diagn Lab* 1994; 30: 221-240.
12. Limon J, Siedlecki JA. Choroby nowotworowe. (w) Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. Bala J (red.). Springer PWN, Warszawa 1998.
13. Żeromski J, Szczypiński J, Szmeja Z i wsp. Badania immunomorfologiczne w raku krtani. *Otolaryngol Pol* 1983; 5-6: 495-497.
14. Huang AT, Mold NG, Fischer SR. A prospective study of squamous head and neck carcinoma. Immunologic aberrations in patients who develop recurrent disease. *Cancer* 1987; 59: 1721-1726.
15. Jakóbiński M. Immunologia, PWN, Warszawa 2000.
16. Reichert TE, Watkins S, Stanson J. Endogenous IL-2 in cancer cells: a marker of cellular proliferation. *J Histochem & Cytochem* 1998; 46: 603-611.
17. Callard R, George AJ, Stark J. Cytokines, chaos, and Complexity. *Immunity* 1989; 11(5): 507-513.
18. Niesiołędzka-Krężel J, Paluszewska M. Pegylowane interferony. *Współcz Onkolog* 2001; 5: 148-151.
19. Klatka J. Ocena wartości prognostycznej antygenów P53, BCL-2 i Syndekanu-1 w raku krtani oraz ich przydatności w charakterystyce odpowiedzi pierwotnych hodowli komórkowych raka krtani na Cis-platynę. *Otolaryngol Pol* 2003; 5: 765-768.
20. Tisch M, Heimlich F, Daniel V i wsp. Cellular immune defect caused by postsurgical radiation therapy in patients with head and neck cancer. *Otolaryng. Head Neck Surg* 1998; 119: 412-417.
21. Wustrow TP, Kabelitz D. Interleukin-2 release from lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989; 98(3): 179-184.
22. Gonzalez F, Vargas J, Banacloche J i wsp. Functional and phenotypic analysis of T-lymphocytes in laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* 1994; 114: 663-668.
23. Heimdal J, Aarstad H, Klemetsen B i wsp. Disease stage related in vitro responsiveness of peripheral T-lymphocytes in patients with head and neck carcinoma. *Acta Otolaryngology* 1998; 118(6): 887-891.
24. Wanebo H, Blackinton D, Weigel T. Augmentation of the lymphokine-activated killer cell response in head and neck cancer patients by combination interleukin-2 and interferon-alfa. *Am J Surg* 1991; 162: 384-387.
25. Li D, Zeiders J, Liu S i wsp. Combination nonviral cytokine gene therapy for head and neck cancer. *Laryngoscope* 2001; 111: 815-820.
26. Lai JP, Tao ZD, Xiao JY i wsp. Microinvasive Nd: YAG laser therapy of early glottic carcinoma and its effect on soluble interleukin-2 receptor, interleukin-2, and natural killer cells. *Laryngoscope* 2001; 111: 1585-1688.