

Analiza stężenia IL-8 i IFN- γ oraz korelacja z ekspresją receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR u chorych z rakiem krtani

Analysis of IL-8 and IFN- γ concentration and the correlation with the expression of epidermal growth factor receptor in patients with cancer of the larynx

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

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

^{2/} Katedra Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

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

^{4/} Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

Wprowadzenie. Jednym z wiodących zagadnień w immunologii onkologicznej jest ocena wzajemnego wpływu komórek odpornościowych i nowotworowych.

Cel pracy. Ocena funkcji autologicznych komórek krwi obwodowej oraz znalezienie związków z cechami kliniczno-morfologicznymi guza (cechą pT, pN, G) i poziomem immunoekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) u pacjentów z rakiem krtani.

Materiał i metody. Analizą objęto grupę 55 chorych ze zweryfikowanym rakiem płaskonabłonkowym krtani. Stężenia IL-8 i IFN- γ we krwi pełnej chorych oceniano w dwóch punktach czasowych (21h i 72h) metodą immunoenzymatyczną ELISA. Ekspresję odczynów błonowych i cytoplazmatycznych dla EGFR z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych oceniono metodą immunohistochemiczną.

Wyniki. W rakach płaskonabłonkowych krtani, charakteryzujących się najmniejszą rozległością miejscową procesu nowotworowego pT2 obserwowano znamienne największe wydzielanie IFN- γ . Nasilenie ekspresji odczynu błonowego EGFR było dodatnio liniowo skorelowane ze stopniem rozległości miejscowej pT guza. W badanej grupie chorych z rakiem krtani nie stwierdzono znamienych zależności między pN i G a profilem badanych cytokin oraz ekspresją EGFR.

Wnioski. Badania wykazały możliwość praktycznego wykorzystania oznaczania profilu cytokin oraz immunoekspresji EGFR jako istotnych metod dla określenia zaawansowania zmian klinicznych i morfologicznych, a tym samym wyboru właściwego modelu leczenia.

Słowa kluczowe: rak krtani, IL-8, IFN- γ , receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu EGFR

Introduction. Evaluation of the mutual influence of immune processes cells and cancer cells is one of the major issues in cancer immunology.

Aim. To evaluate autologous peripheral blood cell function and to find a relationship with clinical and morphological features (pT, pN, G) of the tumor and with the level of epidermal growth factor receptor (EGFR) immunoexpression in patients with larynx carcinoma.

Material and methods. We analyzed a group of 55 patients with confirmed squamous cell carcinoma of the larynx. Concentrations of IL-8 and IFN- γ in whole blood of patients were assessed at two time points (21h and 72h) by ELISA. Expression of membrane and cytoplasmic reactions for EGFR using monoclonal antibodies were evaluated by immunohistochemistry.

Results. Significantly highest secretion of IFN- γ was recorded in squamous cell carcinoma of the larynx characterized by the smallest extent of local pT2 tumor process. Severity of the reaction membrane EGFR expression was positively linearly correlated with the extent of local tumor pT. In the group studied there was no significant relationship between pN and G, and the cytokine profile or expression of EGFR.

Conclusions. The study showed the possibility of practical use of cytokine expression profile and EGFR expression as the important methods in determining the stage of clinical and morphological changes and, therefore, the selection of the optimal model of treatment.

Key words: laryngeal carcinoma, IL-8, IFN- γ , epidermal growth factor receptor

WSTĘP

Na świecie, rak krtani zajmuje drugie miejsce wśród nowotworów regionu głowy i szyi (*head and neck squamous cell carcinoma* – HNSCC) oraz jedenaste miejsce wśród najczęstszych raków występujących u mężczyzn [1]. Częstość występowania raka krtani w Europie Środkowej jest największa na świecie a Polska od ponad 20 lat, obok Francji, Hiszpanii i Włoch, należy do krajów wysokiego ryzyka raka krtani [2-4].

Wybór najbardziej optymalnego modelu leczenia chorych z HNSCC jest w dużej mierze związany ze znajomością parametrów pozwalających na ocenę stopnia inwazyjności guza nowotworowego. Wskazanie tych wykładników może mieć również znaczenie rokownicze i wpływać na wydłużenie czasu przeżycia pacjentów, poprzez zastosowanie odpowiedniego postępowania uzupełniającego i wyznaczenie właściwego zakresu kontrolnych badań pooperacyjnych, prowadzonych pod kątem wykrycia wczesnej wznowy procesu nowotworowego. W światowym piśmiennictwie liczni badacze wskazują na znaczącą rolę badań nad zaburzeniami układu odpornościowego dla poszukiwania związków z cechami kliniczno-morfologicznymi w przebiegu choroby nowotworowej [5-12]. Rola komórek układu odpornościowego w przebiegu choroby nowotworowej, w tym w nowotworach regionu głowy i szyi, nie jest do końca wyjaśniona. Mimo braku bezpośrednich dowodów na to, iż komórki nadzoru immunologicznego chronią przed rozwojem i progresją nowotworu, pośrednie obserwacje kliniczne oraz badania doświadczalne wskazują na ich aktywność w odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym różnego pochodzenia. Niewiele wiadomo na temat patomechanizmów i wzajemnych interakcji między komórkami nowotworowymi i autologicznymi komórkami układu odpornościowego, oddziałujących za pośrednictwem wydzielanych cytokin prozapalnych, regulatorowych, immunosupresyjnych i angiogennych. Ocena wzajemnego wpływu komórek biorących udział w procesach odpornościowych, w tym aktywności limfocytów T CD4+ i CD8+ oraz komórek nowotworowych, związek z cechami guza oraz determinację ekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) w utkaniu nowotworowym u chorych z nowotworami regionu głowy i szyi, a w szczególności z rakiem płaskonabłonkowym krtani staje się obecnie wiodącym zagadnieniem w immunologii onkologicznej.

Celem pracy była ocena funkcji autologicznych komórek krwi obwodowej, współuczestniczących

w procesach odpornościowych na podstawie analizy wydzielania cytokin (IL-8, IFN- γ) oraz znalezienie związków z cechami kliniczno-morfologicznymi (cechą pT, pN, G) i poziomem immunoekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) a u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani.

MATERIAŁ I METODY

Grupa badana

Analizą objęto grupę 55 chorych leczonych chirurgicznie z powodu raka płaskonabłonkowego krtani. Grupę badaną stanowiło 53 (96,4%) mężczyzn i 2 (3,6%) kobiety, w wieku 47–83 lat (śr. wieku 58,3 lat). W badanej grupie chorych 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. 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. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki UM w Łodzi (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). Charakterystykę kliniczno-morfologiczną grupy badanej przedstawiono w tabeli I.

Ocena wydzielania IL-8 i IFN- γ

Krew żylną pobierano do próbówki zawierającej heparynę litową (stężenie końcowe 10U/mL), rozcieńczano w płynie hodowlanym RPMI-1640 (Biomed, Lublin, Poland), zawierającym 10% v/v zinaktywowanej płodowej surowicy cielęcej FCS (Biochrom AG Seromed, Berlin, Germany), 100 U/mL penicyliny i 100 μ g/mL streptomycyny (Sigma, USA), tak by uzyskać gęstość 1×10^6 komórek/mL. W celu oceny generacji cytokin IL-8 i IFN- γ próbówki wirowano (2000 obrotów/min, 10 minut) i zbierano nasącz w 21h i 72h hodowli komórkowej. Stężenia cytokin oceniano metodą immunoenzymatyczną ELISA, przy użyciu zestawów dla oceny

Tabela I. Kliniczno-morfologiczna charakterystyka badanej grupy chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani

Cecha	Liczebność grupy N (%)
Płeć	
Mężczyźni	53 (96,4)
Kobiety	2 (3,6)
Leczenie chirurgiczne	
Częściowe usunięcie krtani	22 (40,0)
Całkowite usunięcie krtani	33 (60,0)
Operacja usunięcia węzłów chłonnych	22 (40,0)
Selektywna operacja węzłowa (SND)	20 (36,4)
Radykalna operacja węzłowa (RND)	2 (3,6)
pT	
pT2	14 (25,4)
pT3	21 (38,2)
pT4	20 (36,4)
pN	
pN0	39 (70,9)
pN1-3	16 (29,1)
pN1	7 (12,7)
pN2	4 (7,3)
pN3	5 (9,1)
Zróżnicowanie histopatologiczne G	
G1	4 (7,3)
G2	44 (80,0)
G3	7 (12,7)

ludzkiej IL-8 (czułość 2 pg/mL) i IFN- γ (czułość 1 pg/mL), ELISA SET BD Opt EIA (San Diego, USA). Absorbancję badanych próbek odczytywano przy fali długości 450 nm (czytnik ELx808) (Bio-Tek Instruments, USA).

Ocena odczynów immunohistochemicznych

Stopień nasilenia odczynów immunohistochemicznych (IHC), z wykorzystaniem pierwotnego monoklonalnego mysiego przeciwciała przeciw ludzkiemu antygenowi EGFR (Novocastra, Laboratories Ltd. UK, rozcieńczenie 1:75, klon: EGFR.113), w utkaniu badanych raków krtani oceniono w mikroskopii świetlnej przy zastosowaniu 40-krotnego powiększenia. Ekspresję receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR określono metodą półilościową, oceniając odsetek komórek utkania nowotworowego, wykazujących dodatni odczyn błonowy i cytoplazmatyczny, w badanym polu widzenia. Wyniki przedstawiano jako uśredniony wynik z 10 pól widzenia. Reakcje barwne dla odczynów błonowych (EGFR-m) klasyfikowano następująco: słaba ekspresja (1+) gdy dodatni odczyn błonowy występował w mniej niż 25% komórek utkania nowotworowego, średnia ekspresja (2+) gdy dodatni odczyn błonowy występował w 25-50% komórek

utkania nowotworowego, silna ekspresja (3+) gdy dodatni odczyn błonowy występował w >50% komórek utkania nowotworowego. Dla odczynów cytoplazmatycznych (EGFR-c): brak ekspresji (0) gdy nie stwierdzono reakcji barwnej lub była ona wątpliwa w komórkach utkania nowotworowego, średnia ekspresja (1+) gdy w obrazie mikroskopowym stwierdzono małe lub średnie wybarwienie cytoplazmy w komórkach utkania nowotworowego (<50% komórek z dodatnim odczynem cytoplazmatycznym), silna ekspresja (1+) gdy w obrazie mikroskopowym stwierdzono silne wybarwienie cytoplazmy w komórkach utkania nowotworowego (>50% komórek z dodatnim odczynem cytoplazmatycznym). Zaproponowane kryteria oceny ekspresji EGFR, zostały zaakceptowane przez recenzentów czasopism z Listy Filadelfijskiej [13,14].

Analiza statystyczna

Ocenę statystyczną zebranych danych przeprowadzono przy pomocy 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 oraz modele regresji liniowej (test Pearsona, test Spearmana) dla oceny zależności (korelacji) między badanymi cechami. Dla wszystkich stosowanych testów przyjęto poziom istotności $p \leq 0,05$.

WYNIKI

Immunohistochemiczna ocena ekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) w badanej grupie raków krtani

Wykonane odczyny IHC potwierdziły pozytywną ekspresję białka EGFR-m w 42 przypadkach raka krtani (42/55, 76,4%). W 13 (13/55, 23,6%) preparatach nie stwierdzono występowania dodatniego odczynu błonowego. Zgodnie z kryteriami zaproponowanej skali intensywności odczynów błonowych, ekspresję EGFR-m określoną jako (1+) stwierdzono w 17 przypadkach (17/55, 30,9%), ekspresję (2+) stwierdzono w 9 przypadkach (9/55, 16,4%) oraz ekspresję (3+) w 16 preparatach analizowanych raków krtani (16/55, 29,1%). Pozytywny odczyn cytoplazmatyczny został potwierdzony w 17 przypadkach badanych raków płaskonabłonkowych krtani (17/55, 30,9%), w tym w 11 z nich odczyn został określony jako słaby lub średni (11/55, 20%) a w 6 przypadkach jako silny (6/55, 10,9%). Brak ekspresji białka EGFR-c stwierdzono w 38 analizowanych przypadkach raka krtani (38/55, 69,1%).

Analiza wydzielania IL-8 i IFN- γ we krwi pełnej w zależności od cech klasyfikacji pTNM i cechy G

Analiza danych wykazała istotne statystycznie różnice wartości średniego stężenia IFN- γ w nadsączach krwi pełnej, w układach badawczych ocenionych w 21h inkubacji, w zależności od rozległości miejscowej guza nowotworowego pT ($p = 0,02$). W analizowanych układach badawczych stwierdzono istotne różnice wartości średniego stężenia IFN- γ w zależności od cechy pT ($p=0,01$). W testach post-hoc wykazano, że raki krtani pT2 charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższymi wartościami średniego stężenia IFN- γ w porównaniu z guzami pT3 i pT4 (* $p = 0,05$ dla pT2 vs. pT4, ** $p = 0,02$ dla pT2 vs. pT3). W analizowanych układach badawczych nie stwierdzono znamienych statystycznie zależności rozległości zmian węzłowych, określonych w badaniu patomorfologicznym (pN) oraz stopnia histologicznego zróżnicowania guza (G) od poziomu średnich stężeń IL-8 i IFN- γ zarówno w doświadczeniach ocenionych w 21h i 72h inkubacji ($p>0,05$). Wartości średniego stężenia IFN- γ w zależności od cechy pT oraz wyniki analizy statystycznej przedstawia tabela II i ryc. 1.

Analiza zależności ekspresji EGFR od poziomu cytokin we krwi obwodowej w badanej grupie

Analiza ekspresji odczynów błonowych (EGFR-m) w komórkach utkania guza nowotworowego, w zależności od stężenia badanych cytokin w nadsączach krwi obwodowej u chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani wykazała występowanie istotnych statystycznie różnic między wynikami IHC EGFR-m w zależności od poziomu IL-8, ocenionej w 21h inkubacji ($p = 0,007$). Przeprowadzone dodatkowo testy post-hoc wykazały znamienne różnice średnich stężeń IL-8 w nadsączach krwi pełnej, uzyskanej od chorych z guzami nowotworowymi charakteryzującymi się odczynem IHC EGFR-m określonym jako (2+) i (3+) ($p = 0,02$). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między wynikami IHC EGFR-m w zależności od poziomu IFN- γ w pozostałych układach badawczych. Średnie wartości stężeń IL-8, ocenionych w nadsączach krwi pełnej, w 21h inkubacji, w grupach guzów nowotworowych, charakteryzujących się różnym odczynem błonowym EGFR-m, wynosiły (śr. \pm SEM): $116,9 \pm 19,53$ ng/mL w grupie (1+), $56,9 \pm 12,27$ ng/mL w grupie (2+) i $127,1 \pm 22,4$ ng/mL w grupie (3+), w układach badawczych bez stymulacji. Wyniki oceny ekspresji EGFR-m w zależności od poziomu IL-8 w nadsączach krwi pełnej w badanych układach przedstawiono na rycinie 2. Ocena immunohistochemiczna odczynów cytoplazmatycznych

Tabela II. Stężenia cytokin prozapalnych i regulatorowych w nadsączach krwi pełnej w zależności od cechy pT

Cecha pT	Układ badawczy		
	t	IL-8 \pm SEM [ng/mL]	IFN- γ \pm SEM [pg/mL]
pT2	21h	109,6 \pm 20,63	5,67 \pm 2,21*/**
	72h	333,9 \pm 71,05	58,17 \pm 49,28
pT3	21h	115,5 \pm 20,99	0,39 \pm 0,27**
	72h	231,4 \pm 98,49	0,0 \pm 0,00
pT4	21h	88,2 \pm 14,37	0,62 \pm 0,61*
	72h	294,2 \pm 65,13	0,46 \pm 0,46

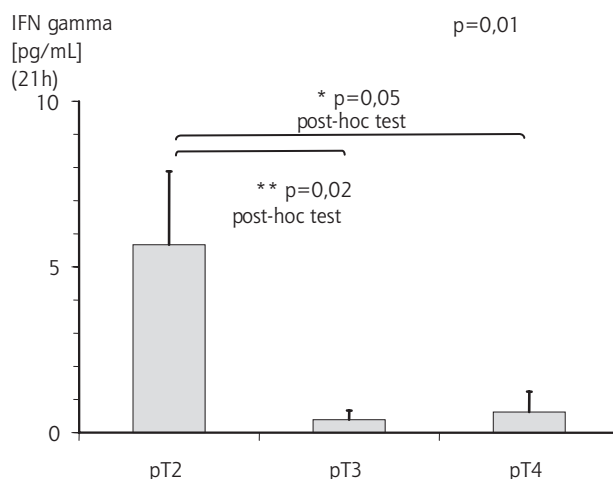
Istotne statystycznie różnice stężeń IFN- γ :

* $p = 0,05$ (pT2 vs. pT4);

** $p = 0,02$ (pT2 vs. pT3)

h – godzina

SEM – średni błąd standardowy



Ryc. 1. Stężenie IFN- γ w zależności od miejscowej rozległości procesu nowotworowego pT w badanej grupie raków krtani

(EGFR-c) w komórkach utkania guza nowotworowego, w zależności od stężenia badanych cytokin w nadsączach krwi obwodowej, w badanej grupie chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani nie wykazała występowanie znamienych statystycznie różnic między wynikami IHC EGFR-c w zależności od poziomu IL-8 i IFN- γ , ocenionych w badanych układach.

Ocena korelacji ekspresji EGFR od cech klasyfikacji pTNM i cechy G w badanej grupie raków krtani

Wśród analizowanych raków płaskonabłonkowych krtani najliczniejszą grupę stanowiły guzy nowotworowe o wysokim stopniu rozległości miejscowej pT (pT3 i pT4), które jednocześnie charakteryzowały się silną ekspresją EGFR-m, określoną jako (3+), zgodnie z kryteriami zaproponowanej skali intensywności odczynów błonowych

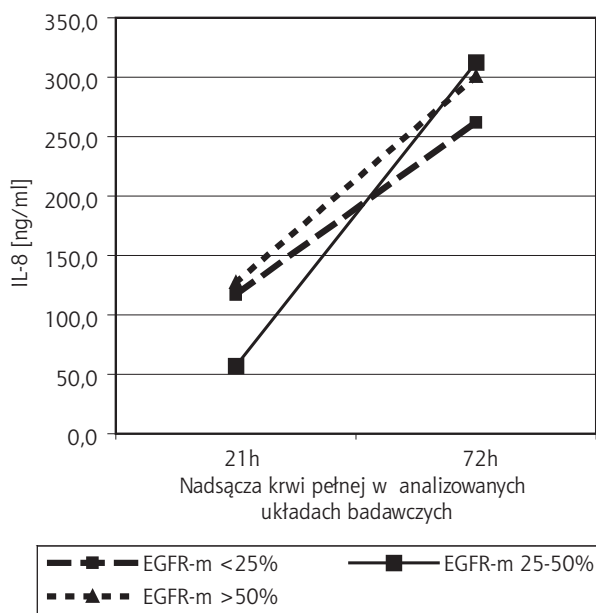
w komórkach nacieku nowotworowego (25,5%, 14/55). Analiza statystyczna ekspresji odczynów błonowych (EGFR-m) w komórkach utkania guza nowotworowego, w zależności od wykładników morfologicznych, w badanej grupie raków płaskonabłonkowych krtani wykazała występowanie istotnych statystycznie dodatnich korelacji między wynikami IHC EGFR-m i nasileniem zmian histologicznych utkania nowotworowego. Znamienne zależności dotyczyły stopnia rozległości miejscowej pT ($r = 0,99$, $p < 0,001$). Raki krtani z wyższym stopniem rozległości miejscowej pT istotnie częściej charakteryzowały się bardziej nasilonym pozytywnym odczynem EGFR-m. Wśród analizowanych raków krtani najliczniejszą grupę stanowiły guzy nowotworowe charakteryzujące się brakiem ekspresji odczynów cytoplazmatycznych EGFR-c w komórkach nacieku nowotworowego i jednocześnie średnim stopniem zróżnicowania histopatologicznego G utkania guza (47,3%, 26/55). Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych zależności wyników badań immunohistochemicznych i pozostałych wykładników morfologicznych guza (pN i G) ($p > 0,05$). Wyniki badań IHC EGFR-m i EGFR-c w komórkach nacieku nowotworowego w zależności od cechy pT i G przedstawia tabela III.

DYSKUSJA

W przedstawionej pracy zestawiono wyniki stężeń IL-8 i IFN- γ ocenionych w warunkach *in vitro* z kryteriami klasyfikacji pTNM dla raków regionu głowy i szyi oraz stopniem zróżnicowania

histopatologicznego zmian G w najbardziej inwazyjnej i najmniej zróżnicowanej części nacieku nowotworowego. Przeanalizowano także poziom immunoekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR w utkaniu raka płaskonabłonkowego krtani, w odniesieniu do wybranych wykładników komórkowej odpowiedzi immunologicznej. W dostępnym piśmiennictwie dotyczącym tematu, można znaleźć artykuły, w których analizowano związek między zjawiskami immunologicznymi a cechami guza nowotworowego m.in. parametrami klasyfikacji pTNM, stopniem klinicznego zaawansowania zmian S i zróżnicowania histologicznego G [8,15-22]. Niestety wyniki badań cytowanych autorów dotyczą w większości niejednorodnych grup różnych raków regionu głowy i szyi, co nie pozwala na bezpośrednie porównanie z wynikami analizy przeprowadzonej w przedstawionej pracy [8,15-22]. Do dyskusji wybrano te publikacje, w których autorzy analizowali wybrane wykładniki odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego, w odniesieniu do cech morfologicznych guzów nowotworowych u pacjentów z rakami regionu głowy i szyi, cechujących się zbliżonym do analizowanej grupy profilem klinicznym.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono silną zależność wydzielania IFN- γ przez komórki układu odpornościowego krążące we krwi obwodowej od klinicznego zaawansowania choroby nowotworowej. Raki krtani o największej rozległości miejscowej pT3 i T4 charakteryzowały się znamienne niższymi poziomami IFN- γ oznaczonym we krwi pełnej w porównaniu z guzami pT2. Ponadto potwierdzono znamienne zależności obecności dodatnich odczynów IHC błonowych dla EGFR



Ryc. 2. Wyniki oceny ekspresji EGFR-m w zależności od poziomu IL-8 w nadszczach krwi pełnej

Tabela III. Wyniki badań IHC EGFR-m i EGFR-c w komórkach nacieku nowotworowego

EGFR-m	1+	2+	3+	Liczebność grup N (%)
Badana cecha	(<25%) N=17	(25%-50%) N=9	(>50%) N=16	
pT				
pT	6	5	1	12/55(21,8)
pT	6	2	8	16/55(29,1)
pT	5	2	7	14/55(25,5)
EGFR-c	brak odczynu N=38	słaby/średni odczyn N=11	silny odczyn N=6	Liczebność grup N (%)
Zróżnicowanie histopatologiczne G				
G1	0	3	1	4/55 (7,3)
G2	32	7	5	44/55 (80,0)
G3	6	1	0	7/55 (12,7)

w utkaniu guza z cechami określonymi według kryteriów klasyfikacji pTNM. Analiza wykonanych odczynów IHC wskazała na znaczenie odczynów błonowych EGFR-m jako istotnych wskaźników progresji zmian nowotworowych. Ocena związków między cechami kliniczno-morfologicznymi w raku płaskonabłonkowym krtani a ekspresją receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR wykazała, że raki krtani z bardziej nasilonym pozytywnym odczynem dla EGFR-m istotnie częściej charakteryzowały się wyższym stopniem rozległości miejscowej pT. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują pośrednio na złożone zależności międzykomórkowe będące rezultatem zaburzeń mechanizmów regulacyjnych komórkowej odpowiedzi immunologicznej na antygeny guza nowotworowego tj. supresja autologicznych komórek układu odpornościowego oraz występowanie tolerancji w przebiegu zaawansowanego klinicznie raka płaskonabłonkowego krtani. Wskazują na to istotne różnice wartości stężeń IFN- γ , oznaczonych we krwi pełnej, dla różnych stadiów inwazyjności procesu nowotworowego, co może wynikać ze zmniejszającej się aktywności komórek immunokompetentnych, pomimo stymulacji przez antygeny nowotworowe, w zaawansowanych morfologicznie guzach. Wzrost agresywności nacieku w rakach płaskonabłonkowych krtani, korelujący ze zmniejszonym wydzielaniem IFN- γ przez komórki krwi obwodowej, może być związany z zaburzeniem funkcji tych komórek, wywołanym postępującym, wraz z rozwojem choroby nowotworowej, brakiem działania IL-8 i IFN- γ oraz innych cytokin. Zmniejszenie efektywności lub hamowanie mechanizmów zależnych od IFN- γ wiąże się m.in. ze spadkiem proliferacji i pobudzenia limfocytów T rozpoznających antygen, upośledzeniem różnicowania limfocytów T w kierunku limfocytów cytotoksycznych T_c, zmniejszeniem aktywacji limfocytów T_c i komórek NK, posiadających zdolność do bezpośredniego hamowania proliferacji komórek nowotworowych oraz działania cytotoxicznego [23,24]. Obniżone wydzielanie IFN- γ może być także spowodowane hamowaniem przez IL-10, generowanej głównie przez limfocyty Th2/Tc2, dominującą subpopulację we krwi krążącej [25]. Wzmocniona produkcja IL-10 może być przyczyną nasilenia supresyjnych mechanizmów regulacyjnych, zależnych od tej interleukiny m.in. hamowania ekspresji cząsteczek MHC klasy II na makrofagach, co prowadzi do zmniejszenia prezentacji antygenów nowotworowych, z hamowaniem powstawania limfocytów Th1 pobudzonych przez antygeny guza, blokowaniem działania limfocytów Th1 oraz makrofagów i wytwarzania przez nie cytokin m.in. IFN- γ , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 [23,24]. Wszystkie mechanizmy przyczyniające się

do osłabienia lub braku reakcji odpornościowej na antygeny nowotworowe, sprzyjają wzrostowi inwazyjności zmian nowotworowych w raku płaskonabłonkowym krtani. Obserwacje badaczy dowodzą istnienia wielorakich zależności między analizowanymi wskaźnikami immunologiczno-klinicznymi, nie dającymi się jednak zdefiniować jednoznacznie, zwłaszcza w niejednorodnej grupie raków regionu głowy i szyi oraz wskazują na konieczność ujednoczenia kryteriów doboru grup badawczych i wyboru materiału biologicznego, jak też indywidualnego podejścia w interpretacji wyników dotyczących danego typu guza nowotworowego, dla wyciągnięcia wiążących wniosków [18,20-22,26,27]. Lathers i wsp. [20] stwierdzili występowanie ujemnych zależności między stężeniem IFN- γ a interleukinami IL-2, IL-4, IL-6 oraz IL-10 oznaczonych w osoczu krwi u chorych z rakami regionu głowy i szyi. Badacze zanotowali także, że w zaawansowanych guzach nowotworowych pT4 wzajemne relacje między badanymi cytokinami były znacznie mniej zaznaczone. Jebreel i wsp. [18] również potwierdzili, że podwyższone wartości IL-10 oznaczonej w surowicy krwi chorych, stwierdzone w 40% analizowanych przypadków raków głowy i szyi wiązały się z potwierdzeniem w badaniu histopatologicznym zaawansowanych guzów pT3 i pT4. Wnioski przedstawione w cytowanych pracach, związane z analizą znaczenia IFN- γ i IL-10 w determinowaniu agresywności HNSCC, są zgodne z obserwacjami odnoszącymi się do badanej grupy raków płaskonabłonkowych krtani. Heimdal i wsp. [26] oceniając wydzielanie cytokin *in vitro* w przypadkach HNSCC z różnym stopniem inwazyjności zmian, zaobserwowali zmniejszone wydzielanie IFN- γ i IL-2 przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, co korelowało ze wzrostem inwazyjności guza. Wyniki uzyskane w przedstawionej pracy oraz dane innych autorów w dostępnym piśmiennictwie, dotyczące wzajemnych związków między poziomem generowanych cytokin a wykładnikami klasyfikacji TNM nie zawsze są zbieżne. Różnice we wnioskach dotyczących znaczenia różnych cytokin w rozwoju choroby nowotworowej m.in. IL-8 i jej roli w determinowaniu inwazyjności zmian mogą wynikać z braku jednolitych kryteriów doboru grup badawczych w cytowanych pracach, różnego materiału biologicznego wykorzystanego w przeprowadzanych badaniach, ale także z faktu, że w większości omawianych prac IL-8 była wydzielana przez komórki nowotworowe badanych raków głowy i szyi. IL-8 będąca przykładem cytokiny pełniącej rolę czynnika promującego wzrost guza i angiogenezę, nie mogło pozostać bez wpływu na otrzymane przez badaczy wnioski [19,28-31]. W dostępnym piśmiennictwie

można wskazać także prace, w których autorzy nie potwierdzają występowania zależności między wydzielanymi cytokinami a cechami kliniczno-morfologicznymi badanych nowotworów regionu głowy i szyi [27,32]. Chen i wsp. [32] nie zaobserwowali istotnych korelacji poziomu oznaczanych w surowicy cytokin o właściwościach prozapalnych i angiogennych z cechami pT, pN, stopniem histologicznego zróżnicowania nowotworu, jak też obecnością komórek nacieku zapalnego w utkaniu guza nowotworowego. Lathers i wsp. [27] nie wykazali znamienych zależności między stężeniem IL-6 i IL-8 oznaczonych w surowicy krwi chorych z HNSCC a parametrami morfologicznymi klasyfikacji TNM. Wnioski przedstawiane przez różnych badaczy w cytowanych pracach dowodzą występowania trudno porównywalnych odmienności w mechanizmach regulacji komórkowej odpowiedzi immunologicznej, w różnych typach raków regionu głowy i szyi. Większość autorów zgodnie podkreśla jednak rolę badanych cytokin jako wskaźników o znaczeniu rokowniczym, w odniesieniu do czasu przeżycia, wznów miejscowych i węzłowych, jak też wyników zastosowanego leczenia u chorych z HNSCC [9,12,33-35].

Przedstawione wyniki dotyczące ekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu w utkaniu nowotworowym są zgodne z rezultatami innych autorów, którzy potwierdzili występowanie pozytywnych odczynów dla EGFR w 49%–90% przypadków raków regionu głowy i szyi różnego pochodzenia, w tym w 47%–88% w rakach płaskonabłonkowych krtani [36-40]. Również wnioski odnoszące się do analizy aktywności EGFR jako wskaźnika stopnia rozwoju choroby nowotworowej w rakach regionu głowy i szyi, są zbieżne z wynikami przedstawianymi przez innych badaczy [36,37,39,40-45]. Hitt i wsp. [42] wykazali, że pozytywne odczyny dla EGFR, o średnim i wysokim nasileniu w utkaniu guza, miały istotny związek z bardziej agresywnym fenotypem w zaawansowanych przypadkach HNSCC, leczonych indukcyjną chemioterapią. Vlachtsis i wsp. [44] również zasugerowali w swoich badaniach, że odsetek komórek z pozytywną ekspresją EGFR mógłby być znaczącym biomarkerem progresji zmian nowotworowych w raku krtani, chociaż otrzymane przez nich wyniki nie osiągnęły granicy istotności statystycznej. Demiral i wsp. [46] nie potwierdzili jednak znamienych różnic w nasileniu odczynów dla EGFR w zależności od cechy pT, histologicznego zróżnicowania zmian nowotworowych oraz występowania nacieku okolicy spoidła przedniego. Dopiero w przeprowadzonej przez badaczy wieloczynnikowej analizie statystycznej poziom ekspresji EGFR okazał się istotnym

wskaźnikiem stopnia miejscowego zaawansowania zmian pT oraz wznów miejscowych. Carracedo i wsp. [36] zaobserwowali, że pozytywny odczyn wybarwienia komórek dla EGFR, oceniony we froncie nacieku nowotworowego w rakach regionu głowy i szyi jest indykatorem częstszego występowania przerzutów węzłowych, ale pozostawał bez związku z innymi badanymi cechami kliniczno-morfologicznymi guza. Również Wei i wsp. [40] zanotowali występowanie znamienych współzależności pozytywnej immunoekspresji EGFR w utkaniu guza oraz zaawansowania miejscowego nowotworu i obecności przerzutów węzłowych w raku krtani. W przeprowadzonych w przedstawionej pracy badaniach nie wykazano występowania korelacji między wynikami immunoekspresji EGFR oraz stopniem zaawansowania zmian węzłowych. Rozbieżności w wynikach, dotyczących analizy związku ekspresji badanego białka i cechy pN, w cytowanych pracach mogą wynikać, z jednej strony, z faktu niejednorodności grup badawczych tj. włączenia do badań różnych raków regionu głowy i szyi, w tym części nosowej i krtaniowej gardła, które charakteryzują się wysokim odsetkiem potwierdzonych przerzutów węzłowych, z drugiej strony z wyborem grupy raków krtani z pozytywnymi w badaniu histologicznym węzłami chłonnymi we wszystkich badanych przypadkach. Należy podkreślić, że w dostępnym piśmiennictwie znaczna większość publikacji dotyczyła analizy prognostycznego znaczenia ekspresji EGFR w rakach regionu głowy i szyi. Przedstawione w pracy wyniki immunoekspresji EGFR w raku płaskonabłonkowym krtani stanowią zatem głos w dyskusji nad znaczeniem aktywności tego białka w zaawansowaniu i progresji zmian nowotworowych, a co za tym idzie, również pośrednio wpływu na rokowanie oraz wybór właściwego postępowania terapeutycznego w badanej grupie chorych. W pracy zestawiono także wyniki oceny immunohistochemicznej z poziomem wydzielania badanych cytokin, dla wykazania ich pośredniej roli w modulowaniu ekspresji EGFR w analizowanej grupie raków płaskonabłonkowych krtani. U chorych z guzami nowotworowymi, charakteryzującymi się wysokim stopniem immunoekspresji EGFR, stwierdzono wyższe wartości stężeń IFN- γ oraz IL-8 we krwi obwodowej. Potwierdzone zależności wskazują na wzajemny wpływ i znaczenie kliniczne ocenianych parametrów immunologicznych i immunohistochemicznych. Zwiększony poziom IL-8 u chorych z nowotworami charakteryzującymi się wysoką ekspresją EGFR, może być spowodowany wysokim stężeniem TNF, który wybitnie wzmacnia produkcję IL-8. Wysokie stężenie IL-8 w guzach z pozytywnymi odczynami dla EGFR może także

wskazywać na zwiększoną aktywność monocytów, które na drodze chemotaksji, za pośrednictwem IL-8, mobilizują i pobudzają w mechanizmie auto- i parakrynnym komórki współuczestniczące w procesach odpornościowych do udziału w odpowiedzi przeciwnowotworowej m.in. stymulując neutrofile do degranulacji, uwolnienia enzymów lizosomowych i działania cytotoksycznego oraz limfocyty T, komórki NK i bazofile do przechodzenia przez śródbłonek naczyń pozawłosowatych do utkania guza [23,24]. W dostępnym piśmiennictwie potwierdza się również odwrotną współzależność ekspresji EGFR w utkaniu nowotworowym od poziomu IL-6, oznaczanej na obwodzie i w podścielisku guza w rakach regionu głowy i szyi [47-49]. Obserwowane zależności mogą być efektem pobudzenia szlaków wewnątrzkomórkowych zależnych od aktywności EGFR i prowadzących do fosforylacji białek transkrypcyjnych z rodziny STAT (signal transducer and activator of transcription), przy współistniejącej obniżonej stymulacji receptora gp130 dla IL-6 [47].

WNIOSKI

1. W rakach płaskonabłonkowych krtani, charakteryzujących się najmniejszą rozległością miejscową procesu nowotworowego pT2, obserwowano znamienne największe wydzielanie IFN- γ przez autologiczne komórki krwi biorące udział w procesach odpornościowych.
2. Nasilenie ekspresji odczynu błonowego (EGFR-m) było dodatnio liniowo skorelowane ze stopniem rozległości miejscowej pT guza. Raki krtani z bardziej nasilonym pozytywnym odczynem dla EGFR-m istotnie częściej charakteryzowały się wyższym stopniem rozległości miejscowej pT.
3. W badanej grupie chorych z rakiem krtani nie stwierdzono znamienych zależności między cechami kliniczno-morfologicznymi pN i stopniem zróżnicowania histologicznego G a profilem badanych cytokin oraz ekspresją receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR).

Badania wykonano w ramach grantu MNiSzW nr N403 043 32/2326

Piśmiennictwo

1. Chu EA, Kim YJ. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up. *Otolaryngol Clin North Am.* 2008; 41(4): 673-695.
2. Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D i wsp. Contribution of tobacco and alcohol to the high rates of squamous cell carcinoma of the supraglottis and glottis in Central Europe. *Am J Epidemiol.* 2007; 165(7): 814-820.
3. Shangina O, Brennan P, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Fabiánová E, Fletcher T i wsp. Occupational exposure and laryngeal and hypopharyngeal cancer risk in central and eastern Europe. *Am J Epidemiol.* 2006; 164(4): 367-375.
4. Zatoński W, Zatoński T. Epidemiologia nowotworów złośliwych krtani. (w) Rak krtani i gardła dolnego. Janczewski G, Osuch-Wójcikiewicz E (red.). Wyd. α -Medica Press, 2002.
5. 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.
6. Bergmann C, Strauss L, Zeidler R, Lang S, Whiteside TL. Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56(9): 1429-1442.
7. Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S, Baral R. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immun.* 2008; 8: 10-19.
8. 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.
9. Pries R, Wollenberg B. Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17(3): 141-146.
10. 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.
11. Strauss L, Bergmann C, Szczepański M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. A unique subset of CD4+CD25high Foxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(1): 4345-4354.
12. Walsh JE, Lathers DM, Chi AC, Gillespie MB, Day TA, Young MR. Mechanisms of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2007; 8(3): 227-238.
13. Starska K, Bryś M, Forma E, Głowacka E, Lewy-Trenda I, Stasikowska O i wsp. Impact of EGFR immunoeexpression on STAT3 activation and association with proinflammatory/regulatory cytokine pattern in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2009; 21(2): 539-548.
14. Starska K, Głowacka E, Lewy-Trenda I, Stasikowska O, Łukowski M. EGFR immunoeexpression and peripheral blood cytokine secretion as potential biomarkers for tumor behavior in laryngeal squamous cell carcinoma. *Med Sci Monit* 2009; 15(11): 518-527.

15. Aarstad HJ, Heimdal JH, Klementsens 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.
16. 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.
17. Heimdal JH, Kross K, Klementsens B, Aarstad HJ. Stimulated monocyte IL-6 secretion predicts survival of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2008; 8:34.
18. Jebreel A, Mistry D, Loke D, Dunn G, Hough V, Oliver K i wsp. Investigation of interleukin 10, 12 and 18 levels in patients with head and neck cancer. *J Laryngol Otol.* 2007; 121(3): 246-252.
19. Kross KW, Heimdal JH, Olsnes C, Olofsson J, Aarstad HJ. Co-culture of head and neck squamous cell carcinoma spheroids with autologous monocytes predicts prognosis. *Scand J Immunol.* 2008; 67(4): 392-399.
20. Lathers DM, Young MR. Increased aberrance of cytokine expression in plasma of patients with more advanced squamous cell carcinoma of head and neck. *Cytokine* 2004; 25(5): 220-228.
21. Riedel F, Zaiss I, Herzog D, Götte K, Naim R, Hörmann K. Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2005; 25(4): 2761-2765.
22. Sparano A, Lathers DM, Achille N, Petruzzelli GJ, Young MR. Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 131(5): 573-576.
23. Gołąb J, Jakóbiński M, Zagożdżon R i wsp. Cytokiny. (w) Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek W i wsp. (red.). *Immunologia*, Wyd. PWN 2008.
24. Jakóbiński M, Lasek W. *Immunologia nowotworów.* (w) Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek W i wsp. (red.). *Immunologia*, Wyd. PWN 2008.
25. Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, Bresciani M, Derna R. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts). *Clin Ter.* 2006; 157(4): 377-386.
26. Heimdal JH, Aarstad HJ, Olofsson J. Peripheral blood T-lymphocyte and monocyte function and survival in patients with head and neck carcinoma. *Laryngoscope.* 2000; 110(3): 402-407.
27. Lathers DM, Achille NJ, Young MR. Incomplete Th2 skewing of cytokines in plasma of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Hum Immunol.* 2003; 64(12): 1160-1166.
28. Kross KW, Heimdal JH, Olsnes C, Olofsson J, Aarstad HJ. Head and neck squamous cell carcinoma spheroid- and monocyte spheroid-stimulated IL-6 and monocyte chemotactic protein-1 secretion are related to TNM stage, inflammatory state and tumor macrophage density. *Acta Otolaryngol.* 2005; 125(10): 1097-1104.
29. 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.
30. Wolf JS, Chen Z, Dong G, Sunwoo JB, Bancroft CC, Capo DE i wsp. IL (interleukin)-1alpha promotes nuclear factor-kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(6): 1812-1820.
31. 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.
32. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW i wsp. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1999; 5(6): 1369-1379.
33. Bron L, Romero P. Immunotherapy: a new alternative treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Bull Cancer* 2007; 94(9): 793-797.
34. Druzgal CH, Chen Z, Yeh NT, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC i wsp. A pilot study of longitudinal serum cytokine and angiogenesis factor levels as markers of therapeutic response and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2005; 27(9): 771-784.
35. Pries R, Wollenberg B. Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17(3): 141-146.
36. Carracedo DG, Astudillo A, Rodrigo JP i wsp. Skp2, p27kip1 and EGFR assessment in head and neck squamous cell carcinoma: prognostic implications. *Oncol Rep.* 2008; 20(3): 589-595.
37. Dietz A, Boehm A, Mozet C, Wichmann G, Giannis A. Current aspects of targeted therapy in head and neck tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008; 265 (1): 3-12.
38. Psyrris A, Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Haffty B, Camp R i wsp. Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(16): 5856-5862.
39. Rafferty M, Helliwell TR, Husband DJ i wsp. Expression of cell cycle associated proteins influences radiocurability of T2N0 squamous cell carcinoma of the larynx. *Oral Oncol.* 2008; 44(10): 975-981.
40. Wei Q, Sheng L, Shui Y i wsp. EGFR, HER2, and HER3 expression in laryngeal primary tumors and corresponding metastases. *Ann Surg Oncol.* 2008; 15(4): 1193-1201.
41. Almadori G, Bussu F, Paludetti G. Predictive factors of neck metastases in laryngeal squamous cell carcinoma. Towards an integrated clinico-molecular classification. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2006; 26(6): 326-334.
42. Hitt R, Ciruelos E, Amador ML i wsp. Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2005; 41(3): 453-460.
43. Pivot X, Magné N, Guardiola E i wsp. Prognostic impact of the epidermal growth factor receptor levels for patients with larynx and hypopharynx cancer. *Oral Oncol.* 2005; 41(3): 320-327.
44. Vlachtsis K, Nikolaou A, Markou K i wsp. Clinical and

- molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005; 262(11): 890-898.
45. Xian J, Lin Y, Liu Y i wsp. Signal transduction-related gene transfer leads to inhibition of proliferation and induction of differentiation in laryngeal squamous cell carcinoma in vitro. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007; 264(12): 1467-1473.
46. Demiral AN, Sarioglu S, Birlik B i wsp. Prognostic significance of EGF receptor expression in early glottic cancer. *Auris Nasus Larynx* 2004; 31(4): 417-424.
47. Lee TL, Yeh J, Van Waes C i wsp. Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin-6 receptor and epidermal growth factor receptor signaling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(1): 8-19.
48. Squarize CH, Castilho RM, Sriuranpong V i wsp. Molecular cross-talk between the NFkappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia.* 2006; 8(9): 733-746.
49. Seethala RR, Gooding WE, Handler PN i wsp. Immunohistochemical analysis of phosphotyrosine signal transducer and activator of transcription 3 and epidermal growth factor receptor autocrine signaling pathways in head and neck cancers and metastatic lymph nodes. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(5): 1303-1309.