

Ekspresja wybranych antygenów aktywacji na limfocytach T u chorych z rakiem krtani a cechy kliniczno-morfologiczne guza*

Expression of activation antigens on the lymphocytes T in patients with carcinoma of the larynx and connection with tumor features*

Katarzyna Starska¹, Ewa Głowacka², Marek Łukomski¹, Iwona Lewy-Trenda³,
Magdalena Józefowicz-Korczyńska¹, Marcin Durko¹, Przemysław Lewkowicz²

¹Katedra Otolaryngologii UM w Łodzi

Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. T. Durko

²Zakład Immunologii Klinicznej ICZMP w Łodzi

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. H. Tchórzewski

³Katedra Patomorfologii, Zakład Patomorfologii UM w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. W. Papierz

Summary

Introduction. Results of studies analyzing the role of immunocompetent cells in tumor environment and whole peripheral blood indicate their responsibility for aggressiveness of neoplasm, prognosis and therapeutic effect. Activation of lymphocytes T is connected with expression the markers (antigens) on their surface. The aim of this study was the analysis of activation antigens expression on lymphocytes T in patients with laryngeal carcinoma and the connection with clinicomorphological features. **Material and methods.** Analysis of activation antigens expression CD69, CD71 and CD25, CD26, HLA/DR on lymphocytes T CD4+ i CD8+ in 33 patients with squamous cell carcinoma of the larynx was performed. Flow cytometry-based analysis of activation antigens in T cell cultures with and without PHA stimulation was used. The connection of these molecules and clinicomorphological features was examined (pT, pN, G, Anneroth, Batsakis and Lunas' classification). **Results.** The significant correlation between chosen markers of activation and tumor features were noted: pT with HLA/DR/CD4, CD69CD8, CD71CD8, pN with CD26CD8, G with CD25CD8, CD71CD8, ABL score with CD25CD4. **Conclusion.** Our data indicated the connection of immunocompetent cell activity and spread of neoplasm in patients with laryngeal carcinoma.

Hasła indeksowe: rak krtani, limfocyty T CD4+ i CD8+, antygeny aktywacji

Key words: laryngeal carcinoma, lymphocytes T CD4+ i CD8+, activation antigens

Otolaryngol Pol 2008; LXII (6): 674–679 © 2008 by Polskie Towarzystwo Otorinolaryngologów – Chirurgów Głowy i Szyi

WSTĘP

Warunkiem udziału komórek immunokompetentnych w zjawiskach immunologicznych zachodzących w przebiegu choroby nowotworowej pod wpływem obecności antygenów zarówno w otoczeniu guza, jak i we krwi obwodowej, jest ich aktywacja, która zapoczątkowuje mechanizmy odpowiedzi komórkowej i humoralnej. Aktywacja limfocytów związana jest z obecnością na ich powierzchni markerów (antygenów) aktywacji: wczesnych (CD69, CD71), jak i póź-

nych (CD25, CD26 i HLA/DR) [1, 2]. Rola limfocytów T cytotoksycznych polega na odróżnianiu i zabijaniu komórek potencjalnie nowotworowych. Limfocyty cytotoksyczne to w większości limfocyty CD8+, które poprzez swoisty receptor TCR mają zdolność rozpoznawania antygeny nowotworowego obecnego na cząsteczce MHC klasy I. Aktywacja limfocytów T cytotoksycznych CD8+ odbywa się z udziałem uprzednio pobudzonych limfocytów T pomocniczych CD4+ [3]. Pobudzenie limfocyta T pomocniczego CD4+ wymaga bezpośredniego kontaktu z komórką prezentującą an-

* Praca finansowana z funduszy Komitetu Badań Naukowych i funduszy pracy własnej UM w Łodzi. (Projekt KBN nr N403 04332/2326, UM 502-12-471)
Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

tygen (APC). Limfocyt CD4⁺ rozpoznaje antygen połączony z cząsteczkami MHC klasy II poprzez swoisty receptor TCR. Drugim sygnałem dla Th jest połączenie się cząsteczki B7.1 (CD80) lub B7.2 (CD86) znajdującej się na APC cząsteczką CD28 na limfocycie T CD4⁺. Te dwa sygnały zapoczątkowują pobudzenie limfocyta Th i uwalnianie przez niego do środowiska szeregu cytokin [3–6]. Aktywność skierowana przeciw komórkom nowotworowym wymaga współpracy różnych typów komórek. Limfocyty CD4⁺ Th2 przez wydzielanie IL-4, IL-5, IL-6 wspomagają syntezę swoistych przeciwciał przez limfocyty B, natomiast CD4⁺ Th1 i CD8⁺ Tc1 przez działanie IFN- γ aktywują makrofagi, przez IL-2 aktywują komórki NK. Limfocyty CD4⁺ Th1 mogą również bezpośrednio zabijać komórki nowotworowe (TNF- β) lub hamować ich proliferację (interferony, TNF- β). Wiele badań wskazuje, że komórki CD8⁺ Tc1 mogą uczestniczyć w cytolizie komórek nowotworowych związanej z mechanizmem FAS – Fas-L [7].

Celem badań była ocena ekspresji antygenów aktywacji wczesnych i późnych na limfocytach T CD4⁺ oraz CD8⁺ u chorych z rakiem krtani oraz ocena związku z cechami kliniczno-morfologicznymi guza (pT, pN, G, klasyfikacja Annerotha, Batsakisa i Luny).

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na materiale pochodzącym od 33 chorych na raka płaskonabłonkowego krtani, którzy zostali poddani laryngektomii całkowitej lub częściowej, oraz w wybranych przypadkach operacji usunięcia węzłów chłonnych szyi. Chorzy byli operowani w Klinice Laryngologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2003–2007. Uzupełniającą radioterapię przeprowadzono na Oddziale Radioterapii Szpitala Zespołonego im. M. Kopernika w Łodzi. Rozległość zmian nowotworowych określono wg kryteriów WHO klasyfikacji TNM (2001).

Krew pełna była pobierana od pacjentów w trakcie rutynowych badań kontrolnych w ilości 10 ml jednorazowo na antykoagulant – heparynę litową (10 U/ml). Zgodę na wykonanie badań wyraziła Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (nr RNN/15/03/KN). Celem izolacji limfocytów krwi obwodowej krew pełna była pobierana od pacjentów w trakcie rutynowych badań kontrolnych w ilości 10 ml jednorazowo na antykoagulant – heparynę litową (10 V/ml). Zgodę na wykonanie badań wyraziła Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w dniu 14 stycznia 2002 r. (nr RNN/15/03/KN). Limfocyty krwi obwodowej były izolowane przez wirowanie w gradiencie gęstości Ficol-Paque (ciężar właściwy 1,077g/cm³)

(1800 obrotów/min, przez 30 minut, w temp. 20°C). Po przygotowaniu zawiesiny komórek o gęstości 1 x 10⁶ komórek, 100 μ L limfocytów mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej z odpowiednimi ilościami przeciwciał monoklonalnych (Becton-Dickinson): anti-HLADR/CD4, anti-HLADR/CD8; anti-CD4CD69, anti-CD8CD69; anti-CD4CD71, anti-CD8CD71; anti-CD4CD25, anti-CD8CD25; anti-CD4CD26, anti-CD8CD26; anti-CD8CD57. Po inkubacji i odpłukaniu (Cell Wash) komórki utrwalano płynem Cellfix (Becton-Dickinson). Do oceny stosowano cytometr przepływowy FACSCalibur z argonowym laserem 488 nm (Becton-Dickinson). Wyniki podawano jako odsetek analizowanych komórek, wykazujących obecność badanego receptora. Badania immunologiczne wykonano w Zakładzie Immunologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi.

Materiał tkankowy bezpośrednio po wykonanym zabiegu operacyjnym był utrwalany w roztworze 10% zbuforowanej formaliny. Wycinki z guza pierwotnego do badania mikroskopowego były pobierane standardowo. Jako miejsce reprezentatywne dla określenia głębokości nacieku nowotworowego wybierano punkt najgłębszego naciekania do ściany krtani i tkanek otaczających. Z każdego węzła pobierano jeden lub dwa wycinki, po uprzednim przecięciu węzła w jego największym wymiarze. Wycinki pobrane do badania zatopione były w bloczki parafinowe i rutynowo krojone na skrawki grubości 4–5 μ m (co najmniej 3–4 z guza pierwotnego i każdego węzła chłonnego), przyklejane na szkiełka podstawowe i dalej poddane zwykłej procedurze barwienia H&E. Ocenę histopatologiczną preparatów guza pierwotnego wykonano na podstawie kryteriów zmodyfikowanej wg własnego pomysłu klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny [8]. Oceniano 10 wykładników opisujących cechy histopatologiczne nowotworu (stopień rogowacenia, pleomorfizm jąder, figury podziału) oraz rodzaj reakcji guz – tkanki otaczające (głębokość i typ naciekania, obecność nacieku limfoidalnego i eozynofilowego, komórek wrzecionowatych, inwazję naczyń, obecność mikroprzerzutów). Preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym (pow. 200 x, liczbę mitoz pow. 400 x). Wynik przedstawiano jako sumę punktów w zastosowanej klasyfikacji, z maksymalną liczbą punktów 28. W analizie uwzględniono także pięć grup, w zależności od otrzymanej sumy punktów: 1 grupa: 7 ÷ 10, 2 grupa: 11 ÷ 15, 3 grupa: 16 ÷ 20, 4 grupa: 21 ÷ 25, 5 grupa >25 punktów (im wyższa grupa, tym bardziej zaawansowany proces nowotworowy).

W analizie statystycznej uzyskanych wyników zastosowano test jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, przy poziomie istotności p=0,05.

WYNIKI

Analizowana grupa chorych liczyła 33 osoby (30 mężczyzn – 90,9% i 3 kobiety – 9,1%). Wiek pacjentów wahał się od 48 do 78 lat (śr. 52 ± 2 lata). Zaawansowanie miejscowe procesu nowotworowego, zgodnie z kryteriami klasyfikacji TNM, w badanej grupie chorych określono jako: pT2 u 11 (33,3%), pT3 u 14 (42,4%), pT4 u 8 (24,3%) oraz pN0 w 27 (81,8%), pN+ w 6 (18,2%) przypadkach. 18 (54,5%) chorych zostało zakwalifikowanych do usunięcia całkowitego krtani, 15 (45,5%) pacjentów do częściowej operacji krtani. W 16 (48,5%) przypadkach wykonano ponadto operację węzłową. Najczęstszym typem histologicznym raka płaskonabłonkowego krtani były postacie średnio zróżnicowane G2 (27–81,8%). W ocenie morfologicznej węzłów chłonnych obecność przerzutów choćby do jednego węzła przyjmowano jako wykładnik rozprzestrzeniania nowotworu. Przerzuty do węzłów chłonnych stwierdzono u 6 (18,2%) chorych.

Analiza sumy punktów uzyskanych na podstawie oceny guza pierwotnego wg klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny wykazała, że suma punktów wahała się od 12 do 28 (średnio 14 pkt). Najliczniejszą grupę

wśród nowotworów stanowiły przypadki o liczbie $16 \div 20$ punktów – 16 chorych (48,5%). W badanym materiale dominowały raki naciekające i przekraczające granicę *lamina propria*. W analizowanej grupie pacjentów przeważały nowotwory charakteryzujące się naciekiem litymi wstęgami.

Średnie wartości odsetka komórek o fenotypie CD4+ i CD8+ oraz wykazujących ekspresję wybranych antygenów aktywacji wczesnej (CD69, CD71) i późnej (CD25, CD26 i HLA/DR) na powierzchni limfocytów T CD4+ i CD8+ przedstawiono w tabeli I.

Ocena statystyczna zależności wybranych cech kliniczno-morfologicznych z wynikami ekspresji wybranych antygenów aktywacji na limfocytach T CD4+ i CD8+ w układach komórkowych bez i ze stymulacją PHA wykazała:

1. istotny statystycznie związek cechy pT (wraz ze wzrostem rozległości zmian nowotworowych wzrastał poziom ekspresji antygenów aktywacji):

- z ekspresją antygeny HLADR na limfocytach CD4+ w układzie bez i ze stymulacją PHA ($p < 0,009$ i $p < 0,05$),
- z ekspresją antygeny CD69 na limfocytach CD8+ w układzie bez stymulacji PHA ($p < 0,01$),

Tabela I. Ekspresja wybranych antygenów aktywacji na limfocytach T CD4+ i CD8+

| Antygeny aktywacji | Średnia ekspresja [%] | Odchylenie standardowe [\pm SD] | Błąd standardowy średniej |
|--------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------------|
| HLADR/CD4 | 25,37 | 12,44 | 2,16 |
| HLADR/PHA/CD4 | 34,94 | 13,29 | 2,31 |
| HLADR/CD8 | 38,44 | 11,77 | 2,04 |
| HLADR/PHA/CD8 | 45,18 | 13,51 | 2,35 |
| CD4CD69 | 11,07 | 10,99 | 1,91 |
| CD4CD69PHA | 32,92 | 20,69 | 3,60 |
| CD8CD69 | 15,08 | 12,91 | 2,24 |
| CD8CD69PHA | 45,39 | 23,42 | 4,07 |
| CD4CD71 | 6,43 | 7,53 | 1,31 |
| CD4CD71PHA | 27,92 | 20,93 | 3,64 |
| CD8CD71 | 4,35 | 5,11 | 0,89 |
| CD8CD71PHA | 22,77 | 15,60 | 2,71 |
| CD4CD25 high | 1,30 | 0,67 | 0,11 |
| CD4CD25 total | 10,40 | 8,04 | 1,40 |
| CD4CD25PHA high | 2,79 | 1,95 | 0,33 |
| CD4CD25PHA total | 14,92 | 7,63 | 1,32 |
| CD8CD25 | 9,92 | 4,56 | 1,13 |
| CD8CD25PHA | 13,04 | 7,30 | 1,82 |
| CD4CD26 | 0,34 | 0,27 | 0,05 |
| CD4CD26PHA | 4,63 | 4,20 | 0,93 |
| CD8CD26 | 20,85 | 10,53 | 2,35 |
| CD8CD26PHA | 26,53 | 11,35 | 2,53 |
| CD8CD57 | 4,65 | 4,44 | 0,99 |
| CD8CD57PHA | 5,29 | 3,85 | 0,86 |
| CD4 | 34,60 | 7,16 | 1,24 |
| CD8 | 30,19 | 5,82 | 1,01 |

– z ekspresją antygeny CD71 na limfocytach CD8+ w układzie bez stymulacji PHA ($p < 0,01$).

– z ekspresją antygeny CD71 na limfocytach CD4+ w układzie bez stymulacji PHA ($p < 0,01$).

2. istotny statystycznie związek punktów klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny, uwzględniając podział na grupy (wraz ze wzrostem sumy zmniejszał się poziom ekspresji):

– z ekspresją antygeny CD25 na limfocytach CD4+ w układzie ze stymulacją PHA ($p < 0,004$).

3. istotny statystycznie związek zróżnicowania histopatologicznego guza G (wraz ze wzrostem cechy G wzrastał poziom ekspresji):

– CD71 na limfocytach CD8+ w układzie ze stymulacją PHA ($p < 0,02$).

Nie wykazano znaczącego statystycznie związku odsetka komórek o fenotypie CD4+ i CD8+ we krwi obwodowej oraz ekspresji antygenów pobudzenia na powierzchni limfocytów T CD4+ i CD8+ zarówno w układach bez stymulacji, jak i pod wpływem PHA z cechą pN ($p > 0,05$).

DYSKUSJA

Znaczenie prognostyczne nacieku limfocytarnego w podścielisku i samych guzach badano w wielu nowotworach [9–16]. W opracowaniach dotyczących raków głowy i szyi dominują prace podkreślające korzystny wpływ znaczenia prognostycznego nacieku limfocytarnego, złożonego głównie z limfocytów T. Według Wolfa i wsp. [16] naciek z tych komórek wykazywał znamiennej statystycznie korelację z czasem przeżycia. W badaniach Magnano i wsp. [17] wykazano, że liczba komórek T zarówno w samym guzie, jak i w jego otoczeniu zmniejszała ryzyko wystąpienia wznowy u chorych z rakami głowy i szyi. Hald i wsp. [12] stwierdzili, że większy naciek limfocytarny występował w nowotworach głowy i szyi o niższym stopniu zaawansowania. W badaniach dotyczących raka płaskonabłonkowego jamy ustnej udowodniono, że liczba limfocytów T w nacieku otaczającym guz jest niższa u pacjentów z wysokim stadium zaawansowania według klasyfikacji TNM oraz, że wykazuje związek z większą liczbą przerzutów w węzłach chłonnych. Inni badacze oceniający znaczenie aktywowanych limfocytów nie wykazali związku istotnego statystycznie między aktywowanymi limfocytami T a wielkością nacieku nowotworowego lub stopniem jego zróżnicowania [9].

Biorąc pod uwagę doniesienia dotyczące oceny proporcji różnych subpopulacji limfocytów, wyniki tych prac różnią się od siebie znacznie. Według Wolfa i wsp.

[16] naciek limfocytarny w utkaniu guza, w którym dominują limfocyty CD8+, był większy w nowotworach płaskonabłonkowych głowy i szyi o mniejszym stopniu zaawansowania, natomiast w nacieku otaczającym guz odsetki komórek CD8+ i CD4+ były zbliżone. W raku płaskonabłonkowym jamy ustnej uzyskano podobne wyniki. Większa liczba komórek CD8+ występowała w mniej zaawansowanych guzach i wykazywała ujemną korelację z obecnością przerzutów [18]. Odmienne wyniki przedstawili Żeromski i wsp. [19] w badaniach dotyczących raków krtani, tj. naciek z przewagą komórek CD4+ wykazywał odwrotną korelację z liczbą przerzutów w węzłach chłonnych. W badaniach tych samych autorów oceniających limfocyty izolowane z pierwotnych guzów krtani, wykazano, że większa liczba komórek CD8+ towarzyszyła mniej zaawansowanemu stadium choroby T1 i T2 [20]. W najnowszych badaniach tej samej grupy autorów stwierdzono, że w samym guzie dominowały limfocyty o fenotypie CD8+, natomiast na obrzeżu nowotworu dominowały limfocyty CD4+ [21]. Również w badaniach porównujących subpopulacje limfocytów w guzach pierwotnych i przerzutach w raku jamy ustnej uzyskano sprzeczne wyniki [22, 23]. Należy podkreślić, że w światowym piśmiennictwie wielu autorów wykazało jednoznacznie, że wśród limfocytów naciekających guz dominują komórki CD4+, a odwrócenie stosunku komórek CD4+/CD8+ wiąże się ściśle z przebiegiem klinicznym choroby nowotworowej [5].

Aktywacja limfocytów związana jest z obecnością na ich powierzchni markerów (antygenów) aktywacji: wczesnych (CD69, CD71), jak i późnych (CD25, CD26 i HLA/DR) [1, 2]. Antygen aktywacji CD69 jest markerem pojawiającym się najwcześniej w reakcji immunologicznej, ulegającym ekspresji na powierzchni aktywowanych komórek [1]. Stymulacja receptora TCR/CD3 powoduje szybką indukcję, po 2–4 godzinach, ekspresji CD69 na powierzchni limfocytów T, B, komórkach NK. Białko CD69 pełni rolę w przekazywaniu sygnału aktywującego syntezę IL-2 i IFN γ , jak też receptora IL-2R [2, 24]. Antygen CD71 jest także markerem wczesnego pobudzenia i proliferacji limfocytów T [1, 2]. Poprzez niekowalencyjne połączenie z receptorem TCR na limfocycie T odgrywa rolę w transdukcji sygnału [2]. Antygen CD25 występuje jako późny marker na powierzchni aktywnych limfocytów T i B oraz monocytach [2]. Cząsteczka CD25 jest także receptorem dla IL-2. Obecność miogenów lub obcych antygenów w środowisku limfocytów T powoduje ekspresję CD25 [25]. Antygen CD26, inaczej dipeptylopeptydaza IV, pojawia się jako późny marker aktywacji na wielu komórkach układu immunologicznego. Czynnikiem wiążącym się z tym antygenem

mogą być chemokiny i czynniki wzrostu. Uczestniczy w stymulacji limfocytów T, zależnej od CD2 i CD3. Bierze również udział w fosforylacji tyrozyny białek receptorowych, uczestniczących w transdukcji sygnałów przekazywanych przez TCR/CD3. Ponadto odgrywa istotną rolę w rozwoju nowotworów [26, 27]. Antygen HLA/DR jest markerem późnego pobudzenia (24 godziny po stymulacji) głównie limfocytów T i komórek NK, choć również ulega ekspresji na limfocytach B i makrofagach [2].

WNIOSKI

1. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* wykazano istotne statystycznie zależności między ekspresją antygenów aktywacji (wczesnej i późnej) na komórki limfocytach T CD4+ i CD8+ a cechami kliniczno-morfologicznymi guza nowotworowego.

2. Analiza danych wykazała istotny statystycznie związek cechy pT z ekspresją antygenów HLADR i CD71 na limfocytach CD4+ oraz istotnych korelacji między oceną guza wg klasyfikacji ABL a ekspresją antygeny CD25 na limfocytach CD4+.

3. W ocenie statystycznej nie potwierdzono istotnych zależności cechy pN z ekspresją badanych antygenów aktywacji.

4. Przeprowadzone badania wskazują na związek cechy G z ekspresją antygeny CD71 na limfocytach CD8+.

PIŚMIENNICTWO

- Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, i wsp. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 1997; 27(1): 71–76.
- Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an *in vitro* model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods* 2004; 293(1–2): 127–1242.
- Kowalski M. (red.): *Immunologia kliniczna cz. I. Immunologia ogólna*. Mediton 2002.
- Ito N, Nakamura H, Tanaka Y, Ohgi S. Analysis of T Helper Type 1 and 2 Cells and T Cytotoxic Type 1 and 2 Cells by Intracellular Cytokine Detection with Flow Cytometry. *Cancer* 1999; 1, 85(11): 2359–2367.
- Sheu B, Hsu S, Ho H, Lin R. Reversed CD4/CD8 Ratios of Tumor-Infiltrating Lymphocytes are Correlated with the Progression of Human Cervical Carcinoma. *Cancer* 1999; 86(8): 1537–1543.
- Sheu B, Lin R, Lien H, Ho H. Predominant Th2/Tc2 Polarity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Human Cervical Cancer. *J Immunol* 2001; 167: 2972–2978.
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1989; 18: 432–437.
- Starska K, Łukomski M, Lewy-Trenda I. The correlation of cytokeratin antigens expression in lymph nodes with the morphological features of the tumor front in laryngeal carcinoma – the prognostic significance of the Anneroth, Batsakis and Lunas' classification in the presence of micrometastases. *J Oncol* 2006; 56 3: 254–259.
- Ebert E, Brolin R, Roberts A. Characterization of activated lymphocytes in colon cancer. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 50: 72–81.
- Flamm J. The value of tumor-associated tissue inflammatory reaction in primary superficial bladder cancer. *Urol Res* 1990; 18: 113–117.
- Furihata M, Ohtsuki Y, Sonobe H. Prognostic significance of simultaneous infiltration of HLA DR-positive dendritic cells and tumor infiltrating lymphocytes into human esophageal carcinoma. *J Exp Med* 1993; 169: 187–195.
- Hald J, Rasmussen N, Claesson M. *In vivo* infiltration of mononuclear cells in squamous cell carcinoma of the head and neck correlates with ability to expand tumour-infiltrating T cells *in vitro* and with the expression of MHC class I antigens on tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1994; 39: 383–350.
- Hiratsuka H., Imamura M. Immunohistologic detection of lymphocyte subpopulations infiltrating in human oral cancer with special reference to its clinical significance. *Cancer* 1984; 53: 2456–2466.
- Magnano M, Bussi M, De Stefani A et al. Prognostic factors for head and neck tumor recurrence. *Acta Otolaryngol* 1995; 115: 833–838.
- Rivers JK, McCarthy SW, Shaw HM i wsp. Patients with thick melanomas surviving at least 10 years; histological, cytometric and HLA analyses. *Histopathology* 1991; 18: 339–345.
- Wolf GT, Hudson J, Peterson K, Miller H, Mc Clatchey K. Lymphocyte subpopulations infiltrating squamous carcinomas of the head and neck: Correlations with extent of tumor and prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1986; 95: 142–147.
- Magnano M, Bussi M, De Stefani A et al. Prognostic factors for head and neck tumor recurrence. *Acta Otolaryngol* 1995; 115: 833–838.
- Hirota J, Ueta E, Osaki T, et al. Immunohistologic study of mononuclear cell infiltrates in oral squamous cell carcinomas. *Head & Neck* 1990; 12: 118–125.
- Żeromski J, Szmeja Z, Rewers A, Kruk-Zagajewska A. Immunofluorescent assessment of tumor infiltrating cells in laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* 1986; 102: 325–332.
- Żeromski J, Pietrzak J, Szmeja Z, Jeżewska E, Górny M, Kruk-Zagajewska A. Evaluation of phenotype of mononuclear host

- cells isolated from primary tumor and peripheral blood of patients with laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* 1988; 105: 149–154.
21. Żeromski J, Dworacki G, Kruk-Zagajewska A, Szmeja Z, Jeżewska E, Kostecka J. Assessment of immunophenotype of potentially cytotoxic tumor infiltrating cells in laryngeal carcinoma. *Arch Immunol Ther Experim* 1993; 41: 57–62.
22. Horst HA, Horny HP. Tumor infiltrating lymphoreticular cells. Histologic and immunologic investigations performed on metastasing squamous cell carcinoma of head and neck. *Cancer* 1991; 68(2): 2397–2402.
23. Snyderman C, Heo D, Johnson J, D'Amico F i wsp. Functional and phenotypic analysis of lymphocytes in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117: 899.
24. Kozar K, Zagożdżon R. Aktywacja limfocytów. W: Immunologia. Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W. (red.), PWN, Warszawa 2004 176–191.
25. Gołąb J, Jakóbsiak M, Zagożdżon R, Obłąkowski P. Cytokiny. W: Immunologia. Gołąb J, Jakóbsiak M., Lasek W. (red.), PWN, Warszawa 2004: 176–191.
26. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2001; 54(3): 249–264.
27. Pro B, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol Histopathol* 2004; 19(4): 1345–1351.

Adres autora:

dr n. med. Katarzyna Starska
Katedra Otolaryngologii UM
Kopcińskiego 22
90-153 Łódź

Pracę nadesłano: 10.04.2008 r.

Zaakceptowano do druku: 04.08.2008 r.