

Analiza stężeń cytokin TNF α i IL-10 wydzielanych przez limfocyty T krwi obwodowej pod wpływem obecności komórek nowotworowych u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani

Katarzyna Starska¹, Marek Łukomski¹, Ewa Głowacka²

Cel pracy. Celem badań wstępnych była analiza wydzielania cytokiny prozapalnej TNF α i regulatorowej IL-10 w hodowli pierwotnej limfocytów T krwi obwodowej z komórkami nowotworowymi raka płaskonabłonkowego krtani.

Materiał i metody. Analizę wydzielanych cytokin w hodowlach mieszanych wyizolowanych limfocytów T, komórek nowotworowych centrum i obrzeża guza oraz nabłonka prawidłowego przeprowadzono u siedmiu chorych z rakiem krtani, leczonych w Klinice Laryngologii Onkologicznej UM w Łodzi w latach 2003-2005. Stężenie cytokin w supernatancie układów badawczych oznaczono metodą ELISA.

Wyniki. Badania wstępne wykazały, że komórki nabłonka prawidłowego krtani oraz centrum i obrzeża guza nowotworowego nie wydzielają IL-10 oraz TNF α . Obecność komórek nabłonka prawidłowego, jak i zmienionych nowotworowo komórek krtani w hodowli mieszanej zwiększa wydzielanie przez limfocyty T badanych cytokin prozapalnych i regulatorowych.

Wnioski. Przeprowadzone badania wstępne wskazują na wpływ obecności komórek nabłonka krtani na funkcję limfocytów T i regulację stężenia wydzielanych przez nie cytokin IL-10 i TNF α .

Analysis of concentration of cytokines TNF α and IL-10 secreted by peripheral blood lymphocytes T under influence of the tumor cells presence in patients with squamous cell laryngeal carcinoma

Aim. The aim of this study was to analyse proinflammatory TNF α and regulatory IL-10 cytokine secretion produced in primary cocultures of T lymphocytes with neoplasm cells in patients with laryngeal carcinoma.

Material and methods. We performed an analysis of cytokine levels in mixed cultures of lymphocytes T, central tumour cells, marginal tumour cells and normal epithelial cells. The material was obtained from seven patients with squamous cell carcinoma of the larynx treated at the ENT Department of the Medical University of Lodz between the years 2003 and 2005. For the estimation of the proinflammatory and regulatory cytokine secretion in supernatants we used the ELISA test.

Results. We found that normal epithelial cells of the larynx as well as cells from the centre and the margins of the tumour did not produced IL-10 and TNF α . The presence of the noncancerous cells and cancerous cells in cocultures with lymphocytes T is associated with the increased secretion of the monitored proinflammatory and regulatory cytokines.

Conclusion. The results of this preliminary study indicate that the presence of laryngeal squamous carcinoma cells and noncancerous epithelial cells in cultures with lymphocytes T exerts influence on their function and concentration of IL-10 and TNF α .

Słowa kluczowe: rak krtani, limfocyty T, IL-10, TNF α

Key words: laryngeal carcinoma, lymphocytes T, IL-10, TNF α

Wstęp

W wielu badaniach dotyczących roli cytokin w onkogenezie i patologii raków płaskonabłonkowych regionu głowy i szyi potwierdzono znaczenie regulatorowej IL-10 jako czynnika supresyjnego odpowiedzi immunologicznej, mającego wpływ na przebieg i prognozę u chorych leczonych z powodu choroby nowotworowej [1-11]. W dostępnym piśmiennictwie podkreśla się także wartość oceny ekspresji prozapalnej cytokiny TNF- α w analizie inwazyjności nowotworu i ryzyku powstawania przerzutów [1-11].

¹ Katedra Otolaryngologii, Klinika Laryngologii Onkologicznej UM w Łodzi

² Zakład Immunologii Klinicznej ICZMP w Łodzi

* Praca finansowana z funduszy Komitetu Badań Naukowych. Projekt KBN nr 3P05 C017 25

Wielu badaczy wskazuje na zasadniczą rolę układu odporności, tj. zarówno wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej w przebiegu procesu nowotworowego, jak również zmian immunologicznych zachodzących w mikrośrodowisku guza, które determinują jego agresywny wzrost i w ten sposób mogą warunkować rokowanie i efekty leczenia u pacjentów z chorobą nowotworową [1-16].

Celem przeprowadzonych badań wstępnych była analiza wydzielania wybranych cytokin prozapalnych (TNF- α) oraz regulatorowych (IL-10) przez limfocyty T krwi obwodowej, poddanych bezpośrednio oddziaływaniu komórek nowotworowych raka płaskonabłonkowego krtani.

Material i metody

Badania wstępne zostały przeprowadzone u siedmiu chorych na raka płaskonabłonkowego krtani, poddanych laryngektomii całkowitej i operacji węzłowej szyi lub leczeniu skojarzonemu, tj. chirurgicznemu i radioterapii. Chorzy byli operowani w Klinice Laryngologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2003-2005. Rozległość zmian nowotworowych określono według kryteriów WHO klasyfikacji TNM (2001). Analizowaną grupę chorych stanowiło 6 mężczyzn i 1 kobieta w wieku od 50 do 72 lat (śr. 58 ± 3 lata). Najlicniejszą grupę stanowili pacjenci z rakiem płaskonabłonkowym krtani, wywodzącym się z okolicy nadgłośnia i jednocześnie zajmującym wszystkie piętra krtani – 6 chorych oraz z IV stopniem zaawansowania procesu nowotworowego S – 4 pacjentów. Guzy T4 stanowiły 42,8%, a T3 – 57,2%. Najczęstszym typem histologicznym raka były postaci średnio- i niskozróżnicowane G2 i G3. Przerzuty do węzłów chłonnych stwierdzono u 4 chorych.

Celem izolacji limfocytów krwi obwodowej (PBMcs), krew pełna była pobierana w trakcie rutynowych badań kontrolnych, w ilości 10 ml jednorazowo na antykoagulant – heparynę litową (10U/ml). Zgodę na wykonanie badań wyraziła Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Nr RNN/15/03/KN). Limfocyty krwi obwodowej były izolowane przez wirowanie na gradiencie gęstości – *Ficoll-Paque* (ciężar właściwy 1,077 g/cm³). Komórki z centrum i obrzeża guza (TcC, TmC) oraz komórki niezmiennego nowotworowo nabłonka krtani (NCC) były izolowane z materiału pooperacyjnego pobranego aseptycznie, z co najmniej czterech różnych miejsc guza i z dwóch różnych miejsc niezmiennego nabłonka krtani. Następnie, natychmiast po wykonaniu laryngektomii tkanki przenoszono do jałowego podłoża z dodatkiem penicyliny, streptomycyny i gentamycyny w stężeniu 1% V/V. Po mechanicznym rozdrobieniu fragmenty tkanki płukano trzykrotnie płynem Hanksa (Biomed Lublin, Poland), a następnie zalewano roztworem enzymów kolagenazy i hialuronidazy o stężeniu 1 mg/ml (Sigma-Aldrich), z dodatkiem 2% V/V penicyliny i streptomycyny (*Sigma-Aldrich*, Germany) i inkubowano 18 h w temp. 37°C w atmosferze 5% CO₂ (*Cellstar Incubator*). Po inkubacji fragmenty tkanki płukano trzykrotnie w PBS bez jonów Ca⁺⁺ i Mg⁺⁺ (300 xg, 20 minut, w temp. 8°C), a następnie zalewano roztworem dyspaszy w stężeniu 2,4 U/ml, inkubowano 30 minut w temp. 37°C w atmosferze 5% CO₂, następnie komórki płukano jeden raz w PBS bez jonów Ca⁺⁺ i Mg⁺⁺, zawieszano w 1 ml PBS i przecierano przez sitko o mesh 50 (*Sigma-Aldrich*, Germany). Uzyskaną zawiesinę komórkową płukano trzykrotnie w PBS bez jonów Ca⁺⁺ i Mg⁺⁺ (300 xg, 14 min, w temp. 8°C). Gęstość komórek liczono przy użyciu komory Bürkera. Komórki martwe usuwano za pomocą zestawu *Dead Cell Removal* (Miltenyi Biotec). Czystość hodowli komórek nowotworowych w zawieszynie komórkowej oceniana była z zastosowaniem obiektywnych metod immunomorfologicznych (oznaczanie ekspresji

filamentów cytotkeratynowych metodą immunohistochemiczną). Dla określenia wpływu komórek raka płaskonabłonkowego krtani na funkcję limfocytów T przeprowadzono następujące interakcje: autologiczne limfocyty T krwi obwodowej i autologiczne komórki guza (MLTcC, MLTmC), autologiczne limfocyty T krwi obwodowej i autologiczne komórki niezmiennego nowotworowo nabłonka (MLNCC) w układach bez i ze stymulacją PHA. Komórki były inkubowane przez 21 godzin w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂. W nadsączach komórkowych (1 x 10⁶ komórek PBMcs i 1 x 10⁵ komórek nowotworowych) oceniono wydzielanie IL-10 i TNF α . Stężenie cytokin określone zostało metodą ELISA (*Enzyme Linked Immuno Absorbent Assay*) stosując zestawy BD optEIA firmy Pharmingen, postępując zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Absorbancję próbek odczytywano przy użyciu czytnika Elx808 (Bio-Tek Instruments, USA). Badania immunologiczne wykonano w Zakładzie Immunologii Klinicznej ICZMP w Łodzi. W analizie statystycznej uzyskanych wyników zastosowano nieparametryczny test U Mann-Whitney'a, przy poziomie istotności p=0,05.

Wyniki

Przeprowadzone badania wstępne pozwoliły na oznaczenie stężeń IL-10 i TNF α w wybranych układach bez stymulacji i po stymulacji PHA. Średnie stężenia cytokin IL-10 oraz TNF α w nadsączach hodowli limfocytów T krwi obwodowej w badanej grupie pacjentów z rakiem krtani przedstawia Tabela I. Nie stwierdzono wydzielania obu interleukin przez komórki nabłonka prawidłowego i nowotworowego krtani. Analizując stężenia wybranych cytokin w proponowanych hodowlach mieszanych limfocytów T i komórek nabłonka krtani, zanotowano wzrost wydzielania przez limfocyty T, zarówno IL-10, jak i TNF α , większy po stymulacji PHA (Tabela II i III). Analiza statystyczna stężeń wydzielanych cytokin przez limfocyty T w poszczególnych układach komórkowych wykazała znamienne statystycznie wzrost wydzielania

Tab. I. Wydzielanie IL-10 i TNF α przez limfocyty T krwi obwodowej w badanej grupie

Cytokina	Układ bez stymulacji		Układ po stymulacji PHA	
	Mediana [pg]	\pm SD	Mediana [pg]	\pm SD
IL-10	55,7	29,6	858,4	371,3
TNF α	71,1	68,7	763,9	395,5

Tab. II. Wydzielanie IL-10 w badanych układach komórkowych bez i po stymulacji PHA

Układy komórkowe	Układ bez stymulacji		Układ po stymulacji PHA	
	Mediana [pg]	\pm SD	Mediana [pg]	\pm SD
PBMcs	55,7	29,6	858,4	371,3
MLNCC	970,1	603,7	1633,4	807,1
MLTmC	632,7	412,3	1025,3	875,2
MLTcC	602,0	380,6	886,2	620,6

Tab. III. Wydzielanie TNF α w badanych układach komórkowych bez i po stymulacji PHA

Układy komórkowe	Układ bez stymulacji		Układ po stymulacji PHA	
	Mediana [pg]	\pm SD	Mediana [pg]	\pm SD
PBMCs	71,1	68,7	763,9	395,5
MLNCC	1049,7	188,3	1354,0	499,5
MLTmC	704,3	289,1	738,6	376,6
MLTCc	1163,0	232,9	1063,1	406,4

IL-10 przez limfocyty T w hodowli z komórkami nabłonka prawidłowego krtani, w porównaniu ze stężeniem tej cytokiny w nadsączach hodowli samych limfocytów T (PBMCs v MLNCC) ($p < 0,007$). Podobne wyniki zaobserwowano w układzie po stymulacji PHA ($p < 0,03$). Zanotowano także istotny statystycznie wzrost stężenia IL-10 w nadsączach hodowli limfocytów T z komórkami nabłonka nowotworowego krtani, zarówno centrum guza (PBMCs v MLTCc) ($p < 0,01$), jak i jego obrzeża (PBMCs v MLTmC) ($p < 0,01$), w porównaniu ze stężeniem IL-10 w nadsączach hodowli samych limfocytów T w układzie bez stymulacji. Zestawiając wartości stężeń TNF α w hodowlach mieszanych limfocytów T z komórkami guza nowotworowego zanotowano: znamienne statystycznie wzrost wydzielania TNF α przez limfocyty T krwi obwodowej w hodowli z komórkami nabłonka prawidłowego krtani, w porównaniu ze stężeniem tej cytokiny w nadsączach hodowli samych limfocytów T (PBMCs v MLNCC) ($p < 0,001$). Podobne wyniki otrzymano w układzie po stymulacji PHA ($p < 0,05$). Przeprowadzone badania wykazały także istotny statystycznie wzrost wydzielania w hodowli z komórkami centrum guza (PBMCs v MLTCc) ($p < 0,001$), jak też w hodowli z komórkami obwodu guza (PBMCs v MLTmC) ($p < 0,001$). Obecność PHA w badanych układach pozostawała bez znamienego wpływu na poziomy stężenie wydzielanej przez limfocyty T cytokiny ($p > 0,05$).

Dyskusja

W przedstawionej pracy badania wstępne, oceniające rolę obecności komórek nowotworowych w modyfikowaniu wydzielania wybranych cytokin regulatorowych i prozapalnych, wykazały wpływ komórek raka płaskonabłonkowego krtani na wzrost wydzielania *in vitro* IL-10 i TNF α przez limfocyty T. Zmiany w profilu produkowanych przez komórki immunokompetentne cytokin, zarówno występujących w mikrośrodku guza nowotworowego, jak i w surowicy krwi oraz wydzielanych przez komórki nowotworowe, wskazują na znaczenie oznaczania tych interleukin jako wskaźników odporności przeciwnowotworowej u chorych leczonych z powodu raków różnego pochodzenia, w tym regionu głowy i szyi [1-16]. Należy podkreślić, że w dostępnym piśmiennictwie tylko w pojedynczych pracach analizowano *in vitro* wydzielanie cy-

tokin w proponowanych w pracy układach badawczych z wykorzystaniem świeżych hodowli komórkowych [4, 9, 14]. Najczęściej badania przeprowadzane były na liniach nowotworowych komórkowych, które w oczywisty sposób mają ograniczoną wartość w ocenie mechanizmów i zjawisk zachodzących w warunkach *in vivo* i stanowią tylko model doświadczalny w odniesieniu do oceny komórek immunokompetentnych [1-4, 9, 14]. Wielu badaczy analizowało także poziomy wybranych cytokin prozapalnych, regulatorowych i proangiogennych w surowicy lub pełnej krwi chorych z rakami różnego pochodzenia [5-11, 15, 16].

Fukuyama i wsp. [1] oceniali w supernatantach hodowlanych efekt wydzielania wielu cytokin, m.in. IL-10 i TNF α , przez linie komórkowe w raku płuca i nie zaobserwowali produkcji TNF α przez komórki nowotworowe we wszystkich badanych przypadkach. Również braku wydzielania IL-10 przez komórki guza w badaniach linii komórkowych raka jajnika nie wykazali Toutirais i wsp. [14]. Chen i wsp. [9] przeprowadzając badania dotyczące oceny wydzielania wybranych cytokin przez linie komórkowe oraz w nadsączach świeżych hodowli komórkowych w rakach regionu głowy i szyi, nie zanotowali wydzielania m.in. TNF α , IL-4, IL10, IFN γ . Przedstawione spostrzeżenia potwierdzają również nasze badania, w których nie wykazaliśmy wydzielania IL-10, jak też TNF α przez komórki raka krtani. Wielu autorów jednak, zanotowało istotne wydzielanie tych cytokin w badaniach immunologicznych, przeprowadzanych w różnych nowotworach [1-11, 15, 16]. Bellone i wsp. [4] stwierdzili wzrost wydzielania IL-10 w nadsączach komórek raka trzustki, w tkance nowotworowej, jak również w surowicy krwi, w porównaniu z grupą kontrolną. Autorzy wskazali na znamienne związki poziomu badanych cytokin z czasem przeżycia analizowanych chorych. Pries i wsp. [2] także analizowali poziom stężeń profilu cytokin w nadsączach linii komórkowych raków głowy i szyi. Badacze potwierdzili supresyjne działanie IL-10 w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej w podścielisku guza. Również Jiang i wsp. [3], przeprowadzając badania na modelu zwierzęcym, wykazali istotny wzrost odsetka limfocytów T CD4+ i poziomu wydzielanej IL-10 wraz ze wzrostem zaawansowania zmian nowotworowych. Lathers i wsp. [5, 7] analizując ekspresję cytokin w surowicy pacjentów z zaawansowanym rakiem regionu głowy i szyi, wykazali znaczny wzrost profilu cytokinowego Th2, m.in. IL-10 oraz istotny związki poziomu cytokin ze stopniem zaawansowania zmian miejscowych, jak i węzłowych. Podobne spostrzeżenia przedstawił Sparano i wsp. [6] wykazując współzależność wyższego stopnia cechy T i N z podwyższonym poziomem IL-10. Pignataro i wsp. [8] także sugerują znaczenie regulacyjnych właściwości IL-10 w przebiegu raka krtani. Badacze potwierdzili nadekspresję IL-10 w surowicy krwi przed zastosowaniem leczeniem we wszystkich analizowanych przypadkach. Liczne prace dowodzą znaczenia IL-10 jako czynnika sprzyjającego powstawaniu przerzutów nowotworowych [5, 10, 11]. Nasze wyniki potwierdzają te spostrzeżenia. W ocenianej grupie chorych z wysokim stopniem zaawansowania

zmian nowotworowych (około 60% pacjentów z cechą N+) we wszystkich układach stwierdzono wzrost wydzielania IL-10 przez limfocyty. Chopra i wsp. [11] analizowali stężenie wybranych cytokin w surowicy krwi pacjentek leczonych z powodu raka szyjki macicy i potwierdzili istotny związek poziomu IL-6, TNF α oraz IL-8 i IL-10 z klinicznym stopniem zaawansowania zmian. Również Oka i wsp. [15] analizując poziom IL-6 w surowicy krwi w raku płaskonabłonkowym przetyku, stwierdzili znacząco wyższe stężenia badanej interleukiny w porównaniu z grupą kontrolną. Podobne wyniki przedstawił Ueda i wsp. [16] oceniając stężenie IL-1 β , IL-6, IL-8 oraz TNF α u chorych z potwierdzonymi przerzutami do wątroby w przebiegu raka jelita grubego.

Liczne badania dowodzą zatem, że analiza udziału komórek immunokompetentnych oraz stężeń wydzielanych przez nie cytokin, zmian w mechanizmach regulatorowych układu odporności, powstających pod wpływem działania różnych interleukin, może przyczynić się do lepszego poznania i zrozumienia przebiegu choroby nowotworowej oraz wykorzystania zdobytych doświadczeń dla zastosowania lepszych metod leczenia przeciwnowotworowego, w tym immunomodulacyjnego.

Wnioski

1. Nie stwierdzono wydzielania IL-10 i TNF α przez komórki nabłonka prawidłowego krtani oraz centrum i obrzeża guza nowotworowego w badanych układach komórkowych.
2. W badanych hodowlach mieszanych *in vitro* komórki raka płaskonabłonkowego krtani wykazują wpływ na aktywność limfocytów T krwi obwodowej, modyfikując wydzielanie przez nie cytokin prozapalnych IL-10 i regulatorowych TNF α .
3. Obecność w hodowli limfocytów T komórek prawidłowego nabłonka krtani oraz komórek centrum i obrzeża guza, powoduje zwiększone wydzielanie IL-10 i TNF α , szczególnie w kontakcie z komórkami nabłonka prawidłowego krtani.
4. Stymulacja PHA hodowli komórkowych w badanych układach nie wpływa na wzrost stężeń TNF α , wydzielanych przez limfocyty T krwi obwodowej.

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

Piśmiennictwo

1. Fukuyama T, Ichiki Y, Hamada S i wsp. Cytokine production of lung cancer cell lines: Correlation between their production and the inflammatory/immunological responses both *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Sci* 2007 [Epub ahead of print].
2. Pries R, Thiel A, Brocks C i wsp. Secretion of tumor-promoting and immune suppressive cytokines by cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo* 2006; 20: 45-8.
3. Jiang C, Ye D, Qiu W i wsp. Response of lymphocyte subsets and cytokines to Shenyang prescription in Sprague-Dawley rats with tongue squamous cell carcinomas induced by 4NQO. *BMC Cancer* 2007; 5, 7: 40.
4. Bellone G, Smirne C, Mauri FA i wsp. Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 11: 1-15.
5. 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: 220-8.
6. Sparano A, Lathers DM, Achilles N i wsp. Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131: 573-6.
7. Lathers DM, Achille NJ, Young MR. Incomplete Th2 skewing of cytokines in plasma of patients with squamous cell carcinoma of head and neck. *Hum Immunol* 2003; 64: 1160-6.
8. Pignataro L, Corsi MM, Sambataro G i wsp. Plasmatic cytokine network in patients with laryngeal carcinoma after surgical treatment. *Anticancer Res* 2001; 21: 3621-5.
9. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR i wsp. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1369-79.
10. Karcher J, Reissem C, Daniel V i wsp. Cytokine expression of transforming growth factor-beta2 and interleukin-10 in squamous cell carcinomas of the head and neck. Comparison of tissue expression and serum levels. *HNO* 1999; 47: 879-84.
11. Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Invest* 1998; 16: 152-9.
12. Pries W, Wollenberg B. Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 141-6.
13. Pries R, Nitsch S, Wollenberg B. Role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev. Anticancer Ther* 2006; 6: 1195-203.
14. Toutirais O, Chartier P, Dubois D i wsp. Constitutive expression of TGF-beta1, interleukin-6 and interleukin-8 by tumor cells as a major component of immune escape in human ovarian carcinoma. *Eur Cytokine Neww* 2003; 14: 246-55.
15. Oka M, Yamamoto K, Takahashi M i wsp. Relationship between serum levels of interleukin 6, various disease parameters and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 2776-80.
16. Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *J Gastroenterol* 1994; 29: 423-9.

Otrzymano: 3 lipca 2007 r.

Przyjęto do druku: 3 września 2007 r.