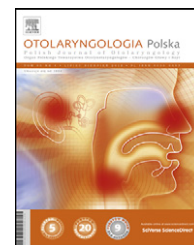


Dostępne online www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/otpol

Artykuł oryginalny/Original research article

Ocena ekspresji wybranych molekuł z rodziny B7 na powierzchni dojrzałych komórek dendrytycznych u chorych na raka krtani

The assessment of selected molecules belonging to B7 family on the mature dendritic cells in laryngeal cancer patients

Janusz Klatka¹, Ewelina Grywalska², Magdalena Wasiak¹, Paulina Wdowiak², Adrian Andrzejczak¹, Eliza Trzaskowska^{1,*}, Jacek Roliński²

¹Katedra i Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Poland

²Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Poland

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 02.04.2012

Zaakceptowano: 05.06.2012

Dostępne online: 09.06.2012

Słowa kluczowe:

- rak krtani
- B7-H1
- B7-H2
- B7-H4
- komórki dendrytyczne

Keywords:

- Laryngeal cancer
- B7-H1
- B7-H2
- B7-H4
- Dendritic cells

A B S T R A C T

B7-H1, B7-H2 and B7-H4 molecules play various roles in the adaptive immune system and are broadly expressed on many cells, especially those localized in cancer tissue. **The aim of the study** was to assess the surface expression of B7-H1, B7-H2 and B7-H4 molecules on the mature dendritic cells (DC) generated from peripheral blood monocytes of laryngeal cancer patients and healthy donors. **Material and methods:** Forty-four male patients treated surgically for squamous cell carcinoma of the larynx were included in the study. Peripheral blood from twelve healthy male donors was used as a control. Mononuclear cells were separated from all individuals by density gradient centrifugation, incubated with anti-CD14 microbeads, and passed through MACS separation columns. The CD14 positive cell population was used to prepare monocyte derived DC. Laryngeal cancer tissue was obtained from patients during surgical treatment and homogenized to prepare tumor cell lysates for further stimulation. We evaluated with the use of flow cytometry method the percentage of cells with an expression and mean fluorescent intensity (MFI) of surface markers, such as: CD83, B7-H1, B7-H2, B7-H4. **Results:** Our study revealed that the percentage of mature dendritic cells, stimulated with autologous tumor cell lysates, with the expression of B7-H1 molecule in patients was lower than in healthy donors ($61.81 \pm 25.58\%$ vs $93.02 \pm 4.63\%$, $p = 0.007$). In laryngeal cancer patients, the percentage of CD83+/B7-H2+ cells was higher than in healthy individuals ($18.32 \pm 10.74\%$ vs $2.89 \pm 0.43\%$, $p = 0.019$). **Conclusions:** There is a relation between the presence of laryngeal cancer and the expression of B7 family molecules.

© 2012 Polish Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery Society. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: Eliza Trzaskowska, Katedra i Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej UM, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin, Poland. Tel.: +48 605765554.

Adres email: trzasia@onet.eu (E. Trzaskowska).

0030-6657/\$ – see front matter © 2012 Polish Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery Society. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.otpol.2012.06.005>

Wstęp

Rak krtani jest obecnie najczęściej występującym nowotworem złośliwym w obrębie głowy i szyi, szczególnie u mężczyzn, u których stanowi istotną przyczynę śmiertelności [1]. Jego dominującym typem histologicznym jest rak płaskonabłonkowy [2]. Do radykalnych metod terapii raka krtani zaliczamy leczenie chirurgiczne i radioterapię. W zaawansowanych stanach stosuje się leczenie skojarzone [3]. Wybór metody jest indywidualny, a efekty mimo ciągłego rozwoju i doskonalenia klasycznych metod terapii pozostają niezadowalające [4, 5].

Przeprowadzone w ostatnim dziesięcioleciu badania kliniczne wskazują na istotną rolę czynników immunologicznych w przebiegu choroby nowotworowej u ludzi [6]. Niezadowalające wyniki leczenia, zwłaszcza zaawansowanych raków krtani, skłaniają do podjęcia badań nad opracowaniem efektywnych programów immunoterapeutycznych w ramach radykalnego leczenia skojarzonego. Podjęto liczne tego typu próby terapeutyczne m.in. z wykorzystaniem komórek dendrytycznych [7]. Niestety, nadal opracowanie optymalnej metody leczniczej przy użyciu komórek dendrytycznych (DC) nie zostało osiągnięte, między innymi z powodu niedokładnej znajomości biologii DC i wpływu antygenów nowotworowych na ich funkcje oraz ekspresję molekuł kostymulujących, niezwykle istotnych w interakcjach DC z innymi komórkami [8].

Molekuły B7-H1, B7-H2 i B7-H4 należą do nowo odkrytych białek immunomodulujących z rodziny B7. Molekuła B7-H1 wykazuje właściwości hamujące względem odpowiedzi immunologicznej ze strony limfocytów T [9]. Molekuła B7-H2, biorąca udział w interakcji z antygenem CD28, jest kluczowa dla wzbudzenia pierwotnej odpowiedzi immunologicznej ze strony ludzkich limfocytów T na antygeny allogeniczne oraz pobudzania komórek pamięci [10]. Molekuła B7-H4 natomiast została zidentyfikowana w 2003 r. jako cząsteczka kostymulująca, istotna w hamowaniu proliferacji limfocytów T oraz blokowaniu wytwarzania cytokin przez subpopulacje Th1 i Th2. Jej wysoka ekspresja na powierzchni komórek niektórych nowotworów powoduje, że może zostać uznana za marker karcynogenezy [11]. Dotychczas nie oceniano ekspresji wymienionych molekuł na komórkach dendrytycznych u osób chorych na płaskonabłonkowego raka krtani. Analiza ta wydaje się niezbędna z kilku powodów: pozwoli ocenić, czy od pacjentów z rakiem krtani można wygenerować w pełni sprawne immunologicznie DC, odpowiadające na antygeny nowotworowe, czy stymulowane lizatami komórek nowotworowych DC pacjentów różnią się od DC zdrowych dawców oraz które DC będą bardziej efektywne w odpowiedzi przeciwnowotworowej – auto- czy allogeniczne.

Celem pracy była ocena ekspresji cząsteczek B7-H1, B7-H2 i B7-H4 na powierzchni dojrzałych komórek dendrytycznych generowanych z monocytów krwi obwodowej chorych na raka krtani i zdrowych dawców. Ekspresję molekuł oceniono zarówno po stymulacji dojrzewania DC autologicznymi lizatami komórek nowotworowych, jak również na niestymulowanych DC zdrowych dawców.

Materiał i metody

Charakterystyka chorych na raka krtani

Materiał do badań uzyskano od 44 nieleczonych uprzednio chorych płci męskiej, z rozpoznaniem płaskonabłonkowym rakiem krtani, zakwalifikowanych do zabiegu operacyjnego celem resekcji nowotworu. Chorzy byli hospitalizowani w Katedrze i Klinice Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie w latach 2006–2010. Wiek badanych chorych wahał się od 41 do 73 lat (średnia $59,78 \pm 13,42$).

Charakterystyka grupy kontrolnej

Grupę kontrolną stanowiło 12 zdrowych mężczyzn, których wiek mieścił się w podobnych granicach do wieku pacjentów – od 45 do 71 lat (średnia $54,39 \pm 12,83$).

Wszystkie osoby, zarówno z grupy badanej jak i z grupy kontrolnej, w okresie 1 miesiąca poprzedzającego pobranie materiału nie przechodziły infekcji, nie stosowały antybiotykoterapii oraz innych leków mogących mieć wpływ na układ immunologiczny, nie miały także wykonywanej transfuzji krwi. Z badań wykluczono osoby zgłaszające w wywiadzie choroby alergiczne.

Badania zostały wykonane zgodnie z protokołem zaakceptowanym przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie.

Materiał do badań

Materiał badany stanowiła krew obwodowa pobierana z żyły odcinkowej w ilości 20 ml do jałowych strzykawek zawierających heparynę sodową (Polfa, Warszawa) w ilości 20 j/ml krwi. Wykorzystano ją do izolacji komórek mononuklearych. Od chorych na raka krtani podczas zabiegu operacyjnego uzyskano materiał tkankowy z guza, który po poddaniu homogenizacji, służył do stymulacji komórek dendrytycznych.

Izolacja komórek mononuklearych z krwi obwodowej

Krew obwodową rozcieńczano 0,9% zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej PBS bez soli wapnia i magnezu (Biochrome AG, Niemcy) w stosunku 1:1. Rozcieńczoną krew nawarstwiano na 3 ml Gradiolu L (Aqua Medica, Polska) o ciężarze właściwym 1,077 g/ml. Krew wirowano w gradience gęstości przez 20 minut przy przyspieszeniu 700 xg. Uzyskaną frakcję komórek jednojądrzastych zbierano i dwukrotnie płukano przez 5 minut w roztworze PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . Następnie wypłukane komórki zawieszano w 1 ml PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} oraz określano ich liczebność i żywotność.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3170937>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3170937>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)