

siveness (mean 12,5% $\pm$ 1,7 s.e.m. $P < 0,001$) before operation. Nine patients were tested several weeks after radical surgery and 7 showed a clear restoration of responsiveness. Twelve patients tested 2 years after radical treatment all showed normal monocyte chemotactic responses.

Chapter 3 describes the effect of LMWF's isolated from 14 head and neck cancer specimens on the "polarization" of healthy donor monocytes. All significantly inhibited monocyte polarization when used in a dilution of 1:10 (0.67 mg tumour tissue/ml). Healthy control factors only had normal effects on monocyte polarization, when tested in this dilution. The inhibitory effect of the tumour derived LMWF's could be neutralized by treating the factors with any of 3 different murine monoclonal antibodies to P15E. A rabbit polyclonal antibody was as effective. This again illustrates the relationship between tumour factors and P15E.

Chapter 4 reports the data of an indirect immuno-peroxidase assay, showing the presence of P15E-like material in surgical specimens of head and neck carcinomas. Thirty-five biopsy specimens were included in this study and all gave positive results. The P15E-like material was mostly distributed in the form of fusiform bands in the cytoplasm of malignant epithelial cells. 63% of other carcinomas (breast, bronchus and ovarium) and 91% of epithelia overlaying inflammatory responses in skin, gut and oral mucosa gave positive results as well. Healthy skin, gut and oral mucosa were invariably negative. This indicates that P15E-like material - though probably playing an important role in cancerous disease - does not seem to be specific for the malignant state.

In chapter 5 we describe the detection of P15E-like molecules in the circulation of head and neck cancer patients. Low molecular weight fractions of less than 25,000 Daltons prepared from the sera of nine patients were tested. All showed a significant inhibition of polarization of healthy donor monocytes. This inhibitory activity was neutralisable by a monoclonal antibody reactive to P15E.

Chapter 6 reports a study on the influence of five head and neck cancer derived LMWF's on the expression of delayed type skin reactions. Investigations were carried out in mice sensitized to the contact allergen Dinitro-Fluoro-Benzene (DNFB). The factors were injected 24 hrs prior to skintesting. The LMWF's appeared to inhibit the skintests, particularly at 24 hrs. Toxic skin reactions to croton oil were equally affected and this shows the aspecificity of the suppressive effect exerted by the factors. The monoclonal antibodies to P15E again abolished the effects of the tumour factors.

In conclusion, this study clearly confirms our earlier findings that monocyte chemotactic responsiveness of patients with head and neck carcinomas is defective. Factors antigenically and physicochemically related to murine P15E are produced by the tumour and detectable in the circulation of the patients; these factors can be held responsible for the suppressive effects. Although the number of patients tested in this study is small, the findings might point to a clinical applicability of the polarization assay; an early detection of tumour growth or recurrences might come in reach by the "titration" of P15E-like molecules in the circulation of patients. The P15E-like molecules, produced by the head and neck cancers are not specific for malignant growth. They were also found in nondividing epithelial cells overlaying inflammatory responses and in thymus epithelial cells. Its precise role and relation to growth factors, oncogenes, animal retroviruses and thymic hormones needs further clarification.

CHAPTER 9

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Dit proefschrift beschrijft de invloed van hoofd/hals tumoren en van laag moleculaire factoren, afgeleid van deze tumoren, op het chemotactisch vermogen van de mononucleaire fagocyten.

In de introductie wordt een kort overzicht gegeven van de literatuur betreffende de relatie tussen het mononucleaire fagocyten systeem en hoofd/hals tumoren. De aanwezigheid van deze tumoren induceert een duidelijke verstoring van verscheidene functies van de mononucleaire fagocyten en met name van het chemotactisch vermogen van deze cellen. Er wordt beschreven dat laag moleculaire factoren, afgeleid van tumoren, verantwoordelijk zijn voor deze gestoorde functie. Deze factoren blijken gerelateerd te zijn aan P15E. P15E is een structurele component van het kapsel van dierlijke retrovirussen (leukemie virussen van katten en muizen) en is bekend om zijn immunosuppressieve werking.

Dit proefschrift behandelt de volgende experimentele vragen:

- *Is de onlangs ontwikkelde zgn. "polarisatie assay" bruikbaar voor het meten van verstoringen in het chemotactisch vermogen van monocyten bij patiënten met hoofd/hals tumoren? Is er sprake van een herstel van deze functie na radicale behandeling van de tumor?* (Hoofdstuk 2)
- *Is de polarisatie assay met gezonde donor monocyten een bruikbare methode om het effect te testen van laag moleculaire factoren geïsoleerd van hoofd/hals tumoren? Kan dit effect geneutraliseerd worden met monoclonale antilichamen gericht tegen P15E?* (Hoofdstuk 3)
- *Kunnen retrovirale producten, zoals P15E en GP70 worden aangetoond in weefselcoupons van hoofd/hals tumoren met behulp van immuno-histochemische technieken?* (Hoofdstuk 4)
- *Kan P15E-achtig materiaal worden aangetoond in sera van patiënten met hoofd/hals tumoren?* (Hoofdstuk 5)
- *Zijn van hoofd/hals tumoren afgeleide laag moleculaire factoren, die het chemotactisch vermogen van de monocyten kunnen beïnvloeden, ook in staat huidtest reacties van het vertraagde type te onderdrukken?* (Hoofdstuk 6)

Hoofdstuk 2 beschrijft de onlangs ontwikkelde "polarisatie assay", die gebruikt wordt voor de meting van het chemotactisch vermogen van de monocytën. Deze methode blijkt sneller en makkelijker uitvoerbaar te zijn dan de eerder gebruikte "Boyden Chamber" methode (migratie door millipore membranen). Deze laatste methode werd door Balm et al gebruikt tijdens vroegere studies naar de chemotaxis van monocytën bij patiënten met hoofd/hals tumoren. De gegevens die met de beide bovengenoemde methoden werden verkregen kwamen goed met elkaar overeen ($P < 0,005$; $r = 0,71$). Gebruikmakend van de polarisatie assay werden de perifere bloedmonocytën van 24 patiënten met hoofd/hals tumoren getest op hun migratie capaciteit. Alle toonden voor de operatie een verminderde chemotactische respons (gemiddeld $12,5\% \pm 1,7$ s.e.m. $P < 0,001$).

9 Patiënten werden enkele weken na radicale chirurgie getest. Hiervan werd bij 7 een duidelijke verbetering van de chemotaxie gezien. Bij 12 patiënten die twee jaar na radicale therapie werden getest bleek het chemotactisch vermogen weer normaal te zijn.

Hoofdstuk 3 beschrijft het effect van laag moleculaire factoren (molecuul gewicht < 25.000 Daltons), afgeleid van 14 hoofd/hals tumoren op de polarisatie van gezonde donor monocytën. In alle gevallen werd een significante remming van de monocytën polarisatie gevonden bij een verdunning van 1 : 10 (0,67 mg tumor weefsel per ml). Gezonde controle factoren hadden nauwelijks effect op de monocytën polarisatie in deze verdunning. Het remmend effect kon worden geneutraliseerd door de tumor factoren te behandelen met 3 verschillende muizen monoclonale antilichamen gericht tegen P15E. Een konijnen polyclonaal antilichaam gericht tegen P15E had een zelfde neutraliserend effect. Deze bevindingen wijzen wederom op de relatie tussen deze tumor factoren en P15E.

In hoofdstuk 4 wordt met behulp van indirecte immunoperoxidase technieken de aanwezigheid van P15E-achtig materiaal onderzocht in tumor preparaten van hoofd/hals tumoren. Er werden 35 preparaten onderzocht. In alle preparaten kon dit materiaal worden aangetoond. Het bleek hoofdzakelijk gelocaliseerd te zijn in de vorm van ringvormige banden in het cytoplasma van maligne epitheliale cellen. Bij 63% van andere tumoren (mamma, bronchus en ovarium carcinomen) en in 91% van ontstoken weefsel van huid, orale mucosa en darm werd eveneens reactiviteit gevonden in de epitheliale gebieden. In gezond epitheel van huid, mucosa en darm werd geen reactiviteit gevonden. Dit toont aan dat, hoewel het P15E-achtig materiaal een belangrijke rol speelt bij maligniteiten, het niet specifiek blijkt te zijn voor maligne groei.

In hoofdstuk 5 wordt gezocht naar de aanwezigheid van aan P15E gerelateerd materiaal in de circulatie van patiënten met hoofd/hals tumoren. Laag moleculaire factoren (molecuulgewicht < 25.000 Daltons), bereid uit de sera van 9 patiënten werden getest. Alle toonden een significante remming van de polarisatie van gezonde donor monocytën. Dit remmende effect kon worden geneutraliseerd met een monoclonaal antilichaam gericht tegen P15E.

Hoofdstuk 6 beschrijft een onderzoek naar de invloed van 5 laag moleculaire hoofd/hals tumor factoren op de huidtest reactie van het vertraagde type. Deze experimenten werden uitgevoerd met muizen die gesensibiliseerd waren met het contact allergeen Dinitro-Fluoro-Benzeen (DNFB). De factoren werden 24 uur voor de huidtest geïnjecteerd.

Er werd een significante remming gevonden van de huidreactie, vooral na 24 uur. De toxische huidreactie onder invloed van Croton olie werd op identieke wijze geremd onder invloed van deze tumor factoren. Dit toont aan dat de remmende werking op de huidtest reactie specifiek is. Monoclonale antilichamen gericht tegen P15E konden wederom het effect van de tumor factoren neutraliseren.

Concluderend kan gesteld worden dat deze studie onze eerdere bevindingen duidelijk bevestigt en aantoont dat het chemotactisch vermogen van de monocytën van patiënten met hoofd/hals tumoren verstoord is. De tumoren produceren laagmoleculaire factoren die zowel antigeen als fysisch/chemisch gerelateerd zijn aan het muizen P15E. Deze factoren, die aantoonbaar zijn in de circulatie, kunnen voor een groot gedeelte voor deze verstoring verantwoordelijk worden gesteld.

Hoewel het in deze studie om een beperkt aantal patiënten gaat, wijzen de bevindingen toch mogelijk op een klinische toepasbaarheid van de polarisatie assay. De vroege detectie van maligne groei of recidieven wordt wellicht mogelijk door de "titratie" van P15E-achtig materiaal in het serum van deze groep patiënten.

Het P15E-achtig materiaal bleek niet specifiek te zijn voor maligne groei en kon ook worden aangetoond in niet delende cellen van het epitheel bij ontstekings reacties en in epitheliale cellen van de thymus. De precieze rol en de relatie tot groeifactoren, oncogenen, dierlijke retrovirussen en thymus hormonen zal nader onderzocht moeten worden.