

Ocena limfocytów T regulatorowych, cytotoksycznych i komórek dendrytycznych u chorych na raka jajnika przed oraz po menopauzie

Assessment of regulatory T cells, cytotoxic lymphocytes and dendritic cells in ovarian cancer patients before and after menopause

Justyna A. Surówka, Iwona Wertel, Grzegorz Polak, Karolina Okła, Monika Bilaska, Jan Kotarski

I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

Streszczenie

Cel: Celem pracy była ocena odsetka limfocytów T regulatorowych (Treg), cytotoksycznych CD8⁺ oraz mieloidalnych (M) i plazmocytoidalnych (P) komórek dendrytycznych (DC) we krwi obwodowej i płynie otrzewnowym (PO) chorych na raka jajnika z uwzględnieniem statusu menopauzalnego pacjentek.

Materiały i metody: Materiał badany stanowiła krew obwodowa (n=74) oraz PO (n=57) uzyskane od chorych na raka jajnika. Odsetek Treg, MDC, PDC oraz limfocytów cytotoksycznych oceniono metodą cytometrii przepływową. Analizy statystycznej dokonano przy użyciu programu Statistica 10.0 PL.

Wyniki: Odsetek Treg był istotnie wyższy w PO chorych przed menopauzą w porównaniu do chorych po menopauzie, natomiast we krwi obwodowej nie różnił się istotnie. U kobiet przed i po menopauzie odsetek Treg w PO był istotnie wyższy niż we krwi obwodowej. Odsetek MDC, PDC oraz limfocytów cytotoksycznych nie różnił się istotnie u chorych przed i po menopauzie, zarówno we krwi obwodowej jak i w PO. Odsetek MDC, PDC i limfocytów CD8⁺ był istotnie wyższy w PO w porównaniu do krwi obwodowej.

Wnioski: Przeprowadzone badania wskazują na akumulację Treg w płynie otrzewnowym chorych na raka jajnika, zarówno przed jak i po menopauzie. Szczególnie zjawisko to jest nasilone u chorych przed menopauzą. Status menopauzalny chorych na raka jajnika nie wpływa na zmiany w odsetkach MDC, PDC i limfocytów cytotoksycznych we krwi obwodowej i w PO.

Słowa kluczowe: rak jajnika / menopauza / limfocyty T regulatorowe /
/ komórki dendrytyczne / limfocyty cytotoksyczne /

Autor do korespondencji:

Justyna A. Surówka

I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

20-081 Lublin, ul. Staszica 16, Polska

tel. 81 53278 47, fax 81 5320608

e-mail: justyna.surowka@gmail.com

Otrzymano: 22.10.2015

Zaakceptowano do druku: 13.11.2015

Justyna A. Surówka et al. Ocena limfocytów T regulatorowych, cytotoksycznych i komórek dendrytycznych u chorych na raka jajnika przed oraz po menopauzie.

Abstract

Objectives: The aim of the study was to assess the percentage of regulatory T cells (Treg), myeloid (M) and plasmacytoid (P) dendritic cells (DC), and cytotoxic CD8⁺ T cells in the peripheral blood (PB) and peritoneal fluid (PF) of patients with ovarian cancer with reference to their menopausal status.

Materials and methods: Peripheral blood (n=74) and peritoneal fluid (n=57) samples were obtained from ovarian cancer patients. The percentage of Treg, MDC, PDC, and cytotoxic T cells was assessed using flow cytometry. Statistical analysis was performed using Statistica 10.0 PL software.

Results: The percentage of Treg was significantly higher in PF of the premenopausal patients, but no such difference was observed in the peripheral blood. In the post- and pre-menopausal patients, the percentage of Treg was significantly higher in the peritoneal fluid than in PB. The percentage of MDC, PDC, and cytotoxic T cells, both in PB and PF, did not differ significantly between the pre- and post-menopausal subjects. The percentage of MDC, PDC, and cytotoxic T cells was higher in PF than PB.

Conclusions: The results of the study show an accumulation of Treg in the peritoneal fluid of the pre- and post-menopausal ovarian cancer patients. A higher percentage of Treg has been observed especially in the premenopausal women. The menopausal status of women with ovarian cancer does not influence the percentage of MDC, PDC, and cytotoxic T cells in both, the peripheral blood and the peritoneal fluid.

Key words: **ovarian cancer / menopause / regulatory T cells / dendritic cells / cytotoxic T cells /**

Wstęp

Rak jajnika jest nowotworem ginekologicznym o wysokiej śmiertelności. Standaryzowany współczynnik umieralności (Age-Standardised Rate ASR) w Polsce w 2010 wynosił 7/10⁵. Pomimo postępu w leczeniu chirurgicznym oraz farmakologicznym umieralność z powodu raka jajnika w Polsce nie zmniejsza się (ASR 1980: 6,5/10⁵, ASR 1990: 6,8/10⁵, ASR 2000: 6,7/10⁵, ASR 2010: 7/10⁵) [1]. Odpowiedź kliniczna u chorych jest zależna od stopnia zaawansowania choroby wg FIGO (*Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa*) oraz typu histologicznego diagnozowanych guzów [2,3].

Badania ostatnich lat skupiają się na poznaniu wpływu układu odpornościowego na rozwój i przebieg choroby. Uważa się, że odpowiedź immunologiczna przeciwko komórkom raka jajnika jest hamowana przez szereg mechanizmów immunosupresyjnych w mikrośrodowisku guza. Jednym z elementów tego środowiska są limfocyty T regulatorowe (Treg) oraz komórki dendrytyczne (DC) [4].

Populacja komórek Treg o fenotypie CD4⁺CD25⁺ została po raz pierwszy opisana w roku 1995 przez Sakaguchi i wsp. [5]. Ze względu na pochodzenie wyróżnia się naturalne limfocyty Treg, które powstają w grasicy oraz Treg indukowane na obwodzie. Treg powstające w grasicy cechuje stała, wysoka ekspresja podjednostki α receptora dla IL-2 (CD25) [6,7]. Ponadto charakterystyczna dla tej populacji komórek jest ekspresja czynnika transkrypcyjnego FoxP3, który warunkuje regulacyjne właściwości Treg [8].

Wykazano, że naturalnie występujące Treg o fenotypie CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ wywierają działanie immunosupresyjne poprzez bezpośredni kontakt pomiędzy komórkami [9,10]. Natomiast indukowane na obwodzie Treg, w tym komórki Tr1 i Th3, hamują odpowiedź immunologiczną za pośrednictwem immunosupresyjnych cytokin: IL-10 i TGF-beta [10,11].

Większość danych na temat wpływu Treg na odporność przeciwnowotworową dotyczy guzów litych. Obserwowano zwiększenie odsetka limfocytów Treg, zarówno w mikrośrodowisku

wisku guza nowotworowego, jak również we krwi obwodowej chorych na nowotwory, takie jak: rak przewodu pokarmowego, piersi, trzustki, wątroby, czerniak czy nowotwory głowy i szyi [12]. Badania Curiel i wsp. wykazały zarówno zwiększenie odsetka komórek Treg, jak też ich supresyjny wpływ na swoistą odpowiedź przeciwnowotworową u chorych na raka jajnika. Ponadto wysoki odsetek Treg korelował z krótkim czasem przeżycia chorych [13].

Mechanizmy wpływające na akumulację i różnicowanie Treg u chorych na raka jajnika nie są do końca poznane. Pojawiają się doniesienia sugerujące możliwy wpływ gospodarki hormonalnej oraz wieku na różnicowanie Treg [14,15]. Podkreślić ponadto należy, że Treg pozostają w ściślejszej zależności z innymi komórkami układu immunologicznego obecnymi w mikrośrodowisku guza, m. in. komórkami dendrytycznymi [4].

DC stanowią heterogenną populację komórek układu odpornościowego, które są zaangażowane w prezentację antygenów limfocytom efektorowym. W pewnych warunkach DC mogą także hamować odpowiedź immunologiczną. Niedojrzałe DC (iDC) charakteryzuje obniżona ekspresja antygenów MHC II oraz molekuł kostymulacyjnych, takich jak CD40, CD86 czy OX40L. Brak odpowiednich sygnałów dojrzewania sprawia, że komórki te prezentują antygeny limfocytom efektorowym w kontekście sygnałów koinhibitorowych, przyczyniając się tym samym do powstania tolerancji immunologicznej na antygeny nowotworowe [16].

Klasyczny podział DC pozwala wyodrębnić mieloidalne (M) oraz plazmacytoidalne (P) komórki dendrytyczne [17]. MDC odpowiadają za polaryzację odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1. Ponadto wykazano, że mogą one indukować różnicowanie limfocytów Th17, których obecność może stanowić pozytywny czynnik prognostyczny u chorych na raka jajnika [18]. PDC wydzielają duże ilości INF- α i tym samym biorą udział w odporności przeciwwirusowej [19]. Natomiast ich rola w odpowiedzi przeciwnowotworowej nie jest jasna. Wykazano, że obecność PDC w mikrośrodowisku raka jajnika wiąże się

Justyna A. Surówka et al. Ocena limfocytów T regulatorowych, cytotoksycznych i komórek dendrytycznych u chorych na raka jajnika przed oraz po menopauzie.

z gorszą odpowiedzią kliniczną [20]. Podejrzewa się, że PDC mogą stymulować różnicowane komórki regulatorowych, hamując tym samym odpowiedź przeciwnowotworową [21].

Cel

Celem pracy była ocena odsetka Treg, MDC, PDC a także limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ we krwi obwodowej i PO chorych na raka jajnika z uwzględnieniem statusu menopauzalnego pacjentek.

Materiał i metody

Z grupy 184 kobiet z podejrzeniem raka jajnika, operowanych w I Katedrze i Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii UM w Lublinie w latach 2008-2014, wybrano grupę badaną (n=74). Kryterium ostatecznej kwalifikacji do grupy badanej było potwierdzone histopatologicznie rozpoznanie raka jajnika, brak cech infekcji i nie przyjmowanie leków mających wpływ na układ odpornościowy. Pacjentki nie otrzymywały wcześniej leczenia przeciwnowotworowego. Z badań wykluczono pacjentki podające w wywiadzie choroby alergiczne i autoimmunologiczne. Szczegółową charakterystykę badanej grupy przedstawiono w Tabeli I. Badany materiał stanowiła krew obwodowa oraz PO, którego obecność stwierdzono w jamie brzusznej 57 pacjentek. Pacjentki podzielono na dwie grupy w zależności od ich statusu menopauzalnego. Pierwszą grupę stanowiły chore przed menopauzą (n=20), a drugą kobiety po menopauzie (n=54). Pacjentki wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniu. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie (Numer KE-0254/138/2008).

Metodyka

Krew obwodową w ilości 10 ml pobierano do heparynizowanych probówek w dniu poprzedzającym zabieg operacyjny. Natychmiast po pobraniu krew rozcieńczano 0,9% zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS, PAA Laboratories GmbH, Austria) bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ w proporcji 1:1, a następnie nawarstwiano na preparat Gradisol L (Aqua Medica, Łódź) i wirowano w gradiencie gęstości przez 20 min. przy przyspieszeniu 700 xg. Komórki z interfazy zbierano i płukano dwukrotnie w roztworze PBS. Następnie komórki zawieszano w 1 ml PBS i oceniano ich liczbę (w komorze Neubauera) oraz żywotność (barwienie błękitem trypanu – 0,4% Trypan Blue Solution, Sigma-Aldrich, Niemcy). Żywotność poniżej 95% stanowiła kryterium dyskwalifikujące prowadzenie dalszych badań.

PO pobierano w trakcie operacji. Do badań wykorzystano płyny otrzewnowe barwy słomkowej lub żółtej bez oznak hemolizy. Ilość pobranego PO wynosiła od 10-20 ml. Komórki jednojądrzaste PO izolowano, w czasie nie dłuższym, niż 10 minut od pobrania, metodą wirowania w gradiencie gęstości w Gradisolu L (Aqua Medica, Łódź). Objętość użytego płynu do izolacji odnoszono do objętości PO, zachowując proporcje 3:5. Przygotowane próbki wirowano w temp. 21°C z przyspieszeniem 700 xg przez 20 minut. Wyizolowane komórki jednojądrzaste tworzące widoczny pierścień na granicy faz przenoszono do nowych probówek i płukano dwukrotnie 0,9% PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ poprzez wirowanie z przyspieszeniem 700 xg przez 5 minut. Następnie komórki zawieszano w 1 ml PBS i oceniano ich liczbę oraz żywotność. Żywotność poniżej 95% stanowiła kryterium dyskwalifikujące prowadzenie dalszych badań.

Tabela I. Charakterystyka grupy badanej.

Charakterystyka grupy badanej	Liczba pacjentek (%)
Stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO	
I	8 (10,8%)
II	17 (23,0%)
III	34 (45,9%)
IV	15 (20,3%)
Typ raka jajnika wg Kurmana i Shiha[3]	
I	31 (41,9%)
II	43 (58,1%)
Status menopauzalny	
przed menopauzą	20 (27,0%)
po menopauzie	54 (73,0%)
Odstęp czasowy od ostatniej miesiączki (lata)	
>10	25 (46,3%)
<10	29 (53,7%)
Inne cechy grupy badanej	Mediana (Min-Max)
Wiek	55 (22-85)
Liczba przeżytych porodów	2 (0-6)

Uzyskane w opisany powyżej sposób komórki jednojądrzaste krwi obwodowej oraz PO, dzielono na 2 porcje. Jedną porcję świeżo wyizolowanych komórek wykorzystywano do oceny DC i limfocytów cytotoksycznych, drugą zawieszano w pożywce hodowlanej RPMI 1640 (PAA, Austria) z dodatkiem 20% albuminy (Baxter, Poland) i 10% DMSO (Sigma-Aldrich, USA) i zamrażano w -80°C do czasu przeprowadzenia oznaczeń limfocytów Treg.

Oznaczanie odsetka limfocytów T regulatorowych we krwi obwodowej i w płynie otrzewnowym

Zamrożone komórki jednojądrzaste rozmrażano przez zawieszenie w pożywce RPMI 1640 z 10% dodatkiem CTL Wash Supplement i poddawano dwukrotnemu płukaniu. Następnie zawieszano je w 1ml PBS w celu dalszej oceny liczebności i żywotności. Żywotność poniżej 95% stanowiła kryterium dyskwalifikujące prowadzenie dalszych badań. Biorąc pod uwagę żywotność komórek limfocyty Treg oznaczono u 65 pacjentek.

Do oceny limfocytów T regulatorowych wykorzystano zestaw Human Treg Flow™ Kit (Biolegend, USA), zawierający następujące przeciwciała monoklonalne:

- anty-CD4 PE-Cy5 znakujące populację limfocytów T pomocniczych (Th) CD4⁺
- anty-CD25 PE w celu wykrycia ekspresji receptora dla IL-2
- anty-FoxP3 Alexa Fluor®488 w celu wykrycia wewnątrzkomórkowej ekspresji białka FoxP3.

Justyna A. Surówka et al. Ocena limfocytów T regulatorowych, cytotoksycznych i komórek dendrytycznych u chorych na raka jajnika przed oraz po menopauzie.

Tabela II. Odsetek MDC, PDC oraz limfocytów cytotoksycznych we krwi obwodowej i PO u chorych na raka jajnika.

Zmienna	Krew obwodowa			Płyn otrzewnowy			p
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max	
% MDC	0,19	0,03	0,71	0,87	0,04	3,34	<0,0001
% PDC	0,19	0,02	0,88	1,19	0,07	6,85	<0,0001
MDC/PDC	0,85	0,05	5,60	0,68	0,06	8,30	>0,05
% CD8	32,03	0,95	72,66	35,05	1,01	87,84	0,02

W pierwszej kolejności na komórkach jednojądrzastych znakowane były antygeny powierzchniowe (CD4 i CD25). Następnie komórki poddawano procesowi 20 minutowej permabilizacji za pomocą roztworu Fix/Perm (Biolegend, USA). W dalszej kolejności komórki były dwukrotnie płukane roztworem Cell Staining Buffer (Biolegend, USA) i wirowane z prędkością 250xg/5 min. Następnie przeprowadzano 15 minutową inkubację z roztworem Perm Buffer (temp. pokojowa, w ciemności). Po tym czasie komórki były ponownie dwukrotnie odpłukiwane (250xg/5 min.) roztworem Cell Staining Buffer (Biolegend, USA). W kolejnym etapie komórki poddawano wewnątrzkomórkowemu znakowaniu przeciwciałem anti-FoxP3 (30 min. w temp. pokojowej, w ciemności). Po dwukrotnym płukaniu (250xg/5 min.) roztworem Cell Staining Buffer (Biolegend, USA) komórki oceniano w cytometrze przepływowym FACSCanto firmy Becton Dickinson (USA). Limfocyty Treg określane były jako odsetek komórek CD25^{high}/FoxP3⁺ w całkowitej puli limfocytów CD4⁺.

Analiza cytometryczna MDC, PDC i limfocytów cytotoksycznych CD8⁺

Biorąc pod uwagę żywotność komórek, DC i limfocyty cytotoksyczne oceniono u 74 chorych. Oceny cytometrycznej dokonano z użyciem przeciwciał monoklonalnych: anti-CD3 FITC, anti-CD8 APC-Cy7, anti-CD19 PE-Cy5, anti-CD123 PE-Cy7, anti-BDCA-1 FITC, anti-BDCA-2 FITC. MDC zidentyfikowano jako komórki BDCA-1(CD1c)⁺CD19⁻, PDC zidentyfikowano jako BDCA-2⁺CD123⁺ [22]. Wyniki przedstawiono jako odsetek wśród komórek jednojądrzastych. Limfocyty cytotoksyczne zidentyfikowano jako komórki CD3⁺CD8⁺, a wyniki przedstawiono jako odsetek całkowitej puli limfocytów CD3⁺. Analizy cytometrycznej dokonano przy użyciu cytometru przepływowego FacsCanto (Becton Dickinson, San Jose, California, USA).

Analiza statystyczna

Analizy statystycznej dokonano przy użyciu programu Statistica 10.0 PL wykorzystując testy: Manna Whitneya, Kolejności Par Wilcozona, Kruskala-Wallis oraz test korelacji rang Spearmana. Wyniki przedstawiono jako mediana, minimum i maksimum. Za istotne statystycznie przyjęto wyniki na poziomie istotności p<0,05.

Tabela III. Zależność pomiędzy Treg a MDC i PDC we krwi obwodowej i PO chorych na raka jajnika.

	R	p
KREW		
Treg i MDC	0,07	0,63
Treg i PDC	0,01	0,91
Treg i MDC/PDC	-0,01	0,90
PO		
Treg i MDC	0,09	0,60
Treg i PDC	0,22	0,19
Treg i MDC/PDC	-0,07	0,68

Wyniki

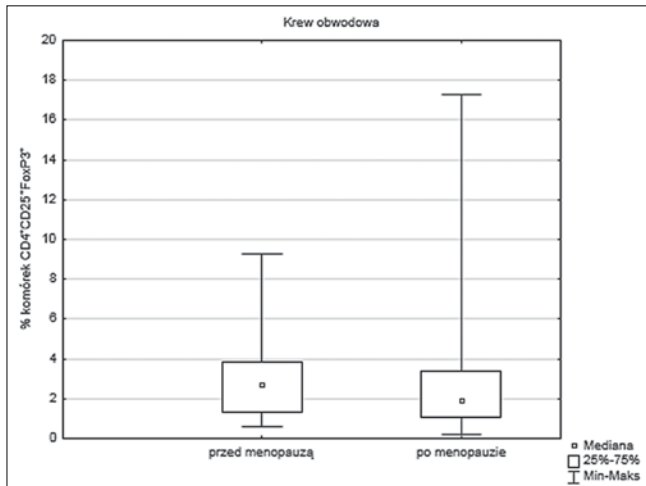
1. Ocena komórek Treg we krwi obwodowej i PO oraz porównanie populacji komórek Treg u chorych przed oraz po menopauzie.

Odsetek Treg we krwi obwodowej wynosił 2,01% przy min.=0,19% i max.=17,32%. W przeprowadzonych badaniach nie wykazano różnicy istotnej statystycznie (p>0,05) w odsetku Treg we krwi obwodowej u chorych przed i po menopauzie (Wykres 1). Odsetek Treg w PO wynosił 2,65% przy min.=0,09% i max.=12,57%. Odsetek Treg w PO chorych przed menopauzą okazał się istotnie statystycznie wyższy (p=0,01) niż u pacjentek po menopauzie (Wykres 2). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w odsetku limfocytów Treg, zarówno krwi obwodowej jak i PO w zależności od stopnia zaawansowania choroby wg FIGO oraz typu raka jajnika wg Kurmana i Shiha (p>0,05).

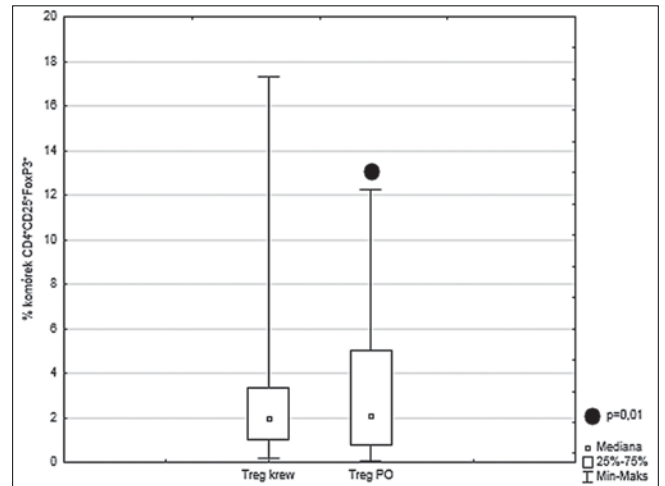
2. Porównanie odsetka Treg we krwi obwodowej i PO u chorych przed oraz po menopauzie.

Zarówno u kobiet przed (p=0,02) jak i po menopauzie (p=0,01) odsetek komórek Treg w PO był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do odnotowanego we krwi obwodowej (Wykresy 3 i 4).

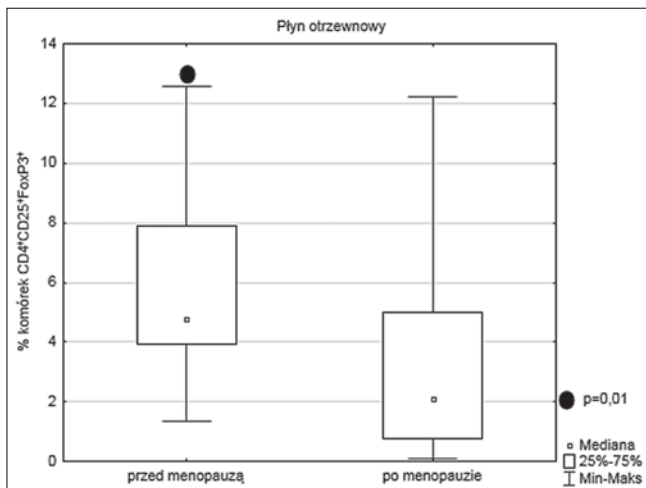
Justyna A. Surówka et al. Ocena limfocytów T regulatorowych, cytotoksycznych i komórek dendrytycznych u chorych na raka jajnika przed oraz po menopauzie.



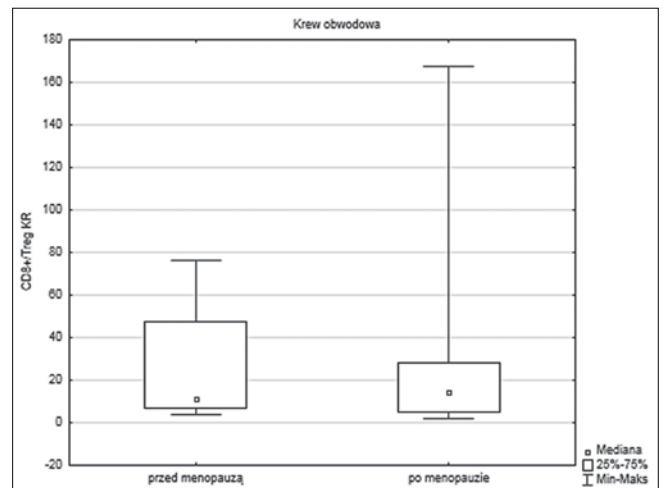
Wykres 1. Porównanie odsetka Treg we krwi obwodowej u chorych przed i po menopauzie.



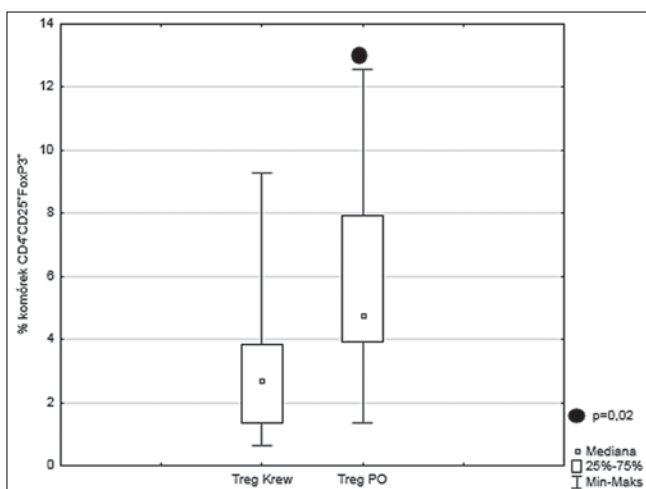
Wykres 4. Porównanie odsetka komórek Treg we krwi obwodowej oraz PO u chorych po menopauzie.



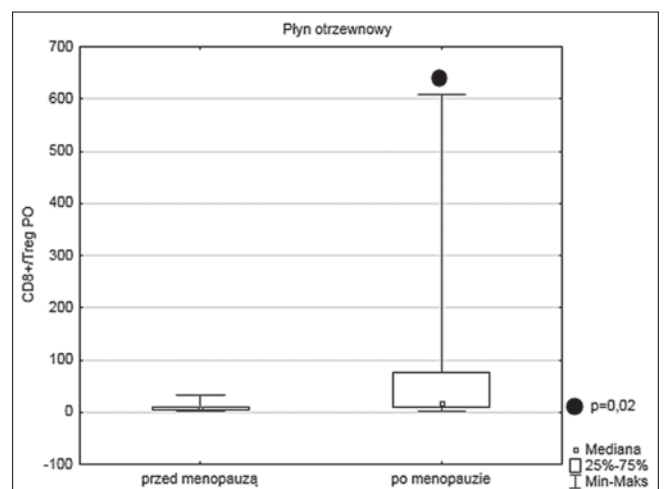
Wykres 2. Porównanie odsetka Treg w PO u chorych przed i po menopauzie.



Wykres 5. Stosunek odsetków limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ do Treg krwi obwodowej w zależności od statusu menopauzalnego pacjentek.



Wykres 3. Porównanie odsetka komórek Treg we krwi obwodowej oraz PO u chorych przed menopauzą.



Wykres 6. Stosunek limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ do Treg PO w zależności od statusu menopauzalnego pacjentek.

Justyna A. Surówka et al. Ocena limfocytów T regulatorowych, cytotoksycznych i komórek dendrytycznych u chorych na raka jajnika przed oraz po menopauzie.

3. Ocena odsetka MDC, PDC oraz limfocytów cytotoksycznych we krwi obwodowej i PO u chorych na raka jajnika.

W przeprowadzonych badaniach nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy odsetkami MDC, PDC oraz limfocytów cytotoksycznych u chorych przed menopauzą i po menopauzie, zarówno we krwi obwodowej jak i w PO ($p>0,05$). Natomiast odsetek MDC, PDC i limfocytów CD8⁺ był istotnie statystycznie wyższy w PO badanych chorych w porównaniu z krwią obwodową (Tabela II). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w odsetkach MDC, PDC oraz limfocytów cytotoksycznych, zarówno krwi obwodowej jak i PO w zależności od stopnia zaawansowania choroby wg FIGO oraz typu raka jajnika wg Kurmana i Shiha ($p>0,05$).

4. Stosunek limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ do Treg a status menopauzalny chorych na raka jajnika.

Stosunek limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ do Treg we krwi obwodowej u chorych przed i po menopauzie nie różnił się istotnie statystycznie ($p>0,05$) (Wykres 5). Natomiast w PO chorych po menopauzie wykazano istotnie statystycznie wyższy stosunek limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ do Treg ($p=0,02$) (Wykres 6).

5. Ocena zależności pomiędzy Treg a MDC i PDC we krwi obwodowej i PO chorych na raka jajnika.

Nie wykazano istotnej statystycznie zależności pomiędzy odsetkiem Treg i MDC oraz PDC, zarówno we krwi obwodowej jak i w PO ($p>0,05$) (Tabela III).

6. Ocena zależności pomiędzy czasem jaki upłynął od ostatniej miesiączki oraz liczbą przeżytych porodów a odsetkiem Treg, MDC, PDC oraz stosunkiem CD8⁺ do Treg we krwi obwodowej i PO chorych na raka jajnika.

W PO wykazano dodatnią korelację pomiędzy czasem jaki upłynął od ostatniej miesiączki a odsetkiem Treg ($p=0,01$, $R=0,49$) oraz ujemną korelację pomiędzy liczbą przeżytych porodów a odsetkiem Treg ($p=0,03$, $R=-0,35$). Ponadto wykazano ujemną korelację pomiędzy czasem jaki upłynął od ostatniej miesiączki a stosunkiem limfocytów CD8⁺ do Treg w PO ($p=0,01$, $R=-0,48$) oraz dodatnią korelację pomiędzy liczbą przeżytych porodów a stosunkiem limfocytów CD8⁺ do Treg ($p=0,02$, $R=0,39$). Opisanych zależności nie obserwowano we krwi obwodowej ($p>0,05$).

Nie wykazano istotnych zależności pomiędzy czasem jaki upłynął od ostatniej miesiączki czy liczbą przeżytych porodów i odsetkami MDC oraz PDC zarówno we krwi obwodowej jak i w PO ($p>0,05$).

Dyskusja

W prezentowanej pracy oceniono zależność pomiędzy stanem menopauzalnym, a odsetkiem limfocytów Treg, MDC, PDC oraz limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ we krwi obwodowej i płynie otrzewnowym chorych na raka jajnika. Według naszej wiedzy w dostępnej literaturze brak jest prac oceniających zależność pomiędzy stanem układu immunologicznego a statusem menopauzalnym chorych na raka jajnika. Brak jest również doniesień dotyczących wpływu statusu menopauzalnego na zmiany odsetkowe Treg i DC. Dlatego też nie mamy moż-

liwości odniesienia się do wyników innych autorów. Nie mniej jednak ciekawą obserwacją wydaje się odnotowany w badaniach własnych istotnie statystycznie niższy odsetek Treg w płynie otrzewnowym pacjentek po menopauzie. Oceniony odsetek Treg korelował istotnie z czasem jaki upłynął od ostatniej miesiączki oraz liczbą przeżytych porodów. Być może obserwacja ta ma związek ze zmianami zachodzącymi w gospodarce hormonalnej w okresie menopauzy. Wiadomo, że estrogeny mogą wpływać na układ odpornościowy modyfikując odpowiedź immunologiczną, zarówno poprzez zmiany ekspresji cytokin zapalnych jak i chemokina. Potwierdzone zostało to również w obserwacjach epidemiologicznych uwzględniających związek płci, ciąży oraz menopauzy z częstością zachorowań na choroby autoimmunologiczne [23,24]. Dostępne są też prace mówiące o wpływie estrogenów na proliferację Treg. W kilku niezależnych badaniach wykazano, że estrogeny mogą wpływać także na zmiany odsetkowe Treg. Podwyższony odsetek Treg odnotowano w ciąży, a więc w okresie kiedy stężenia estrogenów są szczególnie wysokie. Jednocześnie Xiong i wsp. odnotowali, że spadek stężenia estrogenów po porodzie wiązał się z obniżeniem odsetka krążących Treg [25]. Arruvito i wsp. zaobserwowali związek pomiędzy wzrostem poziomu estrogenów w późnej fazie folikularnej cyklu menstruacyjnego a zwiększeniem odsetka Treg [26]. Ekspozycja na duże dawki estrogeny podawane w trakcie hormonalnej terapii zastępczej została uznana przez Hampras i wsp. za pozytywny czynnik prognostyczny wzrostu odsetka Treg u zdrowych kobiet [27].

Menopauza nie jest uznawana powszechnie za czynnik ryzyka zachorowania na raka jajnika, natomiast wpływa na zmianę środowiska hormonalnego, w którym rozwija się nowotwór. W przeprowadzonych badaniach, nie wykazaliśmy różnic istotnych statystycznie w odsetku Treg krwi obwodowej w zależności od statusu menopauzalnego pacjentek. Priero i wsp. ocenili odsetek komórek CD4⁺CD25⁺ u zdrowych kobiet, u których stężenia estrogenów mieściły się w granicach fizjologicznych (0,21–0,53 nM). Nie wykazali oni istotnych zmian w odsetku Treg pomiędzy fazą folikularną i lutealną cyklu menstruacyjnego [28]. W połączeniu z przytoczonymi przez nas wcześniej wynikami pojawia się sugestia, że być może dopiero wysokie stężenia estrogenów wpływają na proliferację komórek Treg. Chen i wsp. wykazali, że stężenie estrogenów było wyższe w płynie otrzewnowym w porównaniu do krwi obwodowej pacjentek z rakiem jajnika [29]. W badaniach naszych nie ocenialiśmy stężenia estrogenów w surowicy krwi obwodowej i PO badanych przez nas chorych, dlatego też nie możemy jednoznacznie stwierdzić, czy uzyskane przez nas wyniki są spowodowane taką właśnie różnicą. Zasadnie więc wydaje się kontynuowanie badań z uwzględnieniem oceny profilu hormonalnego badanych chorych.

Należy podkreślić, że PO stanowi materiał badawczy, który bardzo dobrze odzwierciedla warunki panujące w mikrośrodoisku nowotworu. Curiel i wsp. podkreślają, że wysoki odsetek Treg w PO i mikrośrodoisku guza jest negatywnym czynnikiem prognostycznym u chorych na raka jajnika [13]. Z drugiej strony wykazany przez nas podwyższony stosunek limfocytów CD8⁺ do Treg u kobiet po menopauzie może rzucić nowe światło na przebieg odpowiedzi klinicznej u pacjentek w zależności od ich statusu menopauzalnego. Co ciekawe stosunek ten korelował istotnie z czasem jaki upłynął od ostatniej miesiączki oraz liczbą przeżytych porodów. Udowodniono, że obecność limfocytów CD8⁺ naciekających guz koreluje pozytywnie z lepszą odpowie-

Justyna A. Surówka et al. Ocena limfocytów T regulatorowych, cytotoksycznych i komórek dendrytycznych u chorych na raka jajnika przed oraz po menopauzie.

dzią kliniczną i wydłużonym czasem przeżycia chorych [30]. Co więcej wysoki stosunek limfocytów CD8⁺ do Treg został uznany przez Sato i wsp. za pozytywny czynnik prognostyczny u chorych na raka jajnika [31]. Podobnie Preston i wsp. (2013) odnotowali wyższe stosunki limfocytów CD8⁺ do Treg w tkance chorych na surowiczego raka jajnika w grupie z lepszą odpowiedzią kliniczną [32].

Na uwagę zasługuje również odnotowany przez nas wyższy odsetek komórek Treg w płynie otrzewnowym w porównaniu do krwi obwodowej, zarówno u chorych przed jak i po menopauzie. Curriel i wsp. wykazali wysoki odsetek komórek Treg w PO pacjentek z rakiem jajnika w III i IV stopniu zaawansowania wg FIGO [13]. Podobne rezultaty udało się uzyskać Conrad i wsp., którzy wykazali wyższy odsetek komórek Treg Foxp3⁺ w wodobrzuszu pacjentek z rakiem jajnika w porównaniu z krwią obwodową [33]. Sugeruje się kilka możliwych przyczyn wybiórczej akumulacji komórek Treg w PO chorych na raka jajnika. Autorzy podkreślają głównie rolę wysokich stężeń chemokiny CCL22 w płynie otrzewnowym chorych [13].

Istotny jest również związek wysokiego odsetka Treg w PO pacjentek z rakiem jajnika z obecnością plazmacytoidalnych DC. Conrad i wsp. (2012) wykazali wybiórczą akumulację Treg i PDC w PO chorych na raka jajnika [33]. Podobnie w badaniach własnych wysokiemu odsetkowi Treg w PO towarzyszył również wysoki odsetek PDC. Jednak nie wykazaliśmy istotnego wpływu menopauzy na zmiany odsetkowe MDC i PDC u chorych na raka jajnika, zarówno we krwi obwodowej jak i PO. Pozostaje natomiast kwestią otwartą wpływ gospodarki hormonalnej na stan funkcjonalny tych komórek. W badaniach *in vitro* wykazano, że estrogeny mogą wpływać na funkcje wydzielnicze DC wygenerowanych z monocytów krwi obwodowej [34]. Wykazano, że wysokie dawki estrogenów indukowały wydzielanie IL-10 przez DC izolowane ze śledziony zwierząt doświadczalnych. Z kolei IL-10 przyczynia się do wytwarzania tolerancji obwodowej stymulując różnicowanie tolerogennych DC oraz Treg [35].

Mamy świadomość tego, że pewnym ograniczeniem naszego wnioskowania może być dysproporcja w liczebności porównywanych grup, która jest podyktowana większą wykrywalnością raka jajnika w wieku okołomenopauzalnym. Pragniemy więc podkreślić, że przedstawione badania mają charakter wstępny i wymagają kontynuacji, szczególnie w grupie kobiet z rakiem jajnika przed menopauzą.

Pomimo tego, iż znane są współczynniki 5-letnich przeżyć dla różnych stopni zaawansowania klinicznego oraz poszczególnych typów histologicznych raka jajnika, nie znamy obecnie wszystkich czynników, które mogą wpływać na przebieg choroby. Liczne badania podkreślają rolę układu immunologicznego w patogenezie nowotworów [4,13]. Chociaż poznano wiele antygenów nowotworowych, opisano sposób ich prezentacji przez komórki prezentujące antygen oraz następującą później aktywację komórkowej bądź humoralnej odpowiedzi immunologicznej, trudno obecnie ustalić reguły, które rządzą funkcją układu immunologicznego u chorych z różną manifestacją kliniczną raka jajnika. Nieznany jest wpływ stanu układu immunologicznego na szybkość szerzenia się guza, powstawania przerzutów w węzłach chłonnych i w odległych narządach. Stąd też przebieg choroby nawet u pacjentek z takim samym rozpoznaniem histopatologicznym i w tym samym stopniu zaawansowania klinicznego, jak też odpowiedź na stosowane leczenie może być różna. Złożoność

mikrośrodowiska raka jajnika rodzi potrzebę wieloaspektowej analizy czynników, które mogą wpływać na jego zmiany. Przedstawione dane mogą nakreślić nowy kierunek badań nad stanem układu immunologicznego, który będzie uwzględniał wpływ menopauzy i gospodarki hormonalnej chorych.

Wnioski

Odsetek limfocytów Treg w PO chorych na raka jajnika, zarówno przed jak i po menopauzie, jest istotnie podwyższony w porównaniu do krwi obwodowej.

W PO chorych po menopauzie odsetek limfocytów Treg jest niższy niż u kobiet przed menopauzą.

Istnieje zależność pomiędzy czasem jaki upłynął od ostatniej miesiączki oraz liczbą przebytych porodów a odsetkiem Treg w PO.

Stosunek limfocytów CD8⁺ do Treg jest istotnie podwyższony w PO pacjentek po menopauzie i koreluje z czasem jaki upłynął od ostatniej miesiączki oraz liczbą przebytych porodów.

Status menopauzalny chorych na raka jajnika nie wpływa istotnie na zmiany w odsetkach MDC, PDC i limfocytów cytotoksycznych CD8⁺.

Oświadczenie autorów:

1. Justyna A. Surówka – współautor koncepcji i założeń pracy, izolacja analizowanych populacji komórek, akwizycja i analiza cytometryczna, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Iwona Wertel – współautor koncepcji i założeń pracy, analiza wyników, akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
3. Grzegorz Polak – udział w procesie leczniczym, zbieranie danych klinicznych pacjentek.
4. Karolina Okła – wykonanie obliczeń statystycznych
5. Monika Biłska – udział w procesie leczniczym, zbieranie materiału do badań.
6. Jan Kotarski – udział w procesie leczniczym, akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu

Źródło finansowania:

Praca finansowana z grantu NN 407160940.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Didkowska J, Wojciechowska U. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie. <http://onkologia.org.pl/nawotwory-jajnika-c56/> (access: 2015.06.25).
2. Prat J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynecol Obstet.* 2014, 124, 1-5.
3. Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian Tumorigenesis: A Proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis. *Am J Pathol.* 2004, 16 (5), 1511-1518.
4. Latha TS, Panati K, Gowd DS, [et al.]. Ovarian cancer biology and immunotherapy. *Int Rev Immunol.* 2014, 33 (5), 428-440.

Justyna A. Surówka et al. Ocena limfocytów T regulatorowych, cytotoksycznych i komórek dendrytycznych u chorych na raka jajnika przed oraz po menopauzie.

5. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano N, [et al.]. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995, 155 (3), 1151-1164.
6. Ziegler SF1, Buckner JH. Influence of FOXP3 on CD4+CD25+ regulatory T cells. *Expert Rev Clin Immunol.* 2006, 2 (4), 639-647.
7. Curiel TJ. Regulatory T-cell development: is Foxp3 the decider? *Nat Med.* 2007, 13 (3), 250-253.
8. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, [et al.]. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004, 16 (11), 1643-1656.
9. Trzonkowski P, Szmít E, Myśliwska J, [et al.]. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol.* 2004, 112 (3), 258-267.
10. Bluestone JA, Tang Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol.* 2005, 17 (6), 638-642.
11. Dietl J, Engel JB, Wischhusen J. The role of regulatory T cells in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2007, 17 (4), 764-770.
12. Ladoire S, Martin F, Ghiringhelli F. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011, 60 (7), 909-918.
13. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, [et al.]. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004, 10, 942-949.
14. Trzonkowski P, Szmít E, Myśliwska J, [et al.]. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans – impact of immunosenescence. *Clinical Immunology.* 2006, 119, 307-316.
15. Mjösberg J, Svensson J, Johansson E, [et al.]. Systemic reduction of functionally suppressive CD4dimCD25highFoxp3+ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17 β -estradiol. *J Immunol.* 2009, 183 (1), 759-769.
16. Vacchelli E, Vitale I, Eggermont A, [et al.]. Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2013, 2 (10), e25771. Epub 2013 Jul 29.
17. Robinson SP, Patterson S, English N, [et al.]. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol.* 1999, 29, 1743-1751.
18. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, [et al.]. Phenotype, distribution, generation, and functional relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood.* 2009, 114 (6), 1141-1149.
19. Merad M, Sathe P, Helft J, [et al.]. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013, 31, 563-604.
20. Labidi-Galy SI, Sisirik V, Meeus P, [et al.]. Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2011, 71, 5423-5434.
21. Wei S, Kryczek I, Zou L, [et al.]. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2005, 65, 5020-5026.
22. Wertel I, Polak G, Tarkowski R, [et al.]. SDF-1 α /CXCL12 and dendritic cells in ovarian cancer microenvironment. *Ginekol Pol.* 2011, 82 (6), 421-425.
23. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 2007, 28 (5), 521-574.
24. Sawan S, Burt DJ, Stern PL, [et al.]. Circulating regulatory T cells in endometrial cancer: a role for age and menopausal status. *Immunol Invest.* 2011, 40 (1), 62-75.
25. Xiong YH, Yuan Z, He L. Effects of estrogen on CD4(+) CD25(+) regulatory T cell in peripheral blood during pregnancy. *Asian Pac J Trop Med.* 2013, 6 (9), 748-752.
26. Arruvito L, Sanz M, Banham AH, [et al.]. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol.* 2007, 178 (4), 2572-2578.
27. Hampras SS, Nesline M, Wallace PK, [et al.]. Predictors of immunosuppressive regulatory T lymphocytes in healthy women. *J Cancer Epidemiol.* 2012, 2012:191090. Epub 2012 Aug 26.
28. Prieto GA, Rosenstein Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology.* 2006, 118 (1), 58-65.
29. Chen FC, Oskay-Ozcelik G, Bühling KJ, [et al.]. Prognostic value of serum and ascites levels of estradiol, FSH, LH and prolactin in ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2009, 29 (5), 1575-1578.
30. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, [et al.]. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2003, 348 (3), 203-213.
31. Sato E, Olson SH, Ahn J, [et al.]. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102 (51), 18538-18543.
32. Preston CC, Maurer MJ, Oberg AL, [et al.]. The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer. *PLoS One.* 2013, 8 (11), e80063.
33. Conrad C, Gregorio J, Wang YH, [et al.]. Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res.* 2012, 72 (20), 5240-5249.
34. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Hayrabedyan S, [et al.]. Female sex steroid hormones modify some regulatory properties of monocyte-derived dendritic cells. *Am J Reprod Immunol.* 2007, 58 (5), 425-433.
35. Uemura Y, Liu TY, Narita Y, [et al.]. 17 Beta-estradiol (E2) plus tumor necrosis factor-alpha induces a distorted maturation of human monocyte-derived dendritic cells and promotes their capacity to initiate T-helper 2 responses. *Hum Immunol.* 2008, 69 (3), 149-157.

KOMUNIKAT

Warsztaty Onkologii Ginekologicznej

Postępowanie w nawrotach nowotworów narządów płciowych

03-04 czerwca 2016

Poznań, Hotel Park, ul. Baraniaka 77



Organizatorzy:

Polskie Towarzystwo Ginekologiczne,
Seksja Ginekologii Onkologicznej
Klinika Onkologii Ginekologicznej UM w Poznaniu

Komitet naukowy

Prof. Ewa Nowak-Markwitz
Prof. Marek Spaczyński

TEMATYKA

SESJA I
– Nawroty stanów przedrakowych i wczesnych postaci nowotworów narządów płciowych

CIN nawroty – rozpoznanie i leczenie

Testy HPV a CIN, AIS i rak szyjki macicy FIGO IA

Nawroty rozrostów i raka endometrium u młodych kobiet leczonych zachowawczo; czy nadal jest możliwe postępowanie zachowawcze?

Nawroty raka szyjki macicy i nowotworów jajnika po postępowaniu zachowującym płodność

Sesja II
– Rozpoznanie nawrotów

Objawy kliniczne nawrotu, nawroty markerowe, jak i kiedy rozpocząć leczenie?

CT, NMR, 18F-FDG PET/CT w rozpoznawaniu nawrotów

Czy ultrasonografia jest przydatna w rozpoznawaniu nawrotów?

Sesja III
– Leczenie nawrotów nowotworów narządów płciowych – kiedy zakończyć terapię?

Czy i kiedy jest możliwe postępowanie chirurgiczne w nawrotach raka szyjki macicy?

Nawroty raka endometrium – kiedy operować?

Nawrotowy rak szyjki macicy i endometrium – kiedy można leczyć radioterapią?

Terapia systemowa i celowana w nawrotowym i przetrwałym raku szyjki macicy

Nawrotowy płatynowrażliwy rak jajnika i późne nawroty – jak leczyć?

Nawrotowy platynoooporny rak jajnika, czym i jak długo leczyć?

Nawroty mięsaków macicy i jajnika – leczenie chirurgiczne i systemowe

Terapia hormonalna nawrotów nowotwór narządów płciowych

Nawroty ziarniszczaka i nowotworów germinalnych – jak monitorować nawrót, postępowanie

Krwawienia z zaawansowanych nowotworów, czy radiologia inwazyjna może być pomocna?

Leczenie przeciwbólowe nieuleczalnie chorych

Rejestracja i współpraca z firmami:
www.onkologia-online.pl/konferencje/poznan

Kazimierz Ciekanski
tel. 534 694 964 w godz. 9-16

Partner medialny:

Onkologia Online
Hematologia

