

Markery aktywacji limfocytów u pacjentek z rakiem jajnika

Lymphocyte activation markers in patients with ovarian cancer

Nowicka Aldona, Rogala Ewelina, Bednarek Wiesława, Barczyński Bartłomiej,
Wertel Iwona, Piekarczyk Wanda, Kotarski Jan

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

Streszczenie

Proces aktywacji limfocytów T jest konieczny do pełnienia przez te komórki funkcji obronnych. Warunkiem prawidłowej aktywacji jest bezpośredni kontakt limfocyta z komórką prezentującą antygen i przekazanie sygnału aktywacji do wnętrza komórki T. Aktywowane limfocyty T wykazują ekspresję molekuł powierzchniowych m.in. CD69, CD25 i HLA-DR. Skutkiem aktywacji limfocytów jest kaskada zdarzeń molekularnych prowadzących do proliferacji i ekspansji klonalnej specyficznych antygenowo limfocytów T.

Cel pracy: Celem pracy była ocena fenotypu i markerów aktywacji limfocytów T: CD69, CD25 i HLA – DR we krwi i tkance nowotworowej pacjentek z rakiem jajnika.

Materiały i metody: Badaniami objęto grupę 26 pacjentek operowanych z powodu zaawansowanego raka jajnika. Wyizolowane z krwi obwodowej i tkanki nowotworowej komórki jednojądrzaste znakowano przeciwciałami monoklonalnymi sprzężonymi z odpowiednimi fluorochromami, a następnie analizowano w cytometrze przepływowym FACS Canto.

Wyniki: Odsetek limfocytów wykazujących ekspresję CD69 był istotnie wyższy wśród limfocytów infiltrujących guz w porównaniu z limfocytami krwi obwodowej. Odsetki limfocytów CD3+CD4+ i CD3+CD8+ były wyższe w przypadku limfocytów izolowanych z tkanki nowotworowej w porównaniu z krwią. Ekspresja CD25 była wyższa w przypadku limfocytów krwi obwodowej. Ekspresja HLA-DR była istotnie wyższa w przypadku limfocytów izolowanych z tkanki guza w porównaniu z krwią obwodową.

Wnioski: Infiltrujące tkankę nowotworową jajnika limfocyty T są komórkami aktywowanymi. Stan aktywacji limfocytów T może być wynikiem bezpośredniego kontaktu tych komórek z antygenami nowotworowymi. Niska ekspresja CD25 może sugerować zaburzenia klonalnej ekspansji antygenowo-specyficznych limfocytów.

Słowa kluczowe: rak jajnika / limfocyty T / markery aktywacji / CD25 / CD69 /
/ HLA-DR /

Adres do korespondencji:

Aldona Nowicka
I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii UM w Lublinie
Polska, 20-081 Lublin, ul. Staszica 16,
tel./fax.: +81 5327847; e-mail: aldonga.nowicka@gmail.com

Otrzymano: 13.06.2012
Zaakceptowano do druku: 20.09.2012

Abstract

Introduction: The process of T cells activation is necessary for the performance of the defense functions. Successful activation depends on direct lymphocyte - antigen-presenting cell contact and signal transmission to the lymphocyte. Activated T cells exhibit surface expression of molecules such as CD69, CD25 and HLA-DR. The effect of cell activation is a cascade of molecular events leading to proliferation and clonal expansion of antigen-specific T cells.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the phenotype and T cell activation markers: CD69, CD25 and HLA - DR in the peripheral blood and tumor tissue of ovarian cancer patients.

Material and methods: The study group consisted of 26 patients operated due to ovarian cancer (FIGO IIb - IV). Mononuclear immune cells were isolated from peripheral blood and ovarian cancer tissue. To obtain peripheral blood lymphocytes, blood was collected into heparinized tubes and diluted 1:1 with PBS, then layered on Gradisol L and centrifuged 20 minutes at 2800 rpm. Mononuclear cells were washed twice with PBS and labeled with monoclonal antibodies.

A small piece of tumor tissue (about 1cm³) was fragmented with a surgical blade. Minced tissue was suspended in PBS and layered on Gradisol L for mononuclear cells isolation.

To assess the phenotype and activation status of peripheral blood and tumor infiltrating lymphocytes, we used FACS Canto cytometer and monoclonal antibodies conjugated with fluorochromes: anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE-Cy5, anti-CD8-APC, anti-CD25-PE, anti-CD69-PE-Cy7, anti-HLA-DR-PE-Cy7. Statistical analysis was performed using the Statistica 5.0 and Wilcoxon test.

Results: In all cases we detected T helper CD3+CD4+ and cytotoxic CD3+CD8+ T lymphocytes in both blood samples and tumor tissues. We observed no statistically significant difference in the percentage of CD3+ CD4+ cells among the mononuclear cells present in peripheral blood and tumor tissue. The percentage of CD3+CD8+ cytotoxic T lymphocytes was higher among mononuclear cells isolated from the tumor tissue.

The percentage of CD3+ lymphocytes expressing the very early activation marker CD69 was significantly higher among tumor infiltrating lymphocytes compared with peripheral blood lymphocytes. Similarly, the percentages of CD3+CD4+CD69+ T helper lymphocytes and CD3+CD8+CD69+ cytotoxic T lymphocytes were significantly higher on lymphocytes isolated from tumor tissue when compared to blood.

The expression of an early activation marker - CD25 was significantly higher on the CD3+ and CD3+CD8+ peripheral blood lymphocytes compared to CD3+ and CD3+CD8+ tumor infiltrating lymphocytes. There were no statistically important differences between the percentages of, isolated from blood and tissue, CD3+CD4+ T helper lymphocytes.

The expression of the late activation marker - HLA-DR was significantly higher on CD3+ lymphocytes isolated from tumor tissue compared with peripheral blood. Similarly, the percentages of CD3+CD4+ lymphocytes and CD3+CD8+ cytotoxic T cells expressing HLA-DR were significantly higher among tumor infiltrating lymphocytes when compared to peripheral blood ones.

Conclusions: T cells obtained from ovarian cancer tissues are activated cells. The state of T cell activation may be the result of direct contact of these cells with tumor antigens. The low expression of CD25 may suggest abnormal clonal expansion of antigen-specific lymphocytes.

Key words: **ovarian cancer / T cells / activation markers / CD25 / CD69 / HLA-DR /**

Wstęp

Rak jajnika jest jednym z najtrudniejszych problemów diagnostycznych i terapeutycznych w ginekologii onkologicznej. Patomechanizm tego schorzenia pozostaje niewyjaśniony [1]. Początkowe etapy choroby przebiegają bezobjawowo, stąd rak jajnika określany jest często mianem „cichego zabójcy”. Aż 70% przypadków nowotworu złośliwego jajnika rozpoznawanych jest w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego. Standardowa terapia obejmuje leczenie chirurgiczne z następującą chemioterapią opartą na taksoidach i pochodnych cis-platyny. Pomimo, że 75% pacjentek pozytywnie odpowiada na chemioterapię, u ¼ z nich dochodzi do wznowy w ciągu 2 lat [2].

Przypuszcza się, że przyczyną złej prognozy u pacjentek z zaawansowanym rakiem jajnika może być osłabienie reakcji układu odpornościowego na antygeny guza, co może być wynikiem zdolności guza do ucieczki spod nadzoru układu immunologicznego oraz do modulowania odpowiedzi immunologicznej na antygeny nowotworowe [3].

Aktywacja limfocytów T jest procesem niezbędnym do pełnienia przez te komórki funkcji efektorowych: produkcji cytokin prozapalnych przez limfocyty pomocnicze Th oraz cytotoksyczności przez limfocyty cytotoksyczne Tc [4].

Prawidłowy proces aktywacji wymaga bezpośredniego kontaktu limfocytu T dziewiczego lub limfocytu T pamięci z komórką prezentującą antygen APC (*Antigen Presenting Cells*), np. makrofagiem lub komórką dendrytyczną, wykazującym bądź wykazującą ekspresję cząsteczek MHC związanych ze specyficznym antygenem bakteryjnym lub nowotworowym [4]. Podczas trwania takiej synapsy immunologicznej do wnętrza limfocytu przekazywane są dwa sygnały aktywacji. Pierwszy z nich dociera po rozpoznaniu i związaniu antygeny przez swoisty antygenowo receptor TCR limfocytu, drugi natomiast po kontakcie występujących na powierzchni limfocytu i komórki prezentującej antygen cząsteczek kostymulujących, m.in. CD28:CD80/CD86 [4, 5]. W przypadku otrzymania jedynie sygnału z receptora TCR dziewiczy limfocyt T wchodzi w stan anergii, tzn. nie ulega ak-

tywacji, pozostając jednocześnie niewrażliwym na sygnały aktywacyjne w przyszłości. Wystąpienie zjawiska kostymulacji nie jest konieczne w przypadku aktywacji limfocytów T pamięci, które proliferują już po otrzymaniu pierwszego sygnału [4].

Prawidłowa odpowiedź immunologiczna na antygeny nowotworowe zależy m.in. od aktywacji i proliferacji antygenowo specyficznych limfocytów T. Sygnałem do aktywacji jest związanie receptora TCR limfocytów z odpowiednim antygenem nowotworowym [6]. W przeciwieństwie do limfocytów pozostających w spoczynku, aktywowane limfocyty T wykazują wysoką ekspresję molekuł powierzchniowych m.in. CD69, CD25 oraz HLA-DR. Ze względu na brak ekspresji tych cząsteczek na limfocytach spoczynkowych (*resting T cells*) molekuly te nazwano markerami aktywacji limfocytów [7].

Najwcześniejszym powierzchniowym markerem aktywacji limfocytów jest cząsteczka CD69. Ulega ona ekspresji w ciągu kilku godzin od związania antygeny i nie wymaga syntezy nowego mRNA ani białka [8]. Badania Marzio i wsp. wykazały, że zewnątrzkomórkowa domena CD69 pełni istotną rolę w przekazywaniu sygnału aktywacji do wnętrza limfocytów [9]. CD69 indukuje w limfocytach syntezę cytokin (m.in. IL-2, INF- γ) i proliferację.

W warunkach prawidłowej aktywacji, 2 godziny od zadzia-
łania bodźca (związanie antygeny) na powierzchni limfocytów T ekspresji ulega cząsteczka CD25 (IL-2R α) pełniąca funkcję receptora dla interleukiny 2 [10]. Ze względu na to, że ekspresja CD25 na limfocytach wymaga transkrypcji odpowiednich genów, jej pojawienie się jest opóźnione w czasie w stosunku do ekspresji cząsteczki CD69. Interakcja obecnej w mikrośrodo-
wisku guza IL-2 z indukowanym na powierzchni komórek T receptorem IL-2R α wyzwala aktywację i proliferację antygenowo specyficznych limfocytów T [11, 12].

Ze względu na to, że cząsteczka HLA-DR pojawia się na powierzchni limfocytów stosunkowo późno (3-5 dni po aktywacji) i pozostaje obecna na aktywowanych limfocytach dłużej niż CD25, nazwana została późnym markerem aktywacji [13]. Jak wiadomo, HLA-DR należy do grupy cząsteczek głównego kompleksu zgodności tkankowej – MHC klasy II, a jej obecność jest niezbędna w procesie aktywacji limfocytów. Obecność HLA-DR jest konieczna do prawidłowej prezentacji antygenów przez komórki prezentujące antygen: limfocyty T, limfocyty B, monocyty, makrofagi i komórki dendrytyczne [14].

Cel pracy

Celem pracy była:

- 1) cytometryczna ocena fenotypu limfocytów obecnych we krwi oraz infiltrujących nowotwór złośliwy jajnika,
- 2) cytometryczna ocena ekspresji markerów aktywacji limfocytów: CD69, CD25 oraz HLA-DR na powierzchni limfocytów T izolowanych z krwi obwodowej oraz tkanki nowotworowej kobiet chorych na raka jajnika.

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 26 pacjentek, operowanych w latach 2008-2010 w I Katedrze i Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie z powodu raka jajnika. Żadna z kobiet nie była uprzednio poddana chemio-
i/lub radioterapii. Wiek badanych chorych wahał się od 41 do 79 lat (średnia 56 \pm 11 lat). W okresie badania i okresie bezpośred-

nie po poprzedzającym, żadna z pacjentek nie wykazywała cech infekcji, nie przyjmowała krwi, preparatów krwipochodnych ani żadnych leków modulujących działanie układu odpornościowego. W badanej grupie znalazły się kobiety w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej (FIGO IIb – IV).

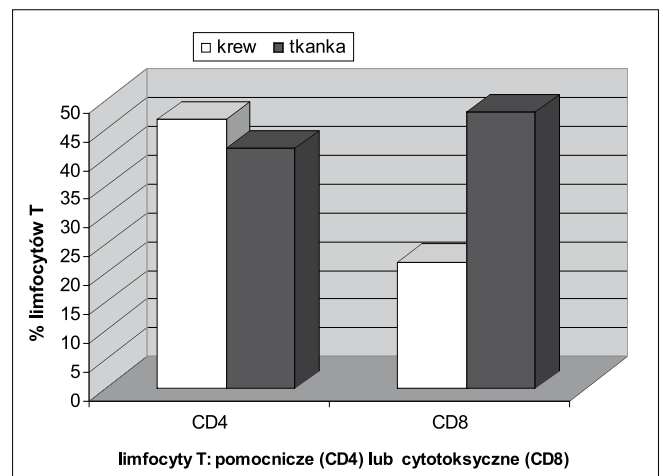
Materiałem do badań były jednojądrzaste komórki immunologiczne izolowane z krwi obwodowej oraz tkanki nowotworowej jajnika. W celu pozyskania limfocytów krwi obwodowej pobrana do heparynizowanych probówek krew rozcieńczano w stosunku 1:1 roztworem soli fizjologicznej (PBS) a następnie nawarstwiano na preparat Gradisol L i wirowano 20 minut z prędkością 2800 rpm. Uzyskane komórki były dwukrotnie przemywane PBS-em bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺, zawieszane w niewielkiej ilości PBS-u, liczone w komorze Neubauera i znakowane przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciw określonym antygenom. W przypadku tkanki nowotworowej, fragment wielkości około 1cm³, bez obszarów martwiczych, był rozdrabniany przy pomocy skalpela chirurgicznego. Rozdrobniona tkanka zawieszana była w PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ i nawarstwiana na gradisol L w celu izolacji komórek jednojądrzastych.

Do oceny fenotypu i stanu aktywacji limfocytów krwi obwodowej i limfocytów infiltrujących tkankę nowotworową wykorzystano cytometr przepływowy FACS Canto oraz przeciwciała monoklonalne sprzężone z następującymi fluorochromami: anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE-Cy5, anti-CD8-APC, anti-CD25-PE, anti-CD69-PE-Cy7, anti-HLA-DR-PE-Cy7. Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy pomocy programu Statistica 5.0 oraz testu nieparametrycznego Wilcoxon.

Wyniki

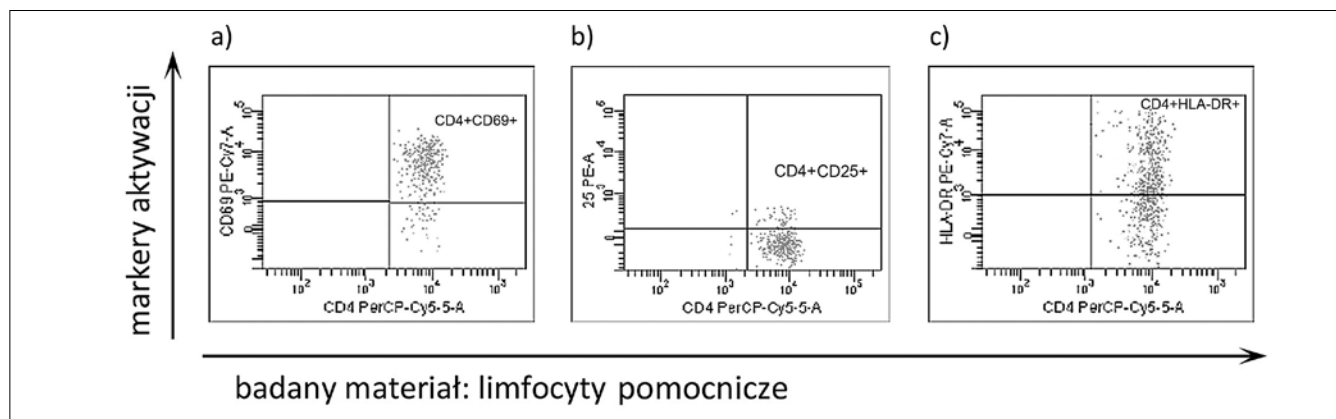
Uzyskane w doświadczeniach wyniki przedstawiono w postaci rycin 1-6.

We wszystkich badanych przypadkach zarówno we krwi jak i tkance nowotworowej stwierdzono obecność limfocytów pomocniczych CD3+CD4⁺ i cytotoksycznych CD3+CD8⁺. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w odsetku limfocytów CD3+CD4⁺ wśród komórek jednojądrzastych obecnych we krwi i w tkance guza. Odsetek limfocytów cytotoksycznych CD3+CD8⁺ był wyższy wśród komórek jednojądrzastych izolowanych z guza w porównaniu z krwią. (Rycina 1).

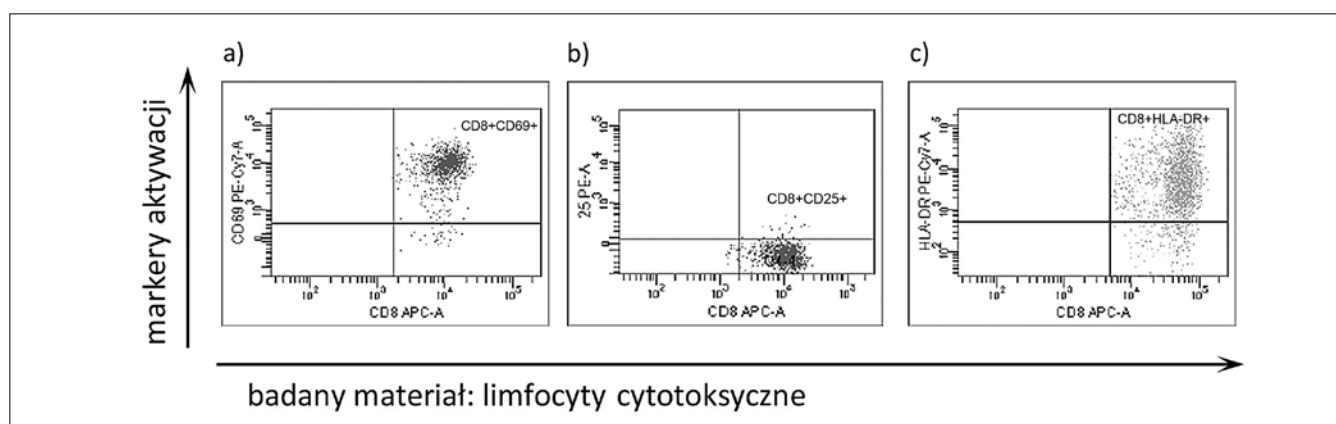


Rycina 1. Odsetek limfocytów pomocniczych CD3+CD4⁺ i cytotoksycznych CD3+CD8⁺ izolowanych z krwi obwodowej i tkanki nowotworowej pacjentek z rakiem jajnika.

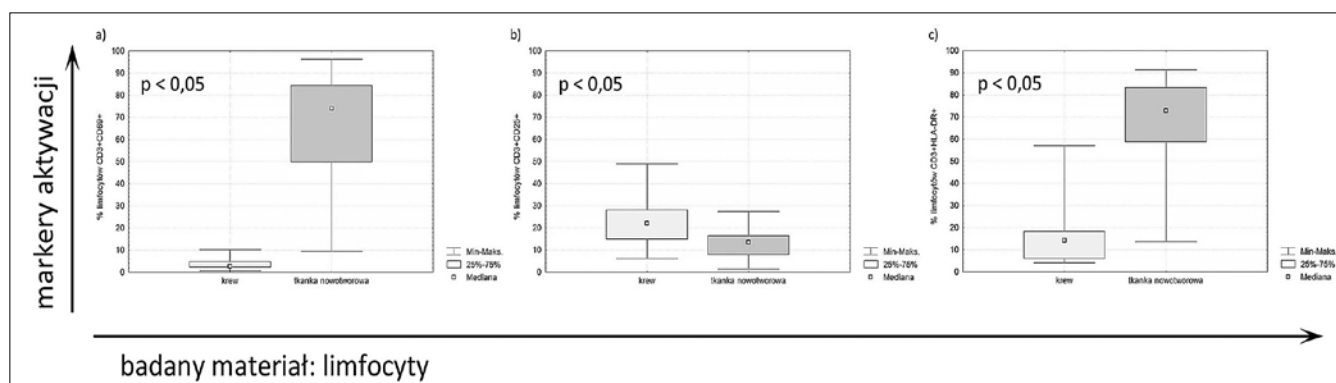
Nowicka A, et al. Markery aktywacji limfocytów u pacjentek z rakiem jajnika.



Rycina 2 (a, b, c). Cytometryczna ocena markerów aktywacji: CD69, CD25 i HLA-DR na limfocytach T pomocniczych CD3+CD4+ izolowanych z tkanki nowotworowej.



Rycina 3 (a, b, c). Cytometryczna ocena ekspresji markerów aktywacji: CD69, CD25 i HLA-DR na limfocytach T cytotoksycznych CD3+CD8+ izolowanych z tkanki nowotworowej.

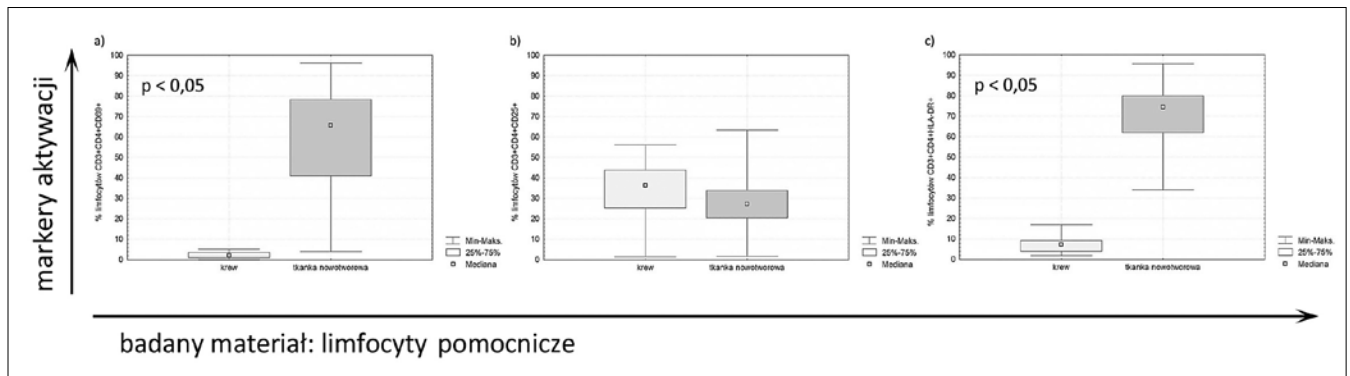


Rycina 4 (a, b, c). Odsetek limfocytów T CD3+ wykazujących ekspresję markerów aktywacji: CD69, CD25, HLA-DR izolowanych z krwi i tkanki nowotworowej.

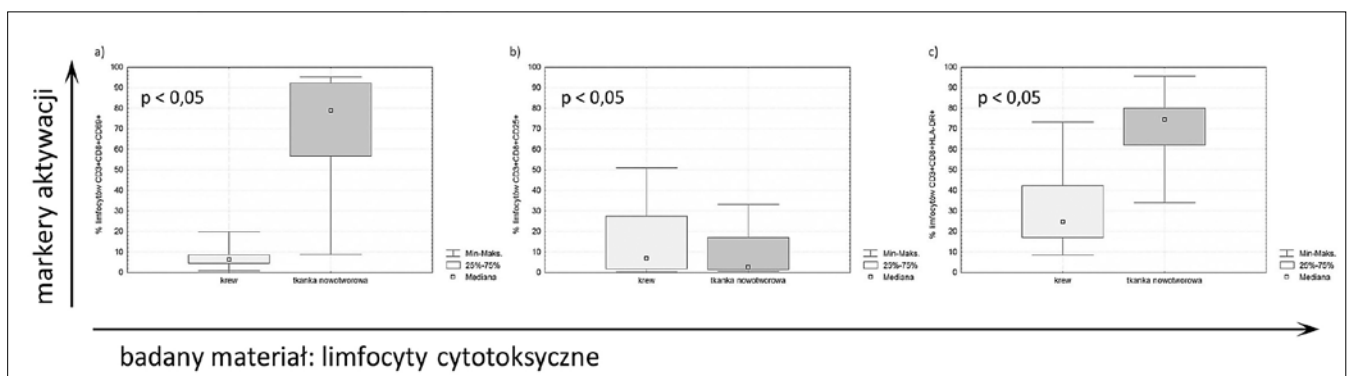
Odsetek limfocytów CD3+ wykazujących ekspresję bardzo wczesnego markera aktywacji CD69 był istotnie statystycznie wyższy w przypadku limfocytów infiltrujących guz w porównaniu z limfocytami krwi obwodowej. (Rycina 4a). Podobnie odsetki limfocytów pomocniczych CD3+CD4+ i cytotoksycznych CD3+CD8+ były istotnie statystycznie wyższe w przypadku limfocytów izolowanych z tkanki nowotworowej, w porównaniu z krwią. (Ryciny 5a, 6a).

Ekspresja wczesnego markera aktywacji – podjednostki α IL2R była natomiast istotnie statystycznie wyższa na powierzchni limfocytów CD3+ oraz CD3+CD8+ krwi obwodowej w porównaniu z limfocytami CD3+ oraz CD3+CD8+ infiltrującymi guz. (Ryciny 4b, 6b) Odsetek limfocytów T pomocniczych wykazujących ekspresję markera CD25 izolowanych z krwi i tkanki nowotworowej nie różnił się w sposób statystycznie istotny. (Rycina 5b).

Nowicka A, et al. Markery aktywacji limfocytów u pacjentek z rakiem jajnika.



Rycina 5 (a, b, c). Odsetek limfocytów pomocniczych CD3+CD4+ wykazujących ekspresję markerów aktywacji: CD69, CD25, HLA-DR izolowanych z krwi i tkanki nowotworowej.



Rycina 6 (a, b, c). Odsetek limfocytów T cytotoksycznych CD3+CD8+ wykazujących ekspresję markerów aktywacji: CD69, CD25, HLA-DR izolowanych z guza i tkanki nowotworowej.

Ekspresja późnego markera aktywacji – cząsteczki HLA-DR była statystycznie istotnie wyższa w przypadku limfocytów CD3+ izolowanych z tkanki guza w porównaniu z krwią obwodową. Podobnie, odsetki limfocytów pomocniczych CD3+CD4+ i cytotoksycznych CD3+CD8+ wykazujących ekspresję HLA-DR były znacząco wyższe wśród limfocytów infiltrujących guz w porównaniu z krwią obwodową. (Ryciny 4c, 5c, 6c).

Dyskusja

W niniejszej pracy wykazano obecność limfocytów Th pomocniczych CD3+CD4+ i Tc cytotoksycznych CD3+CD8+ zarówno w krwi obwodowej jak i tkance nowotworowej raka jajnika. Odsetek limfocytów T CD3+ infiltrujących guz otrzymany w prowadzonych przez nas badaniach był porównywalny z wynikami otrzymanymi przez Santin i wsp. [15].

Przeprowadzone w naszym ośrodku badania dowiodły, że w krwi obwodowej chorych na raka jajnika dominującą populacją były limfocyty pomocnicze CD3+CD4+, natomiast w populacji limfocytów infiltrujących guz większy odsetek stanowiły limfocyty cytotoksyczne CD3+CD8+. Podobne wyniki otrzymali Santin i wsp. [15]. Prace tej grupy badawczej wykazały, że stosunek limfocytów CD3+CD4+ do CD3+CD8+ w krwi obwodowej chorych na zaawansowanego raka jajnika wynosił 3:1, natomiast stosunek CD3+CD4+ do CD3+CD8+ w populacji limfocytów infiltrujących guz – TIL wynosił 1:1. Doświadczenia Santin

i wsp. podobnie jak wcześniejsze doświadczenia Markowskiej i wsp. wykazały ponadto, że stosunek limfocytów CD3+CD4+ do CD3+CD8+ może być wartościowym wskaźnikiem prognostycznym, pozwalającym wyodrębnić pacjentki z szybko postępującą chorobą nowotworową jajnika i zakwalifikować je do odpowiedniego typu leczenia [15, 16]. Według Markowskiej i wsp. wysoki stosunek limfocytów CD4+:CD8+ (około 6-7:1) w krwi obwodowej pacjentki może być markerem złej prognozy [16].

Pomimo obecności limfocytów CD3+ w utkanie raka jajnika, kwestią sporną jest przeciwnowotworowe działanie tych komórek w mikrośrodku guza [17]. Przypuszcza się, że wydzielane przez komórki rosnących nowotworów cytokiny, np. IL-10 czy TGF- β mogą modulować działanie komórek układu odpornościowego, np. hamując efektorowo-sekrecyjne właściwości leukocytów [18, 19, 20].

Nelson w pracy przeglądowej opisał najczęściej spotykane uszkodzenia limfocytów infiltrujących tkankę nowotworową jajnika [21]. Są to: obniżona ekspresja łańcucha CD3-zeta, obniżona produkcja cytokin, np. IL-2, INF-gamma, podwyższona synteza IL-10, zaburzona synteza kinazy tyrozynowej *lck* oraz zaburzenia procesu proliferacji. Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia powstaje pytanie, czy obecne w mikrośrodku raka jajnika limfocyty są komórkami aktywowanymi, czynnie zwalczającymi nowotwór czy wręcz przeciwnie – komórkami promującymi jego wzrost?

Nowicka A, et al. Markery aktywacji limfocytów u pacjentek z rakiem jajnika.

W naszej pracy wykazaliśmy, że limfocyty infiltrujące tkankę nowotworową jajnika są komórkami aktywowanymi. Wykazują istotnie wyższą ekspresję powierzchniową zarówno bardzo wczesnego – CD69 jak i późnego – HLA-DR markera aktywacji w porównaniu z limfocytami krwi obwodowej. Co więcej, z naszych badań wynika, że wykazujące ekspresję tych markerów limfocyty T mogą akumulować się w miejscu bezpośrednio dotkniętym rozrostem nowotworowym. Podobne wyniki otrzymali Sheu i wsp. w badaniach nad rakiem szyjki macicy oraz Rybojad i wsp. w niedrobnokomórkowym raku płuca [22, 23]. Przeprowadzone przez Diederichsen i wsp. badania wykazały, że infiltrujące tkankę raka jelita grubego limfocyty T, wykazujące ekspresję m.in. CD25 i HLA-DR, również są komórkami aktywowanymi [24]. Badacze ci nie są jednak do końca pewni, czy opisywane przez nich aktywowane limfocyty T są komórkami specyficznymi rozpoznającymi antygeny nowotworowe czy też inne, obecne w jelicie antygeny. Wysoką ekspresję późnego markera aktywacji HLA-DR na powierzchni limfocytów infiltrujących raka jajnika wykazał również Santin i wsp. [15]. Jego doświadczenia dowiodły, że nie tylko limfocyty izolowane z tkanki nowotworowej jajnika, ale również limfocyty izolowane z płynu otrzewnowego chorych kobiet, wykazują statystycznie wyższą ekspresję HLA-DR w porównaniu z krwią obwodową.

Największego problemu interpretacyjnego dostarcza analiza ekspresji powierzchniowej cząsteczki CD25. Jako, że jest ona podjednostką β receptora dla interleukiny 2 (interleukiny odpowiedzialnej *de facto* za wzrost i proliferację limfocytów) obniżona jej ekspresja może skutkować zredukowaniem lub zahamowaniem proliferacji specyficznymi antygenowo limfocytów T. Cząsteczka IL-2R β ulega ekspresji na wyciszających odpowiedź immunologiczną, supresorowych limfocytach Treg CD4+CD25+. Komórki te odpowiedzialne są za regulację aktywności limfocytów oraz wygaszanie reakcji zapalnej [25].

Przeprowadzone przez nas doświadczenia wykazały relatywnie niższą ekspresję receptora IL-2R α (CD25) na limfocytach pomocniczych i cytotoksycznych w stosunku do CD69 i HLA-DR oraz brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy ekspresją tego markera na limfocytach krwi i limfocytach infiltrujących zmienioną nowotworowo tkankę. Podobnie, obniżoną ekspresję markera CD25 w stosunku do CD69 i HLA-DR otrzymali Coventry i wsp. w badaniach nad pierwotnym rakiem piersi oraz Sheu i wsp. w raku szyjki macicy [26, 22]. Zarówno obserwacje cytowanych powyżej autorów jak i nasze własne doświadczenia sugerują, iż izolowane z tkanki nowotworowej, pozbawione ekspresji CD25, specyficzne antygenowo limfocyty T mogą mieć upośledzony mechanizm proliferacji a co za tym idzie, ekspansji klonalnej.

Według grupy kierowanej przez Sheu znikoma ekspresja CD25 na limfocytach infiltrujących guz jest fizycznie rozdzielona od względnie wysokiej ekspresji CD69 i HLA-DR [22]. Przeprowadzone przez wspomnianych powyżej badaczy doświadczenia *in vitro*, polegające na ocenie markerów aktywacji limfocytów poddanych działaniu mitogenów, sugerują, że obniżony poziom receptora IL-2R α (CD25) może być wynikiem nie, jak wcześniej przypuszczano, wewnętrznego defektu limfocytów, ale modulującego odpowiedź immunologiczną mikrośrodowiska guza, głównie zawartych w nim cytokin. W badaniach Pisa i wsp. oraz Merogi i wsp. wykazano obecność wysokiego stężenia immunosupresyjnie działającej cytokiny IL-10 w jamie brzusznej kobiet

chorych na raka jajnika [27, 28]. Przypuszcza się, że występująca lokalnie IL-10 może sprzyjać hamowaniu ekspresji IL-2R na powierzchni limfocytów infiltrujących guz oraz hamowaniu efektorowych funkcji tych komórek [18, 19, 20].

Doświadczenia Woo i wsp. dowiodły natomiast, że limfocyty Th wykazujące ekspresję markera CD25, izolowane od chorych na raka jajnika lub niedrobnokomórkowego raka płuca, wydzielają immunosupresyjną cytokinę TGF- β [25]. Jak wielokrotnie opisywano, TGF- β hamuje nie tylko proliferację limfocytów, ale również ekspresję CD25 na aktywowanych limfocytach T i cytotoksyczność limfocytów CD3+CD8+. Badacze podejrzewają, że wśród infiltrujących tkankę nowotworową jajnika limfocytów T CD4+CD25+ znajdują się regulatorowe limfocyty Treg. Obecność limfocytów Treg we krwi obwodowej u pacjentek z rakiem jajnika potwierdziły badania Barnett i wsp. [29].

Na podstawie analizy ekspresji wybranych markerów aktywacji: CD69 oraz HLA-DR na powierzchni limfocytów infiltrujących guz oraz obecnych we krwi obwodowej pacjentek chorych na raka jajnika, dowiedliśmy, że komórki te są komórkami aktywowanymi. Biorąc pod uwagę statystycznie wyższą ekspresję markerów tych cząsteczek na powierzchni TIL przypuszczamy, że bezpośredni kontakt limfocytów T z antygenami nowotworu ma istotny wpływ na pobudzenie tych komórek. Relatywnie niska ekspresja CD25 może natomiast sugerować zaburzenia klonalnej ekspansji antygenowo-specyficznymi limfocytów, a co za tym idzie pełnić funkcję mechanizmu wygaszającego przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną.

Wnioski

1. Wykazano obecność limfocytów pomocniczych CD3+CD4+ i cytotoksycznych CD3+CD8+ we krwi obwodowej i tkance raka jajnika, przy czym we krwi dominującą populację stanowiły limfocyty pomocnicze, natomiast w guzie cytotoksyczne.
2. Zaobserwowano statystycznie istotnie wyższą ekspresję bardzo wczesnego CD69 i późnego HLA-DR markera aktywacji zarówno w przypadku limfocytów pomocniczych jak i cytotoksycznych izolowanych z tkanki nowotworowej w porównaniu z krwią.
3. Odnotowano statystycznie wyższą ekspresję receptora IL-2R α (CD25) na limfocytach krwi obwodowej w porównaniu z limfocytami izolowanymi z guza.

Przeprowadzone badania były finansowane z grantu: KBN NN407038537 oraz KBN NN407160940. Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach Projektu: „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007-2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

Zgoda Komisji Bioetycznej na projekt „Ocena fenotypu i stopnia aktywacji limfocytów infiltrujących rak jajnika” – Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie, Al. Raławickie 1, nr zgody KE-0254 /129/2011

Piśmiennictwo

1. Bednarek W, Mazurek M, Ōwiklińska A, Baczyński B. Ekspresja wybranych markerów i modulatorów angiogenezy u chorych na raka jajnika w okresie przed-, około- i pomenopauzalnym. *Ginekol Pol.* 2009, 80, 93-98.
2. Mądry R. Chemioterapia raka jajnika. W: *Ginekologia onkologiczna*. Markowska J. (red.). Wrocław Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, 2006, 894-909.
3. Nowicka A, Rogala E, Wertel I, [i wsp.]. Układ immunologiczny w chorobie nowotworowej jajnika – sojusznik czy wróg? *Ginekol Dypl.* 2011, 13, 28-32.
4. Kozar-Kamińska K, Kamiński R. Aktywacja limfocytów. W: *Immunologia*. Warszawa, 2008, 223-240.
5. Melichar B, Nash M, Lenzi R, [et al.]. Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. *Clin Exp Immunol.* 2000, 119, 19-27.
6. Weiss A, Littman D. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.* 1994, 76, 263-274.
7. Canuso A, Licenziati S, Conulli M, [et al.]. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry.* 1997, 27, 71-76.
8. Riso A, Smilovich D, Capra M, [et al.]. CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J Immunol.* 1991, 146, 4105-4114.
9. Marzio R, Manuel J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999, 21, 565-582.
10. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, [et al.]. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients in gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res.* 2003, 9, 4404-4408.
11. Crabtree G. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science.* 1989, 243, 355-361.
12. Waldmann T. The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem.* 1991, 266, 2681-2684.
13. Holling T, Schooten E, van Den Elsen P. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol.* 2004, 65, 282-290.
14. Skrzydło M, Bossowski A, Ilendo E, [i wsp.]. Wykorzystanie hodowli komórkowych do analizy ekspresji HLA-DR+ na powierzchni komórek pęcherzykowych tarczycy metodą cytometrii przepływowej. *Endokrynol Ped.* 2008, 2, 9-16.
15. Santin A, Hermonat P, Ravaggi A, [et al.]. Phenotypic and functional analysis of tumor-infiltrating lymphocytes compared with tumor-associated lymphocytes from ascitic fluid and peripheral blood lymphocytes in patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest.* 2001, 51, 254-261.
16. Markowska J, Lacki J, Jaroszewski J, Wiktorowicz K. The usefulness of CD4/CD8 ratio evaluation in monitoring of ovarian cancer patients. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1995, 16, 54-58.
17. Wertel I, Nowicka A, Rogala E, [Kotarski J. Peritoneal immune system in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Int Rev Immunol.* 2011, 30, 87-101.
18. Ding L, Shevach E. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol.* 1992, 148, 3133-3139.
19. Chitko-McKown C, Ruef B, Rice-Ficht A, Brown W. Interleukin-10 downregulates proliferation and expression of interleukin-2 receptor p55 chain and interferon- γ , but not interleukin-2 or interleukin-4, by parasite-specific helper T cells clones obtained from cattle chronically infected with *Babesia bovis* or *Fasciola hepatica*. *J Interferon Cytokine Res.* 1995, 15, 915-922.
20. Dallman M, Shiho O, Page T, [et al.]. Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway. *J Exp Med.* 1991, 173, 79-87.
21. Nelson B. The impact of T-cell immunity on ovarian outcomes. *Immunol Rev.* 2008, 222, 101-116.
22. Sheu B, Lin R, Ho H, Huang S. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma. *Human Immunol.* 1997, 56, 39-48.
23. Rybojad P, Tabarkiewicz J, Baran I, [et al.]. Immune activation's status of T cells derived from peripheral blood, lymph nodes and cancer tissue of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonia, sectio D.* 2004, 59, 105-110.
24. Diederichsen A, Zeuthen J, Christensen P, Kristensen T. Characterisation of tumour infiltrating lymphocytes and correlations with immunological surface molecules in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1999, 35, 721-726.
25. Woo E, Chu C, Goletz T, [et al.]. Regulatory CD4(+)/CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001, 61, 4766-4772.
26. Coventry B, Weeks S, Heckford S, [et al.]. Lack of IL-2 cytokine expression despite IL-2 messenger RNA transcription in tumor-infiltrating lymphocytes in primary human breast carcinoma: selective expression of early activation markers. *J Immunol.* 1996, 156, 3486-3492.
27. Pisa P, Halapi E, Pisa E, [et al.]. Selective expression of interleukin 10, interferon- γ , and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, 89, 7708-7712.
28. Merogi A, Marrogi A, Ramesh R, [et al.]. Tumor-host interaction: analysis of cytokines, growth factors, and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinomas. *Hum Pathol.* 1997, 28, 321-331.
29. Barnett B, Kryczek I, Cheng P, [et al.]. Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol.* 2005, 54, 369-377.

IX Krajowa Konferencja Szkoleniowa
**Ginekologia
i położnictwo 2012**

Kraków, 23–24 listopada 2012 r.

Nowohuckie Centrum Kultury, al. Jana Pawła II 232

Więcej informacji na stronie: mp.pl/gjp2012

Kierownik naukowy prof. Jan Kotarski

ginekologia i położnictwo 2012

Piątek

Sesja I – Sesja International Continence Society

- Nietrzymanie moczu – rodzaje i diagnostyka
- Jak zapobiegać uszkodzeniom dna miednicy w czasie porodu?
- Leczenie operacyjne wypadania narządów macicy – *mesh* or *not to mesh*?

- Otwarcie konferencji oraz wręczenie nagród laureatom programu edukacyjnego „Postępy w ginekologii i położnictwie”
- Wykład wprowadzający do warsztatów

Sesja II – Sesja interdyscyplinarna

- Padaczka u kobiet w wieku rozrodczym
- Nawracające zakażenia układu moczowego
- Czy postępy w mikrobiologii ułatwiają pracę ginekologa?
- Wybrane choroby zakaźne u ciężarnych

Sesja III – Ginekologia

- Badanie śródoperacyjne: oczekiwania klinicysty a możliwości patologa
- Zespół bólowy miednicy mniejszej
- Nowości w ginekologii dziecięcej

Sesja IV – Sesja etyczno-prawna

- Czy kompromis może być alternatywą dla sprzeciwu sumienia?
- Ochrona karna lekarza
- Znaczenie właściwego informowania pacjentów – opisy przypadków

Sobota

Sesja V – Położnictwo

- Nowotwory u kobiet w ciąży
- Szew ratunkowy
- Postępowanie podczas ciąży i porodu w przypadku mięśniaków macicy
- Przebieg ciąży po leczeniu niepłodności

Sesja VI – Wewnątrzmaciczna terapia płodu

- Postępowanie w razie wykrycia zaburzeń serca płodu
- Diagnostyka wad i zaburzeń u płodu, które można leczyć wewnątrzmacicznie
- Terapia wewnątrzmaciczna

Sesja VII – Sesja diagnostyczno-endokrynologiczna

- Ograniczenia i pułapki metod oznaczania hormonów i markerów nowotworowych
- Najnowsze metody biochemiczne i ultrasonograficzne w ocenie ryzyka raka jajnika i raka endometrium
- Wytyczne North American Menopause Society dotyczące terapii hormonalnej z 2012 roku
- *Dysmenorrhoea* – banalny problem i niebanalne trudności diagnostyczno-terapeutyczne

Sesja VIII – „Jak to robie?”

- Wysiłkowe nietrzymanie moczu – jak prawidłowo zakładać *sling* podcewkowy?
- Nawrotowe nietrzymanie moczu – substancje wypełniające
- Zabiegi oszczędzające w przypadku raka sromu – „za i przeciw”
- Histeroskopia w leczeniu niepłodności

Program konferencji może ulec zmianie. W czasie konferencji równolegle z wykładami będą się odbywać warsztaty.

Zgłoszenia

- telefonicznie: 12 293 40 04
- pocztą elektroniczną: gjp2012@mp.pl
- na stronie internetowej: mp.pl/gjp2012

medycyna praktyczna