

Stężenie rozpuszczalnego liganda dla receptora CD30 (sCD30L) – markera procesu apoptozy u kobiet z nowotworem jajnika

Concentration of soluble ligand for receptor CD30 (sCD30L)
– marker of apoptosis in women with ovarian tumor

Mielczarek-Palacz Aleksandra¹, Kondera-Anasz Zdzisława¹, Sikora Justyna¹,
Sadowski Krzysztof², Świtała Jerzy¹, Kubina Robert¹

¹ Katedra i Zakład Immunologii i Serologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

² Oddział Kliniczny Ginekologii i Położnictwa, Katedra Zdrowia Kobiety, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Streszczenie

Cel pracy: Zaburzenia apoptozy leżą u podstaw patogenezy wielu schorzeń, w tym także chorób nowotworowych jajnika. Celem pracy była ocena stężenia rozpuszczalnego liganda dla receptora CD30 (sCD30L) – markera procesu apoptozy u kobiet z nowotworem jajnika.

Materiał i metody: Badaniami objęto 80 kobiet w wieku od 21 do 62 lat, w tym: 30 kobiet z Cystadenocarcinoma serosum la, 35 z Cystadenoma serosum oraz 15 kobiet z Teratoma maturum. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych kobiet w wieku od 24 do 60 lat, u których nie stwierdzono patologicznych zmian w obrębie układu rozrodczego. Stężenie sCD30L w surowicy wszystkich badanych kobiet oraz w płynie z torbieli kobiet z gruczolakotorbielakiem surowiczym jajnika oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA.

Wyniki: Najwyższe stężenie sCD30L zaobserwowano w surowicy kobiet z rakiem jajnika i było ono istotnie podwyższone w porównaniu do stężenia u kobiet z gruczolakotorbielakiem surowiczym i potwornikiem dojrzalym jajnika ($p < 0,0001$). W płynie z torbieli jajnika stężenie tego markera było istotnie podwyższone w porównaniu ze stężeniem w surowicy ($p < 0,0001$).

Wnioski: U kobiet z nowotworem jajnika dochodzi do zaburzenia procesu apoptozy, co manifestuje się wzrostem w surowicy krwi stężenia sCD30L. Zmiany te nasilają się zwłaszcza u kobiet z rakiem jajnika. Podwyższone stężenie badanego parametru w płynie z torbieli jajnika ma związek z lokalną supresją odpowiedzi immunologicznej.

Słowa kluczowe: **apoptoza / ligand CD30 / nowotwory jajnika /**

Summary

Objectives: Impairments of apoptosis processes are the basis of pathogenesis of many diseases, including ovarian tumors. The aim of the study was to evaluate the concentration of soluble ligand for receptor CD30 (sCD30L) – marker of apoptosis in women with ovarian tumor.

Material and methods: The study comprised 80 women, aged from 21 to 62, and included 30 patients with Cystadenocarcinoma serosum la, 35 with Cystadenoma serosum and 15 women with Teratoma maturum. The control group consisted of 30 healthy women, aged 24 to 57, with no evidence of pathological disorders in the reproductive system. The concentration of sCD30L in the serum of all studied women and in the fluid of ovarian cyst of women with cystadenoma serosum were measured by immunoenzymatic method ELISA.

Adres do korespondencji:

Aleksandra Mielczarek-Palacz
Katedra i Zakład Immunologii i Serologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
40-074 Katowice, ul. Raciborska 15
tel/fax (32) 208 74 12
e-mail: apalacz@sum.edu.pl

Otrzymano: 05.11.2008

Zaakceptowano do druku: 25.05.2009

Results: The highest level of sCD30L was observed in the serum of women with ovarian cancer and it was significantly higher when compared to the concentration in the serum of women with cystadenoma serous and teratoma maturum of the ovary ($p < 0.0001$). In the fluid of ovarian cyst, the concentration of this marker was significantly higher in comparison with the level in the serum ($p < 0.0001$).

Conclusions: In women with ovarian tumors we observed impairments of the apoptosis process, which is associated with an increased concentration of sCD30L in the serum. These changes are more intense in women with ovarian cancer. Higher level of the study parameter in the fluid of ovarian cyst is associated with the local immune response suppression.

Key words: **apoptosis / CD30 ligand / ovarian neoplasms /**

Wstęp

Rak jajnika pozostaje do dzisiaj jednym z najtrudniejszych problemów diagnostycznych i terapeutycznych współczesnej onkologii ginekologicznej, a pięcioletnie przeżycia u tych chorych wynoszą zaledwie 25-35% [1]. Istnieje zatem konieczność kontynuacji badań nad biologią tego nowotworu. Pewne nadzieje stwarza poznanie procesu apoptozy, czyli fizjologicznej, programowanej śmierci komórki [2, 3, 4].

W warunkach prawidłowych apoptoza odpowiada za utrzymanie homeostazy w organizmie, dzięki zachowaniu równowagi pomiędzy proliferacją a eliminacją starzejących się lub zmienionych patologicznie komórek [5, 6, 7].

Z piśmiennictwa wynika, że w komórkach nowotworowych obserwuje się obniżenie zdolności do prawidłowego przeprowadzenia procesu apoptozy [8, 9, 10, 11]. Ważną rolę w regulacji tego procesu odgrywa nadrodzina cząsteczek czynnika martwicy nowotworu TNF (*tumor necrosis factor*). Do nadrodziny tej należą co najmniej 22 cząsteczki oraz ponad 30 receptorów [12, 13]. Interakcja receptora ze swoistym ligandem może wpływać na różnicowanie, proliferację oraz powodować śmierć komórki [14, 15]. Jednym z ważniejszych białek uczestniczących w tych procesach jest ligand dla receptora CD30 (CD30L), który znajduje się głównie na powierzchni aktywnych limfocytów T, granulocytów, komórek dendrytycznych, a także na powierzchni monocytów. Cząsteczka ta należy do białek błonowych typu II i podobnie do innych przedstawicieli nadrodziny TNF, przyjmuje konformację β [16].

Oprócz formy związanej z błonami komórkowymi w regulacji apoptozy biorą udział także formy rozpuszczalne, które mogą być oznaczane w płynach biologicznych. Po raz pierwszy CD30L został zidentyfikowany na aktywowanych mysich limfocytach T. Ponadto, obecność CD30L wykryto na komórkach utrzymujących żywotność limfocytów T w śledziona badanych myszy, co odgrywa prawdopodobnie znaczącą rolę w funkcjonowaniu tkanek limfatycznych [17]. Ligand dla receptora CD30 zidentyfikowano także na komórkach grasicy znajdujących się na zewnętrznej ścianie ciałek Hassala. Romagnani i wsp. zaobserwowali, że ekspresja CD30L na powierzchni ciałek Hassala była znacznie wyższa w porównaniu z innymi tkankami zarówno limfatycznymi jak i nielimfatycznymi [18]. Badania na myszach z defektem lub całkowitym brakiem CD30 wykazały, że współistnienie tych cząstek ma ogromne znaczenie w usuwaniu autoreaktywnych limfocytów T.

Cel pracy

Celem pracy była ocena stężenia sCD30L – markera procesu apoptozy w surowicy kobiet z nowotworem jajnika oraz w płynie z torbieli kobiet z gruczolakotorbielakiem surowiczym jajnika.

Materiał i metody

Badaniami objęto 80 kobiet w wieku od 21 do 62 lat (średnia wieku: $47,3 \pm 12,6$ lat) z rozpoznaniem nowotworem jajnika. U 35 kobiet w wieku od 21 do 62 lat (średnia wieku: $44,4 \pm 11,3$ lat) rozpoznano gruczolakotorbielaka surowiczego (*Cystadenoma serosum*), a u 15 kobiet w wieku od 25 do 62 lat (średnia wieku: $44,5 \pm 10,2$ lat) stwierdzono potworniaka dojrzalego jajnika (*Teratoma maturum*).

Pozostałą część grupy badanej tworzyły 30 kobiet w wieku od 29 do 59 lat (średnia wieku: $45,0 \pm 10,2$ lat) z rozpoznaniem rakiem surowiczym jajnika (*Cystadenocarcinoma serosum*), w stopniu zaawansowania klinicznego Ia według klasyfikacji FIGO. Rozpoznanie nowotworu ustalono na podstawie objawów klinicznych, wyników badania ginekologicznego i histopatologicznego oraz badań laboratoryjnych.

Do grupy badanej zakwalifikowano kobiety, u których kliniczne rozpoznanie nowotworu jajnika potwierdzono wynikiem badania histopatologicznego i wykluczono inne współistniejące schorzenia narządów rodnych.

Materiał do badań pochodził z Oddziału Klinicznego Ginekologii i Położnictwa, Katedry Zdrowia Kobiety, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Rudzie Śląskiej. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych kobiet w wieku od 24 do 60 lat (średnia wieku: $45,6 \pm 8,9$ lat), u których nie stwierdzono patologicznych zmian w obrębie układu rozrodczego.

U wszystkich kobiet materiałem wykorzystywanym do badań była surowica krwi, a ponadto płyn z torbieli w przypadku kobiet z gruczolakotorbielakiem surowiczym jajnika. U kobiet z grupy badanej krew pobierano po ustaleniu rozpoznania klinicznego, przed zabiegiem operacyjnym. Krew pobierano w godzinach rannych z żyły łokciowej, na „skrzep” celem uzyskania surowicy. Po 30 minutach od pobrania, krew wirowano przy 1500 x g przez 15 minut. Otrzymaną w ten sposób surowicę przechowywano w małych porcjach w temperaturze -80°C do czasu wykonania badań. Ponadto, od kobiet z gruczolakotorbielakiem surowiczym jajnika pobierano płyn z torbieli przed badaniem śródoperacyjnym. Po 30 minutach od pobrania, płyn wirowano przy 1500x g przez 15 minut. Uzyskany nadsącz przechowywano w małych porcjach w temperaturze -80°C do czasu wykonania badań.

Stężenie rozpuszczalnego liganda dla receptora CD30 (sCD30L)...

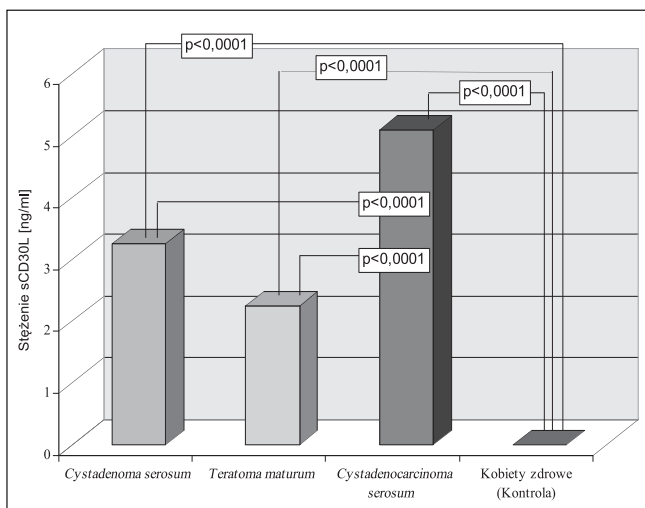
Natomiast od kobiet z grupy kontrolnej, krew pobierano, gdy kobiety zgłaszały się na badania kontrolne i stosowano tą samą procedurę poboru materiału biologicznego.

Do oznaczenia stężenia sCD30L zastosowano metodę immunoenzymatyczną ELISA. W tym celu wykorzystano zestaw Human sCD30L ELISA firmy Bender Medsystems Diagnostics GmbH, Wiedeń, Austria. Czułość testu wynosiła 0,5ng/ml. Wszystkie badane kobiety wyraziły zgodę na przeprowadzenie badań naukowych. Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

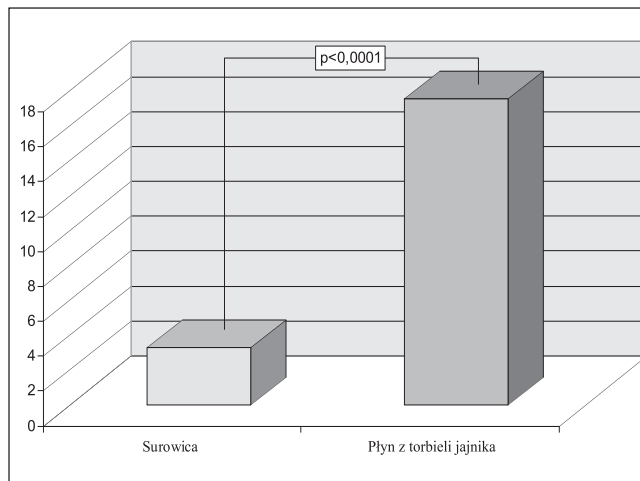
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, korzystając z programu komputerowego Statistica for Windows wersja 8.0 oraz Microsoft Excel. W celu zweryfikowania rozkładu otrzymanych wyników zastosowano test Shapiro-Wilka. Po ustaleniu, że uzyskane wyniki odpowiadały rozkładowi normalnemu, dla każdego parametru obliczono średnią arytmetyczną (\bar{x}) i odchylenie standardowe (SD). Średnie wartości ocenianych parametrów w grupie badanej i kontrolnej porównywano za pomocą testu t-Studenta. Za istotny statystycznie przyjmowano poziom $p < 0,05$.

Wyniki

Uzyskane wyniki zilustrowano na rycinach 1 i 2. U wszystkich kobiet z grupy badanej stwierdzono obecność sCD30L, a jego stężenie było zróżnicowane w zależności od rozpoznania. Najwyższe średnie stężenie tego parametru stwierdzono w surowicy chorych z rakiem jajnika: $5,09 \pm 0,86 \text{ ng/ml}$ i było istotnie podwyższone w porównaniu ze średnim stężeniem w grupie kobiet z gruczolakotorbielakiem surowicznym jajnika: $3,26 \pm 0,74 \text{ ng/ml}$, ($p < 0,0001$). Natomiast najniższe średnie stężenie sCD30L stwierdzono u kobiet z potworniakiem dojrziałym: $3,25 \pm 0,85 \text{ ng/ml}$. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy gruczolakotorbielakiem surowicznym i potworniakiem dojrziałym jajnika. W surowicy kobiet z grupy kontrolnej nie wykryto rozpuszczalnej formy liganda dla receptora CD30.



Rycina 1. Średnie stężenie sCD30L w surowicy kobiet z Cystadenoma serosum, Teratoma maturum, Cystadenocarcinoma serosum i kobiet zdrowych (kontrola).



Rycina 2. Średnie stężenie sCD30L w surowicy i w płynie z torbieli jajnika kobiet z gruczolakotorbielakiem surowicznym jajnika.

Ponadto, w grupie kobiet z torbielą jajnika porównano także średnie stężenie sCD30L w surowicy ze stężeniem w płynie z torbieli jajnika. W płynie z torbieli jajnika średnie stężenie sCD30L wynosiło $17,52 \pm 2,43 \text{ ng/ml}$ i było bardzo istotnie podwyższone w porównaniu ze średnim stężeniem w surowicy ($p < 0,0001$).

Dyskusja

Chorobom nowotworowym jajnika towarzyszą zaburzenia w funkcjonowaniu układu odpornościowego dotyczące zwłaszcza rozpoznawania komórek nowotworowych i ich skutecznego niszczenia w procesie apoptozy. Ze śmiercią komórki wiąże się nadzieje na wyjaśnienie patogenezy nowotworów jajnika [19, 20].

Przekazywanie sygnału komórce do poddania się przemianom apoptotycznym może przebiegać różnymi drogami. Jedną z ważniejszych jest indukcja za pomocą receptorów błonowych i odpowiednich ligandów. Ostateczny efekt cytotoksyczny w mechanizmie zależnym od tych cząsteczek wynika zarówno z ekspresji liganda na komórce efektorowej, jak i swoistego receptora na komórce docelowej. Jednym z ważniejszych ligandów uczestniczących w regulacji apoptozy jest ligand dla receptora CD30, który może także być uwalniany do płynów ustrojowych pod wpływem metaloproteinaz, gdzie występuje jako forma rozpuszczalna. Jego obecność może być efektem złuszczenia cząstek błonowych podczas uszkodzenia komórki lub wewnątrzkomórkowej syntezy a następnie wydzielania do krwi [21].

W przeprowadzonych przez nas badaniach nie wykryto w surowicy kobiet zdrowych rozpuszczalnej formy liganda dla receptora CD30. Natomiast, u wszystkich kobiet z grupy badanej stwierdzono sCD30L. Obecność formy rozpuszczalnej może być efektem złuszczenia cząstek błonowych co wywołuje zakłóconą interakcję CD30/CD30L na komórce nowotworowej prowadzącą do zahamowania procesu apoptozy.

Stężenie tego parametru było zróżnicowane w zależności od rozpoznania nowotworu.

Najwyższe stężenie sCD30L stwierdzono w surowicy kobiet z rakiem surowiczym jajnika, co prawdopodobnie jest związane ze zwiększonym uwalnianiem przez komórki nowotworu złośliwego. Ponadto, wzrost stężenia CD30L może powodować niszczenie przez nowotwór aktywnych wobec niego limfocytów T. W rezultacie powstają strefy immunologicznego uprzywilejowania sprzyjające dalszemu rozwojowi nowotworu.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono także istotny wzrost stężenia sCD30L w płynie z torbieni jajnika w porównaniu ze stężeniem w surowicy. Świadczy to o wzmożonym uwalnianiu badanego parametru w wyniku destrukcji nabłonka otrzewnowo – podobnego wyściełającego torbiele.

W dostępnej literaturze brak jest informacji o tym jak kształtuje się stężenie sCD30L w surowicy chorych z nowotworem jajnika. Dotychczasowe badania dotyczyły innych nowotworów. Oceniano ekspresję liganda dla receptora CD30 na komórkach raka podstawnocomórkowego skóry. Diaconu i wsp., stwierdzili, że w przypadku skóry znaczącym źródłem zarówno CD30L, jak i CD40L są komórki tuczne [22].

Ponadto, autorzy dowiedli, że zwiększona ekspresja tych ligandów jest związana z powstawaniem guzów. Natomiast Rossi i wsp. odkryli obecność glikoproteiny CD30L na komórkach blastycznych w ostrej białaczce nielimfoblastycznej [23]. Zdaniem tych autorów, istnienie specyficznych receptorów dla cytokin umiejscowionych na powierzchni blastów może ułatwiać limfocytom Th2 wydzielanie interleukiny – 4, która wspomaga syntezę swoistych przeciwciał przez limfocyty B [23]. Zdaniem badaczy prawdopodobnie ma to znaczenie w obronie przeciwnowotworowej.

Badano także ekspresję liganda dla receptora CD30 w chłoniakach. Mori i wsp. wykazali, że CD30L może odgrywać znaczącą rolę w przebiegu samoregresji chłoniaka, co daje możliwość analizowania interakcji receptora CD30 wraz ze swoistym ligandem CD30L oraz określenie biologii tych komórek [24].

Oceniano także rolę układu CD30/CD30L. Nishimura i wsp. wykazali istotną korelację pomiędzy CD30 i jego ligandem CD30L w zakażeniach bakteryjnych wywołanych przez *Listeria monocytogenes* [25]. Badacze odkryli, że sygnał CD30/CD30L dotyczy zwłaszcza limfocytów CD8+ odpowiedzialnych za działanie cytotoksyczne. Autorzy potwierdzili istnienie odpowiedzi przeciwko bakteriom indukowanym poprzez CD30L oraz wykazali rolę tego liganda w odpowiedzi typu komórkowego.

Obecnie trwają próby wykorzystania liganda dla receptora CD30 w terapii przeciwnowotworowej [26]. Badania prowadzone dotychczas wykazały, że zastosowanie CD30L wpływa na aktywację odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom guza, co w konsekwencji prowadzi je na drogę apoptozy. Jednak zastosowanie kliniczne tej cząsteczki wymaga dalszych badań.

Ponadto, poznanie mechanizmów regulujących proces apoptozy być może pozwoli na wprowadzenie nowych parametrów diagnostycznych, co umożliwi wczesne rozpoznanie choroby.

Wnioski

1. U kobiet z nowotworem jajnika dochodzi do zaburzenia procesu apoptozy, co manifestuje się wzrostem w surowicy krwi stężenia sCD30L. Zmiany te nasilają się zwłaszcza u kobiet z rakiem jajnika.
2. Podwyższone stężenie badanego parametru w płynie z torbieni jajnika ma związek z lokalną supresją odpowiedzi immunologicznej.

**Praca została zgłoszona na III Sympozjum nt.:
„Postępy w diagnostyce i terapii w położnictwie i ginekologii”,
9-11.10.2008 r. w Łodzi**

Piśmiennictwo

1. Nowak-Markwitz E, Spaczyński M. Postępy w diagnostyce raka jajnika. *Prz Menopauzal.* 2006, 1, 12-16.
2. Van Cruchten S, Van den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.* 2002, 31, 214-223.
3. Wang A, Dean D. Apoptosis, cell signaling, and human diseases: molecular mechanisms. *JAMA.* 2007, 298, 2203-2204.
4. Kam P, Ferch N. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia.* 2000, 55, 1081-1093.
5. Drewa T, Olszewska D, Woźniak A. Znaczenie zaprogramowanej śmierci komórki w patogenezie chorób człowieka. *Pol Merk Lek.* 2002, 12, 336-341.
6. Malhi H, Gores G, Lemasters J. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology.* 2006, 43, 31-44.
7. Loro L, Vintermyr O, Johannessen A. Apoptosis in normal and diseased oral tissues. *Oral Diseases.* 2005, 11, 274-287.
8. Whiteside T. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol.* 2006, 16, 3-15.
9. Kaufmann S, Gores G. Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioassays.* 2000, 22, 1007-1017.
10. Han S, Kim Y, Kim T. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep.* 2008, 41, 1-10.
11. Nguyen J, Wells J. Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003, 100, 7533-7538.
12. Zhang G. Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr Opin Struct Biol.* 2004, 14, 154-160.
13. Zhou T, Mountz J, Kimberly R. Immunobiology of tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunol Res.* 2002, 26, 323-336.
14. Idriss H, Naismith J. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* 2000, 50, 184-195.
15. Zhou T, Mountz J, Kimberly R. Immunobiology of tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunol Res.* 2002, 26, 323-336.
16. Kennedy M, Willis C, Armitage R. Deciphering CD30 ligand biology and its role in humoral immunity. *Immunology.* 2006, 118, 143-152.
17. Watts T. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol.* 2005, 23, 23-68.
18. Romagnani P, Annunziato F, Manetti R, [et al.]. High CD30 ligand expression by epithelial cells and Hassal's corpuscles in the medulla of human thymus. *Blood.* 1998, 91, 3323-3332.
19. Markström E, Svensson E, Shao R, [et al.]. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction.* 2002, 123, 23-30.
20. Brustmann H. Apoptotic bodies as a morphological feature in serous ovarian carcinoma: correlation with nuclear grade, Ki-67 and mitotic indices. *Pathol Res Pract.* 2002, 198, 85-90.
21. So T, Lee S, Croft M. Tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor family members that positively regulate immunity. *Int J Hematol.* 2006, 83, 1-11.
22. Diaconu N, Kaminska R, Naukarinen A, [et al.]. Increase in CD30 ligand/CD153 and TNF-alpha expressing mast cells in basal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2007, 56, 1407-1415.
23. Rossi F, Degan M, Mazzocco F, [et al.]. Co-expression of CD30 ligand and interleukin-4 (IL-4) receptors by acute myeloid leukaemia blasts is associated with the expansion of IL-4 producing CD30+ normal T cells. *Br J Haematol.* 2002, 117, 56-69.
24. Mori M, Manuelli C, Pimpinelli N, [et al.]. CD30-CD30 ligand interaction in primary cutaneous CD30(+) T-cell lymphomas: a clue to the pathophysiology of clinical regression. *Blood.* 1999, 94, 3077-3083.
25. Nishimura H, Yajima T, Muta H, [et al.]. A novel role of CD30/CD30 ligand signaling in the generation of long-lived memory CD8+ T cells. *J Immunol.* 2005, 175, 4627-4634.
26. Younes A, Kadin M. Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligands and receptors in cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2003, 21, 3526-3534.