

Michał Wiśniewski¹, Krzysztof Koper², Ewelina Łukaszewska³,
Wojciech Jóźwicki³, Wiesława Windorbska⁴,
Magdalena Dutsch-Wicherek⁵, Łukasz Wicherek²

Received: 03.11.2011

Accepted: 10.11.2011

Published: 30.11.2011

Zmiany w populacji limfocytów Treg podczas chemioterapii u chorych na raka jajnika

Changes in the Treg lymphocyte population levels in patients being treated for ovarian cancer with chemotherapy

Изменения в популяции лимфоцитов Трег во время химиотерапии у больных с раком яичника

¹ Oddział Chemioterapii Centrum Onkologii im. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

² Klinika Ginekologii Onkologicznej Centrum Onkologii im. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy, Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Pielęgniarstwa Ginekologicznego CM w Bydgoszczy

³ Zakład Patologii Guza i Patomorfologii Centrum Onkologii im. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

⁴ Oddział Teleradioterapii Centrum Onkologii im. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

⁵ Poradnia Laryngologiczna Centrum Onkologii im. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

Correspondence to: Dr hab. n. med. Łukasz Wicherek, prof. UMK, Oddział Kliniczny Ginekologii i Onkologii CO im. F. Łukaszczyka, ul. Romanowskiej 2, 85-796 Bydgoszcz, tel. 52 374 33 99, 52 374 38 74, e-mail: mowicher@cyf-kr.edu.pl

Podziękowanie

Autorzy składają podziękowania Dr. n. med. Zbigniewowi Pawłowiczowi, dyrektorowi Centrum Onkologii im. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy – za stworzenie warunków do pracy naukowej i okazane wsparcie, a także Prof. dr. hab. n. med. Jerzemu Stelmachowowi – za cenne wskazówki i słowa wsparcia w pracy naukowej. Ponadto dziękują Christine Maisto za pomoc w przygotowaniu manuskryptu.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Zbigniew Pawłowicz – for generating the conditions advantageous for our research, and Professor J. Stelmachow – for his advice, helpful discussions, and friendly words of support. Lastly, authors would like to thank Christine Maisto for her assistance.

Source of financing: Department own sources

Streszczenie

Limfocyty regulatorowe T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (komórki Treg) odgrywają istotną rolę w mechanizmach nadzoru i tolerancji immunologicznej, hamując odpowiedź cytotoksyczną układu odpornościowego. Wykazano, że w trakcie rozwoju choroby nowotworowej liczebność limfocytów Treg wzrasta. Obecność nacieków z limfocytów Treg w mikrośrodowisku guza wiąże się z gorszym rokowaniem, a wzrost populacji komórek Treg we krwi obwodowej koreluje z progresją raka jajnika. W niniejszym badaniu sprawdzano wpływ chemioterapii stosowanej u chorych z rakiem jajnika na liczebność populacji Treg we krwi obwodowej. W tym celu odsetek Treg we krwi oznaczano przed, po 3 oraz po 6 kursach chemioterapii (TK – 13, CP – 1, TPT – 1 chora) za pomocą cytometrii przepływowej. Podczas pierwszych 3 cykli chemioterapii zaobserwowano początkowe zmniejszenie odsetka limfocytów T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ wśród limfocytów T CD4⁺, niemniej jednak różnica ta nie była znamienna statystycznie (p=0,3). Następnie w miarę kontynuowania chemioterapii odsetek limfocytów T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ wśród limfocytów T CD4⁺ wzrastał i po 6. cyklu w stosunku do aktywności po 3. cyklu chemioterapii był statystycznie znamiennej większy (p=0,02). Autorzy wnioskują, że badanie populacji Treg może być przydatne do oceny wpływu chemioterapii na układ odpornościowy gospodarza podczas leczenia systemowego chorych na raka jajnika.

Słowa kluczowe: limfocyty CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, Treg, rak jajnika, chemioterapia, immunologiczna tolerancja

Summary

Regulatory T lymphocytes CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ or Treg cells play a major role in immune system surveillance and tolerance. Treg cells are critical for controlling the immunological system because they inhibit the cytotoxic response. Moreover, it has been found that Treg cell recruitment into the tumor microenvironment reduces the chances of survival in cancer patients and that an increase in Treg cells in the peripheral blood correlates with the progression of ovarian cancer. In our study we addressed Treg cell population changes in cases of ovarian cancer where the patients were treated with chemotherapy. Using flow cytometry we determined the levels of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ lymphocytes in the peripheral blood of the patients prior to chemotherapy, after 3 courses of chemotherapy, and then after 6 courses (the respective regimens were: TK – 13, CP – 1, TPT – 1 patient). We observed that the Treg lymphocyte levels of ovarian cancer patients decreased after 3 courses of chemotherapy though the difference ($p=0.3$) was not statistically significant. After 6 chemotherapy courses, however, levels did increase to a statistically significant degree ($p=0.02$). We have therefore concluded that a measurement of the Treg cell population could be helpful in estimating the impact of chemotherapy on a patient's host immune system during the systemic treatment of ovarian cancer.

Key words: CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, Treg, ovarian cancer, chemotherapy, immune tolerance

Содержание

Лимфоциты регуляторы Т КД4⁺КД25⁺ФОИкПЗ⁺ (клетки Трег) играют существенную роль в механизмах наблюдения и иммунологической выносливости, задерживая цитологический ответ сопротивляемой системы. Доказано, что во время развития заболевания связанного с новообразованиями количество лимфоцитов Трег увеличивается. Наличие инфильтратов из лимфоцитов Трег в микросреде опухоли связано с неудачным прогнозированием, а увеличение популяции клеток Трег в периферической крови соотносится с прогрессией рака яичника. В представленном исследовании рассматривается влияние химиотерапии применяемой у больных страдающих раком яичника на количество популяции Трег в периферической крови. Для этого процент Трег в крови проверялся до, после трех и после шести курсов химиотерапии (ТК – 13, КП – 1, ТПТ – 1 больная) при помощи проточной цитометрии. Во время первых трех циклов химиотерапии сначала наблюдалось уменьшение процента лимфоцитов Т КД4⁺КД25⁺ФОИкПЗ⁺ среди лимфоцитов Т КД4⁺, тем не менее эта разница статистически не была существенной ($p=0.3$). Затем, по мере продолжения химиотерапии, процент лимфоцитов Т КД4⁺КД25⁺ФОИкПЗ⁺ среди лимфоцитов Т КД4⁺ увеличивался и после шестого цикла при сравнении с активностью после третьего цикла химиотерапии был статистически более значительным ($p=0.02$). Авторы делают вывод, что исследование популяции Трег может быть полезно для оценки влияния химиотерапии на иммунологическую систему хозяина во время системного лечения больных с раком яичника.

Ключевые слова: лимфоциты КД4⁺КД25⁺ФОИкПЗ⁺, Трег, рак яичника, химиотерапия, иммунологическая выносливость

WSTĘP

L imfocyty regulatorowe T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (komórki Treg) odgrywają istotną rolę w mechanizmach nadzoru i tolerancji immunologicznej. Komórki te są zdolne do ograniczenia aktywności limfocytów T (CD4⁺, CD8⁺), komórek dendrytycznych oraz komórek NK (*natural killer*). Pełnią one kluczową funkcję w kontroli natężenia procesów odpornościowych, hamując odpowiedź cytotoksyczną układu odpornościowego⁽¹⁾. Zmniejszenie aktywności komórek Treg obserwuje się w chorobach autoimmunologicznych, z kolei w trakcie rozwoju choroby nowotworowej liczebność tej populacji komórek układu odpornościowego wzrasta^(1,2). Komórki te są również odpowiedzialne za powstanie zjawiska tolerancji immunologicznej matki względem antygenów płodu⁽³⁻⁸⁾. Podczas rozwoju ciąży stwierdza się wzrost liczebności Treg w doczesnej oraz we krwi obwodowej matki. Jeszcze przed implantacją jaja płodowego w doczesnej w kolejnych fazach cyklu miesięczkowego obserwuje się zmiany w nacieku Treg do doczesnej. Prawdopodobnie

INTRODUCTION

R egulatory T lymphocytes CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ play a major role in immune system surveillance and tolerance. These cells are capable of suppressing the activity of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, dendritic cells, and NK cells (*natural killer*). Treg cells are critical for controlling the immunological system because they inhibit the T-cell mediated cytotoxic response⁽¹⁾. While decreased Treg activity has been observed in patients with autoimmunological diseases, over the course of cancerous diseases a number of these cell populations actually increase^(1,2). Additionally, Treg cells are responsible for immune tolerance of fetal antigens by the mother's immune system⁽³⁻⁸⁾. During pregnancy the number of Treg cells increases in both the decidua and peripheral blood of the mother. Moreover, it has been shown that even before the ovum implantation the amount of Treg cell infiltration in the decidua changes over the phases of the menstrual cycle. These changes are most likely responsible for the short-lived and selective

odpowiadają one za chwilową, selektywną supresję układu odpornościowego w okresie okołoolowulacyjnym i podczas okienka implantacyjnego. Ponieważ mechanizmy molekularne warunkujące powstanie tolerancji immunologicznej w ciąży są podobne do tych, które warunkują ucieczkę guza nowotworowego spod nadzoru układu immunologicznego, sugeruje się, że zmiany w liczebności populacji Treg w mikrośrodowisku raka mogą doprowadzać do zmian natężenia selektywnej supresji towarzyszącej rozwojowi raka⁽¹⁾. W ciąży proces selektywnej supresji odpowiedzi układu odpornościowego matki podlega pełnej kontroli i jest odwracalny (fluktuacyjnie zmienia się w cyklu miesięczkowym i podczas kolejnych etapów rozwoju ciąży), natomiast w chorobie nowotworowej odnotowuje się stały wzrost natężenia tego procesu. Zauważono, że obecność nacieków z limfocytów Treg w mikrośrodowisku guza wiąże się z gorszym rokowaniem⁽⁹⁻¹¹⁾. Wzrost populacji komórek Treg we krwi obwodowej koreluje z progresją zarówno raka jajnika, jak i innych nowotworów^(12,13). Wzrost ekspresji FOXP3⁺ może być niezależnym czynnikiem prognostycznym przeżycia całkowitego pacjentek z rakiem jajnika⁽¹⁴⁾. Leczenie raka jajnika pozostaje nierozwiązanym problemem klinicznym – zastosowanie radykalnego leczenia chirurgicznego oraz uzupełniającej chemioterapii nie przynosi satysfakcjonujących rezultatów leczenia u wszystkich chorych⁽¹⁵⁾. Z tego względu nadal poszukuje się sposobów na poprawę wyników leczenia. Jednym z nich może być immunoterapia⁽¹⁶⁻²¹⁾, trudno jednak ustalić właściwy moment dla jej rozpoczęcia. Wciąż nie wiadomo, czy immunoterapia ma być leczeniem samodzielnym, czy terapią uzupełniającą leczenie chirurgiczne lub chemioterapię.

W ostatnich badaniach autorzy niniejszej pracy, monitorując poziom natężenia selektywnej supresji układu odpornościowego za pomocą oceny liczebności populacji komórek Treg we krwi obwodowej, obserwowali, w jaki sposób leczenie chirurgiczne oddziałuje na zmniejszenie natężenia tego procesu⁽²²⁾. Wydaje się, iż zwiększenie radykalizmu zabiegu chirurgicznego w raku jajnika wpływa na odzyskanie przez układ odpornościowy zdolności do skutecznej kontroli choroby nowotworowej^(23,24). Ponadto monitorowanie stopnia selektywnej supresji układu odpornościowego może wskazać właściwy moment rozpoczęcia immunoterapii. Wyniki badań na modelach zwierzęcych świadczą, iż włączenie immunoterapii w okresie okołoperacyjnym poprawia wyniki leczenia⁽²⁵⁾. Do dziś nie stwierdzono, w jaki sposób chemioterapia wpływa na układ odpornościowy gospodarza. Z dotychczasowych badań wynika, że rekonstrukcja odpowiedzi układu odpornościowego po zastosowaniu chemioterapii jest możliwa, ale znacznie wydłużona w czasie^(26,27). Nie ma też praktycznego sposobu na monitorowanie odpowiedzi układu odpornościowego w trakcie chemioterapii. Z tego względu ustalenie roli, jaką odgrywają komórki Treg w rozwoju choroby nowotworowej, a przede wszystkim związku pomiędzy odpowiedzią na leczenie a poziomem selektywnej supresji, może pozwolić na poprawę wyników leczenia. W niniejszej pracy autorzy postanowili ocenić poziom Treg w surowicy chorych podczas kolejnych kursów chemioterapii w raku jajnika.

suppression of the immune system during the periovulatory period and implantation window. Since the molecular mechanisms controlling immunotolerance in pregnancy are similar to those of tumor immunosurveillance escape, it could be that changes in the Treg cell population in the tumor microenvironment also cause changes in selective immune suppression in cancer progression⁽¹⁾. During pregnancy the selective suppression of the mother's immune system is both fully controlled and reversible (changes during the menstrual cycle and pregnancy), but over the course of a cancerous disease constant intensification of this process is observed. It has been found that Treg cell recruitment into the tumor microenvironment reduces the chances of survival in cancer patients⁽⁹⁻¹¹⁾ and that an increase in Treg cells in the peripheral blood correlates with the progression of ovarian and other types of cancers^(12,13). An increase in FOXP3 expression may be an independent prognostic factor for survival in patients with ovarian cancer⁽¹⁴⁾. The type and application of therapy for ovarian cancer patients constitutes an unresolved clinical problem. The combination of radical surgery and adjuvant chemotherapy fails in many patients⁽¹⁵⁾, and so research toward improving treatment is needed. While immunotherapy seems to be effective in ovarian cancer treatment, it is difficult to assess the optimal time for incorporating it to achieve the best results⁽¹⁶⁻²¹⁾. So far we do not know whether immunotherapy could be a stand-alone procedure or adjuvant to surgery and chemotherapy.

Recently we discovered that surgery may alter the intensity of the selective suppression of the immune system as measured by the quantity of Treg cells in the peripheral blood⁽²²⁾. It would seem that by expanding the radicalism of the surgical procedure, the immune system surveillance could be recovered for successive tumor control^(23,24). Moreover, monitoring the degree of selective suppression of the immune system may help to assess the optimal time for introducing immunotherapy. Experiments on animals have revealed that the administration of immunotherapy during the perioperative period improved treatment results⁽²⁵⁾. Until now it has not been clear how chemotherapy influences the host immune system. Recent data shows that while it is possible for the immune system to recover after chemotherapy, it takes a long time^(26,27). For one thing, there is still no way to monitor immunological response during chemotherapy in clinical practice. Thus fully understanding the impact of Treg cells on the progression of cancer and, above all, discovering connections between the response to the therapy and the level of selective suppression could help in improving the results of treatment. In this study we decided to assess Treg levels in the blood of ovarian cancer patients during chemotherapy treatment.

MATERIAL AND METHODS

All the patients recruited for the study were ovarian cancer patients treated with chemotherapy at F. Lukaszczyk Memorial Oncology Center in Bydgoszcz, Poland, between October 2010 and May 2011. The characteristics of these patients are shown in table 1. Most of the patients underwent primary surgery in the Gynecology and Oncology Department at the

MATERIAŁ I METODY

Badaniem objęto pacjentki z rakiem jajnika poddawane chemioterapii w Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy pomiędzy październikiem 2010 a majem 2011 roku. Charakterystykę chorych przedstawiono w tabeli 1. Włączone do badania chore były pierwotnie leczone chirurgicznie w Klinice Ginekologii Onkologicznej CO w Bydgoszczy, a następnie otrzymywały chemioterapię z powodu wznowy lub progresji choroby na Oddziale Chemioterapii CO w Bydgoszczy (tabela 1). Średni wiek pacjentek wynosił 61 lat (39-75 lat). U większości stosowano chemioterapię wg schematu TK (paklitaksel + karboplatyna), pozostałe schematy to PC (cyklofosfamid + cisplatyna) – 1 chora oraz topotecan – 1 chora. W celu określenia odsetka limfocytów T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ we krwi obwodowej pacjentkom pobierano krew do probówki na EDTA w następujących odstępach czasu: przed chemioterapią, po 3. cyklu oraz po 6. cyklu chemioterapii. U 13 kobiet uzyskano wyniki przed i po 3. seriach chemioterapii, u 6 pacjentek – po 3. i 6. cyklu chemioterapii.

CYTOMETRIA PRZEPLYWOWA

Próbki do cytometrycznej analizy limfocytów Treg zostały przygotowane z użyciem kitu firmy eBioscience, Human Regulatory T Cell Staining Kit (nr kat. 88-8998), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Do 100 µl krwi

Oncology Center in Bydgoszcz and then were treated at the Chemotherapy Department at the Oncology Center in Bydgoszcz by adjuvant or palliative chemotherapy because of disease progression or relapse. The median patient age was 61 (39-75) years. Most of the patients received a TK (paclitaxel + carboplatin) chemotherapy regimen while a regimen of PC was given to the others (cyclophosphamide + cisplatin) – 1 patient and topotecan – 1 patient. In order to determine the level of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T lymphocytes peripheral blood samples were taken to EDTA tubes prior to chemotherapy, after 3 courses of chemotherapy, and then after 6 courses. The Treg levels were obtained from 13 patients prior to chemotherapy and then after 3 chemotherapy cycles, and from 6 patients after 3 and then after 6 cycles of chemotherapy.

FLOW CYTOMETRY

Samples for the cytometric analysis of Treg cell populations in the whole blood of patients and healthy donors were prepared using the Human Regulatory T Cell Staining Kit (eBioscience), according to the manufacturer's instructions with some minor modifications. To the 100 µl of blood, 15 µl of CD4 FITC and CD25 PE cocktail, and 5 µl of CD45 APC-Cy7 (Becton Dickinson) was added. After 30 min of incubation with mAbs (in the dark at 4°C) the cells were washed with Flow Cytometry Staining Buffer, centrifuged for 5 min at 350 g, and permeabilized with freshly prepared Fixation/Permeabilization Buffer

		Liczba paucetek Number of patients	% paucetek Patients %
FIGO	I	2	13
	II	1	6,6
	III	11	73,3
	IV	1	6,6
Cecha G guza Tumor G score	G2	4	26,6
	G3	5	33,3
	G nieokreślone G unknown	6	40
Schemat chemioterapii Chemotherapy regimen	TK (paklitaksel + karboplatyna) TK (paclitaxel + carboplatin)	13	86,6
	PC (cyklofosfamid + karboplatyna) PC (cyclophosphamide + carboplatin)	1	6,6
	TPT (topotecan) TPT (topotecan)	1	6,6
Typ histologiczny Cancer histology	Cystadenocarcinoma serosum + papillare	7	46,6
	Adenocarcinoma (pozostałe, w tym male differentiatum) Adenocarcinoma (unspecified including male differentiatum)	7	46,6
	Carcinoma	2	13

Tabela 1. Charakterystyka paucetek
Table 1. Patients characteristics

pobranej na EDTA dodano 20 μ l mieszaniny przeciwciał CD4 FITC i CD25 PE oraz, dodatkowo, w celu detekcji leukocytów, CD45 APC-Cy7 (BD, nr kat. 348815). Po 30 minutach inkubacji (w temperaturze 4°C w ciemności) komórki przepłukano 2 ml zimnego buforu Flow Cytometry Staining Buffer i odwirowano przez 5 minut przy 350 g, a następnie poddano permeabilizacji przy użyciu świeżo przygotowanego buforu (Fixation/Permeabilization Concentrate i Diluent w stosunku 1:3) przez 40 minut w temperaturze 4°C w ciemności. W następnych etapach komórki dwukrotnie przemywano 2 ml 1 \times stężonym buforem Permeabilization Buffer oraz blokowano przez dodanie 2 μ l surowicy szczurzej (15 minut w temperaturze 4°C w ciemności) i poddawano inkubacji z przeciwciałem anti-FOXP3 APC, przez 35 minut w temperaturze 4°C w ciemności (a w przypadku kontroli izotypowej ze szczurzym przeciwciałem IgG2a κ APC). Po dwukrotnym przemyciu 1 \times stężonym buforem Permeabilization Buffer i zawieszeniu w 0,5 ml buforu Flow Cytometry Staining Buffer komórki poddano analizie cytometrycznej. W każdym badaniu zbierano 30 tys. limfocytów, wśród których zabramkowano komórki CD4⁺, następnie podwójnie pozytywne komórki CD4⁺CD25⁺, a w ostatnim etapie w ich obrębie (i względem kontroli izotypowej) zaznaczono komórki wykazujące ekspresję czynnika transkrypcyjnego FOXP3.

ANALIZA STATYSTYCZNA

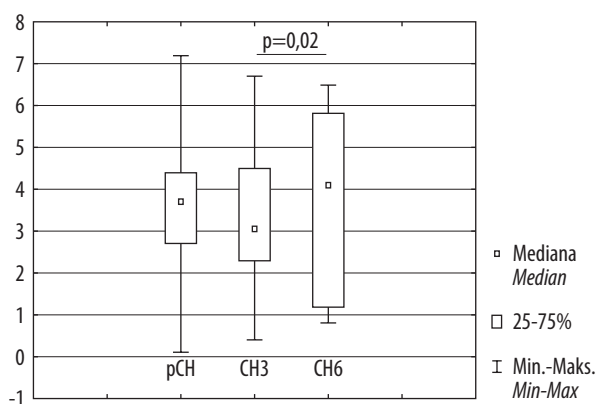
Rozkład zmiennych w badanej grupie sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Istotność statystyczną pomiędzy kolejnymi oznaczeniami zmierzono testem Wilcoxon dla par obserwacji. Za statystycznie istotną uznano wartość $p < 0,05$. Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą programu Statistica 8.0.

WYNIKI

Limfocyty T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ stwierdzono we wszystkich pobranych próbkach chorych na raka jajnika uczestniczących w badaniu. Podczas pierwszych 3 cykli chemioterapii zaobserwowano początkowe zmniejszenie odsetka limfocytów T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ wśród limfocytów T CD4⁺, niemniej jednak różnica ta nie była znamienna statystycznie ($p = 0,3$) (rys. 1, tabela 2). Następnie w miarę kontynuowania chemioterapii odsetek limfocytów T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ wśród limfocytów T CD4⁺ wzrastał i po 6. cyklu w stosunku do aktywności po 3. cyklu chemioterapii był statystycznie znamiennej większy ($p = 0,02$).

OMÓWIENIE

W niniejszym badaniu zaobserwowano zmniejszenie liczebności limfocytów Treg we krwi obwodowej po 3. cyklach chemioterapii w porównaniu z ilością Treg przed leczeniem, a następnie statystycznie znamiennej wzrost liczebności tej populacji komórek po 6. cyklach chemioterapii u chorych leczonych z powodu raka jajnika.



Rys. 1. Odsetek limfocytów FOXP3⁺ wśród limfocytów T CD4⁺ przed (pCH), po 3. (CH3) i 6. (CH6) cyklu chemioterapii
Fig. 1. Percentage of FOXP3⁺ lymphocytes within CD4⁺ lymphocytes prior to chemotherapy (pCH), after 3 (CH3) and after 6 (CH6) cycles of chemotherapy

(for 40 min in the dark at 4°C). Next, the cells were washed twice by adding 1 \times Permeabilization Buffer, blocked by normal rat serum (for 15 min in the dark at 4°C), and subsequently stained with antihuman FOXP3 APC antibody or rat IgG2a κ APC antibody (in the case of isotype control), for 35 min in the dark at 4°C. After another washing step, the cells were suspended in Flow Cytometry Staining Buffer and analyzed using BD FACS Canto II flow cytometer and BD FACS Diva Software (Becton Dickinson). In each sample, 3 \times 10⁴ lymphocytes were collected and gated on SSC \times CD45 APC-Cy7 dot-plot. Next, the populations of CD4⁺ FITC, CD25⁺ PE and double-positive CD4 and CD25 cells were distinguished among the lymphocytes. Finally, the gate of FOXP3 positive cells was established on the CD4⁺CD25⁺ subpopulation. In addition to the specific-stained cell analysis, the negative control was performed for each sample, to measure autofluorescence and the isotype control was performed to exclude non-specific staining of the specific antibodies.

STATISTICAL ANALYSIS

The distribution of variables in the study group was checked by the Shapiro-Wilk test. The statistical significance between the

Czas pobrania Sampling period	Liczba pacjentek Number of patients	Wartość p p value
Przed chemioterapią – pCH vs po CH3 Prior to chemotherapy (pCH) vs. after 3 (CH3) cycles	13	$p = 0,382353$
Po CH3 vs po CH6 After 3 (CH3) vs. after 6 (CH6) cycles of chemotherapy	6	$p = 0,027709$

Tabela 2. Zmiany liczebności populacji limfocytów Treg w zależności od liczby kursów chemioterapii
Table 2. Changes within Treg lymphocytes population regarding the number of cycles of chemotherapy

Dotychczas nie wyjaśniono, jaki wpływ na populację komórek Treg może mieć chemioterapia stosowana w raku jajnika. Niektóre cytostatyki wykazują hamujący wpływ na komórki Treg. Zalicza się do nich paklitaksel stosowany w terapii raka jajnika. Paklitaksel w badaniach *in vitro* i na modelach zwierzęcych wykazywał zmniejszenie liczebności Treg⁽²⁸⁻³⁰⁾. Oparta na paklitakselu chemioterapia stosowana u chorych na raka płuca powoduje supresję aktywności i zmniejszenie żywotności limfocytów Treg w badaniu *in vitro*, nie wpływając na aktywność i żywotność limfocytów T CD4⁺FOXP3⁺ (limfocytów T efektorowych)⁽³¹⁾. W badaniu tym zaobserwowano także supresję czynnościową Treg polegającą na zmniejszeniu produkcji IL-10 i TGF- β , ponadto nie stwierdzono wpływu na wydzielanie IL-2 i INF- γ przez limfocyty T efektorowe, które biorą udział w odpowiedzi cytotoksycznej. Zjawisko zmiany liczebności limfocytów Treg u pacjentek z rakiem jajnika poddawanych chemioterapii nie zostało jak dotąd wyjaśnione. Według wiedzy autorów opublikowano tylko jedno doniesienie o zmianach Treg po chemioterapii raka jajnika paklitakselem i karboplatiną u ludzi⁽¹⁸⁾. W swojej pracy Wu i wsp. odnotowali obniżenie aktywności Treg w dniach 12-14 po podaniu 1. cyklu chemioterapii z udziałem paklitakselu i karboplatyny u chorych z rakiem jajnika w stopniu zaawansowania III i IV, nie obserwując różnic w aktywności przed chemioterapią oraz w dniach 5-7 i 25-28 po 1. cyklu chemioterapii. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki mają wstępny charakter i wydają się uzupełniać te obserwacje.

Można wnioskować, że chemioterapia w dłuższym okresie obserwacji nie prowadzi do zmniejszenia liczebności populacji limfocytów Treg, lecz ze względu na wstępny charakter doniesienia, niewielką liczbę chorych i krótki okres obserwacji nie wiemy, jaki może mieć to wpływ na przebieg choroby. Z kolei zaobserwowane zmiany w populacji Treg mogą wskazywać na przydatność oznaczeń Treg u chorych na raka jajnika poddawanych chemioterapii w celu monitorowania zjawiska selektywnej supresji. Wzrost takiej supresji może świadczyć o potrzebie uzupełnienia klasycznej chemioterapii o immunoterapię lub być przydatny w modyfikowaniu leczenia za pomocą immunoterapii. Terapia immunologiczna chorób nowotworowych wciąż znajduje się w fazie badań eksperymentalnych i obejmuje między innymi wzmocnienie odpowiedzi przeciwnowotworowej za pomocą szczepionek lub transferu komórek cytotoksycznych^(16,19-21,32). Próby eksperymentalnego leczenia immunologicznego mogą również polegać na eliminacji komórek Treg⁽³³⁻³⁵⁾, między innymi za pomocą przeciwciał anty-CD25 (takich jak ONTAK – denileukin diftiox czy daklizumab), co ma wzmacniać odpowiedź przeciwnowotworową i powodować regresję guza. Zmniejszenie liczebności Treg możliwe jest także przy zastosowaniu niskodawkowej terapii cyklofosfamidem, która w badaniach na zwierzętach potęguje efekt immunoterapii przeciwnowotworowej^(36,37). Ponieważ u części pacjentek z rakiem jajnika, pomimo skojarzonego leczenia radykalnego (chirurgicznego i chemioterapii), dochodzi do wznowy choroby, konieczne jest wdrożenie innych metod leczenia, np. terapii immunologicznej. Zrozumienie zjawisk zachodzących w układzie immunologicznym

groups was determined by the Wilcoxon test for paired samples. A p value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed by Statistica 8.0 software.

RESULTS

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T lymphocytes were detectable in all the samples obtained from the patients in the study. After 3 chemotherapy courses, a decrease in the percentage of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T lymphocytes among CD4⁺ T lymphocytes was observed, but this difference was not of statistical significance (p=0.3) (fig. 1, table 2). After continued chemotherapy, the percentage of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T lymphocytes among CD4⁺ T lymphocytes increased and after 6 cycles was higher than after 3 chemotherapy cycles and this difference was statistically significant (p=0.02).

DISCUSSION

In our study we observed that the Treg lymphocyte levels of ovarian cancer patients decreased after 3 courses of chemotherapy with no statistical significance (p=0.3). After 6 chemotherapy courses, it then increased to a statistically significant degree. So far it is unclear how chemotherapy treatment influences Treg cell populations in patients with ovarian cancer.

Some cytotoxic agents may have an inhibiting influence on Treg cells. One of them is paclitaxel which is used in ovarian cancer treatment. Paclitaxel has been shown to decrease Treg levels both in animal models and *in vitro*⁽²⁸⁻³⁰⁾. In those studies paclitaxel lead to Treg cell activity suppression as well as decreased vivacity *in vitro* without impact on the activity and vivacity of CD4⁺FOXP3⁺ T lymphocytes (effector T lymphocytes). The functional degree of suppression of Treg cells was also discovered as measured by decreased IL-10 and TGF- β production without influencing the production of IL-2 and INF- γ by effector T lymphocytes which are responsible for the cytotoxic response. Paclitaxel-based chemotherapy in the treatment of lung cancer patients also decreased Treg number after treatment⁽³¹⁾. The phenomenon of changing Treg levels in patients undergoing chemotherapy for ovarian cancer has not been sufficiently studied. In fact, to our knowledge, until now, only one study addressing Treg level changes in cases of paclitaxel/carboplatin chemotherapy treated ovarian cancer has been published⁽¹⁸⁾. In the study conducted by Wu et al., decreased Treg activity was observed on days 12-14 after the first paclitaxel/carboplatin regimen administration in FIGO III and IV ovarian cancer patients. There were no significant differences, however, between Treg levels prior to therapy, after 5-7 days, or after 25-28 days. Our results are preliminary, but would seem to support and complete the above mentioned study.

Data from our study suggests that longer-lasting chemotherapy would not lead to a decrease in the Treg cell population. Our results, however, are preliminary; since the number of patients in the study was small and the observation period short, we do not know whether there was any impact on the course of the disease. However, the Treg cell population changes do suggest that

w chorobie nowotworowej wydaje się kluczowe dla opracowywania nowych sposobów leczenia tych chorób.

WNIOSKI

Badanie populacji Treg może być przydatne do oceny wpływu chemioterapii na układ odpornościowy gospodarza podczas leczenia systemowego chorych na raka jajnika.

PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

- Feng L.L., Wang X.: Targeting Foxp3⁺ regulatory T cells-related immunosuppression for cancer immunotherapy. *Chin. Med. J. (Engl.)* 2010; 123: 3334-3342.
- Kryczek I., Liu R., Wang G. i wsp.: FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res.* 2009; 69: 3995-4000.
- Wilczynski J.R., Kalinka J., Radwan M.: The role of T-regulatory cells in pregnancy and cancer. *Front. Biosci.* 2008; 13: 2275-2289.
- Sasaki Y., Sakai M., Miyazaki S. i wsp.: Decidual and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.* 2004; 10: 347-353.
- Saito S., Shiozaki A., Sasaki Y. i wsp.: Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. *Semin. Immunopathol.* 2007; 29: 115-122.
- Tilburgs T., Roelen D.L., van der Mast B.J. i wsp.: Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J. Immunol.* 2008; 180: 5737-5745.
- Arruvito L., Sanz M., Banham A.H., Fainboim L.: 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: 2572-2578.
- Schumacher A., Brachwitz N., Sohr S. i wsp.: Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *J. Immunol.* 2009; 182: 5488-5497.
- Zhang L., Conejo-Garcia J.R., Katsaros D. i wsp.: Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 203-213.
- Curiel T.J., Coukos G., Zou L. i wsp.: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 2004; 10: 942-949.
- Leffers N., Gooden M.J., de Jong R.A. i wsp.: Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009; 58: 449-459.
- Miller A.M., Lundberg K., Özenci V. i wsp.: CD4⁺CD25^{high} T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J. Immunol.* 2006; 177: 7398-7405.
- Giannopoulos K., Schmitt M., Kowal M. i wsp.: Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol. Rep.* 2008; 20: 677-682.
- Wolf D., Wolf A.M., Rumpold H. i wsp.: The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 8326-8331.
- the Treg level estimation could be used in chemotherapy treated ovarian cancer patients for immune system selective suppression monitoring. An increase in the suppression level could either indicate the need to complement classical chemotherapy with immunotherapy or be useful for immunotherapy modification. Immunotherapy is so far an experimental treatment and relies on immune system enhancement by vaccination or adoptive cytotoxic cell transfer^(16,19-21,32). Efforts in experimental immunotherapy may also rely on Treg cell elimination⁽³³⁻³⁵⁾. This can be achieved through antibodies against CD25 antigen (such as ONTAK – denileukin diftitox or daclizumab) which can intensify the antitumor response and cause tumor regression. Low-dose cyclophosphamide therapy may decrease the quantity of Treg cells and, as shown in animals, can actualize the effects of antitumor immunotherapy^(36,37). Because some groups of ovarian cancer patients experience a recurrence of the disease in spite of radical treatment (surgery and chemotherapy) there is a real need for alternative therapeutic procedures such as immunotherapy. Understanding the immune system mechanisms at work in cancerous diseases is therefore critical for the development of new treatment strategies.

CONCLUSION

A measurement of Treg cell population may be useful for estimating the impact of chemotherapy on the host immune system during the systemic treatment of patients with ovarian cancer.

- Chan J.K., Cheung M.K., Husain A. i wsp.: Patterns and progress in ovarian cancer over 14 years. *Obstet. Gynecol.* 2006; 108: 521-528.
- Chu C.S., Kim S.H., June C.H., Coukos G.: Immunotherapy opportunities in ovarian cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2008; 8: 243-257.
- Reinartz S., Pfisterer J., du Bois A. i wsp.: Suppressive activity rather than frequency of FoxP3⁺ regulatory T cells is essential for CA-125-specific T-cell activation after abagovomab treatment. *Hum. Immunol.* 2010; 71: 36-44.
- Wu X., Feng Q.M., Wang Y. i wsp.: The immunologic aspects in advanced ovarian cancer patients treated with paclitaxel and carboplatin chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010; 59: 279-291.
- Kandalaft L.E., Powell D.J. Jr, Singh N., Coukos G.: Immunotherapy for ovarian cancer: what's next? *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 925-933.
- Geller M.A., Cooley S., Judson P.L. i wsp.: A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy* 2011; 13: 98-107.
- Hung C.F., Wu T.C., Monie A., Roden R.: Antigen-specific immunotherapy of cervical and ovarian cancer. *Immunol. Rev.* 2008; 222: 43-69.
- Wicherek L., Jozwicki W., Windorbska W. i wsp.: Analysis of Treg cell population alterations in the peripheral blood of patients treated surgically for ovarian cancer – a preliminary report. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011; 66: 444-450.
- Salvadori S., Martinelli G., Zier K.: Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity. *J. Immunol.* 2000; 164: 2214-2220.

24. Cole W.H., Humphrey L.: Need for immunologic stimulators during immunosuppression produced by major cancer surgery. *Ann. Surg.* 1985; 202: 9-20.
25. Côté A.L., Usherwood E.J., Turk M.J.: Tumor-specific T-cell memory: clearing the regulatory T-cell hurdle. *Cancer Res.* 2008; 68: 1614-1617.
26. van Tilburg C.M., van Gent R., Bierings M.B. i wsp.: Immune reconstitution in children following chemotherapy for haematological malignancies: a long-term follow-up. *Br. J. Haematol.* 2011; 152: 201-210.
27. Kang D.H., Weaver M.T., Park N.J. i wsp.: Significant impairment in immune recovery after cancer treatment. *Nurs. Res.* 2009; 58: 105-114.
28. Liu N., Zheng Y., Zhu Y. i wsp.: Selective impairment of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by paclitaxel is explained by Bcl-2/Bax mediated apoptosis. *Int. Immunopharmacol.* 2011; 11: 212-219.
29. Zhu Y., Liu N., Xiong S.D. i wsp.: CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T-cell impairment by paclitaxel is independent of toll-like receptor 4. *Scand. J. Immunol.* 2011; 73: 301-308.
30. Vicari A.P., Luu R., Zhang N. i wsp.: Paclitaxel reduces regulatory T cell numbers and inhibitory function and enhances the anti-tumor effects of the TLR9 agonist PF-3512676 in the mouse. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009; 58: 615-628.
31. Zhang L., Dermawan K., Jin M. i wsp.: Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T cells by paclitaxel-based chemotherapy. *Clin. Immunol.* 2008; 129: 219-229.
32. Mahnke Y.D., Speiser D., Luescher I.F. i wsp.: Recent advances in tumour antigen-specific therapy: *in vivo veritas*. *Int. J. Cancer* 2005; 113: 173-178.
33. Prince H.M., Duvic M., Martin A. i wsp.: Phase III placebo-controlled trial of denileukin difitox for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 1870-1877.
34. Barnett B., Kryczek I., Cheng P. i wsp.: Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2005; 54: 369-377.
35. Mahnke K., Schönfeld K., Fondel S. i wsp.: Depletion of CD4⁺CD25⁺ human regulatory T cells *in vivo*: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Cancer* 2007; 120: 2723-2733.
36. Lutsiak M.E., Semnani R.T., De Pascalis R. i wsp.: Inhibition of CD4⁺25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* 2005; 105: 2862-2868.
37. Liu J.Y., Wu Y., Zhang X.S. i wsp.: Single administration of low dose cyclophosphamide augments the antitumor effect of dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007; 56: 1597-1604.

Zasady prenumeraty kwartalnika „Current Gynecologic Oncology”

1. Prenumeratę można rozpocząć od dowolnego numeru pisma. Prenumerujący otrzyma zamówione numery kwartalnika pocztą na podany adres.
2. Pojedynczy egzemplarz kwartalnika kosztuje 40 zł. Przy zamówieniu rocznej prenumeraty (4 kolejne numery) koszt całorocznej prenumeraty wynosi 120 zł. Koszt całorocznej prenumeraty zagranicznej wynosi 50 dolarów.
3. Istnieje możliwość zamówienia numerów archiwalnych (do wyczerpania nakładu). Cena numeru archiwalnego – 40 zł.
4. Zamówienie można złożyć:
 - Wypełniając załączony blankiet i dokonując wpłaty w banku lub na poczcie.
 - Dokonując przelewu z własnego konta bankowego (ROR) – wpłaty należy kierować na konto: Medical Communications Sp. z o.o., ul. Powsińska 34, 02-903 Warszawa Deutsche Bank PBC SA 42 1910 1048 2215 9954 5473 0001 Prosimy o podanie dokładnych danych imiennych i adresowych.
 - Drogą mailową: redakcja@ginekologia.pl.
 - Telefonicznie lub faksem: tel.: 22 651 97 83, faks: 22 842 53 63.
 - Wypełniając formularz prenumeraty zamieszczony na stronie www.ginekologia.pl/gazeta.
5. Zamawiający, którzy chcą otrzymać fakturę VAT, proszeni są o kontakt z redakcją.

Rules of subscription to the quarterly “Current Gynecologic Oncology”

1. Subscription may begin at any time. Subscribers will receive ordered volumes of the journal to the address provided.
2. A single volume of the quarterly costs 40 PLN. The cost of annual subscription (4 consecutive volumes) is 120 PLN. The cost of annual subscription for foreign subscribers is 50 USD.
3. Archival volumes may be ordered at a price of 40 PLN per volume until the stock lasts.
4. Orders may be placed:
 - By filling-in attached form and making a payment by bank or post-office.
 - By making a money transfer from own bank account – payments should be made payable to: Medical Communications Sp. z o.o., ul. Powsińska 34, 02-903 Warszawa Deutsche Bank PBC SA 42 1910 1048 2215 9954 5473 0001 Please provide a precise address and nominative data.
 - By e-mail: redakcja@ginekologia.pl.
 - By phone or by fax: phone: +48 22 651 97 83, fax: +48 22 842 53 63.
 - Filling-in a subscription form, which may be found on the page www.ginekologia.pl/gazeta.
5. Customers wishing a VAT invoice, are requested to contact directly the Editor.