

Received: 02.02.2012

Accepted: 12.04.2012

Published: 31.07.2012

## Znaczenie prognostyczne komórek immunokompetentnych naciekających guzy nowotworowe w rakach narządu płciowego

Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in gynecologic cancers

Прогностическое значение иммунокомпетентных клеток инфильтрирующих опухоли в раке полового органа

Katedra i Klinika Chirurgii Onkologicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny. Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Janusz Jaśkiewicz  
Correspondence to: Katedra i Klinika Chirurgii Onkologicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Smoluchowskiego 17, 80-952 Gdańsk, tel.: 58 349 31 94, 58 349 34 36, e-mail: jacek.sznurkowski@gumed.edu.pl  
Source of financing: Department own sources

### Streszczenie

W immunologii nowotworów szczególną uwagę zwraca się na limfocyty T i komórki NK z bezpośredniego otoczenia guza, tzw. limfocyty naciekające guz, czyli komórki TILs (*tumor-infiltrating lymphocytes*). Ważnym dowodem na nadzór układu odpornościowego nad komórkami raka jest korelacja pomiędzy intensywnością nacieków komórek TILs a przebiegiem choroby. **Celem pracy** było scharakteryzowanie poszczególnych typów komórek immunokompetentnych, które mogą uczestniczyć w naciekaniu guzów nowotworowych, oraz przeanalizowanie publikacji anglojęzycznych pod kątem danych dotyczących znaczenia prognostycznego subpopulacji TILs w raku jajnika, trzonu macicy, szyjki oraz sromu. **Materiał i metoda:** Baza PubMed została przeszukana przy użyciu słów kluczowych: CD8+, CD4+, FOXP3+, CD57+, CD56+, NK w połączeniu z frazami: *cervical cancer*, *vulvar cancer*, *ovarian cancer*, *endometrial cancer* oraz ze słowem *prognosis*. **Wyniki:** Do najważniejszych TILs należą cytotoksyczne limfocyty T, w większości reprezentowane w badaniach przez populację komórek CD8+, pomocnicze limfocyty T, oznaczane jako komórki CD4+, limfocyty regulatorowe T<sub>reg</sub>, dla których najbardziej specyficznym markerem jest regulator transkrypcji *forkhead box P3* (FOXP3), oraz komórki NK/NKT (*natural killer/natural killer T lymphocytes*), identyfikowane za pomocą CD56 i CD57. W raku jajnika, *endometrium* oraz szyjki macicy wykazano silny związek pomiędzy czasem przeżycia pacjentów a intensywnością nacieków z komórek CD8+ oraz wskaźnikami CD8+/FOXP3+, CD8+/CD4+. Wyjątek stanowi rak sromu, w którym komórki CD8+, CD4+, FOXP3+ nie posiadały znaczenia prognostycznego. **Wnioski:** Nasilenie lokalnej cytolizy guzów, a także hamowanie immunosupresyjnego działania komórek regulatorowych może być w przyszłości wykorzystane w strategiach terapeutycznych w raku jajnika, *endometrium* oraz szyjki macicy. W raku sromu należy ocenić udział komórek nieswoistej odpowiedzi immunologicznej w zwalczaniu guzów nowotworowych.

**Słowa kluczowe:** CD8+, CD4+, NK, TILs, rak jajnika, rak trzonu macicy, rak szyjki, rak sromu, prognoza

### Summary

An interesting field of research in tumor immunology are T-lymphocytes and NK-cells in the area directly adjacent to tumor, i.e. tumor-infiltrating lymphocytes (TIL). An important indicator of immune control of cancer cells is the correlation between intensity of TIL infiltrate and clinical course of the disease. **The aim of this paper** is a review of particular types of immunocompetent cell infiltrating the tumor and a review of English literature as to data concerning prognostic significance of TIL subpopulations in ovarian, endometrial, cervical and vulvar cancer. **Material and method:** the PubMed database was searched using key words: CD8+, CD4+, FOXP3+, CD57+, CD56+, NK, combined with phrases: *cervical cancer*, *vulvar cancer*, *ovarian cancer*, *endometrial cancer* and *prognosis*. **Results:** Most important TILs include cytotoxic T-lymphocytes, mostly represented by the CD8+ population, helper T-lymphocytes, designed as CD4+ cells, regulatory lymphocytes Treg, where the most specific maker is transcription regulator forkhead box P3(FOXP3), and NK/NKT cells (natural

killer/natural killer T-lymphocytes), identified by CD56 and CD57. A close correlation was found between patients' survival and intensity of infiltrate by CD8+ cells and indicators CD8+/FOXP3+, CD8+/CD4+ and ovarian cancer, endometrial cancer and cervical cancer. An exception to this is vulvar cancer, where CD8+, CD4+ and FOXP3+ have no prognostic significance. **Conclusions:** Severity of local cytotoxicity of tumors and inhibition of immunosuppressive activity of regulator cells may be used in future therapeutic strategies in patients with ovarian, endometrial and cervical cancer. In vulvar cancer we should rather focus on non-specific immune response for tumor control.

**Key words:** CD8+, CD4+, NK, TIL, ovarian cancer, endometrial cancer, cervical cancer, vulvar cancer, prognosis

## Содержание

В иммунологии опухолей особое внимание обращают на лимфоциты Т и NK-клетки, расположенные в непосредственном окружении опухоли, так называемые лимфоциты инфильтрирующие опухоль, т.е. TILs-клетки (*tumor-infiltrating lymphocytes*). Важным доказательством надзора иммунологической системы, осуществляемого за клетками рака, является корреляция между интенсивностью инфильтратов TILs-клеток и течением болезни. **Цель работы** заключается в охарактеризовании отдельных типов иммунокомпетентных клеток, которые могут участвовать в инфильтрации новообразований, а также проведении анализа англоязычных публикаций на наличие данных, касающихся прогностического значения субпопуляции TILs в раке яичника, раке тела матки, шейки матки и вульвы. **Материал и методика:** Поиск в базе PubMed с применением ключевых слов: CD8+, CD4+, FOXP3+, CD57+, CD56+, NK в сочетании с фразами: *cervical cancer*, *vulvar cancer*, *ovarian cancer*, *endometrial cancer*, а также со словом *prognosis*. **Результаты:** К самым важным TILs относятся цитотоксические лимфоциты Т, в большинстве представляемые в исследованиях популяцией клеток CD8+, вспомогательные лимфоциты Т, обозначаемые как клетки CD4+, регуляторные лимфоциты T<sub>regs</sub>, для которых самым специфическим маркером является регулятор транскрипции *forkhead box P3* (FOXP3), а также клетки NK/NKT (*natural killer/natural killer T lymphocytes*), идентифицируемые с помощью CD56 и CD57. В раке яичника, раке эндометрия и шейки матки доказана сильная связь между периодом выживаемости пациентов и интенсивностью инфильтратов из клеток CD8+ и показателями CD8+/FOXP3+, CD8+/CD4+. Исключение составляет рак вульвы, при котором клетки CD8+, CD4+, FOXP3+ не имели прогностического значения. **Выводы:** Усиление местного цитолиза опухолей, а также торможение иммуносупрессивного действия регуляторных клеток в будущем может быть использовано в терапевтических стратегиях при лечении рака яичника, рака эндометрия, а также рака шейки матки. В случае рака вульвы следует оценивать участие клеток неспецифического иммунологического ответа в уничтожении опухолей.

**Ключевые слова:** CD8+, CD4+, NK, TILs, рак яичника, рак тела матки, рак шейки, рак вульвы, прогноз

## WSTĘP

Odpowiedź immunologiczna skierowana przeciw nowotworowi obejmuje mechanizmy komórkowe i humoralne. Najważniejsze mechanizmy efektorowe odpowiedzi przeciwnowotworowej to:

- cytotoxicytność limfocytów T;
- aktywność cytokin wydzielanych przez limfocyty T;
- aktywność komórek NK (*natural killer*);
- cytotoxicytność pobudzonych makrofagów i granulocytów obojętnochłonnych;
- aktywność cytokin wydzielanych przez makrofagi;
- cytotoxicytność komórkowa zależna od przeciwciał;
- cytotoxicytność zależna od dopełniacza<sup>(1)</sup>.

Celem pracy było scharakteryzowanie poszczególnych typów komórek immunokompetentnych, które mogą uczestniczyć w naciekaniu guzów nowotworowych, oraz przeanalizowanie publikacji anglojęzycznych pod kątem danych dotyczących znaczenia prognostycznego subpopulacji TILs w nowotworach ginekologicznych, takich jak rak jajnika, rak trzonu i szyjki macicy oraz rak sromu.

## INTRODUCTION

Immune response directed against a tumor includes both cellular and humoral mechanisms. Most important effector mechanisms of antitumor immune response are:

- cytotoxicity of T-lymphocytes;
- activity of cytokines secreted by T-lymphocytes;
- activity of NK-cells;
- cytotoxicity of activated macrophages and neutrophils;
- activity of cytokines secreted by macrophages;
- antibody-dependent cellular cytotoxicity;
- complement-dependent cytotoxicity<sup>(1)</sup>.

The aim of this paper was to characterize particular types of immunocompetent cells, which may participate in infiltration of tumors and analysis of English literature in the aspect of data concerning prognostic significance of TIL subpopulations in gynecologic malignancies, such as ovarian, endometrial, cervical and vulvar cancers.

## MATERIAŁ I METODA

Baza PubMed została przeszukana przy użyciu słów kluczowych: CD8+, CD4+, FOXP3+, CD57+, CD56+, NK w połączeniu z frazami: *cervical cancer*, *vulvar cancer*, *ovarian cancer*, *endometrial cancer* oraz ze słowem *prognosis*.

## WYNIKI

## OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA NAJCZĘŚCIEJ OPISYWANYCH SUBPOPULACJI TILS

W doniesieniach z ostatniej dekady można znaleźć prace dotyczące oceny mechanizmów odpowiedzi komórkowej i humoralnej wskazujące na szczególną rolę limfocytów CD4+ i CD8+ oraz cytokin wydzielanych przez te komórki w procesie rozrostu nowotworowego<sup>(2-8)</sup>.

Rola limfocytów cytotoksycznych (*cytotoxic lymphocytes*, CTL) w większości reprezentowanych przez populację komórek CD8+ polega na rozpoznawaniu za pośrednictwem swoistego receptora TCR (*T-cell receptor*) antygenów nowotworowych obecnych na cząsteczce MHC klasy I. Aktywacja limfocytów CD8+ odbywa się z udziałem uprzednio pobudzonych limfocytów T pomocniczych CD4+<sup>(7)</sup>. Sama aktywacja limfocytów pomocniczych może prowadzić do śmierci limfocytu poprzez apoptozę, jego anergii, czyli tolerancji immunologicznej, jak również do intensywnej proliferacji i różnicowania. Pobudzone limfocyty CD4+ mają zdolność produkowania szeregu cytokin, różnych w zależności od rodzaju subpopulacji (Th1 i Th2). Największe znaczenie w obronie przeciwnowotworowej pełnią cytokiny profilu Th1: interleukiny (IL-2, IL-12, IL-18), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), czynnik nekrozy guza (TNF- $\alpha$ ). To właśnie one sprzyjają rozwojowi odpowiedzi typu komórkowego, w którym elementami efektorowymi są limfocyty cytotoksyczne CD8+<sup>(6,7,9,10)</sup>.

Również limfocyty cytotoksyczne (Tc) wykazują zróżnicowanie pod względem profilu produkowanych cytokin i dlatego także są podzielone na dwie subpopulacje: Tc1 i Tc2.

Limfocyty cytotoksyczne zaliczane do subpopulacji Tc1 za pośrednictwem IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  biorą udział w niszczeniu komórek nowotworowych głównie poprzez indukcję apoptozy zależnej od tak zwanych receptorów błonowych śmierci (*Death receptor 4*, DR4; *Death receptor 5*, DR5), CD95/FAS aktywowanych ligandami TRAIL [*tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*] i FAS-L (*Fas ligand*)<sup>(6,7,9,10)</sup>.

Dodatkowo uwalniana przez komórki Tc1 i Th1 interleukina-2 (IL-2) aktywuje komórki NK, a produkowany interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) aktywuje makrofagi.

Limfocyty regulatorowe (T<sub>regs</sub>) stanowią niejednorodną fenotypowo grupę komórek odpowiedzialnych za kontrolę układu immunologicznego na drodze aktywacji supresji. Funkcjonalnie w obrębie tej populacji można wyróżnić dwie podgrupy komórek. W pierwszej działaniu

## MATERIAL AND METHOD

The PubMed database was searched using key words: CD8+, CD4+, FOXP3+, CD57+, CD56+, NK, combined with phrases: *cervical cancer*, *vulvar cancer*, *ovarian cancer*, *endometrial cancer* and *prognosis*.

## RESULTS

## GENERAL CHARACTERISTICS OF MOST OFTEN DESCRIBED TIL SUBPOPULATIONS

Publications from the past decade include papers assessing mechanisms of cellular and humoral response, indicating a special role of CD4+ and CD8+ lymphocytes as well as cytokines secreted by these cells in the process of tumor growth<sup>(2-8)</sup>.

The role of cytotoxic lymphocytes (CTL), mostly represented by CD8+ population, consists in recognition, based on a specific T-cell receptor (TCR), of tumor antigen present on class I MHC molecule. Activation of CD8+ lymphocytes requires the presence of already activated T-helper lymphocytes CD4+<sup>(7)</sup>. Activation of helper lymphocytes per se may lead to lymphocyte death by apoptosis, its anergy or immune tolerance as well as to intense proliferation and differentiation. Activated CD4+ lymphocytes are able to produce several cytokines, differing depending on type of subpopulation (Th1 and TH2). Most important in antitumor protection are Th1-dependent cytokines: interleukins (IL-2, IL-12, IL-18), interferon (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ). They enhance the development of cell-mediated response, where cytotoxic lymphocytes CD8+ are the effector element<sup>(6,7,9,10)</sup>.

Also, cytotoxic lymphocytes Tc differ in their cytokine profile and thus are subdivided into two subpopulations: Tc1 and Tc2.

Cytotoxic lymphocytes from Tc1 subpopulation secrete IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , and participate in destruction of tumor cells mainly by inducing membrane-receptor-dependent apoptosis (death receptors DR4, DR5), CD95/FAS activated by ligands TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and FAS-L<sup>(6,7,9,10)</sup>.

Furthermore, IL-2 secreted by both Tc1 and Tc2 cells activates NK cells, while IFN- $\gamma$  activates macrophages.

Regulator lymphocytes T<sub>reg</sub> are a phenotypically heterogeneous group of cells, responsible for control of the immune system by activation of suppression. On functional grounds, two subpopulations of Tc-cells may be discerned.

In the first one, suppressor activity requires a direct contact with target cell and is mediated by surface molecules, e.g. GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor), CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4). In the second group, the mechanism of action relies in production and secretion of suppression cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ).

supresorowe wymaga bezpośredniego kontaktu z komórką docelową i związane jest molekułami powierzchniowymi, np. GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), natomiast w drugiej mechanizm działania oparty jest na produkcji i uwalnianiu supresyjnych cytokin (IL-10, TGF- $\beta$ ). Regulatorowe komórki T ( $T_{reg}$ ) odgrywają kluczową rolę w zapewnieniu obwodowej tolerancji wobec własnych i obcych antygenów. Osłabienie funkcji komórek  $T_{reg}$  jest związane z różnymi autoimmunologicznymi chorobami, takimi jak np. toczeń rumieniowaty układowy, cukrzyca typu I, reumatoidalne zapalenie stawów i stwardnienie rozsiane<sup>(11)</sup>.

Szczególnie znaczący dla badań onkologicznych był fakt częstszego występowania komórek  $T_{reg}$  z aktywnością supresorową w guzach złośliwych i krwi osób chorych na raka w stosunku do populacji ludzi zdrowych<sup>(12)</sup>. Zablokowanie funkcji komórek  $T_{reg}$  w modelach guzów u myszy spowodowało silne wzmocnienie odporności przeciwko guzowi oraz jego całkowitą eliminację, co wskazuje na istotną rolę komórek  $T_{reg}$  w odporności przeciwnowotworowej.

$T_{reg}$  należą do podgrupy komórek CD4+ T i stanowią około 10-15% wszystkich komórek CD4+ T. Najbardziej specyficznym markerem dla komórek  $T_{reg}$  jest regulator transkrypcji *forkhead box P3* (FOXP3)<sup>(11)</sup>. Ekspresja FOXP3 jest bezpośrednio związana z supresyjną funkcją komórek  $T_{reg}$ , a transfer genu retrowirusowego FOXP3 do komórek CD4+/CD25- T zamienia je w komórki  $T_{reg}$ <sup>(13)</sup>.

Komórki NK (*natural killer*) to typ limfocytów cytotoksycznych, pełniących funkcje cytotoksyczne i immunoregulatorowe. Komórki NK potrafią spontanicznie zabijać komórki nowotworowe i zakażone wirusem, dzięki czemu odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi na nowotwory i infekcje. Uważa się, że łączą procesy odporności wrodzonej i nabytej, w której uczestniczą między innymi poprzez kontakt z komórkami dendrytycznymi. Populacja komórek NK stanowi od 10% do 15% wszystkich limfocytów krwi obwodowej. Cechą wspólną dla wszystkich komórek NK jest brak ekspresji molekuly CD3, co odróżnia je od limfocytów T CD3+. Komórki NK wykazują ekspresję CD56 i CD16, lecz intensywność ekspresji tych molekuł jest zróżnicowana w zależności od funkcji<sup>(14)</sup>.

W immunologii nowotworów szczególną uwagę zwraca się na limfocyty T z bezpośredniego otoczenia guza, tzw. limfocyty naciekające guz, czyli komórki TILs (*tumor-infiltrating lymphocytes*). TILs mogą rozpoznawać antygeny guza i powodować bezpośrednio jego lizę, bądź też doprowadzać do niej za pośrednictwem uwalnianych cytokin: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . W obrazach pochodzących z mikroskopu elektronowego zaobserwowano, że w regionach bezpośredniego kontaktu TILs i komórek nowotworowych występuje w tych ostatnich zniszczenie błon komórkowych i cytoplazmy, a w niektórych przypadkach stwierdzono przenikanie limfocytu do wnętrza komórki nowotworowej, a nawet niszczenie jądra komórkowego<sup>(15,16)</sup>.

Wśród poznanych dotychczas antygenów nowotworowych rozpoznawanych przez limfocyty T przeważają

Regulator T cells play a crucial role in ensuring peripheral tolerance of own and foreign antigens. Compromised function of  $T_{reg}$  cells is associated with several autoimmune diseases, e.g. systemic lupus erythematosus, type 1 diabetes, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis<sup>(11)</sup>. Of particular importance for oncological studies is the fact of more frequent presence of  $T_{reg}$  cells with a suppressing activity in malignant tumors and in blood of cancer patients, as compared with healthy population<sup>(12)</sup>. Blocking of  $T_{reg}$  function in murine tumor models resulted in a noticeable enhancement of antitumor response and its complete elimination, thus confirming an essential role of  $T_{reg}$  cells in antitumor immune response.

$T_{reg}$  cells belong to a subgroup of CD4+ T cells and account for about 10-15% of all CD4+ T cells. The most specific marker for  $T_{reg}$  cells is transcription regulator forkhead box P3 (FOXP3)<sup>(11)</sup>. Its expression is directly correlated with suppressory function of  $T_{reg}$  cells and transfer of retroviral FOXP3 gene to CD4+/CD25- T-cells transforms them to  $T_{reg}$ <sup>(13)</sup>.

NK cells (natural killer) are a type of cytotoxic lymphocytes with both cytotoxic and immunoregulating functions. NK cells spontaneously kill tumor cells and virus-infected cells, thus play a crucial role in systemic response to tumors and infections. They are also considered a link between congenital and acquired immune processes, where they participate by contact with dendritic cells. NK population accounts for about 10-15% of all lymphocytes present in peripheral blood. A common feature of all NK cells is lack of expression of the CD3+ molecule, which differentiates them from T lymphocytes CD3+. NK cells show expression of CD56+ and CD16+, but intensity of their expression differs depending on particular function of a given cell<sup>(14)</sup>.

An issue of particular interest in tumor immunology are T lymphocytes directly adjacent to tumor, the so-called tumor-infiltrating lymphocytes (TIL). They are able to recognize tumor antigens and induce its lysis, either directly or indirectly, by secreted cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Electron microscope images revealed that in areas of direct contact between TIL and tumor cells, the latter show destruction of cell membrane and cytoplasm, sometimes even with penetration of lymphocyte into the tumor cell and destruction of its nucleus<sup>(15,16)</sup>.

Among hitherto discovered tumor antigens recognized by T lymphocytes, predominate those presented by class I MHC molecules to CD8+ lymphocytes. Increasingly often are also discovered antigens presented by class II MHC molecules to CD4+ lymphocytes. Cancerous nuclear antigens (MAGE, NY-ESO1) and other tumor antigens (PSA, CEA, MART1) possess epitopes presented both by class I and class II MHC molecules, so they can be recognized by both T lymphocytes CD8+ and CD4+<sup>(1)</sup>.

An important evidence for immune control over cancer cells is well documented correlation between intensity of



antygeny prezentowane przez cząsteczki MHC klasy I limfocytom CD8+. Coraz częściej odkrywano antygeny prezentowane także przez cząsteczki MHC klasy II limfocytom CD4+. Antygeny rakowo-jądrowe MAGE, NY-ESO-1, a także inne antygeny nowotworowe, takie jak PSA, CEA, MART-1, posiadają epitopy prezentowane zarówno przez cząsteczki MHC klasy I, jak i klasy II, i dlatego mogą być rozpoznawane tak przez limfocyty T CD8+, jak i limfocyty T CD4+<sup>(1)</sup>.

Ważnym dowodem na nadzór układu odpornościowego nad komórkami raka jest udokumentowana w nowotworach złośliwych korelacja pomiędzy intensywnością nacieków limfocytarnych CD4+, CD8+, T<sub>regs</sub> oraz NK/NKT w bezpośrednim otoczeniu guza a korzystniejszym przebiegiem choroby<sup>(17-19)</sup>.

### **ZNACZENIE PROGNOSTYCZNE TILs W RAKU JAJNIKA**

Znaleziono 10 oryginalnych badań spełniających kryteria wyszukiwania<sup>(20-29)</sup>. Znaczenie prognostyczne przeanalizowano łącznie w grupie 1815 pierwotnie operowanych chorych, u których w 71,1% występował typ surowiczy raka. We wszystkich pracach odnotowano korzystny wpływ naciekania tkanki rakowej przez limfocyty CD8+ na czas przeżycia pacjentów. Limfocyty CD8+ mogą skutecznie ograniczać wzrost guzów na drodze cytolizy komórek nowotworowych i/lub zwiększać efektywność działania cytostatyków stosowanych w chemioterapii. Szczególnie silne znaczenie prognostyczne zaobserwowano w grupie chorych, u których nie udało się wykonać optymalnej cytoredukcji, co z kolei może sugerować, że kobiety z silną odpowiedzią immunologiczną organizmu posiadają zdolność do stabilizacji choroby resztkowej<sup>(29)</sup>. W badaniach, w których dodatkowo oceniono nacieki tkanki rakowej przez komórki regulatorowe FOXP3+, wykazano korzystne znaczenie prognostyczne wskaźnika CD8+/FOXP3+.

### **ZNACZENIE PROGNOSTYCZNE TILs W RAKU BŁONY ŚLIZOWEJ TRZONU MACICY**

Pięć prac badawczych łącznie opisujących 623 przypadki chorych na raka *endometrium* spełniało kryteria wyszukiwania<sup>(30-34)</sup>. *Adenocarcinoma endometriale* występowała w 73,1% analizowanych guzów pierwotnych, natomiast pozostałe 26,9% stanowiły raki nieendometrioidalne (*non-endometrioid carcinoma*). Odnotowano istotny związek pomiędzy intensywnością naciekania tkanki rakowej limfocytami cytotoksycznymi CD8+ a przeżyciem pacjentów zarówno w populacji ogólnej, jak i w każdym podtypie histologicznym z osobna. Negatywne znaczenie prognostyczne limfocytów FOXP3+ stwierdzono wyłącznie u chorych z *Adenocarcinoma endometriale*<sup>(31)</sup>. Stosunek komórek CD8+ do FOXP3+ jest niezależnym czynnikiem prognostycznym czasu do wznowy w raku trzonu macicy.

CD4+, CD8+, T<sub>reg</sub> and NK/NKT lymphocytes' infiltration directly adjacent to tumor and a more favorable clinical course of the disease<sup>(17-19)</sup>.

### **PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF TILs IN OVARIAN CANCER**

Literature survey provided 10 original papers fulfilling search criteria<sup>(20-29)</sup>. Prognostic significance has been analyzed in a cumulative group of 1815 patients undergoing primary surgery, with serous cancer type present in 71.1% of the cases. All papers reported a favorable influence of infiltration of tumor tissue by CD8+ lymphocytes on patients' survival. CD8+ lymphocytes may effectively block tumor growth by cytolysis of tumor cells and/or enhance the effectiveness of cytostatics used in chemotherapy. Particularly robust prognostic significance was seen in a group of patients where no optimal cytoreduction was possible, suggesting that women with a strong immune response are able to stabilize their residual disease<sup>(29)</sup>. Studies additionally assessing tumor tissue infiltration by regulatory FOXP3+ cells revealed a favorable prognostic significance of the CD8+/FOXP3+ index.

### **PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF TILs IN ENDOMETRIAL CANCER**

Five studies, describing a total of 623 cases of endometrial cancer, fulfilled search criteria<sup>(30-34)</sup>. Endometrial adenocarcinoma accounted for 73.1% of primary tumors, while the remaining 26.9% were non-endometrioid cancers. A significant correlation has been found between intensity of infiltration of tumor tissue by cytotoxic CD8+ lymphocytes and patients' survival, both in the entire population and in every histological subtype separately. Negative prognostic significance of FOXP3+ lymphocytes was noticed only in patients with endometrial adenocarcinoma<sup>(31)</sup>. The ratio of CD8+ cells to FOXP3+ cells is an independent prognostic factor for time to recurrence in endometrial cancer. Results of these studies indicate a significant contribution of specific cellular response in combating endometrial cancer.

### **PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF TILs IN CERVICAL CANCER**

Analysis encompassed data from 6 papers<sup>(35-40)</sup> describing prognostic significance of TIL subpopulation in a cumulative group of 387 patients with HPV-positive cervical cancer at FIGO clinical stages I-IIb.

All papers highlight a favorable prognostic role of infiltrate of CD3+ T lymphocytes<sup>(39,40)</sup> and their cytotoxic subpopulation CD8+<sup>(35-38)</sup>. However, a negative prognostic significance of infiltrates of regulatory FOXP3+ cells and of the CD4+/CD8+ index (parameter describing ratio of helper to cytotoxic lymphocytes) have been demonstrated. Cervical cancer densely infiltrated by CD8+ lymphocytes did not produce metastases to regional lymph

Wyniki powyższych badań wskazują na istotny udział odpowiedzi swoistej typu komórkowego w zwalczaniu raka błony śluzowej trzonu macicy.

### **ZNACZENIE PROGNOSTYCZNE TILs W RAKU SZYJKI MACICY**

Przeanalizowano dane pochodzące z 6 prac<sup>(35-40)</sup> opisujących znaczenie prognostyczne subpopulacji TILs łącznie w grupie 387 pacjentów z HPV dodatnim rakiem szyjki macicy w stopniu zaawansowania od I do II B.

We wszystkich publikacjach odnotowano korzystne znaczenie prognostyczne występowania nacieków z limfocytów T CD3+<sup>(39,40)</sup> oraz ich cytotoksycznej subpopulacji CD8+<sup>(35-38)</sup>. Udowodniono natomiast negatywne znaczenie prognostyczne nacieków z komórek regulatorowych FOXP3+, a także wskaźnika CD4+/CD8+ (parametr określony stosunkiem liczby limfocytów pomocniczych do cytotoksycznych). Rak szyjki macicy intensywnie nacieczony przez limfocyty CD8+ nie dawał przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, co w oczywisty sposób tłumaczy znaczenie prognostyczne tych komórek oraz dowodzi, że mogą być w przyszłości wykorzystane w strategiach terapeutycznych jako biomarker zakresu leczenia chirurgicznego lub cel dla immunoterapii.

### **ZNACZENIE PROGNOSTYCZNE TILs W RAKU SROMU**

Do chwili obecnej (styczeń 2012 roku) opublikowano zaledwie 3 prace oryginalne oceniające znaczenie prognostyczne naciekania raka sromu limfocytami CD8+, CD4+ oraz FOXP3+<sup>(41-43)</sup>. We wszystkich odnotowano brak znaczenia prognostycznego nacieków limfocytarnych w tkance rakowej. Rak sromu odbiega zatem od pozostałych nowotworów ginekologicznych pochodzenia nabłonkowego, dla których udział swoistej komórkowej odpowiedzi immunologicznej w zwalczaniu nowotworu jest bezsporny. Może to oznaczać małą immunogenność tkanek raka lub osłabioną funkcję układu odpornościowego związaną z podeszłym wiekiem chorych. Ciekawym zagadnieniem pozostaje zatem udział dominującej u ludzi starych nieswoistej odpowiedzi immunologicznej<sup>(44)</sup>. Niestety brak publikacji dotyczących komórek NK/NKT uniemożliwia ocenę znaczenia tej grupy komórek immunokompetentnych w raku sromu.

### **WNIOSKI**

Komórki swoistej lokalnej odpowiedzi immunologicznej posiadają wyraźne znaczenie prognostyczne w raku jajnika, *endometrium* oraz szyjki macicy. Wzbudzenie lokalnej cytolyzy tkanki rakowej w tych nowotworach oraz hamowanie immunosupresyjnego działania komórek regulatorowych może w przyszłości zostać wykorzystane w nowych strategiach terapeutycznych. Konieczna wydaje się ocena udziału komórek nieswoistej odpowiedzi immunologicznej w zwalczaniu guzów raka sromu.

nodes, obviously confirming prognostic value of these cells and their future role in therapeutic strategies as biological marker of scope of surgery or target for immune therapy.

### **PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF TILs IN VULVAR CANCER**

To date (January 2012) only 3 original papers assessing prognostic role of infiltration of vulvar cancer by CD8+, CD4+ and FOXP3+ lymphocytes have been published<sup>(41-43)</sup>. All denoted lack of prognostic significance of lymphocytic infiltrates in tumor tissue. Vulvar cancer differs from other gynecologic malignancies of epithelial origin, where the role of specific cell-mediated immune response in tumor control is indisputable. This may attest to modest immunogenicity of cancer cells or deficient function of the immune system associated with the usually advanced age of these patients. An interesting issue remains then the role of non-specific immune response, normally predominating in the elderly<sup>(44)</sup>. Unfortunately, lack of publications concerning the role of NK/NKT cells precludes any reliable assessment of role of this population of immunocompetent cells in vulvar cancer.

### **CONCLUSIONS**

Cells mediating specific local immune response have a clear prognostic significance in ovarian cancer, endometrial cancer and cervical cancer. Activation of local cytolytic of tumor tissue in these conditions and inhibition of immunosuppressive effect of regulatory cells, may be used in the future in novel therapeutic strategies. Assessment of role of cells mediating non-specific immune response in the control of vulvar cancer may be necessary in the future.

### **PIŚMIENNICTWO:**

#### **BIBLIOGRAPHY:**

1. Jakóbsiak M., Lasek W.: Immunologia nowotworów. W: Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. (red.): Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008: 478-495.
2. Cho Y., Miyamoto M., Kato K. i wsp.: CD4+ and CD8+ T cell cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63: 1555-1559.
3. Dadabayev A.R., Sandel M.H., Menon A.G. i wsp.: Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2004; 53: 978-986.
4. Dorothee G., Vergnon I., El Hage F. i wsp.: In situ sensory adaptation of tumor-infiltrating T lymphocytes to peptide-MHC levels elicits strong antitumor reactivity. *J. Immunol.* 2005; 174: 6888-6897.
5. Ikeguchi M., Hirooka Y.: Interleukin-2 gene expression is a new biological prognostic marker in hepatocellular carcinomas. *Onkologie* 2005; 28: 255-259.
6. Kim J.W., Tsukishiro T., Johnson J.T., Whiteside T.L.: Expression of pro- and antiapoptotic proteins in circulating CD8+ T cells of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 5101-5110.
7. Kim J.W., Wieckowski E., Taylor D.D. i wsp.: Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral

- cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 1010-1020.
8. van Herpen C.M., van der Laak J.A., de Vries I.J. i wsp.: Intratumoral recombinant human interleukin-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients modifies locoregional lymph node architecture and induces natural killer cell infiltration in the primary tumor. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 1899-1909.
  9. Kimura H., Dobrenkov K., Iida T. i wsp.: Tumor-draining lymph nodes of primary lung cancer patients: a potent source of tumor-specific killer cells and dendritic cells. *Anticancer Res.* 2005; 25: 85-94.
  10. Kuss I., Hathaway B., Ferris R.L. i wsp.: Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to disease. *Adv. Otorhinolaryngol.* 2005; 62: 161-172.
  11. Zou W.: Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 295-307.
  12. Barnet 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.
  13. Zheng Y., Rudensky A.Y.: Foxp3 in control of the regulatory T lineage. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 457-462.
  14. Kopeć-Szlezak J., Podstawka U.: Biologia komórek NK (Natural Killer). *Onkol. Pol.* 2007; 10: 115-119.
  15. Kuss I., Hathaway B., Ferris R.L. i wsp.: Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 3755-3762.
  16. Orlando L., Renne G., Rocca A. i wsp.: Are all high-grade breast cancers with no steroid receptor hormone expression alike? The special case of the medullary phenotype. *Ann. Oncol.* 2005; 16: 1094-1099.
  17. Naito Y., Saito K., Shiiba K. i wsp.: CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58: 3491-3494.
  18. Nakano O., Sato M., Naito Y. i wsp.: Proliferative activity of intratumoral CD8+ T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* 2001; 61: 5132-5136.
  19. Schumacher K., Haensch W., Röefzaad C., Schlag P.M.: Prognostic significance of activated CD8+ T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 2001; 61: 3932-3936.
  20. 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.
  21. Callahan M.J., Nagymanyoki Z., Bonome T. i wsp.: Increased HLA-DMB expression in the tumor epithelium is associated with increased CTL infiltration and improved prognosis in advanced-stage serous ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 7667-7673.
  22. Sato E., Olson S.H., Ahn J. i wsp.: Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005; 102: 18538-18543.
  23. Hamanishi J., Mandai M., Iwasaki M. i wsp.: Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007; 104: 3360-3365.
  24. Tomsova M., Melichar B., Sedlakova I., Steiner I.: Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2008; 108: 415-420.
  25. Han L.Y., Fletcher M.S., Urbauer D.L. i wsp.: HLA class I antigen processing machinery component expression and intratumoral T-Cell infiltrate as independent prognostic markers in ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 3372-3379.
  26. 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.
  27. Clarke B., Tinker A.V., Lee C.H. i wsp.: Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Mod. Pathol.* 2009; 22: 393-402.
  28. Stumpf M., Hasenburger A., Rieger M.O. i wsp.: Intraepithelial CD8-positive T lymphocytes predict survival for patients with serous stage III ovarian carcinomas: relevance of clonal selection of T lymphocytes. *Br. J. Cancer* 2009; 101: 1513-1521.
  29. Adams S.F., Levine D.A., Cadungog M.G. i wsp.: Intraepithelial T cells and tumor proliferation: impact on the benefit from surgical cytoreduction in advanced serous ovarian cancer. *Cancer* 2009; 115: 2891-2902.
  30. Yamagami W., Susumu N., Tanaka H. i wsp.: Immunofluorescence-detected infiltration of CD4+FOXP3+ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2011; 21: 1628-1634.
  31. de Jong R.A., Leffers N., Boezen H.M. i wsp.: Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 2009; 114: 105-110.
  32. Kondratiev S., Sabo E., Yakirevich E. i wsp.: Intratumoral CD8+ T lymphocytes as a prognostic factor of survival in endometrial carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 4450-4456.
  33. Ino K., Yamamoto E., Shibata K. i wsp.: Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 2310-2317.
  34. Chang W.C., Li C.H., Huang S.C. i wsp.: Clinical significance of regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with human endometrial carcinoma. *Cancer* 2010; 116: 5777-5788.
  35. Shah W., Yan X., Jing L. i wsp.: A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4+FOXP3+ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol. Immunol.* 2011; 8: 59-66.
  36. Nedergaard B.S., Ladefkar M., Thomsen H.F. i wsp.: Low density of CD3+, CD4+ and CD8+ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer. *Br. J. Cancer* 2007; 97: 1135-1138.
  37. Piersma S.J., Jordanova E.S., van Poelgeest M.I. i wsp.: High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 354-361.
  38. Sheu B.C., Hsu S.M., Ho H.N. i wsp.: Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 1537-1543.
  39. Bethwaite P.B., Holloway L.J., Thornton A., Delahunt B.: Infiltration by immunocompetent cells in early stage invasive carcinoma of the uterine cervix: a prognostic study. *Pathology* 1996; 28: 321-327.
  40. Chao H.T., Wang P.H., Tseng J.Y. i wsp.: Lymphocyte-infiltrated FIGO Stage IIB squamous cell carcinoma of the cervix is a prominent factor for disease-free survival. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 1999; 20: 136-140.
  41. Sznurkowski J.J., Zawrocki A., Emerich J., Biernat W.: Prognostic significance of CD4+ and CD8+ T cell infiltration within cancer cell nests in vulvar squamous cell carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2011; 21: 717-721.
  42. Sznurkowski J.J., Zawrocki A., Emerich J. i wsp.: Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase predicts shorter survival in patients with vulvar squamous cell carcinoma (vSCC) not influencing on the recruitment of FOXP3-expressing regulatory T cells in cancer nests. *Gynecol. Oncol.* 2011; 122: 307-312.
  43. de Jong R.A., Toppen N.L., Ten Hoor K.A. i wsp.: Status of cellular immunity lacks prognostic significance in vulvar squamous carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2012; 125: 186-193.
  44. Hakim F.T., Flomerfelt F.A., Boyiadzis M., Gress R.E.: Aging, immunity and cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 2004; 16: 151-156.