

Łukasz Spsychalski

**Limfocyty T regulatorowe w mikrośrodowisku wysięku opłucnowego
w przebiegu raka płuca.**

Promotor:

Prof. UM dr hab. med. Jan Sikora

Praca na stopień doktora nauk medycznych
z Kliniki Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

POZNAŃ, 2010 r.

Mojej Żonie
w podziękowaniu

Serdecznie dziękuję:

*Pani Prof. dr hab. Halinie Baturze-Gabryel
za życzliwość i umożliwienie przeprowadzenia badań*

*Panu Prof. UM dr hab. Janowi Sikorze
za naukową opiekę, cenne uwagi i pomoc*

*Mgr inż. Joannie Budnej
z Zakładu Immunologii Klinicznej
za współpracę.*

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów	7
Wstęp.....	9
1. Epidemiologia i etiologia raka płuca.....	9
2. Patofizjologia płynu w jamie opłucnowej	10
2.1 Wysiłek opłucnowy w przebiegu choroby nowotworowej	12
3. Immunologia nowotworów	13
3.1 Antygeny związane z nowotworem	14
3.2 Mechanizmy efektorowe odpowiedzi immunologicznej przeciw komórkom nowotworowym.....	15
3.3 Mechanizmy ucieczki nowotworów przed odpowiedzią immunologiczną	16
4. Limfocyty T regulatorowe.....	19
4.1 Charakterystyka ogólna.....	19
4.2 Markery używane do identyfikacji oraz obliczania liczby Treg	20
4.3 Udział Treg w kontroli odpowiedzi immunologicznej.....	21
4.3.1 Rola Treg w odpowiedzi przeciwnowotworowej.....	22
4.4 Rozpowszechnienie Treg w procesie nowotworowym	23
4.4.1 Częstość Treg we krwi obwodowej.....	23
4.4.2 Treg w węzłach chłonnych.....	24
4.4.3 Treg w guzie	24
4.4 Wpływ guza na Treg	26
4. Treg a immunoterapia nowotworów	27
Cel pracy.....	33
Materiał i metody badań.....	34
1. Materiał	34
1.1 Chorzy	34

1.2 Kryteria włączenia i wyłączenia z badania	34
1.3 Charakterystyka przebadanych wysięków opłucnowych	34
2. Metody	35
2.1 Badania laboratoryjne	35
2.1.1 Badania cytologiczne	35
2.1.2 Badania cytometryczne: oznaczanie komórek T regulatorowych w wysiękach opłucnowych.	35
2.2 Badania kliniczne	36
2.2.1 Wywiad chorobowy i badanie przedmiotowe	36
2.2.2 Torakocenteza.	38
2.2.3 Ocena stopnia zaawansowania procesu nowotworowego	38
3. Analiza statystyczna.	38
4. Zgody na udział w badaniu.....	39
Wyniki	44
1. Charakterystyka badanej grupy	44
1.1 Charakterystyka grupy I	45
1.2 Charakterystyka grupy II	46
1.3 Charakterystyka grupy III	47
2. Limfocyty w wysiękach opłucnowych.....	48
2.1 Odsetek limfocytów w wysiękach opłucnowych	48
2.2 Odsetek limfocytów CD4 ⁺	49
2.3 Odsetek limfocytów CD4 ⁺ CD25 ⁺	50
2.4 Odsetek komórek Treg	51
2.4.1 Ocena zależności między odsetkiem komórek Treg i odsetkiem limfocytów oraz ich subpopulacji.....	53
3. Ocena współzależności między rozpowszechnieniem Treg i stanem klinicznym chorych	57
3.1 Odsetek limfocytów Treg a płeć chorego	57

3.2	Odsetek limfocytów Treg a wielkość guza mierzona w centymetrach	58
3.3	Odsetek limfocytów Treg a stopień zaawansowania raka płuca	59
3.3.1	Odsetek limfocytów Treg a cecha T	59
3.3.2	Odsetek limfocytów Treg a cecha N	61
3.3.3	Odsetek limfocytów Treg a cecha M	62
3.3.3.1	Przerzuty na opłucnej	62
3.3.3.2	Inna lokalizacja przerzutów odległych	63
3.4	Odsetek limfocytów Treg a stan sprawności chorego (PS).....	65
4.	Analiza czynników wpływających na czas przeżycia chorego	66
4.1	Ocena zależności między rozpowszechnieniem Treg a czasem przeżycia chorych.....	66
4.1.1	Grupa z „prawidłowym” odsetkiem Treg	69
4.1.2	Grupa z „wysokim” odsetkiem Treg	70
4.2	Stan sprawności chorego (PS wg skali ECOG) a czas przeżycia.....	71
4.3	Liczba narządów objętych przerzutami odległymi a czas przeżycia.....	72
4.4	Wiek chorego w momencie badania a czas przeżycia.....	73
4.5	Jednoczesny wpływ wielu czynników	74
4.5.1	Grupy I+II łącznie	74
4.5.2	Grupa I	75
4.5.3	Grupa II	76
	Dyskusja	77
	Wnioski	88
	Streszczenie	89
	Summary	91
	Piśmiennictwo	93

WYKAZ SKRÓTÓW

95% CI – *ang. confidence interval* - 95% przedział ufności

CCL22 – *ang. C-C motif chemokine 22* – chemokina 22

CCR4 – *ang. C-C chemokine receptor type 4* – typ 4 receptora dla C-C chemokiny

CD – *ang. cluster of differentiation* – antygen różnicowania komórkowego

CLL – *ang. chronic lymphocytic leukemia* – przewlekła białaczka limfatyczna

CTLA4 - *ang. cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* – antygen 4 związany z cytotoksycznymi limfocytami T

DRP - drobnokomórkowy rak płuca

ECOG - *ang. Eastern Cooperative Oncology Group*

FasL – *ang. Fas ligand* – ligand dla białka Fas

FoxP3 – *ang. forkhead box P3* – gen kodujący białko z rodziny Fox

GIST – *ang. gastrointestinal stromal tumor* – nowotwór podścieliskowy żołądka

IASLC – *ang. International Association for the Study of Lung Cancer*

IL – *ang. interleukin* - interleukina

INF- γ – *ang. interferon-gamma* - interferon-gamma

Komórki K – *ang. killer cells* – komórki zabijające

Komórki NK – *ang. natural killer cells* – komórki naturalnie zabijające

LDH - *ang. lactate dehydrogenase* - dehydrogenaza mleczanowa

Limfocyty Tc - *ang. cytotoxic T cel* - limfocyty T cytotoksyczne

Limfocyty Th - *ang. T helper cells* - limfocyty T pomocnicze

Limfocyty Treg – *ang. regulatory T cell* – limfocyty T regulatorowe

MGUS – *ang. monoclonal gammopathy of undetermined significance* – gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu

MHC - *ang. major histocompatibility complex* – główny kompleks zgodności tkankowej

m-RNA – *ang. messenger ribonucleic acid* – informacyjny RNA

NDRP - niedrobnokomórkowy rak płuca

NSCLC - *ang. non-small cell lung carcinoma* - niedrobnokomórkowy rak płuca

PBS – *ang. phosphate-buffered saline* - fizjologiczny roztwór soli buforowany fosforanami

PD-L1 – *ang. programmed cell death 1 ligand* – ligand 1 dla białka programowanej śmierci komórki

PGE₂ – *ang. prostaglandin E₂* – prostaglandyna E₂

PS – *ang. performance status* - stan sprawności

RT-PCR – *ang. real-time polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym

SCID – *ang. severe combined immunodeficiency* – ciężki złożony niedobór odporności

SCLC - *ang. small cell lung carcinoma* – rak drobnokomórkowy płuca

TAA - *ang. tumor associated antigens* – antygeny związane z nowotworem

Tem – *ang. T effector memory cells* – efektorowe limfocyty T pamięci

TGF-β – *ang. transforming growth factor beta* – transformujący czynnik wzrostu beta

TGF-βR1 - *ang. transforming growth factor beta receptor 1*- receptor 1 dla transformującego czynnika wzrostu

TIL - *ang. tumor infiltrating lymphocytes* – limfocyty naciekające guz

TNF - *ang. tumor necrosis factor* - czynnik martwicy guza

VEGF - *ang. vascular endothelial growth factor* – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

WHO - *ang. World Health Organization* – Światowa Organizacja Zdrowia

WSTĘP

1. Epidemiologia i etiologia raka płuca

Według Światowej Organizacji Zdrowia rak płuca jest najczęściej występującym nowotworem na świecie, w roku 2005 odnotowano około 1 300 000 nowych zachorowań [1]. W Polsce według Krajowego Rejestru Nowotworów w roku 2006 stwierdzono 20 132 nowych zachorowań na raka płuca, w tym 15 157 wśród mężczyzn i 5 075 u kobiet. Był to najczęściej rejestrowany nowotwór złośliwy u mężczyzn (23,6%) i drugi co do częstości występowania u kobiet (8,2%). Standaryzowany współczynnik zachorowalności na nowotwory złośliwe płuca na 100 000 osób w 2006 roku wyniósł 58,5 dla mężczyzn i 15,1 dla kobiet [2].

Rak płuca jest chorobą o wysokiej śmiertelności, a współczynniki zachorowalności i umieralności są na podobnym poziomie, co stanowi wielki problem kliniczny. Na podstawie badania EUOCARE-4 prowadzonego do końca 2003 roku ustalono wskaźnik przeżyć pięcioletnich dla osób z tym rozpoznaniem na 12,3% (95% CL 12,1-12,5) niezależnie od płci. Wskaźnik ten był wyższy w krajach nordyckich (z wyjątkiem Danii) i w centralnej Europie, średni w południowej Europie, niższy w Wielkiej Brytanii i Irlandii, a najgorszy we wschodniej Europie [3]. We wszystkich grupach wiekowych liczba zachorowań i zgonów jest wyższa u mężczyzn, lecz różnica ta w krajach rozwiniętych stopniowo maleje [4]. W Polsce rak płuca stanowi ciągle jedną z najczęstszych przyczyn śmierci obu płci. W roku 2006 liczba zgonów z powodu tego nowotworu wśród mężczyzn wynosiła 16 623 (32,2% zgonów nowotworowych), a wśród kobiet 5 108 (12,8% zgonów nowotworowych) [2].

Rak płuca jest jednym z niewielu nowotworów o znanej i udokumentowanej etiologii. Istotny związek pomiędzy paleniem tytoniu i rakiem płuca wykazano już około 60 lat temu [5]. Obecnie szacuje się, że w Polsce 94% przypadków raka płuca u mężczyzn i 60% u kobiet jest przyczynowo związanych z paleniem tytoniu [6]. Obok nikotynizmu czynnikami ryzyka zachorowania na raka płuca jest uwarunkowanie genetyczne oraz narażenie środowiskowe na m.in.: metale radioaktywne, gazowe produkty ich rozpadu, azbest, nikiel, chrom, arsen, związki węglowodorowe [7]

Nowotwory płuca stanowią niejednorodną grupę pod względem histologicznym i klinicznym. Histologiczna ich klasyfikacja pozostaje nadal najistotniejszym czynnikiem predykcyjnym i rokowniczym. Dodatkowe czynniki, głównie molekularne, uzupełniają ich charakterystykę biologiczną. Pierwotny rak płuca jest nowotworem pochodzącym

z komórek nabłonkowych i stanowi prawie 99% wszystkich nowotworów złośliwych o tej lokalizacji. Podstawowy podział kliniczno-patologiczny przebiega pomiędzy rakiem niedrobnokomórkowym (NDRP; ang. *non-small cell lung carcinoma* - NSCLC), który stanowi około 80% nowotworów płuca, i rakiem drobnokomórkowym (DRP; ang. *small cell lung carcinoma* – SCLC), stanowiącym pozostałe 20%. Pierwszy typ obejmuje niejednorodną grupę nowotworów różniących się utkaniem i złośliwością biologiczną, drugi jest agresywnym nowotworem mającym w większości przypadków postać choroby rozsianej, rzadko ograniczającej się do klatki piersiowej.

2. Patofizjologia płynu w jamie opłucnowej

Opłucna jest cienką błoną surowiczą, która wyściela od wewnątrz ścianę klatki piersiowej oraz przeponę (opłucna ścienna) oraz pokrywa powierzchnię płuca (opłucna płucna). Przestrzeń pomiędzy obu blaszkami opłucnych nazywa się jamą opłucnową. Powierzchnię opłucnej wyściela jednowarstwowy międzybłonek, tworzący błonę podstawną. Poniżej znajduje się szereg warstw tkanki łącznej, w której przebiegają naczynia krwionośne i limfatyczne. Komórki międzybłonka są spłaszczone i posiadają mikrokosmki na swojej powierzchni [8]. Pory w międzybłonku opłucnej ściennej umożliwiają wchłanianie płynu z jamy opłucnej do naczyń chłonnych. Jest to jedyna klinicznie istotna droga jego wchłaniania. W warunkach prawidłowych w jamie opłucnowej znajduje się 10-20 ml płynu wypełniającego około 20 mikrometrową szczelinę pomiędzy opłucną trzewną i ścienną. Jego funkcją jest nawilżanie powierzchni blaszek opłucnowych, przez co ułatwione jest ich wzajemne przesuwanie się względem siebie w trakcie ruchów poprzez zmniejszenie tarcia [9]. Komórki międzybłonka odgrywają również istotną rolę w rozwoju zapalenia w obrębie jamy opłucnowej. Pod wpływem różnych czynników stymulujących, mogą produkować cytokiny, takie jak interleukina 6 i 8 oraz czynnik martwicy guza (ang. *tumor necrosis factor* – TNF) [10, 11]. Komórki międzybłonka mają zdolność do syntezy niektórych składników zewnątrzkomórkowej macierzy, fagocytozy drobinek docierających do opłucnej a także wykazują aktywność fibrynolityczną [12].

Wytwarzanie i wchłanianie płynu jest utrzymywane w stanie równowagi a każde jej zakłócenie może powodować gromadzenie się płynu w opłucnej będące:

- manifestacją choroby dotyczącej samej opłucnej,
- objawem choroby toczącej się w klatce piersiowej lub,
- wyrazem choroby ogólnoustrojowej.

W warunkach fizjologicznych płyn dostaje się do jamy opłucnowej poprzez naczynia włosowate w opłucnej ściennej i jest usuwany przez naczynia limfatyczne umieszczone w tej blaszce opłucnej. Płyn może także przemieścić się do jamy opłucnowej z przestrzeni śródmiąższowej płuc przez opłucną trzewną lub z jamy otrzewnej przez małe otwory w przeponie. Naczynia limfatyczne mogą wchłonąć 20 razy więcej płynu niż tworzy się go w warunkach prawidłowych. Płyn w jamie opłucnowej zbiera się wówczas, kiedy jest dostarczany w nadmiarze (z opłucnej ściennej, przestrzeni śródmiąższowych płuc albo z jamy otrzewnej) lub kiedy zmniejszone jest jego usuwanie przez naczynia limfatyczne.

W zależności od etiopatologii płyny opłucnowe, dzieli się na przesiękowe (łac. *transsudatum*) i wysiękowe (łac. *exsudatum*) [13]. Płyn przesiękowy powstaje w jamie opłucnowej wówczas, kiedy zaburzone są czynniki ogólnoustrojowe, które wpływają na jego tworzenie i wchłanianie tj. wzrost ciśnienia hydrostatycznego w naczyniach włosowatych opłucnej lub spadek ciśnienia osmotycznego bądź onkotycznego krwi. Do jamy opłucnowej może również przenikać płyn przesiękowy z jamy otrzewnej. Główną przyczyną przesięków w jamie opłucnowej jest niewydolność lewokomorowa serca, marskość wątroby i zespół nerczycowy. Płyn wysiękowy pojawia się w jamie opłucnowej wówczas, kiedy zaburzone zostają czynniki miejscowe, wpływające na jego tworzenie i wchłanianie. Do gromadzenia się wysięku przyczyniają się: zwiększona przepuszczalność naczyń włosowatych opłucnej ściennej, zmniejszenie wchłaniania płynu opłucnowego w wyniku upośledzenia drożności naczyń chłonnych i wysokie ciśnienie onkotyczne w jamie opłucnowej w związku z dużym stężeniem białka w wysięku. Wiodącą przyczyną wysięków opłucnowych jest bakteryjne zapalenie płuc, nowotwory, zakażenia wirusowe, zatorowość płucna. [14]

Płyny przesiękowe i wysiękowe mogą być różnicowane dzięki pomiarom aktywności dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH – *ang. lactate dehydrogenase*) oraz stężenia białek w płynie i w surowicy krwi. Służą do tego celu kryteria Lighta, opisane w 1972 roku [15]. Płyn w jamie opłucnowej jest wysiękiem, jeśli spełnia przynajmniej jedno z poniższych kryteriów, podczas gdy płyny przesiękowe nie spełniają żadnego z nich.

1. Stosunek stężenia białka w płynie opłucnowym do stężenie białka w surowicy wynosi $> 0,5$

2. Stosunek aktywności LDH w płynie opłucnowym do aktywności LDH w surowicy wynosi $> 0,6$
3. Aktywność LDH w płynie opłucnowym jest $> 2/3$ górnej granicy normy dla aktywności w surowicy krwi.

2.1 Wysiłek opłucnowy w przebiegu choroby nowotworowej

W krajach rozwiniętych przerzuty nowotworowe do opłucnej są jedną z głównych przyczyn wysięków [16]. Najczęstszą przyczyną gromadzenia się płynu w jamie opłucnowej w przebiegu chorób nowotworowych, spośród guzów litych jest rak płuca, piersi, jajnika i przewodu pokarmowego [17], zaś spośród rozrostów hematologicznych, chłoniaki. Uważa się, iż powstawanie przerzutów na opłucnej najczęściej dokonuje się drogą embolizacji naczyń krwionośnych przez komórki nowotworowe i początkowo dotyczy opłucnej płucnej, a następnie rozszerza się na opłucną ścienną [18]. Do innych potencjalnych mechanizmów ich powstawania należą: naciek guza wynikający z bezpośredniego sąsiedztwa z opłucną (np. w raku płuca, nowotworach ściany klatki piersiowej i raku piersi), inwazja komórek nowotworowych drogą naczyń krwionośnych lub za pośrednictwem naczyń limfatycznych.

Nowotwory złośliwe mogą przyczyniać się do powstania wysięku opłucnowego w różnych mechanizmach, zarówno bezpośrednio jak i pośrednio. Zaburzenie integralności układu limfatycznego na jakimkolwiek odcinku pomiędzy opłucną trzewną a węzłami chłonnymi śródpiersiowymi, może doprowadzić do gromadzenia się wysięku w obrębie jamy opłucnej. Podobnie bezpośredni drażniący wpływ guza na opłucną płucną wynikający z ich wzajemnego sąsiedztwa może również przyczynić się do tworzenia płynu o charakterze wysięku. Zagnieżdżenie się na powierzchni opłucnej komórek nowotworowych (np. w przypadku guzów litych) lub przerzutów nowotworowych z towarzyszącym im miejscowym odczynem zapalnym, powodują zwiększoną przepuszczalność naczyń włosowatych, a to z kolei skutkuje tworzeniem wysięku. Określenie „wysięki paranowotworowe” jest zarezerwowane dla tych sytuacji, w których płyn w jamie opłucnowej powstaje w mechanizmie pośredniego oddziaływania guza na opłucną. Podstawowe przykłady obejmują: zapalenie płuc w obszarze niedodmy (powstającej w wyniku ucisku guza na oskrzele) z następczym powstaniem wysięku parapneumonicznego, niedrożność przewodu piersiowego z powodu ucisku przez guz z powstaniem wysięku chłonnego, czy też jako powikłanie zatorowości płucnej w przebiegu choroby nowotworowej. Czasami leczenie guza pierwotnego może również

przyczynić się do powstania wysięku opłucnowego. Może się on pojawić w następstwie zastosowania radioterapii czy leczenia cytotoksycznego najczęściej z użyciem metotreksatu, prokarbazyny, cyklofosfamidu czy bleomycyny.

W przebiegu choroby nowotworowej sporadycznie może dojść również do gromadzenia się przesięku. Powstaje on wówczas w mechanizmach pośrednio związanych z nowotworem jako wtórne zjawisko do niedodmy z ucisku i/lub w wyniku spadku ciśnienia onkotycznego w przebiegu wyniszczenia nowotworowego. W końcu, inne współistniejące u chorego z procesem nowotworowym choroby, takie jak choćby niewydolność serca, mogą przyczynić się do gromadzenia płynu w jamie opłucnowej [19, 20].

Wysięk nowotworowy spowodowany obecnością przerzutów na opłucnej ma najczęściej krwisty charakter i jest bogaty w limfocyty T [21]. Rozpoznanie opiera się na wykazaniu obecności komórek nowotworowych w wysięku lub na zidentyfikowaniu nacieku nowotworowego w materiale uzyskanym z biopsji opłucnej. Badanie cytologiczne płynu opłucnowego w przebiegu choroby nowotworowej daje pozytywny wynik w 57-72% [22], zaś wynik biopsji pozwala potwierdzić charakter nowotworowy wysięku w 43-65% [22, 23].

3. Immunologia nowotworów.

Nowotwory interesowały immunologów niemal od początku istnienia tej dziedziny nauki. Istnienie zależności między rozwojem procesu nowotworowego a funkcją układu immunologicznego potwierdzały obserwacje kliniczne, w których zwiększone względne ryzyko powstania nowotworów dotyczyło pacjentów w stanie immunosupresji. Hipotezę nadzoru immunologicznego nowotworów stworzyli Burnet i Thomas w drugiej połowie dwudziestego wieku [24, 25]. Dziś uważa się, że hipoteza ta stanowi intelektualną podstawę immunologii nowotworów i ma istotne znaczenie dla zrozumienia funkcji układu odpornościowego w przebiegu procesu nowotworowego. Aktywność immunologiczna gospodarza może przejawiać się produkcją przeciwciał lub zdolnością limfocytów chorego do odpowiedzi immunologicznej, np. cytotoksyczności przeciw komórkom nowotworowym [26]. Odpowiedź immunologiczna, obserwowana u osób z nowotworem przeciw ich własnym (autogenicznym) komórkom nowotworowym, stwarza potencjalne możliwości interwencji stanowiącej podstawy immunoterapii nowotworów [27].

3.1 Antygeny związane z nowotworem.

Celem badań nad antygenami nowotworowymi jest ich wykorzystanie do wykrywania, monitorowania oraz leczenia nowotworów. W literaturze często używa się na ich określenie terminu - antygeny związane z nowotworem (ang. *tumor associated antigens* – TAA). Większość antygenów nowotworowych powstających spontanicznie nie ma charakteru antygenów swoistych i występuje, choćby w niewielkich ilościach, również na niektórych komórkach prawidłowych [26, 28].

Antygeny nowotworowe rozpoznawane są albo przez limfocyty, albo przez przeciwciała, a rzadziej zarówno przez limfocyty T jak i przez przeciwciała. Najlepiej udokumentowanym takim mechanizmem jest prezentowanie antygenów nowotworowych przez cząsteczki MHC klasy I limfocytom T CD8⁺ [29]. Okazuje się jednak, że antygeny nowotworowe mogą być również prezentowane limfocytom T CD4⁺ poprzez cząsteczki MHC klasy II [30].

W wielu badaniach wykazano brak lub zmniejszoną ekspresję cząsteczek MHC klasy I na komórkach nowotworowych [28]. Defekt ten korelował ze złośliwością nowotworu. Potwierdzeniem powyższej obserwacji były doświadczenia, w których uzyskiwano efekt zwiększenia immunogenności komórek nowotworowych przez wprowadzenie (transfekcję) genów MHC co przywracało ich ekspresję w komórkach [31, 32]. Jakkolwiek byłoby to logiczne wytłumaczenie jednego z mechanizmów ucieczki nowotworów przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza to wyniki ostatnich badań nie potwierdzają jednoznacznie zależności między ekspresją cząsteczek MHC a złośliwością nowotworu. Wytłumaczeniem tego zjawiska może być fakt, że o ile ekspresja cząsteczek MHC na komórkach nowotworowych jest konieczna do rozpoznania ich przez limfocyty T, to z kolei brak tych cząsteczek uwrażliwia komórki nowotworowe na cytotoksyczną aktywność komórek NK. Limfocyty Tc i komórki NK stanowią tym samym dwa uzupełniające się elementy obrony przeciwnowotworowej [33].

Współcześnie antygeny nowotworowe wykorzystuje się do szczepionek w różnych podejściach immunoterapii nowotworów (np. szczepienie samymi antygenami, szczepienie antygenami podawanymi z adiuwantami i cytokinami, szczepienie komórkami dendrytycznymi wcześniej „wypełnionymi” antygenami nowotworowymi) [34-37]. Ze względu na to, że wśród komórek danego nowotworu obserwuje się często znaczną heterogenność antygenową to w celach terapeutycznych potencjalnie lepiej będą nadawały się „mieszanki” przeciwciał przeciw różnym TAA obecnym w danym nowotworze. Inną

metodą omięcia powyższego problemu jest również podanie przeciwciał sprzężonych z radioizotopami, zdolnymi do zabicia nie tylko komórki związanej przez przeciwciało ale także wielu warstw otaczających ją komórek [27].

3.2 Mechanizmy efektorowe odpowiedzi immunologicznej przeciw komórkom nowotworowym.

Odpowiedź przeciwnowotworowa obejmuje zarówno wytwarzanie przeciwciał, jak i mechanizmy komórkowe. Do najważniejszych procesów immunologicznych uczestniczących w obronie przeciwnowotworowej należą:

- aktywność komórek NK
- aktywność cytokin takich jak interleukiny, interferony, chemokiny czy nadrodzina TNF,
- cytotoksyczność limfocytów Tc,
- cytotoksyczność pobudzonych makrofagów i neutrofilów,
- cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał
- cytotoksyczność przeciwciał zależna od układu dopełniacza [38].

Limfocyty Tc są zdolne do rozpoznania i zabicia autologicznych komórek nowotworowych dzięki prezentowaniu ich antygenów przez cząsteczki MHC klasy I [29]. Wykazano, iż duża aktywność tych limfocytów w momencie operacyjnego usunięcia guza, koreluje z dobrą prognozą i długim przeżyciem pacjentów. Innym bardzo ważnym elementem komórkowej odpowiedzi przeciwnowotworowej są swoiste limfocyty Th, zdolne są do rozpoznania TAA, jeśli są im prezentowane w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II [30]. Następnym ich aktywacji jest uwolnienie cytokin, które wspomagają lub pobudzają kolejne komórki układu odpornościowego albo bezpośrednio uczestniczą w procesie niszczenia komórek nowotworowych. Jedną z cytokin uwalnianych przez zaktywowane limfocyty Th jest INF- γ , który jest najważniejszą cytokiną stymulującą makrofagi. Te ostatnie, mogą zabijać lub hamować proliferację komórek nowotworowych w wyniku kontaktu bezpośredniego albo pośrednio przy udziale wydzielanych cytokin tj. TNF czy IL-1. Inne wydzielane przez makrofagi cytokiny (tj. IL-12, IL-15, IL-18, IL-27) aktywują limfocyty Tc i komórki NK, co wzmacnia odpowiedź cytotoksyczną skierowaną przeciw komórkom nowotworowym [39]. Ponadto chemokiny wytwarzane przez makrofagi działając chemotaktycznie przyciągają wiele komórek (np. neutrofile,

monocyty, limfocyty) przez co zwiększają ich napływ w kierunku nowotworu [40-42]. Jednak badania prowadzone na makrofagach z mikrośrodowiska guza wykazały, że relacje między nowotworem a naciekającymi go makrofagami nie są wyłącznie antagonistyczne [39]. Na podstawie obserwacji wyodrębniono dwie subpopulacje makrofagów. Makrofagi M1 posiadają zdolność zabijania komórek nowotworowych, podczas gdy często dominujące w mikrośrodowisku guza makrofagi M2 sprzyjają jego rozwojowi [39, 43].

Odpowiedź komórkowa jest dominującą formą aktywności immunologicznej skierowanej przeciw komórkom nowotworowym. Niemniej jednak odpowiedź typu humoralnego może również prowadzić do ich zniszczenia. Dochodzi do tego po związaniu odpowiedniego przeciwciała z TAA na komórce nowotworowej i aktywacji dopełniacza albo przyłączenia komórki K mającej receptor dla fragmentu Fc i zdolnej do cytotoksyczności zależnej od przeciwciał [44].

W końcu w obronie przeciwnowotworowej biorą również udział mechanizmy nieimmunologiczne. Klasycznym tego przykładem jest gromadzenie fibroblastów wokół guza, co hamuje jego rozwój poprzez odgradzanie go od otaczających tkanek. Nie jest to zjawisko zupełnie niezależne od mechanizmów immunologicznych, gdyż ważnym elementem stymulującym proliferację fibroblastów są cytokiny wydzielane m.in. przez limfocyty Th [45].

3.3 Mechanizmy ucieczki nowotworów przed odpowiedzią immunologiczną.

W tabeli 1 przedstawiono podstawowe mechanizmy supresji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Niżej przedstawiono ich krótką charakterystykę.

Zasadniczo u podstawy zjawisk unikania odpowiedzi immunologicznej stoi selekcja klonów. Jest ona wynikiem poddawania komórek nowotworowych presji efektorowych mechanizmów immunologicznych (faza eliminacji), które nie prowadzą jednak do całkowitego zniszczenia nowotworu. W wyniku tych mechanizmów dochodzi do selektywnego przeżycia i namnażania takich klonów komórek nowotworowych, których wrażliwość na cytotoksyczne mechanizmy efektorowe jest osłabiona, na przykład w wyniku zmniejszonej antygenowości (faza równowagi). Te klony komórek uwalniają się spod kontroli immunologicznej i następnie w sposób niekontrolowany namnażają (faza ucieczki). Za udziałem immunoselekcji w rozprzestrzenianiu się nowotworu przemawiają pośrednio wyniki badań wskazujące na różnice antygenowe między nowotworem pierwotnym i jego przerzutami [46].

Tabela 1. Mechanizmy supresyjne o szczególnym znaczeniu dla odporności nowotworowej.

Poziom supresji odpowiedzi immunologicznej	Przykłady
Powstanie odpowiedzi	<ul style="list-style-type: none"> - immunosupresja zewnątrzpochodna (niektóre leki, infekcje wirusowe) - cytokiny hamujące tj. TGFβ, PGE₂ i IL 10
Osłabienie odpowiedzi	<ul style="list-style-type: none"> - ogólne mechanizmy tolerancji obwodowej - hamowanie aktywności limfocytów T przez CTLA-4 - obniżenie odpowiedzi immunologicznej przez limfocyty Treg i inne komórki supresorowe - obecność na komórkach nowotworowych cząsteczek indukujących apoptozę limfocytów T (FasL, PD-L1)
Poziom efektorowy	<ul style="list-style-type: none"> - oporność na rozpoznanie i liżę wskutek spadku ekspresji cząsteczek MHC klasy I i powstania wariantów pozbawionych antygeny - zjawisko selekcji klonów - zjawisko immunomodulacji

Innym opisanym mechanizmem ucieczki jest immunomodulacja. Zjawisko to polega na przejściowym zmniejszeniu się antygenowości komórek nowotworowych przez utworzenie na powierzchni ich błony komórkowej kompleksów antygen – przeciwciała. Kompleksy te mają zdolność przesuwania się w płaszczyźnie błony, skupiając się na jednym z biegunów komórki, tym samym przejściowo eliminując antygeny nowotworowe z jej powierzchni [47].

Ponadto wykazano, że swoiste cytotoksyczne limfocyty T tracą zdolność zabijania komórek nowotworowych, gdy w środowisku obecne są wolne antygeny nowotworowe albo fragmenty błon komórek nowotworowych. Ich efekt supresyjny na odpowiedź przeciwnowotworową potwierdza obserwacja, w której intensywność uwalniania TAA przez komórki nowotworowe korelowała pozytywnie ze złośliwością guza [26].

Brak efektywnej odpowiedzi na antygeny nowotworowe może wynikać również z faktu, że układ odpornościowy pacjenta styka się ze stopniowo wzrastającymi ich stężeniami. Sytuację tę można porównać do zastosowania swoistej immunoterapii, w której przez podawanie małych, a następnie stopniowo wzrastających dawek antygeny uzyskuje się efekt immunotolerancji na dany antygen.

Ciekawych wniosków dostarczyły badania z użyciem przeciwciał przeciwnowotworowych. Wykazały one, że niektóre z przeciwciał mogą wręcz sprzyjać rozwojowi guza. Do tej grupy należą między innymi przeciwciała, które wiążąc się z antygenami na powierzchni komórek nowotworowych, maskują je i blokują tym samym dostęp do nich komórek efektorowych odpowiedzi immunologicznej, np. cytotoksycznych limfocytów T. Ponadto okazało się, że w niektórych sytuacjach swoiste przeciwciała użyte w małych stężeniach mogą stymulować proliferację komórek docelowych [26]. Podobny efekt dotyczy cytokin wydzielanych w reakcjach immunologicznych, a będących czynnikami wzrostu. One również mogą pobudzać proliferację komórek nowotworowych [48, 49].

U chorych z nowotworem obserwuje się osłabienie odpowiedzi immunologicznej szczególnie typu komórkowego. Znaczącą rolę odgrywa w tym zakresie cząsteczka CTLA-4, której ekspresję stwierdza się na komórkach T CD8⁺ [50]. W warunkach fizjologicznych ogranicza ona odpowiedź limfocytów T na obce antygeny jak również na autoantygeny. Wykazano, że w mikrośrodowisku guza CTLA-4 hamuje limfocyty T przez podniesienie progu stymulacyjnego lub przez hamowanie ich aktywności proliferacyjnej [50, 51].

Hamująco na odpowiedź przeciwnowotworową mogą również wpływać limfocyty T regulatorowe oraz tzw. mieloidalne komórki supresorowe. Ponieważ limfocyty T regulatorowe są przedmiotem niniejszej pracy szczegółowa ich charakterystyka zostanie przedstawiona w dalszej jej części.

Ponadto opisano kilka mechanizmów immunosupresji bezpośrednio związanych z nowotworem. Jednym z nich jest wydzielanie przez komórki nowotworowe czynników działających supresyjnie na procesy immunologiczne tj. TGF- β (ang. *Tumor Growth Factor* – czynnik wzrostu guza), prostagandyna E₂ czy IL-10 [26, 28]. Wytwarzany przez wiele typów komórek nowotworowych czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF) nie tylko stymuluje formowanie się naczyń w obrębie nowotworu, ale także hamuje różnicowanie się komórek dendrytycznych z ich prekursorów. Ponadto szereg cząsteczek, których ekspresję wykazano na powierzchni komórek nowotworowych np. ligand dla białka Fas (CD95L) ma zdolność indukowania

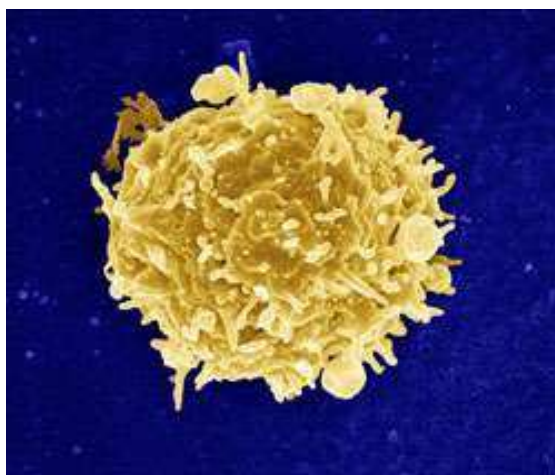
apoptozy limfocytów, które mają w swojej błonie komórkowej wbudowane to białko [28]. W mikrośrodoisku guza istotne znaczenie dla jego progresji mają również komórki dendrytyczne wytwarzające 2,3-dioksygenazę indolaminy, która rozkłada tryptofan i hamuje aktywację limfocytów T. Niektóre komórki nowotworowe mogą same wydzielać ten enzym bezpośrednio wpływając na przebieg odpowiedzi immunologicznej [52].

4. Limfocyty T regulatorowe.

4. 1 Charakterystyka ogólna Treg

Komórki supresorowe po raz pierwszy opisano w latach 70-tych ubiegłego stulecia. Uważano je za komórki antygenowo swoiste, które po aktywacji, poprzez wpływ na komórki T CD4⁺, hamują odpowiedź humoralną i komórkową [53, 54]. Następnie wykazano, że mechanizm supresji jest zdecydowanie bardziej skomplikowany. Ponieważ w tamtym okresie nie udało się ustalić markerów fenotypowych dla tych komórek określenie limfocyty T „supresorowe” wycofano z użycia. Ponad 20 lat później - na modelu zwierzęcym - zostały zidentyfikowane limfocyty T CD4⁺, wykazujące ekspresję łańcucha α receptora dla interleukiny 2 (CD25). Komórki te określono mianem limfocytów T regulatorowych (Treg) [55]. Wykazano, iż stanowią one 5-10% obwodowych naiwnych (dziewiczych) limfocytów T CD4⁺ i odpowiadają za utrzymanie obwodowej tolerancji immunologicznej. Początkowo uważano, że są to komórki anergiczne. Okazało się jednak, że limfocyty Treg proliferują *in vivo* oraz przy zachowaniu odpowiednich warunków hodowli, także *in vitro* [56].

Ryc. 1 Komórka Treg [<http://www3.niaid.nih.gov/NR/rdonlyres/F2974461-0663-479D-91AE-B92ED6E4F6F4/0/hasenkrugFig1.jpg>]



Komórki Treg różnicują się przede wszystkim w grasicy i są to tzw. naturalne Treg. Jednak pod wpływem cytokin lub po kontakcie z antygenem CD4⁺ regulatorowe komórki T mogą powstawać również na obwodzie [57, 58]. Pod wpływem IL-10 komórki te różnicują się w populację Tr1 tj. komórki supresorowe bez ekspresji CD25 oraz FoxP3. Ponadto komórki Tr1 w następstwie aktywacji są źródłem IL-10. Jeśli zaś różnicowanie regulatorowych limfocytów T CD4⁺ zachodzi w obecności TGFβ, to nabywają one zdolność ekspresji cząsteczki CD25 oraz czynnika FoxP3. Komórki te działają hamująco przez wydzielanie TGFβ. W końcu pod wpływem antygeny i kostymulacji na obwodzie powstają tzw. efektorowe komórki pamięci (Tem - *T effector memory cells*), które wydzielają szereg cytokin m.in.: IL-2, INFγ, IL-4 itd. [59]

Rola jaką spełniają limfocyty Treg w układzie immunologicznym jest ambiwalentna. Z jednej strony pełnią funkcje użyteczne tj.: zabezpieczają przed autoagresją poprzez hamowanie aktywności autoreaktywnych limfocytów T, uczestniczą w wytwarzaniu tolerancji pokarmowej, tolerancji na przeszczepy allogeniczne, hamują reakcje nadwrażliwości oraz ochraniają płód przed odrzuceniem przez układ odpornościowy matki. Niestety jednocześnie uczestniczą w procesach, które mają skutki niepożądane dla organizmu tj. hamują eliminację mikroorganizmów (co sprzyja przewlekaniu się infekcji) oraz biorą udział w rozwoju tolerancji na antygeny związane z nowotworem [56].

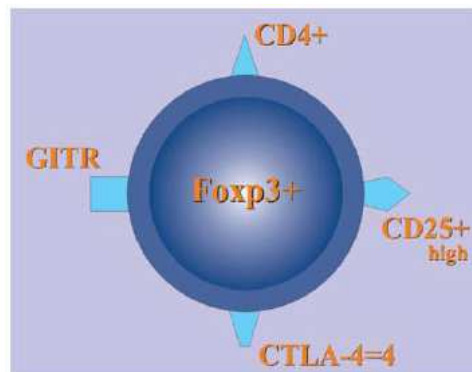
Nie tylko różnicowanie się limfocytów w komórki Treg, ale także ich oddziaływanie z innymi komórkami układu odpornościowego są niezwykle złożone. Dzięki temu aktywność komórek Treg jest precyzyjnie regulowana (dostrajana) na różnych etapach odpowiedzi immunologicznej i pozwala na jej prawidłowy przebieg. Obecnie uważa się, że zaburzenia ilościowe i czynnościowe tej subpopulacji limfocytów przyczyniają się do rozwoju różnych chorób (np. nowotworowych, autoimmunizacyjnych). Z drugiej strony, pełniejsze zrozumienie biologii tych komórek stwarza nowe możliwości terapeutyczne [57-58, 60-61].

4.2 Markery używane do identyfikacji i obliczania Treg.

Przed wprowadzeniem swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko czynnikowi FoxP3, używano wielu markerów, które określały ludzkie Treg. W większości badań prowadzonych w przeszłości u chorych z procesem nowotworowym Treg definiowano poprzez stwierdzenie koekspresji CD4 i CD25. Jednak część badaczy wykluczała z tej

grupy komórki aktywowane [62] wykazujące ekspresję CD69 [62-65] i Ki 67 [62, 66], brak CD62L [66-68]. Inni potwierdzali fenotyp Treg CD4⁺CD25⁺ przez analizę ekspresji CD45RO i CTLA-4 [62-64, 66, 69-73]. Ponieważ aktualne dane wykazały różnice w poziomie ekspresji CD25 pomiędzy ludzkimi a mysimi Treg, stąd niektóre późniejsze badania definiowały Treg na podstawie CD4⁺CD25^{high} i często współobecności konstytutywnych markerów tj.: CTLA-4, GITR, CD45RO, TGF-βR1 [62, 72]. Ostatnie doniesienia wskazują, że specyficzną cechą komórek Treg jest obecność czynnika transkrypcyjnego FoxP3 oraz brak cząsteczki CD127, która jest receptorem dla interleukiny 7 (IL-7R) [74-75]. Odkrycie czynnika FoxP3 i jego istotnej roli w funkcjonowaniu Treg znacznie poprawiło możliwości badania tych komórek [76]. Przeciwciała przeciw FoxP3 bezpośrednio znakują te komórki i umożliwiają dokładną ocenę częstości ich występowania [66-67, 77-78]. Aktualnie przyjęty fenotyp ludzkich komórek Treg to CD4⁺CD25^{high}CTLA4⁺ GITR⁺ FoxP3⁺ CD45RO⁺ CD45RA⁻CD69⁻Ki-67⁻ [79].

Ryc. 2 Fenotyp ludzkich komórek Treg.



4.3 Udział Treg w kontroli odpowiedzi immunologicznej

Komórki regulatorowe (CD4⁺CD25⁺) hamują odpowiedź na autoantygeny, ale również na antygeny egzogenne. Nasilenie aktywności supresorowej komórek Treg zależy od:

- poziomu ekspresji cząsteczek przekazujących sygnał aktywacyjny limfocytom Treg
- dostępności ligandów inicjujących przekazanie sygnału przez te cząsteczki
- wpływu cytokin oraz

- poziomu ekspresji receptorów i ligandów inicjujących apoptozę.

Z reguły komórki Treg otrzymują te sygnały podczas bezpośredniego kontaktu z komórkami kooperującymi [56].

4.3.1 Rola Treg w odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Udział Treg w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw komórkom nowotworowym był głównie badany na modelach zwierzęcych. Ich rola w tworzeniu odporności przeciwnowotworowej u ludzi jest w mniejszym stopniu poznana. Treg determinują obwodową tolerancję przez hamowanie aktywności autoreaktywnych komórek T [80-82]. Ponieważ większość antygenów nowotworowych jest autoantygenami [83], komórki Treg prowadzące do supresji limfocytów skierowanych przeciwko TAA, stanowią potencjalny mechanizm wyjaśniający niepowodzenie układu immunologicznego w odpowiedzi przeciwnowotworowej [68, 84].

U chorych z czerniakiem z ekspresją NY-ESO-1, białka komórki macierzystej często występującego w komórkach nowotworowych w przeciwieństwie do tkanek zdrowych, wykazano obecność przeciwciał anty NY-ESO-1 we krwi obwodowej. Przeciwciała te związane były z odpowiedzią komórek Th1 o fenotypie $CD45RO^+CD4^+$. U chorych nie wykazujących ekspresji tego białka na komórkach nowotworowych (tj. seronegatywnych), nie stwierdzono swoistej odpowiedzi immunologicznej limfocytów T $CD4^+$. Usunięcie komórek $CD4^+CD25^+$ (tj. Treg) prowadziło do nasilonej odpowiedzi $CD4^+CD45RA^+$ T komórkowej i odporności przeciwnowotworowej w grupie kontrolnej, u chorych seronegatywnych, a także u osób, u których wcześniej stwierdzono reakcje komórek T $CD4^+CD45RO^+$ przeciw NY-ESO-1 [85]. Tym samym wykazano, że komórki T nie są w równym stopniu wrażliwe na supresję wywieraną przez Treg. Ostatnio udowodniono, że komórki T swoiste dla NY-ESO-1 mogą być wzbudzone u seronegatywnych pacjentów przez podanie szczepionki z białkiem NY-ESO-1 [86]. W takim przypadku odpowiedź ze strony komórek T w obecności Treg, była niewielka i mogła nie rozpoznać obecności natywnego antygeny NY-ESO-1 na komórkach nowotworowych. Przeciwnie limfocyty T swoiste dla tego antygeny, po wyeliminowaniu Treg, wykrywały go z dużą czułością. Te dane pokazują, że limfocyty T o tych samych właściwościach, ale różnej awidności, charakteryzują się różną wrażliwością na supresję wywieraną przez Treg. Tylko limfocyty z wysoką awidnością, wrażliwe na Treg, mogą brać udział w odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Curiel i wsp. wykazali, że Treg u chorych z rakiem jajnika hamują skierowaną swoiście przeciwko Her2 odpowiedź (tj. proliferację, cytotoksyczność, produkcję IL-2 i IFN- γ) [68]. W dodatku podanie komórek CD3⁺CD25⁻ (uzyskanych od chorych z nowotworem) szczepom myszy NOD/SCID znamienne zwolnił wzrost przeszczepionego guza jajnika, podczas gdy podanie komórek Treg przyspieszało jego wzrost i hamowało skuteczność wyżej wymienionych komórek. Oba te badania wykazały, że istnieje efektywna odpowiedź przeciwnowotworowa ze strony komórek T, i że niektóre z tych komórek podlegają supresji ze strony Treg.

Hamowanie odpowiedzi immunologicznej przez Treg zdaje się nie ograniczać tylko do supresji limfocytów T skierowanych przeciwko antygenom swoistym dla nowotworów. Wykazano, że Treg hamują niezależny od limfocytów T proces zapalny wywołany przez *Helicobacter hepaticus* u myszy [87]. Jeśli rzeczywiście proces zapalny jest powiązany z progresją procesu nowotworowego, to Treg mogą ograniczać progresję nowotworu, przez hamowanie zapalenia.

Nadal nie jest jasne jak Treg hamują zarówno wrodzoną jak i nabytą swoistą odpowiedź immunologiczną. Coraz więcej faktów wskazuje na rolę Treg w hamowaniu komórek NK. Badanie u chorych z GIST po przebytych leczeniu z zastosowaniem c-kit inhibitora kinazy tyrozynowej (imatinib) uwydatniło odwrotnie proporcjonalną korelację pomiędzy ilością INF- γ produkowanego przez komórki NK a liczbą Treg krążących we krwi obwodowej [88]. Analiza *in vitro* wykazała, że Treg hamują aktywność cytolityczną komórek NK, produkcję IFN- γ oraz ekspresję NKG2D na komórkach NK w sposób zależny od związanego z błoną TGF- β . Autorzy idąc dalej tym tropem stwierdzili, że komórki NK uzyskane z węzłów chłonnych zajętych przez komórki nowotworowe, wykazywały niewielką właściwość cytolityczną, która zwiększyła się po wyeliminowaniu Treg. Podobne wnioski uzyskano z równoległych badań przeprowadzonych na myszach, które następnie zostały potwierdzone przez prace Smith i wsp. [89].

4.4 Rozpowszechnienie Treg u chorych na nowotwór.

4.4.1 Częstość Treg we krwi obwodowej

W 2001 roku June i wsp. zaobserwowali zwiększoną liczbę Treg u chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca i rakiem jajnika w porównaniu do grupy kontrolnej, którą stanowili zdrowi ochotnicy [90]. Wyniki niektórych badań prowadzonych na szerokim spektrum chorych z procesem nowotworowym zostały przedstawione w tabeli 2. Większość z tych badań potwierdziło znamienne większą liczbę Treg we krwi

obwodowej u chorych z rakiem w porównaniu do grupy kontrolnej. Dotyczyło to chorych na raka piersi [71], odbytnicy [64,91], przełyku [69], żołądka [65, 69], raka pierwotnego wątroby [92], białaczki [93], raka płuca [64, 90], chłoniaki [93-94], czerniaki [63-95], raka jajnika [90] i trzustki [71].

4.4.2 Treg w węzłach chłonnych

Hiura i wsp. wykazali, że komórki Treg były w większości obecne w węzłach chłonnych zajętych przez komórki nowotworowe w porównaniu z węzłami zmienionymi odczynowo [96]. Badanie węzłów chłonnych u zdrowych ludzi jest trudne do zrealizowania ze względów etycznych. Przeprowadzono natomiast wiele badań, w których obliczono liczbę Treg w węzłach w przebiegu choroby nowotworowej (tabela 3). Zwiększony odsetek Treg wykazano wśród limfocytów węzłów chłonnych zajętych przez komórki nowotworowe w porównaniu do węzłów nie objętych procesem chorobowym. Wykazano to w badaniach chorych z rakiem endometrium, żołądka, z czerniakiem a także z chłoniakami nieziarniczymi. Badanie, w którym porównano obecność Treg w węzłach chłonnych u chorych we wczesnym i późnym stadium w przebiegu raka jajnika [68], wykazało znamienne mniejszą ich liczbę w porównaniu do chorych nienowotworowych. W tym przypadku autorzy sugerowali, że wzrost liczby Treg w obrębie guza koreluje ze stopniem zaawansowania choroby, a mniejszy odsetek Treg w węzłach chłonnych wynika z migracji tych komórek w kierunku guza. To spostrzeżenie podkreśliło celowość jednoczesnego badania liczby Treg we wszystkich kompartmentach (tj. we krwi obwodowej, guzie i w węzłach chłonnych), co pozwoliłoby na uwzględnienie mechanizmów migracji Treg między tymi środowiskami.

4.4.3 Treg w guzie

W kilku badaniach stwierdzono obecność komórek Treg wśród limfocytów obecnych w obrębie guza (ang. *tumor infiltrating lymphocytes* – TIL). W niektórych z tych badań poddano ocenie ich aktywność supresorową. Jednak nadal trudno jest jednoznacznie określić rolę jaką odgrywają komórki Treg w mikrośrodowisku guza.

Jeśli Treg działają miejscowo w najbliższym sąsiedztwie guza, to aby zapobiec skutecznej odpowiedzi skierowanej przeciwko niemu wymagana jest ich odpowiednia liczba. Zjawisko to tłumaczy dlaczego obserwuje się wzrost liczby Treg w przypadku progresji guza, jak również w wyższym stopniu zaawansowania choroby [67-69].

Trzy badania prowadzone wśród chorych na raka jajnika potwierdziły związek pomiędzy rokowaniem a liczbą limfocytów w obrębie guza [68, 78, 97]. Pierwsze badanie wykazało znamiennej statystycznie korelację pomiędzy liczbą Treg obecnych w guzie a przeżyciem [68]. Na jego podstawie wysunięto hipotezę, że Treg przyczyniają się do progresji choroby. Nie wykluczone jest również, że zwiększona liczba Treg w obrębie guza jest raczej konsekwencją niż przyczyną postępu choroby nowotworowej. W innym badaniu nie wykazano istotnego statystycznie związku pomiędzy liczbą Treg w guzie a gorszym rokowaniem, natomiast zauważono, iż lepsze rokowanie wiąże się z większą liczbą limfocytów T CD8⁺ oraz zwiększonym odsetkiem CD8⁺ w porównaniu z CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ [78].

W kolejnym badaniu, w którym zmierzono ekspresję czynnika transkrypcyjnego FoxP3 przy użyciu RT-PCR u 99 chorych z rakiem jajnika, wykazano że jego poziom jest czynnikiem prognostycznym czasu całkowitego przeżycia [97].

Dwa inne badania również wykazały, że liczba Treg koreluje z progresją choroby. Sasada i wsp. pogrupował chorych z rakiem żołądka, na podstawie odsetka Treg (CD4⁺CD25⁺) spośród całej populacji limfocytów CD4 we krwi obwodowej, na 3 grupy: niską < 40%; średnią 40-50% oraz wysoką > 50%. Chorzy spełniający kryterium grupy „wysokiej” żyli krócej w porównaniu do grupy „niskiej” (p=0,007). Roncador i wsp. zbadał ekspresję FoxP3 w chłoniakach z komórek T [98]. Obecność czynnika wykazano tylko w komórkach dojrzałych chłoniaków T-limfoblastycznych (17/25 przebadanych chorych wykazało ekspresję FoxP3) i chociaż nie wykazano istotności statystycznej, to zaobserwowano trend pomiędzy zwiększoną ekspresją czynnika FoxP3 a gorszym rokowaniem.

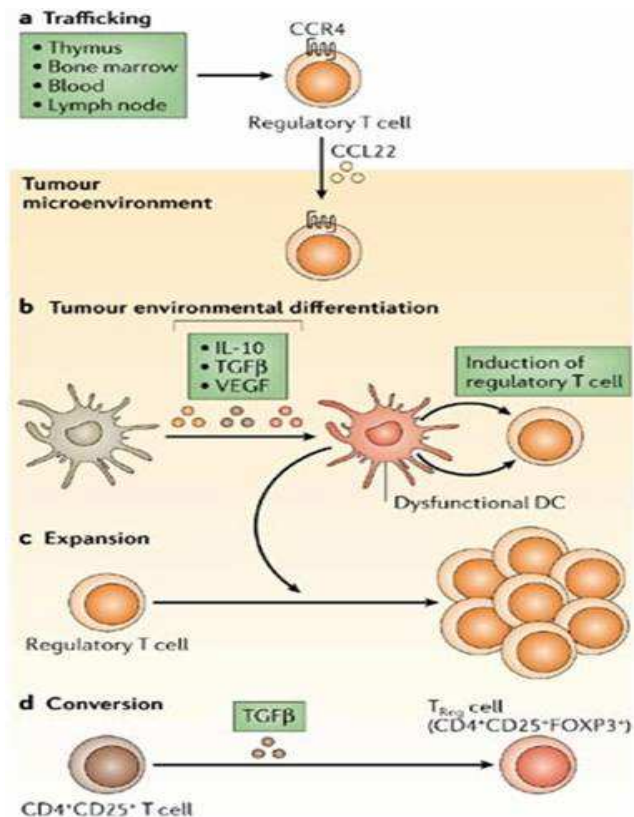
Obecność komórek FoxP3⁺ w kombinacji z komórkami wykazującymi ekspresję ziaren cytotoksycznych wiązała się z niekorzystnym rokowaniem u chorych na ziarnicę złośliwą [99]. W badaniu prowadzonym u chorych na nowotwory głowy i szyi wykazano, że zwiększony odsetek komórek CD4⁺CD69⁺ korelował z lepszą kontrolą miejscową i regionalną oraz lepszym rokowaniem [77]. Zaskakująco wysoki odsetek komórek FoxP3⁺ wiązał się również z lepszą kontrolą loko-regionalną [99]. Dane te pozostają w sprzeczności z wynikami uzyskanymi w badaniach, o których wspomniano wyżej.

Ponadto obecność Treg wykazano w płynie z puchliny brzusznej oraz z jamy opłucnowej. Liczba Treg była znamiennej statystycznie wyższa w płynie w przebiegu choroby nowotworowej w porównaniu z grupą kontrolną [68, 100].

4.5 Wpływ guza na Treg.

Badania przedstawione powyżej, wykazały wysoki odsetek Treg w obrębie limfocytów wewnątrz guza (TIL). Jaką rolę odgrywają te komórki w mikrośrodowisku guza opisano wyżej. W tym miejscu zostaną przedstawione wyniki badań skupiające się na oddziaływaniu guza na komórki Treg (Ryc. 3). Udowodniono, że guzy nie tylko przyciągają Treg w swoim kierunku, ale także poprzez produkcję cytokin, powodują ich miejscową ekspansję. Dwa badania, jedno dotyczące nowotworów jajnika, drugie chłoniaków nieziarnicznych wykazały, że komórki nowotworowe produkują chemokinę CCL22, która poprzez receptor CCR4 obecny na Treg przyciąga je w kierunku utkania nowotworu [68, 73]. W badaniach nad nowotworami jajnika wykazano, że chemokina CCL22 jest produkowana nie tylko przez komórki nowotworowe, a także przez makrofagi znajdujące się w płynie z jamy otrzewnowej [68]. Dodatkowo w tych badaniach wykorzystano szczep myszy NOD/SCID by wykazać, że podanie przeciwciał skierowanych przeciwko chemokinie CCL22 w warunkach *in vivo* hamuje migrację Treg do przeszczepionego nowotworu.

Ryc. 3 Komórki Treg w mikrośrodowisku guza.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Dostępne dane sugerują, że TGF β również wpływa na proliferację oraz aktywność Treg [101-102]. Badanie z użyciem modelu guza zwierzęcego wykazało, że ekspozycja niedojrzałych mieloidalnych komórek dendrytycznych na komórki nowotworowe lub rozpuszczone czynniki produkowane przez te komórki, wpływa na produkcję TGF β , który z kolei stymuluje ekspansję Treg oraz zwiększa ich aktywność *in vivo* [103]. Analiza tych mechanizmów wzajemnego oddziaływania umożliwia zidentyfikowanie czynników związanych z guzem, które promują proliferację Treg. Zablokowanie tych czynników zmniejszy odsetek i zahamuje aktywność Treg w mikrośrodowisku guza co może stać się podstawą nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej.

5. Treg a immunoterapia nowotworów.

Badania na zwierzętach wykazały, że usunięcie komórek CD25⁺ wzmaga odpowiedź immunologiczną indukowaną przez komórki nowotworowe lub pobudzone antygenem komórki dendrytyczne. Zmniejszenie liczby tych komórek w mikrośrodowisku guza powoduje odrzucenie linii komórek nowotworowych pośrednio poprzez uwalniane mediatory immunologiczne [104-106]. Iniekcje bezpośrednio do guza swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko CD4 powodowało jego regresję [107]. W badaniu, w którym użyto różnych linii komórek nowotworowych, wynikiem jednorazowego usunięcia komórek CD25⁺ z wnętrza guza, było zahamowanie jego wzrostu, z kolei wielokrotnie powtarzane eliminacje tych komórek powodowało opóźnienie progresji choroby [108]. Potencjalnym problemem związanym z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko CD25 jest równoczesne wyeliminowanie komórek efektorowych CD25⁺, co może zniweczyć korzystny efekt wynikający z usunięcia Treg. Inne efektywne podejście, badane na modelu zwierzęcym polega na zastosowaniu cyklofosfamidu. Podanie cyklofosfamidu w połączeniu ze szczepionką opartą na komórkach nowotworowych prowadzi do regresji wszczepionego guza u szczurów [109]. W ostatnio prowadzonych badaniach stwierdzono, że zastosowanie cyklofosfamidu w połączeniu z egzosomami pochodzącymi z komórek guza również powodowało jego odrzucenie [110].

Inną strategią leczenia guza jest adoptywna immunoterapia z użyciem limfocytów T. Dodatkowe podanie limfocytów T swoistych dla antygenów melanocytów prowadziło do regresji czerniaka u uprzednio poddanych radioterapii myszy. Natomiast jednoczesne podanie z tymi limfocytami komórek Treg hamowało ten efekt [111]. Badania, w których podawano limfocyty pacjentom z czerniakiem wykazały, że istotna jest długość czasu

przeżycia limfocytów T, która koreluje z aktywnością skierowaną przeciwko guzowi [112]. Zatem eliminacja Treg poprzedzająca podanie limfocytów, bądź limfoablacja (zapewniająca miejsce do rozprzestrzeniania i przeżycia podanych komórek) może w przyszłości znacząco zwiększyć skuteczność immunoterapii adoptywnej.

Użyteczność cząsteczki CD25 jako celu terapii eliminującej Treg jest kłopotliwa ponieważ czynnik skierowany przeciwko CD25 (np. przeciwciało skierowane swoiście przeciwko cząsteczce CD25) z długim okresem półtrwania w warunkach *in vivo*, może również eliminować komórki biorące udział w odpowiedzi przeciwko komórkom guza. Denileukin diftitox (Ontak®) [113] jest rekombinowanym białkiem o krótkim okresie półtrwania (60 min), mimo to ma właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek z ekspresją receptora CD25 o wysokim powinowactwie. Preparat ten jest fuzją białka stanowiącego część łańcucha IL-2 z fragmentami A i B toksyny błonnicy i został wprowadzony do leczenia chorych ze skórną postacią chłoniaka z komórek T przynosząc obiecujące rezultaty i akceptowalną toksyczność. Wstępne wyniki zaprezentowane w 2005 roku pokazały zmniejszenie odsetka komórek z ekspresją CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ we krwi obwodowej w grupie 8 chorych, któremu towarzyszył wzrost proliferujących i produkujących INF- γ komórek we krwi obwodowej. Danuall i wsp. ostatnio doniósł, że pojedyncze dawki denileukin diftitox selektywnie eliminują Treg (mierzone spadkiem limfocytów T CD4⁺CD25^{high} *in vivo* oraz brakiem aktywności supresorowej), co poprawiło odpowiedź po podaniu szczepionki z komórkami dendrytycznymi z wszczepionym fragmentem RNA guza u chorych z rakiem nerki w porównaniu do chorych, którzy otrzymywali tylko szczepionkę [114]. Pomimo tych obiecujących danych ostatnie doniesienia wskazują, że terapia chorych nowotworowych (12 z rozsianym czerniakiem oraz 1 z zaawansowanym rakiem nerki) oparta na denileukin diftitox nie zmniejsza liczby ani nie upośledza funkcji Treg we krwi obwodowej [115]. W tych badaniach używano różnych schematów terapeutycznych i stąd potrzebne są kolejne, żeby wytłumaczyć rozbieżność uzyskanych wyników.

Zastosowanie terapii opartych na środkach celujących w receptor dla IL-2, podobnie jak, co potwierdziły badania prowadzone na myszach, małe dawki leków immunosupresyjnych tj. cyklofosfamid, redukowały liczbę oraz upośledzały funkcję Treg, co pozwalało na rozwinięcie się odpowiedzi przeciwko guzowi. Istotnym z punktu widzenia praktyki klinicznej jest wyjaśnienie czy zastosowanie cyklofosfamidu stanowi użyteczną metodę w hamowaniu Treg i stymulowaniu odpowiedzi immunologicznej przeciwko guzowi u chorych nowotworowych. Terapie z zastosowaniem fludarabiny

wydają się być obiecujące. Zarówno liczba jak i właściwości supresorowe komórek Treg zostały znamienne zredukowane u chorych z przewlekłą białaczką limfatyczną (CLL - ang. *chronic lymphocytic leukemia*) po zastosowaniu terapii z fludarabiną, co wskazuje, że limfocyty Treg są bardziej wrażliwe na fludarabinę niż inne subpopulacje limfocytów T [67]. Zmniejszanie się guza było również obserwowane u chorych z czerniakiem, którym podano swoiste dla guza limfocyty T po chemioterapii, w skład której wchodziła fludarabina [116]. Inne możliwości inaktywacji Treg to terapie celowane skierowane przeciwko cząsteczkom powierzchniowym znajdującym się na Treg (GITR, B7-H1) lub przeciwko cytokinom/chemokinom, które mają wpływ na przeżycie, ekspansję oraz migrację Treg (TGF- β , IL-2, CCL22).

Obecnie jest wiele przekonujących dowodów potwierdzających hipotezę, że Treg mogą hamować odpowiedź układu immunologicznego skierowaną przeciwko guzowi i umożliwiać jego progresję. Żeby wykorzystać te dane w terapii raka, będzie konieczne poszerzenie aktualnej wiedzy w zakresie swoistości Treg oraz tych typów odpowiedzi immunologicznej, które podlegają supresji ze strony tych komórek. Pozwoli to upewnić się, że strategie immunoterapeutyczne, włączając w to usunięcie Treg z mikrośrodowiska guza, uaktywni tylko tę część odpowiedzi immunologicznych, które będą hamowały a nie stymulowały wzrost guza.

Tabela 2. Treg jako % komórek CD4⁺ we krwi obwodowej

Kryterium Treg	Typ nowotworu	liczebność grupy	Treg (% z populacji CD4 ⁺)	Statystyka	Piśmien-nictwo	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Grupa kontrolna	n=16	8,9±3,5			
	Rak żołądka	n=20	18,2±4,1	p<0,05	[69]	
	Rak przełyku	n=10	26,5±4,9	p<0,05		
	Grupa kontrolna	n=10	26,5±4,7			
	Rak żołądka	n=55	43,7±12,7	p=4x10 ⁻⁹	[65]	
	Rak jelita grubego	n=48	39,7±11,3	p=9 x10 ⁻⁷		
	Rak trzustki	n=13	44,0±9,0	p=9 x10 ⁻⁶		
Rak przełyku	n=17	47,0±9,8	p=1 x10 ⁻⁷			
Rak wątroby	n=16	42,1±14,7	p=9x10 ⁻⁴			
Grupa kontrolna	n=7	12 (2-8)				
Rak płuca	n=9	33 (10-60)		brak danych	[70]	
Grupa kontrolna	n=35	9 (2-17)				
Rak piersi	n=35	17 (3-30)		p<0,01	[71]	
Rak trzustki	n=30	13 (4-35)		p<0,01		
Grupa kontrolna	n=4	12,5±3,9				
Ziarnica złośliwa	n=9	13,5±4,2		p=0,71	[94]	
CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Grupa kontrolna	n=14	9,1			
	Czerniak	n=20	14,7	p=0,007	[63]	
	Grupa kontrolna	n=15	2±0,5			
	Ostra białaczka szpikowa	n=36	4,8±1,8	p<0,0001	[62]	
	Grupa kontrolna	n=48	9,2 (1,6-30,2)			
Rak wątroby	n=25	7,2 (1,2-23,3)		p=0,895	[66]	
Grupa kontrolna	n=34	4,7±0,5				
Raki płaskonabłonkowe	n=42	12,5±0,9		p<0,001	[64]	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	Grupa kontrolna	n=42	4,5±1,1			
	Przewlekła białaczka limfatyczna z komórek B	n=73	10,4±4,4	p<0,001	[67]	
	Grupa kontrolna	MD	5,8±1,7			
Czerniak	n=13	4,9±1,9		p<0,37	[95]	
Grupa kontrolna	n=17	5,4±2,7				
Nowotwory głowy i szyi	n=24	10,1±4,7		p<0,04 p<0,0008	[117]	

Tabela 3. T reg jako % komórek CD4⁺ w obrębie węzłów chłonnych

Kryterium Treg	Grupy węzłów chłonnych	Liczba	Treg % z komórek CD4 ⁺	Statystyka	Piśmien-nictwo
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Trzustkowe/pierś	n=20	20		[71]
	Chłoniak Hodgkina	n=6	35.8±16.6		[94]
	Szyjka macicy	n=13	4.2±1.4 N1TDLN 3.8±1.0 N2TDLN	nieistotne	[118]
	Endometrium	n=26	2.5±0.9 N1TDLN 1.8±0.9 N2TDLN	p<0.2	
	Kontrola Rak jajnika stopień 1 Rak jajnika stopień 2 Rak jajnika stopień 3/4	n=8 n=6 n=5 n=25	8 5 5 1	p<0.01 ¹ p<0.01 ²	[68]
CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Węzły chłonne krezkowe – kontrola	n=44	1.2±0.3	p<0.05 ³ p<0.01 ⁴ p<0.02 ⁵	[72]
	Rak żołądka wczesne stadium	n=31	3.3±0.3 N1LN		
		n=13	2.4±0.3 N2LN		
	Rak żołądka późne stadium	n=13 n=23	3.3±0.2 N1LN 3.3±0.2 N2LN		
CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺	Wolne od nowotworu węzły chłonne – kontrola	n=6	6 (2-9)	p<0.001	[73]
	Chłoniak nieziarniczny	n=10	17 (6-43)		
CD4 ⁺ CD25 ^{+/high} FoxP3 ⁺	Wolne od nowotworu węzły chłonne – kontrola	n=16	6.2±4.2	p<0.0006	[95]
	Czerniak	n=13	11.06±1.7		

¹ W węzłach chłonnych pochodzących od grupy kontrolnej znaleziono więcej komórek T reg w porównaniu z chorymi na raka jajnika.

² W węzłach chłonnych od pacjentów z niższym stopniem zaawansowania raka jajnika stwierdzono więcej T reg w porównaniu ze stadiami bardziej zaawansowanymi.

³ Większy odsetek T reg w N1 vs N2 we wczesnym stadium.

⁴Większy odsetek Treg w porównaniu z węzłami chłonnymi krezkowymi.

⁵Większy odsetek T reg w N1 i N2 w chorobie zaawansowanej w porównaniu do krezkowych węzłów chłonnych.

CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie rozpowszechnienia komórek T regulatorowych (Treg) w nowotworowych i nienowotworowych wysiękach opłucnowych oraz ocena zależności między tym rozpowszechnieniem i wybranymi parametrami stanu klinicznego chorych.

Cel ten realizowano poprzez:

1. Ocena różnic w zakresie odsetka limfocytów, komórek CD4⁺, CD4⁺/CD25⁺ i Treg między wysiękami nienowotworowymi i płynami wysiękowymi powstałymi w przebiegu choroby nowotworowej.
2. Ocena zależności między odsetkiem komórek Treg i odsetkiem limfocytów oraz ich subpopulacji.
3. Określenie zależności między rozpowszechnieniem Treg a płcią, stanem sprawności i cechami określającymi stopień zaawansowania choroby nowotworowej.
4. Ocena wartości prognostycznej i predykcyjnej rozpowszechnienia Treg z uwzględnieniem wielu zmiennych (liczba narządów objętych przerzutami odległymi, wiek chorych w momencie badania i stan sprawności).

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

1. Materiał

1.1 Chorzy

Badaniem typu „*case control study*” objęto grupę 76 dorosłych chorych hospitalizowanych w Oddziale Pulmonologii i Onkologii Pulmonologicznej przy Katedrze i Klinice Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Badanie rozpoczęto w roku 2007 i zakończono w maju 2010 roku. Pacjenci przed przystąpieniem do badania zostali poinformowani o celu pracy i wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

1.2 Kryteria włączenia i wyłączenia z badania

Kryteria włączenia:

1. Rozpoznanie raka płuca z obecnością wysięku w jamie opłucnowej.
2. Zapalenie jamy opłucnowej z obecnością wysięku.
3. Wiek powyżej 18 roku życia.

Kryteria wyłączenia:

1. W wywiadzie: inne choroby nowotworowe, choroby autoimmunizacyjne, alergie.
2. Rak płuca w trakcie leczenia cytotoksycznego.
3. Przeciwwskazania do wykonania nakłucia jamy opłucnowej.
4. Brak zgody pacjenta.

1.3. Charakterystyka przebadanych wysięków opłucnowych

Wysięki opłucnowe podzielono na 3 grupy w oparciu o badanie cytologiczne. Wyniki badań cytologicznych były konfrontowane z wynikami badań histopatologicznych materiału uzyskanego drogą bronchofiberoskopii oraz danymi klinicznymi. Charakterystykę materiału biologicznego przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Zestawienie przebadanych wysięków opłucnowych,

Wysięki	Liczba przypadków
I. Wysięki uzyskane od osób z chorobą nowotworową zawierające komórki nowotworowe Rak gruczołowy oskrzela	30
II. Wysięki uzyskane od osób z chorobą nowotworową nie zawierające komórek nowotworowych Rak gruczołowy oskrzela	21
III. Wysięki nienowotworowe	25

2. Metody

2.1. Badania laboratoryjne

2.1.1. Badania cytologiczne

Wysięki opłucnowe wirowano z prędkością 1000 obr/min. przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Z uzyskanego osadu wykonywano rozmaz na szkiełku podstawowym. Rozmazy utrwalano przez 10 min. w mieszaninie 95% alkoholu etylowego i eteru w stosunku objętościowym 1:1, po czym barwiono hematoksyliną i eozyną. Uzyskane preparaty poddawano ocenie cytologicznej pod kątem obecności komórek nowotworowych.

2.1.2. Badania cytometryczne: oznaczanie komórek T regulatorowych w wysiękach opłucnowych.

Na dno probówek wprowadzano po 5 μ l przeciwciał anti-CD4 oraz anti-CD25. Dodawano 100 μ l zawiesiny komórek (ok. 5×10^5) na probówkę, mieszano i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Płukano przy pomocy 2 ml buforu płuczącego,

wirowano przez 10 minut przy 250 x g a następnie usuwano supernatant. Komórki utrwalano przy pomocy 2 ml buforu utrwalającego. W celu usunięcia buforu utrwalającego, komórki wirowano przez 5 minut przy 500 x g. Po utrwaleniu komórki zawieszano w PBS, wirowano przez 5 minut przy 500 x g a następnie usuwano supernatant. Permeabilizację błon komórkowych przeprowadzono z użyciem 0.5 ml buforu permeabilizującego w czasie 30 min. inkubacji w temperaturze pokojowej. Po permeabilizacji komórki dwukrotnie płukano w PBS. Reakcję cytoplazmatyczną przeprowadzono z zastosowaniem 5 µl przeciwciał przeciw FoxP3 w czasie 30 min. inkubacji w temperaturze pokojowej. Po tym czasie komórki były dwukrotnie płukane w 2 ml PBS i wirowane przez 5 minut przy 500 x g w temperaturze pokojowej. Po przeprowadzeniu reakcji immunocytochemicznych komórki zawieszano w 0,5 ml PBS. Wszystkie etapy reakcji immunocytochemicznej przeprowadzono bez dostępu światła. Akwizycję danych (20 000 komórek) przeprowadzono przy pomocy cytometru przepływowego FACS Canto (BD). Sposób analizy danych przedstawia ryc. 4. W obrębie wszystkich komórek materiału biologicznego bramkowano limfocyty (P1), komórki FoxP3⁺ (P2) oraz komórki CD4⁺CD25⁺ (P3). Odsetek komórek T regulatorowych stanowił iloczyn logiczny bramek P2 i P3.

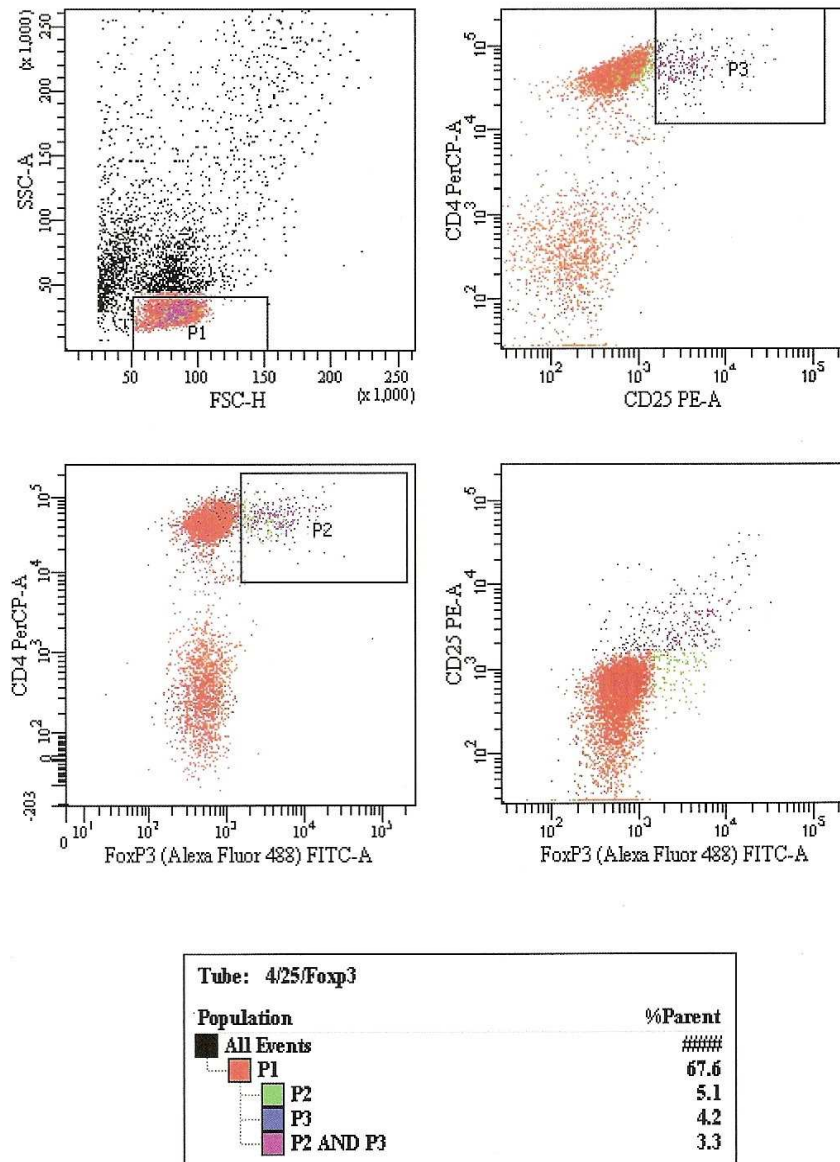
2.2. Badania kliniczne

Przeprowadzono wywiad, badanie przedmiotowe z określeniem stanu sprawności chorych (PS –*ang. performance status*), torakocentezę oraz ocenę stanu zaawansowania choroby nowotworowej.

2.2.1. Wywiad chorobowy i badanie przedmiotowe

Badanie podmiotowe i przedmiotowe przeprowadzono standardowo zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami. W trakcie badania przedmiotowego przeprowadzono ocenę stanu sprawności chorego wg skali Zubroda przyjętej przez WHO (*ang. World Health Organization*) i ECOG (*ang. Eastern Cooperative Oncology Group*) – tabela 5 [119].

FACSDiva Version 6.1.2



Ryc. 4. Przykład oceny odsetka komórek T regulatorowych w obrębie limfocytów nowotworowego wysięku opłucnowego.

2.2.2. Torakocenteza

Torakocenteza to inwazyjna procedura polegająca na wprowadzeniu igły, kaniuli lub trokaru do jamy opłucnowej w celu usunięcia zgromadzonego w niej płynu lub powietrza. Przed wykonaniem nakłucia chory został poinformowany o celu i sposobie wykonania zabiegu. Bezpośrednio przed zabiegiem lokalizację płynu i określenie miejsca nakłucia potwierdzano za pomocą badania USG. Nakłucie wykonywano w warunkach jałowych. Wstępną procedurą było znieczulenie skóry i opłucnej ściennej za pomocą roztworu 1% lignokainy. Następnie po kilku minutach dokonywano nakłucia we wcześniej określonej przestrzeni międzyżebrowej po górnej krawędzi żebra przy użyciu igły wchodzącej w skład specjalnego zestawu do torakocentezy, stale aspirując. Do badania pobierano 50ml płynu do próbówki z dodatkiem 2 ml heparyny niefrakcjonowanej. Płyn do momentu przekazania go do pracowni cytometrii przechowywano w temperaturze 2-8°C.

2.2.3. Ocena stopnia zaawansowania procesu nowotworowego.

Oceny stopnia zaawansowania dokonano na podstawie najnowszej tj. VII edycji klasyfikacji TNM dla raka płuca, wydanej pod auspicjami Międzynarodowego Towarzystwa do Badań nad Rakiem Płuca (IASLC – *ang. International Association for the Study of Lung Cancer*). Określenie zaawansowania raka płuca obejmuje stan guza pierwotnego (cecha T), regionalnych węzłów chłonnych (cecha N) i narządów, w których mogą występować przerzuty (cecha M). W odniesieniu do guza pierwotnego określa się jego wielkość, lokalizację oraz stosunek do okolicznych struktur anatomicznych (ściana klatki piersiowej, opłucna, przepona, serce, duże naczynia, przetyk). Badania, które wykorzystywano do tego celu przedstawiono w tabeli 6. Łączna ocena cechy T, N i M (tabela 7) pozwala na określenie stopnia zaawansowania zarówno niedrobnokomórkowego, jak i drobnokomórkowego raka płuca (tabela 8) [120].

3. Analiza statystyczna

Cechy ilościowe w badanym materiale charakteryzowane były przez podanie wartości: średniej, mediany, minimalnej, maksymalnej, odchylenia standardowego i 95%

przedziału ufności. Cechy te w większości nie miały rozkładu normalnego, wskutek czego do weryfikacji hipotez statystycznych użyte zostały narzędzia nieparametryczne:

- test Manna-Whitneya – do weryfikacji różnicy między dwiema grupami,
- test Kruskala-Wallisa – do weryfikacji różnic pomiędzy więcej niż dwiema grupami,
- współczynnik korelacji rang Spearmana i test jego istotności – do oceny współzależności pomiędzy dwiema cechami ilościowymi lub wyrażonymi w skali porządkowej.

Wykonana została analiza regresji wielorakiej w celu opracowania modelu pozwalającego oszacować czas przeżycia na podstawie kilku cech niezależnych.

Analiza przeżycia Kaplana-Meiera pozwoliła stworzyć krzywe przeżycia w zależności od przedziału wartości odsetka Treg.

Za istotne statystycznie przyjęte zostały wyniki, których poziom istotności p był niewiekszy od 0,05.

Obliczenia wykonane zostały przy użyciu programu STATISTICA firmy StatSoft.

4. Zgody na udział w badaniu

Badanie przeprowadzono po uzyskaniu pisemnej świadomej zgody od pacjenta. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 456/09).

Tabela 5. Skala Zubroda przyjęta przez WHO i ECOG.

Stopień	ECOG
0	Pełna aktywność, zdolność do wykonywania wszystkich czynności sprzed ustalenia rozpoznania bez ograniczeń.
1	Zredukowana aktywność ale pacjent jest zdolny do wykonywania lekkiej pracy.
2	Niezdolność do wykonywania pracy, zdolność do samoobsługi, pacjent spędza w łóżku mniej niż 50% dnia.
3	Bardzo ograniczona zdolność do samoobsługi, konieczna stała pomoc lub hospitalizacja, pacjent spędza w łóżku więcej niż 50% dnia.
4	Całkowita niepełnosprawność, zupełnie niezdolny do samoobsługi, chory obłożnie z powodu objawów choroby nowotworowej.
5	Zgon

Tabela 6. Badania wykonywane w celu oceny zaawansowania raka płuca.

Ocena guza pierwotnego	Ocena węzłów chłonnych	Ocena narządów odległych
Bronchofiberoskopia	Bronchofiberoskopia	USG jamy brzusznej
Rtg klatki piersiowej	TK klatki piersiowej	TK jamy brzusznej
TK klatki piersiowej z użyciem kontrastu	Mediastinoskopia	TK mózgu
	PET	Scyntygrafia kości
		PET

Tabela 7. Klasyfikacja TNM raka płuca

Cecha	Charakterystyka
Guz pierwotny (cecha T)	
Tx	Nie można ocenić guza pierwotnego albo guz rozpoznawany na podstawie stwierdzenia komórek nowotworowych w popłuczynach oskrzelowych, ale niewidoczny radiologicznie lub bronchoskopowi.
T0	Bez cech guza
T1	Guz o największym wymiarze ≤ 3 cm otoczony mięszem płuca lub opłucną trzewną, w bronchofiberoskopii nie nacieka oskrzeli głównych.
T1a	Guz o największym wymiarze ≤ 2 cm
T1b	Guz o największym wymiarze > 2 cm ale ≤ 3 cm
T2	Guz > 3 cm ale ≤ 7 cm lub guz posiadający jedną z następujących cech: <ul style="list-style-type: none"> - naciekający główne oskrzele w odległości ≥ 2cm od ostrogi tchawicy - naciekający opłucną trzewną - guz z towarzyszącą niedodmą lub obturacyjnym zapaleniem płuc sięgającym okolicy wnęki ale nieobejmującym całego płuca.
T2a	Guz o największym wymiarze > 3 cm ale ≤ 5 cm
T2b	Guz o największym wymiarze > 5 cm ale ≤ 7 cm
T3	Guz > 7 cm lub o jednej z następujących cech: <ul style="list-style-type: none"> - naciekający bezpośrednio ścianę klatki piersiowej (w tym guz szczytu płuca), przeponę, nerw przeponowy, opłucną śródpiersiową lub osierdzie - guz oskrzela głównego umiejscowiony w odległości < 2cm od ostrogi tchawicy, ale jej nienaciekający - guz z towarzyszącą niedodmą lub obturacyjnym zapaleniem całego płuca - przerzuty w tym samym płacie płuca.
T4	Guz każdej wielkości o jednej z następujących cech: <ul style="list-style-type: none"> - naciekający śródpiersie, serce, duże naczynia, tchawicę, nerw krtaniowy wsteczny, przełyk, rozwidlenie tchawicy, przełyk lub trzon kręgu - przerzuty w innych płatach płuca po tej samej stronie.

Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych (cecha N)	
Nx	Nie można ocenić regionalnych węzłów chłonnych.
N0	Nie stwierdza się przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.
N1	Przerzuty do węzłów okołoskrzelowych i/lub węzłów wnątkowych po stronie guza lub ich bezpośrednie naciekanie.
N2	Przerzuty do węzłów śródpiersiowych po stronie guza i/lub pod ostrogą tchawicy.
N3	Przerzuty do przeciwległych węzłów wnątkowych i/lub śródpiersiowych. Przerzuty do węzłów mięśni pochyłych i/lub nadobojczykowych po tej samej lub przeciwległej stronie.
Przerzuty odległe (cecha M)	
Mx	Ocena obecności przerzutów odległych jest niemożliwa.
M0	Nie stwierdza się przerzutów odległych
M1a	Odrębne ognisko lub ogniska raka w drugim płucu. Ogniska raka w opłucnej lub wysięk nowotworowy w opłucnej lub osierdziu.
M1b	Stwierdza się przerzuty odległe.

Tabela 8. Stopnie zaawansowania raka płuca.

Stopień	cecha T	cecha N	cecha M
rak utajony	Tx	N0	M0
IA	T1a, T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T1a, T1b, T2a	N1	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a, T1b, T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	dowolny T	N3	M0
IV	dowolny	dowolny	M1a, M1b

WYNIKI

1. Charakterystyka badanej grupy

Do badań zakwalifikowano 76 chorych, w tym 30 kobiet (39,5%) i 46 mężczyzn (60,5%). Chorych podzielono na 3 grupy:

Grupa I – chorzy z rozpoznaniem raka płuca i obecnością komórek nowotworowych w płynie z jamy opłucnowej (n=30)

Grupa II – chorzy z rozpoznaniem raka płuca bez obecności komórek nowotworowych w płynie z jamy opłucnowej (n=21)

Grupa III – grupa kontrolna tj. chorzy z wysiękiem nienowotworowym (n=25).

Ogólną charakterystykę poszczególnych grup przedstawiają zamieszczone niżej tabele.

Tabela 9. Płeć grupy badanej

	Ogółem	Kobiety	Mężczyźni
Grupa I	n = 30	14 (46,7%)	16 (53,3%)
Grupa II	n = 21	9 (42,9%)	12 (57,1%)
Grupa III	n = 25	7 (28%)	18 (72%)

1.1 Charakterystyka grupy I

Tabela 10. Ogólna charakterystyka grupy I

	średnia	95%CI	mediana	minimum	maksimum	SD
Odsetek limfocytów	43,5	32,9-54,1	41,2	1,2	91,1	28,3
Odsetek limfocytów CD4 ⁺	46,5	39,3-53,7	47,2	1,2	81,6	19,4
Odsetek limfocytów CD4 ⁺ CD25 ⁺	17,6	13,9-21,4	18,4	0,9	41,7	10,0
Odsetek limfocytów Treg	2,7	1,9-3,5	2,4	0,0	10,3	2,1
Rozmiar guza [cm]	5,9	5,0-6,7	5,6	2,1	11,2	2,2
Wiek chorego w momencie badania [lata]	62,7	58,9-66,6	62,4	42,9	82,0	10,2
Wiek chorego w momencie zgonu [lata]*	63,6	59,5-67,6	63,4	44,3	82,1	10,3
Czas przeżycia [dni]	173,6	121,9-225,3	171,5	0,0	560,0	138,5

* 27 chorych

Tabela 11. Stan sprawności (PS) wg skali ECOG w grupie I

PS			
1	2	3	4
11 (36,7%)	6 (20,0%)	9 (30,0%)	4 (13,3%)

Tabela 12. Liczba przerzutów odległych w grupie I

Liczba przerzutów odległych				
0	1	2	3	4
8 (26,7%)	13 (43,4%)	7 (23,3%)	1 (3,3%)	1 (3,3%)

1.2 Charakterystyka grupy II

Tabela 13. Ogólna charakterystyka grupy II.

	średnia	95%CI	mediana	minimum	maksimum	SD
Odsetek limfocytów	55,0	41,2-68,8	64,7	8,7	95,0	30,2
Odsetek limfocytów CD4 ⁺	53,3	45,0-61,6	53,7	4,4	80,1	18,2
Odsetek limfocytów CD4 ⁺ CD25 ⁺	18,8	14,1-23,4	20,2	1,3	38,8	10,3
Odsetek limfocytów Treg	2,2	1,1-3,2	1,1	0,1	7,6	2,3
Rozmiar guza [cm]	6,2	5,2-7,1	6,1	2,5	10,3	2,1
Wiek chorego w momencie badania [lata]	62,4	57,1-67,6	60,4	35,0	84,2	11,5
Wiek chorego w momencie zgonu [lata]*	64,9	60,4-69,5	61,3	50,2	84,6	9,5
Czas przeżycia [dni]	170,3	103,1-237,6	137,0	7,0	531,0	147,7

* 19 chorych

Tabela 14. Stan sprawności (PS) wg skali ECOG w grupie II

PS			
1	2	3	4
7 (33,4%)	5 (23,8%)	5 (23,8%)	4 (19,0%)

Tabela 15. Liczba przerzutów odległych w grupie II

Liczba przerzutów odległych				
0	1	2	3	4
3 (14,3%)	6 (28,6%)	7 (33,3%)	5 (23,8%)	0 (0,0%)

1.3 Charakterystyka grupy III

Tabela 16. Ogólna charakterystyka grupy III

	średnia	95%CI	mediana	minimum	maksimum	SD
Odsetek limfocytów	53,4	41,4-65,4	53,3	8,4	98,3	29,0
Odsetek limfocytów CD4 ⁺	47,9	40,5-55,3	52,5	5,1	73,6	18,0
Odsetek limfocytów CD4 ⁺ CD25 ⁺	17,7	11,5-23,9	14,4	1,5	62,6	15,0
Odsetek limfocytów Treg	1,1	0,8-1,4	1,0	0,1	2,6	0,8
Wiek chorego w momencie badania [lata]	58,8	53,2-64,4	61,0	32,3	81,1	13,5

2. Limfocyty w wysiękach opłucnowych

W badaniach cytometrycznych komórek wysięków opłucnowych oceniano odsetek limfocytów, komórek CD4⁺, komórek CD4⁺CD25⁺ oraz limfocytów Treg identyfikowanych na podstawie obecności CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺.

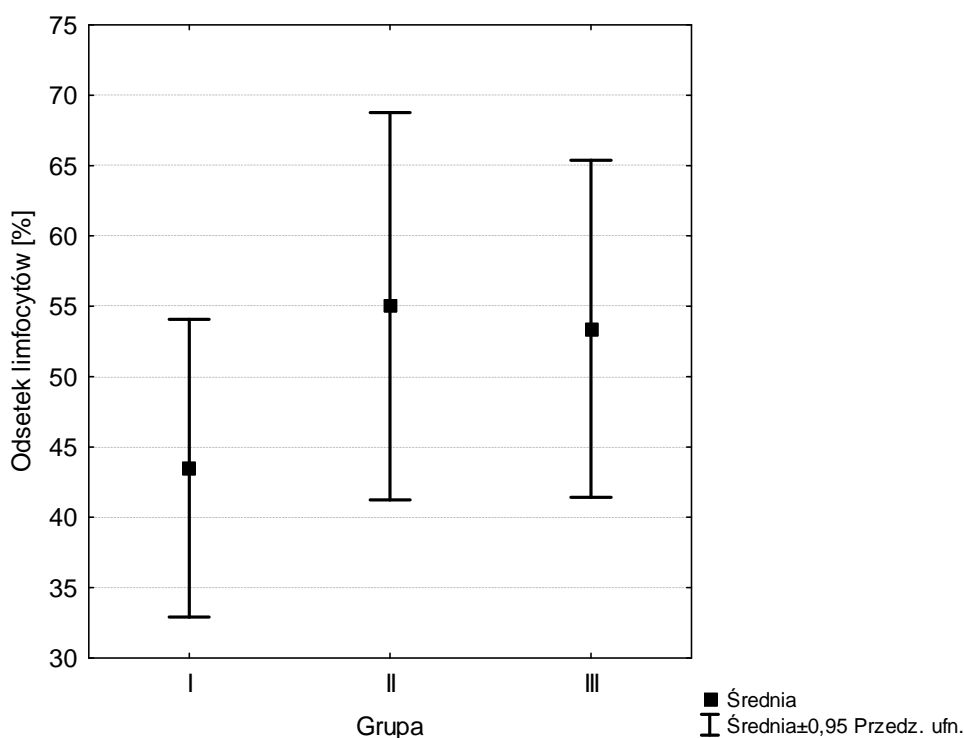
2.1 Odsetek limfocytów w wysiękach opłucnowych

W tabeli 17 oraz na rycinie 5 przedstawiono wyniki badań w zakresie oceny odsetka limfocytów w poszczególnych grupach chorych.

Tabela 17. Różnice pomiędzy trzema grupami w zakresie odsetka limfocytów.

Grupa	N	Odsetek limfocytów				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
I	30	43,48	41,15	1,20	91,10	28,34
II	21	55,00	64,70	8,70	95,00	30,23
III	25	53,40	53,30	8,40	98,30	29,05

Ryc. 5. Odsetek limfocytów w grupach I, II, III.



Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w zakresie odsetka limfocytów między poszczególnymi grupami chorych (test Kruskala-Wallisa; $p=0,219$)

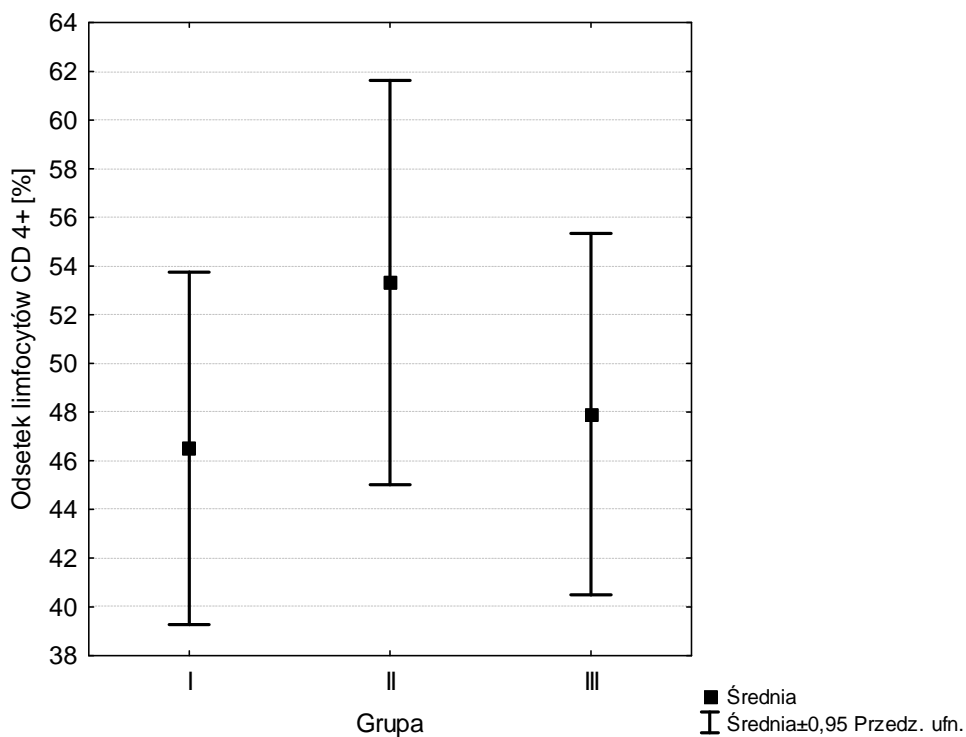
2.2 Odsetek limfocytów CD4⁺

W tabeli 18 oraz na rycinie 6 przedstawiono wyniki badań w zakresie odsetka komórek CD4⁺ w poszczególnych grupach chorych.

Tabela 18. Różnice pomiędzy trzema grupami w zakresie odsetka limfocytów CD4⁺

Grupa	N	Odsetek limfocytów CD4 ⁺				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
I	30	46,51	47,20	1,20	81,60	19,37
II	21	53,32	53,70	4,40	80,10	18,24
III	25	47,92	52,50	5,10	73,60	17,97

Ryc.6. Odsetek limfocytów CD4⁺ w grupach I, II, III.



Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w zakresie odsetka limfocytów CD4⁺ między poszczególnymi grupami chorych (test Kruskala-Wallisa; p=0,392).

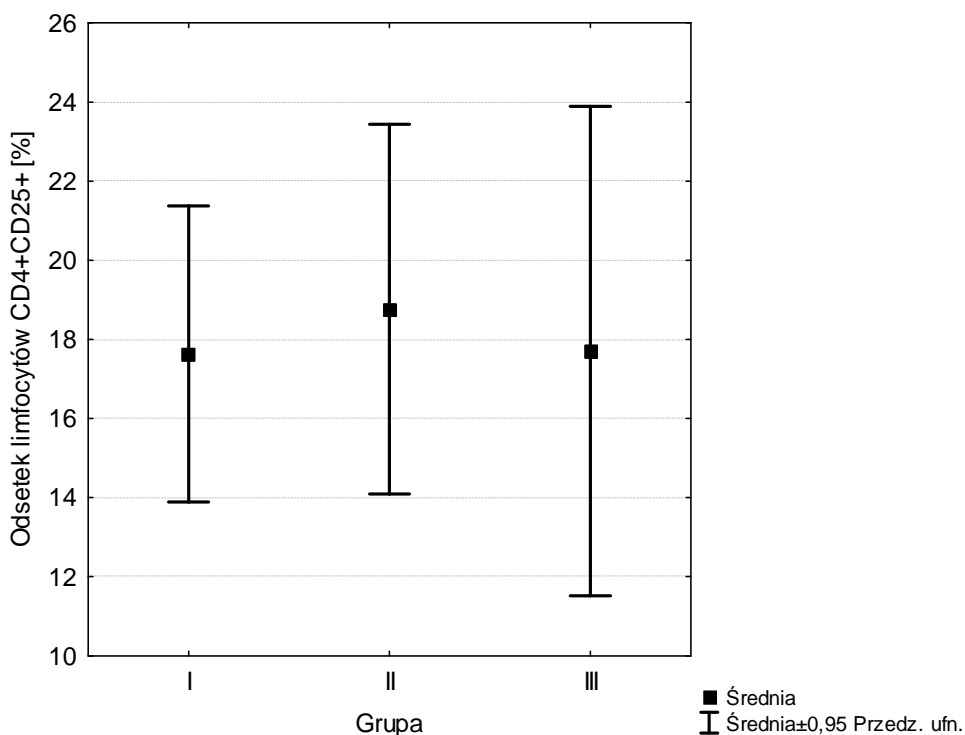
2.3 Odsetek limfocyty CD4⁺CD25⁺

W tabeli 19 oraz na rycinie 7 przedstawiono wyniki badań w zakresie odsetka komórek CD4⁺CD25⁺ w poszczególnych grupach chorych.

Tabela 19. Różnice pomiędzy trzema grupami w zakresie odsetka limfocytów CD4⁺CD25⁺.

Grupa	N	Odsetek limfocytów CD4 ⁺ CD25 ⁺				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
I	30	17,63	18,35	0,90	41,70	10,02
II	21	18,76	20,20	1,30	38,80	10,27
III	25	17,71	14,40	1,50	62,60	14,98

Ryc. 7. Odsetek limfocytów CD4⁺CD25⁺ w grupach I, II, III.



Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w zakresie odsetka limfocytów CD4⁺CD25⁺ między poszczególnymi grupami chorych (test Kruskala-Wallisa; p=0,701).

2.4 Odsetek komórek Treg

W tabelach 20 i 21 oraz rycinie 8 przedstawiono wyniki badań w zakresie oceny rozpowszechnienia komórek Treg w poszczególnych grupach chorych.

Tabela 20. Rozpowszechnienie Treg w poszczególnych grupach chorych.

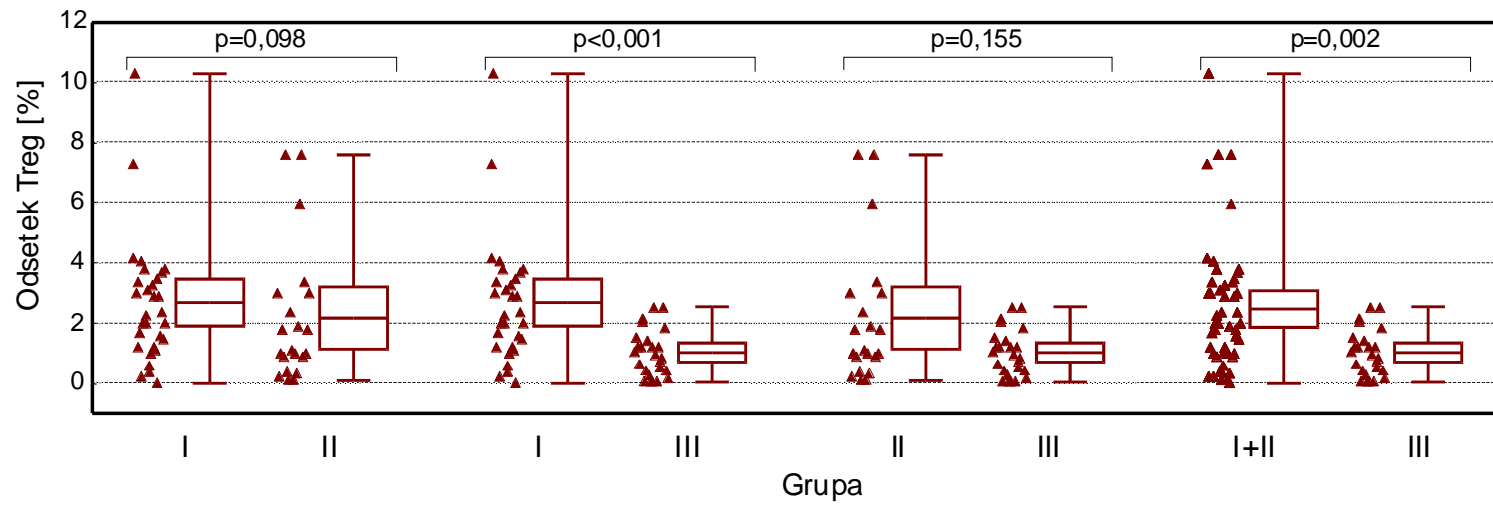
Grupa	n	Odsetek Treg					
		średnia	95%CI	mediana	minimum	maks.	SD
I	30	2,68	1,90-3,46	2,35	0,00	10,30	2,09
II	21	2,17	1,13-3,21	1,10	0,10	7,60	2,29
I+II	51	2,47	1,86-3,08	2,00	0,00	10,30	2,17
III	25	1,07	0,75-1,39	1,00	0,10	2,60	0,78

Tabela 21. Poziom istotności różnic między grupami w zakresie średniej wartości odsetka Treg.

Poziom istotności różnic między grupami (test Manna-Whitneya)			
I vs. II	I vs. III	II vs. III	I+II vs. III
p = 0,098	p < 0,001	p = 0,155	p = 0,002

Stwierdzono istotnie wyższe wartości odsetkowe limfocytów Treg w grupie chorych z rakiem płuca z obecnością komórek nowotworowych w wysięku nowotworowym w jamie opłucnowej (grupa I) w porównaniu z grupą kontrolną tj. grupą III (test Manna-Whitneya; **p<0,001**) oraz w grupie chorych z rozpoznaniem raka niezależnie od obecności bądź braku komórek nowotworowych w wysięku (tj. łącznie grupy I+II) w porównaniu z grupą kontrolną (test Manna-Whitneya; **p=0,002**).

Ryc. 8. Różnice w zakresie odsetka T reg między grupami I vs II, I vs III, II vs III, I+II vs III



[Na rycinie zaznaczono średnią, 95% przedział ufności oraz wartości maksymalną i minimalną].

2.4.1 Ocena zależności między odsetkiem komórek Treg i odsetkiem limfocytów oraz ich subpopulacji.

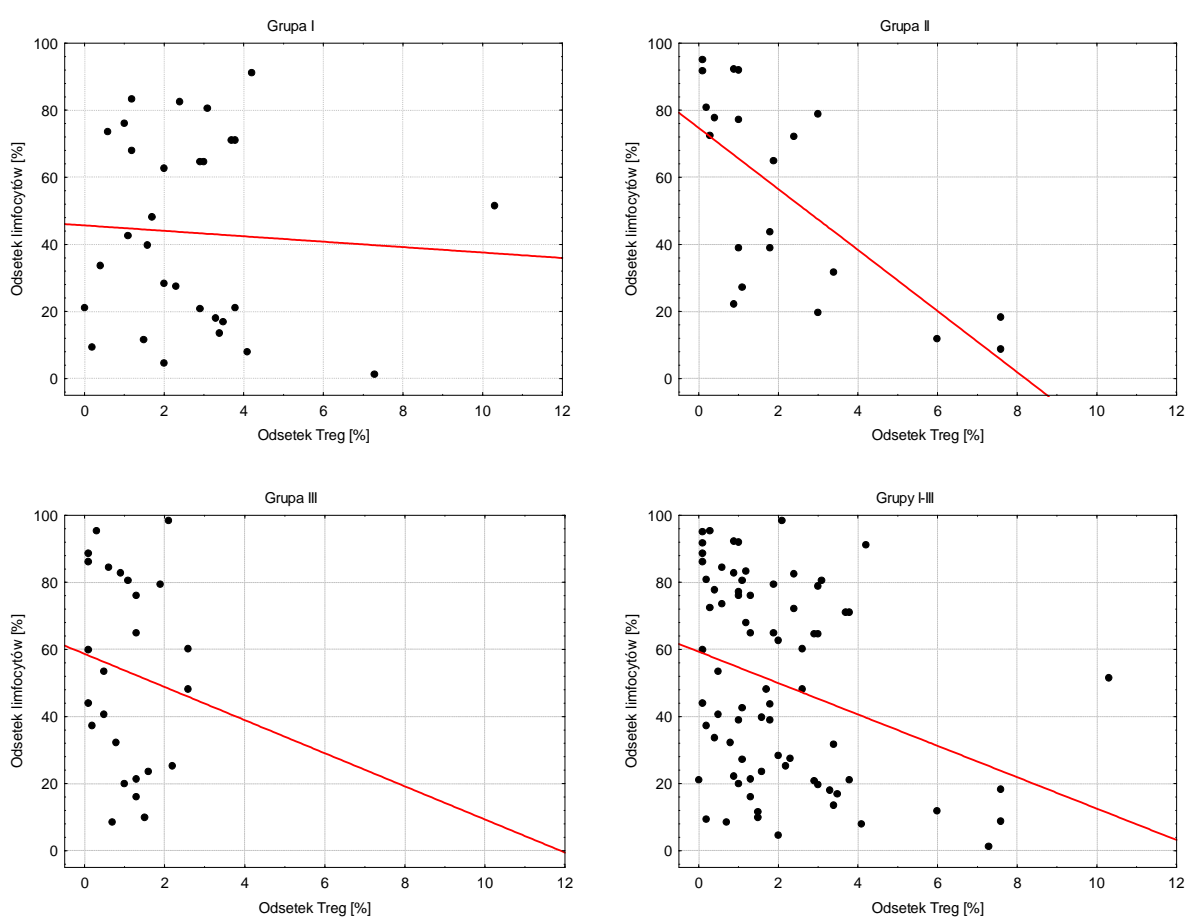
Przeprowadzono ocenę zależności między odsetkiem komórek Treg i odsetkiem limfocytów, komórek CD4⁺, komórek CD4⁺CD25⁺ w wysiękach opłucnowych.

Tabela 22. Zależność między odsetkiem Treg a odsetkiem limfocytów i ich subpopulacji.

	Grupa I	Grupa II	Grupa III	Wszyscy
Treg a limfocyty	$r_s = -0,076$ ($p = 0,689$)	$r_s = -0,729$ ($p < \mathbf{0,001}$)	$r_s = -0,200$ ($p = 0,339$)	$r_s = -0,333$ ($p = \mathbf{0,003}$)
Treg a limfocyty CD4 ⁺	$r_s = 0,111$ ($p = 0,559$)	$r_s = -0,092$ ($p = 0,692$)	$r_s = 0,508$ ($p = \mathbf{0,010}$)	$r_s = 0,134$ ($p = 0,247$)
Treg a limfocyty CD4 ⁺ CD25 ⁺	$r_s = 0,239$ ($p = 0,203$)	$r_s = 0,368$ ($p = 0,101$)	$r_s = 0,458$ ($p = \mathbf{0,021}$)	$r_s = 0,371$ ($p = \mathbf{0,001}$)

Stwierdzono negatywną korelację między odsetkiem Treg i odsetkiem wszystkich limfocytów w każdej z badanych grup chorych, tzn. wzrost odsetka Treg był związany ze spadkiem odsetka limfocytów. Zależność ta była statystycznie znamiennej w grupie II ($r_s = -0,729$; $p < 0,001$) oraz wtedy gdy oceniano wszystkich badanych łącznie ($r_s = -0,333$; $p = 0,003$).

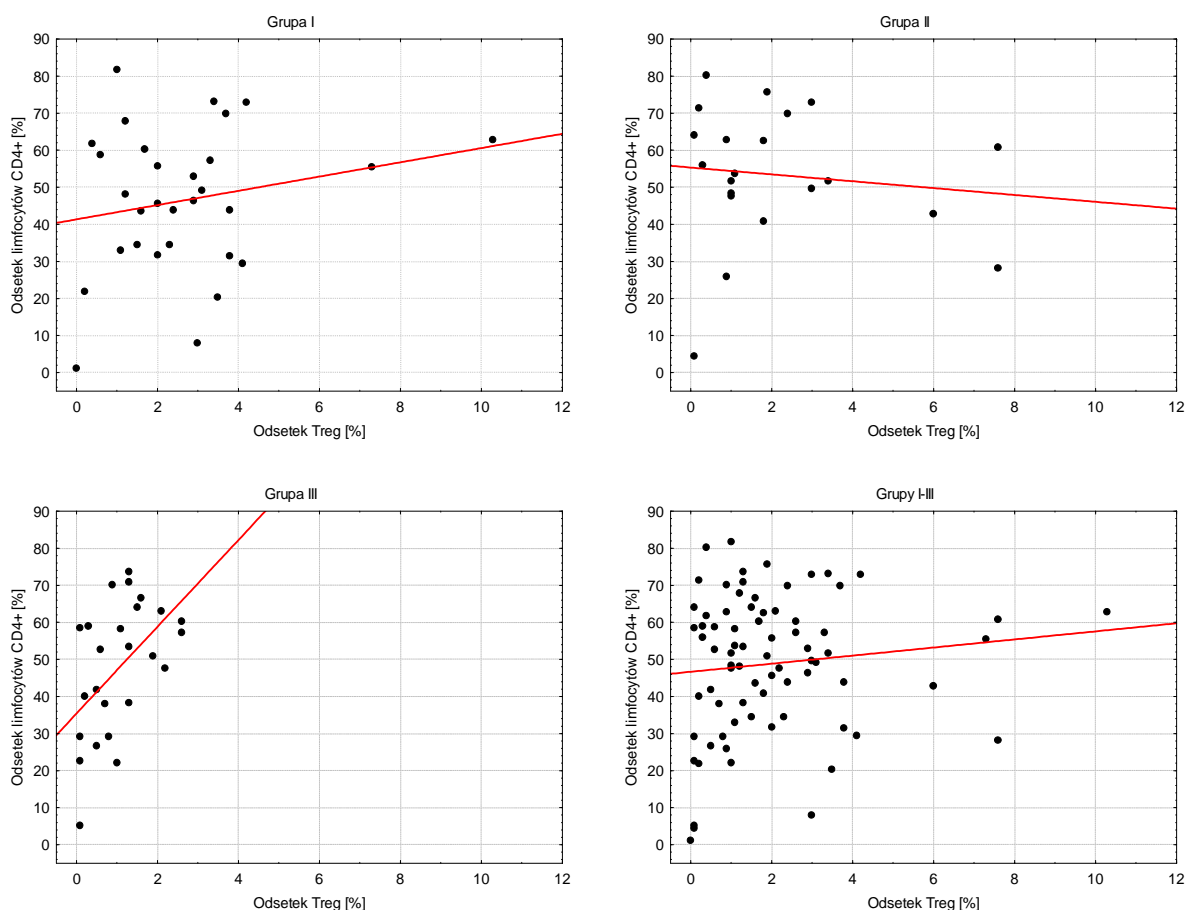
Ryc. 9. Zależność między odsetkiem Treg a odsetkiem limfocytów w grupach I, II, III i dla wszystkich chorych ogółem.



Stwierdzono dodatnią korelację między odsetkiem komórek Treg i odsetkiem limfocytów CD4+ w grupach I, III oraz wtedy gdy oceniano wszystkich chorych łącznie, tzn. wzrost odsetka Treg był związany ze wzrostem odsetka limfocytów CD4+. Zależność ta była statystycznie znamienne w grupie III ($r_s = 0,508$; $p = 0,010$).

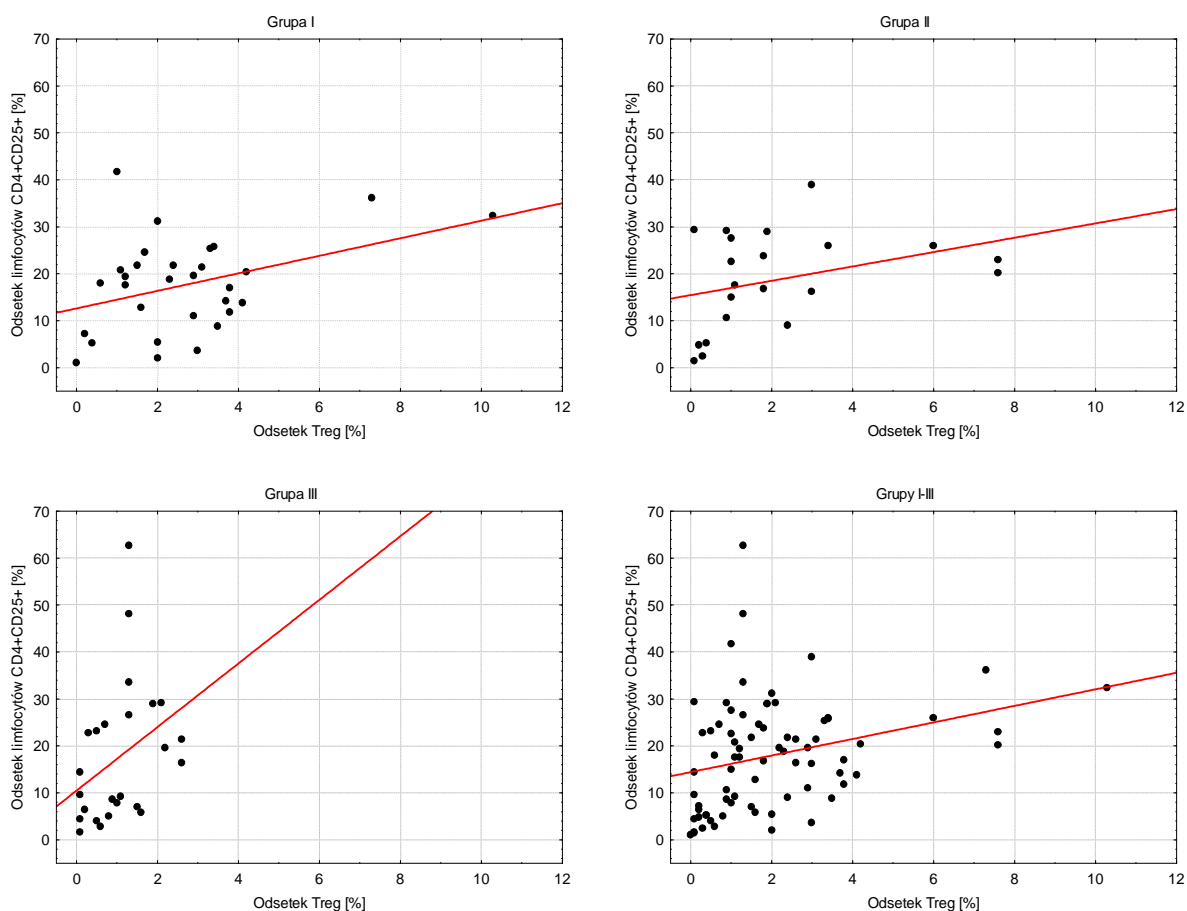
W grupie II stwierdzono negatywną korelację między odsetkiem komórek Treg i odsetkiem limfocytów CD4+, tzn. wzrost odsetka Treg był związany ze spadkiem odsetka limfocytów CD4+. Zależność ta nie była statystycznie istotna.

Ryc. 10. Zależność między odsetkiem Treg i odsetkiem komórek CD4+ w grupach I, II, III i dla wszystkich chorych ogółem



Stwierdzono dodatnią korelację między odsetkiem limfocytów Treg i odsetkiem limfocytów CD4⁺CD25⁺ w każdej z badanych grup chorych, tzn. wzrost odsetka Treg był związany ze wzrostem odsetka limfocytów CD4⁺CD25⁺. Zależność ta była statystycznie znamienne w grupie III ($r_s = 0,458$; $p = 0,021$) oraz wtedy gdy oceniano wszystkich badanych łącznie ($r_s = 0,371$; $p = 0,001$).

Ryc. 11. Zależność między odsetkiem Treg odsetkiem komórek CD4⁺CD25⁺ w grupach I, II, III i dla wszystkich chorych ogółem



3. Ocena współzależności między rozpowszechnieniem Treg i stanem klinicznym chorych

W celu określenia czynników determinujących rozpowszechnienie Treg w poszczególnych grupach przeprowadzono analizę ich wzajemnych zależności z uwzględnieniem płci i cech określające stopień zaawansowania choroby nowotworowej.

3.1 Odsetek limfocytów Treg a płeć chorego.

W grupie I stwierdzono wyższy odsetek limfocytów Treg wśród kobiet w porównaniu do mężczyzn ale różnica ta nie była istotna statystycznie (test Manna-Whitneya; $p=0,901$).

Tabela 23. Odsetek limfocytów Treg a płeć chorego w grupie I.

Grupa I Płeć	n	Odsetek limfocytów Treg					
		średnia	95%CI	mediana	minimum	maksimum	SD
M	16	2,54	1,64-3,45	2,15	0,40	7,30	1,70
K	14	2,84	1,38-4,30	2,90	0,00	10,30	2,53

W grupie II również stwierdzono wyższy odsetek limfocytów Treg wśród kobiet w porównaniu do mężczyzn ale nie wykazano istotności statystycznej dla tych różnic (test Manna-Whitneya; $p=0,862$).

Tabela 24. Odsetek limfocytów Treg a płeć chorego w grupie II.

Grupa II Płeć	n	Odsetek limfocytów Treg					
		średnia	95%CI	mediana	minimum	maksimum	SD
M	12	2,00	0,64-3,36	1,45	0,10	7,60	2,15
K	9	2,39	0,41-4,37	1,00	0,40	7,60	2,57

W grupie III, podobnie jak w grupie I i II również stwierdzono wyższy odsetek limfocytów Treg wśród kobiet w porównaniu do mężczyzn jednak nie wykazano istotności statystycznej dla tych różnic (test Manna-Whitneya; $p=0,976$).

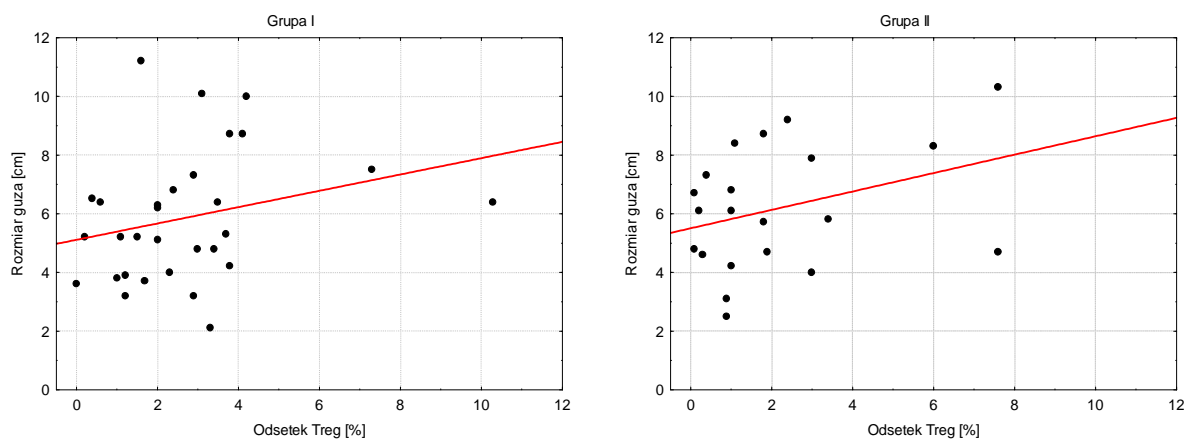
Tabela 25. Odsetek limfocytów Treg a płeć chorego w grupie III.

Gr. III Płeć	n	Odsetek limfocytów Treg					
		średnia	95%CI	mediana	minimum	maksimum	SD
M	18	1,06	0,67-1,45	1,05	0,10	2,60	0,79
K	7	1,09	0,32-1,85	0,90	0,10	2,20	0,83

3.2 Odsetek limfocytów Treg a wielkość guza mierzona w centymetrach.

W grupach I i II wzrostowi mierzonej w centymetrach wielkości guza towarzyszył wzrost odsetka Treg.

Ryc. 12. Korelacja między odsetkiem T reg a wielkością guza w centymetrach w grupie I i II.



Stwierdzona zależność nie miała jednak cech znamienności statystycznej, choć w grupie I stwierdzono wyraźny trend:

grupa I $r_s=0,359$ ($p=0,052$)

grupa II $r_s=0,292$ ($p=0,199$)

3.3 Odsetek limfocytów Treg a stopień zaawansowania raka płuca

W ocenie stopnia zaawansowania choroby nowotworowej brano pod uwagę ogólnie przyjęte cechy ją opisujące tj. T, N i M. Zależności między tymi cechami a średnią wartością odsetka Treg przedstawiono poniżej.

3.3.1 Odsetek limfocytów Treg a cecha T

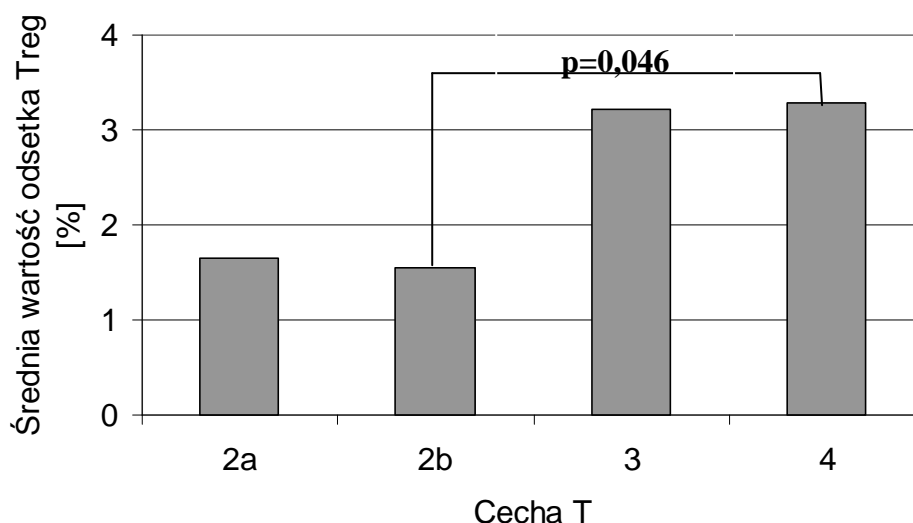
Cecha T opisuje ognisko pierwotne pod względem lokalizacji oraz wielkości. Jej szczegółową charakterystykę przedstawiono w części „Materiał i Metody” (patrz tabela 7 na stronie 40). Przeprowadzono analizę zależności między stopniem zaawansowania choroby pod względem cechy T a odsetkiem Treg dla grup I i II.

Tabela 26. Odsetek limfocytów Treg w zależności od cechy T guza w grupie I.

Cecha T	N	Odsetek limfocytów Treg				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
2a	2	1,65	1,65	0,00	3,30	2,33
2b	8	1,55	1,45	0,20	3,00	1,05
3	11	3,21	2,00	0,60	10,30	2,98
4	9	3,28	3,70	1,60	4,20	0,88

W grupie I najwyższy odsetek limfocytów Treg stwierdzono wśród chorych z cechą T4 czyli najwyższym stopniem zaawansowania pod względem wielkości i lokalizacji ogniska pierwotnego, natomiast najniższą wśród pacjentów z cechą T2b (ryc. 13).

Ryc. 13. Różnice w odsetku T reg w zależności od cechy T w grupie I



Stwierdzono istotne statystycznie różnice w zakresie odsetka limfocytów Treg w zależności od cechy T dla grupy I (test Kruskala-Wallis; $p=0,046$).

Tabela 27. Odsetek limfocytów Treg w zależności od cechy T guza w grupie II.

Cecha T	N	Odsetek limfocytów Treg				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
2a	3	1,93	1,90	0,90	3,00	1,05
2b	1	0,20	0,20	0,20	0,20	0,00
3	10	2,24	1,05	0,10	7,60	2,62
4	7	2,44	1,80	0,40	7,60	2,45

W grupie II najwyższą średnią wartość odsetka limfocytów Treg, podobnie jak w grupie I, stwierdzono wśród chorych z cechą T4 czyli najwyższym stopniem zaawansowania pod względem wielkości i lokalizacji ogniska pierwotnego, natomiast najniższą wśród pacjentów z cechą T2b. Natomiast nie stwierdzono istotnie statystycznego zróżnicowania wartości odsetka limfocytów Treg w zależności od cechy T dla tej grupy (test Kruskala-Wallis; $p=0,554$).

3.3.2 Odsetek limfocytów T reg a cecha N

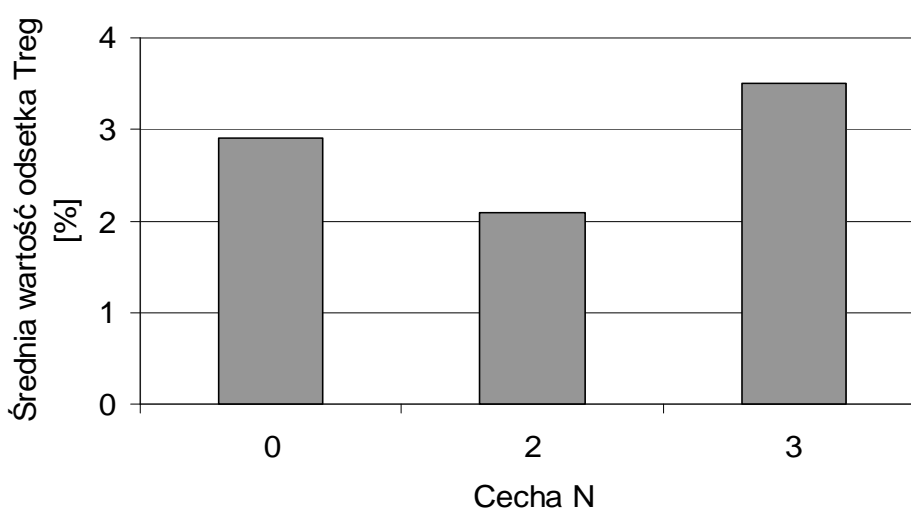
Cecha N opisuje przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych. Jej szczegółową charakterystykę przedstawiono w części „Materiał i Metody” (patrz tabela 7 na stronie 41). Przeprowadzono analizę zależności między stopniem zaawansowania choroby pod względem cechy N a odsetkiem limfocytów Treg dla grup I i II.

Tabela 28. Odsetek limfocytów Treg w zależności od cechy N guza w grupie I.

Cecha N	n	Odsetek limfocytów Treg				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
0	1	2,90	2,90	2,90	2,90	0,00
2	17	2,09	1,70	0,00	7,30	1,71
3	12	3,51	3,40	0,20	10,30	2,45

W grupie I najwyższą wartość odsetka limfocytów Treg stwierdzono wśród chorych z cechą N3 czyli najwyższym stopniem zaawansowania pod względem obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych natomiast najniższą wśród chorych z cechą N2. Cechę N0 reprezentował tylko 1 chory z grupy I, natomiast cechy N1 nie stwierdzono u żadnego chorego w rozpatrywanej grupie.

Ryc.14. Różnice w odsetku Treg w zależności od cechy N w grupie I



Zaobserwowane różnice nie były statystycznie znamienne (test Kruskala-Wallisa; $p=0,068$).

Tabela 29. Odsetek limfocytów Treg w zależności od cechy N guza w grupie II.

Cecha N	n	Odsetek limfocytów Treg				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD.
1	4	1,65	1,45	0,30	3,40	1,34
2	6	1,17	0,95	0,10	3,00	1,09
3	11	2,90	1,80	0,10	7,60	2,83

W grupie II najwyższą wartość odsetka limfocytów Treg stwierdzono wśród chorych z cechą N3 czyli najwyższym stopniem zaawansowania pod względem obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych natomiast najniższą wśród chorych z cechą N2. Cechę N1 reprezentowało tylko 4 chorey z grupy II, natomiast cechy N0 nie stwierdzono u żadnego chorego w rozpatrywanej grupie.

Zaobserwowane różnice nie były statystycznie znamienne (test Kruskala-Wallisa; $p=0,392$).

3.3.3 Odsetek limfocytów Treg a cecha M

3.3.3.1 Przerzuty na opłucnej

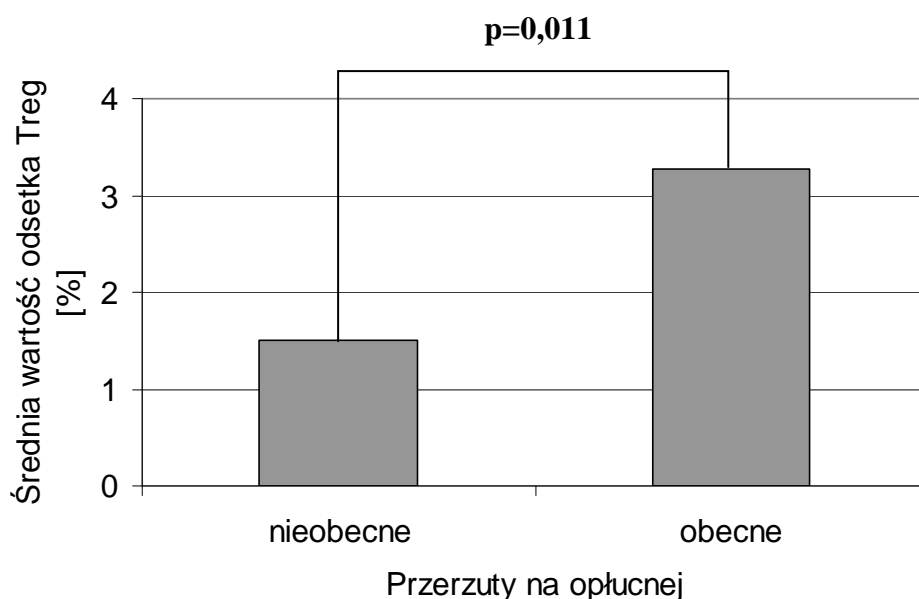
Identyfikacji przerzutów na opłucnej dokonywano na podstawie badania tomografii komputerowej z użyciem kontrastu, które wykonywano w trakcie procesu diagnostycznego wszystkim chorym.

Tabela 30. Odsetek limfocytów Treg w zależności od obecności przerzutów na opłucnej w grupie I.

Przerzuty na opłucnej	n	Odsetek limfocytów Treg				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	SD
0	10	1,50	1,40	0,00	3,40	1,11
1	20	3,28	2,95	0,20	10,30	2,23

U chorych z obecnymi przerzutami na opłucnej stwierdzono wyższą wartość odsetka Treg.

Ryc. 15. Różnice w odsetku T reg w zależności od obecności przerzutów na opłucnej dla grupy I



Zróźnicowanie wartości odsetka Treg w zależności od obecności przerzutów na opłucnej w grupie I było istotne statystycznie (test Manna-Whitneya; **p=0,011**).

3.3.3.2 Inna lokalizacja przerzutów odległych.

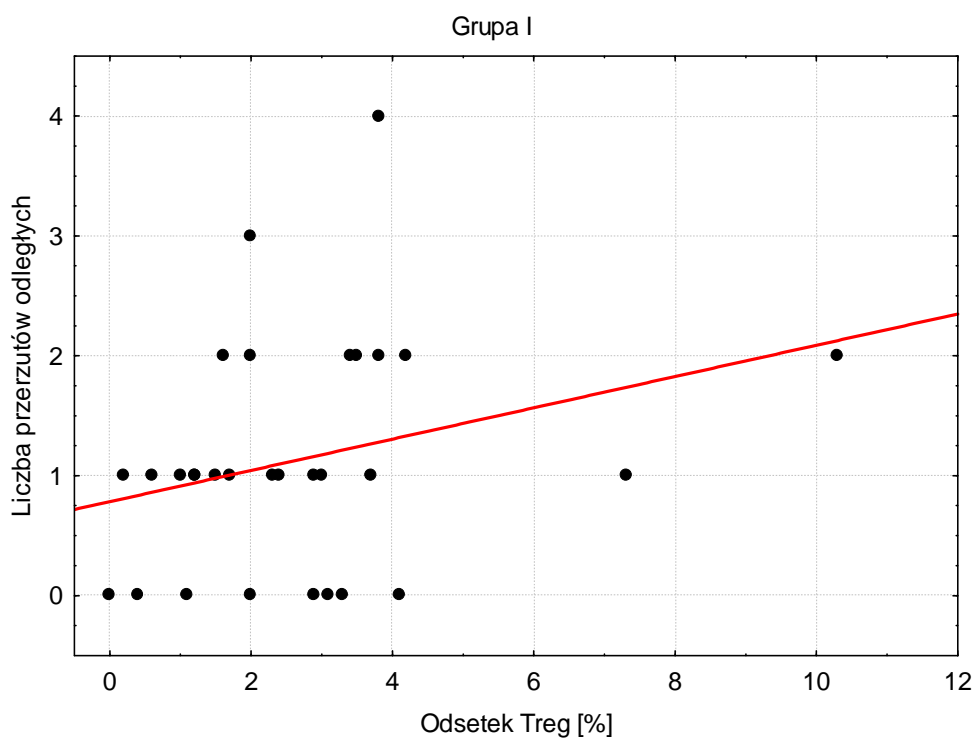
U każdego chorego biorącego udział w badaniu na podstawie wykonanych w procesie diagnostycznym badań obrazowych przeprowadzono ocenę obecności oraz lokalizacji przerzutów odległych. W analizie wzięto pod uwagę liczbę zajętych narządów. Wzrost liczby przerzutów odległych był związany ze wzrostem odsetka Treg w obu grupach chorych. Zależność ta nie była jednak znamienna statystycznie:

grupa I $r_s=0,334$ (p=0,071)

grupa II $r_s=0,088$ (p=0,703)

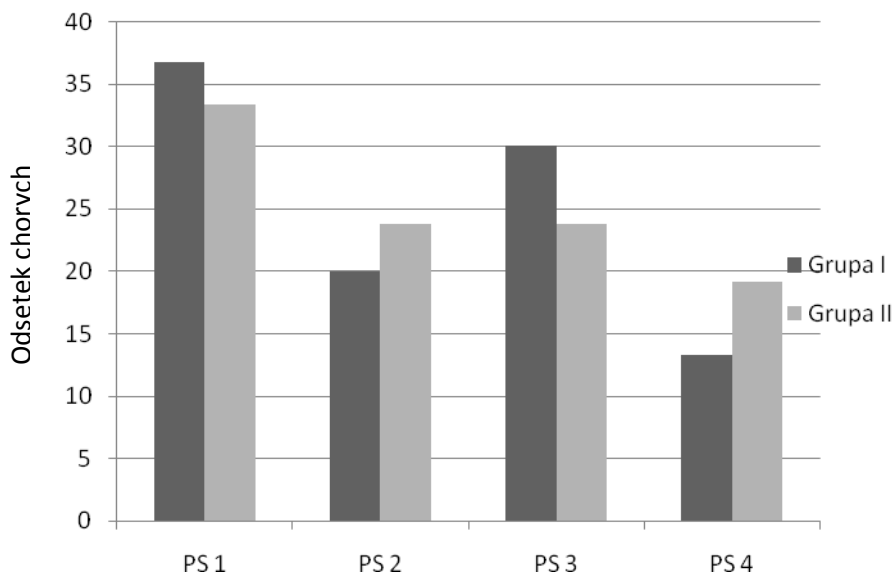
W grupie I zarysował się wyraźny trend wzrostu odsetka limfocytów Treg wraz ze wzrostem liczby narządów zajętych przez przerzuty.

Ryc. 16. Korelacja między odsetkiem T reg a liczbą narządów objętych przerzutami odległymi.



3.4 Odsetek limfocytów Treg a stan sprawności chorego (PS)

Ryc.17. Stan sprawności chorego w grupie I i II badanej populacji.



Większość pacjentów z grupy I i II charakteryzowała się wysokim stanem sprawności tj. PS 1 (odpowiednio: 36,7 i 33,3%), natomiast najniższy odsetek w obu grupach stanowili pacjenci z najniższym stopniem sprawności tj. PS 4 (odpowiednio 13,3 i 19,1%) Ryc. 17.

W trakcie analizy statystycznej nie stwierdzono istotnej korelacji między odsetkiem limfocytów Treg a stanem sprawności chorego określanym jako PS wg skali ECOG:

grupa I $r_s=0,226$ ($p=0,230$)

grupa II $r_s=-0,118$ ($p=0,611$)

4. Analiza czynników wpływających na czas przeżycia chorych

Przeprowadzono analizę czynników potencjalnie mogących wpływać na czas przeżycia chorych.

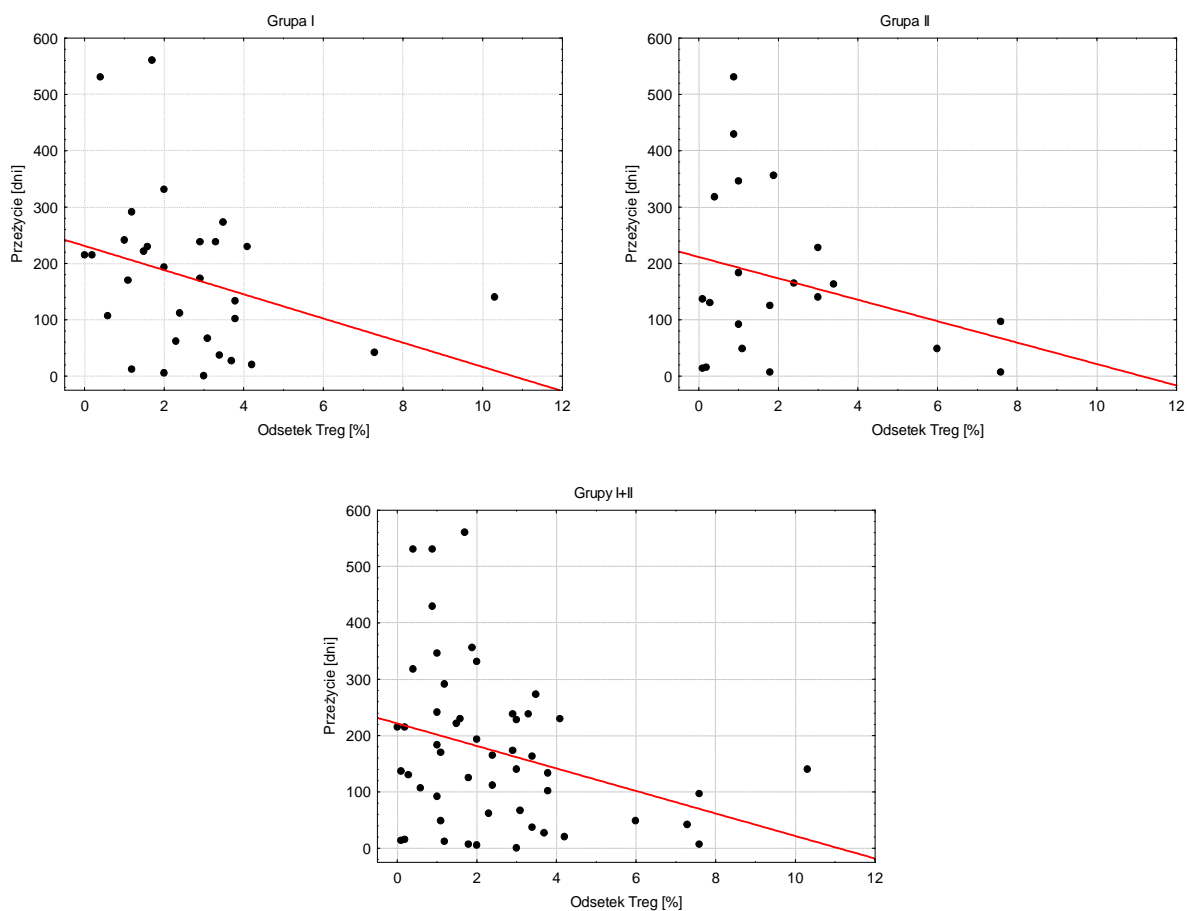
4.1 Ocena zależności między rozpowszechnieniem Treg a czasem przeżycia chorych.

W obrębie grup I, II i obu łącznie (tj. w grupie I+II) oceniono zależność między odsetkiem komórek T regulatorowych i mierzonym w dniach czasem przeżycia chorych. **Dotyczyło to pacjentów zmarłych w trakcie obserwacji.** W każdej z ocenianych grup stwierdzono, że pacjenci z wysokim odsetkiem Treg przeżywali krócej niż osoby z niskim odsetkiem tych komórek (ryc. 18). Zależność ta nie miała jednak cech znamienności statystycznej (tab. 31).

Tabela 31. Zależność między odsetkiem limfocytów Treg a czasem przeżycia w grupach I, II oraz I+II.

Grupa I (n = 27)	Grupa II (n = 19)	Grupa I+II (n = 46)
$r_s = -0,352$ (p = 0,072)	$r_s = -0,118$ (p = 0,630)	$r_s = -0,245$ (p = 0,101)

Ryc. 18. Zależność między odsetkiem Treg a czasem przeżyciem dla grupy I, II i I+II.



Jednocześnie podjęto próbę oceny czasu przeżycia chorych nowotworowych po podzieleniu ich na tych z „prawidłowym” i „wysokim” odsetkiem komórek Treg. W celu wyodrębnienia podgrupy chorych z „wysokim” odsetkiem limfocytów T reg, za jego wysoką wartość arbitralnie przyjęto punkt odcięcia w postaci dwóch odchyłeń standardowych powyżej wartości średniej odsetka limfocytów Treg w grupie kontrolnej tj. grupie III. Podgrupa chorych z wartością równą lub niższą niż ww. została określona jako „prawidłowe Treg”, zaś ci z wartością wyższą jako „wysokie Treg”.

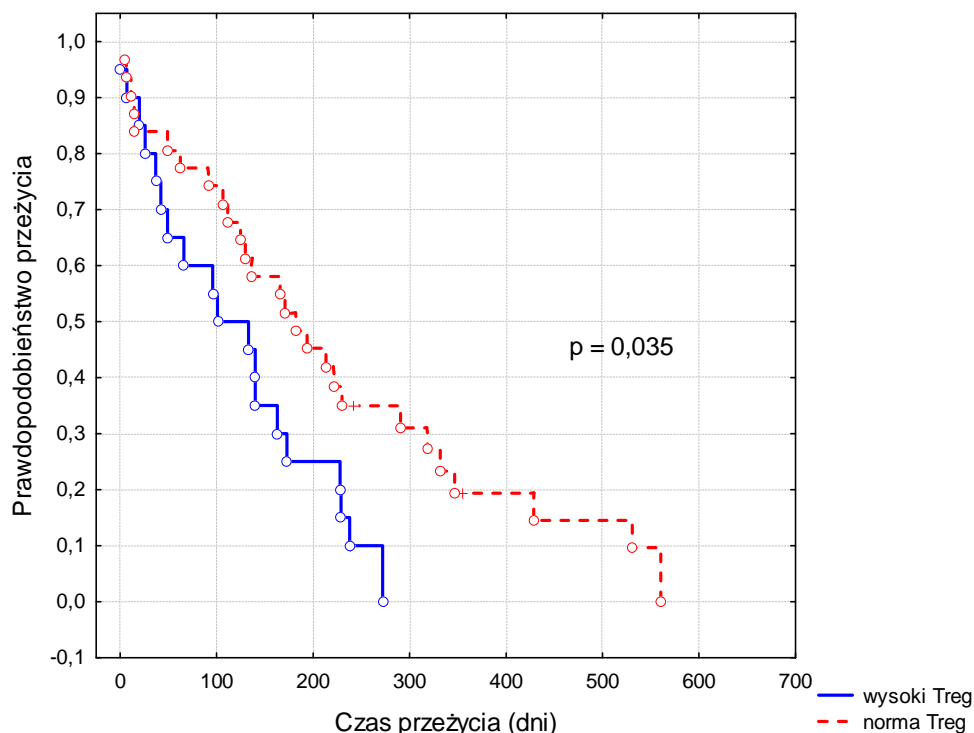
Tabela 32. Różnice długości przeżycia między pacjentami z „prawidłowym” i „wysokim” odsetkiem limfocytów Treg w grupie I+II łącznie.

Odsetek Treg	n	Czas przeżycia (dni)					
		średnia	95%CI	mediana	minimum	maksimum	SD
Norma	27	187	126-248	165	5	560	154
Wysoki	19	114	72-155	101	0	272	86

Czas przeżycia chorych z „prawidłowym” odsetkiem Treg wynosił 187 dni, a z „wysokim” 114. Zaobserwowana różnica nie była jednak istotna statystycznie (test Manna-Whitneya; $p=0,167$).

Analiza przeżycia Kaplana-Meiera wykonana **po włączeniu pacjentów żyjących** (obserwacje ucięte) pozwoliła uzyskać wykres prawdopodobieństwa przeżycia w dwóch grupach utworzonych ze względu na wartość odsetka Treg (ryc.19). Test F Coxa dał wynik istotny **$p=0,035$** .

Ryc.19. Prawdopodobieństwo przeżycia w grupie z prawidłowym i wysokim odsetkiem Treg.



4.1.1 Grupa z „prawidłowym” odsetkiem Treg.

Współczynniki korelacji liniowej Pearsona pomiędzy trzema zmiennymi a czasem przeżycia:

1. liczba narządów objętych przerzutami [przerzuty] a czas przeżycia, $r = -0,626$
2. wiek chorego w momencie badania [wiek] a czas przeżycia, $r = -0,383$
3. stan sprawności chorego [PS] wg skali ECOG a czas przeżycia, $r = -0,757$

Analiza regresji wielorakiej przeprowadzona na tych zmiennych potwierdziła istotną statystycznie ($p < 0,001$) zależność czasu przeżycia od trzech zmiennych, a współczynnik korelacji wielokrotnej $R = 0,890$.

Uzyskany model ma postać:

$$\text{Czas przeżycia} = 813,2 - 59,7 * \text{przerzuty} - 5,9 * \text{wiek} - 76,4 * \text{PS} \pm 74,5$$

(101,7) (17,7) (1,6) (14,5)

w nawiasach błędy standardowe współczynników.

Wszystkie współczynniki są istotne statystycznie. Współczynnik determinacji wynosi $R^2 = 0,765$ i wskazuje, że uzyskany model w ponad 3/4 wyjaśnia zmienność czasu przeżycia w tej grupie.

4.1.2 Grupa z „wysokim” odsetkiem Treg

Współczynniki korelacji liniowej Pearsona pomiędzy trzema zmiennymi a czasem przeżycia:

1. liczba narządów objętych przerzutami [przerzuty] a czas przeżycia, $r = -0,359$
2. wiek chorego w momencie badania [wiek] a czas przeżycia, $r = -0,285$
3. stan sprawności chorego [PS] wg skali ECOG a czas przeżycia, $r = -0,793$

Analiza regresji wielorakiej przeprowadzona na tych zmiennych potwierdziła istotną statystycznie ($p < 0,001$) zależność czasu przeżycia od trzech zmiennych, a współczynnik korelacji wielokrotnej $R = 0,821$.

Uzyskany model ma postać:

$$\text{Czas przeżycia} = 337,7 - 14,8 * \text{przerzuty} - 0,8 * \text{wiek} - 61,3 * \text{PS} \pm 53,8$$

(87,3) (11,1) (1,3) (13,2)

w nawiasach błędy standardowe współczynników.

Jedynie współczynnik dla zmiennej PS jest istotny statystycznie. Współczynnik determinacji wynosi $R^2 = 0,609$ i wskazuje, że blisko 40% zmienności czasu przeżycia w tej grupie pozostaje niewyjaśnione przez ten model.

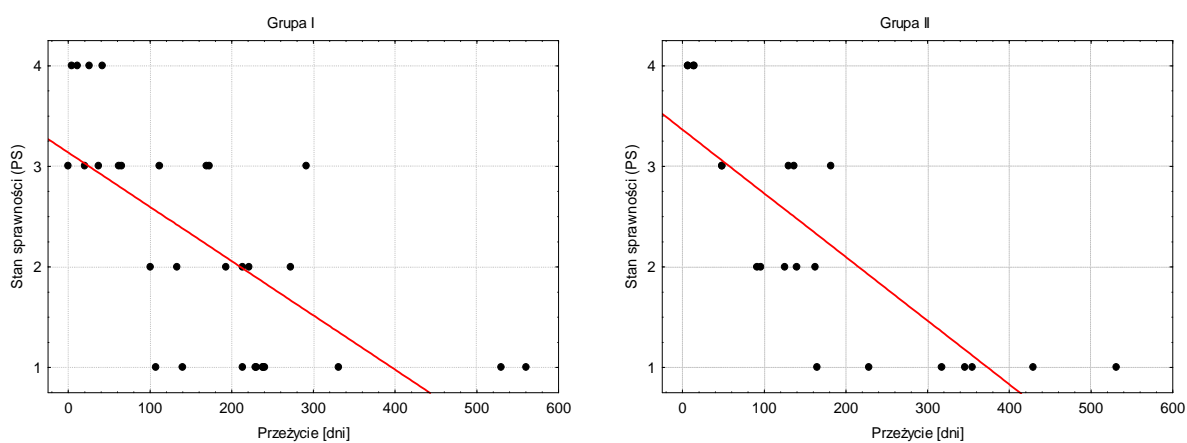
4.2 Stan sprawności chorego (PS wg skali ECOG) a czas przeżycia.

Stwierdzono istotną statystycznie negatywną korelację między stanem sprawności chorego (PS) ocenianym wg skali ECOG a czasem przeżycia chorego tj. wraz z obniżaniem się stopnia sprawności (wyższa punktacja w skali ECOG) tym krótszy czas przeżycia chorych. Powyższa obserwacja dotyczyła zarówno grupy I i II (współczynnik korelacji rang Spearmana – tabela 33).

Tabela 33. Czas przeżycia chorych a stan sprawności (PS).

Grupa I (n = 27)	Grupa II (n = 19)
$r_s = -0,735$ (p < 0,001)	$r_s = -0,852$ (p < 0,001)

Ryc.20. Zależność między stanem sprawności tj. PS a przeżyciem dla grupy I i II.

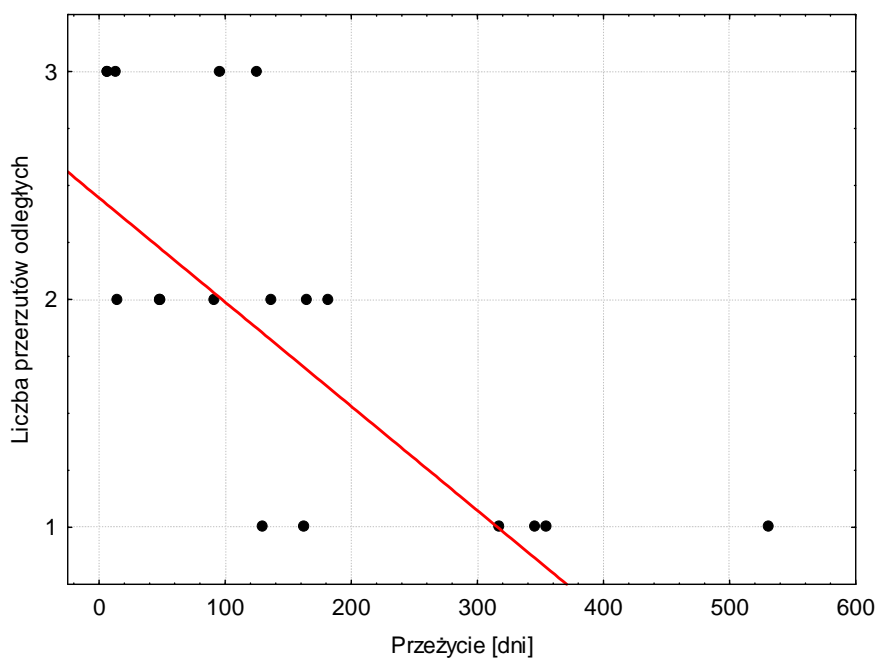


4.3 Liczba narządów objętych przerzutami odległymi a czas przeżycia.

Stwierdzono tendencję ale nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji między liczbą narządów zajętych przez przerzuty odległe a czasem przeżycia chorych w grupie I (n=27, $r_s = -0,336$; $p = 0,087$).

Wykazano natomiast istotną statystycznie negatywną korelację między liczbą zajętych narządów przez przerzuty odległe a czasem przeżycia chorych w grupie II (n=19, $r_s = -0,757$; $p < 0,001$).

Ryc. 21. Zależność między liczbą narządów objętych przerzutami a czasem przeżycia dla grupy II.

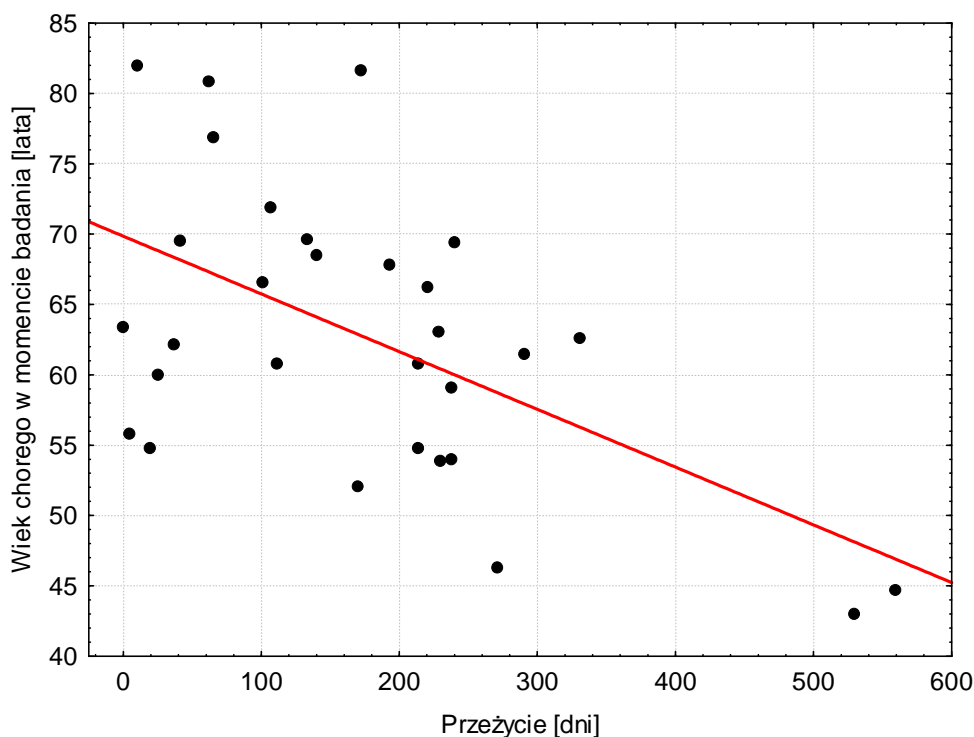


4.4 Wiek w momencie badania a czas przeżycia.

Wykazano istotną statystycznie negatywną korelację między wiekiem w momencie badania a czasem przeżycia chorych w grupie I tj. wraz z wiekiem chorych czas ich przeżycia się skracał (n=27, współczynnik korelacji rang Spearmana, $r_s = -0,405$; **p=0,036**)

Nie stwierdzono natomiast istotnej statystycznie korelacji między wiekiem chorego w momencie badania a czasem jego przeżycia w grupie II (n=19, współczynnik korelacji rang Spearmana, $r_s = -0,033$; p=0,892).

Ryc.22. Zależność między wiekiem chorego w momencie badania a czasem przeżycia dla grupy I.



4.5 Jednoczesny wpływ wielu czynników

Przeprowadzono analizę jednoczesnego wpływu kilku zmiennych tj.: stanu sprawności (PS), wieku w momencie badania, odsetka limfocytów Treg oraz liczby przerzutów odległych na czas przeżycia chorych objętych badaniem odpowiednio w grupie I, grupie II oraz w grupie I+II (łącznie).

4.5.1 Grupy I+II łącznie

Cztery zmienne są w różnym stopniu skorelowane ze zmienną czasu przeżycia (współczynnik korelacji liniowej Pearsona):

1. stan sprawności [PS] wg skali ECOG a czas przeżycia, $r = -0,732$
2. wiek w momencie badania [wiek] a czas przeżycia, $r = -0,395$
3. odsetek limfocytów Treg [Treg] a czas przeżycia, $r = -0,283$
4. liczba narządów objętych przerzutami [przerzuty] a czas przeżycia = $-0,480$

Analiza statystyczna wskazuje, że spośród wyżej wymienionych zmiennych odsetek limfocytów Treg ma najslabszy związek z czasem przeżycia.

Analiza regresji wielorakiej przeprowadzona na tych zmiennych potwierdziła istotną statystycznie ($p < 0,001$) zależność czasu przeżycia od czterech zmiennych, a współczynnik korelacji wielokrotnej $R = 0,834$.

Uzyskany model ma postać:

$$\text{Czas przeżycia} = 627,7 - 32,1 * \text{przerzuty} - 6,3 * \text{Treg} - 3,6 * \text{wiek} - 74,7 * \text{PS} \pm 77,4$$

(79,0) (12,4) (5,8) (1,3) (11,6)

w nawiasach podano błędy standardowe współczynników.

Współczynniki dla wszystkich zmiennych są ujemne, co oznacza, że wzrost wartości każdej zmiennej zmniejsza wartość zmiennej zależnej, czyli czasu przeżycia.

Współczynnik dla odsetka limfocytów Treg nie jest istotny statystycznie, ale usunięcie tej zmiennej z modelu nie poprawia współczynnika determinacji, który wynosi $R^2=0,667$ i wskazuje, że uzyskany model tylko w 2/3 wyjaśnia zmienność czasu przeżycia.

4.5.2 Grupa I

Cztery zmienne są w różnym stopniu skorelowane ze zmienną czasu przeżycia (współczynnik korelacji liniowej Pearsona):

1. stan sprawności [PS] wg skali ECOG a czas przeżycia, $r = -0,685$
2. wiek w momencie badania [wiek] a czas przeżycia, $r = -0,567$
3. odsetek limfocytów Treg [Treg] a czas przeżycia, $r = -0,317$
4. liczba narządów objętych przerzutami [przerzuty] a czas przeżycia, $r = -0,335$

Analiza statystyczna wskazuje, że odsetek limfocytów Treg i liczba narządów objętych przerzutami mają słabszy niż pozostałe dwie zmienne związek z czasem przeżycia.

Analiza regresji wielorakiej przeprowadzona na tych zmiennych potwierdziła istotną statystycznie ($p<0,001$) zależność czasu przeżycia od czterech zmiennych, a współczynnik korelacji wielokrotnej $R=0,834$.

Uzyskany model ma postać:

$$\text{Czas przeżycia} = 726,4 - 32,2 * \text{przerzuty} - 11,5 * \text{Treg} - 5,1 * \text{wiek} - 71,0 * \text{PS} \pm 86,8$$

(106,4) (18,4) (8,5) (1,8) (17,0)

w nawiasach błędy standardowe współczynników

Współczynniki dla odsetka limfocytów Treg i liczby narządów objętych przerzutami odległymi nie są istotne statystycznie, ale usunięcie z modelu zarówno jednej z tych zmiennych jak i obu jednocześnie nie poprawia współczynnika determinacji, który wynosi $R^2=0,640$ i wskazuje, że uzyskany model tylko w 64% wyjaśnia zmienność czasu przeżycia.

4.5.3 Grupa II

Cztery zmienne są w różnym stopniu skorelowane ze zmienną czasu przeżycia (współczynnik korelacji liniowej Pearsona):

1. stan sprawności [PS] wg skali ECOG a czas przeżycia, $r = -0,825$
2. wiek w momencie badania [wiek] a czas przeżycia, $r = -0,051$
3. odsetek limfocytów Treg [Treg] a czas przeżycia, $r = -0,280$
4. liczba narządów objętych przerzutami [przerzuty] a czas przeżycia, $r = -0,710$

Analiza statystyczna wskazuje, że w tej grupie wiek w momencie badania zupełnie nie jest a odsetek Treg jest słabo skorelowany z czasem przeżycia.

Analiza regresji wielorakiej przeprowadzona na tych zmiennych potwierdziła istotną statystycznie ($p < 0,001$) zależność czasu przeżycia od czterech zmiennych, a współczynnik korelacji wielokrotnej $R = 0,881$.

Uzyskany model ma postać:

$$\text{Czas przeżycia} = 425,3 - 30,2 * \text{przerzuty} - 7,3 * \text{Treg} - 0,7 * \text{wiek} - 70,3 * \text{PS} \pm 64,0$$

$(144,7) \quad (19,5) \quad (9,2) \quad (2,2) \quad (17,4)$

w nawiasach błędy standardowe współczynników.

Istotny statystycznie jest tylko współczynnik dla stanu sprawności PS, a współczynnik determinacji wynosi $R^2 = 0,713$, co wskazuje, że uzyskany model tylko w 71% wyjaśnia zmienność czasu przeżycia.

DYSKUSJA

W Polsce umieralność z powodu nowotworów złośliwych ogółem przed 65 rokiem życia (szczególnie u mężczyzn) należy do najwyższych na świecie, a dominujący udział mają w tym nowotwory złośliwe płuca. Najczęstszym przedstawicielem tej grupy nowotworów jest rak płuca. Jak dotąd udało się ustalić wiele danych dotyczących jego etiologii, patomorfologii oraz przebiegu jednak pomimo ogromnego zaangażowania badawczego nie osiągnięto znaczącego przełomu na polu terapii przeciwnowotworowej. W dalszym ciągu podstawową strategią postępowania wobec chorych z rozpoznaniem raka płuca jest stosowanie konwencjonalnej chemioterapii lub leczenia skojarzonego tj. chemioradioterapii. Rokowanie dla tych chorych mierzone czasem całkowitego przeżycia jest wysoce niezadawalające. Ocenia się, że odsetek 5-letnich przeżyć ogółu chorych na raka płuca wynosi nieco ponad 12% [3]

Immunoterapia guzów jako najczęstsza forma leczenia biologicznego nowotworu jest relatywnie nową opcją, w której onkolodzy kliniczni pokładają ogromne nadzieje związane z poprawą rokowania. Immunoterapia opiera się na dotychczasowych obserwacjach dotyczących mechanizmów odpowiedzi przeciwnowotworowej. Jej modyfikacja polegająca na wzmocnieniu szlaków eliminujących komórki nowotworowe, a osłabieniu tych, które pozwalają się tym komórkom namnażać w organizmie gospodarza teoretycznie powinna skutkować poprawą wyników leczenia przeciwnowotworowego. Podlegać tej modyfikacji miałyby komórki w obrębie mikrośrodowiska guza. Pojęcie mikrośrodowiska jest od niedawna wprowadzone i odnosi się do szczególnych właściwości utkania nowotworu wynikających z nieprawidłowych interakcji między guzem nowotworowym a komórkami gospodarza. Jednym z elementów tworzących mikrośrodowisko guza są limfocyty T regulatorowe i to między innymi one stanowią potencjalny cel immunoterapii.

Badania, które dostarczyły dowodów na istnienie komórek Treg oraz pozwoliły ustalić ich funkcję były prowadzone w połowie lat dziewięćdziesiątych [121]. W ciągu kolejnych 15 lat studiów nad tym zagadnieniem udało się ustalić, że w przebiegu procesu nowotworowego komórki Treg hamują odpowiedź skierowaną przeciwko komórkom guza oraz jednocześnie stanowią negatywny czynnik rokowniczy. Większość dotychczasowych doświadczeń oraz najnowsze dane kliniczne sugerują, że opanowanie szkodliwej roli Treg może być ważną składową nową przeciwnowotworową strategią [122].

Markery używane do identyfikacji komórek Treg oraz umożliwiające ich wyodrębnienie spośród puli jednojądrzastych komórek krwi obwodowej ulegały zmianie na przestrzeni lat. W przeciwieństwie do modelu zwierzęcego, zdefiniowanie ludzkich Treg okazało się dużo trudniejsze. W pracach odnoszących się do tego zagadnienia można znaleźć różniące się mniej lub bardziej od siebie molekularne charakterystyki komórek Treg. Początkowo sądzono, że wystarczy potwierdzić koekspresję antygenów CD4 i CD25 by uznać komórki za limfocyty Treg. Następnie podejście to ewaluowało by ostatecznie uznać, że optymalnym zestawem markerów je opisujących jest współwystępowanie $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. Ten ostatni czynnik uznaje się za najbardziej wiarygodny wewnątrzkomórkowy marker komórek Treg. Co więcej aktualnie ustalono, że odgrywa on również decydującą rolę w procesie dojrzewania oraz regulacji funkcji komórek Treg. Ludzkie limfocyty T $CD4^+CD25^{high}$ są wyjątkowo bogatymi w $FoxP3^+$ komórkami, nie mniej jednak jest ciągle znacząca liczba komórek $FoxP3^+$ wśród populacji limfocytów $CD4^+CD25^{low}$. W przypadku braku obecności innych bardziej swoistych markerów na powierzchni komórek, aktualnie nie jest możliwe badanie ludzkich komórek Treg $FoxP3^+$ niezależnie od ekspresji przez nie cząsteczki CD25. To tłumaczy dlaczego komórki Treg u ludzi muszą być opisywane przez jednoczesną ekspresję FoxP3 i CD25 a analiza funkcji hamujących populacji limfocytów T bogatych w FoxP3 jest możliwa głównie przez wysegregowanie komórek $CD25^{high}$.

W badaniach własnych komórki Treg izolowano z osadów komórkowych wysięków opłucnowych identyfikując obecność antygenów $CD4^+CD25^+$ oraz markera $FoxP3^+$ zgodnie z obowiązującymi zasadami.

Od momentu pojawienia się pierwszych danych na temat swoistych komórek T regulatorowych stwierdzano zwiększoną ich liczbę u chorych z procesem nowotworowym. Taką prawidłowość potwierdziło wielu badaczy zajmujących się tym problemem.

Pionierami w zakresie badań nad komórkami Treg był Woo i wsp. Wykazali oni zwiększony odsetek komórek $CD4^+CD25^+$ wśród populacji limfocytów naciekających guz w przypadkach niedrobnokomórkowego raka płuca oraz raka jajnika. Jednocześnie prowadząc badania nad funkcją komórek Treg ustalono, że wydzielają one TGF- β . Był to jeden z dowodów na supresorową czynność tych komórek mogącą prowadzić do dysfunkcji układu immunologicznego u chorych na raka [90]. Kolejne badania nad właściwościami komórek Treg wykazały konstytutywną wysoką ekspresję cząsteczki CTLA-4. Ponadto ustalono, że komórki Treg pośredniczą w hamowaniu proliferacji limfocytów T [70]. Potwierdzeniem pierwszych doniesień dotyczących komórek Treg były

wyniki dużego badania prowadzonego przez Liyanage i wsp., w którym na podstawie obserwacji chorych z rakiem piersi i rakiem trzustki, wykazano zwiększoną liczbę komórek $CD4^+CD25^+$ nie tylko w obrębie mikrośrodowiska guza, ale również we krwi obwodowej. Podobne wyniki uzyskano badając wysięki nowotworowe. Na tej podstawie wysunięto sugestię, że w przebiegu procesu nowotworowego wzrost odsetka limfocytów Treg jest zjawiskiem uogólnionym. [71].

Autorzy zajmujący się czerniakiem złośliwym również zaobserwowali zwiększenie odsetka komórek odpowiadających czynnościowo limfocytom Treg $CD4^+CD25^+$ [123]. W kolejnym badaniu prowadzonym przez Gray i wsp. wzrost liczebności komórek Treg skojarzono ze wzrostem stężenia H-ferrytyny w surowicy krwi u chorych z takim rozpoznaniem [124]. Wydzielanie H-ferrytyny przez komórki czerniaka prowadzi do aktywacji komórek uwalniających IL-10. Cytokina ta z kolei pośrednio, przez wpływ na komórki dendrytyczne, indukuje zjawisko namnażania się i ekspansji komórek Treg u chorych na raka [63]. Aby uwiarygodnić wyniki uzyskane w wyżej przedstawionych pracach dotyczących chorych na czerniaka złośliwego niezbędne było kolejne badanie oceniające ekspresję FoxP3 m-RNA przez limfocyty uznane we wcześniejszych badaniach jako Treg, jedynie na podstawie układu antygenów $CD4^+CD25^+$. Takie weryfikujące badanie przeprowadził w 2004 roku Viguiet i wsp. uzyskując potwierdzenie tak postawionej tezy [95].

U chorych na nowotwory przewodu pokarmowego, zwiększony względny odsetek limfocytów Treg mógłby być właściwie tłumaczony obserwowanym znaczącym spadkiem liczby komórek $CD4^+CD25^-$ we krwi obwodowej. Ponadto udowodniono, że u chorych z rakiem żołądka, złe rokowanie oraz obniżony współczynnik przeżycia korelowały ze wzrostem odsetka Treg [65, 69]. Kono i wsp. w badaniu chorych na raka żołądka i przełyku udowodnili, że po całkowitej resekcji, początkowo zwiększona liczba komórek Treg, ulegała zdecydowanemu zmniejszeniu. Przeciwnie, w przypadku nawrotu choroby liczba komórek Treg ponownie ulegała zwiększeniu [125]. Te dane podkreśliły bezpośrednią korelację między wzrostem guza i rozpowszechnieniem komórek Treg.

Curiel i wsp. przeprowadzili ocenę komórek Treg w przebiegu raka jajnika. W swoich badaniach dowiedli, że komórki Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ hamują swoistą T-komórkową odpowiedź skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym, co przyczynia się do wzrostu guza. Zaobserwowali również, że w przypadku progresji choroby narasta liczba komórek Treg [68]. Ponadto, zwiększony odsetek limfocytów Treg wiązał się z podwyższonym ryzykiem zgonu i skróconym czasem przeżycia chorych. W przypadkach

guzów o wyższym stopniu zaawansowania komórki Treg preferencyjnie przemieszczały się i gromadziły w obrębie guza i wysięków nowotworowych natomiast rzadziej znajdowano je w obrębie drenujących węzłów chłonnych. Zjawisko to tłumaczono obecnością chemokiny CCL22, która była uwalniana przez komórki guza oraz otaczające je makrofagi. Częsteczką tą za pośrednictwem CCR4 wpływa na przemieszczanie się komórek Treg w kierunku guza. Ta swoista rekrutacja komórek Treg może reprezentować jeden z mechanizmów ucieczki nowotworów przed odpowiedzią immunologiczną.

W przypadku chorych na raka płaskonabłonkowego okolicy głowy i szyi również wykazano istotnie podwyższony odsetek limfocytów Treg FoxP3⁺GITR⁺ [117]. Komórki te były znacząco bardziej wrażliwe na apoptozę w porównaniu z innymi limfocytami T, co mogłoby sugerować ich szybszy obrót w krążeniu obwodowym [117]. W jaki sposób zwiększona wrażliwość na apoptozę wpływa na liczbę komórek Treg, nie było jak dotąd przedmiotem badań [121].

U chorych na raka wątrobowokomórkowego Ormandy i wsp. wykazali zwiększony odsetek komórek Treg we krwi obwodowej oraz w obrębie limfocytów naciekających guz [92].

O ile pytania dotyczące roli komórek Treg w przebiegu procesu nowotworowego w przypadku guzów litych wzbudzały zainteresowanie już od dłuższego czasu, o tyle badania dotyczące udziału tych komórek w przebiegu nowotworów pochodzenia hematologicznego rozpoczęto niespełna 5 lat temu.

Pierwsze takie badanie prowadzone przez Marshall i wsp. u chorych na chłoniaka Hodgkina wykazało obecność dużego odsetka limfocytów Tr1 uwalniających IL-10 i komórek Treg CD4⁺CD25⁺, zarówno wśród limfocytów naciekających węzły chłonne jak i w populacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej [94]. Natomiast przeciwnie do guzów litych niska częstotliwość komórek FoxP3⁺, a wysoka limfocytów T cytotoksycznych w obrębie węzłów chłonnych objętych chorobą, korelowała ze skróconym czasem całkowitego przeżycia. Korzystną rolę komórek Treg w tym przypadku tłumaczy się ich zdolnością do hamowania przewlekłego procesu zapalnego, który jest uznawany za ważny czynnik etiopatogenetyczny chłoniaków. Klasycznym tego przykładem jest chłoniak żołądka typu MALT, który może rozwijać się jako następstwo przewlekłego zakażenia *Helicobacter pylorii*. [121].

Natomiast w przypadku przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej, komórki Treg zachowują się analogicznie jak w guzach litych. Udowodniono, że wzrost liczby komórek Treg CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺CTLA4⁺GITR⁺ następuje w korelacji ze

stopniem zaawansowania choroby. Jednocześnie komórki te utrzymują pełną zdolność supresorową. Zastosowanie fludarabiny w leczeniu chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną powodowało spadek liczby komórek Treg oraz upośledzenie ich funkcji [121,126].

Zwiększony odsetek komórek Treg FoxP3⁺CTLA4⁺ zaobserwowano także u chorych na chłoniaka nieziarniczego B-komórkowego [73]. Z kolei u chorych na ostrą białaczkę szpikową zaobserwowano zwiększony odsetek komórek Treg CD4⁺CD25^{high}. Komórki Treg pochodzące od chorych z ostrą białaczką szpikową, podobnie jak w przypadku guzów litych, były mniej odporne na apoptozę za to wykazywały zwiększoną zdolność do proliferacji w porównaniu do grupy kontrolnej [62].

Podobnie do innych nowotworów pochodzenia hematologicznego zwiększony odsetek komórek Treg CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ wykazano także u pacjentów z gammopatią monoklonalną o nieokreślonym znaczeniu (MGUS – *ang. monoclonal gammopathy of undetermined significance*) oraz w szpiczaku plazmocytowym [127]. Wzrost liczby Treg w tych jednostkach również korelował ze stopniem zaawansowania choroby.

Podsumowując dane przedstawione wyżej należy przyjąć, że wzrost komórek Treg dotyczy w takim samym stopniu guzów litych jak i nowotworów pochodzenia hematologicznego. Część badań wymaga jednakże weryfikacji poprzez użycie do identyfikacji komórek Treg swoistych markerów tj. FoxP3⁺ oraz wystandaryzowanych i zaawansowanych technologicznie metod.

Korelacja między wzrostem odsetka limfocytów Treg a wyższym stopniem zaawansowania choroby i gorszym całkowitym przeżyciem została wykazana w szeregu badań. W przewlekłej białaczce limfatycznej po zastosowaniu fludarabiny obserwowano zmniejszoną liczbę komórek Treg, które dodatkowo charakteryzowały się upośledzoną funkcją. Jednak nie wszystkie leki cytotoksyczne wywołują podobny efekt np. u chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną czy szpiczaka plazmocytozowego żadna forma terapii łącznie z przeszczepieniem autologicznych komórek pnia nie wywołało podobnego efektu. Podobnie nie udało się wykazać wpływu chemioterapii czy leczenia skojarzonego w postaci chemioradioterapii na liczbę i funkcję supresorową komórek Treg u chorych na raka szyjki macicy [128].

Ostatnie badania wykazały, że cytokiną odpowiedzialną za rozwój komórek Treg w grasicy, ekspansję na obwód oraz ich aktywność supresorową jest IL-2 [129]. Użycie IL-2 podczas odtwarzania układu immunologicznego po zastosowanej chemioterapii prowadzi do zwiększenia odsetka Treg we krwi obwodowej. Ta ekspansja na obwód jest

dotatkowo podkreślona przez towarzyszącą limfopenię. Komórki Treg, które powstają pod wpływem IL-2 wykazują ekspresję FoxP3 na poziomie obserwowanym u osób zdrowych i mają podobny potencjał czynnościowy [130]. Ahmadzadeh i wsp. prowadząc badania u chorych ze szpiczakiem plazmocytowym oraz rakiem nerkowokomórkowym wykazali, że pod wpływem leczenia IL-2 liczba oraz aktywność komórek Treg były wyraźnie zwiększone, czemu towarzyszył jednocześnie wzrost FoxP3 [131]. To zjawisko może tłumaczyć dlaczego leczenie z użyciem IL-2 pacjentów z rakiem nerkowokomórkowym nie daje spodziewanych efektów. W takiej sytuacji przeciwnowotorowe działanie IL-2 jest neutralizowane przez indukcję komórek Treg.

Nieoczekiwanie, wykazano że szczepienie chorych na szpiczaka plazmocytozowego komórkami dendrytycznymi obciążonymi syntetycznymi peptydami lub lizatami guza powoduje wzrost liczby komórek Treg czemu towarzyszy ekspansja swoistych dla guza limfocytów T cytotoksycznych. Czy to poprawia tolerancję immunologiczną na obecność guza i wpływa niekorzystnie na wywołanie klinicznie efektywnej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym, wymaga dalszych wyjaśnień, ponieważ mechanizm tego zjawiska nie jest ciągle zrozumiany [132].

Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że wybiórcza eliminacja komórek Treg samoistnie lub w połączeniu z innymi formami leczenia może wywołać regresję już ustalonych guzów. Pierwsze pilotażowe badania u ludzi polegające na selektywnej eliminacji komórek Treg już rozpoczęto. Obiecującym i swoistym podejściem może być celowanie w CD25⁺ na powierzchni komórek Treg. Danuell i wsp. użyli połączenia IL-2 z toksyną błoniczą DAB(389)IL-2 (denileukin diftitox) w celu wybiórczej eliminacji komórek Treg wykazujących ekspresję CD25 spośród monojądrzastych komórek krwi obwodowej u chorych z rozpoznaniem nowotworowym bez toksycznego wpływu na inne komórki z ekspresją CD25 utrzymującą się na pośrednim lub niskim poziomie [114]. U chorych na raka nerkowokomórkowego z obecnością przerzutów pod wpływem DAB(389)IL-2 zaobserwowano wyraźne zmniejszenie liczby komórek Treg we krwi obwodowej oraz zniesienie mediowanej przez komórki Treg immunosupresji w warunkach *in vivo*. Ponadto, eliminacja komórek Treg z następczym zastosowaniem szczepienia komórkami dendrytycznymi transferowanymi m-RNA wyraźnie poprawia pobudzenie swoistej T-komórkowej odpowiedzi przeciwnowotworowej w porównaniu z zastosowaniem samego tylko szczepienia.

Podsumowując, pierwsze badania kliniczne wybiórczo eliminujące komórki przyniosły obiecujące wyniki, które wymagają jednakże dalszej oceny.

Powszechne zainteresowanie patofizjologią limfocytów regulatorowych wynika z możliwości terapeutycznego wykorzystania tych komórek jako czynnika modyfikującego odpowiedź immunologiczną w różnorodnych chorobach. W przypadku chorób nowotworowych osłabienie czy zniesienie ich działania może posłużyć jako narzędzie nasilające odpowiedź układu odpornościowego skierowaną przeciw komórkom guza. Teoretycznie jest to możliwe przez użycie przeciwciał monoklonalnych blokujących anty-CD25, co częściowo zostało potwierdzone na modelach zwierzęcych nowotworów [133, 134]. W badaniach na myszach wykazano, iż neutralizacja komórek Treg poprzez wielokrotne iniekcje przeciwciał anty-CD25 lub wybiórcze usunięcie subpopulacji limfocytów $CD4^+CD25^+$ skutkuje zwiększoną odpowiedzią przeciwnowotworową u zwierząt, którym wszczepiono komórki nowotworowe. Badania nad wykorzystaniem przeciwciał neutralizujących komórki Treg zostały ukierunkowane na poszukanie dodatkowego markera, który zwiększyłby swoistość działania takiej terapii. Jako dodatkowe przeciwciało neutralizujące wybrano anty-CTLA-4. Terapia skojarzona z zastosowaniem przeciwciał anty-CD25 i anty-CTLA-4 dała istotnie lepszy wynik, niż z ich zastosowaniem z osobna [135]. Mimo że w badaniach na myszach nie wykazano negatywnego wpływu inaktywacji bądź eliminacji limfocytów Treg, ewentualne zastosowanie tych metod w leczeniu nowotworów u ludzi powinno odbywać się ze szczególną ostrożnością.

Pierwsze próby terapeutycznego wykorzystania limfocytów regulatorowych wydają się obiecujące, jednakże konieczne są dalsze badania pogłębiające wiedzę na temat mechanizmów i efektów ich działania, bowiem niewłaściwe zastosowanie tych komórek może okazać się niebezpieczne i doprowadzić do zaburzeń regulacji odpowiedzi immunologicznej. Osiągnięcia biologii molekularnej oraz możliwości inżynierii genetycznej wydają się kluczowym narzędziem pomocnym w modyfikowaniu funkcji limfocytów regulatorowych oraz ich terapeutycznym zastosowaniu. Manipulacja limfocytami Treg w celach terapeutycznych jest dziedziną ogromnie obiecującą, ale jednocześnie niosącą zagrożenie dysregulacji układu immunologicznego, gdyż zarówno nadmiar, jak i niedobór funkcjonalnie aktywnych limfocytów Treg może doprowadzić do immunopatologii. Uzyskanie dynamicznej równowagi pomiędzy stanem aktywacji i supresji w obrębie układu immunologicznego w zależności od bieżących potrzeb może stać się kluczem do immunoterapii wielu chorób. Należy pamiętać, że limfocyty Treg często działają jako miecz obosieczny, dlatego też wszelkie próby modyfikacji tych komórek u ludzi powinny być prowadzone z wielką ostrożnością.

W badaniach podjętych w bieżącej pracy oceniano odsetek komórek Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ w wysięku nowotworowym u chorych na raka płuca. Uzyskane wyniki potwierdzają te przedstawione wyżej. Na podstawie badań własnych wykazano, że u chorych na raka płuca w wysięku nowotworowym dochodzi do wzrostu odsetka limfocytów Treg w porównaniu do wysięków nienowotworowych. Najwyższy odsetek tych komórek stwierdzono w płynie opłucnowym pochodzącym od chorych, u których w badaniu cytologicznym wykazano obecność komórek nowotworowych. Nie stwierdzono natomiast istotnie statystycznej różnicy w zakresie odsetka pozostałych, spośród badanych komórek tj. limfocytów, komórek $CD4^+$ oraz komórek $CD4^+CD25^+$.

Oceniając zależności między odsetkiem komórek Treg i odsetkiem limfocytów oraz ich poszczególnych subpopulacji, stwierdzono negatywną korelację między odsetkiem Treg a odsetkiem wszystkich limfocytów w każdej z badanych grup, dodatnią korelację między odsetkiem Treg a odsetkiem komórek $CD4^+$ dla większości grup z wyjątkiem II oraz dodatnią korelację między odsetkiem Treg i odsetkiem limfocytów $CD4^+CD25^+$ w każdej z badanych grup.

Jakkolwiek wzrost komórek Treg wydaje się powszechnym zjawiskiem w przypadku guzów litych, to jednak są wyraźne i ciągle niewyjaśnione różnice w tym zakresie między poszczególnymi typami histologicznymi. DeLong i wsp. wykazali istotne statystycznie różnice w zakresie liczebności komórek Treg w wysięku nowotworowym pochodzącym od pacjentów z międzybłoniakiem w porównaniu do tych z rozpoznaniem raka niedrobnokomórkowego płuca czy raka piersi [136]. W badaniach własnych nie udało się przeprowadzić oceny porównawczej w tym zakresie ze względu na dominację jednego typu histologicznego nowotworu (rak gruczołowy) w badanym materiale.

Porównując odsetek limfocytów Treg w grupie chorych z rozpoznaniem raka płuca (grupa I i II) stwierdzono wyższą jego wartość w grupie kobiet w porównaniu do mężczyzn jednak różnice te nie były istotne statystycznie. W literaturze nie znaleziono teoretycznego uzasadnienia dla takiej obserwacji. Kolejnymi analizowanymi cechami demograficznymi były wiek chorego w momencie badania oraz wiek chorego w momencie zgonu. Wykazano dodatnią korelację między wiekiem pacjenta w momencie badania a odsetkiem Treg dla wszystkich badanych grup ale tylko dla chorych z rozpoznaniem raka płuca i obecnymi komórkami nowotworowymi w wysięku miała ona cechy znamienności statystycznej. Podobnie dodatnią korelację stwierdzono również między wiekiem chorego w momencie zgonu a odsetkiem Treg. Zatem im starszy chory tym wyższym odsetkiem Treg się charakteryzował. Podobną zależność wykazali również Sakaguchi i wsp.[55]

Jednym z celów naszych badań była próba wykazania zależności między stopniem zaawansowania choroby nowotworowej a obecnością Treg w wysięku nowotworowym. Stopień zaawansowania choroby określono wg obowiązującej klasyfikacji TNM. Wszyscy chorzy znajdowali się w IV stopniu (najwyższym) zaawansowania choroby, ponieważ zgodnie z aktualnymi zaleceniami obecność wysięku nowotworowego jest traktowana jako przerzut odległy (cecha M1a). Najwyższy odsetek limfocytów Treg stwierdzono w najwyższych stopniach opisujących poszczególne cechy, jednak różnice istotne statystycznie stwierdzono jedynie w zakresie cechy T tj. cechy opisującej wielkość i lokalizację guza pierwotnego. Analiza niezależna od klasyfikacji TNM zależności między odsetkiem Treg a wielkością guza mierzoną w centymetrach wykazała dodatnią korelację tj. odsetek komórek Treg zwiększał się wraz ze wzrostem guza pierwotnego u wszystkich chorych, ale tylko dla grupy I uzyskano wyniki na granicy istotności statystycznej.

Wykazano, że odsetek komórek Treg w wysięku jest wyższy w przypadku obecności przerzutów na opłucnej. Ponadto stwierdzono zwiększenie odsetka Treg wraz ze wzrostem liczby zajętych zmianami przerzutowymi narządów odległych.

Decydujące znaczenie przy kwalifikacji do leczenia jest określenie stopnia sprawności chorego. Stanowi on również ważny czynnik rokowniczy. Im wyższy stopień w skali ECOG tym gorsze rokowanie dla chorego. Teoretycznie należałoby się spodziewać dodatniej korelacji między odsetkiem Treg a stanem sprawności chorego jednak w badaniach własnych nie stwierdzono zależności istotnej statystycznie. Co ciekawe dwie wyodrębnione grupy chorych z rozpoznaniem raka płuca wykazały odmienne wyniki. Dla grupy I miała ta korelacja charakter dodatni dla grupy II zaś negatywny.

Istotną częścią naszych badań było określenie wpływu komórek Treg na czas przeżycia chorych. W każdej z ocenianych grup stwierdzono, że pacjenci z wysokim odsetkiem Treg przeżywali krócej niż osoby z niskim odsetkiem tych komórek, jednak zależność ta nie miała cech znamienności statystycznej. Wzorując się na pracy Griffiths i wsp. [137] podzieliliśmy chorych na dwie grupy w zależności od wielkości odsetka Treg. Czas przeżycia chorych z „normalnym” odsetkiem Treg był dłuższy niż tych w ich „wysokim” odsetkiem. Zaobserwowana różnica nie była jednak istotna statystycznie co można tłumaczyć dużymi rozrzutami wyników w obu grupach o czym świadczą wysokie wartości odchyleń standardowych. Jednak w ocenie zależności czasu przeżycia od rozpowszechnienia Treg z uwzględnieniem osób, które przeżyły dłużej niż czas trwania obserwacji, stwierdzono istotne statyczne różnice między osobami z „wysokim” i „prawidłowym” odsetkiem tych komórek. Ponadto dla grupy z „prawidłowym”

i „wysokim” odsetkiem Treg przeprowadzono analizę regresji wielorakiej w celu określenia zależności czasu przeżycia od trzech zmiennych tj. liczby narządów objętych przerzutami odległymi, wieku chorego w momencie badania oraz stanu sprawności. W obu grupach wykazano istotność statystyczną w tym zakresie.

W trakcie badań podjęto również próbę określenia innych czynników (poza odsetkiem limfocytów Treg) mogących wpłynąć na całkowity czas przeżycia chorego tj. czynników prognostycznych. Stwierdzono istotną statystycznie negatywną korelację między stanem sprawności chorego (PS) ocenianym wg skali ECOG a całkowitym czasem przeżycia dla chorych z obu grup. Stanowi to potwierdzenie dla popartej wieloma dowodami prawidłowości o krótszym czasie przeżycia chorych z wyższym stopniem sprawności w skali ECOG w porównaniu do tych, którzy charakteryzują się niższym stopniem tj. znajdują się w lepszej kondycji fizycznej.

Podobnie negatywnie na czas przeżycia chorych wpływała liczba narządów objętych przerzutami jednak tylko w grupie II miała ona cechy istotności statystycznej. Natomiast zależność między czasem całkowitego przeżycia a wiekiem chorego w momencie rozpoznania również miała charakter negatywny ale tym przypadkiem znamienna była tylko dla grupy I.

Na koniec przeprowadzono analizę jednoczesnego wpływu kilku zmiennych na całkowity czas przeżycia chorych. Pod uwagę wzięto stan sprawności chorego oceniany wg skali ECOG, wiek chorego w momencie badania, odsetek limfocytów Treg oraz liczbę narządów objętych przerzutami odległymi. Dla każdej z tych zmiennych uzyskano ujemne współczynniki co oznacza, że jej wzrost skraca czas całkowitego przeżycia. Ponadto w analizie regresji wielorakiej stwierdzono istotną statystycznie zależność czasu przeżycia od wszystkich czterech wyżej wymienionych zmiennych co dotyczyło grupy I, II oraz wszystkich chorych tj. grupy I+II.

Wcześniejsze badania nad nowotworowymi wysiękami opłucnowymi wskazały szereg mechanizmów mogących odpowiadać za stan immunosupresji w tym mikrośrodku w przebiegu zaawansowanej choroby nowotworowej. Zaliczyć do nich można wysoką ekspresję cząsteczki Fas na limfocytach i wysoką ekspresję FasL na komórkach nowotworowych [138]. Wykazano również niską ekspresję TCR- ζ w limfocytach [139, 140] oraz wysokie stężenie cytokin immunosupresyjnych w tym środowisku [141]. Stwierdzono pronowotworową aktywność makrofagów opłucnowych manifestującą się ich wpływem na ekspresję TCR- ζ oraz aktywność proliferacyjną i ekspresję białek regulujących apoptozę komórek nowotworowych [142, 143]

W świetle badań zaprezentowanych w pracy bieżącej limfocyty T regulatorowe jawią się jako kolejny czynnik odpowiedzialny za stan głębokiej supresji układu odpornościowego w sytuacji zaawansowanej choroby nowotworowej, przynajmniej częściowo sprawczy wobec stwierdzonych wcześniej.

WNIOSKI

1. Odsetek komórek Treg w wyсіękach nowotworowych jest znamienne wyższy w porównaniu z wyсіękami nienowotworowymi.

Różnice te nie występują w odniesieniu do limfocytów, komórek CD4⁺ komórek CD4⁺CD25⁺.

2. W środowisku wyсіęku opłucnowego wzrost odsetka komórek Treg jest związany ze spadkiem odsetka limfocytów oraz wzrostem odsetka komórek CD4⁺CD25⁺.

3. Odsetek Treg zwiększa się wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby i najwyższe wartości osiąga w najbardziej zaawansowanych jej stadium. Jest również wyższy u kobiet niż u mężczyzn.

4. Chorzy z „wysokim” odsetkiem Treg przeżywali krócej niż osoby z „prawidłowym” odsetkiem tych komórek. Do innych pojedynczych czynników prognostycznych dla chorych z rakiem płuca można zaliczyć stan sprawności (PS) oceniany w skali ECOG, liczbę narządów objętych przerzutami odległymi oraz wiek chorego. Ponadto czas przeżycia chorych istotnie zależy od jednoczesnego oddziaływania czterech zmiennych niezależnych, takich jak: stan sprawności chorego, wiek chorego, odsetek limfocytów Treg w wyсіęku nowotworowym oraz liczba narządów objętych przerzutami odległymi.

STRESZCZENIE

Wstęp. Rozprzestrzenienie się procesu nowotworowego na opłucną jest czynnikiem rokowniczo niekorzystnym, z którym związane jest średnie przeżycie chorych rzędu 6-9 miesięcy. W większości przypadków procesowi złośliwemu tak zlokalizowanemu towarzyszy gromadzenie się wysięku w jamie opłucnowej. Komórki nowotworowe, rozsiane lub w postaci ognisk komórkowych, są zawieszane w bogatym w białko płynie, który oprócz nich zawiera liczne komórki układu odpornościowego, w tym limfocyty. Opisano wiele mechanizmów ucieczki nowotworu przed odpowiedzią immunologiczną, u podstaw których leży zjawisko immunosupresji. Komórki Treg są subpopulacją limfocytów T, które odgrywają kluczową rolę w utrzymywaniu tolerancji na antygeny guza. Aktualnie wysuwane hipotezy sugerują, że Treg mają duży wpływ na rozwój i progresję procesu nowotworowego, stąd sugeruje się, że strategie immunoterapeutyczne polegające na usunięciu Treg z mikrośrodowiska guza mogą stanowić przełom w leczeniu chorych na raka.

Celem badań była ocena różnic w zakresie odsetka limfocytów, komórek CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ i Treg między wysiękami nienowotworowymi i płynami wysiękowymi powstałymi w przebiegu choroby nowotworowej, jak również zależności między odsetkiem komórek Treg i odsetkiem limfocytów oraz ich subpopulacji. Podjęto również próbę określenia zależności między rozpowszechnieniem Treg a cechami określającymi stopień zaawansowania choroby nowotworowej oraz próbę oceny jego wartości prognostycznej i predykcyjnej.

Materiał i metody. Badaniem typu „*case control study*” objęto grupę 76 dorosłych chorych z obecnością wysięku w jamie opłucnowej, hospitalizowanych w Oddziale Pulmonologii i Onkologii Pulmonologicznej przy Katedrze i Klinice Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej UM w Poznaniu. Wysięki podzielono na trzy grupy w zależności od wyniku badania cytologicznego: I - wysięki uzyskane od chorych na raka z obecnością komórek nowotworowych (n=30), II – wysięki od chorych na raka bez komórek nowotworowych (n=21), III – wysięki nienowotworowe - grupa kontrolna (n=25). Rozpowszechnienie Treg w wysiękach oceniano metodą cytometrii przepływową. Oceny stopnia zaawansowania procesu nowotworowego dokonano na podstawie najnowszej tj. VII edycji klasyfikacji TNM dla raka płuca, wydanej pod auspicjami IASLC.

Wyniki. Stwierdzono istotnie wyższe wartości odsetkowe limfocytów Treg w grupie chorych z rakiem płuca z obecnością komórek nowotworowych w wysięku nowotworowym w jamie opłucnowej (grupa I) w porównaniu z grupą kontrolną tj. grupą III ($2,68\% \pm 2,09$ versus $1,07\% \pm 0,78$, $p < 0,001$) oraz w grupie chorych z rozpoznaniem raka niezależnie od obecności bądź braku komórek nowotworowych w wysięku (tj. łącznie grupy I+II) w porównaniu z grupą kontrolną ($2,47 \pm 2,17$ versus $1,07\% \pm 0,78$; $p = 0,002$). Nie stwierdzono podobnych różnic w odniesieniu do limfocytów, komórek $CD4^+$ oraz komórek $CD4^+CD25^+$. W środowisku wysięku opłucnowego wzrost odsetka komórek Treg był związany ze spadkiem odsetka limfocytów ($r_s = -0,333$; $p = 0,003$) oraz wzrostem odsetka komórek $CD4^+CD25^+$ ($r_s = 0,371$; $p = 0,001$). Stwierdzono zwiększanie się odsetka Treg wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworowej. Ich rozpowszechnienie było najwyższe u chorych w najbardziej zaawansowanym jej stadium. W grupie pacjentów zmarłych w trakcie obserwacji wykazano negatywną korelację, bez cech znamienności statystycznej, między odsetkiem Treg a czasem przeżycia chorych. Po włączeniu do analizy pacjentów, którzy przeżyli dłużej niż trwał okres obserwacji, uzyskano istotne statystycznie różnice w czasie przeżycia między chorymi z „wysokim” i „prawidłowym” odsetkiem Treg ($p = 0,035$).

Wnioski. Uzyskane dane wskazują na zwiększony odsetek Treg w mikrośrodowisku nowotworowego wysięku opłucnowego w porównaniu z nienowotworowym, jego związek ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej oraz czasem przeżycia chorych. Sugerują słuszność dalszych badań nad modulowaniem aktywności Treg u chorych na raka płuca jako części terapii.

ABSTRACT

Background. Diffusion of cancer in the pleural space portends a dismal prognosis, with life expectancy of six to nine months. In most cases malignancy of this localization is accompanied by effusions. Tumor cells, single or in small clumps, are suspended in a protein rich fluid containing usually large amounts of host cells including tumor associated lymphocytes (TALs). There are many known mechanisms of tumor escape from immune response related to immunosuppression. Treg cells are part of lymphocytes T population, which play a major role in maintaining tolerance to tumor antigens. Current hypotheses suggest that Treg have an effect on human cancer progression, hence immunotherapeutic strategies consisting in selective elimination of Treg from tumor microenvironment might be a landmark in the treatment of cancer patients.

The aim of the study was an evaluation of the lymphocytes, CD4⁺ cells, CD4⁺CD25⁺ cells and Treg difference between malignant effusion and study control, as well as the relationship between Treg frequency and percentage of lymphocytes and their subpopulations. Additionally, the determination of the relationship between Treg cells' frequency and the disease status was made. Prognostic and predictive value of Treg frequency in the malignant pleural effusion was also analyzed.

Material & Methods. It was “*case control study*” type of research. Samples of pleural effusions from 76 patients hospitalized at Pulmonology, Allergology and Lung Oncology Department at Poznan University of Medical Sciences were analyzed by conventional cytology. Thoracocentesis was performed in all patients for diagnostic purposes. Biological materials were divided into three groups: malignant pleural effusions with malignant cells (n=30), effusions from patients with malignancy but without malignant cells in effusions (n=21), and non-malignant pleural effusions (n=25). The Treg levels (%) were measured utilizing a flow cytometry assay for whole lymphocytes in CD4⁺ cells. The degree of disease advance was established according to the 7th IASCL edition of TNM lung cancer classification.

Results. We have shown that there is a significantly increased frequency of Treg in lung cancer patients with malignant cells in pleural effusions (group I) compared to study control (2,68% ± 2,09 *versus* 1,07% ± 0,78; **p<0,001**), as well as in all patients with lung cancer regardless of absence or lack of malignant cells in pleural effusions (group I+II together) compared to study control (2,47±2,17 *versus* 1,07% ± 0,78; **p=0,002**). There

were no similar differences with reference to lymphocytes, CD4⁺ cells and CD4⁺CD25⁺ cells. In malignant pleural effusions, the increased percentage of Treg was related to the decreased level of lymphocytes ($r_s = -0,333$; $p = 0,003$) and the increased level of CD4⁺CD25⁺ cells ($r_s = 0,371$; $p = 0,001$). The data showed the association between higher Treg cells level in pleural effusion and more advanced disease stage. The highest frequency of Treg was found in patients with the highest stage of the disease. In patients who died during observation, the negative correlation (without statistical significance) between Treg frequency and the overall survival was shown. When surviving patients were incorporated into that analysis, significant statistical differences in the overall survival were revealed between patients with high and normal levels of Treg ($p=0,035$).

Conclusion. The data confirms an increased percentage of Treg in microenvironment of malignant pleural effusion compared to study control, and the relationship between an increased level of Treg and disease stage and overall patients' survival. Such results provide impetus to further investigation into the modulation of Treg activity in lung cancer patients as part of their therapy.

PIŚMIENNICTWO

1. WHO: Cancer health topic. <http://www.who.int/cancer/en/index.html>. Revised: May 7 2010.
2. Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2006 roku. Biuletyn 2006 r. Centrum onkologii – Instytut, Warszawa 2008.
3. Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Lasota MB, Coebergh JW., Santaquilni, and the EUROCORE Working group. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-1999: results of the EUROCORE-4 study. *Lancet Oncol* 2007; 8, 8: 773-783.
4. Parkin EM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 33-64.
5. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *BMJ* 1950; 2: 739-748.
6. Ramlau R, Didkowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W, Dyszkiewicz W. Sytuacja epidemiologiczna w Wielkopolsce dotycząca nowotworów złośliwych płuca w latach 1975-2002. *Pneumonol Alergol Pol* 2006; 74: 179-185.
7. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003; 123 (suppl.1): 21.
8. Wang NS. Anatomy of the pleura. *Clin Chest Med* 1998; 19: 229-240.
9. Krenke R. Fizjologia i patofizjologia opłucnej. PZWL, Warszawa 1997.
10. Fujimo S, Yokohama A, Kohno N, Hiwada K. Interleukin 6 as an autocrine growth factor for normal human pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14: 508-515.
11. Anthony VB, Hott JW, Kunkel SL, Godbey SW, Burdick MD, Strieter RM. Pleural mesothelial cell expression of C-C (monocyte chemotactic peptide) and C-X-C (interleukin 8) chemokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 581-588.
12. Philip Joet F, Alessi MC, Philip-Joet C, et al. Fibrinolytic and inflammatory processes in pleural effusions. *Eur Respir J* 1995; 8: 1352-1356.
13. Yetkin O, Tek I, Kaya A, Ciledog A, Numanoglu N. A Simple laboratory measurement for discrimination of transudative and exudative pleural effusions: pleural viscosity. *Respir Med* 2006, 100: 1286-1290.

14. Ferrer J, Roldan J. Clinical management of patient with pleural effusion. *Eur J Radiol* 2000; 34: 76-86
15. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972; 77: 507-513.
16. Marel M, Stastny B, Melinova L, Svandova E, Light RW. Diagnosis of pleural effusions. Experience with clinical studies. *Chest* 1995; 107: 1598-1603.
17. Chernow B, Sahn SA. Carcinomatous involvement of the pleura. Ana analysis of 96 patients. *Am J Med* 1977; 63: 695-702
18. Rodriguez-Panadero F, Borderas Naranjo F, Lopez-Mejias J. Pleural metastatic tumours and effusions: frequency and pathogenic mechanisms in a postmortem series. *Eur Respir J* 1989; 2: 366–369.
19. Antony VB, Laddenkemper R, Astoul P et al. Management of malignant pleural effusions. *Eur Respir J* 2001; 18: 402-419.
20. Shuey K, Payne Y. Malignant pleural effusion. *Clin J Oncol Nurs* 2005; 9: 529-532
21. Dogmala W, Emeson E, Kass LG. Distribution of T-lymphocytes and B-lymphocytes In periphelial blond and effusions In patients with cancer. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 295-300.
22. Prakash URS, Reiman HM. Comparison of needle biopsy with cytologic analysis for the evaluation of pleural effusion: analysis of 414 cases. *Mayo Clin Proc* 1985; 60: 158-164.
23. Poe RE, Israel RH, Utell MJ, Hall WJ et al. Sensitivity, specificity, and predictive values of closed pleural biopsy. *Arch Intern Med* 1984; 144: 325-328.
24. Burnet M. Cancer: a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1957; 1 (5022): 779-86.
25. Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* 1957; 1 (5023): 841-847.
26. Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med*, 2008; 358 (25): 2704-2715.
27. Waldmann TA. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* 2003; 9(3): 269-277.
28. Armstrong AC, Eaton D, Ewing JC. Science, medicine, and the future: Cellular immunotherapy for cancer. *BMJ* 2001;323(7324):1289-93.

29. Nagorsen D, Scheibenbogen C, Marincola FM, Letsch A, Keilholz U. Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4296-4303.
30. Armstrong T, Clements V, Martin B, Ting J, Ostrand-Rosenberg S. Major histocompatibility complex class II-transfected tumor cells present endogenous antigen and are potent inducers of tumor-specific immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6886-6891
31. Shawler DL, Fakhrai H, Van Beveren C, et al. Gene Therapy Approaches to Enhance Antitumor Immunity. *Adv Pharmacol* 1997; 40: 309-337
32. Kobayashi A, Hara H, Ohashi M. Allogeneic MHC Gene Transfer Enhances an Effective Antitumor Immunity in the Early Period of Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7469-7479
33. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, et al. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses *in vivo*. *Nature Medicine* 1999; 5: 405-411.
34. Gruijl TD, Curiel DT. Cancer vaccine strategies get bigger and better. *Nature Medicine* 1999; 5: 1124-1125.
35. Knutson KL, Schiffman K, Disis ML. Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. *J Clin Invest* 2001; 107: 477-484
36. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy moving beyond current vaccines. *Nature Medicine* 2004; 10: 909-915.
37. Barve M, Bender J, Senzer N, Cunningham C, Greco FA, McCune D, et al. Induction of Immune Responses and Clinical Efficacy in a Phase II Trial of IDM-2101, a 10-Epitope Cytotoxic T-Lymphocyte Vaccine, in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4418-4425
38. Jakóbsiak M, Lasek W. Immunologia nowotworów. In: Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W, Stokłosa T, editors. 5th Ed. *Immunologia*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 2007; 28: 478-495
39. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 2007; 37(1): 14-16
40. Mantovani A, Sica A, Locati M: Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005; 23(4): 344-346

41. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Zembala M: Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes. *Immunol Lett* 2007; 113(2): 76-82
42. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A: Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23(11): 549-555.
43. Gordon S: Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(1): 23-35.
44. Ferrane S, and Pellegrino MA. Cytotoxic antibodies to cultured melanoma cells in the sera of melanoma patients. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 1201 -1204.
45. Nazareth MR, Broderick L, Simpson-Abelson M-R, Kelleher R-J, Yokota S-J, Bankert RB. Characterization of Human Lung Tumor-Associated Fibroblasts and Their Ability to Modulate the Activation of Tumor-Associated T Cells. *J Immunol* 2007; 178: 5552-5562
46. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21(2): 137-148
47. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 807-839.
48. Olver S, Apte S, Baz A, Kienzle N. The duplicitous effects of interleukin 4 on tumour immunity: how can the same cytokine improve or impair control of tumour growth? *Tissue Antigens* 2007; 69(4): 293-298
49. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 425-456.
50. Sharpe AH, Abbas AK. T-cell costimulation - biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med* 2006; 355(10): 973-975.
51. Korman A, Yellin M, Keler T et al. Tumor immunotherapy: preclinical and clinical activity of anti-CTLA 4 antibodies. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6(6): 582-591.
52. Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer* 2002; 101(2): 151-155.
53. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunol* 1979; 21: 903-914.
54. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunol* 1970; 18: 723-737.

55. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptors α -chains (25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164.
56. Choraży-Massalska M, Kontny E, Maśliński W. The immune response control by natural (CD4+CD25+) regulatory T cells. *Post Bil Kom* 2006; 33: 772-778.
57. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Tchórzewski H. CD4+CD25+ T regulatory cells: their physiology and role in modulating immune response. *Post Hig Med Dosw* 2005; 59: 362-370.
58. Żylicz M, Bocian K, Korczak-Kowalska G. Regulatory cells: their development, mechanisms and effects of action, and their potential use in transplantation. *Post Hig Med Dosw* 2005; 59: 160-171.
59. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. *Immunologia*. Wydanie II polskie pod red. J. Żeromskiego. Wrocław: Elsevier Urban & Partner; 2008..
60. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Tchórzewski H. CD4+CD25+ T regulatory cells in pathophysiology and therapy of immunologic diseases. *Post Hig Med Dosw* 2005; 59: 371-376.
61. Ryba M, Myśliwska J. Biologia naturalnych limfocytów regulatorowych CD4+CD25+. *Post Biol Kom* 2006; 33: 427-436.
62. Wang X, Zheng J, Liu J et al. Increased population of CD4+CD25 high regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol* 2005; 75: 468–476.
63. Gray CP, Arosio P, Hersey P: Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4+CD25+ regulatory T-Cell levels in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2551–2559.
64. Wolf AM, Wolf D, Steurer M et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 606–612.
65. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies. Possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003; 98: 1089–1099.
66. Unitt E, Rushbrook M, Marshall R et al. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology* 2005; 41: 722–730.

67. Beyer M, Kochanek M, Darabi K et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25 hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* 2005; 106: 2018–2025.
68. Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942–949.
69. Ichihara F, Kono K, Takahashi A et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4404–4408.
70. Woo EY, Yeh H, Chu CS et al. Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 2002; 168: 4272–4276.
71. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169: 2756–2761.
72. Kawaida H, Kono K, Takahashi A et al. Distribution of CD4(+) CD25 high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. *J Surg Res* 2005; 124: 151–157.
73. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ et al. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 107: 3639–3646.
74. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z et al. CD 127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4(+) T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701-1711.
75. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1693-1700.
76. Ziegler SF. FOXP3: Of Mice and Men. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 209–226.
77. Badoual C, Hans S, Rodriguez J et al. Prognostic value of tumor infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 465–472.
78. Sato E, Olson SH, Ahn J et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with

- favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18538–18543.
79. Betts GJ, Clarke SL, Richards HE, Godkin AJ, Gallimore AM. Regulating the immune response to tumours. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006; 58: 948-961.
 80. Shevach EM. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Rev Immunol* 2002; 2: 389-400.
 81. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 263-274.
 82. Von Herrath MG, Harrison LC. Regulatory Lymphocytes: antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nature Rev Immunol* 2003; 3: 223-232.
 83. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumour variants in the generation of “tumour escape” phenotypes. *Nature Immunol* 2002; 3: 999-1005.
 84. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunol* 2005; 6: 345-352.
 85. Nishikawa H, Jager E, Ritter G et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control the induction of antigenspecific CD4+ helper T cell responses in cancer patients. *Blood* 2005; 106: 1008–1011.
 86. Nishikawa H, Qian F, Tsuji T et al. Influence of CD4+CD25+ regulatory T cells on low/high-avidity CD4+ T cells following peptide vaccination. *J Immunol* 2006; 176: 6340–6346.
 87. Maloy KJ, Salaun L, Cahill R et al. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003; 197: 111–119.
 88. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202: 1075–1085.
 89. Smyth MJ, Teng MW, Swann J et al. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol* 2006; 176: 1582–1587.
 90. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumours from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 4766-4772.

91. Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R et al. Inhibition of cytotoxic T lymphocyte proliferation by autologous CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells in colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor- β . *Cancer Res* 2002; 62: 5267-5272.
92. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 2457–2464.
93. Karube K, Ohshima K, Tsuchiya T, et al. Expression of FoxP3, a key molecule in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. *Br J Haematol* 2004; 126: 81-84.
94. Marshall NA, Christie LE, Munro LR et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004; 103: 1755–1762.
95. Viguier M, Lemaitre F, Verola O, et al. Foxp3 expressing CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 2004; 173: 1444-1453.
96. Hiura T, Kagamu H, Miura S et al. Both regulatory T cells and antitumor effector T cells are primed in the same draining lymph nodes during tumor progression. *J Immunol* 2005; 175: 5058–5066.
97. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H et al. 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.
98. Roncador G, Garcia JF, Garcia JF et al.: FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Leukemia* 2005; 19: 2247–2253.
99. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1467–1473.
100. Chen YQ, Shi HZ, Qin XJ et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in malignant pleural effusion. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1434–1439.
101. Huber S, Schramm S, Lehr HA et al. Cutting edge: TGF- β signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Immunol* 2004; 173: 6526–6531.

- 102.** Peng Y, Laouar Y, Li MO, et al. TGF beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4572–4577.
- 103.** Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005; 202: 919–929.
- 104.** Suttmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001; 194: 823–832.
- 105.** Prasad SJ, Farrand KJ, Matthews SA, et al. Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 174: 90–98.
- 106.** Golgher D, Jones E, Powrie F, et al. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol* 2002; 32: 3267–3275.
- 107.** Yu P, Lee Y, Liu W, et al. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med* 2005; 201: 779–791.
- 108.** Needham DJ, Lee JX, Beilharz MW. Intra-tumoural regulatory T cells: a potential new target in cancer immunotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 684–691.
- 109.** Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004; 34: 336–344.
- 110.** Taieb J, Chaput N, Scharz N, et al. Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *J Immunol* 2006; 176: 2722–2729.
- 111.** Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, et al. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 2005; 174: 2591–2601.

112. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 666–675.
113. Foss FM. DAB(389) IL-2 (denileukin diftitox, ONTAK): a new fusion protein technology. *Clin Lymphoma* 200; 1 (Suppl. 1): 27–31.
114. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 3623–3633.
115. Attia P, Maker AV, Haworth LR, et al. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (denileukin diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother* 2005; 28: 582–592.
116. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002; 298: 850–854.
117. Schaefer C, Kim GG, Albers A, et al. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 913–920.
118. Fattorossi A, Battaglia A, Ferrandina A, et al. Lymphocyte composition of tumor draining lymph nodes from cervical and endometrial cancer patients. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 106-115.
119. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982; 5: 649-655.
120. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The New Lung Cancer Staging System. *Chest* 2009; 136: 260-271.
121. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006; 108: 804–811.
122. Ruter J, Barnett BG, Kryczek I, et al.: Manipulating T Regulatory Cells In Cancer Immunotherapy. *Exp Rev Derm* 2006; 1: 589-59.
123. Javia LR, Rosenberg SA. CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother* 2003; 26: 85-93.

124. Gray CP, Arosio P, Hersey P. Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell levels in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2551-2559.
125. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, et al. CD4⁺ CD25^(high) regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1064-1071.
126. Motta M, Rassenti L, Shelvin BJ, et al. Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1788-1793.
127. Beyer M, Kochanek M, Giese T, et al. *In vivo* peripheral expansion of naive CD4⁺CD25^{high} FOXP3⁺ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood* 2006; 107: 3940-3949.
128. Fattorossi A, Battaglia A, Ferrandina G, et al. Neoadjuvant therapy changes the lymphocyte composition of tumor-draining lymph nodes in cervical carcinoma. *Cancer* 2004; 100: 1418-1428.
129. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 665-674.
130. Zhang H, Chua KS, Guimond M, et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med* 2005; 11: 1238-1243.
131. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 2006; 107: 2409-2414.
132. Chakraborty NG, Chattopadhyay S, Mehrotra S, Chhabra A, Mukherji B. Regulatory T-cell response and tumor vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes in human melanoma. *Hum Immunol* 2004; 65: 794-802.
133. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194: 629-644.
134. Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 2004; 200: 771-782.

135. Hiura T, Kagamu H, Miura S, et al. Both regulatory T cells and antitumor effector T cells are primed in the same draining lymph nodes during tumor progression. *J Immunol* 2005; 175: 5058-5066.
136. DeLong P, Carroll RG, Henry AC et al. Regulatory T cells and cytokines in malignant pleural effusions secondary to mesothelioma and carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 342-346.
137. Griffiths RW, Elkord E, Gilham DR et al. Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 1743-1753.
138. Sikora J, Żeromski J: Expression of Fas, Fas-L and apoptosis of tumor associated lymphocytes and tumor cells from malignant pleural effusions. *Nat Immun* 1998; 16: 244-255.
139. Sikora J, Dworacki G, Żeromski J: Expression of TCR- ζ chain of tumor associated lymphocytes from malignant pleural effusions. in: *Progress in Basic and Clinical Immunology*, ed.: A. Mackiewicz et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001; 495: 325-329.
140. Sikora J, Żeromski J: Expression of TCR- ζ chain and apoptosis in subpopulations of tumor associated lymphocytes (TALs) from malignant pleural effusions. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40: 347-351.
141. Sikora J, Dworacki G, Kaczmarek M et al.: Immunosuppressive mechanisms in the microenvironment of malignant pleural effusions. *Cancer Detection and Prevention* 2004; 28: 325-330.
142. Sikora J, Dworacki G, Giersz R et al.: The role of monocytes/ macrophages in TCR- ζ chain downregulation and apoptosis of T lymphocytes in malignant pleural effusions. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents* 2004; 18: 26-33.
143. Kaczmarek M, Frydrychowicz M, Nowicka A et al.: Influence of pleural macrophages on proliferative activity and apoptosis regulating proteins of malignant cells. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59: 321-330.