

Subpopulacje komórek dendrytycznych krwi obwodowej w przebiegu chemioterapii raka jajnika

Subpopulations of peripheral blood dendritic cells during chemotherapy of ovarian cancer

Wertel Iwona, Polak Grzegorz, Barczyński Bartłomiej, Kotarski Jan

I Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie

Wstęp: Rak jajnika jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym narządu płciowego. Standardowym leczeniem zaawansowanego raka jajnika jest chirurgia połączona z chemioterapią. Niestety cytostatyki działają także na komórki zdrowe, szczególnie te, które ulegają dynamicznym podziałom komórkowym, w tym komórki szpiku będące prekursorami elementów morfotycznych układu odpornościowego. Niewiele wiadomo na temat wpływu chemioterapii na ilość i funkcje komórek dendrytycznych (DCs), które są najbardziej efektywnymi komórkami prezentującymi antygen.

Cel pracy: Celem badań była ocena subpopulacji komórek dendrytycznych we krwi obwodowej pacjentek z rakiem jajnika w przebiegu chemioterapii (taksol + cisplatyna).

Materiał i metoda: DCs mieloidalne (MDCs) i limfoidalne (LDCs) oceniono metodą cytometrii przepływowej u 37 chorych przed podaniem cytostatyków oraz po 9 i 15 tygodniach leczenia.

Wyniki: Odsetek mieloidalnych i limfoidalnych DCs wśród mononuklearów był istotnie niższy u kobiet z rakiem jajnika niż u kobiet zdrowych (0,09% i 0,04% vs 0,25% i 0,33%). Po 9 oraz 15 tygodniach leczenia cytostatykami obserwowano zbliżone wartości odsetkowe zarówno mieloidalnych (0,08% i 0,08%) jak też limfoidalnych DCs (0,06% i 0,08%). Po 9 oraz 15 tygodniach leczenia stosunek DCs mieloidalnych do limfoidalnych (1,33 i 1,33) był istotnie niższy w porównaniu do odnotowanego przed leczeniem (1,66).

Wnioski: Wykazano istotnie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej odsetek DCs mieloidalnych i limfoidalnych u kobiet z rakiem jajnika przed, jak też po 9 i 15 tygodniach leczenia cytostatykami. Odnotowano znamienne statystycznie różnice w proporcji MDCs i LDCs u kobiet przed chemioterapią oraz po 9 i 15 tygodniach leczenia.

Słowa kluczowe: **komórki dendrytyczne / rak jajnika / chemioterapia / cytometria przepływowa /**

Adres do korespondencji:

Iwona Wertel
I Katedra i Klinika Ginekologii AM w Lublinie
ul. Staszica 16, 20-081 Lublin
e-mail: iwonawertel@wp.pl

Otrzymano: 25.07.2007

Zaakceptowano do druku: 31.08.2007

Abstract

Peripheral blood dendritic cells subpopulations in women with ovarian carcinoma during chemotherapy

Objectives: Ovarian carcinoma (OVC) is often diagnosed at an advanced stage and requires effective chemotherapy as a first-line treatment. However, chemotherapy may be associated with significant side-effects, like nausea, vomiting, hair loss, cognitive dysfunction, fatigue and changes in sexual functioning. Leucopenia is one of the most common and dangerous side effects of chemotherapy. Little is known about possible effects of chemotherapy on dendritic cells (DCs) counts and function, although it is well documented that primary and secondary cell-mediated immune response are suppressed during this treatment.

Design: In this study we evaluated the myeloid and lymphoid DCs in the peripheral blood (PB) of 37 women with OVC before and after first-line based on platin and taxane chemotherapy, and in 24 healthy blood donors. Patients received 6 courses of treatment, administered at 21-day intervals.

Material and Methods: The myeloid (M) and lymphoid (L) DCs were estimated by flow cytometry before and after 9th and 15th week of treatment.

Results: The percentage of both MDCs and LDCs was significantly lower (0.09% and 0.04%) in PB of patients with ovarian cancer comparing to healthy women (0.25% and 0.33%).

The percentage of both, myeloid and lymphoid DCs after 9th and 15th week (0.08% vs 0.08% and 0.06% vs 0.08%) of chemotherapy did not differ from that found before treatment (0.09% and 0.04%).

The Myeloid to Lymphoid DCs ratio was significantly lower in patients receiving chemotherapy.

Key words: DCs / chemotherapy / ovarian cancer / flow cytometry /

Wstęp

Komórki dendrytyczne (DCs) pochodzą z komórek macierzystych szpiku (CD34⁺) skąd poprzez krew dostają się do tkanki łącznej większości narządów, gdzie jako śródmiąższowe DCs pełnią rolę wartowników broniących organizm przed obcymi antygenami. DCs należą do leukocytów najbardziej wyspecjalizowanych w prezentacji antygenów. W porównaniu z innymi komórkami prezentującymi Ag – makrofagami czy limfocytami B są one ponad 100-krotnie bardziej efektywne w indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej [1, 2].

Prekursory DCs docierają do guza nowotworowego i mogą przejmować antygeny komórek nowotworowych, a potem po osiedleniu się w obwodowych węzłach chłonnych prezentować je dziewiczemu limfocytom T, pomocniczemu CD4⁺ i cytotoksycznym, indukując odpowiedź immunologiczną [3]. Komórki dendrytyczne mogą również uczestniczyć w rozwoju tolerancji immunologicznej [4].

U ponad 70% chorych rak jajnika rozpoznawany jest w III-IV stopniu klinicznego zaawansowania zaś pięcioletnie przeżycia dla wszystkich stopni nie przekraczają 30% [5].

Rozwój nowotworu warunkowany jest przede wszystkim występowaniem zmian genetycznych w komórkach transformowanych nowotworowo ale także zmienioną odpowiedzią układu odpornościowego na nowotwór. Pojawia się tolerancja immunologiczna, w której komórki nowotworowe i cytotoksyczne limfocyty (CD8⁺) koegzystują, a atak limfocytów przeciw komórkom nowotworowym jest zahamowany [3].

Leczenie chirurgiczne wraz z chemioterapią opartą o taksony oraz pochodne platyny stanowi powszechny sposób leczenia zaawansowanego raka jajnika. Niestety cytostatyki działają także na komórki zdrowe, zwłaszcza te, które ulegają szybkim podziałom komórkowym, w tym komórki szpiku kostnego będące prekursorami elementów morfotycznych układu odpornościowego [6, 7, 8].

Cel pracy

Celem naszych badań była ocena subpopulacji komórek dendrytycznych we krwi obwodowej pacjentek z rakiem jajnika w przebiegu chemioterapii (taksol + cisplatyna).

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 37 kobiet leczonych operacyjnie z powodu III^o lub IV^o raka jajnika. U badanych pacjentek stwierdzono nowotwór w stopniu zróżnicowania wg WHO: G2 (n=18), G3 (n=17) oraz u 2 pacjentek w stopniu G1. Ocena histopatologiczna wykazała obecność: raka surowiczego w n=26, endometrioidalnego w n=8, niezróżnicowanego w n=1, jasnokomórkowego w n=1 oraz śluzowego w n=1 przypadkach. U chorych zastosowano schemat leczenia adiuwantowego paklitaksel w dawce 135mg/m² we wlewie 24 godzinnym i cisplatynę w dawce 75mg/m², obejmujący 6 kursów, co 21 dni. DCs mieloidalne i limfoidalne oceniono we krwi chorych przed podaniem cytostatyków oraz po 9 i 15 tygodniach od rozpoczęcia chemioterapii. Grupę kontrolną stanowiły zdrowe dawczynie krwi (n=24); średnia wieku 27 lat.

DCs oceniane były w cytometrze przepływowym przy użyciu przeciwciał monoklonalnych anty-BDCA-1(CD1c) FITC/anty-CD19 CyChrome oraz anty-BDCA-2 FITC/anty-CD123 PE. Wyniki przedstawiono jako odsetek mieloidalnych i limfoidalnych DCs wśród komórek jednojądrzastych (PBMC). U badanych pacjentek oceniano także leukocytozę, stężenie komórek jednojądrzastych w 1ml krwi przy użyciu komory Neubauera oraz stężenie antygeny CA125 w surowicy krwi. Stężenie antygeny CA125 oznaczono przy użyciu zestawu VIDAS[®] CA 125 II[™] firmy bioMerieux - France (Nr kat. 30426). Zestaw przeznaczony jest do pomiaru stężenia Ca 125 metodą enzymoimmunofluorescencyjną (ELFA) na automatycznym analizatorze immunoserologicznym VIDAS[®].

Subpopulacje komórek dendrytycznych krwi obwodowej w przebiegu chemioterapii raka jajnika.

Tabela I. Komórki dendrytyczne mieloidalne i limfoidalne wyrażone w odsetku komórek jednojądrzastych u chorych na raka jajnika przed oraz w trakcie chemioterapii.

Badane pacjentki (n=37)	Stężenie PBMC (x 10 ⁶)	O c e n i a n e p a r a m e t r y			
		Leukocytoza	Mieloidalne DCs (%)	Limfoidalne DCs (%)	Stosunek M/L DCs
przed chemioterapią	2,6 (0,40-8,80)	7000 (4800-13100)	0,09 (0,02-0,35)	0,04 (0,04-0,48)	1,66
po 9 tyg. chemioterapii	*3,0 (0,4-13,4)	6700 (2900-54400)	0,08 (0,02-0,61)	0,06 (0,02-0,48)	1,33
po 15 tyg. chemioterapii	1,4 (0,6-14,6)	**6200 (2100-25300)	0,08 (0,02-0,71)	0,08 (0,02-0,63)	1,33
Grupa kontrolna (n=24)	*3,4 (1,2-12,5)	**5700 (4200-9100)	***0,25 (0,08-0,88)	***0,33 (0,07-0,89)	1,06

*p<0,05 w porównaniu do odnotowanego przed oraz *p<0,0005 po 15 tygodniach leczenia.

**p<0,04 w porównaniu do odnotowanej po 9 tygodniach leczenia oraz **p<0,004 w porównaniu do odnotowanej przed leczeniem

***p< 0, 000001 w porównaniu do odnotowanego przed oraz po 9 i 15 tygodniach leczenia

Wyniki

Odsetek mieloidalnych i limfoidalnych DCs wśród komórek jednojądrzastych u kobiet z rakiem jajnika przed leczeniem jak też po 9 i 15 tygodniach leczenia cytostatykami był istotnie niższy niż u kobiet zdrowych. (Tabela I).

Po 9 i 15 tygodniach leczenia cytostatykami odnotowano zbliżone wartości odsetkowe zarówno mieloidalnych, jak też limfoidalnych DCs. (Tabela I).

Po 9 oraz 15 tygodniach chemioterapii stosunek DCs mieloidalnych do limfoidalnych był istotnie statystycznie niższy w porównaniu do odnotowanego przed leczeniem (p=0,04 i p=0,02).

Stężenie PBMC w 1ml krwi obwodowej kobiet zdrowych oraz pacjentek po 9 tygodniach chemioterapii było istotnie wyższe od odnotowanego przed oraz po 15 tygodniach leczenia. (Tabela I).

W żadnej z badanych grup nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem PBMC a odsetkiem mieloidalnych i limfoidalnych DCs.

Leukocytoza w grupie kontrolnej była istotnie niższa od odnotowanej przed leczeniem (p=0,003) i nie różniła się od odnotowanej po 9 i 15 tygodniach leczenia (p=0,44 i p=0,58).

Leukocytoza odnotowana po 15 tygodniach chemioterapii była istotnie niższa niż po 9 tygodniach leczenia (p=0,03).

Nie wykazano różnicy istotnej statystycznie w stężeniu leukocytów przed leczeniem oraz po 9 i 15 tygodniach leczenia. U pacjentek przed leczeniem wykazano ujemną korelację pomiędzy leukocytozą i odsetkiem mieloidalnych oraz limfoidalnych DCs (p=0,005, R=-0,44 i p=0,03, R=-0,34).

Nie wykazano korelacji pomiędzy leukocytozą i DCs po 9 i 15 tygodniach leczenia.

Stężenie antygenu CA125 po 9 oraz po 15 tygodniach leczenia cytostatykami (11,94U/ml i 10,97U/ml) było istotnie niższe (p=0,000001 i p=0,00005) w porównaniu do odnotowanego przed leczeniem (74,46U/ml).

Nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem antygenu CA125 i odsetkiem mieloidalnych i limfoidalnych DCs przed oraz po 9 i 15 tygodniach leczenia.

Dyskusja

Rak jajnika rozpoznawany jest zazwyczaj w zaawansowanym stadium i dlatego też wyniki ich leczenia są złe a umieralność z tego powodu bardzo duża. Długi okres rozwoju guza bez objawów klinicznych choroby związany jest między innymi z faktem nierozpoznawania nowotworu przez układ odpornościowy [5]. Jest niezrozumiałym, że tak duże guzy, tak bardzo różniące się makroskopowo od tkanki zdrowej nie są rozpoznawane jako obce i eliminowane przez układ immunologiczny. Spekulować możemy, że taka sytuacja jest możliwa w przypadkach bardzo dużego podobieństwa antygenowego tkanki chorej do prawidłowej lub też przy niewydolności układu immunologicznego, szczególnie w zakresie rozpoznawania obcych antygenów.

W prezentowanej pracy oceniano, we krwi obwodowej pacjentek z rakiem jajnika leczonych chemioterapią, subpopulacje komórek dendrytycznych, które są najbardziej efektywnymi komórkami prezentującymi antygen. U badanych pacjentek wykazaliśmy obecność mieloidalnych i limfoidalnych DCs wśród PBMC, jednakże ich odsetek przed leczeniem, jak też po 9 i 15 tygodniach leczenia cytostatykami, był istotnie niższy niż u kobiet zdrowych. Podobne wyniki uzyskali Almand i wsp. [9] u pacjentów z rakiem piersi, głowy i szyi oraz płuc. Również Savary i wsp. [10] wykazali niższy, w porównaniu do odnotowanego u kobiet zdrowych, odsetek DCs u kobiet z rakiem piersi leczonych chemioterapią (0,75% i 0,36%).

Odnotowano zbliżone wartości odsetkowe zarówno mieloidalnych, jak też limfoidalnych DCs u kobiet przed chemioterapią oraz po 9 i 15 tygodniach leczenia cytostatykami.

Obserwacje nasze są nieco odmienne od wykazanych przez Markowicza i wsp. [11] którzy oceniali całkowitą liczbę DCs u 13 pacjentów z chłoniakiem i 23 pacjentów z guzami litymi. Wspomniani autorzy oceniali DCs przed chemioterapią oraz po pierwszym, drugim i trzecim tygodniu leczenia a także po 3 tygodniach od ostatniego kursu. Wykazali oni, iż całkowita liczba DCs obniżyła się istotnie po pierwszym tygodniu leczenia (p<0,002), wzrosła w drugim tygodniu leczenia i osiągnęła wartość wyjściową po trzecim tygodniu chemioterapii (p<0,05). Markowicz i wsp. [11] nie zaobserwowali natomiast różnicy w liczbie DCs ocenianej po trzech tygodniach od ostatniego kursu.

Wertel I, et al.

Obserwowane różnice mogą wynikać z różnej metodyki badań wykorzystanej do oceny DCs, jak też oceny DCs w różnych histologicznie guzach: chłoniak, guzy lite i rak jajnika. W pracy Markowicza i wsp.[11] DCs oceniane były jako komórki wykazujące ekspresję antygeny HLA-DR, nie wykazujące ekspresji antygenów charakterystycznych dla leukocytów lin-. W naszej pracy, podobnie jak we wcześniejszym badaniu [12], wykorzystaliśmy przeciwciała: anti-BDCA-1 do oceny mieloidalnych DCs oraz BDCA-2 do oceny limfoidalnych DCs.

Ciekawą obserwacją wydają się odnotowane w naszych badaniach znamienne statystycznie różnice w proporcji mieloidalnych i limfoidalnych DCs u kobiet przed chemioterapią oraz po 9 i 15 tygodniach leczenia. Na uwagę zasługuje odnotowanie u leczonych pacjentek niższego niż przed chemioterapią stosunku DCs mieloidalnych do limfoidalnych wyrażonych jako odsetek mononuklearów.

Nie znamy mechanizmów powodujących przesunięcie proporcji w kierunku zwiększonej koncentracji DCs limfoidalnych w przebiegu chemioterapii. Jednakże w świetle prezentowanego przez Zou i wsp. [13] poglądu, że limfoidalne DCs mogą indukować stan tolerancji immunologicznej w stosunku do antygenów nowotworowych wyniki nasze wydają się interesujące. Niewykluczone, że limfoidalne DCs w trakcie chemioterapii mogą hamować antygenowo-specyficzną odpowiedź immunologiczną i indukować stan immunosupresji. Jakkolwiek potrzebne są dalsze badania w celu zweryfikowania tej hipotezy.

Wnioski

1. Wykazano istotnie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej odsetek DCs mieloidalnych i limfoidalnych u kobiet z rakiem jajnika przed, jak też po 9 i 15 tygodniach chemioterapii.
2. U pacjentek z rakiem jajnika nie zaobserwowano wpływu pierwszorazowej chemioterapii (taksol+cisplatyna) na odsetek mieloidalnych i limfoidalnych DCs.
3. Odnotowano znamienne statystycznie różnice w proporcji MDCs i LDCs u kobiet przed chemioterapią oraz po 9 i 15 tygodniach leczenia cytostatykami.

Praca zgłoszona na Konferencję Naukowo-Szkoleniową nt. „Immunoterapia w ginekologii i położnictwie” w Lublinie 12-13.10.2007

Przeprowadzone badania były finansowane z grantu KBN 2PO5E 120 27

Piśmiennictwo

1. Di Nicola M, Lemoli R. Dendritic cells: specialized antigen presenting cells. *Haematologica*. 2000, 85, 202-207.
2. Banchereau J, Briere F, Caux C, [et al.]. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000, 18, 767-811.
3. Kawiak J, Hoser G. Niektóre mechanizmy immunologiczne w nowotworach. Immunoterapia nowotworów w modelach zwierzęcych oraz w klinice. *Post Biol Kom*. 2000, 27, suppl.15, 91-120.
4. Curiel T, Cheng P, Mottram P, [et al.]. Dendritic cells subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res*. 2004, 64, 5535-5538.
5. Guppy A, Nathan P, Rustin G. Epithelial ovarian cancer: a review of current management. *Clin Oncol. (R Coll Radiol)*. 2005, 17, 399-411.
6. Kayl A, Meyers C. Side-effects of chemotherapy and quality of life in ovarian and breast cancer patients. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006, 18, 24-28.
7. Loizzi V, Cormio G, Resta L, [et al.]. Neoadjuvant chemotherapy in advanced ovarian cancer: a case-control study. *Int J Gynecol Cancer*. 2005, 15, 217-223.
8. Kempf R, Mitchell M. Effects of chemotherapeutic agents on the immune response. *Cancer Invest*. 1984, 2, 459-466.
9. Almand B, Resser Jr, Lindman B, [et al.]. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res*. 2000, 6, 1755-1766.
10. Savary C, Graziutti M, Melichar B, [et al.]. Multidimensional flow-cytometric analysis of dendritic cells in peripheral blood of normal donors and cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 1998, 45, 234-240.
11. Markowicz S, Walewski J, Zajda K, [et al.]. Recovery of dendritic cell counts and function in peripheral blood of cancer patients after chemotherapy. *Cytokines Cell Mol Ther*. 2002, 7, 15-24.
12. Wertel F, Polak G, Rolinski J, [et al.]. Myeloid and lymphoid dendritic cells in the peritoneal fluid of women with ovarian cancer. *Adv Med Sci*. 2006, 51, 174-177.
13. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, [et al.]. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med*. 2001, 7, 1339-1346.