

## Ocena ekspresji Foxp3 i RORgamma t w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej u chorych z rakiem krtani jako wskaźników zaawansowania zmian nowotworowych – badania wstępne\*

Expression of Foxp3 and RORgamma t in peripheral blood mononuclear cells in patients with laryngeal carcinoma as indicators of tumor stage – preliminary study\*

Paweł Papież<sup>1</sup>, Magdalena Bryś<sup>2</sup>, Iwona Lewy-Trenda<sup>3</sup>, Olga Stasikowska<sup>2</sup>, Jan Woś<sup>1</sup>, Wielisław Papierz<sup>3</sup>, Katarzyna Starska<sup>4</sup>

### SUMMARY

**Introduction:** The degree of activation of cells involved in cellular immune response against tumor antigens (cytotoxic lymphocytes Tc) as well as efficiency of the mechanisms which promote immunosuppression (Treg – regulatory cells CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) may determine the course of the neoplastic disease. The aim of this study was to assess the function of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) involved in the immunological processes on the basis of expression of Foxp3 and RORgamma t molecules as well as analysis of the relationships with clinical and morphological features of the tumor (pT and pN stage, G feature, degree of invasiveness according to the TFG classification) in laryngeal carcinoma.

**Material and methods:** The analysis included a group of 59 patients with verified squamous cell carcinoma of the larynx. In the pathologic evaluation pTNM classification criteria, depth of invasion and degree of histological differentiation were used. Expression levels of mRNA for Foxp3 and RORgamma t in peripheral blood mononuclear cells by quantitative analysis of the amplified product in real time (real-time RT<sup>2</sup>-PCR) were evaluated. The level of Foxp3 and RORgamma t protein expression by Western blot analysis was determined.

**Results:** In squamous cell carcinomas of the larynx, with the highest tumor aggressiveness the significantly highest level of mRNA and protein expression for Foxp3 molecule were observed. The severity of Foxp3 expression at both gene and protein level were positively linearly correlated with the degree of local extent of the tumor (pT3–4), depth of invasion (invasion of cartilage) and the degree of histological differentiation (low-differentiated tumors G3). In the study group of laryngeal cancers significantly lower level of RORgamma t expression in carcinomas with less invasive changes (pT1–2, high-differentiated tumors G1, carcinomas with microinvasion without evidence of invasion beyond the lamina propria) was also noted.

**Conclusions:** The study results indicate the important role of immune cell activity as indicators of advancement of clinical and morphological changes in squamous cell carcinoma of the larynx.

**Hasła indeksowe:** rak krtani, Foxp3, RORgamma t, jednojądrzaste komórki krwi

**Key words:** laryngeal carcinoma, Foxp3, RORgamma t, peripheral blood mononuclear cells

©by Polskie Towarzystwo Otorinolaryngologów – Chirurgów Głowy i Szyi

Otrzymano/Received:

24.07.2011

Zaakceptowano do druku/Accepted:

16.08.2011

<sup>1</sup> Oddział Laryngologii Szpitala im. Żeromskiego w Krakowie

Kierownik Oddziału: Lek. med. J. Zimmer

<sup>2</sup> Katedra Cytobiochemii

Uniwersytetu Łódzkiego

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. n. biol. W.M. Krajewska

<sup>3</sup> Katedra i Zakład Patomorfologii

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. n. med. W. Papierz

<sup>4</sup> I Katedra i Klinika Otolaryngologii

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. n. med. T. Durko

**Wkład pracy autorów/Authors contribution:**

Katarzyna Starska – główny badacz,

przewodniczący zespołu autorów, Jan Woś –

badacz, interpretacja danych, przygotowanie

wyników do analizy, analiza statystyczna,

Paweł Papież – badacz, interpretacja danych,

przygotowanie wyników do analizy, Magdalena

Bryś, Iwona Lewy-Trenda, Olga Stasikowska,

Wielisław Papierz – badacz

**Konflikt interesu/Conflicts of interest:**

Autorzy pracy nie zgłaszają konfliktu interesów.

**Adres do korespondencji/**

Address for correspondence:

imię i nazwisko: Katarzyna Starska

adres pocztowy:

I Katedra i Klinika Otolaryngologii

Uniwersytetu Medycznego

ul. Kopcińskiego 22,

90-150 Łódź

tel./fax 42 6785 785

e-mail katarzyna.starska@umed.lodz.pl

\* Badania wykonano w ramach grantu MNIŚZW

nr N403 043 32/2326

Otolaryngol Pol 2011;  
65 (5a): 109-116

## Wstęp

Ocena interakcji między komórkami układu odpornościowego a komórkami nowotworowymi, jak też związek ze stopniem agresywności guza u chorych z nowotworami regionu głowy i szyi, jest obecnie jednym z wiodących zagadnień w immunologii onkologicznej. Stopień aktywacji komórek uczestniczących w komórkowej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko antygenom guza nowotworowego

(limfocyty cytotoksyczne Tc, limfocyty pomocnicze Th17), jak też sprzyjających immunosupresji reakcji immunologicznej (limfocyty regulatorowe Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), może determinować przebieg procesu nowotworowego. Zróżnicowanie i wzajemne oddziaływanie komórek układu odpornościowego tj. limfocytów cytotoksycznych Tc, limfocytów pomocniczych Th17 oraz limfocytów regulatorowych Treg

**Tabela 1.** Kliniczno-morfologiczna charakterystyka badanej grupy chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani

Table. I Clinicomorphological characteristic of study laryngeal carcinomas group

Cecha	Liczebność grupy N (%)
<b>Płeć</b>	
Mężczyźni	55 (93,2%)
Kobiety	4 (6,8%)
<b>Leczenie chirurgiczne</b>	
Częściowe usunięcie krtani	19 (32,2%)
Całkowite usunięcie krtani	40 (67,8%)
Operacja usunięcia węzłów chłonnych	29 (49,2%)
Selektywna operacja węzłowa (SND)	25 (42,4%)
Radykalna operacja węzłowa (RND)	4 (6,8%)
<b>pT</b>	
pT1	7 (11,9%)
pT2	15 (25,4%)
pT3	18 (30,5%)
pT4	19 (32,2%)
<b>pN</b>	
pN0	49 (83,1%)
pN1-3	10 (16,9%)
pN1	3 (5,0%)
pN2	2 (3,4%)
pN3	5 (8,5%)
<b>Zróżnicowanie histopatologiczne G</b>	
G1	5 (8,5%)
G2	46 (77,9%)
G3	8 (13,6%)

CD4+CD25+Foxp3+, związane jest z aktywnością czynników transkrypcyjnych RORgamma t (*retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t*), Foxp3 (*forkheadbox protein 3*) oraz Runx-1 [1–7]. Istotna rola limfocytów Treg CD4+CD25+Foxp3+ w zjawiskach inicjacji procesu neoplastycznego i transformacji nowotworowej oraz progresji guza jest szeroko omawiana w światowym piśmiennictwie [3–6, 8–13]. Dyskusyjne pozostaje natomiast znaczenie aktywności limfocytów pomocniczych Th17 w determinowaniu przebiegu choroby nowotworowej. Wskazuje się na znamienne rolę immunokompetentnych komórek Th17, które pełnią rolę ważnych mediatorów zapalenia w podścielisku guza nowotworowego i które mogą mieć potencjalny wpływ na regulację odpowiedzi komórkowej skierowanej przeciwko antygenom guza [1, 2, 7, 14].

Celem przeprowadzonych badań była ocena funkcji autologicznych jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC), które współuczestniczą w procesach odpornościowych w przebiegu komórkowej odpowiedzi immunologicznej na antygeny guza nowotworowego, na podstawie analizy ekspresji cząsteczek Foxp3 i RORgamma t, oraz analiza związków z cechami kliniczno-morfologicznymi (cechą pT, pN, G i stopniem zaawan-

sowania zmian we froncie nacieku nowotworowego, wg kryteriów klasyfikacji TFG) w raku płaskonabłonkowym krtani.

## Materiał i metody

Analizą objęto grupę 59 chorych ze zweryfikowanym rakiem płaskonabłonkowym krtani – 55 (93,2%) mężczyzn i 4 (6,8%) kobiety, w wieku 47–83 lat (śr. wieku 63±8,3 roku). W badanej grupie chorych u 40 (67,8%) pacjentów zastosowano całkowite usunięcie krtani, a u 19 (32,2%) chorych częściowe usunięcie krtani. U 29 (49,2%) chorych z potwierdzonymi badaniami śródoperacyjnym powiększonymi węzłami chłonnymi wykonano ponadto operację usunięcia węzłów chłonnych regionu szyi. Przy kwalifikacji pacjentów do przeprowadzanych badań zastosowano następujące kryteria włączenia do grupy badanej: potwierdzony w badaniu patomorfologicznym rak płaskonabłonkowy krtani, zastosowanie leczenia chirurgicznego jako pierwszej metody postępowania leczniczego bez stosowanej w przeszłości innej metody leczenia (immunosupresyjnego, radio- lub chemioterapii), brak obecności przerzutów odległych.

### Ocena patomorfologiczna

W przeprowadzonej analizie patomorfologicznej stopień zaawansowania miejscowego zmian nowotworowych określono zgodnie z kryteriami klasyfikacji TNM UICC 2009 dla raków regionu głowy i szyi [15]. W morfologicznej ocenie uwzględnione zostały kryteria klasyfikacji pTNM, głębokość inwazji wg skali punktowej TFG (*tumor front grading*): 1 punkt – mikroinwazja (CIS; *carcinoma in situ*), 2 punkty – guzkowy naciek podśluzówkowy przekraczający granicę *lamina propria*, 3 punkty – naciek tkanki mięśniowej, 4 punkty – głęboka inwazja ściany (naciek chrząstki krtani) oraz stopień zróżnicowania histologicznego G [16]. Charakterystykę kliniczno-morfologiczną grupy badanej przedstawiono w tabeli I.

### Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

Celem izolacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMCs), pobierano krew pełną w trakcie rutynowych badań kontrolnych w ilości 10 ml jednorazowo na heparynę litową (10 U/mL). Limfocyty krwi obwodowej były izolowane przez wirowanie na gradiencie gęstości Ficoll-Paque™ PLUS (1,077 g/mL, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Supernatant całkowicie usuwano, a następnie dodawano RNAlater RNA Stabilization Reagent (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Komórki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu izolacji RNA.

Materiał kontrolny w ocenie ekspresji badanych kwasów nukleinowych oraz białek w PBMC stanowiły jednojądrzaste komórki krwi obwodowej od

36 zdrowych ochotników. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki UM w Łodzi (RNN/13/11/KE).

#### Ocena ekspresji poziomu mRNA dla Foxp3 i RORgamma t w PBMCs – metoda ilościowej analizy produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym (real-time RT2-PCR)

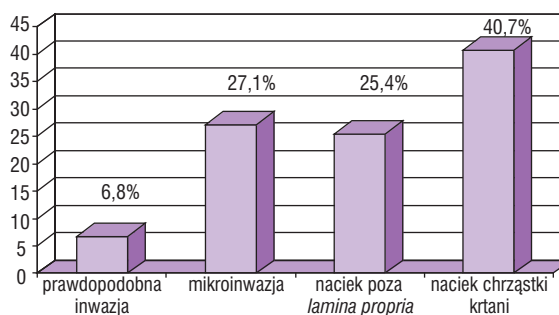
Całkowite RNA izolowano przy użyciu odczynnika TRI Reagent (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), zgodnie z zaleceniami producenta. Czystość otrzymanych preparatów RNA określano metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm i 280 nm. Przyjętym kryterium czystości DNA była wartość A260/A280 mieszcząca się w granicach 1,8–2,0. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano przy użyciu zestawu PCR Kit ver. 3.0 (Takara Bio Inc. Japonia) zgodnie z zaleceniami producenta. cDNA przechowywano w temp. 20°C. Otrzymany RNA stanowił matrycę w reakcji *real-time* PCR dla oznaczenia liczby kopii mRNA dla genu Foxp3 i RORgamma t. Użyta mieszanina reakcyjna zawierała: 0,5 µl cDNA, 5 µl TaqMan® Universal PCR MasterMix, 0,5 µl 20x TaqMan® Gene Expression Assays i 4 µl H<sub>2</sub>O. Reakcję *real-time* PCR prowadzono w urządzeniu Mastercycler®ep realplex (Eppendorf). Początkowa ilość matrycy wyznaczana była na podstawie parametru Ct (teoretyczny numer cyklu, przy którym wartość fluorescencji jest wyższa niż przyjęta arbitralnie wartość graniczna). Pomiar wartości Ct wykonano w dwóch powtórzeniach, jako gen referencyjny wykorzystano GAPDH. Do badań zastosowano następujące sondy TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA): Foxp3 – Hs01085835\_m1 (107 bp), RORgamma t – Hs00172858\_m1(66 bp), GAPDH – Hs00266705\_g1.

#### Ocena poziomu ekspresji białek Foxp3 i RORgamma t w PBMCs – analiza immunologiczna białek techniką Western blot

Rozdzielone w żelu poliakrylamidowym białka elektrotransferowano na immobilon P (Millipore) w układzie: 20% (v/v) metanol – 0,192 M Gly – 0,025 M Tris, pH 8,3 przy natężeniu prądu 400 mA w temperaturze 4°C podczas 80 min. Unieruchomione na membranie białka identyfikowano za pomocą kompleksu streptawidyna/biotyna/peroksydaza chrzanu (StreptABC/HRP; Dako), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Stosowano następujące przeciwciała (Santa Cruz Biotechnology): Foxp3 – sc-28705 (H-190) i RORgamma t – sc-28559 (H-190). Analizę densytometryczną białek immunoidentyfikowanych techniką *Western blot* przeprowadzono za pomocą wideodensytometru firmy Biotec-Fischer (Niemcy) z kamerą SSC-M370CE (Sony) oraz programu komputerowego GelPro Analyzer® version 3.0 for Windows™ (Media Cybernetics, USA).

#### Analiza statystyczna

Analizy statystycznej wyników dokonano przy użyciu programu komputerowego STATISTICA wersja 9.0



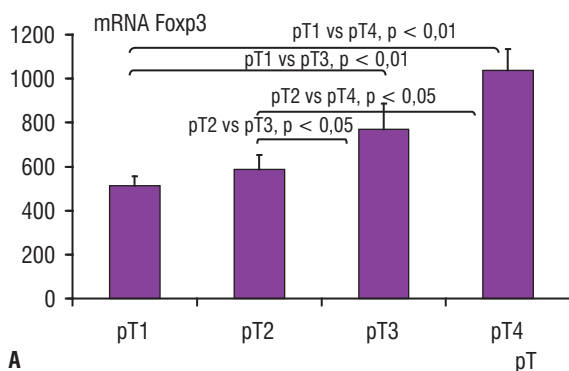
Ryc. 1. Wyniki oceny głębokości inwazji według kryteriów klasyfikacji tumor front grading w badanej grupie raków krtani

Fig. 1. The results of the assessment of invasion depth according to the TFG classification criteria in laryngeal cancer study group

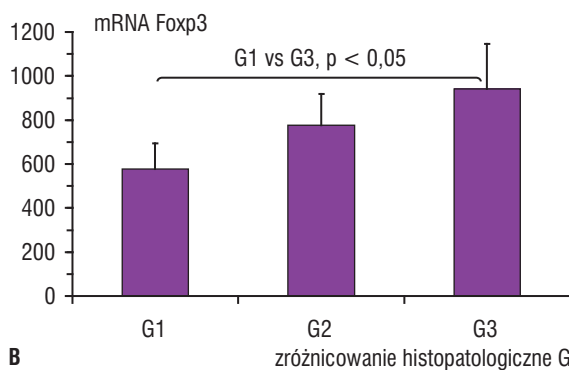
(StatSoft, Polska). Do oceny rozkładów wykorzystano test Kolmogorova-Smirnova i po stwierdzeniu rozkładów odmiennych od normalnych do dalszych obliczeń stosowano testy nieparametryczne U Manna-Whitney'a i Kruskala-Wallisa. Wyliczano także współczynnik skośności i ponieważ przybierał on wartości niższe niż 1,5, stosowano do obliczeń średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe (SD). Za statystycznie istotną przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

## Wyniki

W analizie patomorfologicznej badanego materiału wykazano, że najliczniejszą grupę wśród badanych raków krtani stanowiły guzy w zaawansowanym stadium miejscowej rozległości pT4 – 19 (32,2%) i pT3 – 18 (25,4%) przypadków. Nowotwory w stopniu zaawansowania pT1 i pT2 stanowiły odpowiednio: 7 (11,9%) i 15 (25,4%) analizowanych guzów. W analizowanym materiale przeważały guzy o średnim stopniu zróżnicowania histopatologicznego G2 – 46 (77,9%) przypadków. U 29 (49,2%) chorych z potwierdzonymi badaniami śródoperacyjnym powiększonymi węzłami chłonnymi wykonano operację usunięcia węzłów chłonnych regionu szyi, w tym u 25 (42,4%) selektywną operację węzłów chłonnych i u 4 (6,8%) chorych radykalną operację węzłową w modyfikacji Crile'a-Jawdyńskiego. Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych szyi (pN1–3) potwierdzono w badaniu morfologicznym u 10 (16,9%) pacjentów, a u pozostałych 49 (83,1%) stopień zaawansowania zmian węzłowych określono jako pN0. Ocena morfologiczna wykazała, że najliczniejszą grupę wśród raków płaskonabłonkowych krtani stanowiły guzy charakteryzujące się głęboką inwazją ściany z zajęciem chrząstki narządu – 24 (40,7%) przypadków. Nowotwory o najmniejszej inwazyjności naciekania zmian stanowiły tylko 4 guzy (6,8%) wśród ocenio-



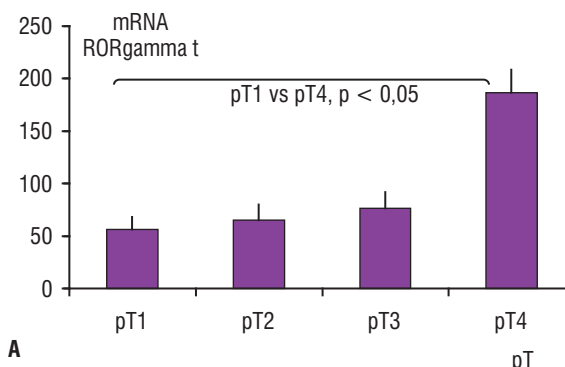
A



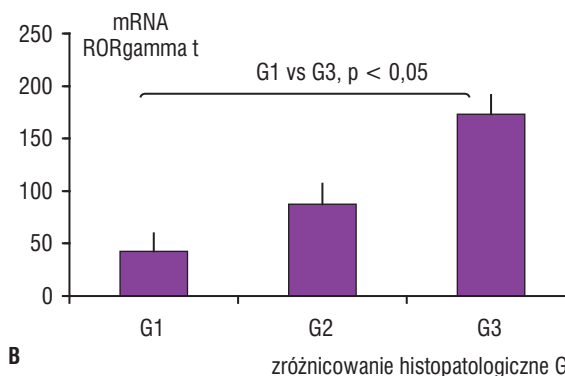
B

**Ryc. 2.** Średnie wartości ekspresji mRNA Foxp3 w badanej grupie raków krtani z uwzględnieniem stopnia miejscowego zaawansowania zmian pT (A) i zróżnicowania histopatologicznego G (B)

Fig. 2. Mean values of Foxp3 mRNA expression in laryngeal cancer study group, including pT feature (A) and histopathological differentiation G (B)



A



B

**Ryc. 3.** Średnie wartości ekspresji białka RORgamma t w badanej grupie raków krtani z uwzględnieniem stopnia miejscowego zaawansowania zmian pT (A) i zróżnicowania histopatologicznego G (B)

Fig. 3. Mean values of RORgamma t protein expression in laryngeal cancer study group, including pT feature (A) and histopathological differentiation G (B)

nych raków krtani. Dokładny rozkład wyników oceny głębokości inwazji według kryteriów klasyfikacji TFG (*tumor front grading*) w badanej grupie raków krtani przedstawia rycina 1.

#### Ocena ekspresji mRNA oraz poziomu ekspresji białek dla Foxp3 i RORgamma t w PBMCs

W przeprowadzonej analizie molekularnej oceniono ekspresję mRNA oraz białka dla cząsteczek Foxp3 i RORgamma t w izolowanych komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u chorych ze zweryfikowanym rakiem krtani oraz u zdrowych ochotników, jako grupy kontrolnej. Pozytywną ekspresję mRNA dla Foxp3 w PBMCs w badanych grupach wykazano u 64,4% (38/59) chorych z rakiem krtani oraz u 30,5% (11/36) zdrowych ochotników. Poziom średnich wartości ekspresji mRNA dla Foxp3 w PBMCs w badanej grupie chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani i w grupie zdrowych ochotników wynosiły odpowiednio: 841,3±117,6 vs 308,5±84,4. Stwierdzono znamienne różnice w poziomie ekspresji mRNA Foxp3 w analizowanych grupach ( $p < 0,001$ ). Dodatnią ekspresję kwasów rybonukleinowych mRNA dla RORgamma t stwierdzono tylko w 3,4% (2/59) przy-

padków raka krtani oraz w 19,4% (7/36) przypadków grupy kontrolnej. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic w poziomie mRNA dla RORgamma t w obu grupach ( $p > 0,05$ ). Ocena analizowanych cząsteczek na poziomie białka wykazała pozytywną ekspresję dla Foxp3 w PBMCs u 47,4% (28/59) chorych z rakiem krtani oraz u 5,5% (2/36) zdrowych ochotników. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic w poziomie białka Foxp3 w obu grupach ( $p > 0,05$ ). Pozytywny wynik analizy ekspresji białka dla RORgamma t stwierdzono w 78% (46/59) przypadkach w grupie badawczej oraz w 33,3% (12/36) przypadkach grupy kontrolnej. Średnie wartości poziomu białka RORgamma t w izolowanych PBMCs w grupie chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani i w grupie zdrowych ochotników wynosiły odpowiednio: 167,54±24,6 vs 43,2±13,8. Wykazano występowanie znamienych różnic w poziomie ekspresji badanego białka w analizowanych grupach ( $p < 0,01$ ).

#### Analiza ekspresji mRNA dla Foxp3 i RORgamma t w zależności od cech kliniczno-morfologicznych

Statystyczna analiza wyników RT<sup>2</sup>-PCR oraz oceny cech kliniczno-morfologicznych badanych raków krtani

wykazała, że ekspresja mRNA dla Foxp3 w izolowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej korelowała dodatnio z cechą pT ( $r=0,5$ ;  $p=0,04$ ). Raki krtani o wyższym stopniu zaawansowania zmian miejscowych wykazywały wyższą ekspresję mRNA Foxp3 w izolowanych PBMCs. Analiza statystyczna potwierdziła także znamienne różnice w poziomie kwasów rybonukleinowych mRNA Foxp3 w grupach guzów pT1 i pT3 (pT1 vs pT3,  $p<0,01$ ) oraz pT1 i pT4 (pT1 vs pT4,  $p<0,01$ ). Podobne zależności dotyczyły nowotworów pT2 i pT3 (pT2 vs pT3,  $p<0,05$ ) oraz pT2 i pT4 (pT2 vs pT4,  $p<0,05$ ). Analiza ekspresji mRNA dla Foxp3 w odniesieniu do stopnia zróżnicowania histologicznego G zmian nowotworowych wykazała, że średnie wartości kwasu rybonukleinowego mRNA w badanej grupie wynosily odpowiednio:  $576,4\pm 116,6$  dla guzów wysokozróżnicowanych G1,  $776,1\pm 142,8$  dla G2 oraz  $942,6\pm 204,1$  dla raków niskozróżnicowanych G3. Statystyczna ocena otrzymanych wyników RT<sup>2</sup>-PCR oraz analizy morfologicznej zmian nowotworowych wykazała, że ekspresja mRNA Foxp3 w izolowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej korelowała dodatnio z cechą G ( $r=0,6$ ;  $p=0,03$ ). Raki krtani o wysokim stopniu zróżnicowania histologicznego charakteryzowały się wyższą ekspresją mRNA Foxp3 w izolowanych PBMCs. W przeprowadzonej analizie wskazano również na znamienne różnice w ekspresji kwasu rybonukleinowego mRNA Foxp3 w grupach guzów G1 i G3 (G1 vs G3,  $p<0,05$ ). W badaniach wykonano także ocenę zależności poziomu mRNA Foxp3 oraz stopnia głębokości naciekania nowotworu. Ocena badanych parametrów potwierdziła znamienne statystycznie różnice ( $p<0,05$ ) między nowotworami charakteryzującymi się najniższym stopniem inwazji narządu (mikroinwazja CIS – 1 punkt, wg skali TFG:  $562,7\pm 72,0$ ) oraz guzami naciekającymi głęboko otaczające tkanki podścieliska guza (z naciekiem chrząstki krtani – 4 punkty wg skali TFG:  $975,2\pm 126,9$ ). Ponadto w wykonanej analizie molekularnej stwierdzono, że dwa przypadki raków płaskonabłonkowych krtani, dla których potwierdzono pozytywną ekspresję mRNA dla RORgamma t w izolowanych PBMCs, charakteryzowały się najniższym stopniem miejscowej rozległości nowotworu pT1, wysoko zróżnicowanym histopatologicznie utkaniem guza G1 oraz najmniej nasiloną inwazją (głębokość naciekania na 1 punkt, zgodnie z kryteriami klasyfikacji TFG). Podsumowując, należy stwierdzić, że dla raków płaskonabłonkowych krtani, które charakteryzowały się największą agresywnością procesu nowotworowego, wg zastosowanych kryteriów kliniczno-morfologicznych (cechy: pT3 i pT4, G3, głębokie naciekanie z inwazją chrząstki krtani), obserwowano znamienne najwyższy poziom ekspresji mRNA dla cząsteczki Foxp3 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej PBMCs. Rozkład średnich wartości ekspresji mRNA dla cząsteczek Foxp3 w badanej grupie raków krtani z uwzględnieniem

stopnia zaawansowania zmian zgodnie z kryteriami klasyfikacji pT i G przedstawiono na rycinie 2.

#### **Analiza ekspresji białka Foxp3 i RORgamma t w zależności od cech kliniczno-morfologicznych**

W statystycznej ocenie poziomu białka Foxp3 w badanym materiale potwierdzono występowanie znamienych dodatnich korelacji w zależności od głębokości naciekania podścieliska guza, zgodnie z przyjętymi kryteriami klasyfikacji TFG ( $r=0,7$ ;  $p=0,04$ ). Wyższa ekspresja białka Foxp3 w izolowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej charakteryzowała nowotwory z wyższym stopniem inwazyjności zmian. Ponadto, przeprowadzona analiza badanych parametrów morfologiczno-molekularnych potwierdziła znamienne statystycznie różnice w ekspresji Foxp3 w izolowanych PBMCs ( $p<0,05$ ) między guzami charakteryzującymi się najniższym stopniem inwazji nowotworowej narządu (mikroinwazja CIS – 1 punkt wg skali TFG:  $83,21\pm 11,3$ ) oraz rakami naciekającymi głęboko otaczające tkanki podścieliska (z naciekiem chrząstki krtani – 4 punkty wg skali TFG:  $241,7\pm 23,4$ ). Ocena wyników analizy *Western blot* w badanej grupie chorych z rakiem krtani nie potwierdziła znamienych zależności ekspresji Foxp3 w zależności od stopnia miejscowego zaawansowania zmian pT. Co więcej, dla guzów nowotworowych o największej rozległości zmian w badaniu morfologicznym (guzy pT3 i pT4) nie wykazano różnic w ekspresji analizowanego białka w PBMCs ( $p > 0,05$ ). Ponadto, wszystkie oceniane raki krtani, które wykazywały pozytywną ekspresję białka Foxp3, zostały zakwalifikowane w badaniu histopatologicznym jako guzy o średnim lub wysokim stopniu zróżnicowania zmian (guzy G2 i G3). Dla tych nowotworów nie stwierdzono występowania znamienych różnic w ekspresji Foxp3 ( $p>0,05$ ) w badaniu statystycznym. W przeprowadzonych badaniach wykazano występowanie istotnych statystycznie różnic między poziomem ekspresji białka RORgamma t w odniesieniu do analizowanych cech kliniczno-morfologicznych. Dla raków krtani charakteryzujących się wyższym stopniem miejscowego zaawansowania zmian pT potwierdzono wyższą ekspresję białka RORgamma t w izolowanych PBMCs (pT1 vs pT4,  $p<0,05$ ). Średnia wartość poziomu RORgamma t dla badanych raków krtani wynosiła:  $56,3\pm 11,7$  dla guzów pT1 oraz  $186,9\pm 21,5$  dla guzów pT4. Analiza wyników badań wykazała także występowanie istotnych statystycznie różnic między poziomem RORgamma t oznaczonego metodą *Western blot* w odniesieniu do stopnia zróżnicowania histologicznego zmian G. Zależności te dotyczyły grupy chorych z rakami krtani charakteryzującymi się najwyższym G1 i najniższym stopniem zróżnicowania morfologicznego guza G3 (G1 vs G3,  $p<0,05$ ). Średnia wartość ekspresji białka RORgamma t dla badanych raków krtani wynosiła odpowiednio:  $42,7\pm 17,2$  dla guzów G1 oraz  $173,1\pm 18,4$  dla guzów G3. W badaniach

wykonano także ocenę zależności poziomu ekspresji białka RORgamma t w izolowanych PBMCs i stopnia inwazyjności nowotworu. Ocena badanych parametrów potwierdziła znamienne statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ) między rakami krtani charakteryzującymi się najmniejszym stopniem inwazji narządu (mikroinwazja CIS – 1 punkt wg skali TFG:  $31,6 \pm 12,4$ ) oraz guzami naciekającymi głęboko otaczające tkanki podścieliska guza (z naciekaniem chrząstki krtani – 4 punkty wg skali TFG:  $174,2 \pm 12,8$ ). Podsumowując, należy stwierdzić, że dla raków płaskonabłonkowych krtani o najwyższym stopniu inwazyjności morfologicznych, wg zastosowanych kryteriów histopatologicznych (cechy: pT4, G3, głębokie naciekanie z inwazją chrząstki krtani), obserwowano znamienne najwyższy poziom ekspresji mRNA dla cząsteczki RORgamma t w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej PBMCs. Rozkład średnich wartości ekspresji mRNA dla cząsteczek RORgamma t w badanej grupie raków krtani z uwzględnieniem stopnia zawansowania zmian zgodnie z kryteriami klasyfikacji pT i G przedstawiono na rycinie 3.

## Omówienie

Pomimo wielu badań z dziedziny biologii molekularnej i immunologii nie przedstawiono jednoznacznych wyników dotyczących roli komórek immunokompetentnych biorących udział w odpowiedzi przeciwnowotworowej, tj. limfocytów cytotoksycznych Tc, limfocytów pomocniczych Th17 oraz limfocytów regulatorowych Treg CD4+CD25+Foxp3+. Dyskusyjne pozostaje także znaczenie wzajemnego oddziaływania komórek układu odpornościowego, rola czynnika RORgamma t na różnicowanie się komórek w kierunku limfocytów Treg lub Th17 oraz wpływ na stopień inwazyjności zmian, a tym samym możliwość determinowania postępowania terapeutycznego u chorych z chorobą nowotworową. Wielu autorów wskazuje na mechanizmy międzykomórkowe prowadzące do aktywacji wymienionych komórek odpowiedzi immunologicznej, wśród których istotne znaczenie ma czynnik transkrypcyjny Foxp3 oraz RORgamma t [1, 2, 14]. Badacze podkreślają znamieną rolę obu cząsteczek w zjawiskach inicjacji procesu neoplastycznego i transformacji nowotworowej oraz progresji guza, a także potencjalny wpływ na regulację odpowiedzi komórkowej skierowanej przeciwko antygenom guza, a tym samym cechy kliniczno-morfologiczne i rokowanie u chorych leczonych z powodu choroby nowotworowej [3–11, 14, 17–22].

Wyniki przedstawione w prezentowanej pracy pozostają zgodne z wynikami badań innych autorów w piśmiennictwie dotyczącym tematu. Zhang i wsp. [14] wykazali, że zwiększona populacja komórek Th17 we krwi obwodowej u pacjentów z rakiem żołądka koreluje pozytywnie ze stopniem rozległości zmian nowotworowych klinicznych oraz występowaniem przerzutów do

regionalnych węzłów chłonnych. Badacze wykazali także, że wzrost aktywności czynnika transkrypcyjnego ROR zarówno w komórkach tkanki nowotworowego, jak i w surowicy, korelował ze stopniem inwazyjności zmian nowotworowych. Schreiber i wsp. [17] zanotowali, że poziom ekspresji białka RORgamma t wiąże się z nasiloną aktywnością komórek cytotoksycznych CTL (*cytotoxic T lymphocytes*), limfocytów CD17 oraz zmniejszoną ekspresją czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w limfocytach CD4+ (Treg CD4+CD25+Foxp3+). Xue i wsp. [18] wykazali znaczenie ekspresji Foxp3 na poziomie genu i białka oznaczonego w tkance guza jako jednoznacznego wskaźnika miejscowego stopnia zaawansowania zmian (nasilone odczyny dodatnie dla guzów z IIB i III, niskozróżnicowanych, z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych) w raku przełyku. Podobne spostrzeżenia przedstawili Gupta i wsp. [4]. Autorzy wykazali, że podwyższony poziom ekspresji Foxp3 na limfocytach w materiale histologicznym węzłów chłonnych charakteryzuje guzy nowotworowe w wyższym stadium pT raka piersi. Shah i wsp. [8] także wykazali istotne zależności między stopniem ekspresji Foxp3 w komórkach CD4+CD25+Foxp3+ w badanej grupie raków płaskonabłonkowych szyjki macicy a czasem przeżycia chorych. Badacze potwierdzili zwiększony poziom badanego białka u pacjentów z krótszym czasem przeżycia. Yang i wsp. [9] zanotowali również dodatnią korelację ekspresji Foxp3 w limfocytach CD8+Foxp3+ naciekających utkanie guza ze stopniem miejscowej rozległości zmian pTNM i S u chorych z rakiem wątroby. Inni badacze zaznaczają rolę czynnika transkrypcyjnego Foxp3 jako wskaźnika aktywności komórek TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*) w podścielisku zmian nowotworowych [11]. Ikemoto i wsp. [22] także wykazali znamienne zależności między poziomem ekspresji Foxp3 w komórkach immunokompetentnych krwi obwodowej a nasileniem inwazyjności zmian nowotworowych w raku trzustki. Również Fujisawa i wsp. [7] dowiedli w swoich badaniach istotnej korelacji ekspresji RORgamma t z aktywnością komórek Th17 i Treg i wskazali na związek nasilonego różnicowania limfocytów Th17 oraz zwiększoną liczbę limfocytów Treg CD4+CD25+Foxp3+. W piśmiennictwie dotyczącym tematu wielu badaczy wskazuje na znaczenie białek obecnych na powierzchni komórek Treg m.in. Foxp3 jako czynników istotnych w strategii leczniczej nowotworów [11–13]. Strauss i wsp. [12] stwierdzili, że zwiększony odsetek komórek krwi obwodowej CD4+CD25+Foxp3 wiąże się z nasileniem zjawisk immunosupresyjnych w przebiegu raków regionu głowy i szyi. Podobne wyniki otrzymali Schuler i wsp. [13], wskazując na zmniejszoną aktywność komórek z dodatnią ekspresją Foxp3 u pacjentów z rakami regionu głowy i szyi leczonych radiochemioterapią. Również Xu i wsp. [19] podkreślili ściśle związek ekspresji markera Foxp3 na poziomie genu w komórkach krwi obwodowej

z zastosowanym sposobem leczenia nieoperacyjnego u pacjentów z rakiem przełyku.

Wielu badaczy nie potwierdza jednak występowania związków ekspresji białka Foxp3 z rozległością węzłową zmian nowotworowych w raku krtani [4]. Gupta i wsp. [4] nie zanotowali zależności między nasileniem cech pN a poziomem badanego markera na komórkach krwi obwodowej. Inni autorzy wskazują na niejednoznaczne zależności dotyczące interpretacji ekspresji cząsteczki Foxp3 w rakach różnego pochodzenia. Jaberipour i wsp. [5] wykazali, że podwyższona ekspresja białka Foxp3 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej w raku piersi charakteryzuje guzy mniej zaawansowane pT1–2, raki wyskokróznicowane, bez potwierdzonych przerzutów do węzłów chłonnych.

Przedstawione badania wskazują na rolę aktywności komórek układu odpornościowego jako wskaźników zaawansowania zmian klinicznych i morfologicznych w raku płaskonabłonkowym krtani.

## Wnioski

1. W rakach płaskonabłonkowych krtani charakteryzujących się największą agresywnością procesu nowotworowego, według zastosowanych kryteriów kliniczno-morfologicznych, obserwowano znamienne największy poziom ekspresji mRNA i białka dla cząsteczki Foxp3 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej.
2. Nasilenie ekspresji Foxp3 i zarówno na poziomie genu, jak i białka, było dodatnio liniowo skorelowane ze stopniem miejscowej rozległości zmian nowotworowych, głębokością inwazji oraz stopniem złośliwości histologicznej guza nowotworowego.
3. Wyższe wartości poziomu ekspresji ROR $\gamma$  t w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej obserwowano w grupie chorych z rakiem krtani o większej inwazyjności zmian nowotworowych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Zhang F, Meng G, Strober W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR  $\gamma$  t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nature Immunology* 2008;9:1297–1306.
2. Huh JR, Leung MW, Huang P, Ryan DA, Krout MR, Malapaka RR i wsp. Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing ROR t activity. *Nature*. 2011;472(7344):486–490.
3. Zorro Manrique S, Duque Correa MA, Hoelzinger DB, Dominguez AL, Mirza N, Lin HH i wsp. Foxp3-positive macrophages display immunosuppressive properties and promote tumor growth. *J Exp Med*. 2011;208:1485–1499.
4. Gupta R, Babb JS, Singh B, Chiriboga L, Liebes L, Adams Si wsp. The numbers of FoxP3+ lymphocytes in sentinel lymph nodes of breast cancer patients correlate with primary tumor size but not nodal status. *Cancer Invest*. 2011;6:419–425.

5. Jaberipour M, Habibagahi M, Hosseini A, Habibabad SR, Talei A, Ghaderi A. Increased CTLA-4 and FOXP3 transcripts in peripheral blood mononuclear cells of patients with breast cancer. *Pathol Oncol Res*. 2010;16:547–551.
6. Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, Gulley JL, Arlen PM, Schlom J i wsp. Enhanced functionality of CD4+CD25(high) FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(4):1032–1040.
7. Fujisawa Y, Nabekura T, Kawachi Y, Otsuka F, Onodera M i wsp. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2011;86–93.
8. Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y.A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol Immunol*. 2011;1:59–66.
9. Yang ZQ, Yang ZY, Zhang LD, Ping-Bie, Wang SG, Ma KS i wsp. Increased liver-infiltrating CD8+FoxP3+ regulatory T cells are associated with tumor stage in hepatocellular carcinoma patients. *Hum Immunol*. 2010;71:1180–1186.
10. Sun X, Wu Y, Gao W, Enjyoji K, Csizmadia E, Müller CE i wsp. CD39/ENTPDI expression by CD4+Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology*. 2010;139(3):1030–1040.
11. Jandus C, Bioley G, Speiser DE, Romero P. Selective accumulation of differentiated FOXP3(+) CD4 (+) T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57:1795–8051.
12. Strauss L, Bergmann C, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. The Frequency and Suppressor Function of CD4+CD25highFoxp3+ T Cells in the Circulation of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res*. 2007;13(21):6301–11
13. Schuler PJ, Börger V, Bölke E, Habermehl D, Matuschek C, Wild CA. Dendritic cell generation and CD4+ CD25high FOXP3+ regulatory t cells in human head and neck carcinoma during radio-chemotherapy. *Eur J Med Res*. 2011;16(2):57–62.
14. Zhang B,Rong G,Wei H,Zhang M,Bi J,Ma L i wsp. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;374:533–537.
15. O'Sullivan B, Shah J. New TNM staging criteria for head and neck tumors. *Semin Surg Oncol* 2003;21:30–42.
16. Starska K, Forma E, Lewy-Trenda I, Stasikowska O, Bryś M, Krajewska WM i wsp. The expression of SOCS1 and TLR4-NFkappaB pathway molecules in neoplastic cells as potential biomarker for the aggressive tumor phenotype in laryngeal carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009;47(3):401–410.
17. Schreiber TH, Deyev VV, Rosenblatt JD, Podack ER. Tumor-induced suppression of CTL expansion and subjugation by gp96-Ig vaccination. *Cancer Res*. 2009;69:2026–2033.
18. Xue L, Lu HQ, He J, Zhao XW, Zhong L, Zhang ZZ, Xu ZF. Expression of FOXP3 in esophageal squamous cell

- carcinoma relating to the clinical data. *Dis Esophagus*. 2010;23(4):340–6.
19. Xu T, Duan Q, Wang G, Hu B. CD<sup>+</sup> CD25(high) Regulatory T Cell Numbers and FOXP3 mRNA Expression in Patients with Advanced Esophageal Cancer Before and After Chemotherapy. *Cell Biochem Biophys*. 2011 (Epub ahead of print).
  20. He YW, Beers C, Deftos ML, Ojala EW, Forbush KA, Bevan MJ. Down-regulation of the orphan nuclear receptor ROR gamma t is essential for T lymphocyte maturation. *J Immunol*. 2000;164:5668–5674.
  21. Sundrud MS, Rao A. Regulation of T helper 17 differentiation by orphan nuclear receptors: it's not just ROR gamma t anymore. *Immunity*. 2008;28(1):5–7.
  22. Ikemoto T, Yamaguchi T, Morine Y, Imura S, Soejima Y, Fujii M i wsp. Clinical roles of increased populations of Foxp3+CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood from advanced pancreatic cancer patients. *Pancreas*. 2006;33(4):386–390.