

UNIwersytet Medyczny w Łodzi

Wydział Wojskowo-Lekarski

Badanie ekspresji hamulców immunologicznych
CTLA-4 i PD-1 w limfocytach T
w okresie okołoperacyjnym u chorych na raka piersi

Lekarz medycyny Łukasz Pakuła

Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii WSS im. Mikołaja
Kopernika w Łodzi

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor pracy: dr hab. n. med. Agnieszka Kołacińska

Łódź 2015

Streszczenie

Wprowadzenie

Hamulce immunologiczne (*immune checkpoints*), zwane też punktami kontrolnymi, to zespół szlaków hamujących, wbudowanych w system odpornościowy, kluczowych dla utrzymania tolerancji tkanek własnych. Jednakże ostatnie badania podkreślają również rolę hamulców immunologicznych w karcynogenezie.

Cel pracy

Celem pracy była ocena związku pomiędzy ekspresją hamulców immunologicznych: CTLA-4 [*cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4* (antygen 4 związany z cytotoksycznym limfocytom T)] i PD-1 [*programmed cell death protein 1* (białko 1 programowanej śmierci komórki)] na limfocytach T CD 8+ w surowicy w okresie okołoperacyjnym u chorych na wczesnego raka piersi a wybranymi czynnikami kliniczno-histopatologicznymi.

Cele szczegółowe badania to:

1. Ocena wybranych hamulców immunologicznych (CTLA-4, PD-1) przed zabiegiem operacyjnym na limfocytach T CD 8+ surowicy chorych na raka piersi oraz u kobiet zdrowych.
2. Ocena związku wybranych hamulców immunologicznych (CTLA-4 i PD-1) na limfocytach T CD 8+ surowicy chorych na raka piersi w okresie okołoperacyjnym: 24 h przed zabiegiem operacyjnym, w trakcie zabiegu operacyjnego po usunięciu węzła lub węzłów wartowniczych oraz 24 h po zabiegu operacyjnym, z wybranymi czynnikami kliniczno-histopatologicznymi:

- wiekiem chorej
- średnicą guza (pT)
- statusem receptorowym (ER - receptor estrogenowy, PR - receptor progesteronowy, HER2 - receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2)
- statusem histopatologicznym węzła wartowniczego (pNsn)

Pacjenci i metody

Do badania zakwalifikowałem 40 chorych na raka piersi w I i II stopniu zaawansowania poddanych zabiegowi oszczędzającemu pierś i biopsji węzła wartowniczego, operowanych w Oddziale Chirurgii Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi pomiędzy wrześniem a grudniem 2013 roku (zgoda Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi numer RNN / 239/13 / KE). Od każdej chorej pobrałem 2,7 ml krwi w celu określenia poziomu CTLA-4 i PD-1 24 godziny przed zabiegiem operacyjnym, w czasie znieczulenia po pobraniu węzła(węzłów) wartowniczego(wartowniczych) i 24 godziny po zabiegu operacyjnym. Kontrolne próbki krwi pobrałem od 25 zdrowych kobiet, dobranych pod względem wieku. Łącznie wykonano 130 oznaczeń. Z badania wykluczyłem chore na raka piersi ze współistniejącą bądź przebytą chorobą autoimmunologiczną, innymi zaburzeniami immunologicznymi lub przebytą inną chorobą nowotworową złośliwą oraz w ciąży lub podczas laktacji.

Z powyższych przyczyn ostateczną analizą objąłem 35 chorych. Poziomy CTLA-4 i PD-1 zostały oznaczone za pomocą cytometrii przepływowej (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) przez doświadczonego specjalistę (dr n. med. Barbarę Cebulę-Obrzut, konsultacja prof. dr hab. n. med. Piotr Smolewski) w Zakładzie Hematologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Preparaty pooperacyjne zostały standardowo ocenione przez doświadczonego patomorfologa specjalizującego się w nowotworach piersi w Zakładzie Patologii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (dr n. med. Dorota Jesionek-Kupnicka, dr n.med. Robert Kubiak, kierownik - prof. dr hab. med. Radziśław Kordek). Dane poddałem analizie statystycznej (test Manna-Whitneya U, współczynnik korelacji rang Spearmana, ANOVA Friedmana, test Wilcoxona z korektą Bonferroniego, Statistica 10 StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA).

Wyniki

Stwierdziłem istotną statystycznie różnicę w ekspresji PD-1 w surowicy u chorych na raka piersi przed zabiegiem operacyjnym i kobiet zdrowych ($26,31 \pm 11,87$ vs $12,72 \pm 8,15$, $p < 0,0001$). Wyższe poziomy PD-1 oznaczyłem u kobiet chorych na raka piersi. Nie zanotowałem związku pomiędzy ekspresją CTLA-4 w surowicy u chorych na raka piersi i kobietami zdrowymi. Stwierdziłem statystycznie istotny związek pomiędzy poziomem CTLA-4 a poziomem PD-1 przed zabiegiem operacyjnym ($r = 0,43$, $p = 0,0084$). Zależność ta nie wystąpiła w trakcie dwóch kolejnych punktów czasowych, podczas zabiegu operacyjnego ($r = 0,08$, $p = 0,62$) i 24 h po zabiegu operacyjnym ($r = 0,14$, $p = 0,43$). U chorych na raka piersi poziomy PD-1 różniły się istotnie statystycznie w badanych trzech punktach czasowych ($p = 0,0458$), z największą różnicą pomiędzy drugim i trzecim punktem czasowym ($p = 0,0007$). Mediana PD-1 przed zabiegiem operacyjnym wynosiła 24,80 (17,20-34,60), w trakcie zabiegu operacyjnego 24,65 (19,50-36,85) oraz 24h po zabiegu operacyjnym 21,25 (17,75-32,60). Nie stwierdziłem różnic w poziomach CTLA-4, które pozostawały stałe w trzech punktach czasowych ($p = 0,3788$). Ekspresja CTLA-4 była związana z wiekiem chorych na raka piersi ($r = 0,33$, $p = 0,0453$). Podwyższone poziomy CTLA-4 były obecne u starszych chorych. Istniał związek bliski istotności statystycznej pomiędzy poziomami PD-1 przed zabiegiem operacyjnym i śródoperacyjnie a średnicą guza ($T2 = 31,41 \pm 14,14$ vs $T1 = 22,47 \pm 8,28$; $p = 0,07$ i $T2 = 32,81 \pm 13,21$ vs $T1 = 24,61 \pm 10,68$, $p = 0,08$, odpowiednio). Stwierdziłem spadek poziomu PD-1 w surowicy u chorych na raka piersi po usunięciu węzła lub węzłów chłonnych pachowych wartowniczych w przypadku, gdy węzeł zawierał przerzuty. Nie stwierdziłem takiej zależności w przypadku węzła wartowniczego bez przerzutów ($p = 0,05$). Odnotowałem negatywną korelację pomiędzy ekspresją PD-1 a poziomem receptora progesteronowego w trzecim punkcie czasowym ($r = -0,39$, $p = 0,024$).

Wnioski

1. Przeprowadzone przeze mnie badanie pozwoliło na wykazanie prawdziwości postawionej hipotezy, iż istnieje związek pomiędzy ekspresją wybranych hamulców immunologicznych: PD-1, CTLA-4 w surowicy w okresie

okołooperacyjnym u chorych na wczesnego raka piersi a wybranymi czynnikami kliniczno-histopatologicznymi. Chore na raka piersi w moim badaniu wykazują zmieniony profil markerów odpornościowych - hamulców immunologicznych, z wyższymi poziomami PD-1 w guzach o większej średnicy, bez ekspresji receptora

progesteronowego i wyższymi poziomami CTLA-4 u chorych starszych. Chirurgicalne usunięcie węzłów chłonnych wartowniczych zawierających komórki nowotworowe zmienia profil immunologiczny poprzez zmniejszenie poziomu PD-1.

2. Wyniki mojej pracy mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad rolą układu odpornościowego, a w szczególności hamulców immunologicznych w raku piersi, jako wartości dodanej do panelu prognostyczno-predykcyjnego sprawdzonych czynników histopatologicznych oraz uzasadnienie na podłożu immunologicznym czysto chirurgicznych procedur, w szczególności zakresu usuwania węzłowych chłonnych pachowych oraz uzupełnienia istniejącego już standardowego leczenia systemowego (chemioterapii, hormonoterapii oraz terapii anty-HER2) o opcję modulacji układu odpornościowego. Wymaga to dalszych wieloośrodkowych badań ze względu na złożoność szlaków immunologicznych i wieloaspektowość ich bezpośredniej translacji z laboratorium do kliniki.

