

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Mateusza Rubinkiewicza pt.: „*Immunological response of T regulatory lymphocytes and its influence on gastrointestinal tract neoplasms development*”

Streszczenie.

Wstęp: Niektóre nowotwory przewodu pokarmowego rozwijają się na podłożu tzw. stanów przedrakowych. Jest to patologiczna zmiana w strukturze tkanki predysponująca do powstania nowotworu. Do najlepiej poznanych stanów przedrakowych należą: przełyk Barrett'a, zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka oraz polip gruczolakowy jelita grubego. W tkankach nowotworów inwazyjnych można uwidocznić nacieki limfocytarne – TIL (tumor infiltrating lymphocytes). W jego skład wchodzi również limfocyty charakteryzujące się obecnością molekuly foxp3+ - tzw. limfocyty T regulatorowe. Odpowiadają one za wytwarzanie immunotolerancji w tkankach. Uważa się, że pozwalają one nowotworom na uniknięcie działania ludzkiego układu odpornościowego. Udowodniono ich rolę w nowotworach inwazyjnych. Jednak nie jest wiadomo, czy limfocyty T regulatorowe pojawiają się już w tkankach na etapie stanu przednowotworowego. Doktorat składa się z trzech prac:

- 1) Foxp3+ lymphocyte count in Barrett's esophagus tissue is higher than in inflamed esophageal tissue.
- 2) The number of regulatory Foxp3+ T-cells in different stages of malignant transformation of large intestinal polyps.
- 3) Liczba limfocytów T foxp3+ jest wyższa w tkankach raka żołądka, niż w tkankach zanikowego zapalenia żołądka."

Cel pracy:

- 1) Ocena nacieku zapalnego z udziałem limfocytów T regulacyjnych oraz limfocytów T pomocniczych w obrębie zmian przednowotworowych oraz raków jelita grubego, żołądka i przełyku.
- 2) Określenie równowagi immunologicznej pomiędzy subpopulacjami limfocytów Treg oraz T pomocniczymi na poszczególnych etapach karcinogenezy raków gruczolowych przewodu pokarmowego.

Material i metody:

ad1) Analizie został poddany materiał tkankowy pobrany od chorych, którzy mieli wykonaną pełną kolonoskopię wraz z polipektomią lub przeszli zabieg resekcyjny z powodu rozpoznanego uprzednio raka jelita grubego. Materiał oceniany był histopatologicznie w Zakładzie Patomorfologii UJ CM. Z badania wyłączono pacjentów leczonych uprzednio onkologicznie, chorych z deficytami immunologicznymi oraz u których rozpoznano cukrzycę. W grupie badanej znalazło się 27 osób, z czego 37% (10) stanowiły kobiety. Mediana wieku pacjentów wynosiła 64 lata (37-82). W usuniętym materiale u 4 chorych rozpoznano polipy hiperplastyczne, u 5 polipy gruczolakowe z dysplazją małego stopnia, a u 8 pacjentów polipy gruczolakowe z dysplazją dużego stopnia. U 10 chorych zdiagnozowano raka jelita grubego. Obecność limfocytów T regulatorowych (Treg) wykazano w badanych grupach przy wykorzystaniu technik immunohistochemicznych (IHC), bazując na materiale tkankowym z blozków parafinowych.

Ad2) W badaniu wzięli udział pacjenci, u których istniały kliniczne lub endoskopowe wskazania do pobrania wycinków z połączenia przełykowo-żołądkowego (podejrzenie zmian zapalnych lub przełyku Barrett'a) oraz chorzy z rozpoznaniem rakiem gruczolowym przełyku, który badanie mieli wykonywane w Szpitalu im. Jana Pawła II. Z badania wykluczono pacjentów leczonych uprzednio onkologicznie, ze zdiagnozowanym niedoborem odporności, cukrzycą oraz kobiety ciężarne. Obecność limfocytów T regulatorowych (Treg) wykazano w badanych grupach przy wykorzystaniu technik immunohistochemicznych (IHC). Do badania włączono 14 chorych ze zdiagnozowanym rakiem gruczolowym przełyku, 15 chorych ze zweryfikowanym przełykiem Barretta, których podzielono na dwie grupy: bez dysplazji oraz z dysplazją. Grupę kontrolną stanowili pacjenci ze zmianami zapalnymi bez cech metaplastyki gruczolowej. W grupie chorych z zapaleniem przełyku znalazło się 14 chorych, w grupie z przełykiem Barrett'a bez dysplazji 6 chorych oraz w grupie z przełykiem Barrett'a z dysplazją 9 chorych. 42% stanowiły kobiety. Mediana wieku pacjentów wyniosła 61,42 (32-83).

Ad3) Materiał badany stanowiły tkanki żołądka pobrane podczas badania gastrokopowego, lub stanowiące preparat operacyjny u chorych operowanych z powodu raka żołądka. Do badania

włączono łącznie 37 pacjentów. Pierwszą grupę stanowiło 12 chorych z rozpoznaniem histopatologicznie zapaleniem zanikowym błony śluzowej żołądka. Do drugiej grupy, którą tworzyli chorzy z inwazyjnym gruczolakorakiem żołądka, włączono 11 osób. Trzecią grupę - kontrolną, włączono pacjentów z prawidłową architekturą żołądka - 14 osób. 48% wszystkich pacjentów stanowiły kobiety. Materiał oceniany był przed tego samego, doświadczonego patologa. Poza rozpoznaniem histologicznym oceniano też obecność bakterii spiralnych (*Helicobacter Pylori*) w badanych preparatach.

Wyniki:

Ad1). Liczba limfocytów T regulatorowych Foxp3+ wzrasta wraz z progresją polipa w kierunku nowotworu i wynosi średnio na 10 dużych pól widzenia w przypadku preparatów polipa hiperplastycznego 12,5, polipa gruczolakowego z dysplazją małego stopnia 29,4, polipa gruczolakowego z dysplazją dużego stopnia 36,5 oraz w przypadku preparatów z rozpoznaniem rakiem jelita grubego 56,3. ($p=0,00$). Średnia ilość limfocytów CD4+ rośnie i wyniosła odpowiednio 45,75, 57,8, 84,125, 110,6, ale wynik ten nie osiąga istotności statystycznej ($p=0,13$). Stosunek liczby limfocytów Foxp3+/CD4+ rośnie wraz z progresją zmiany (odpowiednio 0,27, 0,3, 0,43, 0,5), natomiast wzrost jest istotny statystycznie jedynie w grupie chorych z rakiem jelita grubego ($p=0,01$).

Ad2) Średnia ilość limfocytów Foxp3+ u pacjentów ze zmianami zapalnymi wynosiła 7,37/HPF (zakres 1-9), a następnie 18,5/10HPF (zakres 5-29) oraz 26,8/10HPF u chorych z przełykiem Barretta z dysplazją i bez dysplazji. U chorych z rakiem przełyku było średnio 47,92 limfocyta/10HPF. Różnice między grupami okazały się być istotne statystycznie ($p=0,000$). Chorzy z przełykiem Barrett'a, zarówno z dysplazją, jak i bez, wykazywali statystycznie większą ilość limfocytów Foxp3+, niż chorzy ze zmianami zapalnymi ($p=0,0003$ oraz $p=0,0006$). Także liczba limfocytów Foxp3+ u chorych z rakiem przełyku okazała się być istotnie wyższa, niż u chorych ze zmianami zapalnymi ($p=0,0001$), a także u chorych z przełykiem Barrett'a bez dysplazji i z dysplazją ($p=0,016$ oraz $p=0,00047$).

Ad3) Najwyższa liczba limfocytów Foxp3+ była obecna w preparatach pobranych od chorych z rakiem żołądka - 42,5 (+-13,26), natomiast u pacjentów z zapaleniem zanikowym błony śluzowej żołądka oraz prawidłową architekturą ilość limfocytów Foxp3+/10HPF wyniosła odpowiednio 13 (+-4,7) oraz 11,3/10HPF (+-4,01) ($p=0,001$). W przypadku limfocytów wykazujących ekspresję antygeny CD4+, również najwięcej komórek na 10HPF znajdowało się w nacieku nowotworowym raka żołądka - 89 (+-18,5), następnie w przypadku zmian zanikowych błony śluzowej żołądka było to 44,8 (+-13,7) oraz w błonie śluzowej o prawidłowej architektonice - 37,8 (+-9,02). Obliczono również stosunek poszczególnych populacji limfocytów - Foxp3+/CD4. Wynosił w grupie raka średnio 0,47, w grupie zanikowego zapalenia żołądka 0,29, natomiast u chorych z prawidłową błoną śluzową 0,32. ($p=0,01$).

Wnioski:

ad1) Wzrost udziału limfocytów T regulatorowych w nacieku limfocytarnym polipów jelita grubego rozpoczyna się na wczesnym etapie karcynogenezy. Wzajemny stosunek ocenianych subpopulacji limfocytów T zmienia się znamienne w zależności od nasilenia dysplazji, a zwłaszcza przypadku obecności raka naciekającego jelita grubego.

Ad2) Wzrost ilości limfocytów Foxp3 jest wyraźnie zauważalny w obrębie błony śluzowej połączenia przełykowo-żołądkowego na etapie metaplastji Barrett'a zarówno z dysplazją, jak i bez. Przywrócenie równowagi limfocytarnej w tkance przełyku mogłoby być drogą zapobiegania rozwojowi raka przełyku na podłożu metaplastji Barrett'a.

Ad3) Do wyraźnego zwiększenia zarówno ilości bezwzględnej limfocytów Foxp3+, jak i do zmiany stosunku pomiędzy subpopulacjami limfocytów Foxp3+ oraz CD4+ dochodzi dopiero w stadium raka inwazyjnego.

Summary.

Introduction:

Some of the gastrointestinal track neoplasms develop from so called precancerous states. It is a pathological change in the tissue structure, predisposing to the development of malignant tumor.

The most investigated precancerous states are: Barrett's esophagus, atrophic gastritis and colonic adenoma. It is possible to visualize infiltration of lymphocytes (TIL – tumor infiltrating lymphocytes) into the tissue of malignant tumor. Lymphocytes with the expression of foxp3+ molecule (T regulatory lymphocytes) can be found among TIL. Their main function is creation of immunotolerance in tissues. It is said that Tregs help malignant tumors to avoid human immunological system. Their role in malignancies has been proven. However, it is not known if they are present in precancerous states. The doctorate consist of three papers: 1) Foxp3+ lymphocyte count in Barrett's esophagus tissue is higher than in inflamed esophageal tissue. 2)The number of regulatory Foxp3+ T-cells in different stages of malignant transformation of large intestinal polyps. 3) The number of regulatory Foxp3+ cells is higher in gastric cancer tissues than in atrophic gastritis tissues.

Aim of the study:

1) Assessment of inflammatory infiltration with T regulatory lymphocytes and T helper lymphocytes in precancerous states of colon, gastric and esophageal cancer. 2) Determination of the immunological balance between lymphocytes subpopulations of T regulatory and T helper cells on different stages of gastrointestinal tract malignancies development.

Materials and methods:

ad1) The study included tissue specimens from individuals subjected to complete colonoscopy with polypectomy and from patients who underwent surgical resection of colorectal tumors. This group included 27 individuals, among them there were 10 women (37%). Median age of the patients was 64 years (range 37-82 years). Surgical specimens included hyperplastic polyps (n=4), adenomatous polyps with low- (n=5) and high-grade dysplasia (n=8) and invasive colorectal cancers (n=10). Tregs were identified immunohistochemically.

2) 43 patients were enrolled to the study: 14 with esophageal carcinoma, 15 with Barrett's esophagus and 14 with non-metaplastic esophagitis. Every patient had undergone gastroscopy during which a tissue sample was taken. Foxp3+ lymphocytes and CD4+ lymphocytes were detected using immunohistochemistry.

3) Investigated tissues were sampled during gastroscopic examination or were taken from surgical specimen of the patients operated due to gastric cancer. 37 patients were enrolled in the study. First group consisted of 12 patients with atrophic gastritis. In second group there were 11 patients with gastric carcinoma. Third group – the control one- consisted of 14 patients with normal gastric mucosa. 48% of the patients were women. Tissue samples were assessed by the same, experienced pathologist. Apart from histological diagnosis, presence of Helicobacter Pylori germs was assessed as well.

Results:

Ad 1) Mean number of Foxp3+ T-cells per 10 high-power fields (HPFs) increased with polyp progression to malignant transformation, from 12.5 for hyperplastic polyps, 29.4 and 36.5 for adenomatous polyps with low- and high-grade dysplasia, respectively, to 56.3 for invasive colorectal cancers ($p = 0.00$). An increase in the mean number of CD4+ T-cells was also observed, from 45.75, 57.8, 84.125, to 110.6 per 10 HPFs, respectively, however this change did not prove to be statistically significant ($p = 0.13$). Mean Foxp3+/ CD4+ T-cell ratio increased in line with malignant transformation (from 0.27, 0.3, 0.43, to 0.5), although a statistically significant change of this parameter was only observed in case of invasive colorectal cancers ($p = 0.01$).

Ad2) Mean density of Foxp3+ cells in patients with esophagitis was 7.37/10HPF (range: 1–9), 18.5/10HPF (range: 5–29) and 26.8/10HPF (range: 16–40) in patients with dysplastic and non-dysplastic BE, respectively, and 47.92/10HPF in individuals with esophageal carcinoma. These intergroup differences were found to be statistically significant ($p = 0.000$). Patients with Barrett's metaplasia, either with or without dysplasia, presented with significantly higher Foxp3+ cell counts than the subjects with esophagitis ($p = 0.0003$ and $p = 0.0006$, respectively). Furthermore, the number of Foxp3+ lymphocytes in esophageal adenocarcinoma specimens were significantly higher than in esophagitis ($p = 0.0001$), nondysplastic and dysplastic BE tissue ($p = 0.016$ and $p = 0.00047$, respectively).

ad3) The highest Foxp3+ lymphocyte count was present in tissues sampled from patients with gastric carcinoma = 42.5 (+13.26)/10HPF. In patients with atrophic gastritis and proper architecture of gastric mucosa, the Foxp3+ lymphocyte count was 13 (+4.7) and 11.3/10HPF (+4.01), respectively (p=0.001). In case of lymphocytes with CD4+ expression, the highest concentration per 10 HPF was present in gastric cancer tissues - 89 (+18.5), then in atrophic gastritis 44.8 (+13.7) and in normal gastric mucosa - 37.8 (+9.02). Foxp3+/CD4+ ratio was calculated. It was 0.47 for gastric cancer, 0.29 for atrophic gastritis and 0.32 in normal mucosa (p=0.01).

Conclusions:

ad1) An increase in the number of Tregs in the lymphocytic infiltration of large intestinal polyps is observed at early stages of carcinogenesis. Proportions of various T-cell subpopulations in the infiltration vary considerably depending on the degree of dysplasia, especially in case of invasive colorectal cancer.

ad2) Barrett's metaplasia, either with dysplasia or without, is associated with an evident increase in the number of Foxp3 lymphocytes within the esophagogastric junction mucosa. Restoration of lymphocyte balance in esophageal tissue may prevent malignant transformation of Barrett's metaplasia.

ad3) Significant increase of Foxp3+ lymphocyte count and significant change of Foxp3+/CD4+ ratio are present in invasive cancer stage.