

# Ocena ekspresji immunosupresyjnego enzymu 2,3-dioksygenazy indolaminy w tkance raka jajnika

## *Evaluation of the expression of the immunosuppressive enzyme – indoleamine 2,3-dioxygenase in ovarian cancer tissue*

Ewelina Rogala<sup>1</sup>, Aldona Nowicka<sup>1</sup>, Wiesława Bednarek<sup>1</sup>, Bartłomiej Barczyński<sup>1</sup>, Wanda Piekarczyk<sup>1</sup>, Katarzyna Klimek<sup>2</sup>, Maciej Zakrzewski<sup>3</sup>, Jan Kotarski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie;

kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Jan Kotarski

<sup>2</sup>Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 1 w Lublinie;

dyrektor Szpitala: dr n. med. Adam Borowicz

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie;

kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Jerzy Mosiewicz

Przeгляд Menopauzalny 2013; 3: 223–227

### Streszczenie

**Wstęp:** Progresja choroby nowotworowej związana jest z funkcją układu immunologicznego. Ostatnie doniesienia dowodzą, że w mechanizmie ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego istotną rolę odgrywa enzym 2,3-dioksygenaza indolaminy (IDO). Może ona wyciszać lokalną odpowiedź immunologiczną poprzez blokowanie limfocytów T i komórek NK.

**Cel pracy:** Ocena ekspresji IDO na poziomie mRNA w tkance surowiczego oraz endometrioidalnego raka jajnika.

**Materiał i metody:** Badaniami objęto grupę 40 pacjentek z rakiem jajnika, z czego 15 było przed menopauzą, a 25 po menopauzie. Analizę ekspresji IDO na poziomie mRNA wykonano z zastosowaniem techniki Real-Time PCR (*polymerase chain reaction*). Grupę referencyjną stanowiła tkanka jajnika o prawidłowej budowie, usuniętego podczas leczenia operacyjnego innych schorzeń narządu płciowego.

**Wyniki:** Ekspresja IDO na poziomie mRNA została zaobserwowana we wszystkich badanych guzach jajnika. Była ona znacząco wyższa ( $p < 0,005$ ) w grupie pacjentek z rakiem jajnika (RQ = 0,171) w porównaniu z grupą referencyjną (RQ = 0,040). Rak surowicy wykazywał istotnie wyższą ekspresję IDO (RQ = 0,319) w porównaniu z rakiem endometrioidalnym (RQ = 0,091);  $p = 0,02$ . Ekspresja IDO w tkance nowotworowej pacjentek z III stopniem zaawansowania choroby nowotworowej była wyższa w porównaniu z jego ekspresją w tkance nowotworowej pacjentek z II stopniem zaawansowania raka jajnika, jednak różnica ta nie była statystycznie istotna. Nie wykazano także różnicy istotnej statystycznie w ekspresji IDO w odniesieniu do stopnia zróżnicowania histologicznego raka jajnika oraz statusu menopauzalnego.

**Wnioski:** Nowotwory jajnika różniące się budową histologiczną wykazują zróżnicowaną ekspresję IDO.

**Słowa kluczowe:** 2,3-dioksygenaza indolaminy, tolerancja immunologiczna, rak jajnika.

### Summary

**Introduction:** Tumor progression is associated with the function of the immune system. Recent studies have shown that indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is one of the molecules involved in tumor-induced immunosuppression. IDO probably induces tumor progression through inhibiting NK cells and T lymphocytes activity.

**Aim of the study:** The aim of our study was to assess indoleamine 2,3-dioxygenase at the mRNA level in ovarian serous and endometrial adenocarcinoma.

**Material and methods:** Forty patients (15 before and 25 after menopause) operated due to advanced ovarian carcinoma were recruited. mRNA expression of IDO was assessed by means of real-time PCR. The control group was represented by normal ovary tissue.

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Jan Kotarski, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1, ul. Staszica 16, 20-081 Lublin, tel. +48 81 532 78 47

**Results:** Indoleamine 2,3-dioxygenase was expressed at the mRNA level in all ovarian cancer patients. It was significantly higher ( $p < 0.005$ ) in cancer tissue than in healthy controls (RQ = 0.040). The expression of IDO in serous ovarian cancer (RQ = 0.319) was significantly higher ( $p = 0.02$ ) compared with the expression in endometrioid cancer (RQ = 0.091). The expression of IDO in ovarian cancer patients with clinical stage III was higher than in patients with clinical stage II, but this difference did not reach statistical significance. There was no statistically important difference between the expression of IDO in ovarian cancer patients in relation to grading and menopausal status.

**Conclusions:** IDO positive expression is different among the histological types.

**Key words:** indoleamine 2,3-dioxygenase, immune tolerance, ovarian cancer.

## Wstęp

Pomimo ogromnego postępu w diagnostyce oraz leczeniu, rak jajnika pozostaje główną przyczyną zgonów wśród schorzeń onkologicznych [1]. Badania pokazują, że najczęściej na raka jajnika zapadają kobiety po 50. roku życia.

Menopauza nie stanowi jednak istotnego czynnika predysponującego do powstania raka jajnika [2]. Status menopauzalny nie wiąże się z przebiegiem klinicznym raka jajnika. Wiek uznawany jest jednak za wiarygodny i niezależny czynnik predykcyjny, związany z przeżyciem i odpowiedzią na leczenie [3]. Środowisko hormonalne, w którym rozwija się guz u kobiet przed menopauzą i po menopauzie jest różne [4]. Progresa choroby nowotworowej warunkowana jest wieloma czynnikami, przy czym odpowiedź układu immunologicznego na rozwijający się nowotwór jest jednym z najważniejszych elementów [5–7]. Ostatnie doniesienia dowodzą, że w mechanizm ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego jest zaangażowany enzym 2,3-dioksygenaza indolaminy (IDO) [5].

2,3-dioksygenaza indolaminy jest wewnątrzkomórkowym enzymem inicjującym katabolizm tryptofanu (TRP) [8]. Immunosupresyjne działanie IDO po raz pierwszy udokumentowali Munn i wsp., wykazując protekcyjną rolę tego enzymu w odrzuceniu alogenicznego płodu u myszy [9]. Późniejsze badania dotyczyły roli IDO w patogenezie chorób nowotworowych. Wydzielana przez komórki nowotworowe IDO blokuje proliferację aloreaktywnych limfocytów T i komórek NK poprzez lokalne uszczuplenie zasobów tryptofanu i produkcję jego toksycznego metabolitu – kynureniny [5, 10, 11]. Limfocyty T i komórki NK (*natural killer*) są szczególnie wrażliwe na ubytek tryptofanu. Jego brak powoduje zahamowanie ich proliferacji oraz blokadę cyklu komórkowego w fazie G1 [9]. Na podstawie tych obserwacji wysnuto teorię, że ekspresja IDO może wyciszać lokalną odpowiedź immunologiczną poprzez blokowanie limfocytów T i komórek NK. Duże zainteresowanie badaczy wywołało wykazanie obecności IDO w prezentujących antygen komórkach dendrytycznych (*dendritic cells* – DCs). Udowodniono, że DCs z ekspresją IDO hamują odpowiedź immunologiczną na antygen nowotworowy [12].

Badania potwierdzają aktywność IDO w różnych ludzkich nowotworach: raku żołądka, trzustki, prostaty

i odbytu [5]. W raku jajnika wykazano zależność pomiędzy silną ekspresją IDO a progresją choroby i krótszym czasem przeżycia [13, 14].

## Cel pracy

Celem pracy była ocena ekspresji IDO na poziomie mRNA w tkance surowiczego oraz endometrioidalnego raka jajnika.

## Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 40 kobiet, leczonych operacyjnie w I Katedrze i Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie z powodu raka jajnika w II lub III stopniu zaawansowania wg FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*). Histopatologiczna ocena wykazała obecność: raka surowiczego w 23 przypadkach i raka endometrioidalnego w 17 przypadkach. U badanych pacjentek stwierdzono nowotwór w stopniu zróżnicowania wg Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization* - WHO): G2 ( $n = 18$ ) oraz G3 ( $n = 22$ ). Grupę referencyjną stanowiły tkanki jajnika pobrane od 12 pacjentek, operowanych z innych wskazań niż patologia jajnika. W grupie badanej 15 pacjentek było przed menopauzą, a 25 po menopauzie, w grupie referencyjnej 5 było przed menopauzą, a 7 po menopauzie.

Tkanki guza zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano do momentu izolacji mRNA w  $-80^{\circ}\text{C}$ . Izolację RNA wykonywano z zastosowaniem odczynnika Tri Reagent zgodnie z instrukcją producenta. Jeden mikrogram totalnego RNA przepisywano na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem kitu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Analizę wykonano z zastosowaniem techniki Real-Time PCR (*polymerase chain reaction*). Poziom ekspresji mRNA 2,3-dioksygenazy indolaminy został określony z użyciem sondy TaqMan (Assay ID Hs00984148\_m1) na aparacie 7900 HT Fast-Real Time PCR Systems wg protokołu rekomendowanego przez producenta (Applied Biosystems). Ilościową analizę wykonano z zastosowaniem metody RQ (*relative quantification*), w której referencję endogenną stanowił gen *GAPDH*.

**Wyniki**

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach I, II oraz na rycinie 1.

Ekspresja IDO na poziomie mRNA występowała we wszystkich badanych guzach jajnika. Była ona znacznie wyższa ( $p < 0,05$ ) w grupie pacjentek z rakiem jajnika (RQ = 0,171) w porównaniu z grupą kontrolną (RQ = 0,040). Rak surowiczy wykazywał istotnie wyższą ekspresję IDO (RQ = 0,319) w porównaniu z rakiem endometrioidalnym (RQ = 0,091);  $p = 0,02$ . W obu badanych typach histologicznych guza nie wykazano różnicy istotnej statystycznie w ekspresji IDO w odniesieniu do stopnia zróżnicowania histologicznego raka jajnika (w raku

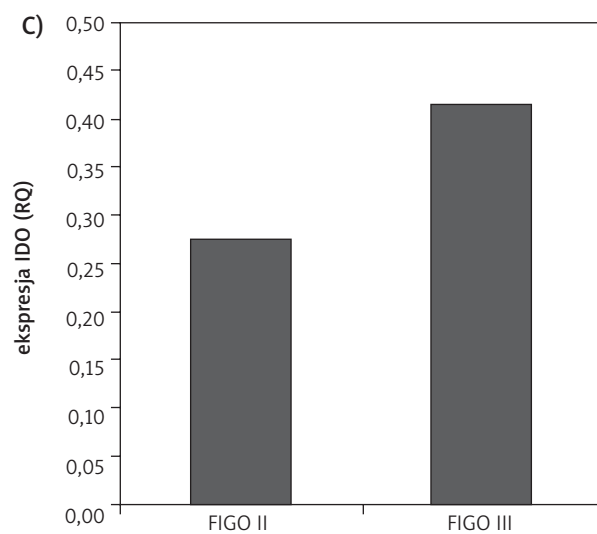
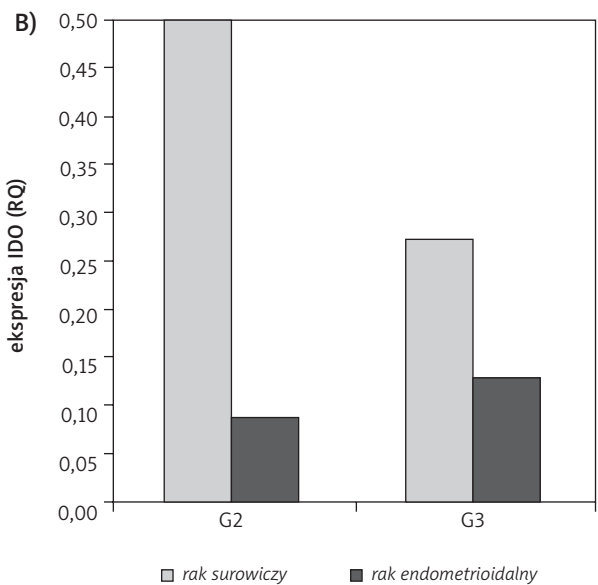
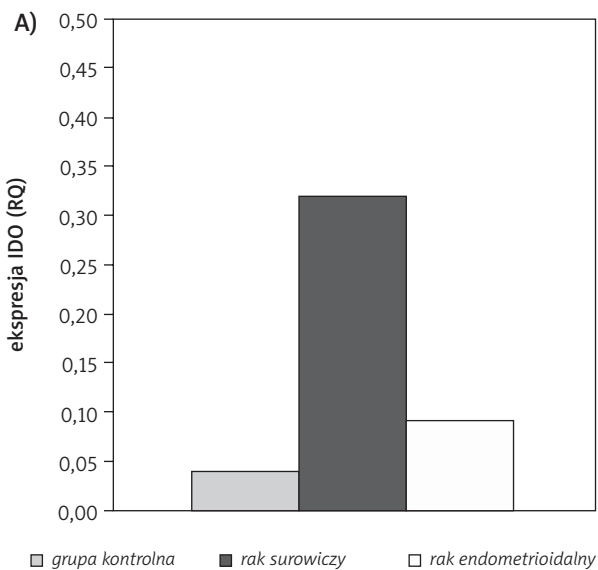
surowiczym  $p = 0,352$ , w raku endometrioidalnym  $p = 0,141$ ). Nie zaobserwowano także różnic w ekspresji badanego enzymu w odniesieniu do stopnia zaawansowania klinicznego raka jajnika oraz statusu menopauzalnego. Ekspresja IDO zarówno w grupie kobiet przed menopauzą (RQ = 0,319), jak i po menopauzie (RQ = 0,117) była istotnie wyższa ( $p < 0,05$ ) w obydwu typach histologicznych guza z porównaniem z grupą referencyjną.

**Tab. I.** Ekspresja IDO w grupie referencyjnej, surowiczym i endometrioidalnym raku jajnika

	n	Ekspresja IDO w raku jajnika		
		RQ (mediana)	minimum	maksimum
kontrola	12	0,040	0,022	0,320
rak surowiczy	23	0,319	0,055	8,076
rak endometrioidalny	17	0,091	0,045	4,321
razem grupa badana	40	0,171	0,088	0,527

**Tab. II.** Ekspresja IDO u pacjentek z rakiem jajnika przed menopauzą i po menopauzie. W nawiasach wartości minimum i maksimum

	Ekspresja IDO (RQ – mediana)	
	przed menopauzą	po menopauzie
kontrola	0,032 (0,022–0,120)	0,048 (0,07–0,146)
rak surowiczy	0,446 (0,118–3,097)	0,192 (0,055–8,076)
rak endometrioidalny	0,103 (0,84–0,171)	0,079 (0,045–4,323)



**Ryc. 1.** Ekspresja IDO na poziomie mRNA (mediana): A) w surowiczym i endometrioidalnym raku jajnika; B) w stopniu zróżnicowania histologicznego G2 i G3 surowiczego i endometrioidalnego raka jajnika; C) w II i III stopniu klinicznego zaawansowania raka jajnika

## Dyskusja

W prezentowanej pracy wykazano ekspresję IDO na poziomie mRNA we wszystkich 40 tkankach raka jajnika. Była ona istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną ( $p < 0,005$ ). W naszych badaniach nie zanotowano różnic w ekspresji IDO w odniesieniu do statusu menopauzalnego. Ekspresja IDO prawdopodobnie nie jest regulowana hormonalnie, a jego udział w progresji raka jajnika nie zależy od statusu menopauzalnego. Przedstawione przez autorów niniejszej pracy wyniki dotyczą dwóch typów histologicznych raka jajnika (surowiczego i endometrioidalnego). Ciekawą obserwacją wydaje się istotnie wyższa ekspresja IDO w raku surowiczym w porównaniu z rakiem endometrioidalnym. Stwierdzono także wyższą ekspresję IDO u pacjentów z III stopniem zaawansowania klinicznego raka jajnika. Można więc przypuszczać, że progresji i rozsiewowi nowotworu towarzyszy silniejsza inhibicja odpowiedzi immunologicznej w następstwie wyższej ekspresji IDO. Wyniki przeprowadzonych badań są zgodne z obserwacjami Okamoto i wsp., którzy po raz pierwszy wykazali obecność IDO u chorych na raka jajnika, opornych na leczenie paklitaksemem. Silna ekspresja IDO była obserwowana w zmianach nowotworowych u pacjentów z III–IV stopniem zaawansowania klinicznego surowiczego raka jajnika [15]. Wyraźną korelację między ekspresją IDO a krótszym czasem przeżycia u chorych z zaawansowanym surowiczym rakiem jajnika (nie z innymi typami histologicznymi) potwierdziły badania Takao i wsp. [16]. Inaba i wsp. uzyskali wyniki na podstawie analizy immunohistochemicznej. W badaniach 60 przypadków raka jajnika, wysoka ekspresja IDO obecna była u chorych z III–IV stopniem zaawansowania klinicznego (70%) i wyraźnie korelowała z niskim odsetkiem limfocytów T CD8+ infiltrujących guz oraz krótszym czasem przeżycia. Odmienne niż w badaniach Takao i wsp., korelacja ta obserwowana była we wszystkich histologicznych typach raka jajnika [17]. Immunosupresyjne działanie IDO potwierdzają doniesienia Nonaka i wsp. [18]. Badacze ci wykazali, że ludzkie komórki raka jajnika ze wzmożoną ekspresją IDO blokują funkcję komórek NK, co prowadzi do wzrostu guza. Do podobnych wniosków dotyczących roli IDO w indukcji tolerancji immunologicznej doszli Qian i wsp. Zwiększonej ekspresja IDO w komórkach raka jajnika towarzyszyła mniejsza proliferacja limfocytów T *in vitro* [19]. Z przedstawionych danych wynika, że IDO indukuje tolerancję immunologiczną w mikrośrodowisku guza. Ekspresję IDO wykazuje ponad połowa pacjentów dotkniętych nowotworami ginekologicznymi w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego, co jest skorelowane z krótszym czasem przeżycia. W świetle powyższych badań, ciekawym wydaje się dokonanie wieloczynnikowej analizy na większej liczbie pacjentów, mającej na celu stwierdzenie, czy IDO może stanowić czynniki prognostyczny tylko dla surowiczego raka jajnika czy także dla pozostałych typów histologicznych.

## Wnioski

Nowotwory jajnika różniące się budową histologiczną wykazują zróżnicowaną ekspresję IDO.

*Przeprowadzone badania były finansowane z grantu: KBN N N407038537 oraz zadania badawczego MNsd 125/12 i MNsd 126/12. Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach projektu: „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.*

## Piśmiennictwo

- McGuire III WP, Markman M. Primary ovarian cancer chemotherapy: current standards of care. *Br J Cancer* 2003; 89 Suppl. S3-8.
- Marzec-Kotarska B, Kotarski J, Cybulski M, et al. Ekspresja genu podoplaniiny w złośliwych nowotworach jajnika. *Prz Menopauz* 2011; 12: 102-5.
- Pectasides D, Fountzilas G, Aravantinos G, et al. Epithelial ovarian carcinoma in younger vs older women: is age an independent prognostic factor? The Hellenic Oncology Cooperative Group experience. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 1003-10.
- Vo C, Carney ME. Ovarian cancer hormonal and environmental risk effect. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2007; 34: 687-700.
- Uytlenhove C, Pilotte L, Theatev I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003; 9: 1269-74.
- Wertel I, Polak G, Barczyński B, et al. Subpopulacje komórek dendrytycznych krwi obwodowej w przebiegu chemioterapii raka jajnika. *Ginekol Pol* 2007; 78: 768-71.
- Whiteside TI. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanism and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 3-15.
- Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase an immunomodulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 2005; 11: 312-9.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fatal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281: 1191-3.
- Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 2002; 196: 459-68.
- Della Chiesa M, Carlomagno S, Frumento G, et al. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of Nkp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* 2006; 108: 4118-25.
- Munn DH, Sharma MD, Hou D, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 2004; 114: 280-90.
- Inaba T, Ino K, Kajiyama H, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. *Gynecol Oncol* 2010; 117: 423-8.
- Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br J Cancer* 2006; 95: 1555-61.
- Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6030-9.
- Takao M, Okamoto A, Nikaido T, et al. Increased synthesis of indoleamine-2,3-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer. *Oncol Rep* 2007; 17: 1333-9.
- Inaba T, Ino K, Kajiyama H, et al. Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2009; 115: 185-92.

18. Nonaka H, Saga Y, Fujiwara H, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through inhibition of natural killer cell function and angiogenesis promotion. *Int J Oncol* 2011; 38: 113-20.
19. Qian F, Vilella J, Wallace PK, et al. Efficacy of levo-1-methyl tryptophan and dextro-1-methyl tryptophan in reversing indoleamine-2,3-dioxygenase-mediated arrest of T-cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 5498-504.