

Received: 2013.02.21
Accepted: 2013.08.13
Published: 2013.11.26

Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe w raku płuca – znaczenie w diagnostyce i ocenie odpowiedzi układu odpornościowego

Bronchoalveolar lavage in lung cancer – diagnostic value and assessment of the anti-cancer immune response

Iwona Osińska, Joanna Domagała-Kulawik

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii. Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Rak płuca należy do najgroźniejszych nowotworów na świecie. Mimo postępu w leczeniu i prowadzeniu licznych badań nowotwór ten pozostaje pierwszą przyczyną zgonów na nowotwory złośliwe u obu płci, a całkowite wyleczenie nie przekracza 15%. Zalicza się go do nowotworów litych, w swoim rozwoju uruchamia mechanizmy wymykania się spod nadzoru immunologicznego. Obserwowane są np.: osłabiona i zmieniona antygenowość, osłabienie funkcji komórek prezentujących antygen, wzmożona apoptoza komórek cytotoksycznych naciekających guz, hamowanie odpowiedzi immunologicznej przez komórki regulatorowe. Rozpoznanie tych mechanizmów wydaje się podstawowe w walce z rakiem płuca. Mały odsetek guzów kwalifikujących się do resekcji sprawia, że badanie odpowiedzi immunologicznej w środowisku raka płuca jest bardzo ograniczone. Rolę tę może spełnić badanie płynu oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF) w zakresie składu komórkowego, subpopulacji limfocytów i składu cytokin dzięki swoim właściwościom i możliwościom pobrania podczas diagnostycznego badania bronchoskopowego. BALF kwalifikuje się do badania nowoczesną metodą cytometrii przepływowej, co umożliwia precyzyjną ocenę fenotypu komórek limfoidalnych i ekspresję czynników regulatorowych na komórkach w otoczeniu guza. Dotychczasowe wyniki badań wykazały, że skład płynu z BAL zmienia się istotnie u chorych na raka płuca, ale także pod wpływem palenia papierosów, co jest z tym nowotworem nieodłącznie związane. Poza znaczeniem w ocenie zmian immunologicznych w środowisku nowotworu, BAL spełnia kryteria badania diagnostycznego w guzach rozsianych i położonych obwodowo. W artykule omówiono możliwości wykorzystania tej wystandaryzowanej metody w diagnostyce raka płuca i ocenie środowiska jego rozwoju przed podjęciem systemowego leczenia.

Słowa kluczowe:

rak płuca • BAL • limfocyty • komórki regulatorowe

Summary

Lung cancer is the most serious neoplasm worldwide. Despite significant progress in the treatment regimens and ongoing research development, lung cancer remains the first cause of cancer death in both sexes, and 5-year survival does not exceed 15%. The failure of host defense against this solid tumor is well known. The mechanisms of escaping from immune surveillance include, among others, changing of cancer cells' antigenicity, impaired function of antigen-presenting cells, enhancing apoptosis of tumor-infiltrating cytotoxic cells, and immune response inhibition by regulatory cells. To recognize these mechanisms well is very

important in anti-cancer therapy. The small number of resectable cases of lung cancer causes very low availability of tumor environment examination. The cellular pattern and cytokine concentration in bronchoalveolar fluid (BALF), which can be performed during diagnostic bronchofiberscopy, reflects the changes in tumor milieu. The character of BAL fluid qualifies this material for analysis by flow cytometry with precise evaluation of lymphoid cell phenotype and measurement of the surface and cytoplasmic molecules' regulatory properties. The results of previous studies have shown that the BAL fluid composition well characterized the local immune response in patients with lung cancer. However, many of the cases resulted from the influence of tobacco smoke, which is inextricably connected with cancer. Furthermore, BAL fulfills the diagnostic criteria in peripheral tumors and in disseminated malignant changes in the lung. We discuss the usefulness of this well-standardized method in the diagnosis of lung cancer and in the assessment of the local immune response prior to systemic treatment.

Key words: lung cancer • BAL • lymphocyte • regulatory cells

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1077723>

Word count: 2518
Tables: 3
Figures: 2
References: 56

Adres autorki: prof. Joanna Domagała-Kulawik, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii. Warszawski Uniwersytet Medyczny, 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1a; e-mail: domagalakulawik@gmail.com

Wykaz skrótów: **APC** – komórka prezentująca antygen (antygen presenting cells); **B** – B limfocyt (B lymphocyte); **BAL** – płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (bronchoalveolar lavage); **BALF** – płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (bronchoalveolar lavage fluid); **CEA** – antygen karcynoembrionalny (carcino-embryonic antygen); **CD** – kompleks różnicowania (cluster of differentiation); **CTLA-4** – cytotoksyczny antygen limfocytów T (cytotoxic T-lymphocyte antygen 4); **Fas** – receptor śmierci (death receptor); **FasL** – ligand dla receptora Fas (Fas ligand); **IDO** – 2,3-dioxygenaza indoloaminy (indoleamine 2,3-dioxygenase); **IL** – interleukina (interleukin); **M1, M2** – makrofagi typu M1, M2 (macrophages); **MHC** – główny układ zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **NK** – naturalny zabójca (natural killer); **PB** – krew obwodowa (peripheal blood); **Tc** – T cytotoksyczny limfocyt (T cytotoxic lymphocyte); **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu β (transforming growth factor); **Th** – T pomocniczy limfocyt (T helper lymphocyte); **Treg** – T regulatorowy limfocyt (T regulatory lymphocyte).

ZNACZENIE BADANIA PŁYNU Z PŁUKANIA OSKRZELOWO-PĘCHERZYKOWEGO W OCENIE RAKA PŁUCA

Rak płuca - zarys problemu

Powszechne występowanie raka płuca (rocznie ponad 1 milion 300 tysięcy zachorowań na świecie) oraz zły rokowanie skłania do ciągłego podejmowania badań nad tym nowotworem. Rak płuca zajmuje pierwsze miejsce wśród przyczyn zgonów z powodu nowotworów złośliwych w Polsce i na świecie [12], jest najczęstszym typem nowotworu u mężczyzn w Polsce i przyczyną aż 1/3 zgonów z powodu nowotworów złośliwych. W 2008 r. liczba zgonów z powodu raka płuca wynosiła w Polsce prawie 17 000 mężczyzn i 5 600 kobiet. Od początku lat 90 ub.w. obserwuje się jednak zahamowanie rosnącego zagrożenia tym nowotworem i powolny systematyczny spadek

u mężczyzn [13]. W populacji kobiet w Polsce w 2007 r. po raz pierwszy częstość zgonów z powodu nowotworu płuca wyprzedziła częstość zgonów związanych z rakiem piersi [14,31]. Podobnie w większości krajów europejskich notuje się bardzo szybki wzrost częstości raka płuca u kobiet [51]. Zachorowalność i umieralność z powodu raka płuca jest skorelowana z wiekiem - największe zagrożenie w grupie pacjentów w najstarszym wieku obu płci. Udokumentowano istotny związek przyczynowy występowania raka płuca z paleniem papierosów [15].

Ze względu na różnice w biologii, przebiegu klinicznym i sposobie leczenia wyodrębnia się niedrobnokomórkowego (NDRP) oraz drobnokomórkowego (DRP) raka płuca. W związku z nowymi sposobami leczenia, zwłaszcza w terapii celowanej znaczenie kliniczne ma precyzyjne rozpoznanie podtypu NDRP: raka płaskonabłonkowego

i gruczołowego [32]. W ostatnich latach pojawiła się nowa siódma edycja klasyfikacji TMN oceny zaawansowania raka płuca [56]. W raku płuca nadal dużym problemem pozostaje zbyt późne rozpoznanie. W większości przypadków nowotwór płuca rozpoznaje się w zaawansowanym stadium. Całkowite wyleczenie osiąga się ogółem u około 15% chorych. Prawie 70% chorych nie kwalifikuje się do leczenia operacyjnego w chwili rozpoznania. To również sprawia, że w dużym odsetku chorych guz niedostępny jest do pełnej diagnostyki histopatologicznej, ale także utrudnia znacznie badania poznawcze. Rozpoznawanie raka płuca opiera się na badaniu wycinka tkankowego lub materiału cytologicznego pobranego z guza podczas badania endoskopowego-bronchofiberoskopii. W pewnym odsetku przypadków guzy położone są obwodowo i pozostają poza zasięgiem bronchoskopu.

W badaniach poznawczych dotyczących patomechanizmu nowotworzenia, ekspansji nowotworu oraz odpowiedzi gospodarza na jego rozwój wykorzystuje się materiał operacyjny, drobne wycinki lub krew obwodową. W pierwszym przypadku dane dotyczące zmian w obrębie nacieku wokół guza usuniętego operacyjnie ograniczają zakres wiedzy do mało zaawansowanych stadiów operacyjnego raka niedrobnokomórkowego. Badania prowadzone z wykorzystaniem krwi obwodowej nie pozwalają na wykazanie zmian miejscowych, krew służy jako materiał do oceny zmian ogólnoustrojowych. Tymczasem wiadomo, że środowisko płuc wykazuje pewną odrębność pod względem charakteru odpowiedzi immunologicznej zarówno u osób zdrowych jak i u osób z chorobami płuc. Badaniem, które umożliwia uzyskanie bogatego materiału komórkowego i substancji pozakomórkowych ze znacznego obszaru obwodowych dróg oddechowych jest płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) [6].

BAL – metoda oceny stanu immunologicznego płuc

Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF) pobierany jest w czasie badania bronchofiberoskopowego. Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) jest to badanie umożliwiające pozyskanie materiału komórkowego i niekomórkowego z przestrzeni oskrzelowo-pęcherzy-

kowej (z powierzchni nabłonka obwodowego dróg oddechowych) [45]. BAL jest to metoda stosunkowo mało inwazyjna, opracowano standardy wykonania i oceny uzyskanego materiału [6]. W praktyce badanie polega na wprowadzeniu w porcjach około 100-250 ml płynu (soli fizjologicznej) ogrzanego do temperatury 37°C i odessaniu go, przy czym zwykle odzyskuje się ok. 50-70% pierwotnej objętości. W wyniku „przeplukania” powierzchni pęcherzyków płucnych solą fizjologiczną otrzymuje się kilka milionów komórek o żywotności ponad 90%. Skład komórkowy od osób zdrowych niepalących jest stały i różni się od składu komórkowego palaczy papierosów [6,26] (tabela 1).

Poza klasycznym badaniem cytologicznym bardzo cenną metodą badania BALF jest cytometria przepływowa. BALF zawiera dużą liczbę żywych komórek, które stanowią naturalną zawiesinę, przez co może być wykorzystywany do oceny fenotypu komórek czy cytokin wewnątrzkomórkowych. Problemem może być domieszka śluzu, pyłów lub ewentualnie krwi przy ocenie płynu z wykorzystaniem technik cytometrii przepływowej. Wykazano jednak, że po wyeliminowaniu tego problemu, możliwe jest uzyskanie spójnych i wiarygodnych wyników, korelujących z oceną fenotypu komórek metodą immunocytochemiczną [49].

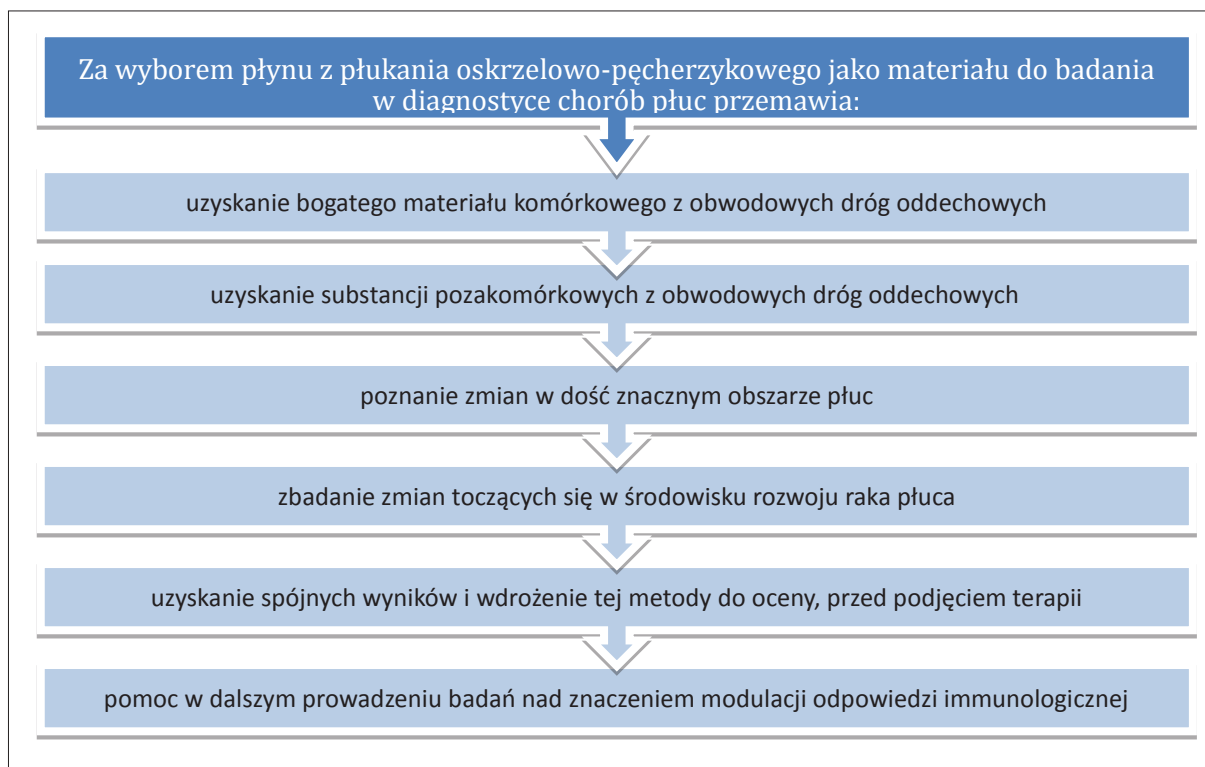
Aby wyniki badania materiału z BAL były wiarygodne i spójne konieczne jest opracowanie materiału uzyskanego z BAL, według ogólnie przyjętych zasad [6]. Próbkę powinny spełniać następujące kryteria:

- nie mogą zawierać widocznych domieszek śluzu ani pyłów, które mogą prowadzić do autofluorescencji;
- nie mogą również zawierać wyraźnej domieszki krwi;
- odzysk płynu musi wynosić co najmniej 30%.

Podstawowym zastosowaniem praktycznym badania płynu z BAL jest diagnostyka chorób rozsianych płuc, w tym infekcji, chorób śródmiąższowych czy zawodowych. Właściwości materiału pozyskanego podczas tego mało inwazyjnego badania warunkują bardzo szerokie zastosowanie BAL jako metody poznawczej. Skład komórkowy i cytokinowy płynu z BAL odzwierciedla bowiem rzeczywisty stan układu immunologicznego i jego homeostazę w zdro-

Tabela 1. Porównanie składu komórkowego płynu z BAL od osób zdrowych niepalących i osób palących tytoń [6,26]

	Osoby NIEPALĄCE	Osoby PALĄCE
Całkowita liczba komórek [x 10 ⁶]	10	20
Makrofagi (%)	> 80	> 90
Limfocyty (%)	< 15	< 10
Granulocyty obojętnochłonne (%)	< 3	< 3
Granulocyty kwasochłonne (%)	< 0,5	< 0,5
Stosunek odsetka limfocytów CD4+/CD8+	1,5-2,5	0,5-1,5



Ryc. 1. Korzyści płynące z wykorzystania tego materiału do badania u chorych z rakiem płuca

wiu oraz podstawowe mechanizmy naruszenia tego stanu w procesach chorobowych. Jako naturalna zawieszina komórkowa płyn z BAL kwalifikuje się do badania z zastosowaniem nowoczesnych technik [3,6]. W oparciu o dane literaturowe i doświadczenie własne autorów, znaczenie badania BAL w przypadku rozrostów nowotworowych można ująć w dwóch aspektach:

- 1) badanie diagnostyczne guzów rozsianych i zlokalizowanych obwodowo,
- 2) badanie stanu miejscowego układu immunologicznego środowiska rozwoju nowotworu.

Badanie BALF pozwala na ocenę zmian w znacznym obszarze płuc, stanowiącym miejsce rozwoju nowotworu, u chorych w różnych stadiach zaawansowania guza, także nieoperacyjnych. Korzyści wynikające z wykorzystania tego materiału do badania u chorych na raka płuca zostały podsumowane na rycinie 1. Jednym z praktycznych zastosowań BAL może być zbadanie stanu układu odpornościowego przed wdrożeniem chemioterapii w tym łatwo dostępnym materiale, co może poprawić odpowiedni dobór środków leczniczych i wpisuje się w aktualne zalecenia terapii personalizowanej.

BAL- znaczenie w diagnostyce raka płuca

Pierwsze badania z wykorzystaniem płynu z BAL u chorych na raka płuca przeprowadzone były w małych grupach badanych. Jednak już w tych badaniach próbowano wyjaśnić znaczenie zastosowania tej metody w diagnostyce guzów płuc [39] i postawiono tezę, że

ocena składników komórkowych i humoralnych w BALF może dostarczyć nowych informacji na temat mechanizmów chorobotwórczych zachodzących w raku płuca [47]. Oceniano między innymi stężenia markerów nowotworowych, takich jak antygen karcinoembrionalny (CEA), co jednak nie znalazło zastosowania praktycznego [9]. Badania te wykazały że płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe i ocena płynu jest użytecznym narzędziem w diagnostyce nacieków w płucach. Skuteczność diagnostyczna BAL okazała się porównywalna z przezoskrzelową biopsją aspiracyjną cienkoigłową, a metoda cennym narzędziem diagnostycznym w rozpoznawaniu obwodowych pierwotnych nowotworów płuc [11,34,42,44]. Publikacje te powstały w latach 80-90 ubiegłego wieku i mimo że płyn z BAL stanowi bardzo cenny materiał, brakuje aktualnych opracowań dotyczących użyteczności jego badania w diagnostyce raka płuca.

Badanie cytologiczne BAL znajduje zastosowanie w diagnostyce różnicowej zmian w płucach o charakterze rozsianym. Taką postać morfologiczną mogą mieć rozrosty limfoproliferacyjne, które wymagają różnicowania z infekcjami i chorobami śródmiąższowymi. Możliwa jest zarówno identyfikacja komórek chłoniaka w badaniu cytologicznym popartym badaniem immunocytochemicznym [7,43], jak i ocena fenotypu komórek limfoidalnych w cytometrii przepływowej. W przypadku płynu ze znaczną przewagą limfocytów rozpoznanie fenotypu limfocytów B (CD19 lub CD20+) może wskazywać na rozrost limfoproliferacyjny (limfocyty B stanowią nieliczną populację w warunkach zdrowia) i ukierunkować dalszą diagnostykę. Możliwość

rozpoznania procesu rozrostowego w BAL i różnicowanie z czynnikami infekcyjnymi uzasadnia wykorzystanie badania w transplantologii [36,43].

Rak gruczołowy jest tym typem histologicznym pierwotnego raka płuca, który może być rozpoznawany z największą czułością z wykorzystaniem płukania oskrzelowo-pęcherzykowego [43]. W poprzedniej klasyfikacji histologicznej znajdował się typ oskrzelikowo-pęcherzykowy, który objawiał się drobnoguzkowymi zmianami rozsianymi. Typ ten został wykreślony z obecnej klasyfikacji raka gruczołowego [32]. Biorąc pod uwagę charakter rozrostów gruczołowych wymienionych w nowej klasyfikacji wydaje się, że BAL może znajdować największe znaczenie w diagnostyce w typie z tapetowaniem przegród lub zmian o charakterze przednowotworowego rozrostu gruczołowego. W związku z potencjalną możliwością rozpoznania procesu nowotworowego zaleca się każdorazowe wykonywanie preparatów utrwalonych w alkoholu i barwionych hematoksyliną-eozyną, jak w badaniach histopatologicznych oraz konsultowanie preparatów z obecnością komórek atypowych przez patomorfologa [6]. Niekiedy zmiany odczynowe komórek nabłonka pęcherzykowego (AEC II), jak również nietypowe obrazy komórek układu immunologicznego, takie jak makrofagi, mogą stwarzać trudności diagnostyczne i budzić podejrzenie procesu złośliwego [19].

ZABURZENIA MECHANIZMÓW IMMUNOLOGICZNYCH W RAKU PŁUCA

W środowisku toczącego się nowotworu dochodzi do znacznych zmian i zaburzeń immunologicznych. Kliniczne ujawnienie się nowotworu łitego, jakim jest rak płuca wiąże się z wymknięciem spod nadzoru immunologicznego, w którym udział biorą liczne mechanizmy, przedstawione schematycznie na rycinie 2. Głównymi komórkami zdolnymi do efektu cytotoksycznego, który jest hamowany w przebiegu nowotworu, są limfocyty T cytotoksyczne (Tc, CD8+), które „rozpoznają” obcą tkankę guza m.in. za pomocą komórek prezentujących antygen (APC-antigen presenting cells) [52]. Do pełnej aktywacji limfocytów cytotoksycznych niezbędne jest przekazanie sygnału kostymulującego m.in. poprzez cząsteczki B7 na powierzchni komórki prezentującej antygen i ich receptorów (CD28) na powierzchni limfocytu. Wykazano, że jedną z przyczyn upośledzenia rozpoznawania komórek nowotworowych są zaburzenia lub brak cząsteczek kostymulujących na komórkach guza oraz na komórkach prezentujących antygen w środowisku nowotworu. Cząsteczki B7 mogą również przekazywać sygnał supresyjny przez oddziaływanie z cząsteczkami CTLA-4, które hamują przekaz sygnału przez receptor TCR limfocytów T [1, 20]. Badania innych autorów wykazują, że wraz ze wzrostem liczby komórek T-regulatorowych wzrasta ekspresja czynnika CTLA4, i ma to również związek z zaawansowaniem choroby i gorszym rokowaniem [22]. Dlatego istotne wydaje się - podczas analizowania zaburzeń mechanizmów immunologicznych - uwzględnienie ekspresji cząsteczek CTLA-4 na komórkach limfoidalnych w środowisku raka płuca. Wykazano

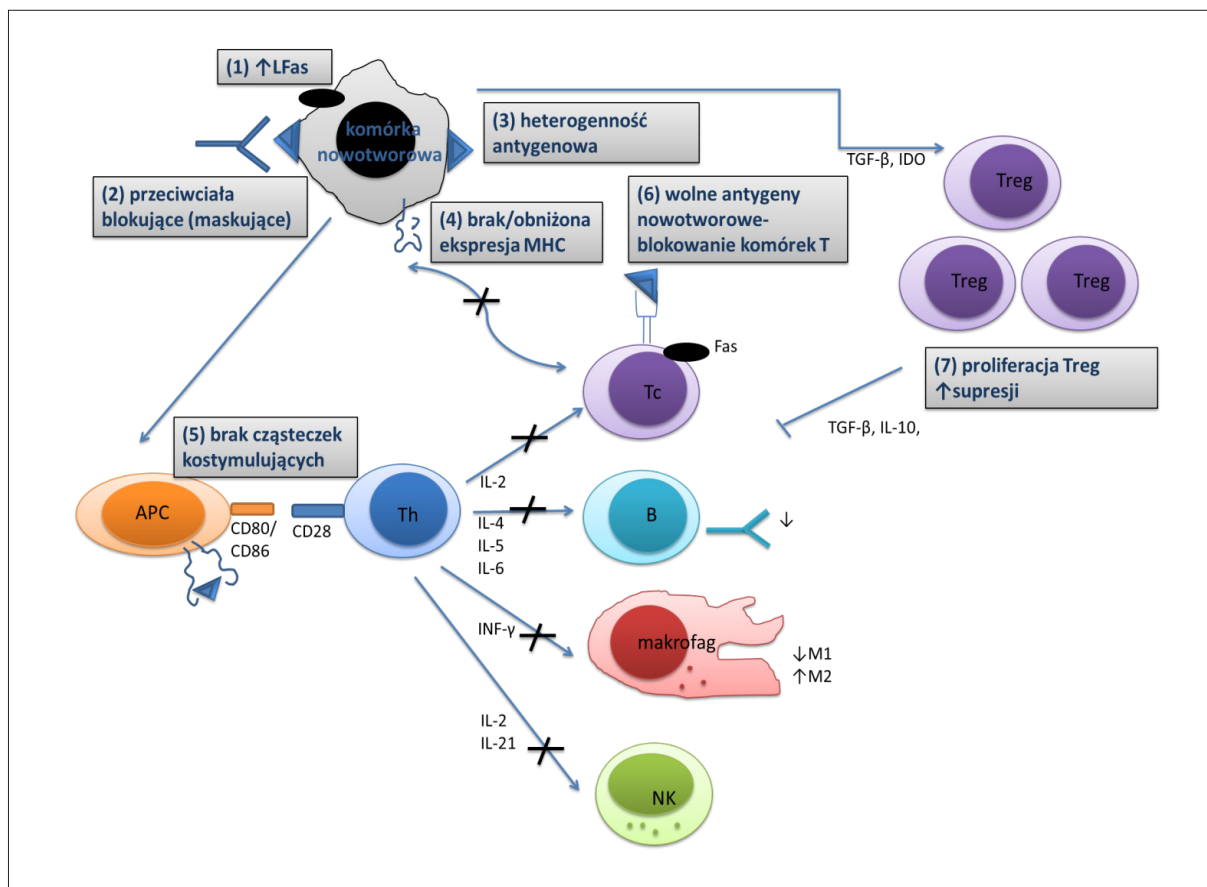
również, że antygeny krążące, które zostały uwolnione z komórki nowotworowej lub też fragmenty komórki nowotworowej mogą działać jak czynniki blokujące i powodować blokowanie limfocytów efektorowych. Innym mechanizmem powodującym „wymknięcie” się komórki nowotworowej spod nadzoru układu immunologicznego jest maskowanie antygenów na powierzchni komórki nowotworowej przez przeciwciała, co blokuje dostęp właściwych komórek efektorowych. Ponadto komórki nowotworowe mają bardzo często obniżoną ekspresję lub brak cząsteczek MHC, a antygeny nowotworowe są heterogenne [1].

Komórki nowotworowe niszczone są m.in. w procesie apoptozy. Jednym z najbardziej aktywnych układów w mechanizmie apoptozy jest układ Fas/FasL (ligand). Apoptozie ulegają komórki, które mają na powierzchni receptor Fas, po połączeniu z FasL [30]. Obroną nowotworu przed niszczeniem jest znaczący ubytek Fas na powierzchni komórek raka, a także wpływ na ubytek limfocytów cytotoksycznych w jego otoczeniu. Zaobserwowano wzrost ekspresji liganda dla białka Fas na komórce nowotworowej, co doprowadza do niszczenia limfocytów cytotoksycznych naciekających guz [33]. Dodatkowo obserwuje się zwiększoną ekspresję receptora Fas na limfocytach w środowisku raka.

Komórki nowotworowe zdolne są do wydzielania substancji działających hamująco na układ odpornościowy. Jednym z najlepiej poznanych czynników o takim działaniu jest identyfikowany w zwiększonych stężeniach w guzach i w hodowlach komórek nowotworowych, transformujący czynnik wzrostu TGF- β [4,23]. Podobne działanie przypisuje się IL-10, IL-2 oraz 2,3-dioksygenazę indoloaminy, indukującej ekspresję CTLA-4.

Najnowsze wyniki badań nad odpowiedzią immunologiczną w nowotworach wskazują na udział w tym procesie komórek regulatorowych. Stwierdzono, że limfocyty T-regulatorowe (Treg) są zdolne do hamowania aktywności limfocytów T (CD4+, CD8+), komórek dendrytycznych oraz komórek NK (natural killers). Odgrywają istotną rolę w mechanizmach nadzoru i tolerancji immunologicznej. Komórki Treg stanowią nieliczną grupę limfocytów CD4+, a identyfikowane są m.in. poprzez ekspresję na ich powierzchni odpowiednich antygenów [46]. Do pełnej funkcji limfocyty Treg potrzebują czynnika transkrypcyjnego Foxp3. Dotychczasowe badania wykazały zwiększone stężenie tego białka w nowotworach, niezależnie od typu guza [27]. Ponadto stwierdzono, że Foxp3+ Treg są złym czynnikiem rokowniczym [41].

Wielu badaczy podkreśla istotną rolę, jaką pełni w funkcji komórek Treg cząsteczka kostymulująca CTLA4, której działaniem jest negatywna regulacja odpowiedzi immunologicznej [2,38]. Pojawiły się również publikacje na temat regulacji odpowiedzi immunologicznej w raku płuca [54,55]. Potwierdzono zwiększenie odsetka komórek T-regulatorowych. Opisane dotychczas badania dotyczyły jednak głównie zmian we krwi obwodowej.



Ryc. 2. Ucieczka komórki nowotworowej spod nadzoru układu immunologicznego

PRZYDATNOŚĆ BAL W OCENIE STANU IMMUNOLOGICZNEGO PŁUC U CHORYCH NA RAKA PŁUCA

Wymienione wyżej zaburzenia w odporności przeciwnowotworowej znajdują odzwierciedlenie w składzie komórkowym i cytokinowym płynu z BAL. U chorych na raka płuca znamienne zwiększa się liczba komórek w BAL, przy czym za zwiększenie cytozy odpowiadają głównie makrofagi. Ich liczba jest większa, ale wykazano upośledzoną funkcję tych komórek [10,25].

Badania własne dotyczące oceny subpopulacji limfocytów w BALF u chorych na raka płuca potwierdziły udział limfocytów w obronie przeciwnowotworowej i różnice w porównaniu z osobami zdrowymi. Zaobserwowano zwiększony odsetek limfocytów T oraz zmniejszony limfocytów B i komórek NK w BALF od chorych. Dodatkowo stosunek limfocytów T CD4+/CD8+ był znacząco niższy w BALF w porównaniu do osób zdrowych. Potwierdzono, że zachodzą istotne zmiany w lokalnej odpowiedzi układu odpornościowego w przebiegu rozwoju nowotworu płuca. Wszystkie badane osoby były palaczami [17]. W badaniu zaburzeń immunologicznych w raku płuca udowodniono szkodliwy wpływ palenia papierosów na zmiany immunologiczne [16,24]. Okazało się, że zachodzą istotne różnice w fenotypie limfocytów w BALF między chorymi na raka płuca i osobami zdrowymi, jak i między palaczami i osobami niepalącymi. Całkowita liczba komórek

w BALF u palaczy tytoniu była istotnie zwiększona. Zaobserwowano niski odsetek komórek T-pomocniczych (Th) oraz zwiększony - komórek T-supresorowych/cytotoksycznych (Ts/c) w BALF u palaczy z rakiem płuca. Stosunki limfocytów Th do Ts/c i Th do T były znacząco niższe w BALF u zdrowych palaczy w porównaniu do niepalących. Udział limfocytów T-aktywowanych był zmniejszony w grupie chorych palaczy na raka płuca w porównaniu do osób zdrowych palących. Wyniki wskazują na konieczność dokładnej oceny historii palenia podczas analizy płynu z BAL [24] (tabela 2). Wpływ dymu tytoniowego na zmiany fenotypu limfocytów w BALF został zaobserwowany przez innych badaczy, którzy podkreślają zwiększony udział limfocytów T i limfocytów T-cytotoksycznych CD8+, zmniejszony stosunek limfocytów CD4+/CD8+ (Ts/Tc) [8,21,35,53]. Ponadto stwierdzono hamujący wpływ dymu papierosowego na liczbę oraz funkcję komórek NK [48,50].

Analizując skład cytokinowy BALF stwierdzono istotne zwiększenie stężenia TGF-β u chorych na raka płuca w porównaniu do zdrowych, które dodatkowo korelowało ze stopniem zaawansowania nowotworu [18].

W niedawnych badaniach, w których wykorzystano płyn z BAL do oceny wskaźników oksydacji i markerów zapalnych u chorych na raka płuca zaobserwowano dodatnią korelację między stężeniami przeciwutleniaczy i cytokin

Tabela 2. Porównanie zmian w subpopulacji limfocytów u osób palących i niepalących, zdrowych i z rakiem płuca [24]

	PALĄCY		NIEPALĄCY	
	Rak płuca	Zdrowi	Rak płuca	Zdrowi
Całkowita liczba komórek	↑9.3	↑10.9	6.2	2.2
T cells (CD3+)	90.9	90.4	92.0	88.8
T helper cells –Th	35.8	45.6	↑57.0	↑60.6
T cytotoxic cells- Tc	↑8.6	↑13.7	3.9	6.7
T supressor/T cytotoxic – Ts/Tc	↑43.5	40.0	28.6	32.1
NK cells	8.6	9.1	4.8	↑10.1

Tabela 3. Przykłady przeciwciał służących do oceny fenotypu subpopulacji w płynie z BAL

Podtypy limfocytów, receptor	Przeciwciało
T	CD3
T pomocnicze (Th)	CD4
T cytotoksyczne (Tc)	CD8
B	CD19
NK	CD3/CD16/CD56
T aktywowane	HLA-DR/CD3
T regulatorowe	CD4/CD25/Foxp3/CD127-
Receptor Fas	CD95

prozapalnych w środowisku lokalnym, czego nie zaobserwowano w badaniu próbki surowicy krwi obwodowej [29]. W najświeższych badaniach ponownie wykazano, że płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe poprawia dokładność diagnostyczną u pacjentów z rozsianymi chorobami płuc. W badaniu uwzględniono nieliczną grupę chorych na raka płuca. Udowodniono przydatność oceny fenotypu limfocytów w diagnostyce różnicowej [5]. Inne badanie ukierunkowane zostało na zastosowanie nowej techniki - proteomiki w poszukiwaniu białkowych biomarkerów [40]. Jak wykazano w wielu badaniach w rozwoju nowotworów złośliwych główną rolę odgrywają komórki macierzyste raka [28,37].

Dzięki poznaniu fenotypu tych komórek ich identyfikacja w BALF jest możliwa i z pewnością znajdzie zastosowanie praktyczne [wyniki własne, w druku]. Przedstawione wyniki badań zachęcają do kontynuowania i rozwinięcia zagadnienia dotyczącego przydatności płynu z BAL do oceny stanu immunologicznego u chorych z rakiem płuca.

PODSUMOWANIE

Wykonując badanie BAL zgodnie z przyjętymi zasadami i rozszerzając je o technikę cytometrii przepływową, która jest coraz bardziej dostępna i uznana jako metoda diagno-

styczna, można uzyskać obraz stanu układu odpornościowego w środowisku płuc chorych we wszystkich stadiach zaawansowania raka płuca. Badanie bronchofiberoskopowe wykonywane jest prawie w każdym przypadku przed podjęciem leczenia, a rozszerzenie procedury o płukanie i włączenie oceny BALF w toku rutynowej diagnostyki guza płuca jest możliwe. Zastosowanie klasycznego, powszechnie dostępnego panelu przeciwciał identyfikujących subpopulacje limfocytów, jak przedstawiono w tabeli 3, pozwala na dość dokładną ocenę stanu środowiska płuc przed podjęciem leczenia. W analizie wyników badania płynu z BAL należy brać pod uwagę wpływ palenia papierosów, który w poważnym stopniu zaburza równowagę immunologiczną płuc. Niemniej i w tym zakresie obserwuje się zmiany, bowiem wzrasta liczba chorych na raka płuca, którzy nigdy nie palili papierosów.

Nieocenione jest znaczenie poznawcze badania płynu z BAL, które pozwala na szczegółową ocenę licznych mechanizmów ucieczki komórki nowotworowej spod nadzoru układu immunologicznego. Wyniki kolejnych badań dokumentują możliwości rozpoznania nowych szlaków komórkowych i cytokinowych biorących udział w procesie patologicznym oraz czynników o znaczeniu regulatorowym. Wykorzystanie tej metody u chorych na raka płuca może wpłynąć na ugruntowanie jej znaczenia w ocenie biologii tego groźnego nowotworu.

PISMIENICTWO

- [1] Aerts J.G., Hegmans J.P.: Tumor-specific cytotoxic T cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. *Cancer Res.*, 2013; 73: 2381-2388
- [2] Baecher-Allan C., Viglietta V., Hafler D.A.: Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 89-98
- [3] Baughman R.P.: Technical aspects of bronchoalveolar lavage: recommendations for a standard procedure. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 2007; 28: 475-485
- [4] Bennett W.P., el-Deiry W.S., Rush W.L., Guinee D.G., Jr., Freedman A.N., Caporaso N.E., Welsh J.A., Jones R.T., Borkowski A., Travis W.D., Fleming M.V., Trastek V., Pairolero P.C., Tazelaar H.D., Midthun D., Jett J.R., Liotta L.A., Harris C.C.: p21waf1/cip1 and transforming growth factor beta 1 protein expression correlate with survival in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1998; 4: 1499-1506
- [5] Capelozzi V.L., Faludi E.P., Balthazar A.B., Fernezlian Sde M., Filho J.V., Parra E.R.: Bronchoalveolar lavage improves diagnostic accuracy in patients with diffuse lung disease. *Diagn. Cytopathol.*, 2013; 41: 1-8
- [6] Chciałowski A., Chorostowska-Wynimko J., Fal A., Pawłowicz R., Domagała-Kulawik J.: Recommendation of the Polish Respiratory Society for bronchoalveolar lavage (BAL) sampling, processing and analysis methods. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2011; 79: 75-89
- [7] Costabel U.: Atlas of bronchoalveolar lavage. Chapman & Hall Medical, London, New York 1999
- [8] Costabel U., Bross K.J., Reuter C., Rühle K.H., Matthys H.: Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest*, 1986; 90: 39-44
- [9] Dabrowska M., Grubek-Jaworska H., Domagała-Kulawik J., Bartoszewicz Z., Kondracka A., Krenke R., Nejman P., Chazan R.: Diagnostic usefulness of selected tumor markers (CA125, CEA, CYFRA 21-1) in bronchoalveolar lavage fluid in patients with non-small cell lung cancer. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2004; 111: 659-665
- [10] Dabrowska M., Grubek-Jaworska H., Hoser G., Domagała-Kulawik J., Krenke R., Chazan R.: Effect of IFN-gamma stimulation on expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on alveolar macrophages in patients with non-small cell lung cancer. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2006; 26: 190-195
- [11] de Gracia J., Bravo C., Miravittles M., Tallada N., Orriols R., Bellmunt J., Vendrell M., Morell F.: Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in peripheral lung cancer. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993; 147: 649-652
- [12] Dela Cruz C.S., Tanoue L.T., Matthay R.A.: Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin. Chest Med.*, 2011; 32: 605-644
- [13] Didkowska J.: Epidemiologia nowotworów złośliwych w Polsce. CMKP, Warszawa 2011
- [14] Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W.: Trendy umieralności na nowotwory złośliwe. Polska na tle Europy. W: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2007 roku, red.: Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W., KRN, Warszawa 2009, 31-38
- [15] Doll R., Peto R.: The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1981; 66: 1191-1308
- [16] Domagała-Kulawik J., Guzman J., Costabel U.: Immune cells in bronchoalveolar lavage in peripheral lung cancer - analysis of 140 cases. *Respiration*, 2003; 70: 43-48
- [17] Domagała-Kulawik J., Hoser G., Droszcz P., Kawiak J., Droszcz W., Chazan R.: T-cell subtypes in bronchoalveolar lavage fluid and in peripheral blood from patients with primary lung cancer. *Diagn. Cytopathol.*, 2001; 25: 208-213
- [18] Domagała-Kulawik J., Hoser G., Safianowska A., Grubek-Jaworska H., Chazan R.: Elevated TGF- β 1 concentration in bronchoalveolar lavage fluid from patients with primary lung cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2006; 54: 143-147
- [19] Domagała-Kulawik J., Olszewski W.T.: Atlas Cytopatologii Układu Oddechowego. Alfa-medica press, Bielsko-Biała 2009
- [20] Egen J.G., Kuhns M.S., Allison J.P.: CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 611-618
- [21] Ekberg-Jansson A., Andersson B., Avra E., Nilsson O., Löfdahl C.G.: The expression of lymphocyte surface antigens in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage cells and blood cells in healthy smoking and never-smoking men, 60 years old. *Respir. Med.*, 2000; 94: 264-272
- [22] Erfani N., Mehrabadi S.M., Ghayumi M.A., Haghshenas M.R., Mojtahedi Z., Ghaderi A., Amani D.: Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, 2012; 77: 306-311
- [23] Fischer J.R., Darjes H., Lahm H., Schindel M., Drings P., Krammer P.H.: Constitutive secretion of bioactive transforming growth factor beta 1 by small cell lung cancer cell lines. *Eur. J. Cancer*, 1994; 30A: 2125-2129
- [24] Hoser G., Domagała-Kulawik J., Droszcz P., Droszcz W., Kawiak J.: Lymphocyte subsets differences in smokers and nonsmokers with primary lung cancer: a flow cytometry analysis of bronchoalveolar lavage fluid cells. *Med. Sci. Monit.*, 2003; 9: 310-315
- [25] Hoser G., Grubek-Jaworska H., Droszcz P., Domagała-Kulawik J., Dabrowska M., Chazan R.: Reactivity of alveolar macrophages in lung cancer patients and healthy subjects: surface ICAM-1 after INF-gamma stimulation in vitro. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2002; 40: 103-104
- [26] Hoser G., Kawiak J., Domagała-Kulawik J., Kopyński P., Droszcz W.: Flow cytometric evaluation of lymphocyte subpopulations in BALF of healthy smokers and nonsmokers. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 1999; 37: 25-30
- [27] Karanikas V., Speletas M., Zamanakou M., Kalala F., Loules G., Kerenidi T., Barda A.K., Gourgoulianis K.I., Germentis A.E.: Foxp3 expression in human cancer cells. *J. Transl. Med.*, 2008; 6: 19
- [28] Kim C.F.: Paving the road for lung stem cell biology: bronchoalveolar stem cells and other putative distal lung stem cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2007; 293: L1092-L1098
- [29] Kontakiotis T., Katsoulis K., Hagizisi O., Kougioulis M., Gerou S., Papakosta D.: Bronchoalveolar lavage fluid alteration in antioxidant and inflammatory status in lung cancer patients. *Eur. J. Intern. Med.*, 2011; 22: 522-526
- [30] Krammer P.H., Dhein J., Walczak H., Behrmann I., Mariani S., Matiba B., Fath M., Daniel P.T., Knipping E., Westendorp M.O., Kirstin Stricker, Bäuml C., Hellbardt S., Germer M., Peter M.E., Debativ K.M.: The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system. *Immunol. Rev.*, 1994; 142: 175-191
- [31] Krzakowski M.: Recommendations on systemic treatment of non-small cell lung cancer and malignant pleural mesothelioma. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2010; 78: 384-385
- [32] Langfort R., Szołkowska M., Szczepulka-Wójcik E., Maksymiuk B.: Small biopsies and cytologic specimens management in microscopic diagnosis and subtyping of non-small cell lung cancer, as recommended by IASLC/ATS/ERS. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2012; 80: 172-177
- [33] Lin Y., Liu L., Zhang T., Liu J.: Functional investigation of Fas ligand expressions in human non-small cell lung cancer cells and its clinical implications. *Ann. Thorac. Surg.*, 2013; 95: 412-418

- [34] Linder J., Radio S.J., Robbins R.A., Ghafouri M., Rennard S.I.: Bronchoalveolar lavage in the cytologic diagnosis of carcinoma of the lung. *Acta Cytol.*, 1987; 31: 796-801
- [35] Mancini N.M., Bénédicte M.C., Gérard H., Chabot F., Faure G., Polu J.M., Lesur O.: Early effects of short-time cigarette smoking on the human lung: a study of bronchoalveolar lavage fluids. *Lung*, 1993; 171: 277-291
- [36] Meyer K.C.: Bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 2007; 28: 546-560
- [37] Morrison B.J., Morris J.C., Steel J.C.: Lung cancer-initiating cells: a novel target for cancer therapy. *Target Oncol.*, 2013; 8: 159-172
- [38] Nielsen J., Holm T.L., Claesson M.H.: CD4+CD25+ regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects. *APMIS*, 2004; 112: 642-650
- [39] Olsen G.N., Gangemi J.D.: Bronchoalveolar lavage and the immunology of primary lung cancer. *Chest*, 1985; 87: 677-683
- [40] Oumeraci T., Schmidt B., Wolf T., Zapatka M., Pich A., Brors B., Eils R., Fleischhacker M., Schlegelberger B., von Neuhoff N.: Bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients: mapping the uncharted waters using proteomics technology. *Lung Cancer*, 2011; 72: 136-138
- [41] Petersen R.P., Campa M.J., Sperlazza J., Conlon D., Joshi M.B., Harpole D.H.Jr., Patz E.F.Jr.: Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*, 2006; 107: 2866-2872
- [42] Pirozynski M.: Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of peripheral, primary lung cancer. *Chest*, 1992; 102: 372-374
- [43] Poletti V., Poletti G., Murer B., Saragoni L., Chilosi M.: Bronchoalveolar lavage in malignancy. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 2007; 28: 534-545
- [44] Rennard S.I.: Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of cancer. *Lung*, 1990; 168 (Suppl. 1): 1035-1040
- [45] Reynolds H.Y.: Use of bronchoalveolar lavage in humans - past necessity and future imperative. *Lung*, 2000; 178: 271-293
- [46] Sakaguchi S., Wing K., Yamaguchi T.: Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur. J. Immunol.*, 2009; 39: 2331-2336
- [47] Semenzato G., Spatafora M., Feruglio C., Pace E., Dipietro V.: Bronchoalveolar lavage and the immunology of lung cancer. *Lung*, 1990; 168 (Suppl. 1): 1041-1049
- [48] Takeuchi M., Nagai S., Nakajima A., Shinya M., Tsukano C., Asada H., Yoshikawa K., Yoshimura M., Izumi T.: Inhibition of lung natural killer cell activity by smoking: the role of alveolar macrophages. *Respiration*, 2001; 68: 262-267
- [49] Thomas M., von Eiff M., Brandt B., Heinecke A., van de Loo J.: Immunophenotyping of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid. A new flow cytometric method vs standard immunoperoxidase technique. *Chest*, 1995; 108: 464-469
- [50] Tollerud D.J., Clark J.W., Brown L.M., Neuland C.Y., Mann D.L., Pankiw-Trost L.K., Blattner W.A., Hoover R.N.: Association of cigarette smoking with decreased numbers of circulating natural killer cells. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989; 139: 194-198
- [51] Tyczynski J.E., Bray F., Aareleid T., Dalmas M., Kurtinaitis J., Plesko I., Pompe-Kirn V., Stengrevics A., Parkin D.M.: Lung cancer mortality patterns in selected Central, Eastern and Southern European countries. *Int. J. Cancer*, 2004; 109: 598-610
- [52] Vermaelen K., Pauwels R.: Pulmonary dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2005; 172: 530-551
- [53] Wallace J.M., Oishi J.S., Barbers R.G., Simmons M.S., Tashkin D.P.: Lymphocytic subpopulation profiles in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood from tobacco and marijuana smokers. *Chest*, 1994; 105: 847-852
- [54] Wolf A.M., Wolf D., Steurer M., Gastl G., Gunsilius E., Grubeck-Loebenstein B.: Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 606-612
- [55] Woo E.Y., Chu C.S., Goletz T.J., Schlienger K., Yeh H., Coukos G., Rubin S.C., Kaiser L.R., June C.H.: Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2001; 61: 4766-4772
- [56] Wrona A., Jassem J.: The new TNM classification in lung cancer. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2010; 78: 407-417

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.