

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DOKTORSKÁ DISERTAČNÍ PRÁCE

Možnosti určení prognózy nemocných s generalizovaným
kolorektálním karcinomem pomocí imunofenotypizace
leukocytů periferní krve

Studijní obor: vnitřní nemoci

Školitel: prof. MUDr. Bohuslav Melichar, PhD

2008

MUDr. Pavel Veselý

Prohlašuji, že jsem celou tuto doktorskou disertační práci vypracoval samostatně, resp. převzal v práci uvedené části v souladu s prezentovanými citacemi.

V Hradci Králové dne ... *12. 5. 2008* ...

Krejčí
.....
podpis

Poděkování

Je mou milou povinností poděkovat všem, kteří jakýmkoliv způsobem odborně pomohli ke vzniku této disertační práce. Na prvním místě bych rád poděkoval svému školiteli, prof. MUDr. Bohuslavovi Melicharovi, PhD, a to nejen za vysoce odborné vedení a významnou pomoc při publikaci výsledků práce na vyšetřované problematice, ale i za trpělivost a toleranci vůči mému zdlouhavému stylu práce v průběhu celého postgraduálního studia. Jsem velmi vděčen Mgr. Miroslavě Touškové, PhD, která provedla všechna laboratorní měření v rámci spolupráce na grantovém projektu na téma „Adoptivní imunoterapie“ (grant IGA MZ č. 4676-3), bez jejíž obětavé práce a odbornosti by nebyla získána v takové kvalitě a rozsahu data imunofenotypu měřená průtokovou cytometrií prezentovaná v této tezi. Velmi podstatnou měrou přispěly k celkovému stylu a pojetí finálního zpracování rukopisu i cenné rady doc. MUDr. Miloslava Pleskota, CSc. poskytnuté mi v rámci vnitrofakultní oponentury.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu IGA MZ č. 4676-3.

Anotace

V teoretické části této práce je proveden stručný přehled současných znalostí o prognostických faktorech u generalizovaného kolorektálního karcinomu a nádorové imunologii se zaměřením na pokročilé nádorové onemocnění. Výzkumná část práce popisuje postup a výsledky šetření souvislostí dat imunofenotypu buněk periferní krve nemocných s kolorektálním karcinomem s metastatickým postižením jater s daty celkového přežití těchto nemocných. Imunofenotyp byl vyšetřen metodou dvoubarevné průtokové cytometrie. Prezentovány jsou celkem tři postupy statistického zpracování tohoto souboru 59 nemocných. Za prvé univariantní a multivariantní analýza přežívání spolu s lineární regresní analýzou k určení těch parametrů fenotypu, které jsou ve formě kontinuálních proměnných nezávislými prognostickými faktory pro celkové přežití. Za druhé metoda konstrukce ROC křivek, zde použitá k nepřímému ověření validity výsledků regrese. A za třetí metoda indukčních grafů umožňující cílenou diskretizaci kontinuálních hodnot parametrů fenotypu a klasifikaci nemocných na dvě skupiny s rozdílným celkovým přežitím. Některé z těchto postupů vyšetřování a jimi dosažených výsledků jsou v této problematice zcela nové. V poslední části této práce jsou pak diskutovány získané výsledky ve světle současných teoretických poznatků, jejich interpretace a biologický význam, a zároveň jsou zde i popsány některé zdroje možných chyb a obecně interní a externí validity dosažených výsledků.

SUMMARY

The recent knowledge about prognostic factors in metastatic colorectal cancer, and tumour immunology of advanced cancer is briefly reviewed in the theoretical part of this dissertation. The experimental part of the work deals with a description of investigation for relations between the peripheral blood cells immunophenotype data acquired by two-colour flow cytometry (FACS) of blood samples from patients with colorectal liver metastases, and the overall survival of these patients. The three different statistical approaches were adopted for FACS and survival data from this sample of 59 patients with colorectal liver metastases. Firstly, uni- and multivariate analysis of survival together with linear regression analysis for a selection of such parameters of the peripheral blood cells phenotype which are in form of continuous variables the independent prognostic factors for overall survival. Secondly, the method of ROC curves, used here for indirect validation of the results achieved from regression and survival analysis. And in the third line, the method of induction graphs which enables targeted discretisation of continual values of the phenotype parameters, and classification of patients on the two groups with different overall survival. Some of the approaches used in this problem area, and achieved results are quite original. In the last part of the work, the results are reviewed as for the current theoretical knowledge, and their interpretation and biological importance altogether with sources of eventual errors and general validity are discussed.

OBSAH

1. Cíle práce a základní teoretická východiska	7
2. Teoretický úvod	9
2.1. Prognostické faktory u nemocných s kolorektálním karcinomem.....	9
2.1.1. Charakteristiky primárního nádoru kolorekta, které jsou zároveň faktory se vztahem k prognose generalizovaného kolorektálního karcinomu.....	10
2.1.2. Prognostické faktory u kolorektálního karcinomu se vzdáleným metastatickým postižením (TNM stadium IV, Dukes D).....	16
2.2. Vztahy mezi imunitním systémem a tumorem	36
2.2.1. Role imunitního systému v kontrole progresu nádoru	37
2.2.2. Imunitní systém jako promotor růstu nádoru resistantního k imunitní odpovědi	38
2.2.3. Zánět a karcinom.....	40
2.2.4. Mechanismy úniku nádoru před imunitním systémem	43
2.2.5. Vliv protinádorové léčby na imunitní systém	47
2.2.6. Souhrnný pohled na imunitu u solidních nádorů dle jejich fáze pokročilosti	49
3. Soubor nemocných a metody.....	52
3.1. Výběr pacientů.....	52
3.2. Laboratorní metodika	53
3.3. Statistické zpracování.....	55
4. Výsledky	61
4.1. Základní charakteristiky souborů nemocných	61
4.2. Univariátní analýza přežívání.....	71
4.3. Regresní modely.....	74
4.4. Vyšetření ROC křivek	78
4.5. Indukce pravidel pro konstrukci skupin s rozdílným celkovým přežíváním	79
5. Diskuse	86
5.1. Biologický význam molekuly CD69 a lymfocytů CD3CD69 u chronické imunitní aktivace a nádorového onemocnění	90
5.1.1. Původní údaje z in vitro studií popisující CD69 jako kostimulační molekulu.....	90
5.1.2. Novější pohledy – CD69 jako imunoregulační molekula	91
5.1.3. Možné imunoregulační role molekuly CD69.....	94
5.2. Role CD3CD69 lymfocytů v periferní krvi pro určení prognosy u generalizovaného kolorektálního karcinomu z pohledu výsledků této studie	95

5.3. Role NK buněk v periferní krvi pro určení prognosy u generalizovaného kolorektálního karcinomu z pohledu výsledků této studie	98
5.4. Role celkového počtu leukocytů v periferní krvi pro určení prognosy u generalizovaného kolorektálního karcinomu z pohledu výsledků této studie	100
5.5. Role monocytů v periferní krvi pro určení prognosy u generalizovaného kolorektálního karcinomu z pohledu výsledků této studie	103
5.6. Role dalších lymfocytárních subpopulací v periferní krvi pro určení prognosy u generalizovaného kolorektálního karcinomu z pohledu výsledků této studie	107
5.7. Vztahy k jiným prognostickým parametrům u generalizovaného kolorektálního karcinomu	110
5.8. Úvahy zaměřené na design studie, použité metody statistického zpracování a z toho vyplývající interpretaci výsledků	119
6. Závěr	124
7. Souhrn	127
8. Použitá literatura	129

1. Cíle práce a základní teoretická východiska

1. Prvním cílem této disertační práce bylo prokázat, že lze z různých hodnot parametrů imunofenotypu leukocytů periferní krve stanovených metodou průtokové cytometrie určit prognózu nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinomem, u kterého jsou predilekčním místem hematogenní diseminace játra.

2. Druhým cílem této pilotní explorativní studie prognostických faktorů bylo určit tímto postupem několik konkrétních kandidátských biomarkerů, které by mohly být použity jako výchozí parametry v dalších studiích hledajících klinicky využitelné prognostické faktory u generalizovaného kolorektálního karcinomu.

K tomuto účelu bylo provedeno retrospektivní vyšetření závislosti celkového přežívání nemocných s metastatickým postižením jater na některých parametrech imunofenotypu leukocytů získaných odběry periferní krve těchto nemocných v různých fázích jejich léčby a léčených různými postupy.

Teoretická východiska:

U generalizovaného kolorektálního karcinomu neexistuje v současnosti žádný biomarker, který by byl rutinně klinicky vyšetřován a dovozoval přesné a spolehlivé stanovení prognózy těchto nemocných. Existuje sice mnoho kandidátských prognostických faktorů, ty jsou však většinou úzce specifické pro určitou metodu léčby generalizovaného kolorektálního karcinomu a většinou jsou výsledkem pouze retrospektivních studií menšího rozsahu, které nebyly následně ověřeny nezávislým prospektivním šetřením, nebo vedlejším produktem studií léčebných.

Generalizované nádorové onemocnění vytváří v organismu stav chronické aktivace imunitního systému se sekundární imunitní dysfunkcí nejen na lokální, ale i systémové úrovni.

Předchozí studie s cílem určit prognózu u časných stadií nádorového onemocnění stanovením imunofenotypu leukocytů periferní krve metodou průtokové cytometrie nebyly úspěšné.

Předchozí studie ukázaly u nemocných s pokročilým nádorovým onemocněním, včetně kolorektálního karcinomu, signifikantní změny v počtu a funkci podskupin buněk periferní krve. Velmi málo je však známo o prognostickém významu těchto změn.

2. Teoretický úvod

2.1. Prognostické faktory u nemocných s kolorektálním karcinomem

Mezi možné prognostické faktory u kolorektálního karcinomu je možno zařadit velké množství parametrů klinickopatologických i laboratorních,^{1, 2, 3} v klinické praxi se však v současnosti rutinně vyšetřuje jen několik málo z nich.^{4, 5, 6, 7} Přitom však žádný z těchto faktorů sám o sobě nevypovídá o prognose dostatečně přesně a spolehlivě. Patrně vlivem značné heterogenity nádorového onemocnění, jejíž rozměry začínáme tušit teprve nyní v nastupující éře klinicky zaměřené molekulární biologie, se jako nadějnější ukazuje přístup zkombinování několika málo nezávislých parametrů se vzájemným potencováním jejich prediktivní hodnoty, získaných z rozdílných úhlů pohledu a rozdílnými metodickými přístupy,^{8, 9, 10, 11} než původní snaha po nalezení jednoho dokonalého prognostického faktoru.^{12, 13, 14} Obor nádorové imunologie má patrně v tomto směru značný a dosud nevyužitý potenciál.

2.1.1. Charakteristiky primárního nádoru kolorekta, které jsou zároveň faktory se vztahem k prognose generalizovaného kolorektálního karcinomu

2.1.1.1. Stadium pT4b

Nejvyšší kategorie pro ohodnocení lokálního rozsahu je pT4, která zahrnuje jednak penetraci do přilehlých orgánů či struktur (pT4a), tak i penetraci parietálního peritonea (pT4b), a to buď včetně či bez infiltrace do přilehlých struktur. Volná perforace kolorektálního karcinomu do peritoneální dutiny (tj. „otvor“ či transmurální defekt v místě tumoru) je klasifikována také jako pT4b a je velmi nepříznivým prognostickým faktorem. Početné rozsáhlé studie hodnotily penetraci serosou jako samostatnou patologickou proměnnou a při multivariantní analýze ukázaly, že se jedná o signifikantní nezávislý faktor nepříznivé prognosy. V tabulce č. 1 jsou ukázány vztahy mezi celkovým přežitím po chirurgické resekci a nádorem pT4, který penetruje viscerální peritoneum na rozdíl od nádoru bez penetrace serosy, a to ať již se vzdáleným meta postižením či bez něj.

Tab. č. 1: Prognostický význam penetrace serosy nádorem u kolorektálního karcinomu

Stadium	5-leté přežití (%)	Medián přežití (měsíce)
pT4a, M0	49	58,2
pT4b, M0	43	46,2
pT4a, M1	12	22,7
pT4b, M1	0	15,5

Patologická studie lokálního postižení peritonea provedená *Shepherdem a kol.*¹⁵ ukázala, že prognostická síla tohoto parametru by mohla být i větší než regionální postižení lymfatických uzlin (pN kategorie). Navzdory svému biologickému významu je penetrace serosy často patologií poddiagnostikována. V jiné práci bylo ukázáno, že

cytologické vyšetření stěrů ze serosy odhalí maligní buňky u 26% histologických preparátů nádoru, které byly samotným histologickým vyšetřením kategorizovány jako pT3.¹⁶ Volné buňky na serosním povrchu jsou přitom silnějším prediktorem intraperitoneální rekurence nebo perzistence, než jiné formy postižení.

2.1.1.2. pN kategorie

Data přežití vztahená ke stadiu jsou odvozena ze studií, ve kterých bylo zhodnocení regionálních lymfatických uzlin v resekátu provedeno konvenčním histologickým barvením makroskopicky identifikovaných lymfatických uzlin. Protože bylo prokázáno, že mnoho nodálních metastáz u kolorektálního karcinomu bývá nalézáno v malých lymfatických uzlinách (tj. o průměru menším než 5mm), je nezbytné pečlivé pátrání po všech lymfatických uzlinách v resekátu.¹⁷ Avšak ve všeobecné patologické praxi však chybí univerzálně akceptované standardy pro přijatelný sběr lymfatických uzlin a nakládání s objevenými lymfatickými uzlinami. Bylo prokázáno, že k přesnému vyjádření se o negativitě regionálních lymfatických uzlin je třeba vyšetřit nejméně 12-15 lymfatických uzlin.^{18, 19, 20} Z tohoto důvodu je doporučeno 12 lymfatických uzlin jako akceptovatelný minimální sběr po pečlivém prokrájení vzorku a pokud je jich při makroskopickém vyšetření nalezeno méně než 12 jsou na zvážení speciální vizualizační techniky jako je například odstranění tuku.

2.1.1.3. Na klinickopatologickém stadiu nezávislé prognostické morfologické faktory Angioinvaze venosních cév a lymfatických cév

V 10 různých studiích byla ukázána venosní invaze jako nezávislý faktor při multivariantní analýze s nepříznivým vlivem na osud nemocného a výsledky léčby. Avšak některé studie, které identifikovaly venosní invazi jako nepříznivý prognostický faktor při univariantní analýze selhaly v potvrzení jejího nezávislého vlivu na prognosu

po provedení multivariantní metody.²¹ Podobně protichůdné výsledky jsou známy i ze studií s lymfangioinvasí. V několika studiích byla prokázána obecně vaskulární invaze (bez rozlišování mezi venosní a lymfatickou vaskulaturou) jako signifikantní prognostický faktor při multivariantní analýze. K tomu ještě v některých studiích byla silným determinantem prognosy lokalizace postižených cév (např. invaze extramurálních žil). I když je těžké dát všechny údaje z provedených studií dostupných v současné literatuře do konzistentního výstupu, je jasné, že tyto studie ukazují na význam venosní a lymfatické invaze nádorem pro prognosu.

Lymfoidní odpověď na tumor

Na našem pracovišti jsem provedli v rámci retrospektivního vyhodnocení výsledků léčby u karcinomu rekta bez hematogenní generalizace i studii zaměřující se na prediktivní a prognostický význam různých laboratorních parametrů včetně vyšetření tumor infiltrujících lymfocytů (TIL).²² I výsledky této naší studie ukazují na složitost celé problematiky vztahu TIL k prognose. Dosavadní postupy hodnocení včetně metod kvantifikace, použitých statistických metod a interpretace často odporujících si výsledků jsou spíše v důsledku nejednotnosti popisu jednoho komplexního biologického problému, nicméně opakovaně prokázaná signifikance TIL či jejich subpopulace jako prognostického faktoru u kolorektálního karcinomu v mnoha navzájem nezávislých studiích poukazuje na velmi pravděpodobnou významnost nejen ve statistickém slova smyslu, ale i na biologický význam fenoménu lymfocytární infiltrace v oblasti tumoru. Ropponen a kol.²³ potvrdili koncept prognostického významu TIL u kolorektálního karcinomu. Především ve své studii semikvantifikovali stupeň přítomnosti TIL ve stromatu a peritumorálně (podél invazivního okraje), rozdělily do 4 skupin a v univariantní i multivariantní Coxově analýze přežití ukázali, že TIL jsou

signifikantním prediktorem lepšího celkové přežití i přežití bez relapsu. Ukázali také inverzní korelaci mezi přítomností TIL a nádorovým stadiem dle Dukese (tj. TIL jsou hojnější u nižších stádií a jejich počet se snižuje u stádií s generalizací - Dukes C a D). Nový pohled do celé situace pak vnesly metody imunohistochemické analýzy lymfocytárních subpopulací TIL. Intraepiteliální lymfocyty (tj. lymfocyty přítomné uvnitř hnízd nádorových buněk či lymfocytární infiltrát v neoplastickém epitelu) jsou obvykle CD8+ T lymfocyty. Ačkoliv nejsou hojné, zdají se právě tyto intraepiteliální CD8+ T buňky velmi významné pro určení prognosy. Jejich kvantifikací v místech nejvyššího výskytu lze získat parametr, který signifikantně koreluje s delším přežitím specifickým pro nemoc (analýza Naita a kol.²⁴ na 138 nemocných, analýza Chiby a kol.²⁵ na 385 nemocných - multivariantní s kovariantami zahrnujícími N a M kategorie dle TNM). V kontrastu k tomu nejsou signifikantními faktory pro přežití ani počet CD8+ T lymfocytů ve stromatu nádoru ani počet CD8+ T lymfocytů podél invazivního okraje tumoru. Nakonec je nutné zmínit, že dosud provedené multivariantní analýzy jasně ukazují, že prognostický význam intraepiteliálních CD8+ T lymfocytů u kolorektálního karcinomu je více evidentní při delší periodě sledování (křivky přežití bez choroby se začínají separovat až po 1-3 letech).

2.1.1.4. Molekulární prognostické faktory

Navzdory značné prognostické síle stagingu kolorektálního karcinomu do TNM stádií je osud nemocných s nádory stejného stadia heterogenní. K tomu, aby šlo přesněji individualizovat prognosu a plánovat vhodnou terapii, jsou hledány na molekulární úrovni přídatné prognostické indikátory založené na vlastnostech tkání. Do současné doby bylo vyšetřeno množství molekulárních markerů (především proteinových a

polysacharidových) pro jejich možného užití jako prognostických faktorů, ale žádný z nich nemá takovou validitu, aby splňoval kritéria pro nasazení do běžné klinické praxe. Jedná se o širokou škálu molekul, byly vyšetřovány alterace genotypu jako je amplifikace *c-myc*, overexprese *her2/neu*, ztráta heterozygoty v rozličných místech různých chromosomů (např. 1p, 3p, 4p, 5q, 8p, 17p, 18q), stejně jako markery buněčné proliferace a angiogenese, proteázy a jiné enzymy, včetně jejich receptorů, exprese glykoproteinů plasmatických membrán, které mohou přispívat k adhezi buněk apod. Většina studií těchto kandidátů na prognostické markery u kolorektálního karcinomu jsou šetření jednoho markeru, a jsou retrospektivního charakteru, nanejvýš se jedná o prospektivní studie malého rozsahu. Interpretace těchto studií je často ztížena špatnou kvalitou databází klinických dat, nehomogenitou (většinou adjuvantní) léčby, absencí standardizace a kontroly kvality laboratorních metodik a variabilitou statistického zpracování. Jen velice málo z potenciálních molekulárních markerů tedy bylo do dnešního ověřeno a schváleno pro užití v klinické praxi. V tabulce č. 2 je uveden seznam potenciálních prognostických markerů u kolorektálního karcinomu, které byly v literatuře posledních dvou dekad nejvíce diskutované.

Tabulka č. 2: Kandidátské molekulární prognostické markery u kolorektálního karcinomu

CD44 V6	Mn superoxid dismutasa	Ki-ras
C-reaktivní protein	Bcl-2, Bax	receptor pro vitamin D
hyaluronová kyselina	thymidin fosforylase	PCNA
Si LeA	VEGF	NM23
Si LeX	thymidylát syntasa	Ki67
CEA	receptor pro prolaktin	cyclin D1
sucrasa-isomaltasa	DCC/18q LOH	ploidita
aktivátor plasminogenu	p53/17p LOH	aneuploidita chromosomu 1
UPA receptor	p21	aneuploidita chromosomu 11
matrix metaloproteinasy	p27	mikrosatelitní instabilita (MSI-H)
kathepsin B	c-myc	TIMP
HER2/neu	EGF-R	CA 19-9

2.1.2. Prognostické faktory u kolorektálního karcinomu se vzdáleným metastatickým postižením (TNM stadium IV, Dukes D)

U přibližně 50% nemocných s kolorektálním karcinomem se v průběhu onemocnění vyvinou jaterní metastázy.²⁶ Játra jsou u kolorektálního karcinomu nejčastějším místem metastatického rozsevu a jsou odpovědné za nejméně dvě třetiny všech úmrtí nemocných s kolorektálním karcinomem.^{27, 28} V současnosti je jedinou akceptovanou potenciálně kurativní standardní léčbou nemocných s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu provedení jaterní resekce. Po resekci je míra 5-letého přežití v současných souborech nemocných uváděna mezi 37 až 58 %.^{29, 30, 31, 32, 33} Ačkoliv pouze 10 – 20 % nemocných s hepatálními metastázami kolorektálního karcinomu je primárně vhodných k resekci, je absolutní počet nemocných tuto léčbu podstupující relativně velký a je stále rostoucí vlivem lepších zobrazovacích metod, zlepšením chirurgické techniky a pokrokem v systémové léčbě, která redukuje míru jak hepatálního tak extrahepatálního postižení.^{34, 35, 36} Pokroky v systémové léčbě (chemoterapii a biologické terapii) jsou hlavním determinantem pro úspěšnost léčebných přístupů u primárně neresekabilních metastáz.

Do nedávné doby byly nemocní s neresekabilními jaterními metastázami kolorektálního karcinomu léčeni pouze paliativní chemoterapií s omezenou účinností a 5-leté přežití těchto nemocných bylo téměř nulové.³⁷ V současnosti je možné novějšími režimy systémové léčby dosáhnout resekability i u původně neresekabilního postižení.

Chemoterapie režimy založenými pouze na 5-fluorouracilu, tj. 5-FU v monoterapii či eventuelně potencovaný leukovorinem (FUFA, v bolusovém režimu dle Mayo clinic či kontinuální režim dle de Gramonta) pouze zřídka poskytují intrahepatálně tumoricidní efekt dostatečný k tomu, aby se dosáhlo konverze jaterních metastáz na technicky

resekabilní (míra odpovědi, response rate, méně než 20 %). Avšak nové kombinační režimy obsahující 5-FU, kyselinu listovou a oxaliplatinu či irinotecan dosahují lepší míry odpovědi (response rate kolem 50 %),^{38, 39, 40} což se promítá i do toho, že 10 - 30% nemocných s primárně neresekabilními metastázami jater může nakonec podstoupit kurativní resekci.⁴¹ Navíc klinické studie přidávající k takovéto kombinační chemoterapii ještě i biologickou léčbu, při primárním podání především bevacizumab,⁴² ale i cetuximab⁴³ (který je však v současnosti indikován pouze v případě salvage indikace při refrakternosti na irinotecan), prokázaly, že takovouto kombinovanou systémovou léčbou je možné dosáhnout ještě vyšších odpovědí u iniciálně neresekabilních nálezů, s response rate dosahujících hodnot 70 % a více.^{44, 45}

Další otázkou je pak u nemocných, u kterých se podařilo primární systémovou terapií dosáhnout konverze primárně neresekabilního nálezu a následně provést kurativní jaterní resekci, jaký je u nich průběh onemocnění v dlouhodobějším časovém horizontu. V literatuře nyní existuje hodně studií dokumentujících dosažení resekability a popisujících míru odpovědi na primární systémovou terapii,⁴⁶ avšak pouze 4 z nich se zároveň zabývají zhodnocením dalšího osudu nemocných a eventuálními prognostickými faktory.^{47, 48, 49, 50} Jednotlivé údaje včetně těch o přežití se samozřejmě v těchto studiích mírně liší, již jen vzhledem k tomu, že každá studie užívala jiný režim chemoterapie, ale celkově lze výsledky těchto studií hodnotit tak, že míra objektivní odpovědi stanovená dle zobrazovacích metod dle kritérií WHO pro hodnocení objektivní odpovědi na léčbu se pohybovala v rozmezí 40 % až 60 %, resekability bylo dosaženo a kurativní resekce byla provedena u 12,5 % až 37 % primárně inoperabilních nemocných, následně po jaterní resekci bylo 3-leté celkové přežití kolem 65 %, 5-leté celkové přežití mezi 30 až 35 % a 10-leté celkové přežití kolem 23 %, s mediánem

celkového přežití asi 26 měsíců, přežití bez nemoci po provedené resekci pak je v těchto studiích udáváno s mediánem kolem 14 měsíců. Faktory asociované s nepříznivou prognosou zahrnovali v těchto studiích následující parametry: primární nádor v rektu, 3 a více jaterních metastáz, velikost největší metastázy větší než 10 cm a hladina sérového markeru CA 19-9 více než 100 IU/l. K těmto prognostickým faktorům lze počítat i to, zda předoperační chemoterapie byla schopna dosáhnout kontroly růstu nádoru. Progrese tumoru během předoperační chemoterapie je asociována s horším celkovým přežitím po provedené jaterní resekci a měla by být proto považována za kontraindikaci tohoto postupu léčby.⁵¹ Co se týče načasování chirurgického výkonu v návaznosti na primární systémovou léčbu, měla by být primární systémová léčba ukončena a jaterní resekce provedena v momentě dosažení technické resektability a to ze dvou důvodů – za prvé předoperační chemoterapie alteruje hepatální funkce a může takto zvyšovat morbiditu a mortalitu následně provedené hepatální resekce,^{52, 53} a za druhé může příležitostně předoperační systémová léčba dosáhnout klinické kompletní odpovědi (tj. radiografické, bez záhytu choroby na zobrazovacích vyšetřeních), která je však jen v menšině histologicky verifikovatelnou patologickou kompletní odpovědí (udává se, že jen v 7% a méně), ale paradoxně v klinické praxi je v takovéto situaci nejčastěji rozhodnuto o neprovedení jaterní resekce. Onkologicky radikální jaterní resekce by měla zahrnovat odstranění všech jaterních segmentů postižených vstupně před zahájením primární systémové léčby na zobrazovacích metodách.

2.1.2.1. Prognostické faktory užívané pro rozhodnutí o provedení kurativní resekce

Pro další osud nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinomem je tedy nejpodstatnější, zda se podaří provést kurativní resekci. Problémem je však v klinické

praxi vyselektovat nemocné vhodné pro tuto léčbu. V současné klinické praxi se pro tvorbu těchto rozhodnutí užívá různých schémat založených na rozličných parametrech.^{54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61} Neexistuje tedy jednotný klasifikační systém pro hodnocení stagingu jaterních metastáz kolorektálního karcinomu, což by umožňovalo spolehlivě srovnávat výsledky z různých studií zabývajících se resekci či léčbou jaterních metastáz obecně. Zahrnované parametry v těchto klasifikacích buď přímo popisují některé z vlastností jaterních metastáz či se jedná o parametry se vztahem k jejich prognose. Nejčastěji se sleduje počet metastatických ložisek,⁶² velikost metastáz,⁶³ distribuce metastáz (tj. zda se jedná o unilobární či bilobární postižení),⁶⁴ rozsah postižení jater (jako cut-off hodnoty je použito nejčastěji 25% či 50% parenchymu), chronologie sekundárního postižení ve vztahu k primárnímu nádoru v době jeho diagnózy (tj. synchronní či metachronní jaterní postižení),^{65, 66, 67} přítomnost extrahepatálních metastáz,^{68, 69} metastatické postižení lymfatických uzlin v hepatálním pediklu, invaze do velkých cév či žlučových, výkonnostní stav (performance status dle WHO, ECOG či Karnofsky index), disease-free interval, pohlaví (horší prognosa u mužů) a sérová alkalická fosfatáza, a dále vlastnosti primárního nádorového postižení střeva^{70, 71, 72, 73, 74, 75, 76} a různé další biologické markery („klasické nádorové markery“ - sérová hladina CEA⁷⁷ a CA 19-9,⁷⁸ dále v tkáni nádoru vyšetřované parametry⁷⁹ – např. Fas/CD95,⁸⁰ p53 či Ki67⁸¹) či eventuálně parametry stanovované novými molekulárně biologickými metodami (microarrays atd.). Pro prognosu po provedené jaterní resekci jsou pak důležité i další faktory, které souvisí se zvolenou metodou a výsledkem terapie (typ provedené resekce⁸², pozitivita okrajů jaterního resekatu,^{83, 84, 85, 86} „adjuvantní“ chemoterapie či biologická léčba po resekci^{87, 88, 89}).

Určité předělem v literatuře zabývající se prognostickými faktory po provedené jaterní resekci pro jaterní metastázi kolorektálního karcinomu je velká unicentrická studie *Fonga a kol.*⁹⁰ vyhodnocující výsledky jaterních resekcí pro kolorektální karcinom u 1001 nemocných v období mezi lety 1985 a 1998. Jako nepříznivé faktory s vlivem na celkové přežití vyšly na těchto datech v multivariantní analýze následující parametry: pozitivní resekcční okraj při jaterní resekci, extrahepatální postižení, více jak 1 jaterní metastáza, velikost největší jaterní metastázy více jak 5cm, pozitivní regionální lymfatické uzliny u primárního nádoru, disease-free interval mezi diagnosou primárního nádoru a metastatickým postižením jater méně než 12 měsíců a předoperační hladina CEA více jak 200 ng/ml. Jako „nejvíce vlivné“ faktory vyhodnotili autoři pozitivní resekcční okraj a přítomnost extrahepatálního postižení a vzhledem ke kontextu doby, učinily z tohoto závěr o kontraindikovanosti jaterní resekcce při extrahepatálním postižení. Zbývající signifikantní faktory měly menší vliv na celkové přežití nemocných po jaterní resekci a autory nebyly hodnoceny jako absolutní kontraindikace resekcčního výkonu, protože každý z nich izolovaně byl asociován s dostatečně příznivou prognosou. Tato práce i přehledně zhodnotila výsledky studií jaterních resekcí z předchozích let a shrnuje prognostické faktory po provedené jaterní resekci z období před zavedením nových postupů systémové léčby do klinické praxe.

V současné literatuře není jednotný názor na význam faktorů popisujících masu tumoru v játrech, tj. především ohledně cut-off hodnoty pro 2 základní parametry – počet metastatických ložisek a jejich velikost. Většina studií uvádí jako předělovou hodnotu pro počet jaterních metastáz buď jedno ložisko versus více ložisek (tj. solitární meta) či 3 ložiska a méně versus více než 3 ložiska, a pro velikost největšího ložiska naměřený průměr 5cm a méně versus více než 5 cm. V úvahu je v tomto případě nutné vzít i fakt,

že po provedené resekci metastáz kolorektálního karcinomu má větší prognostickou hodnotu celkový počet kompletně resekabilních metastáz ve všech lokalizacích, než pouze konstatování přítomnosti extrahepatální choroby.⁹¹ Játra se tedy nezdají být privilegovaným místem z hlediska prognosy kolorektálního karcinomu po radikální resekci metastáz. Tato data zahrnují již i nemocné léčené novějšími režimy chemoterapie s irinotecanem a oxaliplatinou.

Navzdory jaterní resekci s kurativním záměrem 60% nemocných po takovéto léčbě relabuje, buď opět v játrech či se jedná o extrahepatální postižení nebo jejich kombinaci. Z nich je asi 20% vhodných k opakování resekce jater.⁹² Takováto opakovaná jaterní resekce u nemocných k jaterními metastázami kolorektálního karcinomu je bezpečná a poskytuje benefit v přežití srovnatelný s tím, kterého lze dosáhnout první jaterní resekcí.⁹³

Celkově lze tedy říci, že o prognose nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinomem po kurativní resekci všech míst s makroskopickým nádorovým postižením rozhoduje především celková nádorová masa. Během posledních 20 let se etabloval názor, že mikrometastázy a nádorové buňky jsou u pokročilého onemocnění vždy přítomny v krevní cirkulaci, v kostní dřeni a v lymfatických uzlinách.⁹⁴ Bylo i ukázáno, že většina buněk uvolňovaných z primárního nádoru není zlikvidována v játrech a vstupuje do systémové cirkulace.⁹⁵ Z tohoto pohledu je pak i tradiční radikální chirurgický výkon v podstatě jen cytoredukční. Plného vyléčení nemocného je pak možné dosáhnout v kombinaci s odpovědí imunitního systému a/nebo chemoterapie. Chirurgickým výkonem dosažená redukce nádorového bujení může poskytovat imunologický benefit tím, že sníží antigenní zátěž a zdroj tvorby různých působků, které nádor uvolňuje a které působí imunosupresivně. Z hlediska benefitu

cytoredukčního výkonu pro účinnost chemoterapie je nutné vzít pak v úvahu log-kill hypotézu, která tvrdí, že každá dávka cytostatika zabije vždy konstantní frakci nádorových buněk a ne jejich konstantní absolutní počet. Proto redukce počátečního objemu nádoru zvyšuje pravděpodobnost odpovědi nádorového onemocnění na chemoterapii a zároveň i značně snižuje pravděpodobnost rozvoje lékové rezistence, která se zvyšuje přímo úměrně s počtem nádorových buněk a délkou trvání léčby. V posledních desetiletích bylo i prokázáno, že systémová chemoterapie může u kolorektálního karcinomu vyléčit mikroskopickou chorobu, především v situaci adjuvantní terapie po resekci primárního nádoru.^{96,97} S poslední generací cytostatik užívaných u kolorektálního karcinomu pak lze tento koncept rozšířit i na aplikaci systémové léčby u metastatického postižení. Z tohoto pohledu má chirurgie a chemoterapie stejný význam pro eventuelní vyléčení kolorektálního karcinomu, podstatná je kombinace těchto léčebných modalit.

2.1.2.2. Prognostické faktory u ostatních cytoredukčních metod léčby generalizovaného kolorektálního karcinomu

Velkou otázkou je samozřejmě definice úplného vyléčení u generalizovaného kolorektálního karcinomu. Z konzervativního úhlu pohledu je na celou léčbu generalizovaného kolorektálního karcinomu nadále nutno nazírat jako na léčbu pouze paliativní, s cílem dosažení dlouhodobé remise.

Jestliže je nutno nadále na generalizovaný kolorektální karcinom nazírat jako na onemocnění nevyléčitelné u většiny nemocných, je možné výše zmíněný princip cytoredukce chirurgickou metodou léčby rozšířit i na jiné léčebné postupy, které sice většinou dosahují horší výsledek ohledně celkového přežití ve srovnání s kurativní

resekcí, avšak zmenšují nádorovou masu a tím dosahují lepšího paliativního efektu než pouze samostatná systémová léčba u kurativně neresekabilních nemocných. Mezi takovéto cytoredukční metody paliativní léčby je možné počítat lokální ablační metody léčby - radiofrekvenční ablaci (RFA) a kryoablaci jaterních metastáz, a radiofrekvenční ablaci plicních metastáz u kurativně neresekabilních nemocných, dále chemoembolizaci jaterních metastáz a intraarteriální regionální chemoterapii cestou arteria hepatica (v anglické literatuře hepatic arterial infusion, HAI), eventuelně i paliativní radioterapie a různé kombinace všech těchto metod. Do této cytoredukční strategie léčby lze počítat i provádění paliativních kolorektálních resekcí u nemocných s neresekabilními jaterními metastázami. Jedná se o metody, které v současném rozkvětu „neoadjuvantní“ a „adjuvantní“ systémové léčby spojené s kurativní resekcí (dosud především jaterních metastáz) ustoupily do pozadí literárního zájmu, avšak s ohledem na to, že u většiny nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinomem není možno nikdy v průběhu jejich onemocnění kurativní resekci provést, je dle mého názoru jejich význam v současné době vysoce nedoceňován a zasloužily by si minimálně stejné pozornosti, co se týče hodnocení jejich výsledků v kontextu stratifikace nemocných dle prognosy a z toho vyplívajícího zpřesnění jejich indikací. Současně dostupné studie o těchto metodách léčby jsou většinou na malém počtu nemocných a většina z nich je provedena ještě před dostupností nových metod systémové léčby generalizovaného kolorektálního karcinomu, což zmenšuje jejich vypovídací hodnotu v současné situaci prudkého nástupu nových metod léčby. Dále bude pojednáno pouze o těch cytoredukčních metodách, který byly použity v léčbě nemocných zařazených do souboru vyšetřovaného ve výzkumné části této teze.

V současné době je příklon k radiofrekvenční ablaci, která je prováděna intraoperačně i perkutánně či laparoskopicky a lze s její pomocí ošetřit i extrahepatální metastatické léze (nejčastěji metastázy plic, eventuelně i ledvin). RFA se nejprve začalo užívat jako alternativa resekční léčby jaterních metastáz kolorektálního karcinomu u neresekabilních nemocných, a v takovémto případě je dosahováno 1-letého celkového přežití v rozmezí 85 % až 100 % a 3-letého 33 % až 52 %.⁹⁸ Problémem zůstává lokální rekurence v místě ošetření, jejíž míra je uváděna až do výše přibližně 40%.^{99, 100, 101}

Berber a kol. hledali v prospektivní studii RFA provedené během období 5 let u jaterních metastáz kolorektálního karcinomu na souboru 135 nemocných prognostické faktory pro přežití bez nemoci i celkového přežití.¹⁰² Medián celkového přežití po RFA pro všechny nemocné byl 28,9 měsíce, což je zlepšení ve srovnání s tradičními režimy chemoterapie dosahujícími mediánu celkového přežití maximálně okolo 15 měsíců (bolusový 5-FU/LV průměrně okolo 12 měsíců), avšak blíží se hodnotě teoreticky dnes běžně dosažitelné moderními režimy systémové léčby (při užití všech 5 současných léčebných agens - 5-FU/LV, oxaliplatin, irinotecan, bevacizumab a cetuximab - v průběhu léčby ve vhodné sekvenci). Při univariantské analýze přežití vyšly jako prognostické faktory významné pro celkové přežití největší rozměr metastázy větší než 5 cm a CEA vyšší než 200 ng/ml, s trendem u parametru více než 3 metastatických ložisek, avšak při multivariantské Coxově analýze vyšel signifikantně z těchto faktorů pouze rozměr metastázy větší než 5 cm. Tato skupina nemocných (tj. rozměr ošetřeného metastatického ložiska větší než 5 cm) měla medián celkového přežití 21 měsíců. Při multivariantské analýze přežití bez nemoci nevyšel jako signifikantní žádný z faktorů. Peroperačně prováděná RFA je dnes běžně užívána jako doplňková metoda při jaterní resekci.¹⁰³

Regionální chemoterapie cestou arteria hepatica/jaterní arteriální infuze (hepatic arterial infusion, HAI) s podáním chemoterapie založené na fluoropyrimidinech byla ve své době alternativou k systémově podávané (paliativní) chemoterapii s 5-fluorouracilem. Většina údajů, které proto o léčbě HAI máme v současné době k dispozici, je získána v kontextu starších režimů systémové chemoterapie. HAI s fluoropyrimidiny je metodou léčby jaterních metastáz kolorektálního karcinomu s v randomizovaných kontrolovaných studiích prokázanou vyšší mírou objektivní odpovědi (response rate, RR mezi 42 % až 62 %, ve srovnání se systémovým 5-FU s prokázaným RR do maximálně 24 %) a lepší kvalitou života oproti systémové chemoterapii založené na 5-FU.^{104, 105, 106, 107, 108, 109, 110} Co se týče vlivu HAI na přežití, máme k dispozici rozporuplné informace. V adjuvantním podání HAI s fluoropyrimidiny po kurativní jaterní resekci se ukazuje, že tento postup může redukovat míru rekurence a prodloužit období bez nemoci.^{111, 112, 113, 114, 115} Studie *Kemenyové a kol.* publikovaná v roce 1999 prokázala, že adjuvantní podání chemoterapie cestou HAI po provedené jaterní resekci pro metastázy kolorektálního karcinomu zlepšuje nejen délku přežití bez nemoci, ale i celkové přežití.¹¹⁶ Jiní autoři však toto pozorování zlepšeného přežití ve stejné klinické situaci (tj. adjuvantní HAI po jaterní resekci) nepotvrdili a naopak poukázali na významnou toxicitu ve formě biliární sklerosy a ulcerací žaludku.¹¹⁷ Navzdory adjuvantní HAI mají mnozí nemocní relaps v játrech a/nebo extrahepatálně. HAI je v klinické praxi užívána již 40 let,¹¹⁸ v minulém desetiletí dosáhla svého maximálního rozkvětu, avšak nyní její tradiční indikace znehledňuje absence dat o její účinnosti ve srovnání s novými režimy systémové paliativní léčby jaterních metastáz. Nejasnou a spíše pochybnou v tomto kontextu zůstává indikovanost a benefit adjuvantní HAI po provedené RFA¹¹⁹ (eventuelně kryoablaci) v případě nemožnosti

jaterní resekce. Naopak jsou v poslední době dostupné informace ze studií, které nevyklučují, že podávání HAI (a to jak samotné,¹²⁰ tak i v kombinaci se systémovou léčbou) by mohlo mít přínos nejen pro větší míru odpovědi a prodloužení času do progresu v játrech, ale i pro prodloužení celkového přežití v případě nemožnosti jakékoliv cytoredukční terapie. Závažným limitem paliativní chemoterapie podávané cestou HAI je však vyšší míra extrahepatálních relapsů/progresí choroby ve srovnání se systémovou léčbou. Nicméně i přesto nelze vyloučit, že primární kontrola choroby v játrech i při vyšším riziku extrahepatálního postižení může u části nemocných zajistit zvýšeného celkového přežití při užití HAI ve srovnání s pouze systémovým podáním paliativní chemoterapie. Prognostickými faktory lepšího přežití se v tomto případě zdají být omezené zvýšení sérové alkalické fosfatázy, LDH a celkového počtu leukocytů v periferní cirkulaci (*Kemenyová a kol.*, 2006). Kombinovaný přístup přináší oproti samotné HAI další zlepšení odpovědi (RR), času do progresu i celkového přežití.^{121, 122,}

¹²³ Je nutné si dále i uvědomit, že většina studií s HAI u neresekabilních jatrních metastáz kolorektálního karcinomu, včetně všech randomizovaných, je provedena na selektované populaci nemocných, a proto se ve studiích s HAI v podstatě jedná o nemocné s intermediární prognosou a to i ve srovnávacích ramenech systémové léčby. Ohledně objektivně prokázaných prognostických faktorů při léčbě neresekabilních metastáz HAI jsou informace dostupné v současné literatuře velmi nesoustavné a v podstatě neexistuje rozsáhlejší studie provedená s tímto primárním cílem. Kritéria pro indikaci podávání HAI z paliativní indikace jsou proto často odvozená z biologické podstaty HAI a přenesená ze studií se systémovým podáváním paliativní chemoterapie, mnohdy pouze empirická a nutně subjektivní. *Chang a kol.* například uvádí ve své studii jako signifikantní faktor pro horší prognosu nemocných léčených HAI postižení

lymfatických uzlin v oblasti hepatální arterie. V jiných studiích se jako nejvýznamnější prognostický faktor a zároveň selekční kritérium nemocných vhodných k paliativní léčbě HAI prokázal rozsah postižení jaterního parenchymu. Je zcela jistě třeba dalších studií k zodpovězení současných nejistot ohledně srovnání benefitu a nákladů léčby HAI a nových postupů systémové paliativní léčby (biologická terapie, novější cytostatika), a v tomto kontextu je nutno i zmínit, že novější cytostatické léky mohou být podávány i cestou HAI a tím může být docíleno opět o něco lepších výsledků než u HAI založené pouze na fluoropyrimidinech.¹²⁴

2.1.2.3. Prognostické faktory u systémových metod léčby generalizovaného kolorektálního karcinomu

Medián celkového přežití u všech neléčených nemocných s metastatickým kolorektálním karcinomem bývá udáván v rozmezí 5 až 9 měsíců (konzervativněji 6 až 8 měsíců). Většina těchto nemocných má přítomno sekundární postižení jater.¹²⁵ Hematogenně do jater metastazuje častěji karcinom kolon, u karcinomu rekta bývá metastatické postižení jater přítomno asi u 19 % nemocných v době laparotomie pro resekci primárního nádoru střeva.¹²⁶ V literatuře k současnému datu je dostupných relativně dost informací o možných prognostických faktorech, které mají vliv na přirozený průběh onemocnění v tomto stadiu. Nejedná se však o studie velkého rozsahu a většinou jde o retrospektivní hodnocení staršího data provedené v jedné instituci. Nicméně jako možné nezávislé prognostické faktory jsou nejčastěji zmiňovány následující parametry: rozsah jaterního postižení, grade primárního nádoru střeva, přítomnost extrahepatálního metastatického postižení, postižení mesenterických lymfatických uzlin, zvýšené CEA v séru, přítomnost ascitu či ikteru, abnormality

v jaterních funkcích vyšetřených laboratorně (nejčastěji je zmiňována zvýšená alkalická fosfatáza) a pokročilý věk nemocného.^{127, 128, 129} V případě vyselektování pouze nemocných se synchronním metastatickým postižením jater jsou kromě toho zmiňovány jako možné nezávislé prognostické faktory i následující parametry: výkonnostní stav nemocného, stadium primárního nádoru střeva klasifikované dle Dukese a postižení regionálních lymfatických uzlin primárního nádoru střeva.^{130, 131} Nemocní s omezeným jaterním postižením a nepřítomností jiných nepříznivých prognostických faktorů mohou i bez léčby dosáhnout relativně vysokého mediánu přežití (udáváno až kolem 20 měsíců).

U pokročilého kolorektálního karcinomu byla po mnoho let jedinou léčebnou možností systémová aplikace 5-fluorouracilu (5-FU), teprve později rozšířená o potenciaci kyselinou folinovou (leukovorinem), dohromady tvořící tzv. režim FUFA. Toto cytostatikum je schopno u nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinomem dosáhnout prodloužení přežití bez nemoci, s odpovědí nádoru dosažitelnou u přibližně 32 % nemocných a dle velké metaanalýzy provedené v roce 1992 i prodloužit celkové přežití na hodnotu 11,5 měsíce.¹³² V 90-tých letech 20. století pak dochází k nástupu nových cytostatik, které dosahují dalšího zlepšení celkového přežití. Přidáním irinotecanu (CPT-11) působící mechanismem inhibice topoizomerázy I k FUFA (režim ILF a později FOLFIRI) bylo v randomizovaných studiích dosaženo statisticky signifikantního prodloužení celkového přežití na 14,8 měsíce (*Rougier a kol., 1998, Saltz a kol., 2000*).¹³³ Oxaliplatina je platinový derivát třetí generace, který v kombinaci s FUFA (režim FOLFOX4) je schopen prodloužit přežití bez nemoci v adjuvantní indikaci u kolorektálního karcinomu stadia II a III (*Andre a kol., 2004*).¹³⁴ U metastatického kolorektálního karcinomu zlepšilo užití oxaliplatiny spolu s FUFA

(různé režimy FOLFOX) míru odpovědi až na 50,7 % a zvýšilo i medián celkového přežití (ale jedná se o nesignifikantní zvýšení) na 16,2 měsíce (*de Gramont a kol., 2000*).¹³⁵ Novější studie poté zkoumala možnosti a výhody podání režimu s irinotecanem (FOLFIRI) a následně při progresi režimu s oxaliplatinou (FOLFOX6) a opačně. Oba postupy zlepšily dále celkové přežití na hodnoty 21,5 a 20,6 měsíce, a režimy se signifikantně lišily pouze profilem toxicity (*Tournigand a kol., 2004*).¹³⁶ Jako další možnost systémové paliativní léčby generalizovaného kolorektálního karcinomu pak byla zavedena do klinické praxe v tomto desetiletí jednak humanizovaná monoklonální protilátka proti VEGF nazvaná genericky bevacizumab. Její užití v kombinaci s režimem IFL dosáhlo dle výsledků studie III. fáze ve srovnání se samostatným režimem IFL jednak prodloužení doby přežití bez známek nemoci z 6,2 měsíce na 10,6 měsíce a zároveň i zvýšila celkové přežití z 15,6 měsíce na 20,3 měsíce (*Hurwitz a kol., 2004*).¹³⁷ Chimerická monoklonální protilátka proti receptoru pro EGF (EGF-R), genericky nazvaná cetuximab, pak je schopna dosáhnout v kombinaci s chemoterapií s obsahem irinotecanu a FUFA další odpovědi u generalizovaného kolorektálního karcinomu refrakterního na léčbu samotným irinotecanem a prodlužuje medián celkového přežití těchto předléčených nemocných z 6,9 měsíce na 8,6 měsíce (*Cunningham a kol., 2004*).¹³⁸

Pokroky v dosahovaných výsledcích systémové paliativní cytostatické a biologické léčby generalizovaného kolorektálního karcinomu v posledním desetiletí jsou tedy značné. Méně prudký vývoj je však na poli hodnocení prognostických a prediktivních faktorů v souvislosti s těmito novými postupy systémové léčby. Většina informací o faktorech s vlivem na prognosu nemocných léčených systémovou léčbou či o faktorech schopných predikovat účinnost terapie či přesněji vymežit její indikace ohledně cílové

skupiny nemocných a vhodného trvání léčby, které by souborně sloužily k udržení benefitu léčby pro „citlivé“ nemocné v kombinaci s omezením toxicity nadbytečné léčby, se bohužel vztahuje nadále pouze k systémovému režimu FUFA či samotnému 5-FU. Je sice pravdou, že každá studie hodnotící přežívání se snaží dodatečně najít i nějaký relevantní prognostický faktor, ale konstrukce studií je primárně zaměřená na hodnocení efektivity léčby u celé cílové skupiny nemocných a neumožňuje tedy dostatečně stratifikovat nemocné a získat dostatečně validní informace co se týče parametrů s prognostickým významem pouze analýzou podskupin. Studie, které se touto problematikou pak zabývají primárně jsou dosud omezeného rozsahu a nižší kvality (limitovaný počet nemocných, retrospektivní, unicentrické) než studie léčebné. Nejrozsáhlejším a relativně kvalitním synteticko-analytickým zhodnocením zabývajícím se klinickými determinantami přežívání nemocných s metastatickým kolorektálním karcinomem léčeným systémovou paliativní chemoterapií založenou na 5-FU je práce *Köhneho a kol.* z roku 2002.¹³⁹ Jedná se o retrospektivní analýzu dat z 19 prospektivních randomizovaných studií a 3 studií II. fáze, která vyšetřuje multivariantní analýzou celkově 3825 nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinomem léčených různými systémovými režimy s 5-FU mezi léty 1982 a 1996 na různých evropských pracovištích. Celý soubor nemocných byl rozdělen na 2 podskupiny, inferenční soubor o 2549 nemocných a soubor pro validaci o 1276 nemocných. Pro všechny nemocné byla zjišťována data pro celkově 23 parametrů, které byly kandidátskými prediktory. Tyto parametry byly pak seskupeny do 3 skupin – laboratorní parametry (11), s nádorem související parametry (7) a klinické parametry (5). Pro tyto skupiny byla v prvním kroku provedena vždy separátní analýza a takto byly vybrána pouze část nejperspektivnějších faktorů do obecného celkového modelu.

Metodika byla založena na klasifikačních pravidlech (the tree analysis using the recursive partition and amalgamation method – RECPAM). Klasifikační pravidla z obecného modelu na inferenčním vzorku pak byla použita pro ověření validity na kontrolním menším vzorku. Výsledná regresní analýza identifikovala 3 skupiny rozdílného rizika:

- skupina nízkého rizika (1111 nemocných z inferenčního souboru) s mediánem celkového přežití 15 měsíců definovaná pomocí následujících parametrů: PS ECOG 0/1 a jen jedno místo postižené nádorem,
- skupina středního rizika (904 nemocných z inferenčního souboru) s mediánem celkového přežití 10,7 měsíce definovaná pomocí následujících parametrů: (PS ECOG 0/1 a více než jedno místo postižené nádorem a alkalická fosfatáza méně než 300) nebo (PS ECOG více než 1 a jen jedno místo postižené nádorem a počet leukocytů méně než $10 \times 10^9/l$),
- skupina vysokého rizika (534 nemocných z inferenčního souboru) s mediánem celkového přežití 6,1 měsíce definovaná pomocí následujících parametrů: (PS ECOG 0/1 a více než jedno místo postižené nádorem a alkalická fosfatáza více než 300) nebo (PS ECOG více než 1 a více než jedno místo postižené nádorem a počet leukocytů více než $10 \times 10^9/l$).

Medián přežití pro takto definované skupiny nemocných na souboru určeném pro validaci vyšel pro nízké riziko 14,7 měsíce, pro střední 10,5 měsíce a pro vysoké 6,4 měsíce. Autoři pak doporučují, aby tato kritéria byla používána pro stratifikaci nemocných v běžné klinické praxi při rozhodování o intenzitě léčby a v rámci klinických studií ke stratifikaci dle rizika. Uzavírají, že validita jakéhokoliv jiného molekulárního či biologického markeru prognosy u generalizovaného kolorektálního

karcinomu by měla být poměřována těmito čtyřmi parametry (PS dle ECOG, počet leukocytů, alkalická fosfatáza a počet míst postižených metastatickým procesem). Tato práce se stala nejcitovanější studií zabývající se prognostickými faktory u neresekabilního generalizovaného kolorektálního karcinomu. Má však i své slabiny, na které bylo upozorňováno téměř hned po jejím uveřejnění. Především se jedná o retrospektivní analýzu na teoreticky značně nehomogenním souboru nemocných. Autoři v závěru doporučují ke stratifikaci nemocných dle rizika užití výše zmíněných 4 parametrů jako konečného výsledku analýzy, v konečném modelu byly ale použity na základě signifikance při prvním kroku i počet trombocytů a hladina hemoglobinu - dle výsledků prvního kroku se tedy také jednalo o nezávislé prognostické faktory, které však ztratily svoji vypovídací hodnotu v kombinované analýze s nelaboratorními parametry. Dále pak lze zpochybnit nesignifikantnost některých dalších laboratorních parametrů vyšetřovaných v této studii, které však v jiných studiích vyšly statisticky signifikantně jako prognostické faktory celkového přežití. Jedná se zejména o LDH, albumin, AST, bilirubin a sérové CEA. Je poukazováno na fakt, že v této Köhneho studii byl počet chybějící dat pro signifikantní faktory nižší než u dalších parametrů, které vyšly nesignifikantně. Konkrétně procento chybějících hodnot pro leukocyty a hemoglobin bylo 30 %, pro trombocyty 32 % a pro ALP 38%, avšak pro LDH 72 %, pro albumin 67 %, pro aminotransferázy 48 % a 44 %, pro bilirubin 46 % a pro CEA 53 %. Vysvětlením by mohla být i vysoká nehomogenita v použitých metodikách měření jednotlivých parametrů v jednotlivých studiích (jak použitých pro Köhneho analýzu, tak i ve studiích které jsou s ní srovnávány). Existuje vysoká variabilita v analytické fázi (např. různé komerční kity užívané v určitou dobu), avšak ještě větším zdrojem chyb je s největší pravděpodobností v této situaci fáze preanalytická. Žádná z těchto

publikovaných studií nepopisuje podrobně použité metodiky pro stanovení těchto laboratorních parametrů a tím je v podstatě i teoreticky nemožné provést reprodukovatelně nezávislá měření. Tím je způsobeno, že variabilita mezi studiemi může dosahovat u některých parametrů až 50 % naměřených hodnot.¹⁴⁰ Jako kompromisní řešení protichůdných informací z této studie ve srovnání s jinými pak někteří oponenti doporučují ke stratifikaci nemocných na základě praxe založené na principech evidence-based laboratory medicine i rutinní užití výše jmenovaných dalších parametrů z jiných, nezávisle provedených studií,¹⁴¹ a tím je popřen v podstatě smysl výsledku celé této Köhneho studie pro rutinní klinickou praxi.

Pakliže lze takto zpochybnit validitu nejrozsáhlejší a tím pádem - jak je mnohými na věci nazíráno - i „nejkvalitnější“ studie na toto téma, jsou všechny další prognostické studie „s 5-FU“ zatíženy faktory snižujícími jejich validitu ještě vyšší měrou, což má i odraz v jejich často protikladných závěrech.

Jak již bylo uvedeno výše, je počet studií zabývajících se prognostickým faktory u generalizovaného kolorektálního karcinomu léčeného paliativní systémovou léčbou s novějšími cytostatiky či biologickou léčbou dosud značně nízký. Jedná se především o vedlejší produkty primárně léčebných studií, u kterých autoři následně provedli analýzu možných faktorů s vlivem na celkové přežití či přežití bez nemoci. Je možno zmínit především několik studií zabývajících se prognostickými faktory při chemoterapii s irinotecanem.^{142, 143, 144, 145} *Mitry a kol.* publikovali v r. 2004 svoji poolovanou analýzu z dat 2 randomizovaných studií III. fáze s irinotecan a infusními režimy FUFA, celkově retrospektivně analyzovali data od 602 nemocných s pokročilým kolorektálním karcinomem a v multivariantní analýze našli jako signifikantní prognostické faktory pro lepší přežití bez známek progresu ztrátu váhy menší než 5 % ($p = 0,047$), PS 0 až 1

dle WHO ($p = 0,005$) a režim chemoterapie s irinotecanem ($p = 0,035$), pro lepší celkové přežití pak ztrátu váhy menší než 5 % ($p < 0,001$), PS 0 až 1 dle WHO ($p = 0,002$), 2 či méně míst metastatického postižení ($p = 0,04$) ALP rovnou nebo menší než dvojnásobek horního limitu normy ($p < 0,001$) a režim chemoterapie s irinotecanem ($p = 0,009$).¹⁴⁶ Studií vyšetřující prognostické faktory při paliativní systémové chemoterapii s oxaliplatinou je ještě méně a jsou horší kvality než studie s irinotecanem.^{147, 148, 149} Kvalitnější studie vyšetřující prognostické faktory při biologické systémové léčbě neresekabilních forem generalizovaného kolorektálního karcinomu neexistují.

2.1.2.4. Shrnutí prognostických faktorů u pokročilého kolorektálního karcinomu

Prognostické faktory u generalizovaného kolorektálního karcinomu obecně tedy jsou studovány především v retrospektivních studiích menšího rozsahu a proto byly opakovaně provedeny systematické přehledy těchto studií k získání alespoň nějaké ucelené informace, která by pokud možno vytvořila klinicky užitečný výstup pro upotřebení v situacích, kdy je nutné pro rozhodování o další léčbě znát prognosu nemocného.

Systematický přehled od *Watina a Friedberga* z roku 2004 se snažil nalézt odpověď na to, které z laboratorních parametrů je pak možno doporučit jako prognostické faktory u metastatického kolorektálního karcinomu k vyšetřování v rámci stratifikace nemocných pro účely terapeutických studií a pro guideliney uplatnitelné v klinické praxi.¹⁵⁰ Pro tento účel byly selektovány jen studie vysoké kvality a o rozsahu minimálně 100 vyšetřených nemocných, s cílem zajištění co největší validity posuzovaných studií. Na základě striktních inkusivních a exklusivních kritérií bylo tedy nakonec pro účely tohoto přehledu vyselektováno z celkově 877 publikací pouze 15 studií. Na základě evidence

vyplývající z těchto studií pak autoři doporučují aby u všech těchto nemocných v rámci jejich stratifikace v klinických studiích byly systematicky měřeny následující předléčebné laboratorní parametry: počty krvinek v periferní krvi, hemoglobin, protrombinový čas, sérová ALP, LDH, transaminasy, albumin, bilirubin a CEA. Pokud by se uvažovalo o přidání dalších testů doporučují autoři zahrnout i gama-glutamyltransferasu a sedimentaci erytrocytů. Dále autoři doporučují místo užívání arbitrárně stanovených prahových hodnot užívat tyto proměnné jako kontinuální. Co považují však na této stati za nejhodnotnější je úhel pohledu na prognostické faktory z pohledu lékaře zabývajícího se laboratorní medicínou a ne čistý úhel pohledu klinika. Autoři diskutují metodické problémy srovnání studií zabývajících se prognostickými faktory u kolorektálního karcinomu a obrovskou heterogenost studií, co se týče jejich použitých laboratorních metod a předělových hodnot, což vše dohromady velmi komplikuje objektivní posouzení validity jednotlivých prognostických faktorů i v těch případech, kdy se jejich klinické užití považuje všeobecně za standardní a užitečné. Ze zkoumaných 15 studií v přehledu potvrdilo 87 % z nich některý z laboratorních parametrů jako nezávislý prognostický faktor. Jednotlivé laboratorní parametry, které byly zkoumány ve více než 2 studiích, a které byly prokázány být signifikantními v multivariantsní analýze u více než 20 % studií v přehledu jsou: albumin (6/8, 75 %), leukocyty (5/8, 62,5 %), ALP (7/14, 50 %), hemoglobin (3/7, 43 %), transaminasy (2/6, 33 %), CEA (3/12, 25 %) a bilirubin (2/9, 22 %).

2.2. Vztahy mezi imunitním systémem a tumorem

Nádorové onemocnění vytváří v organismu situaci s komplexními vztahy mezi imunitním systémem a tumorem. V současnosti je všeobecně přijímán názor podložený výsledky experimentů a epidemiologických sledování z posledních dvou desetiletí, který nahlíží na vzájemný vztah tumoru a imunitního systému z úhlu dvou základních představ, a to sice, že zdravý imunitní systém je nutnou komponentou pro kontrolu maligního onemocnění a že s karcinomem asociovaná imunitní dysfunkce přispívá k progresi nádoru. Tumor využívá obdobné molekulární a buněčné mechanismy jako infekční patogeny k tzv. úniku před imunitním systémem hostitele a tumorem je postupně navozen stav nerovnováhy imunitního systému. Tuto imunitní dysfunkci u nemocných s nádory lze do jisté míry vysvětlit jako sekundární defekt imunitního systému vyvolaný trvalou přítomností progresivně rostoucího a geneticky se neustále měnícího tumoru, který pod selekčním tlakem „obránných mechanismů hostitele“ získává v čase stále více agresivnější fenotyp. Nádor, pokud není v počáteční fázi svého růstu imunitou zlikvidován, naopak v dalších fázích imunitu aktivně ovlivňuje pro sebe výhodným, ale pro organismus jako celek nevýhodným, směrem. Zatímco počáteční fáze nádorového růstu nevyvolává systémovou imunodeficienci a bývá spojena s tolerancí specifickou k nádorovým antigenům či lokální neodpovídností T buněk (mechanismy anergie, exhausce či nevhodné presentace antigenu), převládá u pokročilých stadií nádorů nespecifická a systémová imunitní dysfunkce.^{151, 152, 153}

2.2.1. Role imunitního systému v kontrole progresu nádoru

Jak u lidí postižených karcinomem tak u zvířecích modelů nádorového růstu je jasně prokázáno, že hostitel obvykle vytváří imunitní odpověď na tumor.

Za užití citlivých moderních technologií je u nositelů nádorů možná detekce tumor-specifických cytotoxických/cytolytických T lymfocytů (CTL) a IgG protilátek specifických pro nádorové epitopy. Za použití tetramerů a průtokové cytometrie mohou být nyní měřeny T lymfocyty schopné vazby MHC I či MHC II restringovaných peptidů.^{154, 155} Funkční *ex vivo* testy (testy proliferace, cytotoxicity nebo produkce cytokinů v odpovědi na peptidy asociované s tumorem) potvrzují tato fenotypizační data, i když *ex vivo* odpovědi na tyto epitopy jsou často slabé a vyžadují *in vitro* senzitivizaci (IVS) antigen-prezentujícími buňkami (APC) a exogenně dodanými cytokiny.¹⁵⁶ Souhrnem lze z těchto studií říci, že jsou v cirkulaci většiny nositelů nádoru detekovatelné prekurzory T lymfocytů schopných odpovědi na vlastní antigeny, které jsou často zvýšeně exprimovány na nádorech. Tyto T lymfocyty jsou v cirkulaci detekovatelné v nízké frekvenci, bohatěji jsou zastoupeny v tkáních nádoru.¹⁵⁷ U pacientů s karcinomem jsou také často detekovatelné protilátky proti nádorovým antigenům (TAA).¹⁵⁸

2.2.2. Imunitní systém jako promotor růstu nádoru rezistentního k imunitní odpovědi

V oblasti premaligních a časných nádorových lézí se obvykle vytváří infiltráty imunitních buněk, především T lymfocytů, makrofágů a dendritických buněk (DCs), někdy jsou přítomny i formace B lymfocytů připomínající lymfoidní folikuly.^{159, 160} Z nich především nádor infiltrující lymfocyty (tumor infiltrating lymphocytes – TIL) byly považovány za komponentu standardní zánětlivé odpovědi hostitele na tumor.¹⁶¹ Avšak během let se shromáždily data, které ukazují, že: 1. TIL mají vyjádřený aktivační fenotyp,¹⁶² ale jsou funkčně kompromitovány,¹⁶³ 2. v TIL jsou bohatě zastoupeny paměťové lymfocyty specifické k TAA.¹⁶⁴ TIL jsou tedy atrahovány přítomností nádoru a jsou lokalizovány v místech jeho „signálů“, ale na rozdíl od normálních zánětlivých infiltrátů obsahují imunitní buňky specifické pro mnoho různých peptidů exprimovaných nádorovými buňkami. Byla vznesena hypotéza, že TIL produkují cytokiny a růstové faktory nutné pro růst nádoru a že nádor produkuje chemotaktické faktory, které aktivně rekrutují mononukleární buňky - u lidí hlavně lymfocyty a makrofágy - do místa tumoru.¹⁶⁵ Je zatím nezodpovězeno, jestli tato rekrutace je řízena a koordinována tumorem nebo je spouštěna buňkami okolní tkáně v odpovědi na přítomnost tumoru. Bylo diskutováno, zda rekrutované imunitní buňky aktivované v odpovědi na „nebezpečné signály“ mohou být zdrojem trofických faktorů pro tumor přičemž ale selhávají ve svých protinádorových funkcích. Pro tuto hypotézu svědčí nová data potvrzující, že TIL jsou schopny produkce cytokinů v odpovědi na TAA ačkoliv jejich protinádorové efektorové funkce jsou buď slabé nebo zcela nepřítomné. Pře jsou vedeny i o roli imunity v metastazování nádorů. Aby mohl metastazovat, musí nádor vykazovat určité zvláštní charakteristiky, včetně schopnosti penetrovat

endothelium a získat mobilitu uvnitř tkání, lymfatických a krevních cév.¹⁶⁶ Není možná překvapením, že je možné i to, že buňky solidních nádorů jsou schopné adopce fenotypových charakteristik lymfoidních buněk, které jim umožňují migraci za užití těch samých mechanismů.¹⁶⁷ Tento fenomén je jen dalším příkladem, jak nádory využívají imunitní buňky k vlastnímu prospěchu. Zároveň stojí tyto migrující nádorové buňky před obdobným problémem jako infekční patogeny využívající strategie přímého průniku do cirkulace – jak přežít v hostilním prostředí primárně namířeném proti takové možnosti. Je známo, že cirkulující nádorové buňky jsou obzvláště senzitivní k lýze monocytů a přirozenými zabíječi (NK cells).¹⁶⁸ Za přítomnosti protinádorových protilátek by měly být tyto efektorové buňky přirozené imunity schopny efektivně eliminovat nádorové cíle za pomoci mechanismu cytotoxicity zprostředkované protilátkami (antibody-dependent cellular cytotoxicity – ADCC).¹⁶⁹ Ta nádorová buňka, která se dokáže vyhnout imunitní intervenci v periferní krvi nebo lymfatické cirkulaci a doputuje do místa nové tkáně je nepochybně závislá na lokálním mikroprostředí co se týče růstových faktorů a strukturní podpory extracelulární matrix (ECM). Je spekulováno, že nádorově specifické imunitní buňky odpovídající na TAA mohou takové růstové faktory produkovat a podporují tak formování metastáz.

Obraz , který se takto rýsuje, ukazuje imunitní systém v duální roli – ten provádí eliminaci nádoru i promoci nádorového růstu, přičemž výsledný směr je snad závislý na lokálních okolnostech a signálech doručených nádorem. Agresivnější nádory mohou být úspěšnější v podřízení si mikroprostředí - včetně imunitních buněk - pro své potřeby.¹⁷⁰

2.2.3. Zánět a karcinom

Z interakcí mezi nádorem a imunitním systémem „hostitele“ je důležitá především neustálá kompetice mezi protinádorovou imunitní odpovědí a mechanismy úniku nádoru před imunitním systémem (immune escape mechanisms), které eventuelně vedou k imunosupresi a nekontrolovanému nádorovému růstu. Nádorové buňky tomuto imunitnímu dohledu unikají několika způsoby, které lze stručně shrnout do třech kategorií: nádorové buňky se vyhýbají detekci, sekretují inhibiční faktory a stávají se rezistentními k cytotoxickým aktivitám buněk imunitního systému.

Během této fáze souboje mezi nádorem a vrozenou a adaptivní imunitou jsou extenzivně aktivována obě ramena imunitního systému, což vede k vývoji zánětlivé odpovědi, která napomáhá eliminaci abnormálních buněk. Nepřetržitá aktivace vrozeného a adaptivního imunitního systému se vyskytuje za „patogenních podmínek“, což se děje u některých infekčních nemocí, či za „sterilních podmínek“ typických pro nádory a autoimunitní onemocnění. Jejich protražovaná aktivace u nádorů vedoucí k chronickému zánětu může být indukována cestou nádorově specifických či nespecifických imunitních odpovědí. Zatímco specifické odpovědi jsou zprostředkovány aktivací T buněk přes TCR, jsou nespecifické odpovědi zprostředkovány aktivací tzv. Toll-like receptorů (TLRs), které jsou primárně exprimovány na myeloidních buňkách. Z toho vzniklá zánětlivá odpověď v akutní fázi podporuje eliminaci nádorových buněk. Avšak když se tato zánětlivá odpověď stane chronickou, může vystupňovat nádorový růst přímo či nepřímo cestou indukce imunosuprese postihující funkce T i NK buněk. K této se zánětem asociované

imunopresi přispívají nejrůznější mediátory zahrnující cytokiny, chemokiny, prostaglandiny a oxidanty, které všechny zvyšují růst nádoru a angiogenezi.

Jedna z hlavních cest, které způsobují selhání imunitního systému v jeho snaze eliminovat nádor v průběhu chronického zánětu, závisí na míře aktivace, proliferace a rekrutování myeloidních supresorových buněk (myeloid suppressor cells – MSCs). MSCs využívají výhody poskytnuté jim faktory sekretovanými tumorem a hostitelem v průběhu zánětlivé odpovědi ke své proliferaci a hromadění v lymfatických orgánech, kde uplatňují své imunopresivní účinky na T a NK buňky.

Dalším protinádorovou imunitu suprimujícím faktorem jsou pak regulační T lymfocyty CD4⁺CD25⁺ (Treg) a subpopulace CD4⁺ buněk zvaných „regulačních buňky typu 1“ (Tr1). Treg zprostředkovávají svoji supresní funkci přímými buněčnými kontakty jejichž bližší povaha však není dosud objasněna, Tr1 pak svojí sekrecí IL-10 a TGF-β. Tregs a Tr1 nejsou však jedinečné ve své schopnosti inhibovat aktivaci T buněk, protože i Th2 buňky, jež jsou expandovány u nemocných s nádory, mohou také suprimovat protektivní protinádorovou imunitu. Tyto buňky produkují vysoké množství IL-4, IL-10 a IL-13, ale málo INF-γ, a jsou často převažující populací T lymfocytů v populaci TIL, přičemž nádor svou sekrecí IL-10 a TGF-β zprostředkovává a podporuje tento cytokinový sekreční profil (převaha IL-4) typický pro Th2 buňky.^{171, 172} Treg buňky mohou navíc kromě své suprese buněčné adaptivní protinádorové imunity mít vliv i na adaptivní humorální imunitu (B lymfocyty)^{173, 174, 175} a vrozenou buněčnou imunitu (přímý vliv na NK buňky,¹⁷⁶ vliv na makrofágy přes suprimaci CD4⁺ Th buněk, vliv na dendritické buňky jakožto APC^{177, 178, 179, 180} – down regulace MHC II třídy, kostimulačních molekul CD80 a CD86).

Souhrnem řečeno, když se zánětlivá odpověď stane chronickou, zabraňuje či blokuje robustní protinádorové imunitní odpovědi.

2.2.4. Mechanismy úniku nádoru před imunitním systémem

V obecné rovině užívají tumory dvě základní strategie pro vyhnutí se imunitní odpovědi. Buď se před imunitními buňkami „schovají“ a tím zabrání svému rozeznání. Nebo přikročí k zneschopnění či eliminaci imunitních buněk.

Dlouho je známo, že nádory jsou schopny odlučovat své povrchové antigeny anebo snižují expresi klíčových molekul nutných pro interakce s imunitními buňkami. Tímto způsobem mohou uniknout nádory před imunitním systémem hostitele tak, že se stanou 1. slabým stimulem pro T buňky či 2. nedůležitým cílem pro nádorově specifické CTL. Na nádorových buňkách je často snížena či alterována exprese takových klíčových molekul jako jsou nádorové antigeny (TAA), HLA I. třídy. Další aberace často vídaná u tumorosních buněk je down-regulace exprese kostimulačních molekul na buněčném povrchu. Jedním z důvodů proč nádor nemůže fungovat jako účinná buňka prezentující antigen je skutečnost, že není schopen dodat kostimulační signál („druhý signál“), který je nutný pro produktivní interakce s T lymfocyty. Down-regulace kostimulačních molekul na nádorových buňkách včetně členů molekulární rodiny B7¹⁸¹ vede k neodpovídavosti založené na MHC-I restringované prezentaci antigenu bez převodu kritického kostimulačního signálu leukocytům.

U solidních nádorů je známo, že přímo interferují s imunitním systémem hostitele. Buď produkují a uvolňují faktory, které modulují funkce imunitních buněk, nebo indukují apoptosu těchto buněk. Seznam imunopresivních faktorů derivovaných z nádoru zahrnuje širokou škálu biologických efektorových molekul: několik různých systémů receptor-ligand, reaktivní malé molekuly, buněčné enzymy, rozpustné buněčné komponenty a cytokiny/chemokiny.

Dendritické buňky asociované s nádorem (TADC, tumor-associated dendritic cells) představují další mechanismus, který může také vysvětlit dysfunkci či případně smrt T buněk *in situ*,¹⁸² což souvisí i s funkční méněcenností alterovaných efektorových buněk, které se akumulují v místě nádoru. TADC nejen zpracovávají a prezentují nádorové antigeny, ale jsou významným zdrojem různých cytokinů (hlavně IL-1, IL-12, IFN-alfa, IL-15, IL-18, IL-23 a IL-27). Mají také bohatě vyjádřené kostimulační molekuly (CD80, CD86, OX40, 4-1BBL), které jsou nutné jako druhý signál, a jsou i zdrojem růstových faktorů důležitých pro diferenciaci, proliferaci T buněk a vývoj imunitní paměti. Proto, pokud TADC nejsou schopny fungovat normálně¹⁸³ nebo také podléhají apoptose *in situ*, tak je také nepravděpodobné, že by TADC-TIL interakce byly optimální pro generování produktivní TAA specifické imunity.

Kromě TADC existuje i podobná „teoretická koncepce“ pro monocyto-makrofágový systém – makrofágy asociované s nádorem (TAM) vykazují také funkční defekty ve srovnání s makrofágy z míst nepostížených nádorem od těch samých nemocných.¹⁸⁴ Role makrofágů u pokročilých nádorů však je mnohem dalekosáhlejší. Zdá se, že makrofágy hrají dvojí roli a to v závislosti na své topografii vůči nádoru. TAM jsou potom jenom jednou z částí ambivalentní a složité role, kterou sehrává monocyto-makrofágový systém jako celek v celém organismu v pozdních fázích nádorového růstu. Makrofágy v místech proximálních k tumoru jsou jím suprimovány a pod vlivem působků z tumoru nakonec i částečně přispívají k lokální neodpovídavosti v místě mikroprostředí nádoru, avšak makrofágy/monocyty v tumor distálním kompartmentu jsou v pozdních fázích nádorového růstu aktivními supresory imunitního systému jako

celku a napomáhají (či lépe řečeno jsou integrální součástí) procesu progresu tumoru na úrovni celého organismu. Mononukleární fagocyty jsou versatilní buňky, které mohou vyjadřovat v odpovědi na signály ze svého mikroprostředí rozdílné funkční programy. Plně polarizované M1 a M2 makrofágy jsou extrémními póly na kontinuální škále funkčních stavů. Makrofágy, které infiltrují tkáň nádoru, jsou řízeny cytokiny derivovanými z nádoru a okolních T buněk¹⁸⁵ (které jsou v okolí nádoru polarizovány především k Th2 fenotypu a produkují vysoké množství IL-4, IL-10 a IL-13) k polarizaci do M2 fenotypu.¹⁸⁶ Tyto funkčně polarizované buňky (a podobně orientované nebo nezralé DC, jak již zmíněno výše) přítomné v okolí nádoru mají pak klíčovou roli v podmanění si adaptivní imunity i v zánětlivých procesech, které napomáhají růstu tumoru *in situ* a následně i jeho progresi v celém organismu.

Jako další faktor přispívající k nádorovému úniku bývá v poslední době zdůrazňována přítomnost regulačních imunitních buněk, které se hromadí v místě nádoru, ale jsou detekovatelné i v periferní cirkulaci nemocných s nádory. Lymfoidní (CD4+CD25+) a/nebo myeloidní (CD34+ nezralé, antigen prezentující) supresorové buňky tlumí funkce imunitních efektorových buněk, především cestou sekrece cytokinů (IL-10, TGF-beta)¹⁸⁷, jakožto součást normálního procesu kontroly autoimunity. Protože nádory exprimují „organismu vlastní“ antigeny, mohou být supresorové buňky rekrutovány do míst nádoru k utlumení imunitní odpovědi na „vlastní“. U zvířecích modelů se ukázalo, že tyto buňky jsou zodpovědné za ochranu před autoimunitními chorobami¹⁸⁸ a že inhibují generování nádorově-specifických T-buněčných odpovědí. Deplece CD4+CD25+ T buněk se ukázala jako promotor rejekce tumoru u myši.¹⁸⁹ Regulační buňky jsou nejlépe definovány pomocí svojí supresivní funkce a protože chybí

spolehlivý fenotypický marker pro jejich identifikaci jsou obtížně studovatelné u lidí.

Za pomoci definice: subpopulace T buněk Foxp3+, CTLA-4+, GITR+, se zdá tato populace být bohatěji zastoupena mezi tumor infiltrujícími lymfocyty (TIL) u lidských nádorů a jsou častěji zastoupeny v periferním oběhu nemocných s nádory než u normálních jedinců.¹⁹⁰

2.2.5. Vliv protinádorové léčby na imunitní systém

Dalším důležitým momentem přispívajícím k celkové komplexitě imunitních procesů u nádorového onemocnění jsou pak vlivy často značně intenzivní multimodální protinádorové terapie na celkový stav imunity.^{191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202}

Vliv protinádorové léčby zasahuje do rovnováhy mezi nádorem a imunitním systémem „hostitelského“ organismu a často má účinky imunosupresivní. U časných stádií nádorů tyto suprimující účinky protinádorové léčby na celkově normálně fungující imunitu převládají a jsou často ve svém výsledku „nevýhodné“ pro „hostitelský“ organismus.

Vliv protinádorové léčby na redukcii masy tumoru v organismu a tím i na snížení antigenní zátěže má ale příznivý vliv na imunitní procesy obecně, tj. u časného i pokročilého nádorového onemocnění. Avšak u pokročilých nádorových onemocnění lze objektivně prokázat i účinky protinádorové léčby posilující protinádorovou imunitu nejen vlivem na redukcii celkové nádorové masy, ale i svým suprimujícím vlivem na buňky zprostředkovávající chronickou systémovou imunitní aktivaci, která navozuje u pokročilého nádorového onemocnění stav imunitní dysfunkce. Obecně tedy říci, jestli některá z onkologických léčebných modalit má příznivý či nepříznivý vliv na protinádorovou imunitu, proto často není možné.

Vlivy protinádorové léčby u nádorových onemocnění lze „didakticky“ rozdělit dle mechanismu účinku a cíle jejich primárního působení. Antiproliferativní a cytotoxické účinky léčby, tedy její přímý protinádorový efekt, je spojen, jak již uvedeno výše, se snížením antigenní zátěže při redukcii nádorové masy, avšak jsou s ní často spojeny nežádoucí účinky, které navozují stav imunosuprese i u jinak normálně fungujícího imunitního systému. U chemoterapie i radioterapie jsou tyto efekty navozovány

v oblasti maximálně tolerovatelných dávek (MTD, maximum tolerated doses).

Protinádorová léčba však může mít i účinky primárně cílené na hostitelské biologické systémy. V případě chemoterapie a radioterapie se jedná o efekty navozované při nižším dávkování než u přímé protinádorové léčby, efektivní dávkování se pak pohybuje v malých či středních dávkách (OBRMD = optimal biological response modifier doses). Toho lze s výhodou využít u pokročilých nádorových onemocnění, v paliativních indikacích, a konkrétně se jedná o účinky imunomodulační (cyklofosfamid a jiné alkylační látky, 6-mercaptopurin, methotrexát, 5-fluorouracil, nitrosurea, cytosin-arabinosid, vinblastin a vincristin, bleomycin, mitomycin-C, cis-platina, tamoxifen) či o potlačení neoangiogeneze (doxorubicin, cyklofosfamid). S primárním cílem potlačení nádorem navozené angiogeneze je pak úspěšně aplikována v současné klinické praxi mnohdy i „klasická“ biologická léčba (interferon-alfa u Grawitzova tumoru a maligního melanomu, bevacizumab u kolorektálního karcinomu) a tyto a některé další biologické preparáty s primárním účinkem na angiogenezi jsou ve fázi klinických studií u dalších onkologických diagnos.

Komplexnější konkrétní vlivy na imunitní systém jsou pak relativně nejlépe prostudovány u cytostatik doxorubicinu a paclitaxelu. Doxorubicin posiluje funkce makrofágů (\uparrow TNF- α , \uparrow IL-1), stimuluje odpověď cytotoxických T lymfocytů, zvyšuje expresi IL-2 pomahačskými T buňkami a inhibuje T regulační buňky. Paclitaxel pak posiluje funkce makrofágů v místě nádoru (\uparrow syntézu TNF- α , IL-1 a NO) a dosahuje parciální korekce tumorem indukované supresorové funkce makrofágů v tumor-dílním kompartmentu (snížení produkce NO, obnovení produkce IL-12).

2.2.6. Souhrnný pohled na imunitu u solidních nádorů dle jejich fáze pokročilosti

Role imunitního systému při vzniku a u časných stadií nádorů

Ústřední role buněčné specifické imunity v protinádorové odpovědi:

- účinná prezentace antigenu a jeho zpracování
- význam pomahačských T lymfocytů (rozvoj CTL efektorové odpovědi, potenciace protinádorového efektu makrofágů a eosinofilů)
- efektorové funkce CTL a NK buněk, pomocná role protilátek a komplementu

Mechanismy nádorového úniku (Tumor escape):

- změny imunokompetentních buněk na molekulární úrovni (poruchy MHC antigenů, změny TCR/CD3 komplexu, nedostatek kostimulačních molekul)
- imunoselekce nádorových buněk se slabou imunogenicitou
- vznik tolerance specifické k nádorovým antigenům (nepřiměřená prezentace antigenu imunitnímu systému, výskyt těchto antigenů v časně ontogenezi, klonální exhausce nebo anergie CD4 buněk) - typické pro CD4 lymfocyty
- suprese imunitní odpovědi cytokiny, růstovými faktory, chemotaktickými molekulami a proteázami sekretovanými tumorem či pod vlivem tumoru (např. TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, MDF, TGF- β 1, PGE(2) a M-CSF)
- indukce supresorových T CD4 buněk
- lokální neodpovídavost, tumor vytváří imunoprivilegované místo a nádorové buňky jsou chráněny proti lokální aktivaci T buněk - typické pro CD8 lymfocyty

Imunitní systém jako celek je plně funkční a převládá antigen specifická imunitní dysfunkce, která je však pouze v místě nádoru.

Role imunitního systému u pozdních stadií nádorů

Pokročilým nádorem je v podstatě v organismu vytvořena generalizovaná sekundární imunodeficiencie. Je nutno rozlišovat procesy probíhající v tumor-proximálním (s mechanismy a procesy vycházejícími z principů imunity u časných nádorů) a tumor-distálním kompartmentu *in vivo* a jejich vzájemné interakce. Dále je nutný uvažovat i

vliv mikroprostředí, které je čím dál více pod vlivem nádoru (lokální suprese imunity nádorem, nádorové stroma včetně angiogenese).

Ústřední role monocytů/makrofágů:

- deaktivace nebo suprese cytotoxicity aktivovaných makrofágů faktory produkovanými nádorem a T lymfocyty v tumor-proximálním kompartmentu, indukce alternativního programu aktivace makrofágů a jejich polarizace k M2 fenotypu (TAMs = tumor-associated macrophages) - snížení produkce IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , INF typu I
- indukce supresorové funkce makrofágů faktory sekretovanými tumorem v tumor-distálním kompartmentu (inhibiční cytokiny včetně TGF- β 1 a IL-10), tyto tzv. „tumor-induced macrophages“ zprostředkovávají imunosupresi nadprodukcí faktorů suprimujících odpověď T buněk (NO, TNF- α) a nedostatečnou produkcí pozitivních regulačních cytokinů
- TAMs způsobují remodelaci tkání, fibrosu a angiogenesi – tvorba stromatu nádoru
- nádorové buňky často sekretují PGE(2) a zároveň stimulují expresi COX-2 a syntézu PGE(2) v makrofázích (vlivem IL-1, TNF- α , INF- γ), což ovlivňuje produkci cytokinů makrofágem (přes stimulaci NF-IL6, útlum NF-kappaB) – porucha rovnováhy IL-12/IL-10, polarizace k imunitní odpovědi typu II (polarized Th2 response)
- nádorové buňky způsobují (vlivem IL-10, TGF- β , PGE(2)) supresi produkce NO (snížení iNOS) a TNF- α v TAMs (NO v makrofázích fyziologicky inhibuje produkci PGE(2) přes COX-2) - převládá cesta arginasy (ornithin, polyaminy), a naopak nadprodukcí NO a TNF- α v makrofázích tumor-distálního kompartmentu

Nespecifická a systémová imunitní dysfunkce navozená chronickou systémovou aktivací imunitních mechanismů:

- systémově je snížena exprese TCR/CD3 zeta řetězce-CD16 zeta řetězce , TCR eta řetězce, IL-2R α řetězce, p56^{lck} p59^{fyn} a různé další funkční defekty CTL a NK buněk
- systémově jsou navozeny defekty v proteinech signál-transdukční kaskády (JAKs, STATs) – např. redukce fosforylace JAK3/ STAT5 u IL-2R u T lymfocytů
- tyto molekulární poruchy jsou vyvolány působením NO a reaktivních produktů kyslíku (H₂O₂) uvolňovaných aktivovanými makrofágy
- zvýšená apoptosa T lymfocytů a NK buněk se sníženou funkční kapacitou (mechanismy: FasL na povrchu nádorových buněk, H₂O₂ uvolňovaný z makrofágů)

Předchozí studie ukázaly signifikantní změny v počtu a funkci podskupin mononukleárních buněk periferní krve u nemocných s nádorovým onemocněním, včetně kolorektálního karcinomu.^{203, 204, 205, 206, 207} Méně je však známo o prognostickém významu těchto změn.^{208, 209, 210, 211, 212, 213, 214} Cílem této disertační práce je prokázat využitelnost stanovení imunofenotypu těchto buněk metodou průtokové cytometrie pro určení prognosy nemocných s kolorektálním karcinomem generalizovaným do jater.

3. Soubor nemocných a metody

3.1. Výběr pacientů

Toto šetření je retrospektivní analýza celkového přežívání 59 pacientů s histologicky verifikovaným kolorektálním karcinomem metastázujícím do jater. Nemocní byli zařazováni do studie bez ohledu na léčbu (tj. bez ohledu na již absolvovanou i aktuálně probíhající léčbu). Jednalo se o nemocné léčené (především systémovou a regionální chemoterapií, ale i o nemocné po jaterní resekci či zařazených do klinické studie s regionální adoptivní imunoterapií^{215, 216, 217}) na klinicko onkologické ambulanci v období od 25.8.1998 do 1.9.2002 v univerzitní nemocnici (Klinika onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Karlova univerzita v Praze). U těchto nemocných byly provedeny buď před léčbou či v průběhu léčby (vždy před započítáním aplikace cyklu chemoterapie) odběry vzorků heparinizované periferní krve k vyšetření imunofenotypu mononukleárních buněk periferní krve a následně zpětně určeny časy celkového přežití či celkové doby sledování.

3.2. Laboratorní metodika

Relativní počet buněk CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺), CD3⁺DR⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD69⁺, CD8⁺CD28⁺, CD8⁻CD28⁺, CD8⁺CD57⁺, CD19⁺, CD19⁺CD23⁺, CD14⁺DR⁺ a CD14⁺CD16⁺ byl určen pomocí dvoubarevné průtokové cytometrie metodikou již dříve zavedenou na pracovišti Ústavu klinické imunologie a alergologie FNHK a v době šetření již rutinně prováděnou. Následně jsme výpočtem získali absolutní počty všech vyšetřovaných populací. Zkrácený popis metodiky přípravy vzorku k měření: 25 µl heparinizované periferní krve bylo smíšeno s 10 µl roztoku odpovídající monoklonální protilátky a inkubováno 20 minut při pokojové teplotě. Pro analýzu fenotypu leukocytů periferní krve jsme použili následující monoklonální protilátky či kombinace monoklonálních protilátek k definování odpovídajících populací leukocytů: fluorescein isothiocyanate conjugated (FITC) anti-CD3 (CD3⁺ lymfocyty), FITC anti-CD3/ phycoerythrin conjugated (PE) anti-CD4 (CD3⁺CD4⁺ lymfocyty), FITC anti-CD3/ PE anti-CD8 (CD3⁺CD8⁺ lymfocyty), FITC anti-CD3/ PE anti-CD16 + PE anti-CD56 (NK buňky), FITC anti-CD3/ PE anti-HLA-DR (CD3⁺HLA-DR⁺ lymfocyty), FITC anti-CD3/ PE anti-CD25 (CD3⁺CD25⁺ lymfocyty), FITC anti-CD3/ PE anti-CD69 (CD3⁺CD69⁺ lymfocyty), FITC anti-CD8/ PE anti-CD28 (CD8⁺CD28⁺ a CD8⁻CD28⁺ lymfocyty), FITC anti-CD8/ PE anti-CD57 (CD8⁺CD57⁺ lymfocyty), FITC anti-CD19 (B lymfocyty), FITC anti-CD19/ PE anti-23 (CD19⁺CD23⁺ B lymfocyty), FITC anti-CD14/ PE anti-HLA-DR (CD14⁺HLA-DR⁺ monocyty) a FITC anti-CD14/ PE anti-CD16 (CD14⁺CD16⁺ monocyty). FITC anti-CD3, PE anti-CD4, PE anti-CD8, PE anti-CD16, PE anti-CD56, PE anti-HLA-DR, FITC anti-CD19, and FITC anti-CD14 byly získány od Immunotech (Marseille, France). FITC anti-CD8 and PE anti-CD28 byly získány od Becton Dickinson (San

Jose, CA, USA). Po inkubaci bylo přidáno 135 μ l lyzačního roztoku (OptiLyse C, Immunotech) a směs byla inkubována dalších 10 minut. Suspense byla pak propláchnuta v 1.5 ml solného roztoku a centrifugována 10 minut při 125 G. Následně byl odstraněn supernatant a sediment byl resuspendován v 250 μ l solného roztoku. Analýza průtokovou cytometrií byla provedena za použití EPICS XL flow cytometru (Coulter, Miami, FLA, USA) a analýza byla založena na 5×10^3 gated events. K určení a verifikaci „light scatter gate“ pro lymfocyty bylo užita FITC anti-CD45/ PE anti-CD14 (LeucoGATE, Becton Dickinson). Takto zjištěná čistota lymfocytů byla udržována konzistentně nad 90 %. Gating monocytů byl založen na barvení CD14. Zároveň bylo provedeno stanovení krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem leukocytů a byly spočítány absolutní počty odpovídajících leukocytárních populací. Výsledky byly vyjádřeny v absolutních počtech buněk na μ l.

3.3. Statistické zpracování

K vyšetření vztahů mezi celkovým přežíváním a parametry fenotypu leukocytů byly využity 3 různé statistické metody (univariantní a multivariantní analýza přežívání spolu s lineární regresní analýzou, metoda konstrukce ROC křivek a metoda indukčních grafů).

V první fázi byly zjišťovány pro všechny stanovené parametry fenotypu rozdíly v přežívání pacientů - vždy ve dvou skupinách získaných rozdělením nemocných podle mediánu absolutního počtu buněk příslušné leukocytární subpopulace. Univariantní analýza přežívání byla provedena Kaplan-Meierovou metodou (Kaplan-Meier product limit method) a příslušné křivky přežívání pak byly porovnány pomocí log-rank testu a zobecněného Wilcoxonova testu.

V druhé fázi statistického vyhodnocení byly vyšetřovány možnosti predikce celkového přežívání pomocí konstrukce regresních modelů. Vzhledem k tomu, že distribuce přežívání k 1.9.2002 statisticky signifikantně odpovídá Weibullově rozdělení, byly užity lineární regresní modely určené pro predikci v censorovaných datech přežívání při známé distribuci dat – modul Life data regression v softwaru Statgraphics a modul Distribution regression v softwaru NCSS. Následně byly provedeny i výpočty regresních modelů podle metody Cox proportional hazards regression – modul Cox regression v NCSS, avšak vzhledem k malému podílu censorovaných měření a po předběžných výpočtech i vzhledem k malé síle regrese (pseudo R^2) se tato metoda jeví na tomto souboru jako o něco méně vhodná.²¹⁸ Na druhé straně je Coxova regresní analýza výhodná v tom, že její výsledky by zůstaly v platnosti i kdyby v dalším

sledování nakonec neodpovídala distribuce celkového přežívání Weibullově rozdělení. Coxova analýza také dává uspokojivě robustní výsledky v případě opakovaných longitudinálních měření 1 parametru u stejných nemocných při analýze přežívání (i když toto lze 100% spolehlivě říci jen u prospektivního vyšetřování, ve statistické literatuře neexistuje podobný údaj pro studie s retrospektivním designem), čehož lze s výhodou využít k získání informací o validitě výsledků multivariantní analýzy jejich ověřením na souboru nemocných s daty fenotypu získanými v časovém odstupu od prvních měření na inferenčním souboru (v podstatě ověření prediktivní přesnosti regresního modelu v závislosti na průběhu času).²¹⁹ Uvedenými regresními metodami byly vyšetřovány vztahy mezi jednotlivými parametry fenotypu leukocytů jako nezávislou kontinuální proměnnou a celkovým přežíváním jako závislou proměnnou. K rozšíření možností byly vedle všech původních parametrů fenotypu leukocytů vytvořeny ještě další nezávislé proměnné ve formě indexů zkonstruovaných jako vzájemné podíly jednotlivých leukocytárních populací.

Vzhledem k omezenému počtu nemocných ve studii jsme stáli před problémem, jak zajistit co největší validitu získaných výsledků. Postupovali jsme dvěma způsoby k zajištění „parciální“ validity:

1. Využili jsme skutečnosti, že u některých pacientů byla měření parametrů fenotypu leukocytů v průběhu léčby či sledování opakována. Vytvořili jsme kontrolní soubor 43 nemocných. Jestliže bylo uskutečněných měření více, zařadili jsem poslední provedené. Takto zkonstruovaný soubor tedy obsahoval měření provedená s časovým odstupem u nemocných zastoupených již v původním souboru použitým k inferenci. Tento postup tedy zcela jistě

nezajišťuje plnou validitu, nicméně s jeho pomocí jsme výrazně zredukovali počet regresních modelů získaných inferencí.

2. Provedli jsme náhodné rozdělení původního souboru na dva menší (30 a 29 nemocných). První získaný soubor jsme použili jako inferenční a na druhém jsme ověřili validitu získaných výsledků. Tento postup k zajištění validity je tedy limitován pouze menším rozsahem souborů.

Následně byla i zpětně rozšířena univariální analýza přežívání u skupin vytvořených podle parametrů fenotypu (viz. první fáze statistického zpracování) zahrnutím indexů, které jako nezávisle proměnné při Weibullově regresi na původním souboru nemocných přispívaly k vytvoření signifikantních regresních modelů. Opět jsme k ověření validity takto získaných výsledků použili výše popsany kontrolní soubor o 43 nemocných s měřeními fenotypu provedenými v časovém odstupu. Srovnání přežívání na tomto kontrolním souboru bylo provedeno u skupin vytvořených jednak podle mediánů leukocytárních populací původního inferenčního souboru, jednak podle mediánů parametrů fenotypu leukocytů tohoto kontrolního souboru.

V třetí fázi statického zpracování byly k ohodnocení diagnostické přesnosti takto zkonstruovaného testu použity metody ROC (receiver-operating characteristic) křivek.²²⁰ Tato metoda zde byla užita jako další možnost ověření validity dosažených výsledků tím, že bylo provedeno spočítání signifikance plochy pod křivkou (AUC, jednostranné testování, zda-li je AUC větší než 0.5) pro parametry určené v předchozí fázi statistického zpracování. Hodnocení signifikance AUC mělo největší spolehlivost na původním inferenčním vzorku rozděleném dle mediánu přežití na 2 skupiny (30 a 29

nemocných), což se již blíží optimálnímu počtu 30 negativních + 30 pozitivních měření pro absolutní spolehlivost užívaného Z-testu. Na kontrolním souboru či při rozdělení inferenčního souboru ne podle jeho mediánu je tedy spolehlivost již o něco menší než teoreticky dosažitelná, ale vzhledem ke kongruenci vysoké signifikance dosažených výsledků pro hlavní hodnocený parametr imunofenotypu, který vycházel signifikantně i při analýze přežívání, nezdá se v tomto konkrétním případě nižší počet nemocných nepřekonatelným praktickým problémem, který by měl zcela znehodnotit validitu těchto výpočtů. Dostatečný počet různých hodnot testovaného parametru (5-7 různých hodnot) byl pak ve všech případech spolehlivě splněn. Vzhledem k nenormálnímu rozdělení vyšetřovaných souborů byly použity jen neparametrické testy. Tyto výpočty byly provedeny v programu NCSS 2001.

Ve čtvrté fázi statistického zpracování byly zkoušeny možnosti vytváření skupin s rozdílným celkovým přežíváním konstruovaných za pomoci parametrů fenotypu leukocytů. Principem postupu v této fázi je použití metody indukčních grafů²²¹ k vytvoření klasifikačních pravidel z parametrů fenotypu pro určení přiřazení toho kterého nemocného do jedné z předem dvou daných skupin vytvořených rozdělením souboru dle nějaké arbitrárně předem zvolené hodnoty celkového přežití. Jedná se v podstatě o cílenou diskretizaci kontinuálních atributů pro potřeby klasifikace do předem daných skupin. Využili jsme software Rule Extractor (R. Rakotomalala, Laboratoire E.R.I.C., Université Lyon 2, France) provádějící takovouto indukci pravidel z poskytnutého vzorku pomocí vylepšeného CN2 algoritmu.^{222, 223, 224} Jedná se o techniku k indukci rozhodovacích pravidel ve formátu „IF, THEN“, přičemž tato metoda má uspokojivou efektivitu učení a současně i vykazuje žádoucí toleranci šumu,

imunitu k chybějícím datům a robustnost vzhledem k malému tréninkovému vzorku. Jako evaluační funkci jsme použili „Intensity of Implication“. Indukce byla provedena nejprve na původním inferenčním souboru o 59 nemocných a následně na již popsaném kontrolním souboru o 43 nemocných, na obou souborech vždy pro 2 skupiny celkového přežívání (menší versus větší) - jako hodnotu k rozdělení na tyto 2 skupiny jsme použili hodnotu 583 dní (medián přežívání původního inferenčního souboru) a 420 dní. Výsledkem jednotlivých indukcí je vždy množina několika pravidel rozhodujících na základě intervalu či kombinace intervalů hodnot některých parametrů fenotypu leukocytů o přiřazení do skupiny většího či menšího celkového přežívání. Podle těchto pravidel jsme poté pro každý model provedli rozdělení daného souboru na 2 skupiny a pro tyto skupiny (obdobně jako v 1. fázi statistického zpracování) univariální analýzu přežívání, a to vždy na obou souborech, čímž jsme opět částečně ověřili validitu takto získaných pravidel. Co se týče ohodnocení diagnostické přesnosti takto konstruovaných testů nebylo provedeno nějaké hlubší šetření, vzhledem k menším počtům nemocným se totiž stejně jedná pouze o hypotézy generující výsledky (neprováděli jsme tedy ani ověřování Coxovou analýzou u úplně všech modelů, což by byl vhodný postup v nejbližším dalším kroku k ověření validity těchto výsledků). Nicméně není špatné na tomto místě zmínit obecně platný fakt, že testy zkonstruované z několika „nebo“ pravidel mají vždy vyšší sensitivitu ale nižší specificitu ve srovnání s nekombinačními testy s jedním parametrem, přičemž se jedná v realitě o situaci, kdy každá testovací komponenta užitá v kombinaci a srovnávaný nekombinační test s jedním parametrem mají obdobné diskriminační vlastnosti (viz. např. dlouhotrvající diskuse o „optimalizaci“ Lightových kritérií pro rozlišení transudátu od exsudátu u pleurálního výpotku).²²⁵

Všechny provedené statistické testy byly považovány za signifikantní na 95% hladině spolehlivosti a i výsledky s trendy (tj. p hodnota mezi 0,05 a 0,10) jsou považovány za zcela nesignifikantní.

Výpočty byly provedeny za použití softwaru MS Excel 2000 (Czech version, Microsoft Corp., USA), NCSS 2001 (Hintze, J. (2001). NCSS and PASS. Number Cruncher Statistical systems, Kaysville, Utah, USA, www.ncss.com), Statgraphics Plus 5.0 (Evaluation version, Statistical Graphics Corp., USA) a Rule Extractor (R.Rakotomalala, Laboratoire E.R.I.C., Université Lyon 2, France).

4. Výsledky

4.1. Základní charakteristiky souborů nemocných

a) původní „velký“ inferenční soubor:

Základní soubor 59 nemocných, z nichž 9 cenzorováno

(proporce cenzorovaných = 15,25%).

Tab. č. 3a: Souhrn pro „velký“ inferenční soubor

Typ pozorování	Počet	Celkové přežívání (dny)		
		Minimum	Maximum	Aritmetický průměr
Zemřel	50	14	1241	467
Cenzorován	9	933	1467	1244
Celkem	59	14	1467	586

Tab. č. 3b: Tabulka percentilů pro „velký“ inferenční soubor

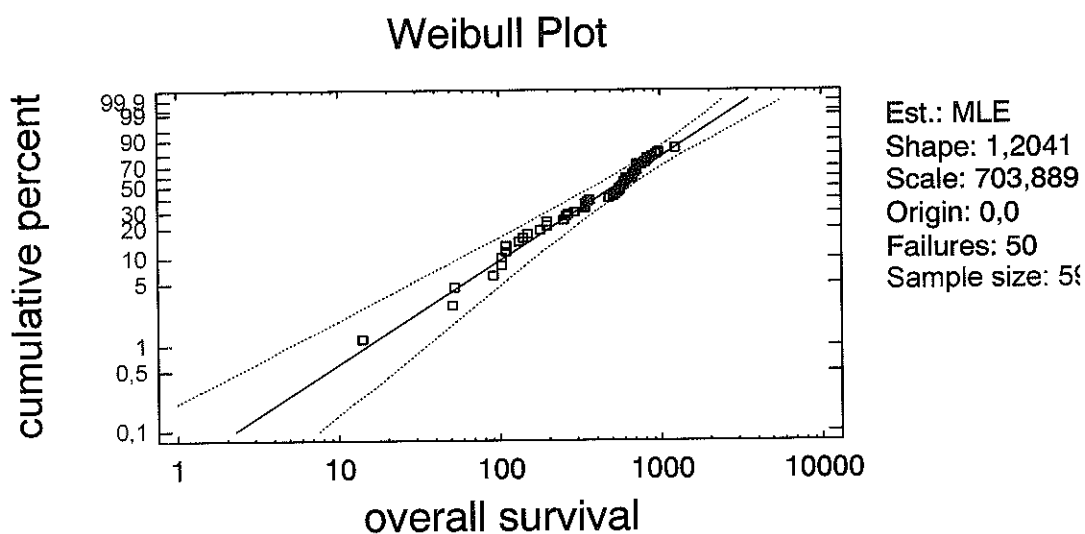
Percentil	Odhad (dny)	Směrodatná odchylka (dny)
75%	251	66
50%	583	52
25%	824	93

Weibullova analýza – celkové přežití - pro původní inferenční soubor

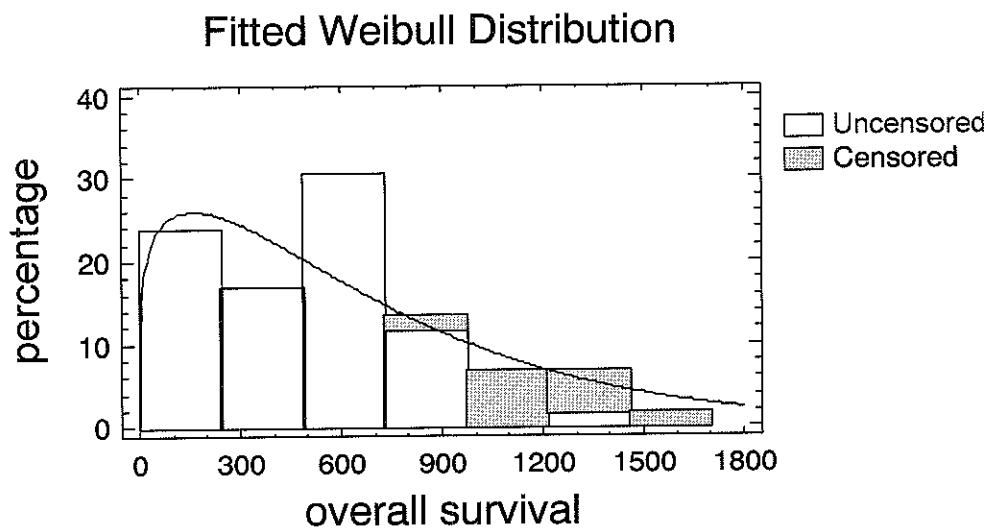
Testy jakosti shody rozdělení

- Chi-kvadrát test: Chi-Square = 4,88983 s 3 s.v., p hodnota = 0,180041
- Kolmogorov-Smirnov: odhadovaná celková statistika DN = 0,0817319, přibližná hodnota p = 0,825484

Graf č. 1a: Signifikance Weibullova rozdělení pro inferenční soubor



Graf č. 1b: Weibullovo rozdělení pro inferenční soubor



b) kontrolní soubor pro validaci

Soubor 43 měření provedených s časovým odstupem u části nemocných z původního souboru. Z nich 5 cenzorováno (proporce cenzorovaných = 11,63%).

Tab. č. 4a: Souhrn pro „velký“ kontrolní soubor

Typ pozorování	Počet	Celkové přežívání (dny)		
		Minimum	Maximum	Aritmetický průměr
Zemřel	38	6	917	260
Cenzorován	5	929	1265	1074
Celkem	43	6	1265	355

Tab. č. 4b: Tabulka percentilů pro „velký“ kontrolní soubor

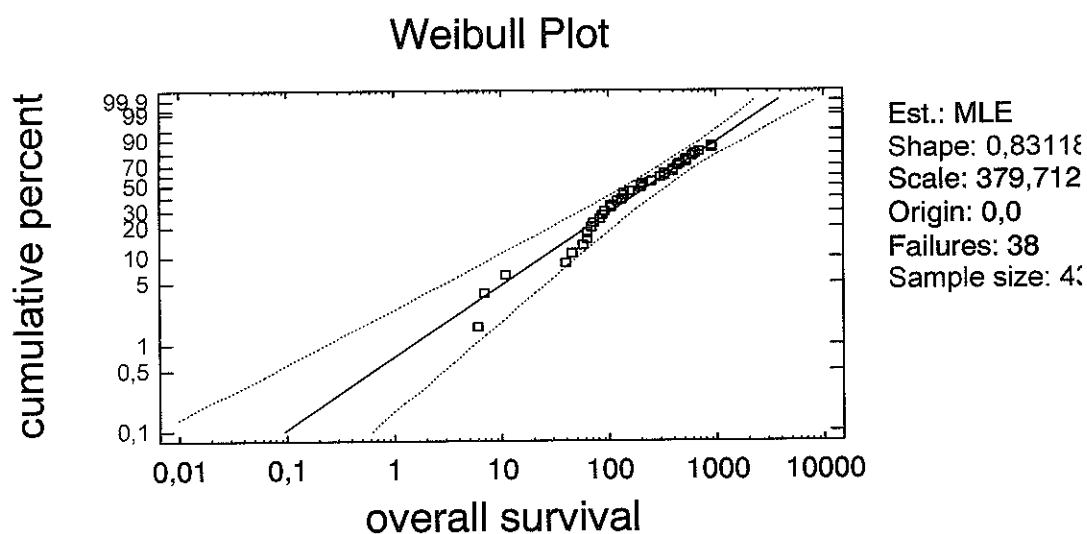
Percentil	Odhad (dny)	Směrodatná odchylka (dny)
75%	85	16
50%	204	73
25%	524	116

Weibullova analýza – celkové přežití - pro kontrolní soubor

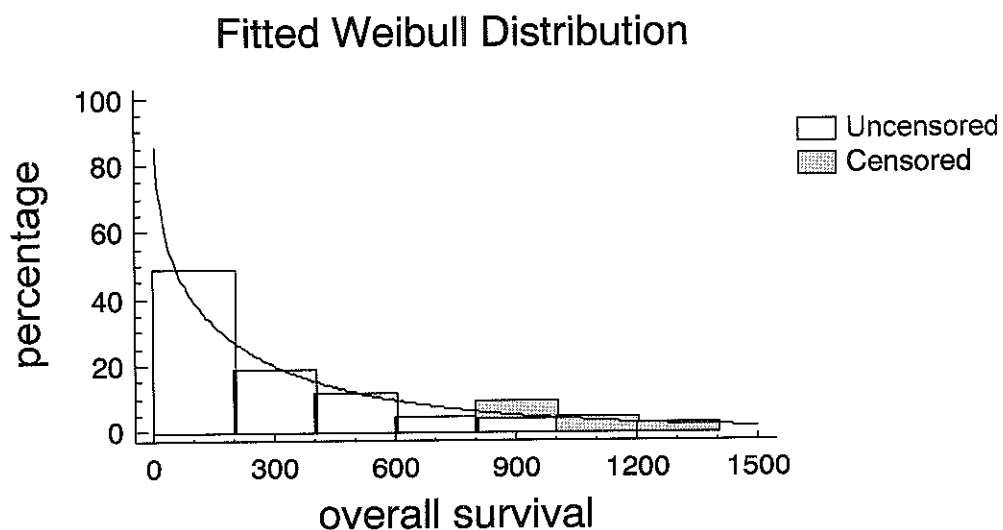
Testy jakosti shody rozdělení

- Chi-kvadrát test: Chi-Square = 2,74419 s 4 s.v., p hodnota = 0,601505
- Kolmogorov-Smirnov: odhadovaná celková statistika DN = 0,0865852, přibližná hodnota p = 0,903864

Graf č. 2a: Signifikance Weibullova rozdělení pro kontrolní soubor



Graf č. 2b: Weibullovo rozdělení pro kontrolní soubor



c) „malý“ inferenční soubor

Soubor 30 nemocných náhodně vybraných z původního inferenčního souboru, z nichž 4 cenzorováni (proporce cenzorovaných = 13,33%).

Tab. č. 5a: Souhrn pro „malý“ inferenční soubor

Typ pozorování	Počet	Celkové přežívání (dny)		
		Minimum	Maximum	Aritmetický průměr
Zemřel	26	103	940	473
Cenzorován	4	933	1434	1243
Celkem	30	103	1434	576

Tab. č. 5b: Tabulka percentilů pro „malý“ inferenční soubor

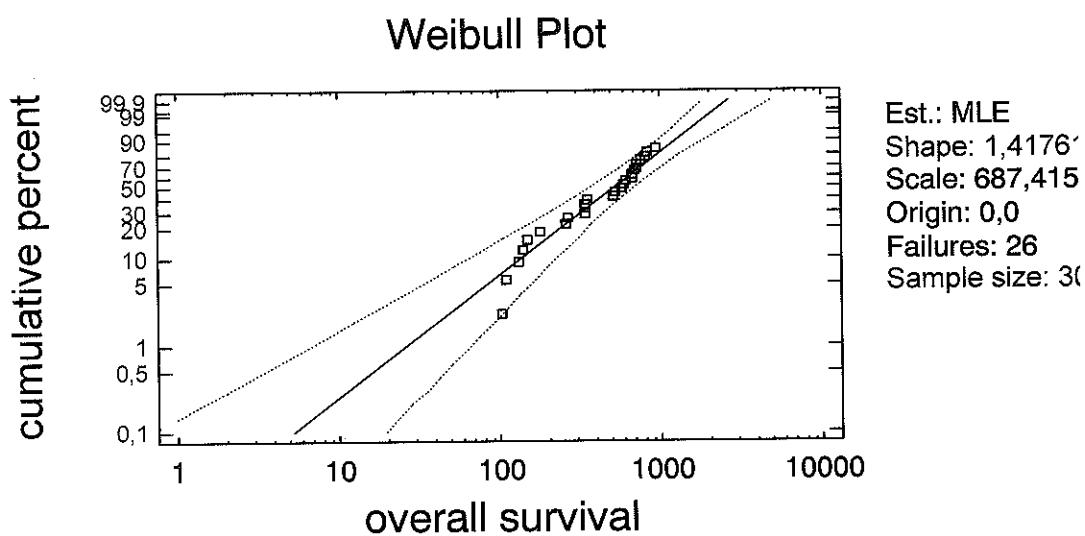
Percentil	Odhad (dny)	Směrodatná odchylka (dny)
75%	268	100
50%	589	75
25%	748	67

Weibullova analýza – celkové přežití - pro „malý“ inferenční soubor

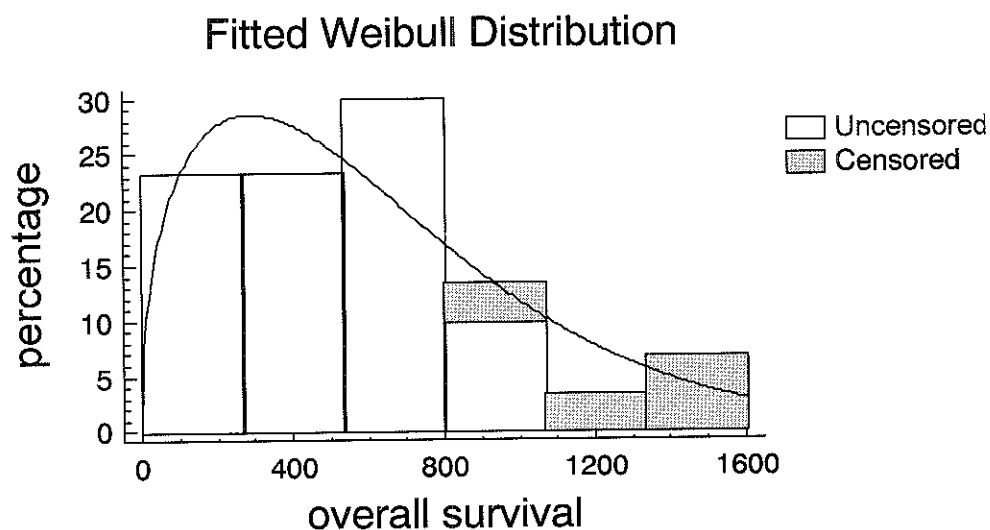
Testy jakosti shody rozdělení

- Chi-kvadrát test: Chi-Square = 4,4 s 2 s.v., p hodnota = 0,110803
- Kolmogorov-Smirnov: odhadovaná celková statistika DN = 0,107797, přibližná hodnota p = 0,876699

Graf č. 3a: Signifikance Weibullova rozdělení pro „malý“ inferenční soubor



Graf č. 3b: Weibullovo rozdělení pro „malý“ inferenční soubor



d) „malý“ kontrolní soubor

Soubor zbývajících 29 nemocných náhodně vybraných z původního inferenčního souboru, z nichž 5 cenzorováno (proporce cenzorovaných = 17,24%).

Tab. č. 6a: Souhrn pro „malý“ kontrolní soubor

Typ pozorování	Počet	Celkové přežívání (dny)		
		Minimum	Maximum	Aritmetický průměr
Zemřel	24	14	1241	461
Cenzorován	5	1075	1467	1245
Celkem	29	14	1467	596

Tab. č. 6b: Tabulka percentilů pro „malý“ kontrolní soubor

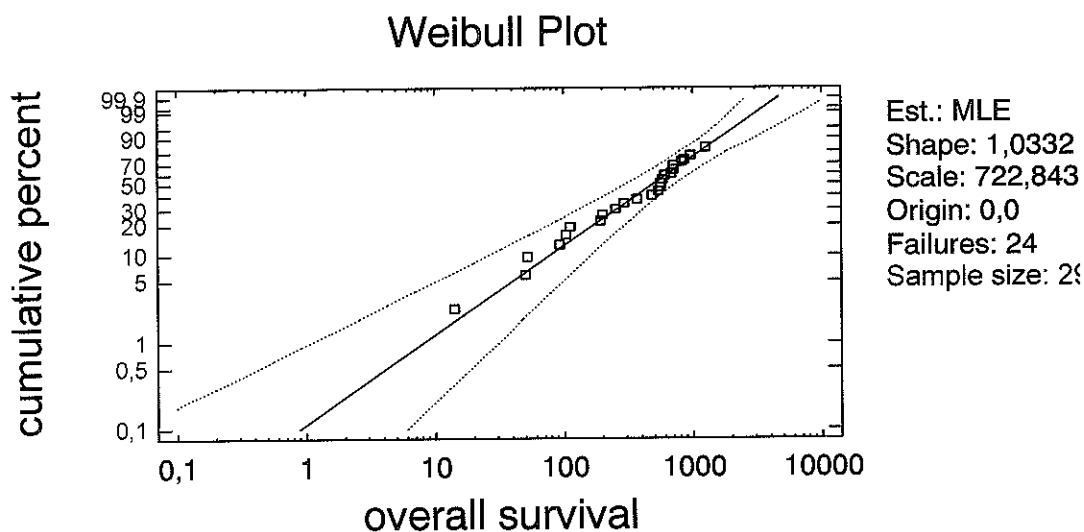
Percentil	Odhad (dny)	Směrodatná odchylka (dny)
75%	198	88
50%	566	46
25%	871	240

Weibullova analýza – celkové přežití - pro „malý“ kontrolní soubor

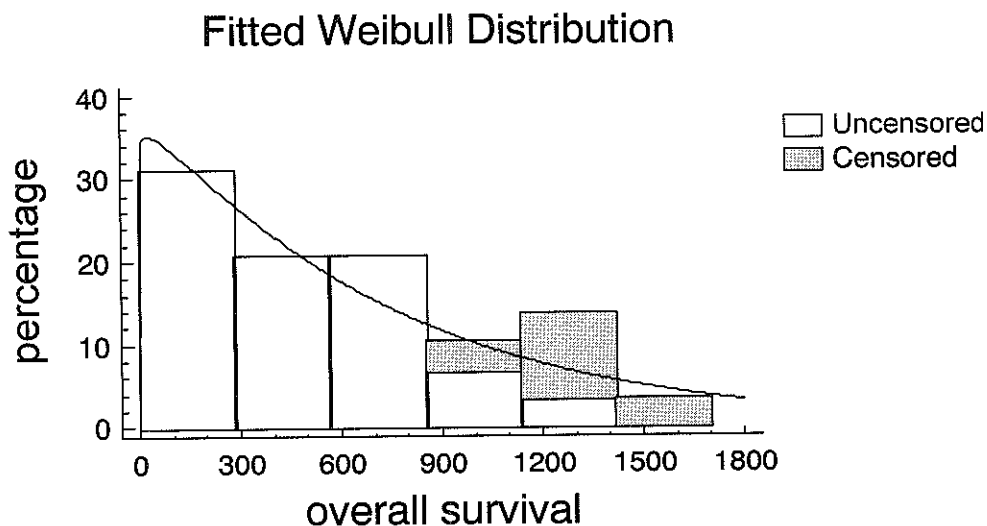
Testy jakosti shody rozdělení

- Chi-kvadrát test: Chi-Square = 4,2069 s 2 s.v., p hodnota = 0,122035
- Kolmogorov-Smirnov: odhadovaná celková statistika DN = 0,106313, přibližná hodnota p = 0,898456

Graf č. 4a: Signifikance Weibullova rozdělení pro „malý“ kontrolní soubor



Graf č. 4b: Weibullovo rozdělení pro „malý“ kontrolní soubor



Tab. č. 7: Sdružený přehled základních charakteristik vyšetřovaných souborů

Inferenční soubor 1	Typ pozorování	Počet	Celkové přežívání (dny)		
			Minimum	Maximum	Průměr
	Zemřel	50	14	1241	467
	Cenzorován	9	933	1467	1244
	Celkem	59	14	1467	586
	Percentil	Odhad (dny)		Směrodatná odchylka (dny)	
	75%	251		66	
	50%	583		52	
25%	824		93		
Kontrolní soubor 1	Typ pozorování	Počet	Celkové přežívání (dny)		
			Minimum	Maximum	Průměr
	Zemřel	38	6	917	260
	Cenzorován	5	929	1265	1074
	Celkem	43	6	1265	355
	Percentil	Odhad (dny)		Směrodatná odchylka (dny)	
	75%	85		16	
	50%	204		73	
25%	524		116		
Inferenční soubor 2	Typ pozorování	Počet	Celkové přežívání (dny)		
			Minimum	Maximum	Průměr
	Zemřel	26	103	940	473
	Cenzorován	4	933	1434	1243
	Celkem	30	103	1434	576
	Percentil	Odhad (dny)		Směrodatná odchylka (dny)	
	75%	268		100	
	50%	589		75	
25%	748		67		
Kontrolní soubor 2	Typ pozorování	Počet	Celkové přežívání (dny)		
			Minimum	Maximum	Průměr
	Zemřel	24	14	1241	461
	Cenzorován	5	1075	1467	1245
Celkem	29	14	1467	596	

	Percentil	Odhad (dny)	Směrodatná odchylka (dny)
	75%	198	88
	50%	566	46
	25%	871	240

Protože na všech 4 souborech pro všechny testy (chi-kvadrát i Kolmogorovův-Smirnovův test) hodnotící „jakost shody rozdělení pravděpodobností“ s Weibullovou distribucí byla p hodnota větší než 0,05, nelze zamítnout hypotézu, že všechny 4 soubory mají Weibullovu distribuci, a to na 95% hladině spolehlivosti.

4.2. Univariantní analýza přežívání

Nejprve byly určeny pro jednotlivé leukocytární populace mediány jejich absolutních počtů.

V dolní polovině následující tabulky jsou pak i uvedeny mediány některých vybraných indexů zkonstruovaných jako podíly absolutních počtů leukocytárních populací (tj. pouze pro ty indexy, které vyšly signifikantně v dalších výpočtech):

Tab. č. 8: Mediány absolutních počtů leukocytárních populací a některých indexů (v buňkách na mikrolitr)

Leukocytární populace	Inferenční soubor 1			Kontrolní soubor 1		
	Medián	95% LCL	95% UCL	Medián	95% LCL	95% UCL
White cell count (total)	6900	6100	8100	6000	5300	7200
Lymphocyty	1500	1300	1700	1300	1120	1430
Monocyty	600	500	700	530	380	610
CD3+CD4+	593	482	673	547	388	663
CD3+	966	806	1130	958	693	1105
CD3+CD8+	354	274	413	327	258	403
NK buňky	220	162	260	176	111	218
CD3+DR+	84	64	102	92	62	136
CD3+CD25+	73	58	84	72	65	93
CD3+CD69+	50	36	67	49	34	104
CD19+	113	89	140	111	92	133
CD19+CD23+	74	57	85	70	56	92
CD8+CD28+	110	93	150	113	79	156
CD8-CD28+	512	363	616	506	337	575
CD8+CD57+	86	60	132	84	57	122
CD14+DR+	378	345	529	385	329	572
CD14+CD16+	285	206	353	207	133	260
CD14+DR+/CD14+CD16+	1.536	1.360	1.975	1.770	1.481	2.039
CD14+CD16+/CD14+DR+	0.650	0.506	0.735	0.564	0.426	0.669
CD14+CD16+/CD8-CD28+	0.536	0.419	0.690	0.495	0.252	0.748
CD3+CD8+/NK	1.588	1.103	2.056	1.941	1.189	2.385
NK/CD14+CD16+	0.974	0.707	1.217	1.008	0.549	1.213
NK/CD3+CD69+	4.477	3.043	6.074	2.725	1.234	5.122
CD3+CD69+/NK	0.223	0.164	0.328	0.366	0.187	0.741

CD3+/NK	4.147	3.481	5.681	5.192	3.750	7.400
NK/ white cell count	0.032	0.024	0.041	0.023	0.019	0.035
CD3+CD69+/CD3+	0.053	0.042	0.069	0.073	0.039	0.092
CD3+CD69+/CD8+	0.167	0.129	0.194	0.201	0.096	0.289
CD3+CD69+/CD4+	0.092	0.070	0.140	0.137	0.069	0.215
CD3+CD69+/CD3+DR+	0.700	0.510	0.898	0.663	0.434	1.271
CD3+DR+/CD3+CD69+	1.428	1.113	1.960	1.507	0.739	2.275
CD3+CD69+/CD3+CD25+	0.620	0.494	0.888	0.818	0.525	1.111
CD3+CD69+/CD8-CD28+	0.101	0.080	0.151	0.143	0.101	0.224
CD8-CD28+/CD3+CD69+	9.850	6.610	12.454	6.952	4.138	8.525
CD8+CD57+/CD3+CD69+	1.408	1.000	1.900	1.133	0.615	1.956
CD14+DR+/CD3+CD69+	7.269	5.682	12.055	6.345	3.701	11.050
CD3+CD69+/CD14+DR+	0.137	0.082	0.175	0.157	0.087	0.234
NK/CD3+CD8+	0.629	0.486	0.905	0.515	0.396	0.780

95% LCL/UCL = upper/lower 95% confidence limit of median (horní/dolní interval spolehlivosti pro medián); white cell count (total) = celkový počet bílých krvinek; NK buňky = CD3-CD16+CD56+ buňky

Následně bylo pro všechny výše uvedené parametry provedeno srovnání přežívání skupin vytvořených rozdělením podle jejich mediánů. Výsledky pro daný parametr jsou uvedeny jen pokud vyšel alespoň v jednom z testů statisticky signifikantní rozdíl celkového přežívání mezi těmito skupinami na 95% či vyšší hladině spolehlivosti, viz. tabulka č. 9.

Tab. č. 9: Univariátní analýza přežívání pro skupiny zkonstruované dle mediánů absolutního počtu odpovídajících leukocytárních populací či jejich indexů

Leukocytární populace či index	Inferenční soubor		Kontrolní soubor			
	Medián inferenčního souboru		Medián inferenčního souboru		Medián kontrolního souboru	
	log-rank	Wilcoxon	log-rank	Wilcoxon	log-rank	Wilcoxon
White cell count (total)	0,040	0,024	0,001	0,001	0,000	0,003
CD3+CD69+	0,007	0,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD14+CD16+	0,035	0,027	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD14+DR+/CD14+CD16+	n.s.	0,006	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD14+CD16+/CD14+DR+	0,012	0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
NK/CD14+CD16+	n.s.	n.s.	0,001	0,001	0,004	0,003
NK/CD3+CD69+	0,002	0,000	0,013	0,006	0,002	0,002
CD3+CD69+/NK	0,006	0,001	0,013	0,006	0,007	0,002
NK/ white cell count	0,003	0,009	0,004	0,001	0,000	0,000
CD3+CD69+/CD3+	0,003	0,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD3+CD69+/CD3+CD8+	0,014	0,004	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD3+CD69+/CD3+CD4+	0,004	0,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD3+CD69+/CD3+DR+	n.s.	0,015	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD3+DR+/CD3+CD69+	n.s.	0,042	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD3+CD69+/CD3+CD25+	0,037	0,007	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD3+CD69+/CD8-CD28+	0,008	0,001	0,031	0,040	n.s.	n.s.
CD8-CD28+/CD3+CD69+	0,007	0,001	0,031	0,040	n.s.	n.s.
CD8+CD57+/CD3+CD69+	0,006	0,024	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD14+DR+/CD3+CD69+	n.s.	0,009	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD3+CD69+/CD14+DR+	0,037	0,003	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. = nesignifkantní na 95% hladině spolehlivosti

4.3. Regresní modely

Pro všechny leukocytární populace a indexy (podíly absolutních počtů parametrů fenotypu leukocytů) byly vypočteny na původním inferenčním souboru regresní modely pomocí obou regresních metod (Weibull regression, Cox regression). Výsledky pro daný parametr jsou uvedeny jen tehdy, pokud vyšel alespoň jeden z regresních modelů statisticky signifikantně na 95% či vyšší hladině spolehlivosti, viz. tabulka č 10.

Tab. č. 10: Regresní modely pro původní inferenční soubor

Leukocytární populace či index	Weibullova regrese			Coxova regrese		
	Odhad reg.koef.	Odhad konstanty	p	Reg. koef.	p	pseudo R ²
White cell count (total)	-0,000094	7,22553	0,0485	0,000130	0,0240	0,0941
CD14CD16	-0,001447	6,98531	0,0161	0,001825	0,0115	0,1152
CD25/CD3CD25	-0,420537	6,92287	0,0259	0,564690	0,0091	0,1220
CD14DR/CD14CD16	0,223451	6,09552	0,0176	-0,298214	0,0289	0,0887
CD14CD16/CD14DR	-0,640590	6,98124	0,0067	0,921440	0,0006	0,1956
CD14CD16/CD8-CD28+	-0,272201	6,77536	0,0151	0,321004	0,0084	0,1242
CD3CD8/NK	-0,130126	6,82928	0,0395	0,182746	0,0151	0,1076
NK/CD14CD16	0,251925	6,22600	0,0165	-0,341998	0,0219	0,0968
NK/CD3CD69	0,044384	6,22568	0,0034	-0,058881	0,0140	0,1096
CD3CD69/NK	-0,359780	6,69136	n.s.	0,490023	0,0194	0,1004
CD3/NK	-0,050467	6,83482	n.s.	0,072750	0,0335	0,0845
NK/ white cell count	11,042200	6,12087	0,0134	-14,931938	0,0138	0,1102
CD3CD69/CD3	-5,353550	6,91298	0,0103	6,929630	0,0043	0,1428
CD3CD69/CD3CD8	-1,773100	6,88636	0,0298	2,403858	0,0127	0,1126
CD3CD69/CD3CD4	-3,399320	6,97517	0,0011	4,330696	0,0005	0,1991
CD3CD69/CD3CD25	-0,331023	6,86993	0,0093	0,396801	0,0059	0,1338
CD3CD69/CD8-CD28+	-2,172870	6,85883	0,0064	2,784359	0,0017	0,1666
CD8-CD28+/CD3CD69	0,023465	6,22337	0,0204	-0,029656	0,0333	0,0846
CD8CD57/CD3CD69	0,093702	6,28120	0,0073	-0,114978	0,0264	0,0914
CD14DR/CD3CD69	0,020239	6,27308	0,0133	-0,026417	0,0252	0,0927
CD3CD69/CD14DR	-0,773200	6,70571	n.s.	0,974475	0,0484	0,0736
NK/CD3CD8	0,294797	6,28044	0,0300	-0,383948	0,0473	0,0743

Pro všechny leukocytární populace a indexy, které jako nezávisle proměnné vytvořily signifikantní regresní modely na původním inferenčním souboru, byly poté provedeny výpočty regresních modelů i na kontrolním souboru, opět oběma regresními metodami (Weibullova regrese, Coxova regrese). Výsledky daného parametru jsou uvedeny opět jen tehdy pokud vyšel na kontrolním souboru alespoň jeden z regresních modelů statisticky signifikantně na 95% či vyšší hladině spolehlivosti, viz. tabulka č. 11.

Tab. č. 11: Regresní modely pro kontrolní soubor

Leukocytární populace či index	Weibullova regrese			Coxova regrese		
	Odhad reg.koef.	Odhad konstanty	p	Reg. koef.	p	pseudo R ²
White cell count (total)	-0,000192	7,24963	0,0001	0,000182	0,0001	0,3013
CD3CD8/NK	-0,080572	6,16627	0,0186	---	n.s.	---
NK/CD14CD16	0,262438	5,47805	0,0059	-0,214865	0,0446	0,0983
NK/CD3CD69	0,075344	5,40000	0,0003	-0,064572	0,0105	0,1502
CD3CD69/NK	-0,297894	6,19023	0,0442	0,231475	n.s.	0,0903
CD3/NK	-0,049000	6,27566	0,0115	0,051651	0,0016	0,2128
NK/ white cell count	30,290100	4,77936	0,0000	-29,566019	0,0008	0,2333
CD8-CD28+/CD3CD69	0,043848	5,41858	0,0074	-0,033515	0,0447	0,0982
CD8CD57/CD3CD69	0,141729	5,53026	0,0047	-0,111319	0,0471	0,0963
NK/CD3CD8	0,749885	5,26302	0,0005	-0,652686	0,0132	0,1424

n.s. = nesignifikantní na 95% hladině spolehlivosti

Leukocytární populace a indexy z nichž byly vytvořeny signifikantní regresní modely na původním inferenčním souboru a zároveň i na kontrolním souboru byly následně použity - s cílem ověřit validitu - k výpočtům regresních modelů (opět oběma metodami - Weibull regression i Cox regression) na dvou menších souborech vytvořených náhodným rozdělením původního inferenčního souboru, viz. tabulka č. 12 a tabulka č. 13.

Tab. č. 12: Regresní modely pro „malý“ inferenční soubor

Leukocytární populace či index	Weibullova regrese			Coxova regrese		
	Odhad reg.koef.	Odhad konstanty	p	Reg. koef.	p	pseudo R ²
White cell count (total)	-0,000107	7,27507	n.s.	0,000155	n.s.	0,0907
NK/CD14CD16	0,350570	6,17629	n.s.	-0,476055	n.s.	0,0894
NK/CD3CD69	0,112588	6,00893	0,0224	-0,181488	0,0302	0,1582
CD3/NK	-0,049253	6,82834	n.s.	0,081705	n.s.	0,0846
NK/ white cell count	8,141610	6,21780	n.s.	-12,684297	n.s.	0,0822
CD8-CD28+/CD3CD69	0,027035	6,18004	0,0371	-0,037232	n.s.	0,1050
CD8CD57/CD3CD69	0,162259	6,17682	0,0203	-0,241090	n.s.	0,1199
NK/CD3CD8	-0,191873	6,67574	n.s.	0,122431	n.s.	0,0039

Tab. č. 13: Regresní modely pro „malý“ kontrolní soubor

Leukocytární populace či index	Weibullova regrese			Coxova regrese		
	Odhad reg.koef.	Odhad konstanty	p	Reg. koef.	p	pseudo R ²
White cell count (total)	-0,000101	7,30707	n.s.	0,000117	n.s.	0,0989
NK/CD14CD16	0,239570	6,19470	n.s.	-0,283888	n.s.	0,1085
NK/CD3CD69	0,043704	6,12499	0,0167	-0,048824	0,0367	0,1595
CD3/NK	-0,052491	6,84678	n.s.	0,066194	n.s.	0,0870
NK/ white cell count	14,243400	6,01146	0,0466	-16,619375	0,0512	0,1418
CD8-CD28+/CD3CD69	0,020847	6,26096	n.s.	-0,022065	n.s.	0,0610
CD8CD57/CD3CD69	0,081876	6,27809	n.s.	-0,080556	n.s.	0,0908
NK/CD3CD8	0,486794	6,04146	0,0107	-0,563005	0,0263	0,1766

n.s. = nesignifikanční na 95% hladině spolehlivosti

Tab. č. 14: Sdružený přehled regresních modelů pro jednu nezávislou proměnnou

Soubor	Leukocytární populace či index	Weibullova regrese			Coxova regrese		
		Odhad reg.koef.	Odhad konstanty	p	Reg. koef.	p	pseudo R2
Inferenční soubor 1	White cell count (total)	-0.000094	7.22553	0.0485	0.000130	0.0240	0.0941
	NK/CD14+CD16+	0.251925	6.22600	0.0165	-0.341998	0.0219	0.0968
	NK/CD3+CD69+	0.044384	6.22568	0.0034	-0.058881	0.0140	0.1096
	CD3+/NK	-0.050467	6.83482	n.s.	0.072750	0.0335	0.0845
	NK/ white cell count	11.042200	6.12087	0.0134	-14.931938	0.0138	0.1102
	CD8-CD28+/CD3+CD69+	0.023465	6.22337	0.0204	-0.029656	0.0333	0.0846
	CD8+CD57+/CD3+CD69+	0.093702	6.28120	0.0073	-0.114978	0.0264	0.0914
NK/CD3+CD8+	0.294797	6.28044	0.0300	-0.383948	0.0473	0.0743	
Kontrolní soubor 1	White cell count (total)	-0.000192	7.24963	0.0001	0.000182	0.0001	0.3013
	NK/CD14+CD16+	0.262438	5.47805	0.0059	-0.214865	0.0446	0.0983
	NK/CD3+CD69+	0.075344	5.40000	0.0003	-0.064572	0.0105	0.1502
	CD3+/NK	-0.049000	6.27566	0.0115	0.051651	0.0016	0.2128
	NK/ white cell count	30.290100	4.77936	0.0000	-29.566019	0.0008	0.2333
	CD8-CD28+/CD3+CD69+	0.043848	5.41858	0.0074	-0.033515	0.0447	0.0982
	CD8+CD57+/CD3+CD69+	0.141729	5.53026	0.0047	-0.111319	0.0471	0.0963
NK/CD3+CD8+	0.749885	5.26302	0.0005	-0.652686	0.0132	0.1424	
Inferenční soubor 2	White cell count (total)	-0.000107	7.27507	n.s.	0.000155	n.s.	0.0907
	NK/CD14+CD16+	0.350570	6.17629	n.s.	-0.476055	n.s.	0.0894
	NK/CD3+CD69+	0.112588	6.00893	0.0224	-0.181488	0.0302	0.1582
	CD3+/NK	-0.049253	6.82834	n.s.	0.081705	n.s.	0.0846
	NK/ white cell count	8.141610	6.21780	n.s.	-12.684297	n.s.	0.0822
	CD8-CD28+/CD3+CD69+	0.027035	6.18004	0.0371	-0.037232	n.s.	0.1050
	CD8+CD57+/CD3+CD69+	0.162259	6.17682	0.0203	-0.241090	n.s.	0.1199
NK/CD3+CD8+	-0.191873	6.67574	n.s.	0.122431	n.s.	0.0039	
Kontrolní soubor 2	White cell count (total)	-0.000101	7.30707	n.s.	0.000117	n.s.	0.0989
	NK/CD14+CD16+	0.239570	6.19470	n.s.	-0.283888	n.s.	0.1085
	NK/CD3+CD69+	0.043704	6.12499	0.0167	-0.048824	0.0367	0.1595
	CD3+/NK	-0.052491	6.84678	n.s.	0.066194	n.s.	0.0870
	NK/ white cell count	14.243400	6.01146	0.0466	-16.619375	0.0512	0.1418
	CD8-CD28+/CD3+CD69+	0.020847	6.26096	n.s.	-0.022065	n.s.	0.0610
	CD8+CD57+/CD3+CD69+	0.081876	6.27809	n.s.	-0.080556	n.s.	0.0908
NK/CD3+CD8+	0.486794	6.04146	0.0107	-0.563005	0.0263	0.1766	

n.s. = nesignifikantní na 95% hladině spolehlivosti

4.4. Vyšetření ROC křivek

Signifikance plochy pod křivkou (AUC) ROC křivek pro některé parametry fenotypu:

K získání alespoň určité další informace k potvrzení validity výsledků testů analýzy přežití byla v následujícím kroku testována na původním inferenčním i kontrolním souboru (vždy rozděleném dle svého mediánu celkového přežití a celkového přežití 1 rok) signifikance AUC ROC křivek. Tento postup by měl poskytnout do určité míry nezávislou informaci o významu jednotlivých testovaných parametrů fenotypu jako diskriminátoru celkového přežití v uvedených souborech. Testovány byly pouze parametry, které vycházely statisticky signifikantně při univariantní či multivariantní analýze přežití či eventuelně které tvořily komponenty indexů, které byly v analýze přežití (alespoň hraničně) signifikantní.

Tab. č. 15: Signifikance AUC ROC křivek některých parametrů fenotypu

Testovaný parametr fenotypu	Inferenční soubor		Kontrolní soubor	
	medián (583 dní)	1 rok	medián (204 dní)	1 rok
leukocyty	n.s.	n.s.	0,003	0,006
NK/CD14CD16	0,014	0,006	0,006	0,031
NK/CD3CD69	0,001	0,003	0,005	0,009
NK/leukocyty	n.s.	n.s.	0,000	0,000
CD8-CD28+/CD3CD69	0,015	0,003	n.s.	n.s.
CD8CD57/CD3CD69	n.s.	n.s.	n.s.	0,033
NK/CD3CD8	n.s.	n.s.	0,018	0,039
monocyty	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD3CD69	0,003	0,002	n.s.	n.s.
NK	n.s.	n.s.	0,003	0,006
CD14CD16	0,022	0,012	n.s.	n.s.
CD3CD8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

4.5. Indukce pravidel pro konstrukci skupin s rozdílným celkovým přežíváním

V této části bude označením „leuko“ míněn celkový počet všech bílých krvinek v obvodové krvi (jedná se o parametr „white cell count (total)“ uváděný v předchozích tabulkách) a označením „mono“ pak monocyty.

Pro každý vygenerovaný model bude uvedeno jeho plné znění (tj. vyjmenována všechna pravidla pro vyšší i nižší dobu celkového přežití) a poté uvedena tabulka s výsledky univariální analýzy přežití provedené rozdělením dle těchto pravidel daného modelu, a to vždy pro původní inferenční (inferenční soubor 1) i kontrolní soubor (kontrolní soubor 1).

Ověření platnosti univariální analýzy přežití provedením Coxovy analýzy pro 1 nezávislou proměnnou nebylo provedeno. Tento postup by vyseletoval možná ještě validnější modely speciálně pro hodnoty v těchto souborech a na těchto konkrétních nemocných, ale vzhledem k malému počtu měření by bylo i určité riziko ztráty i jinak validního modelu a protože se jedná o explorativní studii, není toto prioritou. Prioritou je naopak generování hypotéz a v takovém případě stačí pro srovnání prediktivní hodnoty jednotlivých modelů provedení pouze univariální analýzy přežití a použít tyto modely i pro jejich speciální vyovídací hodnotu o kvantitativních vztazích, protože (na rozdíl od výše použitých metod) tato metoda dokáže pracovat s dělením jednoho parametru na několik intervalů, které mají odlišný prognostický vliv.

A) Konstrukce ze všech parametrů

Indukci pravidel byla nejprve provedena na všech parametrech použitých k předchozí analýze přežívání, tj. pro „signifikantní“ parametry fenotypu leukocytů a indexů těchto parametrů, které jako nezávisle proměnné při Weibullově regresi na původním souboru nemocných vytvořili signifikantní regresní modely. Pro jednotlivé soubory a jejich rozdělení podle celkového přežívání byly zkonstruovány následující signifikantní modely (uvedeny jen modely s nejmenší mírou chyby - „error rate“, pro které vyšel na obou souborech alespoň v jednom z testů statisticky signifikantní rozdíl celkového přežívání mezi jimi definovanými skupinami na 95% či vyšší hladině spolehlivosti):

a) původní inferenční soubor rozdělený na celkové přežívání menší či větší než 583 dní:

Model 1

1. $CD3CD69 \in [55.5; 90.0) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
2. $mono \in [1050; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
3. $leuko \in [2800; 3750) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
4. $CD14CD16 \in [338.5; \infty) \text{ AND } CD3CD8 \in [419; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
5. $leuko \in [3750; 6750) \text{ AND } CD3CD8 \in [51; 419) \Rightarrow$ vyšší celkové přežití

Srovnání celkové přežití	Inferenční soubor			Kontrolní soubor		
	chi-kvadrát	p		chi-kvadrát	p	
log-rank test	20,828	0,000		6,684	0,009	
zobecněný Wilcoxonův test	22,844	0,000		6,558	0,010	
Odhady percentilů (dny)	75%	50%	25%	75%	50%	25%
nižší celkové přežití	110	251	505	88	103	391
vyšší celkové přežití	704	748	940	204	331	---
Počet nemocných	celkem	zemřel	cenzorován	celkem	zemřel	cenzorován
nižší celkové přežití	26	25	1	9	9	0
vyšší celkové přežití	14	12	2	18	13	5

Model 2

1. $CD3CD69 \in [55.5; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
2. $mono \in [1050; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
3. $leuko \in [600; 3750) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
4. $CD14CD16 \in [338.5; \infty) \text{ AND } CD3CD8 \in [419; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
5. $leuko \in [3750; 6750) \text{ AND } CD3CD8 \in [41; 419) \Rightarrow$ vyšší celkové přežití

Srovnání celkové přežití	Inferenční soubor			Kontrolní soubor		
	chi-kvadrát	p		chi-kvadrát	p	
log-rank test	9,807	0,002		10,250	0,001	
zobecněný Wilcoxonův test	14,565	0,000		8,476	0,004	
Odhady percentilů (dny)	75%	50%	25%	75%	50%	25%
nižší celkové přežití	111	268	536	63	90	160
vyšší celkové přežití	709	748	940	326	600	---
Počet nemocných	celkem	zemřel	cenzorován	celkem	zemřel	cenzorován
nižší celkové přežití	32	29	3	13	13	0
vyšší celkové přežití	12	10	2	9	6	3

B) Konstrukce z parametrů *leuko* a *mono*

Předchozí výsledky ukázaly význam parametrů *leuko* a *mono* při konstrukci všech pravidel. Pro zřejmou atraktivnost možnosti použití pouze těchto 2 rutinně

vyšetřovaných parametrů byla následně provedena ještě indukce pravidel pro pouze tyto 2 parametry. Pro jednotlivé soubory a jejich rozdělení podle celkového přežívání byly zkonstruovány následující modely (uvádím opět jen modely s nejmenším „error rate“, pro které vyšel na obou souborech alespoň v jednom z testů statisticky signifikantní rozdíl celkového přežívání mezi jimi definovanými skupinami na 95% či vyšší hladině spolehlivosti):

a) původní inferenční soubor rozdělený na celkové přežívání menší či větší než 583 dní:

Model 3

1. $leuko \in [6750; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití

2. $leuko \in [3750; 6750) \Rightarrow$ vyšší celkové přežití

Srovnání celkové přežití	Inferenční soubor			Kontrolní soubor		
	chi-kvadrát	p		chi-kvadrát	p	
log-rank test	7,604	0,005		12,182	0,000	
zobecněný Wilcoxonův test	10,447	0,001		12,744	0,000	
Odhady percentilů (dny)	75%	50%	25%	75%	50%	25%
nižší celkové přežití	151	364	614	58	88	134
vyšší celkové přežití	666	748	966	160	331	903
Počet nemocných	celkem	zemřel	cenzorován	celkem	zemřel	cenzorován
nižší celkové přežití	31	28	3	16	16	0
vyšší celkové přežití	22	17	5	26	21	5

Model 4

1. leuko $\in [6750; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
2. leuko $\in [600; 3750) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
3. mono $\in [1050; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
4. leuko $\in [3750; 6750)$ AND mono $\in [50; 1050) \Rightarrow$ vyšší celkové přežití

Srovnání celkové přežití	Inferenční soubor			Kontrolní soubor		
	chi-kvadrát	p		chi-kvadrát	p	
log-rank test	8,713	0,003		11,937	0,001	
zobecněný Wilcoxonův test	12,340	0,000		11,828	0,001	
Odhady percentilů (dny)	75%	50%	25%	75%	50%	25%
nižší celkové přežití	178	344	613	58	88	200
vyšší celkové přežití	691	748	966	160	331	903
Počet nemocných	celkem	zemřel	cenzorován	celkem	zemřel	cenzorován
nižší celkové přežití	38	34	4	18	18	0
vyšší celkové přežití	21	16	5	25	20	5

b) původní inferenční soubor rozdělený na celkové přežívání menší či větší než 420 dní:

Model 5

1. leuko $\in [8650; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
2. mono $\in [1050; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
3. leuko $\in [2800; 8650)$ AND mono $\in [200; 1050) \Rightarrow$ vyšší celkové přežití

Srovnání celkové přežití	Inferenční soubor			Kontrolní soubor		
	chi-kvadrát	p		chi-kvadrát	p	
log-rank test	7,470	0,006		4,999	0,025	
zobecněný Wilcoxonův test	12,893	0,000		5,188	0,022	
Odhady percentilů (dny)	75%	50%	25%	75%	50%	25%
nižší celkové přežití	111	195	481	63	90	134
vyšší celkové přežití	505	675	871	136	326	600
Počet nemocných	celkem	zemřel	cenzorován	celkem	zemřel	cenzorován
nižší celkové přežití	18	16	2	13	13	0
vyšší celkové přežití	41	34	7	24	21	3

Model 6

1. leuko $\in [8650; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
2. mono $\in [1050; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
3. leuko $\in [600; 8650)$ AND mono $\in [50; 1050) \Rightarrow$ vyšší celkové přežití

Srovnání celkové přežití	Inferenční soubor			Kontrolní soubor		
	chi-kvadrát	p		chi-kvadrát	p	
log-rank test	7,470	0,006		6,543	0,011	
zobecněný Wilcoxonův test	12,893	0,000		6,480	0,011	
Odhady percentilů (dny)	75%	50%	25%	75%	50%	25%
nižší celkové přežití	111	195	481	63	90	134
vyšší celkové přežití	505	675	871	136	326	642
Počet nemocných	celkem	zemřel	cenzorován	celkem	zemřel	cenzorován
nižší celkové přežití	18	16	2	13	13	0
vyšší celkové přežití	41	34	7	30	25	5

c) kontrolní soubor rozdělený na celkové přežívání menší či větší než 420 dní:

Model 7

1. mono $\in [930; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití

2. mono $\in [50; 930) \Rightarrow$ vyšší celkové přežití

Srovnání celkové přežití	Inferenční soubor			Kontrolní soubor		
	chi-kvadrát	p		chi-kvadrát	p	
log-rank test	2,884	n.s.		9,805	0,002	
zobecněný Wilcoxonův test	4,982	0,025		9,328	0,002	
Odhady percentilů (dny)	75%	50%	25%	75%	50%	25%
nižší celkové přežití	141	258	481	45	71	90
vyšší celkové přežití	341	613	824	104	252	600
Počet nemocných	celkem	zemřel	cenzorován	celkem	zemřel	cenzorován
nižší celkové přežití	11	10	1	7	7	0
vyšší celkové přežití	48	40	8	36	31	5

n.s. = nesignifikanční na 95% hladině významnosti

5. Diskuse

Na základě výsledků univariantsní analýzy přežívání byly prokázány jako robustně signifikantní pro určení horší či lepší prognosy nemocných s kolorektálním karcinomem metastázuujícím do jater následující parametry: celkový počet bílých krvinek v periferní krvi (dále označováno jednodušeji slovem leukocyty) a poměry NK/CD3CD69, CD3CD69/NK a NK/leukocyty. Tyto parametry tedy splňují intuitivně nutnou podmínku pro možnost užití daného parametru jako nezávisle proměnné ke konstrukci regresního modelu vhodného k predikci celkového přežívání.

Při regresní analýze přežívání vycházely nezávisle na těchto výsledcích jako nejvalidnější modely s pouze jedním kontinuálním parametrem, přičemž na datech této přirozené domény vycházel nejrobustněji na všech souborech zkonstruovaných k účelu ověření validity model s parametrem NK/CD3CD69. Další regresní modely o jednom parametru, které byly signifikantní na původním souboru a zároveň na validačním souboru zkonstruovaném z longitudinálních měření těch samých nemocných, jsou v podstatě také relativně silnými kandidátskými prognostickými biomarkery použitelnými pro predikci celkového přežití, avšak při dalším kroku k zajištění maximální validity (ověření na původním souboru náhodně rozděleném na dva menší) vyšly nesignifikantně. To nevylučuje, že při ověření na jiném nezávislém souboru nemocných by i tyto markery mohly vycházet signifikantně. Na celou věc lze možno nazírat i z úhlu „overfittingu“ modelu s parametrem NK/CD3CD69 a tudíž není dokonce vyloučeno, že při takovémto nezávislém ověření vnější validity výsledků by některý z těchto markerů vycházel na jiných datech robustněji než model s NK/CD3CD69. Takovými kandidátskými prognostickými faktory prokázanými v této studii při vyšetření regresních modelů s jedním parametrem jsou následující

parametry: leukocyty, NK/CD14CD16, CD3/NK, NK/leukocyty, CD8-CD28+/CD3CD69, CD8CD57/CD3CD69 a NK/CD3CD8.

V multivariantní analýze byly zkoušeny i modely s více parametry, které samostatně vycházely signifikantně v univariantní analýze či multivariantní analýze (tj. především leukocyty, NK/leukocyty, ale i NK/CD14CD16 a další parametry), avšak přidání těchto parametrů nikdy nevytvářelo v multivariantní analýze signifikantní modely a vždy jen zhoršilo signifikanci parametru NK/CD3CD69. Samostatný parametr NK/CD3CD69 je tedy výsledkem mnoha multivariantních analýz s různými kombinacemi vstupních parametrů, který zůstal jako jediný signifikantní parametr v těchto modelech (při Weibullově analýze „ručně“ metodou pokus-omyl, v Coxově analýze při užití standardního postupu v takové situaci – selekce modelů s nastavením Hierarchical Forward with Switching v NCSS).

Při ověření validity metodou vyšetření statistické významnosti ROC křivek pro jednotlivé modely z regresní analýzy se potvrdila na obou vyšetřovaných souborech (původní a kontrolní zkonstruovaný z longitudinálních měření u stejných nemocných) při rozdělení celkového přežívání na dvě skupiny robustnost modelu s parametrem NK/CD3CD69. Dostatečně robustně pak vycházel při tomto postupu ověření i model s parametrem NK/CD14CD16.

Vzhledem k charakteru dat této vyšetřované přirozené domény se jeví jako „výtěžnější“ (teoreticky přesnější a spolehlivější) než užití „klasických“ statistických metod vyšetřování, jejichž výsledky jsou popsány výše, užití některého z moderních postupů založených na teorii rozhodovacích stromů (decision trees v anglosaské literatuře). Zde bylo užito metody indukčních grafů, která dovoluje ke klasifikaci navíc i diskretizaci kontinuálních proměnných a tím získání více intervalů vyšetřovaných parametrů a

vzájemné kombinace takto získaných intervalů. Tento postup na vyšetřovaných datech vygeneroval velice zajímavé výsledky ve formě pravidel, která jsou vzhledem ke své silné predikční hodnotě (ve srovnání s výsledky získanými „klasickými“ metodami) takovýchto modelů i relativně jednoduchá. Síla tohoto přístupu statistického zpracování je patrná především z výsledků dosažených pro pouze dva základní parametry periferní krve (leukocyty a monocyty). Získané výsledky (především Model č. 4) jsou zcela originální. Ve srovnání se všemi přechozími studiemi na prognostické faktory u generalizovaného kolorektálního karcinomu zachycují tyto modely biologicky interpretovatelnou vzájemnou interakci hodnot těchto dvou parametrů a v tomto překonávají i výsledky mnohem větších studií prezentovaných dosud ve světové literatuře s cílem určit, zda lze tyto dva parametry užít pro určení prognosy, a u kterých klasickým přístupem bylo apriorní arbitrární rozdělení hodnoty těchto dvou parametrů dle mediánů či limitů normálních hodnot (většinou horních). Takto zkonstruovaný model sice neumožňuje definici prognosy pro všechny nemocné, vždy existuje při ověření na jiných datech skupina nemocných, pro která jsou vygenerovaná pravidla ve vnitřním rozporu a tedy nepoužitelná pro jejich klasifikaci, ale pro zbylé nemocné je klasifikační výkonnost tohoto modelu založeného na dvou levných a rutinně vyšetřovaných parametrech periferní krve překvapivě silná. Navíc je tento výsledek biologicky celkem dobře interpretovatelný a to zvyšuje pravděpodobnost jeho vnější validity, kterou lze však samozřejmě stanovit jedině provedením stejného šetření na nezávislé skupině nemocných.

Toto je však jen vedlejším produktem při hledání takovýchto vygenerovaných pravidel pro parametry imunofenotypu mononukleárních buněk periferní krve nemocných s kolorektálním karcinomem s metastatickým postižením jater pro účely určení jejich

prognosy (definované zde jako dvě skupiny s apriorně definovaným rozdílným celkovým přežitím) v rámci naplnění druhého hlavního cíle této disertační práce, tj. definice konkrétních kandidátských prognostických markerů. Získaný Model č. 2 je z tohoto hlediska nejlepším z mnoha vygenerovaných, jeho signifikantnost při zpětném ověření v univariantské analýze přežití je dostatečně robustní na obou vyšetřovaných souborech (původní a z longitudinálních měření zkonstruovaný validační soubor) a mnohdy lze provést i relativně smysluplnou biologickou interpretaci takovýchto intervalů vyselektovaných parametrů a jejich vzájemné interakce (viz. diskuse níže). Tento výsledek je tedy jistě na první pohled složitější, avšak z důvodu této složitosti má větší pravděpodobnost být pravdivým při popisu vyšetřované situace, která je složitá. Při „klasických“ metodách statistického vyšetření souborů byl tedy získán jako nejvalidnější regresní model s parametrem tvořeným poměrem NK a CD3CD69 buněk. Určité intervaly počtu CD3CD69 lymfocytů v periferní krvi byly vygenerovány i jako součást pravidel v rámci určení klasifikačních kritérií ke konstrukci dvou skupin s odlišným celkovým přežitím metodou indukčních grafů. Celkově lze tedy říci, že k vysvětlení biologické podstaty těchto všech výsledků je podstatné se v prvním kroku zaměřit na roli CD3CD69 lymfocytů u pokročilého nádorového onemocnění. K tomuto tématu tedy nyní detailněji.

5.1. Biologický význam molekuly CD69 a lymfocytů CD3CD69 u chronické imunitní aktivace a nádorového onemocnění

5.1.1. Původní údaje z in vitro studií popisující CD69 jako kostimulační molekulu

Z tradičního úhlu pohledu vyjadřuje parametr CD3CD69 počet časně aktivovaných T lymfocytů v periferní krvi.^{226, 227}

Glykoprotein CD69 je molekula patřící do molekulární rodiny lektinů.²²⁸ Gen pro CD69 je umístěn v rámci „natural killer (NK) komplexu genů“ na myším chromosomu 6 a lidském chromosomu 12^{229, 230} a kóduje lektin typu II, C typu, patřící do skupiny tzv. rodiny NK receptorů. CD69 je exprimován po aktivaci na všech buňkách derivovaných z kostní dřeně s výjimkou erytrocytů. Většina NK lektinových receptorů přímo zprostředkovává své aktivační či inhibiční efekty přes své cytoplasmatické domény.²³¹ Avšak cytoplasmatická doména CD69 je krátká a postrádá jakékoliv identifikovatelné s funkcí asociované motivy. Dosud nebyly popsány žádné signální proteiny, které by byly přímo asociovány s cytoplasmatickou doménou CD69.

Rychlá a přechodná indukce exprese CD69 na T buňkách poukazuje na to, že by tato molekula mohla napomáhat aktivaci a/nebo diferenciaci podobně jako je tomu u CD40L (CD154) nebo CD25. Při absenci chybějícího známého ligandu byly *in vitro* studie k prozkoumání možné funkce CD69 založeny na užití monoklonálních protilátek.²³² V přítomnosti forbol esterů stimulují monoklonální protilátky anti-CD69 produkci IL-2, který zvyšuje proliferaci T buněk^{233, 234} a syntézu TNF-alfa,²³⁵ přičemž indukují sekreci oxidu dusnatého monocyty²³⁶ a v destičkách aktivaci metabolismu kyseliny arachidonové a degranulaci,²³⁷ což vše nasvědčuje tomu, že CD69 by mohl účinkovat

jako prozánětlivý receptor. Cross-linking CD69 sekundárními protilátkami zprostředkovává časné signální události jako jsou influx extracelulárního Ca^{2+} u T buněk po setkání s antigenem. Navíc protilátky proti CD69 významně inhibují schopnost T buněk aktivovat makrofágy pomocí buněčného kontaktu. CD69 může tedy zjevně zprostředkovávat aktivaci imunitních buněk a vykazovat, ať již přímo či nepřímo, prozánětlivé účinky *in vitro*.

Avšak vazba na CD69 také spouští u různých buněčných typů apoptosu (např. u monocytů či eosinofilů)^{238, 239} a tato molekula by mohla zprostředkovávat inhibiční signály pro proliferaci T buněk zprostředkovanou CD3 nebo receptorem pro IL-1.²⁴⁰ Všechna tato data ukazují, že CD69 se chová *in vitro* více jako kostimulační receptor než jako čistě inhibiční či aktivační molekula, ačkoliv osud této kostimulace by se mohl lišit v závislosti na buněčném kontextu.

5.1.2. Novější pohledy – CD69 jako imunoregulační molekula

In vivo modely původně vybrané ke studiu funkce CD69 byly založeny na důkazech možných funkcí dle míst, kde je tato molekula exprimována. Studie na myších transgenních pro CD69 se zaměřovali na proces selekce v thymu, což je proces, při kterém je přechodně indukována exprese CD69. Navzdory údajům získaným ze studií *in vitro*, jež ukazovali na možnou prozánětlivou úlohu CD69, konstitutivní exprese CD69 na T buňkách transgenních myší není asociována se stavem zánětu.^{241, 242} Dále i analýza antigenně specifických odpovědí u myší neprokázala redukovanou aktivaci T buněk při absenci CD69, což nasvědčuje tomu, že tento receptor nevykazuje čistě

pozitivní kostimulační efekt u T buněk *in vivo*, ačkoliv nemůže být vyloučena i jeho redundantní role jako pozitivního kostimulátoru pro T buňky.

Při výsledcích *in vitro* a *in vivo*, které jsou v částečném rozporu, začalo být považováno za vhodné studovat roli CD69 na *in vivo* modelu chronického zánětu. Tato analýza byla založena na dvou liniích důkazů. Za prvé, CD69 je trvale vyjádřena v ohniscích zánětu. Za druhé, gen pro CD69 je lokalizován v tzv. CIA3 lokusech na krysím chromosomu 4 a myším chromosomu 6, syntenním k lidskému 12p12-p13, tj regionu, který obsahuje lokusy ke zvýšené náklonnosti k několika autoimunitním nemocem, včetně kolagenem indukované artritidy (collagen induced arthritis, CIA).^{243, 244} Co je však ještě více pozoruhodné, studie CIA u myší deficientních pro CD69 objevily novou regulační roli pro CD69. U myší deficientních v CD69 se vyvíjí exacerbovaná forma CIA s vyššími T- a B-buněčnými odpověďmi proti kolagenu. Tato vystupňovaná odpověď koreluje s redukovanými hladinami TGF-beta v zanícených kloubech. TGF-beta účinkuje u CIA jako protizánětlivý cytokin²⁴⁵ a u normálních myší (wildtype mice) podání protilátek blokujiících TGF-beta exacerbuje tíži artritidy za zvýšení prozánětlivých cytokinů a chemokinů. U myší deficientních v CD69 však tyto protilátky takto neúčinkují. Redukované hladiny TGF-beta a absence CD69 by mohly spolu kauzálně souviset. V tomto ohledu je i zajímavé, že cross-linking molekul CD69 *in vitro* podněcuje syntézu TGF-beta. Navíc je i syntéza TGF-beta závislá na aktivaci ERK²⁴⁶ a cross-linking molekul CD69 zprostředkovává aktivaci ERK. Tímto se zdá, že regulační účinky CD69 *in vivo* jsou zprostředkovány přes syntézu pleitropního cytokinu, který by mohl být citlivě regulován pomocí řízené exprese předpokládaného „CD69-ligandu“.

Cross-linking molekul CD69 indukuje tvorbu TGF-beta v CD4+ a CD8+ T buňkách stejně jako v NK buňkách a makrofázích, což nasvědčuje tomu, že tento receptor vykazuje širokou imunoregulační působnost a že by mohly na tomto fenoménu participovat také další buňky, které by exprimovaly odpovídající předpokládaný „proti-receptor“. Tímto mechanismem by mohl CD69 ovlivňovat nejen adaptivní, ale i přirozenou imunitu. V souladu s tím vede u myšního modelu NK-senzitivních nádorů deficiencie v CD69 k redukované syntéze TGF-beta imunitními buňkami, což má za výsledek vysokou tvorbu chemokinů se snížením apoptosy lymfocytů, akumulací NK buněk a zvýšenou lýzou nádorových buněk. Tyto údaje podporuje i to, že blokáda přenosu signálu TGF-beta v T buňkách zvyšuje protinádorovou imunitu pomocí usnadnění expanze nádorově specifických CD8+ T buněk.²⁴⁷

Oba modely, model NK-senzitivního nádoru a CIA model, ukazují, že deficiencie CD69 vede ke sníženým hladinám TGF-beta, což podporuje zvýšení imunitní odpovědi a za výsledek má více účinnou lýzu tumorů nebo zvýšení zánětu u kolagenem indukované artritidy. Užitím protilátky způsobující snížení exprese CD69 *in vivo* reprodukuje u normálních (wildtype) myší fenotyp, který nalézáme u myší deficientních v CD69, a tento jev dále podporuje hypotézu imunoregulační role CD69. Avšak, jak již je zmíněno výše, cross-linking molekuly CD69 *in vitro* zprostředkovává také produkci prozánětlivých mediátorů, což naznačuje, že CD69 by mohla mít duální roli zprostředkováním syntézy různých cytokinů v závislosti na konkrétním buněčném kontextu.

5.1.3. Možné imunoregulační role molekuly CD69

Předchozí výsledky ze studií *in vitro* popisovaly molekulu CD69 především jako stimulační receptor, avšak novější studie *in vivo* ukázaly, že povaha chování CD69 je více komplexní.²⁴⁸ Jak již zmíněno výše, absence CD69 vede k vyšší imunitní odpovědi u dvou nezávislých modelů: zvýšení závažnosti T buňkami řízené experimentální artritidy na zvířecím modelu²⁴⁹ a vystupňované rejekci NK-senzitivních tumorů.²⁵⁰ Teoretickým podkladem je skutečnost, že CD69 zprostředkovává produkci TGF-beta a efekt tohoto pleitropního cytokinu by mohl být zodpovědný za regulační účinky CD69, ačkoliv se na tomto mohou podílet i další mediátory. CD69 by mohl takto ovlivňovat různé uzlové body v mechanismech zodpovědných za limitaci imunitní odpovědi. Zpětnovazební limitace imunitní odpovědi je základem pro její kontrolu a řízení a molekuly indukované během aktivace lymfocytů mohou hrát roli negativních regulátorů. Za prvé, CD69 by mohl mít roli v delecii lymfocytů cestou apoptosy následující po aktivaci. Za druhé, během prezentace antigenu mohou být parciální aktivační signály schopné zároveň indukovat expresi CD69^{251, 252} a stav anergie, který je charakteristický pro CD69-exprimující lymfocyty u chronických zánětlivých chorob.^{253, 254} Tyto anergní lymfocyty by se mohly shodovat s dosud špatně definovanou skupinou adaptivních Treg buněk, které fungují jako vedlejší populace supresorových lymfocytů svojí produkcí TGF-beta nebo dalších imunoregulačních cytokinů zprostředkujících lokální či systémovou odchylku imunity.²⁵⁵ Za třetí, zapojení CD69 by mohlo regulovat konečnou rovnováhu Th1/Th2 diferenciaci. Je i jasné, že charakterizace ligandů CD69 a znalost jejich prostorové a časové exprese by nám v budoucnu měla vnést i více světla do imunoregulačních funkcí molekuly CD69.

5.2. Role CD3CD69 lymfocytů v periferní krvi pro určení prognosy u generalizovaného kolorektálního karcinomu z pohledu výsledků této studie

V této studii získané výsledky by šlo tedy interpretovat tak, že při systémové imunitní aktivaci projevující se v periferní krvi snížením poměru počtu NK buněk k počtu T lymfocytů exprimujících CD69 na svém povrchu je prognosa nemocných s kolorektálním karcinomem metastazujícím do jater zhoršena a že lze pravděpodobně predikovat hodnotu celkového přežívání u těchto nemocných pomocí výše definovaných regresních modelů s parametrem NK/CD3CD69 jako nezávisle proměnnou a to s přibližně 10-15 % silou regrese. Při vhodně zvolených hodnotách cut-off bodu příslušné ROC křivky může tento parametr sloužit jako celkem slušný diskriminátor celkového přežití u nemocných, kteří odpovídají svými charakteristikami nemocným ve vyšetřených souborech. Výkonnost takto zkonstruovaného diagnostického testu pak přirozeně závisí plně na „použitém souboru“ a kladené otázce. Dále bylo v této studii ukázáno, že počet CD3CD69 buněk větší než 55,5 buněk/ μ l definuje jedno z pravidel vymezujících v kontextu pravidel ostatních na daných souborech nemocných skupinu s horším celkovým přežíváním a že při konstrukci pravidel ostatních nemá počet NK buněk v periferní krvi žádnou roli. Na obou vyšetřovaných souborech (původní inferenční soubor a kontrolní soubor) lze pokles poměru NK/CD3CD69 vysvětlit především trendem vzestupu parametru CD3CD69, konkrétně (pro nesplnění podmínky „bivariate normality“ uvádím vždy pouze Spearmanův korelační koeficient rho) pro inferenční soubor koreluje NK/CD3CD69 negativně s CD3CD69 ($\rho = -0,733$, $p < 0,001$) a pozitivně s NK ($\rho = +0,520$, $p < 0,001$), pro kontrolní soubor pak koreluje NK/CD3CD69 opět negativně s CD3CD69

(rho = -0,769, p < 0,001) a opět pozitivně ale silněji než u inferenčního souboru s NK (rho = +0,737, p < 0,001). K tomu lze ještě dodat pro ilustraci pohledem další metody, že komponenta vzestupu se podílí u obou souborů na asi 33.3% variability hodnot parametru CD3CD69 odpovídajícím jednotlivým sestupně seřazeným hodnotám parametru NK/CD3CD69, navíc u kontrolního souboru se komponenta poklesu podílí na asi 25% variability hodnot parametru NK odpovídajícím jednotlivým sestupně seřazeným hodnotám parametru NK/CD3CD69). Parametry NK a CD3CD69 navzájem statisticky signifikantně nekorelují ani na jednom z obou souborů (neparametrická Spearmanova korelace).

Určitá souvislost mezi počtem CD69 lymfocytů a CD4CD69 lymfocytů v periferní krvi a prognosou u nemocných s metastazujícími adenokarcinomy (karcinom prsu, kolorekta, ovaria) je známa již z předchozích studií – nižší počet lymfocytů s expresí CD69 byl dán do souvislosti s lepší prognosou, ale na druhé straně jejich vzestup po aktivní specifické imunoterapii byl ukazatelem dobré odpovědi na léčbu a tím i ukazatelem lepší prognosy.^{256, 257} Poměr počtu NK/CD3CD69 je na základě výše uvedených teoretických imunologických poznatků logicky efektivnějším ukazatelem těchto výše popsaných procesů než samotné CD69 lymfocyty vzhledem k tomu, že tyto mechanismy jsou u nádorů mnohdy zprostředkovány či jsou závislé na NK buňkách. Jako další nepřímý důkaz pro platnost tohoto konceptu lze uvést, že při použití protilátek proti molekule CD69 dochází u myší k rejekci NK-senzitivních tumorů.²⁵⁸ Pokud by se v dalších studiích na nezávislých souborech nemocných tento fakt potvrdil, je publikační výstup z této explorativní studie světově prvním, kde byl popsán možný

prognostický význam poměru NK/CD3CD69 u generalizovaného kolorektálního karcinomu či generalizovaného solidního nádoru vůbec.²⁵⁹

5.3. Role NK buněk v periferní krvi pro určení prognosy u generalizovaného kolorektálního karcinomu z pohledu výsledků této studie

Co se týče čitatele parametru NK/CD3CD69, tj. lymfocytů CD3-CD16+CD56+, byl jeho význam pro variabilitu celého parametru NK/CD3CD69, jak již zmíněno výše, větší na kontrolním souboru, který představoval nemocné s celkově horší prognosou. I s přihlédnutím k výsledkům signifikance AUC u ROC křivek pro NK buňky se lze domnívat, že pokles NK buněk v pozdějších fázích pokročilého nádorového onemocnění představuje další faktor nepříznivé prognosy, který je v podstatě „statisticky“ nezávislý na vzestupu CD3CD69. Kombinovaná informace vzniklá pak dáním těchto dvou parametrů do vzájemného poměru má silnou vypovídací hodnotu „napříč“ fázemi nádorového růstu u generalizovaného solidního nádoru (od částečně limitovaného až ke zcela nekontrolovanému) a s ním spojených různých mechanismů imunitní dysfunkce. Nejprve excesivní a chronická aktivace jejímž obrazem je vysoký CD3CD69 i při „normálních“ hodnotách NK buněk, které se na pozadí pravděpodobně „snaží bojovat“ až k fázi exhausce, spojené se „stabilizací nárůstu“ CD3CD69 (již „nemá růst kam“ a tedy určitá fáze plató při dosažení biologického limitu) přičemž ale i tato „fáze klidu CD3CD69“ spolehlivě devastuje organismus při rozvratu imunitních funkcí, ale především s relativním a později dokonce absolutním poklesem NK buněk, který nakonec „nabírá vrchu“ a dochází ke zhroucení „obránné hráze“ tvořené vrozenou imunitou tvořenou lymfocyty (tedy především NK buňkami).

Za hlavní efektory buněčné protinádorové imunity jsou považovány T buňky, které zprostředkovávají specifické odpovědi, avšak údaje ze zvířecích modelů nasvědčují tomu, že NK buňky participují v časných fázích protinádorové odpovědi a jsou

obzvláště efektivní v eliminaci metastáz nesených krevním proudem.^{260, 261} Naproti tomu T buňky jsou efektorové buňky zodpovědné za specifickou, dlouho trvající imunitu. NK buňky mohou kromě svých přímých protinádorových funkcí^{262, 263} i mobilizovat adaptivní imunitní odpověď přímo²⁶⁴ či, a to především, zprostředkovaně svým vlivem na zrání dendritických buněk^{265, 266} a poskytováním jim antigenního materiálu derivovaného z lýzy nádorových buněk.²⁶⁷ NK buňky tak mohou spolupůsobit v nádorovém mikroprostředí na posun rovnováhy z tolerogenních na imunogenní podmínky a podporou zrání DC změnit supresivní lokální prostředí a tím zvyšovat imunitní odpovědi a vést k eliminaci nádorových buněk.²⁶⁸

5.4. Role celkového počtu leukocytů v periferní krvi pro určení prognosy u generalizovaného kolorektálního karcinomu z pohledu výsledků této studie

Při hlubší analýze vztahu počtu všech leukocytů v periferní krvi (tj. nejen pouze segmentů) k celkovému přežívání lze na základě námi získaných výsledků rozdělit definiční obor počtu leukocytů na celkem 4 disjunktí podmnožiny s rozdílnou výpovědní hodnotou k prognose nemocných. Hodnoty leukocytů v intervalu $[8650; \infty)$ svědčí o nejhorší prognose, v intervalu $[3750; 6750)$ o prognose nejlepší. U hodnot leukocytů z intervalů $[600; 3750)$ a $[6750; 8650)$, pokud bereme v úvahu výsledky „*Indukce pravidel ...*“, je prognosa intermediární či spíše nejistá. Při srovnání přežívání nemocných s počtem leukocytů z těchto 2 intervalů (bez dalších kritérií tvořených jinými parametry) s přežíváním nemocných s počtem leukocytů v intervalu $[8650; \infty)$ vychází najevo, že z hlediska určení celkové prognosy všechny 3 intervaly vymezují skupiny nemocných bez statisticky signifikantního rozdílu v celkovém přežívání a že všechny 3 definují skupiny nemocných s horší prognosou oproti intervalu $[3750; 6750)$. U původního inferenčního souboru vymezuje počet leukocytů v intervalu $[8650; \infty)$ při srovnání přežívání nemocných s leukocyty v intervalu $[6750; 8650)$ skupinu nemocných s horší krátkodobou prognosou. K ověření platnosti těchto výsledků by však bylo třeba provést měření na souboru nemocných s mnohem větším počtem pozorování v jednotlivých intervalech, zejména v intervalu $[600; 3750)$. Na obou námi vyšetřovaných souborech je vzestup celkového počtu leukocytů v silné souvislosti se vzestupem počtu polymorfonukleárních elementů (komponenta vzestupu se podílí u obou souborů na asi 80% variability hodnot počtu polymorfonukleárů odpovídajícím

jednotlivým vzestupně seřazeným hodnotám celkového počtu leukocytů). Zajímavým zjištěním však je u obou souborů silně signifikantní pozitivní korelace mezi celkovým počtem leukocytů (tj. všech bílých krvinek v periferní krvi) a monocyty a do jisté míry rozporuplně i CD14CD16 buňkami. Pro inferenční soubor je neparametrická Spearmanova korelace mezi leukocyty a monocyty $\rho = 0,353$, $p = 0,006$ a mezi leukocyty a CD14CD16 monocyty $\rho = 0,429$, $p = 0,001$, na kontrolním souboru je pak tato korelace mezi leukocyty a monocyty $\rho = 0,569$, $p < 0,001$ a mezi leukocyty a CD14CD16 monocyty $\rho = 0,371$, $p = 0,014$. U celkových monocyty je takováto situace vysvětlitelná - a to i vzhledem k faktu, že nemocní v kontrolním souboru mají nižší medián celkového přežití - imunitní aktivací spojenou s postupujícím onemocněním, jež se projevuje i sklonem k vyššímu počtu monocytů v pokročilé fázi nádorového onemocnění. Trošku matoucí je však „pouze normální signifikance“ korelace leukocytů s CD14CD16 buňkami na kontrolním souboru. Může jít i o pouhý náhodný výkyv. Lze to snad i dát do souvislosti s faktem, že korelace mezi monocyty z krevního obrazu a CD14CD16 monocyty z fenotypu je rozdílná síla korelace na obou souborech (na inferenčním $\rho = 0,810$, $p < 0,001$, na kontrolním pak $\rho = 0,675$, $p < 0,001$). Lze jen spekulovat, zda jde tedy jen o výkyv vlivem náhody či o jev s biologickou kauzalitou. Obdobná korelace mezi celkovým počtem všech leukocytů a všech lymfocytů v periferní krvi pak na žádném z obou souborů není. V naší referenční laboratoři je pro celkový počet leukocytů v periferní krvi normální rozmezí 3800– 9400 cells/ μ l. Tyto výsledky můžeme interpretovat jako: 1. zhoršení prognosy nemocných s celkovým počtem leukocytů sníženým pod normální rozmezí, což by mohlo být vysvětleno především snížením polymorfonukleárů během chemoterapie, 2. zhoršení prognosy nemocných s celkovým počtem leukocytů v horní polovině normálního

rozmezí a nad normálním rozmezím, což je pravděpodobně hlavně projevem vzestupu počtu polymorfonukleárů v rámci systémové imunitní aktivace při pokročilém nádoru a eventuelně i v rámci koincidence infekce.

Alterace v periferním krevním obraze u nemocných s nádorovým onemocněním jsou již popsány v několika předchozích sděleních. *Ruka a kol.* v roce 2001 prokázali, že u 43% u nemocných se sarkomy měkkých tkání lze najít odchylky v rutinních krevních testech, častěji u pokročilého onemocnění, přičemž neutrofilie byla nejčastější (28.3% případů), následovaná leukocytosou (27.6%), poklesem hemoglobinu (25.5%), monocytosou (19.3%) a trombocytosou (14.5%).²⁶⁹ V případě neutrofilů je nutno vzít v úvahu, že jejich pokles bývá často indukován intenzivní protinádorovou terapií a že těžká neutropenie může být život ohrožující komplikací.²⁷⁰ Při dobré senzitivitě nádoru na léčbu a odeznění přechodného poklesu neutrofilů však může být celkové přežívání v takovém případě i zlepšeno. Na druhé straně vzestup neutrofilů v periferní krvi a zejména neutrofilie kombinovaná s lymfopenií (vzestup indexu neutrofilů/lymfocyty) byly opakovaně popsány jako negativní prognostický faktor a jsou častější u pokročilých nádorů.^{271, 272}

5.5. Role monocytů v periferní krvi pro určení prognosy u generalizovaného kolorektálního karcinomu z pohledu výsledků této studie

Výsledky této studie dále poukazují na souvislost monocytosy se špatnou prognosou nemocných s kolorektálním karcinomem metastazujícím do jater. Zvýšený počet monocytů v periferní krvi (nad 1050 cells/ μ l) se uplatnil jako prediktor špatné prognosy v několika modelech získaných „*Indukcí pravidel ...*“. V naší referenční laboratoři je pro celkový počet monocytů v periferní krvi normální rozmezí 150– 900 cells/ μ l. Pokud byl použit počet monocytů v periferní krvi jako jediný parametr k určení skupin pacientů s rozdílným celkovým přežíváním, jako cut-off hodnota vyšel počet 930 monocytů/ μ l, což zhruba odpovídá horní hranici normálního rozmezí. Validita tohoto výsledku je opět omezena nízkým počtem pozorování, a to zejména ve skupině s vyšším počtem monocytů.

Již výše bylo uvedeno, že korelace mezi monocyty z krevního obrazu a CD14CD16 monocyty z fenotypu je rozdílná síla korelace na obou souborech (na inferenčním $\rho = 0,810$, $p < 0,001$, na kontrolním pak $\rho = 0,675$, $p < 0,001$). Neparametrická Spearmanova korelace mezi celkovým počtem monocytů a CD14HLA-DR+ monocyty je pak na inferenčním souboru $\rho = 0,820$, $p < 0,001$ a na kontrolním souboru $\rho = 0,887$, $p < 0,001$. Neparametrická Spearmanova korelace mezi počtem CD14CD16 monocytů a CD14HLA-DR+ monocytů je na inferenčním souboru $\rho = 0,678$, $p < 0,001$, na kontrolním pak $\rho = 0,615$, $p < 0,001$. Na obou vyšetřovaných souborech je vzestup celkového počtu monocytů ve středně silné souvislosti se vzestupem počtu CD14DR buněk (komponenta vzestupu se podílí u obou souborů na přibližně 50% variability hodnot počtu CD14DR buněk odpovídajícím jednotlivým vzestupně

seřazeným hodnotám celkového počtu monocytů) a ve středně silné souvislosti se vzestupem počtu CD14CD16 buněk (komponenta vzestupu se podílí u původního inferenčního souboru na asi 50% variabilitě CD14CD16 buněk a u kontrolního souboru na asi 30% variabilitě CD14CD16 buněk odpovídajícím jednotlivým vzestupně seřazeným hodnotám celkového počtu monocytů).

Biologický význam a ambivalentní role buněk monocyto-makrofágového systému u pokročilého nádorového onemocnění byly již krátce diskutovány v teoretické části této teze. S nádorem asociované makrofágy (TAM) jsou polarizovány především k M2 fenotypu a mají několik s M2 fenotypem asociovaných pronádorových funkcí, včetně napomáhání angiogenezi, remodelování matrix a suprese adaptivní imunity.²⁷³ Tato protumorózní role TAM je dále dokumentována klinickými studiemi, které našli korelaci mezi vysokým zastoupením makrofágů ve stromatu tumoru a špatnou prognosu,²⁷⁴ a nepřímo i faktem, že nesteroidní protizánětlivé léky (modelově bývají zmiňovány především COX-2 inhibitory) redukuje nejen riziko výskytu některých nádorů, ale zdá se, že snad částečně v určitých situacích i rychlost jejich progresu. Vedle cytokinů se podílí na funkční polarizaci makrofágů k M2 fenotypu i různé chemokiny^{275, 276} a například i glukokortikoidy a vitamin D3. Polarizované makrofágy se liší navzájem expresí receptorů, efektorovými funkcemi a svojí produkcí cytokinů a chemokinů. Například u M1 makrofágů je metabolismus aminokyseliny argininu charakterizován vysokými hladinami indukibilní NO syntázy (iNOS), avšak u M2 polarizovaných makrofágů převládá metabolická dráha arginázy s produkcí ornithinu a polyaminů. Klíčovou vlastností polarizovaných makrofágů je pak rozdílná produkce cytokinů. M1 fenotyp zahrnuje produkci IL-12 a TNF, avšak M2 makrofágy v typickém

případě produkují IL-10, IL-1ra (IL1 receptor antagonist) a IL-1 decoy receptor typu II. Také chemokinová síť (receptory i ligandy) je u polarizovaných makrofágů rozdílně modulována. Dostupné informace nasvědčují tomu, že M1 makrofágy jsou potentními efektorovými buňkami, které zabíjejí mikroorganismy a nádorové buňky a produkují velké množství prozánětlivých cytokinů, zatímco M2 makrofágy utlumují zánětlivou odpověď a Th1 adaptivní imunitu, požírají tkáňové úlomky a podporují angiogenezi a remodelaci a reparaci tkání. TAM vznikají rekrutací monocytů z obvodové krve, *in situ* proliferace makrofágů v místě nádoru u lidí je minimální.²⁷⁷ Nádory jsou obecně charakteristické tím, že produkují konstitutivně takové chemokiny, které jsou v normálních tkáních klasifikovány jako inducibilní či zánětlivé.²⁷⁸ K rekrutaci makrofágů v tumoru může pak obzvláště přispět produkce VEGF a M-CSF nádorem, které napomáhají migraci a přežití makrofágů.^{279, 280, 281} Tyto různé látky produkované nádorem však nepůsobí jen na migraci buněk monocyto-makrofágového systému do místa nádoru, ale i změnu jejich funkcí s profilem směrem k M2 fenotypu (včetně vlivu na angiogenezi a remodelaci matrix stromatu). V místě nádoru se pak namigrované monocyty diferencují pod vlivem IL-10 a TGF- β (produkovanými nádorem i samotnými okolními makrofágy) ve zralé makrofágy a blokuje se jejich diferenciace směrem k dendritickým buňkám. Tento efekt IL-10 na diferenciaci monocytů pak může spolurozhodovat a o vzájemné rovnováze mezi TAM a s tumorem asociovanými dendritickými buňkami (TADC) v místě nádoru. TAM jsou funkčně obdobné makrofágům polarizovaným k M2 fenotypu (mají omezenou cytotoxicitu k nádorovým buňkám, naopak napomáhají proliferaci nádorových buněk a jsou chabými producenty NO, exprimují ve vysokém množství receptory pro mannosu a špatně prezentují antigeny, jejich cytokinový profil je: vysoký IL-10 + nízký IL-12).

Svojí expresí fenotypu shodnou s M2 polarizovaným makrofágy participují s nádorem asociované makrofágy (TAM) na procesech jež regulují růst nádoru, jeho progresi, supresi adaptivní imunity, formaci nádorového stromatu a angiogenezi. TAM jsou klíčovou komponentou v zánětlivých procesech, které napomáhají progresi nádoru a jeho metastazování.^{282, 283} Z tohoto pohledu navození stavu chronického zánětu u pokročilého nádorového onemocnění jsou pak buňky monocyto-makrofágového systému rozhodujícími pro další vývoj nádoru a tedy i pro osud organismu jako celku. Monocytosa v periferní krvi u pokročilých nádorů je pak dlouho známým jevem, který je projevem dalšího kroku monocyto-makrofágového systému směrem k podpoře progresu tumoru, tentokrát na úrovni organismu jako celku, a je v korelaci se špatnou prognosou. Mechanismem je vytvoření tumor-distálního kompartmentu monocytů/makrofágů. Vlivem jejich supresorových funkcí dochází k navození stavu sekundární imunitní dysfunkce nejen lokálně, ale i na systémové úrovni, jak bylo již popsáno v teoretické části této práce.

5.6. Role dalších lymfocytárních subpopulací v periferní krvi pro určení prognosy u generalizovaného kolorektálního karcinomu z pohledu výsledků této studie

Vztahy počtu lymfocytů či jejich subpopulací v periferní krvi k prognose nádorového onemocnění se zdají mít dosti komplexní charakter. Podobně jako neutrofilů i lymfocyty jsou ovlivněny průběhem protinádorové terapie, přičemž ale výsledky vlivu terapie souvisí se vstupními hodnotami lymfocytů,²⁸⁴ vliv léčby může u některých lymfocytárních subpopulací způsobit i vzestup.²⁸⁵ Navíc proces regenerace neprobíhá u všech lymfocytů shodným tempem,^{286, 287} což působí jako další faktor celkové heterogenity alterací lymfocytárních subpopulací v periferní krvi u nádorového onemocnění. Použitelnost různých lymfocytárních populací k určení prognosy nemocných s nádorovým onemocněním vyplývá z několika předchozích prací.^{288, 289, 290,}

²⁹¹ V této studii byla kromě již výše diskutovaných CD3CD69 v kombinaci s NK buňkami ukázána souvislost s prognosou dále jen u počtu CD3CD8 lymfocytů v kombinaci s počtem CD14CD16 monocytů či celkovým počtem leukocytů a to vždy v kontextu dalších pravidel s jinými parametry, tedy ne pouze samostatné CD3CD8 lymfocyty. Podobně jako u parametru CD3CD69 i v případě CD3CD8 lymfocytů je zvýšení jejich počtu příspěvkem k definování pravidla k určení skupiny nemocných s horší prognosou. Je možné vznést hypotézu, že tento vzestup počtu CD3CD8 lymfocytů v periferní krvi je spojen s jejich sníženou funkcí a že je tedy v podstatě dalším projevem excesivní systémové imunitní aktivace a s ní spojené imunitní dysfunkce, tedy zcela konkrétně například se snížením funkce CD3CD8 lymfocytů způsobenou signálními defekty v TCR/CD3 komplexu a dalšími funkčními alteracemi T a eventuelně i NK buněk.

Pro zajímavost uvádím i šetření zaměřené na skutečnost, jestli koresponduje zvýšení počtu CD3CD8 lymfocytů se zvýšením počtu „časně aktivovaných“ T lymfocytů vyjádřeném vyšší hodnotou parametru CD3CD69. Neparametrická Spearmanova korelace mezi počtem CD3CD8 a CD3CD69 lymfocytů je na inferenčním souboru $\rho = 0,598$, $p < 0,001$, na kontrolním souboru pak Spearmanova korelace vychází nesignifikantně a tyto 2 parametry tedy nejsou na kontrolním souboru ve vzájemné korelaci. Následně byl pro oba tyto parametry použit opět postup generování komponent variability hodnot parametru CD3CD69 odpovídajících jednotlivým vzestupně seřazeným hodnotám počtu CD3CD8 lymfocytů a naopak - komponent variability počtu CD3CD8 lymfocytů odpovídajících jednotlivým vzestupně seřazeným hodnotám parametru CD3CD69. Vyšla pouze slabá závislost variability CD3CD69 na vzestupu CD3CD8 (na původním inferenčním souboru komponenta trendu vzestupu s podílem na variabilitě CD3CD69 asi 16.5%, na kontrolním souboru komponenta vzestup-pokles s podílem na variabilitě CD3CD69 asi 23%) a slabá závislost variability CD3CD8 na vzestupu CD3CD69 pouze na původním inferenčním souboru (komponenta trendu vzestupu s podílem na variabilitě CD3CD8 asi 13.5%). Relace mezi zvýšením počtu CD3CD8 lymfocytů a „časnou aktivací“ T lymfocytů v periferní krvi vyjádřenou přítomností molekuly CD69 na jejich povrchu (a tedy systémovou imunitní aktivací) se proto zdá být pouze slabá až středně silná, avšak oba tyto jevy přispívají pravděpodobně ke zhoršení prognosy nemocných s kolorektálním karcinomem metastazujícím do jater. Je možné opět jen spekulovat jestli oba tyto jevy pak nějak biologicky kauzálně souvisí a jakými mechanismy je rozhodováno v organismu o „cestě“ imunitní dysfunkce projevující se změnami těchto subpopulací lymfocytů v periferní krvi u generalizovaného kolorektálního karcinomu.

I některé z dalších parametrů fenotypu leukocytů periferní krve, které vycházely hraničně signifikantně či sice signifikantně, ale jenom na některém ze souborů, v analýze přežití či při analýze ROC křivek by mohly mít biologickou úlohu pro prognosu nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinomem, avšak v této studii se tento jejich vztah s prognosou vlivem výběru a různých dalších bias nepodařil prokázat. Nicméně lze jen doporučit, aby v případě opakování takto konstruované studie vyšetřující vztahy fenotypu leukocytů periferní krve a prognosy nemocných se solidními nádory byly i tyto „hraniční“ parametry zahrnuty do explorativních analýz. V případě prospektivně designované studie bych však navrhol použít pouze parametrů, které vyšly jasně signifikantně na všech souborech této studie (ale i včetně výsledků indukce pravidel), a je nutno počítat s tím, že se může prokázat, že i silně signifikantně vycházející výsledky studie prezentované v této tezi jsou nevalidní pro jiný soubor (tj. jinou selekci ze stejné populace) či dokonce jinou populaci nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinomem. Pravděpodobnost toho, že tyto výsledky jsou validní, by však měla (vzhledem k použití různých manipulací ke zvýšení validity a přísných kritérií signifikance použitých v této studii) být vyšší než pravděpodobnost toho, že jsou nevalidní.

5.7. Vztahy k jiným prognostickým parametrům u generalizovaného kolorektálního karcinomu

Vzhledem k důvodům vysvětleným v teoretické části této teze pojednávající o současném stavu prognostických faktorů u generalizovaného kolorektálního karcinomu je obtížné stanovit některý z nich či malou skupinu z nich jako „zlatý standard“, k němuž by šlo kandidátské prognostické faktory vygenerované v této studii vztáhnout či který by šlo použít pro stratifikaci nemocných a použít ho i jako kovariantu v multivariantní analýze či jako další proměnnou při indukci klasifikačních pravidel. Je nutné znovu připomenout skutečnost diskutovanou podrobněji v teoretické části této teze, že jestliže je současná literatura zabývající se prognostickými kolorektálního karcinomu obecně, ve všech stádiích, v mnohém nedostatečná, fragmentovaná a nesoustavná, zaměřující se na módní trendy nových technologií a nehodnotící spolehlivě data nashromážděná za delší časové období metodami „starými“, pak u generalizovaného nádoru je situace ještě řádově horší. Studie se zaměřují pouze na minoritu nemocných s resektabilním onemocněním a i zde není vyjasněn význam alespoň těch parametrů, které se zdají být signifikantní u kolorektálního karcinomu obecně, vyplívajících z jeho biologických rysů. Spolehlivé hodnocení větší skupiny prognostických faktorů pro generalizovaný kolorektální karcinom plně vycházející ze zásad „evidence-based medicine“ v podstatě neexistuje. Proto i jakákoliv stratifikace dle již prokázaných signifikantních faktorů je arbitrární a teoreticky může být hluboce zavádějící. Nyní jsme ve fázi shromažďování dat vztahujících se k novým metodám léčby generalizovaného kolorektálního karcinomu a k jejich vzájemným kombinacím. Většina studií zabývajících se touto problematikou je tedy nutně spíše pouze deskriptivních a provedené analytické studie mají omezenou validitu, snadno

zpochybnitelnou provedením studie další, ať již založené na stejné či rozdílné metodice. Informace tohoto druhu v současné běžné klinické praxi nejcitelněji chybí v situacích, kdy je třeba rozhodnout o indikaci zahájení či ještě častěji pokračování nákladné a často i toxické systémové léčby, o přesné indikaci kurativních resekcí v situaci většího hepatálního a především omezeného extrahepatálního postižení a o indikaci cytoredukčních metod dosahujících lepšího paliativního efektu než samostatná systémová léčba u neresekabilního postižení. Pro všechna tato rozhodnutí by bylo žádoucí znát relevantní prediktivní a prognostické faktory, nejlépe několik faktorů, navzájem nezávislých. Celá situace je objektivně komplikována jednak obrovskou biologickou heterogenitou pokročilého kolorektálního karcinomu a je navíc umocněna i značnou heterogenitou v léčebných postupech užitých u toho kterého nemocného s generalizovaným kolorektálním karcinomem, což je dáno v posledním desetiletí především množstvím nových účinných léků, které mnohdy mění i prognosu nemocných s touto diagnosou, a požadavkem na individualizaci protinádorové léčby. Z těchto důvodů byla tedy objektivně předem dána největší slabina celé této prezentované pilotní explorativní studie - „nedostatečně přesně definovaný“ soubor nemocných, tj. chybějící popis faktorů, které mohly mít vliv na prognosu, u každého nemocného ve vyšetřovaném souboru. Nejcitlivějším z hlediska interpretace těchto výsledků je tedy fakt, že jejich maximální teoreticky dosažitelná spolehlivost jakožto nutný předpoklad pro jejich užití v praxi by byla možná jen v případě aplikace na populaci nemocných s charakteristikami obdobnými jako byla vyšetřovaná populace včetně identických postupů léčby, což však již nelze z objektivních důvodů v podstatě dosáhnout a nelze takovouto populaci ani jednoduše popsat. Tato „nepřesná definovanost“ vyšetřovaného souboru nemocných je pak i dána samozřejmě pracností a

vzhledem k malému počtu nemocných z něho vyplívající výslednou „atomizací“ na statisticky spolehlivě nehodnotitelné skupiny. Tedy za cenu velkého úsilí šlo teoreticky dosáhnout spíše zhoršení podmínek pro validní statistické šetření.

Oba dva důvody tedy přispívají k tomu, že možný prognostický význam fenotypu leukocytů periferní krve u nemocných s kolorektálním karcinodem metastazujícím do jater byl v této studii vyšetřován izolovaně od jiných prognostických faktorů a na nedostatečně stratifikované populaci nemocných dle jejich léčby a dalších základních charakteristik.

To je pravděpodobně závažnější překážkou pro zevšeobecnitelnost a reprodukovatelnost výsledků této studie než její samotný design jakožto retrospektivní studie na relativně malém počtu nemocných.

Nicméně lze i doufat, že takovýto „přirozeně“ heterogenní zdroj dat by v případě „biologické robustnosti“ výsledků (tedy biologicky danou širokou přenositelností definovaných „imunitních parametrů“ napříč celé skupiny všech nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinodem) mohl být spíše s výhodou, protože modeluje lépe než nějakým způsobem vyselektovaná homogenní skupina nemocných „realitu klinicky-onkologické praxe“ a svým způsobem, z čistě statistického pohledu na věc, tedy zabraňuje overfittingu na „vedlejší“ prognostické faktory.

Po těchto obecných úvahách se pokusím alespoň částečně, nepřímou, ukázat na některé teoreticky možné vztahy těchto kandidátských prognostických faktorů k jiným, na této studii nezávislým, prognostickým faktorům generalizovaného kolorektálního karcinomu.

Pokud se týče postavení těchto kandidátských prognostických faktorů vzhledem k „jedinému ověřenému“ laboratornímu prognostickému faktoru, tj. sérové hladině CEA, je nutné si uvědomit především jejich výhody a nevýhody.

CEA je zde déle a má vlivné obhájce v etablovaných klinických kruzích, i když jeho obliba spočívá spíše v tradici a absenci alespoň jediného kvalitního biomarkeru k monitorování odpovědi na systémovou léčbu a k určení prognosy u generalizovaného kolorektálního karcinomu. Nejnovější doporučení Americké společnosti klinické onkologie (ASCO 2006) pro užití nádorových markerů u gastrointestinálních nádorů nazírají na CEA jako na jediný marker vhodný k monitoraci metastatického kolorektálního karcinomu v průběhu systémové terapie („marker of choice“)²⁹² a dle tohoto doporučení by měl být CEA měřen na začátku léčby metastatické choroby a každé 1-3 měsíce během aktivní léčby, přičemž perzistentně stoupající hodnoty nad bazální hladinu by měly být podnětem k restagingu, ale definují progredující chorobu dokonce i při absenci progresse dokumentovatelné zobrazovacími vyšetřeními. Poté je ještě upozorněno na možný falešně pozitivní vzestup hladiny CEA 4-6 týdnů po zahájení nové terapie, především vídaný u léčby oxaliplatinou.²⁹³ V pasážích vysvětlujících racionální pozadí tohoto doporučení je však uvedeno, že jsou v situaci stoupajícího CEA určité výjimky, a že samotný vzestup CEA „sám o sobě v průběhu chemoterapie“ by neměl být uvažován jako evidence pro progresi choroby,^{294, 295} obzvláště po zahájení chemoterapie. Navíc vzestup CEA asociovaný s chemoterapií může být vztahován k poruchám jaterních funkcí navozených léčbou.

CEA není v některých situacích dobrý diskriminátor prognosy či progresse choroby. Nejedná se o neužitečný parametr, avšak v určitých klinických situacích jasně selhává v diskriminaci či přínosu nové informace. V takovýchto situacích v současné klinické

praxi nastupuje po přihlédnutí k dalším informacím získaných z jiných vyšetření a subjektivních potíží nemocného, včetně jeho výkonnostního stavu, které ale většinou nepomohou rozhodnout, již pouze empirie, vlastní zkušenost, intuice. Krátce řečeno, v klinické praxi je často naprostý deficit na subjektu lékaře i pacienta nezávislých informací se vztahem k prognose a z toho plynoucí absence možnosti objektivního racionálního rozhodování a pak tedy nastupuje subjektivismus. Stabilní vysoká hladina či vzestup CEA při progresi generalizovaného kolorektálního karcinomu v průběhu chemoterapie je udávána u asi 80 % nemocných, přičemž u 20 % nemocných s jasnou progresí dle zobrazovacích metod hladina CEA v séru klesá či zůstává nadále nízká.²⁹⁶ Naopak byla spíše ukázána relativně silná diskriminační schopnost CEA v situacích, kdy je potřeba vyločit progresi generalizovaného kolorektálního karcinomu – nemocní s poklesem hladiny CEA po 1. cyklu chemoterapie FUFA alespoň o 50% vstupní hodnoty CEA před zahájením paliativní systémové chemoterapie mají signifikantně vyšší počet parciálních či kompletních remisí,²⁹⁷ přičemž objektivní odpověď na 1. linii paliativní chemoterapie FUFA je sama o sobě markerem lepší prognosy.²⁹⁸ Tyto fakta o diagnostické výkonnosti sérového CEA u generalizovaného kolorektálního karcinomu v průběhu léčby chemoterapií souhrnně dokumentují nálezy další studie, která vyšetřovala vztah trendů v hladinách sérového CEA a objektivní odpovědi na chemoterapii dle CT po 8 týdnech. Pro 30% práh poklesu CEA byla pozitivní prediktivní hodnota 53,8 % a pro 50% práh poklesu CEA byla pozitivní prediktivní hodnota 60,0 % v testu postaveném k predikci odpovědi nádoru na CT hodnocených podle RECIST kritérií, přičemž při pátrání po cut-off hodnotě CEA vhodné k určení progresu při vzestupu CEA s požadavkem na pozitivní prediktivní hodnotu více než 90

% byl jako vhodný určen 200 % vzestup CEA oproti vstupní hladině. Vzestup CEA o 100 % pak byl v signifikantním vztahu s celkovým přežitím ($p = 0,0023$).²⁹⁹

Samotná, jedenkrát odebraná hladina CEA v séru nemá u generalizovaného kolorektálního karcinomu žádný prognostický význam. U CEA je důležitý trend vzestupu (či spíše poklesu) a to vždy jen u části nemocných, kteří jsou „sekretoři“, což je však pojem, který silně závisí s volbou cut-off hodnoty pro měření sérového CEA (tj. zvýšení je uváděno při cut-off bodu pro CEA = 4 ng/ml u asi 85% nemocných s metastatickým kolorektálním karcinomem,³⁰⁰ avšak jen u 51 % při předělovém CEA = 10 ng/ml – *Hanke a kol.* 2001). K tomu je nutné zmínit, že například kuřáci mají běžně 1,5-násobnou hladinu CEA oproti nekuřákům (což představuje medián CEA 6,2 ng/ml u mužů a 3,4 ng/ml u žen)³⁰¹ a že existuje množství nenádorových onemocnění, která zvyšují CEA na hodnoty přibližně mezi 10-20 ng/ml (peptický vřed, gastritida, chronická obstrukční choroba plicní, diabetes mellitus, nemoci jater a v podstatě jakýkoliv stav akutního či chronické zánětu). Ke zvýšení CEA může dojít i pouze vlivem střevní obstrukce při ponechaném primárním tumoru či jeho lokoregionální recidivě či v rámci pooperačních vazivových srůstů s rozvojem ileosního stavu.³⁰²

Sérové CEA je tedy jako prognostický či prediktivní faktor u generalizovaného kolorektálního karcinomu v určitých situacích užitečný, nicméně je třeba sledovat více jeho hodnot a přihlížet k jeho nízké vypovídací hodnotě v počátku zahájení chemoterapie a v době toxicity chemoterapie, navíc je určitá skupina nemocných (minimálně cca 20 %), u kterých CEA není při generalizaci kolorektálního karcinomu vůbec zvýšeno. V této studii vygenerované kandidátské prognostické faktory založené na fenotypu leukocytů periferní krve, by pak v těchto situacích mohly CEA teoreticky nahradit. Vzhledem k tomu, že se jedná o parametry většinou související se systémovou

imunitní aktivací, je jejich biologická podstata jiná než u CEA. Lze i předpokládat, i když pro to není přímá opora v žádných datech ani v současné literatuře, že existuje možnost, že tato systémová imunitní aktivace je jevem korelujícím s masou tumoru v organismu pouze částečně. Zcela jistě hraje „fáze“ růstu nádoru nějakou roli i při míře chronické imunitní aktivace a imunitní odpovědi obecně, včetně dysfunkce imunitního systému v terminálních fázích onemocnění, avšak korelace těchto jevů ve srovnání s korelací hladiny sérového CEA s masou tumoru v organismu by mohla být slabší. Je nutné si uvědomit, že v případě fenotypu leukocytů periferní krve jde o parametry vypovídající o odpovědi složitého systému (imunity) na silný tlak na jeho fungování, kdežto u CEA jde o parametr vypovídající především o množství nějaké látky (konkrétně jde o glykovaný protein z velké imunoglobulinové rodiny, svou funkcí pravděpodobně se vztahem k adhezním molekulám) uvolňované tumorem. To je teoreticky obrovská možnost pro získání informací takového typu, které není schopno podat ani řada jiných prognostických faktorů u generalizovaného kolorektálního karcinomu - pokud bych uvažoval jen o těch nejvalidnějších – ALP, bilirubin a AST vypovídají nejspíše jen o míře postižení jaterního parenchymu, ALP eventuelně i o postižení kostí (tyto informace získám však ještě lépe ze zobrazovacích metod), LDH vypovídá o celkové (již obrovské) mase tumoru a je ve vztahu s anaerobním metabolismem a CA 19-9 je také jen látka uvolňovaná (někdy) nádorem do cirkulace. Na druhou stranu podobný druh informací jako fenotyp může teoreticky poskytovat z ostatních dříve studovaných prognostických faktorů celkový počet leukocytů, výkonnostní stav organismu a částečně i CRP v kombinaci s albuminem (částečně je možno na ně nazírat jako na marker rozsahu postižení jater, avšak to až při jejich masivní postižení, CRP je však především reaktant akutní fáze zánětu a lepší vypovídací

hodnotu beroucí do úvahy tuto ambivalenci „játra versus proteiny akutní fáze“ bude mít tedy jejich poměr – viz. i práce Glasgowské skupiny). Hemoglobin a trombocyty jsou pak jaksi stranou této „klasifikace“ či z jiného úhlu pohledu možná i na pomezí obou skupin (souvislost alterací metabolismu Fe s chronickou imunitní aktivací, souvislost trombocytů s VEGF a jeho vlivy na imunitu). Výhodou fenotypu je však jeho „větší složitost“ a tím pádem teoreticky lze od této relativně velké množiny parametrů očekávat větší citlivost v diskriminaci množství variant a situací vyplývajících z heterogenity samotného nádoru i odpovědi organismu na něj a to i s přihlédnutím k obrovské dynamičnosti těchto vztahů, a zároveň i lze očekávat i větší flexibilitu v konstrukci diagnostických testů na různé klinické otázky a rychlejší získání potřebných informací.

Co považuji za velmi důležité zdůraznit (i když je to již uvedeno v popisu postupu statistického zpracování), je fakt, který staví objektivní kvalitu této studie a jejích výsledných kandidátských prognostických faktorů u generalizovaného karcinomu kolorekta ve srovnání s třeba i většími studiemi na „klasické“ prognostické markery do nadprůměru, a to sice, že nezávislé proměnné byly v regresní analýze vyšetřovány jako kontinuální proměnné. Jedná se o postup statistického zpracování, který je teoreticky velice žádoucí, i když publikačně silně nevděčný a tedy téměř nepoužívaný. Má teoreticky mnoho předností před vyšetřováním kategorických nezávislých proměnných vytvořených z „přirozeně“ kontinuálních číselných parametrů stanovením nějaké arbitrární hranice/hranic sloužících k diskretizaci této proměnné. V univariantské analýze přežívání srovnávající přežívání podskupin nelze postupovat jinak, avšak v (multivariantské) regresní analýze se jedná o postup vnášející do situace zbytečné

zdroje chyb a falešně pozitivních i negativních výsledků. Je příznačné, že postup zvolený při volbě takovéto arbitrární hranice je ve většině studií na prognostické faktory cudně zamlčen. Mnou zvolený „striktnější“ postup sice možná při nižším počtu nemocných „minul“ některou biologicky významnou informaci ve fenotypu ve vztahu k prognose avšak má výhodu v tom, že dovoluje vyhodnocení pomocí ROC křivek a volbu „optimálního“ cut-off bodu až dodatečně dle klinikem volené otázky. To umožňuje i objektivní srovnání diagnostické přesnosti a výkonnosti testu, které je v případě kategoričných proměnných možný jen v případě volby „stejných cut-off bodů“ určených apriorně. Jedná se i o postup zaručující jaksi mimochodem přirozeně větší míru validity a především reprodukovatelnosti dosažených výsledků, protože není tak závislý na laboratorní metodice jednoho jediného pracoviště (která většinou ani nelze přesně do detailu popsat) a „jejího“ cut-off bodu a s tím spojených zdrojů chyb v preanalytické i analytické části měření. Jedná se pak o postup, který je nyní jednoznačně doporučován u všech studií na prognostické faktory, které aspirují na získání alespoň nějaké informace užitečné i pro jiné nezávislé studie na toto téma provedené v budoucnu.

5.8. Úvahy zaměřené na design studie, použité metody statistického zpracování a z toho vyplývající interpretaci výsledků

U postupů, které byly použity pro statistické hodnocení, je nutné zmínit, že jediné správné ověření dosažených výsledků s nižší validitou danou volbou designu studie a počtem provedených měření a vyšetřených nemocných, je problematické vzhledem k nutnosti opakování stejně postavené studie na nezávislém vzorku nemocných z podobné populace (v ideálním případě prospektivní kohortové prognostické studie). Praktickou překážkou není jen otázka peněz a pracnost opakování/rozšíření takovéto studie, ale i další objektivní příčiny. Vzhledem k přírodou objektivně danému množství lidí, kteří touto chorobou onemocní a k zavedenému systému zdravotní péče v západních civilizacích, lze říci, že z hlediska nákladů a počtu nemocných byla tato pilotní explorativní retrospektivní studie s prospektivně sbíranými daty kandidátského diagnostického testu (s apriorně určeným panelem protilátek užitých při průtokové cytometrii vybraných na základě teoretických poznatků nádorové imunologie 90-tých let 20. století) a s retrospektivním sběrem dat celkového přežití i z pohledu celosvětových měřítek standardní unicentrickou studií na prognostické markery u nemocných s nádorovým onemocněním. O provedení takovéhoho šetření prospektivně je sice možno teoreticky uvažovat, avšak „odborným“ (medicínským, statistickým) limitem by byly především počty měření na unikátních nemocných dosažitelné unicentricky či v případě multicentricity designu takovéto studie pak obrovské nehomogenity vnesené do celé situace především biologickými rozdíly v jednotlivých populacích a rozdílnými metodami měření na jednotlivých pracovištích (obecně řečeno všechny teoreticky myslitelné chyby preanalytické i analytické fáze), což by pak vytvářelo tlak na řádově vyšší počty celkově vyšetřených nemocných (odhaduji, že

minimálně v řádu stovek, spíše však tisíců vyšetřených unikátních nemocných). V případě multicentrického designu takovéto další studie by pak adekvátním statistickým postupem bylo užití řádově složitějších postupů k hodnocení diagnostické přesnosti/výběru optimálních regresních modelů, které jsou vyvíjeny statistiky především pro radiodiagnostiky (zejména multireader/multirated, correlated ROC curves). Z těchto důvodů je v realitě vysoce pravděpodobné opět rozhodnutí o provedení opakovaných (longitudinálních) měření na stejných nemocných a je i vysoce pravděpodobné, že se bude jednat spíše opět o unicentrickou studii. Další komponentou komplexity celého studovaného problému v realitě je pak fakt, že se jedná o vyšetřování dat přežívání. Hodnocení přesnosti diagnostických testů v situaci longitudinálních měření s cenzorovanými daty přežívání je možno provést „statisticky čistě“ pouze metodami časově-závislých ROC křivek. To je metodika, která je velice atraktivní (nejen hodnocení přesnosti testu v různých časových bodech longitudinálních měření s vyšetřením vlivu na prognosu a výběr časově závislých optimálních cut-off bodů, ale i „obráceně“ možnost použití časově-dependentních ROC křivek k výběru vhodných regresních modelů s kriteriem optimality daným AUC časově-dependentních ROC křivek místo R kvadrátu), teoreticky již dnes možná (v současné realitě však pouze velmi nedokonale, zatím jsou teprve vyvíjeny postupy a metody takovýchto statistických šetření a téměř vždy mají určité „matematikou“ diktované limity, které znemožňují jejich smysluplné širší použití v běžné praxi), avšak pouze u prospektivních kohortových studií. V současné době tedy neexistuje ověřená statistická metoda, která by byla schopna „statisticky čistě“ provést takovéto vyšetřování přežívání s longitudinálním měřením nezávislých proměnných v případě retrospektivní studie. V současné situaci vědeckého poznání a metod je tedy vysoce pravděpodobné, že bude

provedena maximálně další retrospektivní studie s obdobným designem a postupem statistického zpracování jako je tato prezentovaná, avšak na jiných souborech nemocných, což by mělo zajistit vyšší míru jistoty o validnosti a klinické užitečnosti v této tezi prezentovaných výsledků. Tento postup k ověření validity je však z hlediska statistiky nedokonalý a z hlediska potřeb klinické medicíny nedostatečný. Nicméně jedná se o současnou realitu vědecké práce na prognostických faktorech generalizovaných solidních nádorů v celosvětovém měřítku, jak i dokumentuje přehled o známých prognostických faktorech u generalizovaného kolorektálního karcinomu prezentovaný v teoretické části této teze. Souhrnem lze tedy říci, že retrospektivní design této naší studie a použité postupy k ověření validity výsledků jsou tedy samozřejmě z „čistě statistického“ hlediska relativně jednoduše napadnutelné, avšak většina ostatních studií zabývajících se prognostickými faktory u nádorových onemocnění publikovaných k současnému datu je také retrospektivních a nesnaží se ani o takovou míru ověření validity (i když nedokonalou) jaká byla prezentována v této naší pilotní explorativní studii hledající nové prognostické faktory u generalizovaného kolorektálního karcinomu.

Toho, že všichni cenzorovaní nemocní byli vždy na „jedné straně“ šlo sice s výhodou užít při vyšetření ROC křivek (simplifikace na variantu bez cenzorovaných dat), avšak mohlo by to být v některých případech omezením pro validitu log-rank testu užitého v univariální analýze přežívání. Jedná se o neproporcionální rozložení cenzorovaných, jinými slovy o závislost toho, jestli jedinci budou cenzorováni, na jejich celkovém přežití. Je to dáno nejspíše vlivem určité selekční bias, i když obtížně takto zpětně definovatelné. Nicméně tento možný nepříznivý vliv na validitu měření je snad částečně

zmenšen provedením Weibullový regrese analýzy a nevybráním pouze těch parametrů, které byly signifikantní v univariální analýze dle Kaplan- Meier metodiky s log-rank testem. Lépe „obejít“ tento nedostatek by šlo teoreticky použitím jiných testů (např. permutačních testů) místo log-rank testu pro srovnání přežití mezi skupinami, avšak to nejsou metody běžně dostupné v statistických programech a dopad na celkové výsledky to má s největší pravděpodobností minimální. Univariální analýza s log-rank testem byla v podstatě použita pouze pro první hrubé vyselektování nesignifikantních parametrů fenotypu. Navíc byl užít i zevšeobecněný Wilcoxonův test.

Mnoho problémů, které jsou spojeny s vývojem diagnostického/prognostického testu je uvedeno v stati pojednávající o vývoji screeningových testů od *Bakera a kol.*³⁰³ K této tezi relevantní jsou především pasáže vztahující se k možným postupům k zajištění validity testů obecně a především k zdrojům overfittingu modelů na konkrétní data vyšetřovaného souboru a k postupům k jeho zmenšení. Jedná se o záležitosti matematicky mnohdy velmi složité a také pracné a téměř vždy vyplývající z boje s malým počtem měření či vyšetřených individuálních nemocných. Nicméně sama velikost studie nemusí být zárukou vyloučení bias a i malá studie může podat kvalitní informace typu generování hypotéz v explorativních šetřeních, pokud jsou uspokojivě ve všech fázích identifikovány a snižovány/eliminovány (nebo alespoň dostatečně popsány) různé zdroje chyb/bias. K tomuto asi nejlépe článek *Ransohoffa*³⁰⁴ pojednávající nejen o různých druzích bias, ale i o designu klinických studií na molekulární markery. Zárukou vyloučení bias způsobujících „vnitřní“ nevaliditu studie pak není kromě většího počtu vyšetření ani průkaz reprodukovatelnosti testu („vnější“ validity) a způsob provedení statistické analýzy. Jak již zmíněno výše, za hlavní zdroj

bias a z nich plynoucích omezení „vnitřní“ validity studie prezentované v této tezi je možno považovat „nedostatečnou definici“ vyšetřovaného souboru nemocných (či snad ještě lépe řečeno, jeho velkou heterogenost a nemožnost provedení smysluplné stratifikace při absenci nějaké rozumně velké skupiny dalších validních prognostických parametrů známých a ověřených z jiných nezávislých studií na prognostické faktory u generalizovaného kolorektálního karcinomu).

Při interpretaci je nutno postupovat velmi opatrně s jakoukoliv extrapolací výsledků této studie na populaci odlišnou od charakteristik zdrojové populace a lišící se způsobem výběru nemocných z této populace k vytvoření vyšetřovaného vzorku populace (nelze třeba zcela jistě bez rizika aplikovat na pouze nemocné, kteří jsou kandidáty na primární resekci jater). Vyšetřovaný vzorek byl vytvořen „náhodným“ výběrem nemocných léčených mezi lety 1998 až 2002 na klinicko onkologické ambulanci univerzitní nemocnice a s alespoň nějakou jistotou by tedy šlo výsledky aplikovat pouze na vzorek vybraný z obdobné populační skupiny nemocných. Nutno zdůraznit, že šetření bylo provedeno v době nástupu nových režimů chemoterapie (irinotecan, oxaliplatin, raltitrexed, capecitabin), ale před nástupem užití biologické léčby kolorektálního karcinomu do běžné klinické praxe.

6. Závěr

Úkolem tohoto šetření bylo provést explorativní analýzu možností užití dat imunofenotypu buněk periferní krve ke stanovení prognosy u nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinomem, se zaměřením na nemocné s metastázami jater. Rozsah dat byl hraničně dostačující k tomuto úkolu, avšak zcela jistě by nestačil na stratifikaci nemocných a analýzu jejich podskupin. Tuto stratifikaci by však nyní nemělo smysl provádět i z důvodu neuspokojivého stavu současných teoretických poznatků o prognostických faktorech u generalizovaného kolorektálního karcinomu a tudíž nemožnosti zvolit některé z nich jako spolehlivé kovarianty. Z tohoto hlediska je nutné i nazírat na interpretaci výsledků celé této pilotní studie.

Dosažené výsledky a naplnění cílů práce:

1. Prvním cílem této disertační práce bylo prokázat, že lze z hodnot parametrů imunofenotypu leukocytů periferní krve stanovených metodou průtokové cytometrie určit prognózu nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinomem. Ze všech vyšetřovaných parametrů fenotypu byla vyselektována relativně malá skupina proměnných, které šlo úspěšně užít na daných datech k predikci prognózy (tj. k rozhodnutí, zda bude nemocný mít lepší či horší celkové přežití jakožto nejobjektivnější parametr stanovení prognosy). K tomuto účelu byly zkonstruovány jednak klasické regresní modely, jednak i modely založené na metodice indukčních grafů.

2. Ve shodě s druhým cílem této disertační práce byly nalezeny konkrétní kandidátské biomarkery zkonstruované z parametrů imunofenotypu buněk periferní krve, které by se mohly v dalším šetření ukázat být prognostickými faktory použitelnými i v klinické praxi pro určení očekávaného celkového přežití u části nemocných s metastatickým postižením jater při kolorektálním karcinomu a teoreticky eventuelně i při jiných primaritách (což vychází z předpokladu obdobné povahy „biologie“ pokročilých solidních nádorů a stejných procesů v imunitním systému s tím spojených, bez ohledu na primaritu, v tomto ohledu lze teoreticky předpokládat konzervativnost a uniformitu reakcí ze strany imunity).

Při regresní analýze přežívání vycházely jako nejvalidnější modely s pouze jedním kontinuálním parametrem, přičemž na daných datech vycházel nejrobustněji (včetně všech souborů zkonstruovaných k účelu ověření validity) model s parametrem NK/CD3CD69. Dalšími kandidátskými prognostickými faktory prokázanými v této studii při vyšetření regresních modelů s jednou nezávislou kontinuální proměnnou jsou následující parametry buněk periferní krve či jejich imunofenotypu: leukocyty, NK/CD14CD16, CD3/NK, NK/leukocyty, CD8-CD28+/CD3CD69, CD8CD57/CD3CD69 a NK/CD3CD8.

Vzhledem k charakteru dat této vyšetřované přirozené domény je však vhodnější užít ke statistickému zpracování některý z moderních postupů založených na teorii rozhodovacích stromů. Zde bylo užito metody indukčních grafů, která dovoluje nejen klasifikaci, ale navíc i diskretizaci kontinuálních proměnných a tím získání více intervalů vyšetřovaných parametrů, a při indukci pravidel užítí i kombinací takto

získaných intervalů. Touto metodou byl na daných datech jako nejlepší prediktor zařazení nemocného do skupiny lepšího či horšího celkové přežití vygenerován model o těchto několika pravidlech:

1. $CD3CD69 \in [55.5; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
2. $monocyty \in [1050; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
3. $leukocyty \in [600; 3750) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
4. $CD14CD16 \in [338.5; \infty) \text{ AND } CD3CD8 \in [419; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
5. $leukocyty \in [3750; 6750) \text{ AND } CD3CD8 \in [41; 419) \Rightarrow$ vyšší celkové přežití.

Tato studie tedy našla některé nové kandidátské prognostické faktory u nemocných s kolorektálním karcinomem generalizovaným do jater založené na vyšetření fenotypu buněk periferní krve metodou dvoubarevné průtokové cytometrie. Jejich hodnotu pro klinickou praxi lze však ověřit pouze provedením dalších studií na toto téma (ideálně primárně prognostických, prospektivních kohortových, randomizovaných, multicentrických a velkého rozsahu, v realitě alespoň unicentrických retrospektivních malého rozsahu s nebo bez longitudinálních měření na stejných nemocných). To lze ale očekávat v časovém horizontu spíše vzdáleném a nejprospěšnějším alternativním krokem, nepřímo napomáhajícím k ověření validity výsledků této prezentované studie, by bylo alespoň provedení kvalitní prognostické studie na „již prokázané“ a mnohdy i běžně klinicky používané parametry, což by vytvořilo solidní základ pro stratifikaci nemocných či ještě lépe selekci homogenního vzorku pro užití v explorativních studiích malého rozsahu jako je tato prezentovaná v této tezi.

7. Souhrn

Cíle práce: Prvním cílem této disertační práce bylo prokázat, že lze z různých hodnot parametrů imunofenotypu leukocytů periferní krve stanovených metodou průtokové cytometrie určit prognózu nemocných s generalizovaným kolorektálním karcinomem, u kterého jsou predilekčním místem hematogenní diseminace játra. Druhým cílem této pilotní explorativní studie prognostických faktorů bylo určit tímto postupem několik konkrétních kandidátských biomarkerů, které by mohly být použity jako výchozí parametry v dalších studiích hledajících klinicky využitelné prognostické faktory u generalizovaného kolorektálního karcinomu.

Soubor nemocných a metody: K tomuto účelu bylo provedeno retrospektivní vyšetření závislosti celkového přežívání 59 nemocných s metastatickým postižením jater na některých parametrech imunofenotypu leukocytů získaných odběry periferní krve těchto nemocných v různých fázích jejich léčby a léčených různými postupy. Imunofenotyp byl vyšetřen metodou dvoubarevné průtokové cytometrie. Byly použity celkem tři postupy statistického zpracování. Za prvé univariantní a multivariantní analýza přežívání spolu s lineární regresní analýzou k určení těch parametrů fenotypu, které jsou ve formě kontinuálních proměnných nezávislými prognostickými faktory pro celkové přežití. Za druhé metoda konstrukce ROC křivek, zde použitá k nepřímému ověření validity výsledků regrese. A za třetí metoda indukčních grafů umožňující cílenou diskretizaci kontinuálních hodnot parametrů fenotypu a klasifikaci nemocných na dvě skupiny s rozdílným celkovým přežitím.

Výsledky:

Při regresní analýze přežívání vycházely jako nejvalidnější modely s pouze jedním kontinuálním parametrem, přičemž na daných datech vycházel nejrobustněji (včetně všech souborů zkonstruovaných k účelu ověření validity) model s parametrem NK/CD3CD69. Dalšími kandidátskými prognostickými faktory prokázanými v této studii při vyšetření regresních modelů s jednou nezávislou kontinuální proměnnou jsou následující parametry buněk periferní krve či jejich imunofenotypu: leukocyty, NK/CD14CD16, CD3/NK, NK/leukocyty, CD8-CD28+/CD3CD69, CD8CD57/CD3CD69 a NK/CD3CD8.

Metodou indukčních grafů byl na daných datech jako nejlepší prediktor zařazení nemocného do skupiny lepšího či horšího celkové přežití vygenerován model o těchto několika pravidlech:

1. $CD3CD69 \in [55.5; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
2. $monocyty \in [1050; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
3. $leukocyty \in [600; 3750) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
4. $CD14CD16 \in [338.5; \infty) \text{ AND } CD3CD8 \in [419; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
5. $leukocyty \in [3750; 6750) \text{ AND } CD3CD8 \in [41; 419) \Rightarrow$ vyšší celkové přežití.

Závěr: Tato studie našla některé nové kandidátské prognostické faktory u nemocných s kolorektálním karcinomem generalizovaným do jater založené na vyšetření imunofenotypu buněk periferní krve metodou dvoubarevné průtokové cytometrie. Jejich hodnotu pro klinickou praxi lze však ověřit pouze provedením nejméně jedné další studie na toto téma na nezávislém souboru nemocných.

8. Použitá literatura

- ¹ Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, et al. Prognostic indicators of colon tumors: the Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer* 1986; 57(9): 1866-1870
- ² McLeod HL, Murray GI. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 1999; 79(2): 191-203
- ³ Gennari L, Doci R, Rossetti C. Prognostic factors in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2000; 47(32): 310-314
- ⁴ Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 845-856
- ⁵ Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG Stearns M, Schwartz MK, et al. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1978; 299: 448-451
- ⁶ Ladenson JH, McDonald JM. Colorectal carcinoma and carcinoembryonic antigen (CEA). *Clin Chem.* 1980; 26: 1213-1220
- ⁷ Filella X, Molina R, Grau JJ, et al. Prognostic value of CA 19.9 levels in colorectal cancer. *Annals of Surgery* 1992; 216(1): 55-59
- ⁸ Sun XF, Carstensen JM, Zhang H, et al. Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 1992; 340: 1369-1373
- ⁹ Bauer KD, Bagwell CB, Giaretti W, et al.: Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer. *Cytometry* 1993; 14(5): 486-491
- ¹⁰ Lanza G, Matteuzzi M, Gafa R, et al.: Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *International Journal of Cancer* 1998; 79(4): 390-395
- ¹¹ Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, et al.: Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *New England Journal of Medicine* 2000; 342(2): 69-77
- ¹² American Society of Clinical Oncology. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1996; 14(10): 2843-2877
- ¹³ Roth JA. p53 prognostication: paradigm or paradox? *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 3345
- ¹⁴ Massacesi C, Norman A, Price T, Hill M, Ross P, Cunningham D. A clinical nomogram for predicting long-term survival in advanced colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 2000; 36: 2044-2052
- ¹⁵ Shepherd N, Baxter K, Love S. The prognostic importance of peritoneal involvement in colonic cancer: a prospective evaluation. *Gastroenterology* 1997; 112: 1096-1102
- ¹⁶ Zeng Z, Cohen AM, Hajdu S, et al. Serosal cytologic study to determine free mesothelial penetration of intraperitoneal colon cancer. *Cancer* 1992; 70: 737-740
- ¹⁷ Herrera-Ornelas L, Justiniano J, Castillo N, et al. Metastases in small lymph nodes from colon cancer. *Arch Surg* 1987; 122: 1253-1256

-
- ¹⁸ Scott KWM, Grace RH. Detection of lymph node metastases in colorectal carcinoma before and after fat clearance. *Br J Surg* 1989; 76: 1165–1167
- ¹⁹ Tepper JE, O'Connell MJ, Niedzwiecki D, et al. Impact of number of nodes retrieved on outcome in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 157–163
- ²⁰ Blenkinsopp WK, Stewart-Brown S, Blesovsky L, et al. Histopathology reporting in large bowel cancer. *J Clin Pathol* 1981; 34: 509–513
- ²¹ Compton CC. The pathology report in colon cancer: what's prognostically important? *Dig Dis* 1999; 17: 67–79
- ²² Dvořák J, Veselý P, Tomšová M, Melichar B, Petera J, Tyčová V, Nová M. Retrospektivní studie k vyhodnocení výsledků léčby a určení prognostických faktorů u nemocných ozařovaných pro adenokarcinom rekta. *Klin Onkol* 2006; 19: 186-193
- ²³ Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 1997; 182: 318-324
- ²⁴ Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. CD8+ T-cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 3491-3494
- ²⁵ Chiba T, Ohtani H, Mizoi T, Naito Y, Sato E, Nagura H, Ohuchi A, Ohuchi K, Shiiba K, Kurokawa Y, Satomi S. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *Br J Cancer* 2004; 91: 1711-1717
- ²⁶ Faivre J, Manfredi S, Bouvier AM. [Epidemiology of colorectal cancer liver metastases]. *Bull Acad Natl Med* 2003; 187: 815-822
- ²⁷ Geoghegan JG, Scheele J. Treatment of colorectal liver metastases. *Br J Surg* 1999; 86: 158-169
- ²⁸ Welch JP, Donaldson GA. The clinical correlation of an autopsy study of recurrent colorectal cancer. *Ann Surg* 1979; 189: 496-502
- ²⁹ Yamamoto J, Shimada K, Kosuge T, et al. Factors influencing survival of patients undergoing hepatectomy for colorectal metastases. *Br J Surg* 1999; 86: 332-337
- ³⁰ Ercolani G, Grazi GL, Ravaioli M, et al. Liver resection for multiple colorectal metastases: influence of parenchymal involvement and total tumor volume, vs number or location, on long-term survival. *Arch Surg* 2002; 137: 1187-1192
- ³¹ Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, et al. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* 2002; 235: 759-766
- ³² Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, et al. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004; 239: 818-825

-
- ³³ Mann CD, Metcalfe MS, Leopardi LN, Maddern GJ. The clinical risk score: emerging as a reliable preoperative prognostic index in hepatectomy for colorectal metastases. *Arch Surg* 2004; 139: 1168-1172
- ³⁴ Adam R, Lucidi V, Bismuth H. Hepatic colorectal metastases: methods of improving resectability. *Surg Clin North Am* 2004; 84: 659-671
- ³⁵ Fusai G, Davidson BR. Management of colorectal liver metastases. *Colorectal Dis* 2003; 5: 2-23
- ³⁶ Fong Y. Surgical therapy of hepatic colorectal metastasis. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 231-255
- ³⁷ Giacchetti S, Itzhaki M, Gruia G, et al. Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery. *Ann Oncol* 1999; 10: 663-669
- ³⁸ Masi G, Allegrini G, Cupini S, et al. First-line treatment of metastatic colorectal cancer with irinotecan, oxaliplatin and 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFOXIRI): results of a phase II study with a simplified biweekly schedule. *Ann Oncol* 2004; 15: 1766-1772
- ³⁹ de Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938-2947
- ⁴⁰ Rougier P, Van Cutsem E, Bajetta E, et al. Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 1998; 352: 1407-1412
- ⁴¹ Bismuth H, Adam R, Levi F, et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg* 1996; 224: 509-520
- ⁴² Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-2342
- ⁴³ Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345
- ⁴⁴ Hoff PM, Eng C, Adinin RB et al. Preliminary results from a phase II study of FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for metastatic colorectal cancer (mCRC) American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2006; Abstract No: 252
- ⁴⁵ Rubio ED, Tabernero J, Cutsen EV et al. Cetuximab in combination with oxaliplatin/5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (FA) (FOLFOX-4) in the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing metastatic colorectal cancer: An international phase II study. American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2005; Abstract No: 3535

-
- ⁴⁶ Folprecht G, Grothey A, Alberts S, et al. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann Oncol* 2005; 16: 1311-1319
- ⁴⁷ Adam R, Delvart V, Pascal G, et al. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg* 2004; 240: 644-657
- ⁴⁸ Zelek L, Bugat R, Cherqui D, et al. Multimodal therapy with intravenous biweekly leucovorin, 5-fluorouracil and irinotecan combined with hepatic arterial infusion pirarubicin in nonresectable hepatic metastases from colorectal cancer (a European Association for Research in Oncology trial). *Ann Oncol* 2003; 14: 1537-1542
- ⁴⁹ Pozzo C, Basso M, Cassano A, et al. Neoadjuvant treatment of unresectable liver disease with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid in colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2004; 15: 933-939
- ⁵⁰ Alberts SR, Horvath WL, Sternfeld WC, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: a North Central Cancer Treatment Group phase II study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 9243-9249
- ⁵¹ Adam R, Pascal G, Castaing D, et al. Tumor progression while on chemotherapy: a contraindication to liver resection for multiple colorectal metastases?. *Ann Surg* 2004; 240: 1052-1061
- ⁵² Karoui M, Penna C, Amin-Hashem M, et al. Influence of preoperative chemotherapy on the risk of major hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2006; 243: 1-7
- ⁵³ Vauthey JN, Pawlik TM, Ribero D, et al. Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in ninety-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2065-2072
- ⁵⁴ Gennari L, Doci R, Bozzetti F, Veronesi U. Proposal for a clinical classification of liver metastases. *Tumori* 1982; 68: 443-449
- ⁵⁵ Fortner JG, Silva JS, Golbey RB, Cox EB, Maclean BJ. Multivariate analysis of a personal series of 247 consecutive patients with liver metastases from colorectal cancer. I. Treatment by hepatic resection. *Ann Surg* 1984; 199: 306-316
- ⁵⁶ Petrelli NJ, Bonnhaim DC, Herrera LO, Mittelman A. A proposed classification system for liver metastasis from colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1984; 27: 249-252
- ⁵⁷ Gayowski TJ, Iwatsuki S, Madariaga JR, Selby R, Todo S, Irish W, Starzl TE. Experience in hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of clinical and pathologic risk factors. *Surgery* 1994; 116: 703-710; discussion 710-711
- ⁵⁸ Ueno H, Mochizuki H, Hatsuse K, Hase K, Yamamoto T. Indicators for treatment strategies of colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2000; 231: 59-66
- ⁵⁹ Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, Balladur P, Boudjema K, Bachellier P, Jaeck D. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to

improve case selection, based on 1568 patients. *Association Francaise de Chirurgie. Cancer* 1996; 77: 1254-1262

⁶⁰ Nagashima I, Takada T, Nagawa H, Muto T, Okinaga K. Proposal of a new and simple staging system of colorectal liver metastasis. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(43): 6961-6965

⁶¹ Minagawa M, Yamamoto J, Kosuge T, Matsuyama Y, Miyagawa S, Makuuchi M. Simplified staging system for predicting the prognosis of patients with resectable liver metastasis: development and validation. *Arch Surg.* 2007; 142(3): 269-276; discussion 277

⁶² Younes RN, Rogatko A, Brennan MF. The influence of intraoperative hypotension and perioperative blood transfusion on disease-free survival in patients with complete resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg* 1991; 214: 107-113

⁶³ Seifert JK, Bottger TC, Weigel TF, Gonner U, Junginger T. Prognostic factors following liver resection for hepatic metastases from colorectal cancer. *Hepatogastroenterol* 2000; 47: 239-246

⁶⁴ Tanaka K, Shimada H, Fujii Y, Endo I, Sekido H, Togo S, Ike H. Pre-hepatectomy prognostic staging to determine treatment strategy for colorectal cancer metastases to the liver. *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389: 371-379

⁶⁵ Nakamura S, Suzuki S, Konno H. Resection of hepatic metastases of colorectal carcinoma: 20 years' experience. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6: 16-22

⁶⁶ Beckurts KT, Holscher AH, Thorban S, Bollschweiler E, Siewert JR. Significance of lymph node involvement at the hepatic hilum in the resection of colorectal liver metastases. *Br J Surg* 1997; 84: 1081-1084

⁶⁷ Sugihara K, Hojo K, Moriya Y, Yamasaki S, Kosuge T, Takayama T. Pattern of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Br J Surg* 1993; 80: 1032-1035

⁶⁸ Nagashima I, Oka T, Hamada C, Naruse K, Osada T, Muto T. Histopathological prognostic factors influencing long-term prognosis after surgical resection for hepatic metastases from colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 739-743

⁶⁹ Pedersen IK, Burcharth F, Roikjaer O, Baden H. Resection of liver metastases from colorectal cancer. Indications and results. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 1078-1082

⁷⁰ Sugawara Y, Yamamoto J, Yamasaki S, Shimada K, Kosuge T, Makuuchi M. Estimating the prognosis of hepatic resection in patients with metastatic liver tumors from colorectal cancer with special concern for the timing of hepatectomy. *Surgery* 2001; 129: 408-413

⁷¹ Minagawa M, Makuuchi M, Torzilli G, Takayama T, Kawasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, Imamura H. Extension of the frontiers of surgical indications in the treatment of liver metastases from colorectal cancer: long-term results. *Ann Surg* 2000; 231: 487-499

⁷² Doci R, Gennari L, Bignami P, Montalto F, Morabito A, Bozzetti F. One hundred patients with hepatic metastases from colorectal cancer treated by resection: analysis of prognostic determinants. *Br J Surg* 1991; 78: 797-801

-
- ⁷³ Hughes KS, Simon R, Songhorabodi S, Adson MA, Ilstrup DM, Fortner JG, Maclean BJ, Foster JH, Daly JM, Fitzherbert D. Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases: a multi-institutional study of patterns of recurrence. *Surgery* 1986; 100: 278-284
- ⁷⁴ Steele G Jr, Ravikumar TS. Resection of hepatic metastases from colorectal cancer. Biologic perspective. *Ann Surg* 1989; 210: 127-138
- ⁷⁵ Gruenberger T, Jourdan JL, Zhao J, King J, Morris DL. Echogenicity of liver metastases is an independent prognostic factor after potentially curative treatment. *Arch Surg* 2000; 135: 1285-1290
- ⁷⁶ Yamada H, Kato H, Kondo S, Okushiba S, Morikawa T. Mesenteric lymph nodes status influencing survival and recurrence pattern after hepatectomy for colorectal liver metastases. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1265-1268
- ⁷⁷ Sasaki A, Iwashita Y, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Kitano S. Analysis of preoperative prognostic factors for long-term survival after hepatic resection of liver metastasis of colorectal carcinoma. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 374-380
- ⁷⁸ Sasaki A, Kawano K, Inomata M, Shibata K, Matsumoto T, Kitano S. Value of serum carbohydrate antigen 19-9 for predicting extrahepatic metastasis in patients with liver metastasis from colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2005; 52(66): 1814-1819
- ⁷⁹ Neal CP, Garcea G, Doucas H, Manson MM, Sutton CD, Dennison AR, Berry DP. Molecular prognostic markers in resectable colorectal liver metastases: a systematic review. *Eur J Cancer*. 2006; 42(12): 1728-1743
- ⁸⁰ Onodera H, Mori A, Nagayama S, Fujimoto A, Tachibana T, Yonenaga Y, Tsuruyama T. Fas/CD95 signaling rather than angiogenesis or proliferative activity is a useful prognostic factor in patients with resected liver metastases from colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2005; 20(6): 477-484
- ⁸¹ Weber JC, Nakano H, Bachellier P, Oussoultzoglou E, Inoue K, Shimura H, Wolf P, Chenard-Neu MP, Jaeck D. Is a proliferation index of cancer cells a reliable prognostic factor after hepatectomy in patients with colorectal liver metastases? *Am J Surg*. 2001; 182(1): 81-88
- ⁸² Scheele J, Stang R, Altendorf-Hofmann A, Paul M. Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg* 1995; 19: 59-71
- ⁸³ Cady B, Jenkins RL, Steele GD Jr, Lewis WD, Stone MD, McDermott WV, Jessup JM, Bothe A, Lalor P, Lovett EJ, Lavin P, Linehan DC. Surgical margin in hepatic resection for colorectal metastasis: a critical and improvable determinant of outcome. *Ann Surg* 1998; 227: 566-571
- ⁸⁴ Shirabe K, Takenaka K, Gion T, Fujiwara Y, Shimada M, Yanaga K, Maeda T, Kajiyama K, Sugimachi K. Analysis of prognostic risk factors in hepatic resection for metastatic colorectal carcinoma with special reference to the surgical margin. *Br J Surg* 1997; 84: 1077-1080
- ⁸⁵ Yamaguchi A, Kurosaka Y, Kanno M, Yonemura Y, Izumi R, Miwa K, Miyazaki I. Analysis of hepatic recurrence of colorectal cancer after resection of hepatic metastases. *Int Surg* 1993; 78: 16-19

-
- ⁸⁶ Cady B, Stone MD, McDermott WV Jr, Jenkins RL, Bothe A Jr, Lavin PT, Lovett EJ, Steele GD Jr. Technical and biological factors in disease-free survival after hepatic resection for colorectal cancer metastases. *Arch Surg* 1992; 127: 561-568; discussion 568-569
- ⁸⁷ Kokudo N, Seki M, Ohta H, Azekura K, Ueno M, Sato T, Moroguchi A, Matsubara T, Takahashi T, Nakajima T, Aiba K. Effects of systemic and regional chemotherapy after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg Oncol* 1998; 5: 706-712
- ⁸⁸ Curley SA, Roh MS, Chase JL, Hohn DC. Adjuvant hepatic arterial infusion chemotherapy after curative resection of colorectal liver metastases. *Am J Surg* 1993; 166: 743-746; discussion 746-748
- ⁸⁹ Fielding LP, Hittinger R, Grace RH, Fry JS. Randomised controlled trial of adjuvant chemotherapy by portalvein perfusion after curative resection for colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 1992; 340: 502-506
- ⁹⁰ Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg*. 1999; 230(3): 309-318; discussion 318-321
- ⁹¹ Elias D, Liberale G, Vernerey D, Pocard M, Ducreux M, Boige V, Malka D, Pignon JP, Lasser P. Hepatic and extrahepatic colorectal metastases: when resectable, their localization does not matter, but their total number has a prognostic effect. *Ann Surg Oncol*. 2005; 12(11): 900-909
- ⁹² Wanebo HJ, Chu QD, Avradopoulos KA, Vezeridis MP. Current perspectives on repeat hepatic resection for colorectal carcinoma: a review. *Surgery* 1996; 119: 361-371
- ⁹³ Antoniou A, Lovegrove RE, Tilney HS, Heriot AG, John TG, Rees M, Tekkis PP, Welsh FK. Meta-analysis of clinical outcome after first and second liver resection for colorectal metastases. *Surgery*. 2007; 141(1): 9-18
- ⁹⁴ Tsavellas G, Patel H, Aleen-Mersh TG. Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer. *Review. Br J Surg* 2001; 88: 1307-1320
- ⁹⁵ Sadahiro S, Suzuki T, Tokunaga N, et al. Detection of tumor cells in the portal and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma using competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 2001; 92: 1251-1258
- ⁹⁶ IMPACT (International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials) Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. *Lancet* 1995; 345: 939-944
- ⁹⁷ Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004; 22: 1797-1806
- ⁹⁸ Lencioni R, Crocetti L, Cioni D et al. Percutaneous radiofrequency ablation of hepatic colorectal metastases: technique, indications, results and new promises. *Invest Radiol* 2004; 39: 689-697
- ⁹⁹ Curley S, Izzo F, Delrio P et al. Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. *Ann Surg* 1999; 230: 1-8

-
- ¹⁰⁰ Solbiati L, Ierace T, Tonolini M et al. Radiofrequency thermal ablation of hepatic metastases. *Eur J Ultrasound* 2001; 13: 149–158
- ¹⁰¹ Siperstein A, Garland A, Engle K et al. Local recurrence after laparoscopic radiofrequency thermal ablation of hepatic tumors. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 106–113
- ¹⁰² Berber E, Pelley R, Siperstein A. Predictors of survival after radiofrequency thermal ablation of colorectal cancer metastases to the liver: a prospective study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1358–1364
- ¹⁰³ Oshowo A, Gillams AR, Lees WR, et al: Radiofrequency ablation extends the scope of surgery in colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 244-247
- ¹⁰⁴ Chang AE, Schneider PD, Sugarbaker PH, Simpson C, Culnane M, Steinberg SM. A prospective randomized trial of regional versus systemic continuous 5-fluorodeoxyuridine chemotherapy in the treatment of colorectal liver metastases. *Ann Surg* 1987; 206: 685-693
- ¹⁰⁵ Kemeny N, Daly J, Reichman B, Geller N, Botet J, Oderman P. Intrahepatic or systemic infusion of fluorodeoxyuridine in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. *Ann Intern Med* 1987; 107: 459-465
- ¹⁰⁶ Hohn DC, Stagg RJ, Friedman MA, Hannigan JF, Rayner A, Ignoffo RJ, Acord P, Lewis BJ. A randomized trial of continuous intravenous versus hepatic intraarterial floxuridine in patients with colorectal cancer metastatic to the liver: The Northern California Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1646-1654
- ¹⁰⁷ Kirk Martin J, O Connell MJ, Wieand HS, Fitzgibbons RJ, Mailliard JA, Rubin J, Nagorney DM, Tschetter LK, Krook JE. Intra-arterial floxuridine vs systemic fluorouracil for hepatic metastases from colorectal cancer. *Arch Surg* 1990; 125: 1022-1027
- ¹⁰⁸ Rougier P, Laplanche A, Huguier M, Hay JM, Ollivier JM, Escat J, Salmon R, Julien M, Rouillet Audy JC, Gallot D, Gouzi JL, Paillet JL, Elisa D, Lacaine F, Roos S, Rotman N, Luboinski M, Lasser P. Hepatic arterial infusion of floxuridine in patients with liver metastases from colorectal carcinoma: Long-term results of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1112-1118
- ¹⁰⁹ Allen-Mersh TG, Earlam S, Fordy C, et al: Quality of life and survival with continuous hepatic artery floxuridine infusion for colorectal liver metastases. *Lancet* 1994; 344: 1255-1260
- ¹¹⁰ Earlam S, Glover C, Davies M, Fordy C, Allen-Mersh TG. Effect of regional and systemic fluorinated pyrimidine chemotherapy on quality of life in colorectal liver metastasis patients. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2022-2029
- ¹¹¹ Wagman LD, Kemeny MM, Leong L, et al.: A prospective randomized evaluation of the treatment of colorectal cancer metastatic to the liver. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1885–1893
- ¹¹² Tono T, Hasuike Y, Ohzato H, et al.: Limited but definite efficacy of prophylactic hepatic arterial infusion chemotherapy following curative resection of colorectal liver metastases—A randomized study. *Cancer* 2000; 88: 1549–1556

-
- ¹¹³ Curley SA, Roh MS, Chase JL, et al.: Adjuvant hepatic arterial infusion chemotherapy after curative resection of colorectal liver metastases. *Am J Surg* 1993; 166: 743–748
- ¹¹⁴ Okuno K, Shigeoka H, Lee YS, et al.: Adjuvant hepatic arterial IL-2 and MMC, 5-FU after curative resection of colorectal liver metastases. *Hepato-gastroenterology* 1996; 43: 688–691
- ¹¹⁵ Lorenz M, Muller H, Schramm H, et al.: Randomized trial of surgery versus surgery followed by adjuvant hepatic arterial infusion with 5-fluorouracil and folinic acid for liver metastases of colorectal cancer. *Ann Surg* 1998; 228: 756–762
- ¹¹⁶ Kemeny N, Huang Y, Cohen AM, et al.: Hepatic arterial infusion of chemotherapy after resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *N Engl J Med* 1999; 341: 2039–2048
- ¹¹⁷ Onaitis M, Morse M, Hurwitz H, et al.: Adjuvant hepatic arterial chemotherapy following metastasectomy in patients with isolated liver metastases. *Ann Surg* 2003; 237: 782–788
- ¹¹⁸ Sullivan RD, Norcross JW, Watkins E: Chemotherapy of metastatic liver cancer by prolonged hepatic-artery infusion. *N Engl J Med* 1964; 270: 321–327
- ¹¹⁹ Martin RC 2nd, Scoggins CR, McMasters KM. A phase II study of radiofrequency ablation of unresectable metastatic colorectal cancer with hepatic arterial infusion pump chemotherapy. *J Surg Oncol.* 2006; 93(5): 387-393
- ¹²⁰ Kemeny NE, Niedzwiecki D, Hollis DR, Lenz HJ, Warren RS, Naughton MJ, Weeks JC, Sigurdson ER, Herndon JE 2nd, Zhang C, Mayer RJ. Hepatic arterial infusion versus systemic therapy for hepatic metastases from colorectal cancer: a randomized trial of efficacy, quality of life, and molecular markers (CALGB 9481). *J Clin Oncol.* 2006; 24(9): 1395-1403
- ¹²¹ Kemeny N, Jarnagin W, Paty P, et al: Phase I trial of systemic oxaliplatin combination chemotherapy with hepatic arterial infusion in patients with unresectable liver metastases from colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4888-4896
- ¹²² Fiorentini G, Cantore M, Rossi S, Vaira M, Tumolo S, Dentico P, Mambrini A, Bernardeschi P, Turrisi G, Giovanis P, Guadagni S, Valori V, De Simone M. Hepatic arterial chemotherapy in combination with systemic chemotherapy compared with hepatic arterial chemotherapy alone for liver metastases from colorectal cancer: results of a multi-centric randomized study. *In Vivo.* 2006; 20(6A): 707-709
- ¹²³ Kim JC, Kim HC, Lee KH, Yu CS, Kim TW, Chang HM, Ryu MH, Kim JH, Ha HK, Lee MG. Hepatic arterial infusion alternating with systemic chemotherapy in patients with non-resectable hepatic metastases from colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 21(6): 1026-1035
- ¹²⁴ Melichar B, Voboril Z, Cerman J Jr, Melicharova K, Mergancova J, Voboril R, Jandik P. Survival of patients with colorectal cancer liver metastases treated by regional chemotherapy. *Hepatogastroenterology.* 2006; 53(69): 426-434
- ¹²⁵ Welch JP, Donaldson GA. The clinical correlation of an autopsy study of recurrent colorectal cancer. *Ann Surg* 1979; 189: 496-502
- ¹²⁶ Gorog D, Toth A, Weltner J. Prognosis of untreated liver metastasis from rectal cancer. *Acta Chir Hung.* 1997; 36: 106-107

-
- ¹²⁷ Arnaud JP, Dumont P, Adloff M, Leguillou A, Py JM. Natural history of colorectal carcinoma with untreated liver metastases. *Surg Gastroenterol*. 1984; 3(1): 37-42
- ¹²⁸ Palmer M, Petrelli NJ, Herrera L. No treatment option for liver metastases from colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1989; 32(8): 698-701
- ¹²⁹ Stangl R, Altendorf-Hofmann A, Charnley RM, Scheele J. Factors influencing the natural history of colorectal liver metastases. *Lancet* 1994; 343: 1405-1410
- ¹³⁰ Giacchi R, Sebastiani M, Lungarotti F. [Natural history of synchronous hepatic metastases from a non-treated colorectal cancer], *J Chir (Paris)*. 1988; 125: 419-423
- ¹³¹ Yamamura T, Tsukikawa S, Akaishi O, Tanaka K, Matsuoka H, Hanai A, Oikawa H, Ozasa T, Kikuchi K, Matsuzaki H, Yamaguchi S. Multivariate analysis of the prognostic factors of patients with unresectable synchronous liver metastases from colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1997; 40: 1425-1429
- ¹³² Project A. C. C. M.-A. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: Evidence in terms of response rate. *J Clin Oncol* 1992; 10: 896-903
- ¹³³ Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirotta N, Elfring GL, Miller LL. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 905-914
- ¹³⁴ Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2343-2351
- ¹³⁵ de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938-2947
- ¹³⁶ Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 229-237
- ¹³⁷ Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-2342
- ¹³⁸ Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-45
- ¹³⁹ Kohne CH, Cunningham D, Di CF, Glimelius B, Blijham G, Aranda E, Scheithauer W, Rougier P, Palmer M, Wils J, Baron B, Pignatti F, Schoffski P, Micheel S, Hecker H. Clinical

determinants of survival in patients with 5-fluorouracil-based treatment for metastatic colorectal cancer: results of a multivariate analysis of 3825 patients. *Ann Oncol.* 2002; 13(2): 308-317

¹⁴⁰ Friedberg B, Watine J, Miédougé M. Unresected colorectal liver metastases: prognostic value of laboratory variables. *Gastroenterol Clin Biol* 2001; 25: 962–966 [article in French; full English text on-line: <http://www.e2med.com/gcb>]

¹⁴¹ Watine J. Laboratory variables to stratify metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2003; 14: 1450–1451

¹⁴² Cunningham D, Pyrhonen S, James RD, Punt CJ, Hickish TF, Heikkila R, et al. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 1998; 352: 1413–1418

¹⁴³ Rougier P, Van Cutsem E, Bajetta E, Niederle N, Possinger K, Labianca R, et al. Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 1998; 352: 1407–1412

¹⁴⁴ Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan study group. *N Engl J Med* 2000; 343: 905–914

¹⁴⁵ Knight R, Miller L, Pirota N et al. First-line irinotecan (C), fluorouracil (F), leucovorin (L) especially improves survival (OS) in metastatic colorectal cancer (MCRC) patients (PT) with favorable prognostic indicators. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; 19: 255a (Abstr 991)

¹⁴⁶ Mitry E, Douillard JY, Van Cutsem E, Cunningham D, Magherini E, Mery-Mignard D, Awad L, Rougier P. Predictive factors of survival in patients with advanced colorectal cancer: an individual data analysis of 602 patients included in irinotecan phase III trials. *Ann Oncol.* 2004; 15: 1013-1017

¹⁴⁷ Michael M, Goldstein D, Clarke SJ, Milner AD, Beale P, Friedlander M, Mitchell P. Prognostic factors predictive of response and survival to a modified FOLFOX regimen: importance of an increased neutrophil count. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6: 297-304

¹⁴⁸ Melichar B, Kohlova T, Vesely P. Survival after oxaliplatin therapy of irinotecan-pretreated advanced colorectal cancer patients. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1707-1714

¹⁴⁹ Diaz R, Aparicio J, Girones R, Molina J, Palomar L, Segura A, Montalar J. Analysis of prognostic factors and applicability of Kohne's prognostic groups in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line irinotecan or oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 5: 197-202

¹⁵⁰ Watine J, Friedberg B. Laboratory variables and stratification of metastatic colorectal cancer patients: recommendations for therapeutic trials and for clinical practice guidelines. *Clin Chim Acta* 2004; 345: 1-15

¹⁵¹ Kiessling R, Wasserman K, Horiguchi S, Kono K, Sjöberg J, Pisa P, Petersson M. Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother.* 1999; 48: 353-362

-
- ¹⁵² Whiteside TL. Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunol Immunother.* 1999; 48: 346-352
- ¹⁵³ Chen GG, Lee JFY, Chan UPF, Xu H, Ip PC, Lau WY. Increased Apoptosis in Infiltrating Mononuclear Cells of Colorectal Cancer, A Mechanism for Tumor Escape. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126: 686-691
- ¹⁵⁴ Meidenbauer N, Hoffmann TK, Donnerberg AD. Direct visualization of antigen-specific T cells using peptide-MHC-class I tetrameric complexes. *Methods* 2003; 31: 160–171
- ¹⁵⁵ Palmowski M, Salio M, Dunbar RP, Cerundolo V. The use of HLA class I tetramers to design a vaccination strategy for melanoma patients. *Immunol Rev.* 2002; 188: 155–163
- ¹⁵⁶ Nagorsen D, Scheibenbogen C, Thiel E, Keilholz U. Immunological monitoring of cancer vaccine therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2004; 4: 1677–1684
- ¹⁵⁷ Albers AE, Kim GG, Ferris RL, DeLeo AB, Whiteside TL. Immune responses to p53 in patients with cancer enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory CD4+CD25+ cells at tumor sites. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 62: 670–679
- ¹⁵⁸ Soussi T. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res.* 2000; 60(7): 1777–1788
- ¹⁵⁹ Von Kleist S, Berling J, Boxhle W, Wittekind C. Immunohistochemical analysis of lymphocyte subpopulations infiltrating breast carcinomas and benign lesions. *Int J Cancer* 1987; 40: 18–23
- ¹⁶⁰ Coronella J, Telleman P, Kingsbury, et al. Evidence for an antigen-driven humoral immune response in medullary ductal breast carcinoma. *Cancer Res.* 2001; 61: 7889–7899
- ¹⁶¹ Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest* 2006; 86: 231
- ¹⁶² Leong PP, Mohammad R, Ibrahim N, Ithnin H, Abdullah M, Davis WC, Seow HF. Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Immunol Lett.* 2006; 102(2): 229–236
- ¹⁶³ Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, Davies S, Gibbs P, Morris LS, Coleman N, Alexander GJ. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology* 2005; 41(4): 722-730
- ¹⁶⁴ Whiteside TL. *Tumor infiltrating lymphocytes in human malignancies.* Austin, TX: RG Landes Co.; 1993
- ¹⁶⁵ Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 540–550
- ¹⁶⁶ Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 2003; 22: 6524–6536
- ¹⁶⁷ Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* 2003; 98: 413–423
- ¹⁶⁸ Whiteside TL, Herberman RB. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol.* 1995; 7: 704–710
- ¹⁶⁹ Mellstedt H. Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today* 2003; 39(Suppl.): C1–16

-
- ¹⁷⁰ Whiteside TL. The role of immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Treat Res.* 2006; 130: 103-124
- ¹⁷¹ Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol* 2001; 167: 2972–2978
- ¹⁷² Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Finke JH, et al. Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma. *J Exp Med* 2002; 196: 619–628
- ¹⁷³ Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2001; 2: 1126–1132
- ¹⁷⁴ Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest* 2004; 114: 1640–1649
- ¹⁷⁵ Seo SJ, Fields ML, Buckler JL, Reed AJ, Mandik-Nayak L, Nish SA, et al. The impact of T helper and T regulatory cells on the regulation of anti-double-stranded DNA B cells. *Immunity* 2002; 16: 535–546
- ¹⁷⁶ Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Dobyszek A, Mysliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol* 2004; 112: 258–267
- ¹⁷⁷ Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human CD25(+)CD4(+) T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001; 193: 1295–1302
- ¹⁷⁸ Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells downregulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1538–1543
- ¹⁷⁹ Oldenhove G, de Heusch M, Urbain-Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O, et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2003; 198: 259–266
- ¹⁸⁰ Min WP, Zhou D, Ichim TE, Strejan GH, Xia X, Yang J, et al. Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. *J Immunol* 2003; 170: 1304–1312
- ¹⁸¹ Wang S, Chen L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes Infect.* 2004; 6: 759–766
- ¹⁸² Shurin MR, Esche C, Lokshin A, Lotze MT. Tumors induce apoptosis of dendritic cells in vitro. *J Immunother.* 1997; 20: 403
- ¹⁸³ Gabrilovich DI. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic cell differentiation in cancer. *Nat Med.* 2004; 4: 941–952
- ¹⁸⁴ Mantovani A. Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab Invest.* 1994; 71: 5–16

-
- ¹⁸⁵ Mills CD, et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* 2000; 164: 6166–6173
- ¹⁸⁶ Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23: 549-555
- ¹⁸⁷ Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004; 10: 942–949
- ¹⁸⁸ Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 423–449
- ¹⁸⁹ Gallimore A, Sakaguchi S. Regulation of tumour immunity by CD25+ T cells. *Immunology* 2002; 107: 5–9
- ¹⁹⁰ Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 913–920
- ¹⁹¹ Brenner BG, Friedman G, Margolese RG. The relationship of clinical status and therapeutic modality to natural killer cell activity in human breast cancer. *Cancer* 1985; 56(7): 1543-1548
- ¹⁹² Lukac J, Kusic Z, Kordic D, Koncar M, Bolanca A. Natural killer cell activity, phagocytosis, and number of peripheral blood cells in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 1994; 29(3): 279-285
- ¹⁹³ Sabbioni ME, Castiglione M, Hurny C, Siegrist HP, Bacchi M, Bernhard J, Thurlimann B, Bonnefoi H, Perey L, Goldhirsch A, Senn HJ. Interaction of tamoxifen with concurrent cytotoxic adjuvant treatment affects lymphocytes and lymphocyte subsets counts in breast cancer patients. *Support Care Cancer* 1999; 7(3): 149-153
- ¹⁹⁴ Sewell HF, Halbert CF, Robins RA, Galvin A, Chan S, Blamey RW. Chemotherapy-induced differential changes in lymphocyte subsets and natural-killer-cell function in patients with advanced breast cancer. *Int J Cancer* 1993; 55(5): 735-738
- ¹⁹⁵ Chan OT, Yang LX. The immunological effects of taxanes. *Cancer Immunol Immunother.* 2000; 49(4-5): 181-185
- ¹⁹⁶ Tong AW, Seamour B, Lawson JM, Ordonez G, Vukelja S, Hyman W, Richards D, Stein L, Maples PB, Nemunaitis J. Cellular immune profile of patients with advanced cancer before and after taxane treatment. *Am J Clin Oncol.* 2000; 23(5): 463-472
- ¹⁹⁷ Kotsakis A, Sarra E, Peraki M, Koukourakis M, Apostolaki S, Souglakos J, Mavromanomakis E, Vlachonikolis J, Georgoulis V. Docetaxel-induced lymphopenia in patients with solid tumors: a prospective phenotypic analysis. *Cancer* 2000; 89(6): 1380-1386
- ¹⁹⁸ Mafune K, Tanaka Y. Influence of multimodality therapy on the cellular immunity of patients with esophageal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2000; 7(8): 609-616
- ¹⁹⁹ Krainer M, Wolf HM, Wiltschke C, Wilfing A, Kaider A, Kratzik C, Eibl MM, Zielinski CC. Transient increase in mitogen-induced lymphoproliferative responses in patients with testicular cancer after BEP chemotherapy. *Urology* 2000; 55(6): 934-938

-
- ²⁰⁰ Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Roman J, Pecorelli S, Cannon M, Parham GP. Effects of concurrent cisplatin administration during radiotherapy vs. radiotherapy alone on the immune function of patients with cancer of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 48(4): 997-1006
- ²⁰¹ Vuckovic-Dekic L, Susnjar S, Stanojevic-Bakic N, Radosavljevic D. Radio- and chemotherapy variably affect the general immunocompetence of lung cancer patients. *Panminerva Med.* 1999; 41(2): 129-133
- ²⁰² Safwat A: The immunobiology of low-dose total-body irradiation: more questions than answers. *Radiat Res.* 2000; 153: 599-604
- ²⁰³ Hong WS, Min YI, Son YS, Hong SI. Peripheral blood lymphocyte subsets in patients with stomach cancer. *J Korean Med Sci.* 1995; 10(3): 164-168
- ²⁰⁴ Schroder W, Vering A, Stegmuller M, Strohmeier R. Lymphocyte subsets in patients with ovarian and breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1997; 18(6): 474-477
- ²⁰⁵ Murta EF, de Andrade JM, Falcao RP, Bighetti S. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori* 2000; 86: 403-7
- ²⁰⁶ Melichar B, Touskova M, Dvorak J, Jandik P, Kopecky O. The peripheral blood leukocyte phenotype in patients with breast cancer: effect of doxorubicin/paclitaxel combination chemotherapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2001; 23(2): 163-173
- ²⁰⁷ Melichar B, Touskova M, Solichova D, Kralickova P, Kopecky O. The phenotype of peripheral blood leukocytes and systemic immune activation in patients with primary and secondary liver tumors. *Proc AACR* 2000; 41: 621
- ²⁰⁸ Marana HR, Silva JS, Andrade JM, Bighetti S. Reduced immunologic cell performance as a prognostic parameter for advanced cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10(1): 67-73
- ²⁰⁹ Marana HR, Silva JS, Andrade JM. NK cell activity in the presence of IL-12 is a prognostic assay to neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2000; 78: 318-323
- ²¹⁰ Sabbioni ME, Siegrist HP, Bacchi M, Bernhard J, Castiglione M, Thurlimann B, Bonnefoi H, Perey L, Herrmann R, Goldhirsch A, Hurny C. Association between immunity and prognostic factors in early stage breast cancer patients before adjuvant treatment. *Breast Cancer Res Treat.* 2000; 59(3): 279-287
- ²¹¹ Berghella AM, Pellegrini P, Del Beato T, Maccarone D, Adorno D, Casciani CU. Prognostic significance of immunological evaluation in colorectal cancer. *Cancer Biother Radiopharm.* 1996; 11(6): 355-361
- ²¹² Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, Konaka Ch, Kato H. Immunologic parameters as significant prognostic factors in lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 37: 161-169
- ²¹³ Holcombe RF, Jacobson J, Dakhil SR, Stewart RM, Betzing KS, Kannan K, Macdonald JS. Association of immune parameters with clinical outcome in stage III colon cancer: results of Southwest Oncology Group Protocol 9009. *Cancer Immunol Immunother.* 1999; 48(9): 533-539

-
- ²¹⁴ Zaloudik J, Lauerova L, Janakova L, Talac R, Simickova M, Nekulova M, Mikulikova I, Kovarik J, Sheard M. Significance of pre-treatment immunological parameters in colorectal cancer patients with unresectable metastases to the liver. *Hepatogastroenterology* 1999; 46(25): 220-227
- ²¹⁵ Melichar B, Touskova M, Blaha M, Vesely P, Dvorak J, Krajina A, Cerman J. Hepatic Arterial Administration of Activated Monocytes in Patients with Liver Metastases – a Pilot Study. *American Society of Clinical Oncology Program/ Proceedings 37th Annual Meeting, May 12-15, 2001, San Francisco, Volume 20: 2621. Abstract*
- ²¹⁶ Melichar B, Toušková M, Veselý P, Dvořák J, Bláha M, Krajina A, Cerman J. Regionální adoptivní imunoterapie u nemocných s metastatickým postižením jater. *Bulletin HPB. Časopis České společnosti HPB chirurgie* 2001; 9 (1): 52. Abstrakt
- ²¹⁷ Melichar B, Toušková M, Bláha M, Veselý P, Dvořák J, Krajina A, Cerman J. Hepatic arterial administration of activated leukocytes in patients with liver metastases. *Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17, 545-552
- ²¹⁸ Heller G, Simonoff JS. Prediction in Censored Survival Data: A Comparison of the Proportional Hazards and Linear Regression Models. *Biometrics* 1992; 48(1): 101-115
- ²¹⁹ Zheng Y, Cai T, Feng Z. Application of the time-dependent ROC curves for prognostic accuracy with multiple biomarkers. *Biometrics*. 2006; 62: 279-287
- ²²⁰ Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39: 561–577
- ²²¹ Rakotomalala R. Graphes d'Induction. PhD thesis, Université Claude Bernard, 1997
- ²²² Clark P, Niblett T. The CN2 algorithm. *Machine Learning Journal* 1989; 3(4): 261-283
- ²²³ Clark P, Boswell R. Rule induction with CN2: Some recent improvements. *Machine Learning - Proceedings of the 5th European Conference, Yves Kodratoff editor, Berlin Spring-Verlag, 1991: 151-163*
- ²²⁴ Zighed DA, Rakotomalala R, Rabaseda S. A discretization method of continuous attributes in Induction Graphs. *Proceedings of the 30th European Meetings on Cybernetic and Systems Research, Vienna, 1996: 997-1002*
- ²²⁵ Heffner JE. Evaluating diagnostic tests in the pleural space: differentiating transudates from exudates as a model. *Clin Chest Med* 1998; 19: 277–293
- ²²⁶ Simms PE, Ellis TM. Utility of Flow Cytometric Detection of CD69 Expression as a Rapid Method for Determining Poly- and Oligoclonal Lymphocyte Activation. *Clin Diagnostic Lab Immunol*. 1996; 3(3): 301-304
- ²²⁷ Craston R, Koh M, McDermott A, Ray N, Prentice HG, Lowdell MW. Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells. *J. Immunol. Methods* 1997; 209: 37-45
- ²²⁸ Poggi A.: CD 69, PROW Database, prow@ncbi.nlm.nih.gov, 1999

-
- ²²⁹ Ziegler SF, et al. Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. *Eur J Immunol.* 1993; 23: 1643–1648
- ²³⁰ López-Cabrera M, et al. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med.* 1993; 178: 537–547
- ²³¹ Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 875–904
- ²³² Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol. Today.* 1994; 15: 479-483
- ²³³ Testi R, et al. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J. Immunol.* 1989; 143: 1123–1128
- ²³⁴ Cebrián M, et al. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1988; 168: 1621–1637
- ²³⁵ Santis AG, et al. Tumor necrosis factor- α production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *Eur. J. Immunol.* 1992; 22: 1253–1259
- ²³⁶ De-Maria R, et al. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 1999–2004
- ²³⁷ Testi R, et al. CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *J. Exp. Med.* 1990; 172: 701–707
- ²³⁸ Ramirez R, et al. CD69-induced monocyte apoptosis involves multiple nonredundant signaling pathways. *Cell. Immunol.* 1996; 172: 192–199
- ²³⁹ Walsh GM, et al. Ligation of CD69 induces apoptosis and cell death in human eosinophils cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 1996; 87, 2815–2821
- ²⁴⁰ Cosulich ME, et al. Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987; 84: 4205–4209
- ²⁴¹ Feng C, et al. A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int. Immunol.* 2002; 14: 535–544
- ²⁴² Nakayama T, et al. The generation of mature, single-positive thymocytes in vivo is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. *J. Immunol.* 2002; 168: 87–94
- ²⁴³ Remmers EF, et al. A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen-induced arthritis in rats. *Nat. Genet.* 1996; 14: 82–85
- ²⁴⁴ Mc Indoe RA, et al. Localization of non-MHC collagen-induced arthritis susceptibility loci in DBA/1j mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999; 96: 2210–2214
- ²⁴⁵ Brandes ME, et al. Transforming growth factor β 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 1108–1113
- ²⁴⁶ Grewal JS, et al. Serotonin 5-HT_{2A} receptor induces TGF- β 1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 1999; 276: F922–F930

-
- ²⁴⁷ Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- β signaling in T cells. *Nat. Med.* 2001; 7: 1118–1122
- ²⁴⁸ Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005 Mar; 26(3): 136-140
- ²⁴⁹ Sancho D, et al. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen induced arthritis. *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 872–882
- ²⁵⁰ Esplugues E, et al. Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J. Exp. Med.* 2003, 197, 1093–1106
- ²⁵¹ McInnes IB, et al. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 1997, 3, 189–195
- ²⁵² Sancho D, et al. Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15. *Blood.* 1999; 93: 886–896
- ²⁵³ Ishikawa S, et al. A subset of CD4⁺ T cells expressing early activation antigen CD69 in murine lupus: possible abnormal regulatory role for cytokine imbalance. *J. Immunol.* 1998; 161: 1267–1273
- ²⁵⁴ Hernández-García C, et al. The CD69 activation pathway in rheumatoid arthritis synovial fluid T cells. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 1277–1286
- ²⁵⁵ McGuirk P, Mills L. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol.* 2002; 23: 450–455
- ²⁵⁶ Yacyshyn MB, Poppema S, Berg A, MacLean GD, Reddish MA, Meikle A, Longenecker BM. CD69⁺ and HLA-DR⁺ activation antigens on peripheral blood PBL populations in metastatic breast and ovarian cancer patients: correlations with survival following active specific immunotherapy. *Int J Cancer* 1995; 61: 470-474
- ²⁵⁷ Reddish MA, MacLean GD, Poppema S, Berg A, Longenecker BM. Pre-immunotherapy serum CA27.29 (MUC-1) mucin level and CD69⁺ lymphocytes correlate with effects of Theratope® sialyl-Tn-KLH cancer vaccine in active specific immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 42: 303–309
- ²⁵⁸ Esplugues E, Vega-Ramos J, Cartoixà D, et al. Induction of tumor NK-cell immunity by anti-CD69 antibody therapy. *Blood.* 2005; 105: 4399-406
- ²⁵⁹ Vesely P, Tousekova M, Melichar B. Phenotype of peripheral blood leukocytes and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *Int J Biol Markers.* 2005; 20: 126-133
- ²⁶⁰ Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 1991; 22: 633-640
- ²⁶¹ Soloski MJ. Recognition of tumor cells by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 154-162

-
- ²⁶² Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K, Harada H, Takano S, Nose T, Ohno T. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res* 2004; 24: 1861-1871
- ²⁶³ Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Jirousková M, Degen JL. Platelets and fibrinogen increase metastatic potential by impeding natural killer mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005; 105: 178-185
- ²⁶⁴ Fan Z, Yu P, Wang Y, Wang Y, Fu ML, Liu W, Sun Y, Fu YX. NK-cell activation by LIGHT triggers tumor-specific CD8+ T-cell immunity to reject established tumors. *Blood* 2006; 107: 1342-1351
- ²⁶⁵ Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002; 195: 335-341
- ²⁶⁶ Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cells and DC interaction. *Trends Immunol* 2004; 25: 47-52
- ²⁶⁷ Mocikat R, Braumuller H, Gurny A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, Bubeck A, Louis J, Mailhammer R, Riethmüller G, Koszinowski U, Röcken M. Natural killer cells activated by MHC-class-I-low targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 2003; 19: 561-569
- ²⁶⁸ Matera L, Galetto A, Bello M, Baiocco C, Chiappino I, Castellano G, Stacchini A, Satolli MA, Mele M, Sandrucci S, Mussa A, Bisi G, Whiteside TL. In vivo migration of labeled autologous natural killer cells to liver metastases in patients with colon carcinoma. *J Transl Med.* 2006; 4: 49
- ²⁶⁹ Ruka W, Rutkowski P, Kaminska J, Rysinska A, Steffen J. Alterations of routine blood tests in adult patients with soft tissue sarcomas: Relationships to cytokine serum levels and prognostic significance. *Annals of Oncology* 2001; 12: 1423-1432
- ²⁷⁰ Young NS. Agranulocytosis (clinical conference). *JAMA* 1994; 271: 935-938
- ²⁷¹ Hirashima M, Higuchi S, Sakamoto K, Nishiyama T, Okada H. The ratio of neutrophils to lymphocytes and the phenotypes of neutrophils in patients with early gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124: 329-334
- ²⁷² Satomi A, Murakami S, Ishida K, Mastuki M, Hashimoto T, Sonoda M. Significance of increased neutrophils in patients with advanced colorectal cancer. *Acta Oncol* 1995; 34: 69-73
- ²⁷³ Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25: 315-322
- ²⁷⁴ Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42: 717-727
- ²⁷⁵ Kodelja V, et al. Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 α with a Th2-associated expression pattern. *J. Immunol.* 1998; 160: 1411-1418

-
- ²⁷⁶ Bonecchi R, et al. Divergent effects of IL-4 and interferon- γ on macrophage-derived chemokine (MDC) production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood* 1998; 92: 2668–2671
- ²⁷⁷ Mantovani A, et al. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* 1992; 13: 265–270
- ²⁷⁸ Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today* 1999; 20: 254–257
- ²⁷⁹ Lin EY, et al. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.* 2001; 193: 727–740
- ²⁸⁰ Barleon B, et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the flt-1/VEGF receptor. *Blood* 1996; 87: 3336–3343
- ²⁸¹ Duyndam MC, et al. Vascular endothelial growth factor-165 overexpression stimulates angiogenesis and induces cyst formation and macrophage infiltration in human ovarian cancer xenografts. *Am. J. Pathol.* 2002; 160: 537–548
- ²⁸² Balkwill F, et al. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539–545
- ²⁸³ Coussens LM, et al. Inflammatory cells and cancer: think different! *J. Exp. Med.* 2001; 193: F23–F26
- ²⁸⁴ Rav-Coquard I, Blay JY, Sebban C, Bachelot T, Biron P. Lymphopenia $\leq 700/\mu\text{L}$ and Performance Status (PS) >1 as Prognostic Factors of Early Death After Conventional Cytotoxic Chemotherapy (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 1999; 18: A2225
- ²⁸⁵ Melichar B, Touskova M, Vesely P. Effect of Irinotecan on the Phenotype of Peripheral Blood Leukocyte Populations in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Hepato-Gastroenterology* 2002; 49: 967-970
- ²⁸⁶ Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feurstein IH, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS, Gress RE. Distinction between CD8+ and CD4+ T-cell pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 1997; 89: 3700-3707
- ²⁸⁷ Mackall CL. T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review. *Stem Cells* 2000; 18: 10-18
- ²⁸⁸ McMillan DC, Fyffe GD, Wotherspoon HA, Cooke TG, McArdle CS. Prospective study of circulating T-lymphocyte subpopulations and disease progression in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 1068-1071
- ²⁸⁹ Lissoni P, Fumagalli L, Paolorossi F, Mandala M. Changes in lymphocyte number during cancer chemotherapy and their relation to clinical response. *Int J Biol Markers* 1999; 14: 115-7
- ²⁹⁰ Soygur T, Beduk Y, Baltaci S, Yaman O, Tokgoz G. The prognostic value of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with bladder carcinoma treated using neoadjuvant M-VEC chemotherapy. *BJU Int* 1999; 84: 1069-1072
- ²⁹¹ Ownby HE, Roi LD, Isenberg RR, Brennan MJ. Peripheral lymphocyte and eosinophil counts as indicators of prognosis in primary breast cancer. *Cancer* 1983; 52: 126-130

-
- ²⁹² Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancers. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5313-5327
- ²⁹³ Sorbye H, Dahl O. Transient CEA increase at start of oxaliplatin combination therapy for metastatic colorectal cancer. *Acta Oncol* 2004; 43: 495-498
- ²⁹⁴ Sorbye H, Dahl O. Carcinoembryonic antigen surge in metastatic colorectal cancer patients responding to oxaliplatin combination chemotherapy: Implications for tumor marker monitoring and guidelines. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4466-4467
- ²⁹⁵ Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. An evaluation of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer. *JAMA* 1993; 270: 943-7
- ²⁹⁶ Herrera MA, Chu TM, Holyoke ED, Mittelman A. CEA monitoring of palliative treatment for colorectal carcinoma. *Ann Surg* 1977; 185: 23-30
- ²⁹⁷ Hanke B, Riedel C, Lampert S, Happich K, Martus P, Parsch H, Himmler B, Hohenberger W, Hahn EG, Wein A. CEA and CA 19-9 measurement as a monitoring parameter in metastatic colorectal cancer (CRC) under palliative first-line chemotherapy with weekly 24-hour infusion of high-dose 5-fluorouracil (5-FU) and folinic acid (FA). *Ann Oncol*. 2001; 12: 221-226
- ²⁹⁸ Buyse M, Thirion P, Carlson RW, Burzykowski T, Molenberghs G, Piedbois P. Relation between tumour response to first-line chemotherapy and survival in advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *Meta-Analysis Group in Cancer. Lancet*. 2000; 356: 373-378
- ²⁹⁹ Trillet-Lenoir V, Chapuis F, Touzet S, Barbier JY, Freyer G, Gaudin JL, Lombard-Bohas C, Valette PJ, Lledo G, Gouttebel MC, Boyer JD, Chassignol L, Hamon H, Claudel-Bonvoisin S, Leprince E, Amoyal P, Glehen O, Darnand P, Heilmann MO, Bleuse JP. Any clinical benefit from the use of oncofoetal markers in the management of chemotherapy for patients with metastatic colorectal carcinomas? *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2004; 16: 196-203
- ³⁰⁰ Mayer RJ, Garnick MB, Steele GD Jr, Zamcheck N. Carcinoembryonic antigen (CEA) as a monitor of chemotherapy in disseminated colorectal cancer. *Cancer* 1978; 42(3 Suppl): 1428-33
- ³⁰¹ Wilson APM, van Dalen A, Sibley PEC, Kasper LA, Durham AP, El Shami AS. Multicenter tumour marker reference range study. *Anticancer Res* 1999; 19: 2749-2752
- ³⁰² Sugarbaker PH. Carcinoembryonic antigen (CEA) assays in obstructive colorectal cancer. *Ann Surg* 1976; 184: 752-757
- ³⁰³ Baker SG, Kramer BS, McIntosh M, Patterson BH, Shyr Y, Skates S. Evaluating markers for the early detection of cancer: overview of study designs and methods. *Clin Trials* 2006; 3: 43-56
- ³⁰⁴ Ransohoff DF. Bias as a threat to the validity of cancer molecular-marker research. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5: 142-149