

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

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

MUDr. Pavel Veselý

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program

VNITŘNÍ NEMOCI

Hradec Králové

2008

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia v doktorském studijním programu vnitřní nemoci na Klinice onkologie a radioterapie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Uchazeč: MUDr. Pavel Veselý
Klinika onkologie a radioterapie
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové
a Fakultní nemocnice Hradec Králové
Sokołská 581, 50005 Hradec Králové

Školitel: Prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.
Klinika onkologie a radioterapie a Katedra vnitřního lékařství
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové
a Fakultní nemocnice Hradec Králové
Sokołská 581, 50005 Hradec Králové

Oponenti: Prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.
Klinika dětské hematologie a onkologie
Univerzita Karlova v Praze, 2. Lékařská fakulta
a Fakultní nemocnice Motol
V úvalu 84, 15006 Praha 5

Prof. MUDr. Jindřich Macháček, CSc.
Onkologická klinika
Lékařská fakulta Univerzity Palackého
a Fakultní nemocnice Olomouc
I. P. Pavlova 6, 77520 Olomouc

Obhajoba se koná před Komisí pro obhajoby
disertačních prací v doktorském studijním programu

Vnitřní nemoci

v pondělí 1. září 2008 od 12.00 hodin,

Onkologický pavilon – budova č. 23, 3. poschodí, místnost
3.212, Fakultní nemocnice v Hradci Králové

Prof. MUDr. Jan Bureš, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu
vnitřní nemoci

OBSAH

1. Souhrn	3
2. Summary	4
3. Cíle práce	4
4. Základní teoretická východiska	5
5. Soubor nemocných a metody	7
5.1. Výběr pacientů.....	7
5.2. Laboratorní metodika.....	7
5.3. Statistické zpracování	8
6. Výsledky	12
6.1. Základní charakteristiky souborů nemocných.....	12
6.2. Regresní modely	13
6.3. Vyšetření ROC křivek	14
6.4. Indukce pravidel pro konstrukci skupin s rozdílným celkovým přežíváním.....	15
7. Diskuse	17
8. Závěr	23
9. Použitá literatura	25
10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY	26

1. SOUHRN

V teoretické části disertační 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 první univariantsní a multivariantsní 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.

2. 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.

3. 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.

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.

4. ZÁKLADNÍ 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 jsou vedlejším produktem studií léčebných.

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 (1). 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. Dále autoři doporučují místo užívání arbitrárně stanovených prahových hodnot užívat tyto

proměnné jako kontinuální. Autoři diskutují metodické problémy srovnání studií zabývajících se prognostickými faktory u kolorektálního karcinomu a obrovskou heterogennost 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 významnými v multivariální 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 %).

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 (2).

Předchozí studie ukázaly signifikantní změny v počtu a funkci podskupin mononukleárních buněk periferní krve u nemocných s nádorovým onemocněním, včetně kolorektálního karcinomu. Velmi málo je však známo o prognostickém významu těchto změn (3, 4). Cílem této disertační práce je prokázat využitelnost stanovení imunofenotypu těchto buněk metodou průtokové cytometrie pro určení prognosy nemocných s kolorektálním karcinomem generalizovaným do jater.

5. SOUBOR NEMOCNÝCH A METODY

5.1. 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 (5-7) - 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.

5.2. 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 μ l heparinizované periferní krve bylo smíšeno s 10 μ l 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. Suspence 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.

5.3. 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. Univariátní 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 cenzorovaných 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 cenzorovaných 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 (8). 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 multivariátní analýzy jejich ověření 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) (9). 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 bylo problémem, jak zajistit co největší validitu získaných výsledků. Postupováno bylo dvěma způsoby vedoucími 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.

V třetí fázi statického zpracování byly k ohodnocení diagnostické přesnosti takto zkonstruovaného testu použity metody ROC (receiver-operating characteristic) křivek (10). 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 grafů (11) 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 (12, 13). 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) univariantní 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.

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).

6. VÝSLEDKY

6.1. Základní charakteristiky souborů nemocných

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.

Tab. č. 1: 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	280
	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	

6.2. Regresní modely

Tab. č. 2: Sdružený přehled regresních modelů pro jednu nezávislou proměnnou

Soubor	Leukocyty mí populace či index	Weibulova 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

6.3. 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 univariální či multivariální analýze přežití či eventuálně které tvořily komponenty indexů, které byly v analýze přežití (alespoň hraničně) signifikantní.

Tab. č. 3: 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.

n.s. = *nesignifikantní*

6.4. Indukce pravidel pro konstrukci skupin s rozdílným celkovým přežíváním

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). (V autoreferátu uvedeny pouze modely č. 2, 3 a 4).

A) Konstrukce ze všech parametrů

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

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 $\in [3750; 6750]$ 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	enzorován	celkem	zemřel	enzorován
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.

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	enzorován	celkem	zemřel	enzorován
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

7. DISKUSE

Na základě výsledků univariální analýzy přežívání byly prokázány jako robustně signifikantní pro určení horší či lepší prognózy nemocných s kolorektálním karcinomem metastázujícím 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 vycházely 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 multivariální analýze byly zkoušeny i modely s více parametry, které samostatně vycházely signifikantně v univariální analýze či multivariální analýze (tj. především leukocyty, NK/leukocyty, ale i NK/CD14CD16 a další parametry), avšak přidání těchto parametrů nikdy nevytvářelo v multivariální analýze signifikantní modely a vždy jen zhoršilo signifikanci parametru NK/CD3CD69. Samostatný parametr NK/CD3CD69 je tedy výsledkem mnoha multivariálních 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 „vítěznější“ (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 použito 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 studii 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.

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 zaměřit na roli CD3CD69 lymfocytů u pokročilého nádorového onemocnění.

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 „použitím 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. 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 (14, 15). 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 myši k rejekci NK-senzitivních tumorů (16). 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 (17).

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 „obrné hráze“ tvořené vrozenou imunitou tvořenou lymfocyty (tedy především NK buňkami).

V naší referenční laboratoři je pro celkový počet leukocytů v periferní krvi normální rozmezí 3800–9400 cells/ μ l. V této studii dosažené výsledky zahrnující celkový počet leukocytů můžeme interpretovat jako: I. 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 normálními rozmezím, což je pravděpodobně hlavně projevem vzestupu počtu polymorfonukleárů v rámci systémové imunitní aktivace při pokročilém nádoru a eventuelně i v rámci koincidence infekce.

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 však omezena nízkým počtem pozorování, a to zejména ve skupině s vyšším počtem monocytů. Svoji 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 (18, 19). 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.

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.

8. 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.

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 nejobektivnější parametr stanovení prognosy). K tomuto účelu byly zkonstruovány jednak klasické regresní modely, jednak i modely založené na metodice indukčních grafů.

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. $CD14CD16 \in [338.5; \infty)$ AND $CD3CD8 \in [419; \infty) \Rightarrow$ nižší celkové přežití
5. leukocyty $\in [3750; 6750)$ 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 nejméně jedné další studie na toto téma na nezávislém souboru nemocných.

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. 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
2. 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
3. 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
4. Zaloudik J, Lauerova L, Janakova L, et al. Significance of pre-treatment immunological parameters in colorectal cancer patients with unresectable metastases to the liver. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 220-227
5. Melichar B, Tuskova 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*
6. 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
7. 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
8. 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
9. Zheng Y, Cai T, Feng Z. Application of the time-dependent ROC curves for prognostic accuracy with multiple biomarkers. *Biometrics.* 2006; 62: 279-287
10. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39: 561–577
11. Rakotomalala R. Graphes d'Induction. PhD thesis, Université Claude Bernard, 1997

12. Clark P, Niblett T. The CN2 algorithm. *Machine Learning Journal* 1989; 3(4): 261-283
13. 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
14. 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
15. Reddish MA, MacLean GD, Poppema S, et al. 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
16. 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
17. Veselý 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
18. Balkwill F, et al. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-545
19. Coussens LM, et al. Inflammatory cells and cancer: think different! *J. Exp. Med.* 2001; 193: F23-F26

10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY

Původní články:

1. 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. **IF 1,763.**
2. Melichar B, Toušková M, Veselý P. Effect of irinotecan on the phenotype of peripheral blood leukocyte populations in patients with metastatic colorectal cancer. *Hepato-Gastroenterol* 2002; 49: 967-970. **IF 0,756.**
3. Melichar B, Kohlova T, Veselý P. Survival after oxaliplatin therapy of irinotecan-pretreated advanced colorectal cancer patients. *Hepato-Gastroenterol* 2005; 52: 1707-1714. **IF 0,756.**
4. Veselý P, Toušková M, Melichar B. Phenotype of Peripheral Blood Leukocytes and Survival of Patients with Colorectal Cancer Liver Metastases. *Int J Biol Markers* 2005; 20: 126-133. **IF 0,966.**
5. 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 rektu. *Klin Onkol* 2006; 19: 186-193
6. Melichar B, Solichová D, Svobodová I, Urbánek L, Veselý P, Melicharová K. Urinary neopterin in patients with liver tumors. *Tumori* 2006; 92: 318-322. **IF 0,701.**
7. Melichar B, Urbánek L, Krčmová L, Kalábová H, Svobodová I, Dragounová E, Veselý P, Hyšpler R, Solichová D. Urinary neopterin in patients with ovarian cancer. *Pteridines* 2006; 17: 145-153. **IF 0,545.**
8. Melichar B, Tousekova M, Hornychova H, Vokurkova D, Solichova D, Vesely P, Mergancova J, Urmínska H, Ryska A. Systemic immune activation and peripheral blood lymphocytes during primary chemotherapy with the combination of doxorubicin and paclitaxel in patients with breast carcinoma. *Pteridines* 2007; 18: 25-34. **IF 0,545.**

Přehledové články:

1. Dvorak J, Zoul Z, Melichar B, Petera J, Vesely P, Vosmik M, Dolezel M. Liposomal doxorubicin combined with regional hyperthermia: Reducing systemic toxicity and improving locoregional efficacy in the treatment of solid tumors. J Chemotherapy 2004; 16, Suppl.5: 34-36. IF **1,374**.

Kasuistická sdělení:

1. Veselý P, Filip S, Vaculiková M, Odrážka K, Jon B, Hadži Nikolov D, Jansa J, Melichar B. Testicular Choriocarcinoma with Jejunal Metastasis Complicated by Intestinal Perforation and Acute Peritonitis. Chir Gastroenterol 2006; 22: 195-197. IF **0,178**.
2. Tomaszová-Romžová M, Kutílek P, Baker K, Podhola M, Dvořák P, Hoffman P, Veselý P. Maligny fibrózní histiocytóm. Urologia 2006; 12(4): 35-37

Závěrečná zpráva grantu:

1. Veselý P., Melichar B.: Závěrečná zpráva grantového projektu GA UK 75/03 (Prospektivní sledování změn funkčních parametrů leukocytů periferní krve u nemocných s jaterními metastázami karcinomu tlustého střeva.), 2004.

Statě ve sbornících, abstrakta a postery z tuzemských konferencí:

1. 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
2. Melichar B., Veselý P.: Možnosti imunoterapie mozkových nádorů z pohledu poznatků o imunitním systému mozku. Sborník abstrakt, VIII. ročník celostátního postgraduálního kurzu v neurochirurgii, Hradec Králové, 2001: 21. Abstrakt
3. Veselý P., Melichar B.: A colorimetric lymphocyte proliferation assay in the assessment of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) function in cancer patients, abstrakt přednášky na VIII. vědecké konferenci LFHK UK a FNHK, 28. ledna 2004., Acta Med (Hradec Králové) 2004; 47(2). Abstrakt
4. Dvořák J., Veselý P., Štúk J., Ryška A., Tomšová M., Melichar B., Petera J.: Korelace mezi expresí Ki-67, p53, hormonálními receptory a tradičními klinicko-patologickými charakteristikami pokročilého karcinomu prsu ve stádiu III a IV. 10.ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii. Brno, 6.1.-8.1.2005. Abstrakt.
5. Dvorak J., Petera J., Vesely P., Melichar B., Zoul Z., Vosmik M., Jandik P., Hladik P., Vaculikova M., Mergancova J.: "Sandwich technique" preoperative and postoperative radiotherapy for rectal adenocarcinoma: a retrospective evaluation of 82 patients treated in 1995-2000. 1.Konference SROBF. Hradec Králové, 25.2.-26.2.2005. Sborník příspěvků (ISBN: 80-239-4105-4), s.29-33. Abstrakt.
6. Dvorak J., Vosmik M., Petera J., Vesely P., Melichar B., Zoul Z., Papik Z., Jansa J., Kabelac K., Jandik P.: Swallowing function before and after radiotherapy for inoperable oesophageal cancer. 1.Konference SROBF. Hradec Králové, 25.-26.2.2005. Sborník příspěvků (ISBN: 80-239-4105-4), s.134-137. Abstrakt.
7. Dvořák J., Zoul Z., Veselý P., Vaculiková M., Vošmik M., Jilková V., Melichar B., Jandik P., Hladík P., Petera J.: Palliativní radioterapie mozkových metastáz kolorektálního karcinomu. XII.Jihočeské onkologické dny. Český Krumlov 13.10.-15.10.2005. Sborník s.72. Abstrakt.
8. Dvořák J., Ryška A., Tomšová M., Veselý P., Jansa J., Štúk J., Melichar B., Zoul Z., Jandik P., Petera J. Korelace mezi expresí estrogenových a progesteronových receptorů, hladinou CEA a CA 15-3 před

- léčbou a tradičními klinicko-patologickými charakteristikami karcinomu prsu u žen starších 70 let. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. Olomouc 9.12.-10.12.2005. s.22-23. Abstrakt
9. Dvořák J., Vaculíková M., Vošmik M., Veselý P., Jansa J., Jandík P., Křozová Urminská H., Řezáčová J., Melichar B., Petera J. Palliativní radioterapie mozkových metastáz karcinomu prsu. 11.ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii. Brno, 6.1.-7.1.2006. Abstrakt.
 10. Dvořák J., Veselý P., Tomšová M., Melichar B., Petera J., Tyčová V., Nová M.: Expres EGFR a VEGF ve vztahu k toxicitě pooperační adjuvantní radiochemoterapie adenokarcinomu rekta – pilotní studie. 2.konference Společnosti radiační onkologie, biologie a fyziky. Hradec Králové, 3.3.-4.3.2006. Abstrakt.
 11. Dvořák J., Zoul Z., Veselý P., Ryska A., Tomšová M., Štuk J., Melichar B., Jansa J., Jandík P., Petera J.: Korelace mezi expresí estrogenových a progesteronových receptorů, Ki-67, p53, hladiny CEA a CA 15-3 před léčbou u žen s karcinomem prsu. XIII. Jihočeské onkologické dny. Český Krumlov, 19.-21.10.2006. Sborník s.108. Abstrakt.
 12. Veselý P.: Plicní embolizace u onkologicky nemocných. 12. celostátní gerontologický kongres. Hradec Králové, 15.-17.11.2006. Sborník s. 42. Abstrakt.
 13. Dvořák J., Tomšová M., Melichar B., Veselý P., Tyčová V., Vošmik M., Petera J.: CD 3, CD 105, VEGF, EGFR, p53 and survivin expression in patients with local advanced rectal adenocarcinoma treated by adjuvant radiotherapy – a pilot study. 4.konference Společnosti radiační onkologie, biologie a fyziky. Hradec Králové, 22.-23.2.2008. Abstrakt.

Statě ve sbornících, abstrakta a postery z mezinárodních konferencí:

1. Melichar B.,Touskova M., Blaha M., Veselý 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
2. Dvořák J., Veselý P., Vízda J., Melichar B., Vošmik M., Odrážka K., Jandík P., Hladík P., Vobořil R., Petera J.: The prognostic value of pretreatment CEA level and pretreatment thrombocytes in irradiated rectal cancer patients. 6th Central European Conference on Human Tumor Markers - CECHTUMA 2004. Praha. 1.-3.10.2004. Biomarkers and Environment 2004; 3,4 (8): p.78. Abstract.
3. Dvorak J., Petera J., Melichar B., Kabelac K., Vobořil R., Zoul Z., Vosmik M., Vesely P., Spacek V., Jandik P.: Preoperative neoadjuvant radiochemotherapy for gastric cancer. ESTRO 23. Amsterdam. Holandsko. 24.10.-28.10.2004. Radioth Oncol 2004; 73, Suppl.1, S270: 616. Abstract.
4. Dvorak J., Zoul Z., Melichar B., Vesely P.: Thermochemotherapy: combining hyperthermia with cytotoxic chemotherapy. World Conference on Magic Bullets, Celebrating Paul Ehrlich's 150th Birthday, Nürnberg, Německo, 9.9.-11.9. 2004; A-34: 134. Abstract.
5. Dvorak J., Vosmik M., Petera J., Vesely P., Melichar B., Zoul Z., Jansa J., Kabelac K., Jandik P.: Radio chemotherapy for inoperable esophageal cancer. 16th international Congress on Anti-Cancer Treatment (ICACT). Paříž, Francie, 1.2.-4.2.2005. Abstract book. s. 236-237. Abstract.
6. Dvorak J., Vesely P., Melichar B., Ryska A., Zoul Z., Petera J.: Relations among expression of Ki-67, p53, hormonal receptors and traditional clinicopathological features in stage I and stage II breast cancer. Primary Therapy of Early Breast Cancer, St.Gallen, Švýcarsko 26.1.-29.1.2005. The Breast 2004; 14, Suppl.1, P9: 17. (ISSN 0960-9776).Abstract
7. Dvorak J., Vesely P., Petera J., Melichar B., Zoul Z., Vosmik M., Vaculikova M., Dolezel M.: Radiotherapy of brain metastases from renal cell carcinoma. ESTRO International Symposium

- "Challenges in the practice of evidence based oncology in developing countries", ESTRO/ TMH-EBM 2005, Tata Memorial Hospital, Mumbai, Indie, 28.2.-3.3.2005. Abstract book, pp. 49-50. Abstract.
8. Dvorak J., **Vesely P.**, Stuk J., Ryska A., Tomsova M., Melichar B., Zoul Z., Petera J., Jandik P., Mergancova J.: Expression of oncoprotein Her2/neu and its relations with oncoprotein p53 and other clinicopathological features in breast cancer. The 3rd Congress Of The World Society For Breast Health jointly with The 5th Biennial Meeting Of The Asian Breast Cancer Society. Tokyo, Japonsko, 20.4.-23.4.2005. Abstract.
 9. Dvorak J., Petera J., **Vesely P.**, Melichar B., Zoul Z., Vosmik M., Jandik P., Hladik P., Voboril R., Mergancova J.: Adjuvant postoperative radiochemotherapy for rectal adenocarcinoma. ESEC 2005 Conference, Budapest, Mačarsko, 2.6.-5.6.2005. *Annals of Oncology* 2005; 16, Suppl. 2, pp.288-289: 68. Abstract.
 10. Dvorak J., Voboril R., **Vesely P.**, Vosmik M., Petera J., Melichar B., Jandik P., Hladik P., Zoul Z., Mergancova J.: Adjuvant postoperative radiotherapy for rectal adenocarcinoma. XV. World Congress of IASG, Praha, 7.9.-10.9.2005. *Hepato-Gastroenterol* 2005; 52, Suppl 1, A175, T12-P-04. Abstract.
 11. Dvorak J., Voboril R., **Vesely P.**, Vosmik M., Petera J., Melichar B., Jandik P., Hladik P., Zoul Z., Mergancova J.: Palliative radiotherapy for inoperable rectal adenocarcinoma. XV. World Congress of IASG, Praha, 7.9.-10.9.2005. *Hepato-Gastroenterol* 2005; 52, Suppl 1, A175, T12-P-05. Abstract.
 12. Dvorak J., Lukesova S., **Vesely P.**, Melichar B., Petera J., Doležel M., Buresova E., Kopecky O., Simkova M., Jandova E.: Radiotherapy of brain metastases from cutaneous melanoma. 6th World Congress on Melanoma. Vancouver, Kanada, 6.9.-10.9.2005. Abstract.
 13. Dvorak J., Voboril R., Hladik P., **Vesely P.**, Melichar B., Petera J., Zoul Z., Vosmik M., Jandik P., Mergancova J.: Preoperative neoadjuvant radiochemotherapy for rectal adenocarcinoma. Eur J Cancer 2005; 3(2) Suppl. p.196: 693. Abstract. The European Cancer Conference ECCO 13, Paříž, Francie, 30.10.-3.11.2005.
 14. Dvorak J., Hladik P., **Vesely P.**, Vosmik M., Zouhar M., Melichar B., Jandik P., Zoul Z., Jansa J., Petera J.: Short-course preoperative radiotherapy for locally advanced rectal adenocarcinoma. XVI. World Congress of IASG, Madrid, Španělsko, 25-27.5.2006. *Hepato-Gastroenterol* 2006; 53, Suppl. 1, 158-159. Abstract.
 15. Dvorak J., **Vesely P.**, Tomsova M., Melichar B., Petera J., Tycova V., Nova M.: Expression of tumor infiltrating T lymphocytes in rectal cancer treated with neoadjuvant radiochemotherapy. XVI. World Congress of IASG, Madrid, Španělsko, 25.-27.5.2006. *Hepato-Gastroenterol* 2006; 53, Suppl. 1, 160. Abstract.
 16. Dvorak J., Vosmik M., **Vesely P.**, Hladik P., Jandik P., Zouhar M., Melichar B., Zoul Z., Jansa J., Petera J.: Radiotherapy for inoperable local recurrence of rectal adenocarcinoma in preirradiated patients. XVI. World Congress of IASG, Madrid, Španělsko, 25.-27.5.2006. *Hepato-Gastroenterol* 2006; 53, Suppl. 1, 161. Abstract.
 17. Dvorak J., **Vesely P.**, Tomsova M., Melichar B., Petera J., Tycova V., Nova M.: Expression of tumor infiltrating T lymphocytes in rectal adenocarcinoma treated by adjuvant postoperative radiotherapy. 31st ESMO Congress, Istanbul, Turecko, 29.9.-3.10.2006. *Annals of Oncology* 2006; 17, Suppl. 9, 368P. Abstract.
 18. Dvorak J., **Vesely P.**, Tomsova M., Melichar B., Petera J., Tycova V., Nova M.: Expression of tumor infiltrating T lymphocytes, EGFR, VEGF and p53 in rectal carcinoma treated by adjuvant

- postoperative radiochemotherapy. ESTRO 25 Congress, Lipsko, Německo, 8.-12.10.2006. Radioth Oncol 2006; 81, Suppl. 1, 571 poster. Abstract.
19. Dvorak J., Melichar B., Petera J., Kabelac K., Vosmik M., Zoul Z., Vesely P., Ryska A., Jandik P.: Prognostic factors of preoperative neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced gastric adenocarcinoma. 7th International Gastric Cancer Congress (IGCC), Sao Paulo, Brazilie, 9.-12.5.2007. Journal of the Brazilian Medical Association 2007; Suppl., PO-11-073. Abstract.
 20. Dvorak J., Tomsova M., Melichar B., Vesely P., Tycova V., Vosmik M., Holikova M., Petera J.: Survivin expression in rectal adenocarcinoma treated by adjuvant postoperative radiotherapy. 2007 World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, Španělsko, 28.6.-1.7.2007. Annals of Oncology 2007; 18, Suppl. 7, P-0137. Abstract.
 21. Dvorak J., Tomsova M., Melichar B., Vesely P., Tycova V., Vosmik M., Petera J.: Microvessel density using endoglin (CD 105) expression in rectal adenocarcinoma treated by adjuvant postoperative chemoradiotherapy. ESMO Conference Lugano (ECLU), Lugano, Švýcarsko, 5.-8.7.2007. Annals of Oncology 2007; 18, Suppl. 9, 39P. Abstract.
 22. Dvorak J., Vosmik M., Kabelac K., Vesely P., Petera J., Melichar B., Zoul Z., Zouhar M., Bedrosova J., Jandik P.: Palliative external beam radiotherapy for inoperable esophageal carcinoma. XVII. World Congress of IASGO. Hepato-Gastroenterol 2007; 54, Suppl 1, A108, T03-P-04. Abstract.
 23. Dvorak J., Vosmik M., Jandik P., Vesely P., Zoul Z., Jilkova V., Melichar B., Majirsky M., Sirak I., Petera J.: Palliative radiotherapy of brain metastases from colorectal adenocarcinoma. XVII. World Congress of IASGO. Hepato-Gastroenterol 2007; 54, Suppl 1, A141, T06-P-03. Abstract.
 24. Dvorak J., Tomsova M., Melichar B., Vesely P., Tycova V., Vosmik M., Petera J.: Angiogenesis assessment using endoglin (CD 105) expression in rectal adenocarcinoma treated by adjuvant radiotherapy. XVII. World Congress of IASGO. Hepato-Gastroenterol 2007; 54, Suppl 1, A152, T07-P-01. Abstract.

Přednesené přednášky na odborných setkáních mimo pracoviště:

1. Vesely P., Melichar B.: Možnosti imunoterapie mozkových nádorů z pohledu poznatků o imunitním systému mozku. VIII. ročník celostátního postgraduálního kurzu v neurochirurgii, Hradec Králové, 2001.
2. Vesely P., Melichar B.: Systémová léčba generalizovaného renálního karcinomu. Krajský urologický seminář, Urologická klinika FNHK, říjen 2003.
3. Vesely P., Melichar B.: A colorimetric lymphocyte proliferation assay in the assessment of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) function in cancer patients. VIII. vědecká konference LFHK UK a FNHK, 28. ledna 2004.
4. Vesely P.: Plicní embolizace u onkologicky nemocných. 12. celostátní gerontologický kongres. Hradec Králové, 15.-17.11.2006.