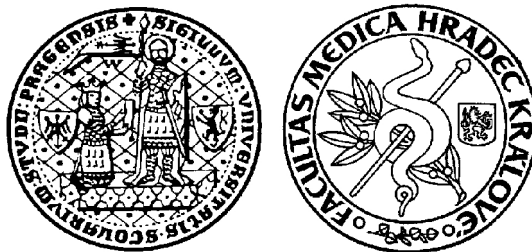


**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



**Změny buněčných imunologických parametrů se zaměřením na populaci NK
buněk u pacientů s tumorem pankreatu ve vztahu k léčbě a depresi**

Jindřich Kopecký

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program klinická onkologie a radioterapie

Hradec Králové

2013

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Klinická onkologie a radioterapie na Ústavu Klinické onkologie a radioterapie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Jindřich Kopecký, FN Hradec Králové, Klinika onkologie a radioterapie

Školitel: MUDr. Stanislav Filip Ph.D., DSc. FN Hradec Králové, Klinika onkologie a radioterapie

Školitel konzultant: doc. MUDr. Ladislav Slováček Ph.D, FN Hradec Králové, Klinika onkologie a radioterapie

Oponenti: doc. MUDr. Renata Soumarová, Ph.D., MBA, Nemocnice Nový Jičín, Oddělení radioterapie a onkologie

MUDr. Karel Čwierka, Ph.D., FN Olomouc, Onkologická klinika

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. MUDr. Jiří Petera, Ph.D.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Klinická onkologie a radioterapie

Obsah

1. Souhrn	4
2. Summary	5
3. Úvod do problematiky	6
4. Cíle disertační práce	9
5. Materiál a metodika	10
6. Výsledky	13
7. Diskuze	16
8. Závěr	19
9. Použitá literatura.....	20
10. Přehled publikační činnosti autora	25

1. Souhrn

Karcinom pankreatu (dále jen KP) se řadí k onemocněním s největším maligním potenciálem. Stejně jako v polovině minulého století umírá většina pacientů do 1 roku od stanovení diagnózy a pouze 2 až 5 % nemocných přežívají více než 5 let. Příčinou je biologická povaha nádoru charakterizovaná schopností agresivně prorůstat do okolních tkání, postižením lymfatických uzlin již v časných stádiích onemocnění, perineurálním šířením, invazí do cév a metastatickým postižením jater a peritonea. Subklinický průběh premaligních a časných nádorových fází onemocnění je hlavní příčinou pozdní diagnostiky nádoru v pokročilých, již inoperabilních stádiích. Navzdory pokroku v poznání molekulárně-biologických procesů účastných v nádorové patogenezi i novým diagnostickým možnostem zůstává prognóza pacientů s KP de facto nezměněna. Jedním z průvodních jevů u pacientů s KP je až v 50% případech přítomnost depresivních symptomů či již klinicky rozvinutá deprese. Kombinace deprese s nádorovým onemocněním tvoří významný faktor ovlivňující kvalitu života a vede ke zvýšené morbiditě. Přesto, že je známa souvislost mezi funkcí podkorových center mozku, imunitním a endokrinním systémem, je často opomíjen dopad dlouhodobého stresu a deprese na homeostázu vnitřního prostředí. Z dlouhodobého hlediska má stav duševního zdraví velký význam pro správnou funkci imunitního systému (dále jen IS). V průběhu zhoubného novotvaru (dále jen ZN) jsou aktivovány jak cytotoxické buňky (cytotoxické T lymfocyty a NK buňky), tak další buněčné populace (makrofágy, dendritické buňky, B lymfocyty), které mají společně s nádorovými buňkami zásadní vliv na charakter protinádorové imunitní odpovědi. Přítomnost aktivovaných imunokompetentních buněk ještě není důkazem účinné protinádorové odpovědi. Dalším faktorem zasahujícím do homeostázy vnitřního organismu včetně IS je u pacientů s KP vlastní protinádorová léčba. Dlouhodobě přijímané tvrzení, že v důsledku cytostatické léčby dochází k navození imunosuprese, není zcela pravdivé, ale v povědomí laické i odborné veřejnosti stále přetrvává. V experimentálních studiích je prokázáno, že některá cytostatika selektivně potlačují populace imunosupresivních buněk a zesilují protinádorovou imunitní odpověď. Tyto poznatky nemají žádné nebo jen marginální využití v klinické praxi. Znalost imunitních změn, vyvolávaných jak ZN, tak protinádorovou léčbou, je nutným předpokladem pro využití při zavádění nových léčebných přístupů a metod v léčbě KP.

2. Summary

Changes in cell immune parameters with focus on NK cells in patients with pancreatic cancer in relation to therapy and depression

Pancreatic cancer (further PC) is one of the diseases with the greatest malignant potential. Most of patients die within 1 year from diagnosis, and only 2-5 % of patients survive more than 5 years. A major cause of late diagnosis of PC and so his insufficient therapeutic management is due to the late clinical signs of PC.

Despite of progress in understanding of the molecular and biological basis of tumor genesis, the prognosis of patients with PC stays during the years unchanged. One of the often clinical signs related with PC is the presence of depressive symptoms or already developed clinically depression. The association of depression and cancer constitutes an important factor affecting the quality of life and can lead to increased morbidity. Even when the relationship between the function of subcortical centers of the brain, immune and endocrine system is known, the role of long-term stress and depression in the homeostasis is often overlooked.

The mental health has a great importance for the proper functioning of the immune system from the long term. During the tumor genesis there are activated cytotoxic cells (cytotoxic T lymphocytes and NK cells) and other cell populations (macrophages, dendritic cells, B lymphocytes), which together with tumor cells have significant final effect on the character of anti-tumor immune responses. But the presence of activated immunocompetent cells itself does not prove an effective antitumor response.

Another factor affecting the homeostasis of the organism, including immune system in patients with PC is own cancer treatment. Long time accepted thesis that the cytostatic therapy can induce only immunosuppression is not completely true, but in the minds of the general public and even among experts still persists. In experimental studies, it is shown that some antineoplastic agents selectively suppress the population of immunosuppressive cells and potentiate the antitumor immune response. These findings have still no or only marginal use in clinical practice. But the knowledge of immune changes induced by both cancer and anticancer treatment is a prerequisite for understanding and further progression in new therapeutic approaches and methods in the treatment of PC.

3. Úvod do problematiky

Nádory pankreatu jsou heterogenní skupinou onemocnění a řadí se k onemocněním s největším maligním potenciálem. Z didaktivního hlediska se nádory pankreatu dělí na ductální adenokarcinom, tvořící více jak 90 % nádorů žlázy, a ty ostatní, méně časté (nádory cystické, neuroendokrinní, lymfomy a metastázy nádorů jiných lokalizací). V následujícím textu se s ohledem na výběr pacientů do studie pojednává pouze o ductálním adenokarcinomu pankreatu.

Adenokarcinom pankreatu se řadí svojí častostí výskytu mezi gastrointestinálními nádory na třetí příčku (*ÚZIS ČR 2013*). Pro adenokarcinom pankreatu je charakteristické časně vrůstání do okolních struktur a metastazování do regionálních uzlin a jater. Samotná diagnóza karcinomu pankreatu má velice špatnou prognosu, kdy procentuálně 5leté přežití se pohybuje kolem 5 % bez rozdílu stádia a rasy (*Fazal et al. 2007*). Samotná léčba KP je založena na principu multimodálního přístupu - chirurgie, radiační a klinická onkologie. Vzhledem k pozdě diagnostikovanému KP, kdy je většina nádorů již inoperabilní, přistupujeme ke KP již primárně s paliativním záměrem protinádorové léčby, kde i s ohledem na profil nežádoucích účinků, je gemcitabin považován za standard v první linii paliativní chemoterapie.

Pacienti s KP mají prokázanou poruchu funkce IS. V nádorovém milieu KP se nachází leukocytární infiltrace, kde ale hlavní komponenty této leukocytární populace tvoří imunosupresivní buňky, jako tumor asociované makrofágy, myeloidní supresorové buňky a T regulační lymfocyty. Přítomné jsou i cytotoxické T lymfocyty, avšak jejich množství a aktivace jsou v průběhu onemocnění velmi nízké (*Clark et al. 2007*).

Změna funkce IS u onkologicky nemocných pacientů může mít fyziologický charakter v rámci imunitní odpovědi na nádorové antigeny. Může být také alterována (suprimována) působením faktorů uvolňovaných z nádorové tkáně. Ke změnám v imunitní odpovědi dochází i vlivem deprese a fobie, které jsou přítomny u řady nemocných s ZN. Změny imunitní reaktivity ovlivňuje i protinádorová léčba. Veškeré tyto změny se následně kvalitativně a kvantitativně odráží v humorální i buněné složce IS, a to jak na úrovni přirozené (např. cytokiny, NK buňky), tak i adaptivní imunity (např. T lymfocyty).

Ve studiích prováděných na myších modelech, ale i v několika klinických studiích, bylo prokázáno, že průkaz cytotoxických buněk v nádorovém stromatu je asociován s příznivější prognózou onemocnění (*Jass 1986; Zhang et al. 2003; Satto et al. 2005*). Přítomnost NK buněk v nádorovém stromatu je považována za jedno z prognostických znamení (*Coca et al. 1997; Villegas et al. 2002; Hsia et al 2005; Beano et al. 2008*). Naproti tomu existuje řada dokladů, že v nádorovém stroma dochází také k produkci řady cytokinů a chemokinů, z nichž mnohé mají

ambivalentní efekt. Nádorové stroma je z velké části tvořeno makrofágy, které jsou pod regulačním vlivem nádorových buněk a sami produkují mediátory, které podporují proliferaci nádorových buněk, s nádorem spojenou angiogenezi a metastazování. Navíc chemokiny produkované v místě rostoucího nádoru jsou odpovědné za vstup neutrofilních segmentů. Tyto leukocyty pak po vstupu do stroma uvolňují další angiogenní faktory, mitogeny a proteolytické enzymy. Tímto mechanismem vzniká mikroprostředí příznivé pro nádorový růst a založení vzdálených metastáz (*Yan et al. 2006*).

NK buňky jsou důležitou komponentou přirozené imunity, která zajišťuje obranné reakce proti virům, bakteriálním a parazitárním intracelulárním patogenům a nádorově změněným buňkám. Po kontaktu s poškozenou buňkou jsou NK buňky schopny rychlé odpovědi bez předchozí senzibilizace a cytotoxická reakce není závislá na přítomnosti antigenů hlavního histokompatibilního systému (*Smyth et al. 2001; French et al. 2003*). Aktivované NK buňky produkují řadu cytokinů (např. INF- γ , GM-CSF a TNF- β) a chemokinů, které vedou k autokrinní a parakrinní aktivaci buněk podílejících se na imunitní reakci. Touto cestou jsou NK buňky schopny regulovat jednak přirozenou, jednak získanou imunitní odpověď (*Taub et al. 1999; Biron et al. 2000*). Naproti tomu jsou pozitivně i negativně regulovány jak dalšími buňkami IS, tak poškozenými a nebo nádorově transformovanými buňkami.

Průlomem objasnění mechanismu aktivace či inhibice cytotoxické aktivity NK buněk bylo objevení dvou odlišně funkčních typů membránových receptorů (*Bottino et al. 2004; Moretta et al. 2004*). Doposud byla objevena a popsána – jak svou funkcí, tak strukturálně – většina zástupců hlavních rodiny povrchových buněčných receptorů, mezi které řadíme zástupce receptorů z rodiny KIR, C-typ lectinu a zástupce NCR receptorů.

Výsledná rovnováha mezi stimulací aktivačních a inhibičních receptorů na povrchu NK buněk je určujícím principem, zda převáží aktivace či inhibice NK buňky. Mezi silné inhibiční stimuly patří přítomnost MHC molekul I. třídy na povrchu cílové buňky. Ztráta MHC molekul I. třídy či jejich snížená exprese nebo změna exprese na povrchu buňky spouští v NK buňkách aktivační kaskády s výslednou destrukcí takové buňky (*Raulet et al. 2001; McQueen et al. 2002; Bottino et al. 2004; Moretta et al. 2004*).

Změny v náladě a psychickém ladění ovlivňují imunologickou obranyschopnost na buněčné úrovni (*Thorton et al. 2007*). Dlouhodobý stres vyvolává změny v IS. Jde o snížení počtu a funkční kapacity NK buněk a CD8⁺ T lymfocytů, zatímco ostatní parametry IS jsou ovlivněné méně (*Zakowski et al. 1992; Koga et al. 2001*).

U pacientů s depresí je často nalézána relativní lymfopénie a monocytopenie, relativní snížení počtu T lymfocytů, zvýšení absolutního i relativního CD4⁺ T lymfocytů a zvýšení poměru

CD4/CD8. Stav deprese je provázen zvýšením hladiny solubilních prozánětlivých molekul (Zorrila et al. 2001; Gabbay et al. 2009). U pacientů s depresí vykazují CD4⁺ T lymfocyty zvýšenou expresi Fas receptorů (CD95) zodpovědných za aktivaci signální dráhy vedoucí k apoptóze (Szuster-Ciesielska et al. 2008).

U pacientů s depresí je zvýšena sérová hladina TNF α . V důsledku toho dochází k supresi genů regulujících buněčný cyklus. Dochází ke snížení exprese membránových molekul zodpovědných za aktivaci T lymfocytů. Tím je potlačena proliferační schopnost a tvorba cytokinů T lymfocyty, dále zvýšená sérová hladina TNF α ovlivňuje signální dráhy s kalciovým messengerem a apoptické dráhy (Wong et al. 2008), blokuje aktivitu thyrosin fosfatázy zodpovědnou za nitrobuněčné signály. TNF α potlačuje expresi MHC I molekul na povrchu buněk a zvyšuje tak možnost úniku nádorových buněk imunitnímu dozoru (Holden et al. 1998).

U depresivních stavů jsou alterovány i faktory humorální imunity. Snížení celkové hladiny sérového proteinu a zvláště albuminu je častým nálezem. Naopak zvýšeny jsou sérové hladiny proteinů např. haptoglobinu, α 1 glycoproteinu α 1 trypsinu, IgM, PGE2, IL-1beta, IL-6, IL-2, IL-12, TNF α , INF γ a CRP (Zorrila et al. 2001; Irwin et al. 2007; Simon et al. 2008).

4. Cíle disertační práce

Jeden z nejdůležitějších mechanismů, který organismus využívá k obraně před ZN, je skryt v aktivitě vlastního IS – a to ať už vrozené, nebo získané složky. IS podléhá vlivům vycházejících z vnějších tak i vnitřních faktorů.

V případě KP je IS ovlivněn paliativní chemoterapií a v některých případech i operačním zákrokem. ZN vyvolává u postižených osob stresovou situaci se změnami produkce regulačních mediátorů v hypothalamo-hypofyzární ose. U nemocných s KP je popisována vyšší koincidence depresivních stavů, které se následně projevují v organismu změnami ladění humorálního prostředí, které mohou následně ovlivňovat přirozenou i specifickou buněčnou imunitní odpověď. Hlavním cílem naší práce je prozkoumání vlivu humorálních změn u depresivních stavů a vlivu protinádorové léčby u pacientů s KP na imunokompetentní buňky v periferní krvi uplatňujících se v protinádorové odpovědi (T lymfocyty a NK buňky) a v případě NK buněk i vlivu na změnu exprese povrchových aktivačních a inhibičních receptorů.

Dílčím cílem této práce je seznámit se a osvojit si metodu průtokové cytometrie, která se stává důležitou součástí na poli současné onkologie, a to jak v samotné diagnostice ZN, tak v monitorování protinádorové léčby.

5. Materiál a metodika

Do studie bylo zahrnuto 21 pacientů, v době zařazení do studie s lokálně pokročilým KP (histologicky adenokarcinom), léčených v ambulanci paliativní onkologické péče Kliniky onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice v Hradci Králové v období mezi prosincem 2010 a dubnem 2011 s následným sledováním do září 2011. Vstupně byl s pacienty podepsán souhlas s účastí ve studii, která byla schválena Etickou komisí FN Hradec Králové. Vylučovacím kritériem byla pozitivní psychiatrická anamnéza, nepodepsání informovaného souhlasu, věk pod 18 let a vstupní performance status dle ECOG 2 a výše.

Medián věku pacientů zařazených do studie byl 67 let (věkové rozmezí 41–81). Bylo zařazeno 11 žen (z toho 5 s depresí) a 10 mužů (z toho 5 s depresí). Nejčastější lokalizací KP byla hlava pankreatu (71,4% tj. 15 pacientů). V naší sledované skupině bylo dle TNM klasifikace AJCC 2009 v době stanovení diagnózy nejvíce zastoupeno stádium IIB s 10 pacienty, následovaným IV stádiem s 5 pacienty. U 13 pacientů byl KP inoperabilní, avšak v průběhu léčby u 6 z těchto pacientů byl nutný paliativní chirurgický výkon pro riziko vysokého ileu. Primárně radikální chirurgický výkon podstoupilo 8 pacientů, nicméně u 2 z nich byl nutný v čase i paliativní chirurgický výkon pro riziko vysokého ileu. Radikální operace v naší sledované skupině byli schopni pouze pacienti do II. stádia dle prvotní TNM klasifikace v době stanovení diagnózy.

Zařazení pacienti byli rozděleni na základě jednotlivých kritérií do dvou skupin (10 s projevy deprese, 11 bez projevů deprese). Tyto dvě podskupiny byly dále rozděleny na pacienty, kteří v době zařazení do sledování absolvovali chemoterapii a na ty, kteří byli bez chemoterapie déle jak 1 měsíc. Jako kontrolní skupina sloužilo 5 zdravých jedinců bez přítomnosti tumoru a bez depresivních symptomů. V případě parametrů krevního obrazu a jeho diferenciálního rozpočtu byly výsledky našich pacientů porovnávány s referenčním rozmezím jednotlivých parametrů stanovené pro zdravou populaci.

V době zařazení do studie podstupovalo 10 pacientů paliativní chemoterapii gemcitabinem v dávce 1250mg/m² D1,8,15 v intervalu 28 dnů. 2 pacienti podstupovali paliativní chemoterapii v režimu FUFA dle DeGramonta (tito pacienti nebyli zařazení pro statistické výpočty porovnávací skupinu pacientů s chemoterapií a bez chemoterapie). U pacientů s paliativní chemoterapií gemcitabinem jsme vypočetli dávkovou intenzitu vztahenou na m²/týden. V našem souboru byla průměrná dávka intenzity 687,1mg/m²/týden (směrodatná odchylka 183,346).

Celková doba přežití pacientů v naší sledované skupině k 1. 9. 2011 byla v mediánu 366 (rozptyl 90 až 4475 dnů).

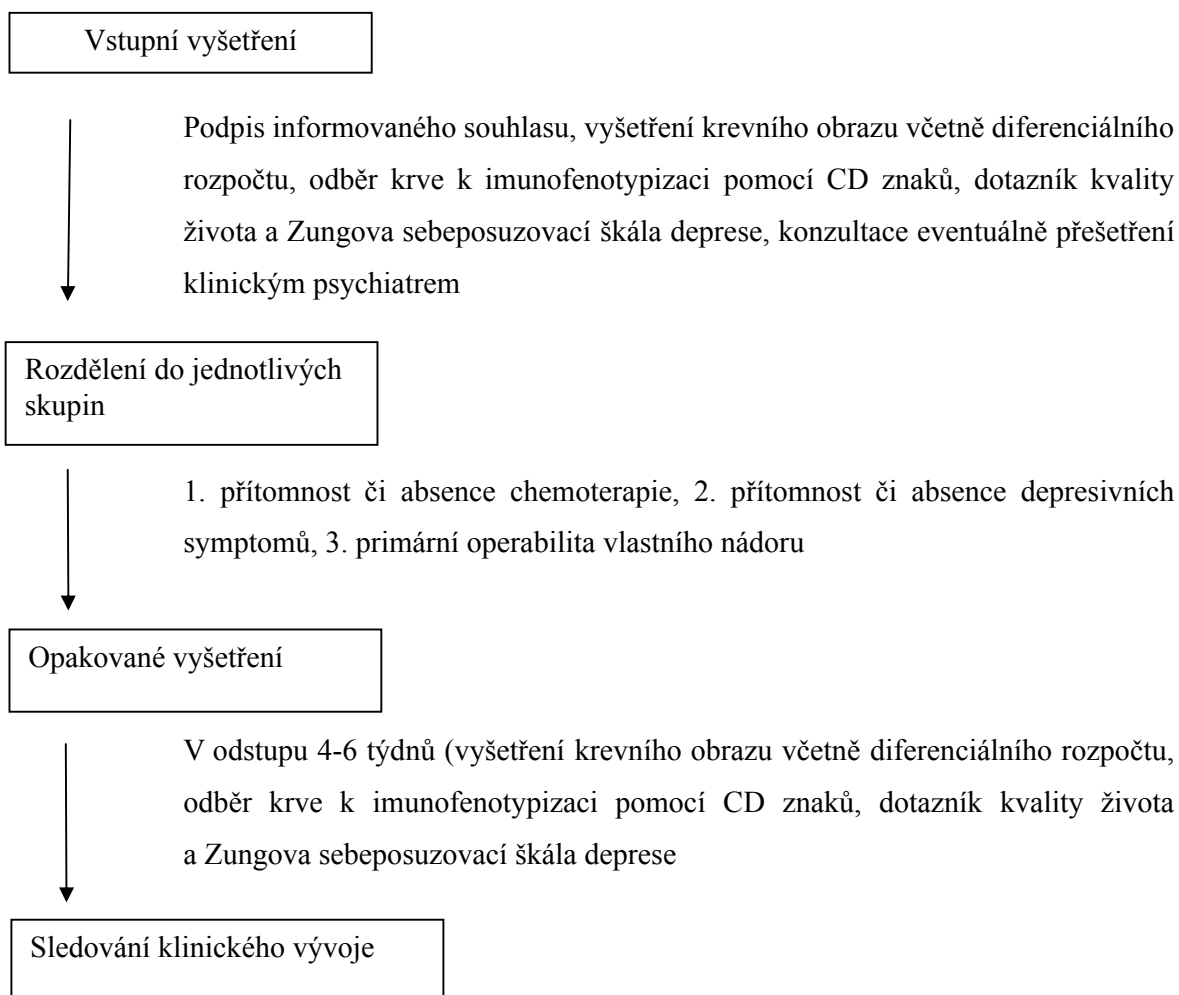
V naší práci byla použita Zungova autoevaluační škála pro zhodnocení výskytu a závažnosti deprese. Tento test se skládá z 20 otázek, z 10 pozitivních a 10 negativních. Dotazovaný pacient vyjadřuje míru potíží na čtyřbodové škále možnosti odpovědí – nikdy nebo zřídka, někdy, dosti často a velmi často. Z výsledného hrubého skóre je pak podle vzorce vypočítán tzv. SDS index, který vyjadřuje míru deprese. Pro depresi svědčí dosažení SDS indexu nad 50 bodů.

Průtoková cytometrie, která byla použita v naší práci, je moderní laboratorní metoda, pomocí které lze vyšetřovat jakékoliv imunofluorescenčně označené buněčné suspenze a stala se součástí imunologické a diferenciatní diagnostiky v klinické praxi. K našemu měření jsme použili průtokový cytometr CyAn ADP od firmy DAKO (devíti barevný průtokový cytometr).

V naší studii jsme použili konjugované monoklonálních protilátek následujících CD znaků: CD3 FITC (Beckman Coulter), CD4 PE (Pharmigen™ BD Biosciences), CD8 PE (Beckman Coulter), CD8 FITC (Beckman Coulter), CD16 APC (BioLegend®), CD25 PB (BioLegend®), CD56 PeCy7 (Beckman Coulter), CD69 PeCy5 (Beckman Coulter), CD158i PE (Beckman Coulter), CD158e1/e2 PE (Beckman Coulter), CD159a APC (Beckman Coulter), CD314 APC (Beckman Coulter), CD335 PE (Beckman Coulter), CD337 PE (Beckman Coulter). Pro jednotlivá měření průtokovou cytometrií a pro základní identifikaci buněčné populace lymfocytů a bližší charakteristiku NK buněk jsme použily následující kombinace: CD8 FITC CD4 PE; CD3 FITC CD8 PE CD69 PeCy5 CD25 PB; CD3 FITC CD335 PE CD56 PeCy7 CD159a APC; CD3 FITC CD337 PE CD56 PeCy7 CD159a APC; CD3 FITC CD158i PE CD56 PeCy7 CD314 APC; CD3 FITC CD158e1 PE CD56 PeCy7; CD3 FITC CD8 PE CD16 APC CD56 PeCy7; CD3 FITC CD4 PE CD69 PeCy5 CD25 PB.

Ke statistické analýze dat byl použit program NCSS od Hintze.J (2011). Nejprve byla testována normalita rozložení získaných dat pomocí Kolmogorova-Smirnovova testu a následně dle výsledku při vlastní statistické analýze byly použity parametrické nebo neparametrické párové či nepárové testy (párový t-test nebo Wilcoxonův párový test, respektive nepárový t-test nebo Mann-Whitneyho U test); za statisticky významné bylo považováno $p < 0,05$.

Vlastní uspořádání studie



6. Výsledky

Celkový počet leukocytů, neutrofilů, lymfocytů a monocytů

Hodnotili jsme celkový počet leukocytů včetně diferenciálního rozpočtu neutrofilů, lymfocytů a monocytů. Celkový počet leukocytů byl u pacientů s KP a depresivními symptomy vyšší oproti zdravým jedincům ($p=0,01$; $9,42\pm 1,04$ vs. $6,65\pm 0,03$). Neprokládali jsme statisticky významný rozdíl pro leukocyty u skupin pacientů bez projevů deprese a pacientů bez chemoterapie oproti hodnotám kontrolní skupiny ($p=0,08$). U skupiny pacientů bez projevů deprese podstupující chemoterapii jsme pozorovali statistické snížení počtu leukocytů ve srovnání se zdravými jedinci ($p=0,02$; $5,77\pm 0,34$ vs. $6,65\pm 0,03$). Při srovnání jednotlivých skupin jsme pozorovali statisticky významně vyšší počty leukocytů pouze v případě pacientů s depresivními symptomy a pacientů bez projevů deprese ($p=0,01$; $9,42\pm 1,04$ vs. $5,97\pm 0,37$).

Naše výsledky poukazují na to, že počet lymfocytů u pacientů s KP bez ohledu na přítomnost či absenci projevů deprese a bez ohledu na chemoterapii, byl signifikantně snížen oproti hodnotám vyskytujících se u zdravých jedinců. Neprokládá se statisticky významný rozdíl v počtu lymfocytů mezi pacienty s/bez chemoterapie. V případě srovnání skupin pacientů s/bez projevů deprese jsme prokázali snížení počtu lymfocytů u pacientů s depresivními symptomy ($p<0,001$; $14\pm 2,17$ vs. $25,77\pm 2,04$).

Pozorovali jsme výrazně vyšší hladiny neutrofilů u pacientů s depresivními symptomy, s/bez chemoterapie oproti hladinám vyskytujících se u zdravých jedinců, ne však pro skupinu pacientů bez projevů deprese ($p=0,08$). Při srovnání jednotlivých skupin mezi sebou, jen pacienti s depresivními symptomy vykazovali vyšší počty neutrofilů v porovnání s pacienty bez projevů deprese ($p<0,001$; $64,77\pm 2,25$ vs. $76,5\pm 2,19$).

V případě počtu monocytů jsme u pacientů s KP bez ohledu na přítomnost projevů deprese či chemoterapie neprokládali statisticky významný rozdíl oproti zdravým jedincům.

NK buňky

V našem souboru jsme neprokládali alteraci počtu NK buněk mezi pacienty s/bez depresivních symptomů oproti kontrolní skupině ($p=0,33$ respektive $p=0,38$) a ani mezi pacienty s/bez chemoterapie a zdravými jedinci ($p=0,77$ respektive $p=0,61$).

Vyšetření čtyřbarevnou průtokovou cytometrií prokázala vyšší hladiny NK lymfocytů u pacientů s projevy deprese oproti pacientům bez projevů deprese ($p=0,07$; $12,41\pm 1,63$ vs. $8,09\pm 1,13$). Ve skupině pacientů s chemoterapií přítomnost depresivních symptomů vedla k zvýšení počtu NK buněk oproti pacientům bez projevů deprese ($p=0,01$; $13,0\pm 2,18$ vs. $6,54\pm 1,22$).

Alterace T lymfocytů

V případě T lymfocytů nebyly rozdíly mezi kontrolní skupinou a pacienty s KP. Při srovnání skupin s/bez projevů deprese jsme pozorovali tendenci nižších hladin T lymfocytů u pacientů s depresivními symptomy ($p=0,07$; $87,58\pm 1,63$ vs. $91,9\pm 1,13$). U pacientů s chemoterapií pak přítomnost depresivních symptomů vede ke statisticky významnému snížení hladin T lymfocytů oproti pacientům bez projevů deprese ($p=0,01$; $86,99\pm 2,18$ vs. $93,45\pm 1,22$).

CD3⁺highCD8⁺high lymfocyty

Pacienti s KP ať s/bez projevů deprese vykazují výrazně nižší hladiny CD3⁺highCD8⁺high T lymfocytů oproti kontrolní skupině ($p=0,0005$; $22,84\pm 1,58$ v.s. $38,62\pm 4,84$ respektive $p=0,004$; $27,62\pm 1,31$ vs. $38,62\pm 4,84$) a snížené hladiny CD3⁺highCD8⁺high T lymfocytů oproti kontrolní skupině jsme pozorovali také u pacientů s chemoterapií i bez chemoterapie ($p=0,003$; $26,49\pm 1,46$ vs. $38,62\pm 4,84$ respektive $p=0,0009$; $23,83\pm 1,56$ vs. $38,62\pm 4,84$).

Při srovnání jednotlivých skupin jsme sledovali statistický rozdíl při porovnání pacientů s/bez projevů deprese, kde pacienti s projevy deprese vykazovali významně nižší hladiny CD3⁺highCD8⁺high T lymfocytů ($p=0,02$; $22,84\pm 1,58$ vs. $27,62\pm 1,31$).

Alterace subpopulací NK buněk

Výsledky průtokové cytometrie pomocí CD znaků CD16 a CD56 ukázaly signifikantní snížení počtu subpopulace NK lymfocytů CD16⁻CD56^{bright} na hladině statistické významnosti $\alpha=0,05$ v porovnání se zdravými jedinci. Tyto rozdíly byly pozorovány bez ohledu na přítomnost či absenci projevů deprese nebo chemoterapie.

Při srovnávání jednotlivých skupin jsme neprokázali statistické odlišnosti v rámci jednotlivých subpopulací NK buněk mezi skupinami pacientů s/bez deprese a ani u skupin pacientů s/bez chemoterapie.

NKp46 pozitivita NK buněk

Pozorovali jsme snížení NKp46 pozitivitu NK buněk oproti kontrolní skupině v následujících situacích: u pacientů s chemoterapií ($p=0,01$; $50,20\pm 4,95$ vs. $79,20\pm 6,48$), u pacientů s depresivními symptomy ($p=0,02$; $79,20\pm 6,48$ vs. $51,99\pm 5,56$) a u nemocných bez projevů deprese ($p=0,05$; $79,20\pm 6,48$ vs. $59,42\pm 4,41$). V případě pacientů bez chemoterapie nebylo snížení statisticky významné ($p=0,097$; $63,45\pm 4,40$ vs. $79,20\pm 6,48$), avšak v případě pacientů bez chemoterapie s projevy deprese došlo k statistickému snížení ($p=0,02$; $54,51\pm 5,93$ vs. $79,20\pm 6,48$).

Neprokázali jsme statisticky významnou odlišnost mezi pacienty s/bez chemoterapie ($p=0,061$; $50,20\pm 4,95$ vs. $63,46\pm 4,39$), avšak ve skupině u pacientů bez projevů deprese přítomnost chemoterapie snižuje hladiny NKp46 pozitivních NK buněk ($p=0,016$; $50,09\pm 5,42$ vs. $70,62\pm 5,58$).

NKG2A pozitivita NK buněk

Na našem souboru jsme pozorovali tendence statistického snížení NK buněk s expresí receptorů NKG2A vůči kontrolním jedincům ať u pacientů s chemoterapií ($p=0,06$; $32,21\pm 4,36$ vs. $51,68\pm 8,0$) nebo bez chemoterapie ($p=0,07$; $38,02\pm 3,25$ vs. $51,68\pm 8,0$), ale i u pacientů bez projevů deprese ($p=0,05$; $34,74\pm 3,57$ vs. $51,68\pm 8,0$).

Při srovnání pacientů s/bez chemoterapie a pacientů s/bez projevů deprese jsme nepozorovali odlišnosti. V podskupině pacientů bez projevů deprese jsme prokázali snížení NKG2A⁺ NK buněk u pacientů s chemoterapií v porovnání s pacienty bez chemoterapie ($p=0,04$; $28,15\pm 4,62$ vs. $42,65\pm 4,63$). U pacientů bez chemoterapie s projevy deprese jsme pozorovali tendenci snížení počtu NKG2A⁺ NK buněk v porovnání s pacienty bez projevů deprese ($p=0,08$; $31,42\pm 3,17$ vs. $42,65\pm 4,63$).

NKG2D pozitivita NK buněk

V našem souboru měření jsme prokázali statistické snížení NKG2D⁺ NK buněk u pacientů s chemoterapií oproti kontrolní skupině ($p=0,005$; $73,16\pm 3,0$ vs. $84,68\pm 2,24$). V ostatních případech jsme nepozorovali statisticky významné odlišnosti.

7. Diskuze

IS člověka podléhá různým vnějším a vnitřním vlivům. U pacientů s KP je IS ovlivněn především vlastním ZN. Vliv má ale i případná protinádorová léčba a s ní související podpůrná léčba. Ukazuje se, že na IS má vliv i psychické ladění pacienta.

ZN nese s sebou stresovou situaci (vyrovnání se se smrtelným onemocněním, změna životního stylu apod.). Tato skutečnost se následně odráží i v humorálním prostředí organismu především na úrovni regulačních mediátorů v hypothalamo-hypofyzární ose, která může u pacientů s KP spolu s ostatními vlivy vyústit až v projevy deprese. Ty jsou provázeny změnami hladin katecholaminů a neurotransmiterů a dále snížením metabolického obratu těchto neurotransmiterů či jejich prekursorů (Kovaru *et al.* 2009). Výsledkem těchto alterací jsou změny hladin hormonů, cytokinů, které vedou v konečném důsledku i ke změnám imunitní protinádorové odpovědi jak na úrovni získané, tak i přirozené složky (Schedlowski *et al.* 1993). Literárně je znám vztah mezi počty T lymfocytů, B lymfocytů a NK buněk a změnami hladin serotoninu či glukokortikoidů (Hsueh *et al.* 2002; Lima *et al.* 2002; Abdouh *et al.* 2004; Peňa *et al.* 2005).

Kvantitativně se projevuje vliv chronického stresu a projevů deprese na počet leukocytů - vyšší hladiny neutrofilů a naopak nižší celkových lymfocytů, snížený počet cirkulujících B a T lymfocytů, kde dle našich výsledků je nejvíce ovlivněna specifická populace tzv. CD8⁺ cytotoxických T lymfocytů (Olf 1999). Pohled na vliv projevů deprese na hladiny NK buněk se v literatuře liší. Existují práce, které podobně jako naše práce u pacientů s KP a depresí popisují vyšší hladiny NK buněk (Griffiths *et al.* 1997; Ravindran *et al.* 1999; Pavón *et al.* 2006), ale jsou i práce s protichůdnými výsledky (Andreoli *et al.* 1993; Schleifer *et al.* 1999). Tyto rozdílné výsledky si vysvětlujeme odlišně nastavenými parametry jednotlivých prací jako jsou demografické charakteristiky, kuřáctví, pohlaví, celkový zdravotní stav s ohledem na primární onemocnění a jeho rozsah, ale i ne vždy přesně definovanými podmínkami pro měření parametrů IS. Zvýšená hladina NK buněk v periferní krvi může souviset i s funkční deficiencí NK buněk, kterou se organismus snaží kompenzovat zvýšením jejich počtu (Zorrilla *et al.* 2001; Jozuka *et al.* 2003).

Přesný mechanismus alterace protinádorové cytotoxicity NK buněk není detailně znám. U pacientů s projevy deprese byly popsány změny u leukocytů na úrovni alfa podjednotky G proteinu (Kovaru *et al.* 2009), který zajišťuje přenos signálů vedoucí k aktivaci leukocytů. Svoji roli negativní regulace protinádorové odpovědi mají glukokortikoidy (Druker *et al.* 2006)

a v neposlední řadě mohou být buňky zodpovědné za cytotoxickou aktivitu ovlivněny změnami hladin přímo neurotransmiterů při depresivních stavech. Na povrchu T, B lymfocytů, ale i NK buněk, byly detekovány receptory pro serotonin a katecholaminy (*Pellegrino et al. 2002*). Všechny tyto mechanismy vedou v konečném důsledku ke zvýšené indukci apoptózy imunokompetentních buněk, či ke snížení jejich proliferační aktivity u pacientů s projevy deprese (*Ivanova et al. 2006; Chesnokova et al. 2002*).

Při analýze jednotlivých subpopulací NK buněk se jako hlavní negativní faktor ukazuje samotný KP bez ohledu na přítomnost či absenci projevů deprese. Nejvíce ovlivněnou subpopulaci NK buněk dle našich výsledků je CD16⁻CD56^{bright} subpopulace. Toto si vysvětlujeme následovně: 1. CD56^{bright} NK buňky se nacházejí preferenčně v kompartmentech jakým jsou lymfatické uzliny, či slezina, proto je jejich zastoupení nižší v periferní krvi, kde dominuje zastoupení CD56^{dim} NK buněk (*Lima et al. 2001; Farag et al. 2006*), 2. CD56^{bright} buňky jsou považovány za fylogeneticky mladší formu NK buněk, ze kterých se následně diferencují CD56^{dim} NK buňky (*Nagler et al. 1989*), kdy v přítomnosti tumoru dochází k přesunu CD56^{bright} buněk ze sekundárních kompartmentů do periferní krve s postupnou maturací v CD56^{dim} fenotyp NK buněk.

Změna míry exprese aktivačních a inhibičních receptorů na NK buňkách souvisí pravděpodobně s vlastní přítomností a rozsahem tumoru, kde literárně je známo, že u pacientů s progresí ZN dochází ke snížení exprese aktivačních receptorů jako NKp30, NKG2D a naopak zvýšení exprese inhibičních receptorů jako NKG2A (*Garcia-Iglesias et al. 2009; Mamessier et al. 2011*). A dále snížení exprese NCR receptorů a NKG2D receptorů podléhá aktivitě TGFβ, indoleamin 2,3-dioxygenase, prostaglandinu E2 či kortikosteroidům (*Vitale et al. 2004; Hao et al. 2007; Spaggiari et al. 2008; Li et al. 2009*), kdy především kortisol snižuje povrchovou expresi receptorů NKp46 a NKp30 (*Mavoungou et al. 2005*). V neposlední řadě je známo, že v průběhu maturace NK buněk z CD56^{bright} k CD56^{dim} se snižuje membránová exprese NKG2A receptoru a naopak CD56^{dim} NK buňky získávají membránové receptory KIR (*Béziat et al. 2010; Farag et al. 2006*).

Vlivu cytostatické protinádorové léčby byl dlouhá léta přikládán pro nespecifickou účinnost pouze negativní vliv na IS. V léčbě KP je v dnešní době užíván především gemcitabin, jehož mechanismus účinku je založen na přerušení syntézy DNA inhibicí ribonukleotidreduktázy a DNA polymerázy α, což vede k vyčerpání zásob deoxynukleotidu. Svým působením zasahuje gemcitabin i do IS, kde převážně působí jako stimulační faktor. Svým působením redukuje počet MDSC (*Suzuki E, 2005*) a zvyšuje počet nádorových antigenů (*Zisman et al. 2001*). Gemcitabin

nepřímo stimuluje protinádorovou imunitu i tím, že preferenčně potlačuje proliferaci B lymfocytů s následným snížením produkce protilátek, zatímco T-lymfocyty mediovaná cytotoxická reakce je ovlivněna minimálně (*Qin et al. 1998; Nowak et al. 2002*). Gemcitabin inhibuje rovněž Th2 typ imunitní reakce a zvyšuje aktivitu Th1 typu, která je nutná v protinádorové odpovědi (*Plate et al. 2005*).

I na našem souboru pacientů jsme pozorovali očekávané změny v počtu leukocytů a neutrofilů a dále i CD8⁺T lymfocytů u pacientů s cytostatickou protinádorovou léčbou oproti kontrolní skupině. Avšak mírně překvapující byly pro nás negativní výsledky při srovnání skupin pacientů s/bez chemoterapie mezi sebou. Zdá se, že v přítomnosti projevů deprese při současné cytostatické protinádorové terapii dochází k augmentaci vlivu těchto obou faktorů. To může být dáno malým vzorkem pacientů, různorodostí pacientů, ale z části právě i imunostimulačním potenciálem gemcitabinu.

8. Závěr

Přesto, že je známa souvislost mezi funkcí podkorových center mozku, imunitním a endokrinním systémem, je často opomíjen dopad dlouhodobého stresu a projevů deprese na homeostázu vnitřního prostředí. Z dlouhodobého hlediska má stav duševního zdraví velký význam pro správnou funkci IS. Průtoková cytometrie je metoda volby ke kvantitativnímu stanovování buněčných komponent přirozené imunity člověka. Z naší práce vyplývá, že u nemocných s KP byla hlavním faktorem ovlivňující buněčnou složku IS přítomnost samotného ZN. Tento vliv na imunokompetentní buňky zvyšuje přítomnost chronického stresu v podobě projevů deprese. Naopak mírně překvapující byla nevýznamnost faktoru jako je vlastní cytostatická protinádorová léčba. I přes limitaci interpretace výsledků vzhledem k velikosti souboru pacientů poukazuje naše práce na negativní vliv projevů deprese nejen na kvalitu života, ale i na samotný IS. Námi zjištěné alterace v případě NK buněk je nutné dále analyzovat zjm. pak kvalitativně (funkční schopnosti NK buněk).

9. Použitá literatura

- Abdouh M, Albert PR, Drobetsky E, Filep JG, Kouassi E.: 5-HT1A-mediated promotion of mitogen-activated T and B cell survival and proliferation is associated with increased translocation of NF-kappaB to the nucleus. *Brain Behav Immun* 2004;18(1): 24–34.
- Andreoli AV, Keller SE, Rabaeus M, Marin P, Bartlett JA, Taban C.: Depression and immunity: age, severity, and clinical course. *Brain Behav Immun* 1993;7(4):279–292.
- Beano A, Signorino E, Evangelista A, Brusa D, Mistrangelo M, Polimeni MA, Spadi R, Donadio M, Ciuffreda L, Matera L.: Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *Journal of Translational Medicine* 2008;6:25.
- Béziat V, Descours B, Parizot C, Debré P, Vieillard V.: NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One* 2010;5(8):e11966.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP.: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999;17:189-220.
- Bottino C, Moretta L, Pende D, Vitale M, Moretta A.: Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from natural killer cells. *Mol. Immunol* 2004;41(6-7):569–575.
- Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH.: Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion *Cancer Res* 2007;67(19):9518-9527.
- Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M.: The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1997;79(12):2320-2328.
- Druker J, Liberman AC, Acuña M, Giacomini D, Refojo D, Silberstein S, Pereda MP, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E.: Molecular understanding of cytokine-steroid hormone dialogue: implications for human diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1088:297–306.
- Farag SS, Caligiuri MA.: Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006;20(3):123–137.
- Fazal S, Saif M.: Supportive and palliative care of pancreatic cancer. *JOP* 2007; 8(2): 240–253
- French AR, Yokoyama WM.: Natural killer cells and viral infections. *Curr Opin Immunol* 2003;15(1):45-51.
- Gabbay V, Klein RG, Alonso CM, Babb JS, Nishawala M, De Jesus G, Hirsch GS, Hottinger-Blanc PM, Gonzalez CJ.: Immune system dysregulation in adolescent major depressive disorder *J Affect Disord* 2009;115(1-2):177-182.

- Garcia-Iglesias T, Del Toro-Arreola A, Albarran-Somoza B, Del Toro-Arreola S, Sanchez-Hernandez PE, Ramirez-Dueñas MG, Balderas-Peña LM, Bravo-Cuellar A, Ortiz-Lazareno PC, Daneri-Navarro A.: Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions *BMC Cancer* 2009;9:186.
- Griffiths J, Ravindran AV, Merali Z, Anisman H.: Neuroendocrine measures and lymphocyte subsets in depressive illness: influence of a clinical interview concerning life experiences. *Psychoneuroendocrinology* 1997;22(4):225–236.
- Hao S, Zhao J, Zhou J, Zhao S, Hu Y, Hou Y.: Modulation of 17betaestradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors. *Int Immunopharmacol* 2007;7(13):1765-1775.
- Holden RJ, Pakula IS, Mooney PA.: An immunological model connecting the pathogenesis of stress, depression and carcinoma *Med Hypotheses* 1998;51(4):309-314.
- Hsia JY, Chen JT, Chen CY, Hsu CP, Miaw J, Huang YS, Yang CY.: Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Chang Gung Med J* 2005;28(5):335-340.
- Hsueh CM, Chen SF, Lin RJ, Chao HJ.: Cholinergic and serotonergic activities are required in triggering conditioned NK cell response. *J Neuroimmunol* 2002;123(1-2):102–111.
- Chesnokova V, Melmed S.: Minireview: Neuro-immunoendocrine modulation of the hypothalamic-pituitaryadrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology* 2002; 143(5):1571-1574.
- Irwin MR, Miller AH.: Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain Behav Immun* 2007;21(4):374–383.
- Ivanova SA, Semke VIa, Vetlugina TP, Rakitina NM, Kudiakova TA, Simutkin GG. Apoptosis of immunocompetent cells in patients with depressive disorders *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2006;106(5):49-51.
- Jass JR.: Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 1986;39(6):585–589
- Jozuka H, Jozuka E, Takeuchi S, Nishikaze O.: Comparison of immunological and endocrinological markers associated with major depression. *J Int Med Res* 2003;31(1):36–41
- Koga C, Itoh K, Aoki M, Suefuji Y, Yoshida M, Asosina S, Esaki K, Kameyama T.: Anxiety and pain suppresses the natural killer cell activity in oral surgery outpatients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(6):654–658.
- Kovaru H, Pav M, Kovaru F, Raboch J, Fiserova A.: Cell signalling in CNS and immune system in depression and during antidepressant treatment: focus on glial and natural killer cells. *Neuro Endocrinol Lett* 2009;30(4):421-428.

- Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X.: Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta1. *J Immunol* 2009;182(1):240-249.
- Lima L, Urbina M.: Serotonin transporter modulation in blood lymphocytes from patients with major depression. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22(5-6):797-804.
- Mamessier E, Sylvain A, Thibault ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Gonçalves A, André P, Romagné F, Thibault G, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F, Moretta A, Olive D.: Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest* 2011;121(9):3609-3622.
- Mavoungou E, Bouyou-Akotet MK, Kremsner PG.: Effects of prolactin and cortisol on natural killer (NK) cell surface expression and function of human natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp44 and NKp30). *Clin Exp Immunol* 2005;139(2):287-396.
- McQueen KL, Parham P.: Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol* 2002;14(5):615-621.
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A.: Different checkpoints in human NK-cell activation. *Trends Immunol* 2004;25(12):670-676.
- Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH.: Comparative studies of h:RIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989;143(10):3183-3191.
- Nowak AK, Robinson BW, Lake RA.: Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res* 2002;62(8):2353-2358.
- Olf M.: Stress, depression and immunity: the role of defense and coping styles. *Psychiatry Res* 1999; 85(1):7-15.
- Pavón L, Sandoval-López G, Eugenia Hernández M, Loría F, Estrada I, Pérez M, Moreno J, Avila U, Leff P, Antón B, Heinze G.: Th2 cytokine response in major depressive disorder patients before treatment. *J Neuroimmunol* 2006;172(1-2):156-165.
- Pellegrino TC, Bayer BM.: Role of cent:HT(2) receptors in fluoxetine-induced decreases in T lymphocyte activity. *Brain Behav Immun* 2002;16(2):87-103.
- Peña S, Baccichet E, Urbina M, Carreira I, Lima L.: Effect of mirtazapine treatment on serotonin transporter in blood peripheral lymphocytes of major depression patients. *Int Immunopharmacol* 2005;5(6):1069-1076.
- Plate JM, Plate AE, Shott S, Bograd S, Harris JE.: Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54(9):915-925.

- Qin Z, Richter G, Schuler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T.: B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* 1998;4(5):627-630.
- Raulet DH, Vance RE, McMahon CW.: Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 2001;19:291-330.
- Ravindran AV, Griffiths J, Merali Z, Anisman H.: Circulating lymphocyte subsets in obsessive compulsive disorder, major depression and normal controls. *J Affect Disord* 1999;52(1-3):1-10.
- Satto E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjatich S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K.: Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(51):18538-18543.
- Schedlowski M, Falk A, Rohne A, Wagner TO, Jacobs R, Tewes U, Schmidt RE.: Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells. *J Clin Immunol* 1993; 13(5):344-351.
- Schleifer SJ, Keller SE, Bartlett JA.: Depression and immunity: clinical factors and therapeutic course. *Psychiatry Res* 1999;85(1):63-69.
- Simon B, Printz H.: Epidemiological trends in pancreatic neoplasias. *Dig Dis* 2001;19(1):6-14.
- Simon NM, McNamara K, Chow CW, Maser RS, Papakostas GI, Pollack MH, Nierenberg AA, Fava M, Wong KK.: A detailed examination of cytokine abnormalities in Major Depressive Disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008;18(3):230-233.
- Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA.: A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001;2(4):293-299.
- Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L.: Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008;111(3):1327-1333.
- Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM.: Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 2005;11(18):6713-6721.
- Szuster-Ciesielska A, Słotwińska M, Stachura A, Marmurowska-Michałowska H, Dubas-Slemp H, Bojarska-Junak A, Kandefers-Szerszeń M.: Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32(3):686-694.

- Taub DD.: Natural killer cell-chemokine interactions. Biologic effects on natural killer cell trafficking and cytotoxicity. In: Rollins BJ, editor. Chemokines and cancer. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 1999. p. 73-93.
- Thornton LM, Andersen BL, Crespín TR, Carson WE.: Individual trajectories in stress covary with immunity during recovery from cancer diagnosis and treatments. *Brain Behav Immun* 2007;21(2):185–194.
- ÚZIS ČR, Aktuální informace 5/2013 Incidence zhoubných novotvarů v ČR v roce 2010 na <http://www.uzis.cz/rychle-informace/zhoubne-nadory-roce-2010>.
- Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, Zuñil M, Callol L.: Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002;35(1):23-28.
- Vitale C, Chiossone L, Cantoni C, Morreale G, Cottalasso F, Moretti S, Pistorio A, Haupt R, Lanino E, Dini G, Moretta L, Mingari MC.: The corticosteroid-induced inhibitory effect on NK cell function reflects downregulation and/or dysfunction of triggering receptors involved in natural cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2004;34(11):3028-3038.
- Wong ML, Dong C, Maestre-Mesa J, Licinio J.: Polymorphisms in inflammation-related genes are associated with susceptibility to major depression and antidepressant response. *Mol Psychiatry* 2008;13(8):800–812.
- Yan L, Anderson GM, DeWitte M, Nakada MT.: Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006;42(6):793-802.
- Zakowski SG, McAllister CG, Deal M, Baum A.: Stress, reactivity and immune function in healthy men. *Health Psychol* 1992;11(4): 223–232.
- Zhang L, Conejo-García JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G.: Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348(3):203-213.
- Zisman A, Ng CP, Pantuck AJ, Bonavida B, Belldegrun AS.: Actinomycin D and gemcitabine synergistically sensitize androgen-independent prostate cancer cells to Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis. *J Immunother* 2001;24(6):459–471.
- Zorrilla EP, Luborsky L, McKay JR, Rosenthal R, Houldin A, Tax A, McCorkle R, Seligman DA, Schmidt K.: The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav Immun* 2001;15(3):199-226.

10. Přehled publikační činnosti autora

Původní práce

Slováček L, Slováčková B, Slánská I, Priester P, Petera J, Kopecký J, Vaňásková J.: Cancer and depression: a prospective study. *Neoplasma*. 2009;56(3):187-93. **IF 1,192.**

Slováček L, Slánská I, Slováčková B, Petera J, Filip S, Priester P, Kopecký J, Jebavý L.: Screening for depression in survivors of metastatic ovarian cancer in a programme of palliative cancer care: a prospective study. *Bratisl Léč Listy* 2009,110(10):655-9. **IF 0,345.**

Slováček L, Slováčková B, Slánská I, Petera J, Priester P, Filip S, Kopecký J. Depression symptoms and health-related quality of life among patients with metastatic breast cancer in programme of palliative cancer care. *Neoplasma*. 2009;56(6):467-72. **IF 1,192.**

Kopecký J, Kopecký O, Priester P, Petera J, Slováček L.: **Our experiences in the treatment of peripheral primitive neuroectodermal tumor in the years 2000-2010 in Cancer Center in Hradec Králové** *Wspolczesna Onkol* 2011; 15 (4): 203-207. **IF 0,211.**

Statě ve sbornících

Slováček, L., Filip, S., Šimková, M., Priester, P., Slánská, I., Švecová, D., Kopecký, J.: Ambulance paliativní onkologické péče, funkce a zařazení do systému poskytování zdravotní péče v regionu. In: *Ulrychová, H., Vašátková, I.: Sborník přednášek XVI. Královehradecké ošetrovatelské dny*, Nucleus Hradec Králové 2010, s. 49-50, ISBN 978-80-87009-75-8.

Slováček, L., Slováčková, B., Priester, P., Filip, S., Kopecký, J., Slánská, I., Petera, J.: Depression Symptoms among Patients with Metastatic Ovarian Cancer in a Programme of Palliative Cancer Care: A Prospective and Cross-sectional Study. *Palliative Medicine* 2010, 24 (4): S127-S127. ISSN 0269-2163. **IF 2,031.**

Slováček, L., Priester, P., Slováčková, B., Kopecký, J., Slánská, I., Petera, J., Filip, S.: Epidemiology of Depression Among Palliative Cancer Care Female Inpatients in a Program of Palliative Cancer Care: The Results of a Pilot Prospective Study. *J Palliat Care* 2010, 26 (3): 234-234. ISSN 0825-8597. **IF 0,825.**

Slováček, L., Priester, P., Kopecký, J., Slánská, I., Petera, J., Filip, S.: Health-Related Quality of Life Among Metastatic Breast Cancer Survivors in a Program of Palliative Cancer Care: A prospective and Cross-Sectional Study. *J Palliat Care* 2010, 26 (3): 234-234. ISSN 0825-8597. **IF 0,825.**

- Slováček, L., Kopecký, J., Slováčková, B., Priester, P., Slánská, I., Petera, J. Health-Related Quality of Life Among Female Patients with Metastatic Breast Cancer in a Program of Palliative cancer Care: A Prospective Study. *J Palliat Care* 2010, 26 (3): 241-242. ISSN 0825-8597. **IF 0,825.**
- Slováček, L., Priester, P., Kopecký, J., Švecová, D., Petera, J., Filip, S.: Paliativní onkologická péče – její role v poskytování komplexní zdravotní péče na úrovni regionu. *In.: Petera, J. a kol.: Radiační onkologie 2011 – sborník příspěvků*, Klinika onkologie a radioterapie FN a LF UK Hradec Králové 2011, s. 83-85. ISBN978-80-254-9062-4.
- Filip, S., Slováček, L., Priester, P., Kopecký, J., Švecová, D., Šimková, M., Petera, J.: Indikátory kvality paliativní onkologické péče. *In.: Petera, J. a kol.: Radiační onkologie 2011 – sborník příspěvků*, Klinika onkologie a radioterapie FN a LF UK Hradec Králové 2011, s. 77-77. ISBN978-80-254-9062-4.
- Kopecký J, Sinkorova Z, Knizek J, Priester P, Slováček L, Filip S, Kopecký O.: Immune alteration (NK and T cells) in patient with pancreatic carcinoma with or without chemotherapy Support Care Cancer 2012, 20 (Suplement 1) 28-28, DOI: 10.1007/s00520-012-1479-7 **IF 2,597.**
- Kopecký J, Priester P, Chovance V, Filip S, Slováček L.: Extravasation of doxorubicine—dreaded complication in paliative cancer treatment. Support Care Cancer 2012, 20 (Suplement 1) 28-28, DOI: 10.1007/s00520-012-1479-7 **IF 2,597.**
- Kopecký J, Priester P, Filip S, Kopecký O, Slováček L.: Aplastic anemia as a cause of death in a patient with glioblastoma multiforme treated with temozolomide Support Care Cancer 2012, 20 (Suplement 1) 29-29, DOI: 10.1007/s00520-012-1479-7 **IF 2,597.**
- Kopecký J, Sinkorova Z, Knizek J, Priester P, Filip S, Slováček L, Kopecký O.: Depression as an alteration factor of immunocompetent cells in patients with pancreatic cancer Support Care Cancer 2012, 20 (Suplement 1) 30-30, DOI: 10.1007/s00520-012-1479-7 **IF 2,597.**
- Kopecký J, Slováček L, Slánská I, Šimková M, Švecová D, Hrstka Z, Filip S.: Palliative and supportive care in oncology — a pilot study of supportive program in outpatient clinic Support Care Cancer 2012, 20 (Suplement 1) 62-62, DOI: 10.1007/s00520-012-1479-7. **IF 2,597.**

Přehledové články

- Kopecký J.: **Metadonová substituce v těhotenství.** Gynekolog, 2008(1),8-11
- Kopecký J, Kopecký O. **NK cells, chemokines and chemokine receptors** Klin Onkol. 2010;23(1):5-9.
- Priester P, Kopecký J, Slováček L,: The malignant thymoma as an aethiology of bilateral cardiac failure: a case report Bratisl Léč listy 2011;112(10):586-588 **IF 0,345.**
- Slováček L, Priester P, Petera J, Slánská I, Kopecký J. Tamoxifen and arrhythmia. Med Oncol. 2010;27(4):1431-1432.
- Slováček L, Slánská I, Slováčková B, Priester P, Kopecký J, Jebavý L: The sexual dysfunction among females treated with peripheral blood progenitor cell transplantation: a review of the literature Bratisl Léč Listy 2010;111(8):457-460 **IF 0,345.**
- Kopecký J, Priester P, Slováček L, Petera J, Kopecký O.: **Aplastic anaemias as a cause of death in patient with temozolomide** Strahlenther Onkol 2010;186(8):452-456. **IF 4,163.**
- Filip S, Slováček L, Svecová D, Milka D, Kopecký J, Priester P, Petera J, Svoboda V. Outpatient clinic of palliative care in oncology Cas Lek Cesk. 2011;150(3):169-72.
- Slováček L, Priester P, Kopecký J, Slováčková B, Švecová D, Petera J, Filip S . Paliativní onkologická péče v systému poskytování zdravotní péče v Královéhradeckém kraji: vlastní zkušenosti Klinická onkologie, 24, 2011, 4, 265 – 270.
- Vaňásková J, Grim J, Kopecký J, Kubala E, Filip S.: High-dose interferon alfa v léčbě pacientů s maligním melanomem, sledování prediktivních a prognostických biomarkerů Klinická onkologie, 24, 2011, 3, 180 – 186.
- Slováček L, Priester P, Petera J, Slánská I, Kopecký J.: Tamoxifen/norfloxacin interaction leading to QT interval prolongation in a female patient with extracranial meningioma. Bratisl Lek Listy. 2011;112(6):353-4. **IF 0,345.**
- Kopecký J, Slováček L, Priester P, Slováčková B, Kopecký O.: **Změny imunologické reaktivity u onkologických pacientů** Klin Onkol. 2012;25(2):97-102.
- Priester P, Kopecký J, Prošvicová J, Petera J, Zoul Z, Slováček L.: Cutaneous recurrence of malignant mesothelioma of the tunica vaginalis testis: a rare case report. Onkologie. 2012;35(1-2):46-8. **IF 1,0.**

Přednášky

- Kopecký, J., Priester, P., Filip, S., Švecová, D., Petera, J., Slováček, L.: Žilní přístupy u nemocných zařazených do programu paliativní onkologické péče. *In.: Petera, J. a kol.:*

Radiační onkologie 2011 – sborník příspěvků, Klinika onkologie a radioterapie FN a LF UK
Hradec Králové 2011, s. 79-79. ISBN978-80-254-9062-4.

Kopecký J.: Bolest z pohledu onkologa, přednáška v rámci semináře „Průlomová bolest“ v Hradci
Králové 14. 11. 2012 pořádanou pro Alianci žen s rakovinou prsu.