

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

Doktorský studijní program
Klinická onkologie a radioterapie

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

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

MUDr. Jindřich Kopecký

Školitel: prof. MUDr. Stanislav Filip Ph.D., DSc.

Školitel konzultant: doc. MUDr. Ladislav Slováček Ph.D.

Hradec Králové dne

Obhajoba dne:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 15.7.2013

Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kdo se spolupodíleli na tomto projektu. Na prvním místě svému školiteli prof. MUDr. Stanislavu Filipovi, Ph.D., DSc. a školiteli specialistovi doc. MUDr. Ladislavu Slováčkovi, Ph.D., kteří mi pomohli zpracovat toto téma a umožnili mi spolupracovat s nimi na dalších významných projektech. Dále bych rád poděkoval přednostovi Kliniky onkologie a radioterapie FN v Hradci Králové prof. MUDr. Jiřímu Peterovi, Ph.D., který mi umožnil zpracovat toto téma na klinice, získávat patřičné zkušenosti a podpořil moje vědecké snažení. Velké poděkování patří paní prof. RNDr. Jiřině Vávrové, CSc., vedoucí laboratoře Katedry radiobiologie FVZ UO v Hradci Králové a paní doc. RNDr. Zuzaně Šikorové, Ph.D. rovněž z Katedry radiobiologie FVZ UO, která mi umožnila aktivně poznat práci v laboratoři a byla mi velice nápomocna při řešení jednotlivých úkolů disertační práce. Dále děkuji panu Ing. Jiřímu Knížkovi, Ph.D., který mi byl nápomocen při statistickém zpracování získaných dat. V neposlední řadě děkuji svým rodičům a své manželce za jejich podporu a trpělivost při řešení tohoto projektu.

Seznam zkratek

ADCC Antibody dependent cellular cytotoxicity
BRCA1/BRCA2 breast cancer 1 / breast cancer 2
CA 19-9 karbohydratový antigen 19
CDx cluster of differentiation (x značí číslo)
CEA karcinoembryonální antigen
CNS centrální nervová soustava
CRP C reaktivní protein
CT computed tomography
DAP death-associated protein
DNA deoxyribonukleová kyselina
EGF epidermal growth factor
EGFR epidermal growth factor receptor
ERCP endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie
ERK extracelular regulated kinase
EUS endoskopický ultrazvuk
FasL Fas ligand
FcR Fc receptor
FGF fibroblast growth factor
GM-CSF granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HLA Humane leukocyte antigen
HMGB1 High mobility group box 1
ICAM-1 Intercellular Adhesion Molecule 1
IgG imunoglobulin G
IL-x interleukin – (x značí číslo)
INF-x interferon – (x značí řecké písmeno)
IS imunitní systém
ITAM imunoreceptor pro tyrozin aktivující motiv
ITIM imunoreceptor pro tyrozin inhibující motiv
KIR killer cell immunoglobulinlike receptor
KP karcinom pankreatu
MDSC myeloid derived supressor cell
MEK mitogen-activated protein kinase/ERK

MHC major histocompatibility komplex
MICA MHC I chain-related A
MICB MHC I chain-related B
MR magnetická rezonance
NCR natural cytotoxic receptor
NK natural killer
NKR Natural Killer Receptors
p16 protein 16
p53 protein 53
PAK p21 aktivované kinázy
PGE2 prostaglandin E2
PI3K phosphoinositide 3 kinase
RPM revolutions per minute (otáčka za minutu)
SHP-1 Src homology phosphatase-1
STK11 serin-theroninová kináza
TCR T-cell receptor
TGF-x tumour growth factor – (x značí řecké písmeno)
TLR Toll like receptor
TRAIL TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg regulační T lymfocyt
UZ ultrazvukové vyšetření
WHO World Health Organization
ZN zhoubný novotvar

1. OBECNÝ ÚVOD.....	8
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	9
3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY A LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1. KARCINOM PANKREATU	10
3.1.1. <i>Epidemiologie</i>	10
3.1.2. <i>Etiologie</i>	10
3.1.3. <i>Patogeneze</i>	12
3.1.4. <i>Karcinom pankreatu a imunitní systém</i>	13
3.1.5. <i>TNM Klasifikace</i>	14
3.1.6. <i>Stanovení diagnózy a klinické symptomy</i>	15
3.1.7. <i>Terapie a management pacientů s tumorem pankreatu</i>	15
3.1.7.1. <i>Lokalizované operabilní onemocnění</i>	15
3.1.7.2. <i>Inoperabilní a metastazující onemocnění</i>	17
3.2. DEPRESE A KARCINOM PANKREATU	18
3.2.1. <i>Epidemiologie</i>	18
3.2.2. <i>Klinické příznaky</i>	18
3.2.3. <i>Diagnostika depresivní poruchy u onkologických nemocných</i>	19
3.2.4. <i>Depresivní poruchy u onkologických nemocných</i>	19
3.2.5. <i>Příčiny depresivní poruchy u pacientů s karcinomem pankreatu</i>	19
3.2.6. <i>Patogeneze</i>	20
3.3. ALTERACE IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....	22
3.3.1. <i>Fyziologické změny imunitního systému</i>	22
3.3.2. <i>Imunitní systém a zhoubný novotvar</i>	23
3.3.3. <i>Imunitní systém a léčba zhoubného novotvaru</i>	24
3.3.4. <i>Imunitní systém a psychický stav onkologických pacientů</i>	27
3.4. NK BUŇKY	28
3.4.1. <i>NK buňky jako prognostický faktor v onkologii</i>	28
3.4.2. <i>NK buňky CD56+dim a CD56+bright</i>	29
3.4.3. <i>Receptory NK buněk</i>	30
3.4.3.1. <i>Hlavní rodiny receptorů</i>	31
3.4.3.2. <i>Aktivační receptory NK buněk</i>	33
3.4.3.3. <i>Inhibiční receptory NK buněk</i>	36
4. METODY A PACIENTI.....	38
4.1. USPOŘÁDÁNÍ STUDIE	38
4.1.1. <i>Vlastní uspořádání studie</i>	38
4.1.2. <i>Zařazovací a vyřazovací kritéria</i>	38
4.1.3. <i>Rozdělení do jednotlivých skupin</i>	39
4.2. SOUBOR PACIENTŮ.....	39
4.3. NÁSTROJ KE STANOVENÍ DEPRESE	41
4.4. METODY STANOVENÍ BUNĚČNÉ POPULACE - PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	43
4.4.1. <i>Indikace k vyšetření</i>	43
4.4.2. <i>Princip průtokové cytometrie</i>	44
4.4.3. <i>Fluorochromy</i>	45
4.4.4. <i>Spektrální překryv a jeho kompenzace</i>	47
4.4.5. <i>Příprava krve na vyšetření</i>	47
4.4.6. <i>Analýza a interpretace</i>	48
4.4.7. <i>CD nomenklatura a použité CD znaky v projektu</i>	51
4.4.8. <i>Charakteristika použitého cytometru</i>	51
4.4.9. <i>Vlastní protokoly</i>	52
4.4.9.1. <i>Protokol pro přípravu lyzujícího roztoku</i>	52
4.4.9.2. <i>Protokol pro přípravu periferní krve</i>	52
4.4.9.3. <i>Protokol k označení leukocytů monoklonálními protilátkami</i>	52
5. STATISTIKA	54
6. VÝSLEDKY	55
7. DISKUSE	60
8. ZÁVĚR.....	63

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
10. PŘÍLOHY	94

1. Obecný úvod

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 lymfatik 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 imunosupresivní 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. 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.

3. Úvod do problematiky a literární přehled

3.1. Karcinom pankreatu

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). 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 KP má velice špatnou prognosu, kdy procentuálně 5leté přežití se pohybuje kolem 5 % bez rozdílu stádia a rasy (*Fazal et al. 2007*). V následujícím textu se s ohledem na výběr pacientů do studie pojednává pouze o ductálním adenokarcinomu pankreatu.

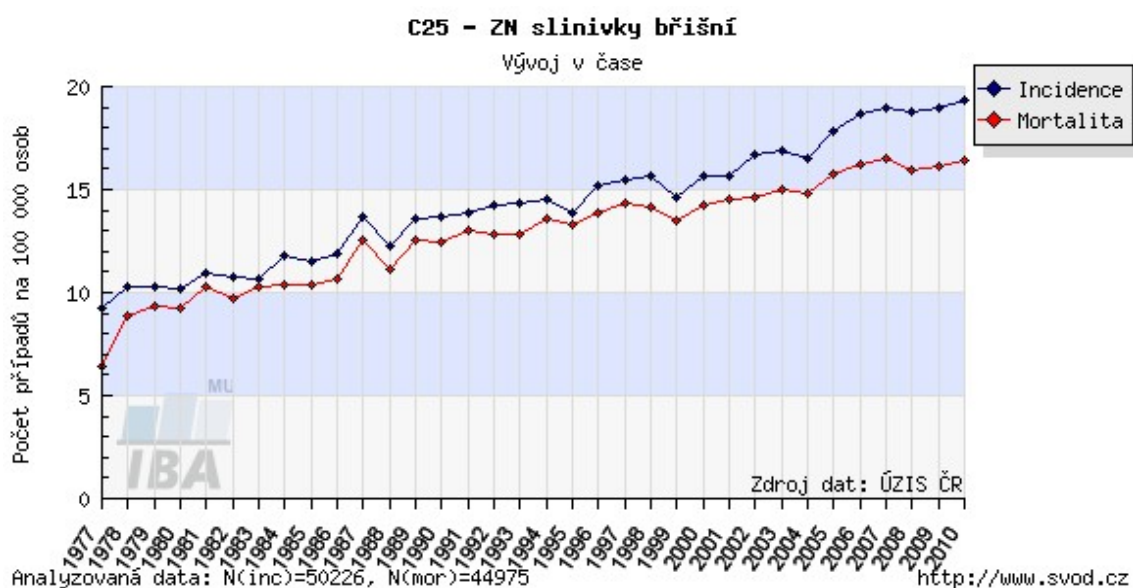
3.1.1. Epidemiologie

Incidence KP v ČR byla pro rok 2010 9,61 na 100 000 obyvatel a v posledních letech má stoupající tendenci (viz Obr.1). Incidence nádoru strmě stoupá ve věkových kategoriích nad 50 let (viz Obr.2) (*ÚZIS ČR 2013*). KP se vyskytuje častěji u mužů než u žen. Mortalita KP dosahuje přibližně stejných hodnot jako jejich incidence. Medián přežití se u radikálně operovaných nemocných pohybuje mezi 15-19 měsíci, u nemocných s lokálně pokročilým inoperabilním KP mezi 6-12 měsíci a u nemocných s primárně metastatickým KP nepřesahuje medián přežití 4-6 měsíců (*Du et al. 2000*). Po nádorech plic, tlustého střeva a karcinomu prsu u žen a karcinomu prostaty u mužů je KP na 4. místě v příčinách smrti na nádorová onemocnění mužů a žen mezi 35 až 54 roky (*Jemal et al. 2006; ÚZIS ČR 2013*). Ve dvou třetinách případů je nádor lokalizován v hlavě pankreatu (*Hlavsa et al. 2008*).

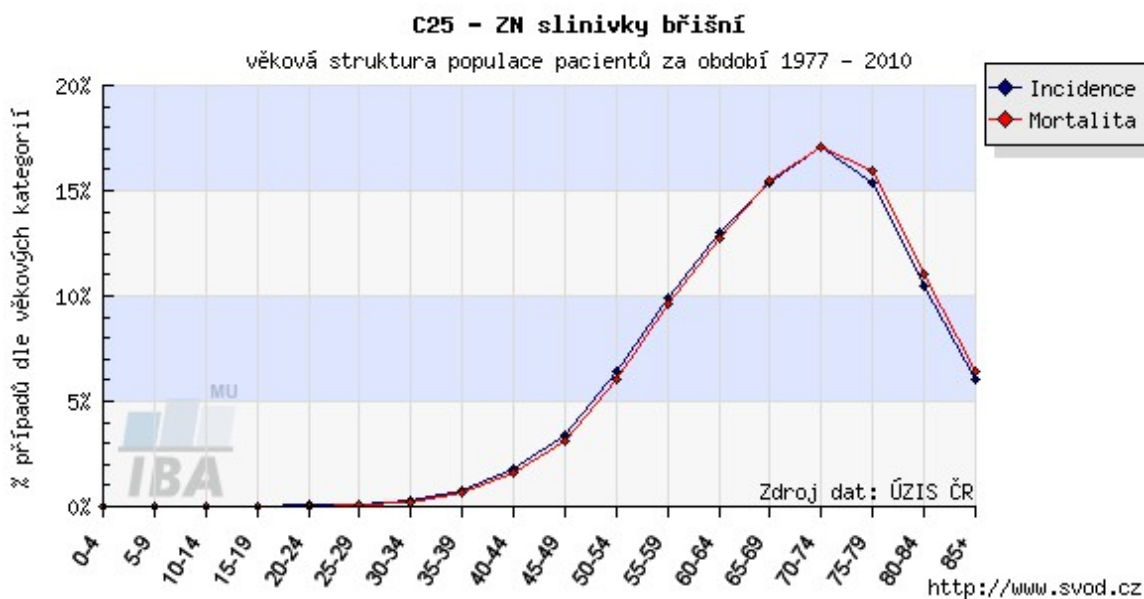
3.1.2. Etiologie

Etiologie KP není dosud zcela objasněná. V molekulární genetice se ukazuje, že u více než 90 % adenokarcinomů je prokazatelná mutace K-ras onkogenu na kodonu 12 (*Hruban et al. 1993; Pellegata et al. 1994; Apple et al. 1999*) a antionkogenu p53 (*Pellegata et al. 1994; Apple et al. 1999*). U přibližně 4-16% nemocných je KP spojován s rodinným výskytem (*Lynch et al. 1996; Schenk et al. 2001; Klein et al. 2001*). Jde například o mutace genů,

kteře jsou zodpovědné za opravu poškozené DNA u Lynchova syndromu (*Kastrinos et al. 2009*), genu STK11 u Peutz-Jeghersova syndromu (*Amos et al. 2001*), genu BRCA1/BRCA2 u nádoru prsu či vaječníků (*Thompson et al. 2002; Hahn et al. 2003; Couch et al. 2007*) nebo poškození onkosupresorového genu p16 u familiárního atypického mnohočetného melanomu (*Goldstein et al. 1995*). Hereditární pankreatitida je onemocnění způsobené mutací v genu PRSS1 pro trypsinogen a jedinci s tímto genetickým zatížením mají až 40% pravděpodobnost výskytu KP (*Whitcomb et al. 1996*).



Obr. 1 Incidence a mortalita nádoru pankreatu (převzato z [ww.svod.cz](http://www.svod.cz) 10.5.2013)



Obr. 2 Incidence a mortalita nádoru pankreatu u jednotlivých věkových skupin (převzato z [ww.svod.cz](http://www.svod.cz) 10.5.2013)

Hlavním rizikovým faktorem pro vznik KP se zdá být kouření (*Silvermann et al. 1994; Boyle et al. 1996; Fuchs et al. 1996*). Riziko vzniku KP u kuřáka je 1,5x větší a stoupá s množstvím vykouřených cigaret (*Lin et al. 2002; Lowenfels et al. 2002*). Souvislost mezi KP a kouřením byla prokázána jak v prospektivních tak i v retrospektivních studiích (*Mack et al. 1986; Boyle et al. 1996; Silvermann et al. 1998; Simon et al. 2001*).

Dalším rizikovým faktorem pro vznik KP je strava. Jedná se především o stravu bohatou na tuky, maso, cholesterol, karcinogeny ve stravě, nedostatek vlákniny ve stravě, zvýšenou konzumaci alkoholu (*Lyon et al. 1993; Baras et al. 2012*). Mezi další rizikové faktory patří obezita, diabetes mellitus, chronická pankreatitida a onemocnění žlučových.

3.1.3. Patogeneze

Na počátku karcinogeneze KP stojí mutace ras onkogenu a inaktivace supreseových genů p53 p16 a DPC 412. Dále dochází k lokálním změnám v nádorové tkáni, k tzv. desmoplastické reakci, kdy epiteliální tumorové elementy jsou obklopeny nadměrně hustým fibrosní stromatem. Na této reakci spojené s proliferací fibroblastů se podílejí pojivová tkáň a novotvořené nádorové cévy. Nádorové buňky využívají této reakce k lokálnímu růstu a vzdálenému metastazování (*Kimura et al. 1998*). Ztráta integrity basální membrány v okolí nádoru je zapříčiněna zvýšenou aktivitou metaloproteinových proteáz a je rizikovým faktorem zvýšené invazivity tumoru (*Satoh et al. 1994; Bramhall et al. 1996*). K dalšímu zvýšení invazivity tumoru přispívá zvýšení tvorby angiogenních faktorů u KP jako jsou insulin-like growth factor 1, basic fibroblast growth factor a epidermal growth factor (*Korc 1998*).

Až 90% pacientů s KP umírá během prvního roku od stanovení diagnózy a 5leté přežití pacientů s KP se pohybuje okolo 5% (*Kuvshinoff et al. 2000*). Cca 20% pacientů s KP je schopno podstoupit radikální operaci, ale z těchto pacientů má 5leté přežití jen 15-20 % (*Fitzsimmons et al. 1999*).

Přitom mezi základní prognostické faktory patří stádium onemocnění, provedení radikálního chirurgického výkonu a výkonnostní stav nemocného (*Geer et al. 1993; Fortner et al. 1996*). Pokud pacient podstoupí radikální operaci, nejsou symptomy jako anémie, ztráta váhy negativními prediktory (*Compton et al. 1997*). Onkomarkery u nás běžně měřeny jako CA 19-9 a CEA mají malý prognostický dopad u pokročilých KP a jsou vhodné spíše jako pomocný marker dynamiky onemocnění v průběhu onemocnění a jeho léčby (*Lundin et al. 1995; Safi et al. 1996*). Ukazuje se, že pacienti s KP s prokázanou mutací K-ras onkogenu mají horší prognosu, dále se ukazuje jako prognosticky negativní faktor zvýšená exprese

receptorů EGF a TGF- α (Yamanaka et al. 1993a; Uegaki et al. 1997), TGF- β (Friess et al. 1993; Lu et al. 1997), aFGF a bFGF (Yamanaka et al. 1993b; Ohta et al. 1995).

3.1.4. Karcinom pankreatu a imunitní systém

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).

Jiným mechanismem, jak se nádorové pankreatické buňky mohou vyhnout protinádorovému účinku IS, je např. indukce apoptosy infiltrovaných T lymfocytů (Igney et al. 2000), schopnost snížení exprese povrchových membránových znaků jak MHC I. tak MHC II. třídy (Scupoli et al. 1996), či snížení exprese adhesivních molekul (Pettit et al. 2000).

V neposlední řadě je IS ovlivňován cytokiny. Toto cytokinové prostředí vytvářené vlastním organismem a modifikované tumorem může usnadňovat další šíření a růst tumoru. U pacientů s KP se nachází v séru redukované hladiny IL-2 a zvýšené hladiny TNF- α , TGF- β 1, IL-10, IL-2R, IL-1 β a IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12 p40, IL-18 (Bellone et al. 2006; Poch et al. 2007). Tyto změny v humorální složce IS vedou opět k supresi protinádorové imunity. Bellone a spol. sledovali souvislost mezi výskytem hladiny cytokinu a délkou přežití, kde u pacientů s vysokými hladinami IL-1 β , IL-11 a IL-12 a s nižšími hladinami IL-6, IL-18 a TGF- β 2 pozorovali delší přežití (Bellone et al. 2006).

3.1.5. TNM Klasifikace

Tak jako většina nádorů i KP je popisován pomocí TNM klasifikace (International union against cancer UICC, 7. vydání 2009)

T - Primární nádor

TX primární nádor nelze hodnotit

T0 bez známek primárního nádoru

Tis karcinom in situ

T1 nádor omezen na pankreas, do 2 cm v největším rozměru

T2 nádor omezen na pankreas, větší než 2 cm v největším rozměru

T3 nádor se šíří mimo pankreas, nepostihuje však truncus coeliacus nebo

a. mesenterica superior

T4 nádor postihuje truncus coeliacus nebo a. mesenterica superior

N - Regionální mízní uzliny

NX regionální mízní uzliny nelze hodnotit

N0 regionální mízní uzliny bez metastáz

N1 metastázy v regionálních mízních uzlinách

M - Vzdálené metastázy

MX vzdálené metastázy nelze hodnotit (viz Úvod strana 21)

M0 bez vzdálených metastáz

M1 vzdálené metastázy

ROZDĚLENÍ DO STADIÍ

Stadium 0 Tis N0 M0

Stadium IA T1 N0 M0

Stadium IB T2 N0 M0

Stadium IIA T3 N0 M0

Stadium IIB T1, T2, T3 N1 M0

Stadium III T4 jakékoliv N M0

Stadium IV jakékoliv T jakékoliv N M1

3.1.6. Stanovení diagnózy a klinické symptomy

Diagnóza KP může být velmi obtížná. V počátečních stádiích totiž často zůstává toto onemocnění asymptomatické. S postupem času se KP může manifestovat bolestmi pásového typu v oblasti kolem pupku, bezbolestným ikterem, úbytkem na váze či nechutenstvím. Tyto ne zcela jasné symptomy a jejich podcenění ať už pacientem či lékařem mohou vést k opožděnému stanovení diagnózy KP. V krevním obraze mohou být známky anémie. V případě obstrukce žlučových cest nacházíme zvýšené hodnoty obstrukčních enzymů, zjm. pak alkalické fosfatázy (ALP), gama glutamylmonotransferázy (GGT) a bilirubinu. Nespecifické nádorové markery CEA a CA 19-9 bývají zvýšeny takřka u všech nemocných a jsou vhodné spíše k sledování dynamiky onemocnění v průběhu léčby.

Z historického hlediska byla endogenní retrogradní cholangiopankreatikografie (ERCP) metodou volby číslo jedna v diagnostice KP. V dnešní době však díky zvýšenému přístupu k CT a MR vyšetření ztrácí tato metoda na důležitosti. V případě prorůstání KP do cévního systému je toto možné ozřejmit pomocí duplexní sonografie či angiografie.

K definitivní diagnostice KP je vždy nutná histologická verifikace a to buď pomocí biopsie pod kontrolou endosonografické sondy či dle anatomické lokalizace pod UZ či CT kontrolou.

3.1.7. Terapie a management pacientů s tumorem pankreatu

Léčba KP je založena na principu multimodálního přístupu - chirurgie, radiační a klinická onkologie. Avšak vzhledem k pozdě diagnostikovanému KP, kdy je většina nádorů již inoperabilní, je často ke KP přistupováno již primárně s paliativním záměrem protinádorové léčby.

Na základě možnosti resekability KP můžeme rozdělit přístup k pacientovi s KP z didaktického hlediska na tři skupiny: 1. pacienti s lokálně operabilním KP, 2. pacienti s lokálně pokročilým inoperabilním KP, 3. pacienti s metastazujícím KP. V klinické praxi však v podstatě existují dva přístupy: operabilní KP a inoperabilní respektive metastazující KP.

3.1.7.1. Lokalizované operabilní onemocnění

Jde o takové stádium onemocnění, které je resekabilní. Vzhledem k často pozdní diagnostice KP je však v době prvních příznaků většina pacientů již inoperabilní. Věk pacienta, invaze do duodena či žaludku, postižení lymfatických uzlin v operačním poli nejsou

kontraindikací pro radikální operabilitu a histologická předoperační verifikace není podmínkou (Goldstein et al. 2004). Naopak relativní kontraindikací pro chirurgický výkon je zavzetí v. portae, v. mesenterica superior, a. hepatica, a.coeliaca. Nicméně na počátku stanovení diagnostiky by mělo být rozhodnuto o rozsahu samotného onemocnění a tedy i resekabilitě a to pomocí zobrazovacích metod jako CT, EUS, ERCP eventuálně i laparoskopicky (Goldstein et al. 2004).

Během samotné operace by měla být zkontrolována peritoneální dutina a samotná játra, dále by měly být mobilizovány okraje slinivky k určení rozsahu tumorosního procesu. Zvětšené či patologicky se jevící uzliny v operačním poli, ale i mimo něj, by měly být odebrány. Samozřejmostí je vyšetření veškerého odoperovaného materiálu patologem. Pokud je během operace zjištěn neočekávaný nález, jako např. rozsah samotného KP znemožňující radikální operaci, je vždy nutností vzít vzorek na histologické vyšetření. Z chirurgického hlediska je odlišný přístup k tumoru hlavy pankreatu (častější) a tumoru kaudy. Avšak podstatou je vždy radikalita operace. V úvahu připadají pankreatoduodenální resekce, totální pankreatektomie, či odstranění kaudy se zachováním hlavy pankreatu.

Dlouhodobé přežití operovaných pacientů se odhaduje na 10-20 %. U 50-80 % odoperovaných pacientů se však vyskytne lokální recidiva a to nejčastěji do jater (50 %) a peritoneálně (25 %) (Sohn et al. 2000; Birkmeyer et al. 2002).

V další fázi léčby KP má i přes nevýrazné výsledky stále své místo adjuvantní chemoterapie. Adjuvantní radioterapie nemá velký význam (Klinkenbijl et al. 1999; Neoptolemos et al. 2001). Historicky nejpoužívanějším cytostatikem je 5-fluorouracil. Již v 80. letech byly provedeny studie s prokázáním prodloužení života u pacientů, kteří dostávali pooperační chemoradioterapii oproti pacientům, kteří podstoupili pouze operaci (Kalsner et al. 1985; Gastrointestinal Tumour Study Group 1987). Dalším používaným cystostatikem v adjuvantním režimu je gemcitabin. Byly zkoušeny i další kombinace jak s 5-fluorouracilem tak i s gemcitabinem, ale žádné z nich nepřinesly výrazné zlepšení v podobě dlouhodobého přežívání (Freitas et al. 2009; Backlund et al. 2010).

Menší klinické studie poukazují na možný benefit neoadjuvantní terapie. Výhody neoadjuvance spočívají hlavně v tom, že se zamezí opoždění zahájení adjuvantní terapie v důsledku pooperační rekonvalescence. Smyslem neoadjuvance je jako u jiných nádorových nemocí snaha o down staging a tudíž i zlepšení chirurgického přístupu a zamezení rozsevu choroby po dutině břišní. Nicméně tato modalita léčby není v dnešní době standardem a je předmětem dalších klinických studií (Pisters et al. 2000; Wayne et al. 2002).

S nově získanými poznatky ohledně molekulární podstaty KP se objevují nové

možnosti adjuvantní terapie, jako je i tzv. cílená terapie. Jde především o namíření léčby proti angiogenezi, EGFR, či onkogenu ras (*Bruns et al. 2002; Cox et al. 2002*).

Dalším možným léčebným přístupem v adjuvantní léčbě KP se zdá být využití IS. A to v podobě tzv. vakcinační terapie, která je však zatím stále ve fázi klinického výzkumu (*Jaffee et al. 2001; O'Reilly 2002*).

3.1.7.2. Inoperabilní a metastazující onemocnění

U této skupiny pacientů se uplatňují především základy paliativní onkologické péče. Jde především o symptomatickou léčbu zaměřenou na léčbu bolesti a dyspeptických obtíží, nutriční a psychosociální intervenci (*Brescia 2004*). Hlavním měřítkem indikace pro invazivní výkony i pro podání paliativní chemoterapie u této skupiny nemocných, je jejich dopad na kvalitu života pacienta. Vždy je nutné zvažovat přínos a rizika jakékoli léčebné intervence (protinádorové léčby či léčby podpůrné léčby zahrnující i korekci anémie podáním krevní transfúze). Vždy je nutné aktualizovat léčebný přístup na základě aktuálního zdravotního stavu pacienta.

Ukazuje se, že použití chemoterapie v paliativním režimu u KP má nevýrazné výsledky. Historicky tradiční použití 5-fluorouracilu bylo vystřídáno gemcitabinem, kde na základě studie porovnávající 5-fluorouracil a gemcitabin bylo zvýšeno 1 leté přežití u pacientů s gemcitabinem na 18 % versus 5 % s 5-fluorouracilem a medián přežití 5-6,7 měsíců (*Burriss et al. 1997; Berlin et al. 2002; Tebbutt et al. 2002; Di Costanzo et al. 2005*). Dále má gemcitabin přijatelnější toxicický profil. Jedná se především o mírnou myelosupresi, dyspeptické obtíže horního typu (nauzea, zvracení) a symptomy podobné chřipce (flu-like symptoms), které jsou léčebně dobře zvládnutelné. I s ohledem na tyto nežádoucí účinky je gemcitabin považován za standard v první linii paliativní chemoterapie.

Byla zkoušena i jiná paliativní schémata s cisplatinou či 5-fluorouracilem, leukovorinem či irinotekanem. Tyto kombinace byly více cytotoxické a nepřinesly benefit pro pacienta (*Berlin et al. 2002; Cascinu et al. 2000; Scheithauer 2002; Tebbutt et al. 2002; Wein 2002; Di Costanzo et al. 2005*). Avšak u pacientů s inoperabilním KP je nutno vždy nutno zohlednit další faktory ovlivňující léčbu jako je věk pacienta, jeho funkční stav (Performance Status), pacientovo přání a potřeby, vliv rodiny, etnické zázemí apod..

3.2. Deprese a karcinom pankreatu

Depresivní porucha u onkologických nemocných je častá a závažná komplikace zdravotního stavu. Dle aktuálních údajů WHO deprese ve světě postihuje více jak 120 milionů lidí a je jednou z hlavních příčin neschopnosti vedení normálního života. Neléčená deprese vede k subjektivním obtížím a k zvýšené morbiditě. V kombinaci s ZN tvoří významný faktor ovlivňující kvalitu života, snižuje compliance s léčbou, neschopnost postarat se sám o sebe a zkracuje dobu přežití (*Okano et al. 2001; Katon et al. 2002*).

3.2.1. Epidemiologie

Prevalence deprese u ZN je pro jednotlivá ZN odlišná. Mezi nádory často spojené s výskytem deprese patří: nádory hlavy a krku (22-57%), nádory pankreatu (33-50%), nádory prsu (1,5-46%) a nádory plic (11-44%) (*Massie 2004*). Ukazuje se, že u více jak 50% pacientů s KP se objevují symptomy deprese i více jak 43 měsíců před vlastním stanovením diagnózy (*Fras et al. 1967; Joffe et al. 1986; Massie 2004*). Deprese spojená s ZN je obvykle spojována s rychlejší progresí nádoru a kratší dobou přežití (*Onitilo et al. 2006*). Riziko úmrtí u pacientů s ZN vykazující depresivní symptomy je 2,6x vyšší během prvních 19 měsíců od stanovení diagnózy (*Stommel et al. 2002*). Není doposud známo, zda existuje kauzální propojení mezi progresí KP a depresí (*Carney et al. 2003*). Avšak mnohé poznatky poukazují na to, že propojení mezi progresí KP a depresí je komplexní, a že existuje obousměrný vztah mezi depresí a KP (*Jia et al. 2010*).

3.2.2. Klinické příznaky

Klinické příznaky depresivní poruchy můžeme rozdělit na somatické (vegetativní a behaviorální), kam patří např. anorexie, únava, nespavost, ztráta hmotnosti, ztráta sexuálního zájmu, zpomalení psychomotorického tempa, a psychologické (nevegetativní) projevující se jako smutná či dysforická nálada, bezmoc, beznaděj, snížené sebevědomí, pocity zbytečnosti, pocity viny, anhedonie (neschopnost prožívat radost), sebevražedné myšlenky, zabývání se vlastní neschopností. Vegetativní příznaky deprese se často překrývají s příznaky ZN (*Praško et al. 2006; Faldyna 2009*).

3.2.3. Diagnostika depresivní poruchy u onkologických nemocných

Depresivní příznaky snižují pacientovu adherenci k léčbě a tím zhoršují i prognosu onemocnění. Včasná diagnostika a léčba organické depresivní poruchy má význam pro kvalitu života a prognosu onemocnění.

Pro stanovení přítomnosti depresivních příznaků používáme v klinické praxi a) sebeposuzovací stupnice (Beck, Zung), b) škály k objektivnímu hodnocení deprese (Hamilton) či c) strukturovaný klinický pohovor.

3.2.4. Depresivní poruchy u onkologických nemocných

U pacientů s ZN se můžeme setkat s následujícími depresivními poruchami:

1. Smutek a truchlení ze ztráty zdraví, jako normální reakce u onkologických nemocných
2. Adaptační porucha s depresivní reakcí
3. Depresivní epizoda
 - a. Primární (ve smyslu depresivní fáze či dysthimie)
 - b. Sekundární, organická, symptomatická (následkem onemocnění, poškození, nebo dysfunkce mozku, nebo následkem somatického onemocnění)

Mezi normální reakcí, adaptační poruchou a depresivní epizodou je kontinuum (Praško et al. 2006).

3.2.5. Příčiny depresivní poruchy u pacientů s karcinomem pankreatu

1. Reakce na stres, související s diagnózou závažného onemocnění a jeho léčby
2. Příznak samotného onkologického onemocnění
 - a. Protinádorová léčba (kortikoidy, cytostatika, radioterapie) (Krombholz et al. 2008)
 - b. Druhotné neurologické nebo medicínské problémy
 - i. Nutriční deficit (kyselina listová, vitamín B12)
 - ii. endokrinní poruchy (tyreoidální poruchy, insuficience nadledvin, paraneoplastická hormonální produkce)
 - iii. mozkové metastázy, leptomeningeální postižení
3. Koincidence depresivní poruchy s onkologickým onemocněním nebo rekurence již preexistující afektivní poruchy

Onkologičtí pacienti trpí depresí častěji, pokud mají závažnější somatické postižení,

u pokročilých stadií nemocí, není-li dostatečně kontrolována bolest, pokud v minulosti již depresi prožívali nebo jestliže v nedávné době zažili stresovou životní událost (*Praško et al. 2007*). U pacientů s KP je riziko deprese vyšší a depresivní příznaky mohou předcházet rozvoji tělesných příznaků (*Herman et al. 2007*).

3.2.6. Patogeneze

Mechanismů vzniku deprese u ZN je celá řada a mohou se vzájemně kombinovat. Hlavními prostředníky v procesu rozvoje deprese u pacientů s ZN jsou cytokiny působící buď přímo na úrovni samotného mozku, nebo pomocí ovlivňování neuroendokrinního systému.

Mechanismy účinku cytokinů v patogenezi deprese se děje na vícero úrovních. Jednak mohou indukovat neurotoxické metabolity (*Wichers et al. 2005*), dále svým působením zapříčiňují poruchy serotonergního, noradrenalinového a dopaminergního přenosu (*Hindmarch 2002*) a v neposlední řadě jsou zodpovědné i za narušení homeostázy na úrovni hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osy (*Raber et al. 1997*).

Tento proces vzniku stresové situace a deprese u pacientů s ZN je spojen i s konkrétní odpovědí na úrovni IS, kdy dochází k narušení homeostázy na úrovni buněčné, humorální tak i funkční (*Zorrilla et al. 2001*). Jak se však ukazuje, patogeneze deprese se zdá být oboustranným procesem, kdy i IS ovlivňuje a moduluje endokrinní a nervový systém. (*Besedovsky et al. 1996*).

Cytokiny jsou produkovány jak v mozku (hypothalamus, hippocampus, basální ganglia), tak i v periférii (buňky IS, nádorové buňky) (*Illman et al. 2005*). Cytokiny jsou relativně velké hydrofilní molekuly a za fyziologických podmínek nejsou schopny překonání hemato-encefalické bariéry. Avšak překonání této bariéry je možné např. v místech, kde hemato-encefalická bariéra chybí (např. v circumventriculárních orgánech), nebo kde je bariéra oslabena či porušena (např. u nemocných s roztroušenou mozkomíšní sklerózou), a nebo dochází k překonání této bariéry aktivním transportním mechanismem (*Szelényi 2001; Wichers et al. 2002; Raison et al. 2006*).

V mozku existuje cytokinová síť, která je schopna amplifikace a předávání signálů, které jsou zapojené do patofyziologie rozvoje deprese. Jde o oblasti jako hypotalamus, hippocampus, nefrontální kůra, amygdala a striatum (*Dantzer 2006*). IL-1, IL-6 a TNF α hrají klíčovou roli v patogenezi deprese ovlivněním neurotransmiterů jako noradrenalinu či serotoninu v mozku a v aktivaci hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osy se zvýšením sekrece glukokortikoidů (*Dantzer et al. 2008*).

Jedním z mechanismů, jak mohou cytokiny ovlivňovat patogenezi deprese, je narušení neurochemických přenosů a modifikace hypothalamo-hypofyzárně-adrenální osy. Jde především o aktivaci enzymu indoleamin-2,3,-dioxygenasa, který degraduje tryptofan a tak i snižuje dostupnost serotoninu pro CNS. IL-1 a IL-6 indukují syntézu aminokyselin peptidů akutní fáze, které jednak soutěží s tryptofanem o aktivní transport do CNS a jednak snižují tvorbu tryptofanu, prekursoru serotoninu (*Wichers et al. 2002; Wichers et al. 2005*). Navíc IL-1 zvyšuje vychytávání serotoninu ze synaptické štěrbiny pomocí aktivace serotonergního transporteru (*Leonard et al. 2001*). IL-6 svou aktivitou podmiňuje zvýšení produkce hormonu uvolňující kortikotropin, kdy v konečném důsledku dochází k samotnému navýšení hladin kortizolu (*Dentino et al. 1999*). Jiný mechanismus, jak cytokiny mohou zasahovat do patogeneze deprese, je narušení funkce glukokortikoidního receptorů přítomných na buňkách IS. Důsledkem toho nedochází k imunosupresi pomocí glukokortikoidů, ale k dalšímu uvolňování prozánětlivých cytokinů zapojených do patogeneze deprese (*Pariante et al. 1999; Pariante et al. 2001*).

Možné teorie proč deprese předchází KP: (*Makrilia et al. 2009*)

1. Imunologická: nádorové buňky pankreatu uvolňují protilátky, které blokují serotoninové receptory centrálního nervového systému
 2. Hormonální: Zvýšená sekrece serotoninu močí zapříčiňující depleci zásob serotoninu
 3. Paraneoplastická: produkce falešných neurotransmiterů
 4. Biochemická: poruchy acido bazické rovnováhy, anémie a jiné metabolické poruchy
-

U mnohých nemocných s nádorem může být deprese manifestací paraneoplastického syndromu. V případě tzv. paraneoplastické limbické encefalitidy se depresivní symptomy nacházejí až u 58 % pacientů (*Gultekin et al. 2000*). Patofyziologie tohoto jevu je dáвана do souvislosti s IS, kdy autoprotiilátky indukované nádorem jsou namířeny proti centrálnímu nervovému systému (*Farrugia et al. 2005*).

I přesto, že již máme dostatek informací o možných souvislostech mezi depresí a alterací cytokinů u pacientů s KP, je nutné dořešit otázku, zda jde o kauzalitu, či zda jde o symptom předcházející vlastní chorobu a nadprodukce cytokinů je jen podružným nálezem (*Dunn et al. 2005; Schiepers et al. 2005*).

3.3. Alterace imunitního systému

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 buněčné složce IS, a to jak na úrovni přirozené (např. cytokiny, NK buňky), tak i adaptivní imunity (např. T lymfocyty).

3.3.1. Fyziologické změny imunitního systému

IS, podobně jako nervový a endokrinní systémy podléhají cirkadiálnímu rytmu. Vedle změn cirkadiálního rytmu jsou prokázány i změny v rámci celého roku (*Haus et al. 1999*). V rámci cirkadiálního rytmu je zaznamenán největší vzestup v počtu cirkulujících buněk IS v průběhu noci pro B a T lymfocyty a dále pro $\alpha\beta$ T lymfocyty a $CD4^+$ lymfocyty a v denních hodinách pro granulocyty, makrofágy, NK buňky, $\gamma\delta$ T lymfocyty a $CD8^+$ T lymfocyty (*Suzuki et al. 1897; Bertouch et al. 1983; Lange et al. 2010*). V průběhu roku existují pro jednotlivé buněčné populace období s nejvyššími hodnotami v periferní krvi. Nejvyšší počet $CD3^+$ T lymfocytů je v březnu a $CD8^+$ T lymfocytů v prosinci. NK buňky dosahují maxima hodnot v cirkulující krvi v říjnu. Pro $CD4^+$ T lymfocyt byly popsány dva vrcholy a to v březnu a červnu (*Levi et al. 1988*). Dalším fyziologickým faktorem ovlivňujícím IS je snížení funkční kapacity T lymfocytů a jejich počtu v závislosti na věku. Autor Mackall uvádí, že funkční vlastnosti a počty $CD8^+$ T lymfocytů vykazují odlišný trend snížení funkční kapacity oproti $CD4^+$ T lymfocytům (*Mackall et al. 1997*). Tato skutečnost je přičítána jednotlivým mechanismům regeneračních pochodů pro $CD3^+$ T lymfocyty, které jsou závislé na thymu, jenž podléhá degenerativním změnám s přibývajícím věkem a $CD8^+$ T lymfocytům, které jsou schopny regenerace bez ohledu na involuci thymu. Dle autora Spitse je dalším důvodem, proč $CD8^+$ T lymfocyty nevykazují s věkem výrazný pokles, spojení s heterogenitou této populace, kde součástí jsou i $CD3^-$ subpopulace a zdá se, že obnovení právě subpopulace $CD3^-CD8^+$ (NK buňky) je jedním z důvodů časnější regenerace $CD8^+$ T lymfocytů (*Spits et al. 1995*). Vliv těchto jinak fyziologických změn u pacientů s ZN může vést k rychlejší nádorové progresi (*Eismann et al. 2010*).

3.3.2. Imunitní systém a zhoubný novotvar

ZN má přímý modifikující vliv na IS nemocného. Nádorová tkáň je tvořena nejen nádorovými, ale i stromálními buňkami. Zatímco makrofágy a fibroblasty jsou nalézány v nádorovém stromatu konstantně, přítomnost ostatních populací imunokompetentních buněk je proměnlivá. Je prokázáno, že zánětlivá reakce IS a nádorový růst jsou úzce propojeny.

Nádorové mikroprostředí určované interferony, interleukiny a zvláště chemokiny má klíčový význam pro charakter zánětlivé reakce. Vlivem chemotaktického gradientu nádorového mikroprostředí jsou přitahovány T lymfocyty, dendritické buňky, granulocyty, makrofágy i NK buňky. Všechny uvedené buňky mohou produkovat další chemokiny a spolu s cytokiny tvořenými nádorovými buňkami mají zásadní vliv na charakter lokální i systémové imunitní odpovědi. S rozvojem nádoru dochází k akumulaci T regulačních (Treg) lymfocytů v periferní krvi, drénujících uzlinách a v nádorové tkáni, a svým působením inhibují rozvoj protinádorové imunitní reakce organismu (*Bates et al. 2006*).

Na eliminaci nádorových buněk IS se podílejí cytokiny, které ovlivňují funkci efektorových buněk IS. Na základě charakteru imunitní reakce určované cytokiny můžeme dělit imunitní odpověď tzv. prvního typu a druhého typu. Klíčovou roli mají $CD4^+$ T lymfocyty, které v případě reakce prvního typu produkují IL-2, IL-12, $INF\gamma$, což vede ke stimulaci buněčné cytotoxické odpovědi. Reakce druhého typu je určována produkcí IL-4, IL-6, IL-10, které převážně stimulují humorální odpověď. Cytokiny určující jeden typ odpovědi potlačují opačné efektorové mechanismy. V nádorovém prostředí dochází k potlačení reakce prvního typu mechanismem, který není stále detailně znám (*Kemp et al. 2001*).

Důležitou roli v nádorovém prostředí mají i složky vrozeného IS. Dendritické buňky přítomné v nádorovém milieu jsou klíčovými prostředníky k prezentaci nádorových antigenů a zprostředkování specifické protinádorové imunitní reakce. Jejich hlavní funkcí je zpracovávat antigen a prezentovat antigen T lymfocytům. Aktivované dendritických buňky mají schopnost zvýšit cytotoxickou aktivitu NK buněk pomocí zvýšené exprese $INF\alpha$. Komplementový systém, jako důležitá složka přirozeného IS, se skládá z vysoce potentních prozánětlivých molekul jako např. C3a a C5a. Funkce tohoto systému v průběhu vlastního zánětlivého procesu je již dobře zdokumentována (*Rutkowski et al. 2010*). Avšak ukazuje se, že přítomnost složek komplementového systému v nádorovém prostředí má imunosupresivní potenciál a může být příčinou růstu tumoru (*Markiewski et al. 2008*). Specifickou buněčnou populací nádorového prostředí jsou tzv. NKT buňky. Jedná se o malou frakci T lymfocytů

s CD3⁺ znakem avšak jinak zcela podobným fenotypem NK buňkám. Oproti T lymfocytům vykazují mnohonásobně vyšší cytotoxicitu a pomocí produkce cytokinů ovlivňují dozrávání dalších T lymfocytů.

3.3.3. Imunitní systém a léčba zhoubného novotvaru

Chemoterapie

Cytostatická protinádorová léčba působí nespecificky vůči nádorovým buňkám a ovlivňuje tak i ostatní buňky, které proliferují a to bez rozdílu, zda jde o nádorovou či zdravou buňku. Většina cytostatik uplatňuje přímý imunosupresivní účinky tím, že inhibuje funkci a diferenciaci efektorových buněk IS. Působením cytostatických látek může tak dojít k navození anergie imunitních efektorových buněk. Samotný rozpad velkého počtu nádorových buněk v průběhu cytostatické léčby je provázen masivním uvolněním antigenních epitopů, což může vyvolat fenomén imunitní tolerance.

Nejčastěji uváděnými cytostatiky vyvolávající imunosupresivní stavy u pacientů jsou temozolomid (*Su et al. 2004*), fludarabin (*Anaissie et al. 1998*), cyklofosfamid (*Weiner et al. 2002*) a metotrexát (*Weinblatt et al. 1985*).

Účinky chemoterapie či chemoradioterapie se mohou projevat v IS i dlouhou dobu po ukončení terapie. Obnova počtů a funkce imunokompetentních buněk je odvislá od volby cytostatika a použité dávky. Většina chemoterapeutik negativně ovlivňuje především produkci cytokinu IL-2, zatímco samotná radioterapie snižuje hladiny cytokinu IL-4 (*Kang et al. 2009*).

Chemoterapii byly dlouhou dobu připisovány pouze imunosupresivní účinky. Ukazuje se však, že některá cytostatika mají schopnost aktivovat protinádorovou imunitní odpověď a tak potencovat efekt protinádorové léčby.

Hlavním imunostimulačním efektem cytostatické léčby je uvolnění nádorových antigenů. Buněčná smrt indukovaná cytostatiky jako antracykliny, oxaliplatinou či radioterapií, podporuje klonální expanzi cytotoxický T lymfocytů a zvýšení exprese toll like receptoru 4 (TLR4) na dendritických buňkách (*Casares et al. 2005*). TLR4 rozpoznává nebezpečné signální motivy převážně mikrobiálních organismů, ale i endogenních struktur, a je důležitým faktorem ve zpracování a prezentování nádorových antigenů. Ligandem pro receptor TLR4, který je uvolňován nádorovými buňkami po působení cytostatik a radioterapie, je tzv. protein high mobility group box 1 (HMGB1) (*Apetoh et al. 2007*).

Uvolnění nádorových antigenů vyvolané buněčnou smrtí vedoucí k stimulaci IS je známo u gemcitabinu (*Correale et al. 2005*) a taxanů (paklitaxel a docetaxel), které mimo to zvyšují proliferační schopnost T lymfocytů a zvyšují cytotoxickou aktivitu NK buněk (*Carson et al. 2004*).

Zvýšení cytotoxického efektu CD8⁺ lymfocytů a NK buněk vůči nádorovým buňkám napomáhá zesílená exprese FasL (Fas ligand) a TRAIL ligandů na terčovách buňkách působením cytostatik jako jsou cisplatina, doxorubicin, mitomycin C, 5-fluorouracil a camptothecin (*Micheau et al. 1997; Lacour et al. 2001*).

Jiným mechanismem stimulace IS je indukce molekul zajišťujících mezibuněčné vazby. Například působením 5-fluorouracilu dochází v nádorových buňkách k indukci exprese proteinů teplotního šoku, která usnadňuje fagocytózu dendritickými buňkami a následnou prezentaci dalším buňkám IS (*Galletto et al. 2003*).

Dalším mechanismem, při kterém léčba cytostatiky může mít pozitivní vliv na IS, je schopnost některých chemoterapeutik vyvolat depleci imunosupresivních buněk CD4⁺CD25⁺ T lymfocytů či myeloid derived suppressor cells (MDSC) a zvýšit tak latentní imunitní odpověď či synergicky působit s vakcínou. Hlavním inhibítorem Treg buněčné populace je cyklofosamid, který snižuje jak počet Treg, tak inhibuje i supresivní účinek zbývajících Treg (*Lutsiak et al. 2005; Ghiringhelli et al. 2007*). Paklitaxel a doxorubicin mají podobné vlastnosti jako cyklofosamid, kdy indukci apoptózy imunosupresivních buněk stimuluje IS (*Casares et al. 2005; Vicari et al. 2009*).

MDSC představují populaci nezralých myeloidních buněk diferencujících se v makrofágy, granulocyty a dendritické buňky. Mohou inhibovat funkci T lymfocytů jednak přímo, nebo nepřímo přes indukci proliferace Treg buněk (*Ghiringhelli et al. 2005*). Gemcitabin svým působením redukuje počet MDSC, neovlivňuje CD4⁺ a CD8⁺ T buňky a NK buňky a makrofágy (*Suzuki et al. 2005*). Gemcitabin dále potlačuje Th2 typ imunitní reakce a tím zvyšuje odpověď Th1 typu, která je důležitá v protinádorové cytotoxické odpovědi (*Plate et al. 2005*). Gemcitabin nepřímo stimuluje protinádorovou imunitu inhibicí proliferace B lymfocytů zodpovědných za produkci antigen blokujících protilátek a tím zesiluje specifickou i nespecifickou buněčnou cytotoxickou odpověď (*Nowak et al. 2002*).

Je prokázáno, že cytostatika mohou mít i přímý pozitivní účinek na IS. Po intraperitoneálním podání antracyklinu či mitomycinu C dochází ke zvýšení fagocytární kapacity peritoneálních makrofágů a zvýšenému usmrcování nádorových buněk (*Shindo et al. 1985; Ujhazy et al. 2003*). Neoadjuvantní podání paklitaxelu u nádoru prsu je spojeno se zvýšenou přítomností tumor infiltrujících lymfocytů v nádoru a navíc, paklitaxel redukuje

zastoupení Treg lymfocytů v nádorovém stroma (*Landoire et al. 2008*). Podáním trastuzumabu dochází k odstranění nádorových buněk protilátkami zprostředkovanou cytotoxickou reakcí (ADCC) (*Arnould et al. 2006*).

Léčba cytostatiky může mít i nepřímý stimulační účinek na IS. Například inhibitory topoizomerázy nebo radioterapie mohou aktivovat nitrobuněčné mechanismy v nádorové buňce se snahou opravit poškozenou DNA. Aktivace opravných pochodů je spojena s expresí ligandů pro NKG2D receptor přítomný na NK buňkách, NKT lymfocytech, $\gamma\delta$ T lymfocytech, a CD8⁺ T lymfocytech (*Gasser et al. 2005*).

Radioterapie

Samotná radioterapie zvyšuje nádorovou imunogenicitu cestou modulace nádorových peptidů. Ta může probíhat třemi různými způsoby (*Reits et al. 2006*): 1. záření podporuje odbourávání existujících bílkovin a tím zvyšuje pool intracelulárních peptidů využitelných k prezentaci pomocí MHC I. třídy; 2. ozářením dochází k aktivaci mTOR kináz a následné syntéze proteinů antigenní povahy; 3. záření stimuluje syntézu nových bílkoviny a tím i prezentaci nových antigenních peptidů. Nízké dávky radioterapie stimulují samy o sobě expresi antigenu MHC I. třídy a expresi FasL na povrchu nádorových buněk (*Hareyama et al. 1988*). Radioterapie také zvyšuje expresi adhezivních molekul na endoteliálních buňkách (*Gaugler et al. 1997*), čímž dochází k usnadnění vstupu imunokompetentních buněk do nádorového prostředí, například cytotoxických T lymfocytů přítomných ve stroma nádoru tumor infiltrujících lymfocytech (TIL) (*Lugade et al. 2005*).

Glukokortikoidy

Negativní účinek na IS nemusí vždy souviset se samotným cytostatickým účinkem, ale IS může ovlivnit například i léky užívané k podpůrné léčbě v rámci chemoterapie. Steroidy jsou příkladem široce používaných látek v mnoha indikacích. Glukokortikoidy jsou také součástí léčebných protokolů hematologických malignit, kde je využíván jejich proapoptický a antiproliferační efekt (*Distelhorst 2002*). Avšak u solidních nádorů se ukazuje, že glukokortikoidy mají opačný efekt. Způsob, jak může léčba glukokortikoidy ovlivnit konečný výsledek cytotoxické terapie u solidních nádorů, je v podstatě dvojitý: 1. ovlivnění signálních drah indukujících apoptosu a 2. narušení vlastní imunitní odpovědi (*Rutz et al. 2004*).

Výsledný efekt glukokortikoidů je zprostředkován přes aktivaci glukokortikoidových receptorů s následnou modulací transkripce genů na různých úrovních (*Riccardi et al. 2002*). Proteinový komplex zodpovědný za regulaci buněčné apoptosy NF- κ B je u hematologických

malignit na rozdíl od solidních nádorů v důsledku aktivace glukokortikoidových receptorů inhibován a je tedy akcentována náchylnost těchto buněk k apoptóze (*Liden et al. 2000*).

Použití glukokortikoidů je spojeno s ovlivněním migrace imunokompetentních buněk. A to jednak z důvodu snížené exprese adhesivních molekul na imunokompetentních buňkách jako např. ICAM-1 a L-selectinu či E-selectinu na povrchu endotelových buněk (*Cronstein et al. 1992*) a jednak v důsledku inhibice tvorby chemotaktických cytokinů jako IL-8 a CXC chemokinů (*Wertheim et al. 1993; Pype et al. 1999*).

Glukokortikoidy jsou zodpovědné i za inhibici exprese hlavních prozánětlivých cytokinů (interferonů α a β , interleukinu 1α 1β , IL-2, IL-8, TNF α , IL-6, IL-12, IL-18) a naopak glukokortikoidy stimulují tvorbu protizánětlivých cytokinů (IL-4, IL-10 či TGF β) (*Franchimont et al. 2004*).

V důsledcích ovlivnění této tvorby cytokinů glukokortikoidy, kdy je stimulována tvorba IL-4 a naopak inhibována produkce IL-12, dochází k posunu v poměru Th1/Th2 lymfocytů ve prospěch Th2 subpopulace (*Elenkov 2004*).

Kortikosteroidy také výrazně snižují schopnost dendritických buněk diferencovat se ve zralé elementy a tak ovlivňují i jejich schopnost prezentovat antigen (*Rozkova et al. 2006*). Kromě toho je prokázáno, že glukokortikoidy silně snižují expresi genů kódujících proaktivační molekuly buněk specifické imunitní odpovědi, a že indukují sekreci TGF- β , která inhibuje funkce T lymfocytů a NK buněk.

3.3.4. Imunitní systém a psychický stav onkologických pacientů

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 (*Bachen et al. 1992; 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 molekul I. třídy 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-1 β , IL-6, IL-2, IL-12, TNF α , INF γ a CRP (Zorrilla *et al.* 2001; Irwin *et al.* 2007; Simon *et al.* 2008).

3.4. NK buňky

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). NK buňky tvoří pouze 5-10% mononukleárních buněk v periferní krvi. Přesto jsou důležitou složkou přirozené imunity. NK buňky se nacházejí ve všech tělních kompartmentech, jejich zastoupení je však v některých orgánech odlišné. Například v lymfatických orgánech je počet NK buněk až 10 krát vyšší než v periferní krvi (Gregoire *et al.* 2007). Zvýšené počty NK buněk jsou nacházeny i v plicích, játrech nebo slezině (Ferlazzo *et al.* 2004).

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 jak přirozenou, tak získanou imunitní odpověď (Taub *et al.* 1999; Biron *et al.* 2000). Naproti tomu jsou pozitivně i negativně regulovány jak dalšími buňkami IS, tak poškozenými anebo nádorově transformovanými buňkami.

3.4.1. NK buňky jako prognostický faktor v onkologii

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).

3.4.2. NK buňky CD56^{dim} a CD56^{bright}

Na povrchu NK buněk můžeme prokazovat řadu molekul, které mají funkci receptoru pro cytokiny, chemokiny a adhesivní molekuly, pomocí kterých je možné NK buňky identifikovat a určovat jejich subpopulace. NK buňky nemají vyjádřen receptor pro T lymfocyty, jsou CD3 negativní (Robertson et al. 1990). Naopak, všechny NK buňky nesou membránovou molekulu CD7. Hlavní pan NK membránovou molekulou je neurální buněčná adhesivní molekula nesoucí označení CD56 (Lanier et al. 1986). Další povrchovou molekulou vyjádřenou na většině NK buněk je FcγRIII receptor označován jako CD16. Na základě exprese těchto dvou molekul rozlišujeme dvě hlavní subpopulace NK buněk, CD56^{dim}CD16⁺ a CD56^{bright}CD16^{dim/-}. Tyto subpopulace NK buněk vykazují funkční odlišnosti v odpovědi na stimulaci IL-2, v zastoupení NKR, adhezivních molekul a v cytotoxické kapacitě (Cooper et al. 2001A; Cooper et al. 2001b) (viz Obr. 3).

NK buňky CD56^{bright} exprimují na svém povrchu vysokoafinní receptor pro IL-2 tvořené řetězcí α, β, γ (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) (CD 25, CD122 a CD132) a expandují v in vitro a in vivo podmínkách i po nízkých dávkách IL-2. Naopak CD56^{dim} exprimují nízkoafinní receptory pro IL-2 tvořené řetězcí α, β a jejich proliferační odpověď je nízká i na vysoké dávky IL-2. Schopnost usmrcovat terčové buňky je u CD56^{dim} buněk vyšší než u CD56^{bright}. Tato vlastnost CD56^{dim} buněk je dána přítomností velkého počtu cytoplazmatických granul obsahujících perforiny a granzimy a vyšší denzitou membránových receptorů pro Fc fragment. Subpopulace NK buněk mají odlišné zastoupení v jednotlivých tělních kompartmentech, CD56^{bright} buňky se nalézají v největším počtu v lymfatických uzlinách, zatímco CD56^{dim} jsou většinou populací v periferní krvi a slezině (Gregoire et al. 2007). Všechny NK buňky CD56^{bright} mají vyjádřen s vysokou denzitou membránový receptor CD94/NKG2, který náleží do C-typ lecitinové rodiny a jen malý počet (méně než 10%) těchto

buněk exprimuje KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor). Buňky CD56^{bright} mají na svém povrchu přítomny CC-chemokinový receptor 7 (CCR7) a s vysokou denzitou CXCR3 receptor 3 (CXCR3). CD56^{bright} exprimují také adhezivní molekuly z rodiny L-selectinů, které zajišťují vazbu s cévním endotelem a umožňují přesun těchto buněk do sekundárních lymfatických orgánů, kde následně vstupují do interakcí s T lymfocyty (*André et al. 2000*). CD56^{dim} NK buňky mají v naprosté většině (až 85%) vysoce vyjádřeny KIR receptory a naopak nízkou denzitu CD94/NKG2. Povrchový CCR7 není přítomen, ale silně jsou vyjádřeny CXCR1 a CX3CR1. Subpopulace NK buněk se liší i v produkci cytokinů, CD56^{bright} produkují mnohonásobně vyšší množství IFN- γ , TNF- β , GM-CSF, IL-10, a IL-13 než CD56^{dim} (*Cooper et al. 2001a; Cooper et al. 2001b; Jacobs et al. 2001; Fehninger et al. 2003*).

3.4.3. Receptory NK buněk

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.

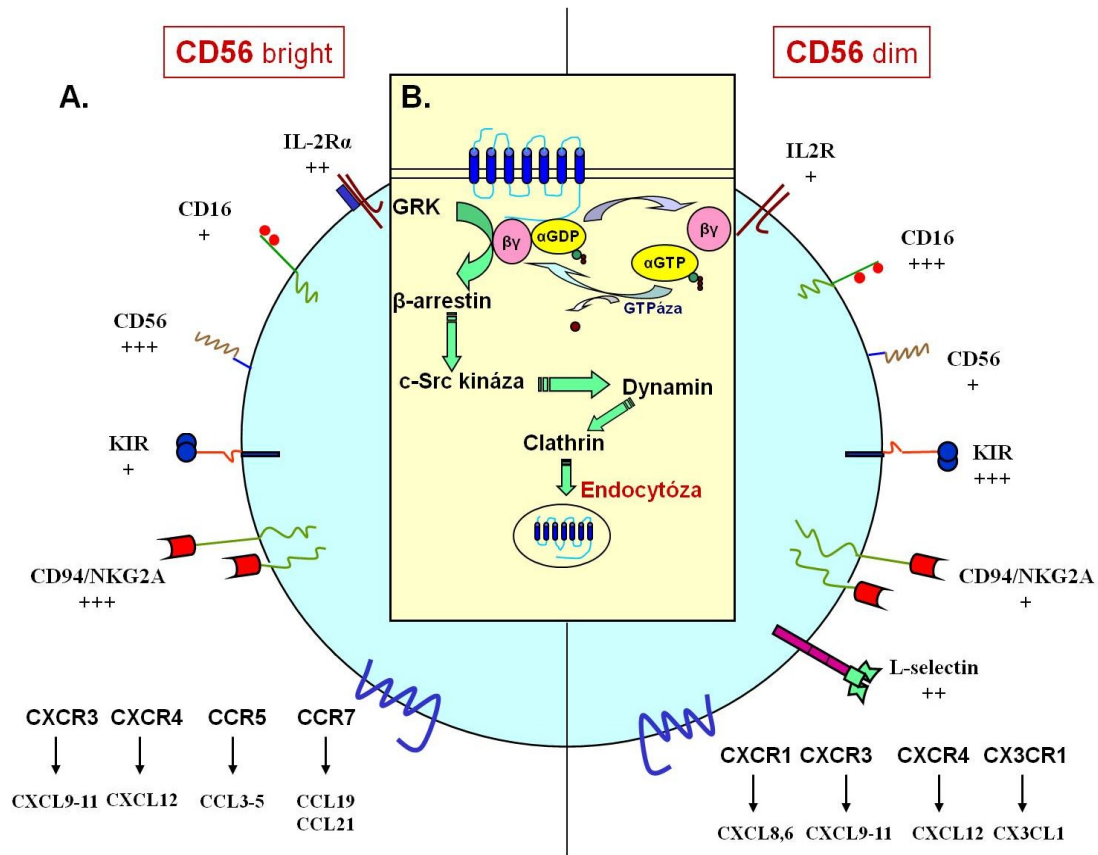
Po navázání ligandu na aktivační či inhibiční receptor dochází na konci spuštěné kaskády k fosforylaci cytoplazmatických konců daného receptoru. Inhibiční receptory mají na svém cytoplasmatickém konci imunoreceptor pro tyrozin inhibující motiv (ITIM), aktivační receptory využívají k zahájení aktivační signální kaskády adaptory obsahující buď vazebné místo pro PI3K, a nebo imunoreceptor pro tyrozin aktivující motiv (ITAM) (*Sallman et al. 2007*).

Principem určujícím zda převáží aktivace či inhibice NK buňky, je výsledná rovnováha mezi stimulací aktivačních a inhibičních receptorů na povrchu NK buněk. Mezi silné inhibiční stimuly patří přítomnost MHC molekul I. třídy na povrchu cílové buňky. Ztráta MHC molekul I. třídy či jeho 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*).

3.4.3.1. Hlavní rodiny receptorů

KIR (killer cell immunoglobulinlike receptor)

KIR receptory se řadí mezi monomerní imunoglobulinové receptory. Geny pro tyto receptory jsou lokalizované na 19p13.4 chromosomu a zahrnují 12 různých alelových variant. Z toho šest inhibičních a šest aktivačních (*Wilson et al. 1997*).



Obr. 3 Membránové molekuly, aktivace a deaktivace receptorů NK buněk. A - Hlavní rozdíly exprese povrchových receptorů u NK bright a NK dim. Míra exprese membránových molekul je vyznačena pomocí znaménka +. B - Po stimulaci receptoru dochází ke konformačním změnám receptoru, které umožní změnu GDP na GTP vedoucí k disociaci βγ podjednotky s α podjednotkou. Existují dvě cesty docílení deaktivace receptorů. První je pomocí GTPázy urychlení hydrolyzy αGTP na αGDP. Druhou možností je zapojení G protein coupled receptor kinázy (GRK), která je po navázání na βγ podjednotku schopna fosforylace receptoru. Fosforylovaný receptor se dále váže s β-arestinem, nereceptorovou tyrosin kinázou c-Src a dyaminem, který usnadňuje endocytózu receptoru pomocí clathrinu.

KIR receptory jsou charakterizovány dvěma (KIR2D) či třemi (KIR3D) extracelulárními doménami, které jsou svojí strukturou podobné extracelulárním doménám

ostatních imunoglobulinových receptorů. Jednotlivé KIR receptory se navzájem odlišují rozdílností cytoplasmatických konců. Existují dva základní typy cytoplasmatického konce: receptory s dlouhým cytoplasmatickým koncem (KIR2DL a KIR3DL) indukující inhibiční signál, nebo s krátkým koncem (KIR2DS a KIR3DS) indukující aktivační signál.

Hlavními ligandy pro KIR receptory jsou alely MHC I. třídy, mezi které patří HLA-A, HLA-B a HLA-C skupiny (*Sallman et al. 2007*).

Výskyt těchto membránových receptorů je odlišný pro CD56^{bright} a CD56^{dim} populaci NK buněk. KIR receptory nacházíme pouze u 10% subpopulace CD56^{bright} NK buněk a naopak u CD56^{dim} NK buněk je až u 85% přítomna vysoká exprese KIR receptorů (*Jacobs et al. 2001*).

Receptory z rodiny C-tyl lectinů

Zástupci receptorů z rodiny C typ lectinů se nachází nejen na povrchu NK buněk, ale jsou přítomny i u cytotoxických T lymfocytů. Tato rodina je charakterizována extracelulární doménou typu C-lectin. Ze strukturálního hlediska se jedná o heterodimery, kdy většina receptorů této rodiny je tvořena kovalentní vazbou mezi podjednotkou CD94 a NKG2 řetězce. Geny pro NKG2 řetězce a CD94 molekuly se nacházejí ve vzájemné blízkosti na chromosomu 12p12.3-p13.1 (*Glienke et al. 1998*).

Jedinou výjimkou jak ve struktuře, tak i funkci mezi receptory této rodiny je NKG2D receptor. Jedná se o aktivační homodimerní receptor.

V rámci receptorů rodiny C-tyl lectinů rozlišujeme pět NKG2 receptorů. Inhibiční NKG2A (a jeho varianta NKG2B), NKG2E (a jeho varianta NKG2H) a NKG2F a aktivační receptory NKG2C, NKG2D. Ligandy pro tyto receptory tvoří neklasické molekuly MHC I. třídy – HLA-E (*Moretta et al. 2006*).

Vysoké zastoupení CD94/NKG2 receptorů nacházíme u CD56^{bright} NK buněk a naopak u CD56^{dim} NK buněk pozorujeme nízkou expresi (*Cooper et al. 2001a*).

NCR receptory (natural cytotoxicity receptors)

Zvláštností této rodiny receptorů je schopnost vyvolat lýzu cílové buňky bez nutnosti přítomnosti MHC molekul I. třídy (*Moretta et al. 2006*). Ligandy pro tuto skupinu receptorů nejsou přesně definovány.

Z této rodiny byly zatím identifikovány následující receptory: NKp46, NKp44 a NKp30. NKp30 a NKp46 receptory jsou konstitutivně exprimovány na povrchu všech NK buněk (*Sivori et al. 1997; Vitale et al. 1998*). NKp44 receptor se nachází pouze na povrchu již

aktivované NK buňky (*Pende et al. 1999*). Vlastní hustota receptorů na povrchu NK buněk koreluje s cytotoxickou schopností.

Strukturálně jsou NKp46, NKp44 a NKp30 od sebe odlišné a odlišný je i mechanismus indukce lýzy. Společné pro tyto tři receptory je nutnost přítomnosti adaptorového proteinu k zahájení aktivace lýzy cílové buňky.

Chemokinové receptory na NK buňkách

Klasifikace chemokinových receptorů kopíruje dělení chemokinových ligandů (*Bacon et al. 2002*). Chemokinové receptory náleží do rodiny receptorů asociovaných s G proteinem tvořeným sedmi transmembránově probíhajícími doménami. G protein je heterotrimerická molekula složená z podjednotek α , β , γ . Prostřednictvím chemokinových receptorů a jejich ligand je uplatňován chemotaktický gradient, vedoucí k polarizaci a migraci NK buněk do poškozených tkání.

Podle Cambella a spolupracovníků většina NK buněk silně exprimuje receptory CXCR1, CXCR4 a CX3CR1, naopak receptory CXCR2 a CXCR3 jsou podle jejich pozorování vyjádřeny slabě (*Campbell et al. 2001*). Práce jiných autorů však popisuje nález pouze receptoru CXCR4 a ne CXCR1, CX3CR1, CXCR2 a CXCR3 (*Inngjerdingen et al. 2001*).

Naopak v případě receptorů pro CC chemokiny se shodují závěry dvou studií v absenci receptorů CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8 a CCR9 na povrchu klidových NK buněk. Ke zvýšení exprese receptorů CCR2, CCR4, CCR5 a CCR8 dochází až po in vitro aktivaci IL-2 nebo IL-15 (*Inngjerdingen et al. 2001; Campbell et al. 2001*).

Přítomnost povrchových receptorů pro chemokiny se u NK buněk liší podle exprese CD16 molekuly. NK buňky CD16⁺ mají silně vyjádřené molekuly CX3CR1, CXCR1 a CXCR4, slabě exprimovány CXCR2 a CXCR3 molekuly, receptory CCR1-7, CCR9 a CXCR5 nejsou přítomny. Na NK buňkách CD16⁻ není membránový receptor pro CXCR1 detekován a receptor pro CX3CR1 je přítomen v nízké denzitě, zatímco receptory CCR5, CCR7, CXCR3 a CXCR4 jsou silně vyjádřeny. Membránové molekuly CCR1-4, CCR6, CCR9 a CXCR2 nejsou na CD16⁻ NK buňkách detekovány (*Campbell et al. 2001*).

3.4.3.2. Aktivační receptory NK buněk

Společnou vlastností všech aktivačních receptorů NK buněk je absence endogenní kinázy, jejíž funkce je nutná k přenosu signálu indukujícího lýzu cílové buňky. Tuto funkci nahrazují proteinové adaptory asociované s aktivačními receptory NK buněk. Mezi tyto

proteinové adaptory patří DAP10, DAP12, CD3- ζ (obvykle asociuje s TCR) a Fc ϵ -RI γ (běžně asociuje s Fc γ -RIII (CD16) receptorem).

Mezi základní aktivační receptory NK buněk patří NKG2D, NKG2C, aktivující KIR receptory, NCR receptory, DNAM-1 (CD226) a 2FB4 (CD244) receptory. Dále jsou blíže popsány pouze receptory použité v disertační práci.

NKG2D

NKG2D receptor je svoji strukturou homodimerický receptor a svou funkcí se řadí mezi důležité aktivační receptory NK buněk. Jeho výskyt však není limitován pouze na NK buňky, ale můžeme jej identifikovat i na aktivovaných CD8⁺ T lymfocytech a NKT buňkách (*Cosman et al. 2001; Bauer et al. 1999*).

NKG2D existuje ve dvou isoformách: NKG2DL a NKG2DS. Jednotlivé isoformy asociují s odlišnými proteinovými adaptory (NKG2DL s DAP10 a NKG2DS s DAP10 a DAP12). U lidských jedinců je přítomna pouze izoforma NKG2DL.

Ligandy pro NKG2DL receptor se nachází v embryonálních tkáních a za normálních podmínek nejsou zdravým organismem exprimovány. Zvýšená tvorba těchto ligandů se vyskytuje v průběhu probíhajícího buněčného stresu, jako např. u virové infekce či nádorové transformace (*Cosman et al. 2001; Moretta et al. 2006*). Mezi hlavní ligandy patří MHC I chain-related A (MICA) a MHC I chain-related B (MICB). Jde o transmembránové proteiny mající podobnost s MHC I molekulami. Je prokázáno, že nádory jako leukémie, melanomy a nádory prostaty vykazují vyšší exprese MICA a MICB (*Groh et al. 2002; Holdenrieder et al. 2006; Salih et al. 2002*).

Mechanismus mobilizace lytických granúl a zahájení lýzy cílové buňky po navázání ligandu s NKG2D receptorem je iniciován fosforylací tyrozinu v DAP10 adaptoru, která následně umožňuje vazbu a aktivaci PI3K. Po aktivaci PI3K následuje sled fosforylací od Rac, p21 aktivované kinázy (PAK) přes extracelárně regulovanou kinázu (ERK) a mitogen-aktivovanou proteinovou kinasu/ERK (MEK) až k výsledné mobilizaci lytických granúl (*Djeu et al. 2002; Jiang et al. 2000*).

Rodina receptorů přirozené cytotoxicity (NCR)

Základní údaje o této skupině receptorů byly popsány již výše. Zde bude pojednáno o jednotlivých receptorech a jejich specificích.

NKp46 je transmembrání receptor, který je tvořen dvěma C2-typy Ig podobným doménám ve své extracelulární oblasti a který je specifický pouze pro NK buňky a to jak v klidovém tak aktivovaném stádiu (*Morreta et al. 2000*).

Ukazuje se, že receptor NKp46 je hlavním aktivačním receptorem, který po navázání ligandu vede k mobilizaci intracelulárního ionizovaného vápníku s výslednou cytotoxickou aktivitou a indukci tvorby cytokinů. Jako proteinové adaptory využívají receptory NKp46 CD3- ζ a Fc ϵ -RI γ , na které je nekovalentně navázán ITAM motiv (*Moretta et al. 2006*).

NKp30 je stejně jako NKp46 exprimována jak na klidových tak aktivovaných NK buňkách a ukazuje se, že NKp30 úzce spolupracuje s NKp46. Tento receptor se liší od NKp46 přítomností pouze jedné extracelulární domény V typu. Jako adaptorový protein s navázaným ITAM motivem funguje CD3- ζ (*Morreta et al. 2000*).

NKp44 receptor je přítomen pouze na aktivovaných NK buňkách v přítomnosti IL-2. Na své extracelulární doméně má jednu doménu typu V. Adaptorem pro tento receptor je DAP12, který obsahuje pouze jediný ITAM motiv umožňující převedení signální kaskády, která vede ke konečnému uvolnění lytických granul (*Blery et al. 2000*).

Aktivující receptory KIR

KIR receptory patří do rodiny receptorů imunoglobulinů. Existuje šest aktivačních variant, který jsou geneticky kódovaný na 19p13.4 chromosomu. Mezi aktivační receptory patří varianty s krátkými cytoplasmatickými konci (KIR2DS a KIR3DS).

KIR receptory asociují s adaptorovým proteinem DAP12. Po navázání ligandu dojde k fosforylaci DAP12 a vytvoření vazebného místa pro Syk/Zap70 s následnou aktivací vedoucí v konečné fázi k lytické aktivitě.

KIR rozpoznávají alely MHC I. třídy, mezi něž patří skupiny: HLA-A, HLA-B a HLA-C (*Moretta et al. 2006*). Zastoupení KIR receptorů na povrchu NK buněk je velice různorodé jak napříč populace, tak i v rámci jednoho jedince. (*Yawata et al. 2006*)

Mezi aktivační receptory se řadí i receptor s krátkou formou KIR2DL4. Tento receptor se řadí mezi aktivační receptory i přes přítomnost ITIM domény. KIR2DL se nachází na CD56^{+bright} NK buňkách. KIR2DL se odlišuje od zbytku receptorů rodiny KIR odlišnou vazebnou aminokyselinou pro proteinový adaptor. V případě KIR2DL4 nejde o zbytek lysinu jako u ostatních KIR receptorů, ale o argininový zbytek. Dalším rozdílem KIR2DL4 od ostatních KIR receptorů je v adaptorovém proteinu, kdy KIR2DL asociuje s Fc γ -RI α (*Kikuchi-Maki et al. 2005*). A v neposlední řadě aktivace KIR2DL4 receptoru nevede

k zprostředkování cytotoxicity, ale produkci velkého množství INF- γ (*Rajagopalan et al. 2001*).

3.4.3.3. Inhibiční receptory NK buněk

Již dlouhou dobu je známa schopnost buněk inaktivovat kaskádu vedoucí k indukci lýzy NK buňkami v přítomnosti MHC I molekul. Podstatou tohoto jevu je přítomnost povrchových molekul, které rozpoznávají MHC I molekuly na cílových buňkách a které vyvolávají spuštění signální inhibiční kaskády. V případě nepřítomnosti či převahy aktivačních receptorů dojde k aktivaci NK buněk. Roli specificky inhibičních receptorů vůči MHC molekulám I. třídy v případě NK buněk mají KIR receptory a NKG2A/CD94 (*Blery et al. 2000; Moretta et al. 2006*). Jak KIR receptory tak i NKG2A/CD94 receptory se mohou nacházet i na některých subtypech T lymfocytů včetně NKT lymfocytů (*Uhrberg et al. 2001*).

Inhibující KIR receptory

Jde o vysoce diversifikovanou rodinu imunoglobulinům podobných receptorů se schopností rozpoznávat polymorfní struktury lidských MHC I molekul (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Strukturálně se podobají aktivujícím KIR pouze v extracelulární části. Od aktivujících KIR receptorů se odlišují dlouhým cytoplasmatickým koncem obsahujícím jeden či více ITIM motivů.

Na ITIM motivu se nachází dlouhá sekvence aminokyselin umožňující spřažení dvou SH2 domén protein fosfatázy SHP-1. Takto aktivovaná SHP-1 fosfatáza inaktivuje kinázy hrající důležitou roli v aktivační kaskádě pro mobilizaci lytických granul NK buněk (*Gupta et al. 1997*). Známé ligandy pro inhibiční receptory KIR2DL jsou HLA-C molekuly, pro KIR3DL1 a KIR3DL2 HLA-B a HLA-A.

V průběhu vývoje a maturace NK buněk je přítomnost KIR receptorů na povrchu nízká. Avšak jednou exprimované KIR receptory zůstávají stabilně exprimovány na povrchu NK buněk (*Freud et al. 2006; Parham 2006; Fauriat et al. 2008*).

NKG2A

Svou strukturou se neliší od jiných receptorů NKG2 rodiny. Na povrchu NK buněk se vyskytuje jako heterodimer společně s molekulou CD94. Na svém cytoplasmatickém konci receptoru jsou navázány dva ITIM motivy, které po navázání receptoru s ligandem podléhají fosforylaci a následně se stávají vazebným místem pro SHP-1 a SHP-2. Touto vazbou dochází

k aktivaci SHP-1 a následné supresi aktivačních signálů pocházejících z aktivačních receptorů (*Borrego et al. 2005*).

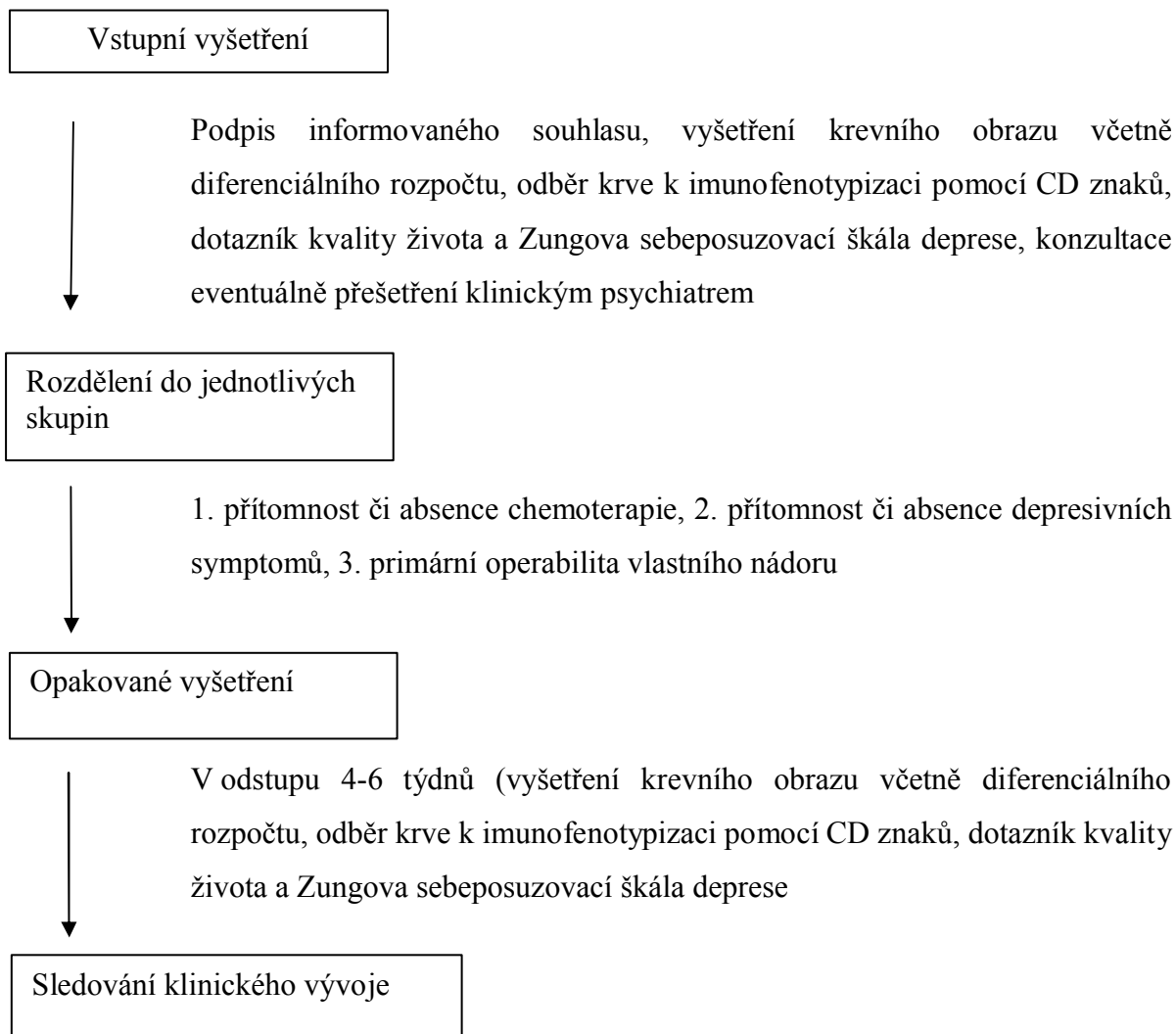
Jedinými ligandy pro NKG2A receptor jsou neklasické HLA-E ligandy.

Receptor NKG2A/CD94 je přítomen na NK buňkách již v průběhu ontogeneze. Existují však rozdíly hustoty zastoupení tohoto receptoru na jednotlivých subtypech NK buněk, kdy nacházíme vyšší denzitu NKG2A/CD94 receptoru na CD56^{+bright} než CD56^{+dim} NK buňkách (*Cooper et al. 2001a*). Můžeme tak říct, že NKG2A receptor může fungovat jako marker zralosti NK buněk, kdy v průběhu maturace z CD56^{+bright} k CD56^{+dim} NK buňkám postupně mizí exprese NKG2A a naopak subsety CD56^{+dim} získávají receptory KIR (*Béziat et al. 2010*).

4. Metody a pacienti

4.1. Uspořádání studie

4.1.1. Vlastní uspořádání studie



4.1.2. Zařazovací a vyřazovací kritéria

Zařazovací kritéria

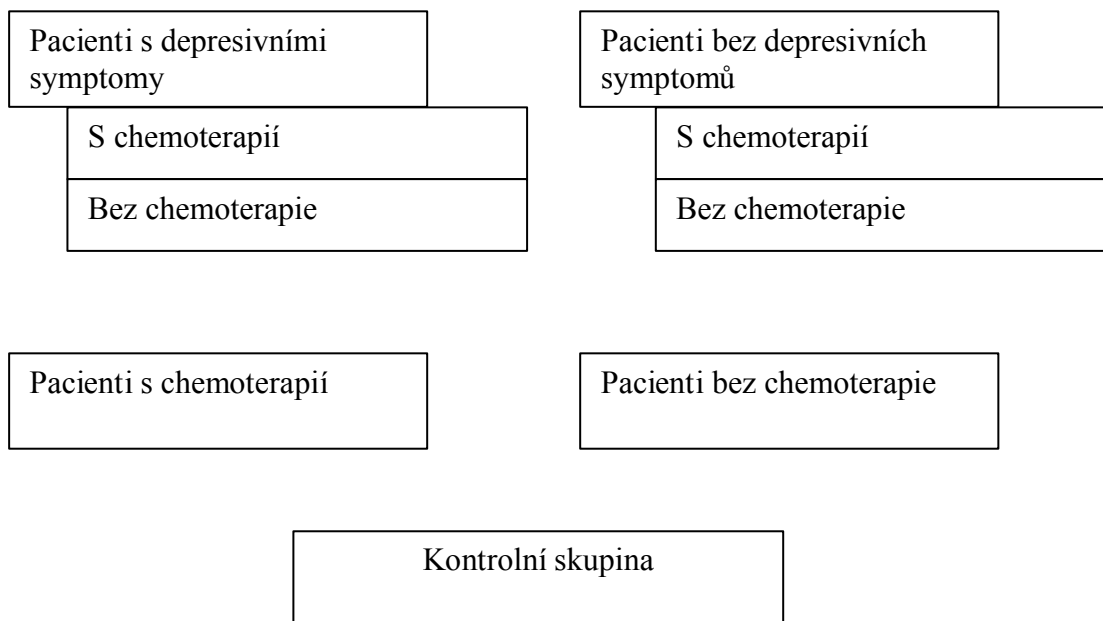
- Vstupní performance status (ECOG 0-1)
- Pacienti sledovaní v paliativní ambulanci pro adenokarcinom pankreatu
- Pacient bez iniciální antidepressivní léčby

- Podepsání informovaného souhlasu o zařazení do studie a možnostech dalšího zpracování biologického materiálu
- Věk nad 18 let

Vylučovací kritéria

- Pozitivní psychiatrická anamnéza
- Objevení se psychiatrické diagnózy v průběhu protinádorové terapie
- Vstupní performance status (ECOG 2 a výše)
- Nepodepsání informovaného souhlasu

4.1.3. Rozdělení do jednotlivých skupin



4.2. Soubor pacientů

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) (viz Graf 1). 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 (viz Tab.1).



Graf 1. Procentuální zastoupení primární lokalizace nádoru pankreatu

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 (viz Tab.1).

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 stanovených 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 porovnávající skupinu pacientů s chemoterapií a bez chemoterapie). U pacientů s paliativní chemoterapií gemcitabinem jsme vypočetli dávkovou intenzitu vztaženou 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).

4.3. Nástroj ke stanovení deprese

U depresivních a úzkostných pacientů je zapotřebí časná diagnóza a okamžitá léčba. V běžné praxi je dobré mít na paměti, že diagnostikovat depresi znamená hlavně na tuto možnost pomyslet. Proto je nutno alespoň orientačně zhodnotit afektivní stav pacienta. Za tímto účelem lze použít diagnostické testy na zjištění deprese zahrnují vyhledávání klinických příznaků a symptomů a v případě známk přítomnosti deprese následně pacienta předat do odborné péče – psychiatra.

Hodnotící sebesuzovací škály využívají kombinace pozorování pacienta tazatelem s vlastním sebesouzením pacienta. Jednotlivé otázky v dotazníku jsou ohodnoceny body, které na konci po součtu mají vypovídající hodnotu dle nastavení jednotlivých dotazníků. Vysoké skóre nemusí nutně znamenat hlubší depresi. Hlavní nevýhodou těchto testů je nemožnost odhalit možnou disimulaci. V našem sledování jsme použili Zungovu autoevaluační škálu pro hodnocení tíhy deprese (viz příloha č. 1).

Tento test byl navrhnout Zungem v roce 1965 k ozřejmění tíhy deprese. Jde o vhodnou alternativu k Beckově testu. Tento test se skládá z dvaceti otázek, z deseti pozitivních a deseti

	Počet pacientů	Ženy	Muži	Medián věku (max-min)	Medián celkového přežití (max-min)	Stadium IV	Stadium III	Stadium IIB	Stadium IIA
S depresivním symptomy	10	5	5	71,5 (81-57)	307 (4475-90)	2	3	4	1
Bez depresivních symptomů	1	6	5	59,0 (77-41)	493 (3083-246)	3	1	6	1
S depresivním symptomy a chemoterapií	6	3	3	neprováděno	neprováděno	2	2	2	0
S depresivním symptomy bez chemoterapie	4	2	2	neprováděno	neprováděno	0	1	2	1
Bez depresivních symptomů a chemoterapií	6	3	3	neprováděno	neprováděno	3	1	1	1
Bez depresivních symptomů bez chemoterapie	5	3	2	neprováděno	neprováděno	0	0	5	0
S chemoterapií	12	6	6	61,5 (75-41)	493 (1366-246)	5	3	3	1
Bez chemoterapie	9	5	4	69,0 (81-54)	493 (4475-90)	0	1	7	1
Celkově	21	11	10	67 (81-41)	366 (4475-90)	5	4	10	2

Tab. 1 Charakteristika pacientů

negativních. Tyto otázky jsou zaměřeny ke zhodnocení psychomotoriky, fyziologického ekvivalentu pacienta a jiných poruch. Dotazovaný má vyjádřit míru potíží na čtyřbodové škále možnosti odpovědi – 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.

4.4. Metody stanovení buněčné populace - průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je moderní laboratorní metoda, pomocí které lze vyšetřovat jakékoli imunofluorescenčně označené buněčné suspenze a stala se součástí imunologické a diferenciální diagnostiky v klinické praxi.

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje automatickou kvantifikaci parametrů pro velký počet buněk během jednoho vyšetření. Touto metodou je také možné analyzovat pevné tkáně po úpravě na buněčnou suspenzi. Tato metoda je založena na fyzikálních vlastnostech světelného rozptylu analyzovaných buněk – tedy především na fluorescenci. Tato fluorescence může být spojena buď s barvou nebo s protilátkou, které jsou konjugovány komponenty nacházejícími se na povrchu či intracelulárně.

Tato metoda velmi usnadnila identifikaci různých buněčných typů při diagnostickém procesu. První průtoková cytometrie umožňovala analýzu jedné či dvou barev, v dnešní době je možné analyzovat až 11 fluorescenčních barev najednou. Běžný cytometr je schopen detekovat přibližně 10^2 - 10^3 molekul označených fluorochromy. Avšak skutečná senzitivita je vždy o něco menší, a to z důvodů rozmělněním imunofluorescence i na nespecifické povrchové antigeny, a také z důvodu shluku těchto částic při nadbytku fluorochromu.

4.4.1. Indikace k vyšetření

Průtoková cytometrie získává v dnešní době stále větší uplatnění i v klinické praxi nejen pro stanovení diagnózy, ale také pro stanovení prognózy, anebo monitoraci průběhu onemocnění (*Craig et al. 2008*).

Ohledně indikací vhodných k vyšetření pomocí průtokové cytometrie byly a jsou pořádány stále nové a nové odborné vědecké diskuze (*Davis et al. 1997; Stetler-Stevenson et al. 2007; Davis et al. 2007*). Základní doporučení ohledně indikace byly naposledy stanoveny skupinou mezinárodních expertů v roce 2006 na konferenci v Bethesdě nazvané: Bethesda

International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia (*Stetler-Stevenson et al. 2007; Davis et al. 2007*) (viz Tab. 2).

Indikace k flowcytometrickému vyšetření

Nejasná leukocytóza, cytopenie (leukopenie, anémie, trombocytopenie, pancytopenie), lymfocytóza či monocytóza, eozinofilie

přítomnost atypických buněk či blastů v periferní krvi či kostní dřeni

klinické podezření na hematologickou chorobu

suspektní uzlinový syndrom

hepatomegalie či splenomegalie

monoklonální gamapatie

defektní funkce trombocytů či trombocytóza

s přítomností abnormálních trombocytů

klinický imunodeficit

Klinické využití průtokové cytometrie

Imunofenotypizace leukemií a lymfomů

DNA analýza

Funkční vyšetření leukocytů

Stanovení intracelulárního vápníku

Diagnostika defektů imunity

Cytometrické vyšetření solidních nádorů

Diagnostika a monitorování autoimunních chorob

Transplantační imunologie

Tab. 2 Indikace k vyšetření průtokové cytometrie všeobecně

4.4.2. Princip průtokové cytometrie

Metoda průtokové cytometrie se opírá o základy fyzikálních zákonů o optice, tekutině, elektronice. Průtoková cytometrie je soustava detekující buňky či částice, které se pohybují v proudu kapaliny skrz laser/světelný paprsek a detekující zónu. Výsledkem je měření relativního světelného rozptylu v měřící soustavě. Analýza a rozlišení buněk jsou pak založeny: zaprvé na rozptylu paprsku v úzkém úhlu ($0,5-10^\circ$) od osy tzv. forward scatter (FSC), který odpovídá velikosti buňky, zadruhé na rozptylu paprsku v 90° ose tzv. side scatter (SCC), která odpovídá zrnitosti, a zatřetí na přítomnosti fluorescenčních molekul buď ve formě protilátky či barvy (*Macey 2007*).

Pomocí flow cytometru jsme schopni měřit několik parametrů na jedné buňce ve stejný čas a je tedy i možné diagnostikovat homogenní skupinu mezi zdánlivě heterogenní populací.

Přístroj jako takový se skládá ze tří funkčních jednotek: 1. jeden či více zdrojů laserového paprsku a senzory, 2. hydraulický systém zodpovědný za kontrolu pasáže přes senzory, 3. počítač, který sbírá data a provádí analytické pochody na základě signálů ze systému senzorů (viz Obr. 4).

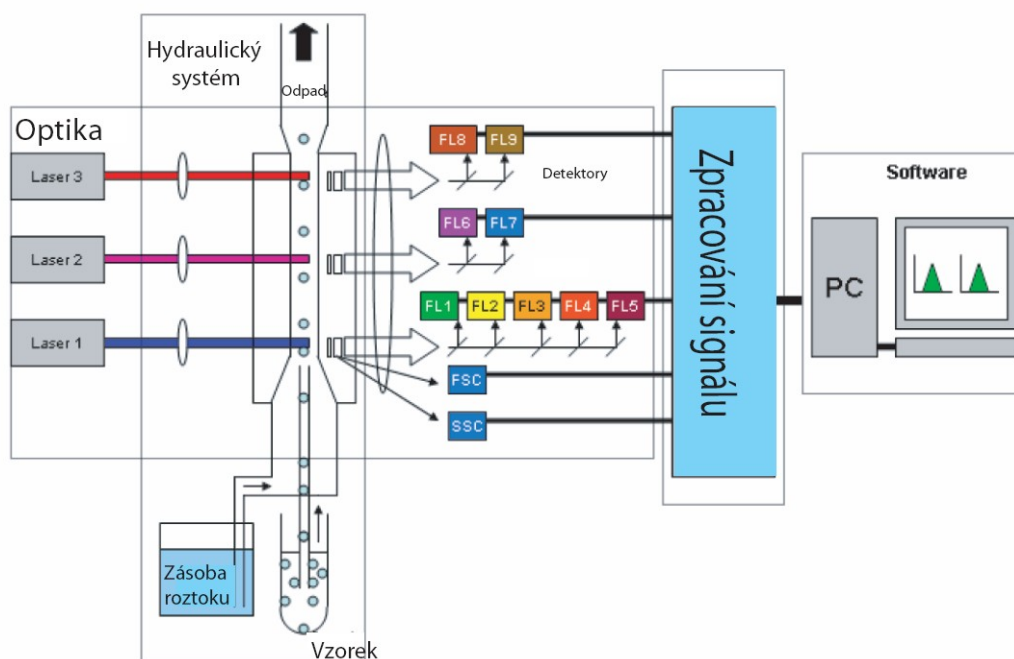
Laser jako zdroj světla má hlavní výhodu v tom, že produkuje monochromatický světelný paprsek. Nejčastěji se používá argonový laser s vlnovými délkami mezi 351nm a 528nm, kryptonové lasery produkují světlo o vlnových délkách mezi 350nm a 799nm. K našemu měření jsme použili průtokový cytometr CyAN ADP od firmy DAKO. Jde o devíti barevný průtokový cytometr využívající tři lasery (o vlnových délkách 488nm, 405nm, 635nm), který je schopen měřit 11 parametrů (FSC, SCC, FL1-9).

Tak jak prochází buňka laserovým paprskem, jsou na jejím povrchu excitovány navázané fluorescenční monoklonální protilátky. Tato excitace je detekována pomocí optického aparátu a dále pomocí soustavy dichronických zrcadel a dalších filtrů. Fotony dopadající na detektor jsou konvertovány na elektrický impuls, který je pak pomocí analog-digitalovým konvertorem převeden na numerický signál. Vizuálním výsledkem je zobrazení jednotek frekvence distribuce, které mohou být jednoparametrové, dvouparametrové, či víceparametrové. Jednoparametrová vizualizace sleduje intenzitu fluorescence na ose x a počet buněk dané fluorescence na ose y. Dvouparametrové histogramy umožňují identifikaci různých buněčných typů, kde na ose x je vynesena intenzita jednoho a na ose y intenzita druhého signálu a množství buněk je znázorněno hustotou bodů (tzv. dot-plot histogram).

4.4.3. Fluorochromy

Látky schopné fluorescence se nazývají fluorochromy. Schopnost měření více znaků na jedné buňce je limitováno počtem fluorochromů, které je možno simultánně měřit. S ohledem na měření průtokovou cytometrií je vhodné, aby fluorochromy měly v optimálním případě následující vlastnosti: biologická inertnost, vysoká fluorescenční intenzita, aby vykazovaly malé spektrální překryvy mezi sebou a umožňovaly jednoduchou konjunkci s monoklonálními protilátkami (*Baumgarth et al. 2000*). Rozlišujeme fluorochromy samostatné a tandemové, u kterých excitace primárního fluorochromu aktivuje k excitaci sekundárního fluorochromu.

Nejčastěji používané flourochromy jsou FITC (fluorescein isothiocyanate), které mají absorpční maximum při vlnové délce 490 až 495 nm a emituje světlo o vlnové délce 520 nm v zelené oblasti a PE (phycoerythrin) s absorpčním maximem při vlnových délkách 485 až 575, které emituje světlo ve vlnové délce 575 nm v červené oblasti. My jsme dále použili samostatné flourochromy Pacific Blue APC a tandemové flourochromy PE-Cy5 a PE-Cy7 (viz Tab. 3).








Obr. 4 Schema principu průtokové cytometrie (převzato z CyAn™ ADP with Summit™ Software User Guide 2006).

Výběr správného flourochromu k identifikaci znaků je závislý na hladině exprese tohoto znaku a druhu buňky, na kterém je exprimován. Pokud nejsou tyto informace k dispozici, je vhodné použít pro tyto neznámé buňky jasné flourochromy jako PE, Cy5PE či APC a méně jasné flourochromy použít k identifikaci známých znaků (*Baumgarth et al. 2000*).

Výběr správné kombinace flourochromů by měl být prováděn na základě jednotlivých specifikací pro konkrétní projekt. Jiná strategie platí pro kombinaci 11 barev a jiná pro 4. Výběr barev je také závislý na počtu detektorů v přístroji. Dále jedno z hlavních kritérií je očekávaná hladina exprese sledovaného znaku.

4.4.4. Spektrální překryv a jeho kompenzace

Spektrální překryv mezi jednotlivými fluorochromy je největším limitačním faktorem pro cytometrické vyšetření. Každý fluorochrom má široké spektrum emise a při použití více fluorochromů je zde vysoká pravděpodobnost, že se jednotlivé spektra budou překrývat. Toto je možné omezit výběrem správného filtru (*Baumgarth et al. 2000; Overton 2006; McCarthy 2007a*). Spektrální překryv je také možné redukovat i výběrem druhu laseru (dle vlnové délky). Další možná kompenzace je závislá na druhu softwaru.

Barva	laserová excitace (nm)	maximální absorbance (nm)	maximální emise (nm)	barva fluorescence
FITC	480	490	525	
PE	480	490, 565	578	
PE-Cy5	488	496, 547	670	
PE-Cy7	488	496, 546	780	infračervená
Pacific Blue	405, 407	410	455	
APC	633, 635, 647	650	661	

Tab. 3 Charakteristika použitých fluorochromů

Hlavním cílem kompenzace je odstranit spektrální překryv fluorochromu ze „špatného“ kanálu, jako například u fluoresceinu (primárně zelený), který je měřen v kanálu FL1, avšak má i žlutou komponentu, která se zobrazuje v kanálu FL2 (*Roederer 2002*).

Správné použití kompenzačního mechanismu je nutným předpokladem ke správné analýze naměřených dat. Například nastavení správného kompenzačního mechanismu je nutné k rozlišení dim populace, kdy podcenění kompenzačního mechanismus může vést k nadhodnocení frekvence přítomnosti dim populace a naopak nadměrná kompenzace nám tuto frekvenci podhodnotí.

4.4.5. Příprava krve na vyšetření

Venózní krev po odběru by měla být okamžitě promíchána s antikoaganciem (heparin, citrát sodný, K3EDTA), aby se zamezilo krevnímu srážení. Výběr antikoagulačního činidla nehraje ve většině případu roli. Ale někdy výběr antikoagulancií může ovlivnit konečný výsledek. K3EDTA je vhodný pro imunofenotypizaci leukocytů, avšak jelikož jde o silný chelátor, není vhodným činidlem pro vyšetření epitopy dependentní na Ca²⁺ jako např. CD11b (*McCarthy et al. 1993*). Samotné heparinové činidlo je vhodné pro vyšetření

funkčních vlastností lymfocytů. Pro vyloučení in vitro aktivace trombocytů a myeloidních buněk je vhodné používat polypropylenové zkumavky (*McCarthy 2007b*).

Z této nesrážlivé krve se pak odstraní převládající červené krvinky a krevní destičky. K tomu se využívá jedna z následujících technik jako diskontinuální hustotní gradient, hypotonická nebo chloridem amonným zprostředkovaná lýza.

Značení leukocytů monoklonální protilátkou může probíhat před lýzou či po lýze bezjaderných krevních elementů. V současné době existuje mnoho experimentálních protokolů k provedení povrchové imunofenotypizace. Tyto protokoly se dají obecně rozdělit na dvě skupiny dle použití techniky značení cílových buněk protilátkami konjugovanými s fluorochromy na na přímé a nepřímé značení.

Pokud není možno z technických důvodů provést barvení vzorků bezprostředně po odběru, je nutné, aby tyto vzorky byly uloženy v příhodných teplotních podmínkách. Teplota kolem 25°C je postačující v případě stabilních molekul jako CD3, ale vhodnější je všeobecně považována teplota 4°C (*Hensleigh, et al. 1983; Ashmore et al. 1989; Repo et al. 1993*).

Buňky se s protilátkami inkubují po dobu 10-30 minut. Následuje promývání koncentrátu buď jednorázovou, nebo opakovanou centrifugací a resuspendací v pufovaném izotonickém roztoku. Tento roztok může obsahovat ochrannou bílkovinu a azid sodný, který brání buněčným pochodům, a někdy i fixační činidlo ke stabilizaci vazby protilátek a buněčných struktur před měřením (*Šinkorová et al. 2008*).

4.4.6. Analýza a interpretace

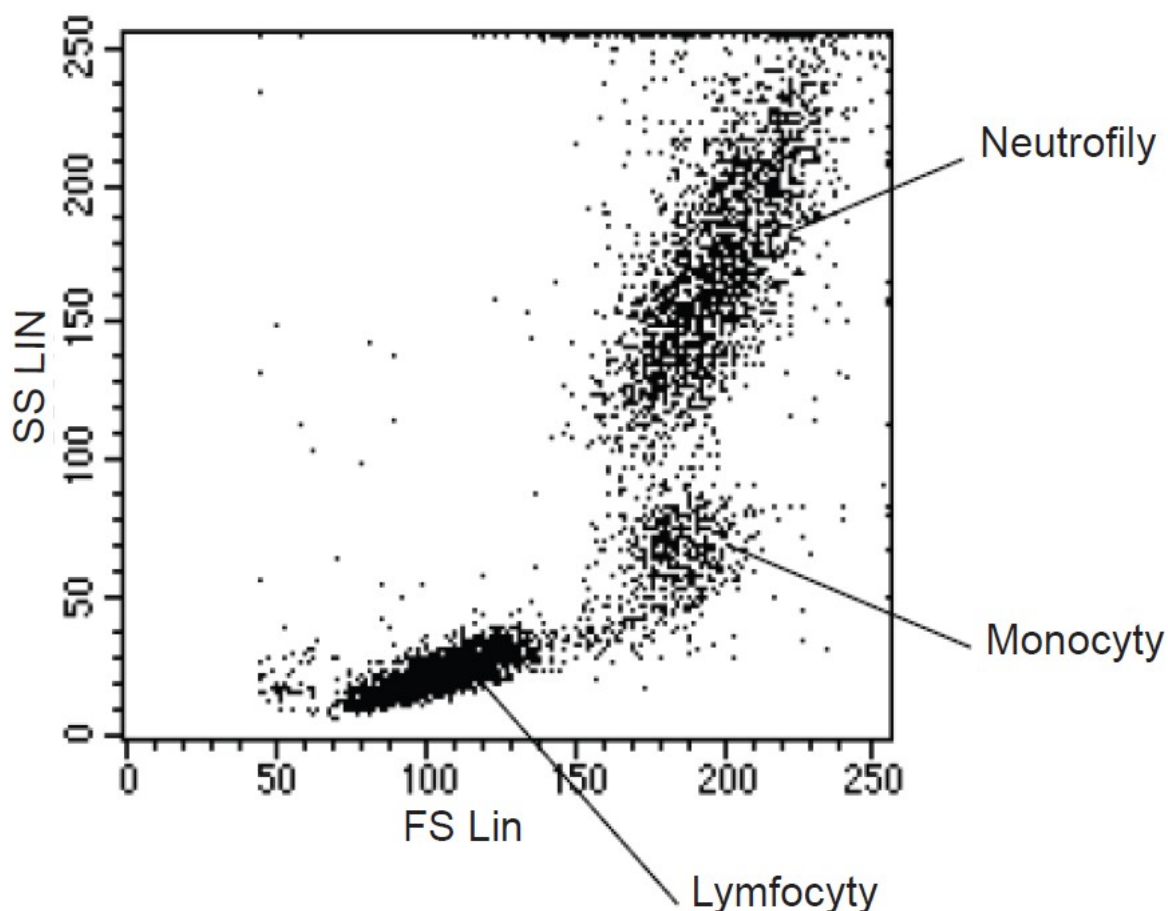
První informace, která charakterizuje analyzovanou suspenzi je tzv. scattergram. Jde o dvojrozměrný tečkový diagram (angl. dot plot). Představuje hromadnou reprezentaci všech objektů vzorku s hodnotou parametru forward scatter vyšší než vybraný práh (angl. threshold). Každá buňka je v takovýchto diagramech reprezentována jednou tečkou.

Scattergram ukazuje závislost mezi velikostí parametru forward scatter a velikostí parametru side scatter. Tyto hodnoty jsou relativní a jsou vynášeny v logaritmické škále. Na základě rozdílů ve velikosti (FSC) a morfologických ukazatelích (SCC) buněk můžeme ve scattergramu vizuálně rozlišit buněčné populace (viz Obr. 5).

Leukocyty periferní krve jsou značně heterogenní z hlediska parametru side scatter a rozpadají se do několika zřetelně odlišitelných populací. Oblast buněk s nízkou hodnotou parametru side scatter představují lymfocyty, oblast se střední hodnotou side scatteru zastupují monocyty a oblast s vysokými hodnotami side scatteru vyobrazují granuloctární

populaci (neutrofilní a eozinofilní polymorfonukleární leukocyty) (Pursley 2006; Šinkorová et al. 2008).

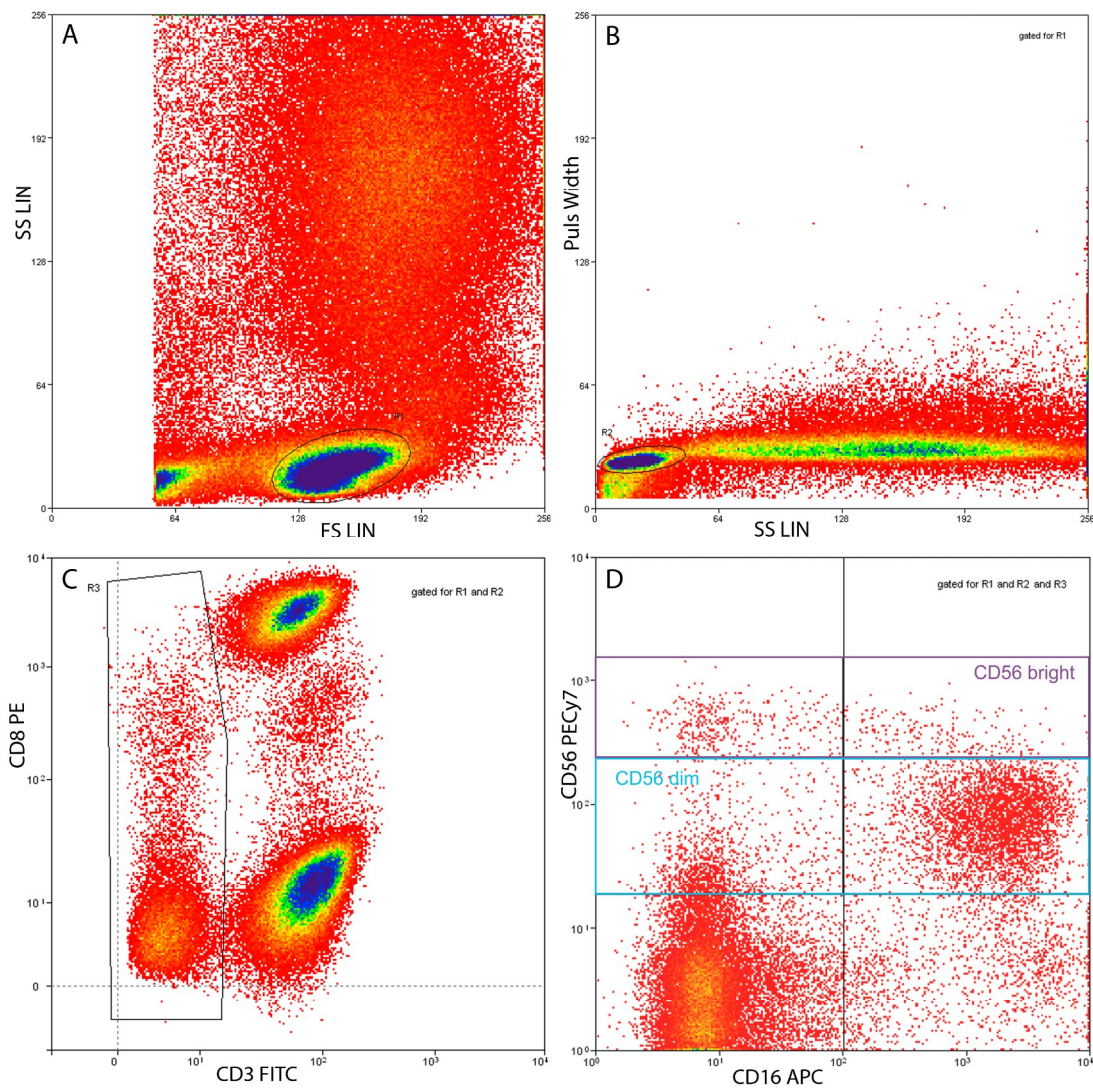
Pokud je analyzovaná buněčná suspenze označena monoklonálními protilátkami reagujícími specificky s definovanými membránovými molekulami, lze proměřit přítomnost a intenzitu fluorescence na jednotlivých buňkách. Digitálně lze najednou analyzovat všechny změřené parametry a vzájemně je kombinovat pomocí elektronické selekce subpopulací (gating).



Obr. 5 Základní scattergram průtokové cytometrie

Na základě exprese CD3 můžeme dělit populaci lymfocytů na $CD3^+$ T-buňky a $CD3^-$ NK-buňky, které je nutné analyzovat odděleně. Pomocí znaků CD16 a CD56 lze v kombinaci s CD3 odlišit tzv. NKT lymfocyty ($CD3^+CD16^+CD56^+$) od T lymfocytů ($CD3^+CD16^-CD56^-$). Subpopulace NKT lymfocytů se dnes považuje za speciální subpopulaci NK buněk s povrchovou expresí CD3 molekuly, přičemž NK buňky jsou definovány jako $CD3^-CD16^+CD56^+$. T lymfocyty s expresí $CD4^+$ představují subpopulaci $CD4^+$ pomocných

a regulačních T-lymfocytů, zatímco exprese CD8⁺ na T lymfocytech představuje subpopulaci převážně cytotoxický T lymfocytů (viz Obr. 6).



Obr. 6 Postup analýzy průtokové cytometrie: A – základní histogram buněčných krevních elementů; B – histogram po gatování na populaci leukocytů; C – histogram po gatování lymfocytů s rozlišením pomocí znaků CD 3 CD8; D – histogram získaný po gatování na CD3- populaci lymfocytů s následným rozlišením dle znaků CD56 a CD16; (zkratky: FS forward scatter, SS side scatter, FITC fluorescein isothiocyanate; PE phycoerythrin, APC allophycocyanin, PECy7 phycoerythrin cyanin).

4.4.7. CD nomenklatura a použité CD znaky v projektu

Jednotlivé buněčné elementy mohou být identifikované pomocí tzv. CD (Cluster Designation) znaků. V podstatě jde o popis povrchových molekul, které byly identifikovány pomocí monoklonální protilátky, tvořené různými hybridomy, u kterých se ukáže, že mají stejné charakteristiky, a které jsou potom spojeny do shluku (clusteru). CD nomenklatura byla založena v Paříži v roce 1982 a je stále doplňována a o další znaky (*Bernard et al. 1984*).

Dnes je známo až 350 membránových molekul (CD1-CD350). Zásadním přínosem CD nomenklatury je možnost komunikace a jednoznačné vyjadřování výsledků analýz, při kterých jsou používány monoklonální protilátky.

V naší studii jsme použili konjugované monoklonálních protilátky 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®), CD56PeCy7 (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) (viz Tab. 4).

Pro jednotlivá měření průtokovou cytometrií a pro základní identifikaci buněčné populace lymfocytů a bližší charakteristiku NK buněk jsme použili následující kombinace:

1. CD8 FITC CD4 PE
2. CD3 FITC CD8 PE CD69 PeCy5 CD25 PB
3. CD3 FITC CD335 PE CD56 PeCy7 CD159a APC
4. CD3 FITC CD337 PE CD56 PeCy7 CD159a APC
5. CD3 FITC CD158i PE CD56 PeCy7 CD314 APC
6. CD3 FITC CD158e1 PE CD56 PeCy7
7. CD3 FITC CD8 PE CD16 APC CD56 PeCy7
8. CD3 FITC CD4 PE CD69 PeCy5 CD25 PB

4.4.8. Charakteristika použitého cytometru

K našemu měření jsme použili průtokový cytometr CyAn ADP od firmy DAKO. Jde o devítibarevný průtokový cytometr využívající tři lasery (o vlnových délkách 488nm, 405nm, 635nm), který je schopen měřit 11 parametrů (FSC, SCC, FL1-9). CyAn ADP poskytuje tři excitační linie s nezávislým optickým aparátem. Je schopen analyzovat až

70 000 událostí za sekundu. Poskytuje plnou 9x9 interlaserovou kompenzaci a vysokou senzitivitu.

4.4.9. Vlastní protokoly

4.4.9.1. Protokol pro přípravu lyzujícího roztoku

Koncentrát lyzujícího roztoku EasyLyse™ (Dako, Denmark) zředíme s ionizovanou vodou v poměru 1:20. Takto zředěný roztok je možno následně uchovávat v lednici.

4.4.9.2. Protokol pro přípravu periferní krve

Použijeme 1ml krve odebrané do zkumavky s heparinem. Vzorek je nutno zpracovat do 24 hod. K tomuto 1ml krve přidáme 10ml lyzačního roztoku a tuto směs necháme při pokojové teplotě inkubovat na 15 min. Směs následně centrifugujeme při teplotě 8°C 1600 RPM na 5 min. Odstraníme supernatant a sediment necháme roztřepat. Poté promyjeme 4ml roztoku cell wash a centrifugujeme 5 min při teplotě 8°C a 1600 RPM. Tuto proceduru promývání opakujeme ještě jednou a následně přidáme 1 ml roztoku cell wash. Tímto způsobem získáme buněčnou suspenzi přibližně s 5×10^5 buněk v 100µl.

4.4.9.3. Protokol k označení leukocytů monoklonálními protilátkami

Monoklonální protilátky aplikujeme postupně dle našeho protokolu do jednotlivých jamek destičky. Přidáme 100 µl získané promyté buněčné suspenze. Tuto směs pak necháme inkubovat 15 min při teplotě okolo 5-8°C. Následně směs centrifugujeme 5 min při teplotě 8°C a 1600 RPM. Odstraníme supernatant a sediment protřepeme. Poté do každé jamky destičky s buněčnou suspenzí přidáme 80µl roztoku cell wash a opět centrifugujeme 5 min při teplotě 8°C a 1600 RPM s následným odstraněním supernatantu a opětovným protřepáním a přidáním 180 µl roztoku cell wash. Znovu centrifugujeme 5 min při teplotě 8°C a 1600 RPM s následným odstraněním supernatantu a protřepáním sedimentu. Získanou buněčnou suspenzi promícháme s cell wash roztokem a odebereme do jednotlivých zkumavek, které slouží k měření. V případě více vzorků a prodloužení doby do vlastního měření, uchováváme vzorky při teplotě okolo 5-8°C.

	Synonyma	Vyskyt	Funkce
CD3	CD3 complex, T3, leu4	T lymfocyty, subpopulace lymfocytů	Signální komponenta TCR komplexu
CD4	OKT4, Leu 3a, T4	Tymocyty, subpopulace T lymfocytů (helpery), monocyty, makrofágy	Koreceptor pro MHC II, aktivace/diferenciace T lymfocytů
CD8	OKT8, Leu T, Ly T2, T8	Subpopulace tymocytů, subpopulace T lymfocytů (supresory), NK buňky	Koreceptor pro MHC I, aktivace/diferenciace T lymfocytů
CD16	FcγRIIIa-CD16a; FcγRIIIb-CD16b	NK buňky, neutrofil, makrofágy (CD16b - granulocyty)	Receptor pro IgG, ADCC, fagocytosa
CD25	Interleukin (IL)-2 receptor α chain, Tac antigen	Aktivované B a T lymfocyty, lymfoidní progenitorové buňky	Formování vysoce afinitivního komplexu s IL-2Rα, w/ IL-2Rβ a γ
CD56	NKHL, neutral cell adhesion molecule (NCAM)	NK buňky, subpopulace T lymfocytů	Adhese
CD69	AIM, activation-induced molecule, MLR3	Aktivované B a T lymfocyty, NK buňky, tymocyty, trombocyty, granulocyty	Signální transdukcce
CD158i	KIR2DS4, p50.3	NK buňky, subpopulace T lymfocytů	Časná aktivace NK buněk, HLA-C receptor
CD158e1/e2	KIR3DL1, p70	NK buňky, subpopulace T lymfocytů	Inhibiční receptor
CD159a	NKG2A	NK buňky, subpopulace T lymfocytů	MHC I receptor, inhibice aktivace NK buněk
CD314	NKG2D, KLR	NK buňky, subpopulace aktivovaných T lymfocytů, myeloidní buňky	Aktivace cytolysy a produkce cytokinu, kostimulační faktor
CD335	NKp46, Ly-94 homolog	NK buňky	Aktivací receptor NK buněk
CD337	NKp30, Ly 117	NK buňky	Aktivací non-MHC receptor NK buněk

Tab 4. Charakteristicka použitých CD značek

5. Statistika

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 $p < 0,05$.

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. $6,65\pm 0,03$). Neproklázali 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. Neproklázal se statisticky významný rozdíl v počtu lymfocytů mezi pacienty s/bez chemoterapie. V případě srovnání skupin pacientů s/bez projevů deprese jsme proklázali snížení počtu lymfocytů u pacientů s depresivními symptomy ($p<0,001$; $14\pm 2,17$ vs. $25,77\pm 2,04$) (viz Tab.5b).

Pozorovali jsme výrazně vyšší hladiny neutrofilů u pacientů s depresivními symptomy, s/bez chemoterapie oproti hladinám vyskytujících se u zdravých jedinců (viz Tab.5a), 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 neproklázali statisticky významný rozdíl oproti zdravým jedincům (viz Tab. 5a,b).

NK buňky

V našem souboru jsme neprokázali 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. $6,54\pm 1,22$) (viz Tab. a,b,c).

Alterace T lymfocytů

V případě T lymfocytů nebyly rozdíly mezi kontrolní skupinou a pacienty s KP (viz Tab. 5a). 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. $93,45\pm 1,22$) (viz Tab. 5b,c).

CD3⁺highCD8⁺high lymfocyty

Pacienti s KP ať s/bez projevů deprese vykazují výrazně nižší hladiny CD3⁺highCD8⁺high T lymfocytů oproti kontrolní skupině ($p=0,0005$; $22,84\pm 1,58$ vs. $38,62\pm 4,84$ 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. $38,62\pm 4,84$) (viz Tab. 5a,b).

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 (viz Tab. 5a).

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 (viz Tab. 5b).

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. $79,20\pm 6,48$) (viz Tab. 5a,c).

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. $70,62\pm 5,58$) (viz Tab. 5b,c).

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. $51,68\pm 8,0$) (viz Tab 5.a).

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. $42,65\pm 4,63$) (viz Tab. 5b,c).

	dep. vs zj.	bez dep. vs zj.	chemo. vs zj.	bez chemo. vs zj.
leukocyty	↑ p=0,01	↔↘ p=0,08	↔ p=0,7	↔↗ p=0,08
lymfocyty	↓ p=<0,001	↓ p=0,0005	↓ p=<0,001	↓ p=<0,001
neutrofily	↑ p=<0,001	↔↗ p=0,08	↑ p=0,0001	↑ p=0,0001
monocyty	↔ p=0,49	↔ p=0,88	↔ p=0,89	↔ p=0,21
T lymfocyty	↔ p=0,33	↔ p=0,38	↔ p=0,77	↔ p=0,61
cT lymfocyty	↓ p=0,0005	↓ p=0,004	↓ p=0,003	↓ p=0,0009
NK buňky	↔ p=0,33	↔ p=0,38	↔ p=0,77	↔ p=0,61
CD16-CD56bright	↓ p=0,01	↓ p=0,003	↓ p=0,01	↓ p=0,04
CD16+CD56bright	↔ p=0,66	↔ p=0,26	↔ p=0,65	↔ p=0,55
CD16-CD56dim	↔ p=0,97	↔ p=0,75	↔ p=0,54	↔ p=0,88
CD16+CD56dim	↔ p=0,73	↔ p=0,57	↔ p=0,97	↔ p=0,26
CD56bright	↔ p=0,49	↔ p=0,31	↔ p=0,57	↔ p=0,17
CD56dim	↔ p=0,49	↔ p=0,31	↔ p=0,57	↔ p=0,17
NKp46	↓ p=0,02	↓ p=0,05	↓ p=0,01	↔↘ p=0,09
NKG2D	↔ p=0,13	↔ p=0,1	↓ p=0,005	↔ p=0,13
NKG2A	↔ p=0,1	↓ p=0,05	↔↘ p=0,06	↔↘ p=0,07

Tab. 5a Porovnání pacientů vůči zdravým jedincům (zkratky: dep - pacienti s depresivními symptomy, bez dep. - pacienti bez depresivních symptomů, chemo - pacienti s chemoterapií, bez chemo - pacienti bez chemoterapie, zj - zdraví jedinci), žlutě vyznačená pole zvýrazňují statistickou významnost při hladině alfa 0,05, šipky poukazují na rozdílnost větší/menší.

	chemo. vs. bez chemo.	s dep. vs. bez dep.
leukocyty	↔ p=0,34	↑ p=0,01
lymfocyty	↔ p=0,33	↓ p=<0,001
neutrofily	↔ p=0,62	↑ p=<0,001
monocyty	↔ p=0,32	↔ p=0,74
T lymfocyty	↔ p=0,49	↔↘ p=0,07
cT lymfocyty	↔ p=0,22	↓ p=0,02
NK buňky	↔ p=0,49	↔↗ p=0,07
CD16-CD56bright	↔ p=0,22	↔ p=0,39
CD16+CD56bright	↔ p=0,9	↔ p=0,21
CD16-CD56dim	↔ p=0,16	↔ p=0,36
CD16+CD56dim	↔↘ p=0,08	↔ p=0,9
CD56bright	↔ p=0,47	↔ p=0,23
CD56dim	↔ p=0,47	↔ p=0,23
NKp46	↔↘ p=0,06	↔ p=0,29
NKG2D	↔ p=0,17	↔ p=0,8
NKG2A	↔ p=0,32	↔ p=0,96

Tab. 5b Porovnání pacientů s chemoterapií a bez chemoterapie, a pacientů s depresivními symptomy a bez depresivních symptomů (zkratky: dep - pacienti s depresivními symptomy, bez dep. - pacienti bez depresivních symptomů, chemo - pacienti s chemoterapií, bez chemo - pacienti bez chemoterapie), žlutě vyznačená pole zvýrazňují statistickou významnost při hladině alfa 0,05, šipky poukazují na rozdílnost větší/menší.

	pacient s chemoterapií		pacienti bez chemoterapie	
		dep. vs. bez dep.		dep. vs. bez dep.
leukocyty	↔↗	p=0,08	↑	p=0,02
lymfocyty	↓	p=0,002	↔↘	p=0,06
neutrofily	↑	p=<0,001	↔	p=0,23
monocyty	↔	p=0,25	↑	p=0,01
T lymfocyty	↓	p=0,01	↔	p=0,78
cT lymfocyty	↓	p=0,03	↔	p=0,29
NK buňky	↑	p=0,01	↔	p=0,78
CD16-CD56bright	↔	p=0,38	↔	p=0,9
CD16+CD56bright	↔	p=0,25	↔	p=0,72
CD16-CD56dim	↔	p=0,24	↔	p=0,92
CD16+CD56dim	↔	p=0,64	↔	p=0,5
CD56bright	↔	p=0,25	↔	p=0,53
CD56dim	↔	p=0,25	↔	p=0,53
NKp46	↔	p=0,96	↔↘	p=0,06
NKG2D	↔	p=0,78	↔	p=0,94
NKG2A	↔	p=0,36	↔↘	p=0,08

Tab. 5c Porovnání skupiny pacientů s chemoterapií a bez chemoterapie po rozdělení na podskupiny s a bez depresivních symptomů (zkratky: dep - pacienti s depresivními symptomy, bez dep. - pacienti bez depresivních symptomů), žlutě vyznačená pole zvýrazňují statistickou významnost při hladině alfa 0,05, šipky poukazují na rozdílnost větší/menší.

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±3,0 vs. 84,68±2,24). V ostatních případech jsme nepozorovali statisticky významné odlišnosti (viz Tab. 5a,b,c).

7. Diskuse

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 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 (*Schallhammer et al. 1997; Moller et al. 1998; Lima et al. 2001; Fehniger et al. 2003; Penack et al. 2005; 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 podle aktivitu 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 stimulující faktor. Svým působením redukuje počet MDSC (*Suzuki E, 2005*) a zvyšuje počet nádorových antigenů (*Zisman et al. 2001; Correale et al. 2005*). 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. Seznam použité literatury

Abdough 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.

Amos CI, Frazier ML, Wei C, McGarrity TJ.: Peutz-Jeghers Syndrome In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. 2001 Feb 23 [updated 2011 Feb 22].

Anaissie EJ, Kontoyiannis DP, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson L, Lerner S, Keating MJ.: Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Ann Intern Med* 1998;129(7):559–566.

André P, Spertini O, Guia S, Rihet P, Dignat-George F, Brailly H, Sampol J, Anderson PJ, Vivier E.: Modification of P-selectin glykoprotein ligandy-1 with natural killer cell-restricted sulfated lactosamine creates n alternace ligandy for L-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(7):3400-3405.

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.

Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, Mariette C, Chaput N, Mira JP, Delaloge S, André F, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L.: The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007;220(1):47–59.

Apple SK, Hecht JR, Lewin DN, Jahromi SA, Grody WW, Nieberg RK.: Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis. *Hum Pathol* 1999; 30(2): 123-9.

Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, Benoit L, Bonnetain F, Migeon C, Cabaret V, Fermeaux V, Bertheau P, Garnier J, Jeannin JF, Coudert B.: Trastuzumab-based treatment of

HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* 2006;94(2): 259–267.

Ashmore LM, Shopp GM, Edwards BS.: Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage. *J Immunol Methods* 1989;118(2): 209–215.

Backlund DC, Berlin JD, Parikh AA.: Update on Adjuvant Trials for Pancreatic Cancer Surg *Oncol Clin N Am* 2010;19(2):391-409.

Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Maysushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K; IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature.: Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22(10):1067-1068.

Bachen EA, Manuck SB, Marsland AL, Cohen S, Malkoff SB, Muldoon MF, Rabin BS.: Lymphocyte subset and cellular immune responses to a brief experimental stressor. *Psychosom Med* 1992;54(6):673–679.

Baras N, Barnes B, Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Laudi A, Wolf U.: Krebs in Deutschland 2007/2008 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012 na http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDo wnloadsB/KID2012.pdf?__blob=publicationFile.

Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH.: Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 2006;24(34):5373–5380.

Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T.: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stressinducible MICA. *Science* 1999;285(5428):727–729.

Baumgarth N, Roederer M.: A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 2000;243(1-2):77-97.

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.

Bellone G, Smirne C, Mauri FA, Tonel E, Carbone A, Buffolino A, Dughera L, Robecchi A, Pirisi M, Emanuelli G.: Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55(6):684-698.

Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson AB 3rd.: Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma. Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J Clin Oncol* 2002; 20(15): 3270–3275.

Bernard A, Boumsell L.: The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Hum Immunol* 1984;11(1):1-10.

Bertouch JV, Roberts-Thomson PJ, Bradley J.: Diurnal variation of lymphocyte subsets identified by monoclonal antibodies. *Br Med J* 1983;286(6372):1171-1172.

Besedovsky HO, Del Rei A.: Immune-neuroendocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Revs* 1996;17(1): 64-102.

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.

Birkmeyer JD, Siewers AE, Finlayson EV, Stukel TA, Lucas FL, Batista I, Welch HG, Wennberg DE.: Hospital Volume and surgical mortality in the United States. *N Engl J Med* 2002;346(15): 1128–1137.

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.

Bléry M, Olcese L, Vivier E.: Early signaling via inhibitory and activating NK receptors. *Human Immunol* 2000;61(1):51–64.

Borrego F, Masilamani M, Kabat J, Sanni TB, Coligan JE.: The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor *Mol Immunol* 2005;42(4):485-488.

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.

Boyle P, Maisonneuve P, Bueno de Mesquita B, Ghadirian P, Howe GR, Zatonski W, Baghurst P, Moerman CJ, Simard A, Miller AB, Przewoniak K, McMichael AJ, Hsieh CC, Walker AM.: Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study of the search programme of the IARC. *Int J Cancer* 1996;67(1):63-71.

Bramhall SR, Stamp GW, Dunn J, Lemoine NR, Neoptolemos JP.: Expression of collagenase (MMP2), stromelysin (MMP3) and tissue inhibitor of the metalloproteinases (TIMP1) in pancreatic and ampullary disease. *Br J Cancer* 1996;73(8): 972–978.

Brescia FJ.: Palliative care in pancreatic cancer *Cancer Control*. 2004;11(1):39-45.

Bruns CJ, Ellis LM, Radinsky R.: Antiangiogenic strategies in pancreatic cancer. In: Evans DB, Pisters PWT, Abbruzzese JL, editors. *Pancreatic cancer*. New York: Springer-Verlag, 2002:p.357–368.

Burriss HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD.: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first line therapy for patients with advanced pancreatic cancer; A randomised trial. *J Clin Oncol* 1997;15(6): 2403–2413.

Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, Wu L, Butcher EC.: Unique subpopulations of CD56+NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression. *J. Immunol* 2001;166(11):6477–6482.

Carney CP, Jones L, Woolson RF, Noyes R Jr, Doebbeling BN.: Relationship between depression and pancreatic cancer in the general population *Psychosom Med* 2003;65(5):884-888.

Carson WE 3rd, Shapiro CL, Crespino TR, Thornton LM, Andersen BL.: Cellular immunity in breast cancer patients completing taxane treatment. *Clin Cancer Res* 2004;10(10):3401-3409.

Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Schmitt E, Hamai A, Hervas-Stubbs S, Obeid M, Coutant F, Métivier D, Pichard E, Aucouturier P, Pierron G, Garrido C, Zitvogel L, Kroemer G.: Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005;202(12):1691-1701.

Cascinu S, Frontini L, Labianca R, Catalano V, Barni S, Graiff C, Picone G, Farinati E, Zonato S, Pessi MA, Curti C, Catalano G.: A combination of a fixed dose rate infusion of gemcitabine associated to a bolus 5-fluorouracil in advanced pancreatic cancer, a report from the Italian Group for the Study of Digestive Tract Cancer (GISCAD). *Ann Oncol* 2000;11(10):1309–1311.

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.

Compton CC, Mulvihill SJ.: Prognostic factors in pancreatic carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 1997;6(3):533-554.

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA.: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001a;22(11):633-640.

Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA.: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood* 2001b;97(10):3146-3151.

Correale P, Cusi MG, Del Vecchio MT, Aquino A, Prete SP, Tsang KY, Micheli L, Nencini C, La Placa M, Montagnani F, Terrosi C, Caraglia M, Formica V, Giorgi G, Bonmassar E, Francini G.: Dendritic cell-mediated cross-presentation of antigens derived from colon carcinoma cells exposed to a highly cytotoxic multidrug regimen with gemcitabine, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin, elicits a powerful human antigen-specific CTL response with antitumor activity in vitro. *J Immunol* 2005;175(2):820–828.

Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ.: ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glykoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001;14(2):123–133.

Couch FJ, Johnson MR, Rabe KG, Brune K, de Andrade M, Goggins M, Rothenmund H, Gallinger S, Klein A, Petersen GM, Hruban RH.: The prevalence of BRCA2 mutations in familial pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(2):342–346.

Cox AD, Toussaint LG: Farnesyltransferase inhibitors: Biologic considerations for future therapeutics. In: Evans DB, Pisters PWT, Abbruzzese JL, editors. *Pancreatic cancer*. New York: Springer-Verlag; 2002. p.389–396.

Craig FE, Foon KA.: Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008;111(8):3941-3967.

Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G.: A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(21):9991–9995.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW.: From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 2008;9(1):46–56.

Dantzer R.: Cytokines, sickness behavior, and depression. *Neurol Clin* 2006;24(3):441-460
Davis BH, Foucar K, Szczarkowski W, Ball E, Witzig T, Foon KA, Wells D, Kotylo P, Johnson R, Hanson C, Bessman D.: U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: medical indications. *Cytometry* 1997;30(5):249–263.

Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, Gorczyca W, Lee R, Maiese R, Orfao A, Wells D, Wood BL, Stetler-Stevenson M.: 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematology neoplasia: medical indications. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(Suppl 1):S5-13.

Dentino AN, Pieper CF, Rao MK, Currie MS, Harris T, Blazer DG, Cohen HJ.: Association of interleukin-6 and other biologic variables with depression in older people living in the community. *J Am Geriatr Soc* 1999;47(1):6-11.

Di Costanzo F, Carlini P, Doni L, Massidda B, Mattioli R, Iop A, Barletta E, Moscetti L, Recchia F, Tralongo P, Gasperoni S.: Gemcitabine with or without continuous infusion 5-FU in advanced pancreatic cancer: a randomised phase II trial of the Italian oncology group for clinical research (GOIRC). *Br J Cancer* 2005;93(2):185-189.

Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002; 9(1):6-19.

Djeu JY, Jiang K, Wei S.: A view to a kill: Signals triggering cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 2002;8(3):636–640.

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.

Du W, Touchette D, Vaitkevicius VK, Peters WP, Shields AF.: Cost analysis of pancreatic cancer treatment. *Cancer* 2000; 89(9):1917-1924.

Dunn AJ, Swiergiel AH, de Beaurepaire R.: Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29(4-5):891-909.

Eismann EA, Lush E, Sephton SE. Circadian effects in cancer-relevant psychoneuroendocrine and immune pathways. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35(7):963-976.

Elenkov IJ. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1024(1): 138–146.

Faldyna Z.: Psychiatrické konzilium a depresivní porucha. *Psychiatrie pro Praxi* 2009;10(3):135-138.

Farag SS, Caligiuri MA.: Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006;20(3):123–137.

Farrugia ME, Conway R, Simpson DJ, Kurian KM.: Paraneoplastic limbic encephalitis. *Clin Neurol Neurosurg* 2005;107(2):128-131.

Fauriat C, Andersson S, Bjorklund AT, Carlsten M, Schaffer M, Bjorkstrom NK, et al. Estimation of the size of the alloreactive NK cell repertoire: studies in individuals homozygous for the group A KIR haplotype. *J Immunol* 2008;181:6010–9.

Fazal S, Saif M.: Supportive and palliative care of pancreatic cancer. *JOP* 2007; 8(2): 240–253.

Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA.: CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003;101(8):3052–3057.

Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A, Münz C.: The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 2004;172(3):1455–1462.

Fitzsimmons D, George S, Payne S, Johnson CD.: Differences in perception of quality of life issues between health professionals and patients with pancreatic cancer. *Psychooncology* 1999;8(2):135-143.

Fortner JG, Klimstra DS, Senie RT, Maclean BJ.: Tumor size is the primary prognosticator for pancreatic cancer after regional pancreatectomy. *Ann Surg* 1996;223(2):147–153.

Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1024(1):124–137.

Fras I, Litin EM, Pearson JS.: Comparison of psychiatric symptoms in carcinoma of the pancreas with those in some other intra-abdominal neoplasms. *Am J Psychiatry* 1967;123(12):1553-1562.

Freitas D, Fernandes Gdos S, Hoff PM, Cunha JE.: Medical management of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology*. 2009;9(3):223-232.

French AR, Yokoyama WM.: Natural killer cells and viral infections. *Curr Opin Immunol* 2003;15(1):45-51.

Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 2006;214:56–72.

Friess H, Yamanaka Y, Büchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI, Korc M.: Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 1993;105(6):1846–1856.

Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Hunter DJ, Rimm EB, Willett WC, Speizer FE.: A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch*

Intern Med 1996;156(19):2255-2260.

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.

Galetto A, Buttiglieri S, Forno S, Moro F, Mussa A, Matera L.: Drug- and cell-mediated antitumor cytotoxicities modulate cross-presentation of tumor antigens by myeloid dendritic cells. Anticancer Drugs 2003;14(10):833-843.

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.

Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH.: The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. Nature 2005;436(7054):1186-1190.

Gastrointestinal Tumour Study Group: Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer. Cancer 1987; 59(12): 2006–2010.

Gaugler MH, Squiban C, van der Meer A, Bertho JM, Vandamme M, Mouthon MA.: Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. Int J Radiat Biol 1997;72(2):201-209.

Geer RJ, Brennan MF.: Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. Am J Surg 1993;165(1):68– 72.

Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, Solary E, Le Cesne A, Zitvogel L, Chauffert B.: Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+ CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. Cancer Immunol Immunother 2007;56(5):641–648.

Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F,

Chauffert B, Zitvogel L.: Tumor cells convert immature dendritic cells into TGF- β secreting cells inducing CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells proliferation. *J Exp Med* 2005;202(7):919–929.

Glienke J, Sobanov Y, Brostjan C, Steffens C, Nguyen C, Lehrach H, Hofer E, Francis F.: The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* 1998;48(3):163-173.

Goldstein AM, Fraser MC, Struewing JP, Hussussian CJ, Ranade K, Zametkin DP, Fontaine LS, Organic SM, Dracopoli NC, Clark WH Jr.: Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. *N Engl J Med* 1995;333(15):970–974.

Goldstein D, Carroll S, Apte M, Keogh G.: Modern management of pancreatic carcinoma. *Intern Med J* 2004;34(8):475-481.

Grégoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, Walzer T.: The trafficking of natural killer cells. *Immunological Reviews* 2007;220:169–182.

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.

Groh V, Wu J, Yee C, Spies T.: Tumourderived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002;419(6908):734– 738.

Gultekin SH, Rosenfeld MR, Voltz R, Eichen J, Posner JB, Dalmau J.: Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. *Brain* 2000;123(Pt7):1481-1494.

Gupta N, Scharenberg AM, Burshtyn DN, Wagtmann N, Lioubin MN, Rohrschneider LR, Kinet JP, Long EO.: Negative signaling pathways of the killer cell inhibitory receptor and Fc gamma RIIb1 require distinct phosphatases. *J Exp Med* 1997;186(3):473–478.

Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, Gerdes B, Kress R, Ziegler A, Raeburn JA, Campa D, Grützmann R, Rehder H, Rothmund M, Schmiegel W, Neoptolemos JP, Bartsch DK.: BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *JNatlCancer Inst* 2003;95(3):214–221.

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.

Hareyama M, Imai K, Ban T, Koshiba H, Kubo K, Shidou M, Oouchi A, Morita K.: Effect of radiation on the expression of carcinoembryonic antigen on the membranes of human gastric adenocarcinoma cells □ immunological study using monoclonal antibodies. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 1988;48(12):1572-1574.

Haus E, Smolensky MH.: Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol Int* 1999;16(5):581-622.

Hensleigh PA, Waters VB, Herzenberg LA.: Human T lymphocyte differentiation antigens: effects of blood sample storage on Leu antibody binding. *Cytometry* 1983;3(6):453–455

Hindmarch I.: Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. *Eur Psychiatry* 2002;17(suppl 3):294–299.

Herman E, Černý M, Praško J.: Poruchy nálady In: Herman E, Praško J, Seifertová D, editors. *Konziliární psychiatrie*. Praha: Medical Tribune CZ s.r.o., 2007:p.79-93.

Hlavsa J, Man M, Kala Z, Procházka V, Svatoň R, Válek V, Vášová I, Novotný I, Starý K, Kiss I, Prášek J.: Nádory pankreatu *Med. Pro Praxi* 2008; 5(10): 388–392.

Holden RJ, Pakula IS, Mooney PA.: An immunological model connecting the pathogenesis of stress, depression and carcinoma *Med Hypotheses* 1998;51(4):309-314.

Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR.: Soluble MICB in malignant diseases: Analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55(12):1584–1589.

Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL.: K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 1993;143(2): 545-554.

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-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology* 2002; 143(5):1571-1574.

Igney FH, Behrens CK, Krammer PH.: Tumor counterattack—concept and reality. *Eur J Immunol* 2000;30(3):725–731.

Illman J, Corringham R, Robinson D Jr, Davis HM, Rossi JF, Cella D, Trikha M.: Are inflammatory cytokines the common link between cancer-associated cachexia and depression? *J Support Oncol* 2005;3(1):37-50.

Inngjerdingen M, Damaj B, Maghazachi AA.: Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 2001;97(2):367–375.

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.

Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora KW, Schmidt RE.: CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 2001;31(10):3121-3126.

Jaffee EM, Hruban RH, Biedrzycki B, Laheru D, Schepers K, Sauter PR, Goemann M, Coleman J, Grochow L, Donehower RC, Lillemoe KD, O'Reilly S, Abrams RA, Pardoll DM, Cameron JL, Yeo CJ.: Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation *J Clin Oncol.* 2001;19(1):145-156.

Jass JR.: Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 1986;39(6):585–589.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ.: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2006;56(2):106–130.

Jia L, Jiang SM, Shang YY, Huang YX, Li YJ, Xie DR, Huang KH, Zhi FC.: Investigation of the incidence of pancreatic cancer-related depression and its relationship with the quality of life of patients *Digestion* 2010;82(1):4-9.

Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, Corliss BC, Hong-Geller E, Wei S, Djeu JY.: Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat Immunol* 2000;1(5):419–425.

Joffe RT, Rubinow DR, Denicoff KD, Maher M, Sindelar WF.: Depression and carcinoma of the pancreas *Gen Hosp Psychiatry.* 1986;8(4):241-245.

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.

Kalser MH, Ellenberg SS. :Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg* 1985;120(8): 899–903.

Kang DH, Weaver MT, Park NJ, Smith B, McArdle T, Carpenter J.: Significant impairment in immune recovery after cancer treatment. *Nurs Res* 2009;58(2):105-114.

Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond VM, Bandipalliam P, Stoffel EM, Gruber SB, Syngal S.: Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA* 2009;302(16):1790-1795.

Katon W, Ciechanowski P.: Impact of major depression on chronic medical illness. *J Psychosom Res* 2002;53(4): 859–863.

Kemp RA, Ronchese F.: Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol* 2001;167(11):6497–6502.

Kikuchi-Maki A, Catina TL, Campbell KS.: Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J Immunol* 2005;174(7):3859–3863.

Kimura W, Kuroda A, Makuuchi M.: Problems in the diagnosis and treatment of a so-called mucin-producing tumor of the pancreas. *Pancreas* 1998;16(3): 363–369.

Klein AP, Hruban RH, Brune KA, Petersen GM, Goggins M.: Familial pancreatic cancer. *Cancer J* 2001;7(4):266–273.

Klinkenbijl JH, Jeekel J, Sahmoud T, van Pel R, Couvreur ML, Veenhof CH, Arnaud JP, Gonzalez DG, de Wit LT, Hennipman A, Wils J.: Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg* 1999;230(6): 776–782.

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.

Korc M.: Role of growth factors in pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 1998;7(1): 25–41.

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.

Krombholz R.: Farmakologicky navozená deprese. *Psychiatr pro Praxi* 2008;9(5):209-212.

Kuvshinoff BW, Bryer MP.: Treatment of resectable and locally advanced pancreatic cancer. *Cancer Control*. 2000;7(5):428-436.

Lacour S, Hammann A, Wotawa A, Corcos L, Solary E, Dimanche-Boitrel MT.: Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Cancer Res* 2001;61(4):1645–1651.

Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, Fumoleau P, Ghiringhelli F.: Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2008;14(8):2413-2420.

Lange T, Dimitrov S, Born J.: Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1193(1):48-59.

Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH.: The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986;136(12):4480–4486.

Leonard BE.: The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001;25(4):767-780.

Lévi FA, Canon C, Touitou Y, Reinberg A, Mathé G.: Seasonal modulation of the circadian time structure of circulating T and natural killer lymphocyte subsets from healthy subjects. *J Clin Invest* 1988;81(2): 407-413.

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.

Liden J, Rafter I, Truss M, Gustafsson JA, Okret S.: Glucocorticoid effects on NF-kB binding in the transcription of the ICAM-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273(3):1008-1014.

Lima L, Urbina M.: Serotonin transporter modulation in blood lymphocytes from patients with major depression. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22(5-6):797–804.

Lima M, Teixeira MA, Queirós ML, Leite M, Santos AH, Justiça B, Orfão A.: Immunophenotypic characterization of normal blood CD56+lo versus CD56+hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27(4):731-743.

Lin Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Kikuchi S, Motohashi Y, Kurosawa M; JACC Study Group. Japan Collaborative Cohort.: A prospective cohort study of cigarette smoking and pancreatic cancer in Japan. *Cancer Causes Control*. 2002;13(3):249-254.

Lowenfels AB, Maisonneuve P.: Epidemiologic and etiologic factors of pancreatic cancer. *Hematol Oncol Clin North* 2002;16(1):1-16.

Lu Z, Friess H, Graber H, Guo X, Schilling M, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW.: Presence of two signalling TGF-beta receptors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumour stage. *Dig Dis Sci* 1997;42(10):2054–2063.

Lugade AA, Moran JP, Gerber SA, Rose RC, Frelinger JG, Lord EM.: Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. *J Immunol* 2005;174(12):7516-7523.

Lundin J, Roberts PJ, Kuusela P, Haglund C.: Prognostic significance of serum CA 242 in pancreatic cancer. A comparison with CA19.9. *Anticancer Res* 1995;15(5B):2181–2186.

Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H.: Inhibition of CD4(+) 25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose

cyclophosphamide. *Blood* 2005;105(7):2862–2868.

Lynch HT, Smyrk T, Kern SE, Hruban RH, Lightdale CJ, Lemon SJ, Lynch JF, Fusaro LR, Fusaro RM, Ghadirian P.: Familial pancreatic cancer: a review. *Semin Oncol* 1996;23(2):251–275.

Lyon JL, Slatter ML, Mahoney Aw, Robison LM.: Dietary intake as a risk factor for cancer of the exocrine pancreas. *Cancer Epidemiol Biomaker Prev* 1993;2(6):513-518.

Macey MG.: Principles of Flow Cytometry. In: Macey MG, editor. *Flow Cytometry Principles and Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.;2007 p.1-15.

Mack TM, Yu MC, Hanisch R, Henderson BE. Pancreas cancer and smoking, beverage consumption, and past medical history. *J Natl Cancer Inst* 1986;76(1):49-60.

Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS, Gress RE.: Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 1997;89(10):3700-3707.

Makrilia N, Indeck B, Syrigos K, Saif MW.: Depression and pancreatic cancer: a poorly understood link. *JOP* 2009;10(1):69-76.

Mamessier E, Sylvain A, Thibult 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.

Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, Coukos G, Lambris JD.: Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol* 2008;9(11):1225–1235.

Massie MJ.: Prevalence of depression in patients with cancer *J Natl Cancer Inst Monogr* 2004;(32):57-71.

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.

McCarthy DA, Macey MG.: A simple flow cytometric procedure for the determination of surface antigens on unfixed leucocytes in whole blood. *J Immunol Methods* 1993;163(2):155–160.

McCarthy DA.: Cell preparation In: Macey MG, editor. *Flow Cytometry Principles and Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2007b p.17-57.

McCarthy DA.: Fluorochromes and fluorescence In: Macey MG, editor. *Flow Cytometry Principles and Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2007a p.59-111.

McQueen KL, Parham P.: Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol* 2002;14(5):615-621.

Micheau O, Solary E, Hammann A, Martin F, Dimanche-Boitrel MT.: Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(11):783–789.

Möller MJ, Kammerer R, von Kleist S.: A distinct distribution of natural killer cell subgroups in human tissues and blood. *Int J Cancer* 1998;78(5):533–538.

Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L.: Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 2000 May;21(5):228-234.

Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A.: Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Sem Immunol* 2006;18(3):151–158.

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.

Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, Bassi C, Falconi M, Pederzoli P, Dervenis C, Fernandez-Cruz L, Lacaine F, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Friess H, Büchler MW; European Study Group for Pancreatic Cancer.: Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001;358(9293): 1576–1585.

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.

O'Reilly EM.: Vaccine therapy for pancreatic cancer. In: Evans DB, Pisters PWT, Abbruzzese JL, editors. *Pancreatic cancer*. New York: Springer-Verlag; 2002. p. 347–356.

Ohta T, Yamamoto M, Numata M, Iseki S, Tsukioka Y, Miyashita T, Kayahara M, Nagakawa T, Miyazaki I, Nishikawa K, Yoshitake Y.: Expression of fibroblast growth factor and its receptor in human pancreatic carcinomas. *Br J Cancer* 1995;72(4):824–831.

Okano Y, Okamura H, Watanabe T, Narabayashi M, Katsumata N, Ando M, Adachi I, Kazuma K, Akechi T, Uchitomi Y.: Mental adjustment to first recurrence and correlated factors in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001;67(3): 255–262.

Olf M.: Stress, depression and immunity: the role of defense and coping styles. *Psychiatry Res* 1999; 85(1):7-15.

Onitilo AA, Nietert PJ, Egede LE.: Effect of depression on all-cause mortality in adults with cancer and differential effects by cancer site. *Gen Hosp Psychiatry* 2006;28(5):396-402.

Overton WR.: Fluorochromes in Flow cytometry In: Wulff S, editor. *Flow cytometry: Educational guide*. Carpinteria, California: Dako; 2006 p.17-22.

Parham P. Taking license with natural killer cell maturation and repertoire development. *Immunol Rev* 2006;214:155–60.

Pariante CM, Miller AH.: Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry* 2001;49(5): 391–404.

Pariante CM, Pearce BD, Pisell TL, Sanchez CI, Po C, Su C, Miller AH.: The proinflammatory cytokine, interleukin-1alpha, reduces glucocorticoid receptor translocation and function. *Endocrinology* 1999;140(9):4359-4366.

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.

Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, Ranzani GN.: K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions *Cancer Res* 1994;54(6):1556-1560.

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.

Penack O, Gentilini C, Fischer L, Asemissen AM, Scheibenbogen C, Thiel E, Uharek L.: CD56dim CD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity: against tumor targets, *Leukemia* 2005;19(5):835–840.

Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A.: Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 1999;190(10):1505-1516.

Pettit SJ, Seymour K, O'Flaherty E, Kirby JA.: Immune selection in neoplasia: towards a microevolutionary model of cancer development. *Brit J Cancer* 2000;82(12):1900–1906.

Pisters PW, Hudec WA, Lee JE, Raijman I, Lahoti S, Janjan NA, Rich TA, Crane CH, Lenzi R, Wolff RA, Abbruzzese JL, Evans DB.: Preoperative chemoradiation for patients with pancreatic cancer: toxicity of endobiliary stents. *J Clin Oncol* 2000;18(4):860–867.

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.

Poch B, Lotspeich E, Ramadani M, Gansauge S, Beger HG, Gansauge F.: Systemic immune dysfunction in pancreatic cancer patients. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392(3):353-358.

Praško J, Marková J, Mesanyová M.: Psychiatrická morbidita v onkologii a hematologii. *Psychiatrie*, 2006;10(Suppl. 1): 32-36.

Praško J, Vyzula R.: Diagnostika a léčba psychických poruch v onkologii In: Herman E, Praško J, Seifertová D, editors. *Konziliární psychiatrie*. Praha: Medical Tribune CZ s.r.o., 2007:p.445-467.

Pursley SW.: Data analysis In: Wulff S, editor. *Flow cytometry: Educational guide*. Carpinteria, California: Dako; 2006 p.33-36.

Pype JL, Dupont LJ, Menten P, Van Coillie E, Opdenakker G, Van Damme J, Chung KF, Demedts MG, Verleden GM.: Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21(4):528–536.

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.

Raber J, Koob GF, Bloom FE.: Interferon-alpha and transforming growth factor-beta 1 regulate corticotrophin-releasing factor from the amygdala: comparison with the

hypothalamic response. *Neurochem Int* 1997;30(4-5):455–463.

Raison CL, Capuron L, Miller AH.: Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 2006;27(1):24-31.

Rajagopalan S, Fu J, Long EO.: Cutting edge: Induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* 2001;167(4):1877–1881.

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.

Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, Camphausen K, Luiten RM, de Ru AH, Neijssen J, Griekspoor A, Mesman E, Verreck FA, Spits H, Schlom J, van Veelen P, Neefjes JJ.: Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med* 2006;203(5):1259-1271.

Repo H, Jansson SE, Leirisalo-Repo M.: Flow cytometric determinativ of CD11b upregulation in vivo. *J Immunol Methods* 1993;164(2):193–202.

Riccardi C, Bruscoli S, Migliorati G.: Molecular mechanisms of immunomodulatory activity of glucocorticoids. *Pharmacol Res* 2002;45(5):361–368.

Robertson MJ, Ritz J.: Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990;76(12):2421–2438.

Roederer M.: Compensation in Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom* 2002;Suppl 22: unit 1.14.1–1.14.20.

Rozkova D, Horvath R, Bartunkova J, Spisek R.: Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin Immunol* 2006;120(3):260-271.

Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Mills SA, Parsa AT.: Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res.* 2010;8(11):1453-1465.

Rutz HP, Herr I.: Interference of glucocorticoids with apoptosis signaling and host-tumor interactions. *Cancer Biol Ther* 2004;3(8):715-718.

Safi F, Schossler W, Falkenreck S, Beger H.: CA 19.9 serum course and prognosis of pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 1996;20(3):155–161.

Salih HR, Rammensee HG, Steinle A.: Cutting edge: Down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002;169(8):4098–4102.

Sallman DA, Djeu JY.: Immunological Sculpting: Natural Killer Cell Receptors and Ligands. In: Prendergast GC, Jaffee EM, editors. *Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth*. New York: Elsevier;2007. p. 63-81.

Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic 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.

Satoh K, Ohtani H, Shimosegawa T, Koizumi M, Sawai T, Toyota T.: Infrequent stromal expression of gelatinase A and intact basement membrane in intraductal neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology* 1994;107(5):1488–1495.

Scupoli MT, Sartoris S, Tosi G, Ennas MG, Nicolis M, Cestari T, Zamboni G, Martignoni G, Lemoine NR, Scarpa A, Accolla RS.: Expression of MHC class I and class II antigens in pancreatic adenocarcinomas. *Tissue Antigens* 1996;48(4):301–311.

Shindo H, Ogura T, Masuno T, Hayashi S, Kishimoto S.: Induction of activated macrophages by intraperitoneal injection of mitomycin C in mice. *Cancer Immunol Immunother* 1985;20(2):145–150.

Schallhammer L, Walcher W, Wintersteiger R, Dohr G, Sedlmayr P.: Phenotypic comparison of natural killer cells from peripheral blood and from early pregnancy deciduas. *Early Pregnancy* 1997;3(1):15–22.

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.

Scheithauer W.: Gemzar alone or in combination with capecitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;21:126 (Abstr 500).

Schenk M, Schwartz AG, O'Neal E, Kinnard M, Greenson JK, Fryzek JP, Ying GS, Garabrant DH.: Familial risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(8): 640-644.

Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M.: Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29(2):201-217.

Schleifer SJ, Keller SE, Bartlett JA.: Depression and immunity: clinical factors and therapeutic course. *Psychiatry Res* 1999;85(1):63–69.

Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Brown LM, Greenberg RS, Hayes RB, Swanson GM.: Cigarette smoking and pancreas cancer: A case control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(20):1510-1516.

Silverman DT, Swanson CA, Gridley G, Wacholder S, Greenberg RS, Brown LM, Hayes RB, Swanson GM, Schoenberg JB, Pottern LM, Schwartz AG, Fraumeni JF Jr, Hoover RN.: Dietary and nutritional factors and pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(22):1710-1719.

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.

Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A.: NKp46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 1997;186(7):1129-1136.

Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA.: A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001;2(4):293-299.

Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, Sauter PK, Coleman J, Hruban RH, Lillemoe KD.: Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg* 2000;4(6): 567–579.

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.

Spits H, Lanier LL, Phillips JH.: Development of human T and natural killer cells. *Blood* 1995;85(10):2654-2670.

Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R.: 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(Suppl 1):S3.

Stommel, M., Given, B.A., Given, C.W.: Depression and functional status as predictors of death among cancer patients. *Cancer* 2002;94(10): 2719–2727.

Su YB, Sohn S, Krown SE, Livingston PO, Wolchok JD, Quinn C, Williams L, Foster T, Sepkowitz KA, Chapman PB.: Selective CD4+ lymphopenia in melanoma patients treated with temozolomide: a toxicity with therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2004;22(4):610–616.

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.

Suzuki S, Toyabe S, Moroda T, Tada T, Tsukahara A, Iiai T, Minagawa M, Maruyama S, Hatakeyama K, Endoh K, Abo T.: Circadian rhythm of leucocytes and lymphocytes subsets and its possible correlation with the function of the autonomic nervous system. *Clin Exp Immunol* 1997;110(3):500-508.

Szelényi J.: Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull* 2001;54(4):329-338.

Szuster-Ciesielska A, Słotwińska M, Stachura A, Marmurowska-Michałowska H, Dubas-Slemp H, Bojarska-Junak A, Kandeferska-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.

Šinkorová Z, Zárbynická L.: Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. část. *Vojenské zdravotnické listy* 2008(3)98-104.

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.

Tebbutt NC, Norman A, Cunningham D, Iveson T, Seymour M, Hickish T, Harper P, Maisey N, Mochlinski K, Prior Y, Hill M.: A multicentre, randomised phase III trial comparing protracted venous infusion (PVI) 5-fluorouracil (5-FU) with PVI 5-FU plus mitomycin C in patients with inoperable oesophago-gastric cancer. *Ann Oncol* 2002;13(10): 1568–1575.

Thompson D, Easton DF, et al. Cancer Linkage Consortium.: Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(18):1358–1365.

Thornton LM, Andersen BL, Crespin 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.

Uegaki K, Nio Y, Inoue Y, Minari Y, Sato Y, Song MM, Dong M, Tamura K.: Clinicopathological significance of epidermal growth factor and its receptor in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1997;17(5B):3841–3847.

Uhrberg M, Valiante NM, Young NT, Lanier LL, Phillips JH, Parham P.: The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol* 2001;166(6):3923– 3932.

Ujhazy P, Zaleskis G, Mihich E, Ehrke MJ, Berleth ES.: Doxorubicin induces specific immune functions and cytokine expression in peritoneal cells. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52(7):463–472.

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>.

Vicari AP, Luu R, Zhang N, Patel S, Makinen SR, Hanson DC, Weeratna RD, Krieg AM.: Paclitaxel reduces regulatory T cell numbers and inhibitory function and enhances the anti-tumor effects of the TLR9 agonist PF-3512676 in the mouse. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58(4):615-628.

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.

Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A.: NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by

activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 1998;187(12):2065-2072.

Wayne JD, Abdalla EK, Wolff RA, Crane CH, Pisters PW, Evans DB.: Localized adenocarcinoma of the pancreas: the rationale for preoperative chemoradiation. *Oncologist* 2002;7(1):34-45.

Wein A. Phase II study with weekly 24-hour infusion (24-h inf) of high-dose 5-fluorouracil (5-FU) and gemcitabine (GEM) in metastatic pancreas cancer (UICC IVb): final results. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;21:156 (Abstr 620).

Weinblatt ME, Coblyn JS, Fox DA, Fraser PA, Holdsworth DE, Glass DN, Trentham DE.: Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1985;312(13):818-822.

Weiner HL, Cohen JA.: Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects. *Mult Scler* 2002;8(2):142-154.

Wertheim WA, Kunkel SL, Standiford TJ, Burdick MD, Becker FS, Wilke CA, Gilbert AR, Strieter RM.: Regulation of neutrophil derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4. *J Immunol* 1993;151(4):2166-2175.

Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD.: Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996;14(2):141-145.

Wichers M, Maes M.: The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *Int J Neuropsychopharmacol* 2002;5(4):375-388.

Wichers MC, Koek GH, Robaey G, Verkerk R, Scharpé S, Maes M.: IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. *Mol Psychiatry* 2005;10(6):538-544.

Wilson MJ, Torkar M, Trowsdale J.: Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. *Tissue Antigens* 1997;49(6):574-557.

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.

Yamanaka Y, Friess H, Büchler M, Beger HG, Uchida E, Onda M, Kobrin MS, Korc M.: Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumour stage. *Cancer Res* 1993b;53(21):5289–5296.

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.

Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P.: Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006;203(3):633–645.

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-Garcia 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. Přílohy

Příloha 1: Zungova sebesuzovací stupnice deprese

Zaznamenejte, prosím, odpověď na každou z dvaceti položek	Nikdy nebo zřídka	Někdy	Dosti často	Velmi často nebo stále
1. Jsem smutný, skleslý a zkroušený.				
2. Ráno se cítím nejlépe.				
3. Jsou chvíle, kdy je mi do pláče.				
4. V noci mám potíže se spaním.				
5. Jím stejné množství jídla jako dříve.				
6. Sexuální život a myšlenky na něj mi stále činí potěšení.				
7. Všiml jsem si, že ubývám na váze.				
8. Mám potíže se zácpou.				
9. Srdce mi buší rychleji než obvykle.				
10. Unavím se a i bez příčiny.				
11. Mám v hlavě jasno jako obvykle.				
12. Snadno zvládnou totéž co dřív.				
13. Cítím nepokoj a nevydržím v klidu.				
14. Jsem plný naděje do budoucna.				
15. Jsem podrážděný více než obvykle.				
16. Snadno se rozhoduji.				
17. Cítím, že jsem užitečný a potřebný.				
18. Žiji plným životem.				
19. Cítím, že by pro ostatní bylo lépe, kdybych zemřel.				
20. Těší mě stejné věci co dříve.				

Instrukce pro vyplnění:

Přečtete si pečlivě každou větu. Pro každou položku zaškrtněte ve sloupcích ten, který nejlépe vyjadřuje, jak jste se cítil(a) v průběhu posledního týdne. Dodržujete-li dietu, u položek 5 a 7 odpovídejte, jako kdybyste na dietě nebyl.

Věk:

Datum:

Zpracováno podle W.W.K. Zung, 1965,1974,1989,1991

Příloha 2

Informace pro pacienta

Vážená paní/pán

Váš ošetřující lékař Vám předložil návrh projektu pod názvem „Imunologické změny u nemocných s inoperabilním tumorem pankreatu s ohledem na kvalitu života a depresi ”, který byl předložen v rámci výzkumného programu GAUK (Grantová agentura Univerzity Karlovy) pro rok 2010 až 2011.

Hlavním cílem projektu je ověřit vztah mezi Vaší chorobou (nádor slinivky břišní) a přítomností či nepřítomností depresivních příznaků s ohledem na Vaši kvalitu života a na Váš imunitní systém.

Výskyt depresivních příznaků v průběhu nádorového onemocnění je známou a častou věcí. Mnohé faktory však ukazují, že propojení mezi depresivními příznaky a nádorovým onemocněním probíhá na úrovni imunitního systému. Dále je známo, že chemoterapie ovlivňuje svým působením imunitní systém a tedy může být i faktorem ovlivňující přítomnost depresivních příznaků.

Výsledky budou získávány průběžně v rámci poskytování zdravotní péče v rámci ambulancí paliativní onkologické péče v paliativní ambulanci Kliniky onkologie a radioterapie. Na sběru dat se bude podílet především Váš ošetřující lékař, edukační sestra a sociální pracovnice. Budete informováni o zahájení a dále průběžně informováni o dalším průběhu studie. Nemocní zařazení do studie budou o tom informováni a s jejich souhlasem - formou informovaného souhlasu, budou dále data shromažďována a vyhodnocována.

Bude Vám odebrána krev v rámci pravidelné kontroly a dále bude s Vámi probírána dotazník ohledně kvality života a dotazník na zhodnocení přítomnosti depresivních příznaků.

Sledované hodnoty (imunologické parametry, dotazníky kvality života) budou zaznamenány do datového souboru v rámci statistických programů, budou anonymní a nebudou dále rozšiřována mimo výzkumný projekt.

Příloha 3 Vyjádření souhlasu nemocného s léčbou

Klinika onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice Hradec Králové

Informovaný souhlas

Jméno a příjmení

r.č.

Zdr. poj.

Souhlas se zařazením do projektu sledování imunologických parametrů u pacientů s nádorem slinivky břišní v rámci projektu pod názvem " Imunologické změny u nemocných s inoperabilním tumorem pankreatu s ohledem na kvalitu života a depresi " (Grantová agentura Univerzity Karlovy – GA UK).

MUDr. mě podrobně a vyčerpávajícím způsobem informoval o projektu sledování imunologických parametrů a kvality života. Byl/a jsem informován o tom, že informace a osobní údaje, které poskytnu v rámci tohoto projektu nebudou dále šířeny a publikovány bez mého souhlasu. Z poskytnutými informacemi bude nakládáno podle vnitřní směrnice a pravidel pro ochranu osobních dat. Mé otázky byly vyčerpávajícím způsobem a dostatečně podrobně zodpovězeny ošetřujícím lékařem. Budu dodržovat příkazy a doporučení mého ošetřujícího lékaře, které souvisí s uvedeným projektem. Dále jsem byl/a upozorněn/a, že mohu souhlasit nebo odmítnout nabízené zařazení do výše uvedeného projektu podle vlastní vůle. Vyhrazuji si právo odvolat svůj souhlas aniž tím budu jakkoliv znevýhodněn.

Datum

Podpis pacienta/pacientky

Datum

Podpis ošetřujícího lékaře

Příloha 4 Charakteristika jednotlivých pacientů

Pacient	Pohlaví	Datum stanovení diagnózy	Doba přežití od stanovení dg k 1.1.2012	TNM k datu zařazení do studie	Lokalizace primárního tumoru	Věk v době zařazení	Depresivní symptomy	Hodnota Zungova testu	Druh operace	Druh chemoterapie	Celková doba chemoterapie
1	Ž	18.08.2010	246	T4N0M1 stadium IV	hlava pankreatu	53	NE	41	paliativní	gemcitabin	58
2	Ž	05.04.2010	637	T3N0M0 stadium IIA	hlava pankreatu	41	NE	28	paliativní	gemcitabin	301
3	M	29.06.2010	317	T2N1M0 stadium IIB	hlava pankreatu	58	NE	27	paliativní	gemcitabin	138
4	M	01.11.2007	1366	T4N0M1 stadium IV	tělo a kauda pankreatu	73	NE	40	NE	FUFA	571
5	Ž	11.12.2009	630	T4N0M1 stadium IV	tělo pankreatu	57	NE	38	paliativní	gemcitabin	105
6	M	12.11.2010	349	T4N1M0 stadium III	hlava pankreatu	60	NE	30	paliativní	gemcitabin	239
7	M	25.03.2003	3205	T1N1M0 stadium IIB	hlava pankreatu	69	NE	38	radikální	NE	NE
8	Ž	01.05.2010	611	T1N1M0 stadium IIB	hlava pankreatu	67	NE	30	radikální	NE	NE
9	Ž	27.04.2010	615	T3N1M0 stadium IIB	hlava pankreatu	59	NE	35	radikální	NE	NE
10	M	01.09.2010	488	T3N1M0 stadium IIB	hlava pankreatu	54	NE	45	radikální	NE	NE
11	Ž	11.09.2009	537	T3N1M0 stadium IIB	hlava pankreatu	77	NE	42	NE	NE	NE
12	Ž	01.10.2010	458	T3N1M0 stadium IIB	hlava pankreatu	57	ANO citalec	56	radikální	gemcitabin	190
13	M	13.11.2008	978	T3N1M0 stadium IIB	kauda pankreatu	75	ANO citalec	60	paliativní	gemcitabin	807
14	Ž	27.08.2010	314	T4N1M0 stadium III	hlava pankreatu	71	ANO Tritico	63	NE	gemcitabin	118
15	Ž	13.12.2010	385	T4N1M0 stadium III	hlava pankreatu	75	ANO wellbutrin	71	radikální	FUFA	195
16	M	18.10.2010	251	T4N0M1 stadium IV	hlava pankreatu	63	ANO citalec	66	NE	gemcitabin	119
17	M	01.12.2010	329	TxNxM1 stadium IV	hlava pankreatu	72	ANO risperal citalec	52	NE	gemcitabin	91
18	Ž	01.06.2010	301	T1N1M0 stadium IIB	tělo pankreatu	80	ANO citalec	72	radikální	NE	NE
19	M	02.06.1999	4597	T3N0M0 stadium IIA	hlava pankreatu	81	ANO citalec	65	radikální	NE	NE
20	M	20.12.2010	90	T4N0M0 stadium III	kauda pankreatu	58	ANO citalec	77	NE	NE	NE
21	Ž	01.02.2009	775	T3N1M0 stadium IIB	tělo a kauda pankreatu	70	ANO neurol oxazepam	73	NE	NE	NE