

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



**Laboratorní parametry v detekci účinku protinádorové  
terapie na imunitní systém**

**Pavína Králíčková**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program:  
Radioterapie a klinická onkologie**

**Hradec Králové**

**2014**

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Katedry kliniky onkologie a radioterapie, Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Pavlína Králíčková  
Ústav klinické imunologie a alergologie, FN Hradec Králové,  
Sokolská 581, 500 05, Hradec Králové

Školitel: prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.  
Onkologická klinika, FN Olomouc, I.P. Pavlova 6,  
775 20, Olomouc

Oponenti:  
prof. MUDr. Jiří Litzman, CSc.  
Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice  
u sv. Anny, Pekařská 53, 656 91, Brno  
Doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.  
Onkologická klinika, Všeobecná FN v Praze, U Nemocnice  
2, 128 08, Praha 2

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

prof. MUDr. Jiří Petra, Ph.D.  
předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Radioterapie a klinická  
onkologie

## **Obsah**

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| Souhrn.....                      | 4  |
| Summary .....                    | 4  |
| Úvod do problematiky .....       | 5  |
| Cíle dizertační práce .....      | 6  |
| Metodika a materiál .....        | 7  |
| Výsledky .....                   | 8  |
| Diskuze .....                    | 11 |
| Závěry .....                     | 15 |
| Seznam literatury .....          | 16 |
| Seznam publikační aktivity ..... | 21 |

## **Souhrn**

Imunitní reakci na nádorové buňky je nutné považovat za poslední obrannou bariéru, kterou organizmus staví vůči nádorovému bujení. Chemoterapeutika zasahují přímými i nepřímými účinky do nádorového mikroprostředí a ovlivňují tak odpověď organismu na nádorové bujení. Práce byla rozdělena do dvou oddílů. Cílem první části práce bylo popsat rozložení definovaných buněčných subpopulací periferní krve a neopterinu v moči u žen s karcinomem prsu a dále sledovat změny v souvislosti s podávanou léčbou. Část druhá se zabývala vzájemnými vztahy mezi  $CD14^+CD16^+$  monocyty periferní krve, močovým neopterinem a rizikovými faktory aterosklerózy. Práce dokumentuje fakt, že již v období diagnózy jsou vyjádřeny změny rozložení lymfocytárních subpopulací vůči populaci bez anamnézy nádorového onemocnění. Prokázali jsme, že léčba může částečně pozitivně ovlivnit imunitní odpověď organismu proti nádoru. Změny lymfocytárních subpopulací u žen s metastatickým rozsahem onemocnění v průběhu léčby jsou vyjádřeny v menší míře. Restaurační změny imunitního systému po ukončení léčby představují dlouhodobý proces. Na akcentované ateroskleróze, jako dlouhodobé komplikaci nemocných s karcinomem prsu, se může spoluuplatňovat i systémová zánětlivá odpověď spojená s nádorem jako takovým.

## **Laboratory parameters in the detection of the effect of anticancer therapy on immune system**

### **Summary**

We can consider the immune response to cancer cells as the last barrier in carcinogenesis. Chemotherapeutics interfere directly or indirectly with tumour microenvironment. Our work was divided into two parts. The aim of our study was to describe the distribution of lymphocyte subsets in peripheral blood and urinary neopterin in breast cancer patients in relation to the treatment in the part one, and elucidate the correlation between CD14+CD16+ monocytes, urinary neopterin and risk factors of atherosclerosis in the part two. We show that the changes of lymphocyte subpopulations are present even at the time of cancer diagnosis. The treatment could positively affect the anticancer response. The changes of these lymphocytes subsets during therapy in patients with metastatic stage of disease are less expressed. The restoration of the immune system is a long-term process. The systemic inflammatory response connected with tumour presence could contribute to the accentuated atherosclerosis, possible long-term complication in cancer patients.

## **Úvod do problematiky**

Imunitní reakci na nádorové buňky je nutné považovat za poslední obrannou bariéru, kterou organizmus staví vůči nádorovému bujení.

Efekt chemoterapie či radioterapie nelze zúžit pouze na cytoredukční. Chemoterapeutika zasahují přímými i nepřímými účinky do nádorového mikroprostředí a ovlivňují tak odpověď organismu na nádorové bujení [1-3].

Pokroky v léčbě nemocných s různými typy nádorů se promítají do zlepšení prognózy a prodloužení doby přežívání. Doposud nebyly dostatečně zmapovány dlouhodobé komplikace vč. aterosklerózy. Několik retrospektivních studií demonstruje zvýšené riziko kardiovaskulárních příhod u

dlouhodobě přežívajících nemocných s nádorovým onemocněním [4;5]. Monocyty/makrofágy hrají důležitou úlohu v rozvoji poškození cévní stěny aterosklerózou. Změny fenotypu monocytů periferní krve byly pozorovány i u nemocných se zvýšeným rizikem aterosklerózy. [6].

Neopterin je sloučenina produkovaná aktivovanými makrofágy. Zvýšené koncentrace prozánětlivých markerů v periferní krvi jsou spojené s aktivací imunitního systému a současně také spojeny s vyšším rizikem aterosklerózy a jejích komplikací [7].

### **Cíle disertační práce:**

Cílem první části naší práce bylo zmapování rozložení vybraných lymfocytárních subpopulací u žen trpících karcinomem prsu s následným sledováním jejich dalších změn v průběhu podávané léčby.

Druhá část práce si vzala za cíl vyhodnotit vztah mezi cirkulujícími  $CD14^+CD16^+$  monocyty, sérovým CRP, koncentrací močového neopterinu a vybranými laboratorními parametry aterosklerózy.

### **Pracovní otázky:**

1. Jaké je rozložení vybraných buněčných subpopulací v periferní krvi u nemocných s nově diagnostikovaným nádorem prsu?
2. Jaké je rozložení těchto vybraných buněčných subpopulací v periferní krvi u nemocných s metastatickou formou onemocnění?
3. Jak se jednotlivé skupiny od sebe liší navzájem a jaký je rozdíl oproti zdravým kontrolám?

4. K jakým změnám dochází v průběhu podávání kombinované chemoterapie?
5. Bude se u žen, u kterých bylo dosaženo dlouhodobé remise onemocnění, i po třech letech lišit rozložení sledovaných subpopulací vůči zdravým kontrolám?
6. Jaký je vzájemný vztah mezi  $CD14^+CD16^+$  monocyty periferní krve, močového neopterinu a rizikových faktorů aterosklerózy, jako případné pozdní komplikace u nemocných s karcinomem prsu?

## **Materiál a metodika**

V prospektivní studii byly hodnoceny vzorky periferní krve pacientek s karcinomem prsu. Nemocné byly léčeny ve dvou skupinách: 1. skupina léčená neoadjuvantní chemoterapií (kohorta A) a 2. skupina s metastatickým onemocněním (kohorta M), léčená paliativní terapií.

Po podepsání informovaného byl před zahájením chemoterapie proveden odběr vzorku periferní krve a ranní moče. V průběhu léčby byly další vzorky odebírány vždy v intervalu jednoho týdne, a to buď do ukončení neoadjuvantní léčby či do progresu u žen s metastatickým postižením. Podskupina žen, u které bylo léčbou dosaženo remise onemocnění, byla po třech letech vyzvána k odběru závěrečného vzorku periferní krve.

Vzorky periferní krve byly analyzovány pomocí čtyřbarevné průtokové cytometrie a stanovovány tyto buněčné subpopulace:

$CD3^+$ ,  $CD3^+8^+$ ,  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD69^+$ ,  $CD8^+CD69^+$ ,  $CD69^+$ ,  $CD3^+CD69^+$ ,  $CD8^+CD28^+$ ,  $CD8^+CD28^-$ ,  $CD3^-CD69^+$ ,

T-regulační lymfocyty a dendritické buňky. Současně byla analyzována koncentrace neopterinu v moči.

Statisticky byly nejprve porovnávány sledované skupiny v čase vstupu do studie. Poté pomocí lineární regrese byly sledovány změny rozložení jednotlivých buněčných subpopulací a neopterinu v průběhu léčby. V závěru pak byla porovnána skupina žen bez progresse onemocnění po 3 letech s výchozími hodnotami a se skupinou zdravých žen.

V druhé části práce byla zjišťována korelace  $CD14^+CD16^+$  monocytů periferní krve, močového neopterinu a rizikových faktorů aterosklerózy (CRP, spektrum lipidů, homocystein, sérový tokoferol- $\alpha$ ,UZ vyšetření karotid),

Soubor byl zpracován pomocí statistického programu IBM SPSS Statistics, verze 20 a Microsoft Excel 2010.

## Výsledky

Ve skupině žen M bylo v porovnání se skupinou A zjištěno rel. snížení  $CD3^+CD4^+$  lymfocytů, imunoregulačního indexu a rel. počtu PDC, a naopak rel. zvýšení  $CD3^+CD8^+$ , rel. i abs. zvýšení  $CD8^+CD28^-$ , rel. i abs. zvýšení  $CD3^+CD69^+$  a abs. počtu  $CD8^+CD69^+$ .

Při porovnání skupin M a kontrolní skupinou bylo zaznamenáno ve skupině M významné abs. Snížení celkových lymfocytů i počtu  $CD3^+$ , abs. i rel. snížení  $CD3^+CD4^+$ , rel. zvýšení  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD8^+CD28^-$ ,  $CD3^+CD69^+$  a  $CD8^+CD69^+$  lymfocytů.

Při vzájemném porovnání skupin A a kontrolní skupinou bylo zaznamenáno rel. i abs. Snížení celkového počtu lymfocytů, abs. snížení  $CD3^+$  a  $CD3^+CD4^+$ , rel. snížení  $CD69^+$ , rel. zvýšení  $CD8^+CD28^+$ , rel. zvýšení TREG a rel i abs. snížení  $CD8^+CD28^-$ .



Nebylo shledáno statisticky významných rozdílů mezi HER-2 pozit. a neg. ženami. Taktéž nebyly zaznamenány změny v koncentraci neopterinu, ani před zahájením léčby, ani v jejím průběhu ve všech sledovaných skupinách.

Statisticky významné výsledky regresní analýzy uvádí následující tabulky:

**Tab. č. 1. Lineární regrese ve skupině A pro první fázi léčby (AC).**

*B (změna parametu za jeden den léčby), statisticky významné jsou výsledky se sig. menší než 0.05, R kvadrát vyjadřuje relativní podíl souboru, který je vysvětlitelný daným modelem*

| Parametr                                  | B     | Signifikance | R kvadrát |
|---|-------|--------------|-----------|
| CD3 <sup>+</sup> (%)                      | 0.175 | <0.001       | 0.091     |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)     | 0.112 | 0.002        | 0.071     |
| CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (%)    | 0.082 | 0.006        | 0.055     |
| CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup><br>(%) | 0.014 | 0.005        | 0.057     |
| CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup><br>(%) | 0.009 | 0.045        | 0.030     |

**Tab. č. 2 Lineární regrese ve skupině A pro druhou fázi léčby.**

| Parametr                                    | B      | Signifikance | R kvadrát |
|---|--------|--------------|-----------|
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (%)       | -0.095 | <0.001       | 0.087     |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)       | 0.021  | 0.024        | 0.029     |
| IRI   | -0.005 | 0.001        | 0.068     |
| CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup><br>(%)   | 0.101  | <0.001       | 0.160     |
| CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup><br>(abs) | 0.002  | <0.001       | 0.107     |
| TREG (%)                                    | -0.013 | <0.001       | 0.104     |

|           |        |        |       |
|-----------|--------|--------|-------|
| MDC (%)   | -0.001 | <0.001 | 0.091 |
| MDC (abs) | <0.001 | 0.028  | 0.027 |

**Tab č. 3 Lineární regrese pro skupinu M**

| Parametr                                 | B      | Signifikance | R kvadrát |
|--|--------|--------------|-----------|
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (abs)  | 0.001  | 0,001        | 0.098     |
| IRI                                      | 0.009  | <0.001       | 0.132     |
| CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (abs) | <0.001 | 0,001        | 0.044     |
| CD3 <sup>-</sup> CD69 <sup>+</sup> (%)   | -0.018 | 0.006        | 0.069     |
| CD3 <sup>-</sup> 69 <sup>+</sup> (abs)   | <0.001 | 0.022        | 0.051     |
| TREG (%)                                 | 0.040  | 0.010        | 0.062     |
| PDC (%)                                  | <0.001 | 0.028        | 0.047     |
| PDC (abs)                                | <0.001 | 0.025        | 0.050     |

Statisticky významné výsledky korelace CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytů, neopterinu a rizikových faktorů aterosklerózy shrnuje tab č. 4.

| Parametr (jednotka)       | $r_s$                                   |  |  |              |
|---------------------------|---|--|--|--------------|
|                           | CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> (%) | CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> (buňky/ $\mu$ l) | Neopterin v moči ( $\mu$ mol/mol krea) | CRP (mg/l)   |
| Hmotnost (kg)             | 0.13 (0.47)                             | <b>0.38 (0.03)</b>                                   | -0.22 (0.22)                           | 0.18 (0.31)  |
| Monocyty (%)              | -0.08 (0.68)                            | <b>0.47 (0.005)</b>                                  | -0.07 (0.71)                           | -0.09 (0.61) |
| Monocyty (buňky/ $\mu$ l) | 0.13 (0.48)                             | <b>0.72 (&lt;0.0001)</b>                             | -0.27 (0.13)                           | 0.21 (0.24)  |
| HDL cholesterol (mmol/l)  | -0.32 (0.08)                            | <b>-0.54 (0.001)</b>                                 | 0.24 (0.18)                            | 0.02 (0.92)  |
| Triglyceridy (mmol/l)     | <b>0.44 (0.01)</b>                      | <b>0.43 (0.01)</b>                                   | -0.15 (0.40)                           | 0.15 (0.40)  |
| NAG v                     | <b>0.42 (0.02)</b>                      | 0.20 (0.26)  | 0.00 (1.00)                            | 0.02 (0.93)  |

|                                   |  |  |  |  |
|-----------------------------------|--|--|--|--|
| moči<br>( $\mu$ kat/mol<br>kreat) |  |  |  |  |
|-----------------------------------|--|--|--|--|

## Diskuse

### Vzájemné porovnání sledovaných skupin žen v čase nule

Předchozí data získaná u žen s karcinomem prsu ukazují na rozdílné zastoupení buněčných subpopulací v periferní krvi nemocných. Při porovnání skupiny žen s nově diagnostikovaným karcinomem prsu a kontrolní skupinou jsme v souladu s literárními údaji zaznamenali snížení relativního i absolutního celkového počtu lymfocytů a snížení absolutního počtu  $CD3^+$  lymfocytů a současně zvýšení relativního počtu T regulačních lymfocytů.[8]. Naše skupina dále vykazovala již v počátečních stádiích onemocnění známky imunoprese ve formě snížení absolutního počtu  $CD3^+CD4^+$  lymfocytů, snížení relativního počtu  $CD69^+$  lymfocytů. Zvýšení relativního zastoupení  $CD8^+CD28^+$  lymfocytů při současném snížení absolutního i relativního počtu  $CD8^+CD28^-$  lymfocytů by mohlo být částečně vysvětlitelné včasnou diagnostikou nádorového onemocnění, kdy antigenní stimulace nádorovými antigeny neprobíhala ještě dostatečně dlouhou dobu tak, aby docházelo ke statisticky významnému snížení exprese molekuly CD28 [9].

V případě karcinomu prsu byly nalezeny i rozdíly na základě dalších molekulárně-biologických charakteristik nádoru. Muraro et al. popsal, u HER-2 negativních nádorů zvýšenou přítomnost NK buněk a T regulačních lymfocytů a snížení poměru  $CD4^+/CD8^+$  lymfocytů v periferní krvi u pacientů s Her-2 negativním typem nádoru. [10]. Nám se však nepodařilo zjistit žádných statisticky významných rozdílů ve sledovaných parametrech mezi Her-2 pozitivními a negativními nemocnými.

U pacientů s metastatickým postižením jsou k imunosupresi vedoucí změny vyjádřeny výrazněji, což dokazuje popsané významné snížení  $CD4^+$  T lymfocytů [11] a nárůst počtu T regulačních lymfocytů [12]. Myeloidní i plasmocytoidní DC jsou sniženy, převažují nezralé formy, které jsou čteně funkčně defektní [13]. V souladu s dalšími autory bylo tedy i v našem souboru zaznamenáno relativní snížení  $CD4^+$  T lymfocytů a PDC.

### **Změny v průběhu neoadjuvantní a paliativní léčby**

I přesto, že je chemoterapie považována za významný imunosuprimující faktor, již byla podána řada důkazů o tom, že vykazuje i pozitivní imunogenní vlivy s tumoricidními důsledky.

Předchozí práce u nemocných s karcinomem prsu prezentovala zvýšení absolutního počtu  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$  a  $CD8^+CD28^+$  lymfocytů již po podání jediného cyklu kombinované chemoterapie doxorubicin/paclitaxel [14]. Potvrdili jsme, že tyto nastolené trendy setrvávají po celou dobu fáze AC, kdy jsme zaznamenali signifikantní vzestup relativního počtu subpopulací  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD8^+CD28^+$ ,  $CD3^+CD69^+$  a  $CD8^+CD69^+$  lymfocytů

V průběhu léčby trastuzumabem bylo zaznamenáno zvýšení počtu NK buněk se zvýšenou produkce granzymů ve srovnání s kontrolní skupinou [15], snížení počtu T-regulačních lymfocytů a naopak navýšení produkce IL-17 [16-18].

V našem souboru průběhu druhé fáze neoadjuvantní léčby, kdy byl u HER-2 pozitivních žen v léčebném režimu navíc podáván trastuzumab, docházelo ke zvyšování podílu  $CD8^+CD28^-$  lymfocytů, ke snižování relativního počtu  $CD3^+CD4^+$  lymfocytů a plasmocytoidních dendritických buněk. Snižování relativního počtu T regulačních lymfocytů

v této fázi může mít za následek snížení imunosupresivních tlaků v organismu. Rozdílně se chovaly HER-2 negativní i pozitivní ženy. Zatímco u HER-2 negativních žen nebyly zjištěny významné změny rozložení jednotlivých buněčných supopulací v čase, u HER-2 pozitivních žen bylo naopak pozorováno zvyšování rel. i abs.podílu  $CD8^+CD28^-$  lymfocytů a vzestup aktivačního markeru CD69 se současným poklesem relativního zastoupení T regulačních lymfocytů.

V souladu s dalšími autory jsme zjistili u žen s metastatickým karcinomem prsu léčených paliativní terapií pouze mírnou tendenci k relativnímu i absolutnímu zvýšení podílu  $CD4^+$  a s tím souvisejícího imunoregulačního indexu[19]. Z uvedených faktů vyplývá, že pozitivní imunomodulační působení protinádorové terapie je u nemocných s progresivními stádii onemocnění značně omezeno.

### **Stupeň rekonstituce imunitního systému po 3 letech**

U nemocných, u kterých došlo vlivem léčby k regresi nádoru a léčba byla již ukončena, lze předpokládat imunorestaurační pochody imunitního systému.[20]. V periferní krvi nemocných s anamnézou nádorového onemocnění dlouhodobě přetrvávají nádor-specifické T lymfocyty, které si i řadu let po dosažení remise zachovávají dobrý funkční potenciál [21]. I v našem souboru jsme zaznamenaly tyto tendence, nicméně ani po třech letech nebylo dosaženo shodné rozložení jako u zdravých kontrol.

Při porovnání žen bez progresu po 3 letech se zdravými kontrolami se sice počty  $CD8^+CD28^+$  a  $CD8^+CD28^-$  T lymfocytů již od sebe statisticky významně nelišily, stále však přetrvávalo absolutní i relativní snížení

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T lymfocytů. Dále bylo popsáno, že po ukončení léčby přetrvává ještě několik měsíců snížení počtu a funkce dendritických buněk [22], za 3 roky však již došlo k relativnímu zvýšení jejich počtu. Nález zvýšeného podílu T regulačních lymfocytů je možno chápat jako potenciálně rizikový faktor pro rozvoj event. progresse základního onemocnění [23]. Lze tedy shrnout, že imunorestaurační pochody nebyly ani za tři roky úplné.

### **Korelace CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytů periferní krve, močového neopterinu a rizikových faktorů aterosklerózy**

V souladu s již publikovanými pracemi naše data potvrdila asociaci mezi počtem CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> periferní krve a koncentrací lipidů[24]. Všeobecně je přijímáno, že ateroskleróza představuje zánětlivý proces [25]. V řadě studií je prokázáno, že hodnota CRP predikuje riziko kardiovaskulárních příhod[26]. Obdobná asociace byla pozorována i v případě neopterinu[27]. Získaná data podporují hypotézu, že se na akcentované ateroskleróze může u nemocných s nádory spoluuplatňovat i systémová zánětlivá odpověď spojená s nádorem jako takovým.

Z předchozích studií byla publikována korelace mezi parametry lipidového metabolismu a CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocyty ve vztahu k aterogenezi [6]. Cirkulující CD14 antigen byl nalezen ve zvýšené míře u nemocných s onemocněním koronárních tepen ve srovnání se zdravými kontrolami a navíc pozitivně koreloval s LDL cholesterolem a negativně s HDL cholesterolem [28].

Neopterin představuje indikátor aktivity makrofágů. Byla pozorována korelace mezi nízkým počtem či zhoršenou funkcí lymfocytů a dendritických buněk a koncentrací neopterinu[29]. V naší studii nebyla pozorována korelace mezi neopterinem v moči a počtem CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytů

periferní krve či rizikovými faktory aterosklerózy. Jedním z možných ovlivňujících faktorů byl i nízký počet účastníků ve studii.

## **Závěry**

Popsali jsme, že se již v období diagnózy karcinomu prsu statisticky významně od sebe liší rozložení sledovaných lymfocytárních subpopulací v periferní krvi oproti zdravým probandům. Jednalo se především o celkovou lymfopenii a  $CD4^+$  lymfopenii. Přítomny byly i další změny potenciálně přispívající ke snížení protinádorové odpovědi organismu ve formě zvýšeného zastoupení relativního počtu T regulačních lymfocytů a snížení exprese povrchové molekuly  $CD69^+$ . V našem souboru jsme nenalezli statisticky významné rozdíly mezi ženami s, či bez exprese nádorového antigenu HER-2.

Potvrdili jsme, že u žen s metastatickým postižením, byly tyto změny vyjádřeny intenzivněji, zejména dalším prohloubením  $CD4^+$  lymfopenie, snížení relativního počtu plasmocytoidních dendritických buněk a snížení exprese molekuly  $CD28$  na periferních lymfocytech.

V průběhu podávání léčby docházelo v čase k dalšímu vývoji rozložení sledovaných buněčných subpopulací. U žen s podávanou neoadjuvantní léčbou docházelo v první části léčby k potenciálně pozitivním změnám ve formě zvyšování zastoupení  $CD3^+$  T lymfocytů se zvýšenou povrchovou expresí molekul  $CD8$ ,  $CD28$  a  $CD69$  v periferní krvi a snížení počtu T-regulačních lymfocytů. Nepozorovali jsme však zmírnění  $CD4$  lymfopenie, charakteristického znaku nemocných s nádory. Stejně tak zvýšení exprese molekuly  $CD28$  bylo pouze přechodné a provázelo jen první část neoadjuvantní léčby.

U žen s metastatickým postižením nebyly až na mírnou tendenci ke zvyšování relativního i absolutního počtu CD4<sup>+</sup> lymfocytů zaznamenány statisticky významné změny v čase. Výsledky však vykazují nižší sílu, protože se jednalo o poměrně malou skupinu pacientů s vysokým rozptylem získaných hodnot.

Ve skupině žen s nově diagnostikovaným karcinomem prsu, u kterých bylo dosaženo remise onemocnění, nedošlo ani po třech letech k plnému vyrovnání nálezů vůči zdravým kontrolám. I nadále přetrvávalo snížení počtu CD4<sup>+</sup> T lymfocytů v periferní krvi, snížení exprese molekuly CD28 a zvýšené zastoupení T regulačních lymfocytů. Z toho lze usuzovat, že změny navozené přítomností nádoru a podávané léčby jsou dlouhodobého charakteru.

V poslední části práce byla popsána asociace mezi počtem CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytů periferní krve a lipidovým metabolismem u nemocných s karcinomem prsu. Zánětlivá odpověď organismu vede ke zvýšení CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytů. Data otevírají možnost, že systémová zánětlivá odpověď spojená s nádorem může být zahrnuta v procesu aterogeneze u těchto nemocných. Nebyla však pozorována žádná korelace mezi počtem CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytů periferní krve a koncentrací neopterinu v moči.

## Seznam literatury

- [1] Ge Y, Domschke C, Stoiber N, et al. Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol Immunother* 2012 Mar;61(3):353-62.



- [2] Panis C, Lemos LG, Victorino VJ, et al. Immunological effects of taxol and adryamicin in breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2012 Apr;61(4):481-8.
- [3] Santos RV, Caperuto EC, de Mello MT, Rosa LF. Effect of doxorubicin on cytokine production by lymphocytes and the Th1/Th2 balance. *Biomed Pharmacother* 2010 Oct;64(8):579-81.
- [4] Huddart RA, Norman A, Shahidi M, et al. Cardiovascular disease as a long-term complication of treatment for testicular cancer. *J Clin Oncol* 2003 Apr 15;21(8):1513-23.
- [5] Meinardi MT, Gietema JA, van der Graaf WT, et al. Cardiovascular morbidity in long-term survivors of metastatic testicular cancer. *J Clin Oncol* 2000 Apr;18(8):1725-32.
- [6] Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, et al. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 Dec;16(12):1437-47.
- [7] Ridker PM. Novel risk factors and markers for coronary disease. *Adv Intern Med* 2000;45:391-418.
- [8] Caras I, Grigorescu A, Stavaru C, et al. Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2004 Dec;53(12):1146-52.

- [9] Vivar N, Ruffin N, Sammicheli S, Hejdeman B, Rethi B, Chiodi F. Survival and proliferation of. *J Infect Dis* 2011 Jun 1;203(11):1658-67.
- [10] Muraro E, Martorelli D, Turchet E, et al. A different immunologic profile characterizes patients with HER-2-overexpressing and HER-2-negative locally advanced breast cancer: implications for immune-based therapies. *Breast Cancer Res* 2011;13(6):R117.
- [11] Melichar B, Touskova M, Solichova D, Kralickova P, Kopecky G. CD4+ T-lymphocytopenia and systemic immune activation in patients with primary and secondary liver tumours. *Scand J Clin Lab Invest* 2001;61(5):363-70.
- [12] Rech AJ, Mick R, Kaplan DE, Chang KM, Domchek SM, Vonderheide RH. Homeostasis of peripheral FoxP3(+) CD4 (+) regulatory T cells in patients with early and late stage breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2010 Apr;59(4):599-607.
- [13] Bennaceur K, Chapman J, Brikci-Nigassa L, Sanhadji K, Touraine JL, Portoukalian J. Dendritic cells dysfunction in tumour environment. *Cancer Lett* 2008 Dec 18;272(2):186-96.
- [14] Melichar B, Touskova M, Dvorak J, Jandik P, Kopecky O. The peripheral blood leukocyte phenotype in patients with breast cancer: effect of doxorubicin/paclitaxel combination chemotherapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001 May;23(2):163-73.

- [15] Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* 2006 Jan 30;94(2):259-67.
- [16] Horlock C, Stott B, Dyson PJ, et al. The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2009 Apr 7;100(7):1061-7.
- [17] Perez SA, Karamouzis MV, Skarlos DV, et al. CD4+CD25+ regulatory T-cell frequency in HER-2/neu (HER)-positive and HER-negative advanced-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007 May 1;13(9):2714-21.
- [18] Slavina EG, Chertkova AI, Zabortina TN, Gan'shina IP, Lichinitser MR. Variations in the number of regulatory T cells (CD4+CD25+) in patients with breast cancer during herceptin therapy. *Bull Exp Biol Med* 2006 Mar;141(3):361-3.
- [19] Recchia F, Sica G, Candeloro G, et al. Maintenance immunotherapy in metastatic breast cancer. *Oncol Rep* 2008 Nov;20(5):1173-9.
- [20] Kang DH, Weaver MT, Park NJ, Smith B, McArdle T, Carpenter J. Significant impairment in immune recovery after cancer treatment. *Nurs Res* 2009 Mar;58(2):105-14.
- [21] Hadrup SR, Gehl J, Sorensen RB, Geertsen PF, Straten PT, Andersen MH. Persistence of survivin

specific T cells for seven years in a melanoma patient during complete remission. *Cancer Biol Ther* 2006 May;5(5):480-2.

- [22] Pinzon-Charry A, Ho CS, Maxwell T, et al. Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *Br J Cancer* 2007 Nov 5;97(9):1251-9.
- [23] Mozaffari F, Lindemalm C, Choudhury A, et al. Systemic immune effects of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide and/or radiotherapy in breast cancer: a longitudinal study. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Jan;58(1):111-20.
- [24] Huang ZS, Chiang BL. Correlation between serum lipid profiles and the ratio and count of the CD16+ monocyte subset in peripheral blood of apparently healthy adults. *J Formos Med Assoc* 2002 Jan;101(1):11-7.
- [25] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005 Apr 21;352(16):1685-95.
- [26] Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002 Nov 14;347(20):1557-65.
- [27] Grammer TB, Fuchs D, Boehm BO, Winkelmann BR, Maerz W. Neopterin as a predictor of total and

cardiovascular mortality in individuals undergoing angiography in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Clin Chem* 2009 Jun;55(6):1135-46.

- [28] Masuda M, Miyoshi H, Kobatake S, et al. Increased soluble FcγRIIIa(Mφ) in plasma from patients with coronary artery diseases. *Atherosclerosis* 2006 Oct;188(2):377-83.
- [29] Melichar B, Tuskova M, Solichova D, Kralickova P, Kopecky G. CD4+ T-lymphocytopenia and systemic immune activation in patients with primary and secondary liver tumours. *Scand J Clin Lab Invest* 2001;61(5):363-70.

### **Seznam publikační aktivity:**

#### **Kapitola v monografii**

**KRÁLÍČKOVÁ**, Pavlína. Angioedém. *Angiologie*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2014, s. 22-26. Lékařské repetitorium, sv. č. 10. ISBN 978-80-7387-716-3.

#### **Původní práce s IF**

**1. KRÁLÍČKOVÁ**, Pavlína, Bohuslav MELICHAR, F. MALÍŘ a T. ROUBAL. Renal Tubular Dysfunction and Urinary Zinc Excretion in Breast Cancer Patients Treated with Anthracycline-based Combination Chemotherapy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 2004, **23**(4), 579-584. ISSN 0392-9078. \*IF=0.607; SCI=3  
\* Hodnota IF je z roku publikování článku, od roku 2008 je časopis evidován v databázi JCR pod jiným ISSN s IF=3.066

**2. KRÁLÍČKOVÁ**, Pavlína, Hana KALÁBOVÁ, Lenka KRČMOVÁ, Markéta KAŠPAROVÁ, Jiří PLÍŠEK, Leoš UNGERMANN, Doris VOKURKOVÁ, Radomír HYŠPLER, Miroslav PECKA, Vlastislav ŠRÁMEK, Hana ŠTUDENTOVÁ, Michaela ZEZULOVÁ, Dagmar SOLICHOVÁ a Bohuslav MELICHAR. Correlation of peripheral blood CD14+CD16+ monocytes, urinary neopterin and the risk factors of atherosclerosis in patients with breast carcinoma. *Pteridines*, 2011, **22**(3), 66-72. ISSN 0933-4807. IF=0.520; SCI=3

**3. KRÁLÍČKOVÁ**, Pavlína, Eva MALÁ, Doris VOKURKOVÁ, Irena KRČMOVÁ, Lenka PLÍŠKOVÁ, Vlasta ŠTĚPÁNOVÁ, Vladimír BARTOŠ, Vladimír KOBLÍŽEK, Ilja TACHECÍ, Jan BUREŠ, Jan BROŽÍK a Jiří LITZMAN. Cytomegalovirus Disease in Patients with Common Variable Immunodeficiency: Three Case Reports. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2014, **163**(1), 69-74. ISSN 1018-2438 IF=2.248; SCI=0

4. MELICHAR, Bohuslav, Miroslava TOUŠKOVÁ, Dagmar SOLICHOVÁ, Pavlína KRÁLÍČKOVÁ a Otakar KOPECKÝ. CD4+ T-lymphocytopenia and systemic immune activation in patients with primary and secondary liver tumours. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2001, **61**(5), 363-370. ISSN 0036-5513. IF=1.294; SCI=32

5. MELICHAR, Bohuslav, Pavel KOHOUT, Miluše BRÁTOVÁ, Dagmar SOLICHOVÁ, Pavlína KRÁLÍČKOVÁ a Zdeněk ZADÁK. Intestinal permeability in patients with chemotherapy-induced stomatitis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2001, **127**(5), 314-

318. ISSN 0171-5216. IF=2.914; SCI=26

6. MELICHAR, Bohuslav, Pavlína KRÁLÍČKOVÁ, Radomír HYŠPLER, Hana KALÁBOVÁ, Jaroslav CERMÁN, Petra HOLEČKOVÁ, Hana STUDENTOVÁ a Eva MALÍŘOVÁ. Hypomagnesaemia in patients with metastatic colorectal carcinoma treated with cetuximab. *Hepato-Gastroenterology*, 2012, **59**(114), 366-371. ISSN 0172-6390. IF=0.774; SCI=2

### **Původní práce bez IF**

NOVOSAD, Jakub, Irena KRČMOVÁ, Magda KLEIBEROVÁ a Pavlína KRÁLÍČKOVÁ, Pavlína. Principy měření oxidu dusnatého ve vydechaném vzduchu, srovnání dvou přístrojů pro elektrochemickou analýzu. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL*, 2009, **6**(4), 13-18. ISSN 1802-0518.

### **Letter to editor s IF**

BELADA, David, Lukáš SMOLEJ, Pavla ŠTĚPÁNKOVÁ, Pavlína KRÁLÍČKOVÁ a Tomáš FREIBERGER. Diffuse large B-cell lymphoma in a patient with hyper-IgE syndrome: successful treatment with risk-adapted rituximab-based immunochemotherapy. *Leukemia Research*, 2010, **34**(9), E232-E234. ISSN 0145-2126. IF= 2.764; SCI=3

### **Přehledové články**

1. DVOŘÁK Josef, Pavel JANDÍK, Bohuslav MELICHAR, Ivana HRNČÍŘOVÁ, Jiří PETERA, Jindřiška MERGANCOVÁ a Pavlína KRÁLÍČKOVÁ. Chemoprevence karcinomu prsu. *Lékařské zprávy LF UK Hradec Králové* 2000, **45**(3-4). 71-77. ISSN 0457-4206.

**2. KRÁLÍČKOVÁ** Pavlína, Irena KRČMOVÁ a Jan KREJSEK. Imunoglobulinová substituční léčba u nemocných s primárními imunodeficity. *Praktický lékař*, 2014, 94(1), 10-15. ISSN 0032-6739.

**3. KRÁLÍČKOVÁ**, Pavlína, Eva MALÁ, Pavel ROZSÍVAL, Jana KRTIČKOVÁ a Irena KRČMOVÁ. Bradykininem indukovaný angioedém a jeho diferenciální diagnostika. *Praktický lékař*, 2012, **92**(7), 378-382. ISSN 0032-6739.

**4. KRÁLÍČKOVÁ**, Pavlína, Irena KRČMOVÁ a Jan KREJSEK. Protilátkové imunodeficeience. *Postgraduální medicína*, 2012, **14**(9), 980-988. ISSN 1212-4184.

**5. KRÁLÍČKOVÁ**, Pavlína, Jan KREJSEK a Irena KRČMOVÁ. Biologická léčba v onkologii II - monoklonální protilátky, cytokiny. *Praktický lékař*, 2011, **91**(5), 258-262. ISSN 0032-6739.

**6. KRÁLÍČKOVÁ**, Pavlína, Jan KREJSEK a Irena KRČMOVÁ. Biologická léčba v onkologie I. *Praktický lékař*, 2011, **91**(4), 189-192. ISSN 0032-6739.

7. ROZSÍVAL, Pavel, Eva PAŘÍZKOVÁ a Pavlína KRÁLÍČKOVÁ. Primární imunodeficity u dětí, současné možnosti léčby. *Pediatric pro praxi*, 2012, **13**(3), 149-152. ISSN 1213-0494.

### **Kazuistiky**

**1. KRÁLÍČKOVÁ**, Pavlína, Eva BUREŠOVÁ, Tomáš FREIBERGER a Ilja TACHECÍ. Hereditární angioedém - opomíjená diagnóza. *Vnitřní lékařství*, 2010, **56**(9), 927-931.



ISSN 0042-773X.

**2. KRÁLÍČKOVÁ** Pavlína, Eva BUREŠOVÁ, Jan KREJSEK a Irena KRČMOVÁ. Atypická koincidence hereditárního angioedému, systémového lupus erythematoses a karcinomu jazyka. *Otorinolaryngologie a foniatrie*, 2011, **60**(3), 163-168. ISSN 1210-7867.

**3. KRÁLÍČKOVÁ** Pavlína, Irena KRČMOVÁ a Doris VOKURKOVÁ. Hyper IgE syndrom. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL*, 2009, **6**(3), 24-28. ISSN 1802-0518.

**4. KRÁLÍČKOVÁ** Pavlína, Radovan SLEZÁK, Milan VOŠMIK, Petra MALÁ, Helena HORNYCHOVÁ, J BROŽÍK a Bohuslav MELICHAR. Goodův syndrom (s thymomem spojená hypogamaglobulinémie) – 2 kazuistiky. *Vnitřní lékařství*, 2012, **58**(2), 154-161. ISSN 0042-773X.

**5. KRÁLÍČKOVÁ**, Pavlína, Lukáš SMOLEJ, Vít ŘEHÁČEK a Irena KRČMOVÁ. Sekundární urtikárie a nemoc chladových aglutininů jako komplikace infekce způsobené *Mycoplasma pneumoniae*. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL*, 2010, **7**(3), 4-7. ISSN 1802-0518.

**6. KRTIČKOVÁ**, Jana, Lenka RYŠKOVÁ, Pavlína KRÁLÍČKOVÁ, Josef SCHARFEN, Jana DĚDKOVÁ a Petra VÍTKOVÁ, Petra. *Nocardia* abscessus – neobvyklý původce zánětu nosu. *Otorinolaryngologie a foniatrie*, 2013, **62**(3), 126-131. ISSN 1210-7867.

**Přednášky v anglickém jazyce (5):**

From autoimmunity to the immunodeficiency – regression of SLE activity after development of CVID. European Society for Immunodeficiencies (ESID) Prague Spring Meeting, 13-14 May 2013

Rapid push technique- a new progressive option for immunoglobulin replacement therapy in Central Europe. Immunodeficiency in Physician and Nurse Practice - Rapid Push Technique - Convenience and Comfort" Warsaw on 4<sup>th</sup> April 2013

Thymoma associated hypogammaglobulinaemia and oral lichen planus (case report). ESID Prague Spring Meeting, 14-15 May 2012

Does MBL deficiency modify hyper IgE syndrom? ESID Prague Spring Meeting, 9-10 May 2011

CMV pneumonitis in CVID. ESID Prague Spring Meeting, 10-11 May 2010

**Přednášky v českém jazyce - odborné akce, sjezdy a semináře v rámci ČR (v oborech imunologie, alergologie, onkologie a hematologie) : 28**

Mutace v oblasti GATA2. Hematologický seminář. Hradec Králové, 5/2014

Humorální imunodeficiency u SLE. Pracovní schůze ČSAKI Praha 4/2014 a Sdělení z klinické praxe, regionální seminář. Hradec Králové 2/2014

Substituční léčba imunoglobuliny. Seminář zdravotních sester ÚKIA FN Hradec Králové, říjen 2013

Humorální imunodeficiencie u nemocných se systémovým lupusem erythematosum. XXX. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů s mezinárodní účastí, Bratislava, Slovenská republika, 10/2013

Substituční léčba imunoglobuliny - kudy vede cesta. XXIII. Severočeská imunologická konference, Ústí nad Labem, 9/2013

Pneumopatie u nemocných s běžnou variabilní imunodeficiencí. Regionální seminář, primární imunodeficiencie, Klimkovice 5/2013

Rekurující horečka v klinické praxi. Regionální seminář. Kazuistická sdělení z klinické praxe. Hradec Králové 3/2013

Hereditární angioedém – aspekty dětského věku. XIV. Hradecké pediatrické dny, Hradec Králové 11/2012

Oportunní infekce u nemocných s běžnou variabilní imunodeficiencí (CVID) XXIX. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů s mezinárodní účastí, Liberec, Česká republika, 10/2012

Vakcinační potenciál pacientů s CVID proti sezonní chřipce. XXII. Severočeská imunologická konference, Ústí nad Labem, 9/2012

Diferenciální diagnostika otoků hrtanu z pohledu alergologa a klinického imunologa. Symposium Hlas, Hradec Králové, 4/2012

Nesnadná cesta pacienta k diagnóze primární vaskulitidy (Churg-Straussův syndrom).  
Kazuistická sdělení z klinické praxe. Hradec Králové 1/2012

Pneumopatie u dětí a dospělých léčených pro běžnou variabilní imunodeficienci. Mezioborová imunologická konference, Třeboň, 10/2011

Recidivující CMV pneumonitis a atypická mykobakteriíza jako vzácné komplikace u pacientky s CVID. XXI. Severočeská imunologická konference, Ústí nad Labem, 9/2011

Nesnadný život pacientů s dg. hereditárního angioedému – kazuistiky. Společný regionální seminář klinická imunologie, alergologie a ORL. Hradec Králové, 9/2011

Castelmannova choroba komplikovaná mnohočetnými autoimunitními projevy. Pracovní schůze ČSAKI, Praha, 4/2011

Goodův syndrom a další onemocnění asociovaná s thymomem. Klinická sdělení z klinické praxe. Hradec Králové 1/2011

CMV pneumonitis u pacienta s CVID.  
Kazuistická sdělení z klinické praxe. Regionální seminář. Hradec Králové 1/2010

Sekundární urtikárie - kazuistika  
Kazuistická sdělení z klinické praxe. Regionální seminář. Hradec Králové 1/2009

Hyper IgE syndrom. Kazuistická sdělení z klinické praxe. Regionální seminář. Hradec Králové 1/2008, Pracovní schůze ČSAKI 4/2008, Regionální seminář pneumologů, Deštné v Orlických horách, 6/2008

Akutní leukemie. Seminář pro zdravotní sestry, ÚKIA FN HK, 11/ 2007

Atypická mykobakteriosa u nemocné s Hodgkinovým lymfomem. Regionální hematologický seminář. Hradec Králové, 11/2000

Nefrotoxicita chemoterapie a biologické terapie, Hematologický seminář. Hradec Králové 9/2000

Autologní transplantace kostní dřeně u nemocného s primární amyloidosou. Hematologicko-patologická konference, Hradec Králové, 1999

Opakující se trombotická trombocytopenická purpura v těhotenství. Hematologický seminář. Hradec Králové, 1997

**První autor posterů na mezinárodních sjezdech: 8**

**Ocenění: Časopis *Pteridines*, Best-Paper-Award 2011 for Young First Author Scientist za článek:**

Correlation of peripheral blood CD14+CD16+ monocytes, urinary neopterin and the risk factors of atherosclerosis in patients with breast carcinoma. *Pteridines*, 2011, 22(3), 66-72.

