

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka

**Vliv nádorového mikroprostředí, buněčné a humorální imunity
na patogenezi nádorových onemocnění**

**(Influence of tumor microenvironment, cellular and humoral immunity
on cancer pathogenesis)**

MUDr. Jan Špaček

Praha 2020

Školitel: doc. MUDr. Eva Zavadová CSc.

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný CSc.

Školící pracoviště: Onkologická klinika 1. LF UK a VFN

Školitel: doc. MUDr. Eva Zavadová CSc.

Konzultant: prof. MUDr. Luboš Petruželka CSc.

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

ÚVOD.....	3
1 VÝCHODISKA A CÍLE PRÁCE	4
1.1 Hypotéza.....	4
1.2 Cíle	4
1.3 Budoucí cíle	4
2 METODIKA	5
2.1 Skupiny pacientů	5
2.2 Laboratorní metody.....	6
2.2.1 Vyšetření plazmy onkologických pacientů	6
2.2.2 Vyšetření nádorového mikroprostředí	8
3 VÝSLEDKY.....	9
3.1 Výsledky vyšetření pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem (soubor č.1).....	9
3.2 Výsledky vyšetřování pacientek s karcinomem prsu (soubor č.2)	11
3.3 Výsledky projektu Immunoscore (soubor č.3)	12
4 DISKUZE	14
5 ZÁVĚR.....	20
6 VÝBĚR Z POUŽITÉ LITERATURY	20

ÚVOD

Podání onkologické specifické léčby nesprávně vybranému nemocnému může vést ke zbytečným nežádoucím účinkům u pacientů s nízkou pravděpodobností léčebného efektu, dále k promeškání času pro podání správné léčby a k neefektivnímu užívání finančních zdrojů. Pro smysluplné a efektivní podání cílené terapie u řady léků stále chybějí spolehlivé prediktory účinnosti. Jejich identifikace je proto předmětem intenzivního klinického výzkumu. V poslední době nepřehlédnutelnou skupinou nových léků z kategorie protinádorové imunoterapie jsou protilátky proti inhibičním molekulám imunologické synapse (CTLA-4 a PD-1/PD-L1), které přinášejí novou naději i značně předlčeným pacientům napříč onkologickými diagnózami. S jejich nástupem nabývá na významu poznání fundamentálních vztahů mezi jednotlivými subpopulacemi buněk imunitního systému a cytokinových poměrů nádorového mikroprostředí i studium chování nádorových buněk a imunitního systému obecně. Protilátky vůči výše jmenovaným receptorům se již klinicky osvědčily v řadě onkologických diagnóz (zejména u maligního melanomu, nemalobuněčných karcinomů plic, renálního karcinomu, karcinomu prsu atd.). Na rozdíl od těchto diagnóz jsou však klinické studie s těmito preparáty u pacientů s kolorektálním karcinomem zatím pouze ve fázích I. až III. Vzhledem k velmi specifickému mechanismu protinádorového působení těchto protilátek cestou odblokování efektorových buněk imunitního systému je nutné počítat s tím, že odpověď na léčbu přichází s delším časovým odstupem od podání, než na jaký jsme zvyklí při konvenční terapii. Rovněž nežádoucí účinky jsou jiné než u běžné onkologické terapie a jsou způsobeny nadměrnou aktivitou imunitního systému (autoimunitní nežádoucí účinky). K nejčastěji postiženým orgánům patří kůže (vyrážka se svěděním nebo bez, eventuálně až puchýře) a gastrointestinální trakt (průjmy). Dalšími nežádoucími účinky mohou být poškození jater (což může vést až k jaternímu selhávání s ikterem) nebo zánětlivé postižení očí či žláz s vnitřní sekrecí (zánět hypofýzy, nadledvin a štítné žlázy). S rozvojem moderní imunoterapie bylo nutné upravit i kritéria pro hodnocení výsledků terapie, protože se ukazuje, že k odpovědi dochází s delším odstupem po zahájení terapie ve srovnání s klasickou chemoterapií, jak bylo napsáno již výše. Hlubší poznání imunitního systému přineslo v posledních letech řadu novinek jak v terapii maligních onemocnění, tak v predikci prognózy onkologických pacientů s kolorektálním karcinomem či karcinomem prsu. Hodnocení množství a konkrétního typu tumor infiltrujících lymfocytů se zdá být vhodným doplněním standardní TNM klasifikace nádorových onemocnění, a to zejména při rozhodování o adjuvantní terapii. Multicentrický projekt Immunoscore, zkoumající infiltrace CD3+ a CD8+ T lymfocytů v centru a v invazivním okraji tumoru za pomoci počítačového softwaru, jehož byl náš tým spoluřešitelem, potvrdil klinický význam tohoto postupu. Imunologické vyšetření a monitorování imunitního stavu onkologických

pacientů by proto měly být součástí standardní péče, zvláště při možnosti nasazení moderní imunoterapie.

1 VÝCHODISKA A CÍLE PRÁCE

1.1 Hypotéza

1. Pacienti se solidními tumory mají zvýšené koncentrace imunosupresivních cytokinů TGF- β a VEGF v plazmě, což může následně způsobovat defekty v jejich protinádorové imunitě.
2. Přítomnost některých subpopulací T lymfocytů (CD8+) v nádorové tkáni a jejím okolí tvoří přirozenou ochranu organismu a snižuje pravděpodobnost tvorby metastáz primárním tumorem.

1.2 Cíle

1. Vyšetření plazmatických koncentrací TGF- β a VEGF u onkologických pacientů se solidním nádorem a srovnání se zdravými jedinci.
2. Vyšetření protinádorové buněčné (CD8+, CD4+, CD19+ lymfocytů a NK buněk) a humorální (IgG, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) imunity u onkologických pacientů se solidním nádorem a srovnání se zdravými jedinci z periferní krve.
3. Hodnocení přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů v centru nádoru a takzvaném invazivním lemu na přechodu zdravé a nádorové tkáně metodou Immunoscore.

1.3 Budoucí cíle

Stav imunitního systému u onkologických pacientů koreluje s odpovědí na léčbu, rychlostí progresu onemocnění a s jeho prognózou. Potvrdí-li se tato hypotéza, pak bude možno:

1. Provádět přesnější klasifikaci nádorových onemocnění doplňující současnou TNM klasifikaci se stanovením rizikových skupin pacientů.
2. Zvolit adekvátní léčebný postup, tj. agresivnější u pacientů s nepříznivými imunologickými parametry (míra infiltrace tumoru specifickými populacemi buněk, změny nebo poruchy buněčné protinádorové imunity, vyšší koncentrace imunosupresivních cytokinů).
3. Monitorovat úspěšnost aplikované terapie, respektive ověřovat účinnost aplikované léčby.

4. Kombinovat současnou standardní terapii s nespecifickou imunoterapií (stimulace protinádorové buněčné imunity, stimulace antigen prezentujících buněk, stimulace NK buněk, suprese T regulačních lymfocytů), nebo cílené potlačení nadprodukce VEGF i TGF monoklonálními protilátkami.

2 METODIKA

2.1 Skupiny pacientů

Soubor č. 1

Pacienti s lokalizovaným kolorektálním karcinomem

Mezi lednem 2014 a prosincem 2016 bylo na Onkologické klinice VFN a 1. LF UK zařazeno do projektu imunologických vyšetření pacientů se solidními tumory 23 pacientů s kolorektálním karcinomem II. a III. klinického stadia. Pacienti neměli ve své osobní anamnéze žádné jiné onkologické onemocnění nebo závažné komorbidity. Všichni byli léčeni podle národních doporučení (FÍNEK, J. et al., 2017). Jejich základní klinické a patologické charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 2. Všichni vstupně podstoupili imunologické vyšetření klinickým imunologem k vyloučení potenciální imunodeficiency nebo autoimunitní choroby a byly jim odebrány a zamraženy vzorky séra. Kontrolní skupinu tvořilo 25 zdravých jedinců.

Soubor č. 2

Skupina pacientů s karcinomem prsu

V letech 2010 až 2012 bylo na Onkologické klinice 1 LF. UK a VFN sledováno a léčeno 68 pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu, u kterých se vyvinula rezistence na hormonální terapii. Všechny pacientky byly v době odběru vzorku krve pro imunologická vyšetření nejméně 2 roky bez chemoterapie. V první linii hormonální terapie bylo 53 žen léčeno tamoxifenem, 14 s nesteroidním inhibítor aromatázy a 1 pacientka steroidním inhibítor exemestanem. Pacientky byly hodnoceny klinickým imunologem, aby se vyloučily imunitní poruchy, jako je alergie, autoimunita nebo imunodeficiency. Kontrolní skupinu tvořilo 48 zdravých žen s normálním laboratorním výsledkem v buněčné i humorální imunitě s mediánem věku 53 let. Postmenopauzálních žen bylo v kontrolní skupině 39 a 9 jich bylo premenopauzálních. U všech pacientek zařazených do výzkumného projektu bylo provedeno komplexní onkologické vyšetření a byl sledován průběh léčby.

Soubor č. 3

Skupina pacientů s kolorektálním karcinomem vyšetřena metodou Immunoscore

Naše pracoviště bylo zapojeno do multicentrického projektu hodnotícího prognostický význam imunitních buněk v nádorovém mikroprostředí u lokálně pokročilých kolorektálních karcinomů. Od roku 2013 mezinárodní konsorcium 14 onkologických center ve 13 zemích, vedené Společností pro imunoterapii nádorových onemocnění, hodnotilo metodu Immunoscore u pacientů s lokálně pokročilým karcinomem tlustého střeva klasifikovaných dle TNM jako klinické stadium I.-III. Celkem bylo zpracováno 3 539 vzorků nádorové tkáně. Z našeho pracoviště bylo autorem této práce zpracováno 250 vzorků nádorové tkáně. Vzorky nádorů od 3 539 pacientů s odoperovaným karcinomem tlustého střeva klinického stadia I.-III. byly shromážděny mezi lety 2013 až 2015 a statistická data byla získána mezi lety 2013 a 2016. Po kontrole kvality biomarkerů bylo vyřazeno 357 pacientů a po klinické kontrole kvality údajů bylo vyloučeno dalších 577 pacientů. Vzorky od 2681 pacientů byly zahrnuty do analýz (700 pacientů v tréninkovém souboru, 636 pacientů v interním validačním souboru a 1 345 pacientů v externím validačním souboru). Pacienti byli zařazeni do výcvikové skupiny, interní nebo externí validační skupiny formou nahodilého výběru.

2.2 Laboratorní metody

2.2.1 Vyšetření plazmy onkologických pacientů

Pacienti souboru č. 1 a č. 2 byli vyšetřeni klinickým imunologem k vyloučení poruchy imunity autoimunitního či alergického původu nebo imunodeficience. Složky buněčné imunity se u pacientů vyšetřovaly z nesrážlivé krve pomocí průtokové cytometrie s použitím FITC (fluorescein isothiocyanate) a PE (phycoerythrin) značených monoklonálních protilátek proti CD 16/56+, imunoregulační index CD4+/CD8+ HLA-DR, CD19+ antigenům s použitím příslušných isotypových kontrol. Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru FACSCALIBUR od firmy Becton Dickinson. Pomocí průtokové cytometrie byly dále vyšetřeny povrchové markery T-lymfocytů CD3+, CD4+ a CD8+. Stanovení koncentrace cytokinů TGF- β a VEGF v plazmě bylo provedeno modifikovanou metodou ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay) s použitím lidských monoklonálních protilátek proti TGF- β 1 a VEGF.

ELISA – TGF- β /VEGF

Protilátka proti TGF- β /VEGF se přes noc naváže na jamky mikrotitrační destičky. Po promytí nenavázaného zbytku protilátky se inkubuje destička s blokovacím roztokem s 1% BSA pro zamezení nespecifických vazeb na povrch jamek destičky. Po promytí se aplikují nařaděné vzorky plazmy nebo séra, ze kterých se naváže lidský TGF- β /VEGF na protilátky navázané v jamkách. Po propláchnutí jamek následuje další inkubace, kdy

dochází k navázání detekční biotinylované kuřecí protilátky na lidské TGF- β /VEGF. Po odmytí nenavázané detekční protilátky probíhá inkubace s konjugátem (streptavidin-HRP), který se váže na biotin a po dalším promytí proběhne reakce substrátu s křenovou peroxidázou navázaného konjugátu. Substrát v přítomnosti navázaného konjugátu vytváří modrou barvu. Přidáním kyseliny dochází k zastavení reakce a změně barvy na žlutý konečný produkt. Intenzita žlutého zbarvení se měří fotometricky při 450 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci TGF- β /VEGF přítomného ve vzorku.

Značení povrchových znaků imunitních buněk pro měření průtokovým cytometrem

Buněčná suspenze se označí nejčastěji pomocí monoklonálních protilátek (mAb) s navázanou fluorescenční molekulou (fluorochromem). Molekuly monoklonální protilátky se specificky vážou na antigeny na povrchu nebo uvnitř vyšetřovaných buněk. Suspenze takto označených buněk se vloží do průtokového cytometru, kde je přetlakem stříkána skrz malý otvor (trysku). Tím se vytvoří tenký proud suspenze, v němž letí buňky za sebou (jsou tedy uspořádány jako korálky na niti, neboť pro správnou analýzu není vhodné, aby se dvě buňky ocitly vedle sebe). Tento proud protíná laserový paprsek. Jakákoliv částice v suspenzi způsobí, že laserové světlo se od ní „odrazí“ (tím více, čím je částice více granulovaná) a rozptýlí (tím více, čím je částice větší), což je důsledkem Tyndallova jevu. Jsou-li na částici navázané molekuly fluorochromů, které se mohou použitým laserovým zářením excitovat, následně vyzáří ještě takzvané fluorescenční světlo. Takto probíhá primární získávání dat (akvizice).

Díky současnému použití různých monoklonálních protilátek s různými fluorochromy můžeme vyšetřit současně přítomnost několika antigenů v každé buňce. U každé buňky zaznamenávají detektory 2 optické parametry (Side scatter – SSc, „odražené“ světlo a Forward scatter – FSc, vyjadřující rozptyl do velmi malého dopředného úhlu) a dále ještě obvykle nejméně 2 parametry vyjadřující fluorescenci na různých vlnových délkách. Všechny tyto parametry se zaznamenávají do počítače ve formě matice. Tato matice (zvaná listmode data) se uchovává v počítači pro analýzu. Následná analýza umožňuje hledat vztah mezi libovolnými měřenými parametry. Nejčastěji měřenými parametry je počet buněk exprimujících danou molekulu, příp. více molekul zároveň. Metodika průtokové cytometrie při barvení buněk s fluorescentním barvivem, které je konjugováno s monoklonálními protilátkami, umožňuje určit přítomnost povrchových znaků. Tyto cytoplazmatické znaky jako tzv. diferenciační znaky (Clusters of Differentiation – CD) umožňují určovat specifické buněčné subpopulace – například CD4+ T lymfocyty značené monoklonální protilátkou proti znaku CD4+ na jejich povrchu.

2.2.2 Vyšetření nádorového mikroprostředí

Metoda Immunoscore

Pro analýzu obrazu a kvantifikaci hustoty CD3+ a CD8+ antigenů T lymfocytů v centru nádoru i v jeho invazivním okraji byl použit software digitální patologie. Patologové ze všech zúčastněných center vybrali od každého pacienta jeden nádorový bloček, který obsahoval primární tumor kolorektálního karcinomu. Dva řezy nádorové tkáně šíře 4 μm byly zpracovány pro imunohistochemické vyšetření podle daného protokolu, doporučeného referenčním centrem (v Evropě se jedná o nemocnici Georgette Pompidou, Paříž, Francie). Digitální obrazy obarvených tkáňových řezů byly získány při 20násobném zvětšení a rozlišení 0,45 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Hustoty CD3+ a CD8+ antigenů T lymfocytů v nádorové tkáni a invazivním okraji byly určeny použitím speciálně vyvinutého modulu Immunoscore, který byl začleněn do systému obrazové analýzy a softwaru Developer XD digitální patologie (Definiens, Mnichov, Německo). Byl sledován průměr a rozdělení intenzity zbarvení imunohistochemicky označených T lymfocytů, aby bylo dosaženo vnitřní kvalitní kontroly každého snímku. Hustoty CD3+ a CD8+ T lymfocytů v nádorové tkáni a invazivním lemu byly porovnávány s těmi, jež byly získány v instruktážních ("tréninkových") a validačních skupinách, a byly převedeny na percentily. Byl vypočítán průměr 4 proměnných (dva markery, dvě oblasti), který se převedl do škály zvané Immunoscore.

Ve třístupňové analýze Immunoscore byla definována hustota antigenů T lymfocytů 0-25 % jako nízká, hustota mezi 25 a 70 % byla zaznamenána jako střední a hustota mezi 70 a 100 % jako vysoká. Ve dvoukategoriální Immunoscore analýze byla hustota 0-25 % zaznamenána jako nízká a hustota mezi 25 a 100 % jako střední a vyšší. Biomarkerové referenční centrum optimalizovalo protokoly pro imunohistochemické vyšetření a poslalo je do středisek s řadou kontrolních vzorků. Byla tolerována maximální odchylka intenzity barvení o 20 % (v porovnání se vzorky zaslanými referenčním centrem). Aby bylo dosaženo dobré úrovně konzistence imunohistochemického vyšetření mezi centry, referenční centrum napsalo a každému zúčastněnému centru distribuovalo uživatelskou příručku. Tento manuál popsal model Immunoscore softwaru a ilustroval (s 38 příklady), jak vybrat jednotlivé oblasti tumoru určené ke kvantifikaci T lymfocytů. Model Immunoscore byl k dispozici tak, aby každé centrum mohlo analyzovat svou vlastní skupinu pacientů. Referenční centrum na konci studie validovalo každý případ tak, aby byla zajištěna kvalita a intenzita barvení. Pokud chyběly výsledky z oblasti nádorové tkáně nebo pokud byla intenzita barvení nízká, byly vzorky vyloučeny z analýzy. Stav mikrosatelitové instability (MSI) byl stanoven pro pacienty, od kterých bylo k dispozici dostatečné množství materiálu. Genomová DNA byla extrahována z parafínem zalitého nádorového bločku a stav MSI byl hodnocen molekulárním panelem Bethesda a imunohistochemicky (s použitím protilátek MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2). Pacienti s dysfunkční opravou chybných párů DNA byli označováni za mikrosatelitově

nestabilní (MSI). Vybrané snímky tkáně barvené na CD 3+ a CD 8+ (N=36) z pěti center v Belgii, Kanadě, Číně, Francii a USA (reprezentující celou kohortu) byly analyzovány patologi z osmi různých center. Byla potvrzena reprodukovatelnost stanovení buněčných hustot v každé oblasti nádoru ($r=0,97$ pro nádor; $r=0,97$ pro invazivní okraj; $p < 0,001$). Reprodukovatelnost výsledků a prognostický význam metody Immunoscore byly porovnány se zavedeným vizuálním stanovením hustoty T lymfocytů infiltrujících nádory přímo v nádorové tkáni barvené hematoxylinem a eozinem. Za tímto účelem bylo určeno 11 pozorovatelů a hodnoceno 268 reprezentativních případů z tréninkové kohorty. Pouze ve 4 % případů zde byla nalezena shoda mezi všemi pozorovateli a naproti tomu úplná absence shody se projevila v 45 % případů, zatímco při použití metody Immunoscore bylo dosaženo 88% shody mezi pozorovateli. V 48 % případů pak byl zjištěn nesoulad ve výsledcích stanovení lymfocytárních infiltrátů metodou Immunoscore a hustotou TILs stanovenou vizuálním hodnocením. Obecně byla kvantifikace lymfocytárních infiltrátů metodou Immunoscore vysoce standardizovaná, reprodukovatelná a spolehlivá.

3 VÝSLEDKY

3.1 Výsledky vyšetření pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem (soubor č.1)

Sérové koncentrace TGF- β a VEGF pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem

Sérová koncentrace TGF- β ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem (N=23) byla $19,5 \pm 2,3$ ng/ml (průměr, standardní odchylka) a byla signifikantně zvýšena ve srovnání s koncentrací $4,9 \pm 0,5$ ng/ml ve zdravé kontrolní skupině (N=25) ($p < 0,001$). Ve skupině s kolorektálním karcinomem nebyl významný rozdíl v koncentracích mezi pohlavím (muži vs. ženy), věkovými skupinami (do 60 let a více než 60 let v době diagnózy), částí tlustého střeva postižené primárním nádorem (levá strana, pravá strana a konečník) nebo klinickým stadiem (stadium I. a II. vs. III.). Mezi pacienty ve stadiu II. (N=13) a stadiem III. (N=10) nebyl statisticky významný rozdíl ($21,2 \pm 3,8$ ng/ml a $17,3 \pm 2,1$ ng/ml, $p = 0,828$). Je však důležité zdůraznit nízký počet pacientů v obou skupinách.

Sérová koncentrace VEGF ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem (N=23) byla $68,0 \pm 11,6$ pg/ml (průměr, standardní odchylka) a byla významně zvýšena ve srovnání se $17,5 \pm 2,2$ pg/ml ve zdravé kontrolní skupině (N=25) ($p < 0,001$). Ve skupině s kolorektálním karcinomem nebyl v plazmatických koncentracích VEGF žádný významný rozdíl pohlavími (muži vs. ženy), částí tlustého střeva postižené primárním nádorem (levá strana, pravá strana a konečník) nebo klinickým stádiem nádoru (stadium I. a II. vs. III.). U pacientů mladších 60 let ve srovnání s pacienty staršími více než 60 let v době diagnózy byl statisticky významný

rozdíl v sérových hladinách VEGF ($p = 0,049$). Mezi pacienty ve stadiu II. ($N=13$) a stadiem III. ($N=10$) nebyl statisticky významný rozdíl ($64,0 \pm 12,8$ pg/ml (průměr, standardní odchylka) a $73,1 \pm 20,5$ ng/ml; $p=0,975$).

Ve zdravé kontrolní skupině nebyl významný rozdíl v sérových koncentracích TGF- β a VEGF mezi pohlavími (muži vs. ženy) a věkovými skupinami (do 60 let a více než 60 let).

Vyšetření buněčné imunity pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem

Absolutní počet periferních CD4+ T lymfocytů ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem ($N=23$) byl $0,65 \pm 0,62 \times 10^9/l$ a byl významně snížen ve srovnání s $0,95 \pm 0,5 \times 10^9/l$ ve zdravé kontrolní skupině ($N=25$) ($p=0,002$). Ve skupině s kolorektálním karcinomem nebyl žádný významný rozdíl mezi pohlavími (muži vs. ženy), věkem (do 60 let a více než 60 let v době diagnózy), částí tlustého střeva postižené primárním nádorem (levý tračník, pravý tračník a konečník) nebo klinickým stadiem (stadium I. a II. vs. III.). Mezi pacienty v klinickém stadiu II. ($N=13$) a ve stadiu III. ($N=10$) nebyl statisticky významný rozdíl v CD4+ lymfocytech ($0,69 \pm 0,10 \times 10^9/l$ a $0,61 \pm 0,07 \times 10^9/l$; $p = 0,877$).

Absolutní počet periferních CD8+ T lymfocytů ve skupině s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem ($N=23$) byl $0,39 \pm 0,04 \times 10^9/l$ a byl významně snížen ve srovnání s $0,58 \pm 0,05 \times 10^9/l$ ve zdravé kontrolní skupině ($N = 25$) ($p = 0,0240$). Ve skupině pacientů s karcinomem nebyl žádný významný rozdíl mezi věkem (do 60 let a více než 60 let v době diagnózy), částí tlustého střeva postižené primárním nádorem (levý tračník, pravý tračník a konečník) nebo klinickým stadiem nádoru (I. a II. vs. III.). U mužů byl rozdíl v sérových hladinách CD8+ lymfocytů oproti ženám ($0,48 \pm 0,05 \times 10^9/l$ oproti $0,33 \pm 0,05 \times 10^9/l$, $p = 0,034$). Mezi pacienty klinického stadia II. ($N=13$) a klinického stadia III. ($N=10$) nebyl statisticky významný rozdíl v koncentracích CD8+ T lymfocytů ($0,38 \pm 0,05 \times 10^9/l$ a $0,39 \pm 0,06 \times 10^9/l$, $p = 0,877$).

Absolutní počet CD19+ B lymfocytů ve skupině s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem ($N=23$) byl $0,65 \pm 0,62 \times 10^9/l$ a byl významně zvýšen ve srovnání s $0,95 \pm 0,50 \times 10^9/l$ ve zdravé kontrolní skupině ($N=25$) ($p < 0,001$). Ve skupině pacientů s karcinomem nebyl významný rozdíl mezi pohlavími (muži vs. ženy), věkovými skupinami (do 60 let a více než 60 let v době diagnózy), částí tlustého střeva postižené primárním nádorem (levý tračník, pravý tračník a konečník) nebo klinickým stadiem nádoru (stadia I. a II. vs. III.). Mezi pacienty v klinickém stadiu II. ($N=13$) a stadiu III. ($N=10$) nebyl statisticky významný rozdíl v lymfocytech CD19+ ($0,17 \pm 0,03 \times 10^9/l$ a $0,15 \pm 0,02 \times 10^9/l$; $p = 0,780$).

Absolutní počet CD16+ CD56+ buněk ve skupině s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem ($N=23$) byl $0,51 \pm 0,01 \times 10^9/l$ a byl signifikantně zvýšen ve srovnání s $0,33 \pm 0,04 \times 10^9/l$ ve zdravé kontrolní skupině ($N=25$) ($p < 0,001$). Ve skupině pacientů s karcinomem nebyl žádný významný rozdíl mezi pohlavími (muži vs. ženy), částí tlustého

střeva postižené primárním nádorem (levý tračník, pravý tračník a konečník) nebo klinickým stadiem nádoru (stádia I. a II. vs. III.). U pacientů ve věku do 60 let v době diagnózy byl rozdíl v sérových koncentracích CD16+ CD56+ ($0,26 \pm 0,02 \times 10^9/l$ a $0,41 \pm 0,07 \times 10^9/l$; $p=0,041$). Mezi pacienty ve stadiu II. (N=13) a ve stadiu III. (N=10) nebyl statisticky významný rozdíl ($0,37 \pm 0,06 \times 10^9/l$ a $0,28 \pm 0,04 \times 10^9/l$; $p=0,291$).

Ve zdravé kontrolní skupině nebyl významný rozdíl v sérových koncentracích TGF- β a VEGF mezi pohlavími (muži vs. ženy) ani věkovými skupinami (do 60 let a více než 60 let).

3.2 Výsledky vyšetřování pacientek s karcinomem prsu (soubor č.2)

Sérové koncentrace TGF- β a VEGF

Ve skupině 68 pacientek s hormonálně rezistentním karcinomem prsu byly plazmatické koncentrace TGF- β ve srovnání se zdravými kontrolami signifikantně zvýšeny. U pacientek byly koncentrace TGF- β $13,02 \pm 5,36$ ng/ml (průměr, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolní skupinou $4,93 \pm 2,08$ ng/ml. Mezi oběma skupinami byl signifikantní rozdíl ($p < 0,001$). U pacientek byly koncentrace TGF- β $13,34 \pm 0,65$ ng/ml (medián, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolou $4,3 \pm 0,54$ ng/ml. Plazmatická koncentrace VEGF byla signifikantně zvýšena u pacientek s karcinomem prsu rezistentním na hormonální terapii. Koncentrace VEGF byly $95,35 \pm 66,41$ pg/ml (průměr, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolní skupinou $25,8 \pm 13,4$ pg/ml. Mezi oběma skupinami byl signifikantní rozdíl ($p < 0,001$). U pacientek byly zjištěny zvýšené koncentrace VEGF $80,6 \pm 8,05$ pg/ml (medián, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolou $26,00 \pm 3,45$ pg/ml.

Plazmatické koncentrace VEGF a TGF- β byly u pacientek s karcinomem prsu rezistentním k hormonální terapii ve srovnání se zdravými kontrolami statisticky signifikantně zvýšené ($p < 0,001$).

Vyšetření buněčné imunity pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu

Zjistili jsme signifikantní pokles v protinádorové imunitě zprostředkované buňkami, zejména nižší hodnoty CD8+ T lymfocytů (cytotoxické efektorové buňky).

U pacientek s karcinomem prsu rezistentním na hormonální terapii bylo procentuální zastoupení CD8+ T lymfocytů ve srovnání s kontrolní skupinou $24,2 \pm 8,7$ % versus $35,7 \pm 3,7$ % (průměr, standardní odchylka). Mezi oběma skupinami byl signifikantní rozdíl ($p < 0,001$). U pacientek s karcinomem prsu byla snížena procentuální hodnota CD8+ T lymfocytů $24,0 \pm 1,1$ % ve srovnání s kontrolou $36,0 \pm 1,0$ % (medián, standardní odchylka). Minimální hodnota zastoupení CD8+ T lymfocytů byla u pacientek 12 %, a u kontrolní skupiny 30 %. Maximální hodnota zastoupení CD8+ T lymfocytů v plazmě u pacientek byla 46 % a u kontrolní skupiny 42 %.

U pacientek s karcinomem prsu rezistentním k hormonální terapii bylo procentuální zastoupení B buněk $11,4 \pm 5,1$ % (průměr, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolní skupinou $14,5 \pm 2,4$ %. Minimální procentuální zastoupení B lymfocytů v plazmě u pacientek bylo 2 % oproti 11 % u kontrolní skupiny. Maximální hodnota procentuálního zastoupení B lymfocytů v plazmě pacientek byla 11 %, zatímco u kontrolní skupiny 20 %.

Vyšetření humorální imunity pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu

U humorální imunity došlo k významnému poklesu koncentrací imunoglobulinů převážně v podtřídě IgG4.

Koncentrace IgG4 u pacientek s karcinomem prsu byly $0,73 \pm 1,36$ U/ml (průměr, standardní odchylka) ve srovnání s kontrolní skupinou $1,15 \pm 0,25$ U/ml. Mezi oběma skupinami byl signifikantní rozdíl ($p < 0,001$). Maximální koncentrace IgG4 měřená v plazmě pacientek byla 11,0 U/ml a u kontrolní skupiny 1,4 U/ml. Minimální koncentrace IgG4 měřená v plazmě u pacientek byla 0,02 U/ml a kontrolní skupiny 0,66 U/ml. U 90 % pacientek se vyskytly příznaky imunodeficiency, např. opakované infekce horních cest dýchacích, infekce močových cest a herpetické infekce. V 50 % případů byly zjištěny sérologické příznaky aktivních a chronických chlamydiových infekcí. V periferní krvi byly přítomny anamnestické protilátky proti viru herpes zoster ve 4,3 % a proti borrelia burgdorferi v 34,5 % případů.

3.3 Výsledky projektu Immunoscore (soubor č.3)

Primárním cílovým parametrem bylo vyhodnotit prognostickou hodnotu Immunoscore vyjádřenou dobou do návratu nemoci, definovanou jako čas od chirurgického zákroku do recidivy onemocnění. Dalším parametrem bylo celkové přežití (doba od operace do úmrtí pacienta v důsledku jakékoli příčiny).

Signifikantní pozitivní korelace byla zjištěna mezi hustotami CD3+ a CD8+ antigenů T lymfocytů v každé nádorové oblasti a celkovým přežitím pacientů v tréninkovém souboru (n=700). Z této skupiny pacientů mělo 155 (22 %) nízké Immunoscore, 357 (51 %) pacientů střední Immunoscore a 188 (27 %) pacientů mělo vysoké Immunoscore. Pacienti s vysokým Immunoscore měli nejnižší riziko recidivy. Recidiva onemocnění do 3 let byla pozorována u 10 pacientů (5 %) s vysokým Immunoscore, u 58 pacientů (17 %) se středně pokročilým Immunoscore a u 42 pacientů (26 %) s nízkým Immunoscore. Poměr rizik [HR] u pacientů s vysokým Immunoscore vs. nízkým Immunoscore 0,20 [95% CI 0,10-0,38; $p < 0,001$].

Podobné výsledky byly zjištěny u upraveného modelu (HR pro vysoké vs. nízké Immunoscore 0,25 [95% CI 0,13–0,48; $p < 0,001$]) pro přežití bez onemocnění a celkové přežití. Nejdelší přežití měli opět pacienti s vysokým Immunoscore. Přežití po dobu 3 let bylo zaznamenáno u 164 (87 %) pacientů s vysokým Immunoscore, u 305 (85 %) pacientů se střední hodnotou Immunoscore a u 117 (76 %) pacientů s nízkým Immunoscore. Přežití

v průběhu 5 let bylo zaznamenáno u 155 (82 %) pacientů s vysokým Immunoscore, u 274 (77 %) pacientů s intermediárním Immunoscore a u 94 (62 %) pacientů s nízkým Immunoscore. V tréninkovém souboru byl také zjištěn signifikantní rozdíl v čase do recidivy u pacientů s Immunoscore s vysokou a střední hodnotou HR 0,38 [95% CI 0,21-0,70; p=0.001] oproti pacientům s nízkou hodnotou Immunoscore. Rozdělení pacientů dle Immunoscore pouze do dvou kategorií umožnilo identifikaci pacientů se zřetelným klinickým výsledkem pro dobu do návratu onemocnění, přežití bez onemocnění a rovněž celkové přežití.

Tyto výsledky byly potvrzeny v interním i externím validačním souboru. Pacienti s nejvyšším Immunoscore měli nejnižší riziko recidivy. Recidiva po 3 letech byla v interním validačním souboru zaznamenána u 10 pacientů (6 %) s vysokým Immunoscore, u 31 pacientů (10 %) s intermediárním Immunoscore a u 33 pacientů (20 %) s nízkým Immunoscore (p <0,001).

Rekurence onemocnění po 3 letech byla v externím validačním souboru zaznamenána u 42 pacientů (14 %) s vysokým Immunoscore, u 104 pacientů (24 %) se střední hodnotou Immunoscore a u 85 pacientů (36 %) s nízkým Immunoscore (HR pro vysoké vs. nízké Immunoscore 0,36 [95% CI 0,24-0,53; p <0.001]). Podobné výsledky byly získány s upravenými modely.

Příznivý prognostický význam vysokého Immunoscore byl také potvrzen pro přežití bez onemocnění a celkové přežití v interních a externích validačních souborech (p <0,05). Při rozvrstvení do dvou kategorií Immunoscore měli pacienti s vysokými stupni Immunoscore také významně prodloužený čas do recidivy, celkové přežití a přežití bez onemocnění, a to jak v tréninkové kohortě, interní validační kohortě, tak i v externích souborech validace (p <0,05). Dvě nezávislé kohorty (interní a externí validační soubory) tak potvrdily zjištění z první kohorty (tréninkový soubor).

U pacientů s nádory ve II. stádiu (N=1 434) bylo vysoké Immunoscore spojeno s nejnižším rizikem recidivy, nejdelším přežitím bez onemocnění a nejdelším celkovým přežitím (p <0,05). Recidiva po 3 letech byla zaznamenána u 23 pacientů (6 %) s vysokou hodnotou Immunoscore, u 73 pacientů (11 %) s intermediárním Immunoscore a u 77 pacientů (20 %) s nízkým Immunoscore. Recidiva po 5 letech byla pozorována u 31 pacientů (8 %) s vysokým Immunoscore, 95 pacientů (14 %) s intermediárním Immunoscore a 91 pacientů (23 %) s nízkým Immunoscore (HR pro vysoké vs. nízké hodnoty Immunoscore 0,33 [95% CI 0,21-0,52; p <0,001]).

Příznivý prognostický význam vysokého Immunoscore přetrvával v přítomnosti rizikových faktorů, jako např. nádorových embolů (tj. pacienti s venózní embolií, lymfatickou invazí nebo perineurální invazí).

Výsledky multivariační analýzy (n=2 681) ukázaly, že Immunoscore je silný prediktor pro dobu do recidivy, celkové přežití a přežití bez onemocnění (p <0,001). Pětileté přežití bez onemocnění bylo zaznamenáno u 428 pacientů (75 %) s vysokým Immunoscore,

688 pacientů (70 %) s intermediárním Immunoscore a 271 pacientů (57 %) s nízkým Immunoscore.

Data ukázala, že metoda Immunoscore je platná na různých kontinentech (HR pro vysoké vs. nízké immunoscore pro čas do recidivy v Severní Americe 0,13 [95% CI 0,05 0,30; $p < 0,001$]; Asii 0,19 [0,04-0,83; $p = 0,027$] a v Evropě 0,31 [0,22–0,43; $p < 0,001$]).

Do analýzy stavu MSI bylo zahrnuto 1 579 vzorků. Při rozvrstvení do tří kategorií Immunoscore byly tumory MSI asociovány s vysokým Immunoscore v 138 (45 %) z 304 případů, zatímco vysoké Immunoscore bylo pozorováno u 273 z 1 275 pacientů s MSS nádory (21 %). Při rozvrstvení do dvou kategorií Immunoscore měli pacienti s vysokým Immunoscore prodloužené přežití bez onemocnění, čas do návratu onemocnění a celkové přežití, bez ohledu na jejich mikrosatelitní stav (HR pro vysoký vs. nízký Immunoscore v MSI-high 0,56 [95% CI 0,34-0,90; $p = 0,015$] a HR pro vysoké vs. nízké Immunoscore v MSS 0,56 [0,46-0,68; $p < 0,001$]).

Navíc pacienti se slabě infiltrovanými MSI tumory neměli ve srovnání s pacienty s MSS nádory výhodu přežití. V multivariačním stratifikovaném Cox modelu, který kombinuje stav MSI s Immunoscore, zůstal MSI významným faktorem pro dobu do recidivy, ale nebyl významným faktorem pro přežití bez onemocnění a celkové přežití a byl závislý na Immunoscore. Příznivý efekt MSI statutu proto souvisel především s jeho schopností navodit silnou imunitu (tj. vysoké Immunoscore). Podobné výsledky byly zjištěny při analýze Immunoscore a MSI u pacientů s nádory II. klinického stadia.

Významným rizikovým parametrem bylo klinické stadium dle TNM klasifikace, zatímco všechny ostatní existující rizikové parametry nádoru neměly výraznější prognostický význam. Ze všech klinických parametrů spadajících pod kategorii rizikové faktory se ukázalo, že Immunoscore jasně dominovalo se 47% přesností predikce ohledně prognózy pacienta, následovala TNM klasifikace s 28 %, stupeň diferenciace (15 %), pohlaví (<3 %), mucinózní histologie a MSI status. Výsledky multivariační analýzy celkového přežití pomocí TNM klasifikace ukázaly, že TNM klasifikace a Immunoscore představují významné rizikové faktory pro celkovou prognózu pacienta s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem.

4 DISKUZE

Od počátku 20. století se předpokládá, že infiltrace nádoru buňkami imunitního systému je pozitivním faktorem pro onkologického pacienta (MACCARTY, W. et al., 1921), nicméně tyto poznatky neměly dříve významnější vliv na klasifikaci maligních onemocnění ani pro klinické rozhodování o dalším terapeutickém postupu a už vůbec nebylo zřejmé, zda a jakým konkrétním způsobem ovlivňují biologické chování samotných nádorových buněk.

Terapeutické možnosti a rozhodování o léčbě onkologických pacientů jsou v současné době založeny na výsledcích histopatologického vyšetření a na klasifikaci rozsahu

onkologického onemocnění dle TNM klasifikace. Ačkoli se tato klasifikace ukázala jako velmi cenná při posouzení prognózy pacienta a dalšího vývoje nemoci, stále poskytuje velmi omezené informace. Důvodem je skutečnost, že nikterak nepopisuje vlastnosti konkrétních nádorových buněk či charakter nádorového mikroprostředí, a tedy ani míru agresivity daného tumoru a z toho vyplývající reálné riziko recidivy či generalizace.

Interakce mezi imunitní odpovědí, konkrétním typem maligního onemocnění a léčebnou strategií pravděpodobně spoluvytvářejí charakter nádorového mikroprostředí a zde přítomných maligních buněk. Význam imunitní protinádorové buněčné reakce je u každého typu nádorového onemocnění odlišný. Existují silně imunogenní nádory s vysoce denzními lymfocytárními infiltráty, rovněž tak malignity s malým počtem tumor infiltrujících lymfocytů. Proto je aktuální klinická potřeba studií s dostatečným počtem pacientů umožňujících analýzu jednotlivých subpopulací bílých krvinek v nádorovém mikroprostředí a posouzení imunitní odpovědi u jednotlivých nádorových onemocnění.

Řada publikací ukazuje, že maligní buňky mají významnou regulační úlohu nad sousedními buňkami a pravděpodobně tedy i nad přítomnou populací imunitních buněk. Většina maligních buněk nejen že produkuje cytokiny způsobující neoangiogenezi, aby podporovala růst nádoru nad limit velikosti primárního tumoru, který je určován mírou vaskularizace nádorového mikroprostředí (CARMELIET, P. et al., 2011), (POTENTE, M. et al., 2011), ale také aktivuje metabolické pochody, při nichž jsou stromální buňky stimulovány k syntéze velkého množství energetických substrátů, jako jsou laktát či látky ketonové povahy (GALLUZZI, L. et al., 2012), (WITKIEWIZ, A.K. et al., 2012).

Fibroblasty v nádorovém mikroprostředí jsou významnými zdroji mitogenních a proangiogenních faktorů, jako je interleukin 6 (IL -6) či vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) (RASANEN, K. et al., 2010). Kromě toho maligní buňky buď přímo, nebo prostřednictvím fibroblastů produkují širokou škálu cytokinů včetně TGF- β a IL-10, které vykazují silné imunopresivní účinky (RABINOWICH, G.A. et al., 2007). Celkově tato pozorování ukazují, že v průběhu nádorového bujení se maligní buňky stávají schopnými přizpůsobit si lokální mikroprostředí takovým způsobem, aby uspokojily své vlastní metabolické potřeby a zároveň se efektivně bránily imunitnímu systému hostitele. TGF- β ligandy jsou často přítomny v nádorovém mikroprostředí a mohou být produkovány jak vlastními nádorovými buňkami nebo stromálními buňkami, tak i imunitními buňkami asociovanými s nádorem (BIERIE, B. et al., 2006 a 2008). TGF- β je také silným induktorem migrace nádorových buněk, který přispívá ke zvýšené schopnosti tumoru metastazovat (MURAOKA-COOK, R.S. et al., 2005). Zejména v pozdních stádiích nádorového onemocnění je rovnováha mezi pozitivními a negativními vlivy cytokinu TGF- β na progresi tumoru posunuta ve prospěch vlastností podporujících vznik metastáz, protože citlivost buněk na antiproliferativní a proapoptotické účinky chemokinů klesá v důsledku dysfunkce beta receptorů TGF nebo vlastní signalizace TGF- β (LEIVO, T. et al., 1998). TGF- β je tedy jedním

z hlavních imunosupresivních faktorů. Navozuje také diferenciaci T regulačních lymfocytů, které potlačují celkovou protinádorovou imunitní reakci. To může vysvětlit korelaci mezi zvýšenými hladinami sérového TGF- β a horší prognózou pacientů s kolorektálním karcinomem (SHIM, K.S. et al., 1999). TGF- β ovlivňuje rovněž hormonální receptory a pravděpodobně se podílí na vzniku hormonální rezistence u pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu (TODOROVIC-RAKOVIC, N. et al., 2005), (WANG, S.E. et al., 2006). Objevuje se stále více důkazů o tom, že existuje vzájemná komunikace mezi estrogenovými receptory a signalizací receptorů růstových faktorů, jako je inzulinový růstový faktor 1, epidermální růstový faktor (EGF), TGF- α a TGF- β (IGNAR-TROWBRIDGE, D.M. et al., 1995), (THORNE, C. et al., 2003). Lze tedy předpokládat, že estrogeny mohou negativně modulovat signalizaci TGF- β v buňkách karcinomu prsu (MALEK, D. et al., 2006), (YOO, Y.A. et al., 2008).

TGF- β zprostředkovává své biologické účinky hlavně prostřednictvím dvou typů receptorů typu serin/threonin kináz, a to receptoru TGF- β I a receptoru TGF- β II s následnou aktivací signální intracelulární dráhy Smad. Po navázání ligandu a dimerizaci TGF- β receptoru I a TGF- β receptoru II jsou proteiny Smad2 a Smad3 regulované receptory fosforylovány a interagují s proteinem Smad4 (MASSAGUE, J. et al., 1998). Tyto aktivované molekulární komplexy se přemístí do buněčného jádra, kde ovlivňují transkripci genů. Bylo prokázáno, že estrogeny inhibují Smad signalizační dráhu aktivací extracelulární regulované kinázy (ERK1/2).

Další molekulou, kterou jsme měřili v rámci našich projektů, je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). VEGF je klíčovou molekulou při podpoře růstu nových cév. Ovlivňuje řadu endotelových funkcí zapojených v procesu angiogeneze včetně inhibice apoptózy endotelových buněk, a to zejména za podmínek hypoxie. Takto stimulovaná angiogeneze podporuje růst nádoru a jeho metastazování. Exprese VEGF je navíc stimulována působením řady růstových faktorů, např. růstového faktoru 2 pro fibroblasty nebo transformujícího růstového faktoru beta.

Léčebné preparáty cílené na VEGF molekulu či její receptor vytváří celou skupinou léčiv tlumících jinak přirozenou neoangiogenezi, vycházející z potřeb stále rostoucího nádoru. Jedním z těchto léčiv je bevacizumab (anti-VEGF monoklonální protilátka), který prodlužuje život právě modifikací nádorového mikroprostředí pacientům s metastatickým karcinomem prsu i tlustého střeva, inhibuje neoangiogenezi, a tedy i schopnosti nádoru metastazovat. Wagner ukázal, že přidáním bevacizumabu k chemoterapii u pacientek s metastatickým karcinomem prsu, které absolvovaly hormonální léčbu, se významně prodlužuje doba přežití a čas do progresu (WAGNER, A.D. et al., 2012). Sérová koncentrace VEGF koreluje s prognózou i u pacientů s kolorektálním karcinomem (BAYHAN, Z. et al., 2014) a pokles koncentrací tohoto cytokinu byl pozorován v průběhu chirurgické léčby i chemoterapie (MEHRABANI, D. et al., 2014).

Naše výsledky tato data potvrzují, a navíc ukazují na významné rozdíly mezi sérovými koncentracemi TGF- β a VEGF u onkologických pacientů (s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem a pacientek s hormonálně dependentním karcinomem prsu) a kontrolní skupinou ($p < 0,0001$). Podobné výsledky vykazující vyšší koncentrace cytokinů TGF- β a VEGF byly dříve popsány v mnoha studiích s jinými typy lokalizovaných solidních nádorů (SHEEN-CHEN, S.M. et al., 2001), (SHIM, K.S. et al., 1999). Pravděpodobně v důsledku malého počtu pacientů jsme neprokázali žádné významné rozdíly mezi pacienty v II. klinickém stadiu ve srovnání s pacienty v III. klinickém stadiu.

Cílem vyšetření plazmatických koncentrací selektovaných parametrů buněčné imunity a imunomodulačních cytokinů u pacientek s karcinomem prsu a pacientů s kolorektálním karcinomem (soubor č. 1 a č. 2) bylo posoudit schopnost imunitní odpovědi onkologických pacientů a prognostický význam imunitní odpovědi u daných diagnóz, a to analýzou imunitního systému (zejména CD8+ T lymfocytů). Naše hypotéza byla, že u karcinomu prsu rezistentního na endokrinní terapii a stejně tak i u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem je snížena populace CD8+ lymfocytů, a tím pádem i možnost adekvátní imunitní reakce. Současná hormonální léčba není efektivní u všech pacientek (primární endokrinní rezistence). Původně citlivé nádory mohou dříve nebo později progredovat navzdory této terapii (získaná rezistence), což nevyhnutelně vede k recidivě onemocnění. Identifikace faktorů a biologických příčin odpovědných za vývoj těchto rezistentních stavů jsou proto důležitým diagnostickým a terapeutickým cílem výzkumu v oblasti nádorové imunologie. V našem výzkumném projektu jsme se zaměřili na podskupinu pacientek s karcinomem prsu rezistentních na hormonální terapii, protože u této skupiny pacientek nebyla doposud publikována žádná data o stavu imunitního systému. Nepozorovali jsme žádnou korelaci mezi plazmatickými koncentracemi TGF- β , VEGF a klinickým stadiem nádorového onemocnění, ale to mohlo být způsobeno malým počtem pacientek. V budoucnu by měl být proveden další výzkum týkající se této podskupiny pacientů.

U našich pacientek s rezistencí na hormonální terapii jsme zjistili hlavně defekty buněčné protinádorové imunity – nižší exprese CD8+ (cytotoxické T lymfocyty). Dále jsme změřili zvýšené koncentrace imunosupresivních cytokinů TGF- β a VEGF, stejně tak jako u pacientů s lokálně pokročilým kolorektálním karcinomem. U většiny pacientek byla zjištěna snížená humorální složka imunity, včetně klinických projevů imunodeficiency.

Další studie jsou nezbytné k tomu, aby se ukázalo, zda TGF- β a VEGF mohou být použity pro úpravu individuální terapie u pacientů s hormonálně dependentním karcinomem prsu. Detailní imunologické vyšetření, speciálně zaměřené na stanovení koncentrací TGF- β a VEGF, by mohlo identifikovat rizikovou skupinu pacientů s časnou nebo pozdní rezistencí k hormonální terapii. Pacienti se zvýšenými koncentracemi cytokinů TGF- β nebo VEGF jsou pravděpodobně kandidáty pro intenzivnější dispenzární péči. Pokud by rozsáhlejší studie prokázala nadprodukcii cytokinů TGF- β nebo VEGF maligními buňkami a změny v buněčné

imunitě, bylo by pak možno potvrdit tyto cytokiny jako další prognosticko-prediktivní biomarker. Měření plazmatických koncentrací TGF- β a VEGF by tak mohlo sloužit k monitoraci léčebné odpovědi vedle klasických nádorových markerů a jejich elevace případně varovat před rozvojem rezistence na hormonální terapii.

V rámci měření parametrů buněčné imunity v plazmě onkologických pacientů jsme kromě významného snížení CD8+ T lymfocytů pozorovali také snížení lymfocytů, tedy celkového antigenu CD3+ obecně. T lymfocyty s cytotoxickou funkcí (CD8+) jsou vyčerpány a dysfunkční zpravidla v důsledku opakovaných infekcí nebo, jako v tomto případě, chronickou stimulací nádorovými neoantigeny, pravděpodobně také i v důsledku humorálního imunodeficitu v podtřídě IgG4. Je zřejmé, že přítomnost imunitních buněk v periferní krvi je modifikována řadou faktorů a je tedy inducibilní. Prokázalo se, že stimulace protinádorové buněčné odpovědi podáním tremelimumabu anti-CTLA4 monoklonální protilátky pacientům s hormonálně dependentním karcinomem prsu byla u většiny pacientů spojena se zvýšenými koncentracemi CD4+ a CD8+ T lymfocytů v periferní krvi (VONDERHEIDE, R.H. et al., 2010).

Ve skupině s kolorektálním karcinomem byly sníženy koncentrace lymfocytů pomocných i cytotoxických (CD4+, CD8+). Tyto výsledky jsou nejpravděpodobněji způsobeny kombinací několika skutečností. Jednak migrací imunitních buněk do nádorové tkáně, ale také vlivem zvýšení imunosupresivních cytokinů. Jedna hypotéza je, že lymfopenie může odrážet stav dysfunkce T lymfocytů vyplývající z imunitního vyčerpání a deplece cytotoxických T lymfocytů, které jsou dysfunkční a mají poté omezenou schopnost uplatňovat svůj protinádorový účinek během protinádorové imunoterapie inhibítorem PD-1 (SCHIETINGER, A. et al., 2014).

Regulaci imunitních reakcí ovlivňuje mnoho aspektů vývoje onkologického onemocnění. Bylo prokázáno, že přítomnost T lymfocytů v nádorové tkáni karcinomu prsu představuje prognostický ukazatel pro přežití bez recidivy a celkové přežití pacientek (DE NARDO, D.G. et al., 2011). Existují také důkazy o tom, že odpověď na chemoterapii je částečně regulována těmito lymfocyty. Experimentální studie ukázaly, že B a T lymfocyty mohou vykazovat pronádorovou aktivitu nepřímo ovlivněním bioaktivity myeloidních buněk včetně makrofágů, monocytů a žírných buněk, což má za následek vznik rezistence na endokrinní terapii a následně možná i na vznik metastáz (DE VISSER, K.E. et al., 2005), (AMMIRANTE, M. et al., 2010), (DE NARDOL, D.G. et al., 2011). Zvýšené koncentrace B lymfocytů v plazmě onkologických pacientů byly dříve vysvětlovány inhibicí T buněčně protinádorové imunity (QIN, Z. et al., 1998). Na myších experimentálních modelech byl pozorován pozvolnější růst primárního tumoru u myší, které měly nižší plazmatické koncentrace B lymfocytů doprovázené zvýšenou přítomností T lymfocytů a NK buněk a silnější cytokinovou Th1 odpovědí se zvýšenou cytolytickou reakcí T lymfocytů v nepřítomnosti B buněk (SHAH, S. et al., 2005). Podobné výsledky byly pozorovány v periferní krvi pacientů s karcinomem tlustého střeva v našem souboru č. 1, kde byly B lymfocyty zvýšeny spolu se sníženými

hladinami NK buněk, CD4+ a CD8+ lymfocytů. Jedná se pouze o předběžné výsledky malé skupiny pacientů, které budou rozšířeny o výsledky z projektu Immunoscore. Nedávná prezentace prognostického významu a biologické činnosti imunitních buněk v nádorovém mikroprostředí spolu s novým softwarem, hodnotícím obraz a detekujícím jednotlivé buňky v nádorovém mikroprostředí, vedly mezinárodní společnost pro imunoterapii nádorových onemocnění k podpoře mezinárodní validace testu Immunoscore (PAGES, F. et al. 2018).

U pacientů s kolorektálním karcinomem v II. klinickém stadiu choroby je obzvláště obtížné rozhodnout, zda má nebo nemá být podána adjuvantní terapie. Mikrosatelitová nestabilita se zdá být dobrým prediktorem přínosu adjuvantní léčby v případě kolorektálního karcinomu II. klinického stadia, ale neposkytuje žádnou prognostickou hodnotu (KIM, J.E. et al., 2017). Nyní bude důležité ověřit standardizovaný Immunoscore test a určit jeho prognostickou hodnotu a predikci odpovědi na chemoterapii v randomizovaných klinických studiích s pacienty, kteří mají II. nebo III. klinické stadium kolorektálního karcinomu a jsou léčeni adjuvantní chemoterapií (např. Studie N0147, International Duration). Další otázkou je, zda mohou být pacienti III. klinického stádia s vysokou hodnotou Immunoscore kandidáty zkrácené adjuvantní chemoterapie (GROTHERY, A. et al., 2018). Tyto studie by mohly poskytnout novou kategorizaci pacientů a modifikovat léčebnou strategii u pacientů s karcinomem tlustého střeva. Ve srovnání s existujícími prognostickými nástroji může být metoda Immunoscore použita k lepší definici prognózy pacientů s kolorektálním karcinomem, lepší identifikaci pacientů s vysokým rizikem recidivy nádorů (včetně pacientů s karcinomem tlustého střeva II. stádia).

Souhrnná studie Immunoscore představuje díky mezinárodnímu konsorciu největší validující standardizovaný imunitní parametr pro stratifikaci pacientů s nádorovým onemocněním. Metoda Immunoscore měla prognostickou hodnotu lepší než nyní existující a v klinické praxi běžně používané parametry charakterizující nádorové onemocnění. Tato iniciativa a tyto výsledky podporují implementaci metody Immunoscore jakožto nové charakteristiky nádoru pro klasifikaci maligních onemocnění TNM-I (imunitní systém). Pro klasifikaci nádorových onemocnění by to představovalo první standardizovaný imunitní test (PAGES, F. et al., 2018), (BENSON, A.B. et al., 2011), (EMENS, L.A. et al., 2016). Vzhledem k poznatkům a faktům vyplývajícím z dosažených výsledků se naše hypotéza potvrdila.

5 ZÁVĚR

Závěrem lze konstatovat následující zjištění:

1. Plazmatické koncentrace námi vybraných imunosupresivních cytokinů TGF- β a VEGF jsou u pacientek s hormonálně rezistentním karcinomem prsu a u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem signifikantně zvýšené oproti zdravým kontrolám.
2. Vyšetřované parametry buněčné imunity v periferní krvi (CD8+, CD4+ lymfocyty a NK buněk) byly signifikantně sníženy v absolutních i procentuálních hodnotách u pacientů s hormonálně rezistentním karcinomem prsu a u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem oproti zdravým kontrolám.
3. Přítomnost cytotoxických T lymfocytů (CD8+) v nádorové tkáni a jejím okolí verifikovaná metodou Immunoscore u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem tvoří přirozenou ochranu organismu, což se projevuje delším přežitím, sníženým rizikem vzniku metastatického postižení a sníženým rizikem recidivy onemocnění.

6 VÝBĚR Z POUŽITÉ LITERATURY

Články v impaktovaných časopisech

ŠPAČEK, J., VOČKA, M., NETÍKOVÁ, I., et al. Immunological examination of peripheral blood in patients with colorectal cancer compared to healthy controls. *Immunol Investigations*, 2018, 47(7), p. 643-653. doi: 10.1080/08820139.2018.1480030. IF = 2,588

ZÁVADOVÁ, E., VOČKA, M., ŠPAČEK, J., et al. Cellular and humoral immunodeficiency in breast cancer patients resistant to hormone therapy. *Neoplasma*, 2014, 61, p. 90-98. IF = 1,696

PAGES, F., MLECNIK B., MERLIOT, F., et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet*, 2018, 391, p. 2128-2139. IF = 36,421