

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát doktorandské disertační práce

Tumor infiltrující lymfocyty jako prognostický faktor prognózy kolorektálního karcinomu po radikální chirurgické léčbě

MUDr. Petr Novák

Plzeň 2014

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného postgraduálního studia na Chirurgické klinice Lékařské fakulty v Plzni

Uchazeč: MUDr. Petr Novák
Chirurgická klinika
Lékařská fakulta v Plzni

Školitel: Doc. MUDr. Josef Vodička, Ph.D.
Chirurgická klinika LF UK a FN v Plzni

Oponenti: Prof. MUDr. Robert Gürlich, CSc., přednosta Chirurgické kliniky 3. LF UK a
FN Královské Vinohrady

Doc.MUDr. Jiří Šiller, Ph.D. přednosta chirurgické kliniky PKN, a.s. a
FZS Univerzity Pardubice.

Stanovisko k disertační práci vypracovalo vedení LF UK a FN v Plzni

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu

chirurgie se koná dne:

Místo obhajoby: Chirurgická klinika FN, Aula, Alej Svobody 80, Plzeň

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty v Plzni Univerzity
Karlovy Praha, Husova 3, Plzeň.

Prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.
předseda komise pro obhajobu disertačních prací v oboru chirurgie
Chirurgická klinika LF UK a FN v Plzni

Obsah:

1 Úvod	4
1.1 CD8+ T lymfocyty.....	5
1.2 CD4+ T lymfocyty.....	5
1.3 NK buňky	5
1.4 Dendritické buňky	6
1.5 Makrofágy	6
1.6 Morfologická hlediska TIL.....	7
2 Cíle disertační práce	7
3 Metodika	7
3.1 Histopatologické hodnocení.....	8
3.2 Imunohistochemie.....	8
3.3 Onkomarkery.....	8
4 Statistické zpracování výsledků	9
5 Výsledky	9
6 Diskuze	20
7 Závěry	22
8 Seznam použitých zkratk	23
9 Literatura	24
10 Souhrn	27
3 Summary	28

1 Úvod

Kolorektální karcinom (KRK) je celospolečenský a celosvětový problém. V incidenci a mortalitě patří mezi nejčastější malignity. I přes pokroky moderní chirurgické a onkologické léčby je stále pro pacienty velmi závažnou diagnózou s nejistou prognózou. Výsledky léčby jsou závislé na stádiu onemocnění. Důležitou roli hraje prevence a záchyt KRK v časných stádiích. Léčba je multidisciplinární. Podílí se na ní celá řada odborníků z oborů radiodiagnostiky, gastroenterologie, onkologie a histopatologie. Klíčovou úlohu v léčbě KRK však představuje chirurg. Postupy chirurgické léčby jsou více méně standardizované a vývoj nyní spíše směřuje k miniinvazivním a přístrojově náročnějším operacím. Onkologická léčba má nepochybně také zásluhu na zlepšení výsledků léčby KRK, ale i zde jsou již vytvořena standardní schémata léčby v současné době dostupnými léky. Výzkum se nyní zaměřuje na pochopení biologického chování nádoru a role imunitního systému v kontrole nebo progresi růstu KRK. Výsledkem by měla být možnost ovlivnit biologické chování nádoru a imunitního systému. Zatím se výsledky výzkumu dají částečně použít jako nadějně prediktivní a prognostické faktory.

Role imunitního systému v kontrole růstu a metastazování KRK není objasněna. Vzhledem k tomu, že po odstranění primárního nádoru dochází často ke vzniku metastáz nebo lokální recidivy, můžeme se domnívat, že je chyba ve fungování imunitního systému. Imunitní systém buď není schopen rozpoznat patologické buňky, nebo naopak může stimulovat růst nádoru a jeho metastáz. Nádorové buňky, okolní tkáň a imunokompetentní buňky hostitele a s nimi související molekulární produkty vytváří tzv. mikroprostředí nádoru, které mohou způsobit paradoxní odpověď imunokompetentních buněk ve smyslu umožnění přežití a šíření maligních buněk v těle hostitele. Nádorové buňky, pokud nejsou zničeny imunitním systémem, mohou časem získat schopnost adaptace za pomoci svého imunofenotypu a mohou začít být pro imunitní systém nedetekovatelné. Základní podmínkou účinné protinádorové imunitní odpovědi je dokonalá spolupráce mezi přirozenou a získanou imunitou. V eliminaci maligních buněk mají klíčovou roli přirozeně zabíječské buňky (Natural killers - NK), dendritické buňky (Dendritic cells - DC) a cytotoxické T lymfocyty (CTL). Je-li aktivita cytotoxických buněk inhibována, může docházet k progresi maligního onemocnění.

Je předpoklad, že tumor infiltrující lymfocyty (TIL), DC a NK buňky mohou být indikátory účinnosti antitumorózní imunologické odpovědi. Počet, typ a morfologie TIL, DC a NK buněk by mohly určovat prognózu KRK [1,2]. TIL můžeme rozlišit z hlediska jejich typu a lokalizace, tzn. v jaké části tkáň se nacházejí, zda infiltrují tumor či jeho nejbližší okolí nebo infiltrují spádové lymfatické uzliny [3]. Z hlediska typu jsme se zkoumali T lymfocyty CD8+, CD4+, NK buňky, CD57+ a S100+ dendritické buňky. Dále je zkoumána funkce makrofágů. Přesná funkce těchto buněk je předmětem současné diskuze [4.5]. Víme jen, že hrají důležitou roli v kontrole vývoje a růstu nádoru.

1.1 CD8+ T lymfocyty

Výskyt CD8+ T lymfocytů v nádorových buňkách KRK byl spojen s lepším přežíváním nemocných. Tyto lymfocyty obsahují cytolytický enzym granzyme-B. V případě zvýšené proliferační aktivity těchto lymfocytů bývá pozorována jejich aktivace a cytotoxický fenotyp je významně spojen s nepřítomností časných metastatických projevů (vaskulární embolizace, lymfatická invaze nebo perineurální invaze nádorových buněk) a dále je spojen s nižším výskytem recidivy malignity [6]. Vysoká hustota T lymfocytů v nádorové tkáni byla častěji pozorována u pacientů bez časných známek metastáz a byla spojena s lepšími výsledky bezpříznakového intervalu (DFI) a prodloužením celkového přežití (OS).

1.2 CD4+ T lymfocyty

CD4+ patří mezi pomocné lymfocyty, které se podílejí na iniciální protinádorové cytotoxické odpovědi. Cytokiny (IL- 12 a 4) uvolněné maligními i imunitními buňkami rozhodují o posunu CD4+ T buněk směrem od Th1 („zánětové buňky“ schopné i přímé reakce) k Th2 (typičtí regulátoři aktivující B lymfocyty) a aktivaci T regulačních lymfocytů (Treg), jež mohou uvnitř maligního nádoru dozrát prostřednictvím Foxp3+. Význam těchto buněk u maligního onemocnění spočívá v podpoře progresu tohoto procesu [7,8,9].

1.3 NK buňky

Natural killer cells zprostředkují efektivní lýzi rakovinových buněk, ale mechanismus detekce rakovinných buněk je odlišná od CD8+ T lymfocytů. NK buňky jsou součástí vrozené imunitní odpovědi, ale nepoznají přidružený antigen na povrchu rakovinových buněk, jako jsou toho schopné CD8+ T lymfocyty. NK buňky mají schopnost způsobovat lýzi maligních buněk za předpokladu, že jsou tyto buňky označené na povrchu protilátkou, kterou rozpoznají. NK buňky mohou reagovat i na jiné signály jako jsou cytokiny produkované antigen zprostředkujícími buňkami (APC), které tímto umožňují včasnou reakci hostitele proti patogenu [10]. Snížený předoperační počet NK buněk je spojen se sníženou frekvencí recidivy KRK [11]. Klíčová úloha NK buněk v odstranění primárních i sekundárních nádorů byla již popsána u hematologických malignit [12,13,14]. V poslední době jsou určité náznaky, že NK buňky mají určitou schopnost paměťové odpovědi, to znamená, že by mohly mít vlastnost, která byla předtím omezena pouze pro sekundární imunitní odpověď, ale v tomto pohledu diskuze stále pokračuje [15]. Aktivace NK buněk může být inhibována expresí stresových molekul (např. MICA, molekul souvisejících s řetězcem MHC -molekul I. třídy) [16]. Dále může být

aktivace NK buněk inhibována přímo nádorem. Nádorové buňky mohou exprimovat ligandy inhibičních receptorů NK buněk nebo mohou uvolňovat imunosupresivně působící faktory. Jako příklady uplatnění těchto mechanismů úniku lze uvést uvolňování TGF-beta, Fas-L, exprese HLA-G a CEA [17].

1.4 Dendritické buňky

S100+ dendritické buňky (DC) jsou považovány za nejsilnější APC. Jejich klíčová role je v aktivaci a stimulaci naivních T lymfocytů a NK buněk. Mohou také indukovat nerozpoznání specifických antigenů nebo imunitní toleranci. Nezralé dendritické buňky vstupují do nádorové tkáně, přijímají a zpracovávají jeho antigeny. Potom migrují do lymfatických uzlin, podstupují zrání a vzájemně na sebe působí s T lymfocyty, jsou schopné rozpoznat prezentovaný antigen a tak T lymfocyty hrají efektorovou funkci v tumor-specifické imunitě. Nezralé DC mohou přispívat k tolerování nádoru, protože nemají dostatečnou expresi aktivačních koreceptorů. Při takové presentaci antigenu T buňkám dojde k anergizaci T buněk a tím k toleranci nádoru imunitním systémem. Jeví se, že imunologická tolerance je častějším jevem v pokročilých stádiích [18,19].

1.5 Makrofágy

Makrofágy produkují důležité faktory, které mají funkci v oblasti progresu nádoru. Jejich funkce není plně známá, ale bylo popsáno, že počet tumor infiltrujících makrofágů koreluje s celkovým přežitím pacientů s KRK [20]. Zdá se, že několik typů tumor infiltrujících makrofágů ovlivňuje rovnováhu mezi pro- a protitumorózní schopností imunitního systému [21]. Chování makrofágů může být ovlivněno zánětem. Role zánětu při vývoji zhoubného nádoru potvrzují nové poznatky z buněčné a molekulární biologie maligních nádorů [22,23]. Makrofágy typu M1 mohou zajišťovat odstraňování nádorových buněk, produkovat IL-12 s následnou aktivací cytotoxických lymfocytů (indukce tvorby interferonu IFN- γ) a Th1 CD4+ buněk, nicméně v reakci na mikroprostředí nádoru mohou prostřednictvím akumulace oxidu dusnatého (NO) inhibovat cytotoxické buňky a nabývat supresivního fenotypu (M2) [24]. Myeloidní buňky a makrofágy uvolňují volné radikály, které představují za normálních okolností významnou linii antimikrobiální obrany. V případě chronického zánětu může mít aktivita reaktivních intermediátů kyslíku a dusíku negativní vliv na buňky hostitele ve smyslu oxidativního poškození a nitrace bazí DNA, čímž narůstá riziko mutací. Reaktivní intermediáty kyslíku a dusíku mohou navozovat genetickou nestabilitu mikroprostředí nádoru a podporovat vznik dalších mutací v již

transformovaných buňkách, přičemž mohou též poškozovat imunitní buňky zapojené do protinádorové odpovědi [25].

1.6 Morfologická hlediska TIL

Z morfologického hlediska můžeme TIL pozorovat ve specifických částech nádoru. Detekujeme intratumorální infiltraci lymfocyty (ITL - intratumoral lymphocytes), intrastromální lymfocyty (ISL - intrastromal lymphocytes), peritumorální lymfocyty (PTL - peritumoral lymphocytes) a Crohn-like reakci (Crohn-like PTL). Dále můžeme sledovat reaktivní histologické změny ve spádových lymfatických uzlinách (LN reactions). Mezi popisované změny patří folikulární hyperplazie (LN-FH), sinusová histiocytóza (LN-SH) a přítomnost granulací (LN-GR).

2 Cíle disertační práce

Cílem disertační práce byla analýza vztahu současných klinických a histopatologických faktorů a tumor infiltrujících lymfocytů, dendritických a „natural killer“ buněk. Dalším cílem byla detekce pacientů s vysokým rizikem zhoršeného celkového přežívání a tendencí k časně recidivě malignity a tím i zkrácení bezpříznakového intervalu po radikálních chirurgických výkonech pro kolorektální karcinom.

3 Metodika

Analyzovali jsme soubor 150 pacientů, kteří podstoupili radikální chirurgickou léčbu pro KRK v období 2004-2007 na Chirurgické klinice FN Plzeň. Do souboru jsme vybrali pacienty, kteří byli elektivně operováni. Z našeho souboru jsme vyloučili pacienty, kteří byli operováni akutně pro ileózní stav, perforaci nádoru se sterkorální peritonitidou, masivní krvácení z tumoru a po iatrogenní perforaci při koloskopii. Důvodem bylo snížit riziko ovlivnění imunitního systému jinými podněty než je vlastní maligní tumor. Vyřazeni byli taktéž pacienti, u kterých bylo zvýšené riziko špatného zařazení do stadia onemocnění (například nízký počet analyzovaných lymfatických uzlin a pacienti se synchronními metastázami). Zařazení pacienti byli standardně sledováni po celé pooperační období za účelem podchycení eventuálního výskytu časně recidivy KRK. Sledovali jsme klinické parametry, jako stadium

a stupeň diferenciacie nádoru, předoperační leukocytózu, typ chirurgického výkonu (radikální nebo paliativní), pooperační komplikace a onkologickou léčbu. Sledované klinické parametry byly statisticky analyzované se vztahem k DFI a OS.

3.1 Histopatologické hodnocení

Zkoumali jsme tři různé části každého nádoru a také části všech nalezených lymfatických uzlin. Tkáň pro světelnou mikroskopii byla fixována v 4% formaldehydu a zalita do parafinu pomocí rutinních postupů. Pět mikrometrů silné řezy byly nařezány z tkáňových bloků a obarveny hematoxylinem-eosinem. Typ a stupeň všech nádorů byly stanoveny v souladu s pokyny WHO z roku 2000. Stádium nádorů bylo stanoveno v souladu s pokyny UICC 2002. Hodnotili jsme endovaskulární (VI), endolymfatickou (LI) a perineurální infiltraci (PI) rakovinovými buňkami (0 - žádná, 1 - ano). Lymfocytární infiltrace byla detekována jako intratumorální (ITL), intrastromální (ISL), peritumorální (PTL) a Crohn-like reakce (Crohn-like PTL). Stupnice hodnocení byla: žádná (0), mírná (1), střední (2) a závažná (3). Reaktivní histologické změny v lymfatických uzlinách (LN) byly popsány jako folikulární hyperplazie (LN-FH), sinusová histiocytóza (LN-SH) a přítomnost granulomů (LN-GR). Všechny tyto parametry byly kvantifikovány stejným způsobem z hlediska lymfocytární infiltrace.

3.2 Imunohistochemie

Pro imunohistochemické vyšetření byly použity následující primární protilátky: CD4 (klon 4B12, 01:50, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), CD8 (klon C8/144B, 01:50, DAKO, Glostrup, Dánsko), CD57 (klon NK1, Ventana, Rocklin, CA, USA) a S100 (polyklonální, 1:1000, Dako, Glostrup, Dánsko). Ve všech případech bylo použito přečištění za pomoci mikrovlnného generátoru. Primární protilátky byly detekovány za pomoci supersenzitivního streptavidin-biotin-peroxidázového komplexu (Biogenex, San Ramon, CA, USA). Byla použita vhodná pozitivní a negativní kontrolní sklíčka. Hustota intratumorální infiltrace lymfocytů byla hodnocena v pěti oblastech za pomoci High power microscopical fields (HPF) a výsledky byly vyčísleny jako počet imunopozitivních buněk při HPF. Histologická a imunohistochemická vyšetření byla prováděna na Šiklově ústavu patologie FN Plzeň.

3.3 Onkomarkery

Krevní vzorky pro stanovení markerů byly odebrány za standardních podmínek z loketní žíly během ranních náběrů. Sérum získané centrifugací bylo skladováno při teplotě -20°C až do laboratorní analýzy. Nádorové markery byly hodnoceny na Oddělení nukleární medicíny FN Plzeň za pomoci

komerčních laboratorních souprav v souladu s doporučením výrobce. Byly stanovovány tyto markery: karcinoembryonální antigen (CEA) (ng/ml, Immunotech, Česká republika), carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9) (IU/l, Shering-CIS BioInternational Francie), cytokeratiny: tkáňový polypeptidový specifický antigen (TPS) (kIU/l, IDL, Švédsko), tkáňový polypeptidový antigen (TPA) (kIU/l, Diasorin, Itálie). Thymidinkináza (TK) (IU/l) byla měřena za pomoci radioenzymatické analýzy (REA, Immunotech, Praha, Česká republika).

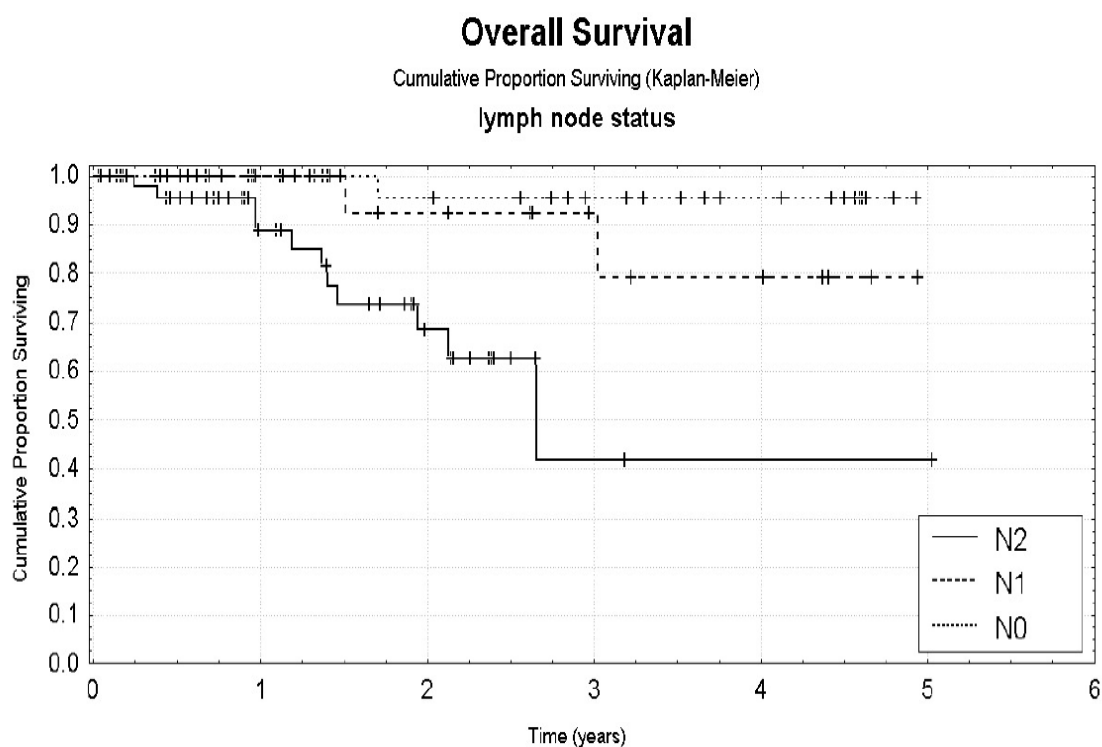
4 Statistické zpracování výsledků

Statistická analýza byla zpracována pomocí statistického softwaru Statistica 9.0. Průměr, medián, směrodatná odchylka (SD), minimum, maximum, kvartily, frekvence a další základní statistická měření byla vypočtena v daných skupinách a podskupinách pacientů ve vztahu ke studovaným klinickým a histopatologickým parametrům. Vztahy mezi proměnnými byly popsány za pomoci Spearmanova korelačního koeficientu. Pro zhodnocení celkového přežití a DFI byla použita Kaplan-Meierova metoda. Zhodnocení statistické významnosti sledovaných parametrů (klinické a histopatologické faktory) bylo provedeno Log-rank testem a Wilcoxonovým testem. Coxův regresní model, relativní riziko (HR) a 95% interval spolehlivosti (CI) pro HR byly použity pro zhodnocení daných klinických a histopatologických faktorů ve vztahu k celkovému přežití nebo DFI. Multivariační analýza byla provedena pomocí klasifikačních a regresních stromů (Classification and regression trees - CART). K nalezení prediktorů v CART byl použit Coxův regresní model.

5 Výsledky

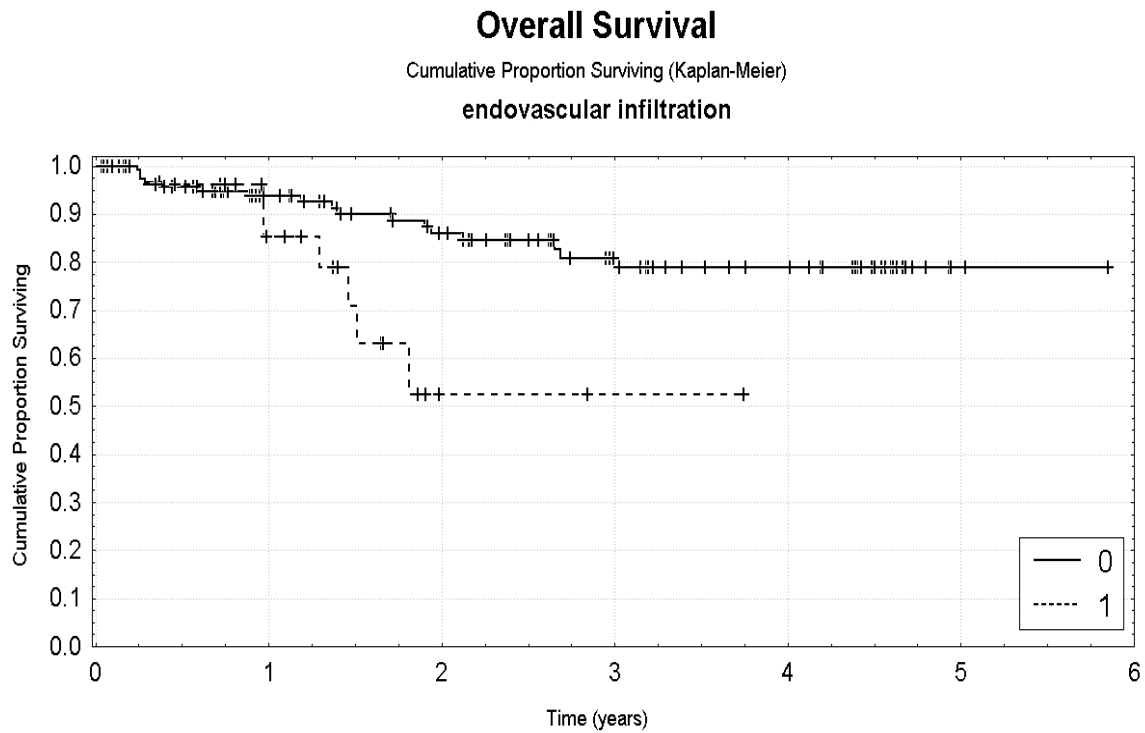
Statistická analýza sledovaného souboru pacientů po chirurgické léčbě KRK prokázala přiměřenou distribuci základních statistických popisů parametrů. Z hlediska pohlaví bylo v souboru 93 mužů a 57 žen. Průměrný věk u mužů byl 65,27 let a u žen 68,07 let. Celkové přežití bylo v 1., 3., a 5. roce 92,2 %, 76,5 % a 70,2 %. Bezpříznakový interval byl v 1., 3. a 5. roce 85,3 %, 64,3 % a 49,4 %. Spearmanův korelační koeficient neprokázal žádný silnější vztah mezi endolymfatickou invazí a infiltrací lymfatických uzlin u metastatického procesu (Spearmanův korelační koeficient 0,56, $p < 0,05$). Všechny ostatní studované faktory byly nezávislé nebo s nízkou korelací. Statistická analýza prokázala, že metastatická infiltrace lymfatických uzlin je statisticky významná pro prognózu celkové přežití ($p < 0,05$) a N2 stadium lymfatických uzlin zvyšuje riziko kratšího celkového přežití 9,3x (graf 1).

Graf 1 - Vztah postižení lymfatických uzlin a OS

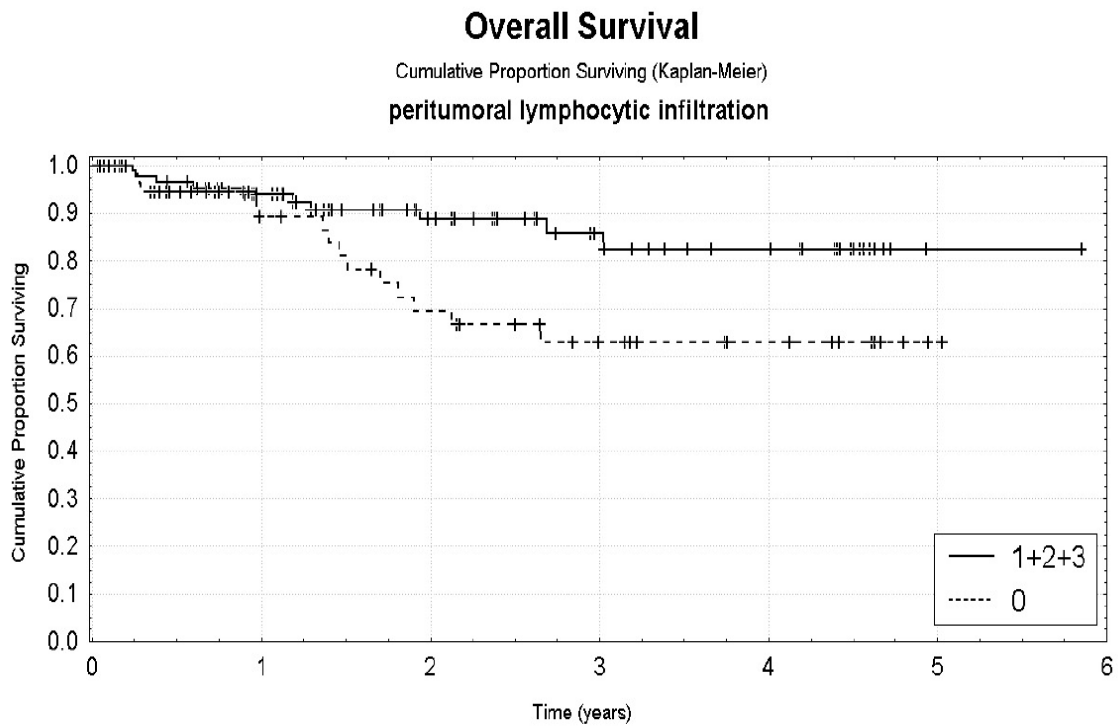


Endovaskulární infiltrace (VI) byla prokázána jako negativní prognostický faktor zkrácení celkového přežití (graf 2). Pacienti s pozitivním histopatologickým nálezem endovaskulární infiltrace měli 3,1x zvýšené riziko pro kratší OS. Přítomnost peritumorálních lymfocytů (graf 3) a Crohn-like PTL (graf 4) byla prokázána jako pozitivní prognostický faktor OS. Pacienti s pozitivním histopatologickým nálezem PTL a Crohn-like PTL mají 2,3x nižší riziko kratšího OS. Folikulární hyperplazie lymfatických uzlin (LN-FH) byla potvrzena jako pozitivní prognostický faktor pro delší celkové přežití (graf 5). Statistická významnost LN-FH souvisela také se zvýšenou hustotou infiltrace. LN-FH pozitivita snížila riziko kratšího celkového přežití 3,3x. Důležitost CD8+ lymfocytární infiltrace byla prokázána u Cox regresního modelu jako pozitivní prognostický faktor zvyšující OS (cut off 30 buněk / HPF). CD4+ lymfocytární infiltrace byla prokázána jako významný faktor pro prognózu OS (cut off 4 cells/HPF) s 2,5x vyšším rizikem u pacientů nad cut off (graf 6). Statistická analýza nepotvrdila statistický význam poměru CD8/CD4.

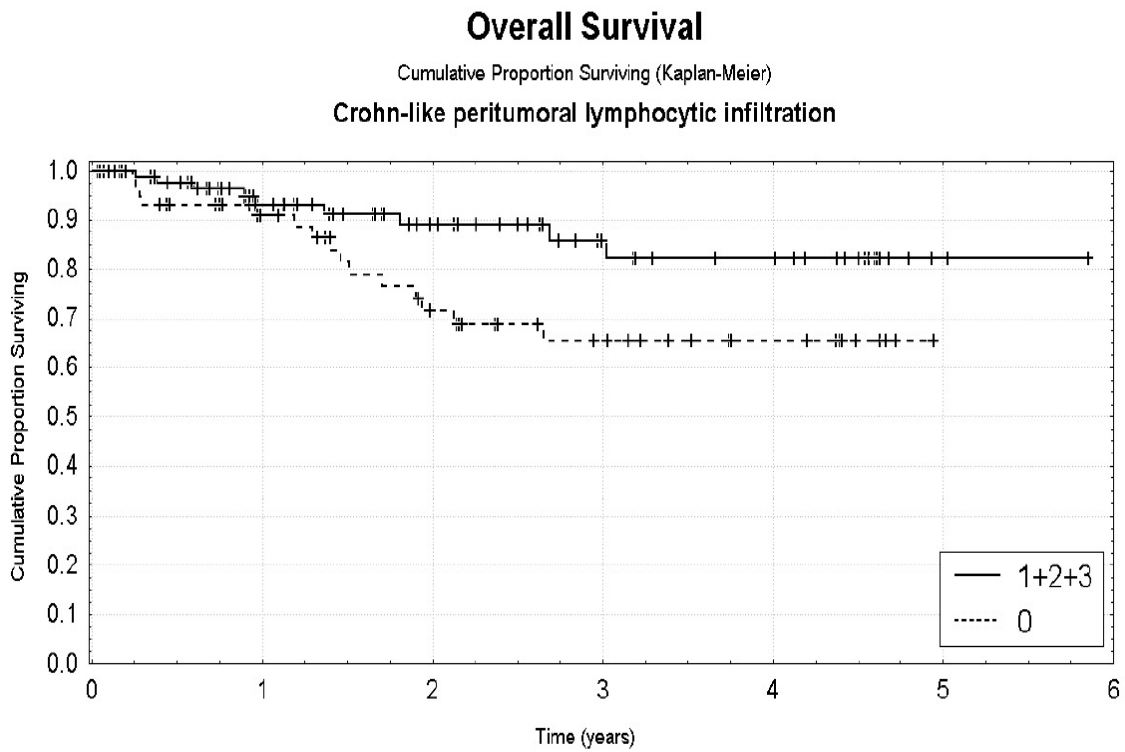
Graf 2 - Vztah přítomnosti endovaskulární infiltrace a OS ($p < 0,05$)



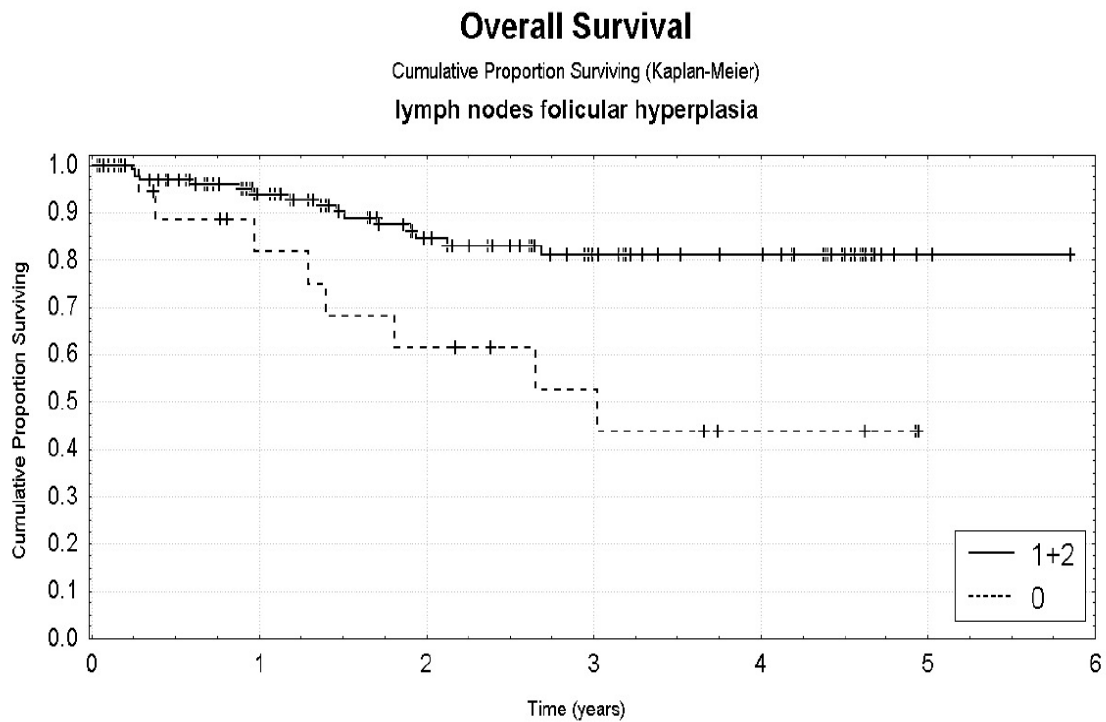
Graf 3 - Vztah přítomnosti infiltrace peritumorálních lymfocytů a OS ($p < 0,05$)



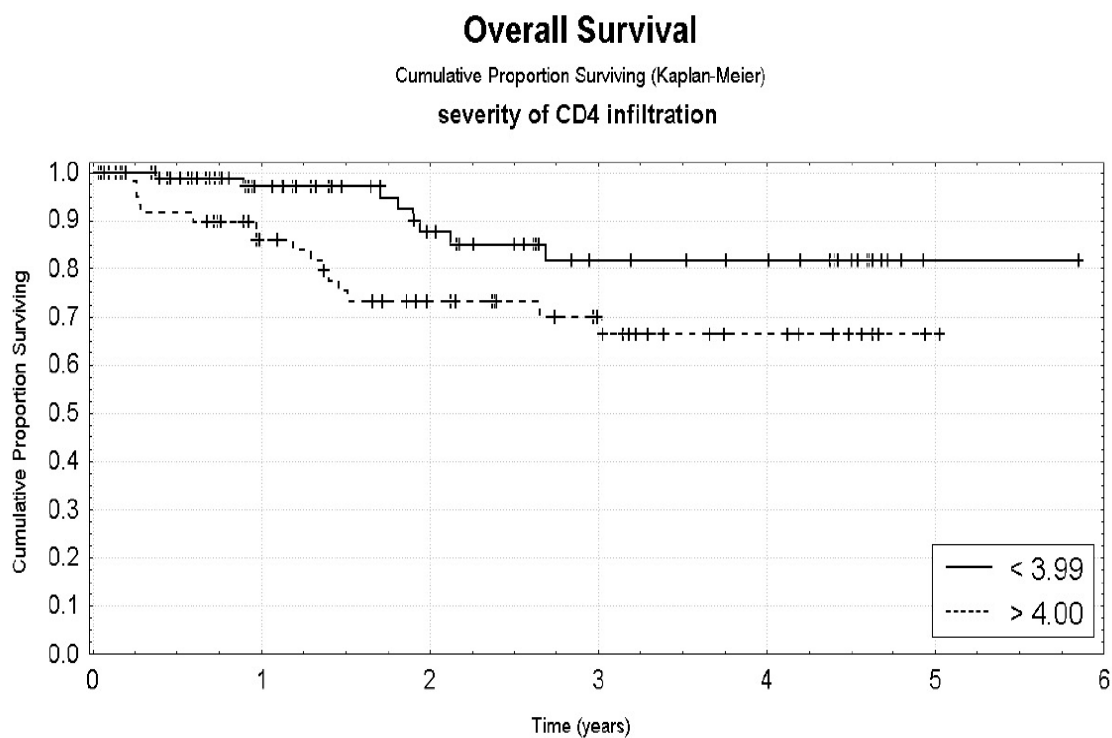
Graf 4 - Vztah Crohn-like PTL a OS ($p < 0,05$)



Graf 5 - Vztah folikulární hyperplazie lymfatických uzlin (LN-FN) a OS ($p < 0,05$)



Graf 6 - Vztah závažnosti intratumorální infiltrace CD4+ lymfocytů a OS ($p < 0,05$)

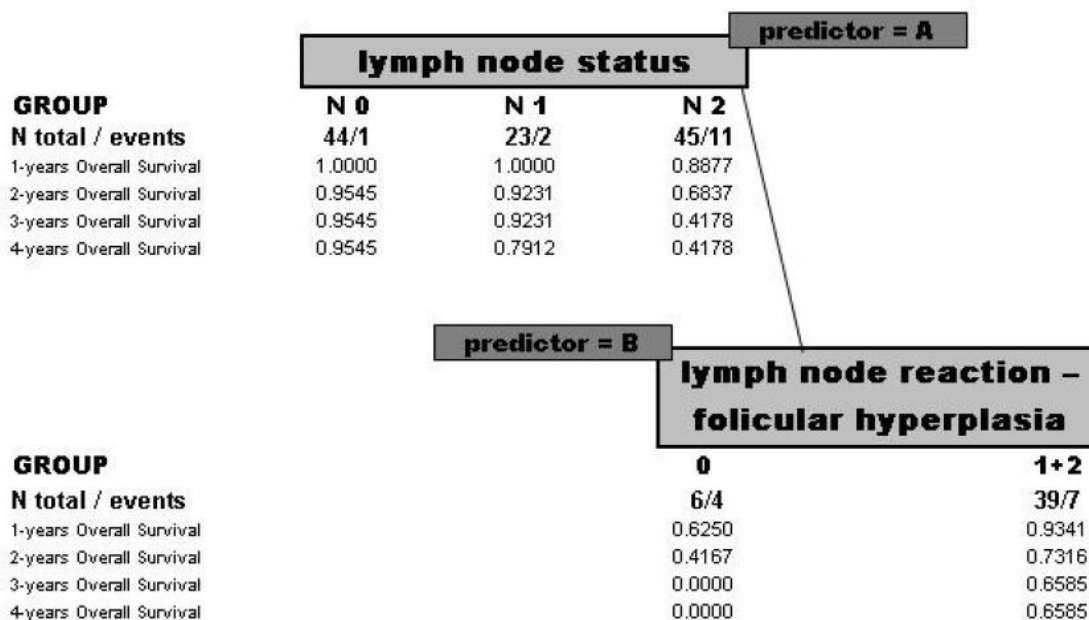


Multivariační Cox Regression Hazard Model ukázal, že kombinace závažnosti infiltrace lymfatických uzlin metastatickým procesem a LN-FH se jeví jako nejlepší prognostický faktor pro predikci rizika kratšího OS ($p < 0,05$). Tato situace je zobrazena v modelu CART (graf 7). Ostatní sledované parametry nebyly prokázány jako statisticky významné pro prognózu OS.

Graf 7 - CART model - vztah závažnosti infiltrace lymfatických uzlin a LN-FN a OS (p<0,05)

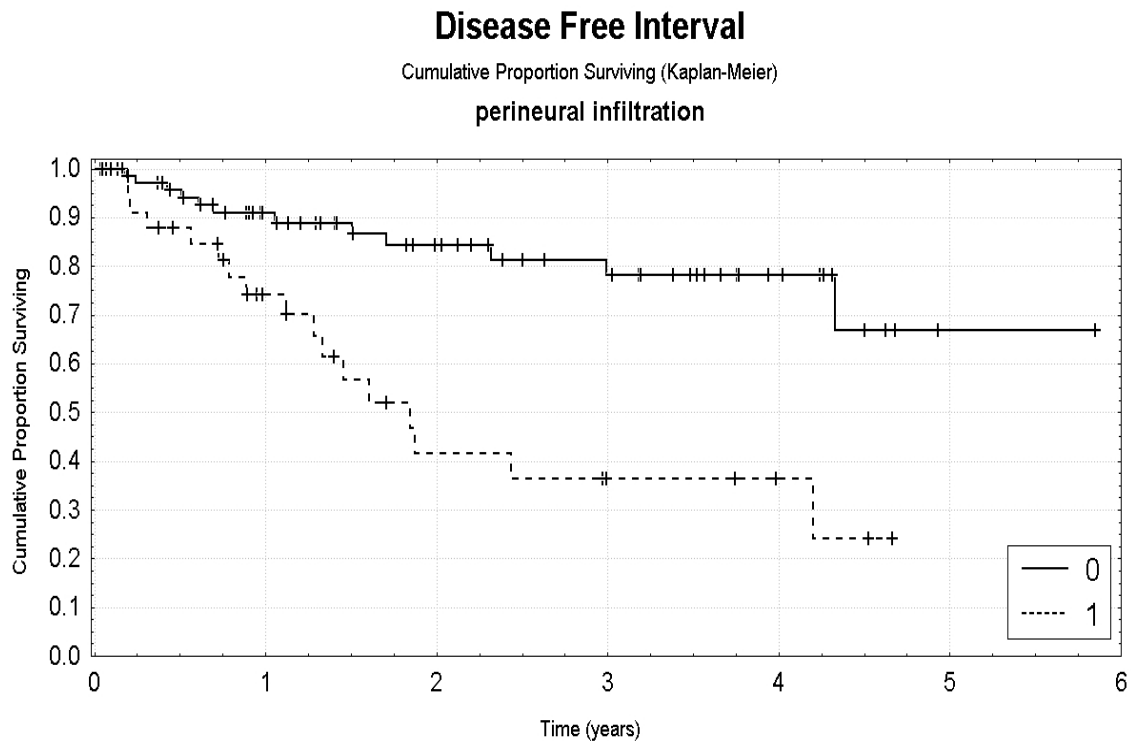
Classification and Regression Tree

Overall Survival

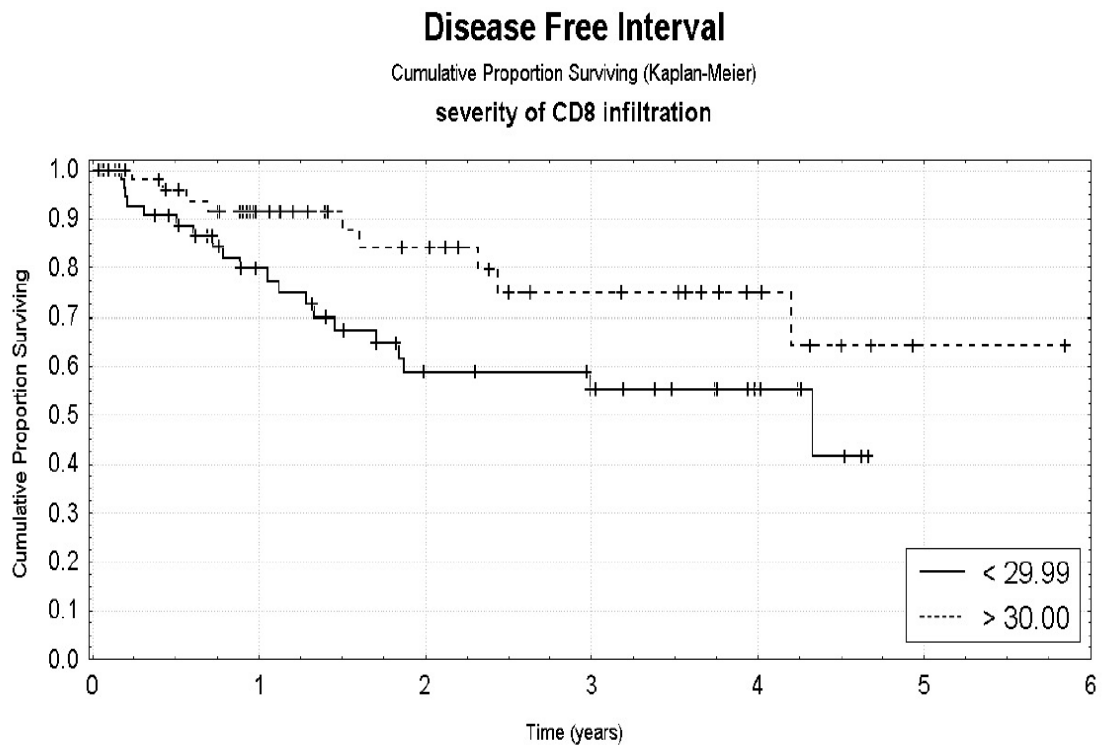


Perineurální infiltrace byla prokázána jako negativní prognostický faktor u časné recidivy (graf 8). Pacienti s pozitivním histopatologickým nálezem PI mají 3,8x zvýšené riziko kratšího DFI. Závažnost infiltrace CD8+ lymfocyty byla prokázána u Cox regresního modelu jako pozitivní prognostický faktor prodlužující DFI (cut off 30 cells/HPF) (graf 9). U pacientů nad cut off je 2,2x zvýšené riziko časné recidivy. Rozsah infiltrace CD4+ lymfocyty nebyl prokázán jako významný faktor pro prognózu DFI. Statistická analýza nepotvrdila statistickou významnost poměru CD8/CD4. Infiltrace lymfatických uzlin byla statisticky signifikantní pro prognózu DFI, N2 stadium lymfatických uzlin zvyšovalo 5x riziko zkrácení DFI (graf 10).

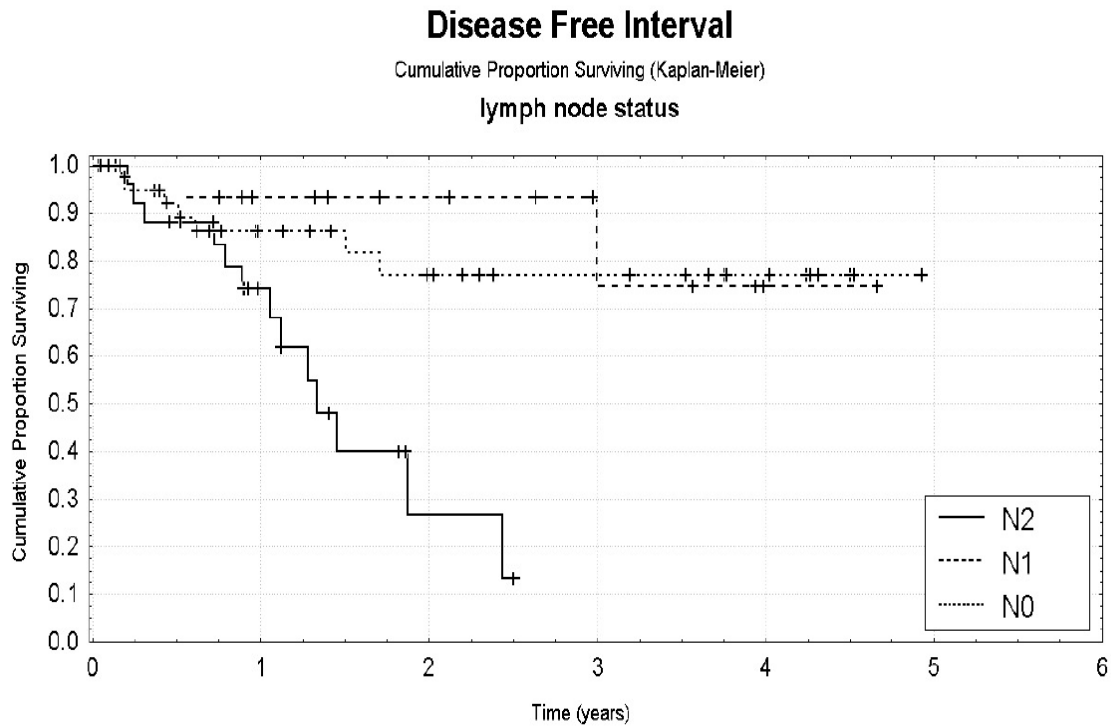
Graf 8 - Vztah perineurální infiltrace a DFI ($p < 0,05$)



Graf 9 - Vztah intratumorální infiltrace CD8+ lymfocyty a DFI ($p < 0,05$)



Graf 10 - Vztah infiltrace lymfatických uzlin a DFI ($p < 0,05$)

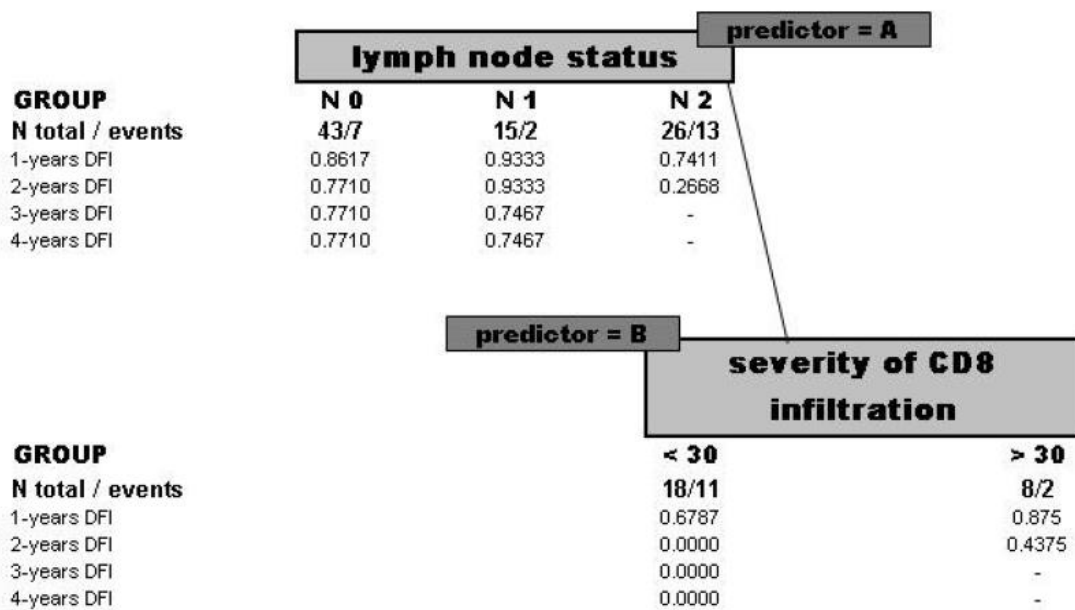


Multivariační Cox Regression Hazard Model prokázal, že kombinace závažnosti infiltrace lymfatických uzlin metastatickým procesem a závažnosti infiltrace CD8+lymfocyty se jeví jako nejlepší prognostický faktor pro predikci rizika časně recidivy ($p < 0,05$). Tato situace je zobrazena v modelu CART (graf 11). U všech ostatních sledovaných parametrů nebyla prokázána statistická významnost pro prognózu DFI.

Graf 11 - CART model - vztah závažnosti infiltrace lymfatických uzlin a závažnosti infiltrace CD8+ lymfocyty a DFI

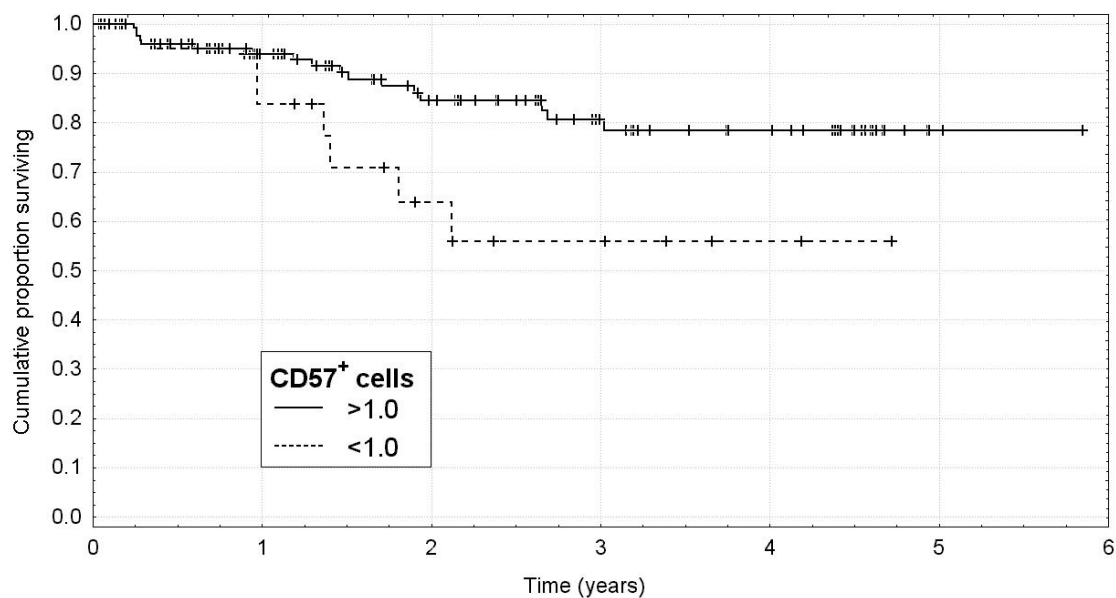
Classification and Regression Tree

Disease Free Interval



Infiltrace CD57+ lymfocytů v nádorové tkáni byla statisticky významným pozitivním prognostickým faktorem pro OS (cut-off 1 cell, p-value=0,0350) (graf 12). Riziko zkrácení OS bylo 2,5x vyšší u pacientů s nízkou infiltračí tumoru CD57+ lymfocyty. CART model ukázal, že kombinace N2 postižení lymfatických uzlin a nepřítomnost CD57+ je nejsilnějším negativním prognostickým faktorem OS (graf 13). Naopak se nepodařilo prokázat žádný statisticky signifikantní vliv infiltrace CD57+ lymfocyty na DFI (graf 14).

Graf 12 - Vztah CD57+ lymfocytů a OS



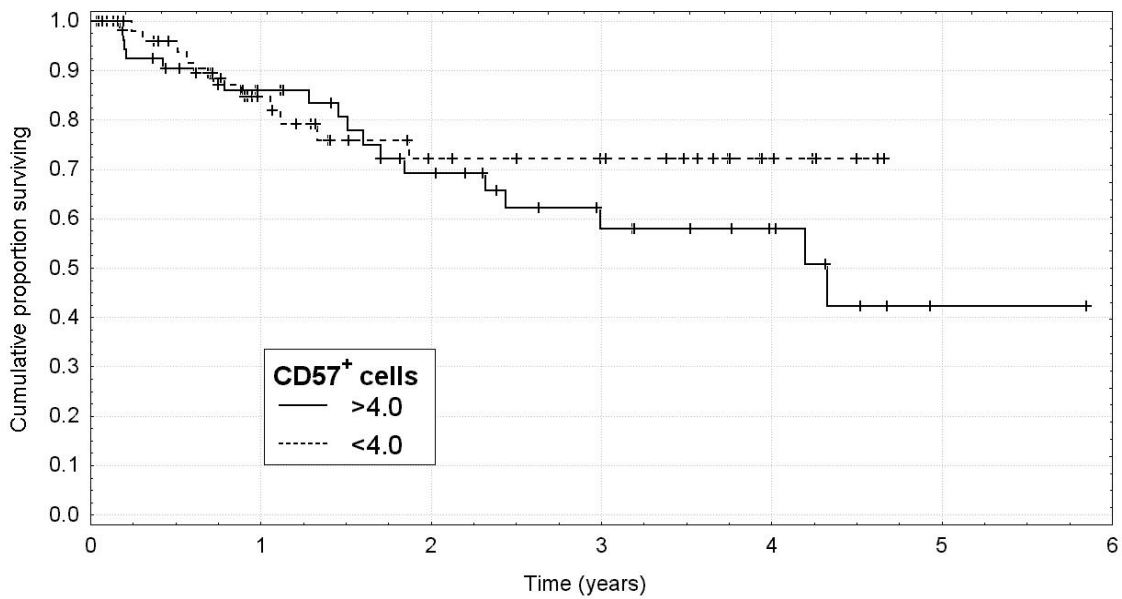
Graf 13 - CART model - vztah závažnosti infiltrace lymfatických uzlin a závažnosti infiltrace CD57+ lymfocyty a OS

Classification and regression tree

GROUP	N		
	N 0	N 1	N 2
N total / events	44/1	23/2	45/11
1-years overall survival	1.0000	1.0000	0.8877
2-years overall survival	0.9545	0.9231	0.6837
3-years overall survival	0.9545	0.9231	0.4178
4-years overall survival	0.9545	0.7912	0.4178

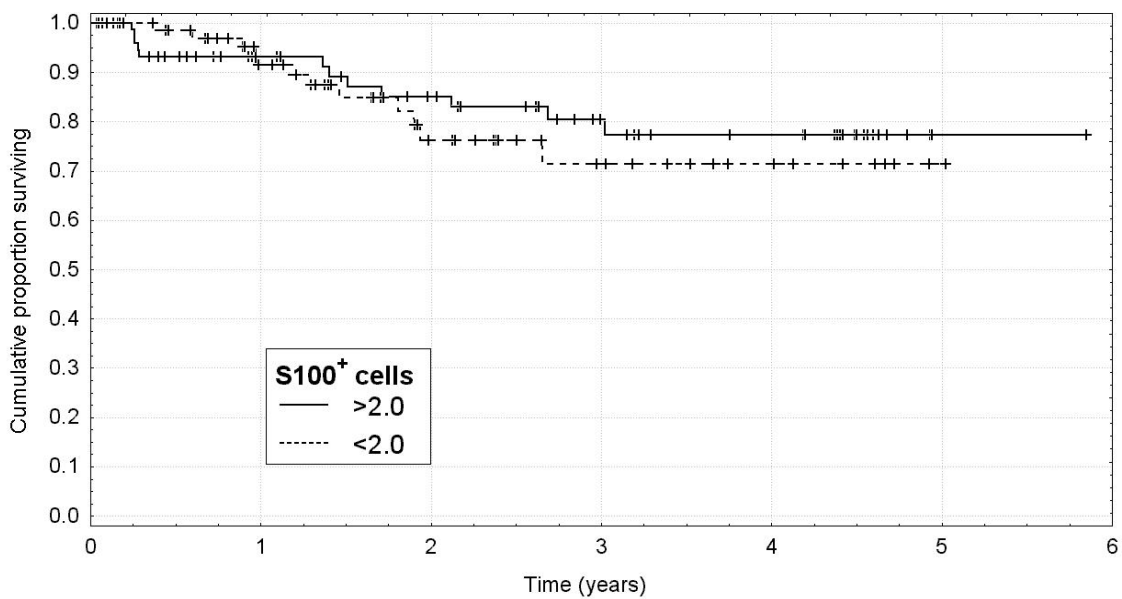
GROUP	CD57+ cells	
	> 1	< 1
N total / events	34/5	11/6
1-years overall survival	0.9688	0.6818
2-years overall survival	0.7863	0.4545
3-years overall survival	0.5242	-
4-years overall survival	0.5242	-

Graf 14 - Vztah infiltrace CD57+ lymfocyty a DFI (cut-off 4 cells, p=0,3415)

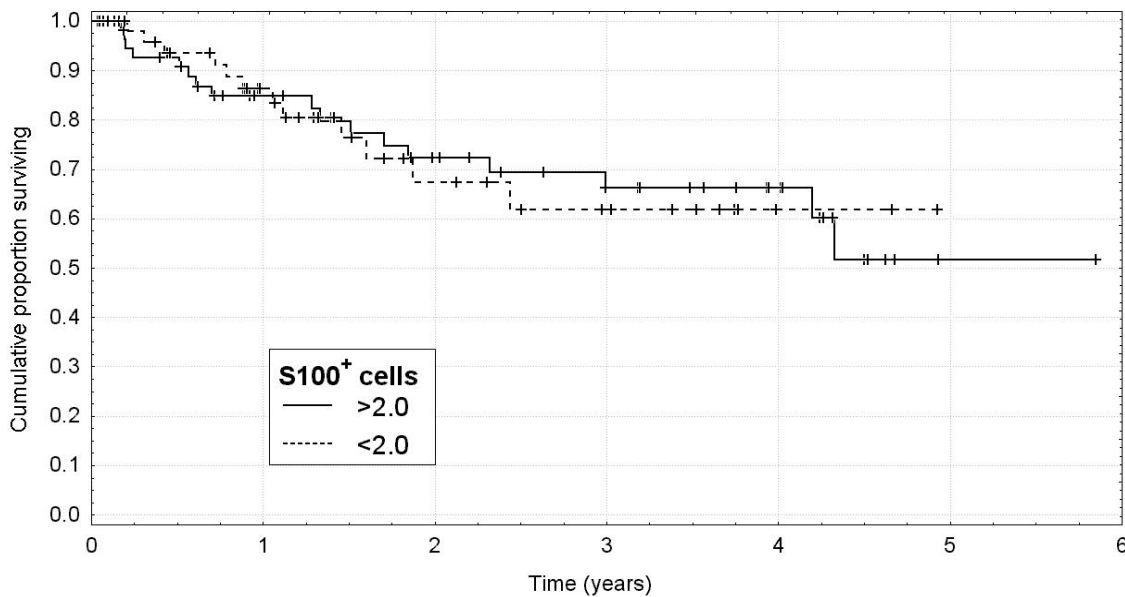


Nepodařilo se prokázat infiltraci S100+ jako statisticky signifikantní faktor z hlediska OS a DFI (graf 15 a 16). Dále se nepodařilo prokázat žádný statistický vztah mezi CD57+ a S100+ a předoperačně stanovenými hladinami CEA, CA19-9, CA72-4, TK, TPS nebo TPA.

Graf 15 - Vztah infiltrace S100+ k OS (cut-off 2 cells, p=0,5877)



Graf 16 - Vztah infiltrace S100+ a DFI (cut-off 2 cells, p=0,9173)



6 Diskuze

Úloha adaptivní imunitní odpovědi při kontrole růstu a relapsu KRK zůstává kontroverzní a současně studie nejsou schopny odpovědět na všechny otázky, které se týkají prognózy pacientů po radikální chirurgické léčbě KRK [26]. Analyzovali jsme soubor 150 pacientů po radikálních chirurgických výkonech pro kolorektální karcinom s cílem detekovat negativní nebo pozitivní prognostické faktory z hlediska časné recidivy onemocnění a zkrácení celkového přežití. Stimulem pro tuto studii byla současná neuspokojivá situace a některá dilemata provázející indikaci chirurgické a onkologické léčby, kdy časná recidiva znehodnocuje radikální smysl operačního výkonu. Navíc vlastní chirurgická operace může být zatížena celou řadou komplikací, které mimo jiné mohou výrazně snížit kvalitu života pacientů. Z tohoto důvodu jsme přistoupili ke studiu morfologie imunitních reakcí v bioptickém materiálu a to včetně imunohistochemických vyšetření.

V této klinicko-patologické studii jsme prokázali, že infiltrace lymfatických uzlin metastatickým procesem, N2 stadium postižení lymfatických uzlin, endovaskulární infiltrace a rozsah intratumorální infiltrace CD4+ lymfocyty jsou negativní prognostické faktory OS. Naopak výskyt peritumorálních lymfocytů, Crohn-like peritumorálních lymfocytů, folikulární hyperplazie lymfatických uzlin a rozsah intratumorální infiltrace CD8+ lymfocyty se ukázaly jako pozitivní prognostické faktory pro OS. Z tohoto vyplývá, že hlavní příčina progresu maligního onemocnění je v přímé souvislosti s postižením lymfatických uzlin nebo neuronálních zakončení. Opakem pak zůstává demonstrovatá tendence makroorganismu k „ohraničení“ maligního onemocnění - tzv. tumor control [27]. Poslední myšlenku

společně podtrhuje jednak vlastní reakce - infiltrace peritumorální tkáně imunitními buňkami makroorganismu - a také lokální reaktivita v podobě folikulární hyperplazie ve spádových lymfatických uzlinách.

Multivariačním modelem se podařilo prokázat, že kombinace faktorů rozsahu infiltrace lymfatických uzlin metastatickým procesem a LN-FH je statisticky významná z hlediska predikce rizika kratšího OS. Tento multivariační model slouží k vytipování nemocných s maximálním rizikem krátkého OS, tedy těch, jejichž prognóza je nejhorší a lze předpokládat i minimální tendenci aktivace imunitní kontroly progresu malignity. Při kumulaci faktorů je pak pravděpodobnost progresu i několikanásobně vyšší, než u pacientů s opačným profilem faktorů. Právě multivariační model je v současné době akceptován jako klinicky nejhodnotnější a lze jej maximálně využít v klinické praxi - indikace adjuvantní léčby apod.

V další části práce jsme se zabývali vztahem uvedených faktorů k DFI. Zde jsme prokázali, že perineurální infiltrace, metastatická infiltrace lymfatických uzlin a stav N2 lymfatických uzlin jsou negativní prognostické faktory časně recidivy. Rozsah intratumorální infiltrace CD8+ lymfocyty byl naopak stanoven jako pozitivní prognostický faktor prodlužující DFI. Kombinace rozsahu postižení lymfatických uzlin metastatickým procesem a rozsahu intratumorální infiltrace CD8+ lymfocyty se ukázala jako nejlepší prognostický faktor pro predikci rizika časně recidivy u multivariační analýzy Cox regresního hazard modelu. Naše výsledky podporují hypotézu, že adaptivní imunitní odpověď v nádorové tkáni a v regionálních lymfatických uzlinách může ovlivnit chování KRK, a tak může mít vliv na prognózu pacientů. Intratumorální infiltrace lymfocyty CD4+ a CD8+ byla prokázána jako klíčový histopatologický projev nádoru ve specifické imunitní odpovědi, což by mohlo být předobrazem aktuálního klinického stavu a tendence buď k časnému relapsu (CD4 +) nebo k prodloužení OS (CD8+) [28,29]. Infiltrace tumoru NK buňkami se zdá být slibným pozitivním prognostickým faktorem odrážejícím snížené riziko pro zkrácení OS. Infiltrace tumoru CD57+ byla prokázána jako pozitivní prognostický faktor radikálně operovaných pacientů s KRK.

Hodnotili jsme několik typů nádorových infiltrací lymfocyty s cílem jasně identifikovat jejich vztahy k recidivě a OS jako pozitivní nebo negativní prognostické faktory. V některých případech byla tato hodnocení publikována jako prioritní - předchozí publikace hodnotily pouze infiltraci nádoru, ale ne kvalitu a typ infiltrace [30].

TIL a NK buňky se jeví jako slibné prognostické faktory s výhledem identifikace pacientů s vyšším rizikem k časně recidivě nebo zkrácení OS.

Předpokládáme využití našich výstupů v rámci klinické praxe. Většina námi uvedených vyšetření je prováděna během rutinního histopatologického vyšetření a jejich zavedením do klinické praxe jsme získali další hodnotné faktory, které lze využívat hlavně při zvažování podání adjuvantní onkologické

léčby v hraničních případech a dále při rozhodování o důkladnější dispenzarizaci pacientů nad rámec doporučení akceptovaných v kolorektální chirurgii (pacient s vysokým rizikem časně recidivy).

Naše práce však otevřela i další otázky spojené s porozuměním vlastní funkce a reaktivitě imunitního systému. Je proto žádoucí, aby se případné další práce zaměřily na molekulárně-biologické pozadí nádorové infiltrace lymfocyty se snahou o pochopení jejich patofyziologických funkcí [31].

7 Závěry

Podařilo se nám prokázat, že histologický a imunohistochemický profil TIL a NK buněk odpovídá stavu imunitního systému z hlediska kontroly progresu nádoru.

Na začátku studie se zdály TIL a NK buňky jako slibné prognostické faktory, které by mohly najít uplatnění v komplexní péči o KRK. V průběhu studie se nám podařilo prokázat prognostický potenciál TIL a NK buněk. V současné době již využíváme výsledků této studie v klinické praxi. Na základě histologické klasifikace TIL a NK buněk jsme schopni aktivně identifikovat pacienty s horší prognózou a u nich cíleně zintenzivnit onkologickou léčbu a dispenzarizaci. Výzkum bude pokračovat v určování dalších imunohistochemických znaků imunitních buněk podílejících se na kontrole progresu malignity s přesahem do molekulární biologie s cílem vysvětlit i fyziologii a patofyziologii těchto procesů.

8 Seznam použitých zkratek

APC	antigen prezentující buňky
Ca	carbohydrate antigen
CART	classification and regression trees
CEA	carcinoembryonic antigen
KRK	kolorektální karcinom
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
DC	dendritic cells
DFI	disease free interval - bezpříznakové přežití
Foxp3+	T regulační buňky
Fas-L	fas ligand
HLA-E	human leukocyte antigen E
HR	hazard ratio - relativní riziko
IFN	interferon
IL	interleukin
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptor
MICA	MHC class I chain-related A molecules
MUC1	mucin 1
NK cells	natural killer cells - přirozený zabíječ
NF- κ B	nuclear factor- κ B
OS	overall survival - celkové přežití
PFS	období bez progrese onemocnění
PGE2	prostaglandin E2
REA	radioenzymatická analýza
SD	standard deviation - směrodatná odchylka
TIL	tumor infiltrující lymfocyty
TGF	transforming growth factor
TK	tymidinkináza
TPA	tissue polypeptide antigen
TPS	tissue polypeptide specific antigen
Treg	T regulační lymfocyty
TYMS	tymidylát syntetáza

9 Literatura

1. Atreya, I., Neurath, M.F. Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2008; 8,4.
2. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B et al. Type, density and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006; 313,5795: 1960-64.
3. Talmadge, J.E., Donkor, M., Schlar, E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer and Metastasis Review*. 2007; 26: 373-400.
4. Jochems, C., Schlom, J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp. Biol Med (Maywood)*. 2011; 236: 567-79.
5. Ohtani, H. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer immunity*. 2007; 7: 4.
6. Pages, F., Berger, A., Camus, M., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B, Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., Meatchi, T., Bruneval, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H., Galon, J. Effector memory T cells, early metastasis and survival in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2005; 353: 2654-2666.
7. Koike, T., Kimura, N., Miyazaki, K., et al. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin - ligand carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 8132-8137.
8. Somasundaram, R., Jacob, L., Swoboda, R., et al. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor - beta. *Cancer Res*. 2002; 62: 5267-5272.
9. Menon, A. G., Janssen-van Rhijn, C. M., Morreau, H., et al. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab. Invest*. 2004; 84: 493-501.
10. Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari, M., Moretta, A.: Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interaction. *Immunological Reviews*. 2006; 214: 219-228.
11. Cooper, M., Fehniger, T.A, Caligiuri, M.A.: The biology of human natural killer - cell subsets. *Trends in Immunology*. 2001; 22: 633-640.
12. Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., Diefenbach, A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans - presenting interleukin 15. *Immunity*. 2007; 26: 503-517.
13. Ljunggren, H.G., Malmberg, K.J. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature Reviews. Immunology*. 2007; 7: 329-339.

14. Stojanovic, A., Cerwenka, A. Natural Killer cells and solid tumors. In: *Journal of Innate Immunity* 10.6.2011, Available from:
<http://content.karger.com/produktedb/produkte.asp?doi=325465>.
15. Cooper M., Colonna M., Yokoyama WM.: Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *Embo reports*. 2009; 10: 1103-1110.
16. Mocikat, R., Braumuller, H., Gummy, A., et al. Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*. 2003; 19: 561-569.
17. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., et al. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res*. 2006; 66: 5527-5536.
18. Sandel, M.H., Dadabayev, A.R., Menon, A.G., Morreau, H., Melief, C.J., Offringa, R., van der Burg, S.H., Janssen-van Rhijn, C.M., Ensink, N.G., Tollenaar, R.A, van de Velde, C.J, Kuppen, P.J. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11: 2576-2582.
19. Steinman, R.M., Hawiger, D., Nussenzweig, M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2004; 21: 685-711.
20. Pollard, J.W. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*. 2004; 4,1: 71-78.
21. Forssell, J., Oberg, A., Henriksson, M.L., Stenling, R., Jung, A., Palmquist, R. High macrophage infiltration along tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007; 1: 1472-1479.
22. Smyth, M. J., Dunn, G. P., Schreiber, R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* 2006; 90: 1-50.
23. Hayday, A., Tigelaar, R. Immunoregulation in the tissues by $\gamma\delta$ T cells. *Nature Rev. Immunol.* 2003; 3: 233-242.
24. Pospisil, M., Bezouska, K., Campa, M., et al. Mechanisms of NK recognition and activation based on lectin-saccharide interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1995; 371: 307-311.
25. Lipská, L., Visokaj, V. a kolektiv: Recidiva kolorektálního karcinomu. 2009; 62.
26. Van den Eynde, M., Hendlisz, A. Treatment of colorectal liver metastasis: a review. *Reviews on Recent Clinical Trials*. 2009; 4: 56-62.
27. Chiba, T., Ohtani, H., Mizoi, T., Naito, Y., Sato, E., Nagura, H., Ohuchi, A., Ochuchi, K., Shiiba, K., Kurokawa, Y., Satomi, S. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a

- Langer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *British Journal of Cancer*. 2004; 91: 1711-1717.
28. Koch, M., Beckhove, P., Op den Winkel, J. et al. Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxin activity in situ. *Annals of Surgery*. 2006; 244,6: 986-992.
29. Pages, F., Galon, J., Die-Nosjeanu, M.C. et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010; 29,8: 1093-1102.
30. Ogino, S., Nosho, K., Iraha, N., Meyerhardt, J.A., Baba, Y. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with Langer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylation phenotype. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15: 6412-6420.
31. Zbar AP: The immunology of colorectal cancer. *Surgical Oncology*. 2004; 13: 45-53.

10 Souhrn

Novák P.: Tumor infiltrující lymfocyty jako prognostický faktor kolorektálního karcinomu po radikální chirurgické léčbě.

Úvod: Kolorektální karcinom patří mezi nejčastější maligní onemocnění a představuje celosvětový problém. Česká republika patří mezi země s nejvyšším výskytem KRK vůbec. Boj s tímto onemocněním se odehrává na několika liniích jako je prevence, vlastní chirurgická a onkologická léčba a v neposlední řadě i odhad prognózy a správné stanovení individuální léčby.

Cíl: Analyzovat vztah současných klinických a histopatologických faktorů a tumor infiltrujících lymfocytů, dendritických a „natural killer“ buněk. Dalším cílem byla detekce pacientů s vysokým rizikem zhoršeného celkového přežívání a tendencí k časně recidivě malignity a tím i zkrácení bezpříznakového intervalu po radikálních chirurgických výkonech pro KRK.

Metodika: Analýza souboru 150 pacientů (93 mužů a 57 žen), kteří byli léčeni na Chirurgické klinice FN Plzeň v období 2004-2007. Podmínkou zařazení do souboru byla radikální chirurgická operace. Ze souboru byli vyřazeni pacienti, u kterých bylo riziko ovlivnění imunitního systému jiným procesem. Hodnotili jsme endovaskulární (VI), endolymfatickou (LI) a perineurální infiltraci (PI) rakovinovými buňkami (0 - žádná, 1 - ano). Infiltrace tumoru byla detekována jako intratumorální (ITL), intrastromální (ISL), peritumorální (PTL) a Crohn-like reakce (Crohn-like PTL). Stupnice hodnocení byla: žádná (0), mírná (1), střední (2) a závažná (3). Reaktivní histologické změny v lymfatických uzlinách (LN) byly popsány jako folikulární hyperplazie (LN-FH), sinusová histiocytóza (LN-SH) a přítomnost granulomů (LN-GR). Kvantifikovali jsme také imunohistochemickou expresi CD4+, CD8+, CD57+ a S100 znaků na imunitních buňkách. Všechny tyto parametry byly kvantifikovány stejným způsobem z hlediska lymfocytární infiltrace. Sledované parametry byly statisticky analyzovány ve vztahu k bezpříznakovému intervalu (DFI) a celkovému přežití (OS).

Diskuze: Autoři prokázali, že negativní prognostické faktory OS jsou infiltrace lymfatických uzlin metastatickým procesem, N2 stadium postižení lymfatických uzlin, endovaskulární infiltrace a rozsah intratumorální infiltrace CD4+ lymfocyty. Pozitivní prognostické faktory OS jsou výskyt peritumorálních lymfocytů, Crohn-like peritumorálních lymfocytů, folikulární hyperplazie lymfatických uzlin, rozsah intratumorální infiltrace CD8+ lymfocyty a infiltrace tumoru CD57+. Negativní faktory DFI jsou perineurální infiltrace, metastatická infiltrace lymfatických uzlin a stav N2 lymfatických uzlin. Intratumorální infiltrace CD8+ lymfocyty je naopak faktor prodlužující DFI. Multivariační analýza prokázala kombinaci závažnosti infiltrace lymfatických uzlin metastatickým procesem a závažnosti infiltrace CD8+ lymfocyty jako nejlepší prognostický faktor pro predikci rizika časně recidivy ($p < 0,05$).

Závěry: Tumor infiltrující lymfocyty a NK buňky se zdají být slibnými prognostickými faktory, které by mohly najít své uplatnění v kolorektální chirurgii a následně onkologické léčbě jako ukazatel typu nebo kombinace typů terapie, která by byla účelně aplikována u pacientů, u kterých by se dalo předpokládat větší riziko časně recidivy anebo zkrácení celkového přežití. Stav tumor infiltrujících lymfocytů a NK buněk odpovídá stavu imunitnímu systému z hlediska kontroly progresu rakoviny.

Klíčová slova: Tumor infiltrující lymfocyty, CD4+, CD8+, CD57+, dendritické buňky, prognostické faktory, celkové přežití, bezpříznakové přežití.

3 Summary

Novák P.: Tumor infiltrating lymphocytes as prognostic factor of colorectal cancer after radical surgical treatment

Background: Colorectal cancer (CRC) belongs among the most frequent malignant diseases and represents worldwide problem. Czech Republic has one of the highest incidence of CRC. The fight against this disease is kept in many lines as preventive, surgical and oncological treatment and very important part is also the estimation of prognosis and suggestion of individual treatment.

Aim: The aim of this study was to analyze the relation of contemporary clinical and histopathological factors and tumor infiltrating lymphocytes, dendritic and natural killer cells. The next aim was to differentiate the patients with high risk of shortened overall survival and tendency to early recurrence of CRC after radical surgical treatment.

Methods: We analyzed the group of 150 patients (93 men, 57 women) that were operated on at the Department of Surgery of Teaching Hospital in Pilsen between 2004 and 2007. The important condition for inclusion into the study was radical operation. We excluded patients with any disease that could influence immunological reactivity. We examined endovascular, endolymphatic, perineural infiltration by tumor cells (0 – none, 1 positive). Infiltrations of tumor by lymphatic cells were intratumoral, intrastromal, peritumoral and Crohn-like reaction. The scale for evaluation was: none (0), mild (1), medium (2) and severe (3). Reactive histological changes in lymphatic nodes were described as follicular hyperplasia, sinuses histiocytosis and presence of granulomas. We quantified also immunohistochemical expression of CD4+, CD8+, CD57+ and S100 patterns on immune cells. All these parameters were analyzed by statistical examination in relation to overall and disease free survival.

Discussion: We proved that negative prognostic factors of overall survival are metastatic proves in lymph nodes, N2 status of affliction of lymph nodes, endovascular infiltration and extension of intratumoral infiltration by CD+ lymphocytes. Positive prognostic factors of overall survival were presence of peritumoral lymphocytes, Crohn-like peritumoral lymphocytes, follicular hyperplasia of lymph nodes, the extension of intratumoral infiltration by CD8+ lymphocytes and CD57+. Perineural infiltration, metastatic infiltration of lymph nodes and N2 status of lymph nodes were proved as negative prognostic factors of disease free survival. Intratumoral infiltration by CD8+ is factor that prolongs disease free survival. Multivariate analysis proved combination of CD8+ infiltration and lymph node affliction by metastatic process as most important for prediction of risk of early recurrence ($p < 0,05$).

Conclusion: Tumor infiltrating lymphocytes and NK cells seems to be promising prognostic factors that could find their application in colorectal surgery and following oncological treatment as key indicator for individualized treatment. The status of tumor infiltrating lymphocytes reflects immune system from the view of tumor control.

Key words: tumor infiltrating lymphocytes, CD4+, CD8+, CD57+, dendritic cells, prognostic factors, overall survival, disease free survival.