

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Lékařská fakulta v Plzni



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

Disertační práce

MUDr. Petr Novák

Chirurgická klinika LF UK v Plzni 2014

Prohlášení k autorství

Prohlašuji, že jsem předloženou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl veškeré použité informační zdroje v souladu s metodickým pokynem o dodržování etických principů při přípravě disertačních prací. Na odběrech vzorků a jejich zpracování se podíleli kolegové z chirurgické kliniky, z ústavu patologie a radioimunologické laboratoře Fakultní nemocnice v Plzni.

Souhlasím s půjčováním disertační práce

MUDr. Petr Novák

V Plzni 2014

Obsah

1 Poděkování.....	5
2 Souhrn	6
3 Summary	7
4 Seznam použitých zkratek.....	8
5 Úvod	11
6 Screening kolorektálního karcinomu	13
7 Diagnostika kolorektálního karcinomu	14
7.1 Koloskopické vyšetření.....	14
7.2 Ultrasonografické vyšetření	14
7.3 Peroperační ultrasonografické vyšetření jater.....	15
7.4 Magnetická rezonance	15
7.5 Výpočetní tomografie.....	16
8 Léčba kolorektálního karcinomu	17
8.1 Chirurgická léčba	17
8.2 Onkologická léčba karcinomu rekta	21
9 Recidiva kolorektálního karcinomu	21
9.1 Jaterní metastázy	22
9.2 Plicní metastázy.....	23
9.3 Lokální recidiva.....	24
10 Prognóza kolorektálního karcinomu	25
11 Biologická aktivita tumoru	28
11.1 Cirkulující nádorové buňky.....	28
11.2 KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog).....	28
11.3 BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene).....	29
11.4 PI3KCA (Phosphatidyl-inositol-3-kináza).....	29
11.5 Genetické subtypy KRK.....	30
12 Vztah imunitního systému a kolorektálního karcinomu	33
12.1 CD8+ T lymfocyty.....	36
12.2 CD4+ T lymfocyty.....	36
12.3 NK buňky	36
12.4 Dendritické buňky	37
12.5 Makrofágy	37
12.6 Morfologická hlediska TIL.....	38
13 Cíle disertační práce	42
14 Metodika	42
14.1. Histopatologické hodnocení.....	42

14.2. Imunohistochemie	43
14.3. Onkomarkery.....	43
15 Statistické zpracování výsledků.....	44
16 Výsledky.....	44
17 Diskuze	54
18 Závěry	56
19 Literatura.....	57
29 Publikace autora.....	69
21 Přílohy	71

1 Poděkování

Rád bych poděkoval všem osobám, bez jejichž přispění by tato práce nevznikla. Přednostně bych chtěl poděkovat prof. MUDr. Vladislavu Třeškovi, DrSc. za poskytnutí námětu a kontrolu práce po odborné stránce. Dále bych chtěl poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Josefovi Vodičkovi, Ph.D. za odborné vedení a podporu při psaní této disertační práce. Další, kdo si zasluhuje poděkování, je as. MUDr. Václav Liška Ph.D., který se velkou mírou zasloužil o zpracování dat a jejich prezentaci. Tato práce by nemohla vzniknout bez podpory kolegů z ústavu patologie, jmenovitě doc. MUDr. Ondřeje Dauma Ph.D. a kolegů z chirurgické kliniky, jmenovitě MUDr. Ondřeje Vyčítala. Poděkování si také zaslouží zdravotní sestry na odděleních a operačních sálech chirurgické kliniky, které se podílely na odběrech biologického materiálu. Velkou pomocí byla i spolupráce s kolegy z radioimunologické laboratoře. Všechna pracoviště patří pod hlavičku Fakultní nemocnice v Plzni. Za pomoc při statistickém zpracování dat patří poděkování Ing. Stanislavu Kormundovi. V neposlední řadě bych rád poděkoval za trpělivost a podporu své rodině, hlavně manželce Martině. Tato práce by nevznikla bez finanční podpory grantů MZ CR IGA 12025 a 14329.

2 Souhrn

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

Úvod: Kolorektální karcinom (KRK) 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 následné 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 imunitního 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.

4 Seznam použitých zkratek

5-FU	5-fluorouracil
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
APC	antigen prezentující buňky
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BMI	body mass index
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene
CA	carbohydrate antigen
CART	classification and regression trees
CEA	carcinoembryonic antigen
CIMP	metylované CpG ostrůvky
CIN	chromozomální nestabilita
KRK	kolorektální karcinom
CRM	circumferential resection margin
CT	computed tomography - počítačová tomografie
CTL	cytotoxické T lymfocyty
DC	dendritic cells
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DFI	disease free interval - bezpříznakové přežití
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
ERCC1	excision repair cross - complementation Group 1
EUS	endoskopická ultrasonografie
Foxp3+	T regulační buňky
Fas-L	fas ligand
Gy	Gray (jednotka absorbované dávky záření)

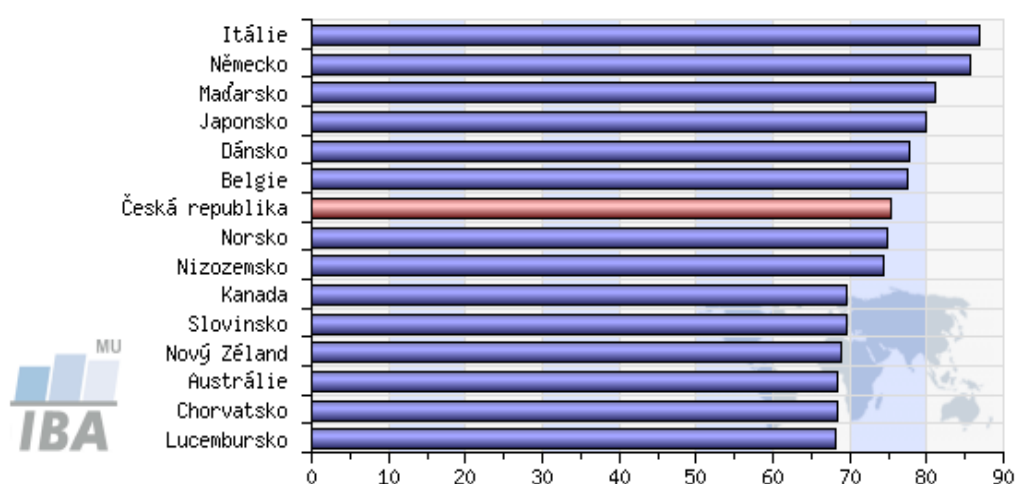
HLA-E	human leukocyte antigen E
HR	hazard ratio - relativní riziko
IFN	interferon
IL	interleukin
IOUS	intraoperative ultrasound - peroperační ultrasonografie
KIR	killer cell immunoglobulin - like receptor
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MHC	major histocompatibility komplex
MICA	MHC class I chain - related A molecules
MIS	mikrosatelitní nestabilita
MMR	mis-match repair systém
moAb	monoklonální protilátka
MR	magnetická rezonance
MUC1	mucin 1
NK cells	natural killer cells - přirozený zabíječ
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NOTES	natural orifice transluminal endoscopic surgery
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
OS	overall survival - celkové přežití
PFS	období bez progresu onemocnění
PGE2	prostaglandin E2
PI3KCA	phosphatidyl-inositol-3-kináza
PTEN	phosphatase and tensin homolog

RFA	radiofrekvenční ablace
REA	radioenzymatická analýza
SD	standard deviation - směrodatná odchylka
SMLA	systematická mediastinální lymfadenektomie
TIL	tumor infiltrující lymfocyty
TEM	transanální endoskopická mikrochirurgie
TGF	transforming growth factor
TK	tymidinkináza
TME	totální mezorektální excize
TNF	tumor nekrotizující faktor
TOKS	testy na okultní krvácení do stolice
TPA	tissue polypeptide antigen
TPS	tissue polypeptide specific antigen
Treg	T regulační lymfocyty
TYMS	tymidylát syntetáza
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
US	ultrasonografie
VEGF	vascular endothelial growth factor

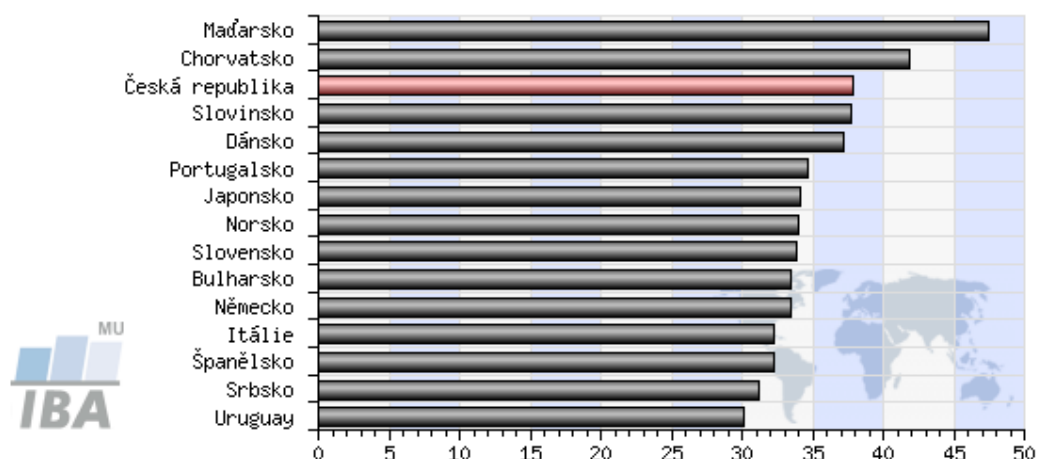
5 Úvod

Kolorektální karcinom (KRK) patří mezi nejčastější malignity a zaujímá druhé místo v incidenci u obou pohlaví. U žen je v pořadí za karcinomem prsu a u mužů za karcinomem prostaty. Ve světových tabulkách se Česká republika řadí mezi státy s nejvyšší incidencí a v mortalitě jsme dokonce na třetím místě za Maďarskem a Chorvatskem (obrázek 1,2).

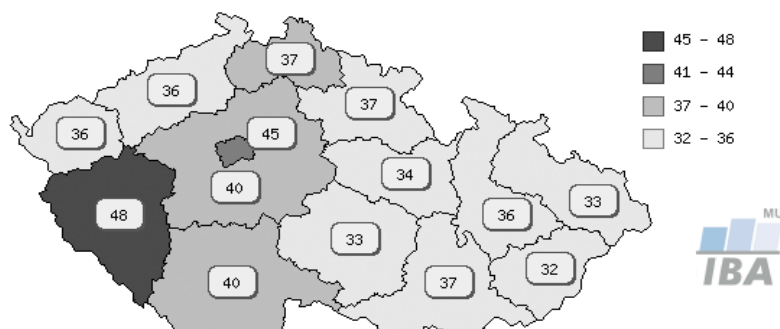
Obrázek 1 - Srovnání incidence kolorektálního karcinomu v ČR v přepočtu na 100 000 osob



Obrázek 2 - Srovnání mortality kolorektálního karcinomu v ČR v přepočtu na 100 000 osob



Obrázek 5 - Mortalita kolorektálního karcinomu v ČR



6 Screening kolorektálního karcinomu

KRK je onemocnění, které je velmi dobře ovlivnitelné prevencí. Prognóza tohoto onemocnění je velmi závislá na jeho stadiu. U časných stádií je dlouhodobé přežití až 90 %, bohužel u pozdních stádií je to jen 10 a méně %. Proto by měla být snaha o zachycení KRK v počátečních stádiích. K tomuto účelu slouží screeningové programy. Prevenci můžeme obecně rozdělit na primární a sekundární. K primární prevenci patří úprava životního stylu a životosprávy. Z hlediska ovlivnění epidemiologie KRK je důležitější sekundární prevence. Screeningem rozumíme časnou diagnostiku choroby u bezpříznakových jedinců. Požadavkem na screeningové metody je, aby byly levné, jednoduché, nezatěžující a měly minimálně falešně pozitivních výsledků. V současnosti lze využívat dvouetapový nebo jednoetapový screeningový program. U dvouetapového následuje koloskopické vyšetření v případě pozitivního testu na okultní krvácení do stolice (TOKS). TOKS by měl být prováděn od 50 let věku v jednoročním intervalu. U jednoetapového screeningového programu se rovnou provádí koloskopické vyšetření v 55 letech. Tyto screeningové programy jsou zaměřené na asymptomatické nízkorizikové skupiny obyvatelstva. Incidence KRK roste s věkem. Je známo, že 80 % KRK vzniká po 50. roce života, proto byl tento věk stanoven jako hranice, nad kterou by mělo být aktivní vyhledávání tohoto onemocnění. Pečlivější aktivní screening se provádí u vysokorizikových skupin obyvatelstva, kam patří jedinci s hereditárními syndromy, pacienti s nespecifickými střevními záněty, jedinci s pozitivní rodinnou anamnézou. Záchyt asymptomatického jedince je prvním krokem v rámci diagnostiky KRK [2].

7 Diagnostika kolorektálního karcinomu

7.1 Koloskopické vyšetření

Koloskopické vyšetření je stále nejdůležitějším vyšetřením v rámci stanovení diagnostiky KRK. Pro endoskopickou praxi je klíčová znalost vzhledu neoplastických lézí. Od roku 2003 se používá Pařížská endoskopická klasifikace povrchových neoplastických lézí. Podle této klasifikace jsou léze rozdělené na povrchové a pokročilé. Povrchové léze zasahují maximálně do submukózy a jsou častým cílem endoskopické léčby. Povrchové neoplazie se dělí na polypoidní (typ 0-I), ploché (typ 0-II) a vyhloubené (typ 0-III) [3]. V konvenčním pojetí koloskopie umožňuje diagnostikovat patologickou lézi, odebrat z ní biopsii k histologickému vyšetření a odstranit polyp endoskopickou polypektomií. Moderní koloskopie navíc umožňuje s vysokou pravděpodobností určit povahu a lokální stadium léze in vivo bez potřeby histologického vyšetření. To má zásadní význam pro aplikaci moderních endoskopických terapeutických metod jako jsou endoskopická slizniční resekce a endoskopická submukózní disekce [4]. Nelze opomenout ani význam koloskopie pro identifikaci nepalpovatelných střevních nádorů ať již jako peroperační vyšetření nebo předoperační označení např. tuší. Koloskopické vyšetření s biopsií je zlatým standardem pro primární diagnostiku KRK. Následující další vyšetření by měla stanovit staging onemocnění a podle toho by měla být stanovena strategie léčby.

7.2 Ultrasonografické vyšetření

Ultrasonografie (US) je dnes nejrozšířenější a nejdostupnější diagnostická zobrazovací metoda. Nevýhodou je subjektivita tohoto vyšetření a dále omezená vyšetřitelnost v závislosti na obezitě pacientů nebo při zvýšené plynové náplni gastrointestinálního traktu. Transabdominální US má relativně vysokou úspěšnost při zobrazení lokálně pokročilých stádií v oblasti tračníku, horší situace je u tumorů rekta, kde je senzitivita uváděna kolem 30 % při dobré náplni močového měchýře. US je metodou první volby při pátrání po jaterních metastázách. V případě, že je tumor diagnostikován US, je předpoklad pokročilého stadia tumoru a v tomto případě je plně indikována výpočetní tomografie (CT) břicha. Zvláštní postavení v rámci diagnostiky karcinomu rekta má endoskopická ultrasonografie (EUS). V současné době se EUS uplatňuje jako nejpřesnější metoda při posouzení lokální invaze v rámci stagingu karcinomu rekta. Přesnost EUS při T stagingu závisí na T stadiu tumoru a v průměru se pohybuje okolo 85 %. Horší výsledky jsou v případě cirkulárních stenozujících nádorů, kde obvykle nelze posoudit celý rozsah tumoru a vztahu nádorové infiltrace a mezorektální fascie u pokročilých stádií onemocnění. Přesnost nodálního stagingu je u EUS

uváděna mezi 70-75 % [5]. Další nevýhodou EUS je větší nepřesnost v rámci restagingu karcinomu rekta po neoadjuvantní chemoradioterapii a zhodnocení změn po chirurgickém výkonu. Právě pro tyto nevýhody je v současné době považována magnetická rezonance (MR) jako zlatý standard v rámci vyšetření karcinomu rekta.

7.3 Peroperační ultrasonografické vyšetření jater

Pro správnou volbu strategie operačního řešení jaterních metastáz kolorektálního karcinomu má velký význam peroperační US jater (IOUS). Tato metoda má nejvyšší citlivost ve srovnání s dalšími diagnostickými metodami. I výsledky této metody jsou závislé na velikosti metastáz, kvalitě jaterního parenchymu a konstituci pacienta. Ve srovnání s ostatními metodami je senzitivita CT,MR a IOUS uváděna 63-82,6 %, 69-86,3 %, 86,3-92 % a specifita 91 %, 92 %, 97,8 % [6,7].

7.4 Magnetická rezonance

Jedním z hlavních cílů MR je stanovení vzdálenosti tumoru od mezorektální fascie a dále znázornění vztahu tumoru k vnitřnímu nebo zevnímu svěračci či ke svalům pánevního dna. O pokus najít vztah mezi výsledkem MR pánve a prognózou karcinomu rekta se pokusil Smith a kol. v roce 2008 [8]. Autoři v této práci navrhli algoritmus, který rozděluje karcinom rekta podle MR nálezů na 3 skupiny – „good, bad and ugly“. Mezi nepříznivé prognostické faktory na MR patří extramurální šíření tumoru v malé pánvi, vztah tumoru k mezorektální fascii, suspektní přítomnost více než 4 metastáz v lymfatických uzlinách a extramurální vaskulární invaze. Pacienti zařazení do skupiny „good rectal cancer“ by měli mít malé riziko lokální recidivy a vzdálených metastáz a mohou být primárně operováni. Pacienti, kteří jsou zařazení do skupiny „bad rectal cancer“ mají větší riziko vzdálených metastáz a u skupiny „ungly rectal cancer“ je největší riziko vzdálených metastáz a lokální recidivy. U těchto dvou skupin je indikována primární onkologická léčba, na kterou poté navazuje léčba chirurgická [9]. MR lze také použít při pátrání po jaterních metastázách hlavně u pacientů, kteří mají alergii na jodovou kontrastní látku. Za hlavní výhodu je možné považovat použití hepatospecifických kontrastních látek, které jsou vychytávány hepatocyty. To umožňuje vyšší senzitivitu při detekci jaterních metastáz nebo zpřesnění diferenciatní diagnostiky patologických ložisek jater [10,11].

7.5 Výpočetní tomografie

CT má oproti jiným zobrazovacím metodám díky moderním přístrojům velkou výhodu v rychlosti, lepší dostupnosti oproti magnetické rezonanci, možnosti vyšetření s větším kraniokaudálním pokrytím a v tvorbě multiplanárních rekonstrukcí v libovolné rovině a prostorových rekonstrukcí. Výhodou oproti US je možnost standardizace - využití standardních protokolů dynamického postkontrastního vyšetření. Jedním z hlavních omezení jsou vyšší dávky ionizujícího záření, jehož účinek roste se zvyšující se kumulativní dávkou. V oblasti břicha nám CT umožňuje hodnotit rozsah a případný rozsev primárního nádoru. Lze odhadnout možnost resektability tumorózního procesu vzhledem k jeho vztahu k cévním strukturám a infiltraci okolních struktur. Dále umožňuje stanovení restagingu po onkologické léčbě. Rovněž je výtěžnou metodou pro navigaci bioptických odběrů a při plánování radioterapie [12]. CT nabízí možnost trojrozměrných rekonstrukcí, čehož se využívá při virtuální CT kolonografii. Tato metoda je spolehlivá pro záchyt větších polypů (nad 5 mm) a karcinomu tračnicku. CT hrudníku, břicha a pánve je používáno pro detekci vzdálených metastáz. CT je široce dostupné a má rychlé akviziční časy. Není ale metodou volby pro hodnocení vrstev stěny střeva, proto nelze dobře použít pro lokální staging tumoru a špatně lze na něm hodnotit povrchové nádory. Senzitivita, pokud zahrneme všechna stadia tumoru, klesá na 63 %. Hodnocení invaze do uzlin dosahuje senzitivity pouze 55-70 %, neboť je založena zejména na velikostních kritériích, která jsou nepřesná. Obdobně jako u EUS a MR je rovněž u CT sledovatelná nižší přesnost stagingu po proběhlé neadjuvantní léčbě kvůli kombinaci postradiačního edému, zánětu, fibrózy a nekrózy. Senzitivita a specifita CT při hodnocení odpovědi na terapii se pohybuje okolo 54 % resp. 60 % [13].

8 Léčba kolorektálního karcinomu

8.1 Chirurgická léčba

Soudobé možnosti chirurgické léčby jsou výsledkem 150 let trvajících rozvoje moderní chirurgie s využitím poznatků dalších oborů, umožňujícím operovat v širokém rozsahu. Chirurgická léčba je základní, nezastupitelnou a jedinou kurativní modalitou onkoterapie KRK. To platí pro nádory, u kterých lze společně s postiženým úsekem střeva operací odstranit nádorové postižení v blízkých tkání, především v lymfatických uzlinách a vzdálené metastázy, nejčastěji v játrech nebo plicích. Zvláštní jednotkou jsou velmi časně nádory v tlustém střevě a konečniku, které lze odstranit v příznivých případech endoskopickými technikami. Hlavním cílem chirurga je provést radikální chirurgický výkon s dostatečnou resekci střeva a spádové lymfatické tkáně, tzv. RO resekci. Stran odstranění spádové lymfatické tkáně lze obecně říci, že čím je odstraněno větší množství lymfatických uzlin, tím mají nemocní z hlediska dlouhodobějšího přežívání větší šanci. Operační možnosti a volba operace záleží na lokalizaci a na rozsahu nádorového postižení. Chirurgická léčba nádorů tlustého střeva a nádorů konečniku se v mnoha ohledech liší. Rozdíly jsou anatomické a funkční. Tlusté střevo leží v celém průběhu v dutině břišní a tím je snáze přístupné operačním výkonům. Jeho úseky jsou relativně dlouhé a ponechávají operatérovi snazší rozhodování o rozsahu resekce a následné rekonstrukční fázi operace. Konečník je jen jednou třetinou lokalizován v břišní dutině, další dvě třetiny jsou uloženy extraperitoneálně v malé pánvi, která je zejména u mužů velmi úzká. Tato lokalizace velmi ztěžuje operační přístup, navíc distální část konečniku přechází do anorekta a anu se svěračovým komplexem. Zatímco funkce zejména orálního úseku tlustého střeva je vstřebávání vody, elektrolytů, žlučových a mastných kyselin, zbylých živin a transport střevního obsahu aborálním směrem, je rektum orgánem zajišťující kontinenci, tzn. udržení stolice a plynů až do jejich vyprázdnění. Ani ztráta velké části tlustého střeva nemusí vzhledem k funkční kapacitě zbylé části pacientovi činit obtíže, navenek může být pouze vyjádřena častější defekací. Resekce tlustého střeva, dokonce subtotalní kolektomie, zpravidla nemá za následek založení střevní stomie, protože v rekonstrukční fázi operace lze založením anastomózy až na výjimky obnovit střevní kontinuitu. To částečně platí i o resekci konečniku. Odstranění konečniku včetně anu se svěračovým komplexem ale vede k zatím neovlivnitelné ztrátě kontinence, proto musí být taková operace následována založením střevní stomie [14]. Tumory tračnicku a konečniku se operují konvenčně z laparotomie, laparoskopicky nebo rukou asistované laparoskopie, roboticky a experimentálně i metodou NOTES (Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery). V posledním desetiletí byl přijat fakt, že laparoskopicky prováděné výkony mají z hlediska onkologického stejné výsledky jako výsledky při konvenční

operaci. Výhodou laparoskopických výkonů je menší množství ranných i pozdních komplikací ve stěně břišní, lepší kosmetický výsledek z hlediska délky operační rány, možnost rychlejší rehabilitace a tím i zkrácení délky hospitalizace. Při rutinním provádění laparoskopických výkonů jsou srovnatelné operační časy, menší krevní ztráta a srovnatelné pooperační nitrobřišní komplikace. Ačkoli se podle literárních údajů může jevit laparoskopický přístup jako jediný správný, statistiky uvádějí, že i v ekonomicky nejvyspělejších zemích nepřesahuje podíl laparoskopicky ošetřených karcinomů střeva 15 % [14]. Hlavními argumenty v neprospěch laparoskopie jsou ztráta taktilního vjemu, obtížnější manipulace a přehlednost u obézních pacientů a především vyšší cena operace. Dalším argumentem je fakt, že u laparoskopie pro střevní tumory je stejně nutné provést laparotomii, která musí být dostatečně velká k odstranění resekovaného střeva a tumoru. Tato laparotomie se někdy délkou přibližuje délce laparotomie u klasického přístupu. Výhoda robotické chirurgie se plně projevuje hlavně v oblasti operace karcinomu rekta. Robotický přístup dovoluje získat dobrý přehled a širší operační možnosti v omezeném prostoru, který malá pánev představuje. Stále vysoké pořizovací a provozní náklady brání většímu rozšíření robotické chirurgie i ověření, nakolik je prospěšná.

Velmi důležitým bodem střevní chirurgie je anastomóza. Existuje celá řada možných způsobů jejího založení. Nejfyziologičtější je termino-terminální anastomóza. Základní technikou je rukou šitá anastomóza. Díky novým šicím materiálům, které jsou atraumatické, monofilamentní a dlouhodobě vstřebatelné, se dnes preferují jednovrstevné extramukózní anastomózy pokračujícím stehem. Staplery usnadňují konstrukci anastomóz především ve špatně přístupné pánvi při resekcii rekta, jejich užití k šití anastomóz na tračníku je vzhledem k vyšším ekonomickým nákladům výjimečné. Obecně přijatá pravda je ta, že zásadní podmínkou zhojení anastomózy je absence jejího napětí.

V oblasti tračníku se většinou jedná o standardizované výkony, při nichž je jasně definován rozsah resekce střeva i s jeho závěsy podle umístění nádoru v průběhu tračníku. Při lokalizaci v pravé polovině tračníku se provádí pravostranná hemikolektomie, při které se resekuje cécum, colon ascendens a orální úsek colon transversum společně se spádovou lymfatickou tkání. Je snaha o přerušování ileokolických a pravých kolických cév při odstupu z horních mesenterických cév. Pokud je tumor umístěn v oblasti colon transversum měla by se provádět tzv. rozšířená pravostranná hemikolektomie. Při tomto výkonu je rozsah stejný jako u pravostranné hemikolektomie, ale resekce je ještě rozšířena o cca 2/3 transversa a podvaz středních kolických cév při odstupu z horních mesenterických cév. V případě, kdy vzhledem k celkovému stavu nemocného nemůžeme provádět takto extenzivní výkon, je možno provést jen klínovitou resekcii transversa. Levostranná hemikolektomie je doporučována u tumorů v oblasti levého tračníku. Zde

se resekuje sestupný tračník, colon sigmoideum a rektosigma se spádovou lymfatickou tkání. Opět se snažíme o podvaz dolní mesenterické tepny při odstupu z aorty. Mezi méně extenzivní výkony patří resekce sigmatu, resekce lienální flexury a resekce rektosigmatu. Podle některých autorů jsou tyto výkony z hlediska radikality nedostatečné, proto jsou opět prováděny jen u nemocných, kteří mají vysoké operační riziko a nejsou únosní k takto rozsáhlým výkonům. Potvrzením, že rozsah resekce střeva byl onkologicky dostatečný, je nepřítomnost nádoru v resekčních liniích a dostatečná bezpečnostní vzdálenost tumoru od resekčních okrajů. Velmi obecně platí, že minimální vzdálenost, ať již orálního nebo aborálního resekčního okraje od tumoru, by měla být u karcinomu tračníku alespoň 5 cm, na levém tračníku 10 cm. Rozsah resekce obvykle odpovídá povodí cévního zásobení [15,16,17].

Multiorgánové resekce provádíme u tumorů prorůstajících do okolí, například do duodena, žaludku, pankreatu, sleziny, močového měchýře či gynekologických orgánů. Tyto výkony jsou zatíženy až 50% morbiditou a 4% letalitou. Na druhé straně časné nádory T1 stadia lze řešit menším výkonem ve smyslu excize z kolotomie nebo endoskopickým výkonem. Podmínkou je odstranění celé léze s následným histologickým ověřením, že odstranění včetně spodiny bylo úplné. Rizikem tohoto postupu je fakt, že ani časný nádor zcela nevyklučuje možnost postižení lymfatických uzlin, lymfatických cév, angioinvaze a neuroinvaze.

Vzhledem k délce tračníku a jeho přístupnosti při operování není ve většině případů konstrukce anastomózy velkým problémem, proto u anastomóz v oblasti tračníku je menší nebezpečí jejich dehiscence a je udávána i poměrně nízká letalita (okolo 1 %). Pokud se nejedná o metastatické stadium tumoru, není indikována neoadjuvantní onkologická léčba.

Jiná situace je u karcinomu rekta. Zde je naopak onkologická neoadjuvantní léčba plně indikována u všech stadií s výjimkou T1 a T2 s nízkým gradingem (G1-2) [18,19]. V těchto případech se provádí transanální excize nejčastěji za pomoci TEM (transanální endoskopická mikrochirurgie). Prováděné výkony na rektu jsou závislé na lokalizaci tumoru. Při tumoru v oblasti horního rekta (10-15 cm od anu) je prováděna resekce minimálně 5 cm od dolního okraje tumoru s parciální mezorektální excizí. U tumorů středního rekta (5-10 cm od anu) by resekční linie měla být minimálně 2 cm od dolního okraje nádoru. Zde je již nutno provést totální mezorektální excizi. U tumorů dolního rekta (méně než 5 cm od anu) lze provést resekční výkon v případě, že je minimální bezpečnostní lem více než 1 cm. Pokud toto není možno dodržet, provádí se amputace rekta. Mezi faktory, které ovlivňují možnost resekčních výkonů, patří kromě vzdálenosti tumoru od svěračů ještě „body mass index“ (BMI) a pohlaví. Ženy mají širší pánev, což umožňuje lepší přístup a přehlednost. U pacientů, kteří mají BMI přes 30, je přístup a orientace v malé pánvi

obtížná. U BMI přes 40 je operace velmi složitá. Anastomózy jsou nejčastěji prováděny za pomoci staplerů. Opět platí, že anastomóza musí být bez napětí a tahu. Pokud je levý tračník krátký a resekce rozsáhlejší, musíme mobilizovat lienální flexuru. Anastomózy mohou být koncem ke konci nebo stranou ke konci, případně může být vytvořen tzv. kolický pouch. Výhody a nevýhody těchto napojení jsou předmětem diskuzí. Anastomózy umístěné distálněji mají větší riziko dehiscence. V literatuře se počet dehiscencí udává mezi 10 až 24 %. Vzhledem k takto vysokému procentu je doporučováno u ultranízkých resekcí rekta u mužů zakládat protektivní ileostomie. U žen je statisticky menší pravděpodobnost dehiscence, proto je na zvážení operátéra, zda u nich protektivní ileostomii založí [20,21]. V poslední době je diskutován efekt transanálně zavedeného drénu jako prevence úniku z anastomózy. Na našem pracovišti jako transrektální drén používáme permanentní močový katétr CH 30, který fixujeme stehem perianálně. Peroperačně provádíme vzduchovou zkoušku. Transanální rektální drén ponecháváme 2-3 dny po operaci. V zahraniční literatuře jednoznačný přínos tohoto preventivního opatření zatím není popsán, ale vzhledem k tomu, že se jedná o velmi bezpečné, nenákladné a pacienta nezatěžující opatření, je tento postup spíše doporučován [22,23].

Abdominoperineální amputace rekta spočívá v odstranění rekta, mezorekta a svěračů se založením terminální stomie. Je prováděna u tumorů, které jsou lokalizované v oblasti distálního rekta, anorekta. V 50. až 70. letech minulého století byla prováděna amputace rekta častěji. Amputace tvořily 50-70 % všech výkonů na rektu. V současné době je to jen asi 10-20 %. Příčinou tohoto pokroku je vývoj operační techniky, zavádění nových operačních výkonů - resekce konečníku s průvlekovou koloanální anastomózou, resekce konečníku s intersfinkterickou disekcí a následnou průvlekovou koloanální anastomózou, vývoj a dostupnost staplerů, snížení doporučené vzdálenosti distálního okraje střeva od tumoru, zlepšení pooperační péče, rozvoj diagnostických metod.

Radikálnější variantou abdominoperineální amputace rekta je extralevátorová abdominoperineální amputace rekta. Při této operaci se mimo již zmiňovaného odstraňují ještě svaly pánevního dna. Výsledkem jsou rozsáhlé defekty na perineu, které je někdy nutno řešit za pomoci sítěk či plastikami kožních laloků. Nejradikálnější formou odstranění nádoru konečníku je exenterace pánve. Při této operaci je odstraněn konečník se všemi orgány pánve. Při operaci se odstraňuje močový měchýř, u žen potom ještě gynekologické orgány. Tento výkon je velmi rozsáhlý, mutilizující.

8.2 Onkologická léčba karcinomu rekta

Chirurgickou léčbu karcinomu rekta ovlivnila v posledních dvou desetiletích neoadjuvantní radio- a chemoterapie jako další léčebná modalita. Je prokázáno, že radioterapie potencovaná chemoterapií snižuje počet lokálních recidiv a že tato léčba je účinnější, je-li aplikována jako neoadjuvantní před operací než jako adjuvantní po operaci [24]. Neoadjuvantní radioterapie se může aplikovat ve dvou možných režimech. Krátkodobé ozáření dávkou celkem 25Gy, rozložených do 5 dnů po 5 Gy. Operace by měla být provedena v průběhu následujícího týdne po ukončení aktinoterapie. Tento režim je horší z hlediska organizačního načasování a skloubení onkologického a chirurgického programu, proto je častěji prováděn druhý možný režim. Jedná se tzv. dlouhodobou konkomitantní radiochemoterapií. Zde je rozložena celková dávka záření 45-50 Gy do 25 denních dávek. Výhodou je kombinace radio- a chemoterapie. Chirurgická léčba je doporučována za 6-8 týdnů po skončení onkologické léčby. Onkologická léčba vede ke zmenšení nádoru, což umožňuje chirurgovi technicky snazší operaci a dokonce větší naději na svěrač zachovávající výkon. V určitém procentu může vést neoadjuvantní radiochemoterapie k vymizení nádoru, k tzv. kompletní biologické odpovědi. Vzhledem k této skutečnosti se nyní řeší otázka, zda je nutná operace nebo by stačila pouze onkologická eliminace nádoru. V současné době je doporučeno provést původně plánovaný radikální chirurgický výkon i v případech, kdy dle MR dojde k onkologické eliminaci nádoru. Nádorová rezidua ve stěně střeva mohou být tak malá, že je nelze detekovat a přesto vedou k časným recidivám. Je popsáno jen několik málo případů, kdy radiochemoterapie postačila k eliminaci nádoru [25,26,27].

9 Recidiva kolorektálního karcinomu

KRK má tendenci vzdáleně metastazovat do jater, plic a časté jsou i lokální recidivy. Synchronní metastázy jsou diagnostikovány asi u 20-25 % pacientů. U dalších 25-30 % pacientů se objeví metastázy v dalším průběhu onemocnění. To znamená, že u 2/3 pacientů musíme v průběhu onemocnění řešit jeho IV. stadium (UICC 2009). Nejčastější jejich lokalizací jsou játra (ve 20-70 %) a plíce (v 10-20 %) [28,29]. Po radikální chirurgické léčbě jaterních a plicních metastáz kolorektálního původu má nemocný lepší prognózu. Pětileté celkové přežití po resekcí jater ve spojení s onkologickou léčbou se dnes pohybuje mezi 35-58 % [30,31] a u plic pak mezi 21-43 % [32,33]. Samostatná onkologická léčba pak přináší minimální efekt s pětiletým celkovým přežitím jen u 0,4 - 4 % nemocných. Obecné pravidlo chirurgické léčby u metastazujícího

kolorektálního karcinomu je radikální resekce všech chirurgicky řešitelných metastáz. To platí rovněž pro jaterní a plicní metastázy, ať již diagnostikované současně, nebo v různém časovém intervalu po sobě [34].

9.1 Jaterní metastázy

Jaterní chirurgie je v současné době velmi bezpečná s nízkou letalitou, která ani u komplexních resekcí u rizikových pacientů nepřesahuje 3 %. Morbidita je však poměrně vysoká a pohybuje se kolem 20-30 % [35,36]. Nejčastějšími komplikacemi jsou biliární sekrece nebo absces v místě resekční plochy. Nejzávažnější komplikací je jaterní selhání. Proto je nutné, aby po resekcí zůstalo alespoň 20 % objemu zdravého jaterního parenchymu. U nemocných po chemoterapii nebo s hepatopatií se musí ponechat minimálně 40 % jaterního parenchymu. Nedostatečný objem zbytku jater po resekcí je jedním z důvodů neresekability. Určitým řešením u některých pacientů jsou tzv. etapové výkony, které slouží ke zvětšení zbytkového objemu jater: embolizace větvě portální žíly, kombinace resekce a radiofrekvenční ablace (RFA), etapové resekce, atd. Resekce můžeme rozdělit na anatomické a neanatomické. Anatomická resekce je taková, při které se odstraňuje anatomicky přesně definovaná část jaterního parenchymu. Neanatomické resekce, kterým se v dnešní době dává u jaterních metastáz přednost, ponechávají větší objem jaterního parenchymu i větší rezervu pro chirurgickou léčbu případné recidivy. Z hlediska onkologické radikality není mezi těmito metodami žádný rozdíl [37,38,39]. Snahou chirurga je provedení R0 resekce, tzn. kompletní odstranění metastázy s ochranným lemem jaterní tkáně, který by měl být >1 mm [40]. Rozeznáváme ještě resekci R1 s mikroskopickým šířením nádoru do resekční linie, ale bez makroskopicky ponechaného rezidua metastázy v játrech. Při R2 resekcí je ponecháno makroskopické reziduum metastázy v játrech. Z hlediska prognózy mají nejlepší výsledky pacienti se solitární jaterní metastázou. Jejich prognóza pětiletého přežití je vyšší než 60 %. Průkaz odstranitelné mimojaterní metastázy (plíce, nadledvina) není kontraindikací jaterní resekce. Za kontraindikaci byly dříve považovány extrahepatální uzlinové metastázy. S pokrokem onkologické léčby a za předpokladu provedení lymfadenektomie hepatoduodenálního ligamenta nejsou již tato stadia kontraindikací operačního řešení [41]. Pacienti zařazení do skupiny potenciálně resekabilních metastáz se mohou stát resekabilními po případné terapeutické odpovědi na onkologickou tzv. konverzní léčbu. Úspěšnost této onkologické léčby se zvyšuje se zařazením biologické léčby. Biologická léčba zvyšuje šanci na léčebnou odpověď chemoterapie [42,43]. Radikálně provedené resekce u pacientů po dosažení sekundární resekability mají prakticky stejnou šanci na pětileté přežití jako pacienti primárně resekabilní [44]. Synchronní metastázy lze řešit třemi možnými způsoby. V případech, kdy je technicky snadno odstranitelný primární nádor i

jaterní metastáza, můžeme provádět simultánní odstranění jak primárního nádoru, tak i jaterních metastáz. Toto je z hlediska onkochirurgie velmi lákavé řešení, ale studie neprokázaly výhodu tohoto postupu [45]. Nevýhodou tohoto postupu je kumulace rizik obou větších výkonů, vyšší morbidita, oddálení systémové léčby, což ve výsledku má horší výsledky pětiletého přežití než u častěji prováděných dvoudobých výkonů. U těch je v první době odstraněn primární nádor a ve druhé, pak jaterní metastázy. Někteří autoři prokázali, že podobných výsledků lze dosáhnout i obráceným postupem, tj. nejdříve resekce jaterních metastáz a ve druhé době odstranění primárního nádoru - „liver first approach“ [46]. Tento obrácený způsob může být výhodnější v těch případech, kdyby při progresi jaterního nálezu mohlo dojít k neresekabilnímu stavu.

9.2 Plicní metastázy

Všeobecně přijatými podmínkami plicní metastazektomie jsou radikální odstranění primárního nádoru, absence neresekabilních extrapulmonálních metastáz, možnost dosažení komplexní resekce sekundárních ložisek a akceptabilní riziko operace [47,48,49,50]. Výsledky sekvenčních operací plic a jater jsou v případě synchronních metastáz horší než u metachronních [51,52]. Z hlediska onkologické radikality je dostačujícím výkonem úplné odstranění metastatického ložiska spolu s alespoň 5mm širokým bezpečnostním lemem zdravé tkáně po jeho obvodu. Takto definované R0 resekce lze dosáhnout buď limitovanou neanatomickou resekci pomocí stapleru či technikou na sorce, nebo precizní laserovou excizí. Obě metody šetří zdravou plicní tkáň a umožňují tak při případné recidivě metastáz reoperace [53,54]. Z hlediska možnosti provést dokonalejší excizi a odstranění většího množství ložisek bez nutnosti anatomické plicní resekce je výhodnější použití laseru [55]. Anatomické plicní resekce nemají lepší výsledky z hlediska dlouhodobého přežití a jsou zatíženy větší letalitou a také limitují případné reoperace při recidivě metastáz z důvodu nedostatečné reziduální funkční plicní kapacity [56]. Přesto mají v chirurgii plicních metastáz své místo, ale pouze u ložisek centrálních či vícečetných, kdy výkon menšího rozsahu není technicky proveditelný nebo nezaručuje potřebnou onkologickou radikalitu. Pokud není možno provést radikální resekci metastatického ložiska, lze je stejně jako v případě jaterních metastáz ošetřit za pomoci RFA, která je s výhodou prováděna pod CT navigací. Vzhledem k tomu, že se jedná již o paliativní metodu, jsou výsledky z hlediska dlouhodobého přežívání (OS) zřetelně horší [57,58]. Frekvence postižení hilových a mediastinálních lymfatických uzlin nádorovou diseminací je při plicních metastázách KRK popisována v rozmezí 8 až 33 % s prokazatelně horším přežíváním [59,60]. Vzhledem k této skutečnosti převládá názor, že systematická mediastinální lymfadenektomie (SMLA) je přínosná v rámci plicní metastazektomie [61]. Důvodem je zpřesnění stadiu a tím i adekvátní onkologické léčby a podle některých studií

se ukazuje i možné zlepšení OS. Dlouhodobé přežívání po plicních metastazektomiích lze očekávat u R0 resekcí, při normálních hodnotách nádorových markerů, u dobře diferenciovaných nádorů časného stadia dle UICC klasifikace TNM, při solitárních, jednostranných, metachronních a malých metastázách. Dále při dlouhém DFI od operace primárního nádoru a absenci nádorového postižení spádových lymfatických uzlin. Lepších výsledků je také dosahováno při kombinaci metastazektomie a adjuvantní onkologické léčby [62]. Pozitivní vliv plicní metastazektomie na dlouhodobé přežití je nepochybný. Podmínkou je ale pečlivý výběr nemocných, kteří budou z tohoto postupu profitovat, s individuálním posuzováním každého jednotlivého případu.

9.3 Lokální recidiva

Přítomnost vzdálených metastáz, a to jak orgánových tak implantačních, patří k základním vlastnostem malignity, a je kritériem pro hodnocení její agresivity a rozsahu. Lokální nitrobršňní a retroperitoneální recidiva kolorektálního karcinomu je uváděna v rozmezí 2,6-32 % v prvních 3 letech a 22-48 % v pětiletém intervalu [63,64,65,66]. U lokálních recidiv bez další léčby je tři a pětileté OS tristní, blíží se nule, medián přežití je přibližně 13 měsíců [67,68]. V případě jejich léčby (chirurgická, onkologická) se přežití zlepšuje. Pětileté přežití je pak uváděno mezi 4-39 % [69,70]. Procento výskytu lokální recidivy se výrazně zmenšuje v případě adjuvantní onkologické léčby, ať už se jedná o chemoterapii nebo kombinovanou radiochemoterapii [71]. Vzhledem k výše uváděným výsledkům je dnes uznávaný aktivní přístup při vyhledání a operování lokálních recidiv. V případě, že se daří provést R0 resekce dochází k výraznému prodloužení OS [72,73,74]. Hlavním kritériem pro rozhodování o volbě léčby by měla být kvalita života v návaznosti na prodloužení OS. Cílem léčby určitě není nemocnému prodloužit život za cenu utrpení a strádání [75].

10 Prognóza kolorektálního karcinomu

Prognóza KRK je závislá na jeho stadiu, biologické aktivitě, stavu imunitního systému a na možnosti radikálního odstranění. Ke stanovení stadia nádoru se nejčastěji používá TNM klasifikace dle UICC (obrázek 6). Tato klasifikace popisuje stupeň penetrace nádoru stěvnou stěnou, stupeň postižení regionálních uzlin a přítomnost či nepřítomnost vzdálených metastáz. Ke správnému stanovení stadia nádoru je mimo jiné nutný dostatečný odečtený počet lymfatických uzlin. Mezinárodní klasifikace karcinomů UICC a American Joint Committee on Cancer (AJCC) vyžadují nález nejméně 12 perikolických lymfatických uzlin (resp. 10-14 lymfatických uzlin) [76,77,78]. Obecně platí, že čím větší je počet odečtených lymfatických uzlin, tím je větší pravděpodobnost správného stanovení „stagingu“ onemocnění a snížení rizika podhodnocení (understagingu). Přesné stanovení stadia onemocnění znamená správně indikovanou onkologickou léčbu a tím i zlepšení prognózy nemocných z hlediska OS a DFI. Limit 12, resp. 14 odečtených uzlin splňuje pouze asi 20-30 % vyšetřených resekátů tlustého střeva a 19-20 % karcinomů rekta po předoperační aktinochemoterapii [79]. Počet stanovených lymfatických uzlin je závislý na řadě faktorů. K těm hlavním patří správně provedená chirurgická operace s odstraněním dostatečného množství lymfatické tkáně. Počet lymfatických uzlin se snižuje po onkologické léčbě, aktinoterapii. Důležitým faktorem je i patolog a jeho zkušenosti s určením lymfatických uzlin v resekátu [80].

Obrázek 6 - UICC klasifikace TNM 7. vydání 2009, česká verze 2011

T – Primární nádor			
TXnelze hodnotit		
T0bez známek primárního tumoru		
Tiskarcinom in situ		
T1nádor postihuje submukózu		
T2nádor postihuje tunica muscularis propria		
T3nádor postihuje subserózu nebo se šíří do neperitelizované perikolické nebo perirektální tkáně.		
T4nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury anebo prorůstá na viscerální peritoneum		
T4anádor prorůstá na viscerální peritoneum		
T4bnádor přímo postihuje jiné orgány či struktury		
N-Regionální mízní uzliny			
NXnelze hodnotit		
N0regionální uzliny bez meta		
N1ametastáza v 1 regionální mízní uzlině		
N2bmetastáza ve 2-3 regionálních mízních uzlinách		
N1cložisko nádoru, tj. satelity v submukóze nebo neperitonealizované perikolické nebo perirektální měkké tkáni bez metastáz v regionální mízní uzlině		
N2ametastázy ve 4-6 regionálních mízních uzlinách		
N2bmetastázy v 7 a více regionálních uzlinách		
M- Vzdálené metastázy			
MXnelze hodnotit		
M0bez vzdálených metastáz		
M1ametastázy jsou omezené na jeden orgán		
M1bmetastázy ve více než jednom orgánu nebo na peritoneu		
Rozdělení do stádií			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1-2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
Stadium IIC	T4b	N0	M0
Stadium IIIA	T1-2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stadium IIIB	T3,T4a	N1	M0
	T2-3	N2a	M0
	T1-2	N2b	M0
Stadium IIIC	T4a	N2a	M0
	T3,T4a	N2b	M0
	T4b	N1-2	M0
Stadium IVA	jakékoliv T	jakékoliv N	M1a
Stadium IVB	jakékoliv T	jakékoliv N	M1b

Z hlediska prognózy je ještě složitější situace u karcinomu rekta. Jak již bylo v textu zmíněno, odstranění části nebo celého konečníku s přilehlou tukovou a lymfatickou tkání, tzv. totální mezorektální excize (TME), patří v současné době ke standardním postupům. Zavedení techniky TME vedlo ke snížení lokální recidivy u karcinomu rekta o 15-20 %. V chirurgii karcinomu rekta jsou rozlišovány proximální, distální a cirkumferentní resekcí okraje (circumferential resection margin - CRM) [81].

Proximální resekcí okraj nebo proximální radikalita zahrnuje odstranění maximálního množství lymfatické tkáně podél horních rektálních cév. Resekcí linie na střevě je dána demarkační linií po podvazu přívodných cév. Je doporučován vysoký podvaz při odstupu z dolních mesenterických cév nebo i podvaz dolní mesenterické tepny při odstupu z aorty. Jednoznačný přínos mezi tímto vysokým a nízkým podvazem horních rektálních cév nebyl prokázán [82,83].

Distální resekcí linie je chápána jako bezpečná resekcí vzdálenost od tumoru na střevě. V současnosti se považuje za bezpečnou vzdálenost resekcí okraje od tumoru v aborálním směru 10-20 mm [84,85]. Tato vzdálenost je dostatečná, protože jak prokázaly četné studie, tak většina tumorů se za tuto vzdálenost intramurálně nešíří. [86,87,88].

Laterální princip radikality zahrnuje odstranění perikolické tukové a lymfatické tkáně. Bylo zjištěno, že z hlediska prognózy má zásadní význam právě laterální resekcí linie, tzn. bezpečná laterální vzdálenost od tumoru. CRM je chirurgicky vytvořená plocha disekce v průběhu odstraňování rekta a jeho uvolňování od okolních struktur a je definována jako nejbližší zjištěná vzdálenost nádorových struktur od cirkulární resekcí linie mezorektálního tuku. Okraj linie je považovaný za negativní v případě, že vzdálenost tumoru od resekcí linie je více než 1 mm. Pokud je tato vzdálenost menší nebo tumor zasahuje přímo do resekcí linie, hovoříme o pozitivním CRM [89,90]. Z hlediska prognózy lze říci, že čím je větší vzdálenost tumoru od laterální resekcí linie, tím je lepší prognóza [91]. U nemocných s pozitivním CRM je větší pravděpodobnost vzniku lokální recidivy a vzdálených metastáz. Celá řada studií potvrdila fakt, že CRM je nejdůležitější a nejpřesnější samostatný prognostický faktor v případě lokální recidivy. Zároveň je silným faktorem z hlediska prognózy vzniku vzdálených metastáz a délky OS [92,93]. Pacienti s pozitivním CRM mají 2x větší pravděpodobnost úmrtí na základní onemocnění a 3,5x větší pravděpodobnost lokální recidivy, která vzniká až u 85 % těchto pacientů [94]. Novější studie prokázaly, že CRM je silnější prognostický faktor než T stádium nádoru a v kombinaci se stadiem lymfatických uzlin dokonce představuje lepší prognostický model než současně používaná TNM klasifikace [95,96]. Hodnocení a popis CRM jsou závislé na kvalitě patologického pracoviště. Patolog posuzuje kvalitu TME podle makroskopického vzhledu neperitonealizovaného povrchu

nefixovaného preparátu. Preparát je hodnocený podle nejhorší oblasti neperitonealizovaného povrchu. Podle kvality jsou TEM děleny do tří kategorií [97,98]:

- I. Kompletní mezorektální excize – povrch hladký či jen s mělkými defekty < 5 mm, bez konizace resektátu CRM hladký, pravidelný.
- II. Téměř kompletní mezorektální excize – povrch nepravidelný, s trhlinami a defekty, které nedosahují ke svalovině muscularis propria. CRM nepravidelný, s hlubšími defekty.
- III. Inkompletní mezorektální excize – nepravidelná vrstva potrhaného mezorektálního tuku, s defekty až ke svalovině muscularis propria, CRM nepravidelný, tuš zatéká ke svalovině.

Mikroskopicky patolog popisuje a měří vzdálenost nádoru od laterálního okraje preparátu. Popisuje naměřenou vzdálenost vlastních nádorových buněk od tušovaného CRM, který je v histologickém řezu při odebrání vzorků přes celou tloušťku stěny v místě nádoru zřetelně černě zvýrazněný [99].

11 Biologická aktivita tumoru

Od výzkumu biologické aktivity tumoru a pochopení jednotlivých kaskád metastatického procesu se v budoucnu očekává přínos do klinické praxe v možnosti ovlivnění jednotlivých fází vývoje nádoru. Se snahou co nejvíce individualizovat léčbu je potřeba identifikovat další spolehlivé prediktivní a prognostické znaky, díky kterým by bylo možné pacientům indikovat nejvhodnější léčbu (tailored therapy = individualized medicine).

Prediktivní znaky jsou takové, které umožňují předpovědět efekt konkrétní léčby u individuálního pacienta. Díky znalosti těchto znaků může být léčba „ušita přímo na míru“ každému konkrétnímu pacientovi, což v první řadě má výhodu v tom, že nezatížíme pacienta zbytečně neúčinnou léčbou, která má řadu nebezpečných komplikací a ve druhé řadě naopak může profitovat z časného nasazení efektivní chemoterapie či biologické léčby. Z praktického hlediska může mít tato individualizace léčby nemalý význam z hlediska úspor finančních prostředků. Prognostické znaky naopak nejsou vázány na konkrétní typ léčby, ale poskytují informace o prognóze onemocnění. Některé molekulární znaky mohou být jak prediktivní, tak prognostické, jako například přítomnost estrogenových receptorů u rakoviny prsu. U KRK zatím žádný znak s kombinovanou rolí nebyl identifikován. Hledání a následné využití prognostických i prediktivních znaků je předmětem dalšího zkoumání.

11.1 Cirkulující nádorové buňky

Myšlenka detekce cirkulujících nádorových buněk ve vztahu k prognóze karcinomu sahá již do poloviny minulého století. Vývoj vysoce citlivých detekčních metod umožnil tuto myšlenku uskutečnit a uvést do praxe. Z karcinomů je nejdále rozpracováno využití cirkulujících nádorových buněk při diagnóze a stanovení prognózy onemocnění u karcinomu prsu, kde je od roku 2007 jejich detekce jako tumorového markeru zahrnuta v doporučení Americké asociace klinické onkologie (ASCO, American Society of Clinical Oncology). U KRK je situace komplikovanější. Výsledky jednotlivých studií jsou nekonzistentní, přesto většinou přiřazují cirkulujícím nebo rozestým nádorovým buňkám určitý prognostický význam. Recentní meta - analýza všech těchto studií prokázala signifikantní korelaci mezi detekcí cirkulujících nádorových buněk, špatnou prognózou onemocnění a zkráceným bezpříznakovým i celkovým přežitím [100,101,102].

11.2 KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)

Aktivační mutace v protoonkogenu KRAS jsou potvrzeny jako negativní prediktivní znak léčby monoklonálními protilátkami (moAb) proti EGFR (např. cetuximab). Tato mutace se

vyskytuje až u 40 % pacientů s KRK, kteří díky tomuto zjištění mohou být ušetřeni potenciálně toxické léčby, která u nich nemá žádný význam. Zatímco prediktivní role KRAS mutací byla potvrzena, o jeho roli jako prognostického faktoru se stále diskutuje. Velká randomizovaná studie RASCALII [103] popsala prognostický efekt mutace KRAS, kdy je v pozici 12 namísto glycinu valin. Takto postižení pacienti měli snížené bezpříznakové i celkové přežití. Podobného výsledku dosáhla i studie prováděna na Chirurgické klinice KN v Pardubicích, ve které autoři potvrdili negativní vliv KRAS mutace na prognózu nemocných [104]. Nicméně již zmiňovaná studie vlivu panitumumabu na léčbu KRK neobjevila žádný efekt mutace KRAS na bezpříznakové přežití u pacientů s podpůrnou léčbou [105]. Podobného výsledku bylo dosaženo u protilátky proti receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). Bylo zjištěno, že léčba Bevacizumabem hraje významnou roli v 1. a 2. linii léčby metastazujícího KRK, kde prodlužuje OS a účinnost léčby je nezávislá na stavu KRAS [106].

11.3 BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene)

BRAF je dalším proteinem v kaskádě EGFR signalizace. Aktivační mutace se vyskytuje asi v 10-15 % nádorů rekta. O jeho roli se začalo uvažovat vzhledem ke skutečnosti, že i přes vyřazení pacientů s mutací KRAS, stále bylo velké procento pacientů s rezistencí na biologickou léčbu protilátkami proti EGFR. Vliv této mutace na rezistenci k léčbě moAb potvrdila retrospektivní studie, která analyzovala léčbu 113 pacientů s metastatickým stadiem KRK. U 11 pacientů s nemutovaným KRAS byla identifikována mutace BRAF. Ani jeden z těchto pacientů neodpovídal na léčbu a měli kratší OS a DFI. Ti, kteří odpovídali na léčbu, neměli mutovanou BRAF alelu [107]. Na základě těchto výsledků lze předpokládat mutaci BRAF jako prediktivní faktor z hlediska léčby moAb a dále byla této mutaci přisouzena i role prognostického faktoru z hlediska OS a DFI. Překvapivě bylo zjištěno, že OS a DFI je nižší u BRAF mutace než u KRAS mutace. I přes tyto nadějně výsledky je potřeba ještě prognostickou a prediktivní roli BRAF mutace ověřit pomocí randomizovaných klinických studií.

11.4 PI3KCA (Phosphatidyl-inositol-3-kináza)

PI3KCA tvoří druhou hlavní efektorovou větev dráhy EGFR signalizace. Hlavním uzlem v PI3K aktivované dráze je další kináza AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog I), která má v buňce řadu rolí, od regulace metabolismu glukózy přes blokování funkce proapoptických proteinů až k regulaci genové exprese. Aktivace dráhy vede obecně k vyššímu přežívání buňky a její větší odolnosti k nepříznivému vlivu okolí. Proběhlo několik studií, které se

pokoušely jednotlivým mutacím PI3KCA přisoudit prognostický či prediktivní význam. Výsledky jsou zatím nepřesvědčivé. Ukazuje se možnost zvýšené rezistence na léčbu cetuximabem s panitumabem. Efekt mutace byl však pozorovatelný jen u pacientů s nemutovaným proteinem KRAS [108]. Výhledově by mutace PI3KCA mohly být považovány, stejně jako KRAS a BRAF mutace, za negativní prediktivní faktor z hlediska indikace léčby monoklonálnímu protilátkou proti EGFR.

11.5 Genetické subtypy KRK

KRK je heterogenní onemocnění. Molekulární klasifikace jednotlivých typů se stále vyvíjí a v současnosti lze rozeznat tři základní typy definované podle přítomnosti chromozomální nestability (CIN), mikrosatelitní nestability (MSI) a podle stupně metylace DNA (CpG island methylator phenotype, CIMP). Každý z těchto typů má mírně odlišné klinické projevy a jinak reagují na léčbu. Kromě rozdělení podle majoritních změn v genomu lze nalézt celou řadu pozmeněných signálních drah a mutací v jednotlivých genech, které se vyskytují vždy jen u určitého procenta kolorektálního karcinomu [109].

CIN se vyskytuje u 65-70 % případů KRK a je rozpoznána jako mnohočetná změna v ploidii nebo struktuře chromozomů. MSI je definována jako změna v délce repetitivních sekvencí (mikrosatelitů) a vyskytuje se zhruba v 15 % případů KRK. CIMP je často asociovaný s přítomností MSI u pacientů bez vrozené mutace v genech pro opravu DNA a je definovaný jako metylace určitého počtu analyzovaných oblastí v genomu. Pozitivita pro CIN a MSI u nádorů byla podrobena rozsáhlým metaanalýzám a z jejich závěrů vyplývá, že pacienti s CIN pozitivním nádorem mají horší prognózu onemocnění a pacienti s MSI pozitivním KRK naopak lepší prognózu než CIN nebo MSI negativní [110,111,112]. Zatím se nepodařilo vyloučit či potvrdit jejich vzájemnou neslučitelnost, proto zatím nelze uvažovat o jejich využití jako prognostických faktorů. CIMP lze rozdělit podle počtu metylovaných analyzovaných oblastí na high a low. U nádorů, které jsou MSI pozitivní a mají vysoký stupeň CIMP, se lze často setkat s BRAF mutací pacienti s tímto typem nádoru mají lepší prognózu. Naopak nádory s MSI negativitou a vysokým stupněm metylace v kombinaci s BRAF mutací mají prognózu horší a se zvyšujícím se stupněm metylace CpG oblastí se prognóza zhoršuje. Druhou epigenetickou změnou u KRK bývá celková DNA hypometylace, která je často asociovaná s CIN pozitivitou a bylo dokázáno, že hypometylace vede ke zhoršení prognózy. Tyto první náznaky možného využití genetických subtypů jako prognostického faktoru KRK budou ještě předmětem dalšího zkoumání. Doposud žádný z těchto znaků nebyl schválen k využití v klinické praxi. Co se týká prediktivního významu, tak je zjištěno, že KRK s CIN je prediktivní pro léčbu taxany, které ovšem obecně nejsou pro léčbu KRK vhodné, jelikož neovlivňují

OS a DFI. Systém pro opravu nesprávného párování (mismatch repair systém, MMR) bazí v DNA je nezbytný pro správnou funkci chemoterapeutik typu 5-Fluorouracilu (5-FU), které se inkorporují do DNA, a díky nesprávnému párování dojde ke spuštění signální kaskády, která končí zastavením buněčného cyklu. MMR systém je nefunkční v případě MSI pozitivních nádorů a byl popsán nepříznivý efekt při podávání 5-FU pacientům s tímto subtypem KRK ve II. a III. st. U léčby pacientů po paliativní resekci ve IV. stadiu byla naopak odpověď na léčbu 5-FU v kombinaci s Leukovorinem lepší [113]. V současné době neexistuje žádné laboratorní stanovení nádorového markeru, které by mělo dostačující specifitu a senzitivitu pro screening KRK. Přehled nejdůležitějších prediktivních a prognostických faktorů je shrnut v tabulce 1 a 2 [114].

Tabulka 1 - Přehled nejdůležitějších známých prediktivních faktorů

Prediktivní faktory	
Faktor	Vliv na výběr léčby
EGFR pozitivita	Možnost použití moAb proti EGFR
KRAS aktivační mutace	Negativní znak pro použití moAb proti EGFR
BRAF aktivační mutace	Negativní znak pro použití moAb proti EGFR
PI3KCA mutace	Hypotetický negativní znak pro použití muAb proti EGFR
PTEN ztráta exprese	Negativní znak pro použití moAb proti EGFR
Vyšší exprese NF- κ B	Snížení účinku moAb proti EGFR, radio- i klasické chemoterapie
NRAS aktivační mutace	Negativní znak pro použití moAb proti EGFR
MSI pozitivita	Negativní faktor pro chemoterapeutika na bázi 5-FU
ERCC1 polymorfismus	Prediktivní znak pro použití oxaliplatinu
Nízká exprese Topol	Negativní prediktivní znak pro použití irinotecanu

Tabulka 2 - Přehled nejdůležitějších známých prognostických faktorů

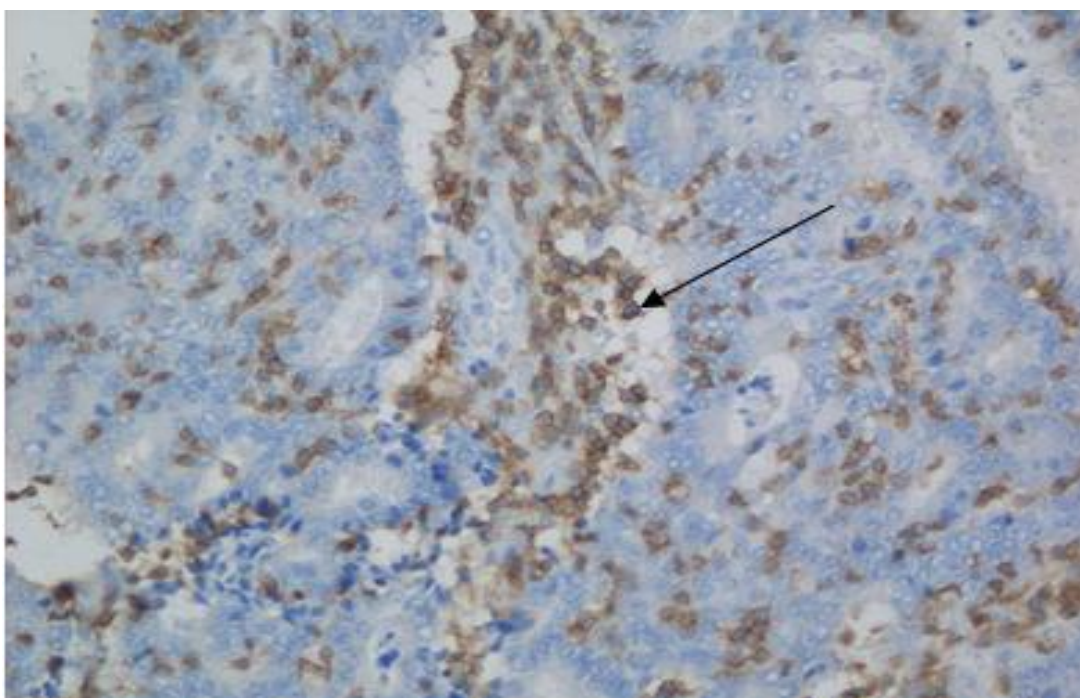
Prognostické faktory	
Faktor	Vliv na prognózu
Cirkulující a diseminované nádorové buňky	Horší prognóza, zkrácení DFI i OS
KRAS mutace v kodonu 12	Zkrácení DFI i OS
BRAF aktivační mutace V600E	Zkrácení DFI i OS
PTEN ztráta exprese	Vyšší riziko lokální recidivy
Zvýšený počet genomových kopií EGFR	Delší OS
Vyšší exprese NF- κ B	Zkrácení PFS a OS
CIN pozitivita	Negativní prognostický faktor
MSI pozitivita	Pozitivní prognostický faktor
Vysoká exprese TYMS	Zkrácení OS

12 Vztah imunitního systému a kolorektálního karcinomu

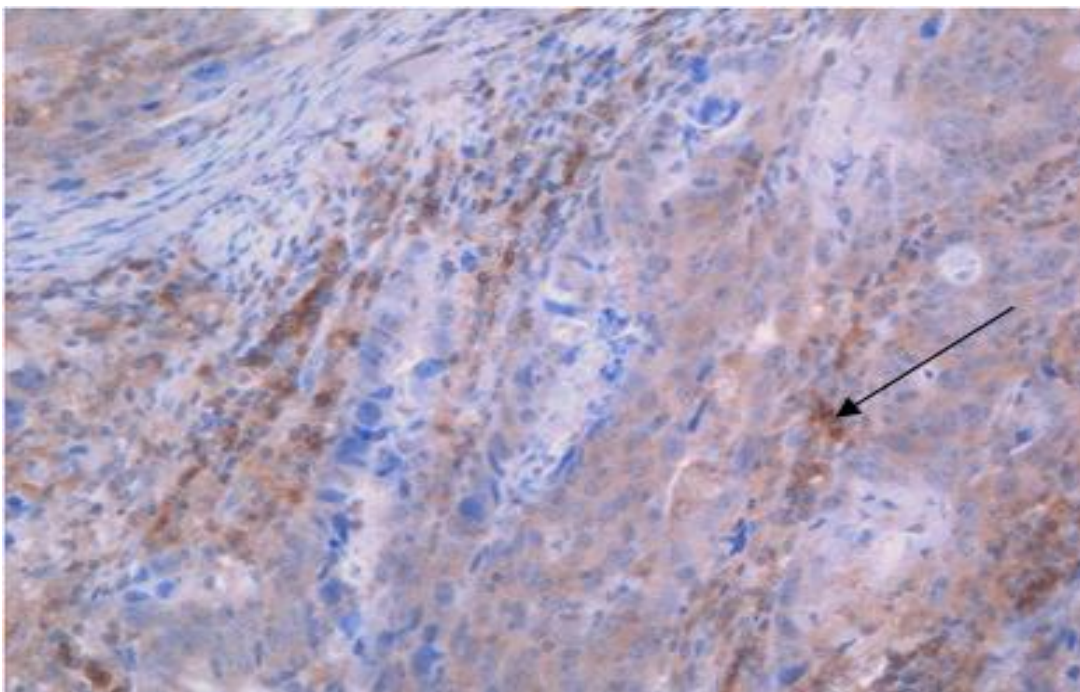
Role imunitního systému v kontrole růstu a metastazování KRK není objasněna. Vzhledem k tomu, že po odstranění primárního nádoru dochází často ke vzniku metastáz nebo lokální recidivy, můžeme se domnívat, že je chyba ve fungování imunitního systému. Imunitní systém buď není schopen rozpoznat patologické buňky, nebo naopak může stimulovat růst nádoru a jeho metastáz. Imunitní systém a maligní nádor se navzájem stále ovlivňují. Dochází k vícestupňové reakci, která je vyvolána vzájemnou interakcí. 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.

Tumor infiltrující lymfocyty (TIL), DC a NK buňky jsou indikátory účinnosti antitumorózní imunologické odpovědi. Počet, typ a morfolgie TIL, DC a NK buněk mohou určovat prognózu KRK [115,116]. 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 [117]. Z hlediska typu jsme se zkoumali T lymfocyty CD8+ (obrázek 7), CD4+ (obrázek 8) a natural killer (NK) cells, CD57+ (obrázek 9) a S100+ dendritické buňky (obrázek 10). Dále je zkoumána funkce makrofágů. Přesná funkce těchto buněk je předmětem současné diskuze [118,119]. Víme jen, že hrají důležitou roli v kontrole vývoje a růstu nádoru.

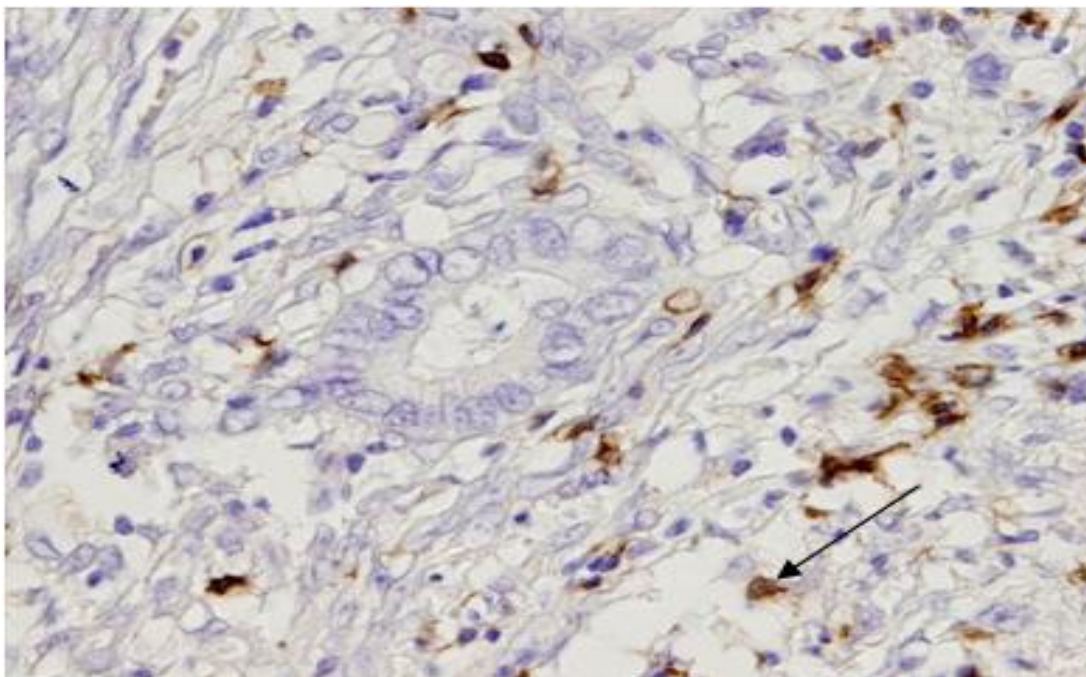
Obrázek 7 - CD8+ T lymfocyty



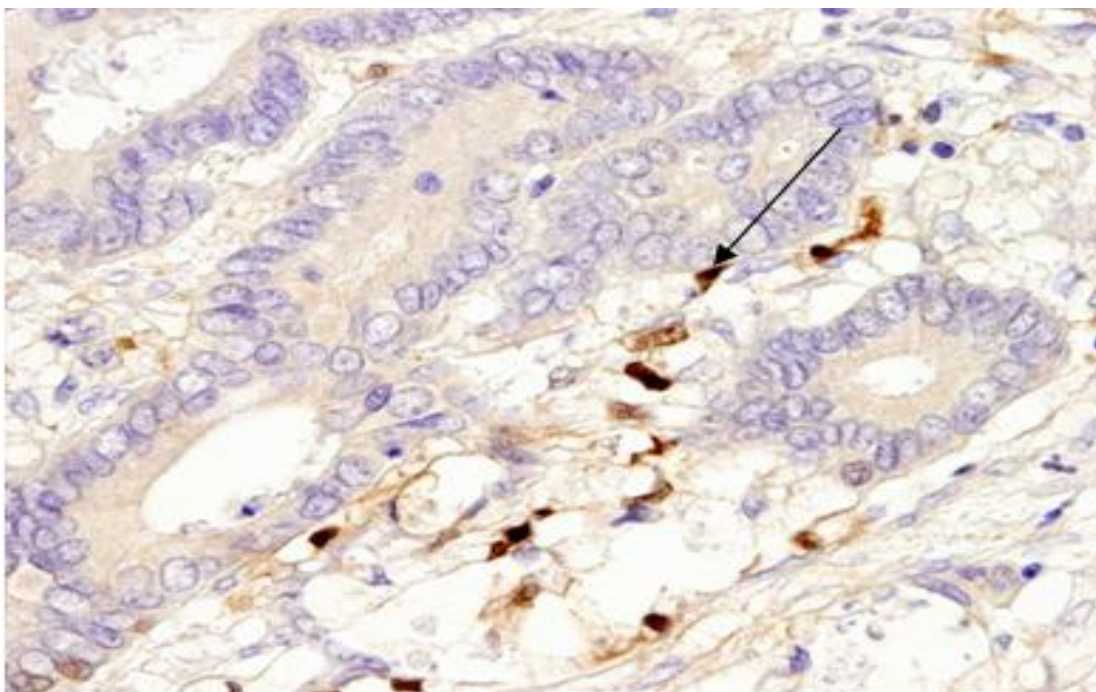
Obrázek 8 - CD4+ T lymfocyty



Obrázek 9 - Natural killer cells (barvení CD57)



Obrázek 10 - Dendritické buňky (barvení S100)



12.1 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 [120]. Vysoká hustota T lymfocytů v nádorové tkáni byla častěji pozorována u pacientů bez časných známek metastáz a byla spojena s lepšími výsledky DFI a prodloužením OS.

12.2 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 [121,122,123].

12.3 NK buňky

Natural killer cells zprostředkují efektivní lýzi rakovinových buněk, ale mechanismus detekce rakovinných buněk je odlišná od CD8+ 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 [124]. Snížený předoperační počet NK buněk je spojen se sníženou frekvencí recidivy KRK [125]. Klíčová úloha NK buněk v odstranění primárních i sekundárních nádorů byla již popsána u hematologických malignit [126,127,128]. 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 [129]. Aktivace NK buněk může být inhibována expresí stresových molekul (např. MICA, molekul souvisejících s řetězcem MHC-molekul I. třídy) [130]. 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 [131].

12.4 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 presentovaný 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 [132,133].

12.5 Makrofágy

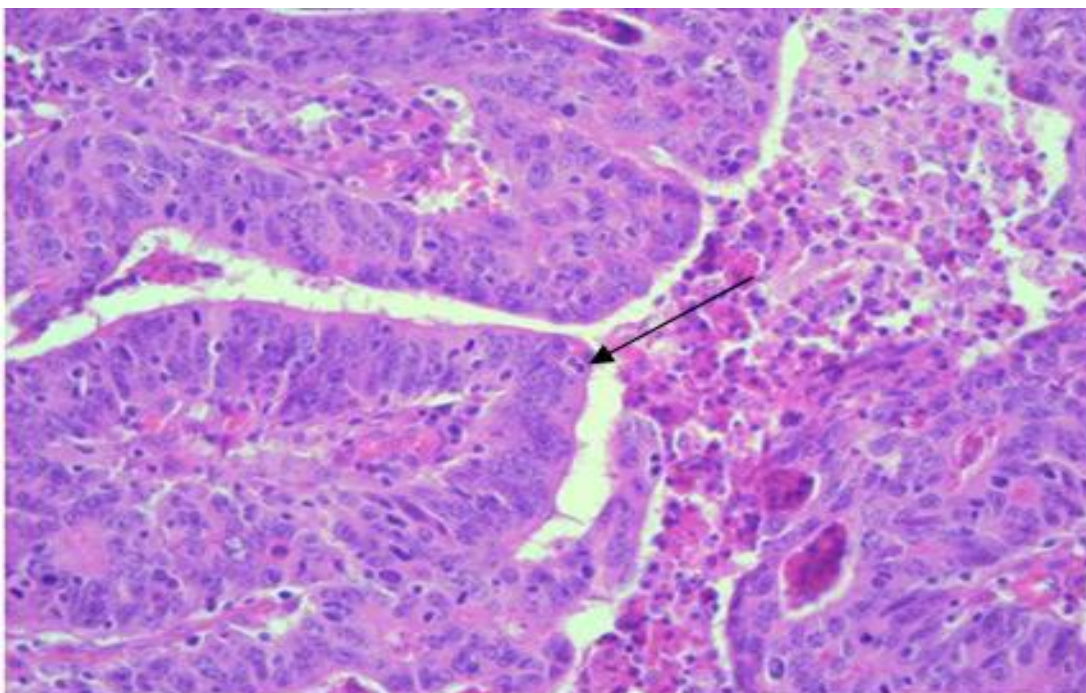
Makrofágy produkují důležité faktory, které mají funkci v oblasti progresu nádoru. Jejich funkce není plně známá, ale bylo popsáno, že počet tumor infiltrujících makrofágů koreluje s celkovým přežitím pacientů s KRK [134]. Zdá se, že několik typů tumor infiltrujících makrofágů ovlivňuje rovnováhu mezi pro- a protitumorózní schopností imunitního systému [135]. Chování makrofágů může být ovlivněno zánětem. Role zánětu při vývoji zhoubného nádoru potvrzují nové poznatky z buněčné a molekulární biologie maligních nádorů [136,137]. 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) [138]. 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 [139].

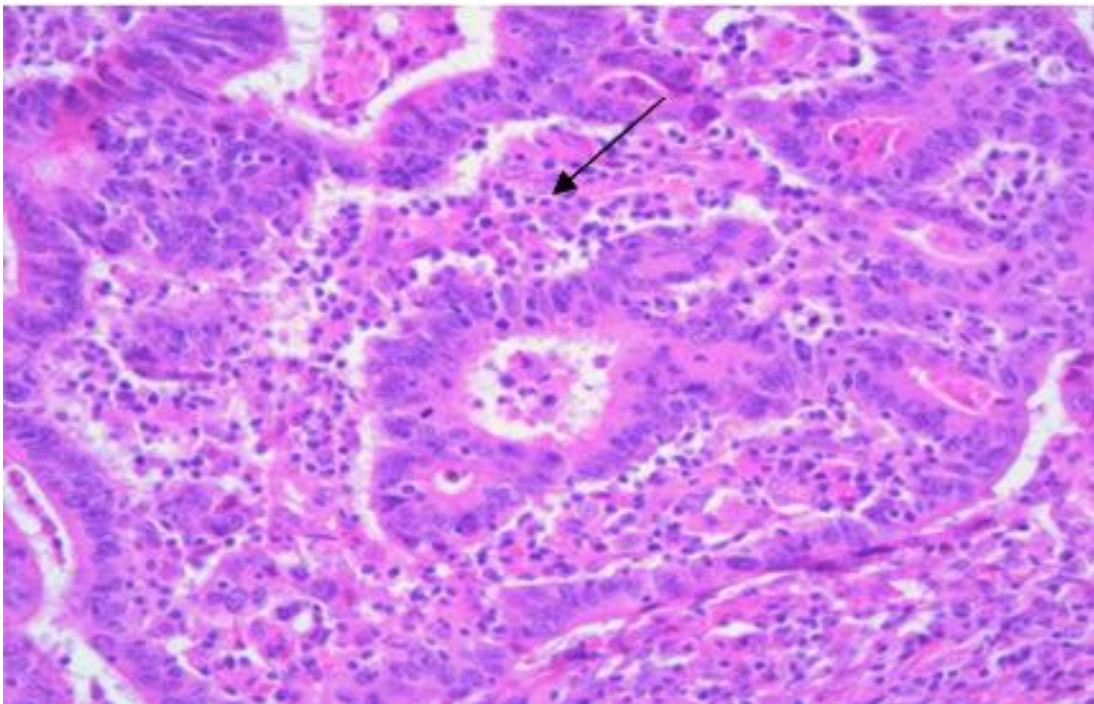
12.6 Morfologická hlediska TIL

Z morfologického hlediska můžeme TIL pozorovat ve specifických částech nádoru. Detekujeme intratumorální infiltraci lymfocyty (ITL - intratumoral lymphocytes) - obrázek 11, intrastromální lymfocyty (ISL - intrastromal lymphocytes) - obrázek 12, peritumorální lymfocyty (PTL - peritumoral lymphocytes) - obrázek 13 a Crohn-like reakci (Crohn-like PTL) - obrázek 14. Dále můžeme sledovat reaktivní histologické změny ve spádových lymfatických uzlinách (LN reactions). Mezi popisované změny patří folikulární hyperplazie (LN-FH) - obrázek 15, sinusová histiocytóza (LN-SH) - obrázek 16 a přítomnost granulací (LN-GR) - obrázek 17.

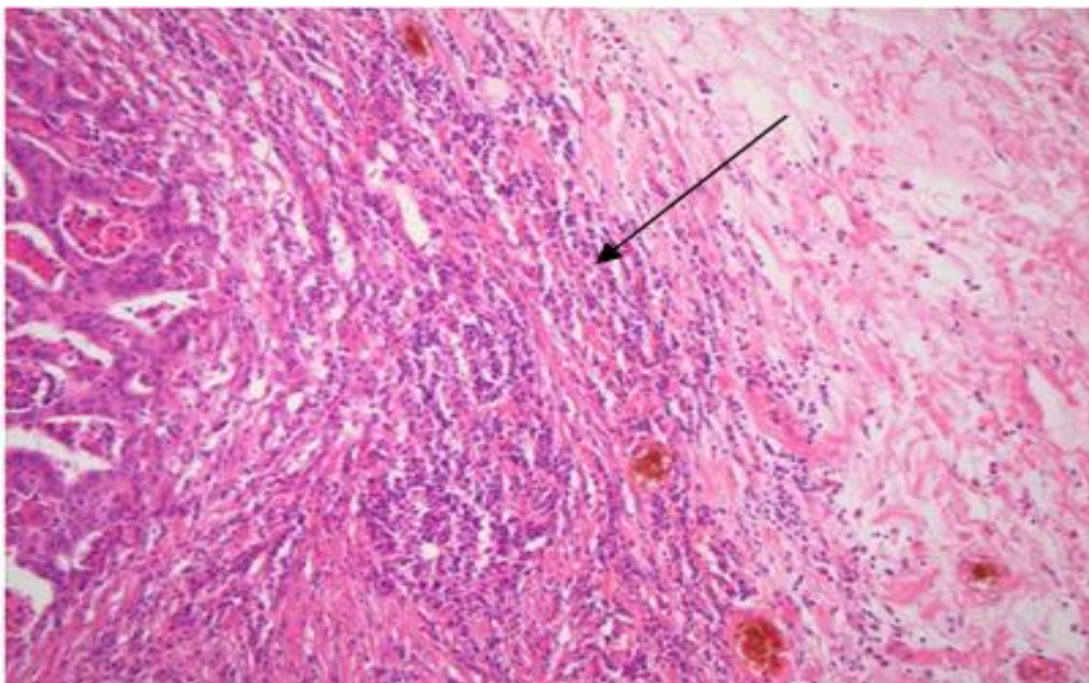
Obrázek 11 - Intratumorální lymfocyty (nádorová tkáň - barveno hematoxylin-eosin)



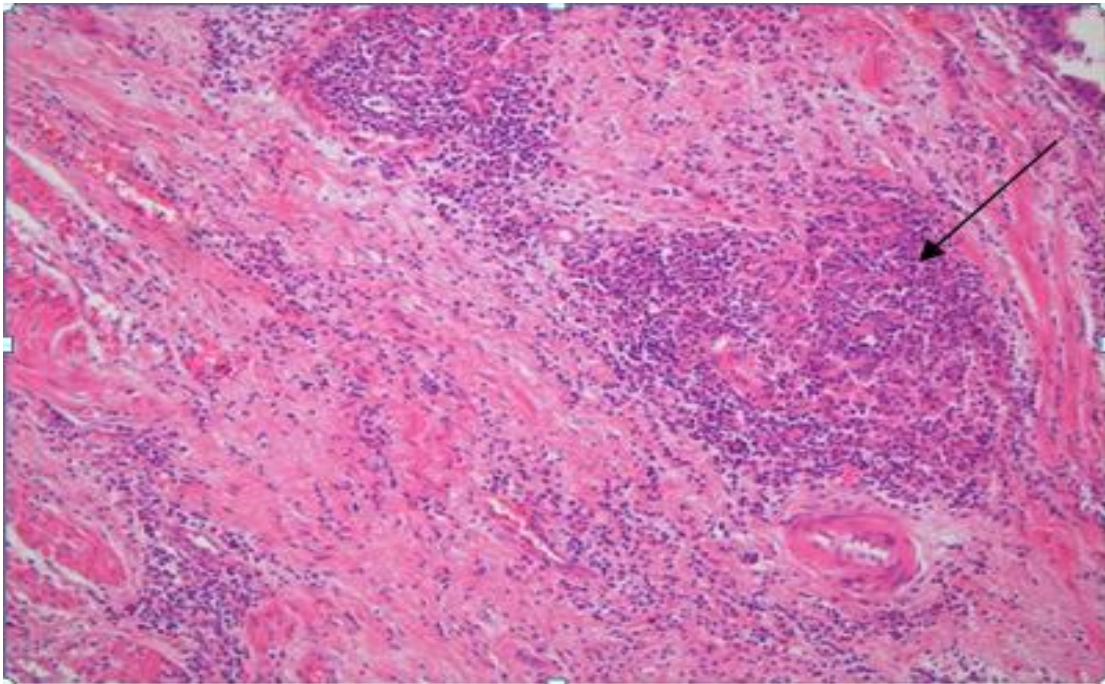
Obrázek 12 - Intrastromální lymfocyty (nádorová tkáň - barveno hematoxylin-eosin)



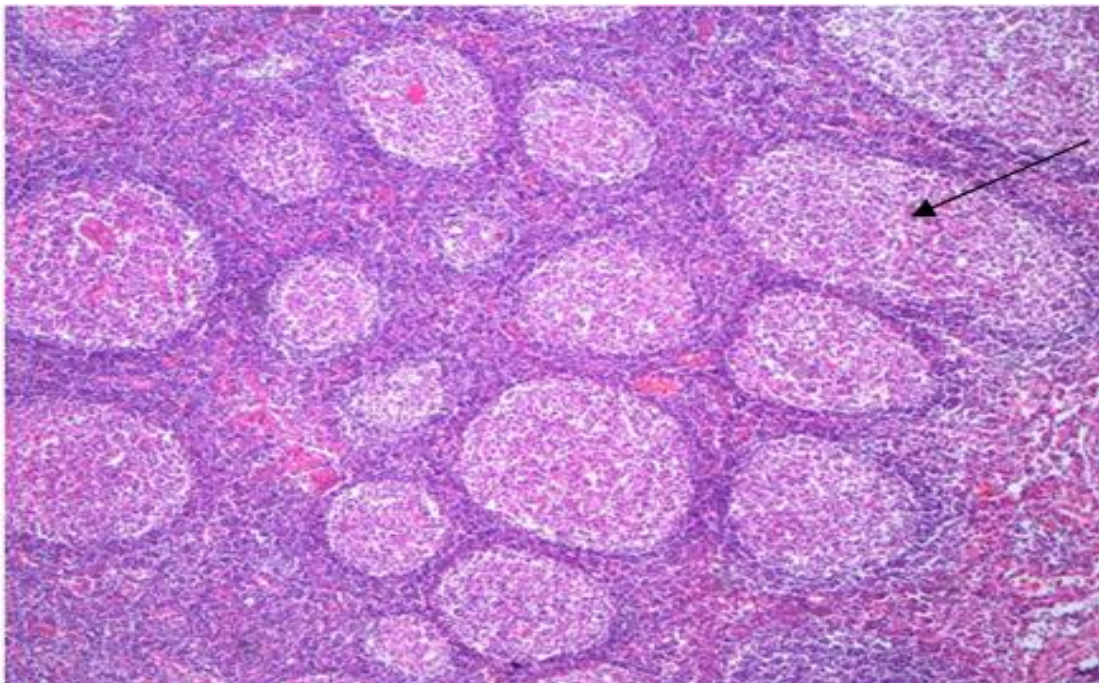
Obrázek 13 - Peritumorální lymfocyty (nádorová tkáň - barveno hematoxylin-eosin)



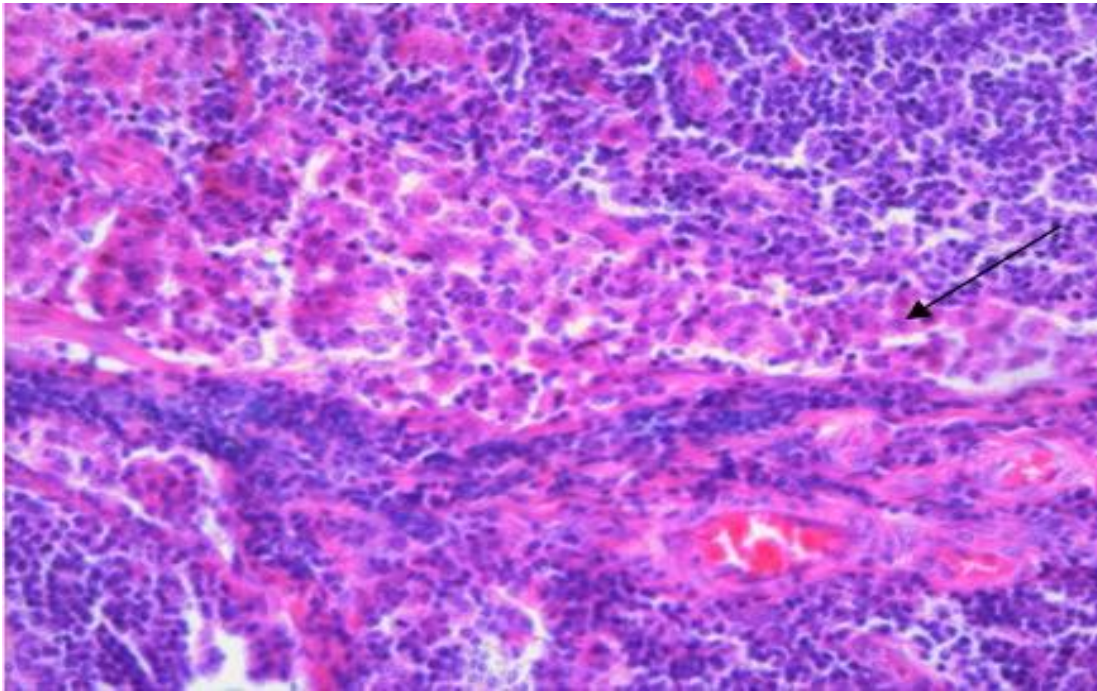
Obrázek 14 - Crohn-like peritumorální lymfocyty (nádorová tkáň - barveno hematoxylin-eosin)



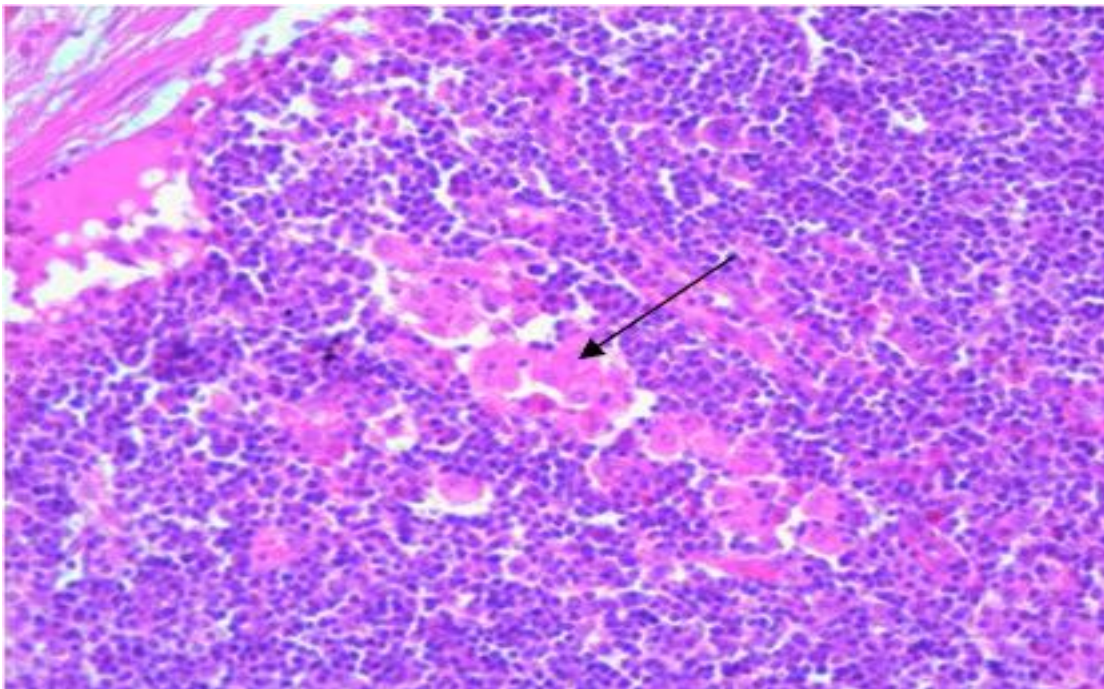
Obrázek 15 - Lymfatická uzlina - folikulární hyperplazie (barveno hematoxylin-eosin)



Obrázek 16 - Lymfatická uzlina - sinus histiocytosis (barveno hematoxylin-eosin)



Obrázek 17 - Lymfatická uzlina - přítomné granulace (barveno hematoxylin-eosin)



V oblasti imunologie maligních nádorů bylo v posledních letech dosaženo značných pokroků. Díky pochopení jednotlivých drah procesů, které vznikají na základě kontaktu nádorových buněk a

imunitního systému bude možno využít tyto znalosti i v klinické praxi. Otevírají se možnosti cílenější léčby s využitím možností vlastního imunitního systému a na základě vyšetření imunologické reakce organismu lze do budoucna předvídat další vývoj nádorového onemocnění. Pro klinickou praxi by to mohlo přinést zlepšení určení stadiu malignity a výhledově lépe odhadnout prognózu nemocného.

13 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.

14 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 diferenciace 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.

14.1. 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.

14.2. 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.

14.3. 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).

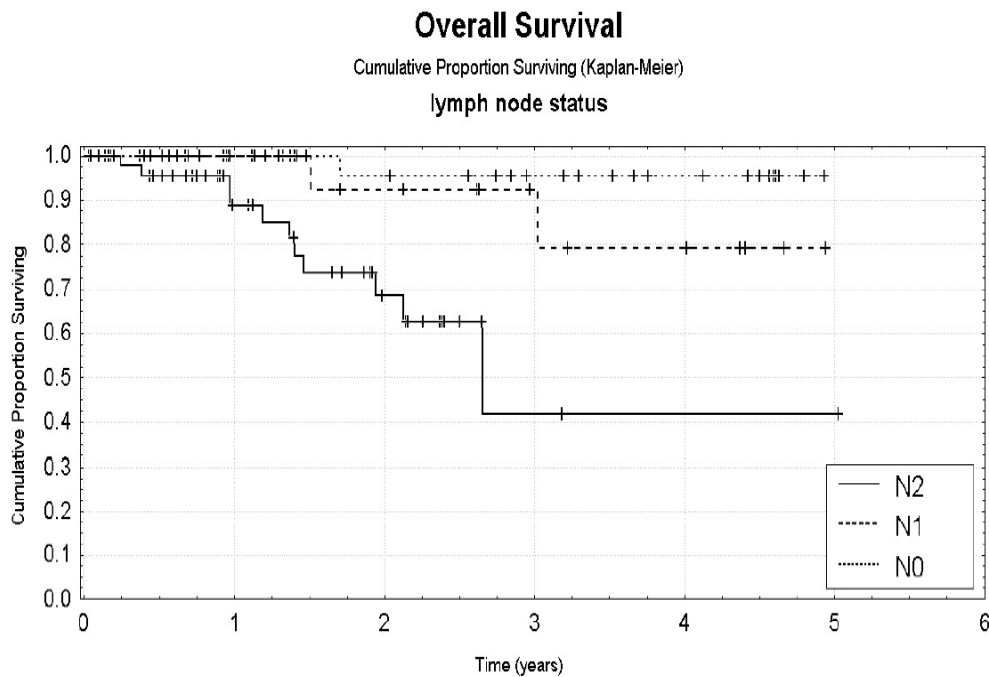
15 Statistické zpracování výsledků

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.

16 Výsledky

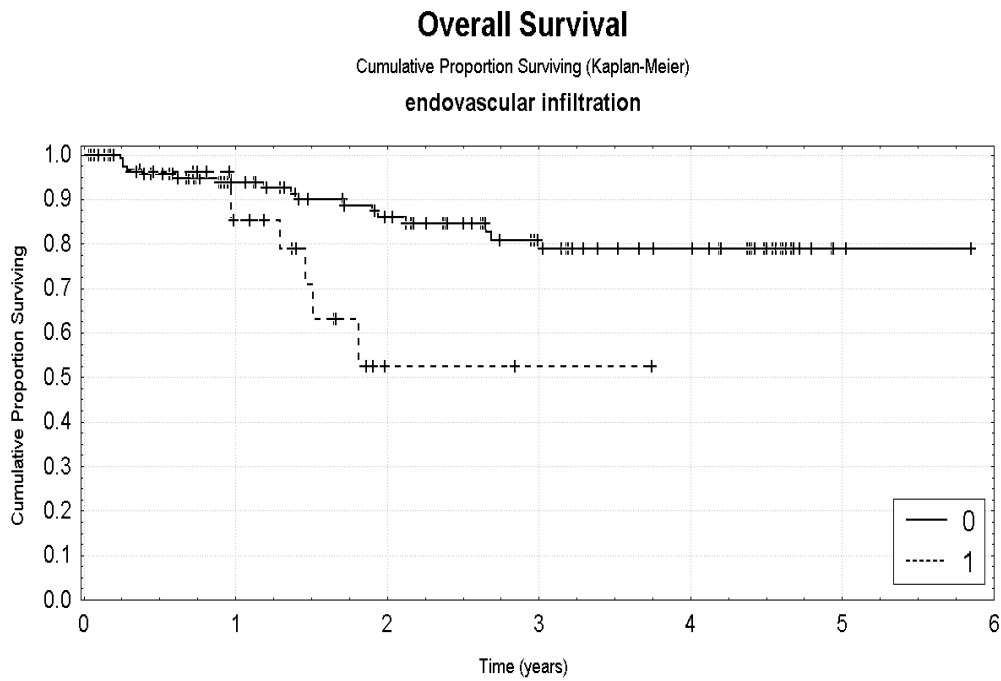
Statistická analýza sledovaného souboru pacientů po chirurgické léčbě KRK prokázala přiměřenou distribuci základních statistických popisů parametrů. Z hlediska pohlaví bylo v souboru 93 mužů a 57 žen. Průměrný věk u mužů byl 65,27 let a u žen 68,07 let. OS bylo v 1., 3. a 5. roce 92,2 %, 76,5 % a 70,2 %. DFI 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

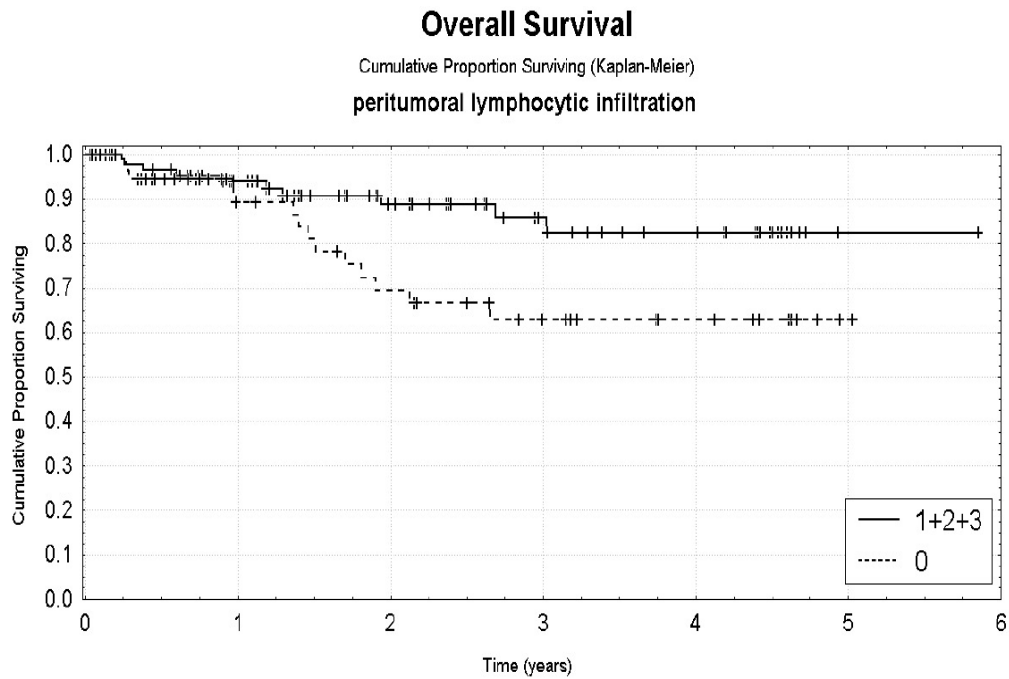


Endovaskulární infiltrace (VI) byla prokázána jako negativní prognostický faktor zkrácení celkového přežití (graf 2). Pacienti s pozitivním histopatologickým nálezem endovaskulární infiltrace měli 3,1x zvýšené riziko pro kratší OS. Přítomnost peritumorálních lymfocytů (graf 3) a Crohn-like PTL (graf 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 OS (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 celkové přežití (cut off 30 buněk / HPF). CD4+ lymfocytární infiltrace byla prokázána jako významný faktor pro prognózu celkové přežití (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.

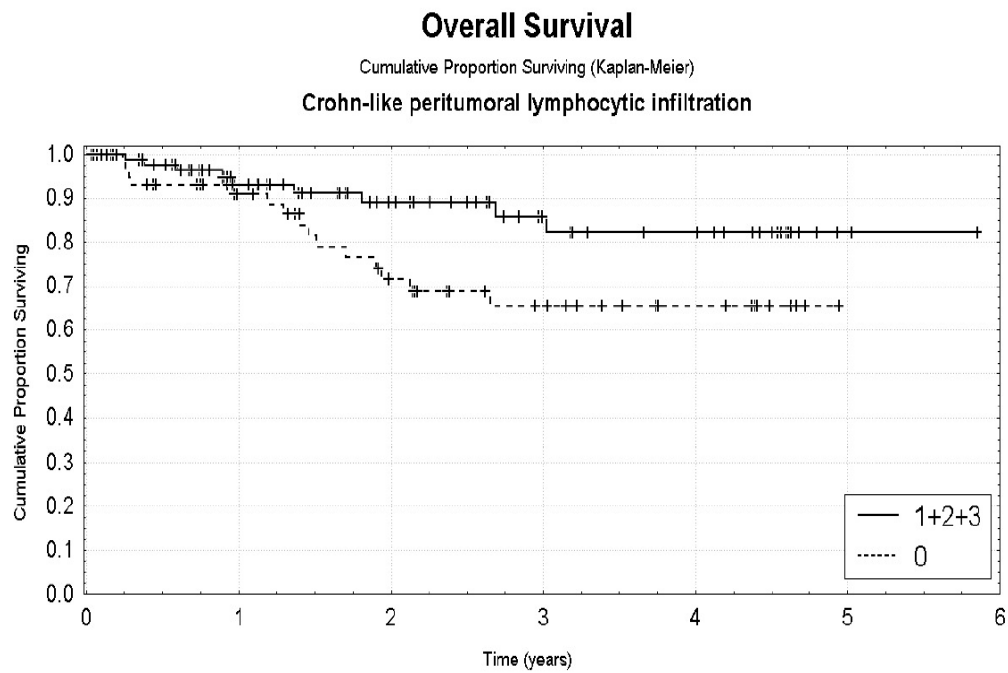
Graf 2 - Vztah přítomnosti endovaskulární infiltrace a OS ($p < 0,05$)



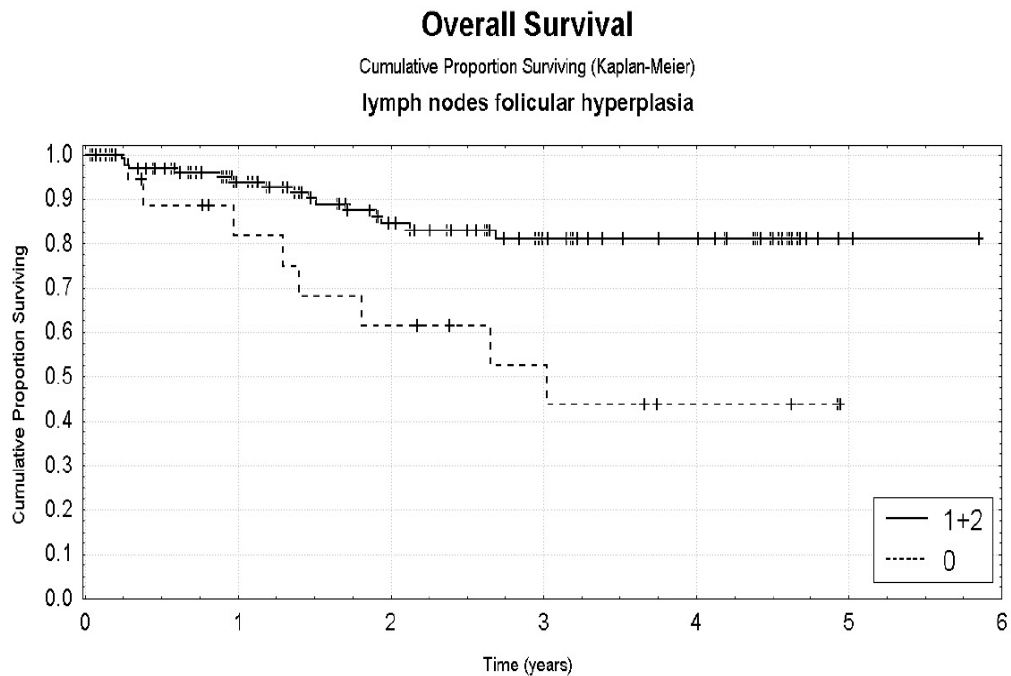
Graf 3 - Vztah přítomnosti infiltrace peritumorálních lymfocytů a OS ($p < 0,05$)



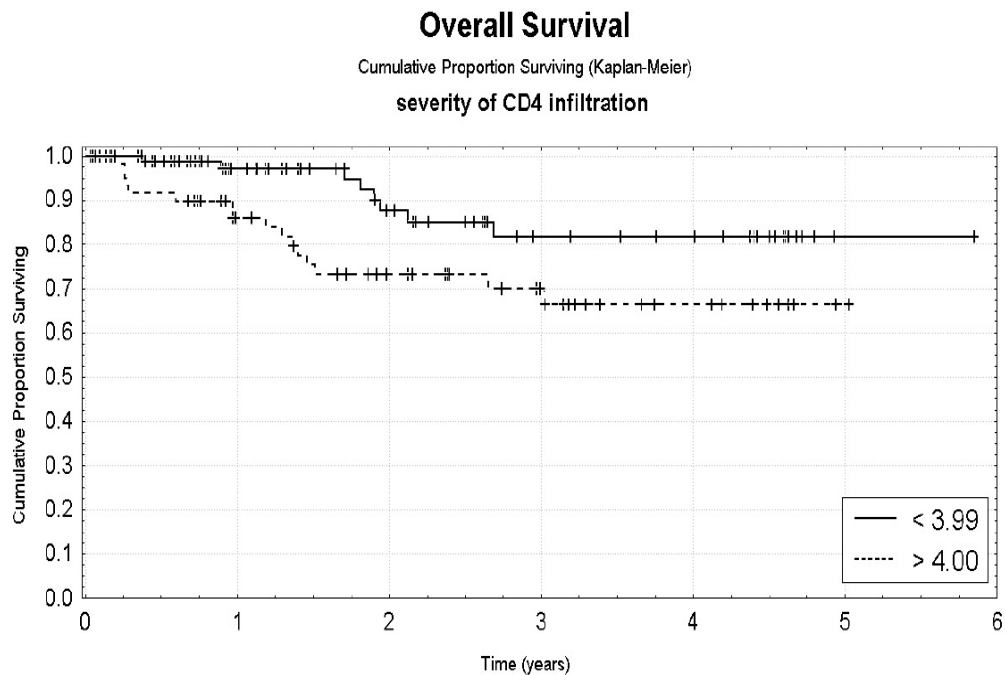
Graf 4 - Vztah Crohn-like PTL a OS ($p < 0,05$)



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)

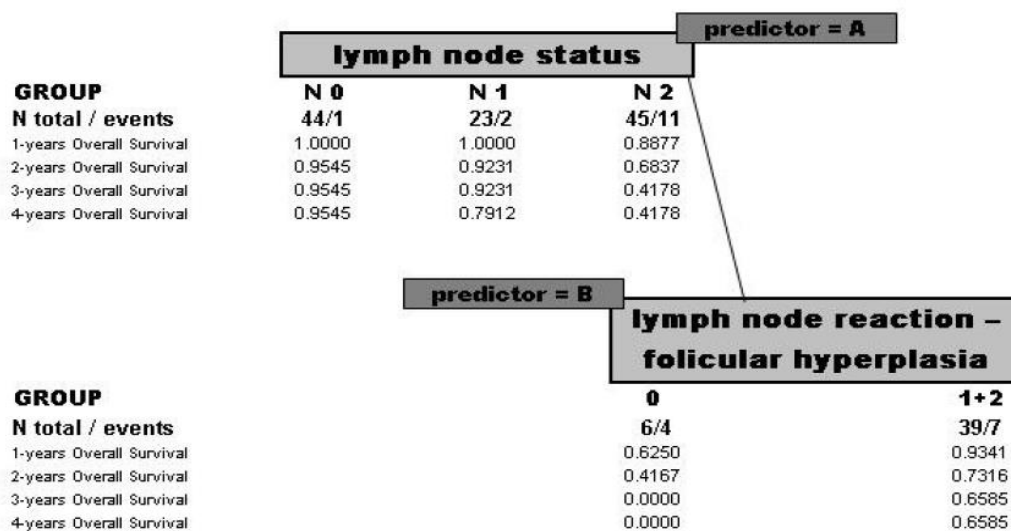


Multivariační Cox Regression Hazard Model ukázal, že kombinace závažnosti infiltrace lymfatických uzlin metastatickým procesem a LN-FH se jeví jako nejlepší prognostický faktor pro predikci rizika kratšího OS (p<0,05). Tato situace je zobrazena v modelu CART (graf 7). Ostatní sledované parametry nebyly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

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

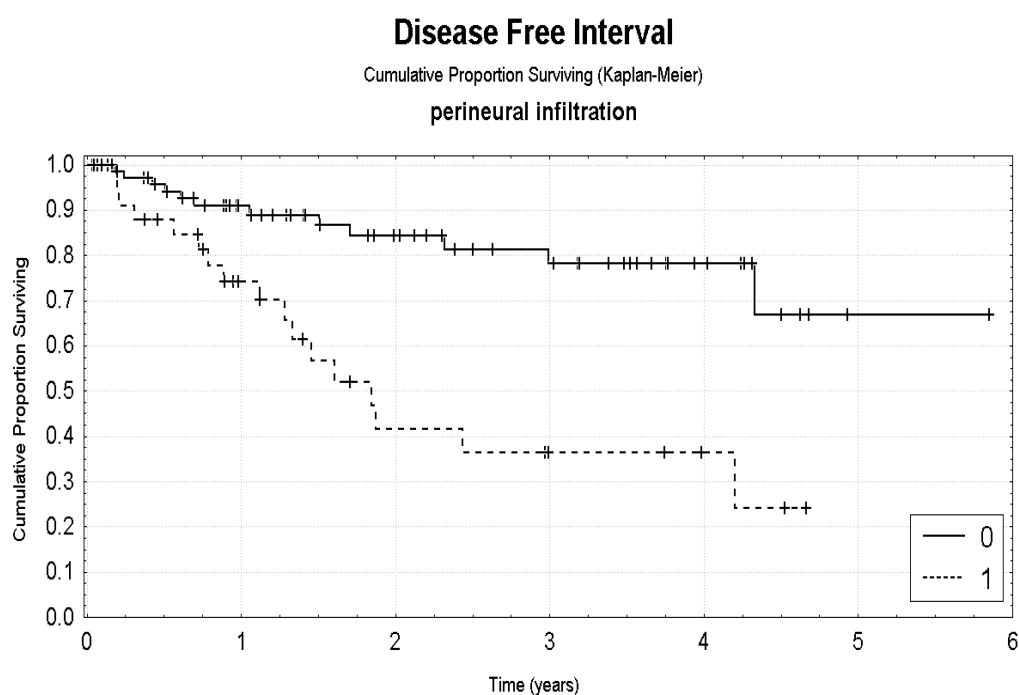
Classification and Regression Tree

Overall Survival

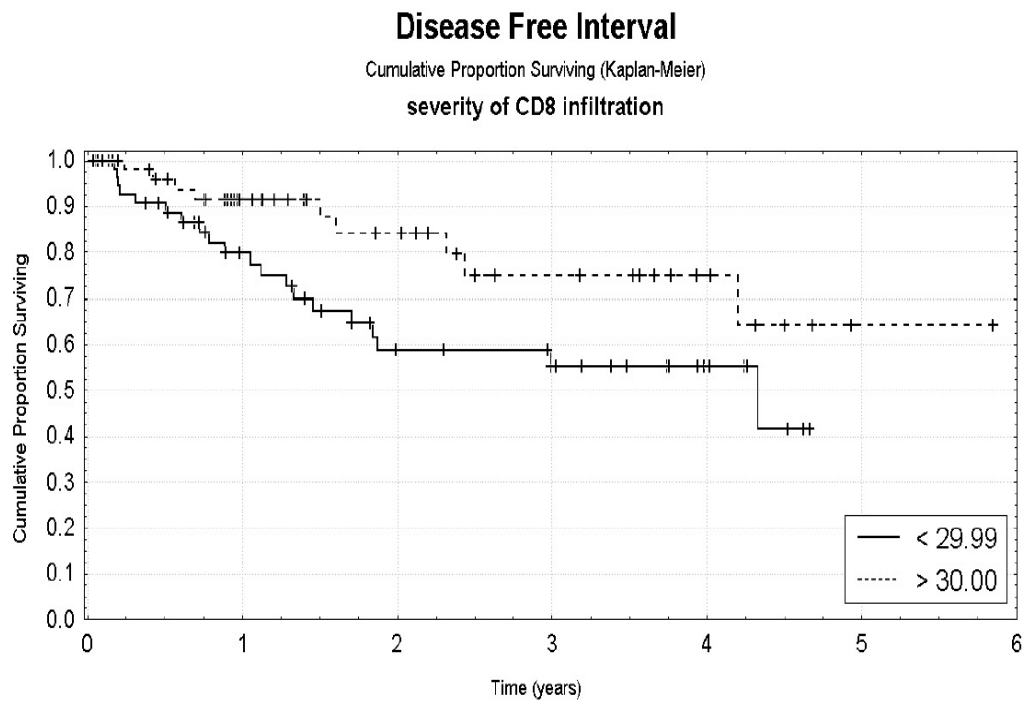


Perineurální infiltrace byla prokázána jako negativní prognostický faktor u časně recidivy (graf 8). Pacienti s pozitivním histopatologickým nálezem PI mají 3,8x zvýšené riziko kratšího DFI. Závažnost infiltrace CD8+ lymfocyty byla prokázána u Cox regresního modelu jako pozitivní prognostický faktor prodlužující DFI (cut off 30 cells/HPF) (graf 9). U pacientů nad cut off je 2,2x zvýšené riziko časně 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).

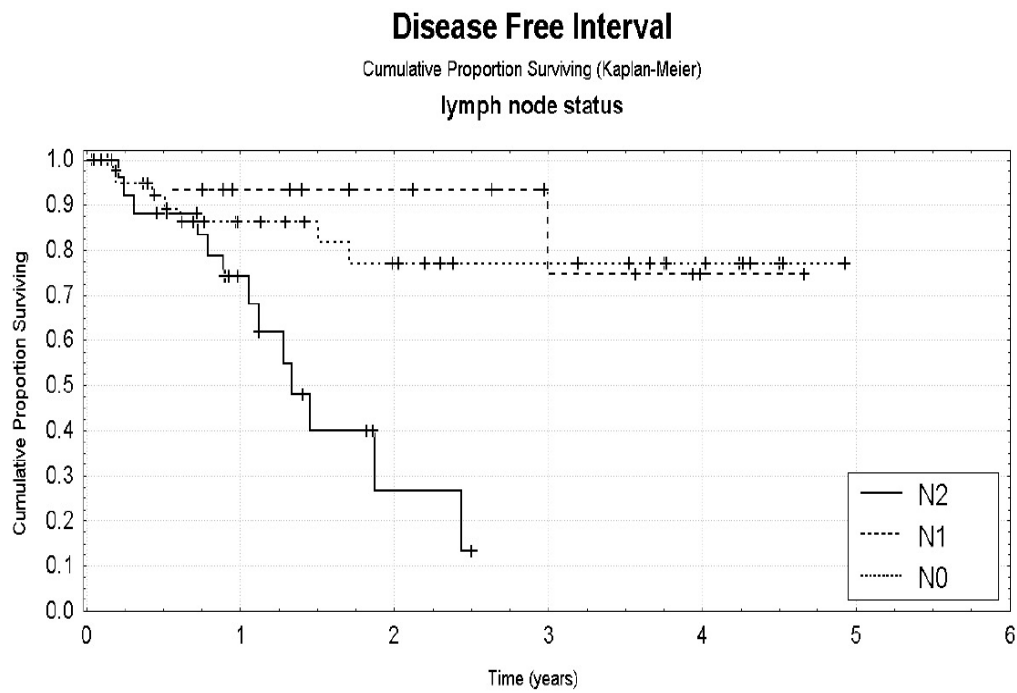
Graf 8 - Vztah perineurální infiltrace a DFI ($p < 0,05$)



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



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

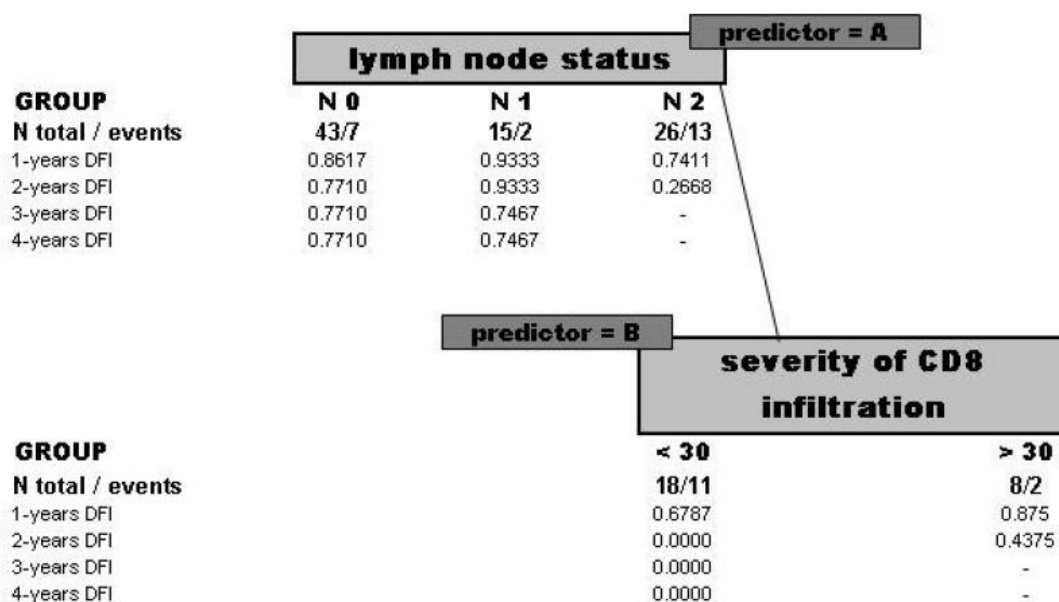


Multivariační Cox Regression Hazard Model prokázal, že kombinace závažnosti infiltrace lymfatických uzlin metastatickým procesem a závažnosti infiltrace CD8+lymfocyty se jeví jako nejlepší prognostický faktor pro predikci rizika časně recidivy ($p < 0,05$). Tato situace je zobrazena v modelu CART (graf 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

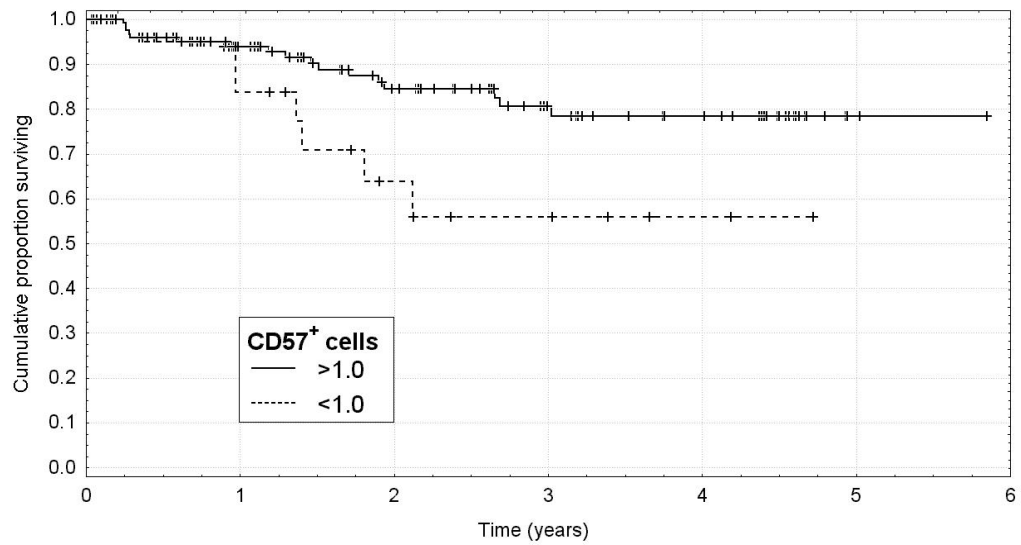
Classification and Regression Tree

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



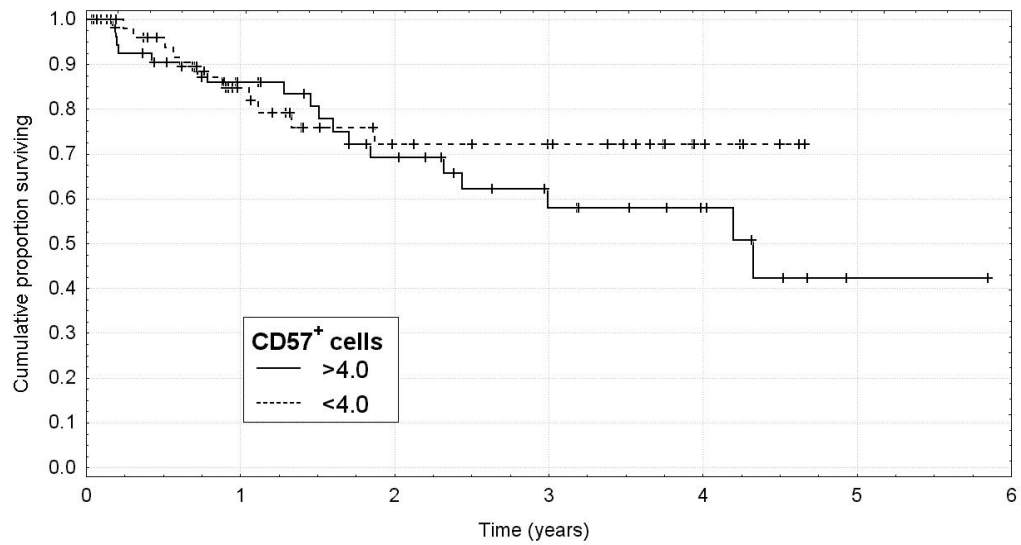
Graf 13 - CART model - vztah závažnosti infiltrace lymfatických uzlin a závažnosti infiltrace CD57+ lymfocyty a OS

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

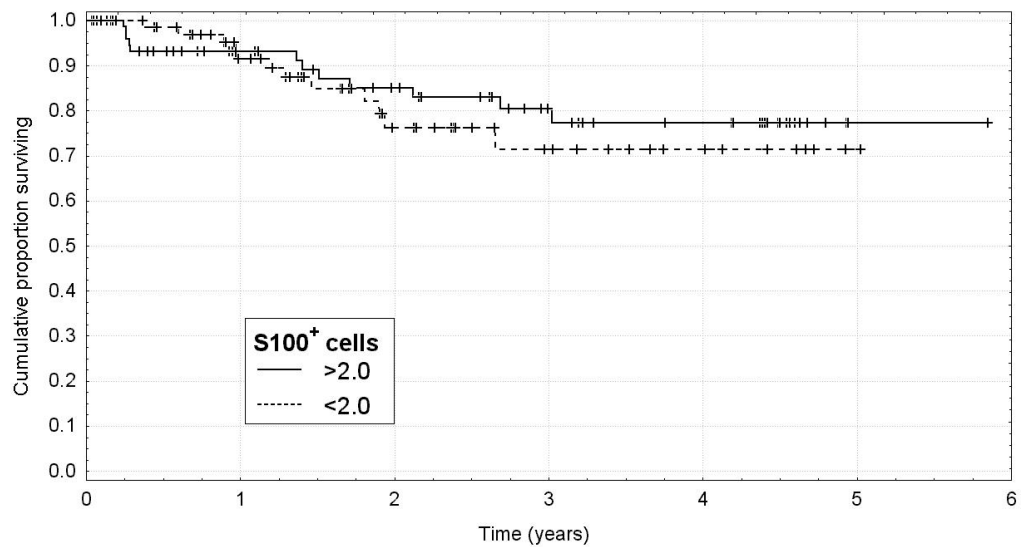
GROUP	CD57+ cells	
	> 1	< 1
N total / events	34/5	11/6
1-years overall survival	0.9688	0.6818
2-years overall survival	0.7863	0.4545
3-years overall survival	0.5242	.
4-years overall survival	0.5242	.

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

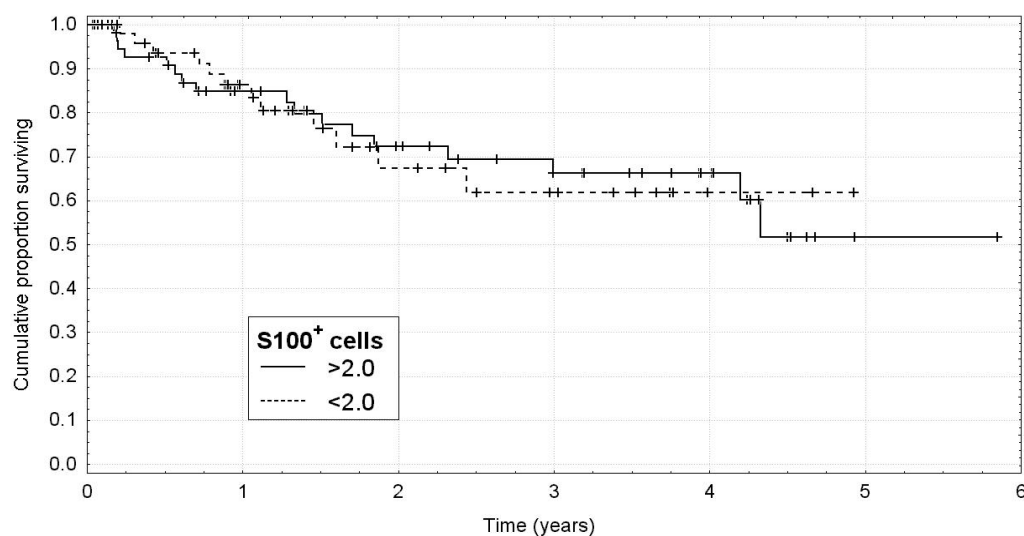


Nepodařilo se prokázat infiltraci S100+ jako statisticky signifikantní faktor z hlediska OS a DFI (graf 15 a 16). Dále se nepodařilo prokázat žádný statistický vztah mezi CD57+ a S100+ a předoperačně stanovenými hladinami CEA, CA19-9, CA72-4, TK, TPS nebo TPA.

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



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



17 Diskuze

Úloha adaptivní imunitní odpovědi při kontrole růstu a relapsu KRK zůstává kontroverzní a současné studie nejsou schopny odpovědět na všechny otázky, které se týkají prognózy pacientů po radikální chirurgické léčbě KRK [140]. Analyzovali jsme soubor 150 pacientů po radikálních chirurgických výkonech pro kolorektální karcinom s cílem detekovat negativní nebo pozitivní prognostické faktory z hlediska časně 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 demonstrováná tendence makroorganismu k „ohraničení“ maligního onemocnění - tzv. tumor control [141]. Poslední myšlenku společně podtrhuje jednak vlastní reakce - infiltrace

peritumorální tkáňe 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 časné 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 časné 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+) [142,143].

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 [144].

TIL a NK buňky se jeví jako slibné prognostické faktory s výhledem identifikace pacientů s vyšším rizikem k časné 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 časných relapsů).

Naše práce však otevřela i další otázky spojené s porozuměním vlastní funkce a reaktivitě imunitního systému. Je proto žádoucí, aby se případně další práce zaměřily na molekulárně-biologické pozadí nádorové infiltrace lymfocyty se snahou o pochopení jejich patofyziologických funkcí [145].

18 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 KHK. 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.

19 Literatura

1. Dušek, L., Malúšková, D., Mužík, J., Abrahámová, J. Epidemiologie nádorů tlustého střeva a konečníku v České Republice. Kolorektální karcinom 2013, speciální příloha Farmakoterapie. 2013; 9: 9-12.
2. Zavoral, M., Grega, T., Suchánek, Š. Screening kolorektálního karcinomu. Kolorektální karcinom 2013, speciální příloha Farmakologie. 2013; 9: 13-16.
3. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesion: esofagus, stomach nad colon. Gastrointest Endosc. 2003; 58: 3-43.
4. Urban, O. Endoskopická diagnostiky kolorektálního karcinomu. Kolorektální karcinom 2013, speciální příloha Farmakologie. 2013; 9: 17-20.
5. Edelman, B.R., Wisner, M.R.: Endorectal Ultrasound: Its Role in the Diagnosis and Treatment of Rectal Cancer, Clinics in Colon nad Rectal Surgery. 2008; 21: 167-177.
6. Ferrero, A., Langella, S., Giuliani, F., Vigano, L. et al. Intraoperative liver ultrasound still affects surgical strategy for patients with colorectal metastases in the modern era. World J Surg. 2013; 37: 2655-2663.
7. Floriani, I., Torri, V., Rulli, E. et al. Performance of imaging modalities in diagnosis of liver metastases from colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. J Magn Reson Imaging. 2010; 31: 19-31.
8. Smith, N., Brown, G. Preoperative staging of rectal cancer. Acta oncologica. 2008; 47: 20-31.
9. Blomquist, L., Glimelius, B. The „good“, the „bad“, and the „ugly“ rectal cancer s. Acta oncologica. 2008; 47: 5-8.
10. Kim, Y.K., Park, G., Kim C.S. et al. Diagnostic efficacy of gadoxetic acid-enhanced MRI for the detencion and characterisation of liver metastases: comparison with multidetector-row CT. Br.J.Radiol. 2012; 85: 539-47.
11. Grazioli, L., Bondioni, M.P., Haradone, H. et al. Hepatocellular adenoma and focal nodular hyperplasia: value of gadoxetic acid-enhanced MR paging in diferential diagnosis. Radiology. 2012; 262: 520-9.
12. Bohatá, Š., Bartušek, D., Hemmelová, B., Válek V. Zobrazovací metody v diagnostice kolorektálního karcinomu. Kolorektální karcinom 2013, Příloha Farmakoterapie. 2013; 9: 21-27.
13. Samee, A., Selvasekar, Ch.R. Current trends in staging rectal cancer. World J. Gastroenterol. 2011; 17: 828-34.
14. Hoch, J. Chirurgická léčba kolorektálního karcinomu. Rozhl Chir. 2012; 91: 48-51.

15. Kala, Z. Chirurgická léčba kolorektálního karcinomu. Kolorektální karcinom 2013, speciální příloha Farmakoterapie. 2013; 9: 47-53.
16. Bokey, E.L., Chapuis, P.H., Dent, O.F., et al. Surgical technique and survival in patients having a curative resection for colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2003; 46: 860-866
17. Teleky, B., Kührer, I. Surgical management of cancer of the colon. *Eur Surg*. 2006; 38: 124-128.
18. Kapiteijn, E., Marijnen, C.A., Naghtegaal, I.D. et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *New Engl J Med*. 2001; 345: 638-646.
19. Glimelius, B., Pahlman, L., Cervantes, A. Rectal cancer: ESMO clinical practise guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010; 5.
20. Krones, C.J., Strumpf, M., Schumpelick, V.: Chirurgie des Rektum-karzinom. *Chirurg* . 2009; 80: 303-310.
21. Glimelius, B., Gronberg, H., Jarhult, J. et al. A systematic overview of radiation therapy effect in rectal cancer. *Acta Oncol* 2003; 42: 476-492.
22. Wen-Tao, Z., Feng-Liang, H., Yu-Ying, L., Hong-Jie, L., Wei-Ming, L., Feng, Sun. Use of a transanal drainage tube for prevention of anastomotic leakage and bleeding after anterior resection for rectal cancer. *World J Surg*. 2013; 37: 227-232.
23. Xiao, L., Zhang, W.B., Jiang, P.C et al. Can transanal tube placement after anterior resection for rectal carcinoma reduce anastomotic leakage rate? A single-institution prospective randomized study. *World J Surg*. 2011; 35: 1367-1377.
24. CCG. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: A systematic review of 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet*. 2001; 358: 1291-1304.
25. Maas, M., Beets-Tan, R.G., Lambregts, D.M. et al. Wait-and-see policy for clinical complete responders after chemoradiation for rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 4633-40.
26. Yu, S., Brown, G., Heald, R. et al. Deferral of rectal surgery following a continued response to preoperative chemoradiotherapy (watch and wait) study: a phase II multicenter study in the United Kingdom. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 489.
27. Dalton, R.S., Velineni, R., Osborne, M.E., et al. A single-centre experience of chemoradiotherapy for rectal cancer: is there potential for nonoperative management? *Colorectal Dis*. 2012; 14: 567-71.
28. Marín, C., Robles, R., Conesa, A.L., Torres, J., Flores, D.P. et al. Outcome patient selection for surgical treatment of hepatic and pulmonary metastases from colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2013; 56: 43-50.

29. Carpizo, D.R., Are, Ch., Jarnagin, W., DeMatteo, R., Fong, Y. et al. Liver resection for metastatic colorectal cancer in patients with concurrent extrahepatic disease: results in 127 patients treated at a single center. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 2138-2146.
30. Grundmann, RT. Current state of surgical treatment of liver metastases from colorectal cancer. *World J gastrointest Surg.* 2011; 3: 183-189.
31. Cai, G.X., Cai, S.J. Multi-modality treatment of colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol.* 2012; 18: 16-24.
32. Yedibela, S., Klein, P., Feuchter, K. Surgical management of pulmonary metastases from colorectal cancer in 153 patients. *Ann Surg Oncol.* 2006; 13: 1538-1544.
33. Shah, S.A., Haddad, R., Al-Sukhni, W. Surgical resection of hepatic and pulmonary metastases from colorectal carcinoma. *J Am coll Surg.* 2006; 202: 468-475.
34. Třeška, V., Vodička, J., Špidlen, V., Skalický, T., Fichtl, J., Šimánek, V., Šafránek, J., Sutnar, A., Brůha, J. Jaterní a plicní metastázy kolorektálního karcinomu – zkušenosti Chirurgické kliniky v Plzni. *Rozhl Chir.* 2013; 92: 488-493.
35. Sun, H.C., Qin, L.X., Wang, L., et al. Risk factors for postoperative complications after liver resection. *Hepatobil Pancr Dis Int.* 2005; 4: 370-374.
36. Virani, S., Michaelson, J.S., Hutter, M.M. Morbidity and mortality after liver resection: results of the patient safety in surgery study. *J Am Col Surg.* 2007; 204: 1284-1292.
37. Van der Pool, A.E., Lalmahomed, Z.S, de Wilt, J.H, et al. Local treatment for recurrent colorectal hepatic metastases after partial hepatectomy. *J Gastrointest Surg.* 2009; 13: 890-895.
38. Lalmahomed, Z. S., Ayez, N., van der Pool, A.E et al. Anatomical versus nonanatomical resection of colorectal liver metastases: is there a difference in surgical and oncological outcome? *World J Surg.* 2011; 35: 656-661.
39. Sarpel, U., Bonavia, A.S., Grucela, A., et al. Does anatomic versus nonanatomic resection effect recurrence and survival in patients undergoing surgery for colorectal liver metastasis? *Ann Surg Oncol.* 2009; 16: 379-384.
40. De Hass, R.J., Wicherts, D.A., Flores, E. R1 resection by necessity for colorectal liver metastases: is it still a contraindication to surgery? *Ann Surg.* 2008; 248: 626-637.
41. Oussoultzoglou, E., Romain, B., Panaro, F. Long-term survival after liver resection for colorectal liver metastases in patients with hepatic pedicle lymph nodes involvement in the era of new chemotherapy regimens. *Ann Surg.* 2009; 249: 879-886.
42. Hurwitz, H.I. et al. The clinical benefit of bevacizumab in metastasis colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with

- chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Oncologist*. 2009; 14: 22-28.
43. Van Cutsem, E. et al. Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Ann Oncol* 2009; 20: 1842-1847.
44. www.livermetsurvey.com.
45. De Haas, R.J., Adam, R., Wicherts, D.A.: Comparison of simultaneous or delayed liver surgery for limited synchronous colorectal metastases. *Br J Surg*. 2010; 97: 1279-1289.
46. Mentha, G., Roth, A.D., Terraz, S. et al Liver first' approach in the treatment of colorectal cancer with synchronous liver metastases. *Dg Surg*. 2008; 25: 430-435.
47. Horák, P., Pospíšil, R., Polouček, P. Přednosti klasického operačního přístupu v chirurgické léčbě plicních metastáz. *Rozhl Chir*. 2011; 90: 162-165.
48. Dominguez-Ventura, A., Nichols, F.C. Lymphadenectomy in metastasectomy. *Thorac Surg Clin*. 2006; 16: 139-143.
49. Kondo, H., Okumura, T., Ohde, Y., Nakagawa, K. Surgical treatment for metastatic malignancies. Pulmonary metastasis: indications and outcomes. *Int J Clin Oncol*. 2005; 10: 81-85.
50. De Haas, R.J., Wicherts, D.A., Adam, R. Resection of colorectal liver metastases with extrahepatic disease. *Dig Surg*. 2008; 25: 461-466.
51. Limmer, S., Oevermann, E., Killaitis, C., Kujath, P., Hoffmann, M., Bruch, H.P. Sequential surgical resection of hepatic and pulmonary metastases from colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg*. 2010; 395: 1129-1138.
52. Marudanayagam, R., Ramkumar, K., Shanmugan, V., Langman, G., Rajesh, P., Coldham, C., Bramhall S.R, Mayer, D., Buckels, J., Mirza, D.F. Long-term outcome after sequential resections of liver and lung metastases from colorectal carcinoma. *HPB*. 2009; 11: 671-676.
53. Sakamoto, T., Tsubota, N., Iwanaga, K., Yuki, T., Matsuoka, H., Yoshimura, M. Pulmonary resection for metastases from colorectal cancer. *Chest* . 2001; 119: 1069-1072.
54. Park, J.S., Kim, H.K., Choi, Y.S. et al. Outcomes after repeated resection for recurrent pulmonary metastases from colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2010; 21: 1285-1289.
55. Pereszlenyi, A., Rolle, A., Koch, R., Schilling, A., Baier, B., Bis, B. Resection of multiple lung metastases – where are the limits? *Bratisl Lek Listy*. 2005; 106: 262-265.
56. Mongil, P.R., Pages, N.C., Ruiz, N.J.A. et al: Survival analysis of resection of lung metastases from colorectal cancer. *Arch Bronchopneumol*. 2009; 45: 235-239.

57. Junggraithmayer, W., Schäfer, O., Stoelben, E., Hasse, J., Passlick, B. Radifrequency ablation of malignant lung tumour. Judicious approach? *Chirurg.* 2005; 76: 887-893.
58. Schultheis, K.H., Schroeder-Finckh, R., Schultheis, A., Kappes, R., Sommerer, F., Tannapfel, A.: Effectiveness of radifrequency ablation of lung tumors. *Chirurg.* 2008; 79: 963-966.
59. García.Yuste M., Cassivi S., Paleru C.: Thoracic lymphatic involvement on patients having pulmonary metastasectomy: incidence and the effect on prognosis. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 166-169.
60. Szöke, T., Kortner, A., Neu, R. et al. Is the mediastinal lymphadenectomy during pulmonary metastasectomy of colorectal cancer necessary? *Interact Cardiovasc Surg.* 2010; 10: 694-698.
61. Vodička, J., Špidlen, V., Šimánek, V., Šafránek, J., Třeška, V., Skalický, T., Sutnar, A., Fichtl, J., Mukenšnábl, P. Chirurgická léčby plicních metastáz kolorektálního karcinomu – desetileté výsledky. *Rozhl Chir.* 2012; 91: 81-86.
62. Riquet, M., Foucault, C., Cazes, A. et al. Pulmonary resection for metastases of colorectal adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg.* 2010; 89: 375-380.
63. Heriot, A.G., Tekkis, P.P., Darzi, A., Mackay, J. Surgery for local recurrence of rectal cancer. *Colorectal Dis.* 2006; 8: 733-747.
64. Kobayashi, H., Mochizuki, H., Sugihara, K., Morita, T., Kotake, K., Teramoto, T., Kameoka, S., Saito, Y., Takahashi, K., Hase, K., Oya, M., Maeda, K., Hirai, T., Kameyama, M., Shirouzu, K., Muto T. Characteristics of recurrence and surveillance tools after curative resection for colorectal cancer: a multicenter study. *Surgery.* 2007; 141: 67-75.
65. Polglase, A.L., McMurrick, P.J., Tremayne, A.B., Bhathal, P.S. Local recurrence after curative anterior resection with principally blunt dissection for carcinoma of the rectum and rectosigmoid. *Dis Colon Rectum.* 2001; 44: 947-954.
66. Ghouti, L., Portier, G., Kirzin, S., Guimbaud, R., Lazorthes, F. Surgical treatment of recurrent locoregional rectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol.* 2007; 31: 55-67.
67. Yamamoto, Y., Imai, H., Iwamoto, S., Kasai, Y., Tsunoda, T. Surgical treatment for the recurrence of colorectal cancer. *Surg Today.* 1996; 26: 164-168.
68. Hempen, H.G., Raab, H.R. Therapy of locally recurrent rectal carcinoma. *Chirurg.* 2009; 80: 311-315.
69. Saito, N., Koda, K., Takiguchi, N., Oda, K., Ono, M., Sugito, M., Kawashima, K., Ito, M. Curative surgery for local pelvic recurrence of rectal cancer. *Dig Surg.* 2003; 20: 192-199
70. Moriya, Y. Treatment strategy for locally recurrent rectal cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2006; 36: 127-131.

71. Wong, C.S., Cummings, B.J., Brierley, J.D., Catton, C.N., McLean, M., Catton, P., Hao, Y.
Treatment of locally recurrent rectal carcinoma-results and prognostic factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998; 40: 427-435.
72. Lipská, L., Visokai, V., et al. Recidiva kolorektálního karcinomu, Grada Publishing .2009; 11-32, 353, 370.
73. Pacelli, F., Tortorelli, A.P., Rosa, F., Bossola, M., Sanchez, A.M., Papa, V., Valentini, V., Doglietto, G.B. Locally Recurrent Rectal Cancer: Prognostic Factors and Long-Term Outcomes of Multimodal Therapy. *Ann Surg Oncol.* 2009; 16.
74. Palmer, G., Martling, A., Cedermark, B., Holm, T. A population-based study on the management and outcome in patients with locally recurrent rectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2007; 14: 447-454.
75. Novák, P., Liška, V., Třeška, V., Maňasová, M. Opakované chirurgické výkony jako zásadní součást léčby recidivujícího kolorektálního karcinomu – kazuistika. *Rozhl Chir.* 2010; 89: 130-134.
76. De la Fuente, S.G., Manson, R.J., Ludwig, K.A., Mantyh, C.R. Neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer reduces lymph node harvest in proctectomy specimens. *J Gastrointest Surg.* 2009; 13: 269-274.
77. Gehoff, A., Basten, O., Spenger, T., Conradi, LCh., Bismarck, C., Bandorski, D., Merkelbach-Bruse, S., Schneider-Stockm R., Wirtz, R.M., Kitz, J., Müller, A., Hartmann, A., Becker, H., Ghadimi, B.M., Liersch, T., Rüschoff, J. Optimal lymph node harvest in rectal cancer (UICC stages II and III) after preoperative 5-FU-based radiochemotherapy. Acetone compression is a new and highly efficient method. *Am J. Surg Pathol.* 2012; 36: 202-213.
78. Chou, J.F., Row, D., Gonen, M., Liu, Y.H., Schrag, D., Weiser, M.R. Clinical and pathologic factors that predict lymph node yield from surgical specimen in colorectal cancer. A population-based study. *Cancer.* 2010; 116: 2560-2570.
79. Mekenkamp, L.J.M., van Krieken, J.H.M., Marijmen, C.A.M., van de Velde, C.J.H., Nagtegaal, I.D. For the Pathology Review Committee and the co-operative clinical investigators. Lymph node retrieval in rectal cancer is dependent on many factors- the role of the tumor, the patient, the surgeon, the radiotherapist, and the pathologist. *Am J Surg Pathol.* 2009; 33: 1547-1553.
80. Dušek, M., Chlumská, A., Mukenšabl, P. Zámečník, M. Hodnocení lymfatických uzlin v resekátech tlustého střeva s kolorektálním karcinomem. *Rozhl Chir.* 2013; 92: 250-54.
81. Ferko, A. Karcinom rekta-současný pohled na kritéria radikality resekčních výkonů. *Rozhl Chir.* 2013; 92: 295-296.

82. Titu, L.V., Tweedle, E., Rooney, P.S. High tie of the inferior mesenteric artery in curative Surgery for left colonic and rectal cancer a systematic review, *Dog Surg.* 2008; 28: 148-157.
83. Heald, R.J., Moran, B.J., Ryall, R.D., Sexton, R., MacFarlane, J.K. Rectal cancer. The Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1987-1997, *Arch Surg.* 1998; 133: 894-899.
84. How, P., Shihab, O., Tekkis, P., Brown, G., Quirke, P., Heald, R., Moran, B. A systematic review of cancer related patient outcomes after anterior resection and abdominoperineal excision for rectal cancer in the total mesorectal excision era. *Surg Oncol.* 2011; 20: 149-155.
85. Quirke, P. Training and quality assurance for rectal cancer: 20 years of data is enough. *The Lancet Oncology.* 2003; 4: 695-701.
86. Kirwan, W.A, Drumm, J., Hogan, J.M, Keohane, C. Determining safe margin of resection in low anterior resection for rectal cancer. *Br J Surg.* 1988; 75: 720-721.
87. Moore, H.G, Riedel, E., Minsky, B.D., Saltz, L., Paty, P., Wong, D., Cohen, A.M., Guillem, J.G. Adequacy of 1 cm distal margin after restorative rectal cancer resection with sharp mesorectal excision and preoperative combined-modality therapy. *Ann Surg Oncol.* 2003; 10: 80-85.
88. Ueno, H., Mochizuki, H., Hashiguchi, Y. Preoperative parameters expanding the indication of sphincter preserving surgery in patients with advanced low rectal cancer. *Ann Surg.* 2004; 239: 34-42.
89. Washington, M.K, Berlin, J., Branton, P., Burgart, L.J., Carter, D.K., Fitzgibbons, P.L, Haling, K., Frankel, W., Jessup, J., Kakar, S, Minsky, B., Nakhleb, R., Compton, C.C. Protocol for the examination of specimen from patients with primary carcinoma of the colon and rektum. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133: 1539-1551.
90. Hermanek, P., Junginger T. The circumferential resection margin in rectal carcinoma surgery. *Tech Coloproctol.* 2005; 9: 193-200.
91. Ihnát, P., Martínek, L., Ihnát, R., Rudinská, L., Mitták, M., Vávra, P., Zonča, P. Circumferenčný resekcčný okraj v modernej liečbe karcinómu rekta. *Rozhl Chir.* 2013; 92: 297-303.
92. Nagtegaal, I.D., Marijnen, A.M., Kranenbarg, E.K., van der Velde, C.J.H., van Kriken, J.M. Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma. *Am J Surg Ptahol.* 2002; 26: 350-357.
93. Wibe, A., Rendedal, P.R, Svensson, E., Norstein, J., Eide, T.J., Myrvold, H.E., Soreide, O. Prognostic significance of the circumferential resection margin following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg.* 2002; 89: 327-334.

94. Lipská, L., Visokai, V. et al. Recidiva kolorektálního karcinomu. Komplexní přístup z pohledu chirurga. Kap: Lokální recidiva karcinomu rekta. Praha, Grada. 2009; 307-321.
95. Nagtegaal, I.D., Gossens, M.J., Marijnen, C.A. et al. Combinations of tumor and treatment parameters are more discriminative for prognosis than the present TNM system in rectal cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 1647-1650.
96. Gossens, M.J., Van Krieken, J.H., Marijnen, C.A. et al. Improvement of staging by combining tumor and treatment parameters: The value of for prognostication in rectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007; 5: 997-1003.
97. Parfitt, J.R., Driman, D.K. The total mesorectal excision specimen for rectal cancer: a review of its pathological assessment. *J Clin Pathol.* 2007; 60: 849-55.
98. Quirke, P., Steele, R., Monson, J., Grieve, R., Khanna, S. et al. Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. *Lancet.* 2009; 373: 821-8.
99. Hovorková, E., Hadži-Nikolov, D., Ferko, A., Örhalmi, J., Chobola, M., Ryška, A. Problematika stanovení bezpečných resekcíh okrajů u karcinomu rekta. *Rozhl Chir.* 2014; 93: 92-99.
100. Divella, R., Daniele, A., Abbate, I., Bellizzi, A., Savino, E., Simone, G., Giannone, G., Giuliani, F., Fazio, V., Gadaleta-Caldarola, G., Gadaleta, C.D., Lolli, I., Sabbà, C., Mazzocca, A. The presence of clustered circulating tumor cells (CTCs) and circulating cytokines define an aggressive phenotype in metastatic colorectal cancer. *Cancer Causes Control.* 2014; 9: 19.
101. Bork, U., Grützmann, R., Rahbari, N.N., Schölch, S., Distler, M., Reissfelder, C., Koch, M., Weitz, J. Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 10296-10304.
102. Akagi, Y., Kinugasa, T., Adachi, Y., Shirouzu, K. Prognostic significance of isolated tumor cells in patients with colorectal cancer in recent 10-year studies. *Mol Clin Oncol.* 2013; 6: 582-592.
103. Andreyev, H.J., Norman, A.R., Cunningham, D., Oates, J., Dix, B.R., Iacopetta, B.J., Young, J., Walsh, T., Ward, R., Hawkins, N., Beranek, M., Jandik, P. et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer.* 2001; 85: 692-6.
104. Šácha, M., Havlíček, K., Sákra, L. et al. K-ras mutation as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Rozhl. Chir.* 2008; 87: 32-37.
105. Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M. et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 1626-1634.

106. Fínek J. 2. a další linie léčby pokročilého kolorektálního karcinomu. Farmakoterapie- speciální příloha: Kolorektální karcinom. 2013; 9: 73-75.
107. Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F. et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J.Clin.Oncol.* 2008; 26: 5705-5712.
108. Sartore-Bianchi, A., Martini, M., Molinari, F. et al. PI3KCA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 2009; 69: 1851-1857.
109. Walter, A., Johnstone, E., Swanton, C. et al. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2009; 9: 489-499.
110. Hveem, T.S., Merok, M.A., Pretorius, M.E., Novelli, M., Bævre, M.S., Sjo, O.H., Clinch, N., Liestøl, K., Svindland, A., Lothe, R.A., Nesbakken, A., Danielsen, H.E. Prognostic impact of genomic instability in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2014; 110: 2159-64.
111. Merok, M.A., Ahlquist, T., Røyrvik, E.C., Tufteland, K.F., Hektoen, M., Sjo, .H., Mala, T., Svindland, A., Lothe, R.A., Nesbakken, A. Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series. *Ann Oncol.* 2013; 24: 1274-82.
112. Banerjee, A., Hands, R.E., Powar, M.P., Bustin, S.A., Dorudi, S. Microsatellite and chromosomal stable colorectal cancers demonstrate poor immunogenicity and early disease recurrence. *Colorectal Dis.* 2009; 11: 601-8.
113. Sargent, D.J., Marsoni, S., Thibodeau, S.N. et al. Confirmation of deficient mismatch repair (dMMR) as predictive marker for lack of benefit from 5-FU based chemotherapy in stage II and III colon cancer: A pooled molecular reanalysis of randomized chemotherapy trials. *J. Clin. Oncol.* 2008; 20: 26.
114. Pitule, P., Liška, V., Třeška, V., Novák, P., Čedíková, M., Kralíčková, M. Přínos molekulární biologie v diagnostice a léčbě kolorektálního karcinomu- současnost a budoucnost. *Rozhl Chir.* 2011; 90: 315-323.
115. Atreya, I., Neurath, M.F. Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Review of Anticancer Therapy.* 2008; 8.
116. 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: 1960-64.
117. Talmadge, J.E., Donkor, M., Scholar, E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer and Metastasis Review.* 2007; 26: 373-400.

118. 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.
119. Ohtani, H. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer immunity*. 2007; 7: 4.
120. 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.
121. 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.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. Cooper, M., Fehniger, T.A, Caligiuri, M.A.: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*. 2001; 22: 633-640.
126. 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.
127. 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.
128. 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>.
129. Cooper M., Colonna M., Yokoyama WM.: Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *Embo reports*. 2009; 10: 1103-1110.

130. Mocikat, R., Braumuller, H., Gumy, 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.
131. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., et al. Tumor–driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res*. 2006; 66: 5527–5536.
132. 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.
133. Steinman, R.M., Hawiger, D., Nussenzweig, M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2004; 21: 685-711.
134. Pollard, J.W. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*. 2004; 4: 71-78.
135. 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; 13: 1472-1479.
136. 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.
137. Hayday, A., Tigelaar, R. Immunoregulation in the tissues by $\gamma\delta$ T cells. *Nature Rev. Immunol*. 2003; 3: 233–242.
138. 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.
139. Lipská, L., Visokai, V. a kolektiv: Recidiva kolorektálního karcinomu. 2009; 62.
140. Van den Eynde, M., Hendlisz, A. Treatment of colorectal liver metastasis: a review. *Reviews on Recent Clinical Trials*. 2009; 1: 56-62.
141. 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.
142. Koch, M., Beckhove, P. Op den Winkel, J. et al. Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Annals of Surgery*. 2006; 244: 986-992.

143. 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: 1093-1102.
144. Ogino, S., Nosho, K., Iraha, N., Meyerhardt, J.A., Baba, Y. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylation phenotype. *Clinical Cancer Research*. 2009; 20: 6412-6420.
145. Zbar AP: The immunology of colorectal cancer. *Surgical Oncology*. 2004; 13: 45-53.

29 Publikace autora

Články: 18

Mírka, H., Ferda, J., Koudelová, J., Skála, V., Klečka, J., Novák, P.

Plyn v portálním řečišti- příčina, diagnostika a klinický význam, Česká radiologie. 2002; 11

Rupert, K., Pesta, M., Holubec, L., Nosek, J., Novák, P., Černý, R., Topolčan, O., Holubec, L.jr., Třeška, V. Characteristics Of Resection Line Of Colorectal Carcinoma By Quantitative Expression Of MRNA CEA And TIMP-1., The Internet Journal of Surgery. 2007; 1.

Koudelová, J., Kunešová, M., Koudela, K. jr., Matějka, J., Novák, P., Krausová, J.- Periferní primitivní neuroektodermový tumor – PNET, Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Czechosl. 2006; 73.

Novák, P., Brabec, M., Novák, I., Maňasová, M. Oboustranný pleurální výpotek jako komplikace zavedení centrálního žilního katétru – kazuistika. Rozhl Chir. 2008; 87: 65-67.

Baxa, J., Ferda, J., Novák, P., Moláček, J., Mírka, H., Bednářová, A., Koželuhová, J., Třeška, V., Kreuzberg, B. Úloha CT-enterografie v zobrazení obstrukce tenkého střeva. Česká radiologie. 2008; 62: 66-73.

Sutnar, A., Skalický, T., Třeška, V., Hess, O., Mírka, H., Michal, M., Novák, P., Liška, V. Cystadenom jater s ovariálním stromatem – kazuistika. Rozhl Chir. 2008; 87: 259-262.

Novák, P., Liška, V., Třeška, V., Maňasová, M. Opakované chirurgické výkony jako zásadní součást léčby recidivujícího kolorektálního karcinomu- kazuistika. Rozhl Chir. 2010; 89: 130-134.

Liška, V., Novák, P., Třeška, V., Holubec, L., Maňasová, M. Moderní algoritmy diagnostiky a léčby anorektálních píštělí na klinickém pracovišti - kazuistiky. Rozhl Chir. 2010; 89: 208-214.

Kulda, J., Kural, T., Hasman, D., Novák, P., Brabec, M. Léčba píštělí orální části gastrointestinálního traktu na chirurgické jednotce intenzivní péče, Rozhl Chir. 2010; 89: 421-426.

Šmíd, D., Novák, P., Liška, V., Třeška, V. Pilonidální sinus- chirurgická léčba na našem pracovišti., Rozhl Chir. 2011; 90: 301-305.

Pitule, P., Liška, V., Třeška, V., Novák, P., Čedíková, M., Kralíčková, M. Přínos molekulární biologie v diagnostice a léčbě kolorektálního karcinomu - současnost a budoucnost. Rozhl Chir. 2011; 90: 315-32.

Novák, P., Liška, V., Kural, T., Brabec, M., Kulda, J., Třeška, V. Hodnocení prognózy těžké sekundární peritonitidy. Rozhl Chir. 2011; 90: 537-542.

Hlavatá, I., Mohelníková-Duchoňová, B., Václavíková, R., Liška, V., Novák, P., Brůha, J., Vyčítal, O., Holubec, L., Třeška, V., Vodička, P., Souček, P. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. Mutagenesis. 2012; 27: 187-96.

Liška, V., Vyčítal, O., Daum, O., Novák, P., Třeška, V., Brůha, J., Pitule, P., Holubec, L. Infiltration of colorectal carcinoma by S100+ dendritic cells and CD57+ lymphocytes as independent prognostic factor after radical surgical treatment. Anticancer Research. 2012; 32: 2129-2132.

Novák, P., Liška, V., Třeška, V., Kopalová, J., Vyčítal, O., Brůha, J. Klinické prognostické faktory kolorektálního karcinomu po jeho radikální léčbě. Rozhl Chir. 2012; 91: 219-222.

Novák, P., Třeška, V.: Chirurgická léčba časných a lokálně pokročilých karcinomů rekta. Kolorektální karcinom 2013. Farmakoterapie-speciální příloha. 2013; 9: 37-41.

Pitule, P., Vyčítal, O., Brůha, J., Novák, P., Hošek, P., Třeška, V., Hlavatá, I., Souček, P., Králíčková, M., Liška, V. Differential Expression and Prognostic Role of Selected Genes in Colorectal Patients. Anticancer Research 2013; 33: 4855-4866.

Knihy – kapitoly v knihách

Liška, V., Daum, O., Novák, P., Třeška, V., Vyčítal, O., Brůha, J., Pitule, P.: Tumor infiltrating lymphocytes as prognostic factor of early recurrence and poor prognosis of colorectal cancer after radical surgical treatment. In Colorectal cancer biology – from genes to tumor, Editor Rajunor Ettarh, Intech, 2012, Rijeka.

Třeška, V., Kasal, E., Stránský, P., Skalický, T., Šimánek, V., Novák, P., Kural, T., Klečka, J. jr., Kuba, J., Bosman, R., Moláček, J., Traumatologie břicha a retroperitonea, 2013; Poranění tenkého střeva, tračníku a konečníku s. 77-93.

Vodička, J. a kol.: Speciální chirurgie. UK v Praze, Karolinum 2014; Novák, P., Holubec, L.: Chirurgie tlustého střeva a anorekta 163-193.

21 Přílohy

Liška, V., Daum, O., Novák, P., Třeška, V., Vyčítal, O., Brůha, J., Pitule, P. Tumor infiltrating lymphocytes as prognostic factor of early recurrence and poor prognosis of colorectal cancer after radical surgical treatment. In Colorectal cancer biology – from genes to tumor, Editor Rajunor Ettarh, Intech, 2012, Rijeka.

Liška, V., Vyčítal, O., Daum, O., Novák, P., Třeška, V., Brůha, J., Pitule, P., Holubec, L.: Infiltration of colorectal carcinoma by S100+ dendritic cells and CD57+ lymphocytes as independent prognostic factor after radical surgical treatment. Anticancer Research, 2012, 32: 2129-2132.

Novák, P., Liška, V., Třeška, V., Kopalová, J., Vyčítal, O., Brůha J.: Klinické prognostické faktory kolorektálního karcinomu po jeho radikální léčbě. Rozhl Chir, 2012, 91: 219-222.

Tumor Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Factor of Early Recurrence and Poor Prognosis of Colorectal Cancer After Radical Surgical Treatment

Vaclav Liska¹, Ondrej Daum², Petr Novak¹, Vladislav Treska¹,
Ondrej Vycital¹, Jan Bruha¹, Pavel Pitule¹ and Lubos Holubec³

¹Department of Surgery,

²Institute of Pathology,

³Department of Oncology, Charles University Prague,
Medical School and Teaching Hospital Pilsen,
Czech Republic

1. Introduction

Sixty percent of patients with colorectal cancer (CRC) are afflicted with distant metastases (liver or lung metastatic process) or a local relapse of malignancy (Bird et al., 2006). The possibilities of surgical and oncological treatment of this disease offer us a large spectrum of treatments including the combination of surgical procedures and consecutive oncological treatments. In the case of radical surgical therapy we can consider the curative access. The main medical problem of CRC is the high rate of recurrences after radically performed surgical therapy. The operability of recurrence is only about 30% in the case of local relapse and 20% in the case of distant metastases (Coleman et al., 2008; Kobayashi et al., 2007). The second dominant problem is the early recurrence of CRC after radical surgical treatment, when the patients undergo a difficult and exhausting procedure with a high risk of perioperative complications without any significant differences in overall survival against modern palliative therapy (Van den Eynde & Hendlisz, 2009).

Contemporary clinical and histopathological prognostic factors (staging, grading, etc.) used for the detection of patients with a high risk of relapse and a short overall survival rate and for the indication of adjuvant oncological treatment after radical surgery are not sufficient. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) were described as a good prognostic factor for patients with a high risk of relapse. They are critical indicators of efficient antitumor immunological response. Their number, type and morphology of TIL cells determine resulting tumor prognosis (Atreya & Neurath, 2008; Galon et al., 2006). They could be connected also with the suppression of micrometastatical disease after radical surgery (Gajewski et al., 2006; Pages et al., 2005). We can recognize either the type of immune cells or distinguish their morphological aspects (infiltration of any part of tumor or surrounding of tumor or tributary lymph nodes) (Talmadge et al., 2007).

We detail only short overview of their types and function. We recommend the readers with deeper interest in these problems to find comprehensive reviews in the cited papers (Jochems et al., 2011; Ohtani 2007). From this view we find CD8+ and CD4+ T lymphocytes (Fig. 1a & Fig. 1b), natural killer cells (Fig. 1c), dendritic cells (Fig. 1d), macrophages, etc. The exact function of these cells is under current discussion. We only know that they play main role in controlling tumor development and growth. CD8+ T lymphocytes within cancer cell nests of colorectal cancer have significant impact on the survival of patients. They contain the cytolytic enzyme granzyme-B. In case of increased proliferating activity of CD8+ T lymphocytes we observe their activated and cytotoxic phenotype that is significantly associated with the absence of early metastatic events (vascular emboli, lymphatic invasion or perineural invasion of tumor cells) and with a decreased rate of cancer recurrence (Atreya & Neurath, 2008, Pages et al., 2010). A high density of memory T lymphocytes within colorectal cancer tissue was more frequently observed in patients without early detectable signs of metastatic events and was associated with both improved disease free interval (DFI) and prolonged overall survival (OS) (Galon et al., 2006; Pages et al., 2005).

Natural killer cells (NK cells) mediate an effective lysis of cancer cells but the mechanism of detection of cancer cells is different from CD8+ T lymphocytes (Cooper et al., 2009). NK cells are mainly involved in the innate immune response and do not recognize specific tumor associated antigen on the surface of cancer cells as CD8+ T lymphocytes. NK cells lyse the cancer cells that are opsonized by surface antibody. NK cells also respond to other signals as cytokines produced by antigen presenting cells, which allow them to mediate early host responses against pathogen (Moretta et al., 2006). Decreased preoperative number of NK cells was associated with increased frequency of postoperative recurrence of colorectal cancer (Atreya & Neurath, 2008; Cooper et al., 2001). Their crucial role in the elimination of haematological malignancies, primary and secondary tumors has been recognized (Lucas et al., 2007; Ljunggren & Malmberg, 2007, Stojanovic & Cerwenka, 2011). In the last year there are some signs that NK-cells have the capacity for memory-like responses, a property that was previously thought to be limited to adaptive immunity, but in this view the discussion still continues (Cooper et al., 2009).

Dendritic cells are considered to be most potent antigen presenting cells. They play key role in activation, stimulation and recruitment of T lymphocytes. They can also induce antigen-specific unresponsiveness or immune tolerance. Immature dendritic cells enter tumor tissue, uptake and process its antigens. Then after they migrate to lymph nodes, undergo maturation and interact with T-lymphocytes that are able to recognize presented antigen and so T-lymphocytes play effector role of this tumor-specific immunity (Atreya & Neurath, 2008; Pages et al., 2005; Sandel et al., 2005; Steinman et al., 2003).

Macrophages are important producers of different factors that have function during tumor progression and also during tumor progression control. Their function is not fully understand, but it was described that the number of tumor infiltrating macrophages correlates with overall survival of colorectal cancer patients (Atreya & Neurath, 2008; Pollard, 2004; Forssell et al., 2007). It seems that several types of tumor infiltrating macrophages influence the balance between pro- and anti-tumor properties of immune system (Forssell et al., 2007).

From the morphologic view we can observe TIL in the specific portions of tumor and so we detect lymphocytic infiltration intratumoral (ITL - intratumoral lymphocytes) (Fig.

2a), intrastromal (ISL - intrastromal lymphocytes) (Fig. 2b), peritumoral (PTL - peritumoral lymphocytes) (Fig. 2c) and Crohn-like reaction (Crohn-like PTL)(Fig. 2d). We can also describe reactive histological changes in tributary lymph nodes (LN reactions). It means follicular hyperplasia (LN-FH) (Fig. 3a.), sinus histiocytosis (LN-SH) (Fig. 3b.) and the presence of granulomas (LN-GR) (Fig. 3c) (Ogino et al, 2009; Pages et al., 2005). The aim of this study was to analyze the relationship of contemporary clinical and histopathological factors and TIL to determine patients with a high risk of poor overall survival and tendency to early recurrence of malignancy with shortened disease free interval (DFI) after radical surgery for CRC.

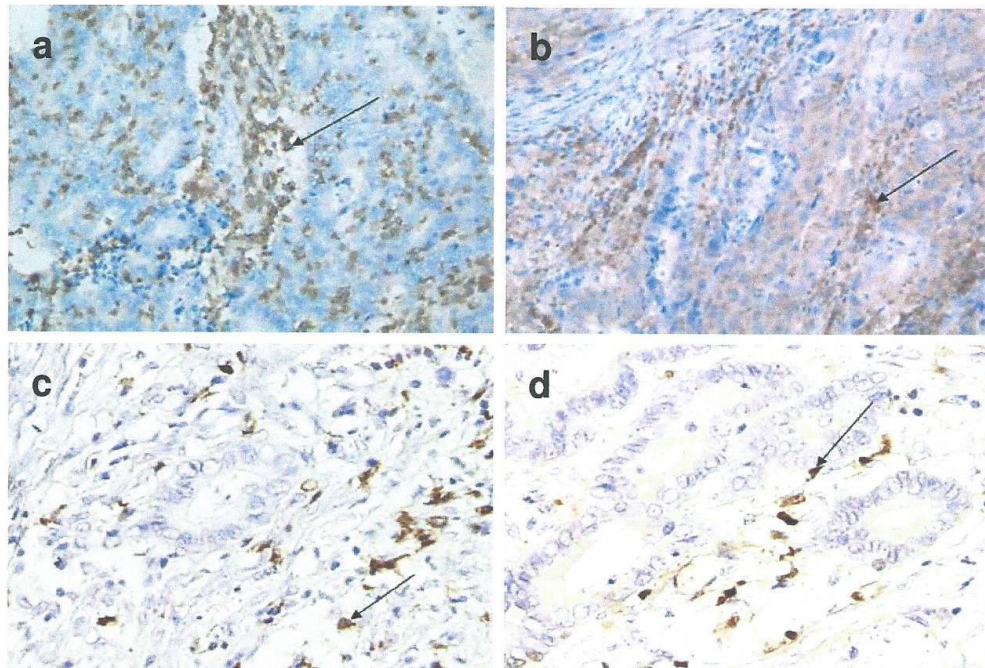


Fig. 1. Examples of tumor infiltration by immune cells: a) CD8+ T lymphocytes; b) CD4+ T lymphocytes; c) Natural killer cell (CD 57 staining) and d) Dendritic cells (S 100 staining).

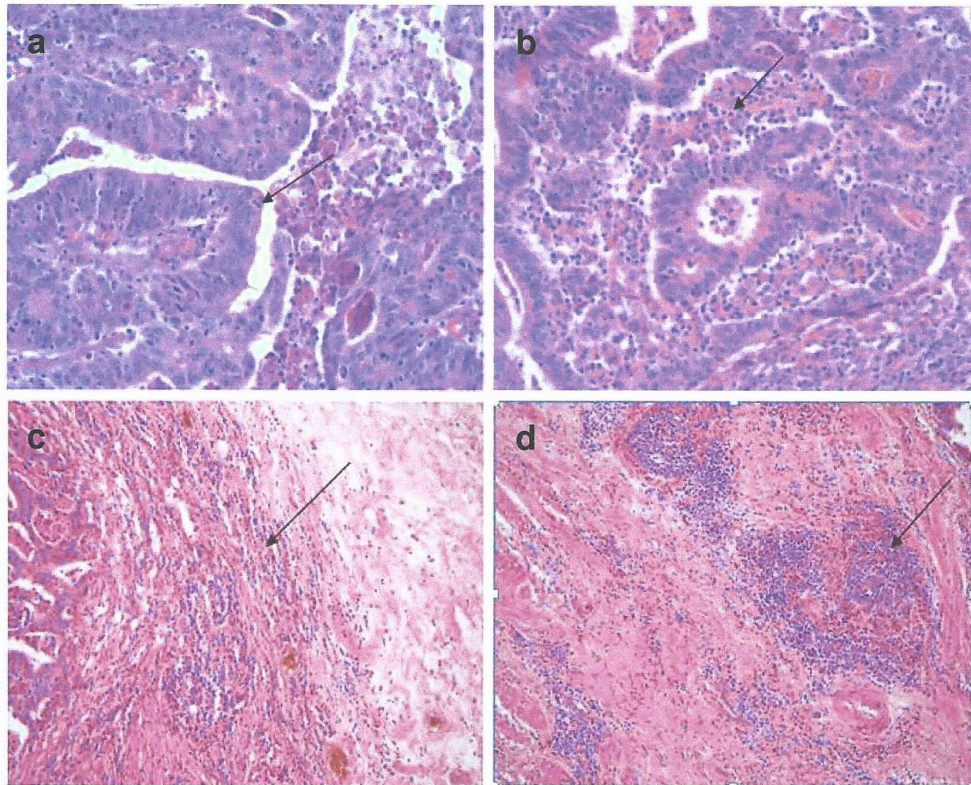


Fig. 2. Different localisation of TIL within the tumor tissue: a) intratumoral lymphocytes; b) intrastromal lymphocytes; c) peritumoral lymphocytes and d) Crohn-like peritumoral lymphocytes. All sections stained with hematoxylin-eosin.

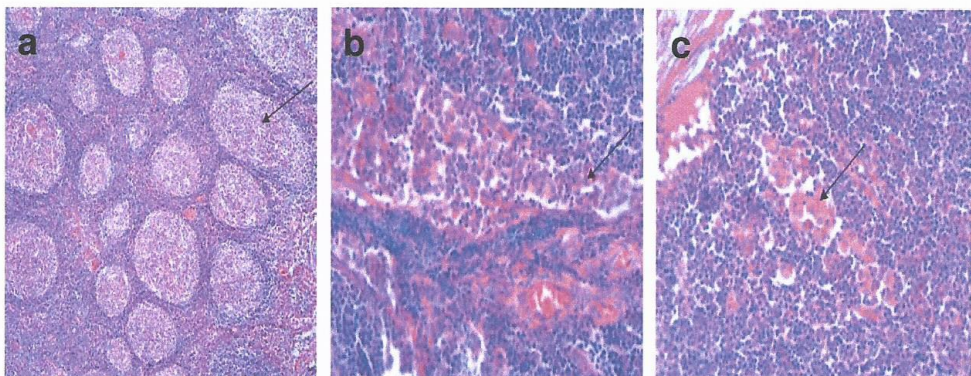


Fig. 3. Reactive histological changes in tributary lymph nodes: a) follicular hyperplasia; b) sinus histiocytosis and c) presence of granulomas. All sections stained with hematoxylin-eosin.

2. Methods

We analyzed 150 patients who underwent radical surgical procedure for CRC between the years 2004-2007 at the Department of Surgery, Medical School and Teaching Hospital in Pilsen, Charles University in Prague. We selected only patients who were operated on electively – our aim was to decrease the risk of inflammation that is often connected with the acute operation of CRC and does not depend on the immune reaction against a tumor but could be evoked by the distension of the bowel. We also excluded patients who had risk of understaging (for example low number of analysed lymph nodes) and patients with a synchronous metastatic process. The inclusion standard was also the entire follow-up of patients during the whole postoperative period to increase the number of patients with a diagnosed early recurrence of CRC.

The following clinical parameters were statistically analysed in relation to the disease free interval (DFI) and the overall survival (OS): staging, grading, preoperative leukocytosis, type of surgical procedure (radical vs. palliative), postoperative complications and postoperative oncological treatment.

2.1 Histology

We examined three different sections of each tumor and also sections of all found lymph nodes. Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. Five micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin-eosin.

The type and grade of all tumors were determined according to WHO 2000 guidelines. The stage of tumors was established according to UICC 2002 guidelines. We evaluated endovascular (VI), endolymphatic (LI) and perineural infiltration (PI) by cancer cells (0 – none, 1 – yes). Lymphocytic infiltration was detected as intratumoral (ITL – intratumoral lymphocytes), intrastromal (ISL – intrastromal lymphocytes), peritumoral (PTL – peritumoral lymphocytes) and Crohn-like reaction (Crohn-like PTL), and scaled as none (0), mild (1), moderate (2) and severe (3). Reactive histological changes in lymph nodes (LN reactions) were detected as follicular hyperplasia (LN-FH), sinus histiocytosis (LN-SH) and the presence of granulomas (LN-GR), and all these parameters were quantified in the same manner as lymphocytic infiltration.

2.2 Immunohistochemistry

For immunohistochemical investigations the following primary antibodies were used: CD4 (clone 4B12, 1:50, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and CD8 (clone C8/144B, 1:50, Dako, Glostrup, Denmark). Microwave pretreatment was used in both cases. The primary antibodies were visualized using the supersensitive streptavidin-biotin-peroxidase complex (Biogenex, San Ramon, CA). Appropriate positive and negative control slides were employed. The density of intratumoral infiltration by lymphocytes was evaluated in five High power microscopical fields (HPF) and expressed as the number of immunopositive cells per HPF.

2.3 Statistical evaluation

Statistical analysis was processed by the statistical software Statistica 9.0. The mean, median, standard deviation (SD), minimum, maximum, quartiles, frequencies and other basic statistical measurements were computed in given groups and subgroups of patients corresponding to studied clinical and histopathological parameters.

The relationships between the variables were described by Spearman rank correlation coefficients.

The analyses of Overall survival (OS) and Disease free interval (DFI) were performed by Kaplan-Meier's survival functions. The influence of given covariates (clinical and histopathological factors) was tested by the Log-Rank test and Wilcoxon test. The Cox regression hazard model, hazard ratio (HR) and 95% confidence interval (CI) for HR were computed for the evaluation of given clinical and histopathological factors to OS or DFI. Multivariate analysis was performed by the use of classification and regression trees (CART). The Cox regression hazard model (stepwise regression) was applied to find the predictors in CART.

3. Results

The statistical analysis of the studied cohort of patients after surgical treatment for colorectal cancer demonstrated an acceptable distribution of basic statistical description parameters (gender ratio 93:57 (male vs. female)). 1, 3 and 5 years overall survival was 92.2%, 76.5% and 70.2% and 1, 3 and 5 year DFI was 85.3%, 64.3% and 49.4%.

The Spearman rank correlation coefficient did not prove any stronger correlation than a moderate correlation at endolymphatic invasion (LI) and lymph node infiltration by metastatic process (Spearman rank correlation coefficient 0.56, $p < 0.05$). All the other studied factors were independent factors or factors with a low correlation.

Statistical analysis proved lymph node infiltration by metastatic process as statistically significant for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$) and N2 status of lymph nodes increased the risk of shorter overall survival 9.3x (Fig. 4).

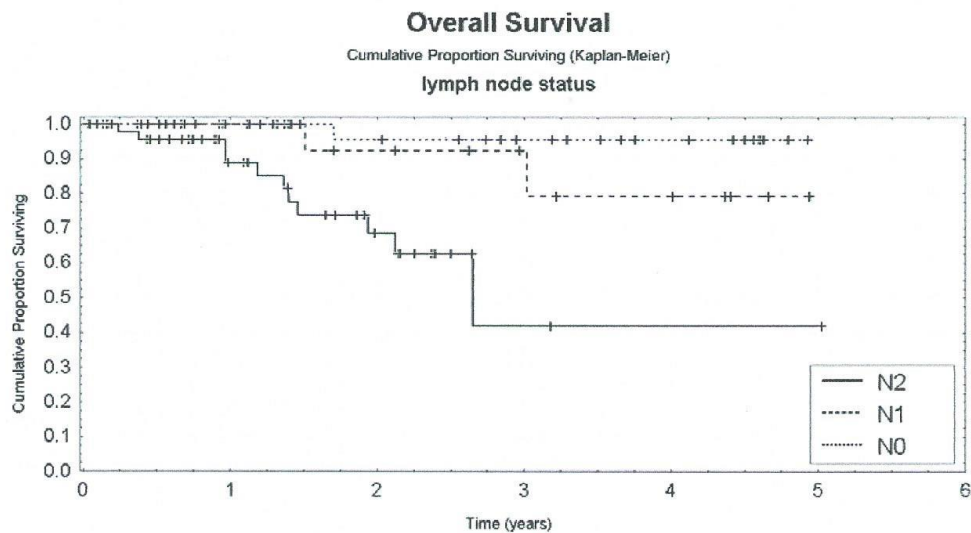


Fig. 4. Statistical analysis proved the lymph node infiltration by a metastatic process as statistically significant for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$), and the N2 status of lymph nodes increased the risk of a shorter overall survival 9.3x.

Endovascular infiltration (VI) was proved as a negative prognostic factor of shorter overall survival (Fig.5.). Patients with positive histopathological findings of VI have 3.1x increased risk for shorter overall survival. The presence of peritumoral lymphocytes (PTL) (Fig.6.) and of Crohn-like PTL (Fig.7.) was proved as a positive prognostic factor of OS. Patients with a positive histopathological finding of PTL and Crohn-like PTL have a decreased risk for shorter overall survival (2.3x and 2.3x respectively). Lymph node follicular hyperplasia (LN-FH) was verified as a positive prognostic factor for longer overall survival (Fig.8.). The statistical significance of LN-FH increased also with the raised density of infiltration. LN-FH positivity decreased the risk of shorter overall survival 3.3times.

The severity of CD8+ lymphocytic infiltration was proved by the Cox regression hazard model as a positive prognostic factor enlarging overall survival (cut off 30 cells/HPF). The severity of CD4+ lymphocytic infiltration was proved as a significant factor for the prognosis of overall survival (cut off 4cells/HPF) with 2.5x increased hazard ratio in patients over the cut off (Fig.9.). Statistical analysis did not confirm the statistical significance of CD8/CD4 ratio.

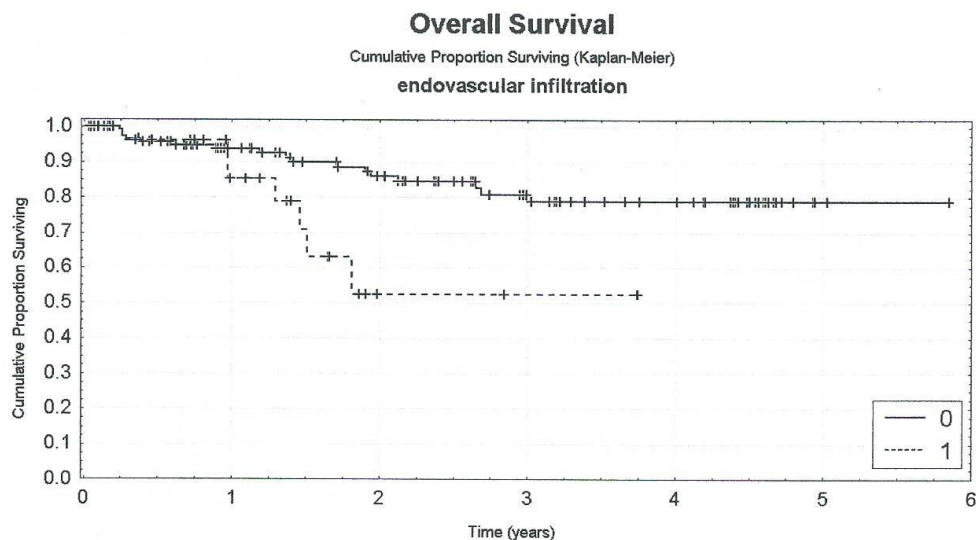


Fig. 5. Endovascular infiltration by cancer cells (VI) was proved as a statistically significant factor for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$). The patients with a positive histopathological finding of VI have 3.1x higher risk ratio for shorter overall survival.

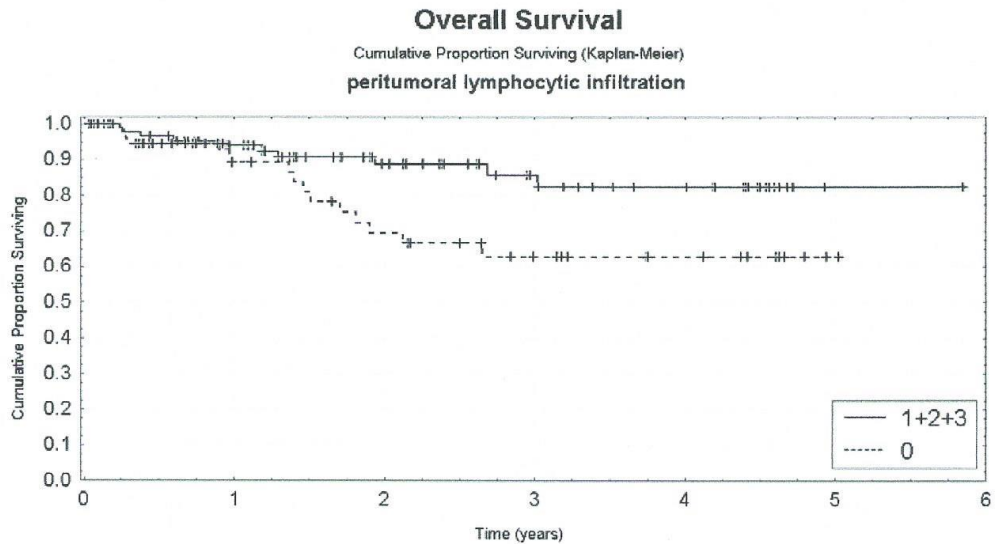


Fig. 6. Presence of peritumoral lymphocytes (PTL) was proved as a statistically significant positive factor for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$). The patients with a positive histopathological finding of PTL have 2.3x lower risk ratio for a shorter overall survival.

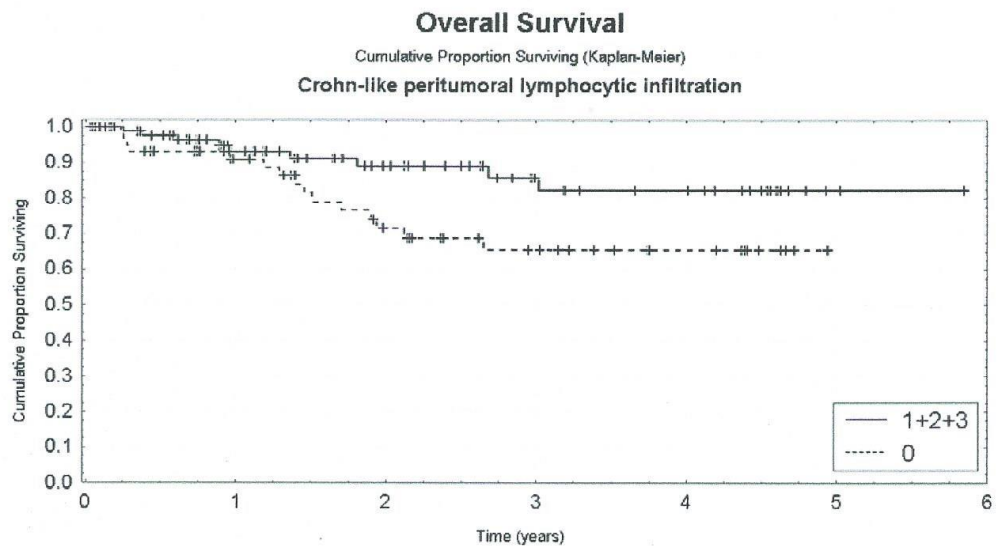


Fig. 7. Presence of Crohn-like PTL was proved as a statistically significant positive factor for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$). The patients with a positive histopathological finding of PTL have 2.3x lower risk ratio for a shorter overall survival.

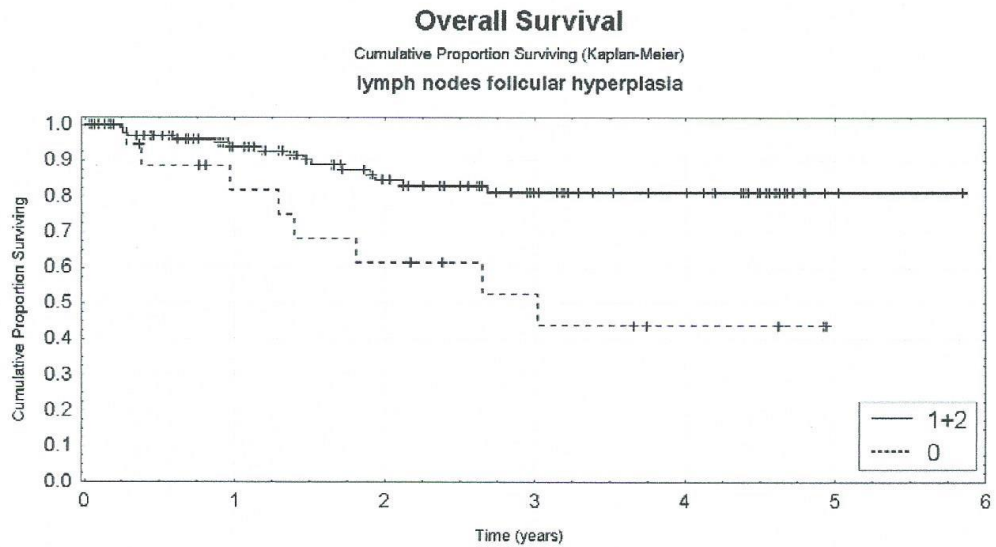


Fig. 8. Lymph node follicular hyperplasia (LN-FH) was verified as a positive prognostic factor for a longer overall survival ($p < 0.05$). The statistical significance of LN-FH increased also with the raised density of infiltration. LN-FH positivity decreased the risk of a shorter overall survival 3.3x.

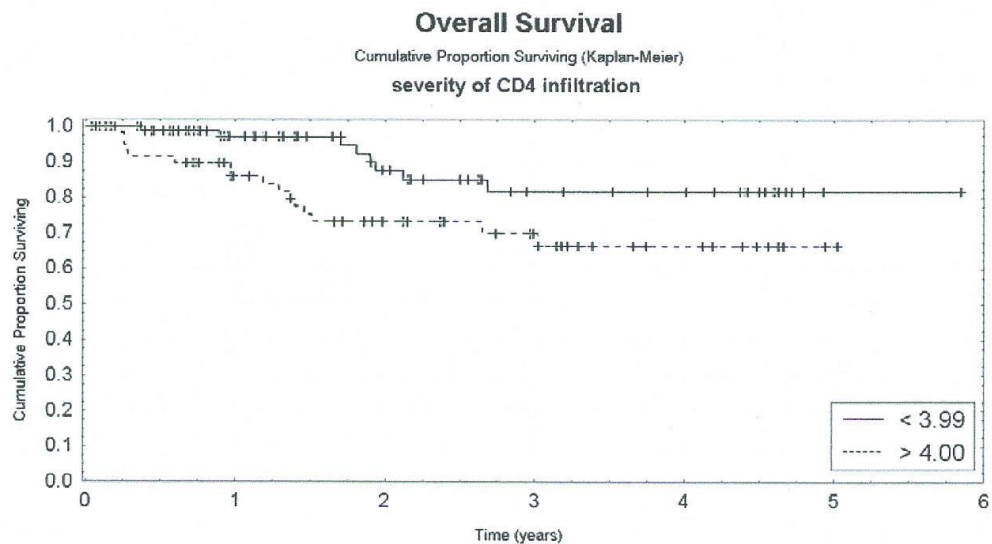


Fig. 9. Severity of CD4+ lymphocytic intratumoral infiltration was proved as a significant factor for the prognosis of overall survival (cut off 4cells/HPF) with a 2.5x increased hazard ratio in patients over the cut off ($p < 0.05$).

The Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of lymph node infiltration by metastatic process and LN-FH as the best prognostic factors for the prediction of the risk of shorter overall survival. This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART)($p < 0.05$) (Fig.10.). All other studied parameters were not proved as statistically significant for the prognosis of overall survival.

Classification and Regression Tree

Overall Survival

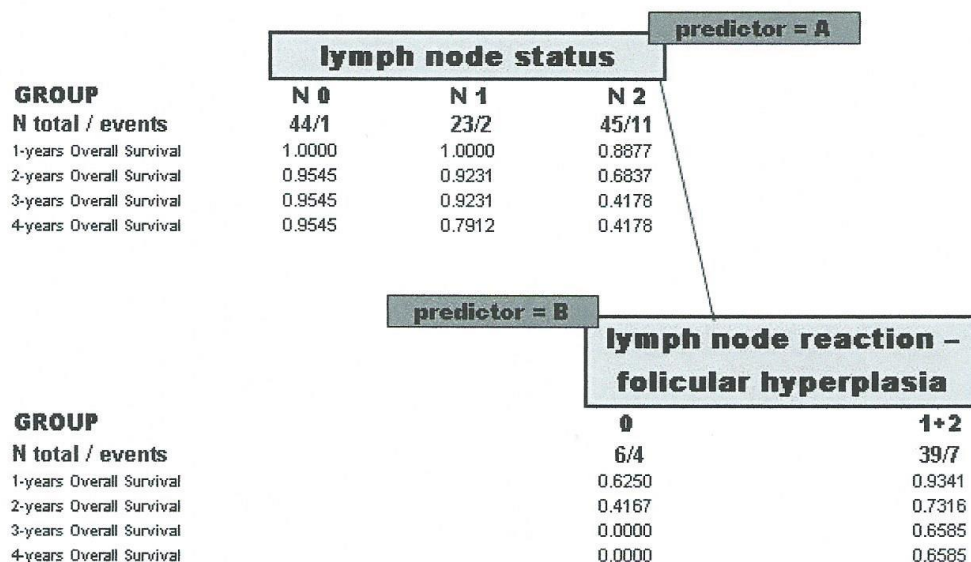


Fig. 10. Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of lymph node infiltration by a metastatic process and LN-FH as the best prognostic factors for the prediction of risk of a shorter overall survival ($p < 0.05$). This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART).

Perineural infiltration (PI) was proved as a negative prognostic factor of an earlier recurrence (Fig.11.). Patients with a positive histopathological finding of PI have 3.8x increased risk for shorter DFI.

The severity of CD8+ lymphocytic infiltration was proved by the Cox regression hazard model as a positive prognostic factor enlarging DFI (cut off 30cells/HPF) (Fig.12.). Patients over the cut off have 2.2x increased risk of an early recurrence. The severity of CD4+ lymphocytic infiltration was not proved as a significant factor for the prognosis of DFI. Statistical analysis did not confirm the statistical significance of the CD8/CD4 ratio.

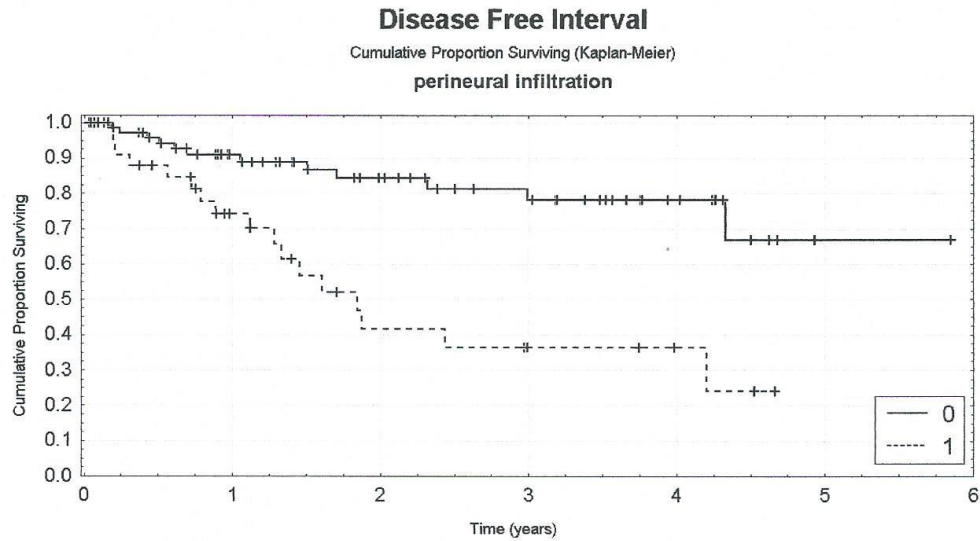


Fig. 11. Perineural infiltration (PI) was proved as a negative prognostic factor of an earlier recurrence ($p < 0.05$). Patients with a positive histopathological finding of PI have a 3.8x increased risk for shorter DFI.

Statistical analysis proved lymph node infiltration by a metastatic process as statistically significant for the prognosis of DFI and N2 status of lymph nodes increased the risk of shorter DFI 5x (Fig. 13.).

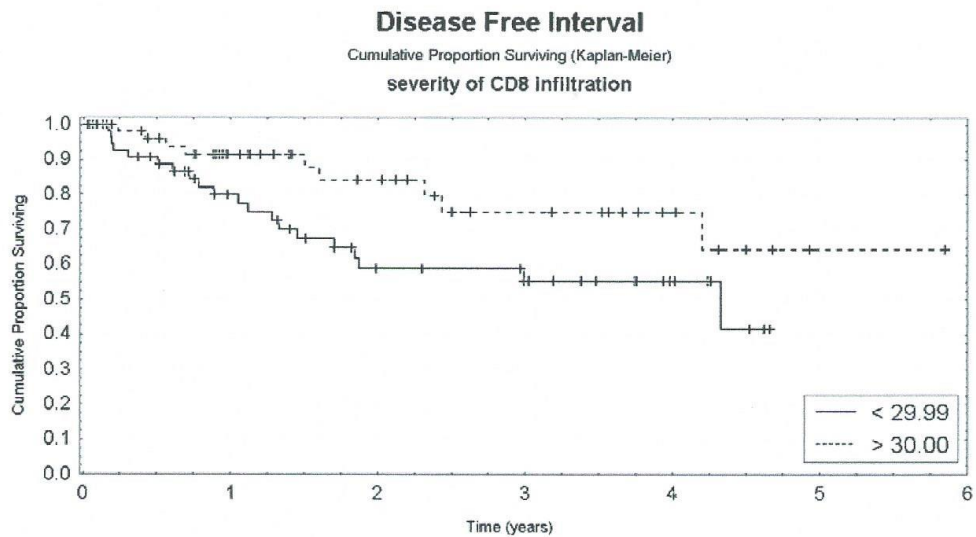


Fig. 12. Severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration was proved as a positive prognostic factor enlarging DFI (cut off 30 cells/HPF) by the Cox regression hazard model ($p < 0.05$). Patients over the cut off have a 2.2x increased risk of an early recurrence.

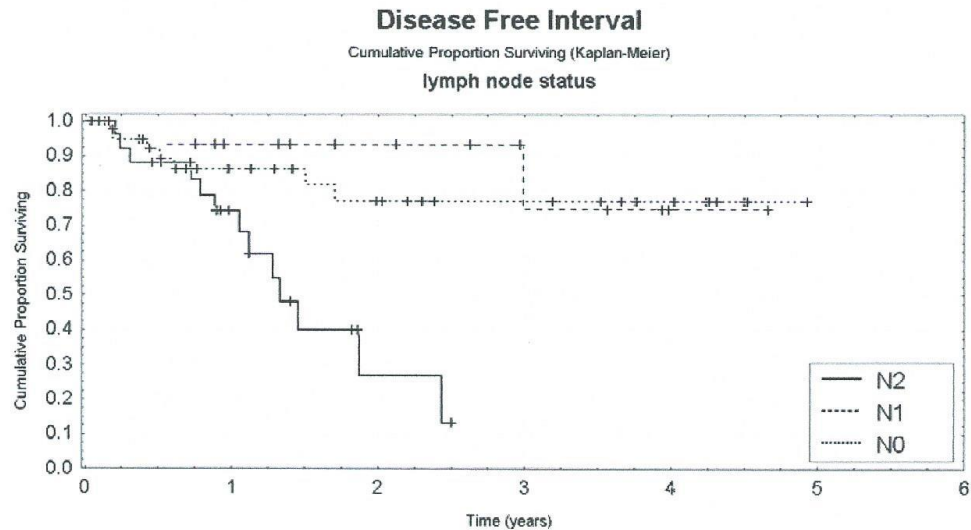


Fig. 13. Statistical analysis proved lymph node infiltration by a metastatic process as statistically significant for the prognosis of DFI, and a N2 status of lymph nodes 5x increased the risk of a shorter DFI ($p < 0.05$).

The Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of the lymph node infiltration by a metastatic process and the severity of CD8 positivity of infiltrating lymphocytes as the best prognostic factors for the prediction of risk of early recurrence ($p < 0.05$). This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART) (Fig. 14). All other studied parameters were not proved as statistically significant for the prognosis of DFI.

4. Discussion

The role of the adaptive immunological response in controlling the growth and relapse of CRC remains controversial and contemporary studies have not answered all the questions about the prognosis of patients after radical surgical treatment of CRC (Galon et al., 2006; Ohtani, 2007; Van den Eynde & Hendlisz, 2009). We analysed our large cohort of patients of CRC with consideration to detect the negative and also positive prognostic factors of early recurrence of the disease and the poor overall survival after radical surgery. It was stimulated by the unsatisfactory situation and some dilemmas in the indication of surgical and oncological treatment, when early recurrence depreciates our effort to radical surgery with a high risk of complications and the long time of the decreased quality of life of our patients.

In the presented clinico-pathological study we demonstrated that lymph node infiltration by a metastatic process, N2 status of lymph nodes, VI, and extent of CD4+ lymphocytic intratumoral infiltration as negative prognostic factors of OS. In contrary PTL, Crohn-like PTL, LN-FH, and severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration were proved as positive prognostic factors of the overall survival.

Classification and Regression Tree

Disease Free Interval

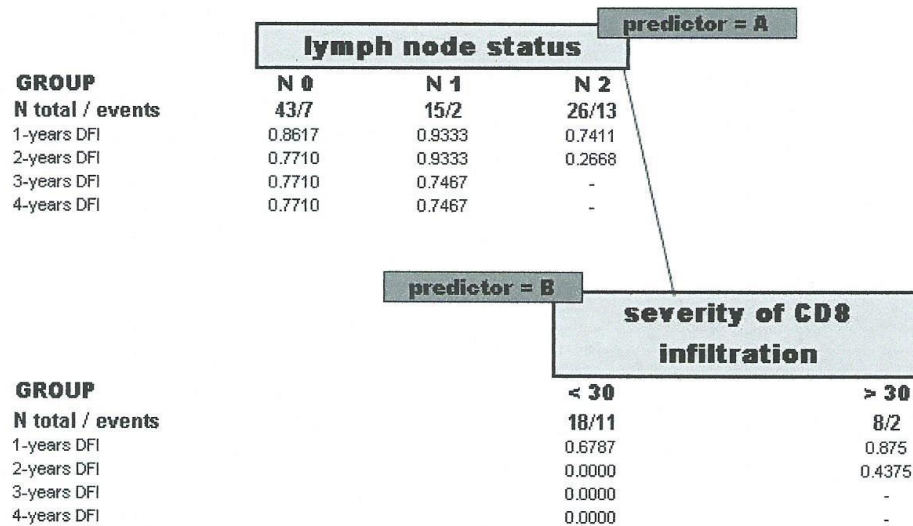


Fig. 14. Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of lymph node infiltration by a metastatic process and the severity of CD8 positivity as the best prognostic factors for the prediction of risk of an early recurrence ($p < 0.05$). This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART).

The combination of the severity of the lymph node infiltration by a metastatic process and LN-FH were proved as the best prognostic factors for the prediction of risk of a shorter overall survival by the Multivariate Cox Regression Hazard Model.

We also demonstrated PI, lymph node metastatic infiltration and the N2 status of lymph nodes as negative prognostic factors of an earlier recurrence, and the severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration as a positive prognostic factor enlarging DFI. The combination of the severity of the lymph node infiltration by a metastatic process and the severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration were proved as the best prognostic factors for the prediction of the risk of an early recurrence by the Multivariate Cox Regression Hazard Model.

Our results support the hypothesis that the adaptive immunological response in tumor tissue and its reaction in regional lymph nodes can influence the behavior of CRC and so affect the prognosis of patients (Atreya & Neurath, 2008; Galon et al., 2006). CD4 and CD8 positivity of ITL was demonstrated as a key histopathological sign of tumor-specific immune response that could reflect the contemporary clinical situation and a tendency to relapse (CD4+) or the larger overall survival (CD8+) (Chiba et al. 2004; Koch et al., 2006, Pages et al., 2010).

We assessed several types of tumor infiltrating lymphocytes and clearly identified their relationships to relapse and the overall survival as positive or negative prognostic factors in contrary to previous publications that evaluated only the infiltration of the tumor but not the quality and type of infiltration (Ogino et al., 2009).

Tumor infiltration by lymphocytes seems to be a promising prognostic factor reflecting the risk of patients to early recurrence or poor overall survival. Future work has to be focused on the molecular-biological background of tumor infiltration by lymphocytes to understand their pathophysiological functions (Pages et al., 2005, Zbar, 2004).

5. Conclusion

Tumor infiltrating lymphocytes seem to be promising prognostic factors that could find their use in colorectal surgery and consecutive oncological treatment as an indicator of the type or combinations of therapies reflecting the risk of patients to early recurrence or poor overall survival. The TIL status corresponds to immune control of cancer progression.

6. Acknowledgment

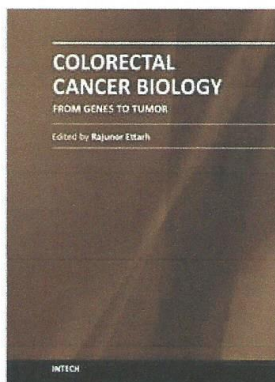
This article was supported by research project MSM 0021620819 (Replacement of and support to some vital organs) and grant IGA MZ CR 10230 and IGA MZ CR 12025 and specific students research grant of Charles University SVV-2011- 262 806.

7. References

- Atreya, I., & Neurath, M. F. (2008). Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Review of Anticancer Therapy*, Vol.8, No.4, (April 2008), pp. 561-572, ISSN 1473-7140
- Bird, N. C., Mangnall, D., & Majeed, A. W. (2006). Biology of colorectal liver metastases: a review. *Journal of Surgical Oncology*, Vol.94, No.1, (July 2006), pp. 68-80, ISSN 0022-4790
- Chiba, T., Ohtani, H., Mizoi, T., Naito, Y., Sato, E., Nagura, H., Ohuchi, A., Ohuchi, K., Shiiba, K., Kurokawa, Y. & Satomi, S. (2004). Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *British Journal of Cancer*, Vol.91, No.9, (November 2004), pp. 1711-1717, ISSN 0007-0920
- Coleman, M. P., Quaresma, M., Berrino, F., Lutz, J. M., De Angelis, R., Capocaccia, R., Baili, P., Rachet, B., Gatta, G., Hakulinen, T., Micheli, A., Sant, M., Weir, H. K., Elwood, J. M., Tsukuma, H., Koifman, S., Silva, E., Francisci, S., Santaquilani, M., Verdecchia, A., Storm, H. H., Young, J. L. & CONCORD Working Group. (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The Lancet Oncology*, Vol.9, No.8, (August 2008), pp. 730-756, ISSN 1470-2045
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer – cell subsets. *Trends in Immunology*, Vol.22, No.11, (November 2001), pp. 633-640, ISSN 1471-4906
- Cooper, M. A., Colonna, M., & Yokoyama, W. M. (2009). Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *Embo reports*, Vol.10, No.10, (October 2009), pp. 1103-1110, ISSN 1469-221X

- Forssell, J., Oberg, A., Henriksson, M. L., Stenling, R., Jung, A., & Palmquist, R. (2007). High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clinical Cancer research*, Vol.1, No.13, (March 2007), pp. 1472-1479, ISSN 1078-0432.
- Gajewski, T. F., Meng, Y., Harlin, H. (2006). Immune suppression in the tumor microenvironment. *Journal of Immunotherapy*, Vol.29, No.3, (May-June 2006), pp. 233-240, ISSN 1524-9557
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H. & Pagès, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, Vol.313, No.5795, (September 2006), pp. 1960-1964, ISSN 0036-8075
- Jochems C, Schlom J. (2011). Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med (Maywood)*. Vol. 236, No.5 (May 2011), pp. 567-79, ISSN 1535-3702
- Kobayashi, H., Mochizuki, H., Sugihara, K., Sugihara, K., Morita, T., Kotake, K., Teramoto, T., Kameoka, S., Saito, Y., Takahashi, K., Hase, K., Oya, M., Maeda, K., Hirai, T., Kameyama, M., Shirouzu, K. & Muto T. (2007). Characteristics of recurrence and surveillance tools after curative resection for colorectal cancer: a multicenter study. *Surgery*, Vol.141, No.1, (January 2007), pp. 67-75, ISSN 0039-6060
- Koch, M., & Beckhove, P. (2006). Op den Winkel J et al. Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Annals of Surgery*, Vol.244, No.6, (December 2006), pp. 986-992, ISSN 0003-4932
- Ljunggren, H.G., & Malmberg, K.J. (2007). Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature Reviews. Immunology*, Vol.7, No.5, (May 2007), pp. 329-339, ISSN 1474-1733
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., & Diefenbach, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*, Vol.26, No.4, (April 2007), pp. 503-517, ISSN 1074-7613
- Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari M. C., & Moretta, A. (2006). Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interaction. *Immunological Reviews*, Vol.214, No.1, (December 2006), pp. 219-228, ISSN 0105-2896
- Ogino, S., Nosho, K., Iraha, N., Meyerhardt, J. A., & Baba, Y. (2009). Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylation phenotype. *Clinical Cancer Research*, Vol. 15, No. 20, (October 2009), pp. 6412-6420, ISSN 1078-0432
- Ohtani, H. (2007). Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer, *Cancer immunity*, Vol. 7, (February 2007), pp. 4, ISSN 1424-9634
- Pagès, 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. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, Vol.353, No.25, (December 2005), pp. 2654-2666, ISSN 0028-4793

- Pagès, F., Galon, J., Die-Nosjeanu, M. C., Tartour, E., & Sautes-Fridman, C. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, Vol.29, No.8, (February 2010), pp. 1093-1102, ISSN 0950-9232
- Pollard, J. W. (2004). Tumor-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, Vol.4, No.1, (January 2004), pp. 71-78, ISSN 1474-175X
- 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. (2005). Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clinical Cancer Research*, Vol.11, No.7, (April 2005), pp. 2576-2582, ISSN 1078-0432
- Steinman, R. M., Hawiger, D., & Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology*, Vol.21, pp. 685-711, ISSN 0732-0582
- Stojanovic, A., & Cerwenka, A. (2011). 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>>.
- Talmadge, J. E., Donkor, M., & Scholar, E. (2007). Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer and Metastasis Reviews*. Vol.26, No.3-4, (December 2007), pp. 373-400, ISSN 0167-7659
- Van den Eynde, M., & Hendlisz, A. (2009) Treatment of colorectal liver metastases: a review. *Reviews on Recent Clinical Trials*, Vol.4, No.1, (January 2009), pp. 56-62, ISSN 1574-8871
- Zbar, A. P. (2004) The immunology of colorectal cancer. *Surgical Oncology*, Vol.13, No.2-3, (August-November 2004), pp. 45-53, ISSN 0960-7404



Colorectal Cancer Biology - From Genes to Tumor

Edited by Dr. Rajunor Ettarh

ISBN 978-953-51-0062-1

Hard cover, 446 pages

Publisher InTech

Published online 10, February, 2012

Published in print edition February, 2012

Colorectal cancer is a common disease, affecting millions worldwide and represents a global health problem. Effective therapeutic solutions and control measures for the disease will come from the collective research efforts of clinicians and scientists worldwide. This book presents the current status of the strides being made to understand the fundamental scientific basis of colorectal cancer. It provides contributions from scientists, clinicians and investigators from 20 different countries. The four sections of this volume examine the evidence and data in relation to genes and various polymorphisms, tumor microenvironment and infections associated with colorectal cancer. An increasingly better appreciation of the complex inter-connected basic biology of colorectal cancer will translate into effective measures for management and treatment of the disease. Research scientists and investigators as well as clinicians searching for a good understanding of the disease will find this book useful.

How to reference

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Vaclav Liska, Ondrej Daum, Petr Novak, Vladislav Treska, Ondrej Vycital, Jan Bruha, Pavel Pitule and Lubos Holubec (2012). Tumor Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Factor of Early Recurrence and Poor Prognosis of Colorectal Cancer After Radical Surgical Treatment, *Colorectal Cancer Biology - From Genes to Tumor*, Dr. Rajunor Ettarh (Ed.), ISBN: 978-953-51-0062-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/colorectal-cancer-biology-from-genes-to-tumor/tumor-infiltrating-lymphocytes-as-prognostic-factor-of-early-recurrence-and-poor-prognosis-of-colore>

INTECH

open science | open minds

InTech Europe

University Campus STeP Ri
Slavka Krautzeka 83/A
51000 Rijeka, Croatia
Phone: +385 (51) 770 447
Fax: +385 (51) 686 166
www.intechopen.com

InTech China

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元
Phone: +86-21-62489820
Fax: +86-21-62489821

Infiltration of Colorectal Carcinoma by S100⁺ Dendritic Cells and CD57⁺ Lymphocytes as Independent Prognostic Factors after Radical Surgical Treatment

VACLAV LISKA¹, ONDREJ VYCITAL¹, ONDREJ DAUM², PETR NOVAK¹,
VLADISLAV TRESKA¹, JAN BRUHA¹, PAVEL PITULE¹ and LUBOS HOLUBEC³

¹Department of Surgery, ²Sídl Department of Pathology and ³Department of Oncology,
Medical School and Teaching Hospital Pilsen, Charles University in Prague, Czech Republic

Abstract. Background: S100⁺ dendritic cells and CD57⁺ lymphocytes are factors reflecting the immune system's ability to suppress the progress of tumor growth. CD57⁺ cells include natural killer cells and late stages of T-effector lymphocytes. We evaluated the relationship between the known clinical and histological factors and tumor markers as well as the presence of S100⁺ and CD57⁺ cells in the tissue of colorectal carcinoma with the aim of detecting patients at high risk of short overall survival (OS) or short disease-free interval (DFI) after radical surgical treatment and we further analyzed whether S100⁺ and CD57⁺ positivity could bring on new information regarding the treatment regimen. Materials and Methods: Data of 150 patients (97 males and 53 females) that underwent an elective radical surgical procedure for colorectal cancer were studied. The influence on DFI and on OS of the following parameters was evaluated: grading, staging and positivity for S100 and CD57 by immunohistochemical staining. We also analyzed the relation of preoperative serum levels of the tumor markers Carcinoembryonic Antigen (CEA), Cancer Antigen 19-9 (CA19-9), Cancer Antigen 72-4 (CA72-4), Thymidine kinase (TK), Tissue-Specific Polypeptide Antigen (TPS) and Tissue Polypeptide Antigen (TPA) in relation to S100 and CD57 positivity/negativity for the same patients. Results: OS at 1, 3 and 5 years was 92.2%, 76.5% and 70.2%; the DFI at 1, 3 and 5 years was 85.3%, 64.3% and 49.4%. CD57 positivity in the tumor mass was proven as a positive prognostic factor for OS. Risk of short OS was 2.5-fold higher in patients with low tumor infiltration by CD57⁺ lymphocytes. The combination of N2 stage for lymph nodes and the absence of CD57⁺ cells was

proven to be the strongest negative prognostic factor for OS. No significant influence of CD57 positivity on DFI appeared. There was no significant influence of S100 positivity on OS or DFI; nor was there any statistical dependence of CD57 and S100 positivity or negativity on preoperative serum levels of CEA, CA19-9, CA72-4, TK, TPS or TPA. Both studied factors were shown to be statistically independent factors. Conclusion: The present study showed infiltration of colorectal cancer tissue by CD57⁺ cells as being an important independent positive prognostic factor for OS.

S100⁺ dendritic cells (DC) and CD57⁺ lymphocytes are factors reflecting the immune system's ability to suppress the progress of tumor growth. Atreya and Neurath demonstrated their role in suppression of the progress of colorectal carcinoma (1). CD57 is a glycoprotein with cell adhesion function also called human natural killer-1 or LEU7 (2). CD57⁺ cells include natural killer (NK) and late stages of T-effector lymphocytes. NK cells as a part of the cellular innate immunity are able to destroy malignant cells (2). NK cells mediate lysis of malignant cells but the mechanism of detection of cancer cells is different from that of the CD8⁺ T-lymphocytes (3); NK cells do not recognize specific tumor-associated antigens of cancer cells as CD8⁺ T-lymphocytes do. NK cells lyse cancer cells that are opsonized by surface antibodies or after stimulation by other signals such as cytokines, produced by antigen-presenting cells (4). A lower preoperative number of NK cells was associated with increased postoperative recurrence of colorectal cancer (5). The S100 antigen protein is present in many types of cells: cells of neural crest, chondrocytes, adipocytes, myoepithelial cells, macrophages, Langerhans cells and dendritic cells. In particular dendritic cells (DC) (antigen-presenting cells) play a key role in activating naive T-lymphocytes and NK cells. DC gather antigens in their surrounding tissues, process them and migrate to the secondary lymphoid organs to present antigens on major histocompatibility complexes class I or class II to CD8⁺ cytotoxic lymphocytes or CD4⁺ helper T-lymphocytes (2, 6). In the majority of the available studies, increased

Correspondence to: Vaclav Liska, MD, Ph.D., Department of Surgery, Medical School and Teaching Hospital Pilsen, Charles University in Prague, Alej Svobody 80, 304 00 Pilsen, Czech Republic. Tel: +420 377104271, e-mail: Vena.Liska@seznam.cz, LiskaV@fnplzen.cz

Key Words: S100⁺ dendritic cells, CD57⁺ lymphocytes, colorectal cancer, prognosis.

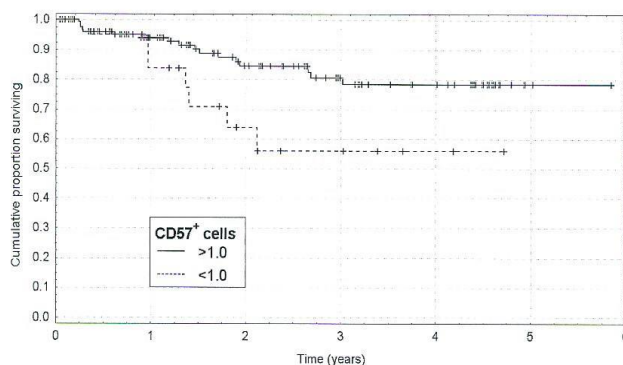


Figure 1. CD57 positivity as a statistically significant prognostic factor for OS (cut-off 1 cell, p-value=0.0350).

numbers of immune cells infiltrating the tumors correlate with an improved prognosis for cancer patients (7), but the role of certain lymphocytes remains unclear (8). Here we evaluated the relationship between the known clinical, histological factors and tumor markers that are used in standard clinical follow-up of patients and the presence of S100⁺ and CD57⁺ cells in the tissue of colorectal carcinoma (CRC) with the aim of detecting patients with a high risk of short overall survival (OS) or short disease-free interval (DFI), after radical surgical treatment and to analyze whether S100⁺ and CD57⁺ positivity could bring new information on the treatment regimen, independently of standard clinical examinations.

Materials and Methods

Data from 150 patients (97 males and 53 females) in a patient cohort that underwent an elective radical surgical procedure at the Department of Surgery of the Teaching Hospital and Medical School in Pilsen between 2004-2007. The influence on DFI and on OS of following parameters was evaluated: grading, staging and positivity of S100 and CD57 by immunohistochemical staining.

Histological and immunohistochemical analysis. Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and was embedded in paraffin. Five micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin-eosin. Three different sections of each tumor were examined.

For the immunohistochemical investigations the following primary antibodies were used: CD57 (clone NK1, ready-to-use; Ventana, Rocklin, CA, USA), and S100 (polyclonal, 1:1000; Dako, Glostrup, Denmark). Microwave pretreatment was used in both cases. The primary antibodies were visualized using the supersensitive streptavidin-biotin-peroxidase complex (Biogenex, San Ramon, CA, USA). The appropriate positive and negative control slides were employed. The number of DCs and NK cells was evaluated in five high power microscopical fields and was expressed as the number of immunopositive cells per high power microscopical field.

Oncomarkers. All the blood samples for assessment of tumor markers were obtained under standard conditions from the cubital vein during

Classification and regression tree

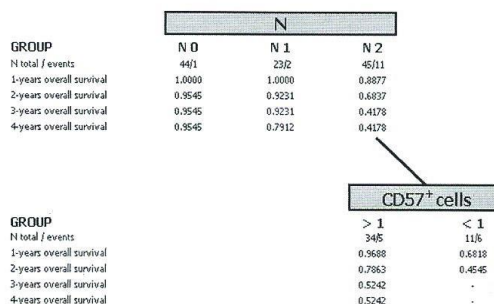


Figure 2. Classification and regression tree diagram presenting the strongest negative prognostic factor combination for OS.

the morning hours. The serum for the assessment of routine tumor markers was acquired through centrifugation and was stored at -20°C until laboratory analysis. Tumor markers were assessed at the Department of Nuclear Medicine, Faculty Hospital Pilsen with commercial laboratory kits, in accordance with the manufacturers' recommendations. The following tumor markers were assessed: CEA (ng/ml, Immunotech, Czech Republic), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9, IU/l, Shering-CIS BioInternational, France), cytokeratins: tissue-specific polypeptide antigen (TPS, kIU/l, IDL, Sweden), tissue polypeptide antigen (TPA, kIU/l, DiaSorin, Italy). Thymidine kinase (TK, IU/L) was measured by radioenzyme analysis (REA) using the Immunotech (Prague, Czech Republic) assay kits.

Statistical analysis. Statistical analysis was processed by the statistical software Statistica 9.0 (StatSoft, CA, USA). The relationships between the variables were described by the Spearman rank correlation coefficients. The analyses of OS and DFI were performed by Kaplan-Meier survival functions. The influence of given covariates (clinical and histopathological factors or tumor markers) was tested by the log-rank test and the Wilcoxon test. The Cox regression the hazard model, hazard ratio (HR) and the 95% confidence interval (CI) for HR were computed for the evaluation of given clinical and histopathological factors and tumor markers to OS or DFI. Multivariate analysis was

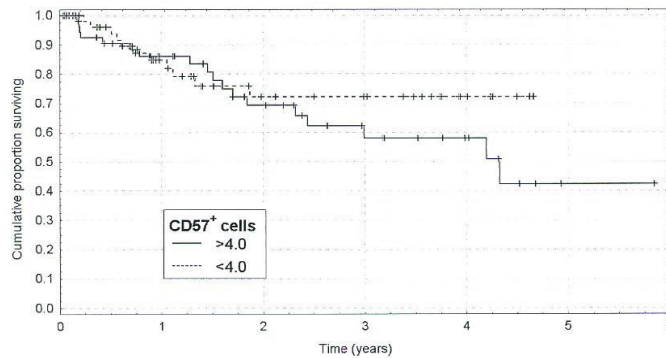


Figure 3. CD57 positivity was not proven as being a statistically significant prognostic factor for DFI (cut-off 4 cells, p -value=0.3415).

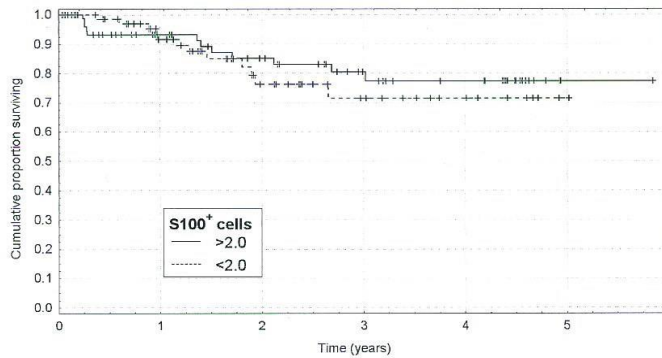


Figure 4. S100 positivity was not proven as being a statistically significant prognostic factor for OS (cut-off 2 cells, p -value=0.5877).

performed by the use of classification and regression trees (CART). The Cox regression hazard model (stepwise regression) was applied in order to find the predictors in CART.

Results

There were 93 males (mean age=65.27 years, median=65.94 years) and 57 females (mean=68.07 years median=67.72 years) in studied patients cohort. No statistically significant differences were proven regarding the age between males and females. OS at 1, 3 and 5 years was 92.2%, 76.5% and 70.2%; the resulting DFI at 1, 3 and 5 years was 85.3%, 64.3% and 49.4%. CD57 positivity of cells in the mass of tumor was a statistically significant positive prognostic factor (cut-off 1 cell, p -value=0.0350, Figure 1) of OS. Risk of short OS was 2.5-fold higher in patients with low tumor infiltration by CD57⁺ lymphocytes. CART showed that the combination of N2 stage of lymph node disease and the absence of CD57⁺ cells was the strongest negative prognostic factor of OS (Figure 2). No

statistically significant influence of CD57 positivity on DFI appeared (Figure 3).

There was no statistically significant influence of S100 positivity on OS nor on DFI (Figures 4 and 5). There was no statistical dependency or correlation of CD57 and S100 positivity or negativity on preoperative serum levels of CEA, CA19-9, CA72-4, TK, TPS or TPA. Both studied factors were found to be statistically independent factors.

Discussion

The role of the immunological response in controlling the growth and relapse of CRC remains controversial and contemporary studies have not answered all the questions about the prognosis of patients after radical surgical treatment of CRC (9, 10, 11, 14). We analyzed a large cohort of patients with CRC aiming at detecting the relation between these types of immune cells and the prognosis of patients after radical CRC surgery. This aim was stimulated by some dilemmas in the decision for

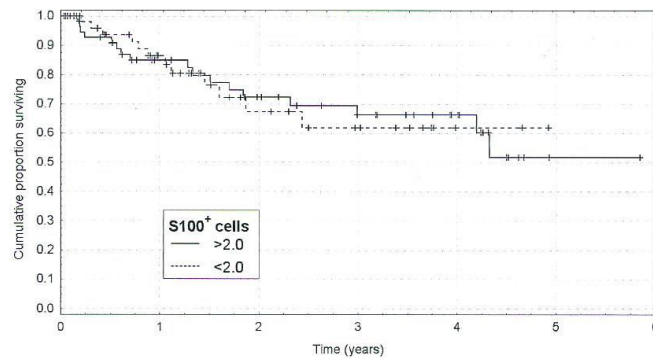


Figure 5. *S100* positivity was not proven as being a statistically significant prognostic factor for DFI (cut-off 2 cells, *p*-value=0.9173).

surgical and oncological treatment, when early recurrence depreciates the effort of radical surgery due to a high risk of complications and the long duration of the decreased quality of life of the patients (3, 12). Our results support the hypothesis that the immunological response observed in the tumor tissue can influence the behavior of CRC and subsequently affect the prognosis of patients (9). Tumor infiltration by NK cells seems to be a promising positive prognostic factor reflecting the decreased risk of patients for poor OS. Future work should focus on the molecular-biological background of tumor infiltration by lymphocytes to provide understanding over their pathophysiological functions (1). The tumor markers inform us of the negative prognosis of patients (early recurrence (DFI) or for the poor prognosis for long OS (13). On the other hand CD57⁺ positivity was demonstrated as being a positive prognostic factor for radically operated patients with CRC. This information is more important for clinicians than a negative factor would be, since it could modify their decision about adjuvant oncological treatment or follow-up regimen. The present study demonstrated the positive influence of tumor-infiltrating CD57⁺ cells on the prognosis of CRC. The results could lead upon intensifying the follow-up strategy for the patients with higher risk of early CRC recurrence.

Acknowledgements

This study was supported by the grant IGA MZ ČR 12025 from Internal Grant Agency of Ministry of Health of Czech Republic.

References

- 1 Atreya I and Neurath MF: Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Ther* 8(4): 563-565, 2008.
- 2 Strioga M, Pasukoniene V and Characiejus D: CD8⁺ CD28⁻ and CD8⁺ CD57⁺ T-cells and their role in health and disease. *Immunology* 134(1): 17-32, 2011.

- 3 Cooper MA, Colonna M and Yokoyama WM: Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *Embo Rep* 10(10): 1103-1110, 2009.
- 4 Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC and Moretta A: Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interaction. *Immunol Rev* 214(1): 219-228, 2006.
- 5 Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA and Moreno M: The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79(12): 2320-2328, 1997.
- 6 Larmonier J: Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 59: 1-11, 2010.
- 7 Stojanovic A and Cerwenka A: Natural killer cells and solid tumors. *J Innate Immun* 3(4): 355-364, 2011.
- 8 Zbar AP: The immunology of colorectal cancer. *Surg Oncol* 13: 45-53, 2004.
- 9 Galon J, Costes A and Sanchez-Cabo F: Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313: 1960-1964, 2006.
- 10 Ohtani H: Focus on TILs: prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immun* 21: 4-7, 2007.
- 11 Van den Eynde M and Hendlish A: Treatment of colorectal liver metastases: a review. *Rev Recent Clin Trials* 4: 56-62, 2009.
- 12 Chauvin C and Josien N: Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles. *J Immunol* 181: 11-16, 2008.
- 13 Duffy MJ, Van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C and Topolcan O: Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 39: 718-27, 2003.
- 14 Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C and Fridman WH: Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29: 1093-1102, 2010.

Received February 13, 2012
 Revised April 13, 2012
 Accepted April 17, 2012

Původní práce

Klinické prognostické faktory kolorektálního karcinomu po jeho radikální léčbě

P. Novák, V. Liška, V. Třeška, J. Kopalová, O. Vyčítal, J. Brůha

Chirurgická klinika LFUK a FN Plzeň, Karlova univerzita v Praze,
přednosta: Prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.

Projekt byl podpořen grantem IGA MZ CR NR 12025.

Souhrn

Úvod: Sřevní anastomózy jsou častým místem komplikací operací kolorektálního karcinomu. Dehiscence anastomózy značně ovlivňuje pooperační průběh a může ovlivňovat i celkové přežití (OS) a bezpříznakové přežití (DFI). Cílem studie byla analýza klinicko-patologických faktorů, které mohou odhalit dehiscenci a mají vztah k další prognóze nemocných.

Materiál a metoda: Byla provedena statistická analýza souboru nemocných (340 pacientů, 207 mužů, 133 žen) s kolorektálním karcinodem, řešených radikální resekci s provedením anastomózy na tlustém střevě či rektu v letech 2003–2007. Mezi studované faktory byly zařazeny: věk, pohlaví, staging, protektivní stomie, neoadjuvantní chemoterapie, neoadjuvantní radioterapie, adjuvantní chemoterapie, adjuvantní radioterapie, insuficience anastomózy. Komplikace byly hodnoceny dle Clavienu a Dinda.

Výsledky: Provedená analýza prokázala jako statisticky významné pro prognózu celkového přežití nemocných tyto faktory. Nemocní se stadiem T4 měli 2,5krát vyšší riziko úmrtí než nemocní s nižšími stadii malignity a 1,9krát vyšší riziko recidivy. Při uzlinovém postižení N2 měli nemocní 3,7krát vyšší riziko úmrtí než nemocní s N0 a N1 uzlinovým postižením a 3,6krát vyšší riziko recidivy malignity. Přítomnost pooperační komplikace III.–V. stupně podle Clavienuvy klasifikace zvyšovala riziko úmrtí 4krát. Nemocní s dehiscencí anastomózy měli 5,5krát vyšší riziko úmrtí. Překvapivě i přítomnost protektivní stomie zvyšovala riziko úmrtí 5,4krát. V případě nepodání adjuvantní chemoterapie se riziko úmrtí zvýšilo 2krát. U pacientů s komplikacemi IIIA, IIIB, IV a V hodnocených na základě stupnice dle Clavienu a Dinda byly statisticky významné tyto parametry: leak, protektivní stomie, adjuvantní chemoterapie, adjuvantní léčba. U pacientů s komplikacemi I a II byla statistická významnost vyhodnocena u rozsahu primárního tumoru pozitivitu lymfatických uzlin. Multivariační analýzou CART byly prokázány silné vztahy u pozitivitu lymfatických uzlin a Clavienuva hodnocení komplikací.

Závěr: Analýza klinicko-patologických faktorů je důležitá pro predikci prognózy pacientů s kolorektálním karcinodem, po jejich radikální léčbě. Sledování a zohledňování těchto prognostických faktorů v pooperačním období může ovlivnit strategii léčby a tím i celkové přežití nemocných po radikální resekci kolorektálního karcinomu. Nepodání adjuvantní chemoterapie významně snižuje celkové a bezpříznakové přežití.

Klíčová slova: kolorektální karcinom – pooperační komplikace – Clavienu-Dindo klasifikace – celkové a bezpříznakové přežití – prognóza

Summary

Novák P, Liška V, Třeška V, Kopalová J, Vyčítal O, Brůha J. Prognostic clinical factors in colorectal cancer after radical therapy

Introduction: Colorectal anastomoses frequently become the site of complications after surgical procedures for colorectal cancer. Anastomotic dehiscence has a significant impact on the whole postoperative disease course, may influence the overall survival (OS) and disease free interval (DFI). The aim of our study was to analyze clinical and histopathological factors, that could facilitate detection of dehiscences and are related to the prognosis of patients.

Material and methods: The authors performed statistical analysis of a cohort of patients (340 patients, 207 males, 133 females) who underwent radical resection followed by anastomosis on the large intestine during 2003–2007. The following factors were assessed: age, gender, staging, protective stoma, neoadjuvant chemotherapy, neoadjuvant radiotherapy, adjuvant chemotherapy, adjuvant radiotherapy and anastomotic insufficiency. Complications were evaluated according to Clavien and Dindo classification.

Results: The analysis confirmed the following factors to be statistically significant for prognosis of OS and DFI: In stage T4 subjects, the risk of death was 2.5 x higher and the risk of recurrence was 1.9 x higher than in the lower disease stage subjects. The presence of N2 lymph node metastases increases the risk of death 3.7 x and the risk of recurrence 3.6 x, compared to N0 and N1 cases. The presence of postoperative complications classified as III–V, grade according to Clavien and Dindo classification increases the risk of death 4x. The risk of death was 5.5 x higher in patients with dehiscence of anastomosis. The surprising finding was that even protective stoma increases the risk of death 5.4 x. Patients who did not undergo adjuvant chemotherapy were at 2 x higher risk of death. In patients with IIIA, IIIB, IV, V complications, the following factors proved to be statistically significant for prognosis of OS: leakage, protective stoma, adjuvant chemotherapy and adjuvant oncological treatment. In patients with complications I and II, the following factors were proved to be statistically significant for prognosis of OS: staging and lymph nodes metastases. Multivariate analysis CART confirmed significant correlation between the lymph node positivity and the Clavien and Dindo classification of complications.

Conclusion: Analysis of clinical and histopathological factors is important for prediction of prognosis in patients with colorectal cancer after radical surgical treatment. Detection and application of these prognostic factors in postoperative period could influence the strategy of treatment and thus the overall survival in patients with radical resections for colorectal carcinoma. Non-administration of adjuvant chemotherapy results in a significant decrease in OS and DFI.

Key words: colorectal cancer – postoperative complication – Clavien-Dindo classification – overall survival – disease free interval – prognosis.

Rozhl Chir 2012;91:219–222

ÚVOD

Kolorektální karcinom (KRCa) lze považovat za celospolečenský problém. Patří mezi nejčastější nádory bez rozdílu pohlaví a věku. V určitých věkových skupinách je vůbec nejčastější malignitou. Každý rok je v České republice nově diagnostikováno v průměru 8000 nových případů a 5000 pacientů na tuto chorobu zemře [1].

Prognostické faktory KRCa lze rozdělit do tří skupin: 1. Faktory biologického chování nádoru. 2. Faktory pacientovy odpovědi na nádorové onemocnění. 3. Faktory ve vztahu k léčbě. Ve výsledku se prakticky jedná o kombinaci všech tří aspektů. Naše práce byla zaměřena na faktory, které souvisejí s léčbou. Rozhodujícím faktorem z hlediska prognózy je radikální operace a R0 odstranění nádoru. S tím samozřejmě úzce souvisejí faktory biologického chování nádoru. Jeho stadia, invazivity, přítomnosti vzdálených metastáz. Tyto faktory jsou nejlépe hodnotitelné dle TNM klasifikace. Dalším důležitým faktorem, který má podíl na výskytu hlavně lokální recidivy, je komplikovaný pooperační průběh ve smyslu infekčních komplikací při prosakování či dehiscenci anastomóz. [2].

Tyto komplikace mají jednak bezprostřední dopad ve formě těžkých sepsí někdy s ireverzibilním průběhem a úmrtím nemocného, a jednak dopad z hlediska dlouhodobé prognózy. Zjistilo se, že nemocní, kteří měli v pooperačním období zánětlivou komplikaci ve smyslu prosakování nebo dehiscence anastomózy, měli častější výskyt lokální recidivy a významně snížené celkové přežití [3, 4, 5, 6, 7, 8, 8, 10]. V literatuře jsme našli i práce, které tuto hypotézu nepotvrdily [11, 12, 13, 14].

Existuje několik teorií, které vysvětlují mechanismus důvodu vyššího výskytu lokálních recidiv a snížení celkového přežití nemocných při prosakování anastomóz. Jedna z teorií je výskyt životaschopných nádorových buněk v místě anastomózy [15, 16]. V případě prosakování se mohou tyto buňky dostat do okolí a způsobit recidivu onemocnění. Dále se na tomto mechanismu podílejí volně cirkulující nádorové buňky, které mohou být příčinou vzdálených metastáz, čímž dochází i ke snížení doby přežití [1, 17]. V případě infekce, která je způsobena prosakováním z anastomózy, může dojít k systémové zánětlivé odpovědi organismu a vyplenění zánětlivých cytokinů, které mohou změnit imunitu a podpořit růst zbytkových implantovaných nádorových buněk [18, 19]. Určitě se na horší prognóze u pacientů s prosakováním anastomózy podílí i ten fakt, že se významně prodlouží vlastní pooperační období, čímž dojde k pozdějšímu zahájení následné onkologické léčby. V některých případech z důvodu dlouhodobého pooperačního stonání není onkologická léčba ani zahajována.

Prosakování střevního obsahu anastomózou je poruchou zásadního významu. Klinický projev záleží na umístění anastomózy, na obsahu střeva, předoperační přípravě střeva, množství uniklého obsahu a možnostech

dutiny břišní stran schopnosti ohraničit tento infekční materiál. Větší únik střevního obsahu může vést k difúzní sterkorální peritonitidě, ke vzniku abscesu nebo píštěle. Řada prací prokázala, že k drobnému úniku může docházet až u 50 % anastomóz, ale klinicky se projeví jen asi v 5 %. Výskyt rentgenologicky prokázaných úniků podstatně převyšuje jejich počet zjištěný na základě klinických příznaků [20]. Hlavním faktorem, který ovlivňuje prosakování, popřípadě dehiscenci anastomózy, je výška anastomózy. Všechny anastomózy do 7 cm od análního okraje jsou vystaveny zvýšenému riziku prosakování a dehiscence. Dalšími faktory, které zvyšují riziko septické komplikace, jsou předoperační chemoterapie nebo radioterapie, mužské pohlaví, vyšší věk, abusus alkoholu a kouření, obezita, imunosuprese, podvýživa a diabetes mellitus [21, 22, 23]. Typ operace (laparoskopicky nebo otevřeně) a způsob šití (ručně nebo staple-rem) nemají žádný význam z hlediska rizikového faktoru. Naopak na snížení rizika dehiscence anastomózy mají podle některých autorů vliv mobilizace lienální flexury, J-pouch anastomóza a zakládání protektivních stomií u nízkých resekcí rekta [22, 23, 24].

Nejčastěji dochází k prosakování anastomóz v levé polovině tračnicku a rekta. Čím je anastomóza uložena distálněji, tím se zvyšuje riziko prosakování a dehiscenci anastomóz. Prosakování je definováno jako defekt integrity střevní stěny, který vede ke komunikaci mezi intra a extraluminálním prostorem. Pánevní absces v blízkosti anastomózy je taktéž považován za ohraničenou formu prosakování. Prosakování můžeme jako hlavní chirurgickou komplikaci z hlediska léčby rozdělit na tři stupně (Tab. 1).

Z důvodu srovnání výsledků a kvality léčby v roce 1992 vytvořil Clavien klasifikaci pooperačních komplikací, která měla 4 stupně. První stupeň komplikací byl alternativou k ideálnímu pooperačnímu průběhu. Druhý stupeň byly stavy život ohrožující, ale bez trvalých následků. Do druhého stupně patřily komplikace vyžadující chirurgickou intervenci. Třetí stupeň zahrnoval rozšíření chirurgické intervence nebo perzistující život ohrožující stavy. Poslední čtvrtý stupeň byla smrt jako následek pooperačních komplikací [25]. Tuto klasifikaci dále v roce 2004 rozpracoval Dindo. V současné době se tato klasifikace používá k obecnému popisu pooperačních komplikací (Tab. 2) [26, 27].

Klinický obraz prosakování nebo dehiscence je velmi pestrý. Mezi klinické příznaky patří subfebrilie až feбри-

Tab. 1: Rozdělení chirurgických komplikací z hlediska léčby
Tab. 1: Distribution of surgical complications according to their treatment

A	nevyžaduje aktivní terapeutickou intervenci
B	vyžaduje aktivní léčebný zásah, ale lze zvládnout bez laparotomie
C	vyžaduje re-laparotomii

Tab. 2: Clavien-Dindo klasifikace chirurgických komplikací
Tab. 2: Clavien-Dindo classification of surgical complications

Stupně	Definice
I.	Normální pooperační průběh bez potřeby farmakologické nebo chirurgické léčby, endoskopické nebo radiologické intervence. Možnost léčby: léky jako antiemetika, antipyretika, analgetika, diuretika, elektrolyty, fyzioterapie. Zahrnuje otevření rány pro infekci na lůžku.
II.	Stav vyžadující farmakologickou léčbu, jiné léky než jsou povolené u stupně I. Zahrnuje krevní transfuze a totální parenterální výživu.
III a.	Vyžadující chirurgickou, endoskopickou nebo radiologickou intervenci - bez nutnosti celkové anestezie.
III b.	Vyžadující chirurgickou, endoskopickou nebo radiologickou intervenci - v celkové anestezii.
IV a.	Život ohrožující komplikace včetně komplikací CNS (krvácení, ischemie mozku) vyžadující péči na jednotkách intenzivní péče, ARO + Selhání jednoho orgánu, zahrnuje i hemodialýzu.
IV b.	Život ohrožující komplikace včetně komplikací CNS (krvácení, ischemie mozku) vyžadující péči na jednotkách intenzivní péče, ARO + Multiorgánové selhání.
V.	Úmrtí
Přípona „d“	(for disability) V případě, že ke komplikacím dojde už po propuštění, se použije přípona k danému stupni postižení.

Tab. 3: Typické klinické charakteristiky pacientů s různými stupni závažnosti úniku z anastomózy
Tab. 3: Typical clinical characteristics of patients with various severity of anastomotic leakage

	Stupeň A	Stupeň B	Stupeň C
Klinický stav	Dobry	Středně závažné potíže	Těžká porucha
Klinické příznaky	ne	břišní/ pánevní bolesti febrilie hnisavý/sterkorální vaginální výtok (přstěl) zkalená/ hnisavá sekrece z konečníku	peritonitida septikémie/ sepse
Obsah z drénů	serózní zakalený nebo zahuštěný obsah	zakalený/ hnisavý (sterkorální)	sterkorální
Laboratorní testy	normální	leukocytóza, elevace CRP	leukocytóza, elevace CRP. v důsledku sepse leukopenie
Radiologické hodnocení	malý únik	prosakování anastomózy s pánevním abscesem	prosakování anastomózy s generalizovanou odpovědí, peritonitida
Specifická léčba	ne	antibiotika intervenční drenáž, transanální laváž, drenáž	re-laparotomie s kontrolou septického ložiska

lie, tachykardie, tachypnoe, citlivost nebo bolestivost břicha, peritonismus, elevace zánětlivých parametrů, zkalená, hnisavá, enterální nebo sterkorální sekrece z drénů, odchod plynů a zápach podél drénů, radiologický průkaz kolekce či nálezu plynu v okolí anastomózy [28]. V tabulce 3 jsou popsány charakteristické příznaky ke stupňům prosakování [29].

MATERIÁL A METODA

Do retrospektivní studie byli zařazeni pacienti, kteří byli léčeni na Chirurgické klinice FN Plzeň v letech 2003–2007. Podmínkou zařazení do této studie byla R0 reseke kolorektálního karcinomu s provedením anasto-

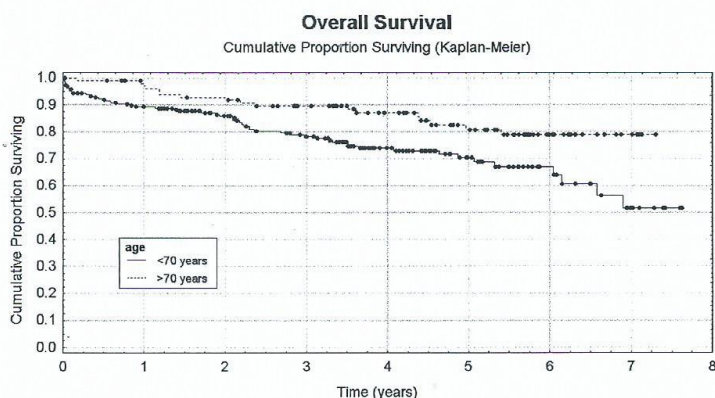
Tab. 4: Přehled operačních výkonů
Tab. 4: Summary of surgical procedures

Pravostranná hemikolektomie	111
Nízká přední resekce rekta double stapling	75
Resekce sigmatu	63
Resekce rektosigmatu	37
Levostranná hemikolektomie	18
Ostatní (resekce transversa, lienální flexury, iliocecální resekce, subtotální kolektomie, kolektomie)	36

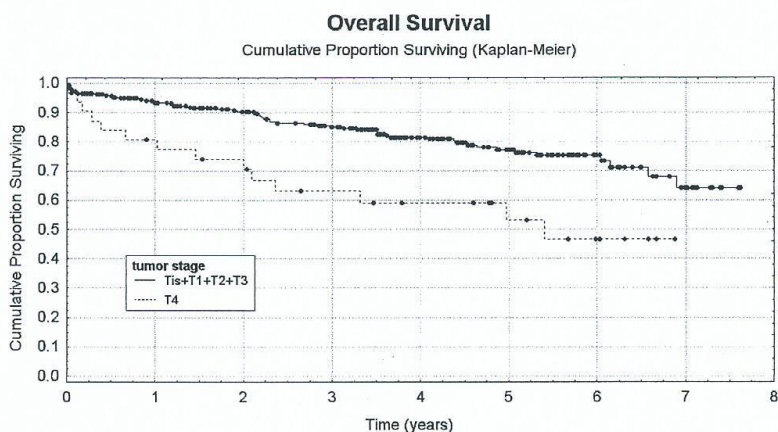
mózy. Tento soubor zahrnoval 340 pacientů, 207 mužů a 133 žen. Průměrný věk byl 69 let (32–91 let). Přehled výkonů uvádí Tab. 4.

Celkově zemřelo 64 nemocných, to znamená 18,8 % pacientů z našeho souboru. Bezprostředně na následky pooperačních komplikací zemřelo 5,8 % nemocných, 6,4 % nemocných zemřelo s odstupem 1–5 let na generalizaci zá-

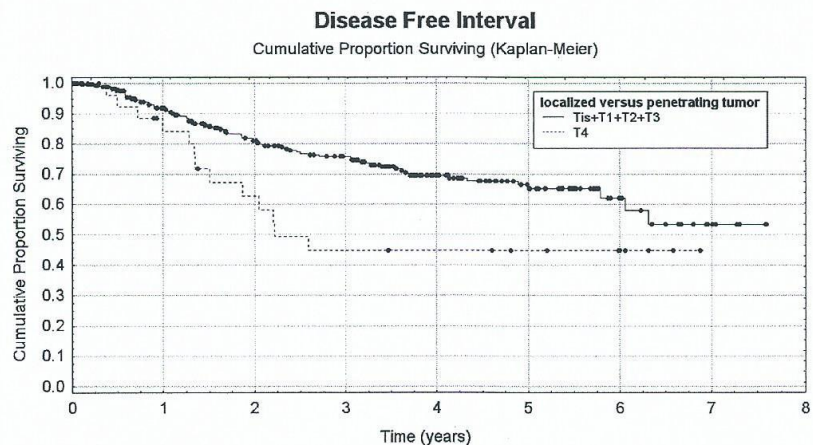
kladního onemocnění. Prokázaný leak z anastomózy mělo 12 pacientů (3,5 %). Celkové úmrtí v této skupině bylo 58,3 %. Na pooperační komplikace zemřeli 4 nemocní (33,3 %). Tři pacienti (25,0 %) zemřeli s odstupem 1–4 let na recidivu KRCa. Protektivní stomii mělo založeno 12 pacientů. U sedmi z nich byla stomie založena v rámci reoperace pro dehiscenci anastomózy. Adjuvantní chemoterapii podstoupilo 29,8 % nemocných z celého souboru 340 pacientů. Ve skupině pacientů s leakem byla pouze v jednom případě provedena adjuvantní onkologická léčba – radioterapie. Analýza celkového přežití (OS) a bezpříznakového přežití (DFI) ve vztahu ke studovaným faktorům byla zpracována pomocí Kaplan-Maierových křivek (LogRank test, Wilcoxon test). Byla provedena multivariační analýza CART zkoumaných faktorů s cílem identifikovat nejvýznamnější prognostické faktory recidivy (bepříznakového přežití) a celkového přežití nemocných. U spojitých proměnných bylo testováno několik vhodných cut off a za „optimální cut off“ byla prohlášena taková, u které



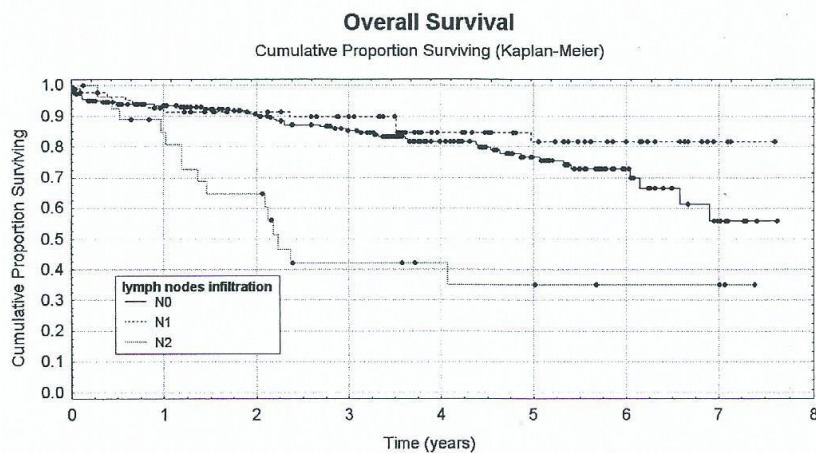
Graf 1: Věk jako rizikový faktor úmrtí, cut off 70 let
Graph 1: Age as a risk factor for death, cut off 70 years



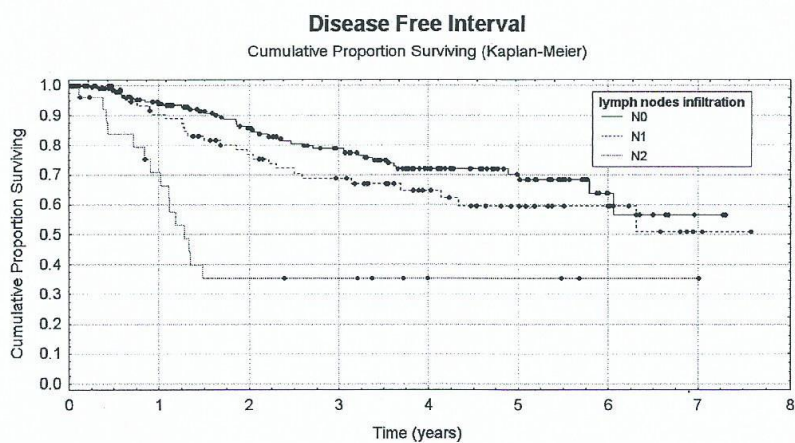
Graf 2: Lokální pokročilost nádoru jako rizikový faktor krátkého celkového přežití nemocných
Graph 2: Localmalignancy stage as a risk factor for short overall survival



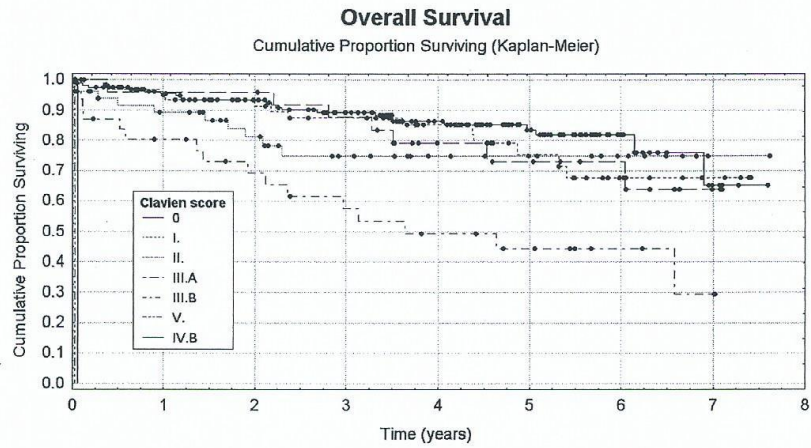
Graf 3: Lokální pokročilost nádoru jako rizikový faktor krátkého bezpříznakového přežití nemocných.
Graph 3: Local malignancy stage as a risk factor for short disease free interval



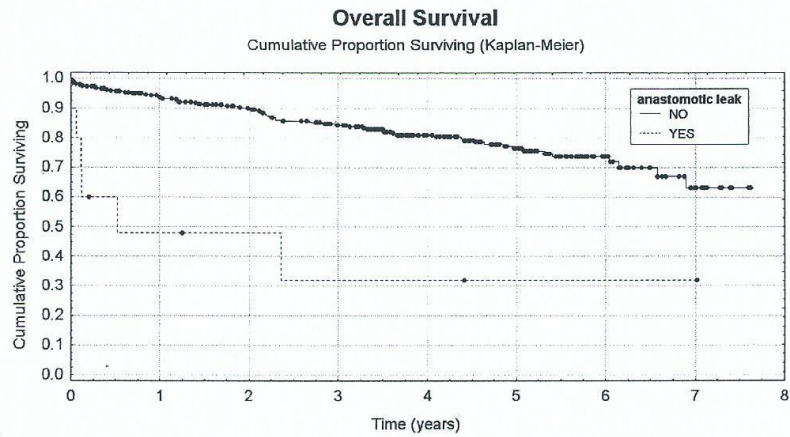
Graf 4: Uzlínové postižení jako rizikový faktor krátkého celkového přežití
Graph 4: Lymph nodes infiltration as a risk factor for short overall survival



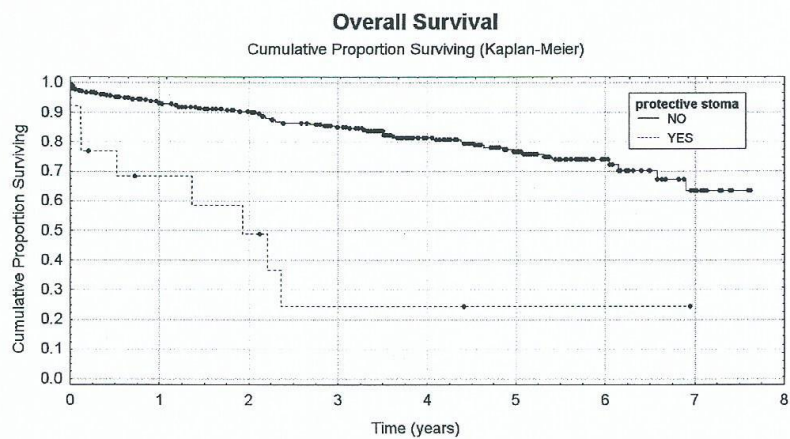
Graf 5: Uzlínové postižení jako rizikový faktor krátkého bezpříznakového přežití
Graph 5: Lymph nodes infiltration as a risk factor for short disease free interval



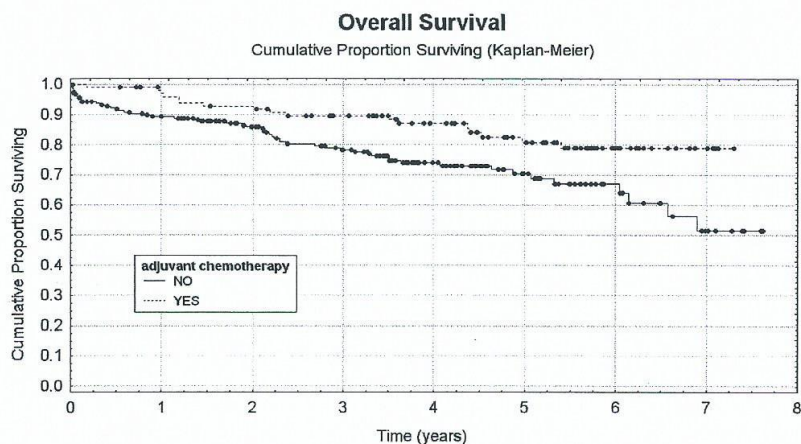
Graf 6: Pooperační komplikace hodnocené dle Claviena a Dinda jako rizikový faktor krátkého celkového přežití
Graph 6: Postoperative complications evaluated according to Clavien and Dindo classification as a risk factor for short overall survival



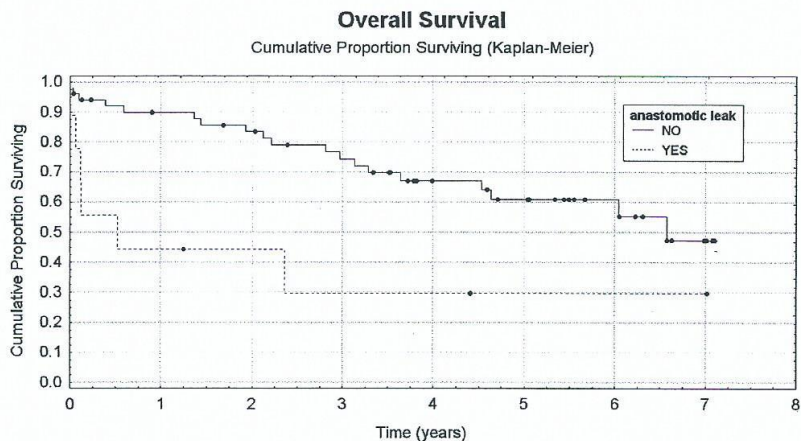
Graf 7: Leak z anastomózy jako rizikový faktor krátkého celkového přežití
Graph 7: Leakage from anastomosis as a risk factor for short overall survival



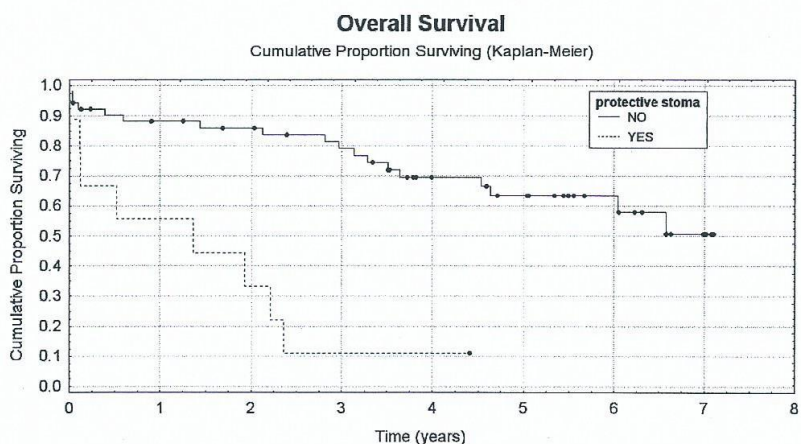
Graf 8: Význam protektivní stomie pro celkové přežití nemocných
Graph 8: Importance of protective stoma for overall survival



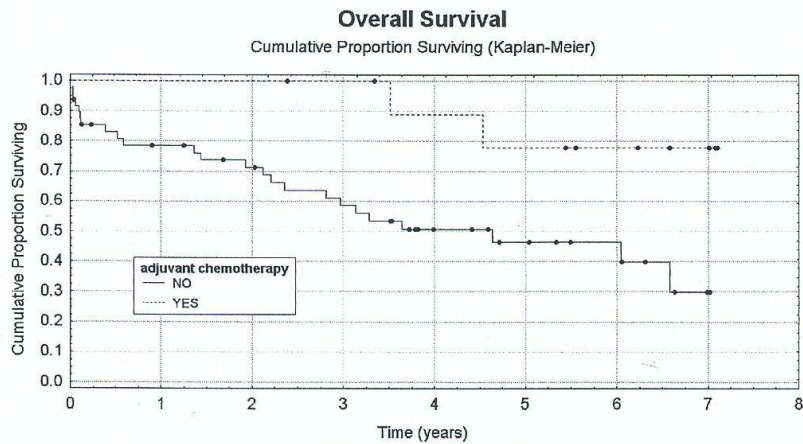
Graf 9: Adjuvantní chemoterapie jako prognostický faktor celkového přežití
Graph 9: Adjuvant chemotherapy as a prognostic factor for short overall survival



Graf 10: Leak z anastomózy jako rizikový faktor krátkého celkového přežití u skupiny pacientů s komplikacemi IIIA, IIIB, IV, V hodnocenými dle Claviena a Dinda
Graph 10: Leakage from anastomosis as a risk factor for short overall survival at the cohort of patients with Grade IIIA, IIIB, IV, V complications evaluated according to Clavien and Dindo

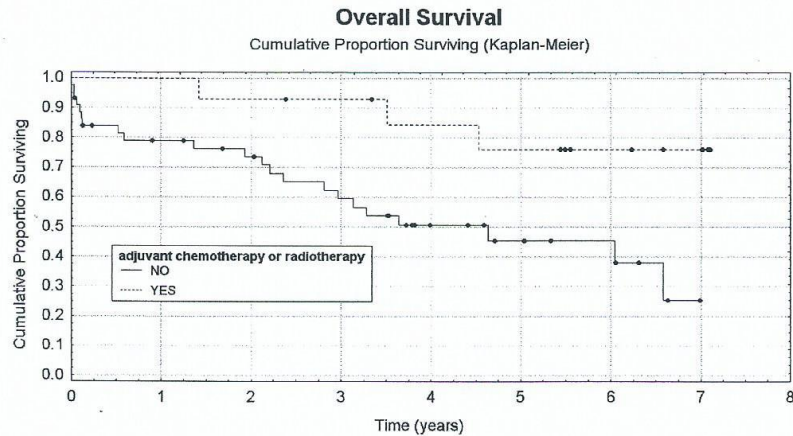


Graf 11: Význam protektivní stomie pro celkové přežití nemocných s komplikacemi IIIA, IIIB, IV a V hodnocenými dle Claviena a Dinda
Graph 11: Importance of protective stoma for overall survival in patients with Grade IIIA, IIIB, IV, V complications evaluated according to Clavien and Dindo



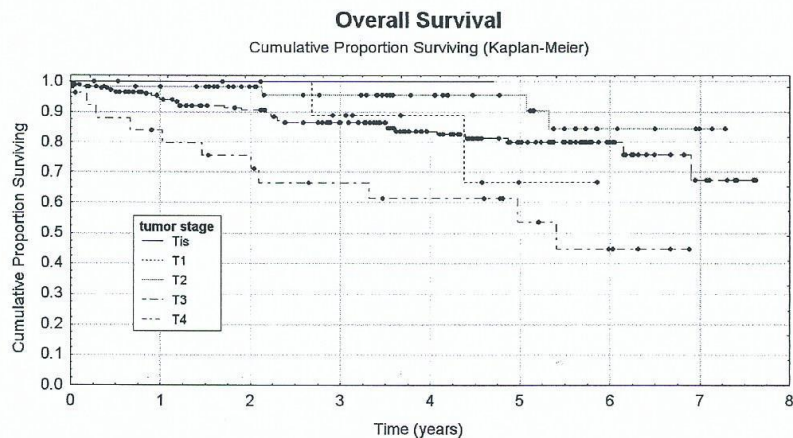
Graf 12: Adjuvantní chemoterapie jako prognostický faktor celkového přežití nemocných s komplikacemi IIIA, IIIB, IV a V hodnocenými dle Claviena a Dinda

Graph 12: Adjuvant chemotherapy as a prognostic factor for overall survival in patients with Grade IIIA, IIIB, IV, V complications evaluated according to Clavien and Dindo



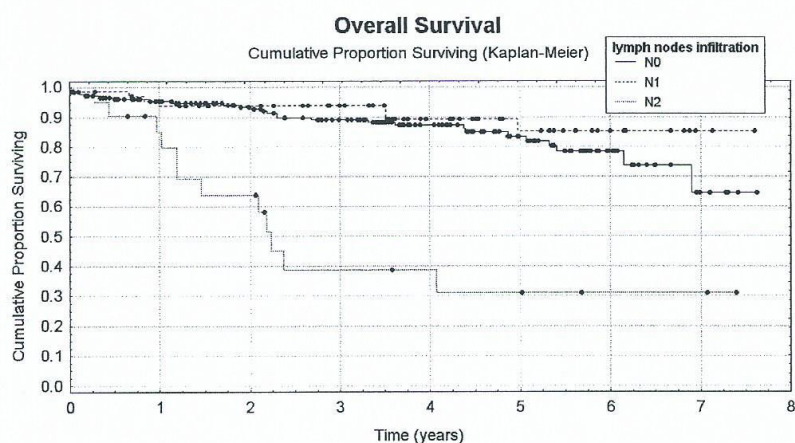
Graf 13: Adjuvantní chemoterapie nebo radioterapie jako prognostický faktor celkového přežití nemocných s komplikacemi IIIA, IIIB, IV a V hodnocenými dle Claviena a Dinda

Graph 13: Adjuvant chemotherapy or radiotherapy as a prognostic factor for overall survival in patients with Grade IIIA, IIIB, IV, V complications evaluated according to Clavien and Dindo



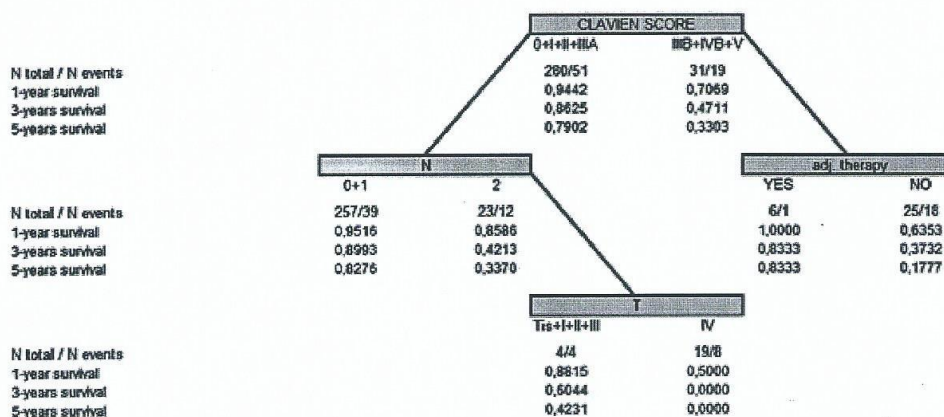
Graf 14: Lokální pokročilost primárního tumoru jako prognostický faktor celkového přežití ve skupině pacientů s komplikacemi I a II hodnocenými dle Claviena a Dinda

Graph 14: Local primary tumor stage as a prognostic factor for overall survival in a cohort of patients with Grade I and II complications, assessed according to Clavien and Dindo



Graf 15: Pozitivita lymfatických uzlin jako prognostický faktor celkového přežití ve skupině pacientů s komplikacemi I a II hodnocenými dle Claviena a Dinda

Graph 15: Positivity of lymph nodes as a prognostic factor for overall survival in a cohort of patients with Grade I and II complications according to Clavien and Dindo



Graf 16: Multivariální analýzou CART celého souboru nemocných byly prokázány silné vztahy k endpointu (nižší celkové přežití) u kombinace pozitivitu lymfatických uzlin, Clavienova hodnocení komplikací a lokálního rozsahu tumoru

Graph 16: Multivariate analysis CART of the whole group of patients confirmed strong correlation between the end point (short overall survival) and the combination of the following factors: positivity of lymph nodes, Clavien evaluation of complications and local primary tumor stage

byla v Coxově regresním modelu nalezena nejvyšší statistická signifikace. Rozdíly v přežití mezi zkoumanými skupinami byly testovány pomocí Log-rank testu. U nemocných jsme sledovali věk, staging onemocnění, uzlinové postižení, podání adjuvantní chemoterapie, pooperační komplikace a vliv těchto faktorů na celkové a bezpříznakové přežití.

VÝSLEDKY

Provedená statistická analýza při hladině významnosti p -value $< 0,05$ prokázala věk nad 70 let, pokročilost KRCa (ve smyslu pokročilého stágu onemocnění), pooperační komplikace, protektivní stomii a nepodání adjuvantní chemoterapie jako prognosticky vý-

znamné negativní faktory celkového přežití. Pacienti starší 70 let měli 1,7krát větší riziko úmrtí (Graf 1). Nemocní se stadiem T4 měli 2,5krát vyšší riziko úmrtí než nemocní s nižšími stadii malignity (Graf 2) a 1,9krát vyšší riziko recidivy (Graf 3). Při uzlinovém postižení N2 měli nemocní 3,7krát vyšší riziko úmrtí než nemocní s N0 a N1 uzlinovým postižením (Graf 4) a 3,6krát vyšší riziko recidivy malignity (Graf 5). Přítomnost pooperační komplikace III.–V. stupně podle Clavienovy klasifikace zvyšovala riziko úmrtí 4krát (Graf 6). Nemocní s dehiscencí anastomózy měli 5,5krát vyšší riziko úmrtí (Graf 7). Překvapivě i přítomnost protektivní stomie zvyšovala riziko úmrtí 5,4krát (Graf 8). V případě nepodání adjuvantní chemoterapie se riziko úmrtí zvýšilo 2krát (graf 9). U pacientů s komplikacemi IIIA, IIIB, IV a V hodnocených

na základě stupnice dle Clavienu a Dinda byly statisticky významné pro celkové přežití tyto parametry: leak (Graf 10), protektivní stomie (Graf 11), adjuvantní chemoterapie (Graf 12) a adjuvantní léčba (chemoterapie nebo radioterapie)(Graf 13). U pacientů s komplikacemi I a II byla statistická významnost prokázána u rozsahu primárního tumoru (Graf 14) a pozitivitu lymfatických uzlin (Graf 15). Multivariační analýzou CART celého souboru nemocných byly prokázány silné vztahy k endpointu (kratší celkové přežití a smrt) u kombinace pozitivitu lymfatických uzlin a Clavienova hodnocení komplikací (Graf 16).

DISKUZE

Výsledky naší studie potvrdily některé prognostické faktory uváděné v literatuře a dále i nová zjištění, která mohou přinést další pohled na léčbu a pooperační péči o nemocné po radikální operaci KRCa s primárně prováděnou anastomózou. Prokázali jsme, že vyšší věk, pokročilé stadium KRCa a pooperační komplikace mají prognosticky negativní vliv na délku celkového přežití. Z hlediska dlouhodobého přežívání jsou naše výsledky ve shodě s předchozími literárními zdroji, jejichž autoři prokázali snížení celkového přežití u nemocných s komplikacemi v oblasti anastomózy, ať už se jedná o leak nebo dehiscenci anastomózy [3, 4, 5, 6, 7, 9,10]. Otázkou zůstává vysvětlení tohoto zjištění. Tento proces je někdy vysvětlován jako nestandardní imunitní odpověď organismu na zánětlivou pooperační komplikaci, čímž může docházet k mikroskopickému šíření buněk nádoru do okolí a vzdálených orgánů. Další příčinou může být ve většině případů výskytu anastomotického leaku následná absence adjuvantní chemoterapie nebo její odložená aplikace. Profit nemocných z adjuvantní onkologické léčby je prokázán. Indikace a zahájení adjuvantní chemoterapie je individuální. Většina onkologických pracovišť se snaží o zahájení adjuvantní chemoterapie do 8 týdnů od operace. V literatuře je i statisticky prokázán profit nemocných, kteří začali adjuvantní chemoterapii i po 8–10 týdnech od operace [30]. Jiný přístup je u adjuvantní radioterapie, která může být zahájena i několik měsíců po operaci. Tato korelace s podáním nebo nepodáním adjuvantní chemoterapie byla patrná i v našem souboru. Nepodání adjuvantní onkologické léčby zvyšovalo riziko úmrtí 2krát. Zajímavým výsledkem byl prognosticky negativní vliv protektivních stomií, které zvyšovaly riziko úmrtí 5,4krát. Na základě těchto poznatků se domníváme, že příčinou negativního charakteru prognostického faktoru protektivní stomie – je fakt, že většinou byly tyto stomie zakládány z důvodu pooperačních chirurgických komplikací a dalším důvodem je absence následné adjuvantní chemoterapie, která byla vyloučena z důvodů dalších komorbidit, jak vyplývá z podrobné analýzy našeho souboru.

ZÁVĚR

Analýza klinicko-patologických faktorů je důležitá pro predikci prognózy pacientů s kolorektálním karcinomem po jejich radikální léčbě. Pacienti hodnocení na základě časných pooperačních klinických příznaků mohou poukázat na ne zcela manifestní dehiscenci střevních anastomóz. Sledování a zohledňování těchto prognostických faktorů v pooperačním období může ovlivnit strategii léčby a tím i celkové přežívání nemocných po radikální resekci kolorektálního karcinomu. Nepodání adjuvantní chemoterapie významně snižuje celkové a bezpříznakové přežití.

Poděkování:

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 12025.

LITERATURA

1. Pitule P, Liška V, Třeška V, Novák P, Čedíková M, Kralíčková M. Přínos molekulární biologie k diagnostice a léčbě kolorektálního karcinomu – současnost a budoucnost. *Rozhl Chir* 2011;90:315–32.
2. Lipská L, Visokai V. et al. Recidiva kolorektálního karcinomu, Grada Publishing, 2009:120–121.
3. Miccini M, Borghese O, Scarpini M, Cassini D, Gregori M, Amore Bonapasta S, Tocchi A. Anastomotic leakage and septic complications: impact on local recurrence in surgery of low rectal cancer. *Ann Ital Chir* 2011;82(2):117–23.
4. Mirnezami A, Mirnezami R, Chandrakumaran K, Sasapu K, Sagar P, Finan P. Increased local recurrence and reduced survival from colorectal cancer following anastomotic leak: systematic review and meta-analysis. *Ann Surg* 2011;253(5):890–9.
5. Law WL, Choi HK, Lee YM, Ho JW, Seto CL.: Anastomotic leakage is associated with poor long-term outcome in patients after curative colorectal resection for malignancy. *J Gastrointest Surg* 2007;11(1):8–15.
6. Law WL, Choi HK, Lee YM, Ho JW. The impact of postoperative complications on long-term outcomes following curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14(9):2559–66. Epub 2007 May 24.
7. Chang SC, Lin JK, Yang SH, Jiang JK, Chen WC, Lin TC. Long-term outcome of anastomosis leakage after curative resection for mid and low rectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2003;50(54):1898–902.
8. Petersen S, Freitag M, Hellmich G, Ludwig K. Anastomotic leakage: impact on local recurrence and survival in surgery of colorectal cancer. *Int. J. Colorect Dis* (1998);13:160–163.
9. Branagan G. Prognosis after anastomotic leakage in colorectal Surgery. *Dis Colon Rectum* 2005;48:1021–1026.
10. McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ. Impact of anastomotic leakage on long-term survival of patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Surg.* 2005 Sep;92(9):1150–4.
11. Bertelsen CA, Andreassen AH, Jørgensen T, Harling H. Danish Colorectal Cancer Group: Anastomotic leakage after curative anterior resection for rectal cancer: short and long-term outcome. *Colorectal Dis* 2010;12(7 Online):e76–81. Epub 2009 Apr 29.
12. Kressner U, Graf W, Mahteme H, Pählman L, Glimelius B. Septic complications and prognosis after surgery for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2002;45(3):316–21.
13. Lee WS, Yun SH, Roh YN, Yun HR, Lee WY, Cho YB, Chun HK. Risk factors and clinical outcome for anastomotic leakage after total mesorectal excision for rectal cancer. *World J Surg* 2008;32(6):1124–9.

14. Jörgren F, Johansson R, Damber L, Lindmark G. Anastomotic leakage after surgery for rectal cancer: a risk factor for local recurrence, distant metastasis and reduced cancer-specific survival? *Colorectal Dis* 2011;13(3):272–83. doi: 10.1111/j.1463-1318.2009.02136.x.
15. Van den Tol PM, van Rossen EE, van Eijck CH, Bonthuis F, Marquet RL, Jeekel H. Reduction of peritoneal trauma by using nonsurgical gauze Leeds to less implantation metastasi sof spilled tumor cells. *Ann Surg* 1998;227:242–248.
16. Umpleby HC, Fermor B, Symes MO, Williamson RC. Viability of exfoliated colorectal carcinoma cells. *Br J Surg* 1984;71:659–663.
17. Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sreter L, Tulassay Z. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001;7:4080–4085.
18. Mc Millan DC, Canna K, McArdle CS. Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. *Br J Surg* 2003;90:215–219.
19. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Wirschow. 2001;357,539–545.
20. Hoch J. Akutní chirurgie tlustého střeva, Maxdorf, 1998:106–107.
21. Moran BJ. Predicting the risk and diminishing the consequences of anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer. *Acta Chir Jugosl* 2010;57(3):47–50.
22. Taflampas P, Christodoulakis M, Tsiptsis DD. Anastomotic leakage after low anterior resection for rectal cancer: facts, obscurity, and fiction. *Surg Today* 2009;39(3):183–8. Epub 2009 Mar 12.
23. Cong ZJ, Fu CG, Wang HT, Liu LJ, Zhang W, Wang H. Influencing factors of symptomatic anastomotic leakage after anterior resection of the rectum for cancer. *World J Surg* 2009;33(6):1292–7.
24. Feng C, Yao RQ, Huang FZ, Nie WP, Liu XY. Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2011;31(5):908–10.
25. Clavien PA, Sanabria JR, Strasberg SM. Proposed classification of complications of surgery with examples of utility in cholecystectomy. *Surgery* 1992;111:518–26.
26. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with valuation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 2004;240(2):205–13.
27. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, Vauthey JN, Dindo D, Schulick RD, de Santibañes E, Pekolj J, Slankamenac K, Bassi C, Graf R, Vonlanthen R, Padbury R, Cameron JL, Makuuchi M.: The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. *Ann Surg* 2009;250(2):187–96.
28. Lipska MA, Bissett IP, Parry BR, Merrie AE. Anastomotic leakage after lower gastrointestinal anastomosis: men are at a higher risk. *ANZ J Surg* 2006;76:579–85.
29. Rahbari N, Weitz J, Hohenberger W, Heald JR, Moran B, Ulrich A. Definition and grading of anastomotic leakage following anterior resection of the rectum: A proposal by the International Study Group of Rectal Cancer Surgery 2010;147:339–51.
30. Czaykowski PM, Gill S, Kennecke HF, Gordon VL, Turner D. Adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer: does timing matter? *Dis Colon Rectum* 2011;54(9):1082–9.

*MUDr. Petr Novák
Hronnice 204
330 11 Hronnice, p. Třemošná
e-mail: novakp@fnplzen.cz*